

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN BAKTERİYAL SELÜLOZ
ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**Kübra ERÇALIŞKAN
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Kıymet GÜVEN**

BİLECİK, 2017

Ref.No: 10157672



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

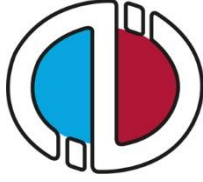
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN BAKTERİYAL SELÜLOZ
ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**Kübra ERÇALIŞKAN
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Kıymet GÜVEN**

BİLECİK, 2017



ANADOLU UNIVERSITY



**BILECIK SEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics**

**ISOLATION AND CHARACTERISATION OF
BACTERIAL CELLULOSE PRODUCING BACTERIA
FROM DIFFERENT SOURCES**

**Kübra ERÇALIŞKAN
Master's Thesis**

**Thesis Advisor
Prof. Dr. Kıymet GÜVEN**

BILECIK, 2017



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 14/06/2017..tarih ve ..31..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/07/2017.....tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra ERGALIŞKAN.....'ın "Gesitli Kaynaklardan Bakteriyel Salıyaz Üreten Bakterilerin... İzolasyonu... ve..." başlıklı tez çalışması Matematik, Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

ÜYE : Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

ÜYE : Doç. Dr. Dilek ÜNAL

Pencere Ek

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve desteğiyle yol gösterip her konuda yardımcı ve yol gösterici olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN' e en içten şekilde teşekkür ederim.

Laboratuvara girdiğim ilk günden beri tecrübesini ve bilgisini paylaşan, anlayışla sürekli yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen ve bana vakit ayıran değerli hocalarıma; FTIR analizi için Prof. Dr. Alaettin GÜVEN'e, SEM ve XRD analizleri için Yrd. Doç. Dr. Meryem Türkay AYTEKİN AYDIN'a, Kimya laboratuvarı alet ve ekipmanlarını kullanmamdaki yardımları için Doç. Dr. İlker AVAN'a, element analizi için Yrd. Doç. Dr. Emel ERMİŞ'e ve ribotiplendirme analizi için Uzm. Erdoğan ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her konuda yardımcı olan ve manevi desteğini sürekli gösteren yüksek lisans dönem arkadaşım, laboratuvar partnerim Ozan SAVAŞAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan başta Alper DEDE olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde her koşulda yanımda olan ve sevgilerini, emeklerini, fedakarlıklarını esirgemeyen, yüksek lisansım boyunca da maddi ve manevi desteğini sürekli gösteren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Kübra ERÇALIŞKAN

Temmuz, 2017

ÖZET

Bakteriyal selüloz, bitkisel selüloza alternatif olarak üretilen, başta tıbbi uygulamalar olmak üzere birçok uygulama alanı olan ve hala geliştirilmeye çalışılan bir biyopolimerdir. Bu çalışmada sirke çeşitleri kullanılarak selüloz üreten asetik asit bakterileri izole edilmiştir ve selüloz üretim verimi en yüksek olan üç izolat seçilmiştir. Bu üç izolat elma ve üzümünden yapılmış karışık sirkeden izole edilmiş olup, izolatların identifikasyonu için hem geleneksel yöntemler hem de 16S rDNA dizi analizi yapılmıştır. H4 (*Komagataeibacter intermedius*), HM3 (*Komagataeibacter xylinus*) ve M2 (*Komagataeibacter xylinus*) izolatları ile hem statik kültürde hem de çalkalamalı kültürde bakteriyal selüloz üretimi yapılmıştır, selüloz örneklerinin spesifik ürün verim katsayısı ve su tutma kapasiteleri incelenmiş ve taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri elde edilmiştir. Statik kültürde üretilen selüloz örneğinin Element Analizi, CP/MAS 13C katı NMR, TGA, FT-IR ve XRD analizleri ile karakteristik özellikleri belirlenmiş ve kullanıma uygun bulunmuştur. Bu çalışma, *Komagataeibacter intermedius* bakterisiyle selüloz üretimi ve karakterizasyonu konusunda ülkemizdeki ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyal selüloz; Asetik asit bakterisi; Fermentasyon; *Komagataeibacter intermedius*; *Komagataeibacter xylinus*

ABSTRACT

Bacterial cellulose, as an alternative to plant based cellulose, is a polymer which is still trying to be improved while it has many applications including medical practices foremost. In this study, different varieties of vinegar has been used to isolate acetic acid bacteria that produces cellulose and three highest producers of cellulose have been chosen. These three isolates have been isolated from apple and grape mixed vinegar. Identification of these organisms were carried out both conventional methods and 16S rDNA gene sequencing analyses. Isolates H4 (*Komagataeibacter intermedius*), HM3 (*Komagataeibacter xylinus*) and M2 (*Komagataeibacter xylinus*) were used to produce bacterial cellulose in both static and shaken culture. Specific product yield coefficient and water holding capacity of cellulose samples was examined. Scanning Electron Microscope (SEM) photographs were obtained. In addition, the cellulose samples produced in the static culture were characterized by Elemental Analysis, CP/MAS ¹³C solid NMR, TGA, FT-IR and XRD analyses. All of the cellulose samples were found to be convenient to use. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter intermedius* and characterisation of the cellulose is the first report of Turkey.

Keywords: Bacterial cellulose; Acetic acid bacteria; Fermentation; *Komagataeibacter intermedius*; *Komagataeibacter xylinus*

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karbohidratlar	2
2.2. Bakteriyal Ekstrasellular Polisakkaritler	7
2.3. Bakteriyal Selüloz	8
2.3.1. Bakteriyal selülozun yapısı.....	8
2.3.2. Bakteriyal selülozun özellikleri	14
2.4. Bakteriyal Selüloz Sentezleyen Mikroorganizmalar	15
2.4.1. Asetik asit bakterileri, kaynaklardan izolasyonu ve sınıflandırılması	16
2.5. Bakteriyal Selülozun Biyosentezi	21
2.6. Bakteriyal Selüloz Üretim Yöntemleri	23
2.6.1. Statik kültür.....	23
2.6.2. Çalkalamalı kültür.....	24
2.6.3. Fermentör çeşitleri	26
2.6.4. Sürekli kültür	27
2.7. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması	27
2.8. Bakteriyal Selüloz Üretimine Etki Eden Faktörler.....	28
2.8.1. Karbon kaynağı.....	29
2.8.2. Azot kaynağı	29
2.8.3. Sıcaklık	29
2.8.4. pH.....	30
2.8.5. Çözünmüş oksijen.....	30
2.9. Bakteriyal Selülozun Uygulama Alanları.....	30
2.9.1. Tıbbi alanda uygulamaları	31
2.9.2. Gıda endüstrisinde uygulamaları	33

2.9.3. Kağıt endüstrisinde uygulamaları	34
2.9.4. Diğer genel kullanım alanları	35
3. LİTERATÜR ÖZETİ	37
4. MATERYAL VE METOTLAR	38
4.1. Materyal.....	38
4.1.1. Örnekler	38
4.1.2. Besiortamları.....	38
4.1.2.1. HS broth	38
4.1.2.2. HS agar.....	39
4.1.2.3. HSM (modifiye besiortamı)	39
4.1.2.4. Mannitol agar	40
4.1.2.5. Kalsiyum karbonat(CaCO ₃)-Etanol besiortamı.....	40
4.1.2.6. Bromcresol green'li besiortamı.....	41
4.1.2.7. Nutrient broth	41
4.1.2.8. Nutrient agar.....	41
4.1.2.9. Karbohidrat fermentasyon ortamları	42
4.1.2.10. Tripton broth	42
4.1.2.11. Nutrient jelatin	42
4.1.2.12. Nitrat broth	42
4.1.2.13. Triptoz fosfat broth	43
4.1.2.14. Triptoz fosfat agar	43
4.1.3. Kullanılan çözeltiler.....	43
4.1.3.1. Fizyolojik tuzlu su.....	43
4.1.3.2. %20'lik gliserol çözeltisi.....	44
4.1.3.3. α-Naftol çözeltisi.....	44
4.1.3.4. Sülfanilik asit çözeltisi	44
4.1.3.5. Kovaks ayırıcı.....	44
4.1.3.6. % 3'lük H ₂ O ₂	44
4.1.3.7. % 1'lik Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisi.....	45
4.1.3.8. % 5'lik Fenol çözeltisi	45
4.1.3.9. % 97'lik H ₂ SO ₄	45
4.1.3.10. 10-100µg/ml'lik Glukoz standart çözeltileri	45
4.1.3.11. % 4'lük NaOH çözeltisi	45
4.1.3.12. % 6'lük Asetik asit çözeltisi.....	45

4.1.3.13. TE tamponu	46
4.1.3.14. Solüsyon I çözeltisi	46
4.1.3.15. P:C:I (25:24:1) çözeltisi	46
4.1.3.16. Sodyum asetat çözeltisi	46
4.1.3.17. İsoopropanol.....	46
4.1.3.18. % 70'lik Etil alkol	46
4.1.3.19. RNase çözeltisi.....	47
4.1.3.20. % 1'lik Agaroz jel çözeltisi.....	47
4.1.3.21. 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) buffer.....	47
4.1.4. Kullanılan boyalar.....	47
4.1.4.1. Kristal viyoleto boyası	47
4.1.4.2. Safranin boyası.....	47
4.1.4.3. İyodür (lugol) çözeltisi.....	48
4.1.4.4. % 5'lik Malasit yesili boya çözeltisi	48
4.2. Metotlar	48
4.2.1. Bakteri izolasyonu	48
4.2.2. Bakteriyal selüloz üreten asetik asit bakterilerinin seçilmesi	49
4.2.3. İzolatların tanımlanması	49
4.2.3.1. Kültürel özellikler	49
4.2.3.2. Morfolojik testler	50
4.2.3.3. Biyokimyasal testler.....	50
4.2.4. Bakteriyal selülozun üretimi, saflaştırılması ve üretim miktarının belirlenmesi	52
4.2.5. Bakteriyal selülozun su tutma kapasitesinin belirlenmesi	52
4.2.6. Hücre kuru ağırlığının belirlenmesi.....	53
4.2.7. Bakteriyal selülozun spesifik ürün verimi katsayısının belirlenmesi	53
4.2.8. Bakteriyal selülozda toplam şeker analizi	53
4.2.9. Bakteriyal selülozun SEM (taramalı elektron mikroskop) analizi.....	54
4.2.10. Bakteriyal selülozun element analizi	54
4.2.11. Bakteriyal selülozun CP/MAS 13C katı NMR analizi	54
4.2.12. Bakteriyal selülozun termo-gravimetrik (TG) analizi	54
4.2.13. Bakteriyal selülozun FT-IR analizi.....	54
4.2.14. Bakteriyal selülozun XRD analizi	55
4.2.15. Ribotiplendirme	55
4.2.16. 16S rRNA sekans analizi	55

4.2.16.1. Genomik DNA ekstraksiyonu	55
4.2.16.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve 16S rRNA genlerinin dizi analizleri ...	56
5. BULGULAR	58
5.1. Morfolojik Özellikler.....	58
5.2. Kültürel Özellikler.....	59
5.3. Biyokimyasal Özellikler	60
5.4. Bakteriyal Selüloz Üretimi	62
5.5. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve Kurutulması	62
5.6. Bakteriyal Selülozun Üretim Miktarı	65
5.7. Bakteriyal Selülozun Su Tutma Kapasitesi	65
5.8. Hücre Kuru Ağırlığı ve Üretim Farklılığına Göre Değişimi	66
5.9. Bakteriyal Selülozun Spesifik Ürün Verim Katsayısı	67
5.10. Toplam Şeker Analizi.....	68
5.11. Bakteriyal Selülozun SEM (Scanning Elektron Mikroskop) Görüntüleri.....	70
5.12. Bakteriyal Selülozun Element Analizi	73
5.13. Bakteriyal Selülozun CP/MAS ¹³ C Katı NMR Analizi.....	73
5.14. Bakteriyal Selülozun TG Analizi	76
5.15. Bakteriyal Selülozun FT-IR Analizi.....	78
5.16. Bakteriyal Selülozun XRD Analizi	82
5.17. 16S rRNA Sekans Analizi	85
5.17.1. Genomik DNA ekstraksiyonu.....	85
5.17.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve 16S rRNA genlerinin dizi analizleri.....	85
5.18. Ribotiplendirme.....	87
6. TARTIŞMA	88
7. SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR	98
EKLER.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2. 1. Bakteriyal selüloz üreten bazı mikroorganizmalar ve ürettikleri selülozun yapısı.....	16
Çizelge 2. 2. Asetik asit bakterilerinin genel özellikleri.....	17
Çizelge 2. 3. AAB'nin sınıflandırılması.....	20
Çizelge 2. 4. Bakteriyal selüloz üretiminde kullanılan reaktörler ve karşılaştırılması...26	26
Çizelge 3. 1. Bakteriyal selülozla ilgili çalışmalarda alınan bazı patentler.....	36
Çizelge 4. 1. Çalışmada kullanılan örnekler, kaynaklar ve izolat sayıları.....	39
Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılan primerler.....	57
Çizelge 5.1. H4, HM3 ve M2 izolatlarının tanımlanmasında kullanılan taksonomik özellikler.....	61
Çizelge 5. 2. Statik koşullarda üretilen BS yaş ve kuru ağırlığı.....	65
Çizelge 5. 3. Çalkalamalı koşullarda üretilen BS yaş ve kuru ağırlığı.....	65
Çizelge 5. 4. Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen BS su tutma kapasiteleri.....	66
Çizelge 5. 5. Statik koşullardaki fermentasyon sonucunda elde edilen hücre kuru ağırlıkları.....	66
Çizelge 5. 6. Çalkalamalı koşullardaki fermentasyon sonucunda elde edilen hücre kuru ağırlıkları.....	67
Çizelge 5. 7. Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen BS verim değerleri.	67
Çizelge 5. 8. 10-100 µg /ml aralığındaki standart glukoz çözeltilerinin 470 nm'de okunan absorban değerleri.	68
Çizelge 5. 9. İzolatların ürettiği bakteriyal selüloz miktarı ve selülozların toplam şeker miktarı.....	69
Çizelge 5. 10. Bakteriyal selüloz örneklerinin element analiz sonuçları.....	73
Çizelge 5. 11. H4, HM3 ve M2 izolatlarının dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2. 1. Selülozun sentezi	6
Şekil 2. 2. Selüloz zincirinin kimyasal yapısı	9
Şekil 2. 3. Selüloz fibriler yapısı.....	10
Şekil 2. 4. Bakteriyal selüloz (a) ve bitkisel selüloz (b) yapısı.....	11
Şekil 2. 5. a) Bakteriyal selülozun iç zincirindeki hidrojen bağları b) Bakteriyal selülozun dış zincirindeki hidrojen bağları.....	12
Şekil 2. 6. Durgun kültürde bakteriyal selüloz oluşumu.....	14
Şekil 2. 7. Çalkalamalı kültürlerde bakteriyal selüloz oluşumu	14
Şekil 2. 8. Ga. xylinum'da karbon metabolizması	22
Şekil 2. 9. Statik kültür (a) ve çalkalamalı kültür (b) ile üretilen bakteriyal selülozun SEM görüntüleri	24
Şekil 2. 10. BASYC®-farklı çaplara, farklı çeper kalınlıklarına ve farklı uzunluklara sahip tüpler	31
Şekil 2. 11. Yanık bir ele mikrobiyal selüloz uygulanması	32
Şekil 2. 12. Mikrobiyal selülozdan oluşan dokunmamış ürünler.....	35
Şekil 5. 1. <i>Komagataeibacter intermedius</i> straininin Gram boyama görüntüsü.....	59
Şekil 5. 2. HSM agar'da <i>Komagataeibacter xylinus</i> koloni gelişimi.....	59
Şekil 5. 3. Kalsiyum karbonat (CaCO ₃)-Etanol Agar'da <i>Komagataeibacter xylinus</i> 'un oluşturduğu zon görüntüsü.....	60
Şekil 5. 4. Statik kültürle <i>Komagataeibacter intermedius</i> 'un (H4) ürettiği bakteriyal selülozun, HS besiyerinin üst yüzeyinde oluşumu.....	62
Şekil 5. 5. Statik kültürle üretilen yaş bakteriyal selüloz (H4 ve M2 örnekleri) tabakası	63
Şekil 5. 6. Çalkalamalı kültürle <i>Komagataeibacter intermedius</i> 'un ürettiği yaş bakteriyal selüloz (H4).	63
Şekil 5. 7. Saflaştırılmış bakteriyal selülozun liyofilizatörde kurutulması.....	64
Şekil 5. 8. 80°C'de kurutulmuş <i>Komagataeibacter intermedius</i> 'un ürettiği saf bakteriyal selülozun (H4) görüntüsü.	64

Şekil 5. 9. Toplam şeker analizi için 470 nm dalga boyundaki değerlerden elde edilen standart eğri	69
Şekil 5. 10. Çalkalamalı kültürle üretilen bakteriyal selüloz SEM görüntüsü (x20000).	70
Şekil 5. 11. Statik kültürle üretilen BS SEM görüntüsü (x 20000).....	71
Şekil 5. 12. Çalkalamalı kültürle üretilen BS SEM görüntüsü (x 50000).....	71
Şekil 5. 13. Statik kültürle üretilen BS SEM görüntüsü (x 50000).....	72
Şekil 5. 14. Statik kültürle üretilen BS SEM görüntüsü (x 2000).....	72
Şekil 5. 15. Selülozun altı karbonlu genel yapısı.....	73
Şekil 5. 16. H4 numaralı BS örneğinin CP/MAS ¹³ C katı NMR analizi sonucu.....	74
Şekil 5. 17. HM3 numaralı BS örneğinin CP/MAS ¹³ C katı NMR analizi sonucu.	74
Şekil 5. 18. M2 numaralı BS örneğinin CP/MAS ¹³ C katı NMR analizi sonucu.	75
Şekil 5. 19. I _α oranı fazla olan ve I _β oranı fazla olan selülozun CP/MAS ¹³ C katı NMR analiz sonucu farkı	75
Şekil 5. 20. H4 bakteriyal selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.....	77
Şekil 5. 21. HM3 bakteriyal selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.	77
Şekil 5. 22. M2 bakteriyal selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.	78
Şekil 5. 23. H4 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.....	79
Şekil 5. 24. HM3 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.	80
Şekil 5. 25. M2 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.	81
Şekil 5. 26. Bakteriyal selüloz örneklerinin FT-IR spektrofotometre analiz sonuçlarının karşılaştırması.....	81
Şekil 5. 27. Bakteriyal selüloz membranlarının FTIR analizi	82
Şekil 5. 28. H4 numaralı bakteriyal selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.....	83
Şekil 5. 29. HM3 numaralı bakteriyal selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.	83
Şekil 5. 30. M2 numaralı bakteriyal selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.	84
Şekil 5. 31. Glucanoacetobacter xylinum tarafından üretilen bakteriyal selülozun XRD analizi grafiği.....	84
Şekil 5. 32. M2, HM3 ve H4 izolatlarının toplam DNA ekstraksiyonu sonrası agaroz jel elektroforezinde görüntüsü.....	85
Şekil 5. 33. M2, HM3 ve H4 izolatlarının PCR görüntüsü.....	86
Şekil 5. 34. İzolatların ribotiplendirme profilleri.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
θ	: Teta
μg	: Mikro gram
μL	: Mikro litre
μm	: Mikro metre
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm^3	: Milimetre küp
ppm	: Milyonda bir kısım
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
BS	: Bakteriyal selüloz
CaCO_3	: Kalsiyum karbonat
CS	: Selüloz sentaz
DP	: Polimerizasyon derecesi

EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
Fru-1-P	: Fruktoz-1-fosfat
Fru-6-P	: Fruktoz-6-fosfat
Fru-bi-P	: Fruktoz-1,6-bifosfat
FBP	: Fruktoz-1,6-bifosfat fosfotaz
FK	: Fruktokinaz
FT-IR	: Fourier transform infrared spectroscopy
G6PDH	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GK	: Glukokinaz
Glc	: Glukoz
GLC-6(1)-P	: Glukoz-6(1)-fosfat
Gr	: Gram boyama
N	: Normalite
NMR	: Nüklear magnetik rezonans
1PFK	: Fruktoz-1-fosfat kinaz
PGA	: Fosfoglukonik asit
PGI	: Fosfoglukoizomeraz
PGM	: Fosfoglukomutaz
PTS	: Fosfotransferaz sistemi
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
UDPGlc	: Uridin difosfoglukoz
UGP	: Pirofosforolaz uridin difosfoglukoz

1.GİRİŞ

Endüstriyel biyoteknoloji uygulamalarının artmasıyla, özellikle son yıllarda mikrobiyal ürün üretiminde de orantılı bir artış olmuştur. İnsanlar çok eski çağlardan bu yana başta peynir, ekmek, şarap, bira olmak üzere çeşitli besin ürünlerinin eldesinde bilinçsizce olsa da mikroorganizmalardan yararlanmışlardır. Uygulanan moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle tarımla üretilen birçok ürünün mikroorganizmalarca elde edilmesi ve ekonomik olarak rekabet düzeyinin artması sağlanmıştır.

Mikroorganizmaların ürettiği, biyoteknoloji alanında kullanılan en önemli materyallerden biri de polisakkaritlerdir. Bu polisakkaritlerin başında da selüloz yer almaktadır. β -1,4 bağlı glukoz monomerlerinden oluşan selüloz klasik yöntemlerle bitkisel kaynaklardan elde edilir. Pamuğun % 94'ünden fazlası, ağacın %50'sinden fazlası selülozdan oluşmaktadır. Dünya nüfus artışına bakıldığında her geçen gün selüloza olan ihtiyacın da artacağı kolayca görülmektedir. Klasik yöntemlerle bitkilerden selüloz elde edilmeye devam edildikçe artan selüloz ihtiyacını karşılamak için odun ve pamuk yetiştirilecek daha fazla alana ihtiyaç duyulacaktır. Bu ihtiyaç doğrudan dünyanın karbon döngüsüne olumsuz etki etmektedir. Odun ve hidrokarbonların yanmasıyla atmosfere çok miktarda karbondioksit verilmesi küresel ısınmayı tetiklemekte ve ekolojik dengenin değişmesine neden olmaktadır (Brown, 1998). Bu sebeplerden dolayı alternatif kaynaklardan selüloz elde edilmesi gittikçe önem kazanmış ve bir zorunluluk haline gelmiştir.

Selülozun geleneksel olarak bitkisel kaynaklardan elde edilmesinin yanında diğer bir yöntem de mikroorganizmalardan biyosentez yoluyla elde edilmesidir. Bakteriyel selüloz, bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı kimyasal yapıya sahiptir. Fakat mekanik dayanıklılık, saflık, fibril çapı, su tutma kapasitesi ve biyoyumluluk özellikleri bakımından bitkisel selüloza kıyasla üstündür (Shoda, vd., 2005; Chawla, vd., 2009).

Bu çalışmada biyoteknolojik yöntemler kullanarak bakteriyel selüloz üretiminin sağlanması, farklı besiyerleri kullanılarak yüksek selüloz üretme kapasitesine sahip suşların bulunup tanımlanması ve elde edilen bakteriyel selülozun uygulama alanının arttırılabilmesi açısından mekanik özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbohidratlar

Karbohidratlar tabiatta en fazla bulunan makromoleküllerdir. Makromoleküllerin en yoğun olanıdır. Hayvan, bitki ve bakteri metabolizmasında hem yapısal hem de metabolik olarak temel rol oynar. Karbohidratlar sakkaritler olarak da isimlendirilirler ve bitkisel kaynaklı gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. Doğada sadece ototroflar tarafından sentezlenebilen karbonhidratlar; insanlar, hayvanlar ve birçok mikroorganizma için çok önemli bir enerji ve karbon kaynağıdır. En önemli karbohidratlardan biri glukozdur. Canlılarda çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin; hayvanlarda glukoz, glikojen şeklinde depo edilerek enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır, bakteri ve bitkilerin hücre duvarı yapısında yapısal element olarak bulunur, yine bitkilerde glukoz, nişasta olarak depo edilir ve enerji kaynağı olarak kullanılır (Gözükara, 1994).

Fotosentezle üretilen karbohidratların bir kısmı proteinler ve yağlar vb. diğer organik maddelere dönüştürülürken, geri kalan kısım ise polisakkaritler olarak şeker polimerlerine dönüştürülür. Doğada birçok üründe farklı moleküler büyüklük, şekil, yapı ve çözünürlük gösteren çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip karbohidratlar bulunur. Karbohidratlar, toksik olmadıkları için kullanımları güvenlidir ve doğada parçalanabilir özellikte oldukları için çevre kirliliği açısından geri dönüşümsüz sorun oluşturmazlar (Saldamlı, 1998).

Karbonhidratlar aktif aldehid veya keton grubuna sahip polihidroksi alkollerin oluşturduğu maddelerdir veya hidroliz edildiklerinde bu maddeleri veren yapılardır. Karbohidratların kapalı formülleri, $(CH_2O)_n$ şeklinde ifade edilir. Bazı karbohidratlar (disakkaritler ve polisakkaritler) bu kapalı formüle uymaz. Karbohidratlar karbon, hidrojen, ve oksijen atomu dışında N(azot), S(kükürt) gibi elementleri de içerebilir. Ayrıca laktik asit ($C_3H_6O_3$), formaldehit (CH_2O) gibi bazı bileşikler de bu formüle uyduğu halde karbohidratlar grubuna dahil değildir. Moleküldeki basit şeker ünitelerinin sayısına göre karbonhidratlar;

1.Monosakkaritler

2.Disakkaritler

3.Oligosakkaritler

4.Polisakkaritler olmak üzere 4 sınıfta incelenir (Saldamlı, 1998).

Monosakkaritler: En basit karbonhidratlardır, basit şekerler olarak adlandırılır ve daha basit şekerlere hidroliz edilemezler. Tek bir polihidroksi aldehit ya da keton biriminden oluşmuştur. Glukoz, fruktoz, galaktoz, riboz, deoksiriboz, dihidroksiaseton, gliseraldehit en önemli monosakkaritlerdir. Bunların içinde doğada en fazla bulunan şeker ise altı karbonlu olan D-glukoz'dur. Bazı monosakkaritler tabiatta serbest halde bulunurlar. Kandaki glukoz ve meyvelerdeki früktoz buna örnektir. Monosakkaritler hücrel işler için en önemli yakıttır, ayrıca diğer monomerlerin (aminoasitler, yağ asitleri) sentezi için ham madde olarak da görev alırlar.

Monosakkaritler tatlı, renksiz ve kristal yapıdadır. Monosakkaritlerin tatlı olma özellikleri moleküllerindeki hidroksil gruplarından (-OH) kaynaklanır. Suda çok çözünürler, polar yapıda olmayan çözücülerde ise çözünmezler. Monosakkaritler yapılarında aldehid veya keton grubu taşımalarına göre aldoz ve ketoz olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Karbonil grubu(C=O) karbon zincirinin bir ucunda ise bu monosakkarit bir aldehittir ve aldoz olarak adlandırılır. Fakat karbonil grubu karbon zincirinin uç kısımları dışında herhangi bir yerinde ise bu bir ketondur ve ketoz olarak adlandırılır (Saldamlı, 1998).

Disakkaritler: İki monosakkaridin glukozidik bağıyla bir molekül su kaybederek birleşmesinden disakkaritler oluşur. Önemli disakkaritler maltoz, sukroz ve laktozdur. Laktoz ve maltoz indirgen özelliğe sahipken sukroz bu özellikte değildir. Disakkaritler suda kolayca erirler ve tatlılık dereceleri disakkaridin türüne göre değişiklik gösterir (Gözükara, 1994; Saldamlı, 1998).

Oligosakkaritler: Birkaç monosakkaritin glukozidik bağ ile birbirlerine bağlanarak, polimerize olmasından oligosakkaritler meydana gelir. Hidroliz olduklarında 2-10 monosakkarit oluşturan karbohidratlardır. Önemli oligosakkaritlerden bazıları şunlardır:

- Raffinoz: Galaktoz-glukoz-fruktozdan oluşmuş bir oligosakkarittir. Doğada şeker pancarında ve birçok yüksek organizasyonlu bitkide bulunur.
- Melezitoz: Glukoz-fruktoz-glukozdan oluşmuş bir trisakkarittir. Bitkilerin tatlı öz sularında ve özellikle çam ağaçlarında bulunmaktadır.

- Gentianoz: Glukoz-fruktoz-glukozdan oluşmuş bir trisakkarittir. Gentian denilen bitkinin kökünde bulunmaktadır
- Planteoz: Galaktoz-fruktoz-glukozdan oluşmuş bir oligosakkarittir.
- Stakioz: Galaktoz-galaktoz-glukoz-fruktozdan oluşmuş bir tetrasakkarittir. İndirgen olmayan bir tetrasakkarittir. Şeftali ve soya fasülyesinde bulunmaktadır.
- Verbaskoz: Galaktoz-galaktoz-galaktoz-glukoz-fruktozdan oluşmuş bir pentasakkarittir. Bir tetrasakkarit olan stakiozun galaktoz ucuna bir galaktoz daha bağlanmasıyla verbaskoz oluşur.
- Linknoz: Galaktoz-glukoz-fruktoz-galaktozdan oluşmuş bir oligosakkarittir (Gözükara, 1994).

Polisakkaritler: Çok sayıda monosakkarit molekülünden meydana gelmiş makro moleküllerdir. Oligosakkaritler gibi glukozidik bağlarla bağlanmış monosakkarit polimerlerdir. Polisakkaritler asitlerle ve spesifik enzimlerle muamele edilerek tamamen hidroliz olursa monosakkarit veya monosakkarit türevlerine (D-glukozamin, glukoronik asit, N-asetil muramik asit, vb) ayrılmaktadır. Polisakkaritlerin yapısında yer alan başlıca monosakkarit genellikle D-glukoz'dur. Fakat fruktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz yapılarıyla da karşılaşılmaktadır (Gözükara, 1994).

Polisakkaritlerdeki monosakkarit sayısı çok geniş bir aralığa sahiptir ve polisakkaritlerdeki monosakkarit sayısı polimerleşme derecesini göstermektedir. Yapıda yer alan zincir boyunca tekrar eden monosakkarit ünitelerine göre ve dallanma derecelerine göre birçok farklı polisakkarit molekülü bulunmaktadır. Kimyasal yapılarından dolayı polisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak iki gruba ayrılır.

-Homopolisakkaritler: Bu polisakkaritlerin tamamı aynı tip monosakkaritlerden meydana gelmişlerdir. Nişasta, glikojen, inülin gibi bazıları depo formları olarak işlev görürler ve bunlar depo homopolisakkaritler olarak adlandırılırlar. Selüloz ve kitin gibi yapısal işlev görenleri de yapısal homopolisakkaritler olarak adlandırılırlar. Bunlara ek olarak her iki işlevi de sağlayan mannan ve galaktan gibi homopolisakkaritler de bulunmaktadır. Depo polisakkaritler (nişasta, glikojen) dallanma gösterirken yapısal

polisakkaritler (selüloz) dallanma göstermemektedir (Nelson, vd., 2005; Gözükara, 1994).

-Heteropolisakkaritler: Çeşitli monosakkarit birimlerinin polimerleşmesi ile meydana gelen polisakkaritlerdir. Heteropolisakkaritler tüm organizmalar için ekstrasellüler (hücre dışı) destek sağlamaktadır. Heteropolisakkaritlere örnek olarak hemiselüloz, glikomannoglikan, galaktomannoglikan ve bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan verilebilir (Gözükara, 1994).

Polisakkaritler, yüksek molekül ağırlığına sahip olup doğada rastlanan karbohidratların çoğunu oluşturmaktadır. Bu polisakkaritler ya depo görevini üstlenerek monosakkaritlerin depo edilmesini sağlamakta ya da yapısal görevdeyse hücre duvarı ve bağ dokusu yapısında yer almaktadır (Gözükara, 1994).

Depo polisakkaritleri

- a. Nişasta: En önemli bitkisel polisakkarittir. α -D-glukoz polimeridir. Yapısal olarak amiloz ve amilopektin olmak üzere iki şekli vardır.
- b. Glikojen: Hayvansal dokularda, çoğunlukla karaciğer ve kaslarda depo edilir. Bazı bakteri, alg ve mantar türlerinde de özellikle mayada bulunur. α -D-glukoz polimeridir.
- c. İnülin: D-Fruktozun (2-1) bağı ile polimerize olmasından oluşmuştur. Enginar, kara indiba, soğan ve sarımsak yumrularında bulunmaktadır.
- d. Dekstranlar: D-Glukozun polimeridir ve çok dallanma göstermektedir. Bakterilerde depo polisakkarit olarak bulunmaktadır.
- e. Diğer depo polisakkaritler: Frukthanlar (levanlar), mananlar, ksilan ve arabinanlardır.

Yapısal polisakkaritler

- a. Selüloz: Glukoz birimlerinin β -1,4 glikozidik bağla bağlanmasıyla oluşan düz zincir yapısındaki homopolisakkarittir. β -D-glukoz polimeridir (Nelson ve Cox, 2005). Fibröz, sert ve suda çözünmeyen yapıdaki selüloz ancak çok konsantre asitlerle ısıtıldığında parçalanarak disakkarit olan sellobioz ve D-glukoz ünitelerine ayrılmaktadır. Selüloz özellikle bitkisel yapıda (gövde, sap, dal ve hücre

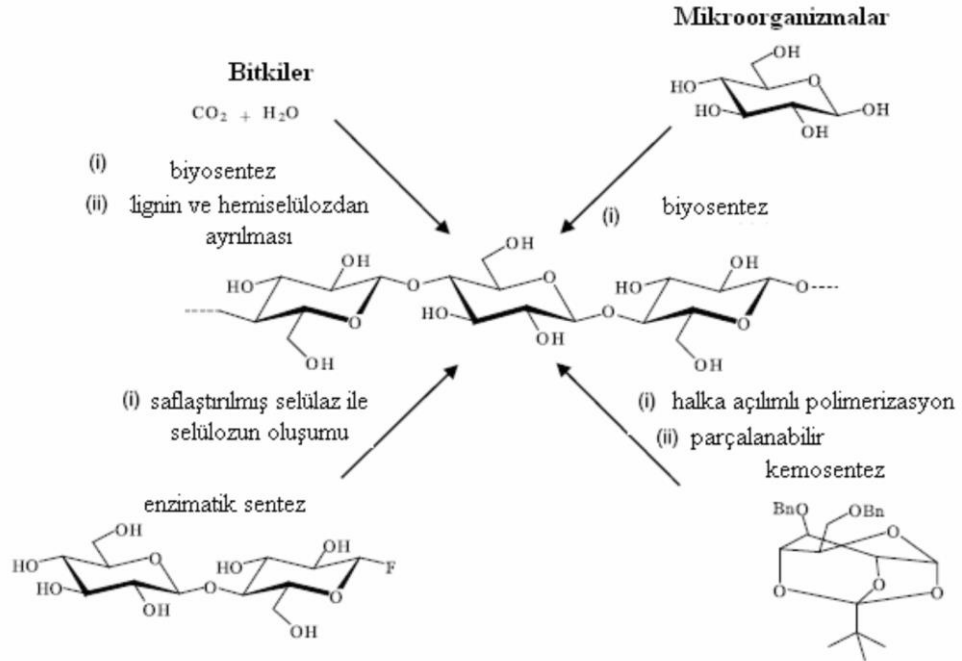
duvarının dış kısmında) yer alan bir polisakkarittir. Pamuk, odun ve kâğıdın yapısında da geniş ölçüde bulunur (Gözükara, 1994).

b. Glikopolisakkarit: Bakteri ve bazı mikroorganizmaların hücre duvarı yapısında yer alırlar. Monosakkarit türevi ve peptidlerden oluşmuştur (Gözükara, 1994).

c. Glikoproteinler: Genellikle hayvan hücre duvarı yapısında bulunmaktadır. Karbohidrat ve protein kompleksinden oluşmuştur (Gözükara, 1994).

d. Asit Mukopolisakkaritler: Birbirlerine benzer yapıdaki bir grup polisakkarittir. Bunlar iki tip tekrarlanan monosakkarit birimi içerirler. Bunlardan en az biri karboksilik veya sülfirik olmak üzere asidik bir grup içerir. En yaygın olarak bulunan asit mukopolisakkarit, hyaluronik asittir. Omurgalıların bağ destek dokusunun hücre membranlarında ve ekstraselüler sıvısında yani matriksde bulunmaktadır (Gözükara, 1994).

Doğada yüksek oranda rastlanan selüloz bitkisel yapıda yer almasının yanında bazı mikroorganizmalar tarafından ekstrasellular olarak sentezlenmektedir. Bakteriyal selüloz, bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı kimyasal yapıya sahiptir fakat fiziksel özellikleri ve moleküler yapısı incelendiğinde farklılıklar bulunmaktadır (Klemm, vd., 2001).



Şekil 2.1. Selüloz sentezi (Klemm, vd., 2001).

2.2. Bakteriyal Ekstrasellular Polisakkaritler

Birçok mikroorganizma, ekstrasellular (hücre dışı) polisakkaritler (EPS) olan biyopolimerleri sentezleyebilmektedirler. Ekstrasellular polisakkaritler ya hücre duvarı ile birleşmiş yapıdaki kapsüller ya da büyük miktarlarda hücre içinde oluştuktan sonra hücre dışına yani kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Sutherland, 1998; Ramesh ve Tharanathan, 2003). Bu yüzden bu yapılar kapsül ve slime layer (cıvık tabaka) olarak isimlendirilir. Bu yapılar birçok farklı polisakkarit ve birkaç proteinden oluşmaktadır. Genel olarak bu yapıya Glikokaliks de denir. Glikokaliks, hücre dışında polisakkarit içeren kısımdır fakat genellikle glikoproteinleri ve çok fazla sayıda polisakkaritleri, polialkolleri ve aminoşekerleri içerir (Brock ve Madigan, 1994).

