

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEKER PANCARI MELASINDAN *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759
KULLANARAK FARKLI KÜLTÜR TEKNİKLERİ İLE BAKTERİYEL SELÜLOZ
ÜRETİMİ**

Yunus Emre ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER

ELAZIĞ-2017

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEKER PANCARI MELASINDAN *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759
KULLANARAK FARKLI KÜLTÜR TEKNİKLERİ İLE BAKTERİYEL SELÜLOZ
ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
YUNUS EMRE ÖZ
(141132102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 30 Haziran 2017
Tezin Savunulduğu Tarih: 17 Temmuz 2017

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER (F.Ü.)
Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Özge HANAY (F.Ü.)
Doç. Dr. Ayşegül Ülkü METİN (Kırıkkale Ü.)

TEMMUZ-2017

ÖNSÖZ

Bu tez konusu TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlarla Yüksek Lisans burs programı tarafından desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar FÜBAP MF. 16.36 nolu proje çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez süresi boyunca her konuda bilgi ve yardımını esirgemeyen danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER'e, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Kübra Koçak ve Ayşegül Çelik'e ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Yunus Emre ÖZ
ELAZIĞ-2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
TABLOLAR LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Bakteriyel Selülozun Tarihi	3
2.2. Selülozun Yapısı	3
2.3. Selülozun Biyosentezi	5
2.4. BS Üretim Yöntemleri	6
2.4.1. Statik ve Karıştırmalı Kültür	7
2.4.2. BS Üretimi için Biyoreaktör Dizaynı	8
2.4.2.1. Hava Kaldırma Biyoreaktör	9
2.4.2.2. Döner Disk Biyoreaktör	9
2.4.2.3. Hücre İmmobilizasyonu ve Biyofilm Reaktörler	10
2.5. Selüloz Üreten Mikroorganizmalar.....	11
2.6. Bakteriyel Selülozun Özellikleri	12
2.7. Bakteriyel Selülozu Üretimine Etki eden Parametreler	13
2.7.1. Karbon Kaynağı	13
2.7.2. Azot Kaynağı.....	17
2.7.3. pH'ın Etkisi	18
2.7.4. Sıcaklık.....	19

2.7.5.	Çözünmüş Oksijen	19
2.7.6.	Diğer Faktörler	20
2.8.	Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları	22
2.8.1.	Medikal alanda BS'nin Kullanımı	22
2.8.1.1.	Yara İyileştirme Materyali Olarak BS Kullanımı	22
2.8.1.2.	İlaç Salınım Sistemlerin ve İlaç Eksipiyani (Katkı maddesi) olarak BS Film Kaplama	24
2.8.1.3.	Yapay Kan Damarı	25
2.8.1.4.	Doku İskelesi	27
2.8.1.5.	Kemik ve Kıkırdak Rejenerasyonu	28
2.8.2.	Elektrik Materyalleri	30
2.8.3.	Manyetik Materyaller	30
2.8.4.	Çevre ve Tarım alanlarında BS Uygulamaları	31
2.8.4.1.	Boya Giderimi için BS Kullanımı	31
2.8.4.2.	Ağır Metallerin Giderimi İçin Bakteriyel Selüloz Kullanımı	31
2.8.4.3.	Tarım Uygulamaları	32
2.8.5.	Kağıt Sanayi Uygulamaları	32
2.8.6.	Ayırma ve Atık Saflaştırma	33
2.8.7.	Gıda Sanayi	34
2.9.	Literatür Özeti	34
2.10.	Şeker Pancarı Melası	38
3.	MATERYAL ve METOT	40
3.1.	Mikroorganizma ve Kültür Ortamı	40
3.2.	Besi yerinin Hazırlanması, Suşun Canlandırılması ve Saklanması	40
3.3.	Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi	42
3.4.	Melastaki Şeker Konsantrasyonunun Üretime Etkisinin Araştırılması ..	42

3.5.	Optimizasyon Çalışmaları	42
3.6.	Kademeli Kolon Statik Kültür Çalışmaları	43
3.7.	Bakteriyel Selülozların Saflaştırılması ve Kurutulması	43
3.8.	Şeker Analizi	44
3.9.	Bakteriyel Selülozun Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	45
3.9.1.	Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	45
3.9.2.	FTIR analizi.....	45
3.9.3.	X-Işınları Kırınımı (XRD).....	45
3.9.4.	Termogravimetrik Analiz (TGA)	46
3.9.5.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	46
3.9.6.	Çekme Testi.....	46
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	48
4.1.	Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi.....	48
4.2.	Melastaki Şeker Konsantrasyonunun Üretime Etkisi.....	50
4.3.	Optimizasyon Çalışmaları	51
4.4.	Kademeli Kolon Statik Kültür (KKSK) Çalışmaları.....	55
4.5.	Üretilen BS'lerin Karakteristik Özellikleri	59
4.5.1.	Su Tutma Kapasitesi.....	59
4.5.2.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Sonuçları	60
4.5.3.	FTIR Analizi Sonuçları	61
4.5.4.	TGA (Termogravimetrik Analiz) Sonuçları.....	64
4.5.5.	X Işınları Difraksiyonu (XRD) Sonuçları	66
4.5.6.	Çekme Testi Sonuçları	69
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	71
	KAYNAKLAR	72

ÖZET

Bu çalışmada, şeker pancarı melasından *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 kullanarak farklı kültür teknikleri (geleneksel statik ve kademeli kolon statik kültür) ile bakteriyel selüloz (BS) üretimi incelenmiştir. Deneyler fermantasyon süresi belirleme, optimizasyon, kademeli kolon statik kültür (KKSK) ve üretilen BS'lerin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

KKSK ve geleneksel statik kültür tekniğiyle yapılan çalışmalar 20-120 g/L şeker konsantrasyonlarında 100-500 ml kültür hacimlerinde ve % 5-15 inokülasyon hacimlerinde yürütülmüştür. Fermantasyon ve KSKS sisteminde kademeler arası geçiş süresinin belirlenmesi için Hestrin-Schraam (HS) besi yerinde glikoz tüketimi ve BS oluşumu 20 gün boyunca incelenmiş ve fermantasyon süresi ile kademeler arası geçiş süresi 10 gün olarak bulunmuştur. Belirlenen fermantasyon süresinde RSM' den elde edilen optimizasyon sonuçları şeker konsantrasyonu-kültür hacmi etkileşiminin optimum BS üretiminde en önemli parametre olduğu göstermiştir. Çalışma kapsamında geleneksel statik kültür ve yeni geliştirilen KSKS karşılaştırılmıştır. KSKS deneyleri ile statik kültürde substrat inhibisyonu ve pH'nın BS üretimine negatif etkisinin olmadığı şartlarda hava transferi probleminin giderildiği görülmüştür. KSKS deneyleri sonucunda 20 ve 40 g/L şeker konsantrasyonlarında geleneksel statik kültüre göre BS üretiminde önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Fakat 60, 80 ve 100 g/L şeker konsantrasyonlarında KSKS' da BS üretimi sırasıyla % 12.46, % 17.49 ve % 22.02 oranlarında artmıştır.

Son olarak, bu çalışmada üretilen BS'ler için yapılan su tutma kapasitesi, SEM, FTIR, XRD, TGA ve çekme testleri gibi karakteristik özelliklerin literatürde üretilen BS'ler standardında olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel Selüloz (BS), Statik Kültür, Kademeli Kolon Statik Kültür (KKSK), Şeker Pancarı Melası, *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759

SUMMARY

BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION FROM SUGAR BEET MOLASSES WITH DIFFERENT CULTURE TECHNIQUES USING *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759

In this study, bacterial cellulose (BC) production has been investigated by different culture techniques (conventional static and staged column static culture) using the sugar beet molasses with *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759. The experiments have been consisted of determination of the fermentation time, the optimization, staged column static culture (SCSC), and determination of characteristic properties of produced BCs.

The studies were carried out by conventional static and SCSC have been performed at 20-120 g/L initial sugar concentrations, in 100-500 ml culture volumes, and in 5-15 % inoculum. In order to determine fermentation time and the transition time between stages in SCSC, glucose consumption and BC formation in Hestrin-Schraam (HS) medium have been examined for 20 days and the fermentation time and the transit time between stages have been found as 10 days. The optimization results obtained from RSM in the time determined has been shown that the most important parameter in production of optimum BC is interaction between sugar concentration and culture volume. In this work, conventional static culture and newly developed SCSC techniques were compared. It has been shown that the SCSC experiments eliminate the air transfer problem when the effect of substrate inhibition and pH on BC production are not existing in static culture. As a result of the SCSC experiments, significant increasing of BC production in SCSC at sugar concentrations of 20 and 40 g/L has been not observed according to conventional static culture technique. However, BC production in the SCSC increased by 12.46 %, 17.49 % and 22.02 % at 60, 80 and 100 g/L sugar concentrations, respectively.

Finally, it has been observed that the characteristic properties such as water holding capacity, SEM, FTIR, XRD, TGA, and mechanic tensile test of BC produced in this study are similar to the standard BC given in literature.

Key words: Bacterial cellulose (BC), Static Culture, Staged Column Static Culture (SCSC), Sugar Beet Molasses, *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2. 1. BS üretimi için farklı biyoreaktör tiplerinin karşılaştırılması	12
Tablo 2. 2. Bazı mikroorganizmalar ve selüloz üretimi	14
Tablo 2. 3. Şeker Pancarı Melası Kimyasal Bileşimi (Keshk, Razek ve Sameshima, 2006; Yılmaztekin, 2009)	39
Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan şeker pancarı melasının özellikleri.....	40
Tablo 3. 2. Optimizasyon için RSM deney şartları.....	43
Tablo 4. 1. Optimizasyon çalışmaların sonucu elde edilen veriler.....	52
Tablo 4. 2. Modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel verileri .	52
Tablo 4. 3. İncelenen bağımsız değişkenler ve birbirleriyle etkileşiminin BS üretimine etkileri.....	53
Tablo 4. 4. Doğrulama deneyi sonucu	54
Tablo 4. 5. KKSK sisteminde üretilen BS miktarları	56
Tablo 4. 6. Geleneksel statik kültür ve KKSK sisteminde üretilen BS miktarları ve statik kültüre göre artış değerleri.....	57
Tablo 4. 7. Toplam şeker konsantrasyonları.....	58
Tablo 4. 8. Farklı kültür teknikleriyle elde edilen bakteriyel selülozların su tutma kapasiteleri.....	60
Tablo 4. 9. HS, KKSK ve statik kültürden elde edilen örneklerin kristalinite değerleri	68
Tablo 4. 10. Çalışmalar sonucunda elde edilen BS örneklerinin mekanik çekme testi sonuçları	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Selülozun hidrojen içi ve hidrojenler arası bağları (Festucci-Buselli, Otoni ve Joshi, 2007).....	4
Şekil 2. 2. A. xylinum tarafından selüloz mikrofibrillerin birleştirilmesi (Iguchi ve ark., 2000).....	6
Şekil 2. 3. Statik kültürde üretilmiş BS (a) ve onun SEM görüntüsü (b) (Huang, Zhu ve Yang, 2014).....	8
Şekil 2. 4. Karıştırmalı Kültürden elde edilmiş BS (Czaja, Romanovicz ve Brown, 2004) .	9
Şekil 2. 5. Döner disk biyoreaktör.....	10
Şekil 2. 6. Ticari olarak satılan XCell bakteriyel selüloz.....	24
Şekil 2. 7. AgNO ₃ nanoparçacıklarının BS matrisi içerisine dahil edilmesi. Saf BS (a) herhangi bir mikrobiyal inhibisyonu göstermezken, AgCl emdirilen edilen BS (b) pelikül çevresinde bir inhibisyon halkası görünmektedir (Jung ve ark., 2009).....	25
Şekil 2. 8. Farklı çap, uzunluk ve duvar kalınlığına sahip BASYC tüpleri (Klemm ve ark., 2001).....	26
Şekil 2. 9. Bir mikrosinir cerrahisinde BASYC tüpün uygulaması (Klemm ve ark., 2001)27	
Şekil 2. 10. Anilin mavisi boya giderimi; (a) muamele edilmemiş, (b) BS ile muamele edilmiş (Mohite ve Patil, 2014).....	32
Şekil 2. 11. Kambucha çayı (sol) ve Nata de coco (sağ).....	36
Şekil 2. 12. Şeker pancarı melası (a) ve şeker pancarı (b)	39
Şekil 3. 1. Liyofilize Gluconacetobacter xylinus NRRL B-759 suşunun viyalden çıkarılması.....	41
Şekil 3. 2. Kademeli kolon statik kültür sistemi.....	44
Şekil 4. 1. HS besi yerinde zamanla oluşan BS ve tükenen glikoz konsantrasyonları.....	48
Şekil 4. 2. Zamanla HS besi yerinin pH'ında meydana gelen değişim	49
Şekil 4. 3. HS besi yerinde üretilmiş ıslak haldeki BS örneği	50
Şekil 4. 4. Melastaki şeker konsantrasyonunun selüloz üretimine etkisi	51
Şekil 4. 5. BS verimi üzerine şeker konsantrasyonu ve kültür hacmin etkisi (A), BS verimi üzerine inokülasyon miktarı ve kültür hacminin etkisi (B), BS verimi üzerine şeker	

konsantrasyonunun etkisi (C), BS verimi üzerine inokülasyonun etkisi (D) ve BS verimi üzerine kültür hacminin etkisi (E)	54
Şekil 4. 6. KKSK sisteminin bir kademesinde üretilen BS	57
Şekil 4. 7. 100 g/L şeker konsantrasyonunda statik kültürde (a), KKSK (b) ve HS besi yerinden üretilen BS (c).....	61
Şekil 4. 8. KKSK (A), geleneksel statik kültür (B) ve HS (C) besi yerinden elde edilen BS örneklerinin FTIR analizi sonuçları.....	63
Şekil 4. 9. HS (A), KKSK sistemi 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneği (B) ve Geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneğinin (C) termal bozunma grafikleri.....	65
Şekil 4. 10. HS (A), KKSK sistemi 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneği (B) ve Geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneğinin (C) XRD kırınım grafikleri	67
Şekil 4. 11. HS besi yeri (A) KKSK (B) ve geleneksel statik kültürden (C) elde edilen bakteriyel selülozların Gerilme/Uzama grafikleri	70

KISALTMALAR

BS: Bakteriyel selüloz

BC: Bacterial Cellulose

SCSC: Staged Column Static Culture

pH: Power of Hydrojen

L: Litre

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)

% w/v: Kütlece yüzde

A. xylinum: *Acetobacter xylinum*

G. xylinus: *Gluconacetobacter xylinus*

UDP: Üridin difosfat glikoz

Glc-1-P: glikoz-1-fosfat

UDPG: UDP-glikoz

PCS: Plastik kompozit destekli

ATP: Adenozin Trifosfat

CSL: Mısır ıslatma şurubu

CMC: Karboksimetil Selüloz

SFW: Şekerlendirilmiş gıda atıkları

MCP: metilsiklopropan

PVA: polivinil alkol

PGA: Poliglikolik asit

PLA: Poli (laktik asit)

PVA: Polivinil alkol

pHEMA: Polihidroksi etil metakrilat

pNIPAA: Poli (N-izopropilakrilamid)

Hap: Hidroksiapatit

PPy: Polipirol

PANI: Polianilinin

AAc: Akrilik asit

MIP: Molecularly Imprinted Polymer

RSM: Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology)

KKSK: Kademeli Kolon Statik Kültür

rpm: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions Per Minute)

XRD: X Işınları Difraksiyonu

TGA: Termogravimetrik analizi

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Transmission Electron Microscope)



1. GİRİŞ

Bitki veya bakteriler tarafından sentezlenen selüloz yeryüzünde oldukça fazla bulunan organik bir polimer kaynaktır ve küresel olarak ekonomik öneme sahiptir (Kim, Kim, Kang, Marquez ve Joo, 2006). Her yıl dünya genelinde tüketilen selüloz miktarı 100 ila 150 milyar ton arasındadır (Hon, 1994). Artan dünya nüfusu dikkate alındığında gelecek yıllarda selüloz tüketimin artması da kaçınılmazdır.

Endüstride kullanılan selülozlar genellikle pamuk ve ağaçlardan elde edilmektedir. Bitkilerin yapısında selülozun yanı sıra lignin, hemiselüloz ve pektin bulunmaktadır. Endüstride selüloz kullanılmadan önce bu yapılardan arındırılması gerekmektedir. Selülozdan bu yapıların ayrılması çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler ile sağlanır. Kullanılan yöntemlere bağlı olarak selülozdan uzaklaştırılan lignin ve hemiselüloz miktarları da değişmektedir. Yüksek saflıkta bir selüloz elde etmek için daha fazla lignin ve hemiselülozun yapıdan ayrılması gerekmektedir. Lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılma yüzdesine de bağlı olarak proses boyunca kullanılan kimyasal ve enerji miktarı da değişiklik göstermektedir. Bu yüzden oluşturduğu çevre kirliliğinin yanı sıra selüloz eldesi için dünya genelinde orman arazilerinin son yıllarda hızlı bir şekilde tahrip edilmesi ve biyoteknolojik alandaki gelişmeler bilim adamlarını selüloz üretmek için farklı arayışlara yönlendirmiştir.

Farklı kaynaklardan selüloz üretimi için bilim insanları çeşitli mikroorganizmalar kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda alg (*Vallnia*), mantar (*Saprolegnia*, *Dactylospora*, *Discoideum*) veya bakteri (*Gluconacetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Zooglea*) gibi selüloz üreten farklı mikroorganizma tipleri bulunmuştur (Iguchi, Yamanaka ve Budhiono, 2000). Bu mikroorganizmalar arasında *Gluconacetobacter* türü bakterilerin endüstriyel boyutta selüloz üretimi için en uygun tür olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Mikrobiyal selüloz ile bitkisel selüloz aynı molekül formülü ($C_6H_{10}O_5$)_n paylaşmasına rağmen, fizikokimyasal özellikleri farklıdır. Bakteriyel selülozun kimyasal yapısı selobioz ile bağlanmış zincir molekülleri olmasına rağmen bitkiden elde edilen selülozda bulunan lignin, hemiselüloz ve pektin gibi kirlenici moleküller yoktur. Bitkisel selüloz ile karşılaştırıldığında bakteriyel selüloz (BS) daha yüksek su tutma kapasitesi, kristalinite, porozite, mekanik direnç, polimerizasyon derecesi, yüksek saf fiber ağ yapısı, hidrofiliklik ve yüksek saflık gibi özelliklere sahiptir (Phisalaphong ve

Jatupaiboon, 2008). Bakteriyel selülozun gelişmiş mekanik özellikleri selülozik fiberlerin eşit ve sürekli dağılımının bir sonucudur.

Bakteriyel selüloz üretimi temel olarak statik ve karıştırmalı kültür teknikleriyle üretilmektedir. Statik kültür tekniğinde besi yeri hava ara yüzeyinde jelatimsi bir BS oluşurken, karıştırmalı kültür tekniğinde küçük kürecikler şeklinde BS oluşumu gözlenir. BS üretmede kullanılan kültür tekniğinin yanı sıra kullanılan besi yeri bileşenleri oluşan bakteriyel selülozun morfolojik ve fiziksel özelliklerini etkilemektedir. Bu da selüloz üretimi esnasında çeşitli parametreleri değiştirerek istenilen özelliklerde BS üretimine olanak sağlamaktadır. BS üretiminin en cezbedici yanlarından biri budur.

Bitkisel selüloz geleneksel olarak kağıt üretimi, tekstil endüstrisi, medikal uygulamalar, takviye ajanı gibi alanlarda hali hazırda kullanılmaktadırlar (Valla ve Kjosbakken, 1981). BS sahip olduğu gelişmiş özelliklerinden dolayı doku mühendisliği doku iskelesi uygulamaları, yara iyileştirme uygulamaları, geniş yanıklarda yapay deri, deri dokusu onarımı, mikrocerrahi için yapay kan damarları, kağıt endüstrisi (Chawla, Bajaj, Survase ve Singhal, 2009), dolgunlaştırıcı ve stabilize edici madde olarak gıda endüstrisini de içeren birçok alanda kullanılmaktadır (Paximada, Tsouko, Kopsahelis, Koutinas ve Mandala, 2016).

Çeşitli uygulamalar için potansiyeli bulunmasına rağmen bakteriyel selülozun yüksek üretim maliyeti endüstriyel uygulamaların önündeki en büyük sorundur. Bu yüzden çeşitli endüstriyel atıklar ve yan ürünlerin BS üretiminde kullanılması maliyet açısından BS üretimini rekabetçi hale getirecektir.

Statik kültürde BS verimi karıştırmalı kültüre göre düşüktür. Bu çalışmada şeker fabrikası yan ürünü olan şeker pancarı melası kullanılarak yeni bir statik kültür sisteminde, statik kültürde bir dezavantaj olan düşük verimi arttırmak ve hammadde maliyetini düşürerek BS üretimini daha ekonomik hale getirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Bakteriyel Selülozun Tarihi

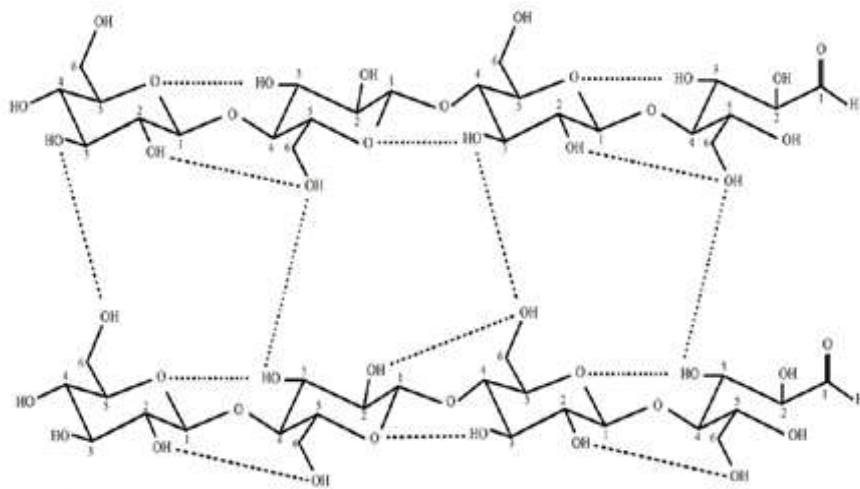
Selüloz birçok bitkide lignin, hemiselüloz ve pektin gibi diğer bileşenler ile birlikte bulunur. Bu nedenle saf selüloz elde etmek için saflaştırma basamaklarına ihtiyaç vardır. Saf halde selüloz elde etmek için *Acetobacter xylinum* gibi bir bakteri kullanılarak fermentasyon ile selüloz üretimi alternatif yöntemlerden biridir (Embuscado, 1991). BS ilk kez 1886'da Adrian Brown tarafından sentezlenmiştir (Brown, 1886). Brown fermentasyon besiyerinin yüzeyinde jelatinimsi mat bir yapı oluştuğunu gözlemlemiştir. O zamana kadar birkaç grup, canlı sistemlerden selüloz oluşumunu açıklamak için çalışma yapmıştı. *Acetobacter xylinum* ile selüloz sentezi 1947'de Hestrin ve arkadaşları tarafından detaylı şekilde ilk kez açıklanmıştır. 1950'lerde selüloz üretimini etkileyen faktörleri, selüloz üretiminin alt basamaklarını, önleyicilerini ve selüloz üretiminde yer alan enzim sistemleri ve ara ürünlerini etkileyen faktörleri içeren çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Gromet, 1957; Hestrin, 1954). 1970'lerde ve 1980'lerin başlarında bilim adamları, selüloz biyosentezi için çok iyi bir model olarak açıklanan *Acetobacter xylinum* üzerinde ek araştırmalar yapmışlardır. 1980'lerin ortalarında *Acetobacter xylinum* ticari selüloz üretiminde kullanılabilmektedir (Valla ve Kjosbakken, 1981). 1990'larda gelişmekte olan teknolojileri, üretimdeki güçlükleri, bakteriyel selülozun bir biyomalzeme olarak özelliklerini ve *Acetobacter xylinum* tarafından selüloz üretimini etkileyen önemli faktörleri içeren bakteriyel selülozun potansiyel uygulamaları konusu altında birçok araştırma yapılmıştır. Bu on yılda BS gıda ve kağıt uygulamalarına ek olarak kompozit membranlar, doku mühendisliği materyalleri, yüksek güçlü materyaller ve kompozit malzemeler gibi alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca sentez sırasında selülozun kimyasal olarak modifiye edilebilmesi bakteriyel selülozun yeni fonksiyonlar kazandırılarak üretilmesini ve böylece farklı alanlarda BS'den faydalanılmasını sağlamıştır (Chen, Cho ve Jin, 2010; Iguchi ve ark., 2000; Yamanaka ve Ishihara, 2000). BS üretiminde verim ve kaliteyi geliştirici çalışmalar halen devam etmektedir.

2.2. Selülozun Yapısı

Ekzopolisakkaritler, farklı oranlarda glikoz, galaktoz ve ramnoz olmak üzere şekerlerin veya şeker türevlerinin dallanmış, tekrarlanan birimlerini kapsayan uzun zincirli polisakkaritlerdir. Bunlar iki gruba ayrılır: Homopolisakkaritler (selüloz, dekstran, mutan, pullulan, curdlan) ve heteropolisakkaritlerdir (gellan, ksantan) (Sutherland, 1994).

Homopolisakaritler, tek bir bağlantı tipiyle veya sınırlı sayıda bağlantı türlerinin bir kombinasyonu ile birleştirilmiş tek bir monosakkarit tipinin (D-glikoz veya D-fruktoz) tekrarlı birimlerden oluşur. BS, $(C_6H_{10}O_5)_n$ moleküler formülüne sahip, β 1-4 glukozidik bağlar ile birbirine bağlı D- anhidroglukopiranoz birimleri içeren lineer bir homopolimerdir. Glukan zincirleri, hidrojen arası ve hidrojen-içi bağ ile bir araya gelir (Ul-Islam, Khan ve Park, 2012) (Şekil 2.1.).

Mikrobiyal selüloz, *Gluconacetobacter* (eski adıyla *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* ve *Salmonella* cinsleri gibi çeşitli bakteri türleri tarafından üretilen bir ekzopolisakkarittir (Shoda ve Sugano, 2005). BS moleküler formülü bitkisel selüloz ile aynıdır, fakat bunların fiziksel ve kimyasal özellikleri farklıdır (Yoshinaga, Tonouchi ve Watanabe, 1997). BS, yüksek saflık derecesinde elde edilebildiğinden ve daha yüksek bir polimerizasyon ve kristallendirme indeksine sahip olduğundan dolayı, bitkisel selülozun yerine tercih edilir. Aynı zamanda bitki selülozundan daha yüksek gerilme mukavemeti ve su tutma kapasitesine sahiptir ve bu sayede yüksek kalitede akustik hoparlörler, yüksek kaliteli kağıt ve tatlı gıdalar üretmek için daha uygun hammaddedir (Shoda ve Sugano, 2005). Bakteriye selülozun mikrofibriler yapısı, yüksek gerilme mukavemeti, yüksek polimerizasyon derecesi ve kristallik indeksi gibi özelliklerinin çoğunu etkiler. BS'nin lifleri bitki selülozundan yaklaşık 100 kat daha incedir. Bu yüzden BS çok gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu özellik BS'nin medikal alandaki kullanımında antibiyotiklerin veya diğer ilaçların yaraya aktarılmasını sağlarken aynı zamanda herhangi



Şekil 2. 1. Selülozun hidrojen içi ve hidrojenler arası bağları (Festucci-Buselli, Otoni ve Joshi, 2007)

bir harici enfeksiyona karşı etkili bir fiziksel engel oluşturur. Bu nedenle BS yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılır (Czaja, Krystynowicz, Bielecki ve Brown, 2006). Bakteriyel selülozun mikrofibriler yapısı ilk kez Mühlethaler tarafından 1949'da tanımlanmıştır (Mühlethaler, 1949). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucu *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen selülozun lif formunda olduğu görülmüştür. Bakteriler önce yapısal olarak homojen bir süngerimsi madde salgılayarak kısa süre sonra selüloz lifleri oluşturur.

