



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BIY-DR-2007-0002**

**YÜZEY KÜLTÜR FERMENTASYON YÖNTEMİ İLE
BAZI ASETİK ASİT BAKTERİLERİNDEN
EKSTRASELLULAR POLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK**

AYDIN-2007

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BIY-DR-2007-0002

YÜZEY KÜLTÜR FERMENTASYON YÖNTEMİ İLE
BAZI ASETİK ASİT BAKTERİLERİNDEN
EKSTRASELLULAR POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK

AYDIN-2007

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN) tarafından hazırlanan “Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi” başlıklı tez, 20.08.2007 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir. tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan: Prof. Dr. İsmail KARABOZ	Ege Üniversitesi	
Üye : Prof.Dr.Kurtuluş OLGUN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Yrd.Doç.Dr.Halil BIYIK	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Mustafa ATEŞ	Ege Üniversitesi	
Üye : Yrd.Doç.Dr.Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun.....sayılı kararıyla(../...../2007)tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

İmza :

ÖZET

Doktora Tezi

YÜZEY KÜLTÜR FERMENTASYON YÖNTEMİ İLE BAZI ASETİK ASİT BAKTERİLERİNDEN EKSTRASELLULAR POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. H.Halil BIYIK

Bu çalışmada özellikle şarap ve sirkeden, ayrıca elma ve üzüm suyundan, selüloz üreten bakteriler izole edilmiştir. Bu izolatlardan selüloz üretim verimi en yüksek olan iki izolat seçilmiş ve bu izolatlar, klasik ve moleküler taksonomiye göre *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olarak tanımlanmıştır. Bu strainlerin, karbon ve azot kaynakları, inkübasyon sıcaklıkları ve pH' ları değiştirilerek selüloz üretim verimleri optimize edilmiştir. Mikrobiyoloji kültür koleksiyonu DSMZ (Almanya Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürü Koleksiyonu)'den alınan *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 ve *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainleri ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, optimum şartlardaki selüloz üretim verimleri melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu ve corn steep liquor gibi ucuz atık maddeler kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Selüloz üretiminde en iyi karbon kaynağının glikoz, en iyi azot kaynağının ise yeast ekstrakt olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sıcaklık ve pH denemeleri sonucunda; en iyi sıcaklık derecesinin 30°C, en iyi pH'ın da 6,5 olduğu saptanmıştır. Kullanılan atık maddeler içerisinde melas, peynir altı suyu ve corn steep liquor içerikli besiortamlarında hücre gelişimi ile birlikte selüloz üretimi gözlenmiştir. Sadece zeytin karasuyunda hiçbir mikroorganizma gelişimi olmamış ve buna bağlı olarak da selüloz üretimi gerçekleşmemiştir. Bu çalışmada, kullanılan tüm besiortamlarında, en yüksek selüloz üretim veriminin, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininde, en düşük selüloz üretim veriminin ise *Acetobacter aceti* DSM 3508 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinde olduğu belirlenmiştir. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin morfolojik görüntüleri ile, optimum şartlarda elde edilen selülozun ağsı yapısı SEM'de görüntülenmiştir. Aynı zamanda, bakteriyel selülozun, enzimatik ve TFA ile asidik hidrolizinin TLC analizi sonucunda, monosakkarit içeriğinin glukoz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bakteriyel selülozun NMR ve FT-IR spektrofotometre analizleri ile kimyasal yapısı incelenmiştir.

2007, 207 sayfa

Anahtar Sözcükler

Bakteriyel selüloz, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, optimizasyon, durgun kültür

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

**EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCTION FROM SOME
ACETIC ACID BACTERIA BY MEANS OF SURFACE CULTURE
FERMENTATION METHOD**

Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. H.Halil BIYIK

In the present study, cellulose producing bacteria were isolated mainly from wine and vinegar as well as apple juice and grape juice. Two strains having highest bacterial cellulose productivity were selected and these isolates were identified as *Acetobacter pasteurianus* HBB6 and *Acetobacter lovaniensis* HBB5 using classical and molecular taxonomy methods. In order to optimize the yield of cellulose production of these strains, carbon and nitrogen sources, incubation temperatures and pH conditions were adjusted. In addition, cellulose producing output of *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 and *Acetobacter aceti* DSM 3508 strains, which were taken from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, as well as *Acetobacter pasteurianus* HBB6 and *Acetobacter lovaniensis* HBB5 were examined by using some cheap waste substances like molasses, whey, olive oil black water and corn steep liquor and the results were compared.

According to the results of this study, the best carbon and nitrogen sources are glucose and yeast extract, respectively. On the other hand, 30 °C and pH 6.5 was found optimal for the highest yield of cellulose production. Among the waste substances examined, cellulose production along with growth of microorganism was observed in the media containing molasses, whey and corn steep liquor. But, no microorganism growth was detected only in use of black water of olive oil, so cellulose production did not take place. In this work, the highest cellulose producing output were found in *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strain while *Acetobacter aceti* DSM 3508 and *Acetobacter lovaniensis* HBB5 were the lowest cellulose producers in the all media examined.

Morphological view of *Acetobacter pasteurianus* HBB6 and *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strains and the bundle structure of cellulose which produced at optimum conditions were monitored by scanning electron microscopy. At the same time, as a result of enzymatic hydrolyse and acidic hydrolyse by TFA and TLC analyze, glucose was found as the main content of bacterial cellulose monosaccharide. Besides, the chemical structure of bacterial cellulose was examined by NMR and FT-IR spectrophotometer.

2007, 207 pages**Key Words:**Bacterial cellulose, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, optimization, static culture

ÖNSÖZ

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde her zaman büyük desteğini gördüğüm ve çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, bilgisini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. H.Halil BIYIK'a, Doktora Tez İzleme Komitem'de bulunan ve tez çalışmam sırasında benden değerli görüş ve önerilerini esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kurtuluş OLGUN'a ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D.'nin değerli hocalarından Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında, deneysel araştırmalarım sırasında bana fedekarca destek olan sevgili arkadaşlarım ve meslektaşlarım Arş. Gör. Burcu İŞMAN'a, Arş. Gör. Öznur ARAT'a, Arş. Gör. Ş.Gökçe ZENCİRCİ'ye ve Biyolog Aslı ŞAHİNER'e ve ayrıca tez çalışmamda emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana göstermiş oldukları ilgi ve deneyimsel katkılarından dolayı, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün değerli öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nün değerli öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Yüksel ŞAHİN'e, ve Arş. Gör. Emrah GİZİROĞLU'na, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a ve Sayın Dr. Tatiana BOGDANOVICH'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamın yürütülebilmesi için gerekli finansal desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, TÜBİTAK'a ve Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana her zaman manevi yönden destek olan sevgili arkadaşlarım Umut OĞUZ'a, Bülent OĞUZ'a ve Barış DAĞTEKİN'e teşekkür ederim.

Aldığım eğitim ve öğretim boyunca daima ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyen canım annem Şükran ÇOBAN ve babam Yusuf ÇOBAN'a, gereksinim duyduğum her zaman yanımda olan ve çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm annem Fatma POYRAZOĞLU'na ve babam Hasan Fehmi POYRAZOĞLU'na içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim eşim Avukat İlkin Barış POYRAZOĞLU'na ve tez çalışmam sebebiyle yeterince ilgilenemediğim fakat buna rağmen sevgisi ve sevimliliği ile bana her zaman manevi güç veren küçük oğlum Alp POYRAZOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	4
2.1. Karbohidratlar	5
2.2. Mikrobiyal Polisakkaritler ve Ekstrasellular Polisakkaritler	11
2.2.1. Mikrobiyal polisakkaritlerin uygulama alanları	12
2.3. Bakteriyal Selüloz	13
2.3.1. Asetik asit bakterileri	14
2.3.1.1. <i>Acetobacter</i>	15
2.3.1.2. <i>Gluconobacter</i>	16
2.3.2. Asetik asit bakterilerinin doğal kaynaklardan izolasyonu ve identifikasyonu	17
2.4. Bakteriyal Selülozun Tarihçesi	17
2.5. Bakteriyal Selülozun Yapısı	18
2.6. Bakteriyal Selüloz Sentezleyen Mikroorganizmalar	21
2.7. Bakteriyal Selülozun Kimyasal Analizi ve Saptanması	22
2.8. Bakteriyal Selülozun Fizyolojik Fonksiyonları	23
2.9. Bakteriyal Selülozun Biyosentezi	23
2.9.1. Selüloz öncülünün sentezi	24
2.9.2. Selüloz sentaz	25
2.9.3. Biyosentez mekanizması	27
2.9.3.1. 1,4-β-Glukan polimerizasyonun mekanizması	27
2.9.3.2. Selüloz zincirinin oluşumu ve kristalizasyonu	29
2.9.4. Bakteriyal selülozun regülasyonu	30
2.10. <i>Acetobacter xylinum</i> 'un Sentezlediği Çözünebilir Polisakkaritler	32
2.11. <i>Acetobacter xylinum</i> tarafından sentezlenen endo ve ekzoselülozların rolü.....	33
2.12. Bakteriyal Selülozun Biyodegradasyonu	33
2.13. Biyoteknolojik Özellikler	35
2.13.1. Bakteriyal selüloz üreten strainlerin doğal kaynaklardan izolasyonu ve gelişimi	35
2.13.2. Genetik mühendisliği ile selüloz üreten strainlerin geliştirilmesi	36
2.13.3. Fermentasyon yöntemi	37
2.13.3.1. Karbon ve azot kaynakları	38
2.13.3.2. pH ve sıcaklığın etkisi	39
2.13.3.3. Durgun ve çalkalamalı kültürler, fermentör çeşitleri	40
2.13.3.4. Sürekli kültür	43

2.14. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması	43
2.15. Bakteriyal Selülozun Özellikleri	44
2.16. Uygulama Alanları	46
2.16.1. Teknik uygulamalar	47
2.16.2. Tıbbi uygulamalar	48
2.16.3. Gıda uygulamaları	49
2.16.4. Genel kullanım alanları	50
2.17. Patentler	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM	54
3.1. Materyal	54
3.1.1. Kimyasallar	54
3.1.2. Örnekler	55
3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar	56
3.1.4. Bakteriyal selüloz (ekzopolisakkarit) üretiminde kullanılan karbon ve azot kaynakları	56
3.1.5. Bakteriyal selüloz üretiminde enerji kaynağı olarak kullanılan atık maddeler	56
3.1.6. Besiortamları	57
3.1.7. Çözeltiler ve Boyalar	64
3.2. Yöntem	74
3.2.1. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu	74
3.2.2. Bakteriyal selüloz üreten bakterilerin seçilmesi	74
3.2.3. İzolatların Tanımlanması	75
3.2.3.1. Morfolojik özellikler	75
3.2.3.2. Kültürel özellikler	76
3.2.3.3. Biyokimyasal özellikler	76
3.2.4. İzolatların Büyüme Eğrisinin Çıkarılması	78
3.2.5. Hücre Kuru Ağırlığının Belirlenmesi	78
3.2.6. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve Kuru Ağırlığının Belirlenmesi	78
3.2.7. Bakterilerdeki Spesifik Selüloz Verim Katsayısının Saptanması	79
3.2.8. Toplam Şeker Analizi	79
3.2.9. Farklı Parametrelerin Hücre Kuru Ağırlığı ve Bakteriyal Selüloz Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	80
3.2.10. Bakteriyal Selüloz Üretiminde Kullanılan Atık Maddeler ve Uygulanan Ön İşlem	80
3.2.10.1. Melas	80
3.2.10.2. Peynir altı suyu (PAS)	81
3.2.10.3. Zeytin karasuyu	82
3.2.11. 16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizi	83
3.2.11.1. Bakterilerden DNA ekstraksiyonun hazırlanması	83
3.2.11.2. DNA'nın agaroz jel elektroforezi	84
3.2.11.3. DNA Baz Dizisinin Belirlenmesi	84
3.2.12. İzolatların SEM (Taramalı Elektron Mikroskop)'de Görüntülenmesi	84
3.2.13. Bakteriyal Selülozun SEM (Taramalı Elektron Mikroskop)'de Görüntülenmesi	85

3.2.14. Bakteriyal Selülozun Monosakkarit İçeriğinin	
İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi	85
3.2.14.1. Bakteriyal selülozun enzimatik (selülaz ile) hidrolizi	86
3.2.14.1.1. <i>Aspergillus niger</i> HBF 40 ve <i>Trichoderma sp.</i>	
HBF 110 funguslarından selülaz enziminin eldesi	86
3.2.14.1.1.1. Kalitatif tarama	86
3.2.14.1.1.2. Selülaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi için	
kullanılan fermentasyon ortamı	87
3.2.14.1.1.3. Selülaz enziminin aktivitesinin ölçülmesi	87
3.2.14.2. Bakteriyal selülozun TFA (Trifluoroasetik asit) ile hidrolizi	89
3.2.15. Bakteriyal Selülozun CP/MAS ¹³C Katı NMR Analizi	89
3.2.16. Bakteriyal Selülozun FT-IR Spektrometresi ile Analizi	89
4. BULGULAR	90
4.1. İzolatların İdentifikasyonu	91
4.1.1. Mikroskopik özellikler	91
4.1.2. Kültürel özellikler	91
4.1.3. Biyokimyasal özellikler	93
4.1.4. 16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizleri	94
4.1.5. İzolatların filogenetik ağaçlarının oluşturulması	98
4.1.6. Strainlerin SEM (Scanning Elektron Mikroskop)'de	
görüntülenmesi	101
4.2. Strainlerin Büyüme Eğrisi	102
4.3. Total Şeker Tayini İçin 470 nm'de Çıkarılan Standart Eğri	105
4.4. Bakteriyal Selülozun Yüzey Kültür Fermentasyonu ile Oluşumu	106
4.5. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve	
Liyofilize Edilerek Kurutulması	106
4.6. Bakteriyal Selülozun SEM	
(Scanning Elektron Mikroskop)'de Görüntülenmesi	108
4.7. Farklı Parametrelerin Hücre Kuru Ağırlığı ve	
Bakteriyal Selüloz Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	109
4.7.1. Kullanılan karbon ve azot kaynaklarının hücre kuru	
ağırlığı ve bakteriyal selüloz üretimi üzerine etkisi	109
4.7.2. Farklı sıcaklık derecelerinin etkisi	116
4.7.2.1. HS Broth ortamında farklı sıcaklık derecelerinin etkisi	116
4.7.2.2. Melashı besi ortamında farklı sıcaklık derecelerinin etkisi	119
4.7.3. Farklı pH'ların etkisi	121
4.7.3.1. HS Broth ortamında farklı pH'ların etkisi	121
4.7.3.2. Melas ortamında farklı pH'ların etkisi	124
4.8. Atık Maddelerin ve Temel Ortamın, Bakteriyal Selüloz Üretimi	
ve Hücre Kuru Ağırlığı Üzerine Etkisi	127
4.9. Bakteriyal selülozun enzimatik (selülaz ile) hidrolizi	135
4.9.1. <i>Aspergillus niger</i> HBF 40 ve <i>Trichoderma sp.</i> HBF 110	
funguslarından selülaz enziminin eldesi	135
4.9.2. Bakteriyal selülozun Trifluoroasetik asit (TFA) ile hidrolizi	136
4.10. Bakteriyal Selülozun CP/MAS ¹³C Katı NMR Analizi	137
4.11. Bakteriyal Selülozun FT-IR Spektrometresi ile Analizi	140

5.TARTIŞMA	142
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	172
KAYNAKLAR	175
ÖZGEÇMİŞ	206

SİMGELELER DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
BS	Bakteriyal selüloz
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
CBH	Sellobiyohidrolaz
c-di-GMP	Siklik digüanozin monofosfat
Cel ⁻	Selüloz negatif mutant
CM	Karboksimetil
CMC	Karboksimetil selüloz
CS	Selüloz sentaz
CSL	Corn steep liquor
DNS	Dinitro salisilik asit
DP	Polimerizasyon derecesi
DSMZ	Almanya Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürü Koleksiyonu
EMS	Etil metan sülfonat
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
FBP	Fruktoz-1,6-bifosfat fosfotaz
FK	Fruktokinaz
Fru-bi-P	Fruktoz-1,6-bifosfat
Fru-6-P	Fruktoz-6-fosfat
Fru-1-P	Fruktoz-1-fosfat
FTIR	Fourier transformed infrared spectrometry
GK	Glukokinaz
Glc	Glukoz
Glc-6(1)-P	Glukoz-6(1)-fosfat
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
Gr	Gram boyama
GYC	Glukoz yeast karbonat besiortamı
HCl	Hidrojen klorid
HS	Hestrin ve Schramm besiortamı (1954)
Lip	Lipid
LP	UDPGPT: lipid pirofosfat: UDPGlc-fosfotranferaz
LPP	Lipid pirofosfatfosfohidrolaz
NaCl	Sodyum klorid
NG	N/-nitro-N-nitroguanidin
NMR	Nüklear magnetik rezonans
PAS	Peynir altısuyu
PS	Bitkisel selüloz
PDEA	Fosfodiesteraz A
PDEB	Fosfodiesteraz B
Pel ⁻	Pellik oluşturmayan
Pel ⁺	Pellik oluşturan
1PFK	Fruktoz-1-fosfat kinaz
PGA	Fosfoglukonik asit
PGI	Fosfoglukoizomeraz
PGM	Fosfoglukomutaz

PTS	Fosfotransferaz sistemi
SEM	Taramalı elektron mikroskop
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SukS	Sukroz sentaz
TBE	Tris- borik asit- EDTA
TFA	Trifloroasetik asit
TK	Terminal kompleks
TLC	İnce tabaka kromatografisi
U	Uridin
UDP	Uridin difosfat
UDPGlc	Uridin difosfoglukoz
UGP	Pirofosforolaz uridin difosfoglukoz
UMP	Uridin monofosfat
UV	Ultraviyole
YPD Agar	Yeast ekstrakt agar
%	Yüzde
&	Ve
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrad
cm	Santimetre
dk	Dakika
et al.	Ve arkadaşları
g	Gram
<i>g</i>	Yer çekimi ivmesi
HBB5	Halil Bıyık Bakteri 5
HBB6	Halil Bıyık Bakteri 6
HBF40	Halil Bıyık Fungus 40
HBF110	Halil Bıyık Fungus 110
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
L	Litre
μg	Mikro gram
μL	Mikro litre
μm	Mikro metre
M	Molarite
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL (ml)	Mililitre
m	Metre
mm	Milimetre
mm^3	Milimetre küp
N	Normalite
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
Pa.s	Paskal saniye
pH	H^+ iyonu konsantrasyonu
ppm	Milyonda bir kısım

Rpm	Dakikadaki devir sayısı
sp	Tür
subsp.	Alt tür
v/v	Hacim/hacim
ve ark.	Ve arkadaşları
Yp/x	Spesifik ürün verimi katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selülozun sentezi.....	10
Şekil 2.2. Bakteriyal ve bitkisel selülozun fibril yapısı.....	18
Şekil 2.3. <i>Acetobacter xylinum</i> 'un durgun kültürde sentezlediği bakteriyal selülozun SEM'de görüntüsü.....	19
Şekil 2.4a. Bakteriyal selülozun iç zincirindeki hidrojen bağları.....	19
Şekil 2.4b. Bakteriyal selülozun dış zincirindeki hidrojen bağları.....	19
Şekil 2.5. Durgun ve çalkalamalı kültür ortamında bakteriyal selüloz pelliğinin oluşumu.....	20
Şekil 2.6. <i>A.xylinum</i> straininde karbon metabolizmasının yolu.....	25
Şekil 2.7. Brown, R.M.,JR. et al., (2000) tarafından tasarlanan β -1,4-glukan zincirindeki polimerizasyon.....	28
Şekil 2.8. Brown'ın modeline göre bakteriyal selüloz sentezinin basitleştirilmiş modeli.....	29
Şekil 2.9. <i>Acetobacter xylinum</i> 'un sentezlediği selüloz subfibrillerinin oluşum modeli.....	30
Şekil 2.10. c-di-GMP'nin yapısı - <i>A.xylinum</i> 'un allosterik aktivatörü	30
Şekil 2.11. <i>A. xylinum</i> 'un selüloz sentezinde önerilen model	32
Şekil 2.12. Sukroz sentaz (SukS) genini içeren rekombinant <i>A.xylinum</i> straininde UDPGlc biyosentez yolu.....	37
Şekil 4.1. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 ve <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainlerinin GYC Agardaki görüntüsü	90
Şekil 4.2. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 ve <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainlerinin, Gram boyamaları ve boyutları.....	91
Şekil 4.3. Kolonilerin GYC ve HS agardaki görüntüsü.....	92
Şekil 4.4. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 ve <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainlerinin bromcresol green'li besi ortamında gelişimi.....	92
Şekil 4.5. 31c ve 8a strainlerinin toplam DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.....	94
Şekil 4.6. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 strainin SEM'deki görüntüsü	101

Şekil 4.7. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainin SEM’deki görüntüsü.....	102
Şekil 4.8. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 strainin 660 nm’de büyüme eğrisi.....	104
Şekil 4.9. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5 strainin 660 nm’de büyüme eğrisi.....	104
Şekil 4.10. Total şeker tayini için 470 nm dalga boyundaki standart eğri.....	105
Şekil 4.11. Bakteriyal selüloz, HS fermentasyon besiortamının üst yüzeyinde zar şeklinde oluşumu.....	106
Şekil 4.12. Saflaştırılmış bakteriyal selüloz, şeffaf pellik şeklinde	106
Şekil 4.13. Saflaştırılmış bakteriyal selülozun liyofilizatörde kurutulma şekli.....	107
Şekil 4.14. Kurutulmuş bakteriyal selüloz ile Whatman no 398 filtre kağıdının görüntüsü.....	107
Şekil 4.15. Bakteriyal selülozun SEM’de x 5000 ve x 1000’deki görüntüsü.....	108
Şekil 4.16. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	115
Şekil 4.17. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	116
Şekil 4.18. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin HS besiortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	118
Şekil 4.19. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin HS besiortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	118

Şekil 4.20. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin, melaslı besiortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	120
Şekil 4.21. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin, melaslı besiortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	121
Şekil 4.22. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin, HS besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	123
Şekil 4.23. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin, HS besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	124
Şekil 4.24. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin, melaslı besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	126
Şekil 4.25. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin, melaslı besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	127
Şekil 4.26. Farklı strainlerin, farklı besiortamlarındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyal selüloz miktarları.....	134
Şekil 4.27. Bakteriyal selülozun, enzimatik hidrolizi.....	135
Şekil 4.28. <i>Aspergillus niger</i> HBF 40 ve <i>Trichoderma sp.</i> HBF 110 funguslarının kalitatif olarak selülotik aktivitesinin belirlenmesi.....	136
Şekil 4.29. Bakteriyal selülozun TFA ile hidrolizi.....	137
Şekil 4.30. Selülozun kimyasal yapısı.....	137
Şekil 4.31. Bakteriyal selülozun, CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiği.....	138
Şekil 4.32. CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiği (Hesse, St. ve Jäger, Ch., 2005).....	138
Şekil 4.33. Bakteriyal selülozun CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiğinde, 180 ppm ve 20 ppm'deki pikler.....	139

Şekil 4.34. Selüloz triasetat polimorflarının (CTA I ve CTA II)	
katı NMR analiz grafiği.....	140
Şekil 4.35. Durgun kültürde üretilen bakteriyal selülozun	
FT-IR spektrofotometre analiz sonucu.....	140
Şekil 4.36. Selülozun FTIR analizi (Cao, Y. et al., 2002).....	141

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen ve endüstriyel olarak önemli başlıca polisakkaritler ve kullanım alanları.....	13
Çizelge 2.2. Asetik asit bakterilerinin genel özellikleri	15
Çizelge 2.3. <i>Acetobacter</i> ve <i>Gluconobacter</i> genusları arasındaki farklar	17
Çizelge 2.4. Bakteriyal selüloz üreten bazı mikroorganizmalar ve selüloz yapısı.....	22
Çizelge 2.5. Bakteriyal selülozun uygulama alanları.....	46
Çizelge 2.6. Patentler.....	52
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan örnekler ve izolat sayıları	55
Çizelge 3.2. Standart deney ortamı.....	88
Çizelge 3.3. DNS çözeltilisinin bileşenleri.....	88
Çizelge 4.1. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 ve <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainlerinin taksonomik özellikleri.....	93
Çizelge 4.2. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin filogenetik ağacı.....	99
Çizelge 4.3. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin filogenetik ağacı.....	100
Çizelge 4.4. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 ve <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 strainlerinin HS Broth besi ortamında 660 nm’de zamana karşı gösterdikleri absorbans değerleri.....	103
Çizelge 4.5. 470 nm’de 10–100 µg/ml aralıktaki Glukoz çözeltilerinin absorbans değerleri.....	105
Çizelge 4.6. <i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	114
Çizelge 4.7. <i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarı.....	115
Çizelge 4.8. HS broth besi ortamında farklı sıcaklıkların etkisi.....	117

Çizelge 4.9. Melas içerikli besiortamında farklı sıcaklıkların etkisi.....	120
Çizelge 4.10. HS broth’da farklı pH’ların etkisi.....	123
Çizelge 4.11. Melas içerikli besiortamında farklı pH’ların etkisi.....	126
Çizelge 4.12. Farklı strainlerin, HS broth besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları.....	132
Çizelge 4.13. Farklı strainlerin, melas içerikli besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları	133
Çizelge 4.14. Farklı strainlerin, CSL içerikli besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları	133
Çizelge 4.15. Farklı strainlerin, peynir altısuğu içerikli besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları.....	134

1. GİRİŞ

Son yıllarda özellikle endüstriyel biyoteknoloji metotları kullanılarak, mikrobiyal ürünlerin üretilmesi ile ilgili araştırmaların sayısında artış olmuştur. Moleküler biyolojide yeni gelişen yöntemler, mikroorganizmaların hücresel yapılarını, endüstriyel biyoteknolojide daha kullanılır hale getirmiştir. Tarihsel süreçte, yıllardır ve özellikle de savaş ve kıtlık döneminde endüstriyel mikrobiyoloji yöntemleri ile elde edilen değişik ürünler, insanların hizmetine sunulmuştur. Günümüzde, tarımla elde edilen birçok ürünün ekonomik olarak mikroorganizmalarca üretimi rekabet düzeyini engellese de, uygulanan moleküler teknikler ile bu olumsuz koşulun aşılabacağı şüphesizdir. İnsanların sanayi ve tarımsal alanda oluşturduğu kirlilik, dünyayı global bir tehlikeye sürüklediği için, daha temiz ve çevre dostu olan mikroorganizma ürünlerinin kullanımının, bilimsel alandaki bu hızlı gelişmeyle daha da artması beklenmektedir.

Günümüzde değişik endüstriyel alanlarda, sayısız biyoteknolojik ürün kullanılmaktadır. Biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler, ihtiyacımız olan maddeleri doğaya zarar vermeden üretmenin yollarını olanaklı kılmıştır. Biyoteknolojik olarak kullanılan en önemli materyallerden biri polisakkaritlerdir. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan polisakkaritler, doğada rastlanan en önemli karbohidratlardan bir tanesidir. Endüstride kullanılan en önemli polisakkaritlerden biri ise selülozdur. Selüloz, birbirine β -1,4 bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz birimlerinin suda çözünmeyen, dallanmamış yapıdaki polimer bileşikleridir. Selüloz bitkilerde hücre duvarının temel yapı maddesidir. Ayrıca dünyada çok yaygın olarak bulunması nedeniyle, kağıt, tekstil, gıda ve kimya endüstrisinde önemli bir yer edinmiş durumdadır.

Dünyada ve ülkemizde kağıt sanayi ürünleri, çevremizde bulunan ve doğaya renk katan ağaçlardan elde edilmektedir. Her yıl yangınlar ve diğer nedenlerle sahip olduğumuz orman alanları azalmaktadır. Kağıt sanayisindeki hammaddenin değişmez olarak selüloz olduğu düşünülürse, doğanın bu sınırlı hammaddesinin yüzyıllarca aynı oranda insanlara hizmet edeceği düşünülemez. Gün geçtikçe yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalan ormanlarımızı kurtarmanın bir yolu da

özellikle selülozun, odun dışındaki başka alternatif kaynaklardan sağlanmasıdır. Dolayısıyla alternatif selüloz kaynaklarının yaratılması, yaşadığımız çevreye yapacağımız en büyük katkılardan biri olacaktır.

Son yıllarda biyoteknolojinin hızla ilerlemesi ile biyoteknologlar bitkiler olmadan da selüloz üretebilmenin yollarını aramışlardır. Son 30 yılda yapılan çalışmalar, selüloz ürettiği bilinen bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır ve *Acetobacter xylinum* adlı bir bakterinin yüksek verimde selüloz ürettiği ve bunun yüksek yapılı bitkilerin ürettiklerine benzer olduğunu keşfetmişlerdir (Brown, 1886). Bakteriler tarafından üretilen bu selüloza “Bakteriyal Selüloz” adı verilmiştir. Kağıt üretimi başta olmak üzere selülozun katıldığı diğer üretim mamülleri dikkate alındığında, bakteriyal selülozun taşıdığı önem yadsınamaz. 1 hektar yüzey alanına sahip durgun(durgun) kültürden yılda yaklaşık 10,000 kg bakteriyel polimer elde edilmesine karşılık, aynı alanda ve sürede sadece 600 kg pamuk yetiştirilebilmesi ekonomik önemin irdelenmesi açısından oldukça çarpıcıdır (Kudlicka, 1989).

Bitkisel selüloz, lignin, hemiselüloz ve diğer maddeler içermesine karşın bakteriyal selüloz saftır. Bitkisel selülozda bulunan, saflığı olumsuz yönde etkileyen ve uzaklaştırılması işçilik yükünü artıran maddelerin bakteriyal selülozda bulunmaması, önemli bir avantajdır. Bakteriyal selülozun bitkisel selüloza göre diğer bir avantajı ise bakteriyal selülozun, üretim aşamasında istenen özellikleri taşıyacak şekilde tasarlanabilmesi ve üretim sonrasındaki kimyasal uygulamalara elverişli olmasıdır. Ayrıca bakteriyal selüloz fibrilleri, bitkisel selüloz fibrillerinden daha dayanıklıdır. Bu özelliğinden dolayı daha kaliteli kağıt ve tekstil ürünlerinin elde edilmesinde kullanıma oldukça elverişlidir.

Acetobacter, *Rhizobium*, *Agrobacterium* ve *Sarcina* genuslarına ait bakteriler selüloz sentezleme yeteneğine sahip olmakla beraber (Jonas ve Farah,1998) selüloz üretim verimi en yüksek olan strain *Acetobacter xylinum*’dur (Yamada et al.,1997; Yamada, 2000).

Günümüzde bakteriyal selüloz üretiminde, endüstri kuruluşlarının atıkları da kullanılabilir. Bunlara örnek olarak, şeker fabrikası atıkları, patates işleme fabrikaları, sirke fabrikası, kağıt fabrikası ve konserve fabrikası atıkları verilebilir. Belirtilen endüstriyel kuruluşlara ait atık ürünler mikrobiyolojik veya kimyasal yöntemlerle bakterilerin kullanabileceği, basit yapılı bileşiklere dönüştürülüp, bakteriyal selüloz üretiminde kullanılabilir. Bu şekilde çevre kirlenmesine neden olan organik ve inorganik maddeler değerlendirilerek çevreye olan olumsuz etkileri giderilmiş olacaktır. Bu nedenle bakteriyal selüloz üreten mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalarda büyük oranda artış olmuştur.