Bazı bakteriler, alg, fungus ve mayalar bu polisakkaritleri sentezleme yeteneklerine sahiptirler. Ekstrasellular polisakkarit hücrenin dış kısmında bitişik olarak bulunan ve sentezlendikten sonra hücre dışına çözünür veya çözünemez şekilde bırakılan polimerik maddelerdir (Sutherland, 2001). Bakteriyal ekstrasellular polisakkaritlerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazıları ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır (Kenne ve Lindberg, 1983). Selüloz, gellan, ksantan, dekstran, pullulan ve süksinoglukan bu ekstrasellular polisakkaritlere örnektir ve ticari olarak da üretilebilmektedir (Sutherland, 2001).

Mikrobiyal ekstrasellular polisakkaritler, birçok bakteri ve fungus cinsi tarafından üretilebilmektedir (Lee, vd., 1997; Tavernier, vd., 1997). Organizmaların çoğunda bakteriyal polisakkaritler bulunmasına rağmen çok azı ticari ürün olarak değerlendirilmektedir. Hem mikroorganizmalardan elde edilen hem de ticari olarak önemli olan polisakkaritlere örnek olarak;

- selüloz (*Acetobacter xylinum*)
- gellan (*Pseudomonas elodea*)
- ksantan (*Xanthomonas campestris*)
- süksinoglukan (*Rhizobium*, *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp.)
- dekstran (*Leuconostoc* sp.)

- pullulan (*Auerobasidium pullulans*)
- alginatlar (*Azotobacter vinelandii*)
- velan (*Alcaligenes* sp.)
- emülsan (*Acinetobacter calcoaceticus*)
- ramsan (*Alcaligenes* sp.) verilebilir (Crescenzi, vd., 1991).

Mikrobiyal polisakkaritlerin organizmalar üzerindeki etkisi incelendiğinde bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağladığı görülmektedir. Üretici mikroorganizmalar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılmazlar fakat mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur ve zararlı ortamlardan uzaklaştırırlar (Ophir ve Gutnick, 1994; Moriello, vd., 2003). Mikrobiyal polisakkaritler bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sararak olası tehlikelere karşı onları korumakla birlikte ortamdaki metalik iyonların tutulmasını da sağlarlar (Denny, 1995; Gugliandola, vd., 2003).

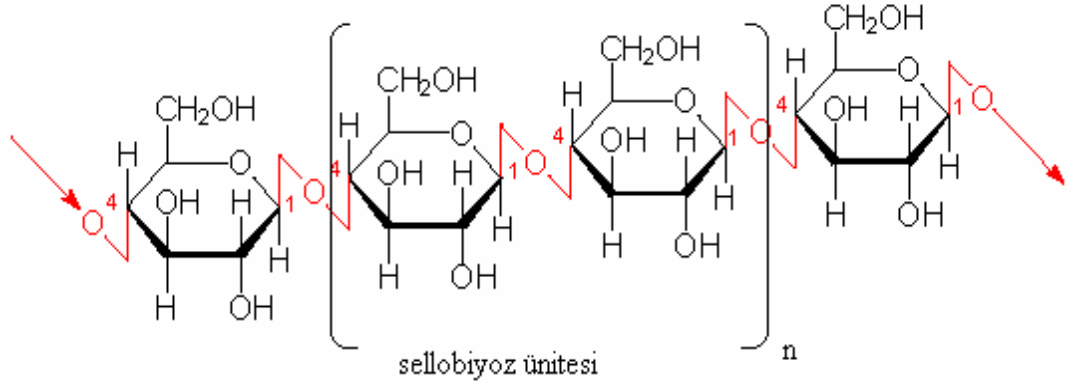
Mikrobiyal polisakkaritlerin, mikroorganizmalar tarafından üretim çeşitliliği fazla olmasından dolayı kullanım alanı da oldukça geniş ve bu da ticari olarak üretilmesini önemli kılmaktadır. Mikrobiyal polisakkaritler fiziki ve kimyasal özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi davranırlar ve kozmetik, tekstil, deterjan, gıda, mayalanma yapıştırıcı, atık ve akarsu iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri gibi oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Yalpani ve Sandford, 1987; Sutherland, 1998).

2.3. Bakteriyal Selüloz

2.3.1. Bakteriyal selülozun yapısı

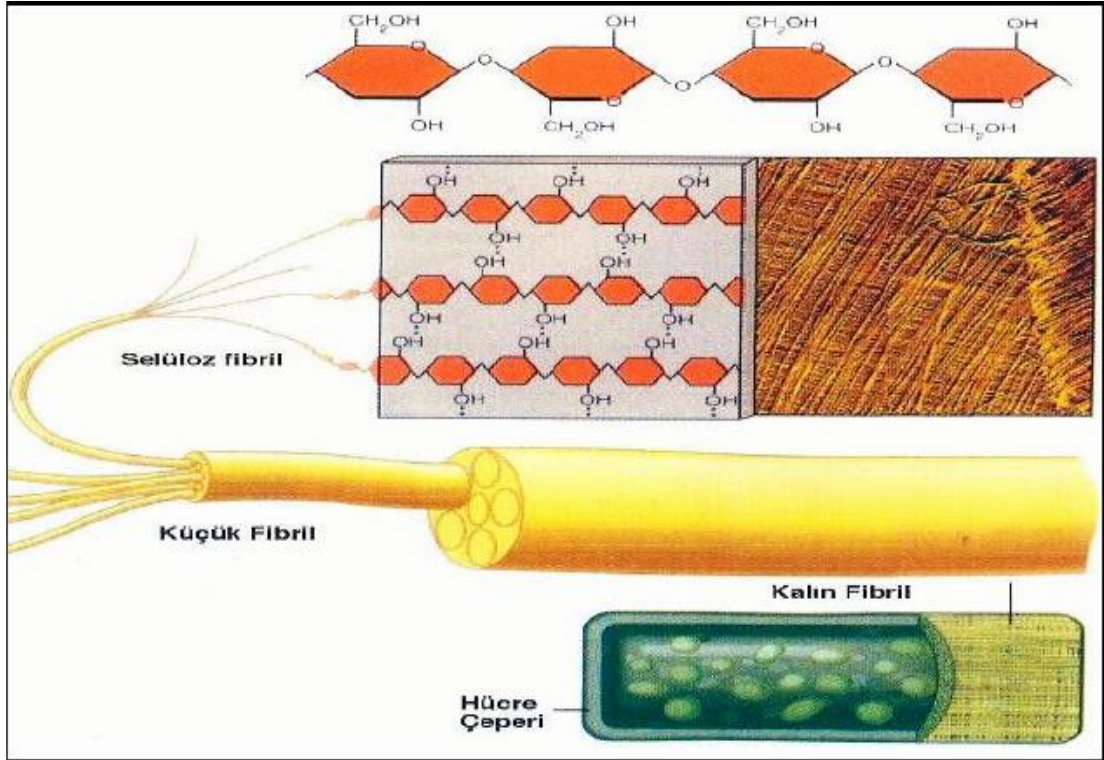
Selüloz, β -1,4 glikozidik bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz ünitelerinin doğrusal diziliminden oluşan polimer bileşiklerdir. 2.000–14.000 arasında glikopiranoz biriminden oluşur. Selüloz, iki glukoz birimi içeren sellobiyozun izotaktik polimeridir. Bu nedenle selülozun zincirsel yapısındaki temel birim sellobiyoz olarak kabul edilebilir. Glukoz ünitelerinin her birinde 2. 3. ve 6. karbonlarında hidroksil grupları bağlı bulunmaktadır. Buradaki hidroksil grupları birbirlerine ya da O⁻, N⁻, S⁻ gruplarına hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Aynı zamanda selülozun OH⁻ gruplarında ve su moleküllerinde de hidrojen bağları mevcuttur. Hidroksil gruplarının burada sağladığı durum, selüloz yüzeyine hidrofobik özellik kazandırmasıdır (Palonen, 2004). Selüloz zincirinin her iki sonunda da hidroksil grupları bulunur ve farklı davranışlar

göstermektedirler. C1 ile biten uç indirgen özellikte grup içerirken, C4 serbest hidroksil grubuna sahip uç indirgen değildir (Akmaz, 2001).



Şekil 2.2. Selüloz zincirinin kimyasal yapısı (Perez, vd., 2002).

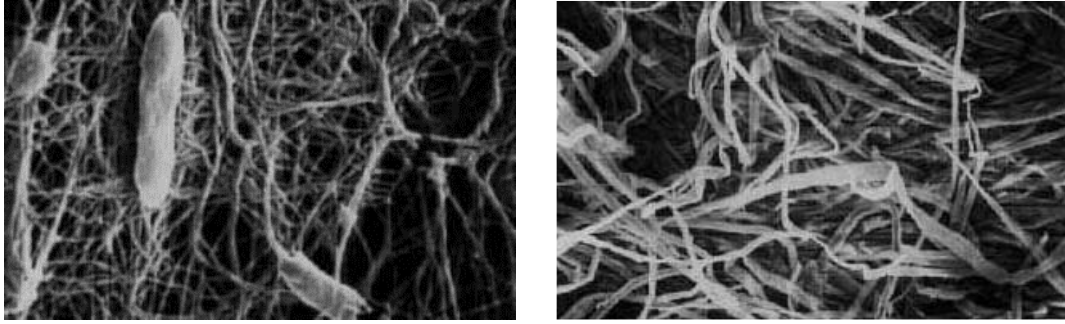
Bakteriyal selüloz, bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı kimyasal yapıya sahiptir fakat fiziksel özellikleri ve moleküler yapısında farklılıklar bulunmaktadır (Klemm, vd., 2001). Doğal kaynaklardan elde edilen selüloz farklı zincir uzunluklarından oluşan bir yapıya sahiptir. Zincirler arasında hidrojen bağları bulunur. Selüloz molekülleri birbirleriyle demetler halinde birleşerek yapılar oluştururlar. Bu yapılardan en küçüğü elementel fibrildir ve oluşan bu demet aynı yönde uzanan 40 selüloz molekülünün birleşimidir. Elementel fibriller (subfibriller) birleşerek daha büyük demet olan mikrofibrilleri oluşturur. Mikrofibriller bir araya gelerek yığın halinde fibrilleri, fibriller de selüloz lamellerini meydana getirir (Hafızoğlu, 1982).



Şekil 2.3. Selüloz fibriller yapısı (Kırcı, 2000).

Bakteriyal selülozun fibril ağ çapı, bitkisel selülozun yaklaşık % 1'i kalınlığındadır ve bakteriyal selülozun fibril ağ çapının 0.1 μm olduğu bilinmektedir (Yoshinaga, vd., 1997). Selüloz fibrillerinin boyutu farklı araştırmacılara göre şu şekildedir; Brown vd.(1976)'na göre 3,2 x 133 nm, Zaar (1977)'e göre 3-4 nm x 70-80 nm, Yamanaka ve Sugiyama (2000)'ya göre 4,1 x 117 nm, Bielecki vd.,(2001)'na göre ise 3,2 x 133 nm ve 4,1 x 117 nm'dir.

Bakteriyal selüloz ipliklerinin uzunluğu 1-9 μm , genişliği 1-25 nm, zincir sayısı aralığı 10-250 ve 2.000–18.000 sayı aralığındaki glikoz biriminden meydana geldiği bilinmektedir. Bu selüloz iplikleri *Gluconoacetobacter xylinum*'da metabolik olarak inert ve oldukça saf olarak hücre dışına salınılmaktadırlar (Ross, vd., 1991; Geyer, vd., 1994).

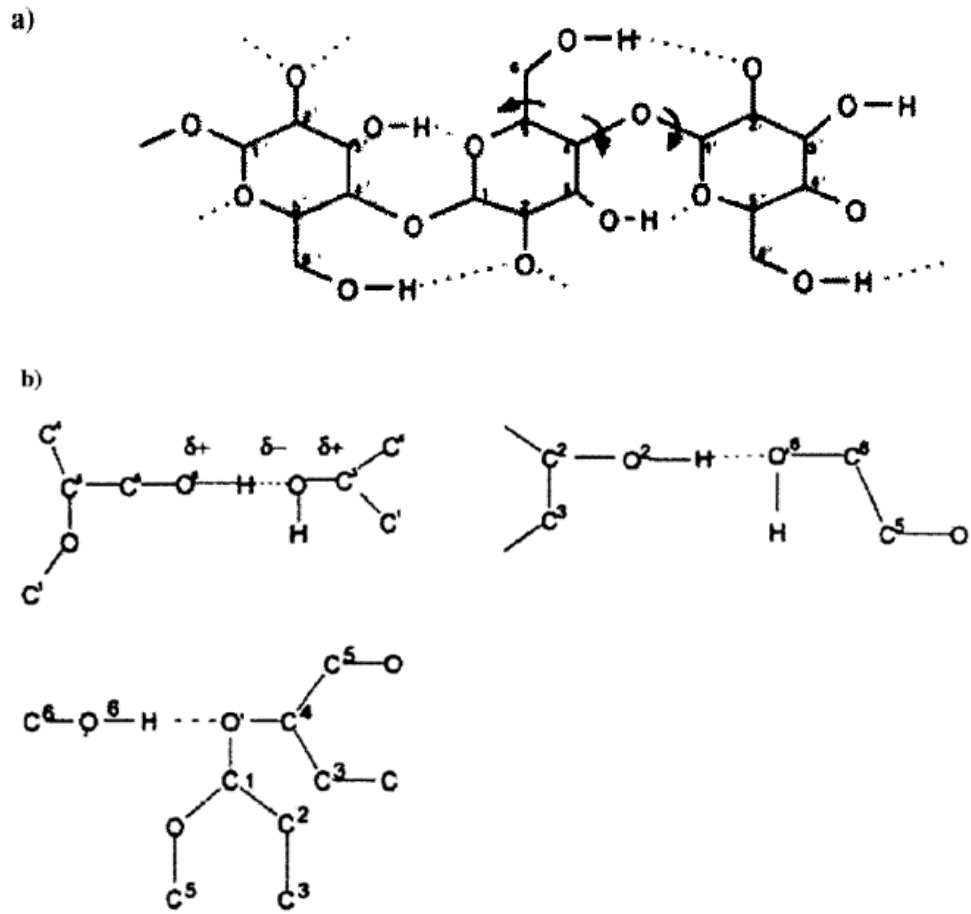


(a) Bakteriyal selüloz (x 20,000)

(b) Bitkisel selüloz (x 200)

Şekil 2.4. Bakteriyal selüloz (a) ve bitkisel selüloz (b) yapısı (Bielecki, vd., 2001).

Bakteriyel selüloz yapısında geniş hidrojen köprüleri bulunur (Geyer, vd., 1994). Bu hidrojen bağları selülozun kristalin yapısına neden olur. Selülozun yapısının %85'ini kristalin bölge oluşturur. Daha az düzenli olup selülozun %15'ini oluşturan kısım ise amorf bölgedir (Ateş, 1990; Ulbrik, 1991). Kristalinite selüloza bir takım özellikler kazandırır; suda çözünememe, gerilme kuvveti, reaksiyonlara dirençlilik, sert ve lifli yapı bunlardan başlıcalarıdır. Bu dirençlilikten dolayı kristalin bölge enzimatik uygulamalarda dezavantajdır (Ryu ve Mandels, 1980). Amorf bölgeler ise kolay hidrolize olurlar (Tsao, 1978; Ulbrik, 1991).



Şekil 2.5. a) Bakteriyal selülozun iç zincirindeki hidrojen bağları b) Bakteriyal selülozun dış zincirindeki hidrojen bağları (Bielecki, vd., 2001).

Bakteriyel selüloz, bitkisel selülozdan kristallenme indeksi ve polimerizasyon derecesi bakımından da farklıdır. Bakteriyal selüloz çok daha yüksek kristallenme indeksi değerine sahiptir. Kristallenme indeksinin farklı çalışmalara bakıldığında % 60- %70 arasında olduğu bildirilmiştir (Valjamae, vd., 1999).

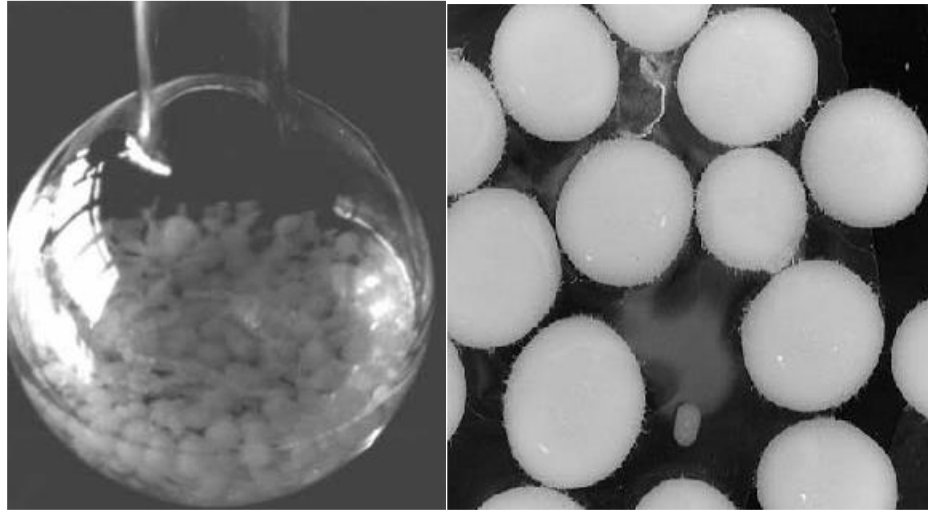
Polimer moleküllerinde birbirlerine bağlanan monomer moleküllerinin sayısına polimerizasyon derecesi denir. Glukoz monomerinden polimer selüloz oluşumu sırasında polimerizasyon derecesi (PD) 6'nın üzerindeyse sudaki çözünürlük azalır (Akmaz, 2001). Selülozun moleküller arası güçlü hidrojen bağları sebebiyle çözünebilirliği PD derecesinin artmasıyla düşer (Zhang, vd., 2006). Polimerizasyon derecesine bakıldığında bitkisel selülozdaki polimerizasyon 13.000-14.000 (Watanabe, vd.,1998), bakteriyal selülozdaki polimerizasyon 2000-6000 olarak bulunmuştur (Teeri, 1997; Jonas ve Farah, 1998).

Selülozun, selüloz I ve selüloz II olmak üzere iki kristalize şekli vardır. Selülozun bu iki formu X-ray, nükleer magnetik rezonans (NMR), Raman spektroskopisi ve Infrared analizi ile görülebilir (Johnson ve Neogi, 1989). Selüloz I, paralel glukoz zincirlerine ve intramoleküler hidrojen bağlarına sahip mikro lifli yapıdaki kristalografik formudur. Selüloz II, doğal selülozun alkali maddelerle çözülmesi veya muamele edilmesinin ardından suyla yıkanmasıyla elde edilir. Suyla yıkama aşaması Selüloz I'in Selüloz II'ye selülozu çözmeden dönüşmesini sağlar (Maguire, 1997). Selüloz I'in de iki ayrı formu bulunmaktadır; selüloz I_α ve selüloz I_β. Selüloz I_α genellikle bakteriyel selülozun ve alglerin yapısında yer alırken, selüloz I_β bitkilerin yapısında bulunmaktadır. CP/MAS 13C-NMR kullanılarak, selüloz I_α ve selüloz I_β'nin ayrımı mümkündür. Statik kültürde oluşan bakteriyel selüloz, çalkalamalı kültürde oluşan bakteriyel selüloza göre daha fazla selüloz I_α içerir (Watanabe, vd.,1998).

Bakteriyel selülozun makroskobik görüntüsü kültür şartlarına bağlıdır. Durgun (statik) ve çalkalamalı kültürlerde oluşan bakteriyel selülozun taramalı elektron mikroskopundaki (SEM) görünen yapısında belirgin farklılıklar bulunur. Durgun koşullarda sıvı besi yerinin üst yüzeyinde selüloz tabakası oluşur. Selüloz fibrilleri daha uzundur, bakteri hücrelerinin yüzeyindeki porlardan dışarı çıkarlar ve kristalize olmuş mikrofibriller birbirlerine paralel biri diğerinin üzerine yığılmış bir şekilde görünürler (Jonas ve Farah, 1998). Durgun kültürde oluşan bakteriyel selüloz fibrillerinin genişliği daha uzundur (Johnson ve Neogi, 1989). Çalkalamalı kültürlerde oluşan bakteriyel selüloz ise düzensiz, kıvrımlı, kenarları pürüzlü, karışık granüler görünümündedir (Yoshinaga, vd., 1997).



Şekil 2.6. Durgun kültürde bakteriyel selüloz oluşumu (Bielecki, vd., 2001).



Şekil 2.7. Çalkalamalı kültürlerde bakteriyel selüloz oluşumu (Bielecki, vd., 2001; Czaja, vd.,2004).

2.3.2. Bakteriyel selülozun özellikleri

Bakteriyel selüloz genellikle çözünmeyen, gerilme direnci yüksek ve elastik bir biyopolimerdir. Bakteriyel selüloz zarları çok hidrofilik bir yapıya sahiptir. Kuru ağırlığının 60-700 katı arasında su tutma kapasitesine sahiptir. Bu kapasite üretim yöntemine göre farklılık gösterebilir. Durgun koşullarda üretilen selüloz zarının toplam ağırlığının yalnızca % 1'i selüloz, geri kalan kısmı ise sudur. Selüloz liflerinin, sıvı besi yerine hücre dışına salınarak birleşmelerinden dolayı toplam ağırlıktaki su oranı çok daha fazladır ve bu sıvı içeriğinden dolayı bakteriyel selüloz jelatinimsi bir görüntüye sahiptir. Bunlara ek olarak üretim aşamasında hidrofilik maddelerin eklenmesiyle bakteriyel

selülozun hidrofilik özelliği arttırılabilir (Yamanaka, vd., 1990; Geyer, vd., 1994; Krystynowicz, vd.,1995,1997).

Bakteriyal selüloza istenilen özellikler sentez sırasında ya da kültüre edilirken kazandırılabilir ya da özellikleri geliştirilebilir, bu bakteriyal selülozun en önemli özelliklerinden biridir. Üretim yöntemi, fermentör seçimi, besiyeri içeriği, hücre yoğunluğu gibi koşullar sayesinde selülozun özellikleri değiştirilebilir. Bakteriyal selüloz bazı bileşikler ile birleştirilerek istenilen fizikokimyasal özellikler elde edilebilir (Yamanaka, vd., 1990). Bunun için bazı yardımcı materyaller; jelatin kollagen, pullulan, alüminyum,heparin, alginatlar, poliakrilamid, polihidroksialkoller gibi bileşikler kullanılır ve bunlar bakteriyal selüloza emdirilerek, selüloza adsorblanarak ya da parçalanmış polimerle karıştırılarak birleştirilir, bu sayede istenilen çeşitli ürünler elde edilir (Bielecki, vd., 2001). Ayrıca bazı selüloz türevleri; nişasta, dekstran, sülfonik asit, alkilfosfat benzeri diğer polisakkaritler gibi bazı bileşikler, besiyerinin içine ilave edildiğinde, elde edilecek ürünün makroskobik morfolojisi, gerilme direnci, adsorblama özellikleri ve optik yoğunluğu değişebilmektedir (Yamanaka ve Sugiyama, 2000). Örneğin; *Listeria mesenteroides*'den elde edilen dekstransukraz ve alternansukraz kullanılarak bakteriyal selülozun enzimatik modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Dekstransukraz ve alternansukraz enzimlerinin besiyerine ilave edilmesiyle *A. xylinum* ATCC 10821 straini tarafından 1,3; 1,4 ve 1,6'ya bağlı glukoz monomerlerinden meydana gelen çözünür selüloz sentezlenmiştir (Kim, vd., 1999).

2.4. Bakteriyal Selüloz Sentezleyen Mikroorganizmalar

Selüloz; bitkiler, küfler (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) , bazı algler (*Vallonia*) ve bakteriler tarafından da sentezlenmektedir (Bielecki, vd., 2001). Selüloz sentezleyen başlıca bakteriler; *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcinia*, *Zoogloea*, *Salmonella spp.*, *E.coli*, *K.pneumoniae* ve değişik *Cyanobacteria* türleridir (Klemm, vd., 2001; Römling, 2002).

Selüloz üretim yeteneklerine bakıldığında bu mikroorganizmalardan en etkin olanı *Acetobacter xylinum*'dur. İlk kez 1886 yılında A.J. Brown tarafından selüloz ürettiği bildirilmiştir. Önce 1997 yılında Yamada vd., tarafından yeni yapılan sınıflandırmayla adı *Gluconoacetobacter xylinus* olmuştur (Kornmann, vd., 2003). Ardından yine Yamada vd. tarafından 2012 yılındaki yeni çalışmayla *Komagataeibacter xylinus* olarak

isimlendirilmiştir. *Komagataeibacter xylinus* bakteriyal selülozun özellikleri, biyosentez mekanizması ve kristalizasyonu gibi özelliklerinin araştırılıp incelenmesinde model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır (Klemm, vd., 2001, Rezaee, vd., 2005).

Tüm bu bakterilerde sentezlenen bakteriyal selülozun biyosentez mekanizması aynıdır fakat polimerin yapısı organizmaya göre değişiklik göstermektedir (Ross, vd.,1991; Jonas ve Farah, 1998).

Çizelge 2. 1. Bakteriyal selüloz üreten bazı mikroorganizmalar ve ürettikleri selülozun yapısı(Jonas ve Farah, 1998).

Organizma (genus)	Selüloz yapısı	Biyolojik görev
<i>Gluconoacetobacter</i>	Ekstrasellular pelik	Aerobik çevrede tutmak
<i>Acetobacter</i>	Ekstrasellular pelik	Aerobik çevrede tutmak
<i>Aerobacter</i>	Selüloz fibriller	Atık suda flokulasyon
<i>Achromobacter</i>	Selüloz iplikler	Atık suda flokulasyon
<i>Agrobacterium</i>	Kısa fibriller	Bitki dokusuna birleşmiş
<i>Alcaligenes</i>	Selüloz fibriller	Atık suda flokulasyon
<i>Sarcina</i>	Amorf selüloz	Bilinmiyor
<i>Pseudomonas</i>	Belirgin fibril yok	Atık suda flokulasyon
<i>Rhizobium</i>	Kısa lifler	Birçok bitkiye birleşmiş
<i>Zoogloea</i>	Belirgin fibril yok	Atık suda flokulasyon

2.4.1. Asetik asit bakterileri, kaynaklardan izolasyonu ve sınıflandırılması

Mikrobiyolojide genelde asidik gıdalarda bulunan, pH 5 değerinin altındaki pH değerlerinde gelişebilen bakterilere asidofilik bakteriler denir. Asetik asit bakterileri (AAB)' de bu grupta yer almaktadır. Asetik asit bakterileri etanolü asetik aside okside ederler.

Asetik asit bakterileri, 0,4-1 µm genişliğinde ve 0,8-4,5 µm uzunluğunda boyutlara sahiptir. Gram negatif ya da gram değişken özellik gösterirler. Metabolizmaları zorunlu

aerobdur. AAB gelişimi için en uygun sıcaklık 25-30 °C, optimum pH değeri aralığı 5-6,5'dur. Ayrıca pH 3-4 arasında da gelişim gösterebildikleri bilinmektedir. AAB, katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir. Elipsoidal dan çubuk şekline kadar değişen görünüşleri vardır. Hareketli veya hareketsizdirler. Hareketli olanların peritrik veya polar flagellaları bulunmaktadır. Endospor oluşturmazlar (De ley, vd., 1984).

AAB, şekerli ortamlarda veya sirke, şarap, bira, bal, ekşimiş meyveler gibi etanol içeren substratlarda gelişim göstermektedirler. Bu substratların üzerinde şekerleri ve alkolü okside ederler. Ortamda son ürün olarak organik asitlerin birikmesini sağlarlar. Etanolü asetik aside dönüşmesine ek olarak galaktozu galaktonik aside, sorbitolu sorboza, glikozu glukonik aside, arabinozu arabonik aside dönüştürebilirler (Raspor ve Goranovic, 2008).

Çizelge 2.2. Asetik asit bakterilerinin genel özellikleri (De Ley, vd., 1984).

Özellik	Reaksiyon
Hücre boyutu	Genişlik 0,4-1 µm ve uzunluk 0,8-4,5 µm
Gram boyama	Gram negatif veya değişken
Oksijen ihtiyacı	Zorunlu aerob
Gelişim sıcaklığı ve pH	25-30 °C ve 5-6,5
Hücre şekli	Çubuk, elipsoidal, kıvrımlı
Hareketlilik	Hareketsiz veya hareketli
Endospor	Yok
Oksidaz	Negatif
Katalaz	Pozitif
İndol	Pozitif
Jelatin	Negatif
Etanol	Asetik asite okside ederler
CaCO ₃ 'lü agarda	Zon oluşturur

AAB, ilk sistematik sınıflandırmasında *Acetobacter* ve *Gluconobacter* olarak iki cins ayrılmıştır. Ardından taksonomik kriter ve moleküler testler yeni sınıflandırma yapılmasını sağlayarak *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinslerinin yüksek filogenetik benzerliğe sahip olduğunu göstermiş ve bunun sonucunda da “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” kitabında *Acetobacter* ve *Gluconobacter* bakterileri *Acetobacteraceae* ailesine dahil edilmiştir. *Acetobacter*’in etanolü asetik aside ve sonrasında karbondioksit ve suya kadar oksitleyebilmesi fakat *Gluconobacter*’in asetik asidi tamamen karbondioksit ve suya kadar oksitleyememesi bu iki cins arasındaki en önemli farklardan birisidir (Guillamon ve Mas, 2011). DNA-DNA, DNA-RNA hibridizasyonu ve 16S rDNA analiz gibi moleküler tekniklere dayanarak yapılan son sınıflandırmaya göre asetik asit bakterileri, *α-Proteobacteria*’nın *Acetobacteraceae* familyası içinde yer almaktadır. *Acetobacteraceae* altında 15 cins tanımlanmıştır. Bu cinsler sırasıyla şu şekildedir: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas* (Urakami, vd., 1989), *Gluconacetobacter* (Yamada, vd., 1997), *Komagatabacter* (Yamada, vd., 2012), *Asaia* (Yamada, vd., 2000), *Kozakia* (Lisdianti, vd., 2002), *Saccharibacter* (Jojima, vd., 2004), *Swaminathania* (Loganathan ve Nair, 2004), *Neoasaia* (Yukphan, vd., 2005), *Granulibacter* (Greenberg, vd., 2006), *Tanticharoenia* (Yukphan, vd., 2008) ve *Ameyamaea* (Guillamon ve Mas, 2011), *Acidocella* (Yamada, vd., 2012), *Neokomagataea* (Yamada, vd., 2012).

Asetik asit bakterileri izole edildiği birçok kaynak bulunmaktadır. *Ameyamaea*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* ve *Acidocella* birer tür içermektedir. Bu durum genel olarak asetik asit bakterilerinin izole edildiği sirke, şarap ve meyve gibi kaynaklardan bu cinslerin çok az hatta nadiren izole edildiğini göstermektedir. 1997 yılında Yamada vd. yaptıkları çalışmada Endonezyadaki bazı fermente gıdalar, çiçekler ve meyveler gibi farklı kaynaklardan asetik asit bakterilerine ait olan 64 izolat elde edilmiş ve bu bakterilerden 45 izolatın *Acetobacter* suşu, 11’inin *Gluconobacter* suşu, 8’inin *Gluconacetobacter* suşu olduğu belirlenmiştir.

Sirke, bira, şarap, kefir, bal, kahve, çeşitli meyveler gibi çok çeşitli kaynaklardan asetik asit bakterilerinin sınıflandırması yapılmıştır. Bu doğal kaynaklardan asetik asit bakterilerinin izolasyonu için Hestrin ve Schramm (1954), Frauter ve Simonart (1952) bir takım yöntemler ve besiyerleri geliştirmişlerdir (Swing, 1992; Du Toit ve Lambrechts,

2002). Ayrıca izolasyon sırasında, besiyerine sikloheksimid, nisin gibi kimyasal maddeler eklenerek maya ve laktik asit bakterilerinin inhibisyonu sağlanmaktadır (Swings, 1992; Du Toit, vd., 2002).

2007 yılında kambuya ayından izole edilen suş *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. olarak adlandırılmış ve RG3^T suşu 16S rRNA gen dizilimi yöntemiyle analiz edilmiştir. Suşun *Gluconacetobacter* cinsinden olup nitrojen bağlayabilen ve selüloz üretebilen yeni bir tür olduğu belirlenmiştir (Debasree ve Gachhui, 2007).

2009 yılında Tayland’da yapılan bir çalışmada ise baldan 4 termotolerant (CMU1, CMU2, CMU3, CMU4) AAB izole edilmiştir. İzolatlar *Gluconobacter* olarak tespit edilmiştir. Ek olarak izolatların farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) etanol ve asetik asit toleransları araştırılmıştır. Sonuçlar izolatlardan sadece CMU4’ün 30°C’de %10 (v/v) etanol konsantrasyonuna ve 37°C’de %9 (v/v) etanol konsantrasyonuna kadar gelişim göstererek en fazla toleransa sahip olduğunu fakat diğerk izolatların hepsinin %1 (v/v) asetik asit konsantrasyonunda 30°C sıcaklığa kadar gelişim gösterebildikleri belirlenmiştir (Kappeng ve Pathom-Aree, 2009).

Elma sirkesiyle yapılan bir çalışmada izole edilen asetik asit bakterilerinin türleri *A. pasteurianus*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus* ve *Ga. xylinus* olarak belirlenmiştir. 2010 yılında yapılan bu çalışma elma sirkesi fermantasyonundan *Gluconacetobacter* cinsinin sorumlu olduğunu gösteren ilk çalışma olarak bildirilmiştir. Bunun sebebi ise elde edilen izolatların % 35,3’ünü *Ga. europaeus* ve *Ga. xylinus* türlerinin oluşturmasıdır (Fernández-Pérez, vd., 2010a).

Çizelge 2.3. AAB'nin sınıflandırılması (Yamada, vd, 2012).

Cins	Tür	Cins	Tür
<i>Acetobacter</i>	<i>A. cerevisiae</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>
	<i>A. malorum</i>		<i>Ga. johannae</i>
	<i>A. orleanensis</i>		<i>Ga. diazotrophicus</i>
	<i>A. indonesiensis</i>		<i>Ga. liquefaciens</i>
	<i>A. cibirongensis</i>		<i>Ga. sacchari</i>
	<i>A. orientalis</i>	<i>Komagatabacter</i>	<i>K. saccharivorans</i>
	<i>A. senegalensis</i>		<i>K. xylinus</i>
	<i>A. tropicalis</i>		<i>K. intermedius</i>
	<i>A. estunensis</i>		<i>K. sucrofermentans</i>
	<i>A. oeni</i>		<i>K. nataicola</i>
	<i>A. aceti</i>		<i>K. swingsii</i>
	<i>A. nitrogenifigens</i>		<i>K. europaeus</i>
	<i>A. pomorum</i>		<i>K. rhaeticus</i>
	<i>A. pasteurianus</i>		<i>K. oboediens</i>
	<i>A. peroxydans</i>		<i>K. hansenii</i>
	<i>A. fabarum</i>	<i>K. kombuchae</i>	
<i>A. lovaniensis</i>	<i>K. entanii</i>		
<i>A. ghanaensis</i>	<i>Asaia</i>	<i>As. krungthepensis</i>	
<i>A. syzygii</i>		<i>As. bogorensis</i>	
<i>Gluconobacter</i>		<i>G. japonicus</i>	<i>As. lannensis</i>
		<i>G. frateurii</i>	<i>As. prunellae</i>
		<i>G. thailandicus</i>	<i>As. spathodeae</i>
		<i>G. wancherniae</i>	<i>As. siamensis</i>
		<i>G. cerinus</i>	<i>As. platycodi</i>
		<i>G. roseus</i>	<i>As. astilbes</i>
	<i>G. oxydans</i>	<i>Neokomagataea</i>	<i>Ne. tanensis</i>
	<i>G. kanchanaburiensis</i>		<i>Ne. Thailandica</i>
<i>G. albidus</i>	<i>Tanticharoenia</i>		<i>T. sakaeratensis</i>
<i>G. sphaericus</i>		<i>Am. chiangmaiensis</i>	
<i>G. kondonii</i>		<i>Ko. baliensis</i>	
<i>Saccharibacter</i>	<i>S. floricola</i>	<i>Ameyamaea</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>
<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. Salitolerans</i>	<i>Kozakia</i>	<i>Ac. methonolica</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>	<i>Granulibacter</i>	
<i>Acidocella</i>	<i>Acidocella facilis</i>	<i>Acidomonas</i>	

Asetik asit bakterilerinin tanımlanması için DNA ve rRNA hibridizasyon yöntemleri, dizi analizleri ya da PCR yöntemleri (RAPD-PCR, PCR-DGGE) gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. 2005 yılında Dellaglio vd., tarafından yapılan

çalışmada elma suyundan 2 yeni tür belirlenmiş; *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. ve *Ga. rhaeticus* sp. nov. olarak adlandırılmıştır. DST GL02T ve DST GL01T kodlu bu iki izolatın fenotipik ve kemotaksonomik özelliklerine bakılmasından sonra 16S rRNA gen dizilimi yöntemi ile *Gluconacetobacter* cinsine ait 2 yeni tür olduğu saptanmıştır.