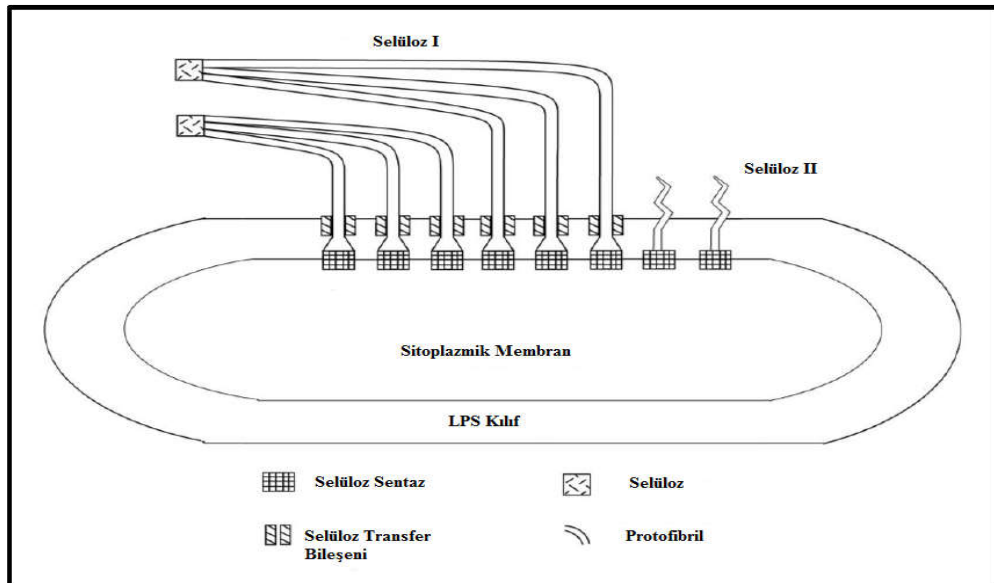
2.3. Selülozun Biyosentezi

Keşfedildiğinden bu yana BS üzerine yapılan birçok çalışma onun biyogenetiğinin çalışılması üzerinedir. Bir *A. xylinum* hücresi saniyede 200000 glikoz molekülünü polimerize edebilmektedir (Hestrin ve Schramm, 1954). Selüloz fiberlerinin oluşması membran içerisinde yer alan glukan zincirlerinin oluşması için glikoz moleküllerinin polimerizasyonu ve son olarak ekstraselüler boşlukta meydana gelen selüloz I içerisinde glukan zincirlerinin kristalinizasyonu olmak üzere iki adımdan oluşmaktadır (Benziman, Haigler, Brown, White ve Cooper, 1980). Ross ve ark. (1991) BS biyosentezini *A. xylinum* suşunu kullanarak geniş ölçüde incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada BS sentez mekanizmasını, genetiğini ve düzenleyici mekanizmasını açıklamışlardır. Üridin difosfat glikoz (UDP) selüloz üretimi için şeker nükleotid öncüsü oluşturur. Glikozun selüloza dönüşmesi dört enzimatik basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar glikokinaz tarafından glikozun fosforilasyonu, fosfoglukomutaz tarafından glikoz-1-fosfata (Glc-1-P) glikoz-6-fosfatın izomerizasyonu, UDPG-pirofosforilaz tarafından UDP-glikozun (UDPG) sentezi ve selüloz sentaz reaksiyonudur. Üç alt birim içeren selüloz sentaz (Bcs A, Bcs B ve Bcs C) selüloz biyogenezi için tek eşsiz enzimdir ve sitoplazmik membran proteini olarak bulunur (Ross, Mayer ve Benziman, 1991). UDP'den oluşan ürün kimyasal ve enzimatik β -1,4-bağlı glukan olarak karakterize edilmiştir. Selüloz üreten hücreler 50-80 por benzeri bölgeye sahiptir. Bunlar taktoidal küme olarak bilinen preselülozik polimerin çıktığı bölgeler olarak düşünülmektedir. Hücre zarındaki gözeneklerden çıkarılan taktoidal agregalar (1.5 nm fibril) yaklaşık 2-4 nm çapında protofibril oluşturur ve bunlar ayrıca yaklaşık olarak 80×4 nm şerit şeklinde mikrofibril biçiminde toplanır (Iguchi ve ark., 2000). Bu genlere ek olarak CMCax (endo- β -1,4 glikokinaz için kodlama yapan) ve CcpAx (protein oluşturan selülozu kodlayan) genleri selüloz biyosentezi için gereklidir (Kawano ve ark., 2002). β -1,4 glikoz zincirlerinin polimerizasyonu çok iyi anlaşılmamıştır ve bu mekanizmayı anlamak için

önerilen birkaç hipotez vardır. Birinci hipoteze göre polimerizasyon, bir glikoztransferaz ile plazma zarında glikozun bir lipid molekülüne dönüştürüldüğü bir lipid ara maddesi içermektedir (Lee, Buldum, Mantalaris ve Bismarck, 2014). İkinci hipotez, glikoz moleküllerinin, β -1,4 glukanın polimerizasyonu sırasında polisakkarit alanının indirgenmeyen ucuna eklenir (Brown ve Saxena, 2000; Lee ve ark., 2014). Yer değiştiren polisakkaritler içeren Bcs A ve Bcs B'nin kompleks kristal yapısı bir glikoz birimi tarafından polisakkaridi genişletmek için selüloz ileten bir kompleks oluştururlar (Morgan, Strumillo ve Zimmer, 2013). Son zamanlardaki çalışmalara göre selüloz 2 μ m/dk hızında şerit şeklinde bakteriden salınır ve yaklaşık olarak 45 mikrofibrilin karışımıdır (Lin ve ark., 2013). *Acetobacter xylinum* iki selüloz formu üretir: selüloz I, şerit benzeri polimer ve selüloz II, termodinamik olarak daha kararlı amorf polimer (Yu ve Atalla, 1996). Selüloz I ve selüloz II'nin sitoplazmik membranın dışındaki oluşumundaki farklılıklar Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

2.4. BS Üretim Yöntemleri

BS üretiminde birçok mikroorganizmanın ve besi yerinin kullanımı literatürde çokça bildirilmiştir (Bae ve Shoda, 2004; Chao, Ishida, Sugano ve Shoda, 2000; Çakar ve ark., 2014; Nguyen, Flanagan, Gidley ve Dykes, 2008; Son, Heo, Kim ve Lee, 2001). BS üretiminde temel olarak statik ve karıştırmalı kültür teknikleri kullanılmaktadır. BS üretiminde kullanılan mikroorganizma, besi yeri gibi bileşenlerin yanı sıra kullanılan kültür



Şekil 2. 2. *A. xylinum* tarafından selüloz mikrofibrillerin birleştirilmesi (Iguchi ve ark., 2000)

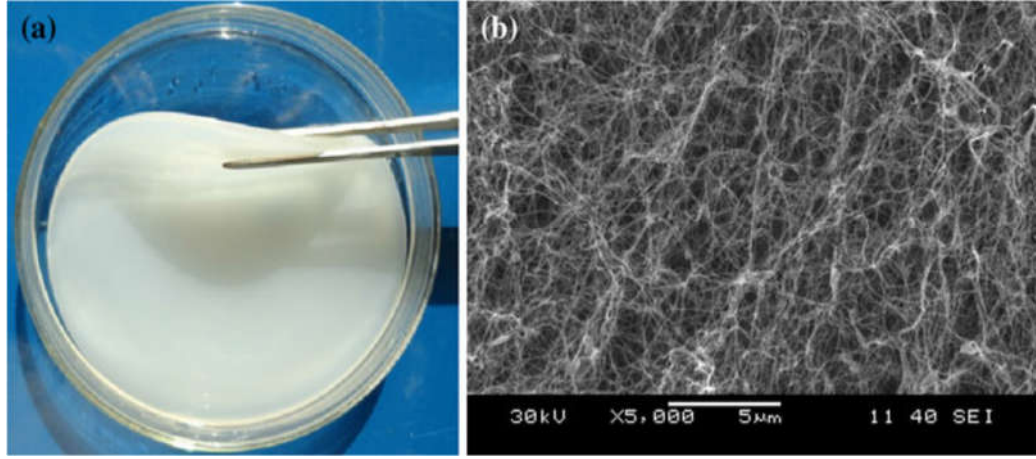
tekniki de üretilen selülozun özelliklerini etkilemektedir. BS üretiminde kullanılan teknikler statik ve karıştırmalı kültür olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir.

2.4.1. Statik ve Karıştırmalı Kültür

Statik kültür, selüloz membran üretiminin nispeten basit ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Besi yeri sıg tepsilere yerleştirilir, aşılır ve selüloz neredeyse tepsiyi doldurana kadar 5-20 gün boyunca yetiştirilir. Bakteri havaya maruz kalan tarafta yoğun bir yüzeye sahip jelatinimsi bir BS film tabakası üretir. BS üretimi derinlik 4.5 cm'den az olduğu zaman hava/sıvı yüzeyi ile direk olarak ilişkilidir (Okiyama, Motoki ve Yamanaka, 1992). Duvar etkisi olarak adlandırılan bir dış faktör BS üretimi için güçlü bir sınırlayıcı etki olduğu için elimine edilmelidir (Hornung, Ludwig, Gerrard ve Schmauder, 2006b). BS ince tabakasının besiyeri yüzeyinde yüzmesi bakteri metabolizmasından üretilen sıkışan CO₂ kabarcıklarından kaynaklanmaktadır.

Geleneksel statik kültürün verimliliği düşüktür ve uzun kültür süresi gerekli olduğundan endüstriyel uygulamayı engelleyebilir, selüloz üretimi pahalı olabilir. Üretimin pahalı olmasındaki bu dezavantaj ucuz besiyeri kaynaklarının kullanılmasıyla bir nebze azaltılabilir. Shezad ve ark. (2010) besin kaynağı olarak atık bira fermantasyon besiyeri kullanımının ticari uygulamalar için uygun seviyede BS verimliliğini arttırmak için basit kesikli-beslemeli yöntemi temel alan yeni statik kültür sistemini önermişlerdir (Shezad, Khan, Khan ve Park, 2010). Atık bira fermantasyon besiyeri, kesikli-beslemeli kültürde BS üretimi için kimyasal olarak tanımlanan besiyerinden daha iyi olduğu bulunmuştur. Atık bira fermantasyon besiyeri kullanılarak 30 gün sonunda 750 g ve 2,5 cm kalınlığında ıslak halde BS elde edilmiştir. Kesikli kültür ile karşılaştırıldığında BS üretiminde 2-3 kat artış görülmüştür. Selüloz tabakası taramalı elektron mikyografarı, kesikli-beslemeli kültürde üretilen BS fibrilleri kimyasal olarak tanımlanmış besiyeri kullanılarak üretilen BS'ye nazaran daha kalabalık ve ince olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark., 2007). Şekil 2.3'de statik kültür de üretilmiş bir BS ve SEM görüntüsü gösterilmiştir.

Statik kültür yöntemi kullanılarak üretilen selülozlar da karıştırmalı kültürde üretilene göre lifler düzenli ve üst üste birikmiş şekildedir. Bu sebeple karıştırmalı kültüre göre



Şekil 2. 3. Statik kültürde üretilmiş BS (a) ve onun SEM görüntüsü (b) (Huang, Zhu ve Yang, 2014)

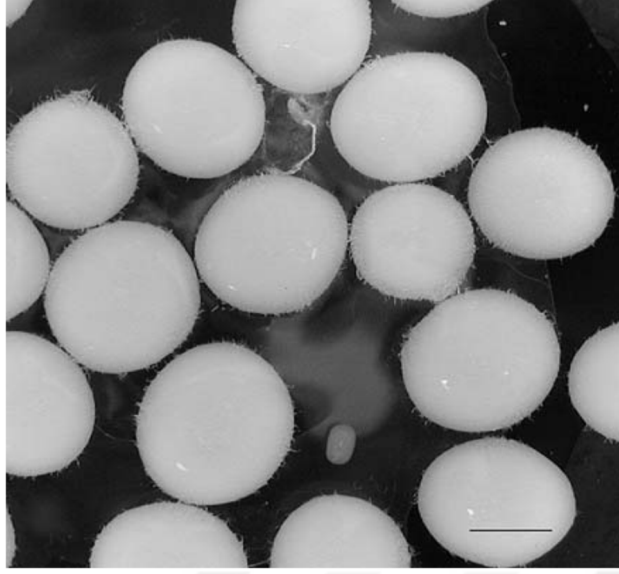
üretilen selülozun molekül içi hidrojen bağları daha kuvvetlidir. Ayrıca statik kültürde elde edilen bakteriyel selülozun kristal boyutu ve kristallenme indeksi karıştırmalı kültürde elde edilen BS'ye göre daha fazladır. Karıştırmalı kültüre göre daha basit olan statik kültür yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. Dezavantajlarından ise kültür süresi boyunca sistemin hareket ettirilmemesidir. Bu durum fermentasyon süresince sistemde meydana gelen değişimleri takip etmeyi zorlaştıracığından istenilmeyen bir durumdur. Diğer problem ise ölçek büyütmede çok büyük alanların gerekmesidir.

Karıştırma kültür tekniğinde statik kültürde üretilen selülozun aksine lifli, mikrofibrilleri ince, kristal büyüklükleri daha küçük, polimerizasyon derecesi daha az ve düzensiz yapıda selüloz oluşumu görülmektedir. Ayrıca karıştırmanın etkisiyle kültürde oluşan selülozlar yuvarlak şekildedir (Şekil 2.4). Zamanla kültür ortamında selülozların oluşumu karıştırmayı güçleştirecektir. Bu da sistemin enerji sarfiyatını arttıracaktır. Karıştırıcının yanında oksijen transferi yüksek iken karıştırıcıdan uzaklaştıkça oksijen transferinin azalması kaçınılmazdır.

Statik ve karıştırmalı kültürün birbirine çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. Selülozun kullanım amacı kültür tekniğinin belirlenmesinde önemli bir parametredir.

2.4.2. BS Üretimi için Biyoreaktör Dizaynı

BS, statik kültür koşullarında besi yeri yüzeyinde bir membran şeklinde üretilir. Bununla birlikte, geleneksel statik kültür yöntemi uzun bir kültür periyodu ve düşük verimlilikle BS ürettiği için seri üretim için uygulanması zordur (Chao ve ark., 2000).



Şekil 2. 4. Karıştırılmalı Kültürden elde edilmiş BS (Czaja, Romanovicz ve Brown, 2004)

Daha yüksek bir BS verimi için, düşük gerilme kuvveti ve yüksek oksijen transfer hızı bir karıştırılmalı fermantasyon modeli gereklidir.

2.4.2.1. Hava Kaldırmalı Biyoreaktör

Karıştırılmalı biyoreaktörle karşılaştırıldığında düşük güç gereksinimi gerektiren hava kaldırmalı biyoreaktör BS üretimi için diğer bir seçenektir. İlk kez Chao ve ark. (1997) BS üretimi için hava kaldırmalı biyoreaktör kullanmışlardır. Hava veya oksijen bakımından zenginleştirilmiş hava tabandan verilmekte ve kültür ortamı boyunca difüzyon gerçekleştirmektedir (Chao, Sugano, Kouda, Yoshinaga ve Shoda, 1997). Daha sonra hava kaldırmalı biyoreaktörün farklı konfigürasyonu BS üretimini artırmak için uygulanmıştır. Chao ve ark. (2000) 50 L hava kaldırmalı reaktör ile çalışmışlardır ve 67 saatlik fermantasyon sonrası 3,8 g/L BS elde etmişlerdir (Chao ve ark., 2000). Cheng ve ark. (2002) 72 saatlik fermantasyon sonucu 7,7 g/L BS üreten modifiye edilmiş bir hava kaldırmalı reaktör geliştirdiklerini rapor etmişlerdir (Cheng, Wang, Chen ve Wu, 2002). En yüksek BS konsantrasyonu hava kaldırmalı reaktör kullanılarak 0,22 g/L/h ile 10,4 g/L'dir (Chao, Sugano ve Shoda, 2001).

2.4.2.2. Döner Disk Biyoreaktör

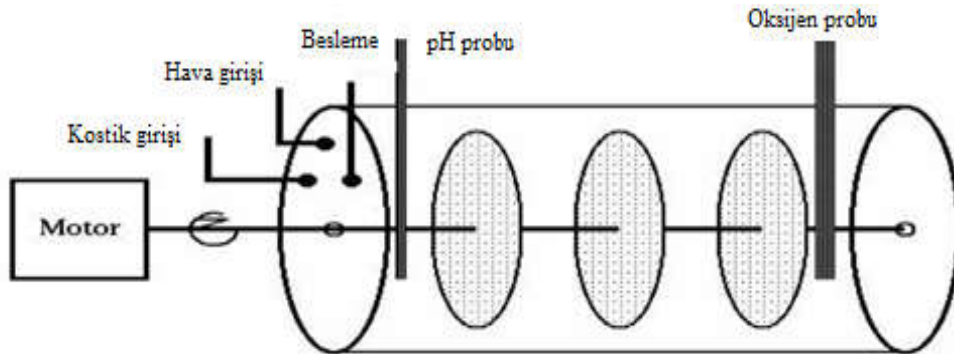
Karıştırılmalı ve hava kaldırmalı biyoreaktörlerinde, üretilen BS'nin reaktörlerin farklı bölümlerine yapışması nedeniyle homojenliği sağlamak zordur. BS üretimi için tasarlanan ilk döner disk biyoreaktörü aşılama için bir giriş ve dönen bir merkezi shaft üzerinde biriken

birkaç dairesel disk içermektedir (Serafica, Mormino ve Bungay, 2002). Döner disk biyoreaktöründe, diskin yüzeyinin yarısı besi yerine batılırken, kalan yarısı da havayla temas etmektedir. Disk sürekli dönerek besi yeri ve havayla temas halindeki yüzeyi değiştirir. Selüloz üreten bakteriler disk yüzeyine yapıştırılır ve bu sayede sırayla hem besi yerine girerler hem de havayla temas ederler. Bu tür reaktörlerde BS üretimi, ortamın hacmi, dönüş hızı ve kullanılan disklerin sayısı gibi farklı değişkenlerden etkilenir (Krystynowicz ve ark., 2002). Döner disk reaktörler için temsili bir görüntü Şekil 2.5’de verilmiştir. Krystynowicz ve ark. (2002) BS üretimi için optimum fermentasyon şartlarını (ortam hacmi, dönme hızı ve disk sayısı) belirlemek için bir takım çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada dönen disk reaktöründe maksimum BS üretimini yüzey alanı/hacim oranı $0,71 \text{ cm}^{-1}$, dönme hızı 4 rpm’de elde etmişlerdir (Krystynowicz ve ark., 2002).

2.4.2.3. Hücre İmmobilizasyonu ve Biyofilm Reaktörler

BS verimliliği immobilize hücre reaktörler, hücre geri dönüşümlü reaktörler ve hollow fiber reaktörler gibi tekniklerin kullanımı ile geliştirilebilir. İmmobilize hücre reaktörlerden biri olan biyofilm reaktör, tasarım maliyetini azaltabilen yüksek biyokütle yoğunluklu sistemlerin en mükemmel örneklerinden biridir.

Biyofilm reaktörler askıda hücre reaktörlerine göre özellikle yüksek biyokütle yoğunluğu sağlaması, operasyon kolaylığı ve ürün verimi gibi birkaç avantaj sağlamaktadır. Cheng ve ark. (2009b) plastik kompozit destekli (PCS) biyofilm reaktör kullanarak BS üretimini başarılı şekilde artırmışlardır (Cheng, Catchmark ve Demirci, 2009). Sonuçlar PCS biyofilm reaktörde normal biyofilm reaktöründen ($2,82 \text{ g/L}$) 2,5 kat daha yüksek ($7,05 \text{ g/L}$) BS üretimi sağlandığını göstermiştir. Ayrıca mekanik kuvvet analizi BS’nin potansiyel



Şekil 2. 5. Döner disk biyoreaktör

uygulamalarını genişletebilen membran formda gözlemlenen karşılaştırılabilir çekme mukavemeti arttırılmış basit zar formunda BS üretildiğini de belirlemiştir. Fakat PCS bileşenlerinin selüloz matriks içerisine yerleşip yerleşmediği açık değildir. BS üretiminde kullanılan farklı tip reaktörlerin avantajı, dezavantajı ve verimler Tablo 2.1’de verilmiştir.

2.5. Selüloz Üreten Mikroorganizmalar

Mikrobiyal veya bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar alg (*Vallnia*), mantar (*Saprolegnia*, *Dctyseliu*, *Discoideum*) veya bakteri (*Gluconacetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomanas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Zooglea*)’dır (Iguchi ve ark., 2000; Ross ve ark., 1991). Selüloz üreten bu türler arasından sadece *Gluconacetobacter* türleri ticari ölçekte üretim için uygundur (Masaoka, Ohe ve Sakota, 1993). Selüloz üreten organizmaların ticari anlamda faydalı olan soyların seçimi, başlangıçta bir gıda ürünü olarak kullanımı ile başlamıştır (Okiyama, Shirae, Kano ve Yamanaka, 1992).

Masaoka ve ark. (1993) en iyi selüloz üretimi sağlayan cinsi bulmak için *Gluconacetobacter* ve *Agrobacterium* ile geniş kapsamlı bir çalışma yapmışlardır (Masaoka ve ark., 1993). Statik kültürde selüloz üretiminin sabit bir kültür hacmi ile kültür yüzey alanına bağlı olduğu bulunmuştur. Büyüme hava-besi yeri ara yüzeyinde meydana geldiği için kültür hacmi ve derinliğinin (4,5 cm üzerinde) üretim hızı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Okiyama, Motoki ve ark., 1992). Adı daha sonradan değiştirilerek *Gluconacetobacter xylinus* olan *A. xylinum*, şuan selüloz üretme yeteneği en fazla olan mikroorganizmadır. Bu mikroorganizma sirke, meyve suları ve meyve gibi ortamlardan izole edilebilir.

Gluconacetobacter xylinus selüloz üretim çalışmaları için uzun bir süredir model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. Aerobik, gram negatif ve çubuk şekilli bir asetik asit bakterisi olan *Gluconacetobacter xylinus* ile selüloz üretimi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* tarafından üretilen bakteriyel selüloz, bitkiler ve diğer mikroorganizmalardan üretilen selüloza göre daha yüksek saflığa sahiptir. Diğer bir avantajı ise, selülozu ürettikten sonra hücre dışına saldığından üretilen selülozu herhangi bir saflaştırma işleminden geçirmeyi gerektirmemesidir.

Tablo 2. 1. BS üretimi için farklı biyoreaktör tiplerinin karşılaştırılması

Reaktör tipi	Avantajı	Dezavantajı	Verim ve Verimlilik	Kaynak
Hava kaldırmalı reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verimlilik; nispeten düşük kayma gerilmesi	Yüksek enerji gereksinimi, uzun biyofilm oluşma süresi	3,8-8,7 g/L 0,056-0,116 g/L/h	(Chao ve ark., 2000; Chao ve ark., 1997, 2001)
Döner disk reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu, aerobik suşlar için iyi	Yarı-sürekli üretim, yüksek kontaminasyon riski	5,35 g/L 0,015 g/L/h	(Krystynowicz ve ark., 2002)
Biyofilm reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verimlilik, ürünü ayırmak kolay	Hücre kirlenmesi, ölçek büyütme uygulamalarında kısıtlamalar	0,82 (kuru selüloz ağırlığı)/m ² /h	(Hofinger, Bertholdt ve Weuster-Botz, 2011)
Akışkan yataklı reaktör	Tek tip partikül karıştırma ve sıcaklık gradyenti, uzun sürekli üretim	Yüksek enerji gereksinimi, uzun biyofilm oluşma süresi, kayma gerilmesi	5,8 g/L 0,08 g/L/h	(Son ve ark., 2001)
Karıştırmalı tank reaktör	Yüksek hücre konsantrasyonu ve verimlilik, uzun süreli üretim	Hücrenin kayma gerilmesi, daha fazla karıştırma gücü ihtiyacı	4,57-13 g/L 0,058-0,23 g/L/h	(Cheng, Catchmark ve Demirci, 2011)

Tek bir *Gluconacetobacter xylinus* hücresi saniyede 200.000 adet glikoz molekülünü β -1,4-glukan bağlarıyla bağlayarak polimerize edebilir (Hestrin ve Schramm, 1954). Bazı bakteriler tarafından üretilen selüloz, özellikleri ve verimi Tablo 2.2’de verilmiştir.

2.6. Bakteriyel Selülozun Özellikleri

Doğal selüloz ve BS aynı kimyasal formüle sahiptir. Fakat BS bazı özellikler bakımından doğal selülozdan üstündür. Doğal selüloz ile karşılaştırıldığında BS yüksek saflıkta, hidrofilik olması, istenilen şekildeki selülozun direkt sentezlenebilmesi, yüksek kristalinite, daha yüksek kimyasal stabilite, yüksek su tutma kapasitesi, biyolojik olarak

parçalanabilir olması ve daha yüksek yüzey alanına sahip olması gibi özelliklere sahip olduğundan dolayı, BS tekstil sanayi, kağıt, gıda, ilaç, atık arıtma, madencilik ve rafineri olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılabilir.

Bakteriyel selülozun en önemli özelliklerinden biri de üretim sırasında fiziksel özelliklerin kontrol edilebilir olmasıdır. Hücre yoğunluğu, besi yeri bileşimi, fermantör tasarımı, fiziksel koşullar gibi fermantasyon koşullarının kontrol edilebilir olması sayesinde matlık, kuvvet ve yumuşaklık gibi özelliklerin ayarlanması kolaylaştırılabilir (Geyer ve ark., 1994). Böylece üretim sürecinde bakteriyel selülozun özellikleri ayarlanabilir. Bu özelliği bakteriyel selülozun kullanım alanını arttırmaktadır (Geyer ve ark., 1994). *Gluconacetobacter xylinus* tarafından üretilen BS dallanmamış bir polimerdir ve onun özellikleri diğer selüloz nanofiberlerinden oldukça farklıdır (Chao ve ark., 1997).

2.7. Bakteriyel Selülozu Üretimine Etki eden Parametreler

Bakteriyel selüloz üretimi sırasında karbon kaynağı, azot kaynağı, sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen ve diğer çeşitli parametreler etkilidir.

2.7.1. Karbon Kaynağı

Bakteriyel selüloz üretiminde en önemli parametrelerin başında karbon kaynağı gelmektedir. Fruktoz, maltoz, ksiloz, nişasta ve gliserol gibi karbon kaynakları da kullanılmasına rağmen genellikle selüloz üretimi için glikoz ve sukroz karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Masaoka ve ark., 1993). Park ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada *G. hansenii* PJK (KCTC 10505 BP) suşu ile karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında 1,72 g/L selüloz üretmiştir (Park, Jung ve Park, 2003). Geleneksel fermante sirkeden izole edilen *Acetobacter* sp. V6 karbon kaynağı olarak glikoz içeren kompleks besi yeri kullanıldığında 4,16 g/L selüloz üretmiştir (Son ve ark., 2003). Masaoka ve ark. (1993b), besi yeri içinde bir yan ürün olarak glukonik asit oluşumu kültür pH'nı azalttığı ve zamanla selüloz üretimini azalttığı için selüloz üretiminde başlangıç selüloz konsantrasyonu etkisinin de önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 6, 12, 24 ve 48 g/L başlangıç şeker konsantrasyonlarında selüloz üretimini incelemişlerdir ve glikoz tüketimini sırasıyla başlangıç konsantrasyonların % 100, % 100, % 68 ve % 28 olarak bulmuşlardır (Masaoka ve ark., 1993).

Tablo 2. 2. Bazı mikroorganizmalar ve selüloz üretimi

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı	İlaveler	Kültür Süresi	Üretim (g/L)	Kaynak
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP)	Glikoz	Oksijen	48 saat	1,72	(Jung, Park ve Chang, 2005)
<i>Acetobacter</i> sp. AP	Glikoz	Etanol	8 gün	15,2	(Son ve ark., 2001)
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Melas	-	72 saat	7,82	(Bae ve Shoda, 2004)
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Fruktoz	Agar, oksijen	72 saat	14,1	(Bae, Sugano ve Shoda, 2004)
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Fruktoz	Agar	56 saat	12,0	(Bae ve ark., 2004)
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	Fruktoz	Oksijen	52 saat	10,4	(Chao ve ark., 2000)
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	Glikoz	-	7 gün	3,5	(Krystynowicz ve ark., 2002)
<i>G. xylinus</i> strain (K3)	Mannitol	Yeşil çay	7 gün	3,34	(Nguyen ve ark., 2008)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	Glikoz	Lignosülfonat	7 gün	10,1	(Keshk ve Sameshima, 2006)

Ishihara ve ark. (2002) *A. xylinum* IFO 15606 tarafından selüloz üretimi için karbon kaynağı olarak ksiloz kullanarak 3 g/L selüloz elde etmişlerdir (Ishihara, Matsunaga, Hayashi ve Tişler, 2002) . Ramana ve ark. (2000), sukroz, mannitol ve glikozun *A. xylinum* NCIM 2526 tarafında selüloz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak bulmuşlardır (Ramana, Tomar ve Singh, 2000). Nguyen ve ark. (2008) kombu çayından izole ettikleri *Acetobacter xylinus* suşu ile karbon kaynağı olarak mannitol kullanarak maksimum selüloz üretimi sağlamıştır (Nguyen ve ark., 2008).

Etanol ilave karbon kaynağı olarak ve bazı kültür koşullarında ortaya çıkabilen selüloz üretmeyen *G. hansenii* (Cel⁻) hücrelerini dejenere etmek için kullanılmıştır. Etanol ilavesi *G. hansenii*'de selüloz üretimini 1,3 g/L'den 2,32 g/L'ye çıkarmıştır (21). Son ve ark. (2001)

yeni izole edilen *Acetobacter* sp. A9 suşunu kullanarak selüloz üretiminde etanolün etkisini araştırmışlardır. Son ve ark. (2001) hacimsel olarak % 1,4 etanol ilavesinin etanolsüz besi yerine göre selüloz üretimini yaklaşık 4 kat arttırarak 15,2 g/L'ye çıkardığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca etanol ilavesinin selüloz üretmeyen doğal mutasyonları elimine ettiğini bulmuşlardır (Son ve ark., 2001).

Selüloz üretiminde karbon kaynağı olarak glikoz kullanımı ile ilişkili olarak kültür ortamında glukonik asit oluşumu zamanla selüloz üretiminin azalmasına sebep olmaktadır. Keshk ve Sameshima (2006) glukonik asit oluşumunu ve liginosülfonat varlığında selüloz üretimini araştırmışlardır. Besi yeri liginosülfonat ile desteklendiğinde glukonik asit oluşumu azalmıştır ve BS üretimi artmıştır. Liginosülfonattaki antioksidan ve polifenolik bileşiklerin varlığı glukonik asit oluşumu inhibe ederek BS üretimini arttırdığı düşünülmüştür (Keshk ve Sameshima, 2006).

Toda ve ark. (1997), GPY-sitrik asit tamponunun selüloz üretimine etkisini araştırmışlardır. 20 g/L asetik asit varlığında selüloz verimi 0,6 g/L'den 3,8 g/L'ye yükselmiştir. Asetik asitten başka diğer (laktik asit, süksinik asit ve glukonik asit) organik asitlerin ilavesi selüloz verimini arttırmamıştır. Asetik asit monomer hammadde olarak tüketilmiştir ve glikoz katabolizması kütle akışı kısmen başka karbon kaynağı tarafından (örneğin asetik asit) sağlandığı belirlenmiştir (Toda, Asakura, Fukaya, Entani ve Kawamura, 1997). Matsuoka ve ark. (1996) azot kaynağı olarak mısır ıslatma şurubu, maya ekstraktı veya pepton içeren % 4 fruktoz eklendiği ortamda laktatın selüloz üretimini uyarıcı etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Naritomi ve ark. (1998) *Acetobacter xylinum* sp. *Secrofermentans* BPR3001A tarafından sürekli kültürde fruktozdan BS üretiminde laktatın etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları bu çalışmada Naritomi ve ark. (1998) besi yeri ortamına 12,5 g/L laktat ilavesinin karalı halde hücre konsantrasyonunu ve fruktoz tüketimini arttırdığını ve laktatın, selüloz biyosentezi için bir substrat olarak değil, bir enerji kaynağı olarak işlev gördüğünü belirtmişlerdir. Laktat oksidasyonundan dolayı artmış hücre içi ATP sürekli kültürde fruktoz tüketimini ve selüloz üretimini arttırabileceği yorumunda bulunmuşlardır (Naritomi, Kouda, Yano ve Yoshinaga, 1998).