Selülozun üretim ve kullanım süreçlerini incelersek; endüstride ve özellikle de biyoteknolojide hızla gelişen metotlar, belli sanayi ürünlerinin teknolojik olarak üretimine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla mikroorganizmaların ürettiği selülozun, insanların ihtiyaçlarını belli alanlarda karşılayacağı yadsınamaz bir gerçektir. Çalışmamızda, insanların ihtiyaç duyduğu selülozu, endüstriyel biyoteknoloji yöntemleri kullanarak elde etmek ve bu alanda eksik olan mikroorganizma taramalarını yapmak amaç edinilmiştir. Elde edilen verilerin, bu konuda sonradan çalışacak olanlara da yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca dünyada bakteriyal selüloz ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, özellikle Türkiye’de bu konuda yok denecek kadar az çalışmanın olduğu düşünülürse, yaptığımız bu çalışma oldukça önem kazanmaktadır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Bu bölümde; bu konu ile ilgili olarak gerek yurt içinde gerekse yurt dışında doğrudan veya dolaylı olarak yapılmış çalışmalar ele alınarak, karbohidratların genel yapısı ve çeşitleri; mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrasellular polisakkaritler ve bunların uygulama alanları; asetik asit bakterilerinin genel özellikleri, izolasyonları ve tanıları; bakteriyal selülozun tarihçesi, yapısı, özellikleri, kimyasal analizi, saflaştırılması, fizyolojik fonksiyonları, biyosentezi, biyodegradasyonu, üretimi ve üretimine etki eden faktörler incelenmiştir.

Brown (1886)'da asetik asit bakterilerinden olan *Acetobacter xylinum* adlı bir bakteri türünün ürettiği selülozun, yüksek yapılı bitkilerin ürettiklerine benzer olduğunu bulmuştur. Hestrin ve Schramm (1947 ve 1954)' de selüloz sentezleyen asetik asit bakterilerini, modifiye ettikleri HS besiortamında izole etmişler ve *Acetobacter xylinum*'u kullanarak bakteriyal selüloz sentezi ile ilgili yoğun çalışmalar yapmışlardır. Aynı zamanda Colvin (1957)' de, *Acetobacter xylinum*' u kullanarak bakteriyal selüloz üretimini araştırmıştır.

Birçok araştırmacı, *Acetobacter* türlerinin selüloz üretimini incelemiştir. Johnson et al. (1989)' da *Acetobacter xylinum*'un çalkalamalı ve durgun kültürde selüloz üretimlerini araştırmışlardır. Masaoka et al. (1993), yaptıkları çalışmada farklı karbon kaynaklarındaki selüloz üretim verimlerini incelemişler ve en yüksek verimin, glukoz varlığında olduğunu belirtmişlerdir. Oikawa et al. (1995), durgun kültürde, *Acetobacter xylinum* straininde, en yüksek selüloz üretiminin mannitol ve arabitol varlığında olduğunu saptamışlardır. Matsuoka et al. (1996), yaptıkları çalışmalarda etanol varlığında hücre gelişiminin ve selüloz üretiminin arttığını gözlemişlerdir. Tonouchi et al. (1996), çalkalamalı kültürde, *A. xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001 straininde en yüksek selüloz üretiminin, fruktoz varlığında olduğunu belirtmişlerdir. Toda et al. (1997), *Acetobacter xylinum* straininin çeşitli karbon kaynaklarındaki, selüloz üretimini araştırmışlardır. Yang et al. (1998), *Acetobacter xylinum* BRC5 straininin, fruktozlu ve sukrozlu besiortamındaki selüloz üretimini incelemişlerdir. Skinner et al. (2000),

Acetobacter xylinum'un farklı sıcaklıklarda, HS besiortamında selüloz üretimini araştırmışlardır. Son et al. (2001), çalkalamalı kültürde, *Acetobacter* sp. V6 izolatu ile yaptıkları çalışmada, farklı karbon kaynaklarında üretilen selüloz miktarını incelemişlerdir. Ishihara et al. (2002), yaptıkları çalışmada, *Acetobacter xylinum*, *A. pasteurianus* ve *A. hansenii* izolatlarının, pH 3,0-7,0 aralığındaki selüloz üretimlerini araştırmışlardır. Krystynowicz et al. (2002) ve Park et al. (2003), yaptıkları çalışmalarda etanol varlığında hücre gelişimini ve selüloz üretimini incelemişlerdir. Bae et al (2004), *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001 straini kullanarak bir jar fermentörde melaslı besiortamında bakteriyel selüloz üretimini araştırmışlardır. Chávez-Pacheco et al. (2005), *Gluconacetobacter xylinum* IFO 13693 strainin glukoz ve sukroz içerikli besiortamındaki, hücre gelişimi ve selüloz üretimini incelemişlerdir. Keskhk et al. (2006a), *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245'dan pancar melaslı besiortamında bakteriyel selüloz üretimini araştırmışlardır.

Dünyada bakteriyel selüloz konusu ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen ülkemizde bu konuda yeterli derecede çalışma yapılmamıştır. Sadece MEF Türkiye lise öğrencileri arası 12. araştırma projeleri yarışmasında, Dığrak ve ark. (2003)'nın rehberliğini yaptığı “*Acetobacter xylinum* DA tarafından bakteriyel selüloz üretimi” isimli çalışma sunulmuştur. Bu çalışmada, izole edilen *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter xylinum* strainlerinin farklı inkübasyon süreleri, pH değerleri ve karbon kaynakları açısından selüloz üretimleri incelenmiştir.

2.1. KARBOHİDRATLAR

Karbohidratlar doğada en bol bulunan makromoleküllerdir. Tüm canlılar için büyük önem taşıyan karbohidratlar bakteri, bitki ve hayvan metabolizmasında temel rol oynar. Fotosentez yoluyla üretilen karbohidratlar, fotosentez yapamayan diğer canlıların hücrelerinde enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılırlar. Fotosentezle üretilen karbohidratların bir kısmı proteinler ve yağlar vb. diğer organik maddelere dönüştürülür. Geri kalan kısım ise polisakkaritler olarak şeker polimerlerine dönüştürülür. Polisakkaritler, yeryüzündeki biyolojik ortamın kuru

madde olarak yaklaşık % 75'ini, insan kalori tüketiminin ise % 80'ini oluşturmaktadır. Karbohidratlar, hem gıdaların doğal bileşiminde bulunurlar hem de gıdalara büyük ölçüde dışarıdan katılırlar.

Doğada birçok üründe farklı moleküler büyüklük, yapı, şekil, polimerizasyon derecesi ve çözünürlük gösteren çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip karbohidratlar mevcuttur. Karbohidratlar, toksik olmadıkları için kullanımları güvenlidir ve doğada parçalanabilir özellikte oldukları için çevre kirliliği açısından uzun vadeli sorun oluşturmazlar. Kimyasal ve biyokimyasal değişimlere açıktır ve bu iki tür modifikasyon karbohidratların özelliklerini geliştirmek ve kullanımlarını artırmak için endüstriyel boyutta kullanılmaktadır (Saldamlı, 1998).

Karbohidratlar, canlılarda çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin; hayvanlarda glukoz, glikojen şeklinde depo edilerek enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde ise glukoz, nişasta şeklinde depo edilir ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Selüloz ise bitkilerin hücre duvarı yapısında, yapısal element olarak iş görür (Gözükara, 1994).

Karbohidratlar, moleküler büyüklükleri glukoz ve fruktoz gibi küçük moleküler ağırlığa sahip, basit şekerlerden başlayarak, amilopektin ve selüloz gibi çok büyük molekül ağırlıklı doğal polimerlere kadar büyük bir değişim göstermektedir. Bu polimerlerin bazıları tek bir şekerden (örneğin, amilopektin sadece glukozdan oluşmuştur) oluşabildiği gibi bazıları da birçok şekerden oluşabilmektedir. Bu kompleks karbohidratlar yapılarında çeşitli şekerlerin yanı sıra protein, lipid ve fenolik maddeleri de içermektedir.

Karbohidratlar, polihidroksi-aldehidler veya polihidroksi- ketonlardır. Bunlar karbon, hidrojen ve oksijen moleküllerinden meydana gelmişlerdir. Karbohidratların kapalı formülleri, $(CH_2O)_n$ şeklinde ifade edilir. Bazı karbohidratlar bu kapalı formüle uymaz; karbon, hidrojen ve oksijen molekülleri dışında azot, fosfor, sülfür gibi bazı elementleri de içerir. (Saldamlı, 1998).

Karbohidratlar mono-, oligo- ve polisakkaritler olmak üzere 3 sınıf içinde incelenir:

Monosakkaritler: Basit şekerlerdir, tek bir polihidroksi aldehit ya da keton biriminden oluşmuştur. Fruktoz, riboz, deoksiriboz, gliseraldehit ve dihidroksiaseton en önemli monosakkaritler olmasına rağmen, doğada en fazla bulunan monosakkarit, altı karbonlu şeker olan D-glukoz'dur.

Monosakkaritler renksiz ve kristal yapıda olup, çoğunlukla tatlıdır. Suda kolay çözünürler, polar yapıda olmayan çözücülerde ise çözünmezler. Yaygın olarak rastlanan monosakkaritler, dallanmamış ana zincir yapısına sahiptir. Bu yapıdaki C atomlarından bir tanesine çift bağla O atomu bağlıdır (C=O: karbonil grubu), diğer C atomlarının her birine ise OH grubu bağlıdır. Eğer karbonil grubu karbon zincirinin bir ucunda ise bu monosakkarit bir aldehittir ve aldoz olarak adlandırılır. Eğer karbonil grubu karbon zincirinin uç kısımları dışında herhangi bir yerinde ise bu monosakkarit bir ketondur ve ketoz olarak adlandırılır (Saldamlı, 1998).

Oligosakkaritler: İki monosakkaritin birbirine glukozidik bağ ile bağlanması sonucu disakkaritler oluşur. Maltoz, sukroz, laktoz disakkaritler içinde yer almaktadır. Birkaç monosakkaritin glukozidik bağ ile birbirlerine bağlanarak, polimerize olmasından meydana gelen karbohidratlar da oligosakkaritler olarak adlandırılır. En önemli oligosakkaritler şöyledir:

- a) Raffinoz: Galaktoz-glukoz ve fruktozdan oluşmuş bir trisakkarittir. Doğada şeker pancarında ve pek çok yüksek organizasyonlu bitkide bulunmaktadır.
- b) Melezitoz: Glukoz-fruktoz ve glukozdan oluşmuş bir oligosakkarittir. Bitki özünde ve özellikle çam ağaçlarında bulunmaktadır.
- c) Gentianoz: Glukoz-fruktoz ve glukozdan oluşmuş bir oligosakkarittir.
- d) Stakioz: Galaktoz- galaktoz- glukoz ve fruktozdan oluşmuş bir tetrasakkarittir (Gözükara, 1994).

Polisakkaritler: Pek çok monosakkarit ünitesinin birbirlerine glukozidik bağlarla bağlanması ile oluşan polimer molekülleri, polisakkarit olarak adlandırılır. Polisakkaritler, asitlerle veya spesifik enzimlerle muamele edilecek olursa ya monosakkaritlere veya basit monosakkarit türevlerine (D-glukozamin, D-galaktozamin, glukoronik asit, N-asetil muramik asit, N-asetil glukozamin) ayrılmaktadır. Genellikle polisakkaritlerin yapısında yer alan başlıca monosakkarit, D-glukoz'dur. Fakat aynı yapıda D-mannoz, D-fruktoz, D-ksiloz, D-arabinoz, D- ve L- galaktoz monosakkaritlerine de rastlanmaktadır (Gözükara, 1994).

Polisakkaritler, glikanlar olarak da bilinir. Polisakkaritler zincir boyunca tekrar eden monosakkarit ünitelerine göre ve dallanma derecelerine göre birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bunlar iki sınıf altında incelenir:

Homopolisakkaritler: Bir tek tip monosakkarit ünitelerinin polimerleşmesi ile meydana gelmiş polisakkaritlerdir. Bazı homopolisakkaritler, bazı monosakkaritlerin depo şekli olarak görev yaparlar. Nişasta, selüloz, kitin ve glikojen bu tip homopolisakkarittir (Gözükara, 1994 ; Nelson et al., 2005).

Heteropolisakkaritler: İki ya da daha fazla çeşitteki monosakkarit ünitelerinin polimerleşmesi ile meydana gelmiş polisakkaritlerdir. Heteropolisakkaritler, tüm hayvanlar aleminde hücre dışı desteği sağlar. Hayvan dokularında hücre dışı boşluk, birkaç tip heteropolisakkarit tarafından doldurulur. Bu şekilde hücreleri bir arada tutarak, koruma ve şekil vermeyi sağlar. Hücrelere, dokulara ve organlara destek oluşturur. Ayrıca heteropolisakkaritlere örnek olarak; bakteri hücre duvarında bulunan ve N-asetil muramik asit ile N-asetil glukozamin'den oluşan peptidoglikan verilebilir.

Polisakkaritler, genellikle proteinler gibi belli bir molekül ağırlığına sahip değildirler. Çünkü depo edildikleri hücrenin metabolik ihtiyacına göre monosakkarit üniteleri, enzimatik olarak ya ilave edilmekte ya da koparılmaktadır. Bu nedenle polisakkaritin molekül ağırlığı, hücrenin çeşitli

zamanlarda karbohidrat metabolizmasına duyduğu ihtiyaç ile değişikliğe uğramaktadır. Nişasta, selüloz ve glikojen bir tek tip monosakkarit olan D-glukozdan meydana geldiği için bunlara glikanlar da denmektedir. (Gözükara, 1994).

Polisakkaritler, hücrelerde ya monosakkaritlerin depo edilmesini sağlamak üzere bulunmakta ya da yapısal element olarak bağ dokusu ve hücre duvarı yapısında yer almaktadır. Bu nedenle polisakkaritler, depo polisakkaritleri ve yapısal polisakkaritler olarak iki grupta incelenir (Gözükara, 1994).

Depo polisakkaritleri

- a) Nişasta: α -D-glukoz polimeridir. Bitkilerde depo edilmektedir. Amiloz ve amilopektin olarak iki yapısal şekli vardır.
- b) Glikojen: α -D-glukoz polimeridir. Hayvanların karaciğer ve kas dokusunda depolanmaktadır.
- c) İnülin: D-fruktoz polimeridir. Enginar, yıldız çiçeği, soğan, sarımsak yumrularında bulunmaktadır.
- d) Diğer depo polisakkaritleri: Destranlar, fruktanlar (levanlar), mananlar, ksilan ve arabinanlar bu grupta yer alır.

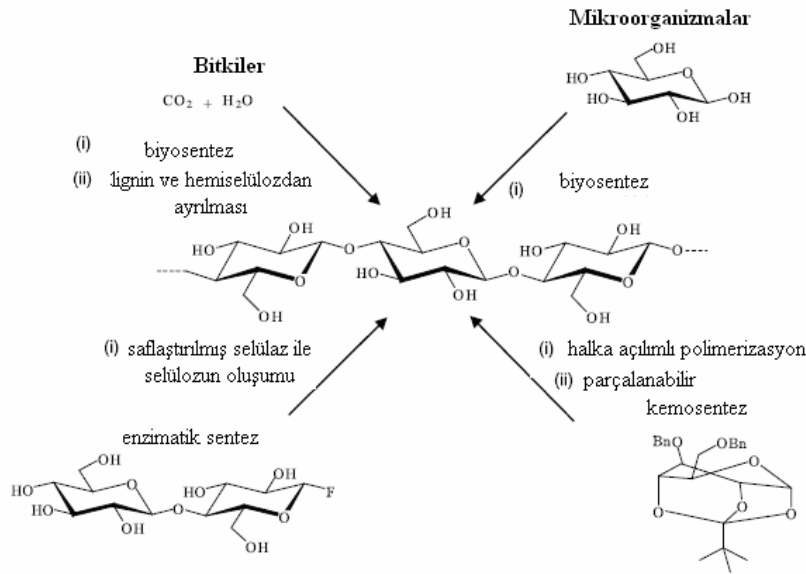
Yapısal polisakkaritler

- a) Selüloz: β -D-glukoz polimeridir ve bitkilerin özellikle sap, dal, gövde ve bitki hücre duvarının dış kısmında bulunmaktadır. Selüloz fibröz, sert ve suda çözünmeyen yapısal bir homopolisakkarittir. Selüloz molekülü doğrusaldır, dallanmamıştır ve 10.000-15.000 D-glukoz birimi içerir. Selülozda glukozlar, β 1 $\rightarrow$ 4 glukozidik bağla bağlanırlar (Nelson et al., 2005). Zayıf asitler selüloza etkisizdir. Fakat kuvvetli asitlerle karıştırılıp, ısıtılacak olursa bir disakkarit olan sellobioz ve D-glukoz ünitelerine parçalanmaktadır (Gözükara, 1994).
- b) Glikopolisakkaritler: Bakteri ve bazı mikroorganizmaların hücre duvarı yapısında bulunurlar. Monosakkarit türevi ve peptit kompleksinden oluşmuştur.
- c) Asit Mukopolisakkaritler: Monosakkarit türevlerinin oluşturduğu türevlerdir. Kondrotinler halinde korneada, kıkırdak ve kemikte hiyaluronik asit halinde

eklem bölgelerinde, antikoagulant madde olarak ve heparin halinde ise karaciğer, akciğer ve bazı arter duvarlarında bulunmaktadır.

d) Glikoproteinler: Karbohidrat ve proteinlerin oluşturduğu kompleks bir yapı olup, genellikle hayvan hücre membranı yapısında bulunmaktadır.

Doğada rastlanan karbohidratların pek çoğu yüksek molekül ağırlığına sahip, polisakkaritler halinde bulunmaktadır. Bu polisakkaritler içinde yer alan selüloz, bitkilerin hücre duvarı yapısında bulunmakla beraber, bazı mikroorganizmalar tarafından ekstrasellular olarak da sentezlenmektedir. Bitkilerin yapısında bulunan selüloza, alternatif olarak, özellikle asetik asit bakterileri tarafından ekstrasellular olarak sentezlenen bakteriyel selüloz gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bazı asetik asit bakterilerinden elde edilen ve ekstrasellular bir polisakkarit olan selüloz üzerinde durulmuştur. Bizim çalışmamıza konu olan bakteriyel selüloz ile bitkisel selüloz, kimyasal yapı olarak aynı olmasına rağmen, moleküler yapısı ve fiziksel özellikleri bakımından farklılık göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Selülozun sentezi (Klemm et al., 2001)

2.2. Mikrobiyal Polisakkaritler ve Ekstrasellular Polisakkaritler

Birçok mikroorganizma, karbon ve enerji kaynağı olarak işlev gören intrasellular (hücre içi) polisakkarit sentezleyebildikleri gibi hücre içinde oluştuktan sonra hücre dışına yani kültür ortamına salgılayabildikleri ekstrasellular (hücre dışı) polisakkarit de sentezleyebilmektedirler. Birçok farklı polisakkarit ve birkaç proteinden oluşan bu yapılar kapsül ve slime layer (cıvık tabaka) olarak isimlendirilir. Genel olarak bu yapıya Glikokaliks de denir. Glikokaliks, hücre dışında polisakkarit içeren materyal olarak da isimlendirilir fakat genellikle glikoproteinleri ve çok fazla sayıda polisakkaritleri, polialkoller ve aminoşekerleri içerir (Brock et al., 1994). Polisakkaritler içinde selüloz, glikojen, ksantan, velan, süksinoglukan, kitin gibi karbohidratlar yer almaktadır. Bazı bakteriler, alg, fungus ve mayalar bu polisakkaritleri sentezleme yeteneklerine sahiptirler. Özellikle bakteriler, sentezledikleri polimerleri hücre dışına çözünür veya çözünemez formlarda bırakırlar. Ekstrasellular polisakkarit hücrenin dış kısmında bitişik olarak yer alan polimerik maddelerdir. Selüloz, ksantan, gellan ve süksinoglukan ekstrasellular polisakkaritler olup, ticari olarak da üretilmektedir (Sutherland, 2001).

Ekstrasellular polisakkarit üreten mikroorganizmalar, doğada birçok farklı habitatta oldukça yaygın olarak bulunurlar. Genel olarak toprakta, tatlı sularda, deniz suyunda, enfekte olmuş bitki materyalinde veya bozulmuş yiyeceklerde bulunabilirler. Aynı zamanda birçok insan ve hayvan patojeni de, polisakkaritleri sentezleme yeteneğindedir. Ekstrasellular polisakkarit üreten mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılabilen belirli bir seçici ortam olmamasına rağmen, incelenmiş olan bakteriler veya fungusların çoğunda polisakkarit sentezini sağlayan kültürel koşullar oluşturulabilmektedir.

Bakteriyal polisakkaritler, organizmaların çoğunda mevcuttur fakat çok azında ticari ürün olarak değerlendirilmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen ve endüstriyel olarak önemli olan başlıca polisakkaritler genel olarak ; Ksantan (*Xanthomonas campestris*), süksinoglukan (*Rhizobium*, *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp.), gellan (*Pseudomonas elodea*), velan (*Alcaligenes* sp.),

emülsan (*Acinetobacter calcoaceticus*), alginatlar (*Azotobacter vinelandii*), selüloz (*Acetobacter xylinum*), dekstran (*Leuconostoc* sp.), ramsan (*Alcaligenes* sp.), pullulan (*Auerobasidium pullulans*) dır (Crescenzi et al.,1991).

Mikrobiyal polisakkaritlerin varlığı ve canlılardaki rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konmuştur. Fakat ekstrasellular polisakkaritlerin varlığı, yalnızca virü lent karakterli bakterilere özgü değildir. Yapılan çalışmalarla; su, toprak gibi çok farklı kaynaklarda yaşayan birçok bakterinin de kapsül içerdiği ortaya konmuştur. Bunların hücrenin yaşamını sürdürmesinde gerekli olmadığı fiziksel ya da kimyasal yolla yok edilen polisakkaritin, bakteri çoğalmasını etkilemeksizin tekrar oluştuğu bildirilmektedir (Kılıç, 2001).

Ekstrasellular polisakkaritler, bunu üreten strainler tarafından katabolize edilemediklerinden, enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Fakat mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korurlar ve dış ortamdan gelebilecek zararlı bir etkiye karşı da bariyer oluştururlar. Ayrıca ortamdaki metalik iyonların tutulmasını da sağlarlar (Kılıç, 2001).

2.2.1. Mikrobiyal polisakkaritlerin uygulama alanları

Mikrobiyal polisakkaritlerin üretimi ve ticari uygulamaları, son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen polisakkaritler, geniş bir kullanım alanına sahip olduklarından, ticari olarak üretilmektedirler. Bu uygulama alanları çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen ve endüstriyel olarak önemli başlıca polisakkaritler ve kullanım alanları (Crescenzi et al.,1991; Özdemir,1997).

Polisakkarit	Mikroorganizma	Kullanım Alanı
Hiyaluronik asit	<i>Streptococcus</i> sp	Farmakoloji
Alginatlar	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Yiyecek, Absorbant Geller, Kromat
Ksantan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Tersiyer yağ kazanımı, Yiyecek, Tekstil
Süksinoglukan	<i>Agrobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Tersiyer yağ kazanımı, Sondaj sıvıları, Süspansiyonlar
Gellan	<i>Pseudomonas elodea</i>	Absorbant, Geller
Velan	<i>Alcaligenes</i> sp.	Sondaj sıvıları
Ramsan	<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Alcaligenes</i> sp.
Selüloz	<i>Acetobacter</i> sp.	Tekstil, Kozmetik, Gıda
Emülsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emülsiyonlar
Dekstran	<i>Leuconostoc</i> sp.	Farmakoloji, Absorbant, Geller
Skleroglikan	<i>Sklerotium</i> sp.	Tersiyer yağ kazanımı, Sondaj sıvıları
Kurdan	<i>Agrobacterium</i> sp.	Absorbant, Geller
Pullulan	<i>Auerobasidium pullulans</i>	Filmler

2.3. Bakteriyal Selüloz

Bakteriyal selüloz metabolizmanın ilk ürünü olan, ekstrasellular bir polimerdir ve hücreyi koruyucu olarak görev yapar. Bitkisel selüloz ise hücrenin yapı elemanı olarak işlev sağlar (Bielecki et al., 2000). *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* ve *Sarcina* cinsleri selüloz sentezleme yeteneğine sahiptir (Jonas ve Farah,1998). Asetik asit bakterileri içinde *Acetobacter xylinum*, en iyi selüloz üreten bakteri olarak bildirilmiştir (Yamada et al.,1997; Yamada, 2000; Cannon et al., 1991).

2.3.1. Asetik asit bakterileri

Asetik asit bakterileri α -Proteobakteriler içindeki *Acetobacteraceae* familyasında olup (Stackebrandt et al.,1988; De Ley et al.,1984), *Acetobacter* (Beijerinck,1989), *Gluconobacter* (Asai,1935), *Acidomonas* (Urakami et al.,1989), *Gluconacetobacter* (Yamada et al.,1997), *Asaia* (Yamada et al.,2000) ve *Kozakia* (Lisdiyanti et al.,2002) olmak üzere altı genusu içermektedir (Holt et al., 1994).

Asetik asit bakterileri, Gram negatif (bazen Gram değişken), zorunlu aerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketli elipsoidal, düz veya hafif kıvrık, çubuk şeklinde bakterilerdir. Etanolün substrat olarak kullanıldığı kültür ortamlarında bu bakteriler asetik asit üretirler. Asidik koşullara iyi direnç gösterirler, çoğu strainleri pH 5'in altındaki değerlerinde bile gayet iyi büyür. Doğal olarak asit toleransı, asit üreten bir organizma için de gereken bir özelliktir. Asetik asit bakterileri 25 °C - 30 °C'de gelişirler (De Ley et al.,1984; Swings, 1992). Asetik asit bakterilerinin genel özellikleri çizelge 2.2'de verilmiştir.

Asetik asit bakterileri, endüstride sirke yapımında kullanılan bakterilerdir. Sirke aslında etil alkolün (etanol) asetik asite dönüştürülmesiyle oluşur. Etil alkolden *Acetobacter* türleri tarafından asetik asit üretimi aerobik (oksidatif) bir olaydır. Bu bakterileri endüstriyel açıdan önemli kılan diğer özellikleri de selüloz sentezleyebilme özellikleri ve C vitamini sentezi için gerekli olan sorbozu üretmeleridir. Bu grubun önemli cinsleri, *Acetobacter* ve *Gluconobacter*'dir (Ünlütürk, 1999).

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

Özellik	Reaksiyon
Gram boyanma	Negatif veya değişken
Oksijen ihtiyacı	Zorunlu aerob
Hücre şekli	Çubuk, elipsoidal, bazıları kıvrımlı
Hücrenin boyutu	0,6–0,8µm/1,0–4,0 µm
Hareketlilik	Bazıları hareketsizdir, hareketliyse peritrik veya polar flagella vardır
Endospor	Yok
Gelişim pH'ı	6,0–4,5
Katalaz	Pozitif
Oksidaz	Negatif
Jelatin	Negatif
İndol	Pozitif
Etanol	Asetik asite okside ederler
Asetik ve laktik asiti	CO ₂ ve H ₂ O'a oksitler
CaCO ₃ lı agarda	Zon oluşturlar

2.3.1.1. *Acetobacter*

Acetobacter genusuna ait bakteriler; Gram negatif (bazen Gram değişken), zorunlu aerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol pozitif, hareketli (peritrik flagella) veya hareketsizdir. Hücreler elipsoidal, düz veya hafif kıvrık, çubuk şeklinde olup tek tek veya zincir şeklinde olabilir. Hücrelerin büyüklükleri 0,6–0,8 µm x 1,0-1-4,0 µm arasında değişmektedir. Endosporları yoktur, kolonileri mattır, pigment üretmezler, laktoz ve nişastayı hidrolize edemezler. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C ve optimum pH 5,4 - 6,3'dür. Bu genus içinde *Acetobacter xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. hansenii*, *A. lovaniensis*, *A. liquefaciens* türleri yer almaktadır (De Ley et al.,1984; Swings, 1992).

Acetobacter türleri; genellikle şarap, sirke, üzüm suyu gibi alkol miktarı yüksek ortamları tercih etmekle birlikte, alkol oranı düşük fakat şeker oranı yüksek olan çiçek, meyve ve sebzelerde de bulunur. Bazı türleri, glukoz ve fruktoz, sukroz gibi şekerlerden ekstrasellular selüloz üretirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu ekstrasellular selüloz, sirke yüzeyinde kalın ve sert bir tabaka oluşturur. Oluşan bu tabakaya “sirke anası” adı verilir (Kılıç, 2001).

Acetobacter türleri aerobik koşullar altında etanolü okside ederek, asetik aside yani sirkeye dönüştürürler. CaCO_3 içeren agarlı kültür ortamlarında üremeleri sonunda, oluşturdukları asetik asit, CaCO_3 ' ı çözer ve bakteri kolonilerinin etrafında bir şeffaf zon oluşur (Swings, 1992; Brock et al., 1994). Bazı *Acetobacter* türleri asetik ve laktik asidi O_2 varlığında, CO_2 ve H_2O 'ya kadar okside ederler. Asetik asidi, oksidasyon yoluyla CO_2 ve H_2O 'ya dönüştüren *Acetobacter* türlerine aşırı oksitleyici türler adı verilir (Ünlütürk, 1999).

2.3.1.2. *Gluconobacter*

Gluconobacter genusuna ait bakteriler; Gram negatif (bazen Gram değişken), zorunlu aerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol pozitif, nitrat indirgenmesi negatif, hareketli (polar flagella) veya hareketsizdir. Hücreler elipsoidal, düz veya hafif kıvrık, çubuk şeklinde olup, tek tek veya zincir şeklinde olabilir. Büyüklükleri $0,5\text{--}1,0\ \mu\text{m} \times 2,6\text{--}4,2\ \mu\text{m}$ arasında değişmektedir. Endosporları yoktur, kolonileri mattır, pigment üretmezler, laktoz ve nişastayı hidrolize edemezler. Optimum gelişme sıcaklığı $25 - 30\ ^\circ\text{C}$ olup, $37\ ^\circ\text{C}$ 'de gelişemezler. Optimum pH $5,5 - 6,0$ 'dır. Bu genus içinde *Gluconobacter oxydans* türü yer almaktadır (Swings, 1992; De Ley et al., 1984).

Gluconobacter'i, *Acetobacter*'den ayıran en önemli özelliklerden biri polar flagellaya sahip olması ve *Gluconobacter*'in asetik ve laktik asidi oksidatif olarak CO_2 ve H_2O 'ya yükseltgeyememesidir (Çizelge 2.3). *Gluconobacter oxydans*, etil alkolden oksidasyon yoluyla yüksek oranda asetik asit üretir ve asitli ortama karşı oldukça yüksek bir toleransa sahiptir. Ayrıca D-Glukoz'dan 2-ketoglukonik asit de üretirler (Swings, 1992; De Ley et al., 1984)

Acetobacter türleri alkol yönünden zengin ortamları tercih ederken, *Gluconobacter* türleri şekerce zengin ortamları tercih eder (Swings, 1992).

Çizelge 2.3 *Acetobacter* ve *Gluconobacter* genusları arasındaki farklar (Swings, 1982; De Ley et al.,1984)

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Flagella peritrik	Flagella polar
Asetik ve laktik asit oksidasyonu CO ₂ ve H ₂ O ya kadar	Asetik ve laktik asit oksidasyonu CO ₂ ve H ₂ O ya kadar değil
Bromcresol green’li besiortamında; Yeşil → Mavi	Bromcresol green’li besiortamında; Yeşil → Sarı
CaCO ₃ lı besiortamında kolonilerin çevresinde zon oluşur	CaCO ₃ lı besiortamında kolonilerin çevresinde zon oluşmaz
Etanol oksidasyonu (+)	Etanol oksidasyonu (+)
D-Arabinoz’dan asit üretimi (-)	D-Arabinoz’dan asit üretimi (+)

2.3.2. Asetik asit bakterilerinin doğal kaynaklardan izolasyonu ve identifikasyonu

Acetobacter türleri genellikle şarap, sirke, üzüm suyu gibi alkol yönünden yüksek ortamlardan ya da alkol oranı düşük, şeker oranı yüksek olan çiçek, meyve ve sebzelerden izole edilir. Doğal kaynaklardan asetik asit bakterilerinin izolasyonu için Hestrin et al. (1954) ve Frauter et al. (1952) bazı yöntemler önermişlerdir (Swing, 1992 ve Du Toit et al., 2002). İzolasyonda, besiortamına maya ve laktik asit bakterilerinin gelişmesini inhibe edici sikloheksimid, pimarisin, nisin gibi maddeler eklenmektedir (Swings, 1992 ve Du Toit et al., 2002). Asetik asitlerin klasik taksonomiye göre tanısı, Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology’e göre yapılmaktadır. Ayrıca Fratuer (1950) ve Carr (1968)’in önerdiği yöntemlerden de yararlanılmaktadır (Swings, 1992).