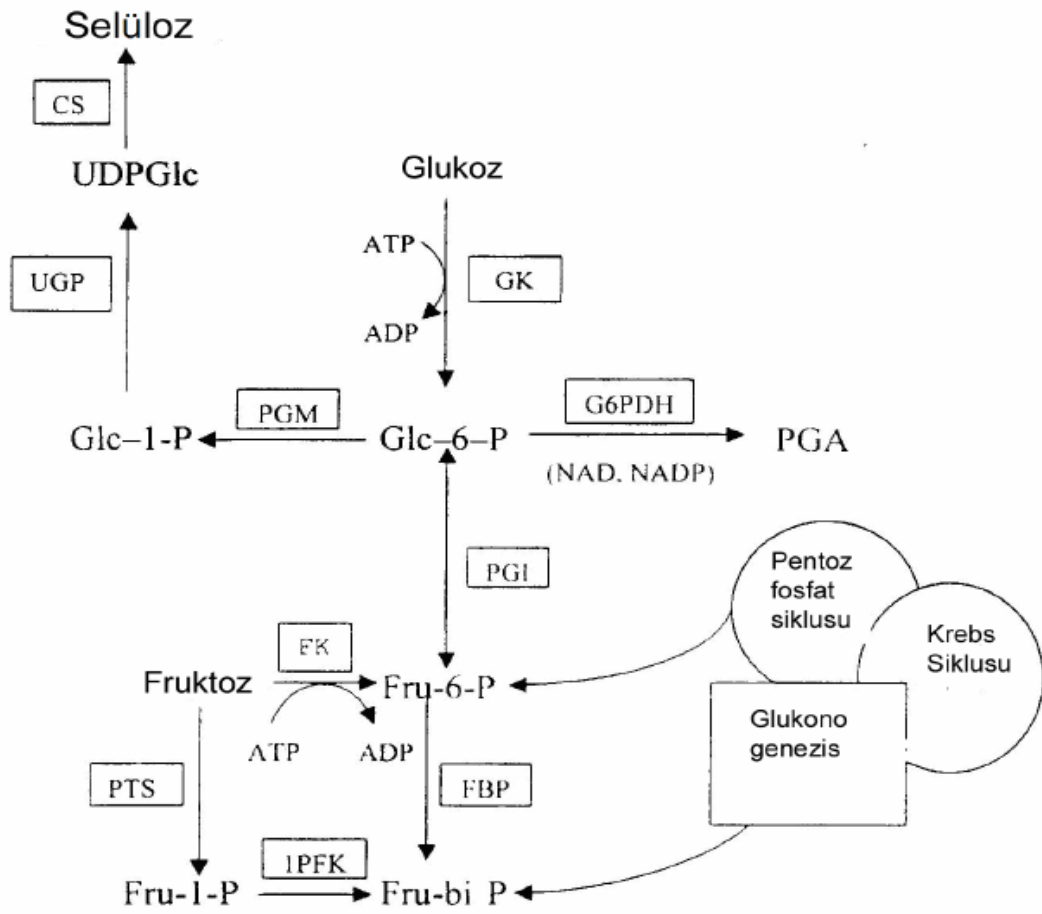
De Vero ve Giudici (2008) sirke kullanarak yaptığı çalışmada PCR-DGGE moleküler tekniği ile elde edilen izolatların *Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* cinsleri olduğunu tanımlamıştır.

2.5. Bakteriyal Selülozun Biyosentezi

Bakteriyel selülozun biyosentezi temelde 4 basamaktan oluşmaktadır. Bu basamakların her kısmında çok sayıda özel enzim, katalitik ve düzenleyici protein kompleksleri yer almaktadır (Chawla, 2009). Biyosentez işlemi glukozun, üridin difosfoglukoz (UDPGlc)'a sentezini de içerir ve ardından β -1,4 glukoz zincirine polimerizasyonu ile devam etmektedir. Olgunlaşmamış β -1,4 glukoz zincirleri bir araya gelerek şeride benzeyen karakteristik şekilli yapıya dönüşür. Bunların da yüzlercesi veya binlercesi bir araya gelerek selüloz zincirlerini oluşturur (Bielecki, vd., 2001). Burada UDPGlc, selüloz sentezinin öncü maddesidir (Ross, vd., 1991).

- Birinci basamak: Glukoz, glukokinaz enzimi ile glukoz-6-P'a katalizlenir.
- İkinci basamak: Glukoz-6-P, fosfoglukomutaz enzimi ile glukoz-1-P'a dönüşür.
- Üçüncü basamak: Glukoz-1-P, UDPGlc pirofosforolaz enzimi ile UDPGlc'ye katalizlenir.
- Dördüncü basamak: UDPGlc, selüloz sentaz enzimi yardımıyla selüloza dönüşür (Ross, vd., 1991; Holmes 2004; Krystynowics, vd., 2005)

Gluconoacetobacter xylinum'da karbon metabolizması Pentoz fosfat döngüsü, Krebs döngüsü ve Glikoneogenez ile bağlantılıdır. Karbonhidratların oksidasyonu için Pentoz Fosfat Döngüsü ve organik asitlerle buna bağlı ürünlerin oksitlenmesinde ise Krebs Döngüsü rol alır. Selüloz, karbon metabolizmasının son ürünüdür. *Gluconoacetobacter xylinum*'da fosfofruktokinaz enzimi bulunmamaktadır. Bu nedenle glikoliz gerçekleşmez yani anaerobik şartlarda glukoza metabolize edememektedir. Okzaloasetat dekarboksilaz enziminin farklı düzenlenmesiyle *Gluconoacetobacter xylinum*'da glikoneogenez gerçekleşmektedir (Ross, vd., 1991).



Şekil 2.8. *Ga. xylinum*'da karbon metabolizması. CS, selüloz sentaz; UGP, UDPGlc pirofosforilaz; UDPGlc, üridin difosfoglukoz; Glc-(1)-P, glukoz-1-fosfat; PGM, fosfoglukomutaz; Glc-(6)-P, glukoz-(6)-fosfat; G6PDH, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; PGA, fosfoglukonik asit; GK, Glukokinaz; PGI, fosfoglukoizomeraz; Fru-6-P, fruktoz-6-fosfat; FBP, fruktoz 1-6-bifosfat fosfotaz; Fru-bi-P, fruktoz-1,6-bifosfat; FK, fruktokinaz; 1PFK, fruktoz-1-fosfat kinaz; PTS, fosfotransferaz sistemi (Bielecki, vd., 2001).

Bazı türler ise karbon kaynağı olarak fruktozu kullanırlar ve burada fosfoglukoizomeraz yüksek aktivite gösterir. Fruktoz, fruktoz-1-fosfata ve sonra fruktoz-1,6-bifosfata katalizlenir (Bielecki, vd., 2001).

Selüloz sentezinde UDPG-pirofosforilaz (UGP) önemli role sahip enzimlerden birisidir. UDPG-pirofosforilaz varlığında oluşan UDPGlc, selüloz sentaz enzimi tarafından substrat olarak kullanılır. Cel⁻ (selüloz üretmeyen fenotip) mutantlarla yapılan

çalışmalar, bu fenotiptekilerin UDPG-pirofosforilaz enzimine sahip olmadıklarını göstermiştir. Bu sayede UDPG-pirofosforilazın glikoz nükleotitlerini parçalayıcı aktivite gösterebilen tek enzim olduğu belirlenmiştir (Valla, vd., 1989).

2.6. Bakteriyal Selüloz Üretim Yöntemleri

Bakteriyal selüloz üretiminde hangi yöntemin kullanılacağı elde edilecek biyopolimerin kullanılacağı alana bağlıdır. Kullanılan üretim yöntemine ve fermentör çeşidine göre üretilen selülozun yapısı, mekanik ve fiziksel özellikleri değişiklik göstermektedir. Statik (durgun) kültür ve çalkalamalı kültür yöntemleriyle bakteriyal selüloz sentezi gerçekleştirilir. Ayrıca bakteriyal selüloz sentezinin daha iyi optimizasyonu ve daha kolay kontrolü için özel fermentörler; yatay fermentörler, dönen disk reaktörleri, dönen biyofilm kontaktörler(RBC), spin filtre donanımlı biyoreaktörler, silikon membranlı reaktörler, küresel kabarcık sütunlu (Fluidized Bed) biyoreaktörü ve hava kaldırmalı reaktörler kullanılabilmektedir (Yoshino, vd., 1996; Krystnowicz, vd., 2002; Kim, vd., 2007; Jung, vd., 2007).

2.6.1. Statik kültür

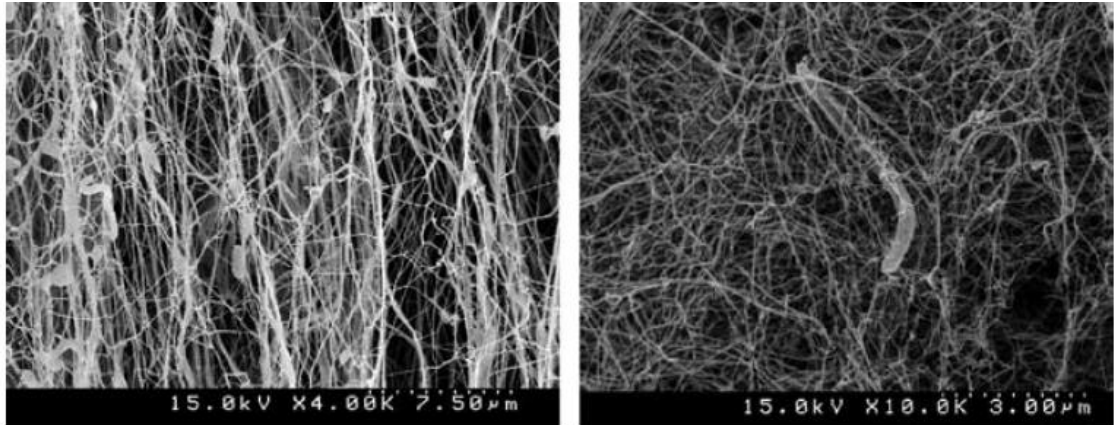
Statik kültürde bakteriyal selüloz üretimi, kültür ortamının yüzey/hacim oranına bağlıdır. Burada kültür ortamının yüzeyinde zar şeklinde selüloz oluşumu gerçekleşir. Kuvvetli hidrojen bağlarına ve paralel konumda glukoz zincirlerine sahip yapıdaki selüloz I oluşumu durgun kültürde daha çok gözlemlenmektedir ve burada selülozun kristallenme indeksi diğer yöntemlere göre daha yüksektir (Bielecki, vd., 2001; Krystnowicz, vd., 2002; Sun, vd., 2005; Hornung, vd., 2006).

Statik kültürle üretim uygulaması kolay ve çok tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen birçok dezavantajı da vardır. Statik-batık kültürde oksijen akımı istenilen şekilde sağlanamamaktadır ve fermentasyon sıvısının viskozitesinde artış olmaktadır. Kültür ortamı yüzeyinde zar şeklinde selüloz oluşumu besi yerine yeteri kadar oksijenin geçişine izin vermemekte bu da yüzeyin altındaki hücrelerin zamanla ölmesine neden olmaktadır. Diğer bir sorun ise kültür ortamı pH kontrolünün sağlanmasıdır. Kültür ortamında glukonik asit veya laktik asit birikmesi nedeniyle pH'ın düşmesi mikrobiyal büyümeyi ve selüloz oluşumunu olumsuz etkileyecektir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için ortama asetik asit ilave edilmiştir. *Acetobacter spp.* asetik asidi karbondioksit ve suya parçalaması sonucunda pH düşmemiş, 5,5 olarak sabit kalmıştır (Watanabe, vd., 1998).

Statik kültürde sıvı yüzeyinde sınırlı oranda pellic oluşumu olmasından dolayı selüloz sentezi sırasında ortam hareket ettirilmemelidir bu da kontrolün sürekli olmasını engellemektedir. Bunlara ek olarak statik kültürle üretimde ölçek büyütme ve fermentasyon süresinin uzun olması problemleriyle de karşılaşılmaktadır. Günümüzde statik kültür çalışmaları yaygın olarak devam etmekte, dezavantajlar giderilmeye çalışılmakta ve bu yöntemle ticari selüloz ürünleri üretilmektedir (Bielecki, vd., 2001, Krystnowicz, vd., 2002; Shoda ve Sugano, 2005; Kongruang, 2008).

2.6.2. Çalkalamalı kültür

Çalkalamalı kültürle üretim kullanılmaya ilk başlandığı zaman selüloz üretimi için elverişli olmamıştır. Çalkalamalı kültür sırasında spontan mutasyonlar nedeniyle ya da selüloz üretmeyen (Cel^-) hücrelerin, selüloz üreten hücrelere (Cel^+) baskın gelmesi nedeniyle selüloz üretiminde kayıplar yaşanmıştır. Bu da statik yönteme kıyasla selüloz veriminin daha düşük olmasına neden olmuştur (Johnson ve Neogi, 1989; Vandamme, vd., 1998). Ancak araştırmacılar çalkalamalı kültürler için uygun olan suşları izole etmeyi başarmışlardır; bunlardan ilki de kirazdan izole edilen *Acetobacter xylinum* BPR2001 adlı izolattır. Ardından 2003 yılında Son ve arkadaşları sirkeden izole ettikleri *Acetobacter sp.* V6 izolatının 200 rpm hızında çalkalamalı kültürde selüloz üretim yeteneğini kaybetmediğini kanıtlamışlar (Tsuchida ve Yoshinaga 1997; Son, vd., 2003).



(a)

(b)

Şekil 2.9. Statik kültür (a) ve çalkalamalı kültür (b) ile üretilen bakteriyel selülozun SEM görüntüleri (Czaja, vd., 2004).

Statik yöntemde elde edilen zar yapısındaki selülozun aksine çalkalamalı kültürde karıştırıcının etkisiyle düzensiz yapıda, lifli kürecikler şeklinde selüloz oluşur. Çalkalamalı kültürde selüloz mikrofibrilleri daha ince ve polimerizasyon derecesi daha düşüktür. Lifli yapının besiyeri viskozitesini arttırması, oksijenin homojen olarak iletilmemesine neden olması yöntemin dezavantajlarından bazılarıdır. Yüksek karıştırma gücü enerji maliyetini artmasına neden olacaktır. Kültür sıvısı viskozitesinin düşürülmesi için de besiyeri alanı ile karıştırıcı gücü arasındaki fark en aza indirgenmelidir. Homojen karıştırma ve oksijen iletiminin sağlanması için karıştırıcının şekli, yeri ve gücü çok önemlidir. Bu sebeplerden dolayı ve selüloz üretim kontrolünün daha iyi sağlanması için özel fermentörler geliştirilmiştir (Kouda, vd., 1997; Watanabe, vd., 1998; Jung, vd., 2005; Chawla, vd., 2009).

2.6.3. Fermentör çeşitleri

Çizelge 2.4. Bakteriyal selüloz üretiminde kullanılan reaktörler ve karşılaştırılması.

Reaktör türü	Avantaj	Dezavantaj	Kaynak
Dönen disk reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu, aerobik bakteriler için uygun	Sürekli üretim olmadığından kontaminasyon riski yüksek	(Krystynowicz, vd., 2002)
Dönen biyofilm kontaktör (RBC)	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verim, ürünün ayrışmasında kolaylık	Büyük ölçekli üretim kısıtlı	(Hofinger, vd., 2011)
Karıştırmalı reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verim, uzun süreli üretim	Hücrelerde yüksek direnç, daha fazla karıştırma gereksinimi	(Chao, vd., 2001(a); Noro, vd., 2004; Jung, vd., 2007; Zinnanti, vd., 2009; Cheng, vd., 2011)
Küresel kabarcık sütunlu reaktör	Uzun süreli üretim ve homojen parçacık karışımı; düşük direnç	Yüksek enerji maliyeti ve biyofilm oluşturma süresi	(Song, vd., 2009)
Hava kaldırmalı reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verim, düşük direnç	Biyofilm oluşturma süresi	(Chao, vd., 1997, 2000, 2001b; Noro, vd., 2004; Zuo, vd., 2006; Cheng, vd., 2009)

Bakteriyal selülozun en yüksek verimle üretilmesi ve kontrolünün iyi bir şekilde sağlanması için çeşitli özel fermentörler de geliştirilmiştir. Dönen disk reaktörlerde, yarısı besiyerine batırılmış yarısı havayla etkileşim halinde olan ve motor yardımıyla dönen disklerden oluşan bir yatak bulunur. Diskler döndükçe disklerin besiyerine ve atmosfere armaruz kalan yüzeyi sürekli olarak değiştirir. Burada disk yüzeyine inoküle olan

hücreler besiyeri kısmından gerekli nutrientleri, atmosfer kısmından da ihtiyaç duyduğu oksijeni alarak selüloz üretimini gerçekleştirir. Ayrıca burada selüloz zarına zara verilmeden besiyerinden kolaylıkla örnek alınıp kontrol altında tutulabilmektedir (Krystnowicz, vd., 2002; Mormino ve Bungay, 2003).

Dönen biyofilm kontaktör (RBC), yatay bir şaft üzerine monte edilmiş bir dizi dairesel diskten oluşur. Burada da diskler döndürülürken ekimi yapılan hücreler hem besiyeriyle hem de havayla temas halindedir. Diğerlerine kıyasla hücreler dönerken daha az kayma gerilmesine maruz kalırlar ve oksijen transfer sistemi burada daha iyidir (Kim, vd., 2007).

Hava kaldırmalı reaktörler ölçek büyütmenin rahatlıkla yapılabilmesi, karıştırıcı olmaması sayesinde enerji maliyetinin ve kesme geriliminin düşük olması nedeniyle selüloz üretiminde tercih edilen reaktörler arasındadır. Viskozitesi yüksek yani akışkan olmayan besiyerlerinin kullanımı için uygun olmaması dezavantajlarından birisidir (Chao, 2000; Chao, 2001).

2.6.4. Sürekli kültür

Bakteriyal selüloz sürekli ve statik koşullar altında da üretilebilir. Küçük ya da büyük tepsilerdeki Hestrin-Schramm besiyerine 28 °C’de inoküle edilen *A. xylinum* 2 gün inkübasyondan sonra yüzeyde pellik oluşturur. Pellik toplanıp bakteri hücre duvarını denatüre etmek için tamamen sodyum dodesil sülfattan (SDS) geçirilir. Ardından pellik 35 mm h⁻¹ hızla dönen bir silindire koyulur ve optimum şartların korunması amacıyla her 8-12 saatte bir ortama taze Hestrin-Schramm besiyeri eklenir ve bu işlem birkaç hafta boyunca devam eder. 2-3 günlük inkübasyondan sonra pellik oluşumu başlar ve filament çekme kuvveti daha güçlü bakteriyal selüloz elde edilir (Sakairi, vd., 1998; Bielecki, vd., 2001).

2.7. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması

Fermentasyon sonrasında elde edilen bakteriyal selüloz, hücre ya da ortam bileşeni kalıntısı içerdiği için saf değildir. Genellikle besiyeri sıvısından kazanılan işlenmemiş selüloza bağlı hücreler bulunacağı için verim yorumlaması yapılırken buna dikkat edilmelidir. Sodyum, potasyum hidroksit, sodyum klorat, seyreltilmiş asitler, H₂O₂, organik çözücüler ya da sıcak su gibi çok farklı ajanlar tek başlarına ya da bileşik halinde bakteriyal selülozun tamamen saf hale getirilmesi için kullanılabilir (Yamanaka, vd.,

1990; Bielecki, vd., 2005). Kùltür ortamından bakteriyal selülozun saflaştırılmasında en yaygın olarak kullanılan yöntem şu şekildedir:

Pellik, 4000 xg'de 20 dakika santrifüj edilerek fermentasyon sıvısından toplanır



Kalan besiyerini uzaklaştırmak için deiyonize su ile yıkanır



Bakteri hücrelerinden arındırmak için 80 °C'de 0.1 M NaOH ile 20 dak muamele edilir



NaOH solüsyonu filtre edilir ve ardından pellik %5 asetik asit ile nötralize edilir



Deiyonize su ile yıkanır



Saflaştırılan bakteriyal selüloz hava/ısı/dondurarak kurutulur (Bielecki, vd., 2005)

2.8. Bakteriyal Selüloz Üretimine Etki Eden Faktörler

Bakteriyal selüloz üretimini etkileyen faktörler arasında besiyeri içerikleri, çevresel koşullar ve yan ürünlerin oluşumu vardır. Genellikle yüksek karbon ve sınırlı oranda nütrient içeren (genellikle azot) besiyerleri polisakkarit üretimi için uygundur. Yüksek verimli polisakkarit fermentasyonu, kullanılan karbon kaynağının %60-80'inin ham polimere dönüşmesine dayanır. Ortamın optimum içerik ve şartlarda tasarlanması mikroorganizmanın gelişimi için çok önemlidir ve bu durum ürün oluşumunu da teşvik eder. Mikroorganizmanın gelişimi için gerekli nütrientler; karbon, azot, fosfor, kükürt, potasyum, magnezyum tuzlarıdır ve gelişimini etkileyen çevresel koşullar; sıcaklık, pH, fermentasyon süresi, çözünmüş oksijen miktarıdır (Ramana, vd., 2000; Shoda ve Sugano, 2005). Bazen hücre gelişimini ve üretimi arttırmak için amino asit ve vitamin içerikli kompleks besiyerleri de kullanılmaktadır (Matsuoka, vd., 1996).

2.8.1. Karbon kaynağı

Bakteriyal selüloz üretiminde en önemli faktör karbon kaynağıdır (Bielecki, vd.,2001). Karbon kaynağı olarak en çok glukoz ve sükroz kullanılmasının yanında fruktoz, maltoz, nişasta, ksiloz benzeri karbohidratlar ve gliserolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalar da yapılmaktadır (Masaoka, vd., 1993).

Ishihara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *A. xylinum* IFO 15606 tarafından ürettikleri bakteriyal selülozda karbon kaynağı olarak ksiloz kullanmış ve 3.0 g/L'lik bir verim elde etmişlerdir (Ishihara, vd., 2002). *A. xylinum* NCIM 2526 izolatından bakteriyal selüloz üretimi için en uygun karbon kaynaklarının glukoz, sukroz ve mannitol olduğu bulunmuştur (Ramana, vd., 2000). Kombuçadan izole edilen *Gluconacetobacter xylinus* suşuyla maksimum bakteriyal selüloz üretimi karbon kaynağı olarak mannitol kullanıldığında elde edilmiştir (Nguyen, vd.,2008).

Acetobacter xylinum ATCC 10245 izolatı kullanılarak farklı karbon kaynaklarının selüloz membran üretim verimliliklerine bakılmıştır. Karbon kaynağı olarak glukoz, gliserol, arabinoz, etanol, ksiloz, galaktoz, laktoz, fruktoz, galaktoz, fruktoz, mannoz, ramnoz, sorboz, methanol, inositol kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda dört ana karbon kaynağının verimlilikleri hesaplanmış ve ilave edilen substrat miktarına göre en yüksek bakteriyal selüloz verimi %28.7 ile gliserolde bulunmuştur (Keshk ve Sameshima, 2005).

2.8.2. Azot kaynağı

Azot, hücre metabolizması için gerekli olan proteinlerin ana bileşenidir ve bakteri kuru hücre kütlelerinin %8-14'ünü oluşturur. Çeşitli azot kaynaklarının bakteriyal selüloz üretimi üzerindeki etkisine bakıldığında *A. xylinum* için; kazein hidrolizat 5 g/L'lik bir verim ve pepton 4.8 g/L'lik bir verim vermiştir (Ramana, vd., 2000).

Yeast ekstrakt konsantrasyonlarının farklı karbon ortamlarında bakteriyal selüloz üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ortamdaki yeast ekstrakt konsantrasyonu 5-60 g/L aralığında ve karbon kaynağı 20 g/L iken maksimum bakteriyal selüloz verimi (6.7 g/L) yeast ekstrakt konsantrasyonu 40 g/L iken elde edilmiştir (Yang, vd., 1998).

2.8.3. Sıcaklık

Sıcaklık hem büyümeyi hem de üretimi etkileyen önemli bir parametredir. Maksimum bakteriyal selüloz üretimi için polimerizasyon derecesinin (DP) ve su tutma

kapasitesinin en iyi olduğu optimum sıcaklık 28 - 30 °C olarak gösterilmiştir (Wlochowicz, 2001; Hestrin ve Schramm, 1954). *Acetobacter sp. A9* izolatında 20 °C ile 40 °C arasında selüloz üretimindeki değişim incelenmiştir. Sonuca göre 25 °C' in altında herhangi bir selüloz üretimi olmazken, 35 °C' in üstünde ise selüloz veriminde azalma olduğu tespit edilmiştir (Son, vd., 2001).

2.8.4. pH

Bakteriyel selüloz üretimi için kültür ortamının optimum pH değeri 4.0-6.0 aralığında olup pH 4.0'ün altında selüloz verimi düşmektedir. Üretim boyunca pH'ın optimum aralıkta tutulması önemlidir çünkü fermentasyon sırasında ortamda glukonik asit, laktik asit veya asetik asit birikmesi nedeniyle pH değeri düşmektedir (Masaoka, vd., 1993; Kongruang, 2008).

Bakteriyel selüloz üretim sürecinde besiyerinin inkübasyon başlangıcında ve sonrasında pH değişimi incelenmiştir. Karbon kaynağı olarak özellikle glukozun kullanıldığı besiyerlerinde ortamda glukonik asit birikmesinden dolayı pH 3,9'a kadar düşmektedir ve selüloz üretimi de doğrusal olarak azalmaktadır. Yapılan çalışmada ortama liginosülfonat ilave edildiğinde glukonik asit birikiminin azaldığı, pH değerinin düşmediğı ve bakteriyel selüloz üretiminin arttığı görülmüştür. Bu durum liginosülfonatta antioksidan ve polifenolik bileşiklerin varlığından dolayı glukonik asit oluşumunun engellenmesine dayandırılmıştır. (Keshk ve Sameshima 2005).

2.8.5. Çözünmüş oksijen

Bakteriyel selüloz üretiminde ortamdaki çözünmüş oksijen miktarı önemli ve kısıtlayıcı bir faktördür. Ortamda çözünmüş oksijen miktarı yüksek olduğunda glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda glukonik asit birikimi artmakta ve selüloz üretim miktarı düşmektedir. Çözünmüş oksijen miktarının düşük olduğu ortamlarda ise kültürlerin gelişmesi için yeterli oran sağlanamadığı için üretim verimi düşmektedir. Yapılan çalışmalara göre en yüksek bakteriyel selüloz üretim verimi %10 oranında çözünmüş oksijen miktarında elde edilmiştir (Shirai, vd., 1994; Hwang, vd., 1999).

2.9. Bakteriyel Selülozun Uygulama Alanları

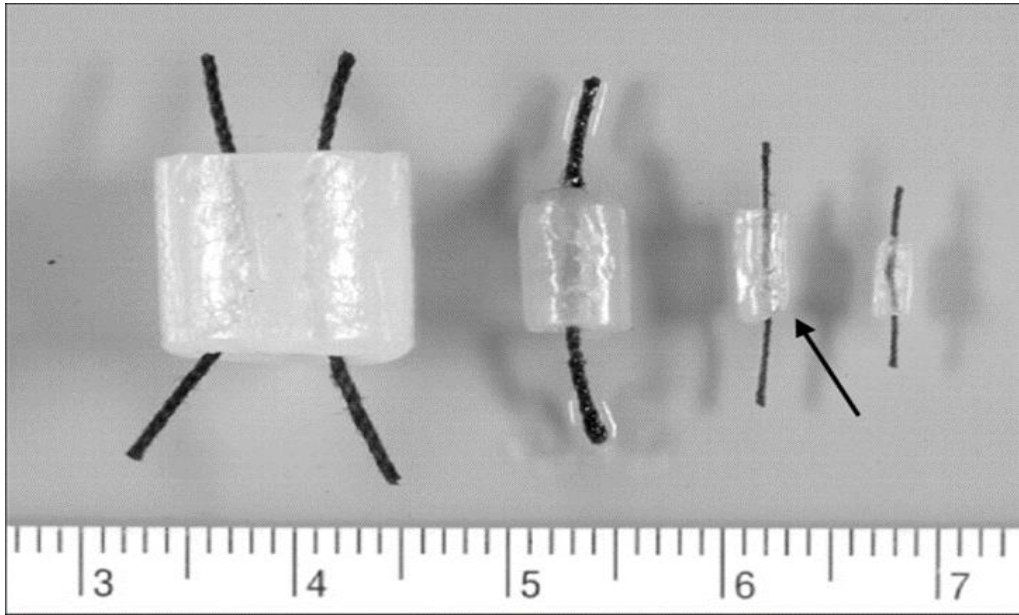
Bakteriyel selülozun kimyasal saflık, yüksek su tutma kapasitesi, dayanıklılığı, yüksek kristallenme derecesi, geniş yüzey alanı, bakteri strainlerinin ucuz atıklarda

gelişebilmesi gibi özelliklerinden dolayı çok çeşitli ticari uygulamaları yapılmaktadır (Legge, 1990; Shah ve Brown, 2005; Czaja, vd., 2006).

2.9.1. Tıbbi alanda uygulamaları

Durgun kültürde üretilen bakteriyel selüloz yüksek gerilme direnci sahip olması, yüksek gözenekliliği, mikrofibril yapısı, toksik olmaması, biyouyumlu olması, su adsorbladığı için nemli ortam sağlaması, steril edilebilmesi, kullanımının kolay olması sayesinde yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar, yanan bölgelerdeki ısıyı adsorblayarak acıyı, ağrıyı azaltır, yaranın dokuda yayılmasını ve enfeksiyon oluşmasını engeller (Bielecki, vd., 2001).

BASYC® (BActerial SYnthesized Cellulose), yapay kan damarı olarak kullanılmak üzere geliştirilmiş bir biyomalzemedir. Durgun kültürde cam tüpler iç içe konularak boru şeklinde bir üretim sağlanmıştır. Deneysel mikro cerrahide kullanılmak üzere hazırlanan BASYC® markalı tüpün iç yarıçapı 1mm, uzunluğu 5mm ve duvar kalınlığı 0.7mm'dir (Klemm, vd., 2001).



Şekil 2.10. BASYC®-farklı çaplara, farklı çeper kalınlıklarına ve farklı uzunluklara sahip tüpler (Klemm, vd., 2001).

Ortası çukur özellikteki bakteriyel selüloz fibrillerinin suni kan damarları ve üreterler olarak kullanılabileceği söylenmiştir (Yamanaka, vd., 1990). Köpeklerde aort

ve boyun damarlarının yerine antitrombik özelliğe sahip olan bakteriyal selüloz içeren suni damarlar kullanılmıştır. 1 aylık uygulamadan sonra bu suni damarlar çıkarılmış ve iç yüzeyde trombinin adhezyonunun durumuna bakılmış ve bakteriyal selüloz içeren kan damarlarının özelliğini kaybetmeden isleyişini koruduğu bildirilmiştir (Bielecki, vd., 2001).

Bakteriyal selülozun, yanık ve ülser tedavisinde kullanımı için geliştirilen ve bandaj olarak kullanılan diğer bir ürün Biofill®'dir. Acıyı alması, yarayı tamamen kaplaması, enfeksiyon riskini azaltması, ameliyat sonrası sorunları azaltması, iyileşme süresini kısaltması gibi çok önemli yararlarının yanında en büyük dezavantajı hareketli alanlarda uygulandığı zaman sınırlı esnekliğidir (Holmes, 2004).



Şekil 2.11. Yanık bir ele mikrobiyal selüloz uygulanması (Czaja, vd., 2006).

“Biofill Produtos Bioetecnologicos” şirketi *Acetobacter* suşu ile bakteriyal selüloz üretimini ve üretilen selülozun özelliklerini araştırarak yeni yara iyileştirme ürünlerini geliştirmiştir. Bu ürünlerden Bioprocess® ve Biofill®; 3.derecede yanıkların, ülserin tedavisinde ve deri transplantasyonun yapay deri olarak, Gengiflex®; diş eti dokusunun

geri dönüşümünde ya da hastalıklarının tedavisinde, Nexfill® yara ve yanıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Czaja, vd., 2007).

“Lohmann & Rauscher” şirketi, enfekte olmayan, hydrobalance yara örtü malzemesi Suprasorb® X ve efekte olan risk altındaki yaralar için %0.3 polihekzametilen biguanid içeren antimikrobiyal yara örtü malzemesi Suprasorb® X + PHMB ürünlerini geliştirmiştir. Bowil Biotech şirketi bakteriyal selülozu kullanarak CELMAT® Wound/Eye/Face ürününü sulu yara örtü malzemesi ve CELMAT® Wound/Eye/Face H ürününü sodyum hiyalüronat içeren yara örtü malzemesi olarak üretmiştir. Cerrahi yama biyomalzemesi olarak Securian® ve BioCelltrix ürünleri üretilmiştir (Czaja, vd., 2006; Ludwicka, vd., 2016).

XCell®’i antimikrobiyal yara örtü malzemesi olarak 2003 yılında Amerikada satışa sunulmuştur (Czaja, 2006). 18 ülser hastası üzerinde XCell® kullanılarak yapılan araştırmada 16 hastanın 13’ünde yarada büyük oranda iyileşme, 1 hastada tam iyileşme gözlenmiştir, 2 hasta uygulama prosedürüne uymadığı için değerlendirmeye alınmamıştır (Brown ve Punchello, 2003).

2.9.2. Gıda endüstrisinde uygulamaları

Kimyasal olarak saf olan bakteriyal selüloz yumuşak dokusu, yüksek lif içeriği, modifikasyonlara uyumluluğu gibi birçok özelliği sayesinde gıda endüstrisinde stabilize edici olarak, düşük kalorili tatlı (Nata de Coco), çerez ve şekerlemelerin üretiminde; dolgunluk verici ve kıvam arttırıcı olarak dondurma ve salata soslarının bileşiminde, ayrıca sosis benzeri gıdaların kaplanması gibi geniş bir kullanım alanı vardır (Dursun, vd., 2006; Akoğlu, vd., 2010)

Bakteriyal selüloz gıda endüstrisinde ticari olarak ilk kez Nata De Coco olarak Filipinlerde kullanılmıştır. Nata De Coco hindistan cevizi suyunun fermantasyonu sonucu oluşan şeffaf, kalın jel halindeki selülozun küp şeklinde kesilmesi ve sukrozlu şeker şurubuna batırılmasıyla hazırlanan bir tatlandırıcıdır (Sutherland, 1998). Ardından buna benzer diyet ürünü olarak kullanılan farklı meyvelerden, meyve sularından ve bitki özlerinden ürünler üretilmiştir. Nata De Pina ananastan üretilen bu ürünlerden biridir (Iguchi, vd., 2000).

Gıda endüstrisinde yapılan diğer bir çalışmada fermente Türk sucuğuna düşük yağ oranı ve standartlara uygun ürün elde etmek amacıyla bakteriyel selüloz ilave edilmiştir. Bakteriyel selüloz kullanımıyla yağ miktarı ve rutubet kaybı azaltılmıştır (Akoğlu, vd., 2010).

Kombuça çayından elde edilen bakteriyel selüloz içerikli başka bir gıda ürünü Chinese Kombucha'dır. Bu ürün çay ya da şeker ekstraktı fermentasyonu sonucunda gelişen asetik asit bakterilerinden üretilir. Fermentasyon sonunda yüzeyde oluşan pelliğin insan sağlığı için önemli etkileri olduğu belirlenmiştir (Iguchi, vd., 2000).

2.9.3. Kağıt endüstrisinde uygulamaları

Bakteriyel selüloz içerikli kağıtlar oldukça küçük selüloz mikrofibrillerinden oluştuğu için çokça direnç ve dayanıklılığa sahiptir. Bunların yanında dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmeleri, elastik, geçirgen ve suyu emme özelliğine de sahiptirler (Iguchi, vd., 1988; Ougiya, vd., 1997). Bakteriyel selüloz içerikli çok iyi mekanik dayanıma sahip birinci kalite kağıt elde edilebilmesiyle beraber bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle ancak ileri derecede özelliklere sahip özel kağıtların üretiminde bakteriyel selülozdan yararlanılabilmektedir.

Bakteriyel selülozun kağıt endüstrisindeki en önemli uygulamalarından biri de elektronik kağıt üretimidir. Elektronik kağıt, kullanılan klasik kağıdın kontrast ve yansıtıcılığının yüksek olması, esnek ve taşınabilir olması gibi optik özellikleriyle ve bilgisayar ekranlarının dinamik özelliklerinin bir araya getirilmesi amaçlanan üründür (Shah ve Brown, 2005). Elektronik kağıt üretimi için Brown ve Shah, bakteriyel selüloz katmanının içine dönüşümlü renk değişimi sağlayan elektronik boyayı eklemiştir. Daha sonra bu katmanı şeffaf elektrotların arasına yerleştirmişlerdir. Radyo sinyalleriyle gönderilen yazı ve grafikler elektrik akımının verilmesiyle elektronik kağıt üzerinde yazı ve grafiğe dönüştürülmektedir. Akım verilmeden önce düz beyaz bir kağıt gibi görünen sistem, elektrotlara elektrik akımı verilmesiyle boyanın rengi koyulaşır ve elektrik akımı kesildikten sonra da rengini korur. Ters akım uygulandığında ise renk açılarak tekrar renksiz hale döner. Düşük enerji tüketimi ve normal kağıttaki aynı görünümün elde edilmesi bu sistemin önemli avantajlarından (Shah ve Brown, 2005).

2.9.4. Diğer genel kullanım alanları

Kimyasal olarak pamuğa benzeyen selülozik nanoliflerden oluşan dokunmamış mikrobiyal (Microbial Non Woven -MNW) ürünler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Pamuğa kıyasla daha yüksek saflık ve yoğunlukta olması, yüksek su kapasitesi, şeklini koruması, yüksek gerilme kuvveti ve yaş halinde daha büyük yüzey alanına sahip olması gibi ayrıcalıkları vardır. Dokunmamış mikrobiyal ürünün yapısına ve fizikokimyasal özelliklerine göre tekstil, gıda, tıp, ilaç ve elektronik alanlarında kullanılması amaçlanmaktadır (Çobanoğlu, vd., 2013).



Şekil 2. 12. Mikrobiyal selülozdan oluşan dokunmamış ürünler. . A: Kültür ortamından mikrobiyal selülozun toplanması, B ve C: Selülozik materyalin yapı iskelesi üzerine alınması ve kurutulması, D: Beslenme ile kontrolü sağlayanabilen bir renk çeşitliliği E ve F: Şarap fermentasyonundan elde edilen elbise (Çobanoğlu, vd., 2013).

Bakteriyel selüloz akustik zar olarak da kullanılmaktadır. Burada bakteriyel selülozun yüksek ses hızı, yüksek içsel kayıp özellikleriyle beraber kendisine özel dayanıklılığı ses geçiren membran (kağıt diyafram) olarak kullanılmasını sağlamıştır. *Acetobacter acti* suşuyla üretilen bakteriyel selüloz kullanılarak Sony tarafından MDR-R10 isimli kulaklık üretilmiştir (Iguchi, vd., 2000).