Bae ve Shoda (2005) bakteriyel selülozunun üretimini bir jar fermentöründe melaslı besi yeri kullanarak *Acetobacter xylinum* BPR2001 ile incelemişlerdir. Melasın H₂SO₄ ön işlemine tabi tutulmasının, muamele edilmemiş melasları kullanarak elde edilen değerlere göre maksimum % 76 daha fazla selüloz konsantrasyonu sağladığını ve spesifik büyüme

hızını iki kat arttırdığını belirlemişlerdir. Bae ve Shoda (2005) H_2SO_4 ile ısıtılma işlemi görmüş melastaki başlangıçtaki şeker konsantrasyonlarını 23 ila 72 g/L arasında değiştirdiler ve melasta daha düşük bir konsantrasyon ile jar fermentörlerde etkili selüloz üretiminin gerçekleştiği sonucuna varmışlardır (Bae ve Shoda, 2005). Bae ve Shoda (2004), melaslı besi yerinde kesikli ve sürekli beslemeli fermentasyon ile bakteriyel selülozunun üretimini de incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada sürekli beslemeli sistemde saatte 6,3 g şeker besleme hızıyla maksimum BS üretimini sağlarken, kesikli beslemeli sistemde 5 kez 200 ml melas besi yeri ekleyerek 7.82 g/L üretim gerçekleştirdiğini görmüşlerdir (Bae ve Shoda, 2004). Keshk ve Sameshima (2006), bir Hestrin-Schramm ortamında şeker kamışı melası kullanarak bakteriyel selülozunun üretimini araştırmış ve selüloz üretimi için melasın glikozdan daha iyi bir karbon kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (Keshk ve Sameshima, 2006).

Premjet ve ark. (2007) sukroz, fruktoz, glikoz, azotlu bileşikler, azotlu olmayan asitler, nükleik asitler, vitaminler, diğer karbonhidratlar, mineraller ve renk maddeleri gibi şeker kamışı melası bileşenlerini tek tek veya kombine halde Hestrin-Schramm ortamına ekleyerek *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 tarafından BS üretimine etkisini araştırmışlardır. Hestrin-Schramm ortamına melastaki vitaminler, amino asitler, diğer karbonhidratlar, mineraller ve renkli maddeler eklenmesinin, karbon kaynağı olarak sukroz ve fruktoz karışımı ile BS verimini arttırdığı sonucuna varmışlardır. Renkli madde, bakteriyel selülozunun üretimini en etkili şekilde arttırmıştır (Premjet, Premjet ve Ohtani, 2007).

Hornung ve ark. (2006), substratın kütle transfer hızının, bakterilerin mikrobiyal büyümesi, selüloz oluşumu ve substratın kullanımı üzerine etkisini araştırmışlardır. Artan selüloz tabakası yoluyla glikozun difüzyonu için temel bir model önerilmiştir. Model, difüzyon direncindeki artışın gerçekten önemli olduğunu doğrulanmakta, ancak diğer faktörlerin de hesaba katılması gerektiğini belirtmektedir (Hornung, Ludwig, Gerrard ve Schmauder, 2006a). Hornung ve ark. (2006) büyüyen selülozun kap veya beher duvarı ile temas halinde olduğunu ve zamanla selüloz aşağıya doğru besi yerini içine aldığına dikkat çekmişlerdir. Bu duvar temasının ortadan kaldırıldığı deneyler gerçekleştirmiş ve birkaç hafta boyunca sabit bir üretim oranı tespit etmişlerdir. Bu, duvarın normal yüzey kültüründe olan rolünün anlaşılmasının önemini ortaya koymaktadır (Hornung ve ark., 2006a).

Bae ve Shoda (2005) ve Dongping ve ark. (2005), istatistiksel teknikler kullanarak bakteriyel selülozunun üretimi için ortam parametrelerini optimize etmişlerdir (Bae ve Shoda, 2005; Dongping ve ark., 2005). Sun ve ark. (2005), kültür koşulunun optimizasyonu için bir dizi istatistiksel yöntem kullanıp optimum besi yeri bileşimini (% olarak) sukroz 5, protein pepton 1,5, sitrik asit 0,2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,2, KH_2PO_4 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03, alkol 1'de ve pH = 6,8, 28 °C'de 6 gün boyunca maksimum BS üretimini 6 g/L olarak rapor etmişlerdir (Dongping ve ark., 2005). Bae ve Shoda (2005), kültür koşullarını optimize etmek için Box-Behnken tasarımını kullanarak % 4,99 fruktoz, % 2,85 mısır ıslatma şurubu, % 28,33 çözünmüş oksijen ve % 0,38 agar ile BS üretiminin 14,3 g/L olduğunu belirlenmişlerdir (Bae ve Shoda, 2005).

Kim ve ark. (2006) hurma sirkesinden *Gluconacetobacter* sp. RKY5 izole edip maksimum BS üretimini optimize etmişlerdir. Kim ve ark (2006) selüloz üretimi için optimize edilmiş besi yeri bileşimini gliserol % 1,5, maya ekstratı % 0,8, K_2HPO_4 % 0,3 ve asetik asit % 0,3 olarak belirlemişlerdir. Bu optimize edilmiş besi yerinde karıştırmalı kültürde 144 st sonra 5,63 g/L selüloz üretilirken 144 st sonra statik kültürde 4,59 g/L selüloz üretilmiştir (Kim, Kim, Wee, Park ve Ryu, 2006).

Çakar ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada BS selüloz üretimi için yeni geliştirdikleri M1A05P5 besi yeri ile farklı besi yerlerinde üretilen selüloz miktarlarını karşılaştırmışlardır. Geliştirdikleri bu besi yerinde verimin diğer besi yerlerine göre 5 kat daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada hammadde maliyeti olarak geliştirilen besi yerinin daha ucuz olduğu vurgulanmıştır (Çakar, Kati ve ark., 2014).

2.7.2. Azot Kaynağı

Azot hücre metabolizmasında gerekli ana protein bileşenidir ve bakterinin kuru hücre kütlelerinin % 8-14'ünü kapsamaktadır. Çeşitli çalışmalarda BS üretimine azot kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. Ramana ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *A. xylinum*'da peptonun 4 g/L, kazeinin 5 g/L selüloz ürettiklerini bildirmiştir (Ramana ve ark., 2000). Matsuoka ve ark. (1996) % 4 fruktozlu besi yerine % 0,15 mısır ıslatma şurubu ilavesinin selüloz üretimini uyarıcı etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durum diğer azot kaynaklarında bulunmayan laktatın mısır ıslatma şurubunda var olduğunu göstermektedir. Ayrıca aynı çalışmada ekstra azot ilavesinin biyokütle üretimine katkı sağladığı fakat selüloz üretimini azalttığı görülmüştür (Matsuoka, Tsuchida, Matsushita, Adachi ve Yoshinaga, 1996).

Yang ve ark. (1998), farklı karbon kaynaklarında hücre büyümesi ve selüloz üretimine maya ekstraktı konsantrasyonunun etkisi araştırmışlardır. Karbon kaynağı 20 g/L iken, 5 ila 60 g/L arasında maya ekstraktı besisi yerine eklenmiş ve besisi yerine 40 g/L maya ekstraktı eklendiğinde maksimum selüloz konsantrasyonu (6,7g/L) elde edilmiştir (Yang, Park, Hwang, Pyun ve Kim, 1998).

2.7.3. pH'ın Etkisi

Bakteriyel selüloz üretimi için kültür ortamının optimum pH'sı 4-6 aralığındadır ve 4'ün altındaki değerlerde BS üretimi düşmektedir (Masaoka ve ark., 1993). Kültür ortamında glukonik asit, asetik asit veya laktik asit birikiminden dolayı fermentatif üretim sırasında pH azalır (Kongruang, 2008). Bu yüzden optimum aralıkta pH kontrolü önemlidir. Viskoz besisi yeri genellikle pH sensörüne bağlandığında optimum pH'ı otomatik olarak düzeltmek zordur ve bu da yanlış pH okumaya sebep olur. Noro ve ark. (2004) mısır ıslatma şurubunu (CSL), çeşitli tamponlama maddeleri içerdiği için tamponlama ajanı olarak kullanmışlardır. Tamponlama kapasitesi ile CSL-fruktoz ortamı kullanıldığı zaman pH optimum aralıkta muhafaza edilebilir ve yüksek BS üretimi sağlanır (Noro, Sugano ve Shoda, 2004).

Keshk ve Sameshima (2006) BS üretilen besisi yerinde inkübasyondan önce ve sonra pH değişimlerini incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada monosakkaritler ile hazırlanan besisi yerinde ortamın son pH değerinin başlangıç pH değerinde daha düşük olduğunu gözlemişlerdir. Özellikle karbon kaynağı olarak glikoz kullanılan besisi yerinde ortam pH değerinin 3,9'a düştüğü gözlenmiştir. Fakat, pH'daki bu düşüş BS üretimine tek başına etki etmemektedir (Keshk ve Sameshima 2006).

BS üretimi için optimum pH karbon kaynağına bağlı olarak değişebilir. Hutchens ve ark. (2007) bakterinin glikoz ile kültürü yapıldığında optimum başlangıç pH'nın 5,5 olduğunu bildirmişlerdir. Fakat mannitol kullanıldığında optimum pH 6,5'dir (Hutchens, León, O'Neill ve Evans, 2007).

Bakteriyel selüloz üretimi esnasında ortamda bulunan glikoz fazlası glukonik asite dönüşmektedir. Glukonik asit oluşumu ortamın pH'ında büyük bir düşüşe neden olmaktadır. Bu nedenle karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında pH ayarlanması, proses verimi üzerinde oldukça etkilidir (Cheng ve ark., 2011).

Statik kesikli kültür koşulları altında, asetik asit ve glukonik asit içine glikoz dönüşümü etanol oksidasyonunu içeren *G. xylinus*'un solunum metabolizmasından dolayı kültür ortamının pH'ı azalır. pH'daki bu azalma hücre büyümesi ve selüloz üretimi için optimum aralıkta pH'ın kontrolünü çok önemli hale getirmektedir (Ha, Shah, Ul-Islam, Khan ve Park, 2011; Kongruang, 2008). Fakat kesikli beslemeli kültür (statik kültür) durumunda taze besi yerinin periyodik olarak eklenmesinden dolayı pH yaklaşık olarak sabit kalabilir (Shezad ve ark., 2010).

2.7.4. Sıcaklık

Mikroorganizmalar için en önemli çevresel faktörlerden biri kuşkusuz sıcaklıktır. Yapılan birçok çalışmada *Gluconacetobacter xylinus* suşu için optimum sıcaklık 28-30 °C arasındadır. Son ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada birçok farklı sıcaklıkta (20-40 °C) deneylerini gerçekleştirmişlerdir. 25 °C'de herhangi bir selüloz üretiminin olmadığını ve 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise selüloz veriminin düştüğünü gözlemlemişlerdir (Son ve ark., 2001).

2.7.5. Çözünmüş Oksijen

Kültür ortamında çözünmüş oksijen selüloz üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Statik kültürlerde substratlar tamamen difüzyon ile taşınmak zorundadır ve karbon kaynağı genellikle ulaşabilir olduğundan oksijene ulaşabilirlik hücre metabolizması için sınırlı hale gelebilir ve selüloz üretiminde ve selüloz kalitesinde negatif etkiye sebep olabilir (Shirai ve ark., 1994).

Kouda ve ark. (1997) havalandırmalı ve karıştırılmalı kültürde *Acetobacter* tarafından BS üretiminde oksijen ve karbon dioksitin etkisini çalışmışlardır. Üretim hızı, besi yeri viskozitesi arttığı için azalan oksijen transfer hızına bağlıdır. Selüloz üretim hızı yüksek oksijen basıncından etkilenmemesine rağmen selüloz üretim hızı, çalışma basıncı arttığı için azalır (Kouda, Naritomi, Yano ve Yoshinaga, 1997).

Kültürdeki çözünmüş oksijen karıştırma hızıyla değişebilir. Tantratian ve ark. (2005) kültür ortamında çok düşük oksijen seviyesinin kültür büyümesi için gerekli oksijeni sağlamadığını ve selüloz üretimini azalttığını, kültür ortamında çok fazla çözünen oksijen bulunmasının ise karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında glukonik asit içeriği arttırdığını ve bu yüzden BS üretimini azalttığı bildirmişlerdir. Kesikli beslemeli kültürde

çok yüksek selüloz verimi % 10 çözünmüş oksijen doygunluğunda elde edilmiştir (Tantratian, Tammarate, Krusong, Bhattarakosol ve Phunsri, 2005).

Chao ve ark. (2001) 50 L hava kaldırmalı reaktörde farklı fruktoz konsantrasyonlarında oksijenle zenginleştirilmiş hava altında BS üretimini çalışmışlardır. Başlangıç fruktoz konsantrasyonu 30 ila 70 g/L arasında değiştirildiği zaman en yüksek selüloz üretim hızı (0,22 g/st) ve en yüksek selüloz konsantrasyonu (10 g/L) 60-70 g/L fruktoz konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir (Chao ve ark., 2001).

2.7.6. Diğer Faktörler

Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan besi yerine etanol, laktik asit, sitrik asit gibi organik asit ilavesi selüloz verimini arttırmaktadır. Organik asitler yardımcı substrat görevi yaparak hücre büyümesini hızlandırmaktadırlar.

Son ve ark. (2001) BS üretiminde etanol ilavesinin etkisini araştırmışlardır. Organik asitler içerisinde hücre bölünmesini en çok etanolün arttırdığını göstermişlerdir. Bunun nedenini ise etanolün selüloz üretmeyen mutant hücrelerin (Cel-) oluşumunu engellemesi şeklinde açıklamaktadırlar. Karıştırmalı yöntemde oluşan Cel- mutantların önlenmesi selüloz verimini önemli ölçüde arttırmaktadır (Son ve ark., 2001). Melas bir yan ürün olduğu için; içerisinde istenmeyen demir, çinko, bakır, manganez gibi bir takım ağır metaller ve renk veren maddeler bulunmaktadır. İstenmeyen bu maddeler BS üretiminin düşmesine neden olmaktadır. Bae ve Shoda (2004) bu maddelerden kurtulabilmek için, fermantasyon öncesi melasa bir takım ön işlemler uygulamışlardır. İki aşamadan oluşan işlemin ilk aşamasında; melası 120 °C’de 20 dk. otoklavladıktan sonra oda sıcaklığında tüm gece bekletip santrifüj uygulamışlardır, ikinci aşamada ise 4 N sülfürik asit (H₂SO₄) ile muamele edip bütün gece bekleterek tekrar santrifüj uygulamışlardır. Böylelikle istenmeyen bu maddelerden büyük ölçüde kurtulmayı başarmışlardır (Bae ve Shoda, 2004). Benzer amaçlarla Lu ve ark. (2011) *G. xylinus* 186 kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sırasında altı farklı alkolün uyarıcı etkisini araştırmışlardır. Oluşan etkiler n-bütanol > mannitol > gliserol > etilen glikol > metanol > n-propanol olarak sıralanabilir. Fakat sonuçlar mannitolün her konsantrasyonda BS üretimini uyarırken n-bütanolün sadece % 1,5 v/v’den daha az konsantrasyonlarda eklendiğinde BS üretimini etkilediğini göstermiştir (Lu ve ark., 2011). Daha fazla çalışma agar ve asetan gibi polisakkaritler eklenmesiyle BS verimliliğini arttırmak ve kayma hızını azaltmak için yapılmıştır.

Son ve arkadaşları *Acetobacter* sp. V6 kullanarak gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada; magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)'ın da selüloz verimini arttırdığını göstermişlerdir. Magnezyum iyonlarının hücresel metabolizmanın devam ettirilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Magnezyum iyonları; selüloz sentaz enzimi için aktivatör olan c-di-GMP için gerekli olduğundan, ortama $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ilave edilmesi hücre büyümesini ve selüloz sentezini arttırmaktadır (Son ve ark., 2001).

Bakteriyel selülozu arttırmak için çeşitli katkı maddelerinin ilavesi ortam viskozitesinin artmasıyla kayma kuvvetlerinin azalması (Bae ve Shoda, 2004), kristalizasyon sürecinin inhibisyonu (Haigler, Brown ve Benziman, 1980) ve hücre tipinin değişimi (Park, Park, Jung, 2003) gibi durumlarda önerilebilir. Bira kültür besisi yerinde elde edilen atık (Ha ve ark. 2008; Shezad ve ark. 2010) , pirinç şarabı damıtımından elde edilen dip suyu (Wu ve Liu, 2012), polisakkaritler (Lee, Kim ve Yang, 2012; Shah, Ha ve Park, 2010), alkoller (Lu ve ark., 2011) gliserol (Jung ve ark., 2010; Mikkelsen, Flanagan, Dykes ve Gidley, 2009) ve organik asitleri (Jung ve ark., 2010) içeren farklı kimyasal bileşenler BS üretimini arttırmak amacıyla fermantasyon ortamına ilave edilen katkılardan bazılarıdır. Cheng ve ark. (2009a) da *A.xylinum*'un süspanse hücre kültüründe elde edilenden 6,3 kat daha fazla erlen yüzeyinde % 1 karboksimetil selüloz (CMC) ilavesi ile BS'nin 8,2 g/L üretilebileceğini göstermişlerdir (Cheng, Catchmark ve Demirci, 2009). Küçük peletler büyük parçaların yerine reaktörün içinde oluşmuşlardır. Selülozun ürün alımı kolay ve sürekli BS üretimi imkânı sağladığından dolayı bu bir avantaj olarak görülmüştür.

Song ve ark. (2009) kontrol kültür içinde 5,0 g/L ile karşılaştırıldığında % 0,4 agar şekerleştirilmiş gıda atıkları (SFW) ortamına eklendiğinde maksimum BS üretimi (5,8 g/L) sağlamışlardır (Song, Li, Seo, Kim ve Kim, 2009). Shah ve ark. (2010) da yüzeyi modifiye edilmiş reaktörlerde (SMRs) çalışmış ve maksimum BS üretimini (5,03 g/L) % 2 agar ile SMRs'de elde etmişlerdir. Bu değer modifiye edilmeyen ortamında elde edilenden (3,05 g/L) yaklaşık 1,7 kat daha yüksektir. Agar BS'nin temel yapısal karakterini koruyan, BS'nin üretiminin ve verimliliğinin artışıyla sonuçlanan hücre büyüme hızı ve viskozitedeki artıştan sorumludur (Shah ve ark., 2010).

Hu ve Catchmark (2010) kültür ortamına 0,14 mg 1-metilsiklopropan (MCP) eklenmesiyle daha az biyokütle üretildiğini ve BS verimi ekleme yapılmaya ortam % 25,4'e kadar artırılabilir olduğunu göstermişlerdir (Hu ve Catchmark, 2010).

2.8. Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları

2.8.1. Medikal alanda BS'nin Kullanımı

Bakteriyel selülozun yapısal ve mekanik özellikleri çeşitli uygulamalar için onu bitkisel selülozdan daha iyi bir seçenek yapmaktadır. Yaklaşık olarak, BS lifleri 20-100 nm çapında ve yüksek yüzey alanına sahip yüksek bir en-boy oranına sahiptir ve BS çok yüksek bir su tutma kapasitesine sahiptir. Üstelik, biyouyumluluk, hidrofilitiklik, şeffaflık ve toksisite gibi diğer birkaç belirgin özellik, biyotıp ve biyoteknoloji de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda BS'yi uygun bir materyal yapmaktadır (Dahman, 2009). Genel olarak, tıbbi uygulamalar için bir biyomalzeme seçimi esas olarak biyouyumluluk derecesine bağlıdır. Aynı şekilde, önerilen bir tıbbi başvuru, belirli bir selüloz yapısının seçimini desteklemelidir. Örneğin, implante edilebilir selüloz, bitki selülozundan yapılmış bir kemik dokusu ve hepatositleri desteklediği bildirilen bir selüloz iskelesine cilt hücrelerinin entegrasyonunu kolaylaştırmak için yapay deri ikameleri için çapı 50-150 µm olan birbirine bağlı gözeneklerle yüksek porozite göstermelidir (Kino, Sawa, Kasai ve Mito, 1998). Benzer şekilde, geçici yara sargısı örtüsü için selüloz iyileşme sürecinde nano-gözenekli bir yapı sergilemek ve yarayı nemli tutmak zorundadır. Çeşitli in vivo çalışmalarda, tavşan ve fare gibi hayvan modellerinde mikrobiyal selülozun kullanımı incelenmiştir (Oster ve ark., 2003). Yapılan çeşitli çalışmalarda bakteriyel selülozun ve kompozitlerinin kullanımı deri, kan damarı, kornea, kemik ve kıkırdak gibi uygulamalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir.

2.8.1.1. Yara İyileştirme Materyali Olarak BS Kullanımı

Yaraların iyileşme süreci, dermisin onarımını ve epidermisin rejenerasyonunu içermektedir (Balasubramani, Kumar ve Babu, 2001). Yanık tedavisinin temel hedeflerinden biri, iyileşme hızını arttırmak ve hızlı bir şekilde ağrı gidermeyi sağlamak için etkili bir yara kapatma işlemini hızla yerine getirmektir (Demling ve DeSanti, 1999; Jones, Currie ve Martin, 2002; Prasanna, Mishra ve Thomas, 2004). Ek olarak, düzgün bir şekilde iyileşme süreci sağlanması için yaranın enfeksiyon kapması engellenmelidir (Gallin ve Hepperle, 1998; Latarjet, 1995). Piyasada birçok farklı biyolojik ve sentetik yara örtüsü bulunmasına rağmen en üst düzey yara örtüsü için araştırmalar devam etmektedir. Modern yara iyileştirme alanındaki uygulamalar, mükemmel bir yara örtü sistemi yapısal ve fonksiyonel olarak otogreft dokuya benzer şekilde geliştirilmesi gerekmektedir (Balasubramani ve ark., 2001). Etkili özelliklerinden dolayı BS son derece etkili bir yara örtü malzemesi olarak

gösterilmiştir. BS, küçük boyutlu fibriller, ıslak doğası, yüksek derecede nano-gözenekli yapı ve yarayı kapatma kolaylığı gibi benzersiz özelliklerinden dolayı geniş bir yara örtü malzemesi olarak araştırılmıştır. Bu özellikler, yaralar için nemli bir ortam sağlamak, antibiyotiklerin ve diğer ilaçların transferini kolaylaştırmak ve enfeksiyonlara karşı fiziksel bir bariyer görevi yapmak gibi birçok avantaja sahiptir.

Yara iyileşmesi, çeşitli hücre tipleri, hücre dışı matris (ECM) molekülleri ve çözünür bileşikler arasındaki karmaşık etkileşimleri içeren dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesi homeostaz, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve yeniden şekillendirme gibi bir dizi etkinliğin koordinasyonunu gerektirir (Eming, Smola ve Kreig, 2002). Ülser yarasının iyileşme sürecindeki sorunların çoğu, bu olayların bir veya daha fazlasının düzgün bir şekilde gerçekleşmemesinden kaynaklanmaktadır. Yara iyileşmesindeki son araştırmalar, iyileşmeyi hızlandıran ve yara izini azaltan, yeni doku veya organ ikamelerini geliştirme unsurlarını optimize ederek ve iyileşme sürecini yenileyerek ve onararak düzeltmeyen sinyalleri belirleyerek sürecin iyileştirilmesine odaklanmıştır. Örneğin, cilt yaralarının iyileşmesi, farklı doku tiplerinin, hücre tiplerinin ve matris bileşenlerin yenilenmesini gerektirir (Balasubramani ve ark., 2001).

Polonya'da yapılan bir çalışmada kurutulmamış BS membran 2. derece bir yanık tedavisinde kullanılmıştır. Bu çalışmada BS membranın gerçekten diğer ticari yara örtüsü malzemelerine göre; 1) yara yüzeyine uygun yapışma, 2) yara için nemli bir ortam sağlama, 3) acıyı etkili şekilde azaltma, 4) epitel dokunun yeniden oluşmasını ve granülasyon dokusu oluşumunu hızlandırma ve 5) yara izi oluşumunu azaltma gibi hususlarda daha etkili bir performans gösterdiği görülmüştür. BS'nin yara örtü malzemesi olarak ilk ticari uygulaması 1980'lerde Johnson & Johnson Company tarafından gerçekleştirilmiştir. Biofill, XCell (Şekil 2.6) ve Bioprocess ürünleri zaten yara iyileşmesinde güncel uygulama için ticari olarak günümüzde ulaşılabilir. Biofill isimli BS ürünün geliştiren Mayall ve ark. (1990) ve Fontana ve ark. (1990) bir çalışmada Biofill ürününün, yanıklar ve kronik ülser gibi deri problemleri için çok başarılı bir yara sargısı malzemesi olduğu kanıtlanmıştır (Fontana ve ark., 1990; Mayall, Mayall, Mayall, Rocha ve Marques, 1990). Biofill'in diğer yara sargısı malzemelerinden ağrıyı azaltmak, yarayı enfeksiyona karşı korumak, iyileşme sürecini hızlandırmak ve tedavinin maliyetini azaltmak gibi çeşitli yollarla daha etkili olduğu gösterilmiştir. Dahası, diğer cilt tedavilerine göre daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu ürünler hemen hemen her çevreye uygundur ve yaranın davranışına göre emici veya serbest

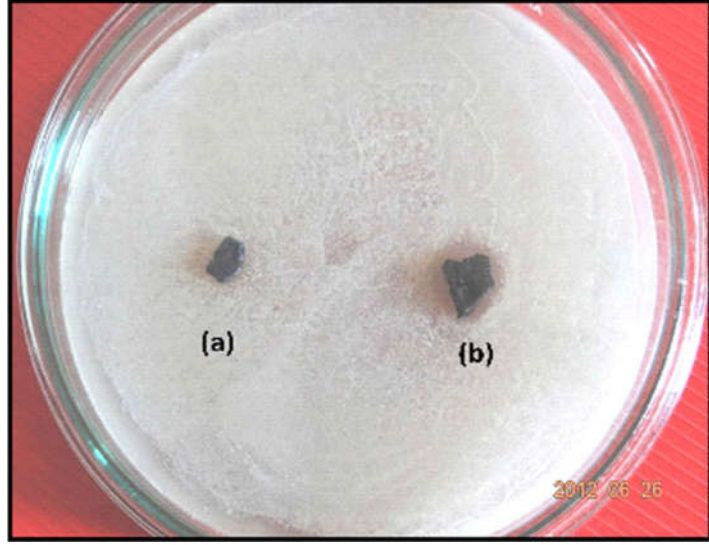


Şekil 2. 6. Ticari olarak satılan XCell bakteriyel selüloz

kalan sıvı tarafından uygun bir su dengesini koruyabildiği için ideal bir nemlendirme sağlar. BS yara enfeksiyonunu engelleyen antimikrobiyal aktiviteye sahip olmamasına rağmen bu gümüş nitrat çözeltisine bakteriyel selülozu daldırarak BS üzerine kazandıran gümüş nanopartikülleri ile elde edilebilir. Gümüş nanopartiküller ile selüloz membran bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite sağlar, böylece kronik yaralar ve yanıklar için antimikrobiyal yara materyali olarak kullanılabilir (Jung, Kim, Kim ve Jin, 2009). Gümüş nanopartikülü eklenmesinin etkisi Şekil 2.7’de gösterilmiştir.

2.8.1.2. İlaç Salınım Sistemlerin ve İlaç Eksipiyanı (Katkı maddesi) olarak BS Film Kaplama

Selüloz, film oluşturucu özelliklerinden dolayı farmasötik kaplamalarda kullanılmaktadır. Buna ek olarak, BS sahip olduğu üniform ve ultra ince fibröz ağ yapısı nedeniyle yüksek gerilme mukavemeti, elastite modülü ve yüksek ıslak mukavemet de dahil olmak üzere arzu edilen mekanik özellikleri sergilemektedir. BS’nin yapısında ve özelliklerinde herhangi bir değişiklik yapılmaksızın sterilize edilebilmesi de önemli bir avantajdır (Hu ve ark., 2009; Wan ve ark., 2009). Yukarıda bahsedilen özellikler, BS’yi bir tablet film kaplama ajanı olarak uygulamaya uygun bir malzeme yapmaktadır. Amin ve ark. (2012), nispeten iyi film oluşturucu özelliklere sahip olan ilaç tabletleri oluşturmuşlardır. Farklı plastikleştiriciler veya polimerler gibi diğer katkıları ile daha iyi özelliklere sahip maddeler oluşturulabilir (Amin, Abadi, Ahmad, Katas ve Jamal, 2012). Bu nedenle BS



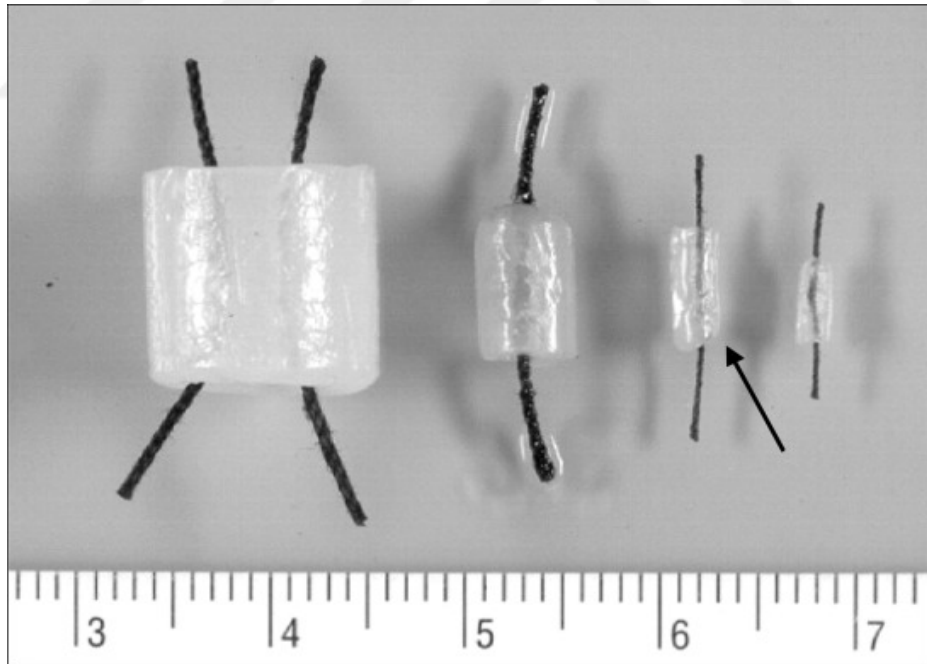
Şekil 2. 7. AgNO_3 nanoparçacıklarının BS matrisi içerisine dahil edilmesi. Saf BS (a) herhangi bir mikrobiyal inhibisyonu göstermezken, AgCl emdirilen edilen BS (b) pelikül çevresinde bir inhibisyon halkası görünmektedir (Jung ve ark., 2009).

fonksiyonel olmayan farmasötik film kaplama ve sürekli ilaç salınım sistemi için potansiyel bir uygulamaya sahiptir. Ayrıca Kulkarni ve ark. (2012), Bakteriyel selülozun tablet formülasyonlar için bir farmasötik eksipiyen olarak uygun bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Kulkarni, Anil Dixit ve Singh, 2012). BS, rastgele bir şekilde 3D boşlukla düzenlenmiş nano ölçekli fiberlerden oluşur ve böylece açık gözenekli bir yapı sağlar; manyetik inorganik nanopartiküllerin çökmesi için bir şablon olarak kullanılır (Pirkkalainen ve ark., 2008; Kari Pirkkalainen ve ark., 2007). İlaç salınım uygulamalarında BS gibi yeni malzemelerin kullanımını belirlemeye yardımcı olması için BS, termo ve pH'ye duyarlı hidrojelleri üretmek için farklı oranlarda akrilik asit ile kombine edilmiştir. Amin ve ark. (2012), BS'nin hidrojellerinin kontrollü ilaç salınım sistemi olarak umut vadeden bir materyal olduğunu ifade etmişlerdir (Amin, Ahmad, Halib ve Ahmad, 2012).