2.4. Bakteriyal Selülozun Tarihçesi

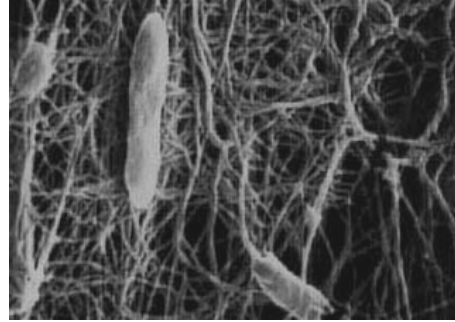
İlk kez Brown (1886) tarafından sirke fermentasyonu sırasında, sıvı yüzeyde oluşan jelatinimsi yapıdan, tanılanan *Acetobacter xylinum* strainin, uygun bir besiortamında üretildiğinde, yüksek miktarda ekstrasellular jelatinimsi bir yapı

sentezlediği belirtilmiştir (Bielecki et al., 2000). 20. yüzyılın ikinci yarısında bakteriyal selüloz dikkat çekmeye başlamıştır. Hestrin et al. (1947, 1954) bakteriyal selüloz üretiminde bir model olan *Acetobacter xylinum*'u kullanarak sentez için yoğun çalışmalar yapmışlardır (Bielecki et al., 2000). Colvin (1957)'de *Acetobacter xylinum* strainini kullanarak bakteriyal selüloz üretimini araştırmıştır.

2.5. Bakteriyal Selülozun Yapısı

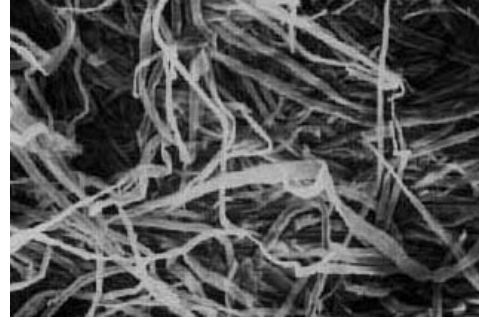
Selüloz, β -1,4 bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz birimlerinin, suda çözünmeyen dallanmamış yapıdaki polimer bileşikleridir. Yoğun olarak araştırılan bakteriyal selüloz, kimyasal olarak bitkisel selüloz ile aynı olmasına rağmen, bakteriyal selülozun moleküler yapısı ve fiziksel özellikleri bitkisel selülozdan farklıdır.

Bakteriyal selülozun, fibril ağ çapının 0.1 μ m olduğu belirtilmektedir, bu çap bitkisel selülozun yaklaşık % 1'i kalınlığındadır (Şekil 2.2) (Yoshinaga et al., 1997).



Bakteriyal selüloz (x 20,000)

2 μ m



Bitkisel selüloz (x 200)

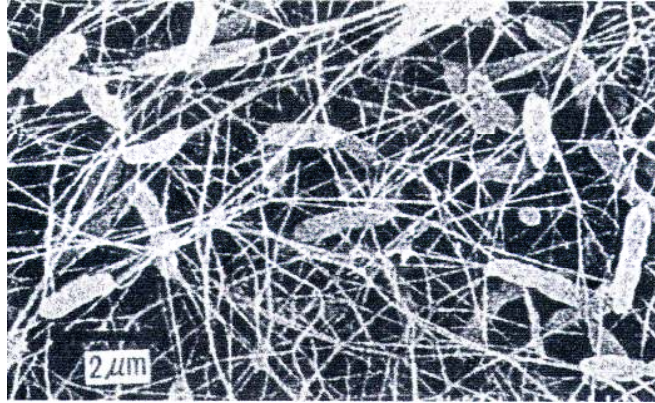
200 μ m

Şekil 2.2 Bakteriyal ve bitkisel selülozun fibril yapısı

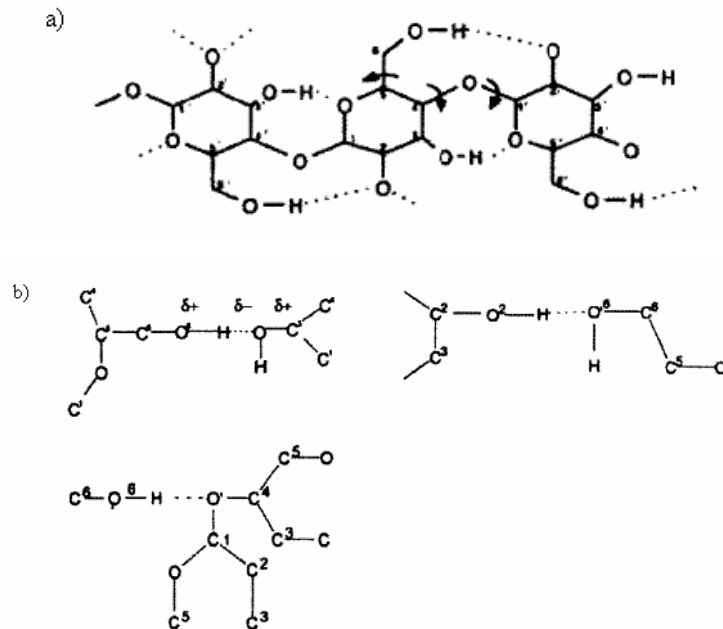
(<http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/english/cellulose/index.html>)

Bakteriyal selülozun subfibrilleri, mikrofibriller halinde kristalize olmuştur (Jonas ve Farah, 1998). Bunlar demetler ve iplikler halinde bulunurlar (Yamanaka et al., 2000). Zaar (1977)'e göre ipliklerin boyutu 3-4 nm x 70-80 nm, Brown (1976)'a

göre $3,2 \times 133$ nm, Yamanaka et al. (2000)'ne göre ise $4,1 \times 117$ nm'dir. Fakat huş ağacının gövdesindeki selüloz fibrillerinin genişliği $1,4-4,0 \times 10^{-2}$ mm ve çam ağacının ise $3,0-7,5 \times 10^{-2}$ mm'dir. Bakteriyal selüloz ipliklerinin uzunluğu ise 1-9 μ m kadardır (Şekil 2.3). Bakteriyal selülozun yapısında oldukça yoğun hidrojen bağları bulunur (Şekil 2.4a,b).



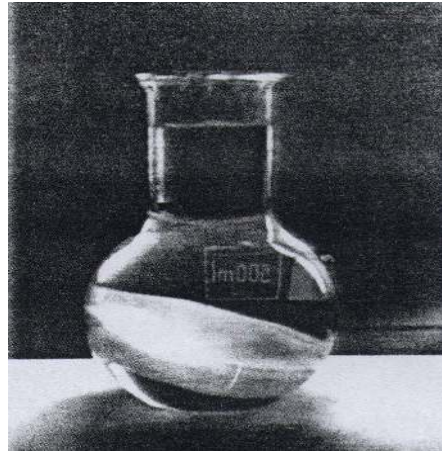
Şekil 2.3 *Acetobacter xylinum*'un durgun kültürde sentezlediği bakteriyal selülozun SEM'deki görüntüsü (Bielecki et al., 2000)



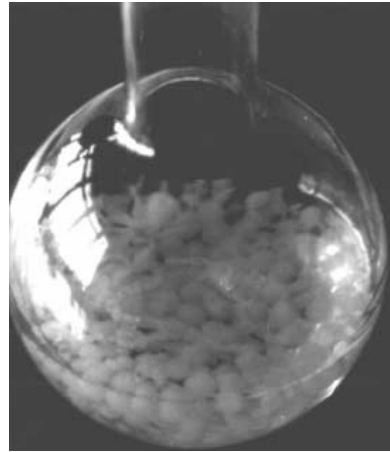
Şekil 2.4 a) Bakteriyal selülozun iç zincirindeki hidrojen bağları b) Bakteriyal selülozun dış zincirindeki hidrojen bağları (Bielecki et al., 2000)

Bakteriyal ve bitkisel selüloz, polimerizasyon derecesi (DP) bakımından birbirinden ayrılır. Bitkisel selülozdaki polimerizasyon 13.000-14.000 (Watanabe et al.,1998) iken, bakteriyal selülozdaki polimerizasyon 2000-6000'dir (Teeri, 1997; Jonas ve Farah, 1998).

Bakteriyal selülozun makroskobik görüntüsü kültür koşullarına bağlıdır (Watanabe et al., 1998; Yamanaka et al., 2000). Durgun koşullarda (çalkalamasız) sıvı besiyortamının üst yüzeyinde (oksijence zengin olan kısım) selüloz tabaka oluşur. Selülozun subfibrilleri devamlı olarak bakteri hücresinin yüzeyindeki porlardan dışarı çıkar ve kristalize olmuş mikrofibriller birbirlerine paralel bir şekilde bulunurlar (Jonas ve Farah, 1998). Çalkalamalı kültürlerde gelişen bakteriyal selüloz ise düzensiz, kenarları pürüzlü granüller şeklinde oluşur (Vandamme et al.,1988) (Şekil 2.5).



Durgun (Çalkalamasız) kültür



Çalkalamalı kültür

Şekil 2.5 Durgun ve çalkalamalı kültür ortamında bakteriyal selüloz pelliğinin oluşumu (Bielecki et al., 2000)

Durgun ve çalkalamalı kültürlerde oluşan bakteriyal selülozun taramalı elektron mikroskopundaki (SEM) üç boyutlu yapısında da dikkate değer bir farklılık vardır. Durgun kültürde oluşan bakteriyal selüloz fibrilleri, daha uzun ve biri diğerinin üzerine yığılmış gibi görünür. Çalkalamalı kültürde oluşan bakteriyal selüloz fibrilleri ise kıvrımlı ve karmakarışık bir görünümündedir. Ayrıca çalkalamalı kültürde oluşan bakteriyal selüloz fibrillerinin genişliği (0,1–0,2 μm),

durgun kültürde oluşan bakteriyal selüloz fibrillerinin genişliğinden (0,05–0,10 μm) daha fazladır (Johnson ve Neogi, 1989).

Selülozun, selüloz I ve selüloz II olmak üzere iki kristalize formu vardır. Selülozun bu iki formu X-ray, nükleer magnetik rezonans (NMR), Raman spektroskopisi ve Infrared analizi ile tespit edilebilir (Johnson ve Neogi, 1989). Durgun kültürde *Acetobacter xylinum*'un ve bitkilerin çoğu tarafından sentezlenen selüloz I'de paralel β -1,4-glukan zincirleri tek eksenli bir şekilde bulunmasına rağmen selüloz II'deki β -1,4-glukan zincirleri rastgele bir şekilde bulunmaktadır.

Çalkalamalı kültürde oluşan bakteriyal selülozun kristalize indeksi, durgun kültürde oluşan bakteriyal selülozunkine göre daha küçük ve daha azdır (Watanabe et al.,1998). Çalkalamalı kültürde sentezlenen bakteriyal selülozun yapısı, selüloz II şeklindedir. Selüloz II'yi doğada bazı algler, mayalar ve *Sarcina ventriculi* gibi bazı bakteriler sentezlemektedir (Johnson, 1989).

CP/MAS ^{13}C -NMR kullanılarak, selülozun iki farklı formu olan selüloz Ia ve selüloz Ib'nin ayrımı mümkündür (Watanabe et al.,1998). Selülozun bu formlarına alglerde, bakterilerde ve bitkilerde rastlamak mümkündür. Hücre birimlerinin farklılığından dolayı selüloz Ia'dan selüloz Ib'ya dönüştürülemeyen kristal transformasyon, X-ray ve CP/MAS ^{13}C -NMR spektrumlarında yer değiştirir. Durgun kültürde oluşan bakteriyal selüloz, çalkalamalı kültürde oluşan bakteriyal selülozdan daha çok selüloz Ia içerir (Watanabe et al.,1998).

2.6. Bakteriyal Selüloz Sentezleyen Mikroorganizmalar

Bakteriyal selüloz üretiminde *Acetobacter* strainleri en iyi bilinen türler olmasına karşın, diğer bazı bakteri genusları da selüloz sentezler (Çizelge 2.4). Selüloz sentezleyen bakteriler arasında başlıca; *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* genuslarına ait türler bulunmaktadır (Jonas ve Farah, 1998). Bakteriyal selülozun biyosentezi bu bakterilerde aynı olmasına rağmen, polimerin yapısı organizmaya göre değişir (Ross et al.,1991; Jonas ve Farah, 1998).

Çizelge 2.4 Bakteriyal selüloz üreten bazı mikroorganizmalar ve selüloz yapısı
(Jonas ve Farah, 1998)

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

Selüloz üreticileri arasında en iyi olanı *Acetobacter xylinum* (sinonimleri: *A. aceti* ssp. *xylinum*, *A. xylinus*) olmakla birlikte *Gluconacetobacter* grubundaki *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* ve *G. intermedius* da selüloz üreten strainler arasında önemli bir yer tutar (Yamada et al., 1998; Yamada, 2000).

2.7. Bakteriyal Selülozun Kimyasal Analizi ve Saptanması

Kristal ya da amorf selülozun, β -1,4- glukon bağlarını saptamak için, birkaç çeşit boya kullanılır (Mondal et al., 2000). Örneğin floresans boyalar ile selüloz kompleksindeki van der Waals ya da hidrojen bağları belirlenebilir. Bu floresans özellikteki boyalardan biri de cacofluor'dur. Bu boyalar, selüloz zincirlerinin direkt görünmesini sağlamaz, fakat yeni oluşmaya başlamış selüloz zincirlerindeki kristalizasyon çalışmalarında uygulanır. Nitratlanmış selüloz örneklerinin depolimerizasyon derecesi (DP) ise yüksek performans jel geçirgenlik kromatografisi ile saptanır. Bu kromatografi yöntemi, sentezlenen polimerin moleküler ağırlık dağılımını belirlemede kullanılan bir metottur, ayrıca biyolojik sistemlerin araştırılmasında da oldukça önemlidir (Watanabe et al.,1998).

Bakteriyal selülozun, ağsı yapısı taramalı elektron mikroskopundaki (SEM) görüntülerde oldukça iyi şekilde belirlenir (Johnson, 1989). Selülozun su tutma kapasitesi, viskozitesi ve kurumuş tabakanın Young modülü gibi fizikokimyasal özellikleri değişik metotlarla saptanabilir (Watanabe et al.,1998; Iguchi et al.,2000).

2.8. Bakteriyal Selülozun Fizyolojik Fonksiyonları

Bakteriler, doğal habitatlarında ekstrasellular polisakkaritleri hücre çevresinde yani hücre dışında oluştururlar (Costeron, 1999). Bu ekstrasellular polisakkaritlerden biri de bakteriyal selülozdur. Selüloz sentezleyen bakterilerin hücreleri, sıvı yüzeyin üst kısmında toplanarak, polimer ağını oluştururlar (Williams et al.,1989). Polimer, matriks hücrelerin adhezyonuna olanak sağlamakta ve adsorbsiyon özelliği ile hücre beslenmesini kolaylaştırmaktadır (Jonas, 1998; Costeron, 1999). *A. xylinum*'un sentezlediği selülozun depo materyali olarak kullanıldığı da ileri sürülmektedir (Okamoto et al.,1994). Selüloz tabakanın, vizkozitesi ve hidrofilik özellikleri nedeniyle bakterileri kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) karşı koruduğu da bilinmektedir. Ayrıca bakteriyal selülozun, bakterileri UV ışınına karşı koruduğu da belirtilmektedir. UV ışınına 1 saat maruz kalan, bakteriyal selüloz ile örtülü olan asetik asit bakterilerinin, % 23'ü canlı kalmaya devam etmiştir (Ross et al.,1991).

2.9. Bakteriyal Selülozun Biyosentezi

Bakteriyal selülozun sentezi, spesifik olarak katalitik ve regülatör protein kompleksleri ve enzimler ile regüle edilen çok basamaklı bir işlemdir. Sentez işlemi glukozun selüloz öncülü olan üridin difosfoglukoz (UDPGlc) sentezini takiben β -1,4 glukan zincirine polimerizasyonunu içerir. Bitkilerde selüloz, membranda bulunan selüloz sentaz enzimi ile plazma membranında sentezlenirken; *A. xylinum* bakterisinde selüloz sentaz enzimi sitoplazmik membranda bulunur ve selüloz ekstrasellular olarak sentezlenir. Diğer

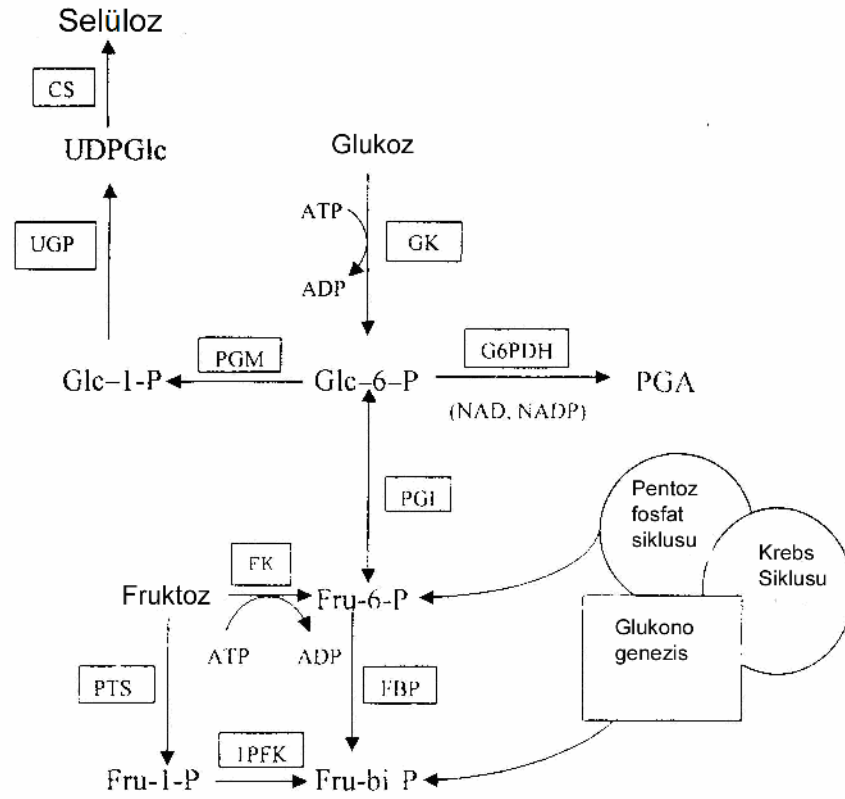
organizmalarda ise selüloz, hücrenin başka bölgelerinde sentezlenmiş olabilir. Örneğin; *Pleurochrysis algin*' de selüloz, golgi aparatında oluşur ve sonra hücre yüzeyinde toplanır (Saxena et al., 1995).

2.9.1. Selüloz öncülünün sentezi

Acetobacter xylinum tarafından sentezlenen selüloz, pentoz fosfat yolu veya Krebs döngüsünün, karbon metabolizmasının son ürünüdür (Ross et al.,1991; Tonouchi et al.,1996). Asetik asit bakterilerinde ise glikolizis metabolik yolunda görevli olan fosfofruktokinaz enzimi olmadığı için bu metabolik yol çalışamaz (Ross et al.,1991).

Acetobacter xylinum'da selüloz sentezi, oksidasyonun katabolik reaksiyonlarına ve katabolik reaksiyonlar sonunda açığa çıkan enerjinin % 10'unun kullanılmasına bağlıdır (Weinhouse, 1977). Bakteriyal selüloz sentezi, protein sentezi gibi diğer anabolik reaksiyonlara engel olmaz (Ross et.al.,1991).

A. xylinum'dan selüloz üretimi için hekzoz, gliserol, dihidroksiaseton, pirüvat ve dikarboksilik asitler gibi karbon kaynakları kullanılabilir. UDPGlc (uridin difosfoglukoz), bitkiler dahil birçok organizmada metabolik yolda selüloz öncülüdür. Glukoz, glukokinaz enzimi ile glukoz-6-P'a katalizlenir. Glukoz-6-P, fosfoglukomutaz enzimi ile glukoz- α -1-P'a dönüşür. Glukoz- α -1-P, UDPGlc pirofosforolaz enzimi ile UDPGlc'ye katalizlenir. Bu son enzim (UDPGlc pirofosforolaz), selüloz sentezinde en önemli olan enzimlerden biridir. Selüloz sentezlemeyen ve fenotipik olarak (Cel⁻) olan mutant hücrelerde bu enzimin eksik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu durum deneysel olarak da gözlenmiştir. (Valla et al.,1989). Pirofosforolaz aktivitesi, *A. xylinum*'un farklı strainleri arasında farklılık göstermekte olup, en yüksek aktiviteye de selüloz üretimi yönünden en uygun olan *A. xylinum ssp. sucrofermentans* BPR2001'da saptanmıştır. Karbon kaynağı olarak fruktozu kullanan strainlerde fosfoglukoizomeraz yüksek aktivite gösterir. Fruktoz, fruktoz-1-fosfata ve sonra fruktoz-1,6-bifosfata katalizlenir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 *A. xylinum* straininde karbon metabolizmasının yolu. CS, selüloz sentaz; FBP, fruktoz 1-6-bifosfat fosfotaz; FK, fruktokinaz; GK, Glukokinaz; G6PDH, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; 1PFK, fruktoz-1-fosfat kinaz; PGI, fosfoglukoizomeraz; PGM, fosfoglukomutaz; PTS, fosfotransferazların sistemi; UGP, pirofosforolaz UDPGlc; Fru-bi-P, fruktoz-1,6-bifosfat; Fru-6-P, fruktoz-6-fosfat; Glc-6 (1)-P, glukoz-6(1)-fosfat; PGA, fosfoglukonik asit; UDPGlc, uridin difosfoglukoz (Bielecki et al., 2000)

2.9.2. Selüloz sentaz

Hem bitkilerde hem de prokaryotlarda selüloz sentezini, üridindifosfat (UDP) katalizler. Selüloz sentaz oluşumu temel olarak 1,4- β - glikotransferaz işlemidir. Çünkü 1, 4- β - glikotransferaz, UDPGlc dan yeni oluşan polisakkarit zincirlerine transfer olarak ardışık glukopironaz halkalarına katılır ve her zaman bu zincirle bağlantılıdır. Oligomerik selüloz sentaz kompleksleri, terminal kompleksler (TK) olarak isimlendirilir. Terminal kompleksler, ilk β -1,4-glukan zincirlerinin sentezinden sorumludur. *A. xylinum*'daki selülaz sentaz, sitoplazmik membrana

bağlı olan 400-500 kDa moleküler ağırlığındaki membran-bağlı proteindir ve sitoplazmik membrana da sıkıca bağlanmıştır (Lin ve Brown, 1989). Selüloz sentazın saflaştırılması, bulunduğu yerden dolayı oldukça zordur, çünkü önce selüloz sentazın bulunduğu membran fragmentinin izolasyonu gereklidir. Ayrıca *A. xylinum*'daki selülaz sentaz stabil olmayan bir protein yapısındadır (Lin ve Brown, 1989). Digitonin (Lin ve Brown, 1989) ya da Triton X-100 gibi deterjanların kullanımı ya da tripsin ile muamele, selülaz sentazın membrandan izolasyonu için kullanılır (Saxena ve Brown, 1989). Lin ve Brown (1989)'a göre saflaştırılmış selülaz sentaz enzimi 90, 67 ve 54 kDa moleküler ağırlığına sahip 3 farklı tipteki alt ünitelerden oluşmuştur. Saxena et. al., (1989) da selülaz sentaz enziminin, 83 ve 93 kDa moleküler ağırlıklarına sahip sadece 2 tip polipeptitten oluştuğunu göstermişlerdir.

Saxena et al. (1990b, 1991), selülaz sentaz operonunda *cesA* ve *cesB* olarak 2 gen saptamışlardır. Wong et al., (1990) ve Ben-Bassat et al. (1993), aynı operondaki bu genler BSsA ve BSsB olarak da belirtmişlerdir. Photolabeling affinite çalışmaları ile 83-kDa olan polipeptidin, katalitik bir alt ünite olduğu ve UDPGlc'ye doğru yüksek affinite gösterdiği anlaşılmıştır (Lin et al., 1990). Gen sekanslarına göre bu ünitenin, hidrofobik olduğu ve 723 aminoasit dizisini içerdiği belirlenmiştir. Bu alt ünite 24 aminoasit dizisinin oluşturduğu tek sekanslı propteinden sentezlenmiştir (Wong et al., 1990). Bu protein hücre membranına yerleşmiştir ve beş transmembran heliksi içermektedir.

Brown et al. (2000), *A. xylinum*'daki katalitik selülaz sentaz alt birimlerinin, benzer türlerindeki glikosiltransferazların işleyişine benzer şekilde çalıştığını ve bu glikosiltransferazların, direkt selüloz sentezinde glukozidik bağları katalizlediğini açıklamışlardır.

Glikosiltransferazın işlediği globuler fragmentte, aspartik asit kataliz bölgesi ile DXD ve QXXRW kısa sekans bölgelerini içine alan A bölgesi bulunmaktadır (Saxena et al., 1997). Buna benzer özelliklere *A. xylinum* selüloz sentazda da rastlanmıştır. Glukozid sentazın çoğunda globuler fragment A ve B olarak iki asıl

bölge içermektedir (Saxena et al.,1995). A bölgesi, kataliz için D zinciri ve nükleotid-şeker substratına bağlanan DXD bölgelerini içerir.

2.9.3. Biyosentez mekanizması

Şimdiye kadar *A. xylinum* selüloz biyosentezi, kristalizasyon ve yapısal özelliklerin araştırılmasında model organizma olarak kullanılmıştır (Klemm et al., 2001). *A. xylinum* ve bitkiler dahil diğer selüloz sentezleyen organizmalarda allomorf selüloz I' in sentezi iki basamakta gerçekleşmektedir:

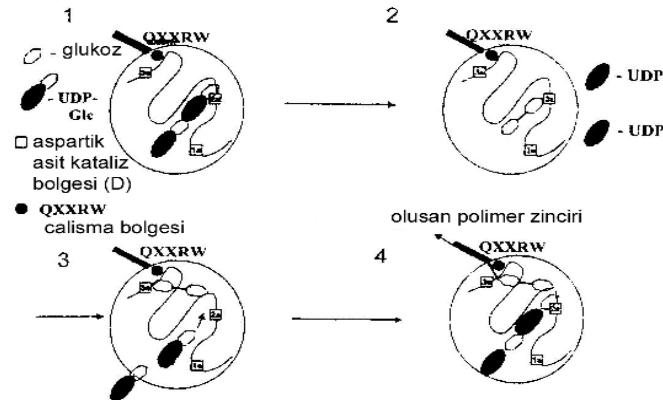
1. Polimerizasyon: Glukoz moleküllerinin linear 1,4- β -glukan zincirine polimerizasyonu,
2. Kristalizasyon: Glukan zincirinin kristalize forma dönüşmesi.

2.9.3.1. 1,4- β -Glukan polimerizasyonun mekanizması

A. xylinum'da bakteriyel selülozun oluşumunu katalizleyen selülaz sentaz kompleksleri sitoplazmik membranda bulunmaktadır. Bu kompleksler, 200,000 molekül glukozun β -1,4-glukan zincirine polimerize olmasıyla oluşur (Ross et al.,1991). Reaksiyon mekanizması tam anlamıyla açıklanamamıştır. *A. xylinum*'daki bu mekanizmayla ilgili olarak iki farklı hipotez ileri sürülmüştür.

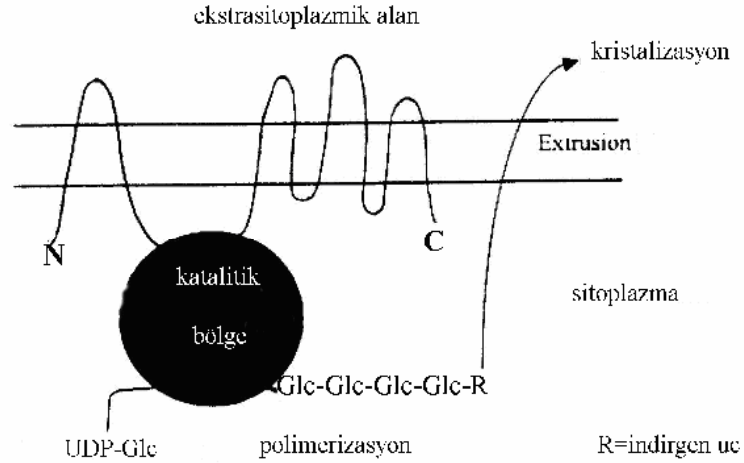
Brown'ın araştırmalarında geliştirilen bu hipotezlerden birine göre, β -1,4-glukan polimerizasyonunda UDPGlc'den glukoz transfer edilen yeni sentezlenmiş polimer zincirinde lipid gerekli değildir (Brown, 1996; Brown ve Saxena, 2000). Bu hipotezin mekanizması, glikotrasferazların dallanmamış homopolisakkaritlerin sentezinden sorumlu olduğunu kabul etmektedir. Brown ve Saxena (2000), 1,4- β -glukan polimerizasyonun tasarımını şekil 2.7'deki gibi önermişlerdir. Bu modele göre, selülaz sentaz katalitik alt ünitesinin globular fragmetinde diğer glikotrasferaz mekanizmasına benzer 3 katalitik bölge vardır. Katalitik bölgelerden biri (2a), 2 UDPGlc molekülünü bağlayan DXD hareketli bölgesini içerir (şekil 2.7.1). İkinci katalitik bölge (1a), serbest kalan 2 UDP molekülünün eşlik ettiği 2 glukoz molekülünün arasındaki β -1,4 oluşumunu katalizleyen aspartik asit (D) molekülü içerir (şekil 2.7.2). Üçüncü katalitik bölge (3a),

sellobiyoz sentezinin indirgendiği QXXRW bölgesini içerir (şekil 2.7.3). Disakkarit UDPGlc molekülüne bağlı 1a ve 2a bölgesinden ayrılır ve ikinci bir sellobiyoz molekülü oluşur (şekil 2.7.4). Birinci sellobiyoz molekülünün indirgen ucunda bulunan QXXRW bölgesi zincirden ayrılacak olan bölgeye doğru hareket eder. Aynı zamanda ikinci sellobiyoz molekülü, sellotetraoz'u veren ilk indirgen olmayan uçlardan birine bağlanır. Zincire ikiden fazla glukozun eklenmesi ile reaksiyon tekrarlanır ve boş olan 1a ve 2a bölgelerine arka arkaya 2 UDPGlc molekülü bağlanır.



Şekil 2.7 Brown ve Saxena (2000) tarafından tasarlanan β -1,4-glukan zincirindeki polimerizasyon

Brown ve Saxena (2000) tarafından tasarlanan modele göre, yeni sentezlenmiş β -1,4-glukan zincirinin ayrılması, her zincirin kendi indirgen ucundan başlamaktadır (Şekil 2.8).