Ayrıca ayırma işlemlerinde membran olarak, toksik maddelerin ortamdan absorplanarak uzaklaştırılmasında, biyokatalitlerin immobilizasyonunda, interferon, interlökin-1, sitostatik ve monoklonal antibiyotikleri üretmek için kullanılan hücre kültürlerinde, kozmetik sektöründeki kremlerde kullanılmak üzere bakteriyal selülozla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (Iguchi, vd., 2000).

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Bakteriyal selülozun üretimi, özellikleri ve uygulama alanları ile ilgili çalışmalar 1980'lerde başlamıştır ve günümüzde hala devam etmektedir. Ülkemizde de kısıtlı sayıda olmakla beraber bu alanda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Poyrazoğlu (2007), bakteriyal selüloz üretimi için *Acetobacter pasteurianus* ve *Acetobacter lovaniensis* suşlarını kullanmıştır. Karbon ve azot kaynağı, inkübasyon sıcaklığı ve pH değerlerini değiştirerek selüloz üretim verimini optimize etmeye çalışmıştır. Yaptığı çalışmada *Acetobacter pasteurianus* ile en yüksek %18 verime sahip bakteriyal selüloz üretmiş olup bakteriyal selüloz örneklerinin yapısını NMR ve FT-IR spektrofotometre analizleri ile incelemiştir.

Kaya (2007), çalışmasında durgun koşullarda *Acetobacter xylinum* (günümüzdeki adı *Komagataeibacter xylinus*) tarafından bakteriyal selüloz üretmiş ve farklı glukoz konsantrasyonlarında üretilen selüloz miktarıyla yağ asidi kompozisyonu arasında ilişki olup olmadığı belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmıştır.

Yılmaz (2007), farklı karbon kaynakları kullanarak statik koşullarda *Acetobacter xylinum* tarafından bakteriyel selüloz üretimiyle ilgili çalışmıştır.

Aydın ve Aksoy (2015), çalışmalarında çürük erikten izole ettikleri *Gluconacetobacter hansenii* P2A suşu ile hem statik hem de çalkalamalı koşullarda bakteriyal selüloz üretimini gerçekleştirmiş ve bu üretimin kinetik modellenmesini yapmışlardır.

Aşık (2016), farklı hacimlerdeki besiyerlerinin bakteriyal selüloz üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmasında statik koşullarda *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC® 23769™) suşuyla temel besiyeri olan Hestrin ve Schram (HS) ve havuç ilaveli besiyeri kullanarak üretim gerçekleştirmiştir.

Yapılan çalışmalar ve yıllara göre alınan bazı patentler EK 1' de verilmiştir.

4.MATERYAL VE METOTLAR

4.1. Materyal

4.1.1. Örnekler

Bu çalışmada bakteri izolasyonu amacıyla farklı bölgelerden toplanmış sirkeler materyal olarak kullanılmıştır. Kemal Kükreci Fabrikası'ndan üzüm sirkesi, İzmir Tariş'ten üzüm sirkesi, ev yapımı üzüm sirkesi, elma sirkesi, kiraz sirkesi, alıç sirkesi ve elma-üzüm karışımıyla yapılan sirke olmak üzere 8 farklı sirke örneğiyle çalışılmıştır. Bu amaçla izolatların sayısı ve bu izolatların elde edildiği sirke örnekleri çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Çalışmada kullanılan örnekler, kaynaklar ve izolat sayıları.

Örnek	Kaynak	İzolat Sayısı
Üzüm Sirkesi	Kemal Kükreci	46
Üzüm Sirkesi	İzmir Tariş	5
Üzüm Sirkesi	Karaman	15
Elma Sirkesi	Karaman	62
Elma Sirkesi	İzmir	37
Elma+Üzüm Sirkesi	Karaman	32
Kiraz Sirkesi	İzmir	20
Alıç Sirkesi	Sivas	16

4.1.2. Besiortamları

4.1.2.1. HS broth (Hestrin ve Schramm, 1957)

Glukoz	% 2
Yeast ekstrakt	% 0,5
Polipepton	% 0,5
Na ₂ HPO ₄	% 0,675
Sitrik asit	% 0,115

Distile su	100 ml
------------	--------

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerine, otoklavlandıktan sonra maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri izolatların bakteriyal selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.2.2. HS agar (Hestrin ve Schramm, 1957)

Glukoz	% 2
Yeast ekstrakt	% 0,5
Polipepton	% 0,5
Na_2HPO_4	% 0,675
Sitrik asit	% 0,115
Agar	% 1,5
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerine, otoklavlandıktan sonra maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri izolatların bakteriyal selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.2.3. HSM (modifiye besiortamı) (Hestrin ve Schramm, 1957)

Glukoz	% 2
Yeast ekstrakt	% 0,5
Kazein pepton + Meat pepton	% 0,25 + % 0,25)
Na_2HPO_4	% 0,675
Sitrik asit	% 0,115
Agar	% 1,5

Distile su	100 ml
------------	--------

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerine, otoklavlandıktan sonra maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri izolatların bakteriyal selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.2.4. Mannitol agar (Du Toit, 2002)

Mannitol	% 2,5
Yeast ekstrakt	% 1
Agar	% 1,5
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerine, otoklavlandıktan sonra maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri izolatların bakteriyal selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.2.5. Kalsiyum karbonat(CaCO₃)-Etanol besiortamı (Frateur, 1950)

Etanol	% 3
CaCO ₃	% 2
Yeast Ekstrakt	% 2
Agar	% 2
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri bakteri izolatlarının etanolü karbon kaynağı olarak kullanılabilirliğinin tespitinde kullanılmıştır.

4.1.2.6. Bromcresol green'li besiortamı (Carr, 1968)

Etanol	% 2
Yeast Ekstrakt	% 3
Bromcresol green	% 0,0022
Agar	% 2
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözdürüp pH'ı $6,0 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Etanol besiyerine otoklav işleminden sonra filtrelenerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri, asetik asit bakterilerinden *Acetobacter* ve *Gluconobacter* genuslarının birbirinden ayırt edilmesinde kullanılmıştır (Carr, 1968).

4.1.2.7. Nutrient broth

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak hazır alınan besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra pH $6,8 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri, biyokimyasal testlerde ve kültürel karakteristiklerin saptanmasında kullanılmak üzere mikroorganizmaların 24 saatlik kültürlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

4.1.2.8. Nutrient agar

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak hazır alınan besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra pH $6,8 \pm 0,1$ 'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri, biyokimyasal testlerde ve kültürel

karakteristiklerin saptanmasında kullanılmak üzere mikroorganizmaların 24 saatlik kültürlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

4.1.2.9. Karbohidrat fermentasyon ortamları (Tamer, vd., 1989)

Karbohidrat fermentasyon denemelerinde glukoz, sukroz, fruktoz ve laktoz' dan 5'er gram alınarak 1L Nutrient broth'a ilave edilmistir. Hazırlanan besiyerleri durham tüpü içeren tüplere dağıtılmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

4.1.2.10. Tripton broth

Tripton	10 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak hazır alınan besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri indol üretiminin saptanmasında kullanılmıştır.

4.1.2.11. Nutrient jelatin

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Jelatin	4 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak hazır alınan besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra pH 6,8± 0,1'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların, jelatinaz aktivitelerinin saptanmasında kullanılmıştır.

4.1.2.12. Nitrat broth

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
KNO ₃	1g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak hazır alınan besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra pH 7,0± 0,1'e (0,1M HCl) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyortamı nitrat redüksiyonunun saptanmasında kullanılmıştır.

4.1.2.13. Triptoz fosfat broth

Triptoz	20 g
Glukoz	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözümlü, pH'ı 7,3± 0,1'e (0,1M NaOH) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri katalaz testi için kullanılmıştır.

4.1.2.14. Triptoz fosfat agar

Triptoz	20 g
Glukoz	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözümlü, pH'ı 7,3± 0,1'e (0,1M NaOH) ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri katalaz testi için kullanılmıştır.

4.1.3. Kullanılan çözeltiler

4.1.3.1. Fizyolojik tuzlu su

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi, sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Tamer, vd., 1989). Bakteri izolasyonunda ve diğer bazı çalışmalarda seyreltme sıvısı olarak kullanılmıştır.

4.1.3.2. %20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol	20 ml
Distile su	80 ml

Gliserol ve distile su karıştırılıp 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Akçelik, 2000). İzolatların stoklanmasında kullanılmıştır.

4.1.3.3. α -Naftol çözeltisi

α -Naftol	5 g
Etanol (% 95)	100 ml

α -Naftol, etanolde çözülerek hazırlanmıştır. İzolatların nitrat indirgenmesi testinde kullanılmıştır.

4.1.3.4. Sülfanilik asit çözeltisi

Sülfanilik Asit	8 g
Glasiyal Asetik Asit	294 ml
Distile su	706 ml

Önce 294 ml glasiyal asetik asit ve 706 ml distile su karıştırılıp üzerine 8 g sülfanilik asit ilave edilmiş ve iyice çalkalanmıştır. İzolatların nitrat indirgenmesi testinde kullanılmıştır.

4.1.3.5. Kovaks ayıracı

Para-Dimetil Aminobenzaldehit	5 g
Amil veya Bütil Alkol	75 ml
Hidroklorik asit (% 37)	25 ml

Ticari olarak hazır alınan çözelti indol testi için kullanılmıştır.

4.1.3.6. % 3'lük H₂O₂ (% 30)

Hidrojen peroksit	10 ml
-------------------	-------

Distile su 90 ml

%30'luk hidrojen peroksitten 10 ml alınıp 90 ml distile su ile karıştırılarak katalaz testi için kullanılmıştır.

4.1.3.7. % 1'lik Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisi

Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid 1 g

Distile su 100 ml

1 g Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid, 10 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır (Tamer, vd., 1989). Oksidaz testinde kullanılmıştır.

4.1.3.8. % 5'lik Fenol çözeltisi

Fenol (katı) 5 g

Distile su 100 ml

5 g fenol, 100 ml distile suda çözülmüştür. Toplam şeker tayini için kullanılmıştır.

4.1.3.9. % 97'lik H₂SO₄

% 97'lik sülfürik asit, toplam şeker tayini için kullanılmıştır.

4.1.3.10. 10-100µg/ml'lik Glukoz standart çözeltileri

10,20,30,40,50,60,70,80,90,100 µg/ml'lik glukoz çözeltileri hazırlanmıştır. Toplam şeker tayininde standart eğrinin çıkarılmasında kullanılmıştır.

4.1.3.11. % 4'lük NaOH çözeltisi

NaOH 4 g

Distile su 100 ml

NaOH, distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Üretilen bakteriyal selülozun saflaştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.3.12. % 6'lık Asetik asit çözeltisi

Asetik asit 6 ml

Distile su 94 ml

Üretilen bakteriyal selülozun saflaştırılmasında kullanılmıştır.

4.1.3.13. TE tamponu

Tris-HCl (pH 8)	10 Mm
EDTA (pH 8)	1 mM
Distile su	100 ml

Tris-HCl ve EDTA, distile suda çözülerek hazırlanmıştır. DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

4.1.3.14. Solüsyon I çözeltisi

Sarcosyl	% 1
NaCl	0,5 M
SDS	% 1
Distile su	100 ml

Kimyasallar belirtilen oranlarda alınıp distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu solüsyon DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

4.1.3.15. P:C:I (25:24:1) çözeltisi

Fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ticari olarak hazır alınarak DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

4.1.3.16. Sodyum asetat çözeltisi (3M, pH 5,2)

Sodyum asetat	24,6 g
Distile su	100 ml

Sodyum asetat distile su içerisinde çözüldükten sonra pH 5,2'e ayarlanmıştır. Bu çözelti DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

4.1.3.17. İsopropanol

DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

4.1.3.18. % 70'lik Etil alkol

Etil alkol	70 ml
Distile su	100 ml

DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

4.1.3.19. RNase çözeltisi (20 µg/ml)

RNase	0,02 g
Distile su	1 ml

DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

4.1.3.20. % 1'lik Agaroz jel çözeltisi

Agaroz	0,40 g
Distile su	40 ml

Agaroz, distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. DNA ekstraksiyonu ve PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde incelenmesinde kullanılmıştır.

4.1.3.21. 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) buffer

Trizma base	48,4 g
EDTA	7,44 g
Asetik asit	11,42 ml

Trizma base ve EDTA tartıldıktan sonra belirtilen miktarda asetik asit eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

4.1.4. Kullanılan boyalar**4.1.4.1. Kristal vivolet boyası**

Kristal Violet	2 g
% 95'lik Etil Alkol	20 ml
Amonyum Oksalat	0,8 g
Distile su	80 ml

2 g kristal violet 20 ml % 95'lik etanolde çözülmüştür. Ayrı bir yerde 0,8 g amonyum oksalat 80 ml distile suda çözülür ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal violete ilave edilmiştir (Tamer, vd., 1989). Bakteri hücrelerinin Gram boyamasında kullanılmıştır.

4.1.4.2. Safranin boyası

Safranin	0,25 g
----------	--------

% 96'lık Etanol	10 ml
Distile su	100 ml

Safranin etanolde çözüldükten sonra distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır ve sonra filtre kağıdından süzülerek kullanılmıştır (Tamer, vd., 1989). Bakteri hücrelerinin Gram boyamasında kullanılmıştır.

4.1.4.3. İyodür (lugol) çözeltisi

İyot (I)	1 g
Potasyum iyodür (KI)	2 g
Distile su	1000 ml

Potasyum iyodür distile suda çözüldükten sonra üzerine iyot eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır (Tamer, vd., 1989). Bakteri hücrelerinin Gram boyamasında kullanılmıştır.

4.1.4.4. % 5'lik Malaşit yeşili boya çözeltisi

Malaşit Yeşili	5 g
Distile su	100 ml

Distile su içinde boya çözülerek hazırlanmıştır (Tamer, vd., 1989). Endospor boyamada kullanılmıştır.

4.2. Metotlar

4.2.1. Bakteri izolasyonu

Asetik asit bakterilerini izole etmek için kaynak olarak kullanacağımız sirke örneklerinin 6 tanesi ev yapımı olup 2 tanesi işlem görmemiş olarak fabrikadan alınmıştır. Örneklerin her birinden aseptik koşullarda 10'ar ml alınarak 250 ml'lik erlenlerde hazırlanan 90 ml Hestrin-Schramm (HS) Broth besiyerine inoküle edilmiştir. Besiyerine maya ve küf üremesini önlemek amacıyla 50 mg/l sikloheksimid eklenmiştir. Durgun koşullarda 30°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılarak zenginleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda iki farklı yöntem izlenerek izolasyon gerçekleştirilmiştir. İlk olarak besiyeri üzerinde oluşan pellik steril FTS solüsyonu içerisine alınıp vortekslenerek tamamen parçalanması sağlanmıştır. Parçalanmış pellik örnekleri steril FTS solüsyonu ile 10^{-3} 'e

kadar seyreltme yapılmıştır. Ardından her seyreltmeden 0,1 ml alınarak HS Agar, HSM Agar ve Mannitol besiyerlerine yayma plak yöntemine göre homojen şekilde dağılması sağlanarak ekim yapılmıştır. İkinci yöntemde ise pelik kısmı alınmadan inkübasyon süresi sonunda her örnekten 0,1 ml alınarak aynı (HS Agar, HSM Agar ve Mannitol) besiyerlerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Her iki yöntemde de ekimi yapılan örnekler 30°C’de 3-5 gün inkübe edildikten sonra oluşan koloniler incelenmiştir (Schramm, 1954; Johnson ve Neogi, 1989; Du Toit, 2002). Kolonilerden asetik asit bakterilerinin morfolojisine uyan beyaz-bej-krem renkli, yapışkan, düzgün kenarlı olanlar seçilmiştir. Saflıklarının kontrolü için tekrar ekimi yapıp emin olunduktan sonra saf izolatlar %20 gliserol içerisine alınarak -80°C’de saklanmıştır.

4.2.2. Bakteriyal selüloz üreten asetik asit bakterilerinin seçilmesi

Stoğu yapılan asetik asit bakterilerinin koloni morfolojisindeki, beyaz-krem-bej renkli, düzgün kenarlı, yapışkan ve 2,5-3mm çaplı kolonilere Gram boyama yapılmıştır. Boyama sonucunda gram negatif izolatlar seçilerek, (CaCO₃)-Etanol besiyerine ekilmiştir ve 30°C’de 3-7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinde asetik asit üretebilen türlerin ayrılması, kolonileri etrafında CaCO₃’ün çözünmesi sonucu şeffaf zonlar oluşturan izolatların seçilmesiyle sağlanmıştır (Sievers, vd., 2005). Seçilen izolatların bakteriyal selüloz üretim yetenekleri araştırılıp, karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 30 °C’de 48-72 saat boyunca HS Broth’lu tüplerde aktifleştirilen izolatların yoğunluğu vitek ile 10⁴e ayarlanmış ve ayarlanan izolatlardan 1 ml alınarak 250 ml’lik erlenlerde hazırlanan 100 ml HS besiyerine inoküle edilerek durgun koşullarda 30°C’de 10 gün inkübe edilmiştir. Besiyerinin üst kısmında pelik oluşup oluşmadığına bakılmıştır. Pelik oluşturan izolatlar, selüloz üreten izolatlar olarak kabul edilerek tanımlamak amacıyla biyokimyasal testlere tabi tutulmuş ayrıca ürettikleri selülozun analizi de yapılmıştır.

4.2.3. İzolatların tanımlanması

4.2.3.1. Kültürel özellikler

HS Agar’da 30°C’de 48-72 saatte geliştirilen izolatlar koloni morfolojisi ve renk bakımından incelenmiştir.

4.2.3.2. Morfolojik testler

A. Gram boyama

Gram boyama için preparat hazırlarken, HS Agar'da 24 saatte geliştirilen taze kültürler öze yardımıyla alınıp lam üzerine bir damla distile su ile yayılarak havada kuruması beklenmiş ve geleneksel Gram boyama yöntemi ile boyanmıştır. Sonra 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. İnceleme sonucuna göre mor renkte olanlar Gram pozitif, pembe-kırmızı renkte görünen bakteriler ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Tamer, vd., 1989).

B. Endospor boyama

Endospor boyamada izolatlar HS Agar'da 48–72 saat geliştirilmiştir. Kültürler öze yardımıyla alınıp lam üzerine bir damla distile su ile yayılarak havada kuruması beklenmiştir. Hazırlanan preparat tamamen kuruduktan sonra bek alevinden üç kez geçirilerek fikse edilmiştir. Ardından preparat üzerine malaşit yeşili ilave edilip sıcak su buharında 5 dakika bekletilmiştir ve distile su ile yıkanmıştır. Preparatlar 30-60 saniye safranin boyası ile boyanıp sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparatlar havada kurutulduktan sonra 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. İnceleme sonucunda yeşil renkli görünen kısımlar endospor, pembe olarak boyanan kısımlar ise hücrenin vejetatif kısmıdır (Öner, 1984).

4.2.3.3. Biyokimyasal testler

A. Katalaz testi

Katalaz testi bakterilerin katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını gösteren, ortamdaki hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrılması temeline dayanan bir testtir. HS Agar'da 30°C'de 24-48 saatte geliştirilmiş olan taze kültürlerin üzerine birkaç damla %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilerek gaz kabarcığı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Test sonucunda gaz kabarcığı oluşturan izolatlar katalaz pozitif, oluşturmazlar ise katalaz negatif kabul edilmiştir (Akçelik, vd., 2000).

B. Oksidaz testi

Nutrient agarda 24 saatte geliştirilen kültürler bir öze yardımı ile alınarak filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. Ardından filtre kağıdına taze olarak hazırlanan % 1'lik Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisinden birkaç damla damlatılmıştır. 10

saniye beklendikten sonra mavi-menekse bir renk oluşturan izolatlar oksidaz pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilmiştir (Tamer, vd., 1989).

C. İndol testi

İndol testi için HS Agar'da 30°C'de 24 saatte geliştirilen kültürlerden, Tripton broth'lu ortama inoküle edilmiştir. Bu tüpler 30°C'de 48 saat inkübasyondan sonra her tüpe 1ml kloroform ilave edilip tüpler iyice çalkalanmıştır. Ardından her tüpe birkaç damla kovaks çözeltisi damlatılmıştır. Tüplerin üzerinde oluşan kırmızı renk indol üretimi için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Öner, 1984; Tamer, vd., 1989).

D. Nitrat redüksiyonu

Nutrient Agar'da 24 saatte geliştirilen kültürler Nitrat Broth'lara inoküle edilmiştir. Kontrol olarak da bir tüp inoküle edilmeden bırakılmıştır. Tüpler 30°C'de 4-6 gün inkübasyona bırakılmıştır. İkinci günden itibaren test tüplerine steril koşullarda her kültürden ayrı ayrı 1'er ml aktarılarak üzerlerine 3 damla sülfanilik asit çözeltisi ve 2 damla α -naftol çözeltisi eklenmiştir. Ortamda nitrit varsa nitrit ile sülfanilik asit ve α -naftol çözeltileri karışımı pembe-kırmızı renkli bir bileşik oluşturarak nitrat redüksiyonu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer, vd., 1989).

E. Jelatin hidrolizi

Nutrient Agar'da 24 saatte geliştirilen kültürlerden Nutrient Jelatin içeren tüplere iğne öze ile dik ekim yapılmıştır. Tüpler 30°C'de 15 gün kadar inkübe edilerek bu süre sonunda buzdolabında 1-2 saat bırakılmıştır. Buzdolabından çıkartılan tüplerde jelatinin hidrolize edildiği durumlarda jelatinli ortamın sıvı halinde kalıp katılaşmadığı görülürse pozitif jelatin hidrolizasyonu, jelatinli besiyerinin katılaştığı durumlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer, vd., 1989).

F. Karbohidrat fermentasyonu

Karbohidrat fermentasyon denemelerinde karbon kaynakları olarak D(+) glukoz, laktoz, fruktoz, sukroz kullanılmıştır. HS Agar'da 30°C'de 48-72 saatte geliştirilen izolatlar indikatör olarak fenol içeren ve durham tüplerinin bulunduğu Nutrient Broth besiyerine inoküle edilerek 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda durham tüplerindeki gaz oluşumuyla beraber besiyeri renginin sarıya

dönmesi karbon kaynaklarının fermentasyonu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer, vd., 1989).

4.2.4. Bakteriyal selülozun üretimi, saflaştırılması ve üretim miktarının belirlenmesi

Selülozdaki mikroliflerin karşılaştırmalı olarak incelenebilmesi için statik yöntem ve karıştırmalı yöntemle iki şekilde üretim yapılmıştır (Shoda ve Sugano, 2005; Bae ve Shoda, 2005; Aydın ve Aksoy, 2015). Pellik oluşturarak selüloz ürettiği kabul edilen izolatlar, 5 ml HS Broth besiyerine ekilerek durgun koşullarda 48-72 saat 30°C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda izolatlardan 1 ml alınarak 250 ml’lik erlenlerde hazırlanan 100 ml HS besiyerine inoküle edilerek hem durgun koşullarda 30°C’de 10 gün hem de çalkalamalı ortamda 120 rpm 30°C’de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Fermentasyon tamamlanınca besiyeri yüzeyinde oluşan pellic uygun yöntemle toplanmış ve 3000 xg’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pellet distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra pellic 80°C’de 1 saat % 4’lük NaOH ile muamele edilmiştir. Bu adıma selülozun sıcak alkali işlemi denilebilir ve bu saflaştırma adımına dayanıklı olması sayesinde işlem sonucunda elde edilen ürün ortam bileşenlerinden ve bakteri hücrelerinden arındırılmış selüloz olarak kabul edilmiştir. Ardından % 6’lık asetik asit ile yıkanmıştır. Bakteriyal selülozun rengi tekrar açılıp, berraklaşana ve süzüntü nötral niteliğe ulaşana kadar distile su ile tekrar tekrar yıkanmıştır. Elde edilen bakteriyal selülozun üzerindeki fazla su eğimli bir düzlemde tutularak uzaklaştırıldıktan sonra yaş ağırlığı hassas terazide tartılmıştır. Yaş ağırlığı belirlenen bakteriyal selülozda karşılaştırma amacıyla iki farklı kurutma yöntemi denenmiştir. Yöntemlerin birinde -20°C’de bir gece dondurulmasından sonra liyofilize edilerek kurutulmuş ve kuru ağırlığı da hassas terazi ile belirlenmiştir (Ishihara, vd., 2002). Diğerinde ise 80°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilerek kurutulmuş ve yine kuru ağırlığı hassas terazi ile belirlenmiştir (Çetin, 2008).

4.2.5. Bakteriyal selülozun su tutma kapasitesinin belirlenmesi

Yaş ağırlığı ve kuru ağırlığı belirlenen bakteriyal selüloz numunelerinin Su Tutma Kapasitesi (STK) verilen (%) Eşitlik 4.1’e göre hesaplanmıştır (Shezad, vd., 2010) :

$$STK = \frac{BS \text{ yaş ağırlığı (g)} - BS \text{ kuru ağırlığı (g)}}{BS \text{ kuru ağırlığı (g)}}$$

(4.1)

4.2.6. Hücre kuru ağırlığının belirlenmesi

Fermentasyon sonunda hücre kuru ağırlığını belirlemek amacıyla pelliği toplanan fermentasyon sıvısı +4°C’de 4000 xg’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Darası ölçülmüş olan kaptaki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 80 °C’de bir gece kurutulmuştur. Hassas terazi ile tartılarak kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir (Gerhardt, vd., 1981; Tamer, vd., 1989).

4.2.7. Bakteriyal selülozun spesifik ürün verimi katsayısının belirlenmesi

Spesifik ürün verimi katsayısı, verilen (%) Eşitlik 4.2’ye göre hesaplanmıştır (Gerhardt, vd.,1994).

$$\text{Spesifik ürün verimi katsayısı } \left(\frac{Y_p}{x} \right) = \frac{\text{Bakteriyal selülozun kuru ağırlığı (mg)}}{\text{Hücre kuru ağırlığı (mg)}}$$

(4.2)

4.2.8. Bakteriyal selülozda toplam şeker analizi

Elde edilen bakteriyal selüloz numunelerinde toplam şeker analizi fenol-sülfirik asit yöntemi ile Dubois (1956) ve Kim (1994)’e göre yapılmıştır. Öncelikle glukoz standart eğrisinin çıkartılması için D(+) Glukoz stok çözeltisinden, 10-100 µg/ml aralığında glukoz içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan her glukoz çözeltisinden 1’er ml alınarak üzerlerine 1ml % 5’lik fenol çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Karışıma hızlıca 5 ml konsantre H₂SO₄ (%97) eklenerek 10 dakika bekletilip çalkalanmış ve 25-30°C’lik su banyosunda 15-20 dakika tutulmuştur. Ardından hazırlanan bu çözeltilerin absorbansı spektrofotometrede 470 nm’de ölçülmüş ve standart eğri çıkartılmıştır. Liyofilize edilmiş bakteriyal selüloz numuneleri ise 5 ml konsantre H₂SO₄ içinde çözülmüştür. Çözülen selülozdan belirli oranlarda seyreltme yapılmıştır. 1ml seyreltilmiş örneklerden alınarak glukoz çözeltilerine yapılan işlemlerin aynaları yapılmış

ve 470 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Çıkartılan standart eğriden yararlanılarak bakteriyal selülozlardaki toplam şeker miktarları saptanmıştır.

4.2.9. Bakteriyal selülozun SEM (taramalı elektron mikroskop) analizi

Liyofilize edilerek kurutulan ve etüvde kurutulan bakteriyal selülozun SEM görüntüleri için numuneler vakum uygulanarak altın ile kaplanmış ve analize hazır hale getirilmiştir. Analizler için ZEISS ULTRA PLUS marka taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır (Mohite ve Patil, 2014).

4.2.10. Bakteriyal selülozun element analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz örnekleri aynı miktarlarda tartılarak element analizi Anadolu Üniversitesi Spektroskopi Laboratuvarında VARIO ELIII ELEMENT ANALİZ CİHAZI (C, H, N, S) kullanılarak yapılmıştır (Klemm, vd., 2001; Yoon, vd., 2006; Castro, vd., 2012).

4.2.11. Bakteriyal selülozun CP/MAS 13C katı NMR analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz numunelerinin CP/MAS 13C Katı NMR Analizi ODTÜ Merkezi Laboratuvarı, AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi’nde yaptırılmıştır. Analiz için BRUKER BIOSPIN Ultrashield TM yüksek çözünürlüklü dijital 300 MHz NMR spektrometresi kullanılmıştır (Tokoh, vd., 2002; Hesse, vd., 2005; Mohite ve Patil, 2014).

4.2.12. Bakteriyal selülozun termo-gravimetrik (TG) analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz örneklerinin TG analizi Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde yapılmıştır. Analiz için Hitachi EX/TG/DTA 7300 markalı cihaz kullanılmıştır. Örnekler yeterli miktarda alınarak 30°-1000°C arasında sıcaklık artış hızı 30°C/dak, azot gazı kullanarak ve oksidasyonu önlemek amacıyla azot gazının akış hızı 50 ml/dak olacak şekilde ayarlanarak yapılmıştır (Mohite ve Patil, 2014).

4.2.13. Bakteriyal selülozun FT-IR analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz numunelerinin FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) analizi Perkin Elmer Spectrum 100 markalı FT-IR cihazı ile yapılmıştır. Yeterli miktarda liyofilize bakteriyal selüloz örneği potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak şeffaf görünümde küçük bir table halinde preslenmiştir. Analiz 4 cm^{-1}

çözünürlükte $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir (Mohite ve Patil, 2014).

4.2.14. Bakteriyal selülozun XRD analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz örneklerine XRD (x ışını difraksiyonu) analizi yapılmıştır. Kırınım diyagramları Bruker-D8 ADVANCE markalı cihaz kullanılarak alınmıştır. Çalışılan voltaj ve akım büyüklüğü sırasıyla 40 kV 40 mA'dir. Numuneler 5° - 50° 2θ aralığında $0,02^{\circ}/\text{dk}$ tarama hızında incelenmiştir (Mohite ve Patil, 2014).

4.2.15. Ribotiplendirme

Üç izolat da üretici firmanın [Riboprinter (Mikrobal Characterisation System, DuPont Qualicon, Wilmington; De)] önerdiği şekilde analize hazırlanmıştır.

- 1) Analiz edilecek örnekler HS agara ekilmiş ve 30°C 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.
- 2) İnkübasyon sonunda firmanın protokolü doğrultusunda 200 μl örnek solüsyonu bulunan tüplere HS agarda gelişen kültürlerden alınarak 5 saniye vortekslenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Tüp içerisindeki hücre yoğunluğunun az ya da çok olmamasına dikkat edilmiştir.
- 3) Bu süspansiyondan 30 μl alınarak cihazın kendi tüplerine aktarılmış ve 25 dakika ısıyla muamele edilmiştir.
- 4) Ardından her bir tüpe 5 μl lysing agent A ve 5 μl lysing agent B solüsyonlarından ilave edilmiş ve örnekler cihaza yüklenmiştir. Isıl işlem sonunda analiz başlamıştır.
- 5) 24-30 saat sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir.
- 6) Genetik parmak izi yöntemi kullanılarak EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilen kromozomal DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılmış, işaretli rRNA operon problemleri ile hibridize olmuştur. Bilgisayar ortamında kayıtlı referans marker fragmentleri ile izolatlardan elde edilen fragmentler karşılaştırılarak izolatların ribotipleri belirlenmeye çalışılmıştır.

4.2.16. 16S rRNA sekans analizi

4.2.16.1. Genomik DNA ekstraksiyonu (Sharma, vd., 2005)

- 1) Selüloz üreten seçilmiş izolatlar HS besiyerine ekilmiş ve 30°C 'de 48-72 saat inkübe edilmiştir.

- 2) Steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine 200 µl TE tamponu konulmuştur.
- 3) Steril tek kullanımlık öze ya da kürdan yardımıyla izolatlar santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 4) Santrifüj tüplerine 400 µl Solüsyon I ilave edilerek iyice karıştırılmıştır.
- 5) Tüplere 3 µl RNAse ilave edilerek 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 37°C'deki su banyosunda 10 dakika daha inkübe edilmiş ve 5 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır.
- 6) Tüplere eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve ters düz yapılarak yavaşça karıştırılmıştır.
- 7) 10.000 g'de 5 dakika 37°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alınmıştır.
- 8) 0,1 hacim 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 0,6 hacim soğuk isopropanol ilave edilerek 4-6 kez alt üst edilip yavaş yavaş karıştırılmıştır.
- 9) 10.000 g'de 5 dakika 37°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 10) Tüplere 1 ml soğuk %70'lik etanol ilave edilmiş ve 10.000 g'de 3 dakika 37°C'de santrifüj edilerek pellet yıkanmıştır.
- 11) Pellet havada kurutulduktan sonra 50 µl steril distile suda çözülmesi sağlanmıştır.
- 12) Elde edilen genomik DNA örneği agaroz jelde yürütülmek üzere -20°C'de saklanmıştır.

4.2.16.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve 16S rRNA genlerinin dizi analizleri

Ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'ların 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi için 27F ve 1492R primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri, miktarları ve primerler aşağıdaki gibidir:

•2,5 mM ileri primer	1 µl
•2,5 mM geri primer	1 µl
•Kalıp DNA	1 µl
•Nükleaz içermeyen steril distile su	9,5 µl
•2,5 mM dNTP mix	12,5 µl
Toplam reaksiyon hacmi:	25 µl

PCR koşulları:

Ön denatürasyon	94°C	3 dk
Denatürasyon	90 °C	30 sn
Bağlanma	55 °C	1 dk
Uzama	72 °C	2 dk
Son uzama	72 °C	10 dk

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan primerler.

Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')
27F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG
1492R	TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T

Genomik DNA örnekleri ve reaksiyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

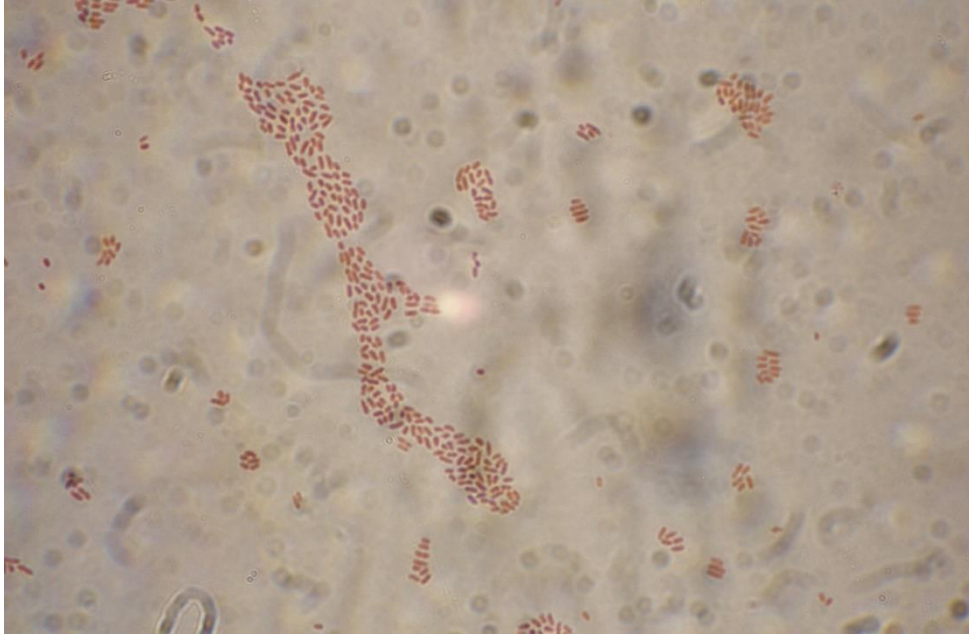
5. BULGULAR

Çalışmada Çizelge 4.1 'de gösterildiği gibi 8 adet sirke örneğinden HS, HSM ve Mannitol besiyerlerine ekim yapılarak toplam 233 saf izolat elde edilmiştir. Bu saf izolatlarda %20'lik gliserolde stoklanmıştır. Elde edilen 233 izolatın kalsiyum karbonat (CaCO₃)-etanol besiyerine ekimi yapıldıktan sonra besiyerindeki CaCO₃'ün çözünmesiyle kolonileri etrafında şeffaf bölgeler oluşturmasıyla asetik asit üretme yeteneklerine bakılarak seçim yapılmıştır (Sievers, 2005). Kalsiyum karbonat (CaCO₃)-etanol besiyerine ekimi yapılması sonucu bunlardan 178 adedi asetik asit üretme yönünden pozitif olmasına rağmen 55 adedi negatiftir. Bu 178 izolata Gram boyama yapılmış ve 65'i Gr(-) olarak belirlenmiştir. Ayrılan 65 izolatın HS besiyerinde, yüzey kültür fermentasyon yöntemi ile selüloz üretimlerine bakılmış ve selüloz üretim miktarı (mg/ml) olarak en fazla olan M2, HM3, H4 kodlu izolatlarda seçilmiştir.

Seçilen üç izolatın hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda H4 *Komagataeibacter intermedius* (önceden *Gluconacetobacter intermedius*), HM3 *Komagataeibacter xylinus* (önceden *Gluconacetobacter xylinus*), M2 *Komagataeibacter xylinus* olduğu bulunmuştur. Her üç izolatın ürettiği bakteriyel selüloz saflaştırılmıştır. Selülozların ağsı yapısı SEM'de görüntülenmiştir. Ardından elde edilen her selüloza elemental analiz, CP/MAS 13C Katı NMR, FT-IR, TGA ve XRD analizleri yapılmıştır.