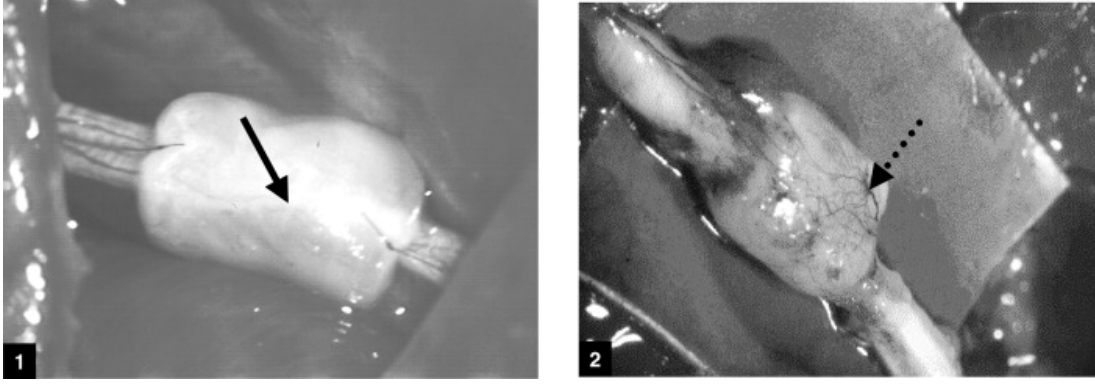
2.8.1.3. Yapay Kan Damarı

Yapay kan damarları, kan dolaşımını düzeltmek için sentetik malzemelerden yapılmış borulardır (Şekil 2.8). Arterlerin sertleşmesinden dolayı kalp çevresindeki koroner damar tıkanıklığı olması durumunda, ilgili olan karmaşık prosedürlere bağlı ölümcül risk taşıyan bir bypass işlemi gereklidir. BS vinyon, teflon ve sentetik elyaf Dacron gibi kimyasal olarak sentetik materyallere kıyasla daha düşük bir kan pıhtısı riski taşıdığı için suni kan damarlarının sentezi için kullanılabilir. BS birçok sentetik malzemeye göre daha üstün şekil

tutma ve yırtılma direnci gibi yapay kan damarlarının sentezi için yararlı birkaç mekanik özellik sergiler. Polipropilen, polietilen tereftalat veya selofan gibi organik tabakalara kıyasla, BS bir film veya tabaka haline getirildiğinde dikkate değer bir mekanik mukavemet sergilemektedir. Yapılan bir çalışmada tüp şekilli bir BS kan damarı yerine uygun bir malzeme olduğu belirtilmiştir (Klemm, Schumann, Udhardt ve Marsch, 2001). Ayrıca, selüloz kanla temasta çok iyi çalışır ve bu nedenle yapay kan damarlarının yerini alabilir. BS lifleri düz kas, endotel ve fibroblast hücrelerinin büyümesini ve proliferasyonunu destekleyerek canlı bir kan damarı oluşturur. Mekanik özelliklerinin, dolaşım sistemi tarafından oluşturulan kuvvetlere dayanması için uygun olduğu kanıtlanabildiğinden kan damarlarının üretimi için etkili olduğu düşünülmektedir. Yapay olarak sentezlenen kan damarları (BASYC tüpleri) genellikle iç çapı 1,0 mm, uzunluğu 5 mm ve cidar kalınlığı 0,7 mm'dir ve hücrelerin yüzeylerinde büyümesine ve kan pıhtılaşmasının önlenmesine imkân sağlar. Yapay kan damarlarının diğer önemli özellikleri, yüksek mekanik mukavemet, mekanik gerilime direnç ve kan basıncının olmasıdır. Şekil 2.9'da BASYC tüplerin klinik uygulaması gösterilmiştir.



Şekil 2. 8. Farklı çap, uzunluk ve duvar kalınlığına sahip BASYC tüpleri (Klemm ve ark., 2001)



Şekil 2. 9. Bir mikrosinir cerrahisinde BASYC tüpün uygulaması (Klemm ve ark., 2001)

Kardiyovasküler greftlerin pratikte gelişimi, sentetik greft ve çevredeki dokular arasındaki uyumsuzluğu sınırlamıştır. Bu dezavantaj, değiştirilen dokulara yakın özelliklere sahip biyomalzemelerin geliştirilmesi ile üstesinden gelinebilir. Yüksek biyouyumluluk gösteren, istenen tıbbi özelliklerin sergilendiği bir anizotropik BS-PVA (polivinil alkol) nanokompozit sentezlenmiştir. Nanokompozitlerin mekanik özellikleri, anizotropi gibi materyali ve işleme parametrelerini kontrol ederek geniş yelpazede çeşitlendirilmiştir. Fizyolojik aralıktaki hem çevresel hem de eksensel yönlerde özellikleri yakından eşleştirilmiş ve fizyolojik yükün ötesinde daha fazla gerilmeye karşı direnç sağlanmıştır. Bu gözlemler BS-PVA nanokompozitlerin anizotropi derecesinin kardiyovasküler sistemden diğer bağ dokularına kadar değişen yumuşak dokuların mekanik özelliklerine yakından uyacak şekilde kontrol edilebileceği sonucuna götürmüştür. Bununla birlikte, yapay kan damarlarının geliştirilmesinden önce, BS dahil olmak üzere değerlendirilecek olan materyal, endotel hücre proliferasyonunu ve trombojenik özellikleri destekleme potansiyeli bakımından konvansiyonel greft materyalleri ile karşılaştırılmalıdır (Ul-islam, Khan, Khattak, Ullah ve Park, 2015).

2.8.1.4. Doku İskelesi

Doku mühendisliği yaklaşımlarında doku rejenerasyonunun başarısını belirleyen anahtar unsur, yeni büyüyen dokuların yanı sıra hücrenin tutulmasını, yayılması, migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşması için yapısal destek sağlayan üç boyutlu bir doku iskelesinin geliştirilmesidir. İskelet hücre hareketine ve büyüyen hücrelere besin maddelerinin taşınmasına izin veren birbirine bağlı gözenek ağı içermesi ayrıca önemlidir. İstenilen bir doku türünün oluşturulması için düzgün üç boyutlu yapı içerisinde hücrelerin

gelişimini sağlayan iskele üzerine hücreler ekilir. İn vitro olarak geliştirilen bu doku yapısı vücudun etkilenen alanına implante edilir (Ul-islam ve ark., 2015).

Daha önceki çalışmalar, iskele materyalinin biyolojik olarak parçalanabilir olması gerektiğini ve böylelikle hücreler çoğaldıkça implante edilen materyalin yerini alacağını göstermişlerdir. Fakat genellikle doku iskelesi bozunma hızı hücrelerin oluşum hızından daha yüksektir. Bu problem, biyolojik olarak uyumlu, gözenekli ve normal doku fonksiyonu için gerekli mekanik özellikleri içeren kalıcı iskele malzemesinin geliştirilmesi yoluyla aşılabılır. Kolajen, aljinat, hiyalüronik asit, fibrin tutkalı ve kitosan gibi doğal polimerler ve Poliglikolik asit (PGA), poli laktik asit (PLA), polivinil alkol (PVA), polihidroksi etil metakrilat (pHEMA) ve poli (N-izopropilakrilamid) (pNIPAA) gibi sentetik polimerler de dahil olmak üzere doku iskelesi tasarımında çeşitli malzemeler denenmiştir (Keshk, 2014). Yapılan ön çalışmalar, BS'nin doku mühendisliğinde iskelet gelişiminde mükemmel bir malzeme görevi görebileceğini göstermiştir. Hem saf BS hem de modifiye edilmiş BS iskele materyali olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar saf BS'nin hücre kültürü ya da doku mühendisliği için etkisiz bir substrat olduğunu göstermiştir, çünkü hücreler BS'ye uymaz ve dolayısıyla çoğalamazlar. Serumda ve sodyum hidroksit gibi elektrolitik çözeltilerle saf BS ıslatıldıktan sonra hücreler yapışmaya ve çoğalmaya başlamış ve BS'nin iskelet gelişiminde bir hücre kültürü substratı olarak kullanılma kabiliyetini kanıtlamıştır (Watanabe ve ark., 1993). *G. xylinus*, biyo-uyumluluk, mekanik mukavemet ve biyobozunabilirlik gibi benzersiz özelliklerinden dolayı iskele için yeni bir malzeme üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Doğal ve kimyasal olarak modifiye edilmiş BS (fosforile ve sülfonatlı BS) sığır kondrositleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, modifiye edilmemiş BS'nin yaklaşık % 50 seviyesinde kondrosit çoğalmasını desteklediğini ve mekanik özellikler açısından önemli avantajlar sağladığını ortaya koymuştur. Doku kültürü plastiği ve kalsiyum alginat ile karşılaştırıldığında saf BS, kondrosit oluşumunda belirgin olarak daha yüksek seviyelerde çıkmıştır.

2.8.1.5. Kemik ve Kıkırdak Rejenerasyonu

Doğal kemik, hidroksiapatitle (HAp) takviye edilmiş bir kollajen matrisinden oluşur. Ciddi hasar gören kemik dokuları genellikle iyileşme süreciyle yenilenmek zordur. Her yıl, dünya çapında iki milyondan fazla kemik grefti ameliyatı yapılmaktadır ve bunların maliyeti 15 milyar doların üzerindedir. Benzer şekilde, kıkırdak, kollajen ve proteoglikanlardan

oluşan bir matriste gömülü olan kondrosit sadece bir tür hücreden oluşan avasküler bir dokudur. Yetişkin kıkırdak dokuları, yüksek derecede farklılaşmış ve bölünmeyen kondrositlerin seyrek dağılımına bağlı olarak sınırlı kendini onarma kapasitesine sahiptir. Buna ek olarak, kendine onarma süreci yavaş bir matris devri, düşük progenitör hücrelerinin temini ve vasküler beslenme eksikliği nedeniyle engellenir. Kemik transplantasyonu, otogreft, allogreft veya oreksenogreft ile yapılır ve allogreft ile oreksenogreft bağışıklık reddi problemiyle karşı karşıyadır. Maksimum başarı şansı olmasına rağmen, otogreft, donör dokuların kısıtlı kullanılabilirliği, boyutu ve şekli, aynı zamanda otojen kemiklerin çıkarılması sırasında cerrahi ağrı nedeniyle sıklıkla kaçınılır. Bu nedenle, büyük kemik hasarlarının onarımı için uygun olmayabilir (Deng, Hong-wen ve Liu, 2005). Ayrıca, metallere, biyoaktif camlardan, alümina seramiklerinden, kalsiyum sülfattan, poli (glikolik asit), poli (laktik asit), polikaprolakton, kalsiyum fosfat, kollajenden ve doğal mercanlardan veya seramiklerden yapılmış sentetik greftler optimal mekanik özellikler sağlamamaktadır (Zimmermann, LeBlanc, Sheets, Fox ve Gatenholm, 2011), zayıf toplam osseointegrasyon gösterirler ve sonunda enfeksiyon veya yorulma yükü nedeniyle başarısız olur. Bu kısıtlamalar, daha büyük, daha karmaşık yapılara kolayca işlenebilen ve doku mühendisliği yoluyla doğal onarım mekanizmasına rehberlik edecek yeni kemik greft materyalleri için büyük bir klinik gereksinimi ortaya çıkarır. Birkaç sentetik polimer şu anda biyomedikal mühendisliğinde kullanılmaktadır ve bozunma süresi gibi bazı önemli özellikleri polimer işleme sürecinde iyileştirilebilmektedir. Doku mühendisliğindeki iskelet hücre proliferasyonunu destekleme ve yeni büyüyen dokuların şeklini tanımlamanın yanı sıra hücrelerin farklı fonksiyonlarını korur. BS, biyouyumluluk, kuru ve ıslak haldeki yüksek çekme mukavemeti, ince fibril ağları, yüksek kristallik ve kalıplanabilirlik nedeniyle, kemik ve kıkırdak dokularının yenilenmesi için doku mühendisliği uygulamalarında bir iskele olarak kullanılmıştır (Bäkdahl ve ark., 2006). Çalışmalar, BS'nin kemik ve kıkırdakın önemli bileşenleri olan endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi birkaç hücre tipinin büyümesini desteklediğini göstermiştir. BS ayrıca bu hücrelere toksik olmayan bir etki göstermiştir. Bununla birlikte, BS ile ilişkili önemli sınırlamalar, yoğun bir ağdan gelen nanofibriller hücre infiltrasyonunu sınırlandırabilmesidir. Sorun, birbirine bağlı gözeneklerin bir ağ oluşturan *A. xylinum* fermantasyonu sırasında porojenlerin eklenmesiyle BS'ye gözeneklilik kazandırılarak aşılmıştır (Bäkdahl, Esguerra, Delbro, Risberg ve Gatenholm, 2008).

2.8.2. Elektrik Materyalleri

Bakteriyel selülozun iletken olmayan bir materyal olduğu bilinmektedir fakat bazı iletken materyalleri selülozun içerisine eklendiğinde selüloz iletkenlik özelliği kazanır. Müller ve ark. (2011), oksidant olarak $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ kullanarak in situ oksidatif polimerizasyon aracılığıyla iletken polipirol (PPy) ve polianilin (PANI) ile birlikte BS yüzeyini kaplamışlardır. Sonuç olarak bir çekirdek-kabuk yapısı ile BS nanofiberin yüzeyinde sürekli bir iletken tabaka oluşturmuşlardır. Kompozitin elektrik iletkenliği, reaksiyon zamanının yanı sıra oksidant ve monomer konsantrasyonuna bağlıdır (Müller, Rambo, Recouvreux, Porto ve Barra, 2011).

Liang ve ark. (2012), başlangıç materyali olarak BS kullanarak yüksek iletkenliğe sahip ve uzayabilen kompozit üretmek için basit ve ucuz bir metot geliştirmişlerdir. Hazırlanan pirolizlenmiş BS (p-BS)/polidimetilsiloksan (PDMS) kompoziti ticari karbon nanotüp ve grafen temelli kompozitlerden çok daha yüksek olan 0,20-0,41 S/cm'lik iletkenlik sergilemiştir. Kompozitlerin olağanüstü elektromekanik özelliklerinin, P-BS aerogellerinin elektronların hızla hareket edebileceği birbiriyle bağlantılı yollar sağlayan güçlü ve önceden oluşturulmuş 3D ağlarından kaynaklandığına düşünölmektedir (Liang ve ark., 2012).

2.8.3. Manyetik Materyaller

Manyetik nanomateriyaller biyomedikal, veri depolama ve araç uygulamalar için geliştirilmiştir. Manyetik nanopartiköller ile kombine edilmiş BS materyalleri günümüzdeki araştırmaların ilgi odağıdır. Önceden kullanılan metotlarda nanopartiköller ile polimer matriks direk olarak karıştırılmaktaydı fakat günümüzde birçok yeni metot ortaya çıkmaktadır. Yüksek mekanik mukavemet sağlamamın dışında fibröz ađ yapısı partiköllerini tutmak için destek yapısı sağlayan BS fiberleri ile nanopatiköllerin çökmesi için reaksiyon haznesi olarak kullanılabilen mikro/nanopor boşluklar sunmaktadır. Vitta ve ark. (2010) Ni-klor hegzahidratın kimyasal redüksiyonu ile oda sıcaklığında Ni partiköllerini tutmak için destek materyali olarak BS kullanmışlardır (Vitta ve Drillon, 2010). Nikel ile yüklenen BS'nin oda sıcaklığında ferromanyetik olduğu bulunmuştur.

2.8.4. Çevre ve Tarım alanlarında BS Uygulamaları

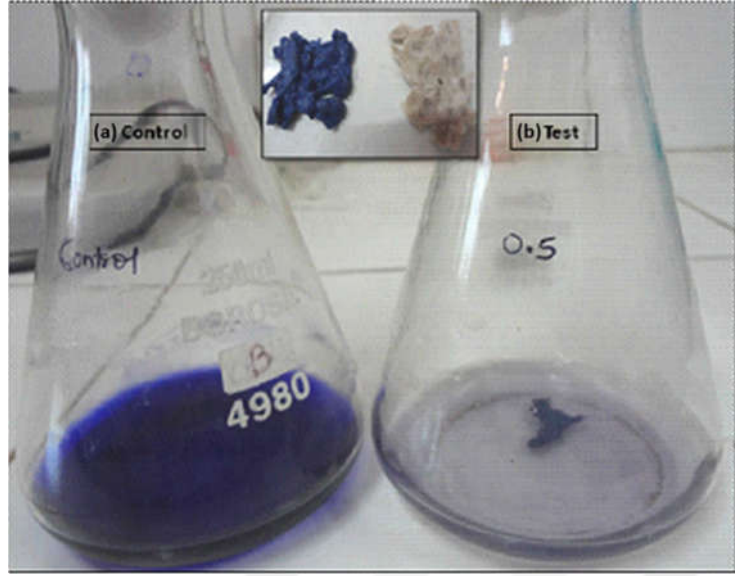
Patel ve Suresh (2008), akrilik bir disk üzerinde BS sentezleyip kesikli ve sürekli sistemde pentaklorofenolün deklorinasyon üzerindeki etkisini incelemişlerdir (Patel ve Suresh, 2008). Nitratlar gibi inorganik kirleticiler de BS-destekli Pd-Cu katalizörü kullanarak azot ve amonyağa indirgenebilir (Sun ve ark., 2010).

2.8.4.1. Boya Giderimi için BS Kullanımı

Boya giderme için adsorban olarak BS kullanılmıştır. Bir azo boya olan anilin mavisi için BS ile boya giderimi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada *Gluconoacetobacter hansenii* tarafından üretilen BS, pH 7'de 10 dakika içinde 100 mg/L konsantrasyonlardaki boyayı % 90'a kadar renksizleştirdiği görülmüştür (Şekil 2.10) (Mohite ve Patil, 2014). Vyjayanthi ve Suresh, (2010), dönen bir katalizör temas reaktöründe drimaren kırmızısı boyasının renksizleştirilmesi için kullanmışlardır ve pH 2'de 25 dakika sonunda 100 mg/L'lik boyanın % 90 oranında giderdiğini rapor etmişlerdir (Vyjayanthi ve Suresh, 2010).

2.8.4.2. Ağır Metallerin Giderimi İçin Bakteriyel Selüloz Kullanımı

BS, civa (Rezaee, Derayat, Mortazavi, Yamini ve Jafarzadeh, 2005), arsenik (Rezaee, Abbas ve Asadikaram, Gholamreza ve Mirzai, Mohammad ve Naimi, Nayera ve Dargahi, Rosa ve Sadegi, 2008), kadmiyum (Min, Xiao-Hui ve De-Zhou, 2011) ve kurşun (Zhu ve ark., 2011) gibi ağır metallerin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Bu uygulamalarda BS'nin etkili bir adsorban olma potansiyeli olduğu belirtmişlerdir. Reed ve ark., (1994) yaptıkları bir çalışmada bakteriyel selülozun civa adsorpsiyonunun oldukça hızlı olduğunu bulmuşlardır ve 10 dakikadan fazla olan işlem süresinin adsorpsiyon hızı üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermişlerdir (Reed ve Arunachalam, 1994). Yapılan başka bir çalışmada arsenik adsorpsiyonu, BS ile arsenik arasındaki kompleks oluşumunun bir sonucu olarak alkal pH aralığında hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (López-Delgado, Pérez ve López, 1998).



Şekil 2. 10. Anilin mavisi boya giderimi; (a) muamele edilmemiş, (b) BS ile muamele edilmiş (Mohite ve Patil, 2014)

BS'nin Pb^{2+} için biyo-adsorpsiyon kapasitesi 132 mg/g olarak belirlenmiştir, bu değer sorbentler için bildirilen değerlerle karşılaştırılabilir bir değerdir (Mohite ve Patil, 2014). BS adsorpsiyon kapasitesi aktif karbon (30 mg/g) (Srivastava, Gupta ve Mohan, 1997), yüksek fırın çamuru (79 mg/g) (Gabriels, 1990) ve yüksek fırın cürufu (40 mg/g) gibi Pb^{2+} için sıklıkla kullanılan adsorbentlerin adsorpsiyon kapasitesinden daha yüksektir. (Wallace, Arthur ve Terry, 1998).

2.8.4.3. Tarım Uygulamaları

Yapılan bazı araştırmalarda toprağa bir biyopolimer uygulanarak toprağın kalitesinde bir artış olduğu görülmüştür. Abdelhak, (2016) bir poliakrilamid-selüloz karışımının su tutma kapasitesi ve geliştirilmiş toprak özelliklerine ilişkin olumlu sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir (Abdelhak, 2016). Selüloz, toprağın maksimum su tutma kapasitesini (MWHC) olumlu yönde etkilemektedir (Patil, Salunke, Patil ve Salunkhe, 2011). Fakat BS'nin kullanımı toprak iyileştirmeleri için uygulanmamıştır.

2.8.5. Kağıt Sanayi Uygulamaları

Bilindiği gibi kağıtlar bir takım prosesler aracılığıyla ağaçlardan elde edilmektedir. Bu prosesler ile ağacın yapısında bulunan lignin ve hemiselüloz selülozdan ayrılmaya çalışılır. Selülozdan lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılma miktarı üretilen kağıdın kalitesini de etkilemektedir. Yani selüloz yüzdesi ne kadar yüksekse üretilen kağıt da o kadar kaliteli

olacaktır. Fakat bu prosesler hem çok yüksek su tüketimi hem de bir takım kimyasalların kullanımını gerektirmektedir. Ayrıca çevreye oldukça zararı vardır.

Yüksek yansıtıcılık, yumuşaklık, hafiflik ve kolay taşınabilirlik, geniş görüş açısı ve saf ve tekdüze doğa gibi BS'nin benzersiz fiziksel ve mekanik özellikleri, elektronik kağıt uygulamalarını ortaya çıkarmıştır (Shah ve Malcolm Brown, 2005). BS kağıtları, gıda endüstrisi, ev dekorasyon ürünleri için biyolojik olarak parçalanabilir ambalajlar olarak kullanılabilir. Statik veya karıştırmalı kültür koşullarından elde edilen BS kağıtlar, aynı özel yağ direnci özelliğine sahiptir ve ambalajlama endüstrisinde kullanılmak üzere faydalı olabilir (Suwannapinunt, Neelobon ve Burakorn, Jirapon ve Thaenthanee, 2007). Basta ve El-Saied ateşe dayanıklı fosfat içeren BS geliştirmişlerdir. Bu modifiye edilmiş BS, spesifik kağıdın hazırlanması için değerli bir üründür, bunun yanında bir dolgu maddesi olarak işlevini yerine getirir (Basta ve El-Saied, 2009).

Mikrobiyal selüloz kağıtlarda bir bağlayıcı olarak araştırılmıştır ve selüloz mikrofibrillerinin son derece küçük kümelerden oluştuğu için, bu özellik kağıda entegre edildiğinde hamurun mukavemetine ve dayanıklılığına büyük ölçüde katkıda bulunur. Japonya'daki Mitsubishi Kağıt Fabrikaları ile birlikte Ajinomoto Co., kağıt ürünleri için mikrobiyal selüloz geliştirmede aktif olarak çalışmaktadır.

2.8.6. Ayırma ve Atık Saflaştırma

BS kompozitleri, bir saflaştırma veya ayırma membranı olarak muazzam bir potansiyel göstermiştir. BS'nin gözenekli membranı, etkili ayırma özelliklerine sahip diğer polimerik malzemelerle birleştirildiğinde ideal bir durum ortaya koyar. BS kompozitleri, ayırma membranları gibi uygulamalar için iyon değişimi özelliklerine sahip akrilik asit (AAc) ile hazırlanmıştır. Ticari membranlarla karşılaştırıldığında, BS-AAc kompozit membranlar gelişmiş elektrokimyasal özelliklere sahiptir ve metal iyonlarıyla bağlanarak ve eser metalleri ayırarak ağır metaller için mükemmel Emilme kabiliyetleri göstermiştir. Biyolojik olarak parçalanabilir malzemelerle BS kompozitlerinin hazırlanması etkili bir stratejidir. İyon değişimi ve ağır metal absorpsiyonu özellikleri ile bu kompozitler atıksu arıtımı ve saflaştırma için etkili bir şekilde kullanılabilir (Choi ve ark., 2004).

Ayırma amacıyla BS membranlarının geliştirilmesiyle afinite kromatografisinde önemli bir uygulama ortaya çıkmıştır. Rasemik karışımlardan arzulanan izomerlerin ayrılması için moleküler olarak damgalanmış polimerler ile BS kompozitleri kullanılabilir.

MIP (Molecularly Imprinted Polymer) nanoparçacıkları, kompozit sentez tekniklerinden herhangi biri vasıtasıyla BS'ye emdirilebilir. Bu BC-MIP kompozitleri, arzulanan enantiyomerleri rasemik bir karışımdan alıp ayırmayı gerçekleştirebilecek çok sayıda bağlanma alanı içerir. Jantarat ve ark. (2008) MIP mikrokürelerini (S-propranolol seçici), moleküler tanıma bölgelerinin kontrollü tahsisi ve kullanılabilirliği ile gözenekli bir BS matrisinde başarıyla sağlamışlardır (Jantarat, Tangthong, Songkro, Martin ve Suedee, 2008). Benzer şekilde başka bir çalışmada, S-propranolol enantiomerinin ayrılması için BS-MIP kompozit membranlar geliştirilmiştir. Kompozitler enantioseçici ayırma için başarıyla kullanılmıştır (Bodhibukkana ve ark., 2006).

2.8.7. Gıda Sanayi

Kimyasal olarak saf selüloz, dolgunlaştırıcı ve stabilize edici ajan olarak işlenmiş gıdalarda kullanılabilir. Gıda endüstrisinde mikrobiyal selülozun ilk kullanımı, Filipinler'de nata de coco'da idi. Mikrobiyal selülozun jel benzeri özellikleri, insan bağırsak yolundaki sindirilemezliği ile birlikte, bunu çekici bir gıda katkı maddesi yapmıştır (Budhiono, Rosidi, Taher ve Iguchi, 1999). 1970'lerde, *Monascus* sp.'nin önemli bir metaboliti olan monacolin K (mevinolin) belirlendi ve kolesterol sentezini inhibe ettiği gösterildi. *Acetobacter xylinum*'dan hazırlanan bakteri selüloz ürünü Nata, Filipinler'de ve diğer ülkelerde popüler bir atıştırmalıktır. Ayrıca, yumuşak dokusu ve yüksek lif içeriği nedeniyle, gıda işleme alanında yaygın olarak kullanılır. Monacolin K ve bakteriyel selülozun fonksiyonel özelliklerini birleştiren *Monascus-nata* kompleksi, potansiyel bir fonksiyonel gıda maddesidir (Ng ve Shyu, 2004; Stephens, Westland ve Neogi, 1990).

1992'de mikrobiyal selüloz Japonya'daki diyet içeceklerine dahil edilmiştir. Asetobakter çay ekstraktında ve şekerde maya ile birlikte yetiştirilmiştir. Bu, gelişmiş sağlık ihtiyaçları için bir kombucha veya Mançurya çayı olarak tüketilir (Chawla ve ark., 2009). Şekil 2.11'de kombucha çayı ve Nata de coco gösterilmiştir.

2.9. Literatür Özeti

Selüloz biyosentezinde karbon kaynağı en önemli proses parametresidir ve selüloz sentezinde en çok; 5 ve 6 karbonlu monosakkaritler, oligosakkaritler, nişasta, alkol ve organik asitler kullanılır. Mono-, di- ve polisakkaritler, alkoller, organik asitlerin kullanıldığı bir çalışmada, karbon kaynağı olarak arabitol ve D-mannitol kullanımında daha fazla BS

üretimi gözlemlenmiştir. Glikoz ile karşılaştırıldığında arabitol kullanımında 6,2 kat, D-mannitol kullanımında ise 3,8 kat daha fazla BS üretilmiştir (Jonas ve Farah, 1998).

Carreira ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada BS üretimi için uygun karbon ve besin kaynağı olarak şarap ve kağıt hamuru sektörünün artıklarını kullanmıştır. Üzüm kabuklarının sulu ekstraktı ve sülfite kağıt hamur likörünü kullanarak 96 saatlik fermentasyon sonunda 20 g/L şekerden sırasıyla 0,6 ve 0,3 g/L BS üretmişlerdir (Carreira ve ark., 2011).

Keshk ve Sameshima (2005), BS üretimine farklı karbon kaynakları etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları bu çalışma sonucunda en yüksek BS üretimi, karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında elde edilmiştir. Bunu sırasıyla glikoz ve fruktoz izlemiştir. Gliserolden yüksek miktarda BS üretilmesi, ortamdaki karbon kaynağının tüketim hızıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. BS üretiminde kullanılan karbon kaynağı çeşidinin selüloz üretiminde tek etken olmadığını, besi yerindeki karbon kaynaklarının tüketim hızının da selüloz üretiminde önemli bir parametre olduğunu gözlemlenmiştir (Keshk ve Sameshima, 2006).