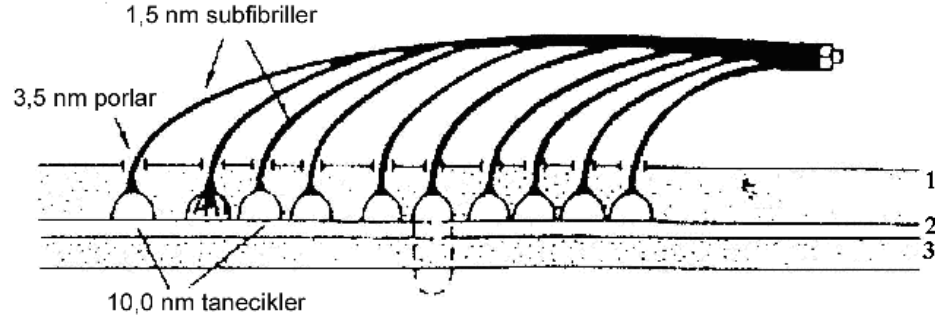
Şekil 2.8 Brown'ın modeline göre bakteriyel selüloz sentezinin basitleştirilmiş modeli (Brown et al., 2000)

Han et al. (1998), bakteriyel selüloz sentezinde sitoplazmik membranda bulunan selüloz sentaz, lipid pirofosfat (UDPGlc fosfotransferaz) (LipPP: UDPGlc-PT), ve lipid pirofosfat fosfohidrolaz (LPP) olmak üzere 3 enzimin görev aldığını belirtmişlerdir.

2.9.3.2. Selüloz zincirinin oluşumu ve kristalizasyonu

Glukopiranoz moleküllerinin β -1,4-glukan zincirine polimerizasyonu, hangi mekanizma ile olursa olsun, bakterilerde bile selüloz sentez aşamasının en az komplike olanıdır. Örneğin; *A. xylinum*'da, selüloz sentezi, bakterinin yüzeyindeki porlar ile birleşmiş olan selüloz-sentaz kompleksi tarafından, dış membran ve sitoplazma membranı arasında gerçekleşir. Selüloz ipliklerinin oluşumu birkaç adımda olur (Şekil 2.9). Hücre yüzeyinde selüloz sentezlenen bölgeler, sıra halinde bulunan 3,5 nm çaplı porlara sahiptir. Her por, polimerizasyon reaksiyonlarında selüloz sentezleyen enzimleri içeren ve diğer fonksiyonlarda ek proteinleri içeren 10 nm'lik parça ile örtülüdür. Her 10 nm'lik parça, 1,5 nm'lik subelementer fibril oluşturan glukan zincirini oluşturur (Jonas ve Farah, 1998). Selüloz sentezleyen kompleksler ve terminal kompleksler (TK), bakterinin yüzeyindeki porlarla birleşmiş ve düzgünce sıralanmıştır. Selüloz oluşumunun ilk basamağında yaklaşık 6-8 glukan dizisi içeren zincir, kompleksten uzaklaşır. Bu subfibriller ikinci basamak için toplanır ve bunu takiben mikrofibriller de üçüncü

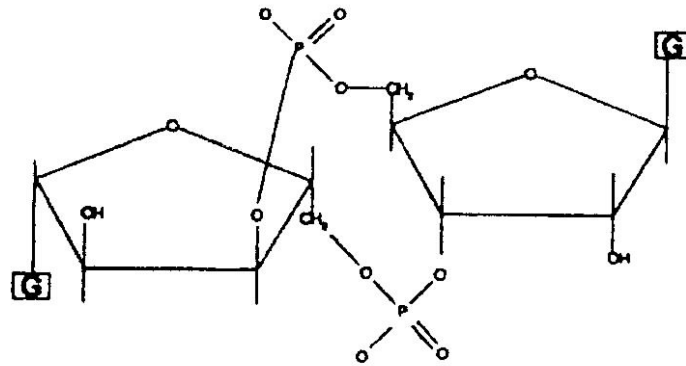
basamak için birleşir. İç ağısı kısmın matriksi “bakteriyal selüloz membranı” ya da “pellik” olarak tanımlanır (Jonas ve Farah, 1998; Brown, 1992; Yamanaka et al., 1994).



Şekil 2.9 *Acetobacter xylinum*'un sentezlediği selüloz subfibrillerinin oluşum modeli
1. lipopolisakkarit tabaka 2. periplazmik boşluk 3. plasmalemma
(Jonas ve Farah, 1998)

2.9.4. Bakteriyal selülozun regülasyonu

Siklo-3,6':3'6 digüanozin monofosfat (c-di-GMP), *A. xylinum* selüloz sentaz için geri dönüşümlü allosterik bir aktivatördür ve tüm β -1,4-glukan biyogenezinin regülasyonunda rol oynar (Şekil 2.10) (Ross et al.,1987). Bu bileşik, enzim düzenleyici alt birimi bağlar ve bakteriyal selüloz protomerlerinin birlikte konformasyonel değişimini kolaylaştıran değişiklikleri indükler (Ross et al.,1987).



Şekil 2.10 c-di-GMP'nin yapısı - *A. xylinum*'un allosterik aktivatörü (Bielecki et al., 2000)

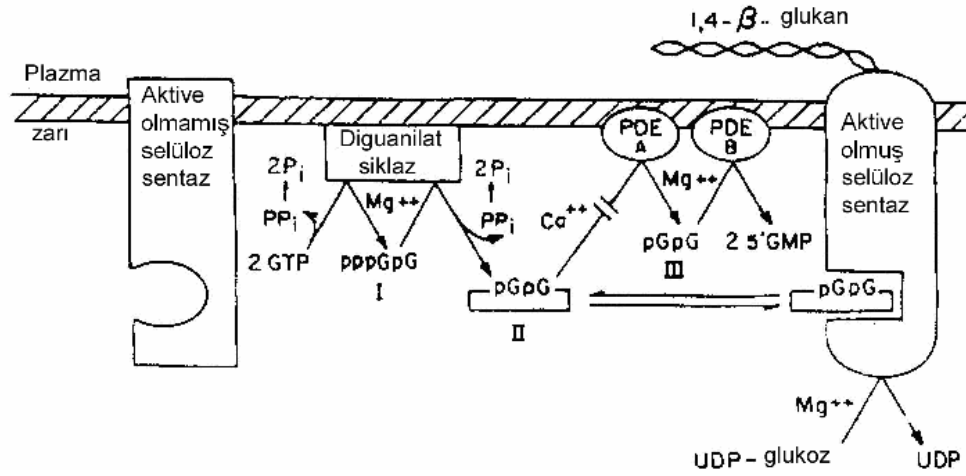
A. xylinum hücrelerinde c-di-GMP'nin konsantrasyonunu regüle eden CDG (diguanyl siklaz), PDEA (fosfodiesteraz A), PDEB (fosfodiesteraz B) olmak üzere 3 enzim vardır (Şekil 2.10) (Ross et al.,1987).

PDEA ve PDEB sitoplazmik membrana tutunmuş durumdadır. CDG ise 2 ayrı forma sahiptir. Bunlardan biri sitoplazmik membrana tutunmuştur diğeri ise sitoplazma içinde bulunur (Ross et al.,1991). Weinhouse et al.(1997), c-di-GMP konsantrasyonunun intrasellular regülasyonunu sağlayan c-di-GMP'ye bağlı yeni bir protein olduğunu belirtmişlerdir. Tal et al. (1998), *A. xylinum*'da c-di-GMP hücresel dönüşümünün üç operon tarafından kontrol edildiğini saptamışlardır.

A. xylinum'da selüloz sentezinde anahtar regülatör enzim olan CDG, iki gen tarafından kodlanan iki polipeptit zincirinden oluşmuştur (Nichols et al., 1998). CDG Mg^{2+} iyonları tarafından aktive edilir ve özellikle saponin tarafından inhibe edilir (Ohana et al.,1988). CDG, ilk önce 2 GTP molekülünü lineer pppGpG'e dönüştürür ve daha sonra ve sonra selüloz sentazı aktive eden c-di-GMP'ye dönüştürür. PDEA, aktif haldeki c-di-GMP'yi inaktif dimer olan linear pGpG ve diGMP'ye ayırır PDEB ise bunları daha da parçalayarak iki molekül 5'/GMP ve pGpG,'lara ayırır (Şekil 2.11).

PDEA, PDEB'yi etkilemeyen Ca^{2+} iyonları ile inhibe olur. Bu nedenle selüloz sentezinde Ca^{2+} konsantrasyonu dolaylı olarak etki etmektedir. Bu iyonlar c-di-GMP'nin inaktif lineer forma dönüşümünü inhibe ettiğinden, kalsiyum iyonun konsantrasyonun yüksek olması inhibisyon oranını artırır.

Selüloz sentaz aktivasyonunun moleküler mekanizmasında; pozitif etkiye sahip olan CDG ve negatif etkiye sahip olan PDEA ve PDEB'yi içeren c-di-GMP' nin rol oynadığına inanılır. Günümüzde selüloz sentez regülasyon mekanizmasına sadece *A. xylinum*'da rastlanmıştır (Bielecki et al., 2000).



Şekil 2.11 *A. xylinum*'un selüloz sentezinde önerilen model (Bielecki et al., 2000)

PDEA; fosfodiesteraz A PDEB; Fosfodiesteraz B; pppGpG; difosfo-di-GMP pGpG (II); c-di-GMP (siklik-di-GMP) pGpG; di-GMP (linear di-GMP)

2.10. *Acetobacter xylinum*'un Sentezlediği Çözünebilir

Polisakkaritler

Selüloz dışında *A. xylinum*'un sentezlediği başka çözünür polisakkaritler de (glukoz, mannoz, ramnoz ve glukuronik asit; 6:1:1:1) de bulunmaktadır (Savidge ve Colvin, 1985). Bu polisakkaritlerden biri olan β -homoglukan çözünebilir bir polisakkarittir. Bu polisakkarit 1970'lerde bulunmuştur. Bu yapının omurgasını β -1,4 bağıyla bağlı glukoz zincirleri oluşturur ve bu zincirdeki her 3 glukoz molekülüne β -1,2 bağıyla bağlı başka glukoz molekülleri bağlıdır (Colvin ve Leppard, 1977; Colvin et al., 1979). *A. xylinum*'un pelik oluşturmayan (pel⁻) strainleri, hücre zarına bağlı olan α -glukan sentezlerler (Dekker et al., 1977). Valla ve Kjosbakken, (1981), (Cel⁻) strainlerinden glukuronik asit zincirleri ile glukoz, mannoz ve ramnoz içeren çözünebilir polisakkaritleri izole etmiştir. Bu polimerdeki zincirlerin bir kısmı asetillenmiştir (Tayama et al., 1985). Bu tip polisakkaritler asetan olarak isimlendirilir (De Lannino et al., 1988).

2.11. *Acetobacter xylinum* tarafından sentezlenen endo ve ekzoselülaazlar

A. xylinum selülaazları ile ilgili ilk bilgiler, özellikle bakterinin genlerinin tanımlanması ile ilgili olarak, Okamoto et al. (1994) ve Standal et al. (1994) tarafından elde edilmiştir. *A. xylinum* IFO 3288 straininden, karboksimetil selülaaz aktivitesi gösteren 24-kDa proteinini (218 molekül) kodlayan enzim için bir gen kodonunu, gen kütüphanesindeki DNA'dan farklı olduğunu ayırt eden ilk otorlerdir. (Okamoto et al., 1994). *A. xylinum* ATCC 23769 (Cel⁻) mutantında selüloz sentaz operonuna ait endoselülaaz geni bulunmuştur (Standal et al.1994). *A. xylinum* BPR 2001 strain endo-1,4- β -glukonaz geninin olduğu saptanmıştır (Tonouchi et al.,1997). Bu strainde endo-1,4- β -glukonaz geni, selülaaz sentaz operonunun yukarı kısmında ekzo-1,4- β -glukanaz geni ise selüloz sentaz operonunun aşağı kısmında lokalize olmuştur.

A. xylinum BPR 2001 strainine ait olan endo ve ekzoselülaazlar saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Oikawa et al., 1997; Tahara et al., 1998). Yapılan çalışmalar sonucunda her iki selülaaz aktivitesinde ve selülaaz sentezinde pH 5'in, pH 4'den daha etkili olduğu saptanmıştır (Tahara et al., 1997). pH 5'de kültür sırasında polimerizasyon derecesindeki miktar, 16.800'den 11.000'e düşmüştür fakat pH 4'de önemli bir değişim olmamıştır. pH 5'de oluşan selülozun gerilme direnci gibi fiziksel özellikleri de düşüktür (Tahara et al., 1998).

2.12. Bakteriyal Selülozun Biyodegradasyonu

Selüloz biyolojik olarak parçalanabilir ve bakteriyal selülozun biyodegradasyonu, hemiselüloz, pektin ve lignin polimerlerini içeren bitkisel selülozun biyodegradasyonuna oranla daha kolaydır. Bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyal selülozun parçalanmasında da selülotik enzimler kullanılır.

Bakteriyal selüloz, yapısal ve fizyolojik özellikleri nedeniyle selülaaz (1,4- β -glukan 4-glukonohidrolaz: endoselülaaz) ve sellobiohidrolaz çalışmalarında

kullanılabilen iyi bir substrat örneğidir. Sellobiohidrolazlar, sellozom bileşiklerinin asıl parçacılarıdır, selülotik bakterilerden olduğu kadar selüloz parçalayan fungal sistemlerin özelleşmiş çoklu enzim parçacılarıdır (Boisset et al.,1999). *Clostridium thermocellum* sellozomları, *A. xylinum* selüloz mikrofibrillerini *Valonia ventricosa* selüloz mikrokristallerinden daha hızlı parçalamaktadır (Boisset et al.,1999).

Hidrolizin ultra yapısı transmisyon elektron mikroskobu (TEM), kızıl ötesi spektroskopisi ve X-ray difraksiyon (kırınım) analizi ile belirlenebilir. *Humicola insolvens* sellobiohidrolazı Cel7A (sellobiohidrolaz I:CBH I), bakteriyel selüloz mikrofibrillerini parçalamıştır. Ayrıca Cel6A (sellobiohidrolaz II: CBH II) ile Cel7A (sellobiohidrolaz I:CBH I)'nın karışımı da bakteriyel selüloz fibrillerini parçalara ayırmıştır (Boisset et al., 2000). *Trichoderma viridei* fungusundan elde edilen CBH I ve endoglukanaz II bakteriyel selüloz mikrofibrillerini parçalamaktadır (Samejima et al., 1997).

Bakteriyel selülozun mikrofibrilleri, asit muamelesi ile de parçalanmaktadır (Samejima et al. 1997).

Trichoderma reesei'nden elde edilen CBH I enzimi de bakteriyel selüloz mikrofibrillerini kolayca parçalamaktadır (Srisodsuk et al.,1998). Polimerin çözünürlüğü hızlı olmasına rağmen polimerizasyon derecesi yavaşça düşer. Bu fungusdan elde edilen endoselülaz I'in substrata etkisi sonucunda tersi olaylar gerçekleşir. Her iki enzim, diğer bitkilerdeki selüloza göre daha yüksek bir saflığa sahip olan pamuktaki selülozu, bakteriyel selülozdan daha yavaş hidrolize eder.

2.13. Biyoteknolojik Özellikler

Bakteriyal selülozun üretim kapasitesini artırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla mikrobiyal biyoteknolojide sürekli kullanılan, iki temel uygulamadan yararlanılmaktadır.

1. Selüloz üreten bakterilerin taranması (screening) ve uygun organizmanın seçimi için metot geliştirilmesi önem taşımaktadır. Ucuz atık karbon kaynaklarını kullanan strainlerin, genetik mühendisliği yöntemleriyle geliştirilmesi de olasıdır.

2. Durgun ya da çalkalamalı kültürdeki üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmelidir. Optimizasyon çalışmalarında uygun karbon, azot kaynakları ile sıcaklık ve pH'ın önemi büyüktür. Bakteriyal selülozun pelik ya da amorf jel formunun saptanması ile esneklik, mekanik direnç ve adsorblama gibi özelliklerinin belirlenmesi de önemlidir.

2.13.1. Bakteriyal selüloz üreten strainlerin doğal kaynaklardan izolasyonu ve gelişimi

Uygun doğal kaynaklardan izole edilen asetik asit bakterilerinin selüloz üretiminin taranmasında De Wulf et al. (1996)'nin önerdiği yöntem kullanılmaktadır. Bu yönteme göre glukozu, glukonik asit yolu ile 2- 5-, veya 2,5 ketoglukonata oksitleyemeyen strainler seçilmektedir (Winkelman et al., 1984; Johnson ve Neogi, 1989; De Wulf et al.,1996; Vandamme et al., 1998). Bu yaklaşımla De Wulf et al. (1996), içinde Br^- ve BrO_3^- iyonları bulunan ve asidik pH'da moleküler brom salabilen bir ortam denemiş ve bu ortamın *A. xylinum* hücreleri üzerine toksik olan bir etkisi olduğunu açığa çıkarmışlardır. Glukozu, glukonata ve onun türevlerine dönüştürmeyen mutantlar bu ortamda canlı kalabilmektedir.

Glukozu, glukonik aside metabolize edemeyen, *A. xylinum* strainlerin seçimi de CaCO_3 içeren besi ortamında yapılmıştır (Johnson ve Neogi, 1989). Selüloz üreten

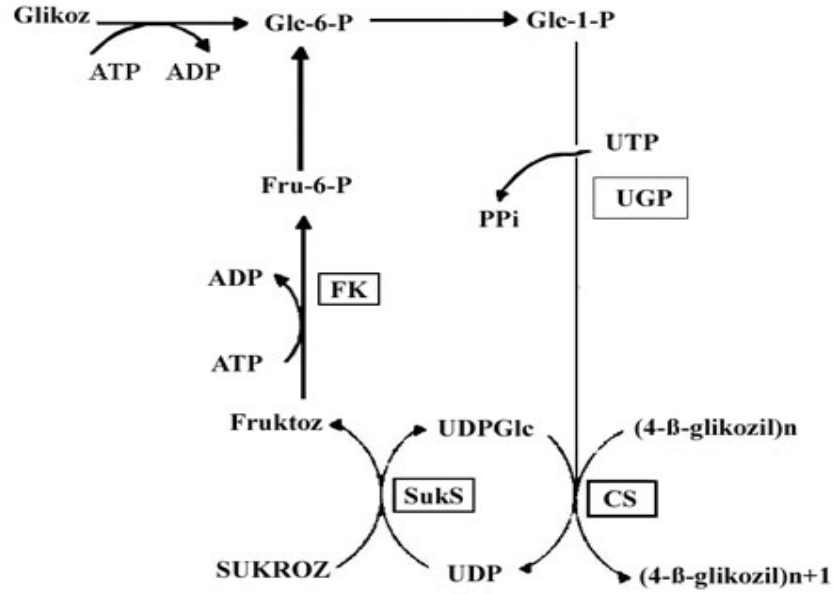
bakteri strainlerinin (Cel⁺) katı besiortamındaki kolonileri bej ya da beyaz renkte olup, yuvarlak, yüksek ya da konveks, küçük ve jelatinimsidir. Selüloz üretmeyen bakteri strainlerinin (Cel⁻) katı besiortamındaki kolonileri ise düz, mat ve büyüktür (Johnson ve Neogi, 1989; Krystnowicz et al.,2002). Vandamme et al. (1998), bu metotla *A. xylinum* KJ33 strainini izole edip, 3,3 g/L⁻¹ bakteriyal selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir.

N-metil-N/-nitro-N-nitrosoguanidin (NG) ya da EMS gibi mutajenik kimyasal bileşikler ya da UV radyasyonu ile selüloz üretimi yüksek olan mutantlar elde edilmiştir. Bu mutantlarda asetan gibi çözülebilir polisakkaritlerin sentezi azalmış ve çok düşük miktarda glukoz organik asitlere dönüşmüştür (Johnson ve Neogi, 1989). *A. xylinum* strainlerinin taranması sırasında spontanların ve selüloz II'yi sentezleyen mutantların izolasyonu amaçlanmıştır. Bu selüloz, nutrient broth yüzeyinde pellik oluşturmayan ve koloni şekilleri düzgün olan bakteriler tarafından sentezlenir. Bakteriyal selülozu en iyi üreten üreticilerin seçimi selüloz üreten bakterilerin geleneksel yöntemlerle sentetik aktivitesinin ayrı ayrı saptanması ile olur. Örneğin; Toyosaki et al. (1995), meyve ve çiçek gibi bitki örneklerinden 2096 *Acetobacter* straini izole etmişler, bunlardan nutrient broth besiortamının yüzeyinde pellik oluşturan 412 straini ayırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, çalkalamalı kültürde bakteriyal selüloz üretimi yönünden en iyi strainin *A. xylinum* ssp. *sucrofermentans* BPR2001 olduğu kaydedilmiştir.

2.13.2. Genetik mühendisliği ile selüloz üreten strainlerin geliştirilmesi

A. xylinum'dan diğer organizmalara çeşitli karbohidrolazları kodlayan genlerin aktarılması ile besiortamı maliyetinin düşürülüp, bakteriyal selüloz üretim miktarını artırma yoluna gidilmiştir. Örneğin; *Leuconostoc mesenteroides*'den sukroz fosforolaz geninin ekspresyonu ile *Acetobacter*'de karbon kaynağı olarak sukrozun kullanımıyla selüloz üretim miktarı artmıştır (Tonouchi et al.,1998). Nakai et al.(1999)'da *Vigna radiata* (*Fabacea*)'dan sukroz sentaz mutant geninin ekspresyonu ile *A. xylinum* strainlerinde selüloz üretim miktarının 2 katına

çıkıldığını göstermişlerdir. Bu mutant enzimde, glutamik asitle yer değiştirmiş 11 serin zinciri bulunmaktadır ve enzim, UDPGlc'nin sentezinde sukrozun parçalanmasını kolaylaştırmaktadır. *A. xylinum*'a mutant genin aktarılması, rekombinant strainlerde ne sukroz metabolizmasının değişmesiyle ne de direk UDPGlc'nin sentezi için yeni metabolik yol yaratılması ile olur (Şekil 2.12). Yüksek bitkilerde de UDPGlc sentezi benzer sistem ile olur.



Şekil 2.12 Sukroz sentaz (SukS) genini içeren rekombinant *A. xylinum* straininde UDPGlc biyosentez yolu (Bielecki et al., 2000)

2.13.3. Fermentasyon yöntemi

A. xylinum strainlerinde bakteriyel selüloz, sıvı besi ortamı yüzeyinde, jelatinimsi bir yapıda gelişir. Bakteriyel selüloz üretiminde durgun koşullar optimal olarak kullanışlı bir yöntem olarak görülmüş olabilir. Fakat durgun kültür koşullarında selülozun sıvı yüzeyde düz bir tabaka şeklinde sentezi ve üretim miktarının düşük olması bir dezavantaj olduğu için yeni fermentasyon yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

2.13.3.1. Karbon ve azot kaynakları

Bakteriyal selüloz üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan karbon kaynaklarıdır. Jonas ve Farah (1998)'de, bakteriyal selüloz üretiminde mono, di ve polisakkaritlerin, alkol ve organik asitlerin etkisini araştırmışlardır. D-arabitol ve D-mannitol gibi karbon kaynaklarının glukozla karşılaştırıldığında selüloz üretiminin 6,2 ya da 3,8 kat daha fazla olduğu kaydedilmiştir (Jonas ve Farah, 1998). Her iki şeker, glukonik asite dönüşmediği için reaksiyon sırasında pH sabit kalmıştır.

Tonouchi et al. (1996), *A. xylinum* strainlerinin glukoz ve fruktozdan selüloz sentezlediklerini bildirmişlerdir. Fruktoz, fosfoglukoz izomeras ve UDPGlc pirofosforolaz aktivitesini stimule etmiş ve selüloz üretimini artırmıştır.

Besiortamında karbon kaynağı olarak sadece maltoz kullanıldığı takdirde bakteriyal selüloz üretimi, glukoz içeren besiortamındaki üretimden 10 kat daha düşük olup, glukoz varlığında üretilen selüloz polimerinin uzunluğundan (DP=11,500) da daha kısa (DP=4000–5000) olmaktadır (Masaoka et al., 1993).

A. xylinum ssp. *BPR2001* strainin çalkalamalı kültürdeki bakteriyal selüloz üretimi, laktat varlığında 4-5 katına çıkmıştır (Matsuoka et al., 1996). Laktat kaynağı, özellikle çalkalamalı kültürde selüloz üretiminde en iyi besiortamı bileşiklerinden biri olan corn steep liquor (CSL)'dür. Selüloz üretiminde enerji kaynağı olan laktat, glukoz ve fruktozun aksine UDPGlc'a dönüşmez fakat Krebs döngüsünde piruvat ve oksalaasetat'a metabolize olur. Besiortamında laktatı üretmek için laktik ve asetik asit bakterilerinin karışık kültürü uygulanır. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* en iyi strainlerdir. Laktik ve asetik asit bakterileri, sukrozu hidrolize eden *Saccharomyces* mayasının (β -fruktofuranosidaz üreticisi) varlığında da gelişir. *Lactobacillus* straini $6,4 \text{ gL}^{-1}$ selüloz üretirken, 14 günlük çalkalamalı kültürde bu miktar $8,1 \text{ gL}^{-1}$ 'ye çıkmıştır (Seto et al., 1997).

Selüloz sentezini stimule eden diğer önemli bileşik etanoldür (Naritomi, et al., 1998a). *A. xylinum*'un sürekli kültüründe bulunan 10 gL^{-1} etanol, fruktoz içeren besiortamında bakteriyel selüloz üretimini artırmakta, fakat etanol miktarı 15 gL^{-1} 'a çıktığında polimer sentezi engellenmektedir. Selüloz sentezinde, laktat gibi etanol de enerji kaynağı olarak kullanılır fakat bunlar substrat değildir. ATP, fruktoz kinazı aktive eder, glukoz-6-fosfat dehidrogenazı da inhibe eder. Bu nedenle 6-P-glukozun, 6-fosfoglukonata dönüşümü engellenir.

Selüloz üreten strainler aminoasitler, vitaminler ve mineral tuzların dışında yeast ekstrakt, CSL, kazein ve diğer protein hidrolizatları gibi kompleks azot kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Tercih edilen azot kaynağı, Hestrin ve Schramm (1954)'ın geliştirdiği besiortamının (HS) temel bileşikleri olan yeast ekstrakt ve pepton'dur. Çalkalamalı kültürde kullanılabilecek en iyi azot kaynağı da CSL'dir (Johnson ve Neogi, 1989). Yeast ekstrakt, baktipepton gibi pahalı besiortamı bileşiklerinin yerine; beyaz kabak suyu, şeker pancarı atığı veya peynir altı suyu gibi ucuz endüstriyel atıklar da kullanılabilir (Krystynowicz et al., 2000).

Besiortamına piridoksin, nikotinik asit, p-aminobenzoik asit ve biotin gibi vitaminler eklenerek, bakteriyel selüloz sentezinde etkisi araştırılmıştır (Ishikawa et al., 1995, 1996b). Kolin, betain ve yağ asitlerinin (tuzlar ve esterler) de *A. xylinum* strainlerinin selüloz üretimini güçlü bir şekilde stimule ettiği gösterilmiştir (Hikawu et al., 1996).

2.13.3.2. pH ve sıcaklığın etkisi

A. xylinum strainlerinin selüloz üretiminde pH etkisinin analizinde strainler için en iyi pH aralığının türe bağlı olarak 4,0-7,0 olduğu anlaşılmıştır (Johnson ve Neogi, 1989; Galas et al., 1999). Ishikawa et al. (1996a) ve Tahara et al. (1997)'nin yaptığı araştırmaya göre *A. xylinum* strainlerinin pH 5,0'de fazla miktarda polimer sentezlediği belirlenmiştir. Krystynowicz et al. (1997)'ye göre de optimal pH 5,0 olarak verilmiştir. Farklı pH aralıklarında, polimerin adsorblama özellikleri araştırılmış ve polimer üretiminde kullanılan HS ortamı için önerilen pH 4,8-6,0

aralığında su tutma kapasitesinin en yüksek olduğu kaydedilmiştir (Wlochowicz, 2001).

Polimer üretiminde pH kadar sıcaklığın da önemi büyüktür. Yapılan araştırmalar sonucunda selülozun polimerizasyon derecesinin (DP) ve su tutma kapasitesinin en iyi olduğu sıcaklığın 28 - 30 °C olduğu gösterilmiştir (Wlochowicz, 2001). 25 °C ve 35 °C'de üretilen polimerin DP'si ve su tutma kapasitesi 30 °C'deki polimerin özellikleri ile karşılaştırıldığında; DP'nin en düşük değerinin yaklaşık 10,000; su tutma kapasitesinin de % 164 olduğu kaydedilmiştir (Wlochowicz, 2001).

2.13.3.3. Durgun ve çalkalamalı kültürler, fermentör çeşitleri

Bakteriyal selüloz sentezi, uygun miktarda hücre transferi ve ortam homojenliği için gerekli olan, çalkalanma ve havalandırmanın sağlandığı batık veya durgun kültürlerde gerçekleşir. Kültür şartlarının seçimi elde edilen polimerin kullanılacağı alana bağlıdır.

Durgun kültürde selüloz üretimi, genellikle yüzey/hacim oranına bağlıdır. Optimum yüzey/hacim oranı, çok yüksek ya da çok düşük havalandırma ile sağlanmaz. Yüzey/hacim oranının 2,2 cm⁻¹'den 0,7 cm⁻¹'e kadar değiştiği kaydedilmiştir (Joris et al.,1990; Krystynowicz et al.,1997). Durgun kültürde bakteriyal selüloz üretimi bir ya da iki adımda gerçekleşebilir (besi ortamına % 5-10 bakteri süspansiyonu inokule edilir). Krystynowicz et al. (1997), durgun kültürün birbirini takip eden iki adımda gerçekleştiğini kaydetmiştir. Birinci adımda *A. xylinum* E25 hücrelerinin 24 saatlik aktivasyonu sağlanır ve ikinci adımda bu ilk kültür, ikinci kültüre inokule edilir ve pellik oluşumu için 4-5 gün inkübe edilir. Bu metot tek tip bakteri gelişimini ve homojen pellik oluşumunu sağlar.

Durgun kültürde bakteriyal selüloz sentezinin kontrolü sıvı yüzeyde sınırlı oranda pellik oluşumundan dolayı zordur. Kontrolün sürekli olması için önemli

parametrelerden biri pH'dır. Polisakkarit sentezi ve hücre gelişimi için önemli bir faktör olan pH, kültür ortamında keto-glukonik asitin birikmesi ile düşer. Durgun kültürde pH ayarı geleneksel yöntemlerle yapılamadığından dolayı Vandamme et al. (1998), *in situ* pH kontrol sistemini uygulamışlardır. Örneğin; *Acetobacter* sp. LMG 1518 straini için substrat olarak fermentasyon ortamına asetik asit eklenmiştir. Keto-glukonat birikimi olsa bile asetik asit katabolizması ile pH'ın çok fazla düşmesi engellenmiş ve besiortamının pH'ı 5,5 olarak sabit kalmıştır.

Acetobacter genusuna ait strainlerden sürekli çalkalamalı kültür ile selüloz eldesinde birçok problemle karşılaşmıştır (Johnson ve Neogi, 1989). Bu problemlerden biri kültürün stabilitesinin çok zor sağlanmasıdır. Bu stabil olmayan durum, strainlerin selüloz yapma yeteneğini yavaş yavaş kaybettirir. Strainlerin stabilitesinin bozulmasının nedeni de spontan mutasyonlar ya da selüloz üretmeyen hücrelerin baskın hale geçmesidir. Çalkalamalı kültür sırasında selüloz üreten hücreler (Cel^+), selüloz üretmeyen (Cel^-) hücrelere değişebilir ve selüloz üretiminin kaybı, fizyolojik faktörlerden çok mutasyonla genetik açıdan selüloz üreten hücrelerin, selüloz üretmeyen hücrelere dönüşmesine bağlıdır (Johnson ve Neogi, 1989). Ayrıca EMS (etil metan sülfonat), nitroz asit ve NG (N/-nitro-N-nitroguanidin) gibi kimyasal mutajenler kullanılarak da (Cel^+) hücreler, Cel^- hücrelere dönüşebilmektedir. Statik kültürde gelişen (Cel^-) hücreler EMS, nitroz asit ve NG ile mutasyona uğrarlarsa (Cel^+) hücrelere dönüşürler (Valla ve Kjosbakken, 1982). Selüloz üreten ve üretmeyen hücrelerden oluşan karışık bir kültür, statik koşullarda geliştiği zaman selüloz üreten hücreler (Cel^+) daha baskın oldukları için kendilerini gösterirler. Fakat bu karışık kültür çalkalamalı koşullarda geliştirildiğinde selüloz üretmeyen (Cel^-) hücreler daha baskın olur (Valla ve Kjosbakken, 1982).