5.1. Morfolojik Özellikler

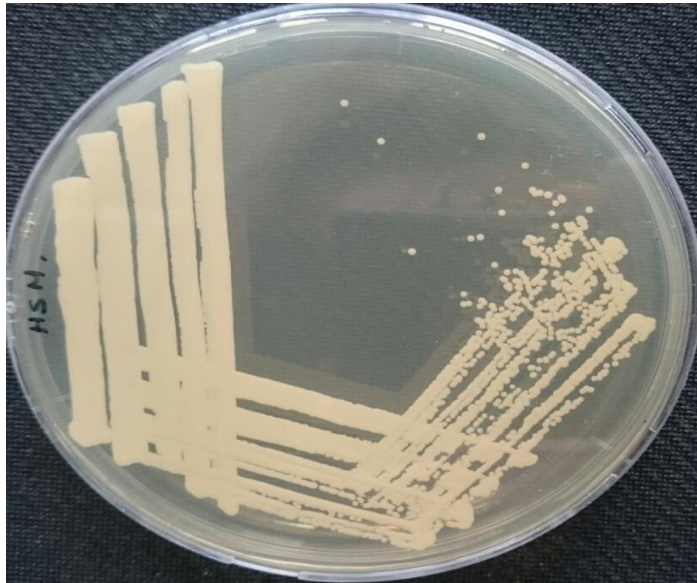
Gram boyama sonucunda her üç izolat da Gr(-) olarak saptanmıştır (Şekil 5.1). Endospor boyama sonucunda hiçbirinin endospor içermediği belirlenmiştir.



Şekil 5. 1. *Komagataeibacter intermedius* straininin Gram boyama görüntüsü.

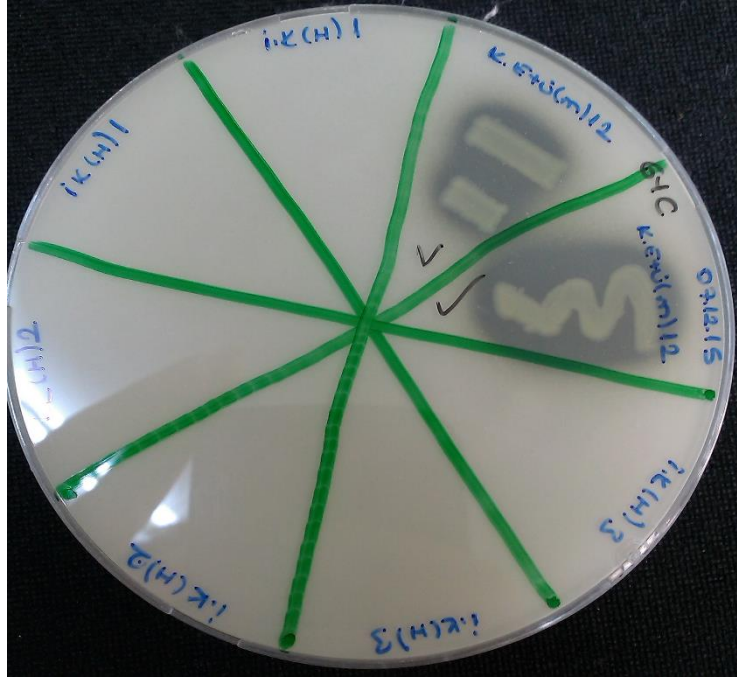
5.2. Kültürel Özellikler

İzolatların HS, HSM, Mannitol agar ve Kalsiyum Karbonat(CaCO₃)-Etanol agara ekimleri yapılmış ve 30 °C'de 48-72 saat boyunca inkübasyonun ardından kültürel özellikleri gözlemlenmiştir. İzolatlar HS, HSM ve Mannitol agar'daki kolonileri küçük, yuvarlak, krem-bej renkli, pigmentsiz ve yüksek şekildedir (Şekil 5.2).



Şekil 5. 2. HSM agar'da *Komagataeibacter xylinus* koloni gelişimi.

Kalsiyum Karbonat(CaCO_3)-Etanol agar'da ise asetik asit bakterilerinin metabolizması sonucu oluşan asetik asitin, besiyerindeki CaCO_3 'ü çözerek zon oluşturması beklenmektedir (Sievers, vd., 2005). Çalıştığımız izolatların oluşturduğu zonlar da Şekil (5.3)'te verilmiştir.



Şekil 5. 3. Kalsiyum karbonat (CaCO_3)-Etanol Agar'da *Komagataeibacter xylinus*'un oluşturduğu zon görüntüsü.

Seçilen izolatların *Acetobacter*, *Gluconobacter* ya da *Gluconacetobacter* olarak cins düzeyinde tanısının yapılabilmesi için bromcresol green'li besiyerine ekimi yapılmıştır. Besiyerindeki gelişim sonucunda indikatör boyanın rengi yeşilden sarıya döndüğü için izolatların *Gluconacetobacter* olduğu saptanmıştır (Carr, 1968).

5.3. Biyokimyasal Özellikler

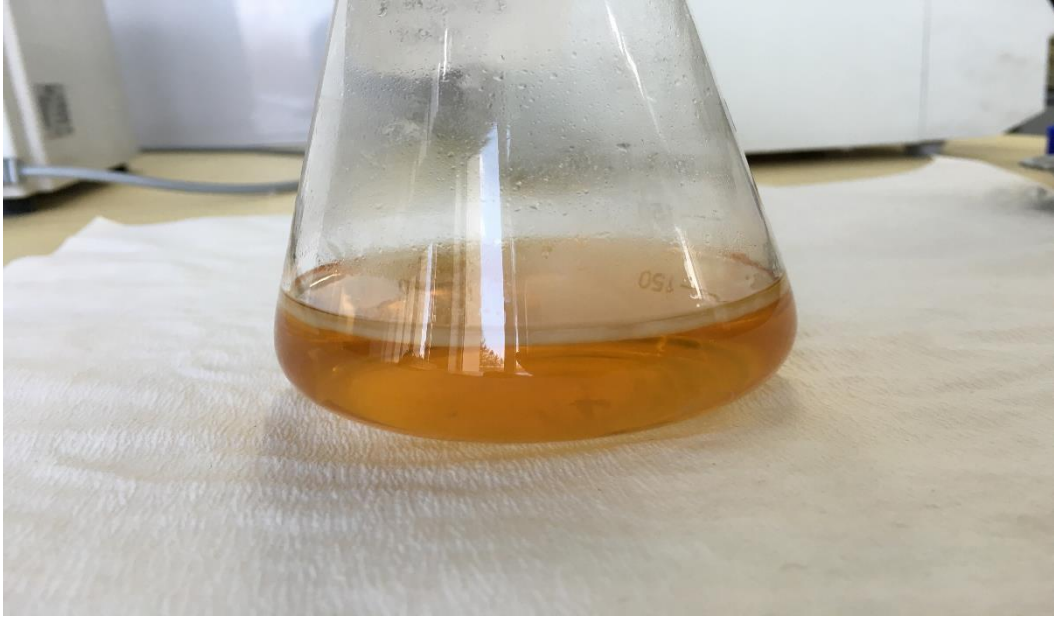
İzolatların biyokimyasal tanımlanmasında kullanılan özellikler ve yapılan testler Çizelge (5.1)'de verilmiştir (De Ley, vd., 1984 ve Swings, 1992).

Çizelge 5.1. H4, HM3 ve M2 izolatlarının tanımlanmasında kullanılan taksonomik özellikler.

Özellikler	H4	HM3	M2
Gram boyama	(-)	(-)	(-)
Hücre düzeni	Tekli	Tekli	Tekli
Hücre şekli	Kısa çubuk	Kısa çubuk	Kısa çubuk
Koloni formu	Yuvarlak, mat	Yuvarlak, mat	Yuvarlak, mat
Hareketlilik	(-)	(-)	(-)
Endospor	(-)	(-)	(-)
Oksijen ihtiyacı	Zorunlu aerob	Zorunlu aerob	Zorunlu aerob
Kahverengi pigment oluşumu	(-)	(-)	(-)
Katalaz testi	(+)	(+)	(+)
Oksidaz testi	(-)	(-)	(-)
İndol testi	(-)	(-)	(-)
Jelatin hidroliz testi	(-)	(-)	(-)
Nitrat indirgenmesi	(-)	(-)	(-)
Galaktoz fermentasyonu	(+)	(+)	(+)
Fruktoz fermentasyonu	(+)	(+)	(+)
Laktoz fermentasyonu	(+)	(+)	(+)
Sukroz fermentasyonu	(-)	(-)	(-)
Etanolün asetik aside oksidasyonu	(+)	(+)	(+)
CaCO ₃ 'lü besiyerinde zon oluşturma	(+)	(+)	(+)
Bromcresol green'li besiyerinde, indikatör boyanın renk değişimi	Yeşil → Sarı	Yeşil → Sarı	Yeşil → Sarı

5.4. Bakteriyal Selüloz Üretimi

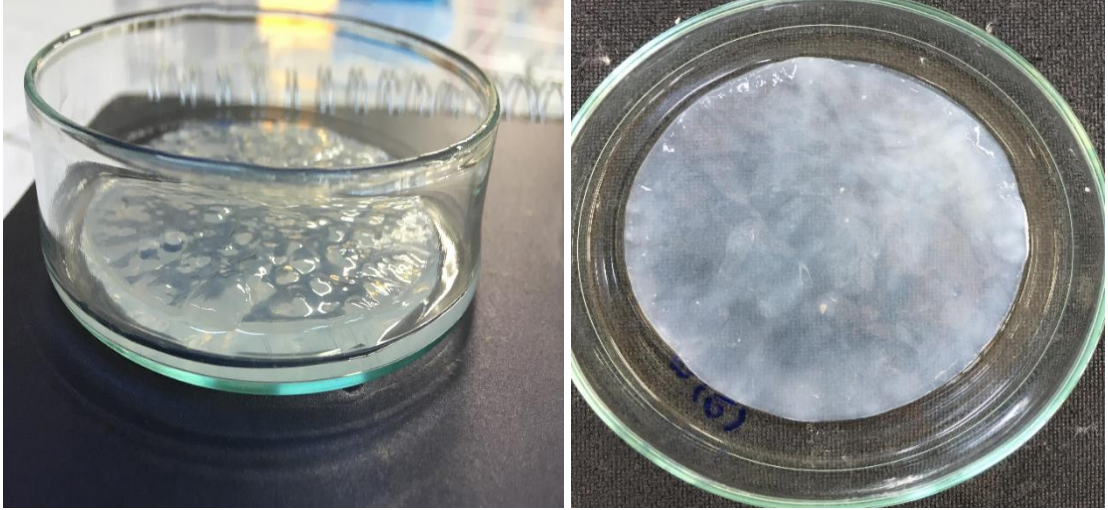
Bakteriyal selüloz durgun koşullarda üretildiği zaman Şekil (5.4)' te verildiği gibi besiyerinin üst yüzeyinde zar şeklinde oluşur. Çalkalamalı kültürde üretim yapıldığında yuvarlak küre şeklinde oluşumlar gözlenmektedir.



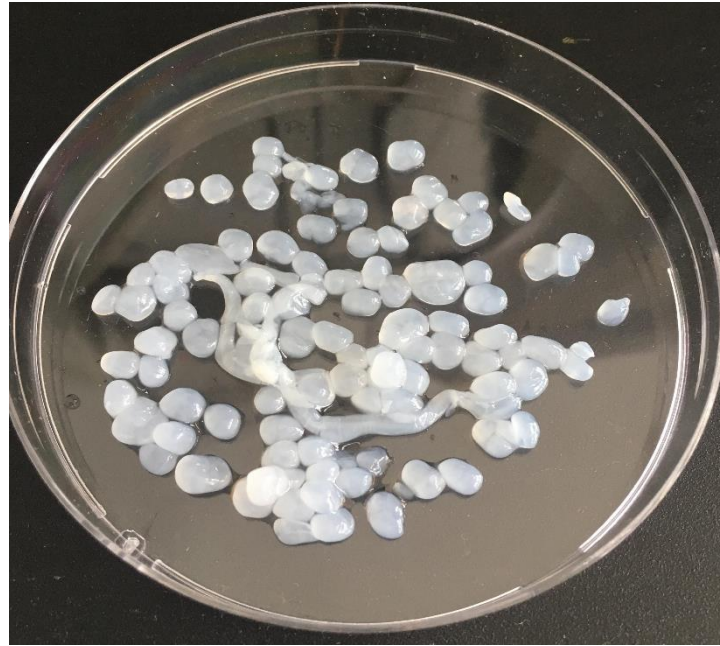
Şekil 5. 4. Statik kültürle *Komagataeibacter intermedius*'un (H4) ürettiği bakteriyal selülozun, HS besiyerinin üst yüzeyinde oluşumu.

5.5. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve Kurutulması

Saflaştırılan bakteriyal selüloz tabakaları şeffaf bir görünüme sahiptir (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6).



Şekil 5. 5. Statik kültürle üretilen yaş bakteriyal selüloz (H4 ve M2 örnekleri) tabakası.



Şekil 5. 6. Çalkalamalı kültürle *Komagataeibacter intermedius*'un ürettiği yaş bakteriyal selüloz (H4).

Bakteriyal selülozun kurutulması hem liyofilizatör kullanılarak hem de 80 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar yapılmıştır (Ishihara, vd., 2002; Çetin, 2008).



Şekil 5. 7. Saflaştırılmış bakteriyel selüloz örneklerinin (H4, HM3,M2) liyofilizatörde kurutulması.



Şekil 5. 8. 80°C'de kurutulmuş *Komagataeibacter intermedius*'un ürettiği saf bakteriyel selülozun (H4) görüntüsü.

5.6. Bakteriyal Selülozun Üretim Miktarı

Komagataeibacter intermedius (H4), *Komagataeibacter xylinus* (HM3), *Komagataeibacter xylinus* (M2) suşlarının HS besiyerinde statik ve çalkalamalı koşullarda geliştirilmesiyle elde edilen BS miktarları (g/100ml) Çizelge (5.2) ve Çizelge (5.3)'te verilmiştir. Statik koşullarda 100ml HS besiyerinde üretilen bakteriyal selüloz örneklerinden H4, HM3 ve M2'nin yaş ağırlıkları sırasıyla 4,682, 3,756 ve 3,325; kuru ağırlıkları 0,0526, 0,0437 ve 0,0383'tür. Çalkalamalı kültürle 100 ml HS besiyerinde üretilen bakteriyal selüloz örnekleri H4^C, HM3^C, M2^C'nin yaş ağırlıkları 3,070, 2,123 ve 2,217; kuru ağırlıkları 0,0357, 0,0269 ve 0,0264'tür.

Çizelge 5.2. Statik koşullarda üretilen BS yaş ve kuru ağırlığı (g/100ml).

Örnek adı	BS yaş ağırlığı (g/100ml)	BS kuru ağırlığı (g/100ml)
H4	4,682	0,0526
HM3	3,756	0,0437
M2	3,325	0,0383

Çizelge 5. 3. Çalkalamalı koşullarda üretilen BS yaş ve kuru ağırlığı (g/100ml).

Örnek adı	BS yaş ağırlığı (g/100ml)	BS kuru ağırlığı (g/100ml)
H4 ^C	3,070	0,0357
HM3 ^C	2,123	0,0269
M2 ^C	2,217	0,0264

5.7. Bakteriyal Selülozun Su Tutma Kapasitesi

Su Tutma Kapasitesi (STK) verilen Eşitlik 4.1'e göre hesaplanıp Çizelge (5.4)'te verilmiştir (Shezad, vd., 2010). Statik koşullarda üretilen bakteriyal selüloz numuneleri olan H4'ün %88, HM3'ün %85 ve M2'nin %86; çalkalamalı koşullarda üretilenler

H4^C'nin %85, HM3^C'nin %78 ve M2^C'nin %83 su tutma kapasitesi sahip oldukları saptanmıştır.

Çizelge 5. 4. Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen BS su tutma kapasiteleri.

Örnek adı	Su Tutma Kapasitesi (%)
H4	88
HM3	85
M2	86
H4 ^C	85
HM3 ^C	78
M2 ^C	83

5.8. Hücre Kuru Ağırlığı ve Üretim Farklılığına Göre Değişimi

HS broth besiyerine inkübe edilen *Komagataeibacter intermedius* (H4), *Komagataeibacter xylinus* (HM3), *Komagataeibacter xylinus* (M2) suşlarının inkübasyon süresi sonunda fermentasyon sıvısı ayrılarak elde edilen kuru hücre ağırlığı statik ve çalkalamalı koşullar için ayrı ayrı tartılarak Çizelge (5.5) ve Çizelge (5.6)'da verilmiştir. Bu verilere göre daha sonra bakteriyal selüloz yüzde verimleri hesaplanmıştır.

Çizelge 5. 5. Statik koşullardaki fermentasyon sonucunda elde edilen hücre kuru ağırlıkları.

Örnek adı	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)
H4	0,234
HM3	0,297
M2	0,304

Çizelge 5. 1. Çalkalamalı koşullardaki fermentasyon sonucunda elde edilen hücre kuru ağırlıkları.

Örnek adı	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)
H4 ^C	0,201
HM3 ^C	0,214
M2 ^C	0,177

5.9. Bakteriyal Selülozun Spesifik Ürün Verim Katsayısı

Elde edilen BS verimleri kuru hücre ağırlığına ve bakteriyal selülozun kuru ağırlığına göre Eşitlik (4.2) kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge (5.7)'de verilmiştir. Statik koşullarda üretilen H4, HM3 ve M2 verimleri sırasıyla %22, %15 ve %13 olarak hesaplanırken çalkalamalı koşullarda üretilen H4^C, HM3^C ve M2^C verimleri %18, %12 ve %15 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5. 2. Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen BS verim değerleri.

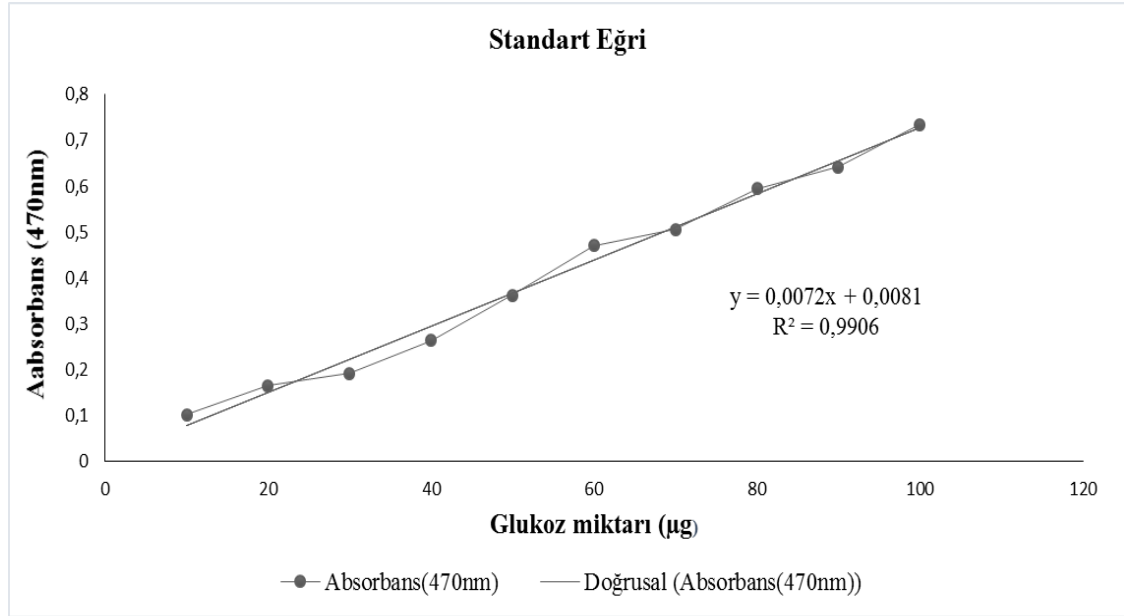
Örnek adı	Y (g/g)	Verim (%)
H4	0,22	22,0
HM3	0,15	15,0
M2	0,13	13,0
H4 ^C	0,18	18,0
HM3 ^C	0,12	12,0
M2 ^C	0,15	15,0

5.10. Toplam Şeker Analizi

10–100 µg/ml aralığında hazırlanan standart glukoz çözeltilerinin spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda okunan absorbands değerleri Çizelge (5.8)'de verilmiş ve bu değerlere göre oluşturulan standart eğri grafiği de Şekil (5.9)'da gösterilmiştir.

Çizelge 5. 3. 10-100 µg /ml aralığındaki standart glukoz çözeltilerinin 470 nm'de okunan absorbands değerleri.

Glukoz (µg/ml)	Absorbans (470 nm)
10	0,102
20	0,166
30	0,193
40	0,264
50	0,362
60	0,471
70	0,506
80	0,594
90	0,642
100	0,734



Şekil 5. 9. Toplam şeker analizi için 470 nm dalga boyundaki değerlerden elde edilen standart eğri.

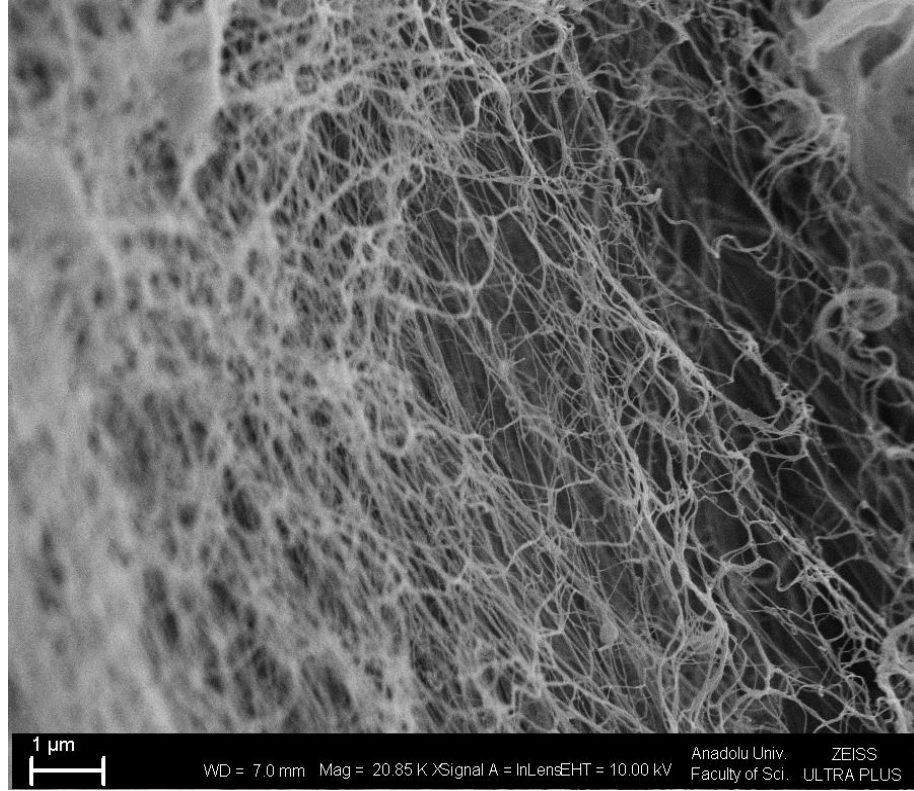
Standart eğriye göre *Komagataeibacter intermedius* (H4)'un ürettiği bakteriyal selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 383,7 (g/100ml), *Komagataeibacter xylinus* (HM3)'un ürettiği bakteriyal selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 213,9 (g/100ml) ve *Komagataeibacter xylinus* (M2)'un ürettiği bakteriyal selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 197,1 (g/100ml) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5. 4. İzolatların ürettiği bakteriyal selüloz miktarı ve selülozların toplam şeker miktarı.

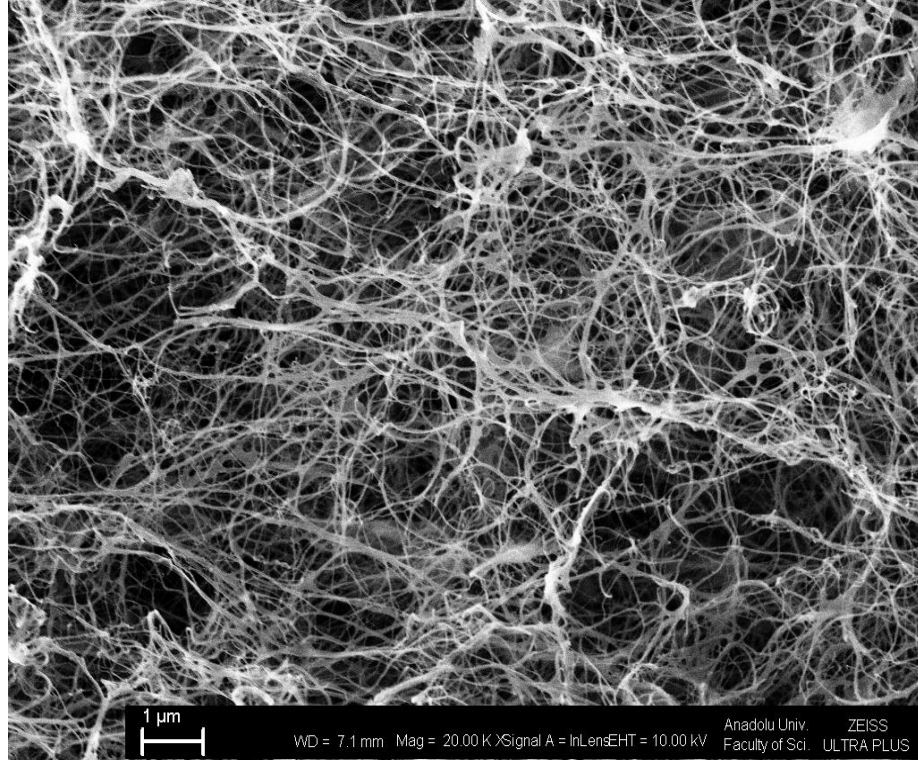
Örnek	Standart eğriye göre polisakkarit miktarı (g/100ml)	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	Polisakkarit kuru ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
H4	383,7	0,234	0,0526	0,22	22,0
HM3	213,9	0,297	0,0437	0,15	15,0
M2	197,1	0,304	0,0383	0,13	13,0

5.11. Bakteriyal Selülozun SEM (Scanning Elektron Mikroskop) Görüntüleri

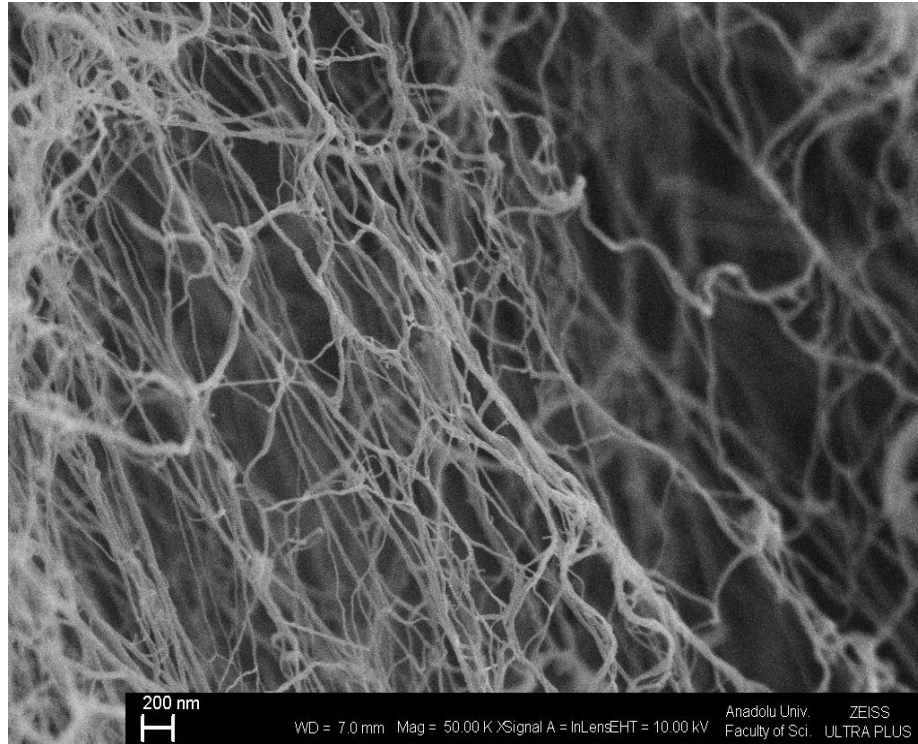
Hem statik hem de çalkalamalı kültürle üretilen bakteriyal selüloz örneklerinin ağısı yapıları taramalı elektron mikroskopunda görüntülenmiştir (Şekil (5.10), Şekil (5.11), Şekil (5.12), Şekil (5.13), Şekil (5.14)).



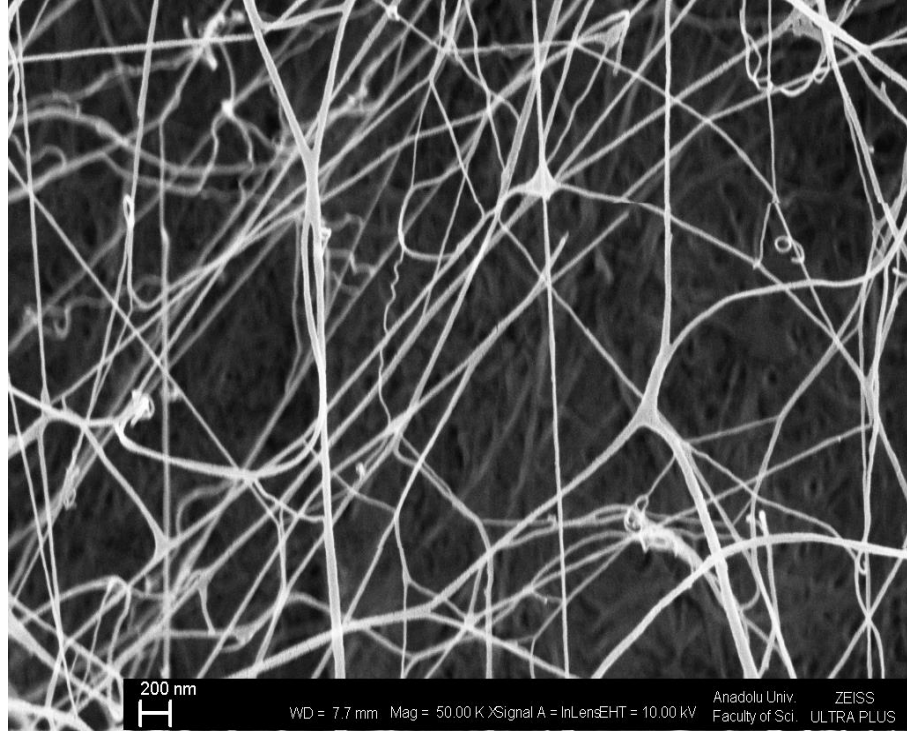
Şekil 5. 10. Çalkalamalı kültürle üretilen BS (HM3^C), SEM görüntüsü (x20000).



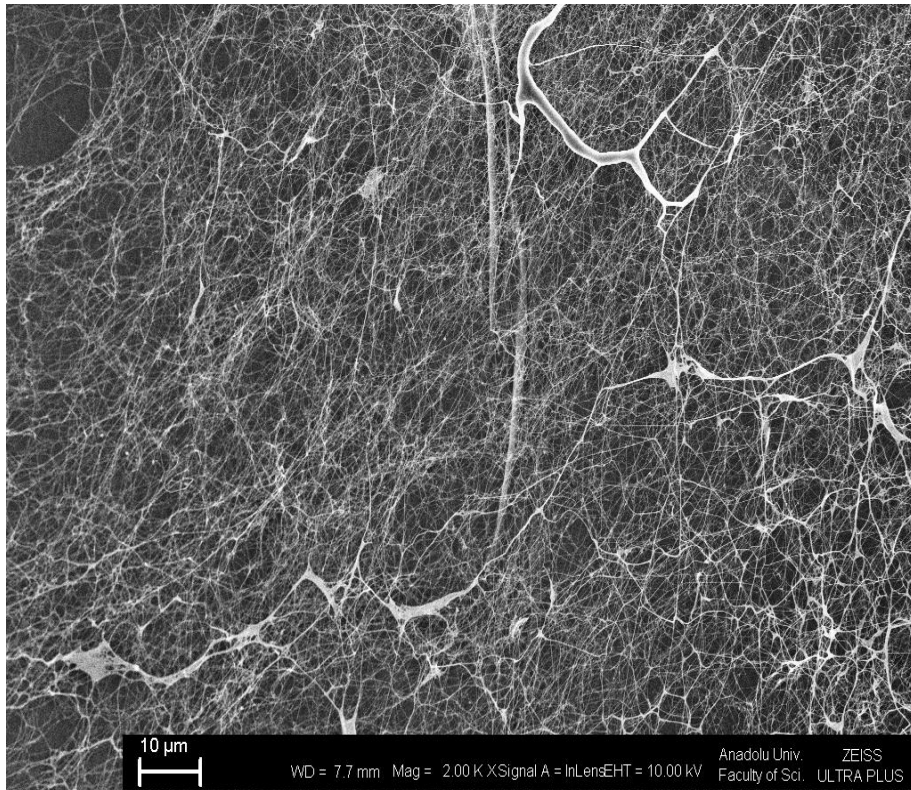
Şekil 5. 11. Statik kültürle üretilen BS (H4), SEM görüntüsü (x 20000).



Şekil 5. 12. Çalkalamalı kültürle üretilen BS (HM3^C), SEM görüntüsü (x 50000).



Şekil 5. 13. Statik kültürle üretilen BS (HM3), SEM görüntüsü (x 50000).



Şekil 5. 14. Statik kültürle üretilen BS (HM3), SEM görüntüsü (x 2000).

5.12. Bakteriyal Selülozun Element Analizi

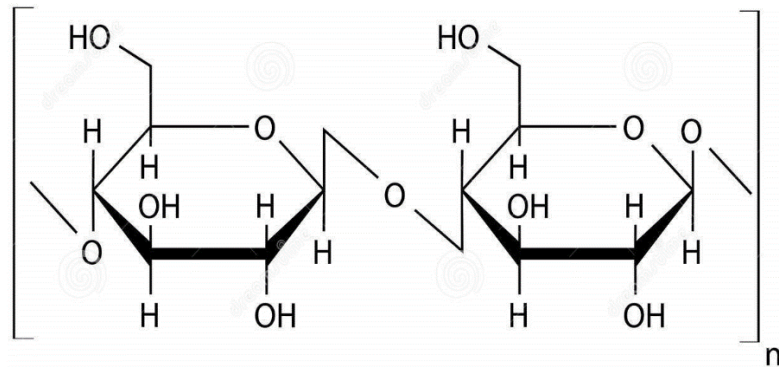
Liyofilize edilerek kurutulmuş bakteriyal selüloz örneklerinin karakterizasyonu için yapılan analizlerden biri olan element analizi sonuçları Çizelge (5.9)' da verilmiştir. Buna göre H4 örneğinin %0,565 N, %44,55 C, %6,448 H, %0,140 S; HM3 örneğinin %0,556 N, %43,50 C, %6,745 H, %0,202 S; M2 örneğinin %0,585 N, %44,34 C, %6,521 H, %0,184 S elementlerini içerdiği belirlenmiştir.

Çizelge 5. 5. Bakteriyal selüloz örneklerinin element analiz sonuçları.

Örnek adı	Ağırlık (mg)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
H4	2,3450	0,565	44,55	6,448	0,140
HM3	2,4360	0,556	43,50	6,745	0,202
M2	2,3480	0,585	44,34	6,521	0,184

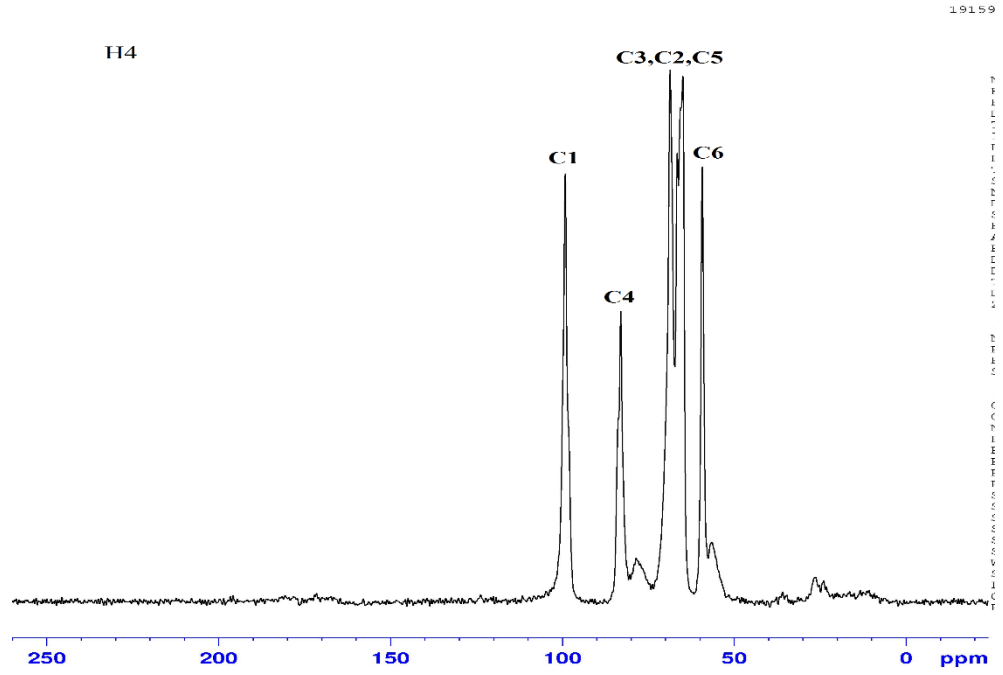
5.13. Bakteriyal Selülozun CP/MAS ¹³C Katı NMR Analizi

Selüloz altı karbonlu genel bir yapıya sahiptir (Perez, vd., 2002). Bu altı karbonlu yapı Şekil 5.15'de gösterilmiştir.