Huang ve ark. (2016), lipid fermentasyon atık suyu ile 25,591 mg/L yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) değeriyle (maya biyokütle ayrıldıktan sonra fermentasyon sıvı kültür ortamı), *Gluconacetobacter xylinus* tarafından BS üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. Beş günlük fermentasyon süresi sonunda en yüksek BS üretimi 0,659 g/L olarak bulunmuştur. *Gluconacetobacter xylinus* suşu fermentasyon sırasında lipid fermentasyon atık suyu içerisinde bulunan monosakkarit ve polisakkaritlerden faydalanabilir (Huang, Guo, Xiong, Wang ve Shi, 2016).

Acetobacter sp. A9 suşunun BS üretiminde fermentasyon koşullarının optimizasyonu için yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak 20 g/L konsantrasyonlarında glikoz, fruktoz, maltoz, şeker, trenaloz, mannitol, arabitol, asetik asit, laktik asit ve süksinik asit kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre en yüksek BS üretimi 2,7 g/L ile glikozlu besi yerinde elde edilmiştir. Glikozu 2,57 g/L ile trenaloz ve 2,53 g/L ile fruktoz izlemiştir.



Şekil 2. 11. Kambucha çayı (sol) ve Nata de coco (sağ)

Ek olarak aynı çalışmada farklı konsantrasyonlardaki glikozun besi yerine eklenmesiyle BS üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve BS üretiminin 40 g/L glikoz konsantrasyonuna kadar arttığı, daha yüksek glikoz konsantrasyonlarında ise substrat inhibisyonu gözlenerek BS üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada besi yeri ortamına % 1,4 (v/v) etanol ilavesinin etanolsüz besi yerine göre BS üretimini yaklaşık 4 kat arttırarak 15,2 g/L'ye çıkardığı gözlemlenmiştir (Son ve ark., 2001).

Hungung ve ark. (2013) *Gluconacetobacter persimmonis* suşu kullanarak ucuz ve ikili karbon kaynakları kullanarak BS üretmeye çalışmışlardır. İkili karbon kaynağı kullanarak yaptıkları çalışmada glikoz, fruktoz, sukroz, maltoz, laktoz, mannitol, inositol ve gliserolü 1:1 şekilde kombine etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda en yüksek BS üretimi 8,79 g/L ile fruktoz ve sukroz kombinasyonunda elde edilmiştir. Yaptıkları diğer çalışmada ise BS üretimi için alternatif ucuz karbon kaynağı olarak farklı meyve suları (karpuz, kavun, domates, portakal içeren), melas, nişasta hidrolizatı ve kokonat sütü kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonunda ise fruktoz-sukroz kombinasyonuna yakın olarak 8,08 g/L BS'i kavunlu meyve suyundan elde etmişlerdir (Hungund ve ark., 2013).

Chao ve ark. (2001) oksijenle zenginleştirilmiş hava beslenmesiyle 50 litrelik bir hava kaldırmalı reaktörde farklı fruktoz konsantrasyonlarında BS üretimini incelemişlerdir. Başlangıç fruktoz konsantrasyonu 30 ile 70 g/L arasında değiştirilerek elde edilen sonuçlara göre en yüksek BS üretim hızı 0,22 g/st olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda 60 g/L fruktoz konsantrasyonunda en yüksek 10 g/L BS üretilmiştir (Chao ve ark., 2001).

Tsouko ve ark. (2015) *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 suşu kullanarak kesikli fermantasyon ile şekerleme atıkları ve biyodizel yan ürünleri ile hazırladıkları fermentasyon ortamında yüksek verimle BS üretmişlerdir. Çalışmada ham

gliserol ve ayçiçeği küspesi hidrolizatı kullanılarak 25 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda 13,3 g/L BS elde edilmiştir (Tsouko, Kourmentza, Ladakis ve Kopsahelis, 2015).

BS'nin fiziksel ve kimyasal yapısında besi yeri ve karbon kaynağına bağlı olarak farklılıklar görülmektedir. Mohammadkazemi ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 suşu ile Hestrin-Schramm, Yamanaka ve Zou besi yerlerinde ve karbon kaynağı olarak glikoz, mannitol, hurma şurubu, sukroz ve gıda saflığında sukroz kullanılmıştır. Çalışma sonucu üretilen selülozlara FE-SEM, XRD ve TGA analizleri uygulanarak BS'nin termal stabilite, kristalinite ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Analizlerden elde edilen sonuçlara göre en yüksek verim mannitol kullanımında sağlanmıştır. Maksimum termal stabilite Hestrin-Schramm besi yerinde mannitol kullanıldığında elde edilmiştir. Bunlara ek olarak Hestrin-Schramm besi yerinde üretilen BS'lerin kristaliniteleri diğer besi yerlerinde üretilen BS'lere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Mohammadkazemi, Azin ve Ashori, 2015).

Poyrazoğlu ve ark. (2011), *Acetobacter lovaniensis* HBB5 suşu kullanarak BS üretimine çeşitli azot ve karbon kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz, mannitol, fruktoz, sukroz ve etanol kullanılırken azot kaynağı olarak maya ekstratı, kazein hidrolizatı ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Karbon kaynakları arasında en yüksek verim glikoz kullanıldığında sağlanırken bunu fruktoz, sukroz ve etanol takip etmiştir. Azot kaynaklarında ise en yüksek verim maya ekstratı ile sağlanmıştır. % 2 glikoz ve % 0,5 maya ekstratı içeren HS besi yerinde 7 gün sonunda 0,040 g/L (kuru ağırlık) BS üretilmiştir (Poyrazoğlu ve Biyik, 2011).

BS üretim verimini kullanılacak mikroorganizma türüne bağlı olarak sıcaklık ve pH gibi fiziksel parametrelerde etkileyebilmektedir. Erbaş ve ark. (2015), *Acetobacter xylinus* 23769 suşu için sıcak su ekstraksiyonu ile kızıl akça ağaçtan elde ettikleri sıvıda sıcaklık (26, 28 ve 30 °C) ve pH'nın (5, 6, 7 ve 8) BS üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. *Acetobacter xylinus* 23769 asidofilik bir bakteri olmasına rağmen 28 °C'de pH 5'de 0,1 g/L BS üretirken pH 8'de 0,15 g/L BS ürettiği gözlemlenmiştir (Erbaş, Kiziltas ve Gardner, 2015).

Aytekin ve ark. (2014), *Gluconacetobacter xylinus* FC01 suşunu kullanarak statik yarı kesikli üretim ile melaslı besi yerinde BS'nin verimliliğini arttırmaya çalışmışlardır.

Yaptıkları bu çalışma sonucunda statik yarı kesikli üretim yöntemiyle 7 günlük fermantasyon süresi sonunda en yüksek 1,637 g/L BS üretmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara göre kesikli proses ile kıyaslandığında melaslı besi yerinde statik yarı kesikli sistemde daha yüksek BS üretimi gözlemlenmiştir (Çakar, Özer, Aytekin ve Şahin, 2014).

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde kullanılan şeker türü, mikroorganizma türü, fermantasyon şekli, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin BS üretimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Yapılacak olan bu çalışmada statik kültür tekniğinde önemli bir problem olan oksijen transfer sorununu, geliştirilecek kademeli kolon statik kültür tekniğiyle giderilip, selüloz veriminin artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada karbon kaynağı olarak ise farklı türden şekerleri içeren şeker pancarı melası kullanılarak BS üretimi gerçekleştirilecektir.

2.10. Şeker Pancarı Melası

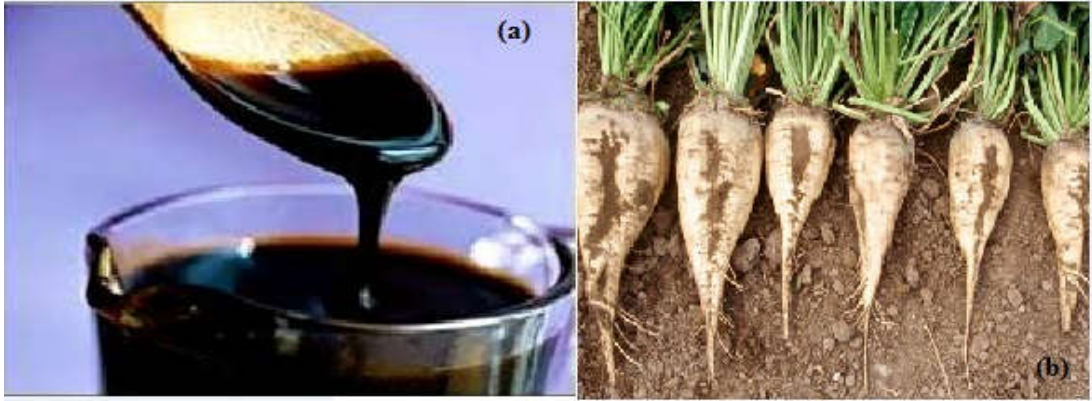
Melas, şeker kamışı ve şeker pancarından şekerin ekstraksiyonu sırasında üretilen koyu renkli, tatlı, şuruplu yan üründür. Melas, kullanılan hammaddenin çeşitliliğine veya şekerin miktarına bağlı olarak renk, tat ve besin içeriği bakımından farklılık gösterebilir (URL-1, 2016). Melas koyu renkli ve kıvamlı bir maddedir ve kuru madde içeriği çeşitli faktörlerden etkilenmesine rağmen ortalama % 77-82 civarındadır ve genellikle % 50 şeker içeriğine sahiptir (URL-2, 2013). Melas, özellikle kalsiyum, magnezyum ve potasyum gibi diğer önemli mineralleri içeriyor olsa da, önemli bir demir içeriğine sahiptir. Bu besin maddelerinin miktarı melasın çeşitliliğine ve melası elde etmek için kullanılan işleme bağlıdır (URL-1, 2016). Melas genellikle organik gübre üretiminde temel hammadde olarak kullanılır. Endüstride kömür sanayinde, toz kömürün taş kömür prosesinde bağlayıcı olarak da kullanımı mevcuttur. Melas, bunların haricinde hayvan yeminde oldukça önemli bir kullanım olanağına sahiptir (URL-3, 2017). Melasın sirke, hamur mayası, ilaç sanayi, inşaat harçları, kozmetik sanayi içilebilir kalitedeki direk damıtılan içkilerde vb. alanlarda kullanımı mevcuttur. Bunun dışında melas sahip olduğu şeker içeriğinden dolayı fermantasyon işlemlerinde ucuz bir hammadde kaynağı olarak son yıllarda önemli ölçüde kullanılmaya başlanmıştır (URL-4, 2017).

Şeker pancarı içeriği su, % 47-60 oranında toplam şeker (sukroz), vitamin, protein, amino asit ve bakır, çinko, demir, magnezyum ve kalsiyum gibi çeşitli ağır metaller vardır

(Göksungur ve Zorlu, 2009). Tablo 2.3’de şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi verilmiştir. Şekil 2.12’de şeker pancarı melası ve şeker pancarı gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. Şeker Pancarı Melası Kimyasal Bileşimi (Keshk, Razek ve Sameshima, 2006; Yılmaztekin, 2009)

Parametre	Bileşim
Briks (Toplam çözünmüş madde) (%)	80-83
Toplam Şeker (%)	48-57
İndirgen Şeker (%)	0,1-2,7
Kurumadde (%)	73-79
Kül (%)	8-10
Fosfor (%)	0,05-0,3
Kalsiyum (%)	0,2-0,5
Sodyum (%)	1
Potasyum (%)	3-5
Sülfür (%)	0.5
Protein (%)	11-12
Özgül ağırlık	1,4
pH	5-7



Şekil 2. 12. Şeker pancarı melası (a) ve şeker pancarı (b)

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Mikroorganizma ve Kültür Ortamı

Çalışmada kapsamından kullanılacak olan liyofilize haldeki *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu ARS kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak melas Elazığ Şeker Fabrikasından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan melasın özellikleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar glikoz (Tekkim), maya ekstratı (CHEMSOLUTE), pepton (LABM), sitrik asit (Tekkim), asetik asit (Merck), NaOH (Tekkim), gliserol (Merck), Na₂HPO₄ (Tekkim), asetik asit (Merck), sukroz (Carlo Erba), fruktoz (Carlo Erba),

Çalışmalarda kullanılan cihazlar santrifüj (NÜVE), etüv (NÜVE), inkübatör (Termal), vorteks (VELP), otoklav (LAB Companion), pH metre (Thermo), hassas terazi (BEL), HPLC (Shimadzu), laminar flow kabin (Bilser), -80 °C dolabı (NuAire)’dir.

3.2. Besi yerinin Hazırlanması, Suşun Canlandırılması ve Saklanması

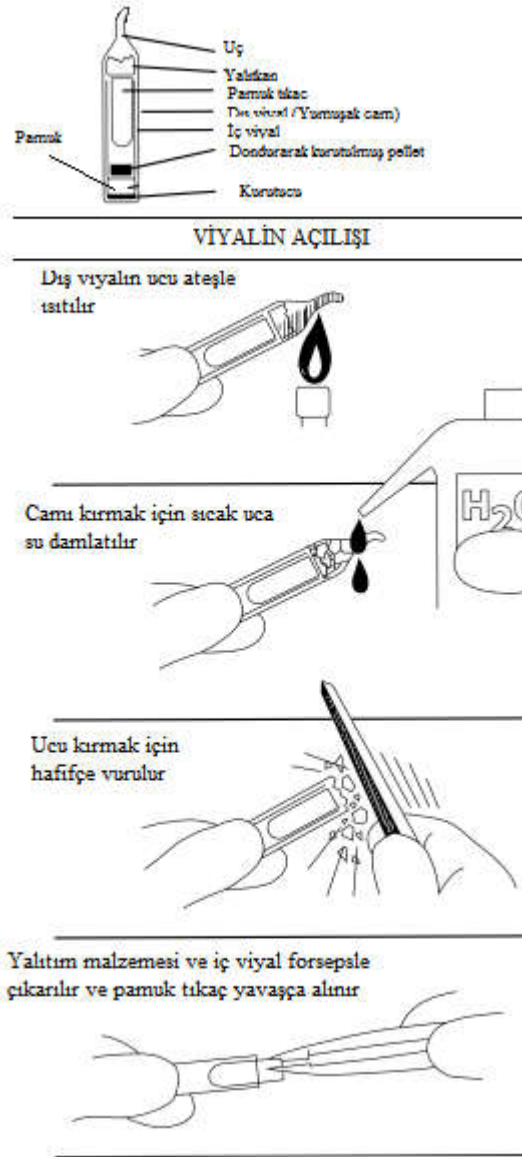
Liyofilize haldeki *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşun canlandırılması ve stok kültürünün yapılması için literatürde sıkça kullanılan Hestrin & Schramm besiyeri (HS besiyeri) tercih edilmiştir. Liyofilize haldeki suşun viyalden çıkarılma basamakları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

HS besiyerinin içeriği ağırlık/hacimce % 2 glikoz, % 0,5 pepton, % 0,5 maya ekstratı, % 0,27 Na₂HPO₄, % 0,15 sitrik asit olup distile su ile besiyeri hazırlandıktan sonra *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu için pH 5’e 1 N asetik asit çözeltisi ile ayarlanmıştır. Hazırlanan bu besiyeri daha sonra 121 °C’de 15 dk boyunca otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril besiyerinden 250 ml’lik bir erlene 50 ml alınarak liyofilize haldeki *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu içerisine steril şartlar altında ekilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra kültür 7 gün boyunca 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda besiyerinde selüloz oluşumu gözlemlenmiştir. Selüloz oluşumu gözlemlendikten sonra bu kültürün % 60’lık steril gliserol çözeltisiyle stok kültürü

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan şeker pancarı melasının özellikleri

Parametre	Değer
Toplam Katı Madde	% 78,90
Toplam Şeker İçeriği	% 50,82
Toplam Çözünmüş Katı Madde	% 60,6
pH	8,1

yapılmıştır. Eppendorf tüplere 100 µl kültürden koyulduktan sonra üzerine hazırlanan gliserolden 1000 µl yavaşça ilave edilip -80 °C’de saklanmaya bırakılmıştır. Elde edilen bu stoklar daha sonraki selüloz üretim çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Liyofilize *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşunun viyalden çıkarılması

Statik ve Kademeli kolon statik kültür çalışmalarında kullanılacak olan şeker pancarı melası besi yerlerinden 200 g/L şeker içeriğine sahip melas stok çözeltileri hazırlanmış ve pH 5'e ayarlanarak steril hale getirilmiştir.

3.3. Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi

Fermantasyon çalışmalarından önce fermantasyon süresinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan stoklardan biri, içerisinde 10 ml HS besi yeri bulunan 50 ml'lik erlene ekilmiştir ve statik kültürde 30 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Daha sonra içinde 18 ml taze besi yeri bulunan başka bir erlene önceki kültürden 2 ml ekim yapılmış ve yine aynı koşullarda 3 gün daha bekletilmiştir. Bu işlemlerin sonunda HS besi yerinde kontrollü 10 set ile fermantasyon süresi belirleme çalışması yapılmıştır. İçerisinde 45 ml HS besi yeri bulunan 250'lik erlene 5 ml son kültürden ekim yapılarak statik kültürde 30 °C'de 20 gün boyunca kültürdeki şeker tüketimi ve selüloz oluşumu incelenmiştir. Bunun için belirli zaman aralıklarında kültürlerden örnekler alınarak şeker analizi ve oluşan selüloz miktarı belirlenerek bu işlemler sonucunda kademeli kolon sistemi için gerekli kademeler arası geçiş süresi belirlenmiştir. Kademeler arası geçiş süresi belirlendikten sonra stok melas çözeltisi 20-120 g/L şeker konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Ayrıca 20 gün boyunca HS besi yerinde meydana gelen pH değişimleri de incelenmiştir.

3.4. Melastaki Şeker Konsantrasyonunun Üretime Etkisinin Araştırılması

Melastaki şeker konsantrasyonunun *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu üzerindeki substrat inhibisyonunu araştırmak üzere 20-120 g/L şeker içeriğine sahip melas çözeltileriyle 250 ml'lik erlenlerde 50 ml'lik besi yeri hacminde % 10 inokülasyon yapılarak fermantasyon süresi belirleme çalışmalarında elde edilen optimum sürede BS üretimi incelenmiştir.

3.5. Optimizasyon Çalışmaları

Fermantasyon koşulların optimizasyonunun sağlanması amacıyla önemli istatistiksel özelliklere sahip merkezi birleşik tasarım (Central Composite Design) uygulanmıştır. Design Expert programı yardımıyla elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapılmıştır. Çalışma koşullarını optimize etmek amacıyla inokülasyon miktarı (% 5-15), kültür hacmi (100-250 ml) ve melastaki şeker konsantrasyonu (20-120 g/L) için RSM analizi yapılmıştır. RSM şartları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. Optimizasyon için RSM deney şartları

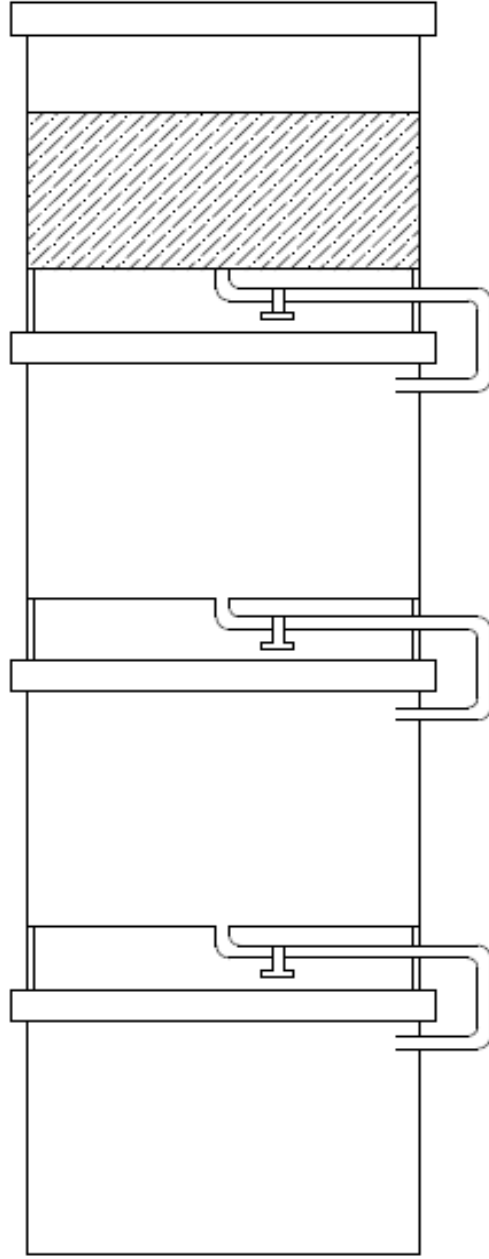
Örnek Adı	Şeker konsantrasyonu(g/L)	% İnokülasyon	Kültür hacmi (ml)
1	40	7	130
2	100	7	130
3	40	13	130
4	100	13	130
5	40	7	220
6	100	7	220
7	40	13	220
8	100	13	220
9	20	10	175
10	120	10	175
11	70	5	175
12	70	15	175
13	70	10	100
14	70	10	250
15	70	10	175
16	70	10	175
17	70	10	175
18	70	10	175
19	70	10	175
20	70	10	175

3.6. Kademeli Kolon Statik Kültür Çalışmaları

Bu çalışmada statik kültür ile BS üretiminde önemli bir yeri olan oksijen transferi sorununun önüne geçmek amacıyla bir kademeli kolon statik kültür (KKSK) sistemi tasarlanmıştır. Optimum fermantasyon süresi, RSM analizi ve substrat inhibisyonuna sebep olan şeker konsantrasyonları belirlendikten sonra KKSK ile BS üretim çalışmaları yapılmıştır. KKSK sistemin çalışmaları kademeler arası geçiş süresi 10 gün, inokülasyon miktarı % 15, 500 ml kültür hacmi, 30 °C’de ve pH 5’de 20-100 g/L şeker içeriğine sahip melaslı besi yerlerinde yapılmıştır. 10 gün sonunda kademeler arası geçiş vanalar yardımıyla sağlanmıştır. Tasarlanan sistemle geleneksel statik kültürün karşılaştırılması amacıyla aynı koşullarda statik kültür çalışmaları yürütülmüştür. Tasarlanan KKSK sistemi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

3.7. Bakteriyel Selülozların Safılaştırılması ve Kurutulması

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen BS’ler kültür ortamından ayrıldıktan sonra distile su yıkanmış ve daha sonra 4100 rpm’de 15 dk boyunca santrifüjlenerek selüloz içerisindeki besi yeri kalıntılarının ve hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Santrifüjlenen selüloz örnekleri 0,1 N NaOH ile 90 °C’de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda selüloz 0,1 N asetik asitle nötrleştirilip iyice yıkanmıştır.



Şekil 3. 2. Kademeli kolon statik kültür sistemi

BS örnekleri daha sonra 70 °C’de ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmaya bırakılmıştır.

3.8. Şeker Analizi

Kademeler arası geçiş süresini belirlemek için HS besi yeri ile yapılan fermantasyon süresi belirleme çalışmaları sonrasında şeker analizi Shimadzu LC-20 A marka HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler ICE-COREGEL-87H3 kolon (300 mm uzunluk, 7.8 mm çap, 20,0 ul hacim) kullanılarak, kolon sıcaklığı 45 °C’de 0,600 ml/dk akış hızıyla ve mobil

faz olarak 0,05 M'lık H₂SO₄ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek örnekler içerisindeki partiküllerin ve hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla kültürden alınan örnekler önce 10000 rpm'de santrifüjlenmiş daha sonra 0,22 mikronluk şırınga filtrelerinden geçirilmiştir. Örnekler bu işlemler uygulandıktan sonra HPLC analizi için uygun hale gelmiştir. Standart eğrileri % 100 saf sakkaroz, glikoz ve fruktoz çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Sonuçlar standart çözeltilerin kalibrasyon eğrilerine göre enstrümantal olarak hesaplanmıştır.

3.9. Bakteriyel Selülozun Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

Deneyler sonucunda üretilen bakteriyel selülozların karakteristik ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla XRD, TGA, SEM, FTIR ve mekanik çekme testi yaptırılmış ve su tutma kapasiteleri hesaplanmıştır.

3.9.1. Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Bakteriyel selüloz örneklerin su tutma kapasiteleri sallama (shake) metodu kullanılarak ölçülmüştür (Schrecker ve Gostomski, 2005). BS örnekleri pens kullanarak saklama kabından çıkarılarak aşırı yüzey suyunu gidermek için iki kez sallanmıştır ve daha sonra tartılmıştır. Tartılan BS örnekleri daha 70 °C'de ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmuştur. BS örnekleri kurutulduktan sonra su tutma kapasitesi aşağıdaki formül kullanarak hesaplanmıştır;

$$\text{Su Tutma Kapasitesi} = \frac{\text{Kuruma sırasında giderilen su kütlesi (g)}}{\text{Bakteriyel selülözün kuru ağırlığı (g)}} \quad (1)$$

3.9.2. FTIR analizi

Bakteriyel selülozun fonksiyonel gruplarını belirlemek için yapılan FTIR analizleri, ATI Unicam Mattson 1000 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Absorpsiyon modunda, 4000-400 cm⁻¹ frekans aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlük ile numune başına toplam 50 kümülatif tarama yapılmıştır.

3.9.3. X-Işınları Kırınımı (XRD)

Bakteriyel selüloz örneklerinin kristalinite indeksini belirlemek için elde edilen örnekler XRD analizine tabi tutulmuştur. Analizler ODTÜ Merlab'da yaptırılmıştır. XRD analizleri, 45 kV voltaj ve 40 mA elektrik akımı ile çalıştırılan bir Ni ile filtrelenmiş CuK α

(1.540562Å) radyasyon kaynağına sahip yüksek çözünürlüklü X-ışını kırınım ölçeri ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler tarama aralığı 5-70°, tarama hızı 2 derece/dakika ve grazing açısı 0.016° koşullarında yürütülmüştür. Kristalinite indeksi (Cr.I) ve yüzde kristalinite aşağıdaki denklem ile belirlenmiştir;

$$Cr. I = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad (2)$$

Burada I_{200} , 2θ'da yaklaşık 22 ° 'de zirve toplam yoğunluğudur ve I_{am} , 2θ'da yaklaşık 18 ° 'de taban çizgisinin yoğunluğudur.

3.9.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Deneyler sonucunda elde edilen bakteriyel selülozlar kurutulduktan sonra TGA ölçümleri yaklaşık 10 mg örnekler alınarak 20 ml/dk azot akış hızıyla 10 °C/dk ısıtma hızında 25-950 °C aralığında Perkin Elmer Pyris 1 cihazı kullanılarak ODTÜ Merlab'da yaptırılmıştır.

3.9.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Üretilen BS örnekleri liflerinin morfolojisi ve mikro yapısı çalışması için SEM analizi yapılmıştır. İncelemeden önce numuneler 15-20 mm kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. Örnekler Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan JEOL JSM -7001F marka taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.9.6. Çekme Testi

Bakteriyel selülozun mekanik özellikleri Universal Test Makinası (Zwick UTM-ZW) kullanılarak ODTÜ Merlab'da yaptırılmıştır. Kurutulan BS örnekleri iki taraftan kelepçelenerek 0.1 N/dk kuvvetle çekme deneyine tabi tutulmuştur. Daha sonra gerilme ve uzama formülleri kullanılarak Young modülleri hesaplanmıştır.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4)$$

Burada σ gerilmeyi, F uygulanan kuvveti, A kuvvet uygulanan kesit alanı temsil etmektedir.

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (5)$$

Burada ε uzamayı, ΔL uzama miktarını, L_0 başlangıç uzunluğunu temsil etmektedir.
Young modülü;

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (6)$$

formülü ile hesaplanmıştır.