Statik koşullarda hücreler, besiortamında O_2 'nin zengin olduğu yere doğru hareket ederek, havanın daha çok olduğu bölgede toplanırlar. Bu kısımda zarımsı bir şekilde pellik oluşur. Havanın yeterli ve homojen olduğu çalkalamalı kültürlerde baskın olan (Cel^-) hücrelerin gelişimi, polimer sentezinden daha fazla olmaktadır (Krystynowicz et al., 2002).

Çalkalamalı kültürde *Acetobacter* strainleri ile selüloz üretiminde karşılaşılan diğer sorun, *Acetobacter* strainlerinin glukozu, glukonik asit ve ketoglukonik asite dönüştürmesidir. Dolayısıyla asit üretimi artar, pH düşer ve selüloz üretimi sınırlanır (Johnson ve Neogi, 1989).

Bakteriyal selüloz sentezinin daha iyi bir şekilde kontrolü için özel fermentörler geliştirilmiştir. Yatay fermentörlerde selüloz üretimi, batık ve sabit kültürlerle sağlanır. Polimer, uzun bir aksın etrafında silindirik yüzeyde toplanır. Oluşan polimerin bir kısmı sıvı ortam içinde bir kısmı da sıvı yüzeyde (havada) kalır. Bu yöntem ile daha fazla oranda polimer eldesi mümkündür (Sattler ve Fiedler, 1990). Bungay ve Serafica (1997)'de bir litre hacmindeki (çapı 12 cm olan) fermentörde selüloz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Krystynowicz et al. (1997), 11 L'lik fermentör kullanarak *A. xylinum* E25 straininden 7 günlük inkübasyon sonunda $4,2 \text{ gL}^{-1}$ BS üretmişlerdir. *A. aceti ssp. xylinum* ATCC 2178 straininden, 300 L'lik fermentör kullanılarak, 30°C 'de 45 saatlik inkübasyon sonunda 10 gL^{-1} BS üretilmiştir (Laboureur, 1988). Chao et al. (2000), *A. xylinum sp.* BPR2001 straininden 50 L'lik internal loop airlift reaktörünü kullanarak BS üretmişlerdir. Oksijence zengin havalandırma ile 67 saat sonra selüloz miktarı $3,8 \text{ gL}^{-1}$ 'den $8,0 \text{ gL}^{-1}$ ye çıkmıştır.

Fermentörlerde bakteriyal selüloz üretimi sırasında karşılaşılan en önemli sorun, kültür ortamında gelişebilecek miselli yapıya sahip olan fungus ve *Streptomyces*'lerdir. Havalandırma ve gaz transferinden dolayı çok miktarda miselyum oluşabilir.

Bakteriyal selüloz sentezi sırasında bazı metabolitlerin birikimi de selüloz üretimini etkilemektedir. Örneğin; Kouda et al. (1998), yüksek oranda CO_2 birikiminin *A. xylinum* gelişimini ve selüloz üretimini azalttığını kaydetmişlerdir.

Laboureur (1998)'de 300-500 L'lik fermentörler kullanarak, *A. xylinum sp.* ATCC 21780 straininden bakteriyal selüloz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan besiortamında % 5 sukroz, % 0.05 yeast ekstrakt, % 0,2 sitrik asit, azot tuzları,

Mg²⁺ ve fosfatlar bulunmaktadır. 30 °C’de 45 saatlik inkübasyon sonunda 18 gL⁻¹ BS üretilmiştir. *Acetobacter sp.* ATCC 8303 straininden, % 0,28 glukoz, % 0,07 maltoz, % 0,03 CSL ve % 0,03 yeast ekstrakt içeren besiortamında, 28 °C’de, pH 4,6’da, 33 saatlik inkübasyon sonunda 13 gL⁻¹ selüloz üretilmiştir.

Selüloza yapışan hücrelerden dolayı büyük hacimli fermentörlerde inoküle edilecek hücre miktarında problem ortaya çıkmaktadır. Selüloz hidrolizi için kullanılan selülaz ile hücreler uzaklaştırılır ve hücre yoğunluğu artmaktadır (Brown, 1989c). Otuz saatlik gelişimden sonra enzim varlığında hücre yoğunluğu 10⁷ mL⁻¹’den 10⁸ mL⁻¹’ye çıkmaktadır. Üretilen selülozdaki fibrillerin değişik çaplarda olması için denemeler yapılmış (Yamanaka et al.,1990) ve çapı küçük olan fibrillerden özellikle kan damarı olarak yararlanılmıştır (Klemm et al., 2001).

2.13.3.4. Sürekli kültür

Mikrobiyal selüloz durgun ve sürekli bir kültürde de üretilebilir (Sakair et al.,1998). Tepsilerde HS besiortamında kültüre edilmiş olan *A. xylinum* straini 2 gün sonra yüzeyde pellic oluşturur. Bu pellic alınarak sodyum dodesilsülfattan geçirilir ve bu sayede hücreler öldürülür ve pellic dönen bir silindire koyulur. Bu işlem 35 mm h⁻¹ dönme hızıyla birkaç hafta devam eder. Bu sırada optimum düzeyin korunması amacıyla her 8-12 saatte bir ortama taze HS besiortamı eklenir. Bu yöntemle uzunluğu 5 m’den daha fazla olan selüloz filamentleri elde edilebilir (Bielecki et al., 2000).

2.14. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması

Durgun ya da çalkalamalı kültürde üretilen mikrobiyal selüloz, hücre ya da besiortamı kalıntısı içerdiği için tamamen saf değildir. Bakteriyal selülozun saflaştırılmasında sodyum, potasyum hidroksit, sodyum klorat ya da hipoklorat, H₂O₂, seyreltilmiş asitler, organik çözücüler ya da sıcak su gibi çok değişik ajanlar kullanılır. Bu ajanlar tek ya da kombine bir şekilde kullanılabilir (Yamanaka et al., 1990). Bakteriyal selülozun bu ajanlardan herhangi biriyle 55 –

65 °C’de, 14–18 saatlik muamelesi sonunda hücre sayısı ve renklenme derecesi düşmektedir.

Yamanaka et al. (1989), bakteriyal selülozu musluk suyunda yıkadıktan sonra % 2 NaOH ile muamele etmişlerdir. Watanabe et al. (1998), ise polimeri 0,1 M NaOH’de 80 °C’de 20 dk. muamele etmişler ve daha sonra distile su ile yıkamışlardır. Takai ve Erata (1998), polimeri önce distile su ile yıkamışlar ve % 2 lik NaOH ile muamele ettikten sonra % 2 lik asetik asit ile nötralize etmişlerdir.

Krystynowicz et al. (1997), bakteriyal selülozu 1 gece musluk suyunda yıkamışlar, daha sonra 2 saat % 1’lik NaOH’de kaynatmışlardır. NaOH kalıntısını uzaklaştırmak için örnek 1 gün daha musluk suyunda yıkanmış ve % 5’lik asetik asit ile nötralize edilmiştir.

Bakteriyal selülozun medikal alanlarda kullanılabilmesi için pirojenik (hastalık toksini) reaksiyonlara sebep olan toksinlerden ve bakteri hücrelerinden arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla selüloz pelliğinin saflaştırılmasında en etkili yöntem, pelliğin % 3’lük NaOH’de 12 saat bekletilmesidir. Bu yöntem 3 kez tekrarlanır ve sonra pellik % 3’lük HCl çözeltisi ile muamele edilerek, distile su ile yıkanır. Saflaştırılmış pellik, otoklavda ya da ⁶⁰Co ışıını ile sterilize edilir.

2.15. Bakteriyal Selülozun Özellikleri

Bakteriyal selüloz genel olarak çözünmeyen, esnek, gerilme direnci yüksek, elastik bir polimerdir. Ağsı bir yapıya sahip olan polimerin kristalize özelliği yüksektir. Bu özellikler bitkisel orjinli selülozda bulunmaz. Ayrıca bitkisel polimerin ipliksi yapıları (fibril), bakteriyal selülozun mikrofibrillerinden 100 kat daha kalındır ve bakteriyal polimerin yüzeyi de bitkisel polimerin yüzey alanına göre 200 kat daha büyüktür. *A. xylinum* straininin çalkalamalı kültürde, ürettiği polimer ile statik kültürde ürettiği polimer karşılaştırılmış ve buna göre polimerizasyon (DP) derecesinin (14,400 ve 10,900), kristalizasyon indeksinin (% 71-63), gerilme direncinin (33,3 ve 28,3) yüksek olduğu fakat su tutma

kapasitesinin (45 ve 170 gBS⁻¹), süspansiyon viskozitesinin (0,04 ve 0,52 Pa.s) düşük olduğu kaydedilmiştir (Watanabe et al.,1998).

Bakteriyal selüloz içerdiği sıvı komponentlerden dolayı jelatinimsi bir görünüme sahiptir. Polimerin su tutma kapasitesi yüksektir fakat suyun fazlası polimere bağlanmaz ve polimer yavaşça bastırılarak fazla su dışarı verilebilir. Kurutulmuş polimer bir kağıt tabakası gibi 0,01-0,5 mm kalınlığında olup, iyi bir adsorblama özelliğine sahiptir (Yamanaka et al.,1990; Krystynowicz et al.,1995,1997). Ayrıca ses dalgalarını hızlı bir şekilde iletebilmektedir. Polimerin bu mekanik özelliğinden dolayı akustik membranlar olarak kullanılabildiği kaydedilmiştir (Vandamme et al.,1998).

Bakteriyal selülozun özellikleri, ya sentez sırasında ya da kültüre edilirken değişebilir. Selüloz türevleri; sülfonik asitler, alkilfosfatlar ya da nişasta, dekstran ve diğer polisakkaritler gibi bazı bileşikler, besiortamının içinde bulunduğu takdirde, ürünün makroskobik morfolojisi, gerilme direnci, optik yoğunluk ve adsorblama özellikleri değişebilmektedir (Yamanaka ve Sugiyama, 2000). Bakteriyal selüloz, ayrıca diğer bazı bileşikler ile kombine edilerek, istenilen fizikokimyasal özelliklere ulaşılabilir (Yamanaka et al.,1990). Bu amaçla, yardımcı materyal olarak alüminyum, cam, agar, alginatlar, carragenan, pullulan, dekstran, poliakrilamid, heparin, polihidroksialkoller, jelatin kollagen gibi inorganik ve organik bileşikler kullanılmaktadır. Bu yardımcı maddeler, bakteriyal selüloza emdirilerek, ya da adsorblanarak veya parçalanmış polimerle karıştırılarak birleştirilir ve çeşitli ürünlerin yapımında bu şekilde kullanılır (Bielecki et al., 2000). *Listeria mesenteroides*'den elde edilen dekstransukraz ve alternansukrazı kullanarak bakteriyal selülozun enzimatik modifikasyonu yapılmıştır (Kim et al., 1999). Bu enzimlerin besiortamında bulunması ile *A. xylinum* ATCC 10821 straini tarafından 1,4; 1,6 ve 1,3'e bağlı glukon monomerlerinden oluşan çözünür selüloz sentezlenmiştir.

2.16. Uygulama Alanları

Bakteriyal selüloz, genellikle güvenli olduğu bilinen (Generally recognized as safe = GRAS) polisakkaritler grubuna ait olup çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Çizelge 2.5). Bu polimerin ticari uygulamalarının yapılması, bakteriyal selülozun benzersiz bazı özelliklerinden ve bakteriyal strainlerin, ucuz atık maddeler üzerinde gelişebilmesinden dolayıdır. Bakteriyal selülozun avantajı, kimyasal saflığı ve genelde bitki polisakkaritlerinde bulunan maddelerin bakteriyal selülozda bulunmaması gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Bielecki et al., 2000).

Çizelge 2.5 Bakteriyal selülozun uygulama alanları (Jonas ve Farah, 1998)

Sektör	Uygulama alanı
Kozmetik sanayi	Kremelerin, toniklerin, tırnak cilalarının emilimini kolaylaştırmada kullanılır.
Tekstil endüstrisi	Suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsorptif materyal olarak kullanılır.
Turizm ve spor sektörü	Spor kıyafetler, çadırlar ve kamp malzemelerinde kullanılır.
Maden endüstrisi ve rafineri	Boşaltılan yağların toplanması, mineral ve yağların yeniden işlenip kullanılabilir hale gelmesinde kullanılır.
Atıkların saflaştırılması	Belediye atıklarının saflaştırılması ve su ultrafiltrasyonunda kullanılır.
Haberleşme-yayın sektörü	Mikrofonlar ve stereo kulaklıklarda kullanılır.
Orman endüstrisi	Çok tabakalı kontrplak, dayanıklı kapların yapımında kullanılır.
Kağıt endüstrisi	Birinci kalite kağıt, arşiv evrakları, dayanıklı banknotlar, çocuk bezi, peçete yapımında kullanılır.
Makine endüstrisi	Araba gövdesi, uçak parçaları ve roket rampalarındaki çatlakların giderilmesinde kullanılır.
Gıda endüstrisi	Yenilebilir selüloz ve “nata de coco” Tatlı yapımında kullanılır.
Medikal sektör	Geçici suni deri, yanık ve ülser tedavisi, dental maddesi, suni implantlarda kullanılır.
Laboratuvar/araştırma kurumları	Proteinlerin immobilizasyonu, kromatografik teknikler, in vitro doku kültürlerinin besiyortamı bileşiminde kullanılır

2.16.1. Teknik uygulamalar

Bakteriyal selüloz (BS) ile bitkisel selüloz (PS) tabakası karşılaştırıldığında bakteriyal selülozun bitkisel selüloza göre; daha düşük yoğunluğa ve yüksek gerilme direncine sahip olduğu görülmüştür (Johnson ve Neogi, 1989). Bakteriyal selüloz, çok iyi mekanik özelliklere sahip olduğundan birinci kalite kağıt üretiminde kullanılır. Bakteriyal polimerin mikrofibrillerinde, çok sayıda hidrojen bağı bulunduğundan bu polimerden elde edilen kağıdın kurutulması sırasındaki kimyasal adhezyon ve gerilme direnci yüksektir. Bakteriyal selüloz içerikli kağıtlar, dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmeleri yanında aynı zamanda elastik, geçirgen, yırtılmalara-yanmalara dirençli ve suyu emme özelliğine de sahiptirler (Iguchi et al., 2000). Tarihi dokümanların tamirinde kullanılan el yapımı kağıtların fibrillerine az miktarda BS ilave edilmesiyle yıpranmaya dirençli bir etki yaratılmış olur (Krystynowicz et al., 1997).

Bakteriyal selülozu % 1 oranında içeren kâğıtlar ISO 9706:1994 standartında yer almaktadır. Ayrıca bakteriyal selülozdan yüzey kaplamada kullanılan kağıtlar da üretilmiştir. Bu kağıtlar cilalı, parlak, düzgün ve gözenekli bir görünüme sahiptir. Yüzde 3 oranında bakteriyal selüloz içeren kaplama kağıtları, % 20 oranında kaplamaya sahip olan rotogravuer kağıtlarına benzer yüzey direncine ve cila özelliklerine sahiptir (Johnson ve Neogi, 1989). Bakteriyal selüloz, sentetik kağıdın önemli bir parçasıdır. Çünkü polar olmayan polipropilen ve polietilen fibrillerine ilave edilen BS, sentetik kağıdın ısıya karşı yalıtımını sağlar ve hidrojen bağları oluşturamadığı için yanmaya karşı dirençli hale gelir (Iguchi et al., 2000). İyi kalite bir kağıtta odun özütünün miktarı % 20-% 50 arasında değişir.

Bakteriyal selüloz, yünlü olmayan kumaş benzeri cilt veya ciltleme ürünlerinde, cerrahi kıyafetlerin ve cübbelerin yapımında ve değişik hidrofobik ve hidrofilik ürünlerde ayrıca selüloz esterleri, polyolefin, naylon, akrilik cam ya da metal fibriller gibi yaygın doğal ve sentetik fibrilleri içeren ürünlerin yapımında da kullanılır (Bielecki et al., 2000).

Bakteriyal selülozu sentez sırasında modifiye edilebildiği için kullanım alanını genişletmek mümkündür. (Brown, 1989a,b). Bu amaç için, kültür ortamına direk olarak CM-selüloz ya da sakkaritlerin kopolimerleri ve dikarboksilik asitler eklenmektedir (Yamanaka et al., 1989). CM-selüloz varlığında elde edilen ve organik çözücülerle kurutulan selüloz, elastik bir özelliğe ve daha yüksek su tutma kapasitesine de sahiptir. CM-selülozun optimum konsantrasyonu % 0,1 ile % 5 (ağırlık/hacim) arasındadır. Organik çözücülerin polaritesi bakteriyal selülozun özelliklerini etkiler. Örneğin aseton ile muamele edilmiş polimer, daha elastik ve esnek iken, saf etanol ile kurutulduktan sonra tabaklanmış deriye benzemektedir (Bielecki et al., 2000).

2.16.2. Tıbbi uygulamalar

Durgun kültürde üretilen selüloz, yanık bölge üzerinde iyileştirici bir özelliğe sahiptir (Bielecki et al., 2000). Bakteriyal selüloz steril edilebilir, dokuya uyumludur, gözenekli, elastik ve elle tutulması kolaydır, suyu adsorbladığı için belli oranda nem içerir bu da yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar ayrıca yaralı bölgede ikincil enfeksiyonların oluşmasını engeller, yanan bölgedeki ısıyı adsorblayarak acıyı ve ağrıyı azaltır ve dokuda yaranın yayılmasını engeller. BS pellikleri farklı boyutlarda elde edilebildiği için yoğun yaralar üzerinde koruyucu olarak kullanılabilir. Hayvansal orijinli ürünlerdeki problemlerden dolayı kollagen kaplayıcılar yerine BS içerikli kaplayıcılar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan bakteriyal selüloz ürünleri Xylos Corp. firması tarafından Prima CelTM olarak üretilmektedir. Bu polimer, Rensselaer Polytechnic Institute (USA)'de ülser tedavisinde yara kapatıcı olarak uygulanmıştır. Bu şekilde tedavi edilen ülser hastalarının % 54'ü, 8 hafta sonra iyileşmişlerdir (Jonas ve Farah, 1998). *A. xylinum*'dan sentezlenen selüloz ticari olarak "Biofil ve Bioprocess" isimleri ile piyasa sürülmüş ve bu materyal 3. derecede yanıkların, ülser ve dekubitus tedavisi ile deri transpalantasyonunda tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Piyasada "Gengiflex" olarak bilinen başka bir ürün de peridontal dokuların geri dönüşümünde ya da iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Jonas ve Farah, 1998). Krystynowicz et al. (2000) tarafından *A. xylinum*'dan elde edilen selülozun, farelerdeki yaralar üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu da belirtilmiştir (Bielecki

et al., 2000). Yamanaka et al. (1990), ortası çukur özelliğe sahip olan bakteriyal selüloz fibrillerinin suni kan damarları ve üreterler olarak kullanılabileceğini de önermişlerdir. Köpeklerde aort ve boyun damarlarının yerine antitrombik özelliğe sahip olan bakteriyal selüloz içeren suni damarlar kullanılmıştır. 1 ay sonra bu suni damarlar çıkarılmış ve iç yüzeyde trombinin adhezyonunun durumu incelenmiş ve bakteriyal selüloz içeren kan damarlarının işleyişini iyi bir şekilde koruduğu gözlenmiştir (Bielecki et al., 2000).

Yüksek gerilme direnci, elastikiyet, sıvıları ve gazları geçirme özelliği olmasından dolayı kuru bakteriyal selüloz, kan glukoz seviyesinin ayarlanması için kullanılan biosensörlerde immobilize edilmiş, glukoz oksidazı koruyan bir membran olarak uygulanmıştır. Bu bakteriyal selüloz membran, 10 kat sulandırılmış insan kan solusyonunda elektrot stabilitesini 200 saat kadar koruyabilmiştir. Cuprophan (AKZO, England) gibi diğer koruyucu membranlar elektrot stabilitesini sadece 30 saat kadar korumuşlardır. Cuprophan ile örtülmüş, seyreltilmemiş insan kan biosensöründe, elektrot stabilitesi 3-4 saat olmasına rağmen bakteriyal selüloz membran 24 saat kadar stabilite sağlamıştır (Bielecki et al., 2000).

2.16.3. Gıda uygulamaları

Bakteriyal selüloz, işlenmiş gıdalarda hiçbir yan etkisi olmayan kalorisiz bir katkı maddesi olarak kullanılır. Bakteriyal selülozun gıda endüstrisinde ticari olarak ilk kez kullanımı “nata de coco” olarak Filipinlerde kullanılmıştır. Nata de coco BS üreten bakterilerin besiortamına ilave edilen sukrozlu hindistan cevizi sütü veya suyundan hazırlanan bir tatlandırıcıdır (Sutherland, 1998). Nata de coco’nun tüketiminin, bağırsak kanserine, damar sertliğine, koroner damarlardaki kanın pıhtılaşmasına karşı koruyucu etkisinin olduğuna ve idrardaki ani glukoz artışını önlediğine inanılır. “Nata de coco”nun kullanımı sadece Asya’da değil, tüm dünyada yaygın hale gelmektedir.

Bakteriyal selüloz içerikli diğer gıda ürünü de “Chinese Kombucha (teakvass ya da tea-fungus)’dır. Bu ürün çay ya da şeker ekstraktlarında gelişen asetik asit

bakterilerinden ya da mayalardan elde edilir. Yüzeyde oluşan bu pelik insan sağlığı için hem selülozu ve hem de enzimleri içerir. Abiyotik aktiviteleri, tüm sindirim sistemi ve özellikle de kalın bağırsağı düzenler. Kombucha'nın bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkisinin olduğuna da inanılır (Iguchi et al., 2000).

A. xylinum E25 straini tarafından sentezlenen bakteriyal selüloz peliklerinin gelecekte, şarap ve meyve filtrasyonunda ve polifenollerin immobilizasyonunda kullanılabileceği de söylenmektedir. Zenginleştirilmiş lifli gıdalarda, bioaktif antosiyanin içerikli gıdaların üretiminde katkı maddesi olarak kullanımı uygundur. BS'nin raf ömrünü uzattığı, lezzetli ve kokusuz olduğu için unlu mamüllerde de kullanılabileceği öne sürülmüştür (Krystynowicz et al., 1999).

2.16.4. Genel kullanım alanları

Bakteriyal selüloz fiziksel kimyasal metotlar ile modifiye edilebildiği için, biyokatalitlerin immobilizasyonunda da uygulanabilirliği gösterilmiştir. İmmobilize hayvan hücrelerinin içerdiği selüloz jeller, interferon, interleukin-1, sitostatik ve monoklonal antibiyotikleri üretmek için gerekli olan hücre kültürlerinde de kullanılmaktadır (Iguchi et al. 2000).

Bakteriyal selüloz, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter methanolyticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin adsorbsiyonunda kullanılır. Bu immobilize strainlerin her birinin, glukonat (% 84-92), dihidroksiaseton (% 90-98) ve etanol (% 88-92) üretiminde etkili oldukları görülmüş, ve ayrıca bunların termal stabilitelerinin ve işlevlerinin daha iyi olduğu da gösterilmiştir (Bielecki et al., 2000).

Saflaştırılan bakteriyal selüloz; selüloz asetat, nitroselüloz, CM-selüloz, hidroksimetilselüloz ve hidroksiselüloz'un sentezindeki ham maddedir (Yamanaka et al., 1990). Bakteriyal selüloz, β 1-4 glukan yapısına sahip olan düzenli fibrillerden oluşan CM-selüloz, diğer selüloz türevleri, nişasta, dekstran gibi diğer karbohidratlar, sulfonatlar ve alkilfosforlar gibi bileşikler varlığında üretildiğinde, tekrarlanan ısılatma ve kurutmadan sonra bile yüksek su tutma

kapasitesi, optik saydamlık gibi yeni ve faydalı özelliklere sahip olmaktadır (Bielecki et al., 2000).

Bakteriyal selülozun kimya, kağıt ve tekstil endüstrisinde potansiyel uygulamaları maliyetine ve kullanılabilirliğine bağlıdır. Bu taleplerin karşılanabilmesi için BS, batık fermentörlerde ve katı ortamlarda veya ucuz atık maddeler üzerinde verimi yüksek strainlerle üretilmek zorundadır (Vandamme et al., 1998).

2.17. Patentler

Bakteriyal selüloz ile ilgili olarak, 1980'den beri yıllık yaklaşık 20 patentin alınması ve son 10 yıldan beri bu konuda yapılan çalışmalardan, her yıl yaklaşık 20-40 yayının çıkarılması, bakteriyal selüloz üzerindeki yoğun ilginin bir göstergesi olarak kabul edilebilir (Iguchi et al., 2000). Bakteriyal selülozun biyosentezi, özellikleri ve uygulama alanları ile ilgili bazı temel patentler çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6 Patentler (Bielecki et al., 2000)

Patent no	Patent firması	Araştırmacılar	Başlık	Yayın tarihi	Açıklama
WO 0125470	Novozymes A/S. Danimarka	Herbert,W.,Chanzy,H.D., Ernstst,S., Schulein,M., Husum,T.L., Kongsbak,L.	Selüloz filmlerinin taranması	2001	Floresansla işaretlenmiş hemoglobin ve galaktomannan içeren, BS mikrofibril filmleri, proteaz ve mannanazları saptamak için kullanılabilir
WO 0105838	Pharmacia Corp., USA	Yang,Z.F., Sharma,S., Mohan,C., Kobzeff,J.	BS'nin kurutulması için yöntemler	2001	Hekzan, alifatik alkol, DMSO vb çözücüler ile selülozun ayrılması
JP	Bio-polymer Reserch Co. Ltd., Japonya	Watanabe,O.	Selüloz mikrofibrillerini dondurup kurutma metodu	1999	<i>A. xylinum</i> 'un oluşturduğu selülozun dondurulup, kurutulması
WO 9943748	Sony	Uryu,M., Tokura,K.	Biyolojik parçalanabilen polimer	1999	<i>A. xylinum</i> 'un oluşturduğu selülozun yeni materyallerde kullanılması
JP 10077302	Bio-polymer Reserch Co. Ltd., Japonya	Tabuchi,M., Watanabe,K., Morinaga,Y.	Çözülebilir BS ve bileşimi	1998	<i>A. xylinum</i> 'un durgun koşullarda sentezlediği selüloz, DMSO ve paraformaldehitile (25:5) 100 °C'de 3 saatte çözülebilir
WO 97/05271	Rensselaer Polytecic Ins.,USA	Bungay,H.R., Serafica,G.	Bioreaktör kullanılarak, mikrobiyal selüloz üretimi	1997	Yatay fermentörde <i>A. xylinum</i> 'dan oluşturulan BS
JP 96316922	Bio-polymer Reserch Co. Ltd., Japonya	Hikawu,S.,Hiroshi,T.,Takaya su,T.,, Yoshinaga,F.	Selüloz oluşumunu teşvik edici maddelerin eklenmesi ile BS'nin üretimi	1996	Kolin, betain ve yağ asitleri gibi bileşikler, <i>A. xylinum</i> 'dan selüloz üretimini stimüle eder
JP 07184675 A	Bio-polymer Reserch Co. Ltd., Japonya	Matsuoka,M.,Tsuchida,T.,Yo shinaga,F.	BS'nin üretimi	1995	Gıdalarda, kosmetikte vb. alanlarda kullanılan BS'nin, <i>Acetobacter</i> strainleri tarafından, metionin içeren sıvı ortamda üretilmesi

JP 06206904	Shin Etsu Chemical Co. Ltd. Japonya	Horii,F., Yamamoto,H.	BS'nin üretimi ve kristal yapısını kontrol etmek için metotlar	1994	<i>A. xylinum</i> 'un kültür ortamına eklenen ksantan sakızı ya da sodyum CM selüloz eklenmesi ile oluşan selülozun kristal yapısı
005268274 USA	Cetus Corp.,USA	BenBassat,A.,Calhoon,R.D., Fear,A.L.,Benziman,M.	Selüloz sentaz operonunu ekspresyonu için nükleik asit sekansları ve metotlar	1993	<i>A. xylinum</i> 'dan BS sentazı kodlayan nükleik asit sekansları ve genlerin izolasyonu için metotlar
EP 0258038 A3	Brown,R.M.	Brown,R.M.	Selüloz üreten mikroorganizmalar ve kültürasyonda selülaz kullanımı	1989	Büyük hacimli fermentörlerde selüloz üretimi için hücre inokulumu ve selülaz etkisi ile <i>A. xylinum</i> hücrelerinin, selülozdan ayrılması
US 004655758	Johson & Johson products,Inc.,USA	Ring,D.F., Nashed;W.,Dow,T.	Mikrobiyal polisakkaritlerin üretim metotları	1987	Bakteri hücrelerinin, sıvı ortamdan uzaklaştırılması ve selüloz pelliğinin çeşitli amaçlar için kullanımı
EP 0200409 A3	Ajinomoto Co.Inc.Japonya	Iguchi,M.,Mitsuhashi,S.,Ichimura,K.,Watanebe,K.,Yamanake,S.	Bakteriler tarafından üretilen selülozdan yapılan materyallerin karşılaştırılması	1986	BS şekle sokulabilen materyallerin üretimi için mükemmel bir bileşimdir

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar

Glukoz (Carlo-Erba), Fruktoz (Carlo-Erba), Sukroz (Carlo-Erba), Yeast ekstrakt (Merck), Kazein pepton (Merck), Meat pepton (Fluka), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), Sitrik asit (Merck), Agar-Agar (Merck), CaCO_3 (Merck), Mannitol (Riedel), Pepton (Merck), KH_2PO_4 (Riedel), K_2HPO_4 (Merck), Etanol (Riedel), Bromcresol green (Riedel), Nutrient agar (Lab M), Nutrient broth (Merck), Et ekstraktı (Merck), Pepton (Merck), Tripton (Fluka), KNO_3 (Kimetsan), Jelatin (Fluka), Triptoz (Oxoid), NaCl (Riedel), Malt Ekstrakt Agar (Merck), Malt ekstrakt (Merck), Czapek dox agar (Merck), Sülfanilik asit (Merck), Glasiyal asetik asit (Riedel), α -Naftol (Merck), Para-dimetil aminobenzaldehit (Riedel), (% 37) Hidroklorik asit (Riedel), Fenol (katı) (Riedel), (% 30) Hidrojen peroksit (Riedel), (% 97) H_2SO_4 (Fluka), Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid (Fluka), Gliserol (Riedel), (% 25) Gluteraldehit (Sigma), NaOH (Merck), Sodyum asetat (Riedel), Asetik asit (Riedel), Tris-HCl (Fluka), EDTA (Merck), Lizozim (Sigma), SDS (Fluka), Proteinaz K (Sigma), RNase (Sigma), Agaroz (Sigma), Tris-Base (Merck), Borik asit (Merck), İsopropil Alkol (Kimetsan), Kloroform (Merck), n-butanol (Merck), Metanol (Kimetsan), TFA (Merck), DNS (Sigma), Potasyum sodyum tartarat (Fluka), Avicel selüloz (Merck), Karboksimetil selüloz (Sigma), Kristal violet (Merck), Amonyum oksalat (Merck), Safranin (Carlo-Erba), İyot (Merck), Potasyum iyodür (Riedel), Malaşit Yeşili (Carlo-Erba), Sikloheksimid (Riedel), Fenol-red (Merck), Üre (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Riedel), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Tween 80 (Fluka), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

3.1.2. Örnekler

Bu araştırmada, bakteri izolasyon materyali olarak ev yapımı şarap, sirke, elma, üzüm, turşu suyu ve bağ toprağı örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla farklı bölgelerden 3 çeşit şarap, 2 çeşit sirke, toprak örnekleri ile elma, üzüm şırası ve turşu suyu toplanmıştır. Bu örnekler izolat elde etme amacıyla kullanılmıştır. İzolatların elde edildiği örnekler ve izolat sayısı çizelge 3.1 verilmiştir.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan örnekler ve izolat sayıları

Örnek Adı	Kaynak Adı	İzolat Sayısı
Şarap	Çal-Denizli	10
Şarap	Geyre-Aydın	42
Şarap	Senirkent-Isparta	15
Sirke	Senirkent-Isparta	52
Sirke	SDÜ-Isparta	15
Elma Suyu	Aydın	14
Üzüm Suyu	Aydın	14
Turşu Suyu	Aydın	15
Bağ Toprağı	Kabalar-Kuşadası	8

Çizelgede belirtildiği gibi 9 adet örnekten 185 izolat elde edilmiştir. Toprak örnekleri üzerinde yapılan inceleme sonunda çoğunlukla *Bacillus*'ların baskın olduğu görülmüş ve bu nedenle sonraki çalışmalarda toprak örneği ile çalışılmaya son verilmiştir. Elde edilen 185 adet izolatın selüloz üretme yetenekleri De Wulf et al. (1996)'ya göre taranmıştır. Bu izolatlardan 136 adedi selüloz üretme yönünden pozitif olmasına rağmen 49 adedi de negatiftir. Çalışma için 136 izolat arasından selüloz üretim miktarı (mg/ml) olarak en fazla olan 31c ve 8a kodlu izolatlar seçilmiştir. 136 adet izolat Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuvarında liyofilize edilerek saklanmaktadır.