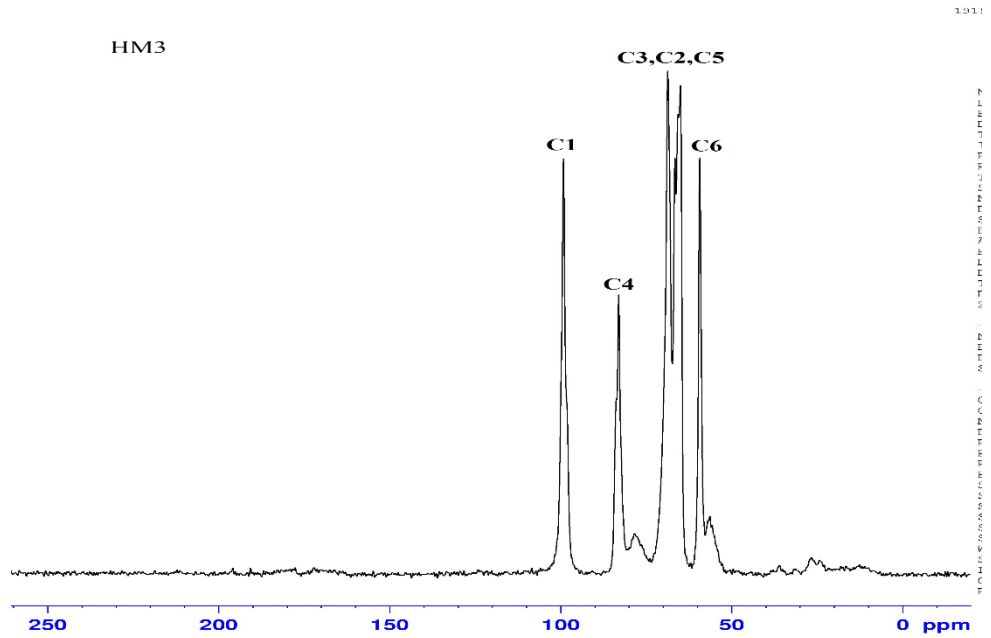


Şekil 5. 15. Selülozun altı karbonlu genel yapısı.

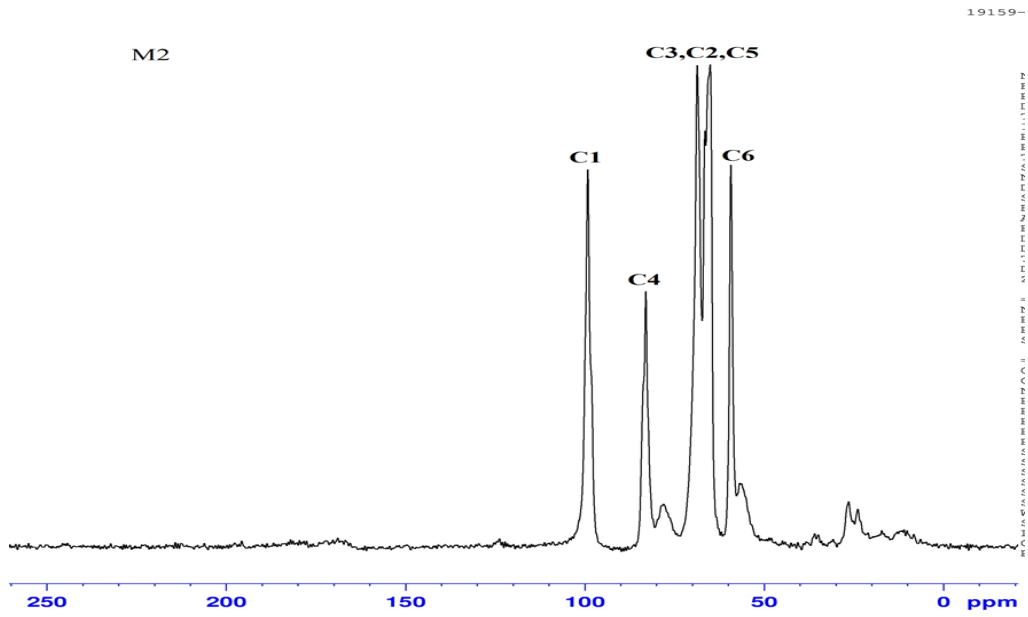
Liyofilizatörde kurutulmuş bakteriyal selüloz numunelerinin (H4, HM3, M2) CP/MAS ¹³C katı NMR spektrofotometre analiz sonuçları sırasıyla Şekil (5.16), Şekil (5.17) ve Şekil (5.18)'de verilerek altı karbonun da yerleri gösterilmiştir.



Şekil 5. 16. H4 numaralı BS örneğinin CP/MAS ^{13}C katı NMR analizi sonucu.

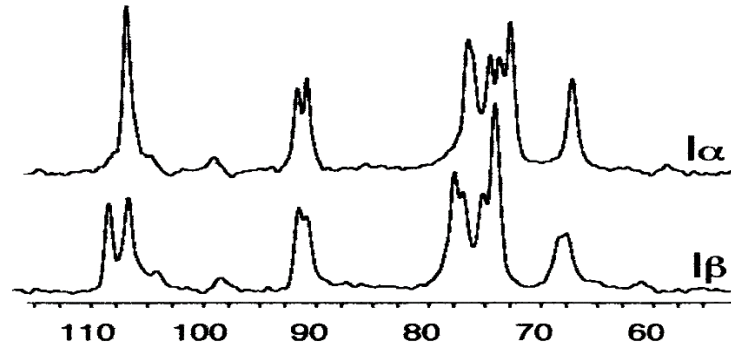


Şekil 5. 17. HM3 numaralı BS örneğinin CP/MAS ^{13}C katı NMR analizi sonucu.



Şekil 5. 18. M2 numaralı BS örneğinin CP/MAS ^{13}C katı NMR analizi sonucu.

Analiz sonuçlarına göre her üç numunenin de karbon değerleri aynı aralıklardadır. 105-100 ppm'de C1'in, 90-80 ppm'de C4'ün, 75-65 ppm'de C2, C3,C5'in, 65-60 ppm'de C6'nın olduğu bulunmuştur (Şekil (5.16), Şekil(5.17), Şekil (5.18)).



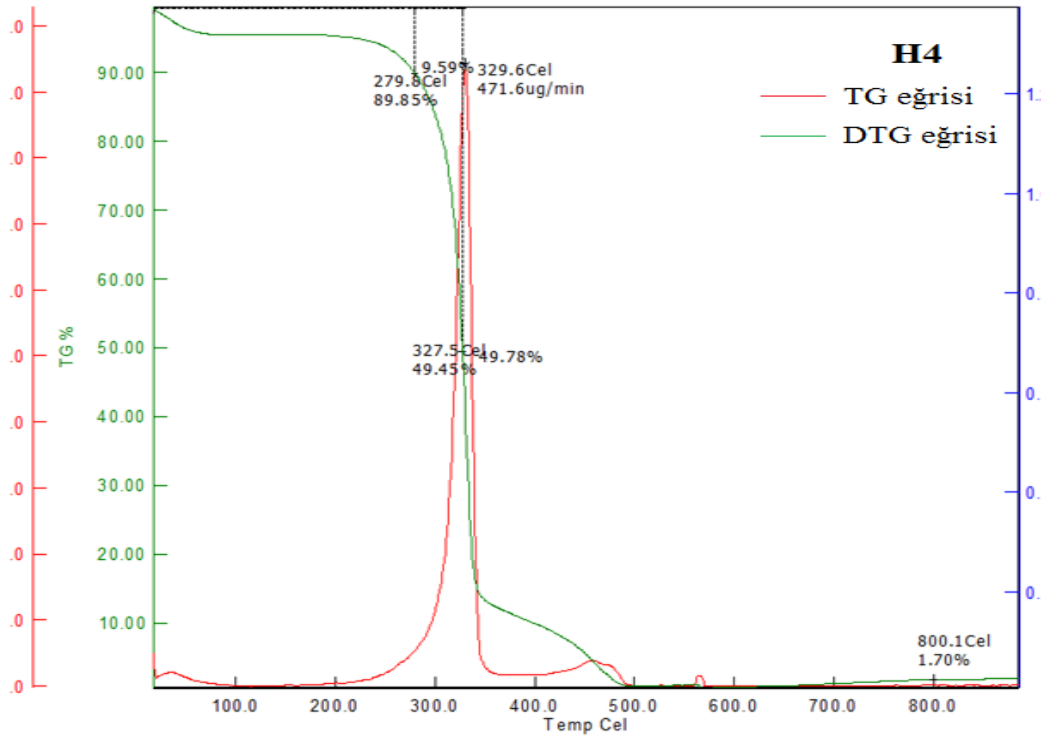
Şekil 5. 19. I_α oranı fazla olan ve I_β oranı fazla olan selülozun CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz sonucu farkı (Kono, vd., 2002).

Selüloz I_α , bakteriyel selülozun yapısında daha yüksek oranda bulunmaktadır ve selüloz I_α dan farklı olarak selüloz I_β 'nın CP/MAS ^{13}C katı NMR analizi sonucunda en belirgin fark olarak C1'de ikili üçlü sinyaller alınmaktadır (Kono, vd., 2002).

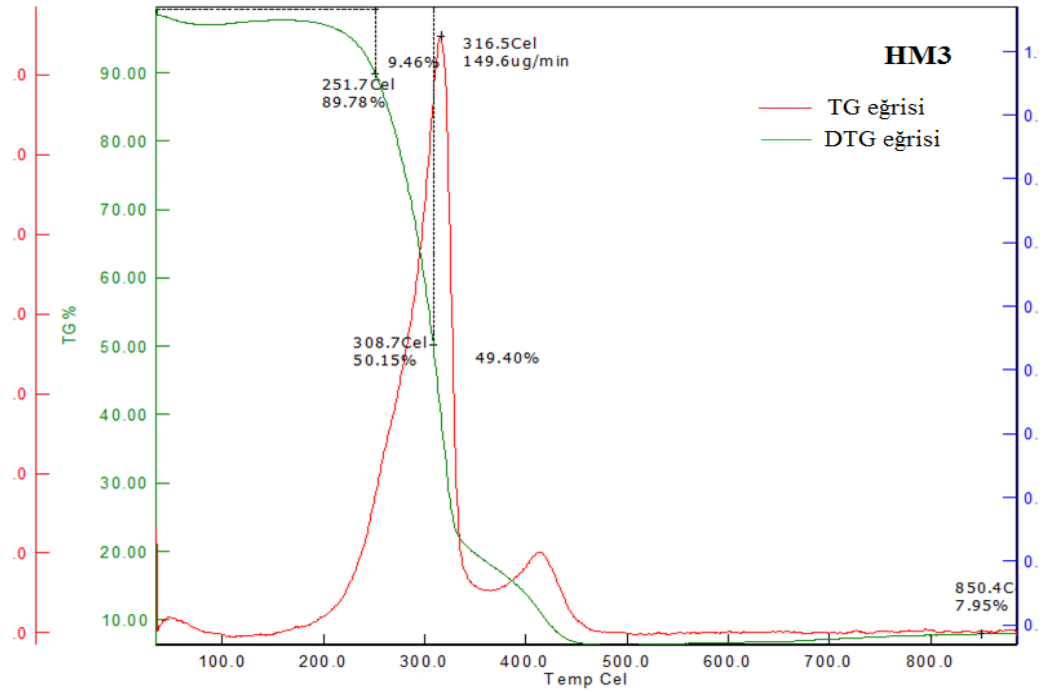
5.14. Bakteriyal Selülozun TG Analizi

Termo-gravimetrik analiz (TGA), programlanmış ısıtma sisteminde artan sıcaklığa göre numune ağırlığının ölçülmesine dayanan sürekli bir işlemdir. TGA eğrileri oluşturulurken sıcaklığa karşı yüzde kütle kaybına göre çizilir ve dekompozisyon adımının başladığı sıcaklık görülmüş olur. Termal bozunma sıcaklığı numunenin molekül ağırlığı ve kristallenme derecesi gibi yapısal parametrelerden etkilenir (Mohite ve Patil, 2014). TG analiz grafikleri ve TG eğrisinin türevi olan DTG eğrileri Şekil (5.20), Şekil (5.21) ve Şekil (5.22)'de verilmiştir.

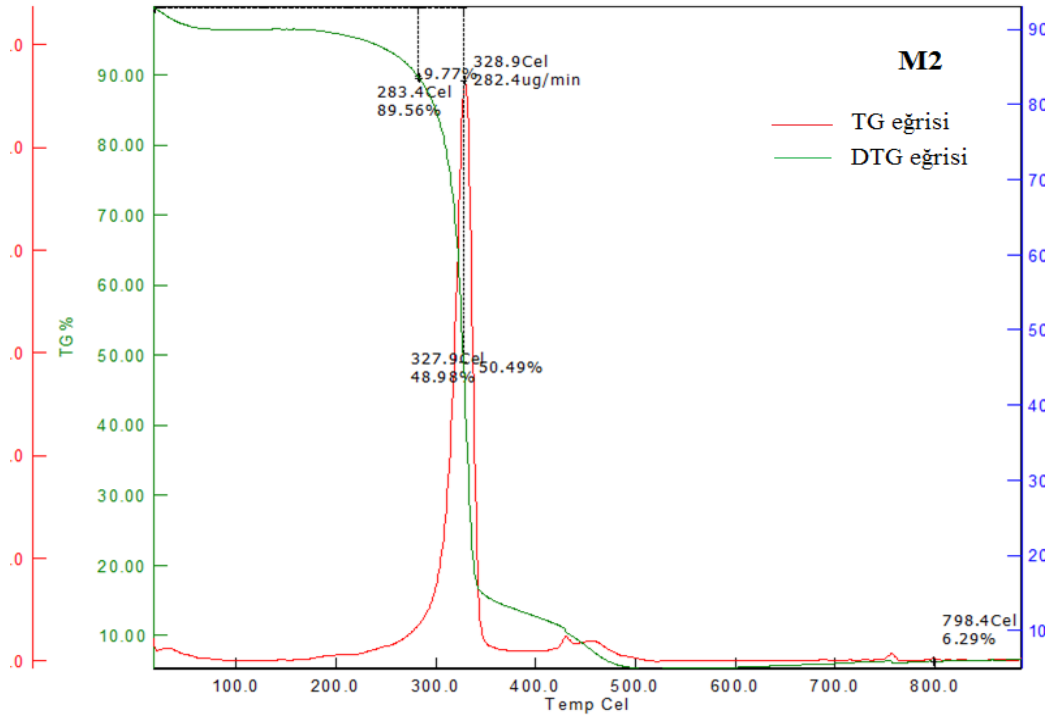
H4, HM3 ve M2 numunelerinin üçü de 30-100 °C arasında az miktarda kütle kaybı yaşamaya başlamıştır. Ardından H4 ve M2 bakteriyal selüloz numunelerinin kütleleri 200°C'ye kadar stabildir (Şekil 5.20 ve Şekil 5.21). Şekil (5.22)'de verilen HM3 bakteriyal selüloz numunesi ise 190°C'ye kadar stabil kalmıştır. Ortam sıcaklığı 200 °C'ye yaklaştığında her üç örneğin de yapısındaki lifler fiziksel olarak emdikleri suyu geri vermeye başlamışlardır. Kristalin alanlar genellikle suyu absorblamadıkları için bu absorblanan su selülozun yapısındaki amorf bölgelerle ilişkilendirilmiştir. Burada absorblanan su kademeli olarak azalır. 200°C'den sonra kütle kayıpları hızla artış göstermiştir. H4 numunesi için kütle kaybı 330 °C'de maksimum değere ulaşmış olup bu sıcaklıkta yaklaşık %93 kütle kaybı olmuştur. HM3 numunesi için sıcaklık 316,5°C'ye ulaştığında kütle kaybı maksimum değere ulaşmıştır ve kütle kaybının yaklaşık %95 olduğu belirlenmiştir. M2 numunesi için kütle 329°C'de maksimum değerlere ulaşmış bu bu sıcaklıkta yaklaşık %90 kütle kaybı olmuştur (Şekil 5.20, Şekil 5.21, Şekil 5.22).



Şekil 5. 20. H4 bakteriyel selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.



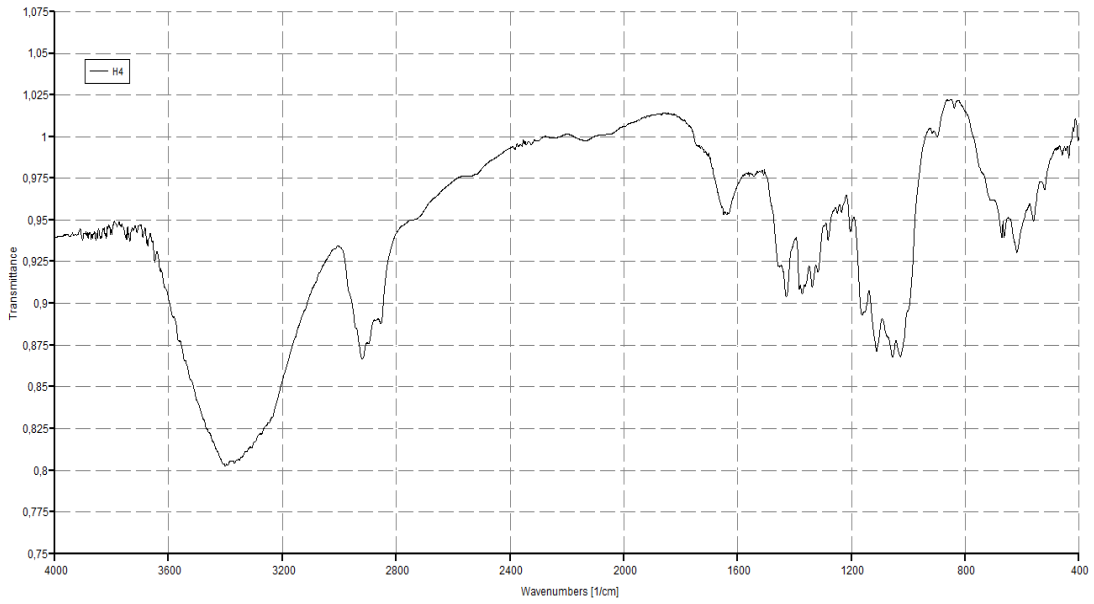
Şekil 5. 21. HM3 bakteriyel selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.



Şekil 5. 22. M2 bakteriyal selüloz numunesine ait TGA ve DTG grafiği.

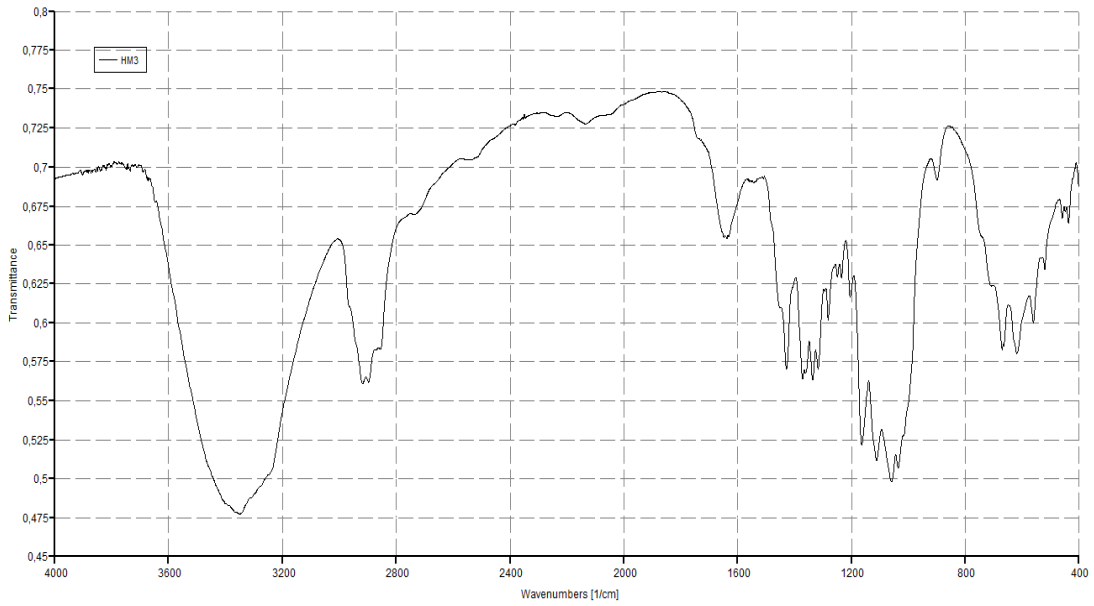
5.15. Bakteriyal Selülozun FT-IR Analizi

Liyofilize bakteriyal selüloz örneklerinden H4 örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucuna göre 3400 cm^{-1} bant bölgesi O-H gerilmesini, 2919 cm^{-1} bant bölgesi C-H gerilmesini, 1638 cm^{-1} bant bölgesinde absorblanan su moleküllerinin titreşiminden oluşan H-O-H gerilmesini, 1056 cm^{-1} bant bölgesi C-O-C ve C-O-H gruplarını göstermiştir. Ayrıca selüloz I için karakteristik olan 1429 cm^{-1} bant bölgesinde CH_2 düzlem içi eğilme titreşimine ve 1163 cm^{-1} bant bölgesinde asimetric gerilmeden oluşan C-O-C titreşimine rastlanmıştır (Şekil 5.23). Ve beklendiği gibi her üç numunede de bakteriyal selüloz için karakteristik olmayan, Selüloz II formu için karakteristik olan 3488 cm^{-1} ve 3447 cm^{-1} bant bölgelerinde O-H tepe noktalarına rastlanmamıştır (El-Saied, vd., 2008; Cakar, vd., 2014; Mohite ve Patil, 2014; Khattak, vd., 2015(a); Khattak, vd., 2015(b); Li, vd., 2015; Lin, vd., 2016; Machado, vd., 2016; Yang, vd., 2016; Yim, vd., 2016).



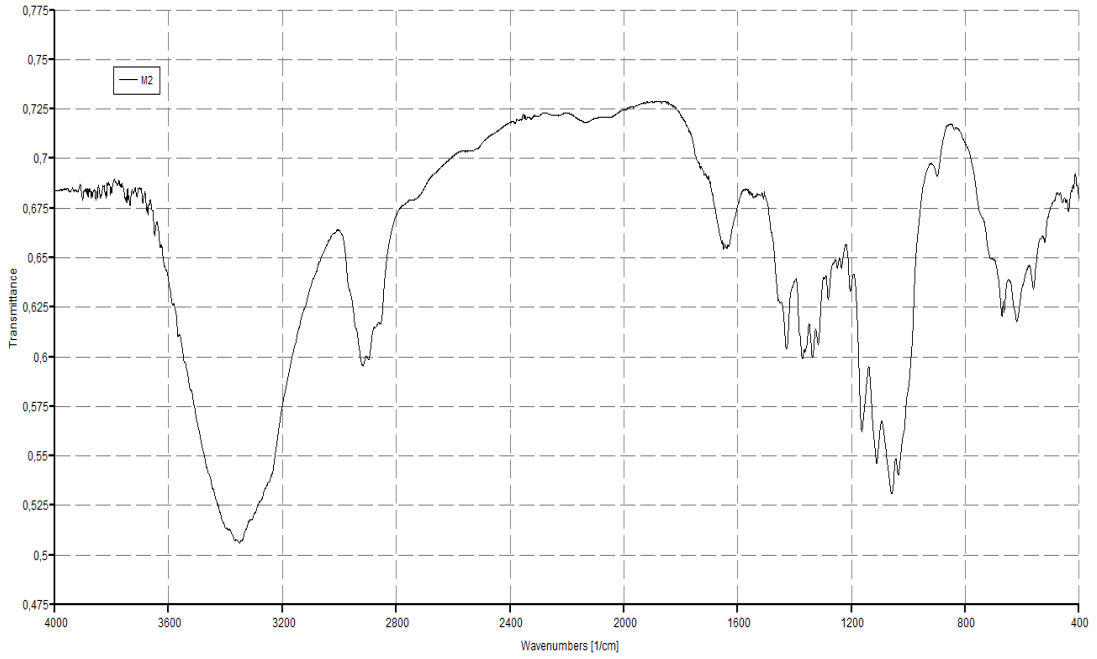
Şekil 5. 23. H4 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.

HM3 örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucuna göre 3350 cm^{-1} bant bölgesi O-H gerilmesini, 2919 cm^{-1} bant bölgesi C-H gerilmesini, 1638 cm^{-1} bant bölgesi absorblanan su moleküllerinin titreşimi oluşan H-O-H gerilmesini, 1060 cm^{-1} bant bölgesi C-O-C ve C-O-H gruplarını göstermiştir. HM3 numunesinde de selüloz I için karakteristik olan 1428 cm^{-1} bant bölgesi CH_2 düzlem içi eğilme titreşimini ve 1163 cm^{-1} bant bölgesi asimetrik gerilmeden oluşan C-O-C gruplarını göstermiştir (Şekil 5.24) (El-Saied, vd., 2008; Cakar, vd., 2014; Mohite ve Patil, 2014; Khattak, vd., 2015(a); Khattak, vd., 2015(b); Li, vd., 2015; Lin, vd., 2016; Machado, vd., 2016; Yang, vd., 2016; Yim, vd., 2016).



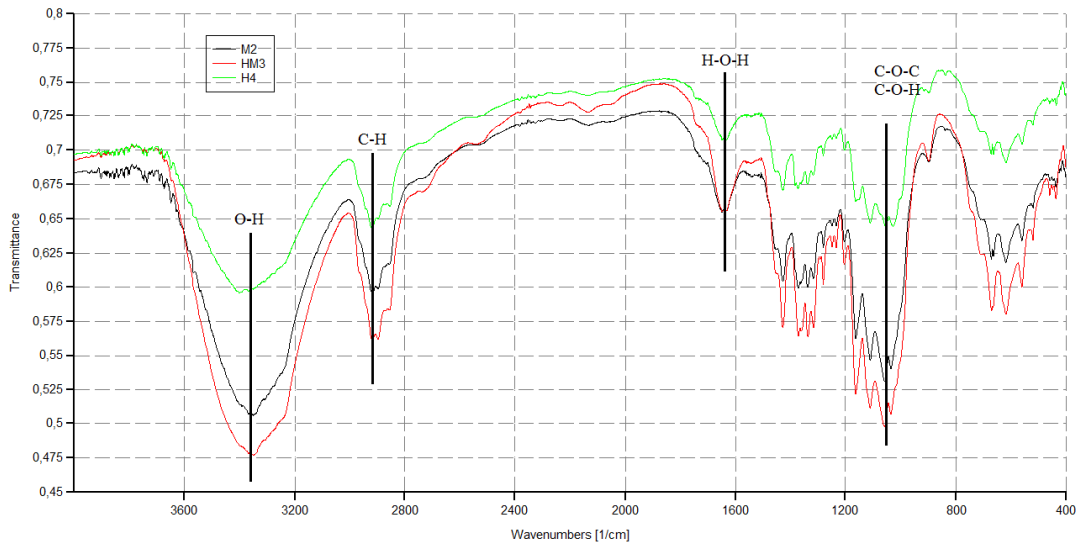
Şekil 5. 24. HM3 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.

M2 örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucuna göre 3350 cm^{-1} bant bölgesi O-H gerilmesini, 2918 cm^{-1} bant bölgesi C-H gerilmesini, 1650 cm^{-1} bant bölgesi absorblanan su moleküllerinin titreşiminden oluşan H-O-H gerilmesini, 1059 cm^{-1} bant bölgesi C-O-C ve C-O-H gerilmelerini göstermiştir. Selüloz I için karakteristik olan 1429 cm^{-1} bant bölgesinde CH_2 ve 1163 cm^{-1} bant bölgesinde asimetrik gerilmeden oluşan C-O-C gruplarına rastlanmıştır (Şekil 5.25) (El-Saied, vd., 2008; Cakar, vd., 2014; Mohite ve Patil, 2014; Khattak, vd., 2015(a); Khattak, vd., 2015(b); Li, vd., 2015; Lin, vd., 2016; Machado, vd., 2016; Yang, vd., 2016; Yim, vd., 2016).



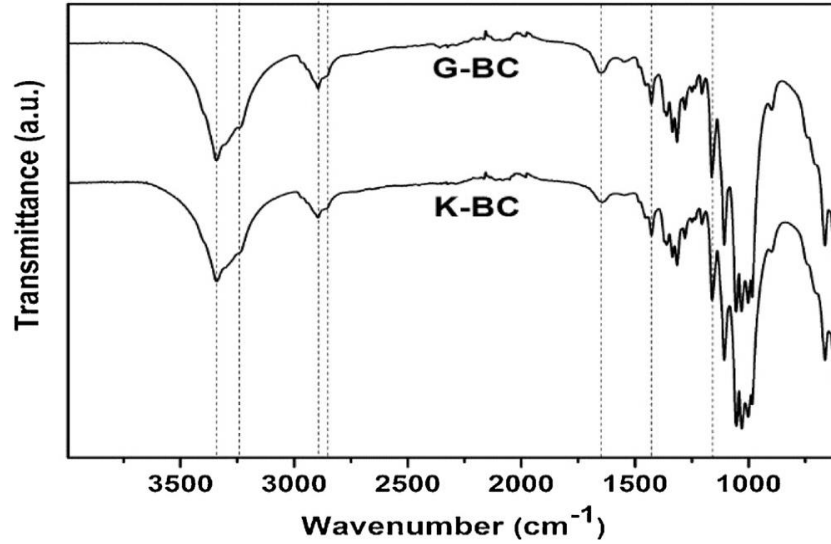
Şekil 5. 25. M2 bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.

Bakteriyal selüloz için karakteristik olan pikler ve bu piklerin yapıdaki hangi bağları ifade ettiği her üç örnek için de Şekil (5.26)'da gösterilmiştir.



Şekil 5. 26. Bakteriyal selüloz örneklerinin FT-IR spektrofotometre analiz sonuçlarının karşılaştırması.

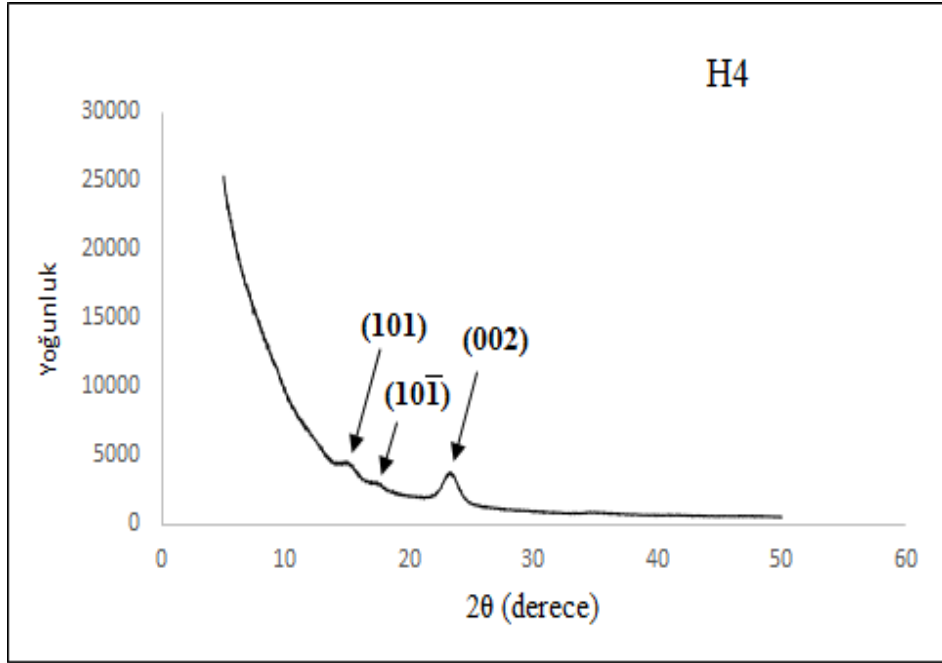
Çalışmamızdaki sonuçlar Machado ve ark. (2016)'nın yaptığı çalışmada elde ettikleri bulguları desteklemektedir. Bu çalışmaya göre 3350 cm^{-1} bant bölgesi O-H bağlarını, 2893 cm^{-1} bant bölgesi C-H gruplarını, 1650 cm^{-1} bölgesi H-O-H gruplarını, 1425 cm^{-1} bant bölgesinde CH_2 ve 1160 cm^{-1} bant bölgesinde C-O-C gruplarına rastlanmıştır (Şekil 5.27).



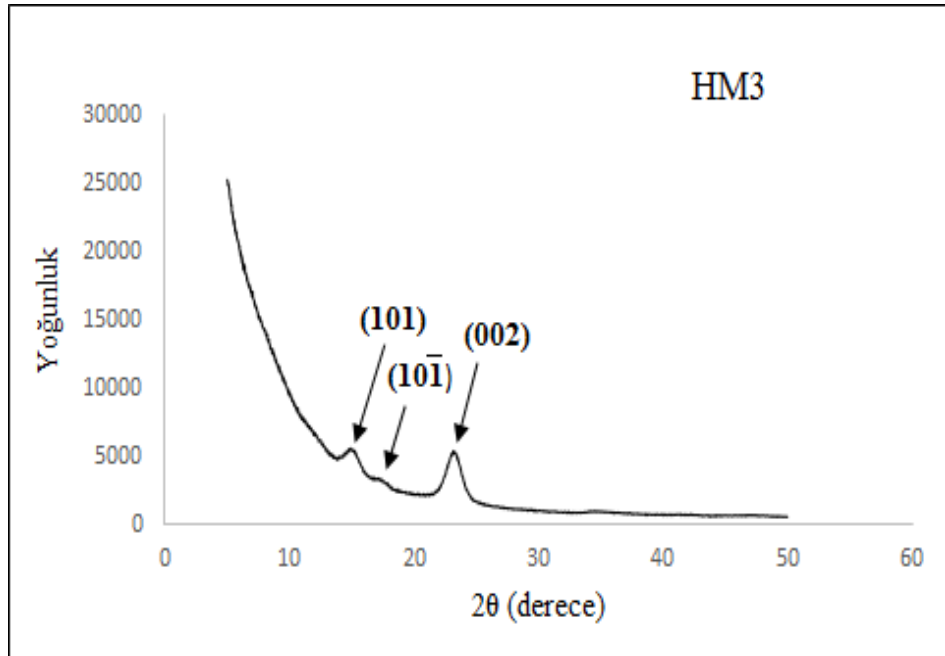
Şekil 5. 27. Bakteriyal selüloz membranlarının FTIR analizi (Machado, vd., 2016). G-BC: *Gluconacetobacter xylinus* tarafından sentezlenen bakteriyal selüloz. K-BC: *Komagataeibacter rhaeticus* tarafından sentezlenen bakteriyal selüloz.

5.16. Bakteriyal Selülozun XRD Analizi

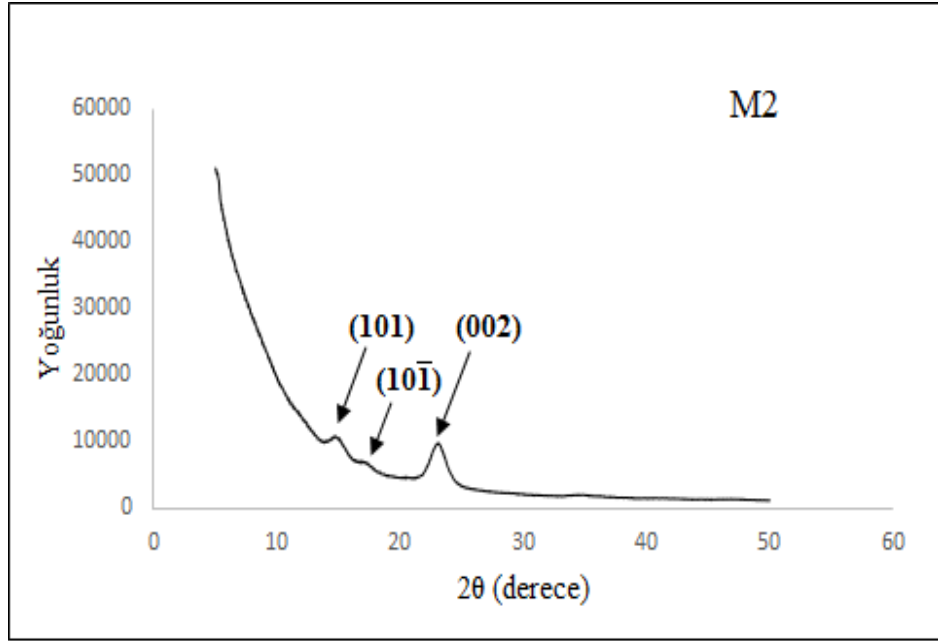
Çalışmamızda elde ettiğimiz liyofilize bakteriyal selülozun XRD analizi sonuçlarına göre Şekil (5.28)'de H4 örneğinin kırınım pikleri $14,5^\circ$: $16,7^\circ$: $22,5^\circ$; Şekil (5.29)'da HM3 örneğinin kırınım pikleri $14,6^\circ$: $16,8^\circ$: $22,7^\circ$; Şekil (5.30)'da M2 örneğinin kırınım pikleri $14,6^\circ$: $16,7^\circ$: $22,8^\circ$ olarak saptanmıştır ve her örnekte selüloz I'in karakteristik kristalin yüzeyleri sırasıyla (101) : (101 $\bar{1}$) : (002) gösterilmiştir. Sonuçlar Şekil (5.31)'de verilen Khattak(2002)'nin yaptıkları çalışmadan elde ettikleri verileri desteklemektedir.



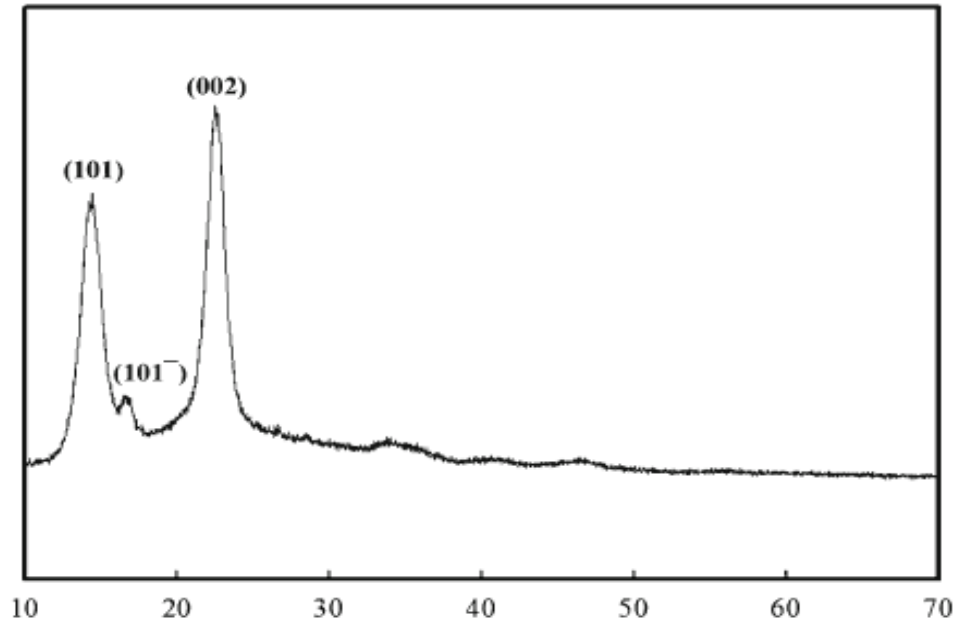
Şekil 5. 28. H4 numaralı bakteriyel selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.