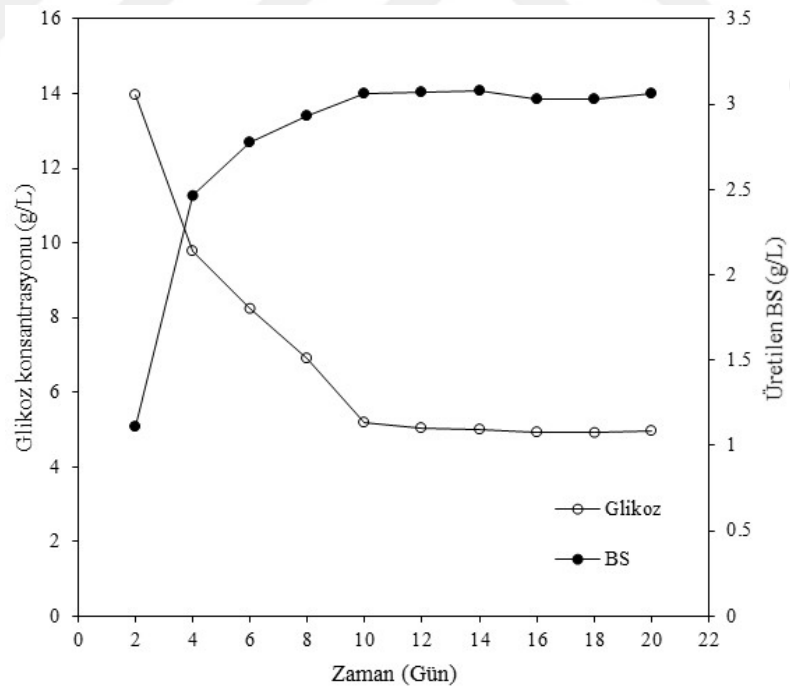


4. BULGULAR ve TARTIŞMA

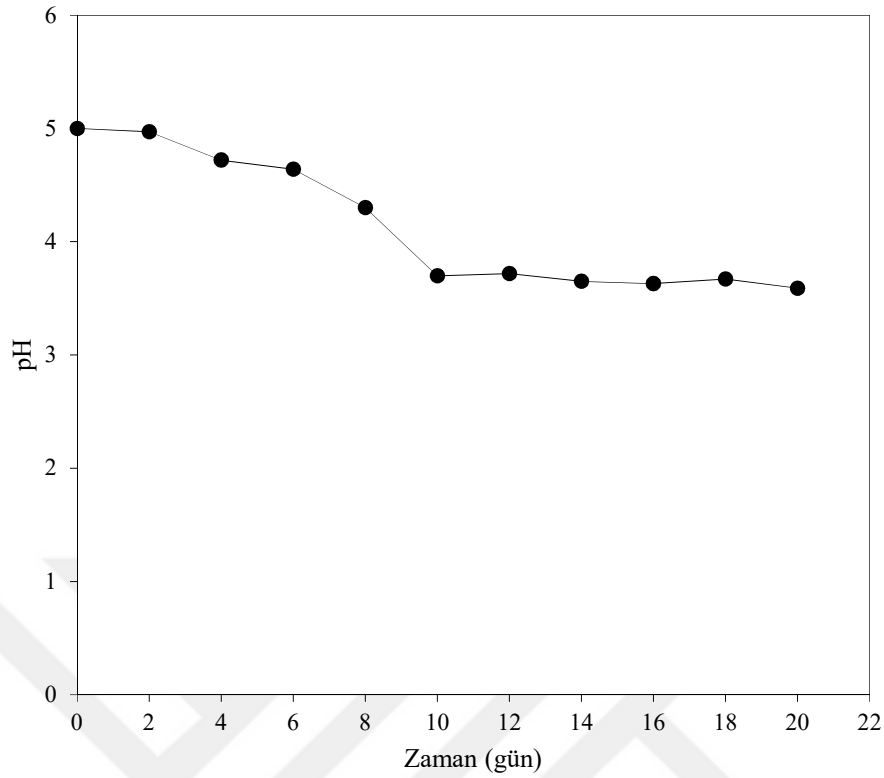
4.1. Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi

HS besi yeri kullanılarak yapılan fermantasyon süresi belirleme çalışmaları statik kültürde 30 °C’de yürütülmüştür. Bu amaçla 20 gün boyunca 2 günde bir üretilen BS ve tüketilen glikoz miktarı ölçülmüştür. Bu süreler sonunda zamanla oluşan BS ve tükenen glikoz konsantrasyon değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi 10. güne kadar BS üretimi artarak 3,07 g/L’ye ulaşmıştır ve sonraki günlerde BS miktarında bir değişim gözlemlenmemiştir. Glikoz tüketimine bakıldığında aynı şekilde 10. güne kadar besi yeri içerisindeki glikoz miktarının yaklaşık olarak 5 g/L’ye kadar düştüğü sonraki günlerde glikoz tüketiminin çok fazla değişmediği görülmektedir. 20 günlük kültür süresi boyunca HS besi yerinin pH değerindeki değişim incelenmiş ve Şekil 4.2’deki grafik elde edilmiştir.



Şekil 4. 1. HS besi yerinde zamanla oluşan BS ve tükenen glikoz konsantrasyonları



Şekil 4. 2. Zamanla HS besi yerinin pH'ında meydana gelen değişim

Şekil 4.2'ye bakıldığında başlangıç pH değeri 5 olan HS besi yerinde zamanla pH 3,5 seviyelerine düştüğü görülmektedir. BS üretiminde karbon kaynağı olarak glikoz kullanımında yan ürün olarak glukonik asit oluştuğu bilinmektedir (Kongruang, 2008). Oluşan glukonik asit besi yeri pH değerini düşürerek mikroorganizmanın selüloz üretimini engellediği bilinmektedir. Glukonik asit oluşumu da 10 günden sonra BS oluşumunu durdurarak daha az verim elde edilmesine sebep olmuştur. pH düşmesi ile azalan BS veriminin bir sebebinin de statik kültürde besi yeri ortamının yüzeyinde meydana gelen BS tabakasının hava transferini engellemesi olduğu düşünülmektedir (Shirai ve ark., 1994). Melaslı besi yeriyle yapılacak olan kademeli kolon statik kültür çalışmalarında kademeler arası geçişin 10 günde bir yapılması bu veriler ışığında uygun bulunmuştur. Şekil 4.3'de HS besi yerinde üretilen ıslak halde BS örneği gösterilmiştir.

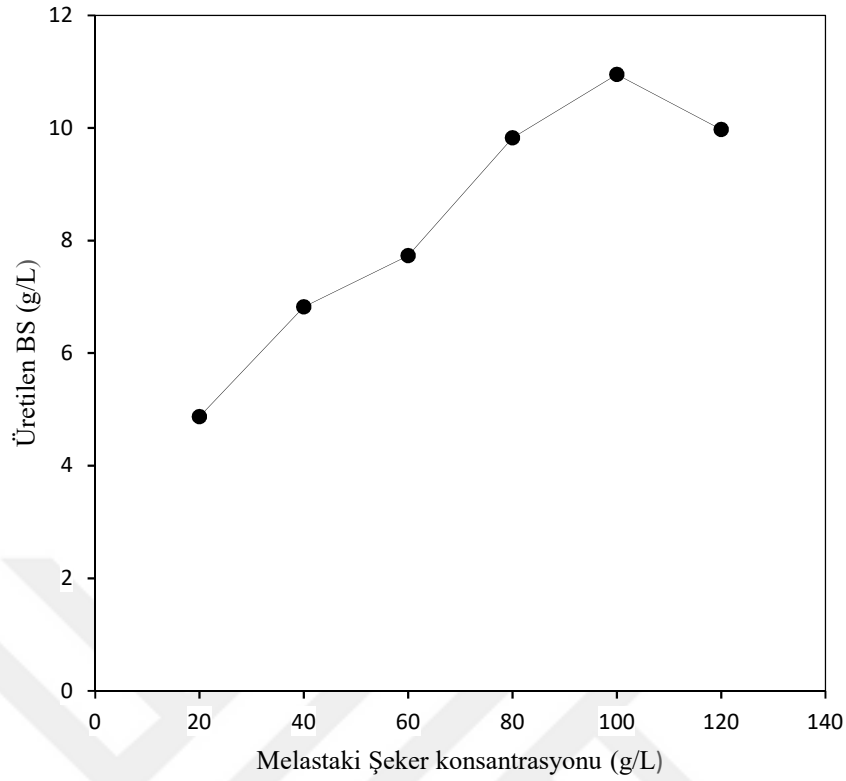


Şekil 4. 3. HS besi yerinde üretilmiş ıslak haldeki BS örneği

4.2. Melastaki Şeker Konsantrasyonunun Üretime Etkisi

Çok yüksek substrat konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerinde inhibisyona sebep olduğu bilinmektedir. *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun substrat inhibisyonuna maruz kaldığı konsantrasyonu belirlemek için 20-120 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melas çözeltileriyle hazırlanan besi yerlerinde 250 ml’lik erlenlerde 10 günlük kültür süresi sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.4’de gösterilmiştir

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi 20-120 g/L şeker konsantrasyonlarında hazırlanan melaslı besi yerlerinde *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun 100 g/L şeker konsantrasyonuna kadar sürekli olarak BS üretimini devam ettirdiği görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonda ise suşun substrat inhibisyonuna uğradığı görülmektedir. Bu nedenle kademeli kolon statik kültür çalışmalarında 20-100 g/L şeker içeriğine sahip melaslı besi yerinin kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 4. 4. Melastaki şeker konsantrasyonunun selüloz üretimine etkisi

4.3. Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada BS üretimi üzerine önemli etkileri olan parametrelerin incelenmesi için önemli istatistiksel özelliklere sahip merkezi birleşik tasarım (Central Composite Design) uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler kullanılarak Design Expert programı ve RSM ile istatistiksel analizler yapıp bir optimizasyon modeli ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Optimizasyon kapsamında inokülasyon miktarı (% 5- 15) melastaki şeker konsantrasyonu (20-120 g/L) ve kültür hacmi (100-250 ml) parametrelili araştırılmıştır. Bu parametreler için kültür süresi fermantasyon süresi belirleme çalışmalarında belirlendiği gibi 10 gün olarak seçilmiştir. Programın vermiş olduğu deneyler ve bu deneylerde elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

İstatistiksel modelin uyum derecesi belirtme katsayısı (R) ve çoklu korelasyon katsayısına (R^2) bakılarak değerlendirilir. Çoklu korelasyon katsayısı değeri 1’e ne kadar yakın ise model değerleri ve deneysel değerler arasındaki ilişki o kadar iyidir. İstatistiksel analiz sonucu öngörülen modelin R^2 değeri 0,938’dir. Bu değer modelin öngördüğü değerler ile deneysel verilerin uyumunu ifade eder. Modele eklenen bağımsız değişkenlerin her biri R^2 değerinin artmasına neden olabilir. Bu durum da modelin açıklayıcılığının daha iyi ifade

Tablo 4. 1. Optimizasyon çalışmalarının sonucu elde edilen veriler

Deney No	Şeker konsantrasyonu (g/L)	% İnokülasyon	Kültür hacmi	Tartılan BS (g)	BS (g/L)	Verim (%)
1	40	7	130	0,377	2,90	7,25
2	100	7	130	0,453	3,48	3,48
3	40	13	130	0,45	3,46	8,65
4	100	13	130	0,461	3,55	3,55
5	40	7	220	0,435	1,98	4,94
6	100	7	220	0,652	2,96	2,96
7	40	13	220	0,525	2,39	5,97
8	100	13	220	1,344	6,11	6,11
9	20	10	175	0,298	1,70	8,51
10	120	10	175	0,685	3,91	3,26
11	70	5	175	0,311	1,78	2,54
12	70	15	175	0,48	2,74	3,92
13	70	10	100	0,543	5,43	7,76
14	70	10	250	0,41	1,64	2,34
15	70	10	175	0,38	2,17	3,10
16	70	10	175	0,391	2,23	3,19
17	70	10	175	0,38	2,17	3,10
18	70	10	175	0,383	2,19	3,13
19	70	10	175	0,387	2,21	3,16
20	70	10	175	0,385	2,20	3,14

edilmesi anlamına gelebilir. Sonuçta kullanılan modele katkısı olmayan değişkenler de dikkate alınarak düzeltilmiş R^2 (Adj. R^2) olarak adlandırılan daha gerçekçi bir R^2 değeri hesaplanır. R^2 değeri 0,938 iken düzeltilmiş R^2 değeri 0,89'dur. RSM ile hesaplanan istatistiksel değerler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Yeterli kesinlik değeri (Adeq. precision) sinyal gürültü oranını temsil etmektedir. Bu değerin 4'ün üstünde olması çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı (12,3534) yeterli sinyale işaret etmektedir. Kodlanmış değerler cinsinden belirlenen son kuadratik model denklemi aşağıda gösterilmiştir. Bu denklemde bağımsız değişkenlerin işaretleri ve katsayısı BS verimini etkileme ölçüsü olarak kabul edilir. Buna göre konsantrasyon ve hacim etkileşimi (AC) kuadratik denklemi en çok etkileyen parametredir. Tablo 4.3'de RSM ile hesaplanan istatistiksel değerler verilmiştir.

$$\text{BS verimi (\%)} = (3,13566) + (-1,3277 \times A) + (0,79697 \times B) + (-1,0219 \times C) + (1,305 \times A \times C) + (0,5775 \times B \times C) + (1,0074 \times A^2) + (0,06872 \times B^2) + (0,71395 \times C^2)$$

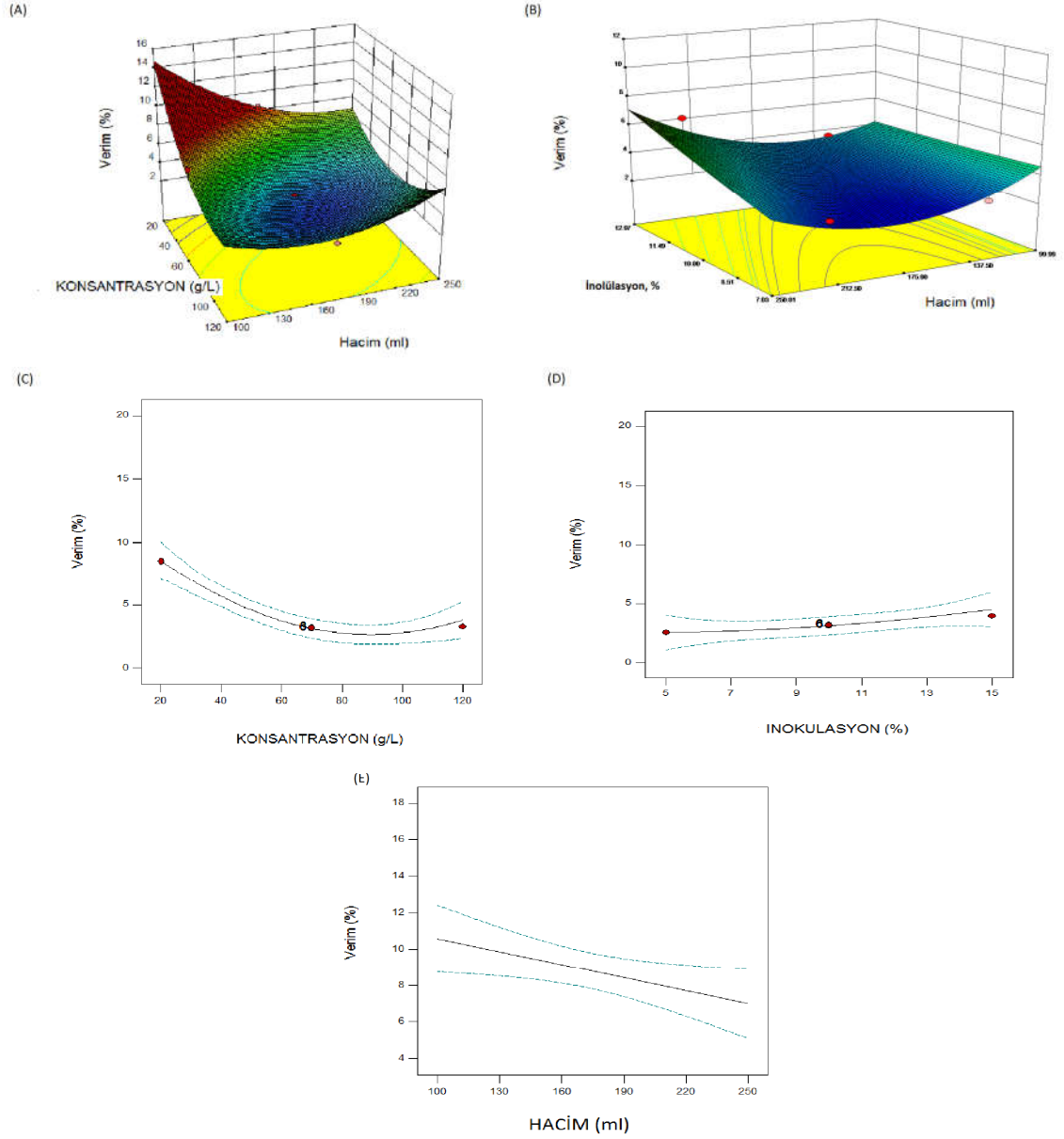
Tablo 4. 2. Modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel verileri

Standart sapma	0,70728	R^2	0,93819
Ortalama	4,358	Adj R^2	0,89324
C.V. %	16,2295	Pred R^2	0,64268
Press	31,8112	Adeq. Precision	12,3534

Tablo 4. 3. İncelenen bağımsız değişkenler ve birbirleriyle etkileşiminin BS üretimine etkileri

Kaynak	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F
Model	83,52	10,44	20,87	< 0,0001
A- Konsantrasyon (g/L)	24,08	24,08	48,13	< 0,0001
B- İnokülasyon (% v/v)	8,67	8,67	17,34	0,0016
C- Hacim (ml)	14,26	14,26	28,51	0,0002
AC	13,62	13,62	27,23	0,0003
BC	2,67	2,67	5,33	0,0413
A ²	14,63	14,63	29,24	0,0002
B ²	0,07	0,07	0,14	0,7193
C ²	7,35	7,35	14,68	0,0028

Modelin F değerinin 20,87 olması modelin önemli olduğunun bir göstergesidir. Prob>F değeri 0,05'den küçük olan değerler BS üretiminde önemli olan parametreleri ifade etmektedir. F değerinin 0,1'den büyük olduğu parametrelerde model için önemsiz olarak değerlendirilmektedir. Buna göre Prob>F değeri 0,0001'den küçük olan şeker konsantrasyonu (A), 0,0016 olan inokülasyon miktarı (B), 0,0002 olan kültür hacmi (C), 0,0003 olan melastaki şeker konsantrasyonu-kültür hacmi (AC), 0,0413 olan inokülasyon miktarı-kültür hacmi (BC), 0,0002 değer sahip A² ve 0,0028 değere sahip C² BS verimi üzerine etkilidir. B² ifadesi için hesaplanan Prob>F değeri ise 0,1'den oldukça yüksek çıktığından bu değer etkili olmadığı söylenebilir. Şekil 4.5'de BS verimi üzerine etkisi olan parametrelerin grafikleri verilmiştir. BS verimine şeker konsantrasyonunun etkisinin gösterildiği grafikte (C), şeker konsantrasyonundaki artışının verimi azalttığını göstermektedir. İnokülasyon miktarının BS üzerine etkisinin gösterildiği grafikte (D) ise inokülasyon miktarının artmasıyla veriminde arttığı görülmektedir. Kültür hacminin BS üretimine etkisinin gösterildiği grafikte de (E) hacmin artmasıyla BS veriminin azaldığı görülmektedir. Fakat Tablo 4.1'de 1, 3 ve 5 nolu deney sonuçları incelendiğinde aynı şeker konsantrasyonu ve kültür hacminde inokülasyon miktarı artarsa kültürden elde edilen BS miktarı, konsantrasyonu ve verimin arttığı sonucuna varılır. Aynı şeker konsantrasyonu ve aynı inokülasyon miktarında kültür hacmi arttığında üretilen BS miktarı artar fakat üretilen BS konsantrasyonu ve verim azalır. Dolayısıyla küçük kültür hacminde çalışarak daha yüksek verim elde edilir. Fakat ölçek büyütme göz önüne alındığında küçük hacimlerde statik kültür tekniğiyle çalışmak oldukça fazla alan ihtiyacı doğuracaktır. Bu da statik kültür tekniği için önemli bir dezavantajdır. Bu yüzden daha yüksek bir hacimde verimini arttırmaya çalışmak önemlidir.



Şekil 4. 5. BS verimi üzerine şeker konsantrasyonu ve kültür hacmin etkisi (A), BS verimi üzerine inokülasyon miktarı ve kültür hacminin etkisi (B), BS verimi üzerine şeker konsantrasyonunun etkisi (C), BS verimi üzerine inokülasyonun etkisi (D) ve BS verimi üzerine kültür hacminin etkisi (E)

Yapılan optimizasyon çalışmaları sırasında kullanılan program sınır şartlarında çalışarak daha yüksek bir verim elde edileceğini göstermiştir. Programın verdiği doğrulama deneyi sonucu Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4. 4. Doğrulama deneyi sonucu

Şeker Konsantrasyonu (g/L)	İnokülasyon Miktarı (%)	Kültür Hacmi	Beklenen Verim (%)	Elde edilen Verim (%)	Yaklaşma (%)
120	15	250	10,91	8,2	75,16

Bu doğrulama deneyinin amacı optimizasyon çalışmalarında elde edilen verilerin doğruluğunu kontrol etmek içindir. Tablo 4.4’de görüldüğü gibi programın sınır şartların beklediği BS verimi % 10,91’dir. Fakat elde edilen verim % 8,2 olarak bulunmuştur. Bu değerin beklenen değere çok yakın olmadığı görülmektedir. *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun substrat inhibisyonuna uğradığı konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışma incelendiğinde, 100 g/L şeker konsantrasyonundan sonra *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun substrat inhibisyonuna uğradığı görülmektedir (Şekil 4.4). Bu nedenle Tablo 4.4’de verilen kültür koşullarında beklenen verime ulaşamaması normal bir durumdur. Çünkü bu konsantrasyonda mikroorganizma inhibisyona uğramış ve daha düşük bir verimde BS üretimi gerçekleştirmiştir.

4.4. Kademeli Kolon Statik Kültür (KKSK) Çalışmaları

Aerobik koşullar altında zamanla besi yeri hava ara yüzeyinde oluşan bakteriyel selülozun oksijen transferini engellemesi ve mikroorganizmanın havasız kalarak karbon kaynağını tam olarak tüketemeden BS üretimin durmasıyla sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla statik kültür tekniğinde verimin düşük olması kaçınılmaz hale gelmektedir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada kademeli bir sistem ile problemin önüne geçerek verimin geleneksel statik kültür tekniğine göre arttırılması amaçlanmıştır.

Deneyler kapsamında yapılan fermantasyon süresi belirleme çalışmaları, *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun substrat inhibisyonuna uğradığı şeker konsantrasyonun belirlenmesi ve istatistiksel optimizasyon çalışmaları neticesinde tasarlanan kademeli kolon statik kültür sistemi için gerekli şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda 20-100 g/L şeker içeriğine sahip melas çözeltisi ile % 15 inokülasyon ve 500 ml kültür hacminde KKSK sisteminde çalışmalar yapılmıştır. Kademeler arası geçiş süresi 10 gün olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında kültür hacmi maksimum 250 ml seçilmesine rağmen KKSK sistemiyle yapılan çalışmalarda kültür hacminin 500 ml’ye çıkarılması uygun bulunmuştur. Bunun amacı tasarlanan KKSK sisteminin etkinliğini arttırmaktır. Tablo 4.5’de KKSK sisteminin farklı kademelerinde üretilen BS miktarları gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. KKSK sisteminde üretilen BS miktarları

Şeker Kons. (g/L)	1.Kademede üretilen BS (g)	2.Kademede üretilen BS (g)	3.Kademede üretilen BS (g)	4.Kademede üretilen BS (g)	Toplam (g)	Verim (g/g)
20	0,697	0,050	0	0	0,747	0,0747
40	1,171	0,114	0	0	1,285	0,06425
60	1,432	1,165	0,282	0	2,879	0,096
80	1,612	1,815	0,791	0	4,218	0,10545
100	1,920	1,970	0,9023	0,335	5,127	0,10254

Tablo 4.5’de verilen değerler 500 ml’lik kültür ortamında elde edilen bakteriyel selülozların kurutulduktan sonraki ağırlıklarıdır. 20 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde KKSK sisteminde yalnızca iki kademe üretim gerçekleşmiştir. 20 g/L şeker konsantrasyonunda elde edilen toplam 0,747 g BS 0,697 g gibi çok büyük bir kısmı 1. kademede üretilirken sadece 0,05 gramı 2. kademede üretilmiştir. 40 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde üretilen BS miktarları incelendiğinde durum 20 g/L şeker konsantrasyonuna sahip besi yerindeki durumdan çok farklı değildir. Bu konsantrasyonda da üretilen toplam 1,285 g BS 1,171 g’ı 1. kademede üretilmiştir. 60 ve 80 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerlerinde 3 kademede selüloz üretimi gözlemlenmiştir. 60 g/L şeker konsantrasyonuna bakıldığında sırasıyla 1. kademede 1,432 g, 2. kademede 1,165 g ve 3. kademede 0,282 g BS oluşumu mevcuttur. Bu konsantrasyonda kademeler arası geçişlerde selüloz üretimi sürekli düşmüştür. 1 ve 2. kademeler arasında üretilen BS miktarındaki düşüş 2 ve 3. kademedekinden azdır. 80 g/L şeker konsantrasyonunda ise son kademede diğer konsantrasyonlardaki besi yerlerine kıyasla daha yüksek BS üretimi gözlemlenmiştir. Bu konsantrasyonda toplam 4,218 g BS elde edilmiştir. 4 kademe üretiminde gerçekleştiği 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde 1. kademede 1,92 g, 2. kademede 1,97 g, 3. kademede 0,9023 g ve 4. kademede 0,335 g olmak üzere toplamda 5,17 g BS elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda 4. kademe sonunda kültür kabında neredeyse hiç sıvı besi yeri kalmadığından çalışma bu basamakta sonlandırılmıştır. Görüldüğü gibi şeker konsantrasyonunun artmasıyla BS’nin üretildiği kademe sayısı da artmıştır. Verim değerleri incelendiğinde 100 g/L şeker konsantrasyonunda verimin artmadığı görülmektedir. Bunun sebebinin substrat inhibisyonu olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.6’da KKSK sisteminin bir kademesinde üretilen BS gösterilmektedir.



Şekil 4. 6. KKSK sisteminin bir kademesinde üretilen BS

Tasarlanan KKSK sistemi ile geleneksel statik kültür tekniğini karşılaştırmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda yapılan çalışmalar elde edilen BS miktarlarını gösteren veriler Tablo 4.6’de verilmiştir.

KKSK sisteminden 20 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde geleneksel statik kültürde 1,487 g/L selüloz üretilirken KKSK sisteminde % 0.47 gibi çok düşük bir artışla 1,494 g/L’ye ulaşmıştır. 40 g/L konsantrasyonda ise 20 g/L şeker konsantrasyonuna sahip besi yerine göre daha iyi bir artış gözlenmiş olup KKSK sisteminde geleneksel statik kültüre % 5.33 artışla üretilen BS miktarı 2,57 g/L’ye ulaşmıştır. 60 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde ise statik kültürde 5,12 g/L olan BS miktarı KKSK sisteminde % 12,46’lık bir artışla 5,758 g/L olmuştur. 80 g/L şeker konsantrasyonda üretilen BS üretimi incelendiğinde kademeli kolon statik kültür sisteminde BS üretimi % 17.49’luk bir artışla 8,436 g/L BS üretilmiştir. Tasarlanan kademeli kolon

Tablo 4. 6. Geleneksel statik kültür ve KKSK sisteminde üretilen BS miktarları ve statik kültüre göre artış değerleri

Şeker Kons. (g/L)	Statik kültürde üretilen BS (g/L)	KKSK Sisteminde üretilen BS (g/L)	Artış yüzdesi (%)
20	1,487	1,494	0,47
40	2,440	2,570	5,33
60	5,120	5,758	12,46
80	7,180	8,436	17,49
100	8,400	10,250	22,02

statik kültür sisteminin geleneksel statik kültüre göre en yüksek artışı gösterdiği besi yeri 100 g/L şeker içeriğine sahiptir. Bu şeker konsantrasyonunda geleneksel statik kültürde 8,4 g/L olan BS miktarı KKSK sisteminde 10,25 g/L'ye ulaşarak % 22,02'lik bir artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun substrat inhibisyonuna uğramadığı yüksek konsantrasyonlara kadar BS üretimini kademeli kolon statik kültür sisteminde geleneksel statik kültüre göre arttırmada başarılı olduğunu söylenebilir. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi 40 g/L ve altındaki şeker konsantrasyonunda KKSK sistemi BS üretimini arttırmada çok etkin değildir. 60, 80 ve 100 g/L şeker konsantrasyonlarında KKSK sistemi geleneksel statik kültür yöntemine göre daha etkindir. Elde edilen sonuçlar literatürde melas kullanılarak yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında yapılan bu çalışmada melaslı besi yerinde üretilen BS miktarının daha fazla olduğu söylenebilir (Bae ve Shoda, 2004; Çakar, Kati ve ark., 2014; Yılmaz, 2007). Literatürdeki çalışmalarda da melas kullanılmasına rağmen yapılan bu çalışmada daha yüksek miktarda BS üretiminin kullanılan mikroorganizmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yılmaz (2007) çalışmasında melastaki şeker konsantrasyonu arttıkça BS üretiminin azaldığı ve 80 g/L şeker konsantrasyonunda ise hiç BS üretmediği görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun ise daha yüksek konsantrasyonlarda BS ürettiği görülmektedir.

Kültür sonrasında sıvı besi yerinden alınan örneklerle şeker analizi uygulanmıştır. Şeker analizi sonucu elde edilen toplam şeker miktarını gösteren veriler Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7'de görüldüğü gibi 20 g/L başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde kültür süresi sonunda ortamda kalan şeker miktarı geleneksel statik kültürde 9,3 g/L iken KKSK sisteminde bu değer 8,87 g/L'dir. Tablo 4.5'e bakıldığında bu konsantrasyon için KKSK sisteminde % 0,47'lik bir artış görülmektedir. Dolayısıyla şeker analizi

Tablo 4. 7. Toplam şeker konsantrasyonları

Melastaki Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Statik Kültür Kalan Toplam Şeker (g/L)	KKSK Kalan Toplam Şeker (g/L)
20	9,3	8,87
40	18,53	17,77
60	24,12	19,32
80	33,7	21,43
100	44,12	27,3

sonucunda geleneksel statik kültür ile KKSK sistemi arasındaki kalan toplam şeker miktarı arasındaki farkın fazla olmaması beklenen bir sonuçtur. Aynı şekilde 40 g/L başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip besi yerinde de kalan toplam şeker miktarı arasındaki fark azdır. 60 g/L şeker konsantrasyonuna sahip besi yerine bakıldığında kültür sonunda statik kültürde 24,12 g/L KKSK sisteminde 19,32 g/L toplam şeker miktarı vardır. KKSK sisteminde 4.8 g/L daha fazla şeker tüketilmesi BS üretiminde % 12,46'lık bir artışa sebep olmuştur. 80 g/L başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde kalan toplam şeker miktarı geleneksel statik kültür de 33,7 g/L iken KKSK sisteminde bu değer 21,43 g/L'dir. Bu da iki sistem arasında BS üretimine % 17,49'luk bir farka sebep olmuştur. 100 g/L şeker konsantrasyonda ise statik kültür 44,12 g/L KKSK sisteminde 27,3 g/L şeker kalmıştır. KKSK ve geleneksel statik kültür tekniğinde kültür sonunda kalan şeker miktarı ile iki sistem arasında elde edilen BS miktarı kıyaslandığında arada büyük bir fark görülmektedir. Örneğin 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip besi yerinde geleneksel statik kültür ve KKSK sisteminde kalan şeker konsantrasyonu arasındaki fark 16,82 g/L'dir. İki sistem arasında üretilen BS arasındaki fark ise 1,85 g/L'dir. Zamanla statik kültürde besi yeri içerisinde selüloz oluşturmayan mutantların oluşumu, pH'daki değişimler ve besi yeri içerisinde biriken CO₂ selüloz oluşumu gibi olumsuz etkenlerin ortamdaki şekerin tamamı kullanılmadan BS üretimini durdurduğu düşünülmektedir. Statik kültürle kıyaslandığında KKSK sisteminin bu olumsuz etkenlerden daha az etkilendiği elde edilen veriler ışığında söylenebilir. Bu çalışmada tasarlanan KKSK sisteminin geleneksel statik kültüre göre daha yüksek miktarda BS üretimi sağlayarak statik kültürde karşılaşılan oksijen transfer probleminin olumsuz etkilerinin giderilmesinde başarılı olduğu söylenebilir.