3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmamızda ev yapımı şarap ve sirkelerden izole ettiğimiz 31c kodlu *Acetobacter pasteurianus* HBB 6 ve 8a kodlu *Acetobacter lovaniensis* HBB 5 bakterileri ile DSMZ Kültür Koleksiyonundan, şahit strain olarak alınan *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004, *Acetobacter aceti* DSM 3508 bakterileri kullanılmıştır.

3.1.4. Bakteriyal selüloz (ekstrasellular) üretiminde kullanılan karbon ve azot kaynakları

Bakteriyal selüloz üretiminde, kendi izolatlarımız olan 31c ve 8a kodlu bakteriler kullanılarak analitik saflıktaki karbon ve azot kaynakları ile optimizasyon çalışmasına gidilmiştir.

Bakteriyal selüloz üretiminde, analitik saflıkta karbon kaynağı olarak; glukoz, fruktoz, sukroz ve etanol, azot kaynakları olarak da yeast ekstrakt, kazein hidrolizat ve amonyum sülfat kullanılmıştır.

3.1.5. Bakteriyal selüloz üretiminde enerji kaynağı olarak kullanılan atık maddeler

Bakteriyal selüloz üretiminde, enerji kaynağı olarak melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu atık maddeleri ile corn steep liquor kullanılmıştır.

3.1.6. Besiortamları

Besiortamı 1: HS Agar (Hestrin ve Schramm, 1957)

Glukoz	% 2
Yeast ekstrakt	% 0,5
Polipepton	% 0,5
(Kazein pepton + Meat pepton)	(% 0,25 + % 0,25)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	% 0,675
Sitrik asit	% 0,115
Agar	% 1,5
Distile su	100 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, besiortamının pH'ı 6,0'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında (Vestel, Turkey) kaynatılıp, otoklavda (Hirayama HA-240 M IV, Japan) 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Besiortamına, sterilizasyon sonunda maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid ilave edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, steril petrilere dökülerek, bakteri izolasyonu için kullanılmıştır.

Besiortamı 2: GYC Agar (Glukoz Yeast Karbonat Agar) (Du Toit, 2002)

Glukoz	% 5
Yeast ekstrakt	% 1
CaCO ₃	% 3
Agar	% 2
Distile su	100 ml
pH	7,5 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 7,5'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı içerisindeki agarı çözmek amacıyla mikrodalga fırında kaynatılıp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Besiortamına, sterilizasyon sonunda maya inhibisyonu için 100 ppm

sikloheksimid ilave edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek, bu besiortamı da bakteri izolasyonu için kullanılmıştır.

Besiortamı 3: Mannitol Agar (Du Toit, 2002)

Mannitol	% 2,5
Yeast ekstrakt	% 1
Agar	% 1,5
Distile su	100 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH 6,0'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı içerisindeki agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Besiortamına, sterilizasyon sonunda maya inhibisyonu için 100 ppm sikloheksimid ilave edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek, bakteri izolasyonu için kullanılmıştır.

Besiortamı 4: HS Broth (Hestrin ve Schramm, 1957)

Glukoz	% 2
Yeast ekstrakt	% 0,5
Poliipepton	% 0,5
(Kazein pepton + Meat pepton)	(% 0,25 + % 0,25)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	% 0,675
Sitrik asit	% 0,115
Distile su	100 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 6,0'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, steril petrilere dökülerek, bakteri izolatlarının bakteriyel selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

Besiortamı 5: Y3-3 Medium (modifiye besiortamı) (Johnson ve Neogi, 1989)

Glukoz	20 g/l
Yeast extract	10 g/l
Pepton	10 g/l
KH ₂ PO ₄	4 mM
K ₂ HPO ₄	6 mM
Distile su	1000 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 6,0'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, steril petrilere dökülerek, bakteri izolatlarının bakteriyel selüloz üretimlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

Besiortamı 6: Modifiye Besiortamı (Frateur, 1950)

Etanol	% 3
CaCO ₃	% 2
Yeast Ekstrakt	% 2
Agar	% 2
Distile su	100 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 6,0'ya (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Etanol, besiortamı sterilize edildikten sonra, ortama ilave edilmiştir. Besiortamı homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülmüştür. Bu besiortamı, bakteri izolatlarının etanolü karbon kaynağı olarak kullanılabilirliğini tespit etmek için kullanılmıştır.

Besiortamı 7: Bromcresol Green’li Besiortamı (Carr, 1968)

Etanol	% 2
Yeast Ekstrakt	% 3
Bromcresol green	% 0,0022
Agar	% 2
Distile su	100 ml
pH	6,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri, distile suda çözülüp, pH’ı 6,0’ya (0,1M NaOH) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Besiortamı homojen olacak şekilde karıştırılmış ve 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülmüştür. Bu besiortamı, asetik asit bakterilerinden *Acetobacter* ve *Gluconobacter* genuslarının birbirinden ayırt etmek için kullanılmıştır (Carr, 1968).

Besiortamı 8: Karbohidrat Fermentasyon Ortamları (Tamer ve ark., 1989)

Karbohidrat fermentasyon denemelerinde, kullanılan sukroz, glukoz, laktoz, fruktoz’ dan 5’er gram alınarak 1L Nutrient broth’a ilave edilmiştir. Ortam durham tüpü içeren test tüplerine dağıtılmış ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Besiortamı 9: Nutrient Agar

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	6,8 ± 0,1

Besiortamı içerikleri, distile suda çözülüp, pH’ı 6,8’e (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp otoklavda 1,1

atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra yatık halde dondurulmuştur (Tamer ve ark.,1989). Bu besiortamı biyokimyasal testlerde kullanılan 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında ve kültürel karakteristiklerin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiortamı 10: Nutrient Broth

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Distile su	1000 ml
pH	6,8 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 6,8'e (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı, homojen olacak şekilde karıştırılıp otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Tamer ve ark.,1989). Bu besiortamı, biyokimyasal testlerde kullanılan 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında ve kültürel karakteristiklerin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiortamı 11: Tripton Broth

Tripton	10 g
Distile su	1000 ml

Tripton distile suda çözülerek, tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Tamer ve ark.,1989). Bu besiortamı indol üretiminin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiortamı 12: Nitrat Broth

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
KNO ₃	1g
Distile su	1000 ml
pH	7,0 ± 0,1

Besiortamı içerikleri, distile suda çözülerek, tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Tamer ve ark.,1989). Bu besiortamı nitrat redüksiyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiortamı 13: Nutrient Jelatin

Et Ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Jelatin	4 g
Distile su	1000 ml
pH	6,8 ± 0,1

Besiortamı içerikleri 50 °C'de çözüldükten sonra test tüplerine dağıtılmış ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Tamer ve ark.,1989). Bu besiortamı izolatların, jelatinaz aktivitelerini belirlemede kullanılmıştır.

Besiortamı 14: Triptoz Fosfat Agar

Triptoz	20 g
Glukoz	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 7,3'e (0,1M NaOH) ayarlanmıştır. Besiortamı, agarı çözmek için mikrodalga fırında kaynatılıp, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ortam 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülmüştür. Bu besiortamı katalaz testinde kullanılmıştır.

Besiortamı 15: Triptoz Fosfat Broth

Triptoz	20 g
Glukoz	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Distile su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 7,3'e (0,1M NaOH) ayarlanmıştır. Besiortamı otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu ortam katalaz testinde kullanılmıştır.

Besiortamı 16: Malt Ekstrakt Agar

Malt ekstrakt	30 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	5,4 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 5,4'e (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu besiortamı fungusların gelişimi için kullanılmıştır.

Besiortamı 16: YPD Agar (Strauss et al., 2001)

Yeast ekstrakt	% 1
Pepton	% 2
Glukoz	% 2
Agar	% 2
Distile su	100 ml
pH	5,5 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 5,5'e (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu besiortamı fungusların gelişimi için kullanılmıştır.

Besiortamı 17: Mandels ve Weber Besiortamı (Mandels ve Weber, 1969)

Üre	0,3 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g/L
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L
Pepton	0,75 g/L
Yeast ekstrakt	0,25 g/L
Tween 80	0,2 g/L
Mikrokristal selüloz	2,0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0mg/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	1,6 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 mg/L
pH	5,5 ± 0,1

Besiortamı içerikleri distile suda çözülüp, pH'ı 5,5'e (0,1M HCl) ayarlanmıştır. Besiortamı otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu besiortamı, funguslardan selülaz enzimi elde etmede fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

3.1.7. Çözeltiler ve Boyalar

Çözelti 1: % 0,85 Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

85 g NaCl, 1000 ml distile suda çözülerek hazırlanır. Bakteri izolasyonu sırasında seyreltme sıvısı olarak kullanılmıştır.

Çözelti 2: Sülfanilik Asit Çözeltisi

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

294 ml glasiyal asetik asit, 706 ml distile su karıştırılır ve üzerine 8 g sülfanilik asit ilave edilerek, iyice çalkalanır. Nitrat indirgenmesi testinde kullanılır.

Çözelti 3: α -Naftol Çözeltisi

α -Naftol	5 g
Etanol (% 95)	100 ml

5 g α -Naftol, 100 ml etanolde çözülerek hazırlanır. Nitrat indirgenmesi ve Voges-Proskauer testinde kullanılır.

Çözelti 4: Kovaks Ayıracı

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

Para-dimetil aminobenzaldehit alkolde çözülür. Çözelti, su banyosunda hafifçe ısıtılır. Bütün içerikler çözüldükten sonra HCl dikkatlice ilave edilir ve karıştırılır (Tamer ve ark.,1989). İndol testi için kullanılır.

Çözelti 5: % 5'lik Fenol Çözeltisi

Fenol (katı)	5 g
Distile su	100 ml

Fenol, distile suda çözülür. Toplam şeker tayini için, fenol-sülfürik asit metodunda kullanılır.

Çözelti 6: % 3'lük H_2O_2 (% 30)

Hidrojen peroksit	10 ml
Distile su	90 ml

(% 30) Hidrojen peroksitten 10 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Katalaz testi için kullanır.

Çözelti 7: % 97'lik H_2SO_4

% 97'lik sülfürik asit, fenol-sülfürik asit metodunda kullanılmıştır.

Çözelti 8: % 1'lik Tetrametil-p-Fenilen Diamin Dihidroklorid Çözeltisi

Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid	1 g
Distile su	100 ml

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

Çözelti 9: 10-100 μ g/ml'lik Glukoz Standart Çözeltileri

10,20,30,40,50,60,70,80,90,100 μ g/ml'lik glukoz çözeltileri hazırlanmıştır. Toplam şeker tayini için, fenol-sülfürik asit metodunda, standart eğrinin çıkarılmasında kullanılmıştır.

Çözelti 10: % 15'lik Gliserol

Gliserol	15 ml
Distile su	75 ml

İzolatların saklanması için kullanılmıştır.

Çözelti 11: % 2 (w/v)'lik Gluteraldehit Çözeltisi

0,8 ml % 25'lik gluteraldehite, 9,2 ml 50mM potasyum fosfat tamponu ilave edilerek, 10ml çözelti hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinin SEM'de görüntülenmesi için, fiksasyon amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 12: Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM, pH 6,5)**A. Potasyum fosfat çözeltisi (50 mM)**

Potasyum fosfat (KH_2PO_4)	0,68 g
Distile su	100 ml

B. NaOH çözeltisi (50 mM)

Sodyum hidroksit	0,2 g
Distile su	100 ml

50 ml A ve 13,9 ml B çözeltisinden alınarak karıştırılmıştır. pH 6,5'a ayarlanıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bakteri hücrelerinin SEM'de görüntülenmesi için, fiksasyon amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 13: Sodyum Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0)**A. Sodyum asetat çözeltisi (50 mM)**

Sodyum asetat	0,68 g
Distile su	100 ml

B. Asetik asit çözeltisi (50 mM)

Asetik asit	0,3 ml
-------------	--------

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

70 ml A ve 30 ml B çözeltisinden alınarak, karıştırılmıştır. pH 5'e ayarlanmıştır. Selülozun enzimatik hidrolizinde ve TLC'de standart çözeltinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 14: Liziz Tamponu (pH 8,0)**A. Tris-HCl (50 mM)**

Tris-HCl	0,79 g
Distile su	100 ml

B. EDTA (20 mM)

EDTA	0,74 g
Distile su	100 ml

C. Glukoz çözeltisi (50 mM)

Glukoz	0,99 g
Distile su	100 ml

Önce Tris-HCl sonra EDTA çözülür ve üzerine glukoz ilave edilip, son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözülür. pH 8,0'e (0,1M NaOH) ayarlanır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 15: Lizozim Çözeltisi (20 mg/ml)

Lizozim	0,1 g
Distile su	5 ml

Buz içinde hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 16: % 20 SDS (Sodyum dodesil sülfat)

SDS	2 g
Distile su	10 ml

Çözünmesi zor olduğu için magnetik karıştırıcı kullanılarak çözünmesi sağlanır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 17: Proteinaz K (20 mg/ml)

Proteinaz K	0,02 g
Distile su	1 ml

Buz içinde hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 18: RNase Çözeltisi (20 µg/ml)

RNase	0,02 g
Distile su	1 ml

0,02 g RNase, 1 ml distile suda çözülerek, buz içinde hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 19: % 0,5 Agaroz Jel Çözeltisi

Agaroz	0,5 g
Distile su	100 ml

0,5 g agaroz, 100 ml distile suda çözülerek, hazırlanmıştır. Bakteri DNA'larının agaroz jel elektroforezinde incelenmesinde kullanılmıştır.

Çözelti 20: 0,5X TBE (Tris-Borik EDTA) Tamponu

Tris-Base	54 g
Borik asit	27,5 g
EDTA.2H ₂ O (0,5 M, pH: 8)	20 ml
Distile su	1000 ml

Agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanır.

Çözelti 21: Sodyum Asetat (C₂H₃NaO₂.3H₂) (3M, pH 3,5) Çözeltisi

Sodyum asetat	0,20 g
Distile su	100 ml

DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Çözelti 22: % 70'lik Etil Alkol

Etil alkol	7,3 ml
Distile su	92,7 ml

Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 23: İsopropil Alkol

Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 24: Fenol-Kloroform Çözeltisi

1/1 oranında hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Çözelti 25: TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) Standartları

50 mM sodyum asetat tamponunda (pH 5,0) glukoz, sellobioz, sellotrioz karbohidratlarını içeren % 0,1'lik standart hazırlanmıştır. Hidrolize edilen selülozun, monosakkarit içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çözelti 26: % 50-% 100 Etil Alkol Serileri

% 50-60-70-80-90-100'e kadar olan etil alkol serileri hazırlanmıştır. Bakteri hücrelerinin SEM'de görüntülenmesi için, fiksasyon amacıyla kullanılmıştır

Çözelti 27: n-butanol:etanol:su (5:3:2)

İnce tabaka kromatografisinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Hidrolize edilen selülozun TLC'de, monosakkarit içeriğinin belirlenmesinde, mobil faz olarak kullanılmıştır.

Çözelti 28: % 0,2 Orsinol Boyası

Sülfürik asit-metanol (1:9) oranında 100 ml karışım hazırlanmıştır. Bu karışım 0,2 g orsinol üzerine eklenmiştir. Hidrolize edilen selülozun TLC'de, monosakkarit içeriğinin belirlenmesinde, boya maddesi olarak kullanılmıştır.

Çözelti 29: TFA (Trifloraasetik Asit) (2 M)

TFA	15,4 ml
Distile su	84,6 ml

15,4 ml TFA üzerine 84,6 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır. Selülozun hidrolizi için kullanılmıştır.

Çözelti 30: Sodyum Hidroksit Çözeltisi (4 N)

NaOH	16 g
Distile su	100 ml

16 g NaOH, 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Çözelti 31: 3,5 Dinitrosalisilik Asit (DNS) Çözeltisi

DNS	0,5 g
Potasyum Sodyum Tartarat	15 g
NaOH (4 N)	5 ml
Distile su	50 ml

0,5 g DNS bagetle iyice ezildikten sonra 5 ml distile su ile karıştırılır. 50 °C'deki su banyosuna arada bir daldırıp çıkararak ve vorteksleyerek DNS'nin tamamen çözünmesi sağlanır. Üzerine 5 ml NaOH ilave edilir. Su banyosuna tekrar daldırıp çıkarma ile karışımın homojen bir şekilde çözünmesi sağlanır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra yavaş yavaş 15 g potasyum sodyum tartarat eklenir ve vorteksleyerek çözünme işlemi gerçekleştirilir. Selüloz aktivitesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çözelti 32: % 1'lik Avicel Selüloz Çözeltisi

Avicel selüloz	1 g
Distile su	100 ml

Enzimatik denemelerde substrat olarak kullanılmıştır.

Çözelti 33: % 1'lik CMC (Karboksimetil Selüloz)

CMC	1 g
Distile su	100 ml

Enzimatik denemelerde substrat olarak kullanılmıştır.

Çözelti 34: % 1'lik Bakteriyal Selüloz

Bakteriyal selüloz	1 g
Distile su	100 ml

Enzimatik denemelerde substrat olarak kullanılmıştır.

Çözelti 35: % 4'lük NaOH Çözeltisi

NaOH	4 g
Distile su	100 ml

4 g NaOH, 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Bakteriyal selülozun saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Çözelti 36: % 6'lık Asetik Asit Çözeltisi

Asetik asit	6 ml
Distile su	94 ml

Bakteriyal selülozun saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Çözelti 37: Gram'ın Kristal Violet Boyası

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

20 ml etanolde 2 g kristal violet çözülür. 80 ml distile suda da 0,8 g amonyum oksalat çözülür ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal violete' e ilave edilir (Tamer ve ark.,1989). Bakteri hücrelerinin, hücre duvarı yapısını belirlemek için, Gram boyamada kullanılmıştır.

Çözelti 38: Gram'ın Safranin Boyası

Safranin	0,25 g
% 96'lık Etanol	10 ml
Distile su	100 ml

Safranin etanolde çözülür, distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve sonra filtre kağıdından süzülür (Tamer ve ark.,1989). Bakteri hücrelerinin hücre duvarı yapısını belirlemek için, Gram boyamada kullanılmıştır.

Çözelti 39: Gram İyodür (Lugol) Çözeltisi

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

İyot ve KI havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilir. Üzerine yavaş yavaş su ilave edilerek, iyice karıştırılır (Tamer ve ark.,1989). Bakteri hücrelerinin hücre duvarı yapısını belirlemek için, Gram boyamada kullanılmıştır.

Çözelti 40: % 5'lik Malaşit Yeşili Boya Çözeltisi

Malaşit Yeşili	5 g
Distile su	100 ml

Boya, distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır (Tamer ve ark.,1989). Endospor boyamada kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu

İzolasyon kaynağı olarak kullandığımız ev yapımı şarap, sirke ile üzüm ve turşu suyundan aseptik koşullar altında 10'ar ml alınarak, erlenlerde hazırlanan 90 ml HS Broth içerisine inokule edilmiştir. Hazırlanan besiortamı içerisine, mayaları ve küfleri inhibe edici 100 ppm sikloheksimid ilave edilmiştir. Durgun koşullarda 30⁰C'de 3-5 gün inkübe edilmiştir (Selecta, Spain). İnkübasyon sonunda, besiortamı yüzeyinde pellik oluşumu gözlenmiştir. Pellik, aseptik koşullara uygun olarak steril % 0,85 NaCl (FTS) solusyonu içine alınmış ve pelliğin, çözelti içinde tamamen parçalanması sağlanmıştır. Pellik, tamamen parçalandıktan sonra steril FTS solusyonu ile 10⁻³'e kadar seyreltilmiştir. Daha sonra “yayma plaka yöntemine” göre, her bir seyreltmeden 0,1 ml izolasyon için hazırlanan HS Agar, GYC Agar ve Mannitol Agar üzerine dökülerek steril bir L-bageti yardımıyla homojen olarak dağılması sağlanmış ve 30 ⁰C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petrilere gelişen küçük, bej, beyaz renkte, yüksek ya da konveks ve kompakt olan koloniler seçilmiş ve bunların saflığı kontrol edilmiştir. Elde edilen saf kolonilerin hepsi yatık olarak GYC Agarlı tüplere çekilip, stok kültürler +4 ⁰C'de muhafaza edilmiştir (Vestel, Turkey). Ayrıca aynı izolatlar %15'lik gliserol içine alınıp, -20 ⁰C'de saklanmıştır (Vestel, Turkey).

3.2.2. Bakteriye selüloz üreten bakterilerin seçilmesi

Yatık GYC Agar'daki izolatlar, HS Broth'lu tüplerde 30 ⁰C'de 48-72 saat aktive edilmiştir. Aktifleşen kültürler, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 670 nm'de OD 0,03'e eşitlenmiştir (Johnson ve Neogi,1989). Ayrıca OD 0,03'e eşitlenen kültürlerle, damlatma kültür yöntemi uygulanarak, sayım işlemi yapılmıştır. 250 ml lik erlenlerde hazırlanan 100 ml HS besiortamına, aktifleşen kültürlerden 1 ml inoküle edilip, durgun koşullarda 30 ⁰C de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiortamının üst kısmında pellik oluşumunun olup olmadığı gözlenmiştir.

3.2.3. İzolatların Tanılanması

3.2.3.1. Morfolojik özellikler

Gram boyama

İzolatların, çeper kalınlıklarının belirlenmesi için Gram boyamaları yapılmıştır. Yatık olarak hazırlanmış GYC agarda, geliştirilmiş 24 saatlik genç kültürden, lam üzerine distile su ile yayılarak preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar havada kurutularak, bek alevinde 3 kez fikse edilmiştir. Preparat Gram'ın kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra preparat iyot çözeltisi ile 1 dakika boyanmıştır ve tekrar distile su ile yıkanıp fazla boya akıtılmıştır. Preparat % 96'lık etil alkol ile 6-15 saniye muamele edilmiştir. Süre sonunda distile su ile yıkanıp, Gram'ın safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır. Distile su ile yıkanıp havada kurutulduktan sonra preparatlar, 100x'lik immersiyon objektifinde (Olympus Cover-015, Japan) incelenmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Endospor boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla kültürler yatık GYC agarda 48–72 saat geliştirilmiştir. Kültürler, lam üzerine yayıldıktan ve havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek 3 kez fikse edilmiştir. Daha sonra sıcak su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edilip, 5 dakika beklenmiştir ve distile su ile yıkanmıştır. Preparatlara safranin boyası ilave edilmiş ve 30-60 saniye sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparat havada kurutulduktan sonra mikroskop altında 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. Pembe olarak boyanan kısımlar hücrenin vejetatif kısmı, yeşil renkli görünenler ise endosporlardır (Öner, 1984).

Yarı-katı hareketlilik testi

İzolatların hareketli olup olmadıklarının anlaşılması için yarı-katı hareketlilik testi yapılmıştır. Bu amaçla tüplerde dik olarak dondurulmuş olan yarı katı HS besiyortamına, 24 saatlik bakteri kültüründen, iğne öze ile dik olarak ekim yapılmış ve bakteri gelişimi incelenmiştir (Öner, 1984).

3.2.3.2. Kültürel özellikler

İzolatlar, GYC agara ekilerek ve 30 °C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra, koloniler morfoloji, renk ve koku bakımından incelenmiştir.

3.2.3.3. Biyokimyasal özellikler

Tür tanılamada Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) ve Swings (1992) kriterleri esas alınmış ve tanılamada kullanılan testler buna göre yapılmıştır.

İndol üretimi

İndol, triptofan aminoasidinin triptofanaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşan bir maddedir. İzolatların triptofanaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla indol testi yapılmıştır. 30 °C'de 24 saat GYC agarda geliştirilen kültürlerden, Tripton broth'lu ortama inokule edilmiştir. Bu tüpler 30 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra her tüpe 1ml kloroform ilave edilmiş ve tüpler iyice çalkalandıktan sonra her tüpe birkaç damla kovaks çözeltisi damlatılmıştır. Sonuçta tüplerin üzerinde oluşan kırmızı renk indol üretimi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Öner, 1984; Tamer ve ark., 1989).

Karbohidrat fermentasyonu

Fermentasyon denemelerinde karbon kaynakları olarak D(+) glukoz, fruktoz, laktoz kullanılmıştır. Bu karbohidratları içeren ve indikatör olarak fenol red bulunan sıvı besiortamına ekim yapılmış ve 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiortamının renginin sarıya dönmesi ile beraber durham tüplerindeki gaz oluşumu karbon kaynaklarının fermentasyonu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Oksidaz testi

Bir parça filtre kağıdı, taze olarak hazırlanan % 1'lik Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisinin birkaç damlası ile ıslatılmıştır. Nutrient agarda 24 saatte geliştirilen kültürden, platin bir öze ile alınmış ve filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşması test için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Nitrat redüksiyonu

Yatık Nutrient agarda 24 saat geliştirilen kültürden Nitrat broth'lara öze ile inokülasyon yapılmıştır ve bir tüp de kontrol olarak inoküle edilmeden bırakılmıştır. Tüpler 30 °C'de 4-6 gün inkübe edilmiştir ve ikinci günden itibaren temiz test tüplerine steril pipetler ile kültürlerden 1'er ml aktarılmıştır. Bunların üzerine 3 damla sülfanilik asit çözeltisi ve 2 damla α -naftol çözeltisi ilave edilmiştir. Eğer ortamda nitrit mevcutsa nitrit ile bu iki çözelti karışımı pembemsi-kırmızı renkli bir bileşik oluşturacağından bu rengin oluşumu nitrat redüksiyonu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Jelatin hidrolizi

Nutrient jelatin içeren tüplere, Nutrient agar'daki 24 saatlik kültürlerden iğne öze ile dik ekim yapılmıştır (Tamer ve ark., 1989). İnkübasyondan sonra besiyortamında büyümenin olduğu yerlerdeki sıvılaşma pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Katalaz testi

Yatık Nutrient agar'da 30 °C'de 72 saat geliştirilmiş olan kültürlerin üzerine % 3'lük 1ml hidrojen peroksit (% 30) çözeltisi damlatılarak gaz habbeciklerinin çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz habbeciklerinin çıkması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

3.2.4. İzolatların Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

HS broth'da 24 saat 30 °C'de geliştirilmiş olan kültürlerden 100'er ml HS ortamı içeren 500 ml'lik erlenlere 1'er ml inoküle edilmiştir. 30 °C'de 150 rpm (devir/dakika)'de çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Germany) inkübasyon başlangıcından itibaren, her 30 dakikada bir örnek alınarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japan) 660nm (OD₆₆₀) dalga boyunda kör örneğe (steril HS ortam) karşılık absorbans değerleri ölçülmüştür (Gerhardt et al., 1981, 1994; Tamer ve ark., 1989).

3.2.5. Hücre Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Hücre kuru ağırlığını saptamak amacıyla fermentasyon sonucu fermentasyon sıvısı +4 °C'de 4000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiş (Hettich Universal 32 R, Germany), süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipteki kısım (pellet), darası ölçülmüş bir kaba alınmıştır. Daha sonra pellet, 80 °C'de bir gece kurutulmuş (Selecta, Spain) ve miktar, hassas terazide (Scaltec SBA 31, Germany) yapılan ölçüm ile belirlenmiştir (Gerhardt et al., 1981; Tamer ve ark., 1989).

3.2.6. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Fermentasyon tamamlandıktan sonra sıvının yüzeyinde oluşan pellik toplanır ve 2993 xg'de (Heraeus Sepatech Labofuge 200, Germany) 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet distile su ile yıkanır. Önce 80 °C'de 1 saat % 4'lük NaOH ile muamele edilir daha sonra % 6'luk asetik asit ile yıkanır. Distile su ile tekrar yıkanır. 105 °C'de (Selecta, Spain) kurutulur ve hassas terazide tartılır (Ishihara et al., 2002).

3.2.7. Bakterilerdeki Spesifik Selüloz Verim Katsayısının Saptanması

Spesifik ürün verimi katsayısı, Gerhardt ve Drew (1994)'ün belirttiği formüle göre hesaplanmıştır (Gerhardt et al.,1994).

$$\text{Spesifik ürün verimi katsayısı (Yp/x)} = \frac{\text{Bakteriyal selülozun kuru ağırlık miktarı (mg)}}{\text{Hücre kuru ağırlık miktarı (mg)}}$$

3.2.8. Toplam Şeker Analizi

Toplam şeker analizi için fenol-sülfürik asit metodu kullanılmıştır (Dubois et al.,1956; Kim et al.,1994). Kurutulmuş olan polisakkarit 5 ml konsantre H₂SO₄ (% 97) içinde çözülmüştür. Çözülen polisakkaritten, belirli oranlarda seyreltme yapılmıştır. 1ml seyreltilmiş örnek üzerine 1ml % 5'lik fenol çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Karışıma hızlı bir şekilde 5 ml konsantre H₂SO₄ eklenerek 10 dakika bekletilip çalkalanmış ve 25 - 30 °C'lik su banyosunda (Memmert/P Selecta, Germany) 10-20 dakika tutulmuştur. Bu çözeltinin, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japan) 470 nm'de absorbansı ölçülmüştür (Dubois et al.,1956; Kim et al.,1994).

Glukoz standartı için, D(+) Glukoz stok çözeltisinden, 10-100 µg/ml glukoz içerecek şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. Toplam şeker analizinde yapılan işlemler, her bir glukoz çözeltisi için yapılarak standart eğri çıkarılmıştır. Bu standart eğriden yararlanılarak fermentasyon kültürlerinden ekstrakte edilen polisakkaritlerin toplam şeker miktarı saptanmıştır.

3.2.9. Farklı Parametrelerin Hücre Kuru Ağırlığı ve Bakteriyal Selüloz Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bakteriyal selüloz üretiminde temel ortam olarak kullanılan HS besi ortamının karbon ve azot kaynakları değiştirilerek optimizasyonu yapılmıştır. Karbon kaynağı olarak; fruktoz, sukroz, etanol ve glukoz, azot kaynağı olarak da yeast ekstrakt, kazein hidrolizati ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Yeni izolatlarımızın farklı pH ve inkübasyon sürelerindeki bakteriyal selüloz üretim verimleri araştırılmıştır. Ayrıca DSMZ Kültür Koleksiyonundan alınan *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004, *Acetobacter aceti* DSM 3508 bakteri strainları ile kendi izolatımız olan *Acetobacter pasteurianus* HBB6 (31c) ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 (8a) strainlerinin HS ortamında, melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu ve CSL (corn steep liquor) içerikli besi ortamındaki selüloz üretim verimleri araştırılmıştır.