Şekil 5. 29. HM3 numaralı bakteriyel selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.



Şekil 5. 30. M2 numaralı bakteriyel selüloz örneğinin XRD analizi grafiği.

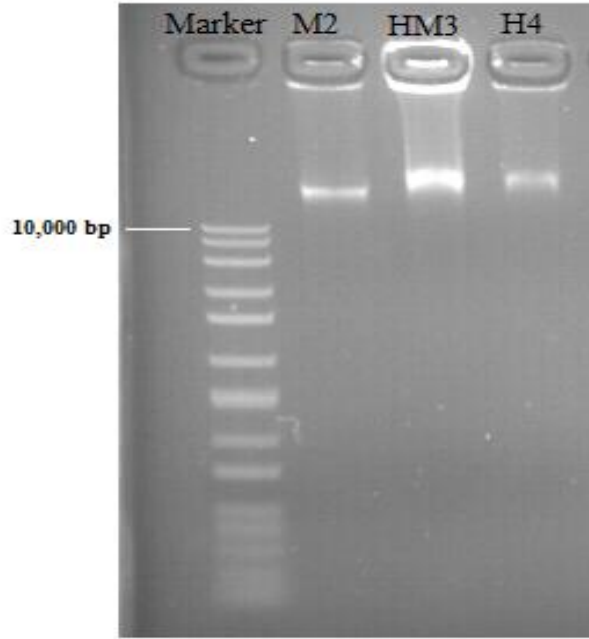


Şekil 5. 31. *Glucanoacetobacter xylinum* tarafından üretilen bakteriyel selülozün XRD analizi grafiği (Khattak, vd., 2015).

5.17. 16S rRNA Sekans Analizi

5.17.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

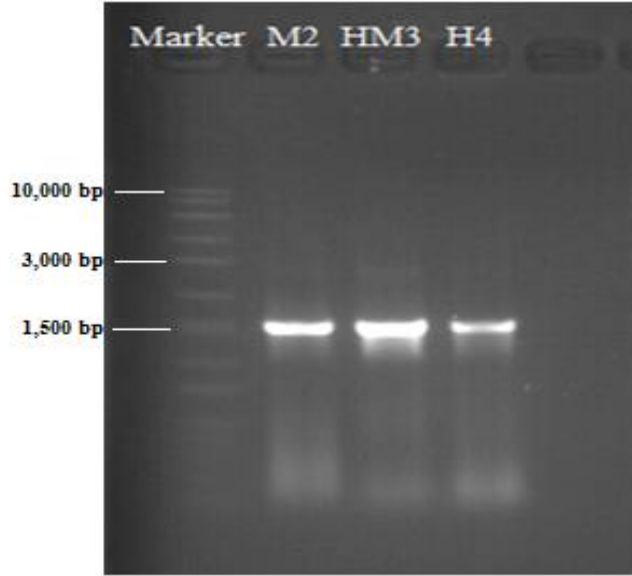
Sharma ve ark (2005)'a göre H4, HM3 ve M2 izolatlarının genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu örneklerinin agaroz jelde yürütüldükten sonraki görüntü Şekil (5.32)'de verilmiştir.



Şekil 5. 32. M2, HM3 ve H4 izolatlarının toplam DNA ekstraksiyonu sonrası agaroz jel elektroforezinde görüntüsü. Marker olarak 10,000 bp'lık DNA kullanılmıştır.

5.17.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve 16S rRNA genlerinin dizi analizleri

16S rRNA gen bölgesi dizi analizi için DNA ekstraksiyonu örneklerinden, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kurulmuştur. PCR örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntü sonucu Şekil (5.33)'de verilmiştir.



Şekil 5. 33. M2, HM3 ve H4 izolatlarının PCR görüntüsü.

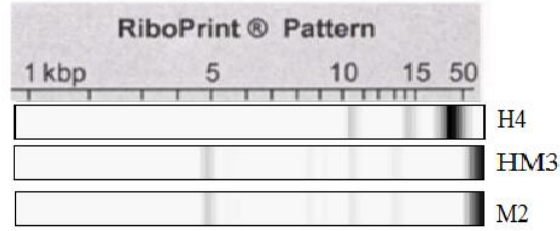
PCR ürünleri, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak 16S rRNA'ya göre dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu dizi analiz sonuçları gen bankasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nükleotid blast programı ile karşılaştırılarak analizi yapılmış ve bu analiz sonucuna göre H4 *Komagataeibacter intermedius* (önceden *Gluconacetobacter intermedius*), HM3 *Komagataeibacter xylinus* (önceden *Gluconacetobacter xylinus*), M2 *Komagataeibacter xylinus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 5. 6. H4, HM3 ve M2 izolatlarının dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.

İzolat adı	Dizi uzunluğu	Eşleşen baz sayısı	Benzerlik yüzdesi	Gen Bankasındaki en yakın karşılığı
H4	1414	1354/1386	%98	<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain 1-6
HM3	1245	1147/1182	%97	<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ATCC 10245
M2	1389	1278/1299	%98	<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ATCC 10245

5.18. Ribotiplendirme

Çalışmamızda 3 izolatın otomatik ribotiplendirme ile benzerliklerine bakılmıştır. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş 5-50 kb büyüklüğündeki fragmentlerden oluşan ribotip profilleri Şekil (5.34)'de verilmiştir.



Şekil 5.34. İzolatların ribotiplendirme profilleri

Ribotiplendirme sonuçları ile 16S rRNA dizi analizi sonuçları birbirini desteklememiştir. Bunun sebebi ise *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter xylinus*'un ve daha önceki adları (sinonimleri) olan *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter intermedius*'un cins ve tür seviyesinde otomatize ribotiplendirme veritabanında bulunmamasıdır.

6. TARTIŞMA

Üzerinde yoğun araştırmalar yapılan ve günümüzde ticari ürün olarak pazarlanan biyopolimerler içinde en önemlilerinden biri bakteriyal selülozdur. Bakteriyal selüloz biyosentezinin ilk adımı Brown'un 1886'da sirke fermantasyonu üzerine yaptığı araştırmalarda *Acetobacter xylinum*'un (güncellenmiş yeni adı *Komagataeibacter xylinus*) ürettiği selülozik biyofilmin yüksek yapılı bitkilerin ürettiklerine benzer olduğunu keşfetmesiyle atılmıştır ve günümüzde hala bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (Toyosaki, vd., 1995; Klemm, vd., 2005). Bakteriyal selüloz oldukça güçlü, katlanınca şeklini koruyan ve esnek olan bir yapıya sahiptir. Bu nedenle çeşitli kullanım alanları olup; kağıt, kumaş, gıda ve tıbbi malzeme endüstrisinde ham madde olarak önemli bir yere sahiptir. (Margaritis ve Pace, 1985; Sutherland, 1996, Çoban ve Bıyık, 2008).

Çalışmamızda bitkisel selüloza alternatif olarak kabul edilen bir biyopolimer olan bakteriyal selülozun; çeşitli kaynaklardan izole edilen bazı asetik asit bakterileri tarafından en yüksek verimle üretilmesi ve bakteriyal selülozun karakterizasyonu üzerinde çalışılmıştır.

Çalışmamızda Kemal Küküker, İzmir Tariş, Karaman, İzmir ve Sivas'tan temin edilen üzüm, elma, kiraz, alıç sirke örnekleri kullanılarak asetik asit bakterileri izole edilmiştir. Asetik asit bakterileri ise doğada genellikle şeker ve alkol oranı yüksek ortamlarda bulunmaktadır. Bu yüzden asetik asit bakterilerinin çiçek, meyve, bal ve özellikle üzüm, elma, hurma şarabından ve sirkesinden izole edilebileceği belirtilmiştir (Swings, 1992). Gullo ve ark. (2006), balzamik sirke *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter pasteurianus* ve *Acetobacter aceti* suşlarını izole etmiştir. Poyrazoğlu (2007), şarap, sirke, üzüm, elma ve turşu suyundan *Acetobacter pasteurianus* ve *Acetobacter lovaniensis* türlerini elde etmiştir. Fernández-Pérez ve ark. (2010), sirke *Gluconacetobacter europaeus* suşunu tanımladıkları belirtilmiştir. Wu ve ark. (2012), geleneksel Çin sirkesi ile yaptıkları çalışmada 58 adet asetik asit bakterisi izole etmiş ve *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter orientalis* ve *Gluconobacter oxydans* türlerini tanımlamıştır. Yetiman ve Kesmen (2015), üzüm ve elma sirkesinden *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter europaeus* ve

Komagataeibacter xylinus türlerini elde etmiştir. Lin ve ark. (2016), ananas, elma ve guava meyvelerinden *Komagataeibacter intermedius* suşunu izole etmiştir.

İzolasyon işleminde temel zenginleştirme besiyeri olarak içinde glukoz, yeast ekstrakt, polipepton, NaH_2PO_4 ve sitrik asit bulunan HS Broth kullanılmıştır (Hestrin ve Schramm, 1957). Koloni gelişimleri ve gelişimlerin incelenmesi için HS Agar, HSM Agar ve Mannitol Agar besiyerleri kullanılmıştır (Hestrin ve Schramm, 1957; Du Toit, 2002). Besiyerinde küçük, yuvarlak yüksek şekilli, krem-beyaz renkte olan koloniler seçilmiştir. Elde ettiğimiz izolatların identifikasyonu taksonomik özelliklerine göre yapılmıştır. İdentifikasyon sonucuna göre izolatların asetik asit bakterisi olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz asetik asit bakterilerinin Gram negatif, çubuk şekilli, katalaz pozitif, oksidaz negatif oldukları görülmüştür. Ardından bu izolatlar tekrar HS Broth besiyerine ekilerek en fazla miktarda bakteriyal selüloz üreten üç izolat seçilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız üç izolatın da kalsiyum karbonat, etanol, yeast ekstrakt ve agar içeren besiyerinde asetik asidin kalsiyum karbonatı çözmesi sonucu ortamda şeffaf zon oluşturdukları gözlemlenmiştir (Frateur, 1950; Sharafi, vd., 2010). Carr 1968 yılında *Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* strainlerini birbirinden ayırmak için, bromcresol green içeren katı besiyerini kullanmıştır (Carr, 1968; Sharafi, vd., 2010). Bu besiyerinde, *Acetobacter* tarafından üretilen asetik asit, indikatör boyanın rengini yeşilden maviye dönüştürmekte, *Gluconobacter*'lerde asetik asit, indikatör boyanın rengi inkübasyon süresince yeşilden sarıya sonra tekrar yeşile dönüştürmekte, *Gluconacetobacter*'lerde ise indikatör boyanın rengi yeşilden sarıya dönüşmektedir (Carr, 1968; Sharafi, vd., 2010). Literatürdeki bu bilgilere bakılarak çalıştığımız üç izolatın bromcresol green'li besiyerindeki gelişimi incelendiğinde, besiyerinin rengi yeşilden sarıya dönmüştür ve izolatlarımızın *Gluconacetobacter* genusundan oldukları belirlenmiştir.

Çalıştığımız asetik asit bakterilerinin identifikasyonu öncelikle fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakılarak taksonomi ile yapılmıştır. Bunların sonucunda bakterilerimizin *Gluconacetobacter* genusuna ait olduğu belirlenmiştir. Fakat bu metotlar zamanla çürütülebilir ve kesin güvenilir sonuçlar vermeyebilir (González, vd., 2004). Klasik taksonomi sonuçlarını desteklemesi ve kesin sonuçlar alabilmek için moleküler yöntemlere başvurulmuştur. Yapılan dizi analizi sonuçları gen bankasındaki

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Nucleotide Blast programı ile karşılaştırılmış H4 izolatu *Komagataeibacter intermedius* (önceden *Gluconacetobacter intermedius*), HM3 izolatu *Komagataeibacter xylinus* (önceden *Gluconacetobacter xylinus*) ve M2 izolatu *Komagataeibacter xylinus* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızda selüloz üretimini belirlemek için en uygun temel besiyeri olan HS Broth (Hestrin ve Schramm, 1957) kullanılmıştır. En uygun besiyerini belirlemek için HS Broth, HSM Broth (modifiye besiyeri) (Hestrin ve Schramm, 1957) ve Mannitol Broth (Du Toit, 2002) kültür ortamlarında üretim yapılmış ve en fazla bakteriyal selüloz üretim verimi HS besiyeri ile sağlanmıştır. Bu yüzden üretim çalışmalarına HS Broth ile devam edilmiştir. Bakteriyal selüloz üretimi genellikle statik kültür koşullarında gerçekleştirilir (Bae ve Shoda, 2005). Statik koşullarda üretilen selüloz besiyeri-hava arayüzeyini tamamen kaplayan bir biyofilm, zar şeklindedir (Schramm ve Hestrin 1954, Toyosaki ve ark 1995). Statik koşullarda selülozun tüm yüzeyi zar şeklinde kaplamasından dolayı oluşan oksijen yetersizliği gibi dezavantajların giderilmesi için çalkalamalı kültürle de bakteriyal selüloz üretimi yapılmaktadır (Park ve ark 2003, Czaja ve ark 2004, Aydın ve Aksoy 2014). Watanabe ve ark. (2000), *Acetobacter xylinum* BPR'ın sıvı HS besiyerinde ve CSL-Fruktoz olarak modifiye edilmiş besiyerinde, durgun ve çalkalamalı koşullarda selüloz oluşumunu incelemiştir. Czaja ve ark. (2004), HS besiyerinde statik ve çalkalamalı kültür kullanarak iki yöntemle üretilen bakteriyal selülozun karakterizasyonunu yapmışlardır. Ruka ve ark. (2012), yüksek verimli bakteriyal selüloz üretiminde statik yöntemle ve HS, HS-CSL modifiye besiyerinde üretim yapmışlardır. Mohite ve Patil (2014), 120 rpm'de çalkalamalı kültürle HS besiyeri kullanarak ürettikleri bakteriyal selülozun yapısını, fiziksel, mekanik ve termal karakterizasyonunu incelemişlerdir. Wu ve Li (2015), *Gluconacetobacter xylinus* suşu tarafından hava kaldırmalı biyoreaktör kullanarak HS besiyerinde bakteriyal selüloz üretimini incelemişlerdir. Khattak ve ark. (2015), palmiye özünden şeker kamışı üretimi sırasında oluşan atık kaynağı kullanılarak hem statik hem de 200 rpm'de çalkalamalı kültürle bakteriyal selüloz üretimi üzerine çalışmışlardır. Liu ve ark. (2015), çalışmalarında çalkalamalı ve statik kültürle bakteriyal selüloz üretimi arasındaki metabolik farklılıkları göstermek için iki yöntemle de üretim gerçekleştirmişlerdir. Kuo ve ark. (2016), asetat tamponu kullanarak *Gluconacetobacter xylinus* tarafından bakteriyal selüloz üretiminin arttırılmasını sağlamak amacıyla statik kültürle ve HS

besiyerini kullanarak üretim yapmışlardır. Yang ve ark. (2016), liçi ekstraktını alternatif bir besiyeri hammaddesi olarak kullanmış ve besiyerine ilave ederek statik kültürle HS besiyerinde bakteriyal selüloz üretimi gerçekleştirmişlerdir (Watanabe, vd., 2000; Czaja, vd., 2004; Ruka, vd., 2012; Mohite ve Patil, 2014; Wu ve Li, 2015; Khattak, vd., 2015; Liu, vd., 2015; Kuo, vd., 2016; Yang, vd., 2016). Yaptığımız çalışmada H4, HM3 ve M2 izolatlarıyla bakteriyal selüloz üretimi hem statik hem de çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilmiş ve üretim verimleri, su tutma kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

100 ml'lik HS Broth besiyerinde yapılan üretim sonucunda statik kültürle yapılan çalışmada H4, HM3 ve M2 bakteriyal selüloz numunelerinin kuru ağırlıkları sırasıyla 0,0526, 0,0437 ve 0,0383; çalkalamalı kültürle üretimde ise H4^C, HM3^C, M2^C'nin kuru ağırlıkları sırasıyla 0,0357, 0,0269 ve 0,0264 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerle spesifik ürün verim katsayıları hesaplanmıştır. Statik kültürde üretilen bakteriyal selüloz numunelerinin verimleri H4 için %22, HM3 için %15 ve M2 için %13; çalkalamalı kültürle üretilen numunelerin verimleri H4^C için %18, HM3^C için %12 ve M2^C için %15 olarak bulunmuştur. Üretim çalışmalarında bakteriyel selüloz verimi suş ve besiyerine bağlı olarak kaynaklarda belirtilen bulgularda 0.01-0.4 g.g⁻¹ aralığında değişmektedir (Shoda ve Sugano 2005; Bae ve Shoda 2005; Chawla, vd., 2009). Bu çalışmada elde edilen ürün verimleri, her iki üretim koşulu için de belirtilen aralıklardadır. Daha önce yapılmış çalışmalara bakıldığında elde ettiğimiz bakteriyal selüloz numunelerinin çoğunda daha yüksek üretim verimi sağladığımız belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde her üç numune için de statik kültürle daha yüksek üretim verimi elde edilmiştir. Bunun sebebinin çalkalamalı kültürde oluşan kesme gerilmesi, oluşan lifli yapının besiyerinin viskozitesini arttırması, oksijenin homojen olarak iletilmemesi ve spontan mutasyonlar ya da selüloz üretmeyen hücrelerin baskın hale gelip suşların stabilitesinin bozulması nedeniyle selüloz üretim kapasitelerinde azalma olduğu düşünülmektedir (Park, vd., 2003; Czaja, vd., 2004; Bıyık, 2007; Aydın ve Aksoy, 2015).

Su tutma kapasitesi bakteriyal selülozun en önemli özelliklerinden birisidir. Gıda endüstrisinde ve özellikle de tıbbi alanda uygulanabilmesi için su tutma kapasitesinin olabildiğince yüksek olması gerekmektedir (Vandamme, vd., 1998; Ciechanska, 2004; Ul-Islam, vd., 2012). Çalışmamızda da ürettiğimiz bakteriyal selüloz örneklerinin tıbbi alanda uygulanabilirliğinin belirlenebilmesi için su tutma kapasiteleri ölçülmüştür. Su tutma kapasiteleri statik koşullarda üretilen bakteriyal selüloz numuneleri için H4'ün

%88, HM3'ün %85 ve M2'nin %86; çalkalamalı koşullarda üretilenler için H4^C'nin %85, HM3^C'nin %78 ve M2^C'nin %83 olarak hesaplanmıştır. Lin ve ark. (2014), ürettikleri bakteriyel selülozun analizinde su tutma kapasitesini %89 olarak bildirmişlerdir. Kwak ve ark. (2015), *Acetobacter sp.* suşuyla bakteriyel selüloz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri selülozun su tutma kapasitesini %70 olarak bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çalışmalarla paralellik gösterip, değerlendirmelere bakıldığında sahip oldukları yüksek su tutma kapasitesine göre tıbbi alandaki ve gıda endüstrisindeki uygulamalar için uygundur (Lin, vd., 2014; Kwak, vd., 2015).

Üretilen bakteriyel selüloz numunelerinin toplam şeker analizi için spektrofotometrik fenol-sülfürik asit metodu kullanılmıştır (Bıyık, 2007). Glukoz çözeltilerinden oluşturulan standart eğriye göre *Komagataeibacter intermedius* (H4)' un ürettiği bakteriyel selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 383,7 (g/100ml), *Komagataeibacter xylinus* (HM3)' un ürettiği bakteriyel selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 213,9 (g/100ml) ve *Komagataeibacter xylinus* (M2)' un ürettiği bakteriyel selülozun içeriğindeki toplam şeker miktarı 197,1 (g/100ml) olarak hesaplanmıştır.

Statik kültürle yaptığımız üretimde besiyeri yüzeyinde bütün bir zar şeklinde selüloz oluşumu olurken; çalkalamalı kültürle yaptığımız üretimde düzensiz, lifli kürecikler şeklinde selüloz oluşumu gözlemlenmiştir. Bakteriyel selülozun ağsı yapısı, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Çalışmamızda, hem durgun kültürde hem de çalkalamalı kültürde elde edilen selüloz, liyofilize edilerek kurutulmuş ve üç boyutlu ağsı yapıları taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Görüntüler kıyaslandığında çalkalamalı kültürle üretilen bakteriyel selüloz liflerinin ince ve daha düzensiz yapıda oldukları; statik kültürle üretilen selülozun çalkalamalı yöntemle üretilene kıyasla daha düzenli ve kalın ağsı yapıya sahip oldukları görülmüştür.

Bakteriyel selüloz numunelerinin karakterizasyonu için Element Analizi, CP/MAS ¹³C katı NMR, TGA, FT-IR ve XRD analizleri yapılarak, elde ettiğimiz bakteriyel selülozların doğruluğu literatür verileriyle kıyaslanarak tespit edilmiştir.

Saflaştırılmış selülozun elemental bileşimine bakılmıştır ve bulgularımız diğer araştırmacılar tarafından bildirilen bileşim kaynaklarını desteklemektedir. Klemm ve ark. (2001) çalışmalarında bakteriyel selülozun element analiz sonucunu %42,39 C ve %6,39 H olarak bildirmişlerdir. Yoon ve ark. (2006), selülozun elemental analiz sonucunda

%45,44 C, %6,42 H ve %0,57 N içerdiğini gözlemlemişlerdir. Castro ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada elde ettikleri bakteriyel selülozun element analizi sonucunda 44.2 ± 1.6 C, 6.3 ± 0.25 H ve 0.39 ± 0.04 N içerdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise numunelerimizden H4 örneğinin %0,565 N, %44,55 C, %6,448 H, %0,140 S; HM3 örneğinin %0,556 N, %43,50 C, %6,745 H, %0,202 S; M2 örneğinin %0,585 N, %44,34 C, %6,521 H, %0,184 S elementlerini içerdiği belirlenmiştir. Yaptığımız ve buna paralellik gösteren diğer çalışmalardaki sonuçlar değerlendirildiğinde saf bakteriyel selülozun yüksek oranda karbon elementini, içeriğindeki karbonun yaklaşık 1/7'si kadar hidrojen elementini ve çok az oranda nitrojen ve kükürt elementini içerdiği görülmüştür (Klemm, vd., 2001; Yoon, vd., 2006; Castro, vd., 2012).

Selüloz I, birbirine paralel zincir yapılardan oluşan doğal selüloz olup iki ayrı allomorf formu bulunmaktadır; bunlar selüloz I α ve selüloz I β 'dir. Yapı oluşurken hangi oranda birleşecekleri türe ve kaynağa göre farklılık gösterirken, Selüloz I α genellikle bakteriyel selülozun ve alglerin yapısında baskın olup, selüloz I β bitkilerin yapısında baskın olarak bulunmaktadır (Zugenmaier, 2001; Nishiyama, vd., 2003). Besiyeri bileşiminin değiştirilmesiyle *Ga. xylinus* tarafından üretilen selüloz I α miktarının etkilendiği gözlemlenmiştir (Klemm, vd., 2006).

Elde ettiğimiz bakteriyel selüloz örneklerinde selüloz I α ve selüloz I β 'nin ayrımını sağlamak ve karakterizasyonu için CP/MAS ¹³C katı NMR analizi yapılmıştır. Kono ve ark. (2002), selüloz triasetat polimorflarının (CTA I ve CTA II) katı NMR analizi sonucunda; CTA I için 102 ppm'de C1'in, 63 ppm'de C6'nın olduğunu ve CTA II için 100 ppm'de C1'in, 65-67 ppm'de C6'nın olduğunu göstermişlerdir. Hesse ve Jäger (2005), çalışmalarında selülozun katı NMR analizini yaparak 105 ppm'de C1, 90 ppm'de C4, 76-70 ppm'de C3, C2, C5 ve 65 ppm'de de C6'nın olduğunu göstermişlerdir. Keshk ve Sameshima (2006), ürettikleri bakteriyel selülozun katı NMR analizi sonucunda; 105 ppm'de C1, 90 ppm'de C4, 78-70 ppm'de C3, C2, C5 ve 65 ppm'de C6'nın olduğunu bildirmişlerdir. Lopes ve ark. (2014), selülozun katı NMR analizi sonucuna göre 105 ppm'de C1, 90 ppm'de C4, 80-75 ppm'de C3, C2, C5 ve 70-65 ppm'de de C6'nın olduğunu bildirmişlerdir. Castro ve ark. (2015), elde ettikleri selülozun katı NMR analizi sonucunda; 102–108 ppm'de C1, 81–93 ppm'de C4, 60–70 ppm'de C6'nın olduğunu bildirmişlerdir (Kono, vd., 2002; Hesse ve Jäger, 2005; Keshk ve Sameshima, 2006; Lopes, vd., 2014; Castro, vd., 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz bakteriyel selülozun

CP/MAS ^{13}C katı NMR analizine göre 105-100 ppm'de C1'in, 90-80 ppm'de C4'ün, 75-65 ppm'de C2, C3,C5'in, 65-60 ppm'de C6'nın olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar referans çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Buna göre numunelerimizin selüloz I $_{\alpha}$ formunu içeren bakteriyal selüloz örnekleri olduğu belirlenmiştir.

Ticari bitkisel selülozun XRD analizinde karakteristik kırınım piki selüloz I $_{\beta}$ formunda 34,5° olarak bildirilmiştir. Bakteriyal selülozun sahip olduğu Selüloz I yapısındaki tipik karakteristik difraksiyon pikleri daha önce yapılan XRD çalışmalarında 14° : 16° : 23° civarında ve kristalin yüzeylerinin ise sırasıyla (101) : (101 $^{-}$) : (020) olduğu belirlenmiştir (Zugenmaier, 2001; Nishiyama, vd., 2003). Castro ve ark. 2012 yılında *Gluconacetobacter medellensis* genusu ile ürettikleri bakteriyal selülozun karakterizasyonunda XRD kırınım pikleri 14,4° : 16,7° : 22,5° olarak bildirmişlerdir. Ruka ve ark. (2012), *Gluconacetobacter xylinus* tarafından maksimum verimde bakteriyal selüloz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada XRD kırınım piklerini 14° : 16,8° : 23° olarak göstermişlerdir. Mohite ve Patil (2014) yaptıkları çalışmada *Gluconacetobacter hansenii* tarafından üretilen bakteriyal selülozun XRD kırınım pikleri 14,56° : 16,87° : 22,74° olarak saptamışlardır. Li ve ark. 2015 yılında *Acetobacter xylinum* kullanarak ürettikleri bakteriyal selüloz örneklerinin karakterizasyonu sonucu XRD kırınım piklerini 1)14,6° : 16,9° : 22,9°, 2)14,75° : 16,7° : 22,9° ve 3)14,45° : 16,7° : 22,65° olarak bildirmişlerdir. Khattak ve ark. (2015) çalışmasında *Glucanoacetobacter xylinum* kullanarak ürettikleri bakteriyal selülozun XRD analizi sonucunda kırınım pikleri 14,62° : 16,55° : 22,72° olarak bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2016) liçi ekstraktı kullanarak yaptıkları çalışmada *Gluconacetobacter xylinus* tarafından üretilen selülozun XRD kırınım piklerini 14,4° : 16,7° : 22,5° olarak saptamışlardır. Lin ve ark. (2016) fermente meyve suyu kullanarak *Komagataeibacter intermedius* tarafından üretilen bakteriyal selülozun XRD analiz sonucunda kırınım piklerini 14,4° : 16,7° : 22,5° olarak bildirmişlerdir (Castro, vd., 2012; Ruka, vd., 2012; Mohite ve Patil, 2014; Li, vd., 2014; Khattak, vd., 2015; Yang, vd., 2016; Lin, vd., 2016). Çalışmamızda ürettiğimiz selüloz örneklerinin XRD analizi sonuçlarına bakıldığında H4 örneğinin kırınım pikleri 14,5° : 16,7° : 22,5°; HM3 örneğinin kırınım pikleri 14,6° : 16,8° : 22,7°; M2 örneğinin kırınım pikleri 14,6° : 16,7° : 22,8° olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardaki bulgular ile çok benzer hatta bazı çalışmalarla aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Bakteriyal selülozun polimorfik yapısı FT-IR spektrumundaki piklerin şiddetine ve konumuna göre ortaya konulur (Mohite ve Patil, 2014). Cakar ve ark. (2014), *Gluconacetobacter xylinus* suşuyla yarı sürekli prosesle ürettikleri bakteriyal selülozun FT-IR analizi sonucunda 3415cm^{-1} bant bölgesinde O-H grubunun, 2999cm^{-1} bant bölgesinde C-H gruplarının, 1058cm^{-1} bant bölgesinde C-O-C grubunun, 1664cm^{-1} bölgesinde karboksilik asit ve 1431cm^{-1} bölgesindeki bantta karboksilat gruplarının olduğunu göstermişlerdir. Khattak ve ark. (2015b), yaptıkları çalışmada ürettikleri bakteriyal selülozdaki O-H gruplarının $3356\text{-}3365\text{cm}^{-1}$ aralığındaki bantlarda, C-H gruplarının 2885cm^{-1} bölgesindeki bantta, CH_2 gruplarının 1420cm^{-1} bölgesindeki bantta olduğunu bildirmişlerdir. Kuo ve ark. (2016) *Gluconacetobacter xylinus* suşu kullanarak ürettikleri bakteriyal selülozun karakterizasyonunda FT-IR analizini $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ dalga sayısında aldıkları ölçümler sonucunda $\sim 3430\text{-}3435\text{cm}^{-1}$ bölgelerindeki bantta O-H gruplarının, $\sim 2927\text{-}2949\text{cm}^{-1}$ bant bölgesi aralıklarında C-H gruplarının, $\sim 1050\text{cm}^{-1}$ bant bölgesinde C-O-C ve C-O-H gruplarının olduğunu göstermişlerdir. Yim ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada 3300cm^{-1} bant bölgesinde O-H gruplarının, 2880cm^{-1} bant bölgesinde C-H gruplarının, 1057cm^{-1} bant bölgesinde C-O-C ve C-O-H gruplarının olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bakteriyal selüloz örneklerinin FT-IR analiz sonuçları, kaynaklarda belirtilen bulgularla paralellik göstermiştir.

Çalışmamızda ürettiğimiz bakteriyal selüloz numunelerinin karakterizasyonu için yaptığımız Termo-gravimetrik analizine göre H4 numunesinin maksimum kütle kaybı sıcaklık 330°C 'ye ulaştığında, HM3 numunesi için maksimum kütle kaybı $316,5^\circ\text{C}$ 'de ve M2 örneği için ise maksimum kütle kaybının 329°C 'de olduğu saptanmıştır. Halib ve ark. (2012) ürettikleri bakteriyal selülozun TG analizinde T_{max} 342°C 'de maksimum kütle kaybı değerine ulaşıldığını bildirmişlerdir. Mohite ve Patil (2014), elde ettikleri bakteriyal selülozun mekanik ve termal karakterizasyonunda TGA sonucunda 303°C 'de maksimum kütle kaybı değerine ulaştıklarını göstermişlerdir. Lin ve ark. (2016), *Komagataeibacter intermedius* suşuyla ürettikleri bakteriyal selülozun TG analizinde maksimum kütle kaybının olduğu T_{max} değerini 315°C olarak bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar bakteriyal selülozun termal analizinde karakteristik bozunma sıcaklıklarının genellikle $300\text{-}360^\circ\text{C}$ arasında olduğunu göstermiştir. Bizim de elde ettiğimiz sonuçlar verilen bu değerler arasında olup daha önce yapılan çalışmalarını desteklemektedir.

7.SONUÇ

Bu çalışma, tüm dünyada ve son yıllarda ülkemizde de önem kazanan, bitkisel selüloza alternatif olarak üretilen, çok çeşitli uygulama alanına sahip olan ve özellikle tıbbi alandaki uygulamaları gün geçtikçe artan bir biyopolimer olan bakteriyal selülozu üretmek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada farklı fermentasyon yöntemleri kullanarak yüksek verimde bakteriyal selüloz üretimi, yüksek selüloz üretme kapasitesine sahip asetik asit bakteri suşlarının tanımlanması ve üretilen bakteriyal selülozun mekanik özelliklerinin araştırılması üzerine çalışılmıştır.

Bu amaçla çalışmada asetik asit bakterilerinin izolasyonu için alkol ve şeker oranı yüksek en iyi ve ekonomik kaynak olan çeşitli sirke örnekleri kullanılmıştır. Farklı besiyerleri kullanılarak çok çeşitli asetik asit bakterileri elde edilmiştir. İzole edilen asetik asit bakterilerinin öncelikle klasik taksonomiye göre identifikasyonu yapılmış, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakılmış ardından selüloz üretim yetenekleri incelenmiştir. Selüloz üretim verimi en yüksek olan H4, HM3 ve M2 izolatları seçilmiş ve çalışmaya bu izolatlarla devam edilmiştir.

Seçilen izolatların klasik taksonomiye göre identifikasyonu, yapılan dizi analiziyle moleküler olarak da desteklenmiştir. Moleküler identifikasyonda 16s rRNA sekans analizine göre H4 izolatı *Komagataeibacter intermedius* (önceden *Gluconacetobacter intermedius*), HM3 izolatı *Komagataeibacter xylinus* (önceden *Gluconacetobacter xylinus*), M2 izolatı *Komagataeibacter xylinus* olarak tanımlanmıştır.

Komagataeibacter intermedius (H4) ve *Komagataeibacter xylinus* (HM3 ve M2) suşlarından hem statik kültürle hem de çalkalamalı kültürle bakteriyal selüloz üretimi yapılarak üretilen selülozların verimleri karşılaştırılmıştır. En yüksek verim *Komagataeibacter intermedius* strain (H4) tarafından statik kültürle yapılan üretimle sağlanmıştır. En düşük yüzde verim *Komagataeibacter xylinus* (HM3) izolatı kullanılarak çalkalamalı kültürle yapılan üretimde saptanmıştır.

Saflaştırılan bakteriyal selüloz örneklerinin içerdiği toplam şeker miktarlarına ve su tutma kapasitelerine bakılmıştır. Bakteriyal selüloz örneklerinin %78-88 arasında yüksek su tutma kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Her üç izolatla üretilen bakteriyal selüloz numuneleri saflaştırılıp liyofilize edildikten sonra taramalı elektron mikroskopunda incelenmiş, statik ve çalkalamalı kültürle üretilen selülozların ağsı yapılarındaki farklılıklar görüntülenmiştir.

Ürettiğimiz selülozun gelecek çalışmalarda geliştirilebilmesi, uygulama alanlarında kullanılabilirliğinin arttırabilmesi için mekanik özellikleri incelenmiştir. Statik kültürle daha yüksek verim elde edildiği için mekanik testlerde kullanılmak üzere bakteriyal selüloz üretimi statik kültürle yapılmıştır. Elemental analizi, CP/MAS 13C katı NMR analizi, TG analizi, FT-IR ve XRD analizi yapılan bakteriyal selüloz numuneleri literatür değerleri ile paralellik göstermiş, daha önce yapılan çalışmaları desteklemiştir.

Yurt dışında bakteriyal selüloz üretimi konusunda çok fazla çalışma yapılmasına rağmen ülkemizde çok sınırlı sayıdadır. Yaptığımız çalışma ile ülkemizde ilk kez *Komagataeibacter intermedius* suşu izole edilip, bu izolatla bakteriyal selüloz üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bunlara ek olarak bakteriyal selülozun üstün özelliklerinin ortaya çıkartılması açısından yapılan karakterizasyon analizleri de önemlidir. Daha önce *Komagataeibacter xylinus* suşuyla çalışılmasına rağmen üretilen selülozun bu şekilde geniş kapsamlı karakterizasyonu açısından çalışmamız ülkemizde yine bir öncüdür.

Gelecek çalışmalar göz önüne alındığında daha yüksek verimlilikte bakteriyal selüloz üretimi için statik kültürle üretim yapılacaksa ölçek büyütme sorunu ve besiyeri içeriğinin zenginleştirilmesi üzerinde çalışmalar yapılabilir ya da çalkalamalı kültürde kültür sıvısının viskozitesinin düşürülmesi sağlayarak iyi bir oksijen iletimi sağlayan özel fermentörler kullanılabilir. Bu sayede üretilen bakteriyal selüloz en yüksek verimlilikte ticari alanlarda kullanılabilecek miktarlarda üretilir.