4.5. Üretilen BS'lerin Karakteristik Özellikleri

4.5.1. Su Tutma Kapasitesi

BS'nin su tutma kapasitesi yara örtü materyali olarak biyomedikal uygulamalar için çok önemli bir parametredir. Bakteriyel selülozların su tutma kapasitelerindeki farklılıklar selülozun gözenekliliği ve yüzey alanıyla ilişkilidir. Kademeli statik kültür ve geleneksel statik kültürde elde edilen BS örnekleri gerek saflaştırma basamakları uygulandıktan sonra kurutulmadan önce ıslak halde ve 70 °C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan örneklerin su tutma kapasiteleri hesaplanmıştır. Bu aşamalar sonunda elde edilen bakteriyel selülozun su tutma kapasiteleri Tablo 4.8'da verilmiştir.

Tablo 4. 8. Farklı kültür teknikleriyle elde edilen bakteriyel selülozların su tutma kapasiteleri

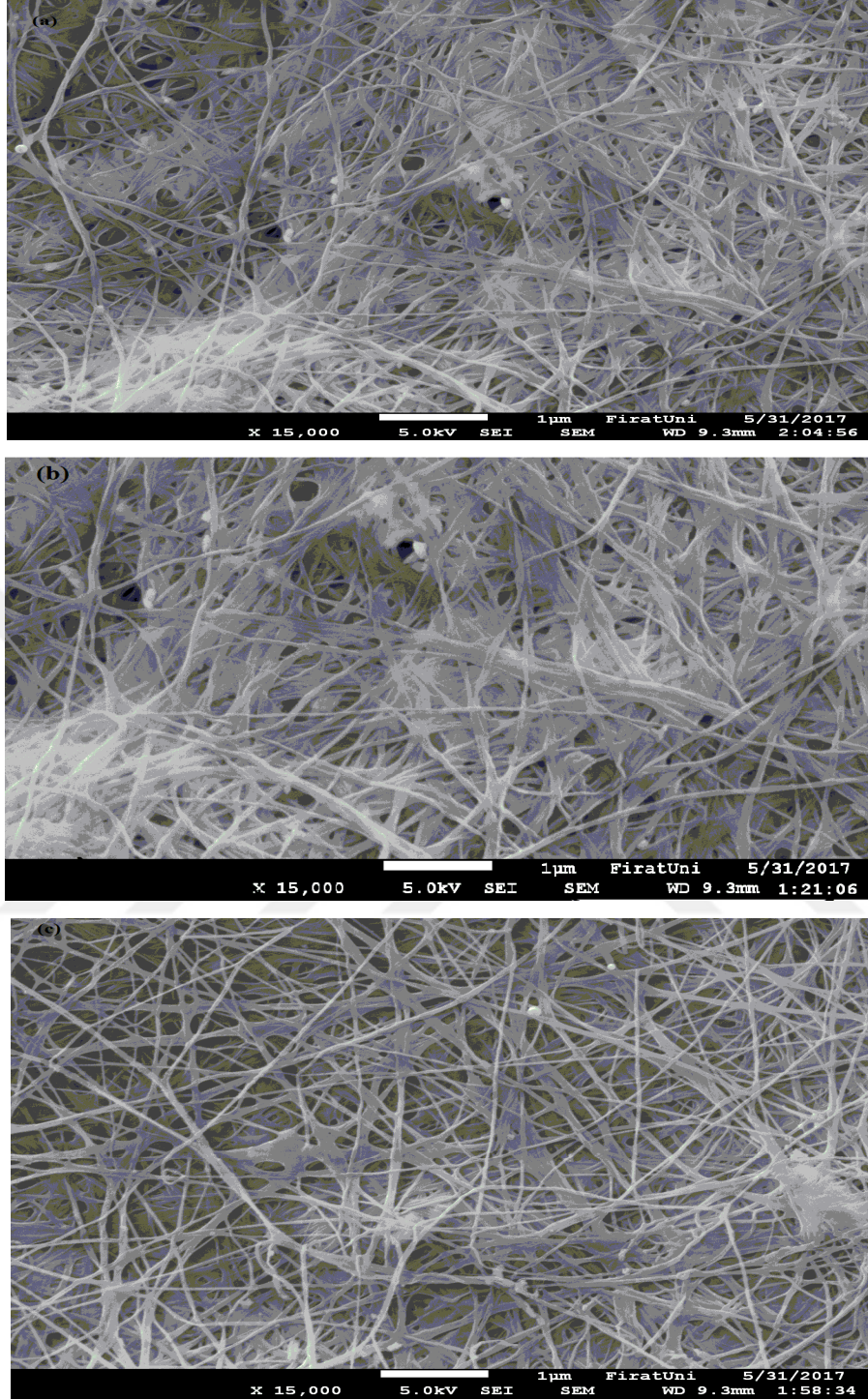
Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Statik Kültür	KKSK
20	108,3	97,3
40	95,5	101,6
60	89,8	83,5
80	87,3	89,1
100	83,8	95,0

Tablo 4.8’de görüldüğü gibi elde edilen BS’lerin su tutma kapasiteleri 83,5 ile 108,3 arasında değişmektedir. Daha yüksek yüzey alanı ve gözenek boyutu BS içerisine alınan ve tutulan su miktarını arttırır. Bu tezde KKSK ve geleneksel statik kültürden elde edilen BS’lerin su tutma kapasiteleri literatürdeki bazı çalışmalarda bulunan değerlerden düşük (Tsouko ve ark., 2015) bazılarından ise yüksektir (Yoshinaga ve ark., 1997). Su tutma kapasitesini selüloz üretim yöntemi, mikroorganizmanın türü, fermentasyon koşulları ve BS’nin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler etkilemektedir.

4.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Sonuçları

Üretilen BS örneklerinin morfolojik karakterizasyonu SEM kullanılarak incelenmiştir. HS ve melaslı besi yerinde üretilen BS arasından seçilen üç örneğe SEM analizi uygulanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Farklı karbon kaynağı ve farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen BS’nin morfolojik ve fiziksel özelliklerinde farklılıklar görülmesi normaldir. Çünkü bu faktörler BS fibrilleri üzerinde etkilere sahiptir. Geleneksel statik kültür ve KKSK sisteminde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip besi yerlerinden alınan örnekler ve HS besi yerinden alınan örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntüleri incelendiğinde geleneksel statik kültür ve KKSK sisteminde elde edilen BS örneklerinde daha yoğun bir fibril yapısı görülmektedir. Fakat HS besi yerinde üretilen BS’de ise fibril yoğunluğu daha azdır. Mohammadkazemi ve ark. (2015) farklı besi yerlerinde farklı karbon kaynakları kullanarak elde ettikleri BS’nin morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan farklı karbon kaynakları ile elde edilen bakteriyel selülozun SEM görüntülerinde büyük farklar görülmüştür (Mohammadkazemi ve ark., 2015). Bu durum farklı ortamlarda üretilen BS’lerin literatür ile uyumlu SEM görüntülerine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca SEM görüntüleri incelendiğinde üretilen tüm BS’lerin nanofibril yapısında olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (Erbas ve ark., 2015; Huang ve ark., 2016; Yan ve ark., 2017; Yang ve ark., 2013).



Şekil 4. 7. 100 g/L şeker konsantrasyonunda statik kültürde (a), KSK (b) ve HS besi yerinden üretilen BS (c)

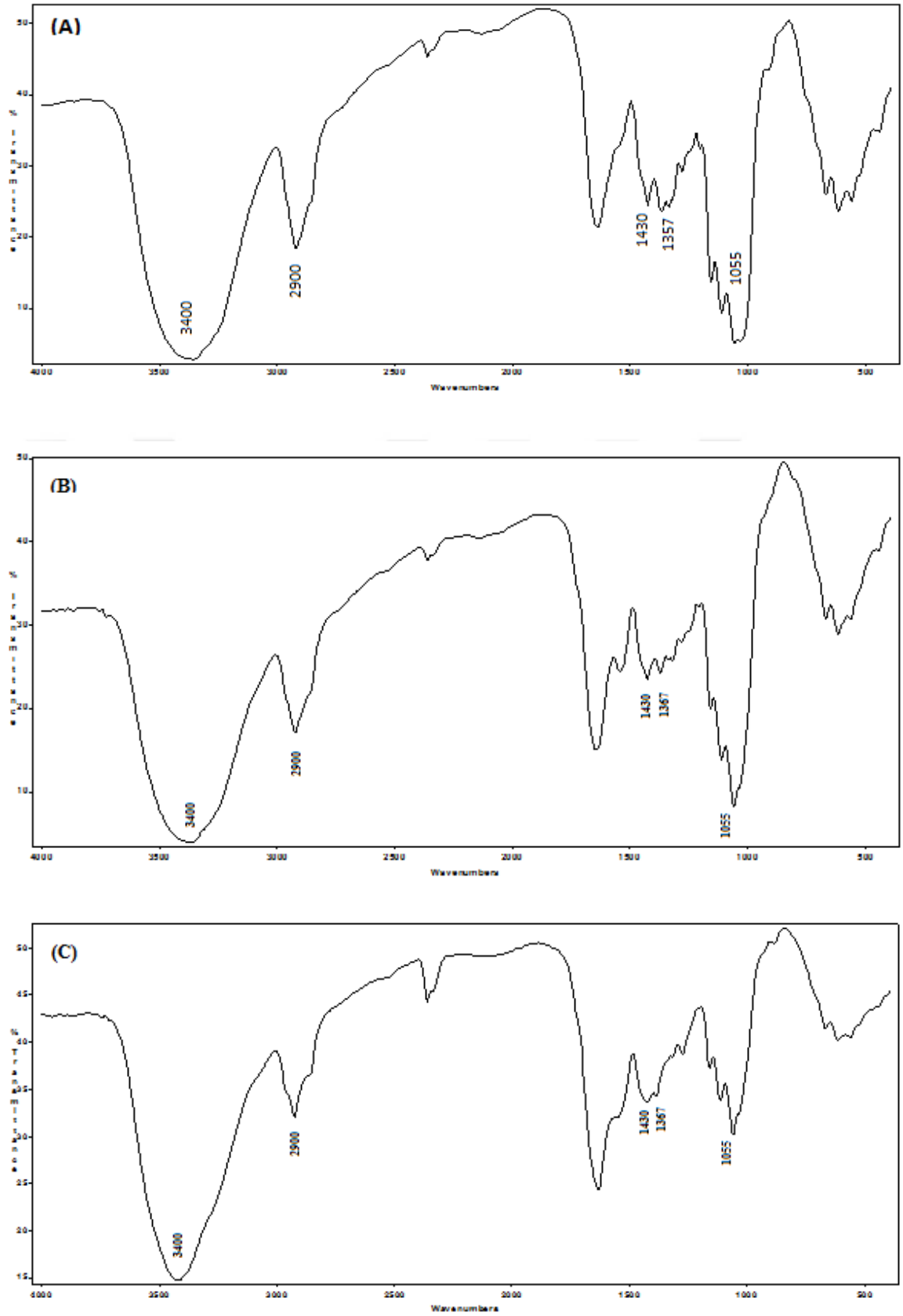
4.5.3. FTIR Analizi Sonuçları

FTIR analizi moleküler bağ karakterizasyonu ile çeşitli organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel grupları, iki bileşiğin aynı olup olmadığını, bileşiğin yapısındaki bağların yerini ve durumunu belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde

moleküldeki fonksiyonel grupların belirlenmesinde daha önceden belirlenmiş, hangi dalga boyu aralıklarında hangi fonksiyonel grubun olduğunu belirten korelasyon tablosu olarak adlandırılan tablolar vardır. Bu tablolar yardımıyla FTIR analiz uygulanan örneğin fonksiyonel grupları belirlenebilir ve bu sayede iki maddenin aynı olup olmadığı belirlenebilir. Bu tezde geleneksel statik kültür, kademeli kolon statik kültür ve HS besi yerinden elde edilen BS'lerin fonksiyonel grupları ve birbirleri arasındaki benzerlikler 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir. Elde edilen grafiklerin yorumlanmasında bir korelasyon tablosu (Maréchal ve Chanzy, 2000) yardımıyla fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. FTIR analizi sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Grafikler incelendiğinde KKSK (A), geleneksel statik kültür (B) ve HS (C) besi yerinde üretilen bakteriyel selülozların hepsinde 3400 cm^{-1} bandında selülozun hidroksil grubu (-OH) gerilme titreşim frekansına karşılık gelmektedir. BS çok sayıda yüksek oranda polar hidroksil grup içermektedir. Dolayısıyla moleküler zincirler molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile etkileşime girmektedir (Maréchal ve Chanzy, 2000). Çalışmalar sonucunda elde edilen tüm örnekler, tipik bir selüloz tip I'in C-H bağının absorpsiyon spektrumuna karşılık gelen yaklaşık 2900 cm^{-1} dalgaboyunda pik oluştuğu Şekil 4.8'de görülmektedir. Korelasyon tablosu incelendiğinde üç örnek için de 1430 cm^{-1} bandında metil ve metilenin asimetric deformasyon titreşimi için, 1367 cm^{-1} bandında ise CH_2 eğilme titreşimi için pik oluşumu görülmektedir. Ayrıca 1055 cm^{-1} 'deki bant şeker halkasının C-O-C ve C-O-H gerilme titreşimi ifade etmektedir (Nelson, O'Connor, 1964; Park, Park ve Jung, 2003).

Sonuç olarak Şekil 4.8 incelendiğinde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde KKSK ile geleneksel statik kültürden ve HS besi yerinden elde edilen BS'lerin yapısında farklılık görülmemektedir. Dolayısıyla kullanılan KKSK sisteminin bakteriyel selülozun işlevsel grupları üzerine negatif bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Bu analiz sonucunda 100 g/L şeker konsantrasyonu sahip melaslı besi yerinden KKSK ve geleneksel statik kültür yöntemi ile HS besi yerinden elde edilen bakteriyel selülozun fonksiyonel grupları arasında bir fark olmadığı grafiklerden açıkça görülmektedir.



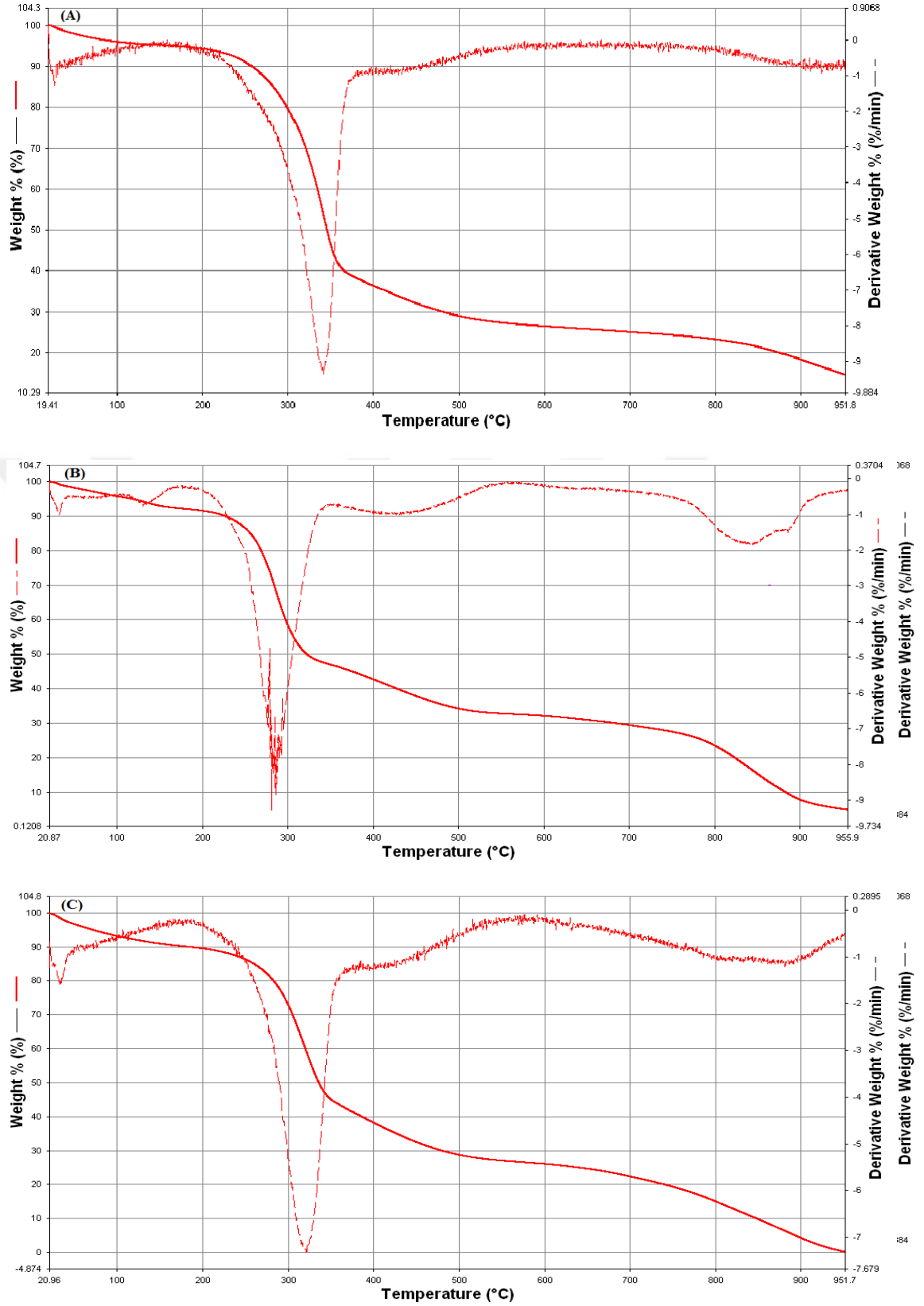
Şekil 4. 8. KKSK (A), geleneksel statik kültür (B) ve HS (C) besi yerinden elde edilen BS örneklerinin FTIR analizi sonuçları

4.5.4. TGA (Termogravimetrik Analiz) Sonuçları

Termogravimetrik analiz yöntemi kontrollü olarak ısıya tabi tutulan bir örneğin ağırlığının sıcaklık ile değişimini ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu yöntem kontrol edilebilen bir atmosfer ortamında gerçekleştirilir. Termogravimetrik yöntemlerde sıcaklık değişiminin örnek kütlelerinde değişim oluşturmamasından dolayı büyük ölçüde yüksetgenme ve bozunma reaksiyonları ile buharlaşma, desorpsiyon ve süblimleşme ile sınırlıdır. TGA sonucunda elde edilen grafiği termal bozunma eğrisi grafiği ya da termogram denir. TGA selüloz gibi çeşitli polimerlerin bozunma mekanizmaları hakkında bilgiler vermektedir. Ayrıca örneklerin karakteristik bir bozunma şekli olduğundan örneklerin tanımlanmasında da kullanılabilir.

Deneyler sonucunda kademeli kolon statik kültür, geleneksel statik kültürden 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden elde edilen birer örnek ile HS besi yerinden elde edilen bir BS örneğine TGA uygulanmıştır. Deneyler her bir BS örneği için 20 ml/dk azot akış hızıyla 10 °C/dk ısıtma hızında 25-950 °C aralığında yapılmıştır. TGA uygulanan 3 BS'nin termal bozunma eğrileri Şekil 4.9'da verilmiştir.

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi HS besi yerinden elde edilen bakteriyel selülozun termal bozunma grafiğinden 20-150 °C arasında az bir miktar kütle kaybı meydana gelmiştir. Aynı şekilde KKSK ve geleneksel statik kültür yönteminde elde edilen BS örnekleri içinde 20-150 °C arasında düşük bir kütle kaybı görülmektedir. Bu sıcaklıklar arasındaki kütle kaybının sebebi örnekler içerisindeki kalıntı suyun buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaklaşık olarak 240-500 °C arasındaki bölgede her üç örnek içinde kütle kaybının fazla olduğu görülmektedir. HS besi yerinden elde edilen BS örneğinde bu sıcaklık aralığından yaklaşık % 60'lık bir kütle kaybı olduğu görülmektedir. KKSK için bu sıcaklık bölgesinde meydana gelen kütle kaybı yaklaşık olarak % 53 iken geleneksel statik kültürden elde edilen BS için bu değer yaklaşık % 58'dir. Bu sıcaklık bölgesinde meydana gelen kütle kaybının glikoz birimlerinin depolimerizasyonu, bozunması ve dehidrasyonunu içeren selüloz bozunma reaksiyon dizisinden meydana geldiği düşünülmektedir (Vasconcelos ve ark., 2017).

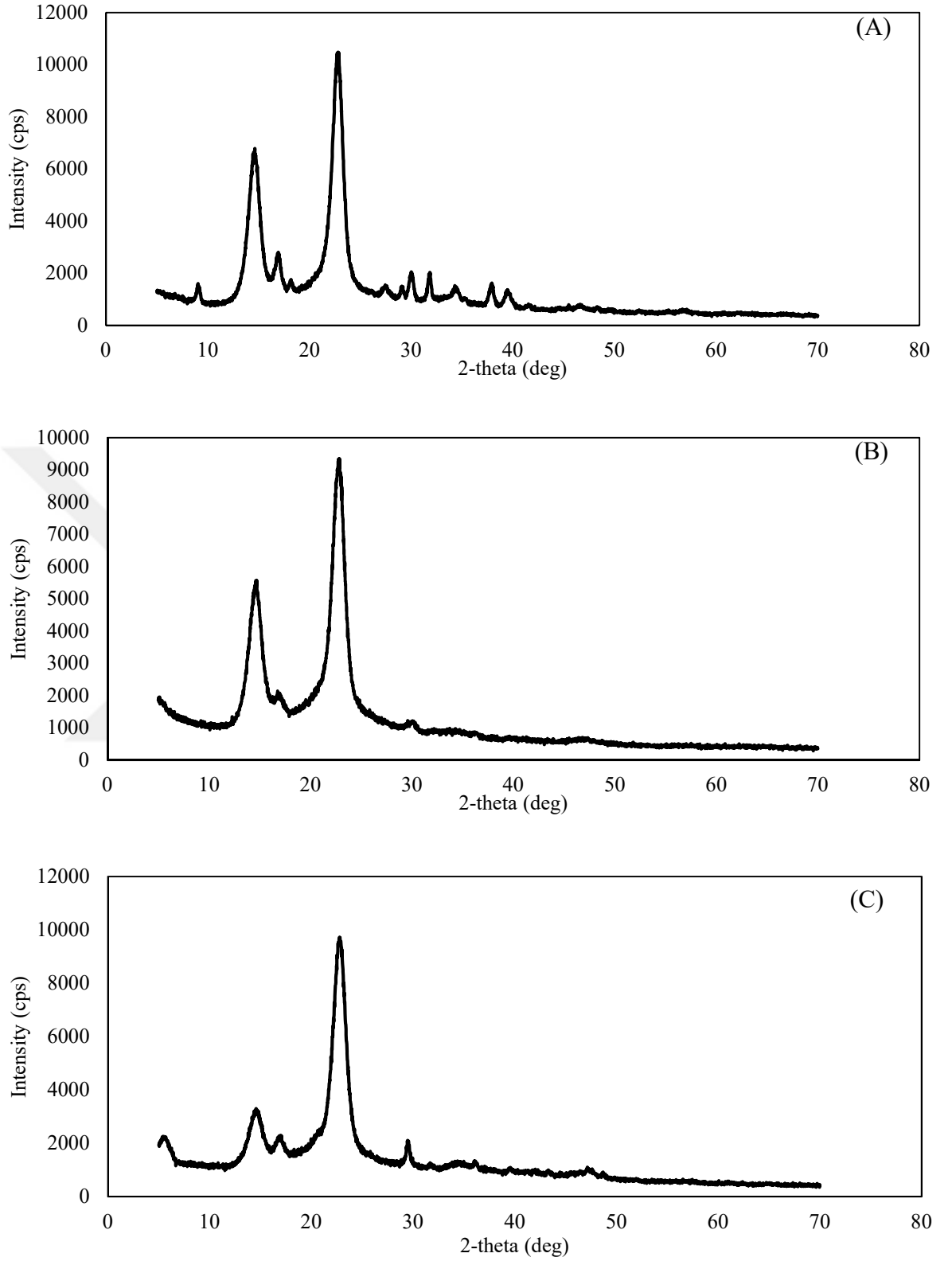


Şekil 4. 9. HS (A), KKSİK sistemi 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneği (B) ve Geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneğinin (C) termal bozunma grafikleri

500 °C'den sonraki bölgede ise karbonlu kalıntıların oksidasyonu ve parçalanmasıyla ilişkili olup düşük molekül ağırlıklı gaz halindeki ürünlerin üretildiği düşünülmektedir. Toplam kütle kaybı incelendiğinde ise HS besi yerinden elde edilen BS örneğinin toplam kütle kaybı % 85,4 iken KKSK sisteminden elde edilen BS örneğinin % 95,067, geleneksel statik kültürden elde edilen BS örneğinin ise % 99,73'dür. Bu değerlere bakıldığında HS besi yerinden elde edilen örneğin KKSK ve geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonunda melaslı besi yerinde üretilen bakteriyel selülozlara göre daha yüksek kül içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Melasın içerisinde sukroz, fruktoz ve glikoz olduğu bilinmektedir. HS besi yerinde karbon kaynağı olarak glikoz bulunmaktadır. Termal bozunum davranışının, molekül ağırlığı, kristalinitesi ve lif yönelimi gibi bazı yapısal parametrelerden etkilendiği bilinmektedir (Segal, Creely, Martin ve Conrad, 1959). HS besi yeri ile melaslı besi yerinde KKSK ve geleneksel statik kültürde elde edilen BS'lerin termostabilitesindeki farklılığın besi yerleri içerisindeki karbon kaynaklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.5. X Işınları Difraksiyonu (XRD) Sonuçları

Maddelerin kristal yapısı üç boyutlu uzayda düzgün olarak tekrarlanan bir şekli temel alan atomik bir yapıdan oluşur. Dolayısıyla katı maddelerin kristal yapıları, yapısında bulundurduğu atom gruplarının veya moleküllerinin katıya özgü olacak geometrik bir düzende bir araya gelmesiyle meydana gelmektedir. Malzemelerin atomik seviyede yapılarını görüntülemek yüksek çözünürlüklü elektron mikroskopları ile mümkün olabilmektedir. Fakat maddenin yapısındaki bilinmeyen yapıları belirlemek ya da yapısal parametreleri incelemek için XRD gibi kırınım teknikleri kullanılır. X ışınları difraksiyonu katı maddelerin kristal yapılarının değerlendirilmesinde en çok kullanılan tekniktir (Arslan, 2010). Çalışmalar sonucunda 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde KKSK sistemi ve geleneksel statik kültürden elde edilen BS örnekleri ile HS besi yerinde elde edilen BS'nin XRD analizleri yaptırılmıştır. Bu örnekleri için elde edilen grafikler Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 10. HS (A), KSKS sistemi 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneği (B) ve Geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinden alınan BS örneğinin (C) XRD kırınım grafikleri

Genel olarak statik kültürde üretilen bakteriyel selülozların difraktogramları X-ışını kırınımında selüloz I'e verilen üç ana karakteristik pike sahiptir ve bu pikler yaklaşık olarak $2\theta = 14^\circ$, 16° ve 22° noktalarındadır (Keshk ve Sameshima, 2006). Bu 2θ noktaları sırasıyla $\overline{110}$, 110 ve 200 kristalografik düzlemlere karşılık gelir. Şekil 4.10'daki kırınım diyagramlarında görüldüğü gibi analiz edilen üç örneğin de selüloz I'in varlığını belirten üç karakteristik kırınım piki oluşturduğu görülmektedir. XRD analizi sonucu elde edilen verilerden yola çıkılarak 3 örnek için hesaplanan kristaliniteler Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tabloda da görüldüğü gibi sırasıyla üretilen BS örneklerinin kristaliniteleri KSK % 96,37, geleneksel statik kültür % 96,07, HS % 84,45 olarak hesaplanmıştır. En düşük kristalinite HS besi yerinde üretilen BS'de görülürken KSK ve geleneksel statik kültürde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde üretilen BS'lerin kristalinite değerleri birbirine çok yakındır, HS besi yerinde üretilen BS'ye göre daha yüksek bir kristaliniteye sahiptir. HS besi yerinde üretilen BS'nin kristalinite değerinin diğer örneklerle göre düşük olması besi yeri içeriğinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tsouko ve ark. (2015) çeşitli karbon kaynakları kullanarak ürettikleri BS örnekleri için en yüksek kristalinite değerini % 88 bulmuştur (Tsouko ve ark., 2015). Cheng ve ark. (2009) ise yaptıkları çalışmada elde ettikleri bakteriyel selülozun kristalinite değerini % 93 olarak bulmuşlardır (Cheng ve ark., 2009). Bu çalışmada KSK ve geleneksel statik kültürde melaslı besi yerinde elde edilen BS örneklerinin kristaliniteleri literatürdeki değerlerden yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca KSK sisteminde üretilen örnek ile geleneksel statik kültürde üretilen örneklerin kristalinite değerleri arasındaki farkın çok düşük olduğu görülmektedir. Bu yüzden tasarlanan sistemin bakteriyel selülozun kristalinitesi üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Tablo 4. 9. HS, KSK ve statik kültürden elde edilen örneklerin kristalinite değerleri

Örnek Adı	Kristalinite (%)
HS	84,45
KSK	96,37
Statik Kültür	96,07

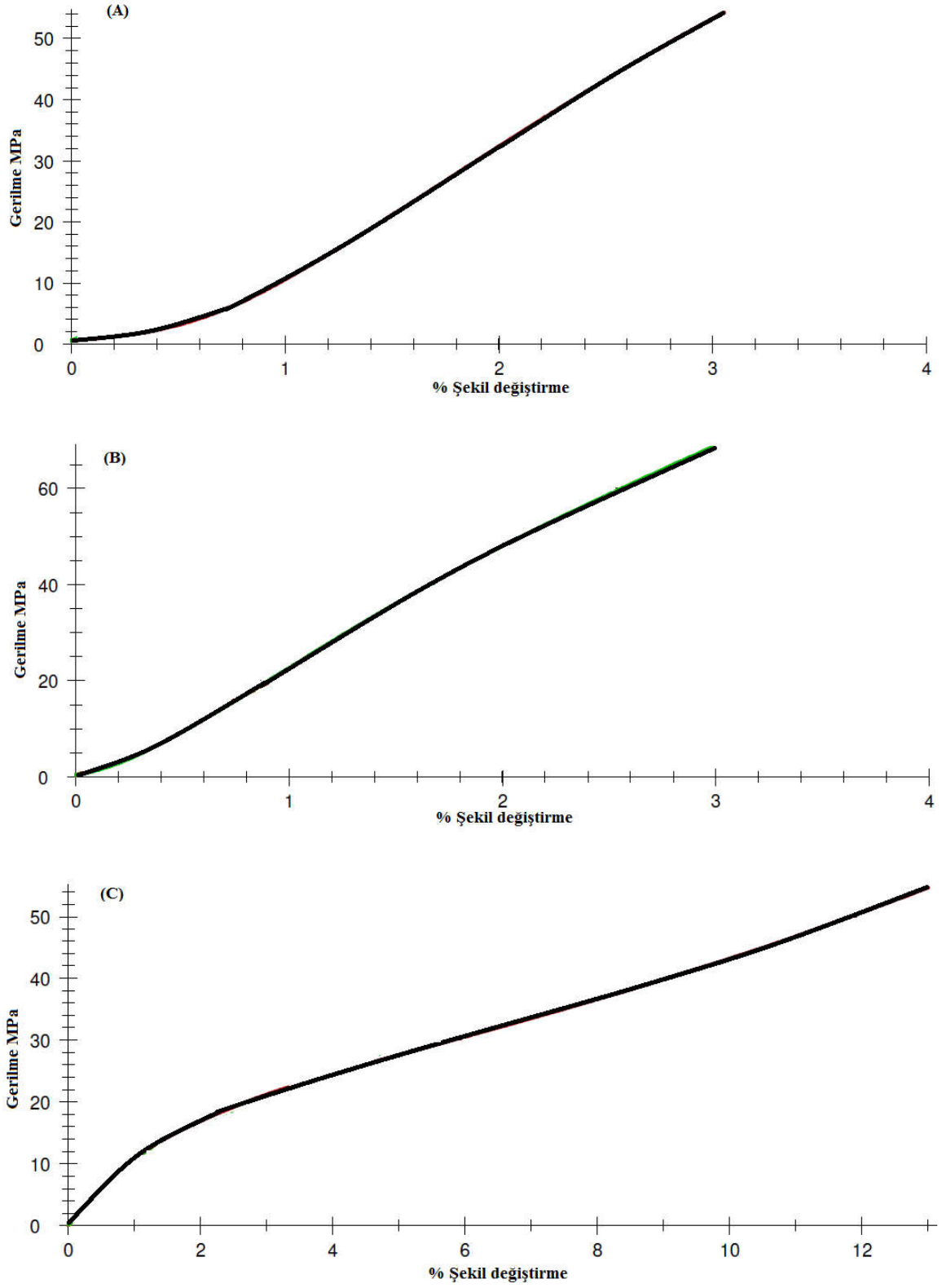
4.5.6. Çekme Testi Sonuçları

Çalışmada HS besi yerinden ve 100 g/L şeker içeriğine sahip melaslı besi yerinden KKSK ve geleneksel statik kültürle elde edilen bakteriyel selülozlara mekanik çekme testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen Young Modülü (E_t), gerilme (σ) ve kopmada uzama (ϵ) verileri Tablo 4.10'da verilmiştir.