3.2.10. Bakteriyal Selüloz Üretiminde Kullanılan Atık Maddeler ve Uygulanan Ön İşlem

3.2.10.1. Melas

Çalışmamızda karbon kaynağı olarak şeker sanayisinin bir atığı veya yan ürünü olan “melas” kullanılmıştır. Melas içerdiği bazı kolloidal bileşikler ve ağır metallerden dolayı (Cu, Fe, Pb vb.) denemede kullanılmadan önce ön işleminden geçirilmiştir (Karaboz, 1986). Bunun için; 170 g melas 300 ml saf su içinde karıştırılarak üzerine 50 ml saf suda çözünen 0,30 g potasyum ferri siyanat çözeltisi ilave edilir. Tüm çözelti saf su ile 500 ml’ye tamamlanıp, 5 g diatome toprağı ilave edilerek iyice karıştırılır. Bir gece +4 °C’de tutulan melas çözeltisi, bu süre sonunda filtre kâğıdından (Whatman no 398) geçirilerek süzülür. Böylece istenmeyen bileşiklerden arındırılmış ve oldukça berrak bir melas çözeltisi elde edilir. Elde edilen bu melas çözeltisinin toplam şeker (sakkaroz) içeriği polarimetrik olarak sakkarimetre ile (Atago, No 121186, Japan) ile hesaplanarak % 22 olarak bulunmuştur. Bu çözelti, ortam hazırlanırken saf su ile istenen konsantrasyonda şeker verecek şekilde seyreltilmiştir.

Melas'ın Bileşimi

1992-1993 dönemine ait Uşak Şeker Fabrikası 'nın pancar melası analiz

değerleri (% g)

Kuru madde	86,14
Polar Şeker	52,15
Safiyet	60,54
Rafinoz	1,0
İnvert Şeker	0,596
Hacmen hava	10,7
Şeker / su	2,04
pH	8,2
Havalı yoğunluk	1,371 g/santimetre küp

3.2.10.2. Peynir altı suyu (PAS)

Çalışmamızda kullandığımız peyniraltı suyu, Aydın Ömür Süt ve Süt Ürünleri İşletmesin'den temin edilmiştir. Peynir altı suyu peynir yapımı sonunda arta kalan yeşilimsi sarı renkte bir sıvıdır. Peynir yapımı sırasında her kg peynir için ortalama 9 kg peynir altı suyu oluşmaktadır (Oura, 1982). Peynir altı suyu süt işletmelerinin en önemli atığıdır. Peynir altı suyu içerik bakımından oldukça zengin bir maddedir. İşletmeden alınan peynir altı suyu 121 °C'de 15 dak süreyle sterilize edildikten sonra denature olan protein parçaları filtrasyon işlemi ile ayrılmıştır.

Peynir altı suyunun bileşimi (Topal, 1982).

Şeker (Laktoz)	% 5
Tuz	% 7,5
Total karbohidrat	% 5
Protein	% 0,85
Yağ	% 0,3
Kül	% 0,3
Riboflavin	0,1 mg/100 ml
Niasin	0,1 mg/100 ml

Demir	0,12 mg/100 ml
Sodyum	14,5 mg/100 ml
Potasyum	30 mg/100 ml
Kalsiyum	13,5 mg/100 ml
Su	% 92
pH	5,5

3.2.10.3. Zeytin karasuyu

Zeytinyağı işletmelerinde işleme tekniklerine göre zeytinlerin sıkılması sonucu zeytinyağı ile birlikte iki önemli yan ürün; prina ve zeytin karasuyu (ZK) ortaya çıkmaktadır. 1L zeytinyağı başına ortalama 2 kg prina ve 2.5 L zeytin karasuyu atık olarak elde edilmektedir. Koyu kahverengi, ekstrakte edilmemiş yağ, pektik maddeler, ksilan vb. polisakkaritlerin yanı sıra polifenoller de içeren asidik, yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı olan karasu hiçbir işleme tabi tutulmadan çevreye verilmesi sebebi ile ciddi boyutlarda çevre kirliliğine yol açmaktadır (Işıklı, 1992; Martinez-Nieto et al., 1993).

Zeytin Karasuyunun Bileşimi: (Öcal et al., 1977)

Şeker	% 0,98
Protein	% 0,77
Yağ	% 0,4
Kuru madde	% 6,2
Kül	% 1,4
Demir	0,3 mg/100 ml
Kalsiyum	7,5 mg/100 ml
Potasyum	112 mg/100 ml
Sodyum	39,5 mg/100 ml
pH	4,5

3.2.11. 16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizi

3.2.11.1. Bakterilerden DNA ekstraksiyonun hazırlanması

(Temizkan ve ark., 2004; Winfrey et al., 1997)

1. İzolatlar, GYC agara tek koloni düşecek şekilde inokule edilmiş ve 30 °C'de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir (Selecta, Spain).
2. İçerisinde 10 ml HS Broth (pH 6,0) bulunan 250 ml'lik erlenlere bakteri kültürleri inokule edilip, çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Germany) 150 rpm'de 30 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonunda kültür sıvısı, steril eppendorf tüplerine aktararak, +4 °C'de 4000 xg'de (Hettich Universal 32 R, Germany) 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatant kısım atılarak, pellet üzerine liziz buffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 50 mM Glukoz, pH 8,0) eklenmiş ve +4 °C'de 13000 rpm (Hettich Universal 32 R, Germany) 5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Pellet, % 0,02 lizozim ve 10 ml liziz tamponu ile süspanse edilerek, 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
6. 5 µl RNase A (20 µg/ml'lik çözeltiden) ve SDS 5µl (% 20'lik çözeltiden) eklenmiş ve 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
7. 6,25 µl Proteinaz K (20 mg/ml'lik çözeltiden) eklenmiş ve 50 °C'de 1saat inkübe edilmiştir.
8. Fenol-kloroform (v/v) eklenip karıştırılmış ve +4 °C'de 13000 rpm (Hettich Universal 32 R, Germany) 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Na-asetat (1/10 v/v, 3 M, pH 3,5) eklenmiş ve karıştırılmıştır.
10. İsoopropanol (v/v) eklenmiş ve karıştırılmıştır.
11. -20 °C'de 30 dk bekletilmiştir.
12. +4 °C'de 15000 rpm (Hettich Universal 32 R, Germany) 20 dk santrifüj edilip, süpernatant atılmıştır.
13. % 70'lik alkolde yıkama yapılmıştır.
14. +4 °C'de 15000 rpm (Hettich Universal 32 R, Germany) 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
15. 50 °C'de alkolün uçması sağlanmıştır.

16. Pellet (DNA) üzerine 50 µl steril distile su eklenerek pelletin, çözülmesi sağlanmıştır.
17. Örnek, agaroz jel elektroforezinde yürütölmek üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.11.2. DNA'nın agaroz jel elektroforezi

% 1 konsantrasyonda 0,5 X TBE tamponu ile hazırlanan agaroz jel üzerindeki kuyucuklara, ayırımı yapılacak olan DNA örnekleri konulmuş ve ayırım tamamlanıncaya kadar elektrik akımı (100 volt) uygulanmıştır. DNA'nın yürütölmeye işlemi tamamlandıktan sonra DNA'nın görünür hale getirilmesi için jel, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren elektroforez tamponu içinde 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. DNA bantları ultraviyole ışık kaynağı altında VILBER LOURMAT (MARNE LA VALLEE Fransa) markalı görüntöleme cihazı ile görüntölenmiştir (Temizkan ve ark., 2004, Winfrey et al., 1997).

3.2.11.3. DNA Baz Dizisinin Belirlenmesi

16S rRNA amplifikasyonu için kullanılan primerler şöyledir:

341f 341δ#8211; 357 CCTACGGGAGGCAGCAG

926r 907 δ#8211; 926 CCGTCAATTC (A / C) TTTGAGTTT

3.2.12. İzolatların SEM (Taramalı Elektron Mikroskop)'de Görüntölenmesi

Bakteri kültürleri HS broth'da aktifleştirilip, + 4 °C'de 9000 x g'de (Hettich Universal 32 R, Germany) 10 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, pellet 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6,5) içinde yıkanmıştır. Aynı tampon (pH 6,5) ile hazırlanan % 2 gluteraldehit ile fikse edilmiştir. Hücre pelletleri, % 50 - % 100 etanol serisi içinde yıkanmıştır (Moonmangmee et al., 2002). Fiksasyon ve dehidrasyon işlemleri tamamlanan hücre örnekleri liyofilize edilerek kurutulmuştur (Yoshii et al., 1977). Liyofilize edilerek kurutulan hücre örnekleri,

TÜBİTAK MAM'da altınla kaplandıktan sonra JEOL/JSM-6335F markalı taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.2.13. Bakteriyal Selülozun SEM (Taramalı Elektron Mikroskop)'de Görüntülenmesi

Fermentasyon tamamlandıktan sonra sıvının yüzeyinde oluşan pellik toplanır ve saflaştırılır. Saflaştırılan pellik, liyofilizatörde (Labconco, USA) kurutulduktan sonra TÜBİTAK MAM'da altınla kaplanmış ve sonra JEOL/JSM-6335F markalı taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir (Yoshii et al., 1977).

3.2.14. Bakteriyal Selülozun Monosakkarit İçeriğinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi

Bakteriyal selülozun, selülaz enzimi ve TFA (Trifluoroasetik asit) hidrolizi ile oluşan ürünlerin analizi için ince tabaka kromatografisi (Alugram® Sil G/UV254 0,20 mm, 5x10 cm, Germany) kullanılmıştır. (Fontana et al., 1988). Standart olarak glukoz, sellobioz ve sellotrioz kullanılmıştır (Ito et al., 2005). Standart karışımı 50 mM sodyum asetat (pH 5,0) tamponunda % 0,1'lik olacak şekilde hazırlanmıştır. İnce tabaka plaklarının alt kısmından ve yanlardan 0,5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizilmiştir. Sonra standart ve örneklerden 10 µl alınarak, 1'er cm aralıklarla plaklara uygulanmış ve havada kurutulmuştur. Hareketli faz için n-butanol: etanol: su (5:3:2) karışımı hazırlanmıştır. İnce tabaka kromatografi tankına (Sigma, Germany) bu karışımdan 15 ml eklendikten sonra kurutulan plaklar tanka yerleştirilmiş ve örneklerin yürütülmesi sağlanmıştır. Yürütme işleminden sonra çözücünün aldığı yol ölçülmüş ve plaklar havada kurutulmuştur. Boyama işlemi için sülfürik asit: metanol (1:9) karışımından hazırlanmış % 0,2'lik orsinol kullanılmıştır. Sonra plaklar boya çözeltisine batırılıp çıkarılmış ve havada kuruması sağlanmıştır. Kuruyan plaklar 100 °C'lik etüvde (Selecta, Spain) 10 dakika tutularak renk oluşumu sağlanmıştır. Oluşan lekelerin aldığı yol cetvelle ölçülmüştür. Örneğin ve standartların aldığı yol,

çözücünün aldığı yola oranlanarak Rf değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Arat, 2007).

$$R_f = \frac{\text{Örneğin aldığı yol (cm)}}{\text{Çözücünün aldığı yol (cm)}}$$

3.2.14.1. Bakteriyal selülozun enzimatik (selülaz ile) hidrolizi

Bu işlem için 2 ml enzim (ADÜ FEF/BİYOLOJİ/Mikrobiyoloji stoklarından temin edilen, *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarından elde edilen selülaz enzim çözeltisi ile 2 ml % 1'lik ön işlem görmüş bakteriyal selüloz karıştırılarak, 55 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0,1,2,3,4,7 ve 28 saat) enzim-selüloz karışımından 200 µl alınarak kaynar su banyosunda (Selecta, Spain) 5 dakika kaynatılmıştır. Örnekler TLC için kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (Sharma et al., 2001; Percival et al., 2006; Amano et al., 2002; Hurst et al., 1977; White et al., 1981).

3.2.14.1.1. *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarından selülaz enziminin eldesi

3.2.14.1.1.1. Kalitatif tarama

Fungusların selülaz enzimini üretip üretmediğine dair kalitatif olarak ön tarama yapılmıştır. Bu tarama fungusların petride hazırlanan besiortamı içinde zon oluşturup oluşturumamasına göre yapılmıştır. Funguslar ilk önce Malt Ekstrakt Agar'da 27 °C'de 5-7 gün geliştirilip, aktifleştirilmiştir. Daha sonra aktifleşen funguslardan petriler içinde hazırlanan CMC Agar (karboksimetil selüloz), YPD Agar ve Czapek Dox Agar olarak 3 ayrı besiortamına inoküle edilip, 27 °C'de 5-7 gün gelişimi sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda selülotik aktivitenin varlığını belirlemek için petride gelişen fungus kolonisinin üzerine % 1'lik Kongo kırmızısı damlatılıp, 15 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra 1 M NaCl çözeltisi damlatılmış ve 5-10 dakika beklenmiştir. Süre sonunda eğer zon oluşumu gözleniyorsa selülotik aktivite pozitif olarak, zon oluşumu yoksa selülotik aktivite

negatif olarak değerlendirilmiştir (Onsori et al., 2005; Strauss et al., 2001; Gopinath et al., 2005; Teather et al., 1982; Doran, 2006).

3.2.14.1.1.2. Selülaaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan fermentasyon ortamı

Selülaaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi için fermentasyon ortamı olarak Mandels ve Weber (1969)'in önerdiği ortam kullanılmıştır. Fermentasyon ortamı 500 ml'lik erlenler içinde 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Funguslar önce içinde % 1 Avicel selüloz bulunan Malt Ekstrakt Agarda aktifleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda 10^7 spor/ml fungusdan 1 ml fermentasyon ortamına inoküle edilmiş ve 27 °C'de 150 rpm'de (Infors HT Ecotron, Germany) 3 hafta inkübe edilmiştir (Chand et al., 2005; Chang et al., 2006).

3.2.14.1.1.3. Selülaaz enziminin aktivitesinin ölçülmesi

Aspergillus niger HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarından elde edilen selülaaz enziminin aktivitesi, Bernfeld'in kısmi olarak değiştirilmiş 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak, spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bernfeld, 1955). Substrat olarak, 50 mM (pH 5.0) sodyum asetat tamponunda hazırlanmış, ön işlem görmüş % 1'lik Avicel selüloz, CMC-selüloz ve bakteriyel selüloz kullanılmıştır. Standart deney ortamlarının bileşenleri, çizelge 3.2'de ve DNS çözeltisinin bileşenleri de çizelge 3.3'de verilmiştir. Enzim aktivitesi, spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japon) kullanılarak, 530 nm'de standart deney koşullarında ölçülmüştür (Ojumu et al., 2003; Ghose, 1987).

Çizelge 3.2 Standart deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1'lik Selüloz (Avicel, CMC, Bakteriyal selüloz)	200 µL	200 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (55 °C)	60 dk	60 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

Çizelge 3.3 DNS çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal Madde	Miktar (g/L)
DNS (dinitrosalisilik asit)	10
NaOH (sodyum hidroksit)	16
C ₄ H ₄ O ₆ KNa.4H ₂ O (potasyum sodyum tartarat)	300

3.2.14.2. Bakteriyal selülozun TFA (Trifluoroasetik asit) ile hidrolizi

Liyofilize edilerek kurutulmuş 2 mg bakteriyal selüloz, 1 ml 2M TFA çözeltisi içinde 120 °C'de 2 saat hidrolize edilmiştir. TFA uçucu bir asit olduğu için bu işlem geri soğutuculu sistemle gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda TFA 40 °C'de evapore edilerek, ortamdan uzaklaştırılmıştır (Deeraksa et al., 2005; Kornmann et al., 2003; Moonmangmee et al., 2002; Nakai et al., 2002). Geri kalan kısım 1 ml distile suda çözülerek, TLC için kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklanmıştır.

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

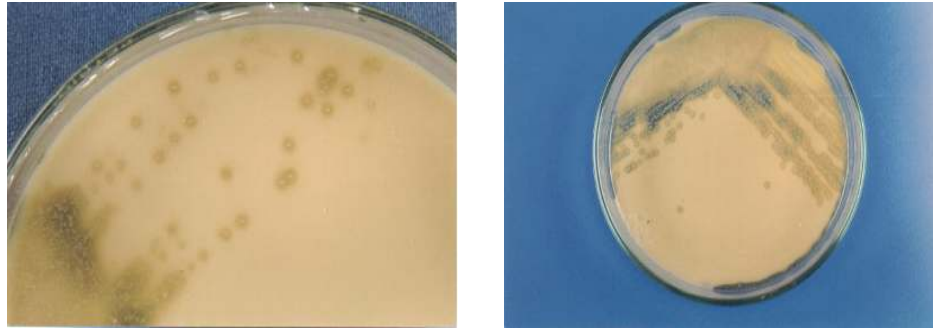
Liyofilize edilerek dondurulup kurutulmuş olan bakteriyal selüloz örneğinin, CP/MAS ¹³C Katı NMR Analizi BRUKER BIOSPIN Ultrashield TM yüksek çözünürlüklü dijital 300 MHz NMR spektrometresi ile ODTÜ Merkezi Laboratuvar, AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde yaptırılmıştır (Tokoh et al., 2002; Hesse et al., 2005; Watanabe et al., 1998; Laszkiewicz, 1997; Yamamoto et al., 1996).

3.2.16. Bakteriyal Selülozun FT-IR Spektrometresi ile Analizi

Liyofilize edilerek dondurulup kurutulmuş olan bakteriyal selüloz örneğinin FT-IR analizi, VARIAN 800 FT-IR Spektrometresi ile ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvar'ında yapılmıştır (Tokoh et al., 1998; Kačuráková et al., 2002; Lee et al., 2001).

4. BULGULAR

Ev yapımı şarap ve sirke örnekleri ile üzüm, elma şırası ve turşu suyundan 185 adet farklı izolat elde edilmiştir. Bu isolatların HS besi ortamında, yüzey kültür fermentasyon yöntemi ile selüloz üretimleri incelenmiş ve 136 izolatın selüloz ürettiği, geriye kalan 49 izolatın ise selüloz üretmediği gözlenmiştir. Selüloz üreten isolatlar içinden selüloz üretim verimi en yüksek olan 31c ve 8a kodlu iki izolat, çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen iki izolatın hem klasik hem de moleküler taksonomiye göre identifikasyonu yapılmış ve 31c kodlu izolatın *Acetobacter pasteurianus* HBB6, 8a kodlu izolatın da *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1). Her iki izolatın ürettiği selülozun ağsı yapısı ve hücre şekli, SEM’de görüntülenmiştir. Bu isolatlardan üretilen selüloz saflaştırılarak, toplam şeker tayini yapılmıştır. Ayrıca, selülozun asidik ve enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizat, ince tabaka kromatografiye uygulanmış ve şeker tayini yapılmıştır. *Acetobacter pasteurianus* HBB6, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin selüloz üretimleri, optimize edilmiş ve DSMZ kültür koleksiyonundan satın alınan üç strain ile birlikte bu strainlerin atık maddeler kullanılarak selüloz üretimleri incelenmiştir.



Şekil 4.1 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin GYC Agardaki görüntüsü

4.1. İzolatların İdentifikasyonu

4.1.1. Mikroskopik özellikler

Gram boyama sonucunda her iki izolatın Gr (-) çubuk şeklinde, 1,62 μm boyutlarında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Endospor boyama sonucunda endospor içermedikleri saptanmıştır.



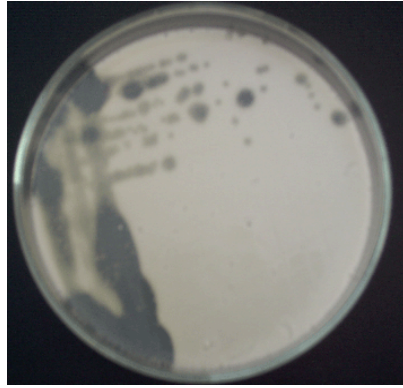
Şekil 4.2 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, Gram boyamaları ve boyutları

4.1.2. Kültürel özellikler

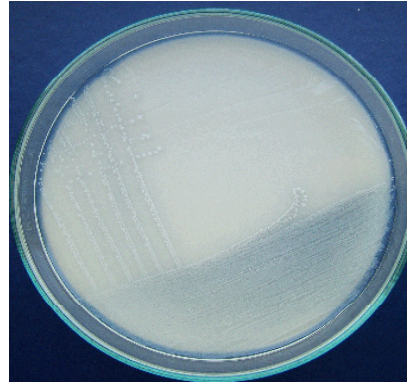
Ekstrasellular polisakkarit (selüloz) üretebilen strainler katı besiortamında (HS agar) bej, beyaz renkte, küçük, yüksek ya da konveks ve kompaktır. Ekstrasellular polisakkarit (selüloz) üretmeyen strainler ise katı besiortamında (HS agar) büyük ve düz kolonilere sahiptir (Johnson ve Neogi, 1989).

İzolatlar HS ve GYC agar içeren petrilere inoküle edilmiş ve 30 $^{\circ}\text{C}$ 'de 48-72 saat inkübasyon sonunda kültürel özellikleri incelenmiştir. Her iki izolatın da HS agar'daki kolonilerinin küçük, yuvarlak, düz kenarlı, kompakt, yüksek ya da konveks olduğu gözlenmiştir. Koloni rengi bej olup, pigment içermemektedir ve

sirke kokusu vardır. GYC agar'da gelişen koloniler zon oluşturmaktadır çünkü asetik asit bakterilerinin metabolizması sonucu oluşan asetik asit, besiortamındaki CaCO_3 'ü çözerek, zon oluşumuna sebep olur (Şekil 4.3).



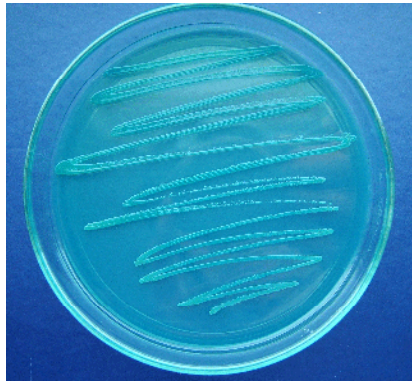
GYC Agar'da zon oluşumu



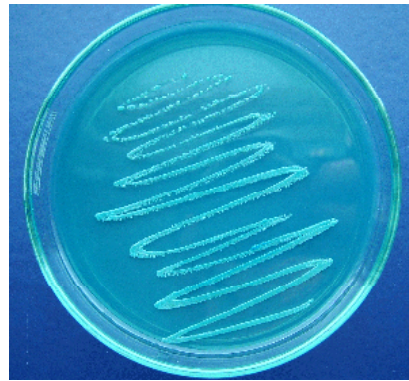
HS Agar'da koloni gelişimi

Şekil 4.3 Kolonilerin GYC ve HS agardaki görüntüsü

Seçilen iki izolatın, cins düzeyinde tanısı için bu izolatların bromcresol green'li besiortamındaki gelişimi incelenmiştir (Şekil 4.4). İnceleme sonucunda besiortamının rengi maviye dönüşmüştür. Bu nedenle bu iki izolatın *Acetobacter* genusuna ait olduğu kanısına varılmıştır.



Acetobacter pasteurianus HBB6



Acetobacter lovaniensis HBB5

Şekil 4.4 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin bromcresol green'li besiortamında gelişimi

4.1.3. Biyokimyasal özellikler

Seçilen iki izolatın tanımlanması De Ley et al. (1984) ve Swings (1992)'ye göre yapılmıştır. Tanılamada kullanılan özellikler çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu özelliklere göre iki izolatın asetik asit bakterilerinden *Acetobacter* genusuna ait olduğu kabul edilmiştir.

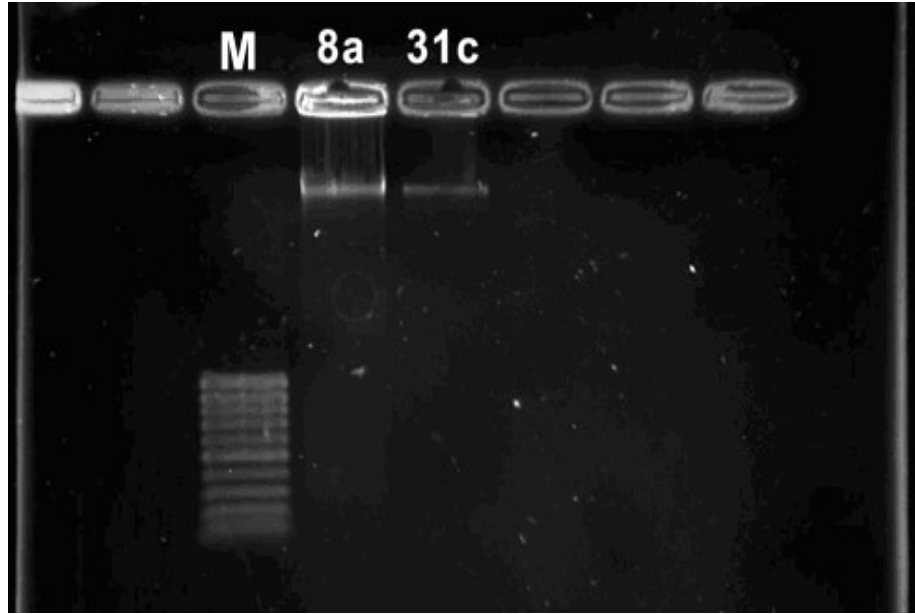
Çizelge 4.1 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin taksonomik özellikleri

Özellikler	<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB 6	<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5
Gram boyanma	–	–
Hücre şekli	Kısa çubuk	Kısa çubuk
Hücre düzenlenme	Tekli	Tekli
Hücre boyutu	1,62 µm	1,32 µm
Hareketlilik	–	–
Endospor	–	–
Oksijen isteği	Zorunlu aerob	Zorunlu aerob
Koloni formu	Küçük, Mat	Küçük, mat
GYC agarda kahverengi pigment	–	–
Katalaz üretimi	+	+
Oksidaz üretimi	–	–
İndol üretimi	–	–
H ₂ S üretimi	–	–
Jelatin hidrolizi	–	–
Nitrat indirgenmesi	–	–
Laktoz fermentasyonu	–	–
Nişasta hidrolizi	–	–
Glukozdan asit oluşturma	+	+
Etanolü, asetik aside okside etme	+	+
Bromcresol green'li besiortamında, indikatör boyanın renk değişimi	Yeşil → Mavi	Yeşil → Mavi
CaCO ₃ 'lü besiortamında, zon oluşturma	+	+

4.1.4. 16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizleri

31c ve 8a izolatlarının DNA izolasyonu, ADÜ FEF Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında, DNA'nın elektroforezde yürütülüp, görüntülenmesi ise ADÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD laboratuvarında yapılmıştır (Şekil 4.5).

16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizleri Pensylvannia State University Hershey Medical Center, Department of Pathology Laboratuvarlarında yapılmıştır. Sekanslar gen bankasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nükleotid blastın programı ile karşılaştırılarak analizi yapılmış ve bu analiz sonucuna göre 31c izolatının *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve 8a izolatının da *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olduğu tanılanmıştır.



Şekil 4.5 31c ve 8a strainlerinin toplam DNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntülenmesi. Marker olarak (M) 1kb DNA (Fermentas) kullanılmıştır

>8a consensus

```
TTTTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCA
ATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATG
ACG
GTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGG
GGG
CTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTACACAGTCAG
ATG
TGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGTAGACTAGAGTGTGAG
AG
AGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCG
GTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG
CAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTA
A
CTTTGTTATTTCAGTGTTCGACAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CA
AGGTTGAAACTCAAATGAATAGACAGA
```

[dbj|AB032351.1](#) *Acetobacter lovaniensis* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Length=1443

Score = 1013 bits (548), Expect = 0.0

Identities = 554/557 (99%), Gaps = 0/557 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 4

TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCG 63

|||||

Sbjct 307

TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCG 366

Query 64

CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTA 123

|||||

Sbjct 367

CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTA 426

Query 124

CCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTA 183

|||||

Sbjct 427

CCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTA 486

Query 184

GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTACACAGTCAGATGTGA 243

|||||

Sbjct 487

GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTACACAGTCAGATGTGA 546

Query 244

AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGTAGACTAGAGTGTGAGAGAGG 303

|||||

Sbjct 547

AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGTAGACTAGAGTGTGAGAGAGG 606

1

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Query 304
 GTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG 363
 |||
 Sbjct 607
 GTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG 666

Query 364
 AAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 423
 |||
 Sbjct 667
 AAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 726

Query 424
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTAACCTTTGTT 483
 |||
 Sbjct 727
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTAACCTTTGTT 786

Query 484
 ATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGA 543
 |||
 Sbjct 787
 ATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGA 846

Query 544 AACTCAAATGAATAGAC 560
 |||
 Sbjct 847 AACTCAAAGGAATTGAC 863

>31c consensus
 TTTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCA
 GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACG
 ATG
 ATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CG
 AAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTGA
 CAG
 TCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGA
 GT
 GTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAG
 A
 ACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
 GG
 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGAT
 GT
 TGGGTGACTTAGTCATTAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGT
 A
 CGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAATGAATAGACAGGGA

>gb|EF528281.1| *Acetobacter pasteurianus* strain CICCHLJ Q61 16S ribosomal RNA
 gene, partial sequence
 Length=1397
 Score = 1020 bits (552), Expect = 0.0
 Identities = 558/561 (99%), Gaps = 0/561 (0%)
 Strand=Plus/Plus

2

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Query 3
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCG 62
|||||

Sbjct 294
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCG 353

Query 63
CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTCGACGGGGACGATGATGACGGTA 122
|||||

Sbjct 354
CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTCGACGGGGACGATGATGACGGTA 413