Ülkemizde bakteriyal selüloz üretimiyle ilgili çalışmalar hala çok azdır. Çalışmamızda bakteriyal selüloz üretiminin gerçekleştirilmesi; gelecek çalışmalarda ekonomik daha fazla kaynak kullanarak selüloz üretim verimliliğinin arttırılması, üretimindeki farklılıklarla yeni özellikler kazanmaya çok elverişli olan bakteriyal selülozun mekanik özelliklerinin geliştirilmesi, bu gelişen mekanik özellikler sayesinde uygulama alanlarının daha da çeşitlilik kazanması ve tıp alanında kullanımının yaygınlaştırılmasına katkıda bulunulması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akmaz, S., “Selülozun enzimli hidroliz yoluyla glukoza dönüştürülmesi ve tepkime kinetiğinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul (2001).
- Akoğlu, A., Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., and Çakır, İ., "Bakteriyel Selülozun Özellikleri ve Gıda Sanayisinde Kullanımı", *Gıda Dergisi*, 35(2) (2010).
- Aşık, N., “Farklı besi ortamı ve yüzey-hacim oranları kullanılarak bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bartın (2016).
- Ateş, S., “Pamuk Bitkisi Saplarının Kimyasal ve Enzimatik Yöntemlerle Değerlendirilmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (1990).
- Aydın, A.Y., , Aksoy, N., “*Gluconacetobacter Hansenii* P2a İle Gerçekleştirilen Bakteriyel Selüloz Üretiminin Kinetik Modellenmesi”, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi A-Uygulamalı Bilimler ve Mühendislik*, Araştırma Makalesi, 16(2): 239 – 247 (2015).
- Bae, S. O. and Shoda M., “Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1): 45–51 (2005).
- Bielecki, S., Krystynowics, A., Turkiewics, M. and Kalinowska, H. “Bacterial cellulose”., *Biopolymers: Vol. 7. Polysaccharides I*, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Munster, Germany, 37-90 (2001).
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., and Kalinowska, H., "Bacterial cellulose", *Biopolymers online*, *Wiley- VCH Verlag*, Germany, 31–85 (2005).
- Brock, T.D. and Madigan, M.T., “Biology of Microorganisms”, *Prentice-Hall International Inc.*, 7: 899 (1994).
- Brown, R.M. , Willison, JR., J.H. and Richardson, C.L., “Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process”, *Proc Natl Acad Sci.*, 73(12): 4565–4569 (1976).
- Brown Jr. RM., “Cellulose structure and biosyn-thesis”, *Pure Appl Chem* , 71(5): 767–775 (1999).
- Brown-Etris, M., Punchello, M., “Evaluation of XCell® Cellulose Wound Dressing on Wound Healing of Pressure Ulcers”, [http://www.xcellwoundcare.com/file_storage/G3.2- Pressure Ulcer-Etris_6_24.pdf](http://www.xcellwoundcare.com/file_storage/G3.2-Pressure_Ulcer-Etris_6_24.pdf) (Ziyaret Edilme Tarihi: 31.03.2017).
- Brown, R. M. Jr., “Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Products”: www.botany.utexas.edu, Position Paper, (Ziyaret Edilme Tarihi: 20.03.2017).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Cakar, F., Özer, I., Aytekin, A. Ö. and Şahin, F., "Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium", *Carbohydrate polymers*, 106: 7-13 (2014).
- Carr, J., "Methods for identifying acetic acid bacteria", *Identification methods for microbiologists*, 33-47 (1968).
- Carrascosa, A. V., R. Muñoz and R. González, "Molecular wine microbiology", *Elsevier* (2011).
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I. and Gañán, P., "Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus." *Carbohydrate polymers*, 89(4): 1033-1037 (2012).
- Castro, C., Cordeiro, N., Faria, M., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Filpponen, I., Velez, L., Rojas, O. J. and Gañán, P., "In-situ glyoxalization during biosynthesis of bacterial cellulose", *Carbohydrate polymers*, 126: 32-39 (2015).
- Chao, Y.P., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., Shoda, M., "Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an airlift reactor", *Biotechnology Techniques*, 11(11): 829–832 (1997).
- Chao, Y.P., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M., "Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3): 345–352 (2000).
- Chao, Y., Mitarai, M., Sugano, Y., Shoda, M., "Effect of Addition of Water-soluble Polysaccharides on Bacterial Cellulose Production in a 50-L Airlift Reactor", *Biotechnology Progress*, 17(4): 781–785 (2001a).
- Chao, Y., Sugano, Y., Shoda, M., "Bacterial cellulose production under oxygenenriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6): 673–679 (2001b).
- Chávez-Pacheco, J.L., Martínez-Yee, S., Contreras, M.L., Gómez-Manzo, S., Membrillo-Hernández, J., and J.E. Escamilla, "Partial Bioenergetic Characterization Of *Gluconacetobacter xylinum* Cells Released From Cellulose Pellicles By A Novel Methodology", *J. App. Microbiol.*, 99: 1130-1140 (2005).
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S., "Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications", *Food Technology and Biotechnology*, 47(2): 107-124 (2009).
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M. ve Demirci, A., "Enhanced Production of Bacterial Cellulose by Using a Biofilm Reactor and Its Material Property Analysis", *Journal of Biological Engineering*, 3:12 (2009).
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A. "Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis", *Biomacromolecules*, 12(3): 730–736 (2011).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Choi, C. N., Song, H. J., Kim, M. J., Chang, M. H. ve Kim, S. J., “Properties of Bacterial Cellulose Produced in A Pilot-Scale Spherical Type Bubble Column Bioreactor”, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1): 136-140 (2009).
- Ciechanska, D., “Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications”, *Fibres Text. East. Eur.*, 12: 69–72 (2004).
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J., “Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1551-1558 (2002).
- Cleenwerck, I., de Vos, P., “Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology”, *International Journal of Food Microbiology*, (125): 2-14 (2008).
- Crescenzi, V., Dentini, M. and Coviello, T., “Solution and Gelling Properties of Polysaccharides”. *Polyelectrolytes*, 41: 61-71 (1991).
- Czaja, W., Romanovicz, D., and Brown, R.M., “Structural Investigations of Microbial Cellulose produced in Stationary and Agitated Culture”, *Cellulose*, 11: 403-411 (2004).
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown Jr., R.M., “Microbial cellulose – The natural power to heal wounds”, *Biomaterials*, 27: 145–151 (2006).
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kaweckı, M. , ve Brown, R. M., “The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications”, *Biomacromolecules*, 8: 11 (2007).
- Çoban, E.P., Bıyık, H.H., “Asetik asit bakterilerinden elde edilen alternatif selüloz”, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2): 19-26 (2008).
- Çobanoğlu, Ö., Eryılmaz, J., Cass, G., Akdemir, Ö., Şener, D., Hamitbeyli, A., “Microbial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* and Its Application For The Fashion And Textile Industry”, *The International Istanbul Textile Congress* (2013).
- De Ley, J., Gillis, M. and Swings, J., “Family *Acetobacteraceae*”, 267-268 (1984).
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelben, K., Janssens, D., Marzotto, M., “Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit”, *International Journal Systematic and Evolutionary microbiology*, 55: 2365- 2370 (2005).
- Denny T. P., “Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis”, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 173-197 (1995).
- De Vuyst, L., N. Camu, T. De Winter, K. Vandemeulebroecke, V. Van de Perre, M. Vancanneyt, P. De Vos and I. Cleenwerck, "Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans", *International journal of food microbiology*, 125(1): 79-90 (2008).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- De Vero, L., and Giudici, P., “Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE”, *International Journal of Food Microbiology*, 125: 96- 101 (2008).
- Dursun, D., Yakar N., Çakır, İ., Çakmakçı, M. L., “Mikrobiyel Selüloz Üretimi ve Gıda Sanayiinde Kullanımı”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu (2006).
- Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G., “The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations”. *International journal of Food Microbiology*, 74: 57-64 (2002).
- Dutta, D. and R. Gachhui, "Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea", *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(2): 353-357 (2007).
- El-Saied, H., El-Diwany, A. I., Basta, A. H., Atwa, N. A. and El-Ghwas, D. E., "Production and characterization of economical bacterial cellulose", *Bioresources*, 3(4): 1196-1217 (2008).
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., Ruiz-Larrea, F., “Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production”, *European Food Research and Technology*, 231: 813-819 (2010a).
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., and Ruiz-Larrea, F., "Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method", *Food microbiology*, 27(8): 973-978 (2010b).
- Frateur, J., “Essai su la systématique des *Acetobacters*”, *La Cellule*, 53: 287-392 (1950).
- Frauter, J. and Simonart, P., “Etude de la flore bactérienne d’un acétificateur de vinaigre d’alcool”, *IX Congresso Internazionale Industrie Agrarie*, Roma (1952).
- Fu, L., Zhang, J., Yang, G., “Present status and applications of bacterial cellulose based materials for skin tissue repair”, *Carbohydrate Polymers*, 92: 1432– 1442 (2013).
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Crystales, R., Tapia-Hernández, A., Jimenez- Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., “Novel nitrogenfixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1305-1314 (2001).
- Gama, M., Gatenholm, P., Klemm, D., “Bacterial Nano Cellulose A Sophisticated Multifunctional Material”, *International Standard Book*, 13: 978-1-4398-6992-5 (2013).
- Geyer, U., Heinze, T., Stei, A., Klenn, D., Marsch, S., Schumann, D. And Schmauder, H., “Formation, Derivatization and Applications Of Bacterial Cellulose”, *Int. J. Biol. Macromol*, 16: 343-347 (1994).
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A. and Guillamòn, JM., “Application of Molecular Methods Fort He Differntiation of Acetic Acid Bacteria in a Red Wine Fermentation”, *Journal of Appl. Microbiol.*, 96: 853-860 (2004).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Gözükara, E.M., *Biyokimya İnönü Üniversitesi Yayınları*, 2: 189-241, Malatya (1994).
- Gugliandola C., Maugeri TL., Cacamo D., Stackebrandt E., “Bacillusaeolius sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy)”, *Systematic and Applied Microbiology*, 26/2, 172-176 (2003).
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., and Giudici, P., "Characterization of Acetic Acid Bacteria in “Traditional Balsamic Vinegar”.”, *International Journal of Food Microbiology*, 106(2): 209-212 (2006).
- Hafizoğlu, H., “Orman Ürünleri Kimyası”, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, *K.T.Ü Basımevi*, Trabzon, 52: 1-245 (1982).
- Halib, N., Amin, M. C. I. M. and Ahmad, I., "Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose (Sifat fizikokimia dan pencirian nata de coco daripada industri makanan tempatan sebagai sumber selulosa)", *Sains Malaysiana*, 41(2): 205-211 (2012).
- Hesse, S. and Jäger, C., “Determination of the ¹³C-chemical shift anisotropies of cellulose I and cellulose II”, *Cellulose*, 12: 5-14 (2005).
- Hestrin, S. and Schramm, M., “Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose”, *Biochem. J.*, 58: 345-352 (1954).
- Hofinger M, Bertholdt G, Weuster-Botz D., “Microbial Production of Homogeneously Layered Cellulose Pellicles in a Membrane Bioreactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (9): 2237–2240 (2011).
- Holmes, D., "Bacterial cellulose", A thesis presented for the degree of Master of Engineering in Chemical and Process Engineering, Department of Chemical and Process Engineering, *University of Canterbury Christchurch*, New Zealand, 1-74 (2004).
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A.M., Schmauder, H.P., “Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1)”, *Eng. Life Sci.*, 6: 537–545 (2006).
- Hu W., Chen S., Yang J., Li Z., Wang H., “Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites”, *Carbohydrate Polymers*, 10: 1043–1060 (2014).
- Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., Kim, Y.S., “Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88: 183–188 (1999).
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A., “Bacterial cellulose—a masterpiece of nature’s arts” , *Journal of Material Science*, 35: 261– 270 (2000).
- Ioelovich, M., “Nanoparticles of amorphous cellulose and their properties, *American Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1): 41-45 (2013).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Ishihara, M., M. Matsunaga, N. Hayashi and V. Tişler , "Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose", *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7): 986-991 (2002).
- Johnson, D.C. and Neogi, A.N., "Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose", US Patent, 4863565 (1989).
- Jonas, R., Farah, L.F., "Production and Application Of Microbial Cellulose", *Polymer Degradation and Stability*, 59: 101-106 (1998).
- Jung, J.Y., Park, J. K., Chang H. N., "Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living noncellulose producing cells", *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 347– 354 (2005).
- Jung, J.Y., Khan, T., Park, J.K., Chang, H.N., "Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter", *Korean J. Chem. Eng.*, 24: 265–271 (2007).
- Kaya, A., "Acetobacter xylinum'un suşlarında selüloz üretimi ile yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2007).
- Kappeng, K., Pathom-Aree, W., "Isolation of acetic acid bacteria from honey", *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3 (1): 71-76 (2009).
- Kenne L., and Lindberg B., "The Polysaccharides", *Academic Press*, New York, 2: 287-363 (1983).
- Kerstens, K., P. Lisdiyanti, K. Komagata and J. Swings, "The family *Acetobacteraceae*: the Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*", The prokaryotes, *Springer*, 163-200 (2006).
- Keshk, S.M.A.S. and Sameshima, K., "Evaluation of Different Carbon Sources for the Bacterial Cellulose Production", *African Journal Of Biotechnology*, 4: 478-482 (2005).
- Khattak, W. A., Khan, A. T., Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., Wahid, F. and Park, J. K., "Production, Characterization and Biological Features of Bacterial Cellulose From Scum Obtained During Preparation of Sugarcane Jaggery (Gur)", *Journal of food science and technology*, 52(12): 8343-8349 (2015a).
- Khattak, W. A., Khan, T., Ul-Islam, M., Wahid, F. and Park, J. K., "Production, characterization and physico-mechanical properties of bacterial cellulose from industrial wastes", *Journal of Polymers and the Environment*, 23(1): 45-53 (2015b).
- Kırcı, H., "Kağıt hamuru endüstrisi ders notları", *K.T.Ü Yayınları*, Trabzon, 269 (2000).
- Kim, D., Kim, Y.M. and Park, D.H., "Modification of *Acetobacter xylinum* Bacterial Cellulose Using Dextranucrase and Alternansucrase", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 704-708 (1999).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Kim, J.Y., Kim, J.N., Wee, Y.J., Park, D.H., Ryu H.W., “Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 in a Rotary Biofilm Contactor”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 137: 529–537 (2007).
- Klemm D., Schumann D., Udhard U. and Marsch S., “Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery”, *Prog. Polym. Sci.*, 26: 1561- 1603 (2001).
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A., “Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”, *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22): 3358-3393 (2005).
- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Hessler, N., Hornung, M., Schmauder, H. P., “Nanocelluloses as innovative polymers in research and application”, *Polysaccharides II*, 205: 49–96 (2006).
- Kongruang, S., “Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 148: 245–256 (2008).
- Kono, H., Yunoki, S., Shikano, T., Fujiwara, M., Erata, T. And Takai, M., "CP/MAS 13C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS 13C NMR spectrum of the native cellulose", *Journal of the American Chemical Society*, 124(25): 7506-7511 (2002).
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I. and Stockar, U., “Influence of Nutritional Factors on the Nature, Yield and Composition of Exopoly sacchradides Produced by *Gluconacteobacter xylinus* I-2281”, *Applied and Environmental Microbiology*, 6091-6098 (2003).
- Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F., “Effect of Agitator Configuration on Bacterial Cellulose Productivity in Aerated and Agitated Culture”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83: 371-376 (1997).
- Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Drynska, E. and GalaS, E., “Bacterial Cellulose Biosynthesis and Application”, *Biotechnologia.*, 30: 120-132 (1995).
- Krystynowicz, A., Galas, E. and Pawlak, E., “Method of Bacterial Cellulose Production”, *Polish Patent*, P-299907 (1997).
- Krystnowicz, A., Czaja, W., Jezierka, A.W., Miskiewicz, M.G., Turkiewicz, M. and Bielecki, S., “Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29: 189-185 (2002).
- Krystynowicz, A., Koziolkiewicz, M., Wiktorowska-Jezierska, A., Bielecki, S., Klemenska, E., Masny, A. and Plucienniczak, A., “Molecular Basis Of Cellulose Biosynthesis Disappearance in Submerged Culture of *Acetobacter xylinum*”, *Acta Biochimica Polonica*, 52: 3691-698 (2005).
- Kuo, C.H., Chen, J. H., Liou, B. K. and Lee, C. K., "Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*", *Food Hydrocolloids*, 53: 98-103 (2016).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Kwak, M. H., Kim, J. E., Go, J., Koh, E. K., Song, S. H., Son, H. J., Kim, H. S., Y. Yun, Y. H., Jung Y. J. and Hwang, D. Y., "Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications", *Carbohydrate polymers*, 122: 387-398 (2015).
- Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H., "Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16(2): 71-75 (1997).
- Legge, R.L., "Microbial Cellulose as a Specialty Chemical", *Biotechnology Advances*, 8: 303–319 (1990).
- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J. and Liu, H., "Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*", *Carbohydrate polymers*, 120: 115-119 (2015).
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R. and Li, Z., "Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source." *Bioresource technology*, 151: 113-119 (2014).
- Lin, S.P., Huang, Y.H., Hsu, K.D., Lai, Y.J., Chen, Y.K., and Cheng, K.C., "Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice", *Carbohydrate Polymers*, 151: 827-833 (2016).
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., "Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines", *Microbiol Cult Coll.*, 19: 91–98 (2003).
- Liu, M., Zhong, C., Wu, X. Y., Wei, Y. Q., Bo, T., Han, P. P. and Jia, S. R., "Metabolomic profiling coupled with metabolic network reveals differences in *Gluconacetobacter xylinus* from static and agitated cultures", *Biochemical Engineering Journal*, 101: 85-98 (2015).
- Lopes, T. D., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A. and Sousa Faria-Tischer, P. C., "Bacterial Cellulose and Hyaluronic Acid Hybrid Membranes: Production and Characterization", *International journal of biological macromolecules*, 67: 401-408 (2014).
- Ludwicka, K., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Kubiak, K., Kolodziejczyk, M., Pankiewicz, T., Bielecki, S., "Medical and Cosmetic Applications of Bacterial NanoCellulose", *Bacterial Nanocellulose*, 9: 145-164 (2016).
- Machado, R. T., Gutierrez, J., Tercjak, A., Trovatti, E., Uahib, F. G., Padua Moreno, G., Nascimento, A. P., Berreta, A. A., Ribeiro, S. J. And Barud, H. S., "*Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production", *Carbohydrate Polymers*, 152: 841-849 (2016).
- Madhaiyana, M., Saravanamb, V. S., Jovic, D. B. S. S., Leea, H., Thenmozhid, R., Harie, K., "Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats", *India Microbiological Research*, 159: 233-243 (2004).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Maguire, A., "Bacterial Cellulose Based Medical Devices", Master of Engineering Science, *The University of Western Ontario*, London (1997).
- Margaritis, A. and Pace, G.W., "Microbial polysaccharides", *Comprehensive Biotechnology*, 3: 1005-44(1985).
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N., "Production of Cellulose From Glucose by *Acetobacter xylinum*", *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 18–22 (1993).
- Mason, L. M., and Claus, W., "Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans*, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov.," *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 174-184 (1989).
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., Yoshinaga, F., "A Synthetic Medium For Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*", *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 60: 575–579 (1996).
- Mohite, B. V. and Patil, S. V., "Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529", *Carbohydrate polymers*, 106: 132-141 (2014).
- Moriello VS., Lama L., Poli A., Gugliandolo C., Maugeri TL., Gambacorta A., Nicolaus B., "Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(2): 95-101 (2003).
- Mormino R., ve Bungay, H. , "Composites of Bacterial Cellulose and Paper Made with a Rotating Disk Bioreactor", *Appl Microbiol Biotechnol*, 62: 503–506 (2003).
- Muñoz-Rojas, J. and J. Caballero-Mellado, "Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth.", *Microbial Ecology*, 46(4): 454-464 (2003).
- Nelson, D. L. and M. M. Cox, "Lehninger Biochemie", *DrMaster Publications*, 293-324 (2005).
- Nguyen, V.Y., Flanagan, B., Gidley, M.J., Dykes, G.A., "Characterization Of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain From Kombucha", *Curr. Microbiol.*, 57: 449–453 (2008).
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L. B., Owusu, M., Andersson, M., Holzapfel, W. H., "The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods", *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168–186 (2007).
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., & Langan, P., "Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(alpha) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction", *Journal of the American Chemical Society*, 125(47): 14300–14306 (2003).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Noro, N., Sugano, Y., Shoda, M., “Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2): 199–205 (2004).
- Ophir T., and Gutnick D. L., “A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 740-745 (1994).
- Ougiya H, Watanabe K, Morinaga Y, Yoshinaga F., “Emulsion effect of bacterial cellulose”, *Biosci Biotech Biochem*, 61: 1541-1545 (1997).
- Özdemir, G., “Aktif Çamurda Flok Oluşturan Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkili Faktörler”, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir (1997).
- Palonen, H., “Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose”, *University of Technology Espoo*, Finland (2004).
- Park, J. K., Park, Y. H. and Jung, J.Y., “Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* PJK Isolated from A Rotten Apple”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(2): 83-88 (2003).
- Pérez, J., J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia and J. Martinez, "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview." *International Microbiology*, 5(2): 53-63 (2002).
- Poyrazoğlu, E., “Yüzey kültür fermentasyon yöntemi ile bazı asetik asit bakterilerinden ekstrasellular polisakkarit üretimi”, Doktora Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aydın (2007).
- Putra, A., Kakugo, A., Furukawa, H., Gong, J.P., “Orientated bacterial cellulose culture controlled by liquid substrate of silicone oil with different viscosity and thickness”, *Polymer Journal*, 41(9): 764–770 (2009).
- Ramana, K.V., Tomar, A., Singh, L., “Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 245–248 (2000).
- Ramesh H. P. and Tharanathan R. N., “Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value”, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23: 149-173 (2003).
- Raspor P. and Goranovic D., “Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2): 101-124 (2008).
- Rezaee, A., Sanaz, S. and Forozandemogadam, M., “Role of Plasmid in Production of *Acetobacter xylinum* Biofilms”, *American Journal of Biotechnology*, 1(3): 121-125 (2005).
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M., “Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria”, *Microbiological Review*, 35-58 (1991).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Römbling U., "Molecular biology of cellulose production in bacteria", *Research in Microbiology*, 153: 205-212 (2002).
- Ruka, D. R., Simon, G. P. and Dean, K. M., "Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose", *Carbohydrate polymers*, 89(2): 613-622 (2012).
- Ryu, D.D.Y., Mandels, M., "Cellulase Biosynthesis and Applications", *Enzyme Microb. Technol.*, 2: 91-102 (1980).
- Sakairi, N., Asamo, H., Ogawa, M., Nishi, N. and Tokura, S., "A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*", *Carbohydr. Polym.*, 35: 233-237 (1998).
- Saldamlı, I., "Gıda Kimyası", *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 38-105 (1998).
- Sani, A. & Dahman, Y., "Improvements in The Production of Bacterial Synthesized Biocellulose Nanofibres using Different Culture Methods", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(2): 151-164 (2010).
- Shah, J., Brown Jr., R.M., "Towards electronic paper displays made from microbial cellulose", *Applied Microbial Biotechnology*, 66: 352–355 (2005).
- Sharafi, S., Rasooli, I., Beheshti-Maal, K., "Isolation, Characterization and Optimization of Indigenous Acetic Acid Bacteria and Evaluation Of Their Preservation Methods", *Iranian Journal Of Microbiology*, 2(1): 38 (2010).
- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S., Ogawa, M., Nishi, N., Tokura, S., "Biosynthesis of a Novel Polysaccharide by *Acetobacter xylinum*", *Int. J. Biol. Macromol.*, 16: 297–300 (1994).
- Shoda M., Sugano Y., "Recent advances in bacterial cellulose production", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10: 1-8 (2005).
- Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G. ve Lee, S.J., "Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Bacterial Cellulose by a Newly Isolated *Acetobacter sp.* A9 in Shaking Conditions", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33: 1-5 (2001).
- Son, H.J., Kim, H.G., Kim, K.K., Kim, H.S., Kim, Y.G. and Lee, S.J., "Increased Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter sp.* V6 in synthetic media under Shaking Culture Conditions", *Bioresource Technology*, 86: 215- 219 (2003).
- Song, H.J., Li, H., Seo, J.H., Kim, M.J., Kim, S.J., "Pilot-Scale Production Of Bacterial Cellulose by a Spherical Type Bubble Column Bioreactor Using Saccharified Food Wastes", *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1): 141–146 (2009).
- Sun, D.P., Zhang, J.D., Zhou, L.L., Zhu, M.Y., Wu, Q.H., Xu, C.Y., "Production of bacterial cellulose with *Acetobacter xylinum* 1.1812 fermentation", *J. Nanjing Univ. Sci. Technol.*, 29: 601–604 (2005).
- Sutherland, I.W., "Extracellular polysaccharides", In: Rehm H.J., Reed G. (eds). *Biotechnology, Weinheim VCH.*, 6: 615-57 (1996).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sutherland I. W., “Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides”, *Trends Biotechnol*, 38: 41-47 (1998).
- Sutherland, I.W., “Microbial polysaccharides from Gram negative bacteria”, *Int. Dairy J.*, 11:663-674 (2001).
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., Brittberg, M., Gatenholm, P., “Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage”, *Biomaterials*, 26: 419–431 (2005).
- Swings, J., “The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*”, The Procaryotes, *Springer-Verlag*, New York, ,2(3): 2268-2286 (1992).
- Tavernier P., Portais J. C., Nava Saucedo J. E., Courtois J., Courtois B. and Barbotin J. N., “Exopolysaccharide and Poly-b-Hydroxybutyrate Coproduction in two *Rhizobium Meliloti* Strains”, *Appl. Environ. Microb.*, 63: 21-26 (1997).
- Teeri, T., “Crystalline Cellulose Degradation: New Insight Into The Function Of Cellobiohydrolases”, *Trends Biotechnol.*, 15: 160–167 (1997).
- Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K., Yamada, F. and Yoshinaga, F. , “The Characterization Of An Acetic Acid Bacterium Useful For Producing Bacterial Cellulose In Agitation Cultures: The Proposal Of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. *nov.*”, *Journal of General and Applied Microbiology*, 41(4): 307-314 (1995).
- Tsao, G.T., “Fermentation Substrates From Cellulosic Materials: Production of Fermentable Sugars From Cellulosic Materials”, *Ann. Rep. Ferment. Proc.*, 21 (1978).
- Tsuchida, T. and Yoshinaga, F., “Production of Bacterial Cellulose by Agitation Culture Systems”, *Pure & Applied Chemistry*, 69: 2453-2458 (1997).
- Ulbrink, T. Y. L., “Cellulolytic Fermentation by *Clostridium thermocellum*”, *Georgia Institute of Technology* (1997).
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J.K., “Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification”, *Carbohydr. Polym.*, 88: 596–603 (2012).
- Valla, S., Coucheron, D.H., Fjaervik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., RosS, P., Amikam, D. and Benziman, M., “Coning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinus*: complementation of cellulose negative mutant by UDPG pyrophosphorylase structure gene”, *Mol. Gen. Genet.*, 217: 26-30 (1989).
- Väljamäe, P., Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G. and Johanson, G., “Acid Hydrolysis Of Bacterial Cellulose Reveals Different Modes Of Synergistic Action Between Cellobiohydrolase I and Endoglucanase I”, *Eur. J. Biochem*, 266: 327-334 (1999).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Vandamme, E.J., Baets, D.S., Vanbaelen, A., Joris, K. and Wulf, D.P., "Improved Production Of Bacterial Cellulose and Its Application Potential", *Polymer Degradation and Stability*, 59: 93-99 (1998).
- Wan, Y.Z., Huang, Y., Yuan, C.D., Raman, S., Zhu, Y., Jiang, H.J., He, F., Gao, C., "Biomimetic Synthesis Of Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposites For Biomedical Applications", *Materials Science and Engineering C*, 27: 855–864 (2007).
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F., "Structural Features and Properties Of Bacterial Cellulose Produced In Agitated Culture", *Cellulose*, 5: 187-200 (1998).
- Watanabe, K., Shibata, A., Ougiya, H., Hioki, N. and Morinaga, Y., "Method for processing bacterial cellulose", *US Patent* 6: 153-413 (2000).
- Wu, J. J., Ma, Y.K., Zhang, F.F., and Chen, F.S., "Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar", *Food microbiology*, 30(1): 289-297 (2012).
- Wu, S. C. and Li, M. H., "Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4): 444-449 (2015).
- Yalpani M., Sandford P. A., "Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments", Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications, *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, 311-35 (1987).
- Yamada, Y. and M. Akita, "An electrophoretic comparison of enzymes in strains of *Gluconobacter* species." *The Journal of General and Applied Microbiology* , 30(2): 115-126 (1984).
- Yamada, Y., K. Hoshino and T. Ishikawa , "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level" *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61(8): 1244-1251 (1997).
- Yamada, Y., Hoshino, K.-I. and Ishikawa, T., "Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 64: *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic])", *Int J Syst Bacteriol*, 48: 327–328 (1998).
- Yamada, Y., Yukphan, P., "Genera and Species in Acetic Acid Bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, (125): 15-24 (2008).
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., and Nakagawa, Y., "Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria." *Annals of microbiology*, 62(2): 849-859 (2012a).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. & Nakagawa, Y., "Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*)", *J Gen Appl Microbiol*, 58: 397–404 (2012b).
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. & Nakagawa, Y., "Komagataeibacter gen. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published , Validation List no. 149", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 1–5 (2013).
- Yamanaka, S., Watanabe, K. and Suzuki, Y., "Hollow Microbial Cellulose, Process For Preparation Thereof and Artificial Blood Vessel Formed Of Said Cellulose", *European patent* 0396344A2 (1990).
- Yamanaka, S. and Sugiyama, J., "Structural Modification Of Bacterial Cellulose", *Cellulose*, 7(13): 213-225 (2000).
- Yang, Y.K., Park, S.H., Hwang, J.W., Pyun, Y.R., Kim, Y.S., "Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 Under Agitated Condition", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85: 312–317 (1998).
- Yang, X.Y., Huang, C., Guo, H. J., Xiong, L., Luo, J., Wang, B., Lin, X. Q., Chen X. F. and Chen, X. D., "Bacterial cellulose production from the litchi extract by *Gluconacetobacter xylinus*", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(1): 39-43 (2016).
- Yetiman, A. E. and Kesmen, Z., "Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques", *International journal of food microbiology*, 204: 9-16 (2015).
- Yılmaz, S., "Alternatif besin yan ürünlerinden bakteriyel selüloz üretimi", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul (2007).
- Yim, S. M., Song, J. E. and Kim, H. R., "Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar", *Process Biochemistry* (2016).
- Yoon, S. H., Jin, H. J., Kook, M. C. and Pyun, Y. R., "Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes." *Biomacromolecules*, 7(4): 1280-1284 (2006).
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., Watanabe, K., "Research Progress In Production Of Bacterial Cellulose by Aeration And Agitation Culture and Its Application As A New Industrial Material", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2): 219-224 (1997).
- Yoshino, T., Asakura, T., Toda, K., "Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane", *J. Ferment. Bioeng.*, 81: 32–36 (1996).
- Zaar, K., "The Biogenesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*", *Cytobiologie*, 16: 1-15 (1977).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Zhang, Y., Himmel, M.E, Mielenz, J.R., “Outlook For Cellulase Improvement: Screening And Selection Strategies”, *Biotechnology Advances*, 24: 452-481 (2006).
- Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Griffin, K., Skvorak, K.J., Paul, H.S., Homanics, G.E., Bewley, M.C., Cheng, K.C., Lanoue, K.F., Flanagan, J.M., “Dual Mechanism of Brain Injury and Novel Treatment Strategy in Maple Syrup Urine Disease”, *Brain*, 132(4): 903– 918 (2009).
- Zugenmaier, P., “Conformation and Packing of Various Crystalline Cellulose Fibers”, *Progress in Polymer Science*, 26: 1341–1417 (2001).
- Zuo, K.W., Cheng, H.P., Wu, S.C., Wu, W.T., “A Hybrid Model Combining Hydrodynamic and Biological Effects for Production of Bacterial Cellulose with a Pilot Scale Airlift Reactor”, *Biochem Eng Journal*, 29(1–2): 81–90 (2006).

EKLER

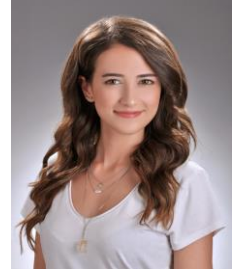
Ek 1: Bakteriyal selülozla ilgili çalışmalarda alınan bazı patentler.

Patent no	Buluş sahibi	Başlık	Yayın tarihi	Açıklama
CN 103060229 B	Liu Dongmei, Wang Chao, Fei Yongtao, Li Jiahui, Huang Danhua, Wu Hui, Tang Yuqian, Yu Yigang	<i>Gluconacetobacter xylum</i> ve karışık floradan yüksek verimli bakteriyal selüloz fermentasyon metodu	2014	Bir tür odun sirkesi basili ve karışık kültür fermentasyonundan BS üretimi
US 201203086 49 A1	Pei-Ying Chen, Jinn-Tsyy Lai, Hsu-Chou Hsiao, Yan-Hwa Chu, Chii-Cherng Liao	İçine kapsül yerleştirilmiş bakteriyal selüloz kompoziti ve bunların hazırlanması	2012	Bakteriyal selüloz matriksine, fonksiyonel bileşikler içeren kapsüllerin yerleştirilmesiyle BS kompozit üretimi
US 7955759 B2	Barbara R. Evans, Hugh M. O'Neill, Valerie Malyvanh Jansen, Jonathan Woodward	Elektrik ve elektronik cihaz üretimi için bakteriyal selülozun metalle kaplanması	2011	Metal tuzları içeren solüsyon içerisine BS yerleştirilmesi ve BS'un metalle kaplanarak elektronik cihaz yapımında kullanılması
CN 101671708 A	Yu Shujuan, Liu Dongmei, Hui Wu	İki aşamalı yöntemle ananas kabuğu suyundan bakteriyal selüloz üretimi	2010	<i>A. xylum</i> 'un çoğaltılması ve ananas kabuğu suyuyla fermentasyonu sonucu BS üretimi

CN 101586134 A	Liu Sixin, Li Congfa	Küresel tanecik şeklinde bakteriyal selüloz hazırlama metodu ve özel kültür ortamı	2009	Karbon, azot kaynağı, inorganik tuz, büyüme faktörü ve hindistan cevizi suyu içeren ortamda BS üretimi
WO 200706385 4 A1	Yutaka Tamai	Bakteriyal selüloz üretim metodu	2007	Daha ucuz ortam bileşenleri kullanarak BS üretimi
WO 200500336 6 A1	Bielecki S., Krystynowicz A., Czaja W., Kolodziejczyk M.	Bakteriyal selüloz üretim metodu	2005	Statik kültürle BS üretimi, immobilize biyokatalizörlerin üretimi, selüloz membranlarının modifiye edilmesiyle yara örtüsü üretimi
US 6429002 B1	Bassat A., Bruner R., Shoemaker S., Aloni Y., Wong H., Johnson D.C., Neogi A.	Ağ yapılı selüloz üreten <i>Acetobacter</i> suşları	2002	Acetobacter suşları kullanılarak çalkalamalı kültürde BS üretimi
WO 0105838	Yang, Z.F., Sharma,S., Mohan, C., Kobzeff, J.	Bakteriyal selülozun kurutulması için yöntemler	2001	Hekzan, alifatik alkol, DMSO vb çözücüler ile selülozun ayrılması
WO 9943748	Uryu, M., Tokura, K.	Biyolojik parçalanabilen polimer	1999	<i>A. xylinum</i> 'un oluşturduğu selülozun yeni materyallerde kullanılması

JP 10077302	Tabuchi,M., Watanabe,K., Morinaga,Y.	Çözülebilir bakteriyal selüloz ve bileşimi	1998	<i>A. xylinum</i> 'un statik koşullarda sentezlediği selüloz, DMSO ve paraformaldehit ile 100°C'de 3 saatte çözülebilir
JP 96316922	Hikawu, S., Hiroshi, T., Takayasu, T., Yoshinaga,F.	Selüloz oluşumunu teşvik eden maddelerin eklenmesi ile BS'nin üretimi	1996	Kolin, betain ve yağ asitleri gibi bileşikler, <i>A. xylinum</i> 'dan selüloz üretimini stimüle eder
JP 07184675 A	Matsuoka, M., Tsuchida, T., Yoshinaga, F.	Bakteriyal selüloz üretimi	1995	Gıda, kozmetik gibi alanlarda kullanılan BS'nin, <i>Acetobacter</i> strainleri tarafından, metionin içeren sıvı ortamda üretilmesi
005268274 USA	Ben Bassat, A., Calhoon, R.D., Fear, A.L., Benziman, M.	Selüloz sentaz operonunu ekspresyonu için nükleik asit sekansları ve metotlar	1993	<i>A. xylinum</i> 'dan selüloz sentazı kodlayan nükleik asit sekansları ve genlerin izolasyonu için metotlar
US 4655758 A	David F. Ring, Wilson Nashed, Thurman Dow	Mikrobiyal polisakkaritlerin üretim metodları	1987	Bakteri hücrelerinin, sıvı besiyerinden uzaklaştırılması ve selüloz pelliğinin çeşitli amaçlar için kullanımı
EP 0200409 A3	Iguchi, M., Mitsubishi, S., Ichimura, K., Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K.,	Bakteriler tarafından üretilen selülozdan yapılan materyallerin karşılaştırılması	1986	BS istenilen şekle sokulabilen materyallerin üretimi için mükemmel bir bileşimdir

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Kübra ERÇALIŞKAN
Doğum Yeri ve Tarihi : ESKİŞEHİR/1991

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Fırat Üniversitesi/Biyomühendislik Bölümü (2010-2014)
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Bilimsel Faaliyetleri :

- Erbaş, O., Kalkanlı, İ., Efe, B., **Erçalışkan, K.**, Gökten, G., Taşkiran, D., “Sepsis ile İnduklenen Sistemik İnflamasyon ve Endotoksemi Modeli Geliştirilen Sıçanlarda Artan Psikoz Yatkinlığının Gösterilmesi ve Bu Etkinin Plazmada Ölçülen TNF Alfa ve Total Oksidan Düzeyi ile Korelasyonu” , 48. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Bursa (2012).
- **Erçalışkan K.**, Atakav, Y., Tanyıldızı, M.Ş., “Çam Kozalağıyla Basic Blue 3 Bazık Boyasının Adsorpsiyonunun Modellenmesi”, ESOGÜ Kimya Mühendisliği Sunulmayan Poster Bildirileri, Eskişehir (2014).
- **Erçalışkan, K.**, “*Komagataeibacter xylinus* ile Bakteriyal Selüloz Üretimi”, 2. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, Afyon (2017).

İş Deneyimi

Stajlar :

- Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir (2012).
- ETİ Şirketler Grubu Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Kalite Güvence Bölümü, Eskişehir (2013).

İletişim

E-Posta Adresi : kubraa.erc@gmail.com

Tarih:...../...../.....