Young modülü malzemenin dayanımının ölçüsüdür. HS besi yerinden alınan BS örneği için Young modülü değeri diğer örneklerle göre düşüktür. Dolayısıyla bu besi yerinde elde edilen BS örneğinin dayanımı düşüktür. En yüksek Young modülü 1860 MPa ile KKSK sisteminde 100 g/L şeker konsantrasyonuna sahip melaslı besi yerinde elde edilmiştir. Literatürdeki bazı çalışmalar incelendiğinde sukroz ve maya ekstraktı bakımından zengin bir besi yerinde *A. xylinum* ile üretilen BS NaOH ile muamele edildikten sonra kurutulan örneğin analiz sonucunda gerilmesi 43,68 MPa elde edilmiştir (George, Ramana, Sabapathy ve Bawa, 2005). Başka bir çalışmada ise *G. hansenii* ile glikoz, pepton ve maya ekstraktı olan besi yerinden elde edilen selülozun gerilmesi 76,7 MPa bulunmuştur (Gayathry ve Gopalaswamy, 2014). Elde edilen sonuçları literatür ile uyumludur. Şekil 4.11'de gerilme-uzama grafikleri verilmiştir.

Tablo 4. 10. Çalışmalar sonucunda elde edilen BS örneklerinin mekanik çekme testi sonuçları

Örnek Adı	Young Modülü (E_t) (MPa)	Gerilme (σ) (MPa)	Uzama (ϵ) (%)
HS	457	54,3	3,1
KKSK	1860	68,5	3
Statik Kültür	1240	54,7	13



Şekil 4. 11. HS besi yeri (A) KKSK (B) ve geleneksel statik kültürden (C) elde edilen bakteriyel selülozların Gerilme/Uzama grafikleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Statik kültürde besi yeri üzerinde oluşan selüloz, oksijen transferini olumsuz yönde etkilemekte ve sonuç olarak düşük bir BS üretim verimine sebep olmaktadır. Bu çalışmada oksijen transfer probleminin önüne geçerek BS verimi arttırılmaya çalışılmış ve besi yeri olarak şeker fabrikası atığı olan melas kullanılarak daha ekonomik bir BS üretimi gerçekleştirmek amaçlanmıştır. Çalışmalarda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Melas yaklaşık olarak % 50 oranında toplam şeker içeriğine sahip bir atıktır ve BS üretmede kullanılan kompleks besi yerlerine göre daha ekonomiktir.
- Yapılan bu tez çalışmasında geliştirilen KKSK sistemi ile nispeten yüksek şeker konsantrasyonlarında BS üretimini arttırmada başarı sağlanmıştır. 100 g/L şeker konsantrasyonunda statik kültür tekniğine göre KKSK sisteminde % 22,02'lik bir artış sağlanmıştır.
- Sonuç olarak oksijen transferi probleminin önüne geçilerek selüloz üretimi için pozitif girdi sağlanmıştır.
- Üretilen BS'lerin XRD, TGA, SEM, FTIR, çekme testi ve su tutma gibi karakteristik özellikleri literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.
- Bu çalışmada kullanılan melasa herhangi bir hidroliz işlemi uygulanmamıştır. Melasa çeşitli hidroliz işlemleri uygulayarak KKSK sisteminde selüloz üretimine etkileri incelenebilir.
- Geliştirilen bu sistemde farklı sanayi atık ve yan ürünleri kullanılarak BS selüloz üretimine etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelhak, M. (2016). Use of polymers and biopolymers blend for water retention and soil stabilization at algerian arid and semi-arid soils.
- Amin, M. C. I. M., Abadi, A. G., Ahmad, N., Katas, H., & Jamal, J. A. (2012). Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: Physicochemical, thermal and drug release properties. *Sains Malaysiana*, 41(5), 561–568.
- Arslan, T. (2010). X-Işınlari Ve Kullanım Alanları.
- Bäckdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2008). Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(6), 320–330. <https://doi.org/10.1002/term.97>
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141–2149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>
- Bae, S., & Shoda, M. (2004). Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1366–1371. <https://doi.org/10.1021/bp0498490>
- Bae, S., & Shoda, M. (2005). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/bit.20325>
- Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70162-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70162-0)
- Balasubramani, M., Kumar, T. R., & Babu, M. (2001). Skin substitutes: a review. *Burns*, 27(5), 534–544. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(01\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(01)00018-3)
- Basta, A. H., & El-Saied, H. (2009). Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 2098–2107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04467.x>
- Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, R. M., White, a R., & Cooper, K. M. (1980).

- Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6678–6682. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6678>
- Bodhibukkana, C., Srichana, T., Kaewnopparat, S., Tangthong, N., Bouking, P., Martin, G. P., & Suedee, R. (2006). Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. *Journal of Controlled Release*, 113(1), 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.03.007>
- Brown, A. J. (1886). XLIII-on an acetic ferment which forms cellulose., 49.
- Brown, R. M., & Saxena, I. M. (2000). Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)
- Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 40(2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00050-8)
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Bioresource Technology Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, 102(15), 7354–7360. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., & Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 345–352. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M)
- Chao, Y., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., & Shoda, M. (1997). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor, 11(11), 829–832.
- Chao, Y., Sugano, Y., & Shoda, M. (2001). Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6), 673–679. <https://doi.org/10.1007/s002530000503>

- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose : Fermentative Production and Applications, *47*(2), 107–124.
- Chen, P., Cho, S. Y., & Jin, H. J. (2010). Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromolecular Research*, *18*(4), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s13233-010-0404-5>
- Cheng, H.-P., Wang, P.-M., Chen, J.-W., & Wu, W.-T. (2002). Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *35*(Pt 2), 125–32. <https://doi.org/10.1042/BA20010066>
- Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009). Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering*, *3*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2011). Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules*, *12*(3), 730–736. <https://doi.org/10.1021/bm101363t>
- Cheng, K., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009). reactor and its material property analysis, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>
- Choi, Y., Ahn, Y., Kang, M., Jun, H., Kim, I. S., & Moon, S. (2004). Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *79*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1002/jctb.942>
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, *27*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R. M. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, *11*. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>
- Çakar, F., Kati, A., Özer, I., Demirbağ, D. D., Şahin, F., & Aytekin, A. Ö. (2014). Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. *Biochemical Engineering Journal*, *92*, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.07.002>

- Çakar, F., Özer, I., Aytekin, A. Ö., & Şahin, F. (2014). Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.103>
- Dahman, Y. (2009). Nanostructured Biomaterials and Biocomposites from Bacterial Cellulose Nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 5105–5122. <https://doi.org/doi:10.1166/jnn.2009.1466>
- Demling, R. H., & DeSanti, L. (1999). Management of partial thickness facial burns (comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns*, 25(3), 256–261. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00165-X)
- Deng, Hong-wen and Liu, Y. (2005). *Current topics in bone biology*. World Scientific.
- Dongping, S., Jidong, Z., Lingli, Z., Mingyang, Z., Qinghang, W., & Chunyuan, X. (2005). Production of bacterial cellulose with *Acetobacter xylinum*~(1.1812) fermentation. *Journal of Nanjing University of Science and Technology*, 29(5), 601—604. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/CBA/608746>
- Embuscado, M. (1991). *Purification and characterization of cellulose produced by Acetobacter xylinum*. Pirdue University.
- Eming, S., Smola, H., & Kreig, T. (2002). Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs*, 172. <https://doi.org/10.1159/000065611>
- Erbas, E., Kiziltas, A., & Gardner, D. J. (2015). Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydrate Polymers*, 124, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.036>
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>
- Fontana, J. D., De Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., ... Farah, L. F. X. (1990). *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24–25(1), 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF02920250>
- Gabriels, D. (1990). Applications of Soil Conditioners for Agriculture and Engineering. In

- M. F. De Boodt, M. H. B. Hayes, A. Herbillon, E. B. A. De Strooper, & J. J. Tuck (Eds.), *Soil Colloids and Their Associations in Aggregates* (pp. 557–565). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2611-1_20
- Gallin, W. J., & Hepperle, B. (1998). Burn healing in organ cultures of embryonic chicken skin: a model system. *Burns*, 24(7), 613–620. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00089-8)
- Gayathry, G., & Gopalaswamy, G. (2014). Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 39(1), 93–96.
- George, J., Ramana, K. V, Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2005). Physico-Mechanical Properties of Chemically Treated Bacterial (*Acetobacter xylinum*) Cellulose Membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 1323–1327. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-3574-0>
- Geyer, U., Heinze, T., Stein, A., Klemm, D., Marsch, S., Schumann, D., & Schmauder, H. P. (1994). Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(6), 343–347.
- Göksungur, Y., & Zorlu, N. (2009). Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkish Journal of Biology*, 25, 265–275.
- Gromet Z., S. M. & H. S. (1957). Synthesis of cellulose by *A. xylinum* 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. *Biochemical Journal*, 10, 679–689.
- Ha, J. H., Shah, N., Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2011). Bacterial cellulose production from a single sugar α -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. *Process Biochemistry*, 46(9), 1717–1723. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.024>
- Ha, J. H., Shehzad, O., Khan, S., Lee, S. Y., Park, J. W., Khan, T., & Park, J. K. (2008). Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(4), 812. <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0134-y>
- Haigler, C. H., Brown, R. M., & Benziman, M. (1980). Calcofluor white ST Alters the in

- vivo assembly of cellulose microfibrils. *Science*, 210(4472), 903 LP-906. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/210/4472/903.abstract>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954a). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954b). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Hofinger, M., Bertholdt, G., & Weuster-Botz, D. (2011). Microbial production of homogeneously layered cellulose pellicles in a membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), 2237–2240. <https://doi.org/10.1002/bit.23162>
- Hon, D. N. S. (1994). Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*, 1(1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/BF00818796>
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. -P. (2006a). Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Product Movement Influences on the Bioreaction (Part 2). *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 546–551. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620163>
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. P. (2006b). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537–545. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>
- Hu, W., Chen, S., Li, X., Shi, S., Shen, W., Zhang, X., & Wang, H. (2009). In situ synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering C*, 29(4), 1216–1219. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.017>
- Hu, Y., & Catchmark, J. M. (2010). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the production of bacterial cellulose biosynthesized by *Acetobacter xylinum* under the agitated culture. *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 109–113. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02866.x>
- Huang, C., Guo, H., Xiong, L., Wang, B., & Shi, S. (2016). Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter*

- xylinus. *Carbohydrate Polymers*, 136, 198–202.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.043>
- Huang, Y., Zhu, C., & Yang, J. (2014). Recent advances in bacterial cellulose, 1–30.
<https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V., & Sg, G. (2013). Microbial & Biochemical Technology Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources, 5(2), 31–33.
<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000095>
- Hutchens, S. A., León, R. V, O'Neill, H. M., & Evans, B. R. (2007). Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02055.x>
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, a. (2000). Bacterial cellulose — a masterpiece of nature ' s arts. *Journal of Materials Science*, 35, 261–270.
<https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., & Tišler, V. (2002). Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 986–991. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00215-6)
- Jantarat, C., Tangthong, N., Songkro, S., Martin, G. P., & Suedee, R. (2008). S-Propranolol imprinted polymer nanoparticle-on-microsphere composite porous cellulose membrane for the enantioselectively controlled delivery of racemic propranolol. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1), 212–225.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.030>
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00197-3)
- Jones, I., Currie, L., & Martin, R. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*, 55(3), 185–193. <https://doi.org/10.1054/bjps.2002.3800>
- Jung, H.-I., Jeong, J.-H., Lee, O.-M., Park, G.-T., Kim, K.-K., Park, H.-C., ... Son, H.-J.

- (2010). Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresource Technology*, 101(10), 3602–3608. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.111>
- Jung, H., Lee, O., Jeong, J., Jeon, Y., Park, K., Kim, H., ... Son, H. (2010). Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp . V6 Using a Cost-Effective Molasses – Corn Steep Liquor Medium, 486–497. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8759-9>
- Jung, J. Y., Park, J. K., & Chang, H. N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.019>
- Jung, R., Kim, Y., Kim, H.-S., & Jin, H.-J. (2009). Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 20(3), 311–24. <https://doi.org/10.1163/156856209X412182>
- Kawano, S., Tajima, K., Uemori, Y., Yamashita, H., Erata, T., Munekata, M., & Takai, M. (2002). Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: Comparison of cellulose synthetic ability between strains. *DNA Research*, 9(5), 149–156. <https://doi.org/10.1093/dnares/9.5.149>
- Keshk, S. M. (2014). Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>
- Keshk, S. M. A. S., Razek, T. M. A., & Sameshima, K. (2006). Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses. *African Journal of Biotechnology*, 5(17), 1519–1523. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Keshk, S., & Sameshima, K. (2006). Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.037>
- Keshk, S., & Sameshima, K. (2006). The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 291. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0265-6>

- Kim, C. W., Kim, D. S., Kang, S. Y., Marquez, M., & Joo, Y. L. (2006). Structural studies of electrospun cellulose nanofibers. *Polymer*, 47(14), 5097–5107. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.05.033>
- Kim, S.-Y., Kim, J.-N., Wee, Y.-J., Park, D.-H., & Ryu, H.-W. (2006). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 Isolated From Persimmon Vinegar. In J. D. McMillan, W. S. Adney, J. R. Mielenz, & K. T. Klasson (Eds.), *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 705–715). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-268-7_57
- Kino, Y., Sawa, M., Kasai, S., & Mito, M. (1998). Multiporous Cellulose Microcarrier for the Development of a Hybrid Artificial Liver Using Isolated Hepatocytes. *Journal of Surgical Research*, 79(1), 71–76. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5389>
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- Kongruang, S. (2008). Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148(1), 245. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8119-6>
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1997). Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2), 124–127. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82540-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82540-8)
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Jezierska, A. W., Gonc, M., Mis'kiewicz, A., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(July), 189–195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>
- Kulkarni, P. K., Anil Dixit, S., & Singh, U. B. (2012). Evaluation of bacterial cellulose produced form *Acetobacter xylinum* as pharmaceutical excipient. *American Journal of Drug Discovery and Development*. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2012.72.86>
- Latarjet, J. (1995). A simple guide to burn treatment. *Burns*, 21(3), 221–225. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)80015-G](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)80015-G)

- Lee, B.-H., Kim, H.-J., & Yang, H.-S. (2012). Polymerization of aniline on bacterial cellulose and characterization of bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite films. *Current Applied Physics*, 12(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2011.04.045>
- Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 10–32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>
- Liang, H.-W., Guan, Q.-F., Zhu, Z.-, Song, L.-T., Yao, H.-B., Lei, X., & Yu, S.-H. (2012). Highly conductive and stretchable conductors fabricated from bacterial cellulose. *NPG Asia Materials*, 4(6), e19. <https://doi.org/10.1038/am.2012.34>
- Lin, S. P., Loira Calvar, I., Catchmark, J. M., Liu, J. R., Demirci, A., & Cheng, K. C. (2013). Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20(5), 2191–2219. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>
- López-Delgado, A., Pérez, C., & López, F. A. (1998). Sorption of heavy metals on blast furnace sludge. *Water Research*, 32(4), 989–996. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00304-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00304-7)
- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., & Sun, B. (2011). Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 186. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2281–2285. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0692-8>
- Maréchal, Y., & Chanzy, H. (2000). The hydrogen bond network in I(β) cellulose as observed by infrared spectrometry. *Journal of Molecular Structure*, 523(1–3), 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(99\)00389-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(99)00389-0)
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18–22. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90171-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90171-4)
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., & Yoshinaga, F. (1996). A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(4), 575–579. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.575>

- Mayall, R. C., Mayall, A. C., Mayall, L. C., Rocha, H. C., & Marques, L. C. (1990). Tratamento das úlceras troficas dos membros com um novo substitute da pele. *Rev. Bras. Cir.*, 80(4), 120–124.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., & Gidley, M. J. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 576–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x>
- Min, L., Xiao-Hui, G., & De-Zhou, W. (2011). Removing Cd 2+ by Composite Adsorbent Nano-Fe 3 O 4 /Bacterial Cellulose, 27(6), 1031–1034.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, 117, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>
- Mohd Amin, M. C. I., Ahmad, N., Halib, N., & Ahmad, I. (2012). Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.022>
- Mohite, B. V., & Patil, S. V. (2014). A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(2), 101–110. <https://doi.org/10.1002/bab.1148>
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431), 181–6. <https://doi.org/10.1038/nature11744>
- Mühlethaler, K. (1949). The structure of bacterial cellulose, 12(Biochim.), 527–535.
- Müller, D., Rambo, C. R., Recouvreux, D. o. s., Porto, L. M., & Barra, G. M. O. (2011). Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. *Synthetic Metals*, 161(1–2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.11.005>
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(1), 89–95. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80360-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80360-1)

- Nelson, M.L., O'Connor, R. T. (1964). Bands, Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Lattice Type. Part 1. Spectra of Lattice Types I, II; III and Of Amorphous Cellulose. 8, (Journal of Applied Polymer Science), 1311–1324.
- Ng, C.-C., & Shyu, Y.-T. (2004). Development and production of cholesterol-lowering *Monascus-nata* complex. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 875–879. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-0873-9>
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Current Microbiology*, 57(5), 449. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9228-3>
- Noro, N., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 199–205. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1457-6>
- Okiyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1992). Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 479–487. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80033-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80033-7)
- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., & Yamanaka, S. (1992). Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 471–477. [https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(09\)80032-5](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(09)80032-5)
- Oster, G. A., Lentz, K., Koehler, K., Hoon, R., Serafica, G., & Mormino, R. (2003). Solvent dehydrated microbially-derived cellulose for in vivo implantation. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US6599518>
- Park, J.K., Park, Y.H., Jung, J. Y. (2003). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK Isolated From Rotten Apple, (Biotechnol. Bioproc), 83–88.
- Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25(24), 2055–2059. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18>
- Patel, U. D., & Suresh, S. (2008). Complete dechlorination of pentachlorophenol using palladized bacterial cellulose in a rotating catalyst contact reactor. *Journal of Colloid*

- and Interface Science*, 319(2), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.12.019>
- Patil, S. V., Salunke, B. K., Patil, C. D., & Salunkhe, R. B. (2011). Studies on amendment of different biopolymers in sandy loam and their effect on germination, seedling growth of *Gossypium herbaceum* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(6), 780–791. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9082-1>
- Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Mandala, I. (2016). Food Hydrocolloids Bacterial cellulose as stabilizer of o / w emulsions. *Food Hydrocolloids*, 53, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>
- Phisalaphong, M., & Jatupaiboon, N. (2008). Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose – chitosan film, 74, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.004>
- Pirkkalainen, K., Leppänen, K., Vainio, U., Webb, M. A., Elbra, T., Kohout, T., ... Serimaa, R. (2008). Nanocomposites of magnetic cobalt nanoparticles and cellulose. *European Physical Journal D*, 49(3), 333–342. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2008-00180-5>
- Pirkkalainen, K., Vainio, U., Kisko, K., Elbra, T., Kohout, T., Kotelnikova, N. E., & Serimaa, R. (2007). Structure of nickel nanoparticles in a microcrystalline cellulose matrix studied using anomalous small-angle X-ray scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 40(SUPPL. 1), 489–494. <https://doi.org/10.1107/S0021889806055804>
- Poyrazoğlu, E., & Biyik, H. (2011). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5, 10(27), 5346–5354. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1693>
- Prasanna, M., Mishra, P., & Thomas, C. (2004). Delayed primary closure of the burn wounds. *Burns*, 30(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2003.09.028>
- Premjet, S., Premjet, D., & Ohtani, Y. (2007). The Effect of Ingredients of Sugar Cane Molasses on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. *Fiber*, 63(November 2015), 193–199. <https://doi.org/10.2115/fiber.63.193>
- Ramana, K. V, Tomar, A., & Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 245–248. <https://doi.org/10.1023/A:1008958014270>

- Reed, B. E., & Arunachalam, S. (1994). Solution pH and Complexing Agents Solution pH has been identified as the variable governing metal adsorp-. *Journal of Environmental Engineering*, 120(2), 416–436.
- Rezaee, Abbas and Asadikaram, Gholamreza and Mirzai, Mohammad and Naimi, Nayera and Dargahi, Rosa and Sadegi, A. (2008). Removal of arsenic using *Acetobacter xylinum* cellulose. *Journal of Biological Sciences*, 8, 209–212.
- Rezaee, A., Derayat, J., Mortazavi, S. B., Yamini, Y., & Jafarzadeh, M. T. (2005). Removal of Mercury from chlor-alkali Industry Wastewater using *Acetobacter xylinum* Cellulose. *American Journal of Environmental Sciences*, 1(2), 102–105.
<https://doi.org/10.3844/ajessp.2005.102.105>
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009>
- Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the Water Holding Capacity of Microbial Cellulose. *Biotechnology Letters*, 27(19), 1435–1438.
<https://doi.org/10.1007/s10529-005-1465-y>
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786–794.
<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- Serafica, G., Mormino, R., & Bungay, H. (2002). Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(6).
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-0978-8>
- Shah, J., & Malcolm Brown, R. (2005). Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 352–355.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1756-6>
- Shah, N., Ha, J. H., & Park, J. K. (2010). Effect of reactor surface on production of bacterial cellulose and water soluble oligosaccharides by *gluconacetobacter hansenii* PJK. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 110–118.
<https://doi.org/10.1007/s12257-009-3064-6>

- Shezad, O., Khan, S., Khan, T., & Park, J. K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.052>
- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S.-I., Ogawa, M., Nishi, N., & Tokura, S. (1994). Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(6), 297–300. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90059-0)
- Shoda, M., & Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/bf02931175>
- Son, H.-J., Kim, H.-G., Kim, K.-K., Kim, H.-S., Kim, Y.-G., & Lee, S.-J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource Technology*, 86(3), 215–219. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00176-1)
- Son, H., Heo, M., Kim, Y., & Lee, S. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), 1–5. <https://doi.org/10.1042/BA20000065>
- Song, H., Li, H., Seo, J., Kim, M., & Kim, S. (2009). Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes, 26(1), 141–146.
- Srivastava, S. K., Gupta, V. K., & Mohan, D. (1997). Removal of Lead and Chromium by Activated Slag—A Blast-Furnace Waste. *Journal of Environmental Engineering*, 123(5), 461–468. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1997\)123:5\(461\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:5(461))
- Stephens, R. S., Westland, J. A., & Neogi, A. N. (1990). Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US4960763>
- Sun, D., Yang, J., Li, J., Yu, J., Xu, X., & Yang, X. (2010). Novel Pd-Cu/bacterial cellulose nanofibers: Preparation and excellent performance in catalytic denitrification. *Applied Surface Science*, 256(7), 2241–2244. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.10.034>

- Sutherland, I. W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 12(2), 393–448. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(94)90018-3)
- Suwannapinunt, Neelobon and Burakorn, Jirapon and Thaenthanee, S. (2007). Effect of culture conditions on bacterial cellulose (BC) production from *Acetobacter xylinum* TISTR976 and physical properties of BC parchment paper. *Suranaree J. Sci. Technol*, 14(357–365).
- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P., & Phunsri, A. (2005). Effect of Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter* sp. *J. Sci. Res. Chula. Univ*, 30(2), 179–186.
- Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E., & Kawamura, Y. (1997). Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(3), 228–231. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82059-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82059-4)
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., & Kopsahelis, N. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams, 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>
- Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>
- Ul-islam, M., Khan, S., Khattak, W. A., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2015). *Synthesis , Chemistry , and Medical Application of Bacterial Cellulose Nanocomposites*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2473-0>
- URL-1. (2016). What is Molasses? Retrieved June 24, 2017, from <https://www.thespruce.com/what-is-molasses-1328678>
- URL-2. (2013). Melas. Retrieved June 24, 2017, from <http://www.turkseker.gov.tr/Urunler.aspx?KOD=01.02>
- URL-3. (2017). Melas, Şeker Pancarı Atığı. Retrieved June 24, 2017, from <http://www.imalatansiklopedileri.com/makaleler/detaylar/melas-seker-pancari-atigi-nedirozelliklerikullanim-alanlari.html>

- URL-4. (2017). MELAS ve KULLANIM ALANLARI. Retrieved June 24, 2017, from <http://privatization-ozellestirme.blogspot.com.tr/2015/11/melas-uretimi-ve-kullanim-alanlari.html>
- Valla, S., & Kjosbakken, J. (1981). Isolation and characterization of a new polysaccharide from a cellulose-negative strain of *Acetobacter xylinum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 3, 599–602.
- Vasconcelos, N. F., Feitosa, J. P. A., da Gama, F. M. P., Moraes, J. P. S., Andrade, F. K., de Souza Filho, M. de S. M., & Rosa, M. de F. (2017). Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. *Carbohydrate Polymers*, 155, 425–431. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.090>
- Vitta S, Drillon M, D. A. (2010). Magnetically responsive bacterial cellulose: synthesis and magnetic studies.
- Vyjayanthi, J.P and Suresh, S. (2010). Decolorization of Drimarene Red Dye Using Palladized Bacterial Cellulose in a Reactor. *Water Environment Research*, 82, 601–609. <https://doi.org/doi:10.2175/106143009X12529484816114>
- Wallace, Arthur and Terry, R. E. and others. (1998). *Handbook of soil conditioners*.
- Wan, Y. Z., Luo, H., He, F., Liang, H., Huang, Y., & Li, X. L. (2009). Mechanical, moisture absorption, and biodegradation behaviours of bacterial cellulose fibre-reinforced starch biocomposites. *Composites Science and Technology*, 69(7–8), 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2009.02.024>
- Watanabe, K., Eto, Y., Takano, S., Nakamori, S., Shibai, H., & Yamanaka, S. (1993). A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. *Cytotechnology*, 13(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/BF00749937>
- Wu, J.-M., & Liu, R.-H. (2012). Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.003>
- Yamanaka, S., & Ishihara, M. (2000). Structural modification of bacterial cellulose, 213–225.
- Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., ... Lin, Q. (2017). Synthesis of bacterial

- cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 72, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>
- Yang, X. Y., Huang, C., Guo, H. J., Xiong, L., Li, Y. Y., Zhang, H. R., & Chen, X. D. (2013). Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 995–1002. <https://doi.org/10.1111/jam.12255>
- Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S. (1998). Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 312–317. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)85681-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)85681-4)
- Yılmaz, S. (2007). *ALTERNATİF BESİN YAN ÜRÜNLERİNDEN BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ*. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Yılmaztekin, M. (2009). *BİYOTEKNOLOJİK YOLDAN DOĞAL İZOAMİL ASETAT VE ETİL ASETAT AROMALARININ ÜRETİMİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR*. Çukurova Üniversitesi.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). 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. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.219>
- Yu, X., & Atalla, R. H. (1996). Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(2), 145–146. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)01109-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)01109-9)
- Zhou, W., Zhu, D., Tan, L., Liao, S., Hu, Z., & Hamilton, D. (2007). Extraction and retrieval of potassium from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology*, 98(1), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.011>
- Zhu, H., Jia, S., Wan, T., Jia, Y., Yang, H., Li, J., ... Zhong, C. (2011). Biosynthesis of spherical Fe₃O₄/bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1558–1564. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.061>

Zimmermann, K. A., LeBlanc, J. M., Sheets, K. T., Fox, R. W., & Gatenholm, P. (2011). Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, 31(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.007>