Query 123
CCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTA 182
|||||

Sbjct 414
CCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTA 473

Query 183
GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGA 242
|||||

Sbjct 474
GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGA 533

Query 243
AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGG 302
|||||

Sbjct 534
AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGG 593

Query 303
GTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG 362
|||||

Sbjct 594
GTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG 653

Query 363
AAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 422
|||||

Sbjct 654
AAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 713

Query 423
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTC 482
|||||

Sbjct 714
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTC 773

Query 483
ATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGA 542
|||||

Sbjct 774
ATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGA 833

Query 543 AACTCAAATGAATAGACAGGG 563
||||| ||| ||| |||

Sbjct 834 AACTCAAAGGAATTGACGGGG 854

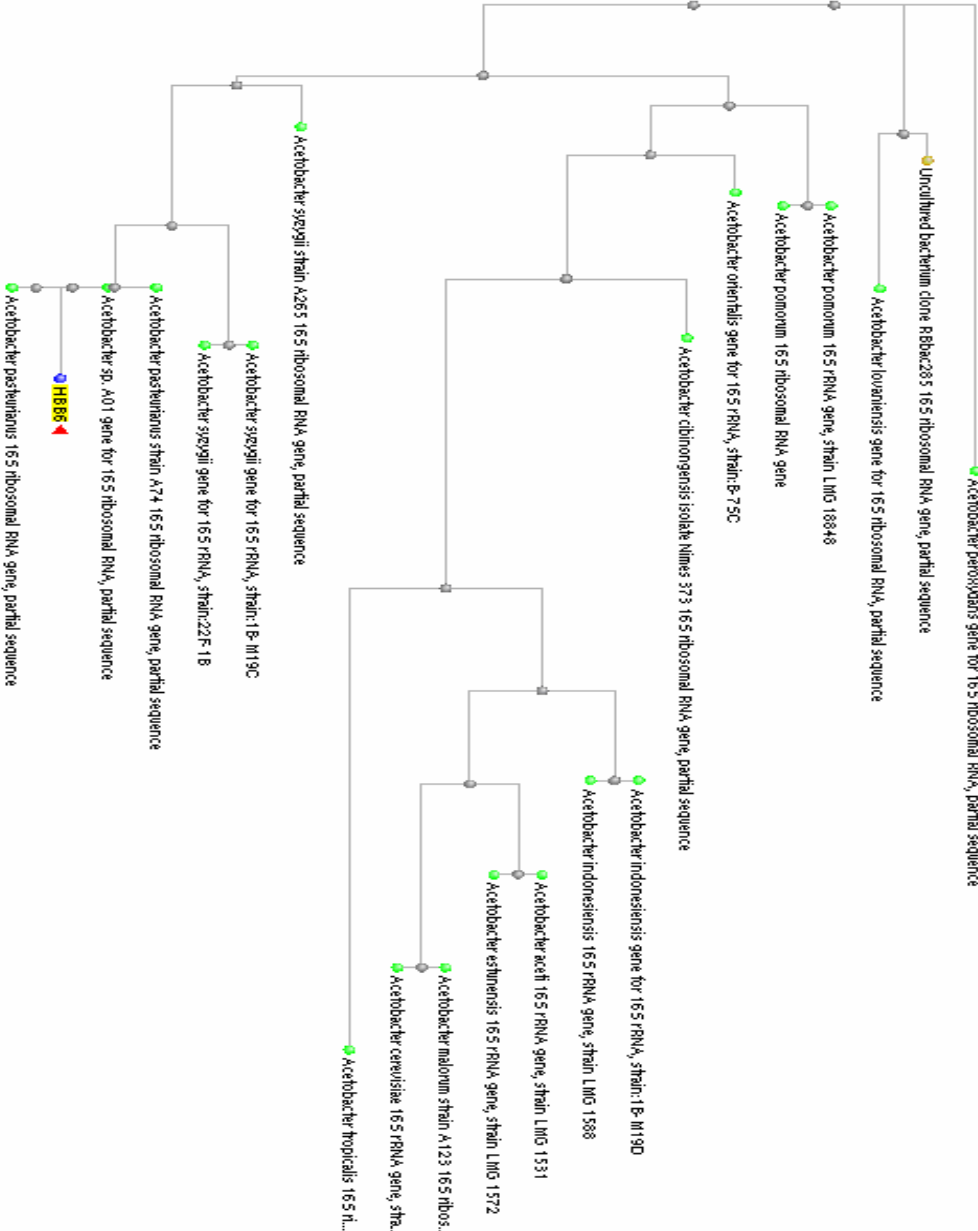
3

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

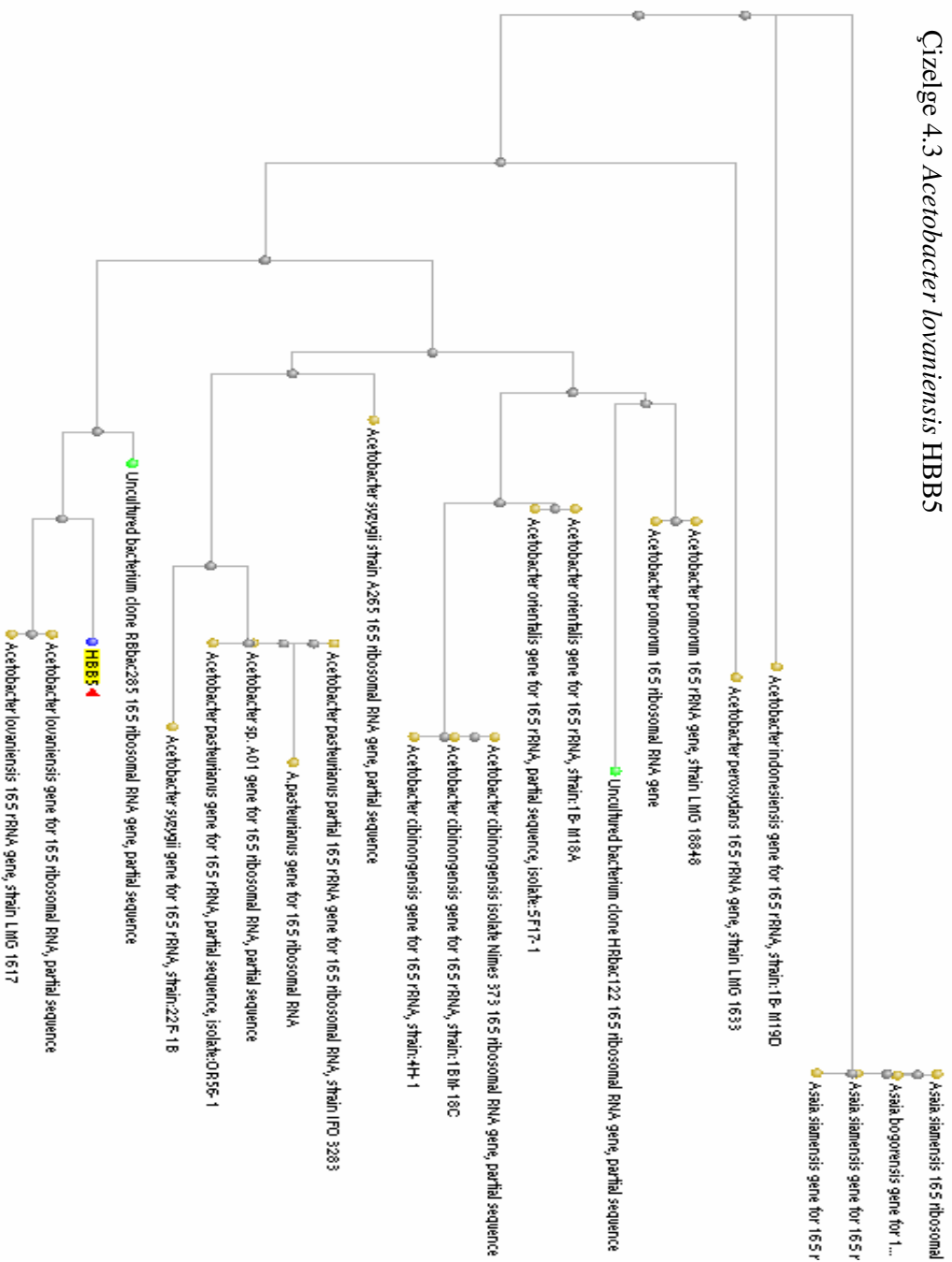
4.1.5. İzolatların filogenetik ağaçlarının oluşturulması

16S ribozomal RNA'ya göre sekans analizleri yapılan izolatların filogenetik ağacı BLAST pairwise alignments programı kullanılarak yapılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). 31c olarak kodlu olan *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ile 8a olarak kodlu olan *Acetobacter lovaniensis* HBB5'in filogenetik ağacı, çizelge 4.2'de ve çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Acetobacter pasteurianus* HBB6

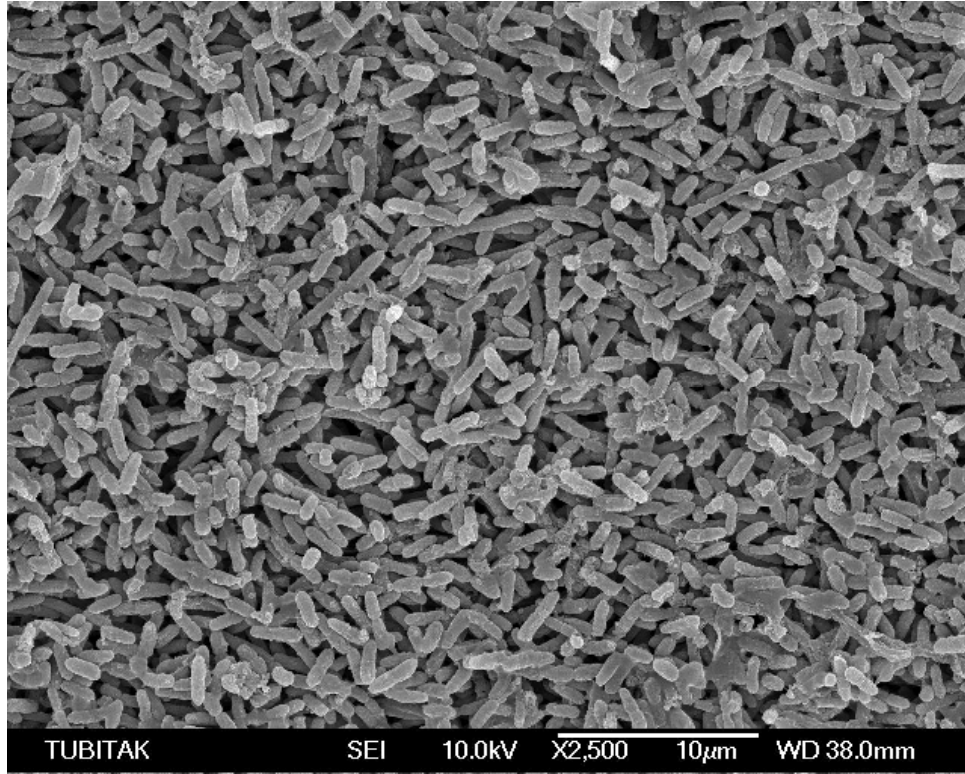


Çizelge 4.3 *Acetobacter lovaniensis* HBB5

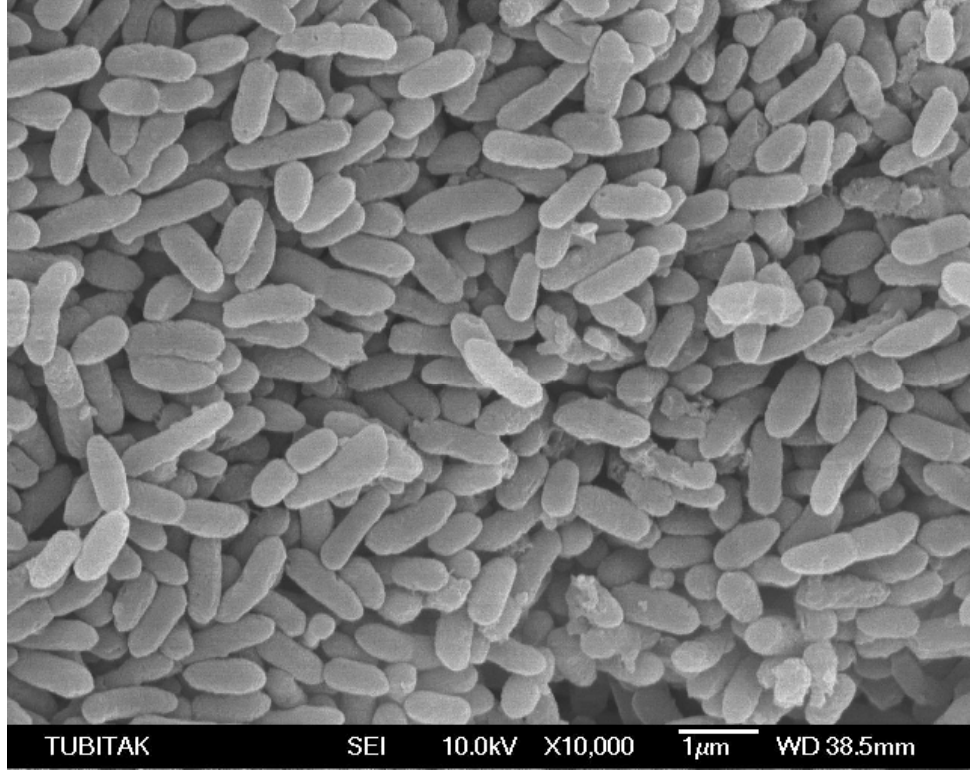


4.1.6. Strainlerin SEM (Scanning Elektron Mikroskop)'de görüntülenmesi

Acetobacter pasteurianus HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainleri, SEM elektron mikroskobunda görüntülenmeden önce ön işlemlerden geçirilmiştir. Daha sonra strainlerin hücre örnekleri, TÜBİTAK MAM'da altınla kaplandıktan sonra JEOL/JSM-6335F markalı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7).



Şekil 4.6 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 strainin, SEM'deki görüntüsü



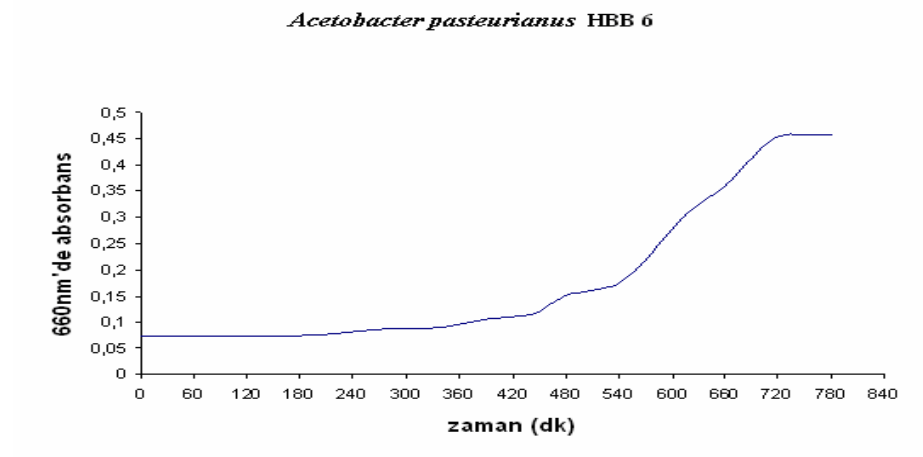
Şekil 4.7 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainin, SEM’deki görüntüsü

4.2. Strainlerin Büyüme Eğrisi

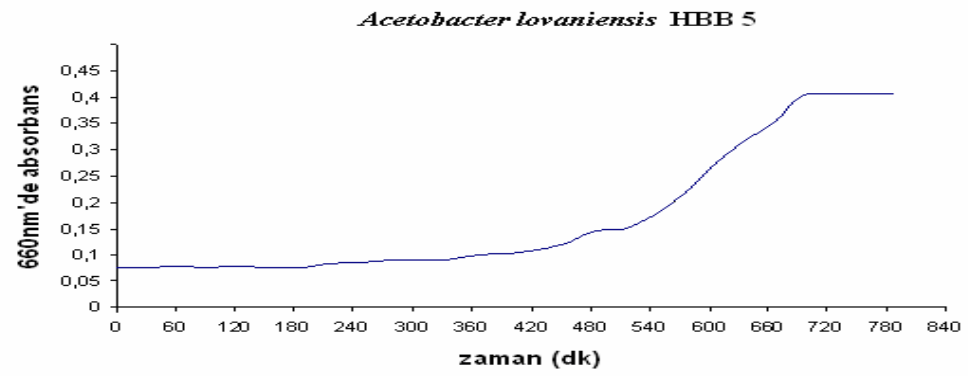
Her iki strainin HS broth ortamında, zamana karşı gösterdikleri absorbans değerleri çizelge 4.4’de verilmiştir. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 strainin, büyüme eğrisi şekil 4.8’de, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainin büyüme eğrisi de şekil 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.4 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin HS broth besiortamında, 660 nm’de zamana karşı gösterdikleri absorbands değerleri

Zaman (dakika)	660 nm’de Absorbans	
	<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6	<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5
0	0,074	0,074
30	0,074	0,074
60	0,075	0,075
90	0,073	0,073
120	0,074	0,074
150	0,074	0,075
180	0,075	0,074
210	0,076	0,081
240	0,081	0,083
270	0,087	0,087
300	0,088	0,088
330	0,090	0,088
360	0,096	0,098
390	0,105	0,100
420	0,110	0,107
450	0,121	0,119
480	0,152	0,144
510	0,160	0,148
540	0,173	0,176
570	0,219	0,214
600	0,280	0,318
630	0,324	0,354
660	0,360	0,354
690	0,413	0,405
720	0,454	0,410
750	0,456	0,411
780	0,456	0,411



Şekil 4.8 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 strainin, 660 nm'de büyüme eğrisi



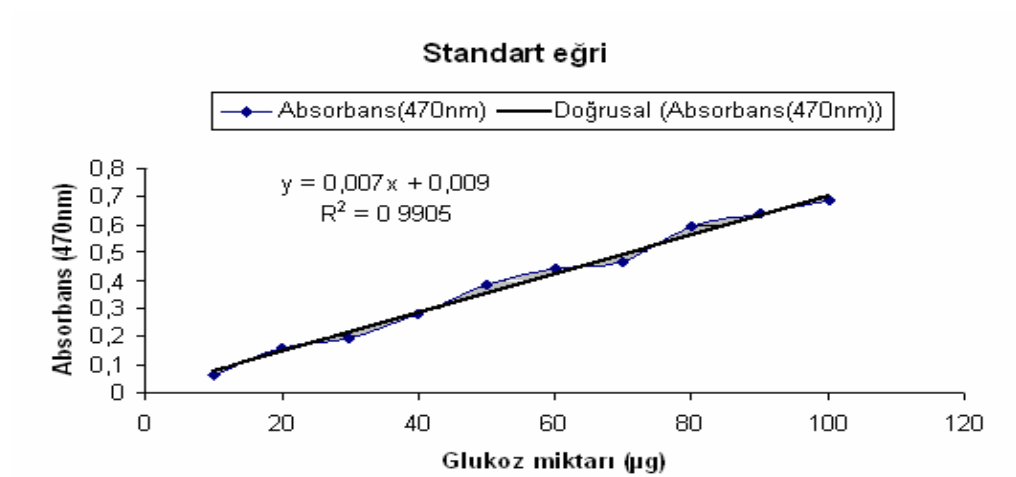
Şekil 4.9 *Acetobacter lovaniensis* HBB 5 strainin, 660 nm'de büyüme eğrisi

4.3. Total Şeker Tayini İçin 470 nm’de Çıkarılan Standart Eğri

10–100 µg/ml aralıkta glukoz solusyonunun spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri çizelge 4.5’de verilmiş ve oluşturulan bu değerlere ait olan standart eğri de şekil 4.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 470 nm’de 10–100 µg/ml aralıktaki standart Glukoz çözeltilerinin absorbans değerleri

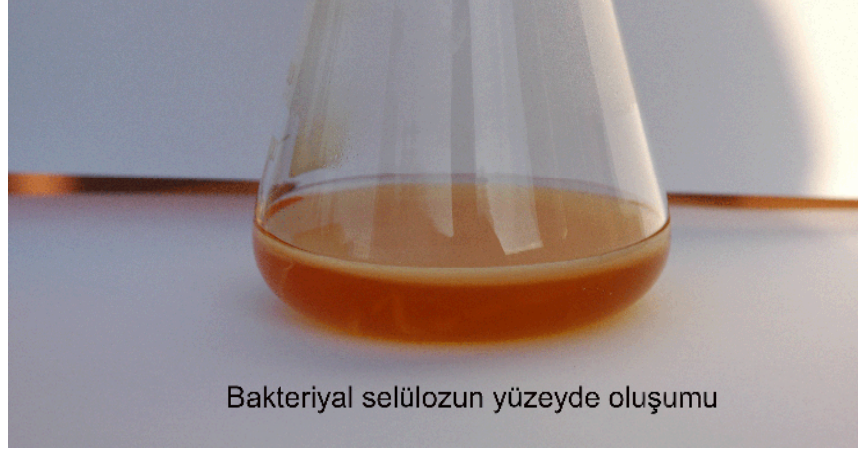
Glukoz (µg/ml)	Absorbans (470 nm)
10	0,066
20	0,164
30	0,194
40	0,283
50	0,384
60	0,441
70	0,469
80	0,592
90	0,637
100	0,683



Şekil 4.10 Total şeker tayini için 470 nm dalga boyundaki standart eğri

4.4. Bakteriyal Selülozun Yüzey Kültür Fermentasyonu ile Oluşumu

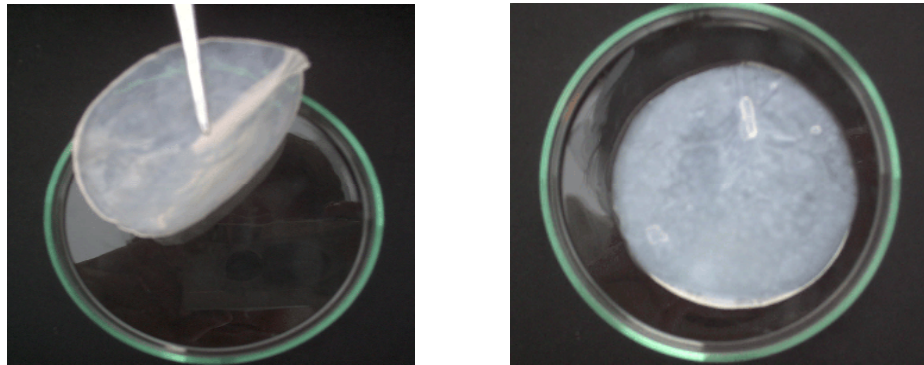
Bakteriyal selüloz, HS fermentasyon besiyortamının üst yüzeyinde zar şeklinde oluşur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Bakteriyal selülozun, HS fermentasyon besiyortamının üst yüzeyinde zar şeklinde oluşumu

4.5. Bakteriyal Selülozun Saflaştırılması ve Liyofilize Edilerek Kurutulması

Saflaştırılmış olan bakteriyal selüloz, şeffaf pelik şeklinde görünür (Şekil 4.12)



Şekil 4.12 Saflaştırılmış bakteriyal selüloz, ıslak ve şeffaf pelik şeklinde

Bakteriyal selülozun kurutulma işlemi, liyofilizatör (Labconco, USA) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Saflaştırılmış bakteriyal selülozun liyofilizatörde kurutulma şekli

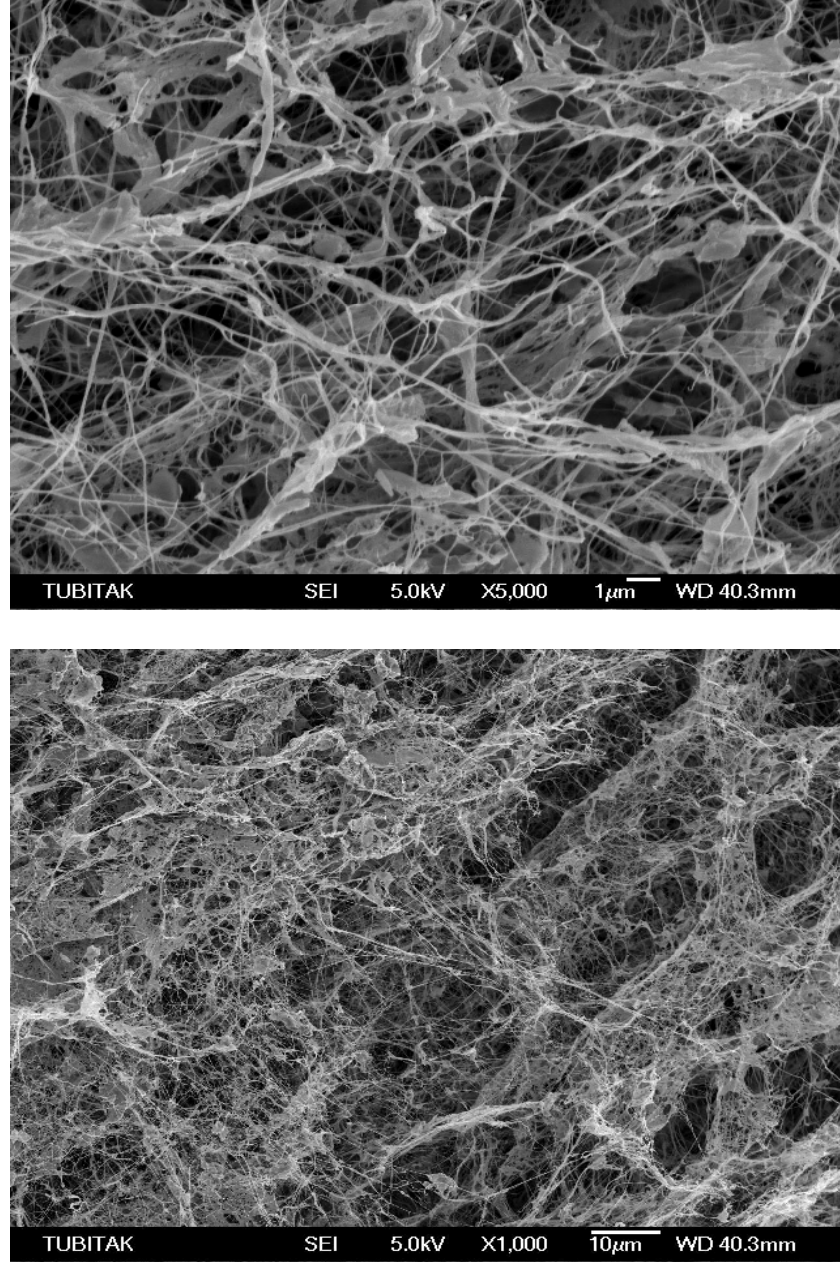
Kurumuş bakteriyal selüloz ile Whatman no 398 filtre kağıdı karşılaştırılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Kurutulmuş bakteriyal selüloz ile Whatman no 398 filtre kağıdının görüntüsü

4.6. Bakteriyal Selülozun SEM (Scanning Elektron Mikroskop)'de Görüntülenmesi

Bakteriyal selülozun ağısı yapısı SEM'de görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Bakteriyal selülozun SEM'de x 5000 ve x 1000'deki görüntüsü

4.7. Farklı Parametrelerin Hücre Kuru Ağırlığı ve Bakteriyal Selüloz Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan bu çalışmada, temel besiortamı olarak HS broth kullanılmıştır. Temel besiortamındaki içeriklerin miktarları sabit tutularak, sadece karbon ve azot kaynakları değiştirilerek, fermentasyon ortamı modifiye edilmiştir. Karbon ve azot kaynakları olarak analitik saflıktaki maddeler kullanılmış ve *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ile *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, fermentasyon besiortamındaki hücre kuru ağırlığı, bakteriyal selüloz üretimi ve yüzde verimleri belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz yerine fruktoz, sukroz ve etanol; azot kaynağı olarak da yeast ekstrakt yerine, kazein hidrolizatı ve amonyum sülfat kullanılmıştır.

4.7.1. Kullanılan karbon ve azot kaynaklarının hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz üretimi üzerine etkisi

Kullanılan karbon ve azot kaynaklarının hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz üretimi üzerine etkisi çizelge 4.6 ve çizelge 4.7’de verilmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.16 ve şekil 4.17’de gösterildiği gibi çizilmiştir. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ile *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerine ait veriler incelendiğinde, en yüksek selüloz üretiminin, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamlarda, en düşük selüloz üretiminin ise etanolün kullanıldığı ortamlarda olduğu görülmüştür. Ayrıca selüloz üretiminin, her iki izolatta da karbon kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı ortamlarda sukrozun kullanıldığı ortamlara göre daha fazla olduğu da görülmüştür.

Acetobacter pasteurianus HBB6 ile *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinden, selüloz üretiminde, kullanılan azot kaynakları içerisinde yeast ekstraktın, kazein hidrolizata göre, kazein hidrolizatının da amonyum sülfata göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Glukozun; karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı temel besiortamındaki , *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straini ile yapılan fermentasyon sonucu hücre kuru ağırlığı 0,025 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0045 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 18 olarak hesaplanmıştır. Bu strainin, kazein hidrolizat içeren glukozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0040 g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise % 15,4 olarak hesaplanmıştır. Aynı strainin amonyum sülfat içerikli glukozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı 0,027 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0036 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da, % 13,3 olarak hesaplanmıştır.

Kazein hidrolizatını içeren glukozlu besiortamında üretilen selüloz miktarı, amonyum sülfatı içeren glukozlu besiortamında üretilen selüloz miktarından 1,1 kat fazla olmasına rağmen, yeast ekstraktı içeren glukozlu besiortamındaki miktardan ise 1,1 kat daha düşüktür. Yapılan deneme sonucunda, yeast ekstrakt içeren glukozlu besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarı, kazein hidrolizat ve amonyum sülfat içeren glukozlu besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarından daha düşüktür. Fakat yeast ekstrakt içeren glukozlu besiortamındaki selüloz miktarı ise kazein hidrolizat ve amonyum sülfat içeren glukozlu besiortamındaki selüloz miktarından daha fazladır.

Fruktozun karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin hücre kuru ağırlığı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0043 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim ise % 16,5 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren fruktozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı 0,033 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0039 g/100ml olup, yüzde verim miktarı da % 11,8 olarak hesaplanmıştır. Aynı straininin, amonyum sülfat içeren fruktozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0024 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı % 9,2 olarak hesaplanmıştır. Yeast ekstrakt ve amonyum sülfat içeren fruktozlu besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarları eşit olmasına rağmen, yeast ekstrakt içeren fruktozlu besiortamındaki selüloz miktarı, amonyum

sülfat içeren fruktozlu besiortamındaki selüloz miktarından 1,8 kat daha fazladır. Kazein hidrolizatını içeren fruktozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı miktarı, yeast ekstrakt ve amonyum sülfat içeren fruktozlu besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarlarından 1,3 kat daha fazladır. Fakat yapılan deneme sonucunda, bu izolatin, fruktozlu besiortamındaki en yüksek selüloz üretimine, yeast ekstrakt içeren besiortamında rastlanmıştır.

Sukrozun karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamındaki *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin hücre kuru ağırlık miktarı 0,023 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0033 g/100ml olarak bulunmuş ve yüzde verim % 14,3 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren sukrozlu besiortamında ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,020 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0025 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim de % 12,5 olarak hesaplanmıştır. Aynı izolatin, amonyum sülfat içeren sukrozlu besiortamındaki hücre kuru ağırlığı 0,012 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0014 g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise % 11,7 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizatı içeren sukrozlu besiortamındaki selüloz miktarı, yeast ekstrakt içeren sukrozlu besiortamındaki selüloz miktarından 1,3 kat daha düşük olmasına rağmen, amonyum sülfat içeren sukrozlu besiortamındakinden 1,8 kat daha fazladır. Fakat sukrozlu besiortamında yapılan deneme sonucunda en yüksek selüloz üretimine, yeast ekstrakt içeren besiortamında, en düşük selüloz üretimine de amonyum sülfat içeren besiortamında rastlanmıştır.

Etanolün karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin hücre kuru ağırlık miktarı 0,029 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0027 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 9,3 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren etanollü besiortamında ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,030 g/100ml, selüloz miktarı ise 0,0020 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 6,7 olarak hesaplanmıştır. Aynı straininin, amonyum sülfat içeren etanollü besiortamında ise, hücre kuru ağırlık miktarı 0,018 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0010 g/100ml olup ve yüzde verim miktarı ise % 5,6 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizatını ve

yeast ekstrakt içeren etanollü besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarları yaklaşık olarak birbirine eşit olmasına rağmen, kazein hidrolizatını içeren etanollü besiortamındaki selüloz miktarı yeast ekstrakt içeren etanollü besiortamındaki selüloz miktarından 1,3 kat daha düşüktür. Fakat kazein hidrolizatını içeren etanollü besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarı, amonyum sülfat içeren etanollü besiortamındaki hücre kuru ağırlığı miktarından 1,7 kat, selüloz miktarından da 2,0 kat daha fazladır. Buna rağmen, etanollü besiortamında yapılan deneme sonucunda en yüksek selüloz üretimine, yeast ekstrakt içeren besiortamında, en düşük selüloz üretimine de amonyum sülfat içeren besiortamında rastlanmıştır.

Glukozun, karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin hücre kuru ağırlık miktarı da 0,031 g/100ml, ürettiği selüloz miktarı da 0,0040 g/100ml, bulunmuş ve yüzde verim %12,9 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren glukozlu ortamda ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,024 g/100ml, selüloz miktarı ise 0,0029 g/100ml olup ve yüzde verim de %12,1 olarak hesaplanmıştır. Amonyum sülfat içeren glukozlu ortamda ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,012 g/100ml, selüloz miktarı da 0,011 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim ise % 9,2 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren glukozlu besiortamında, üretilen selüloz miktarı, amonyum sülfat içeren glukozlu besiortamındakinden 2,6 kat daha fazla olmasına rağmen, yeast ekstraktı içeren glukozlu ortamdakinden 1,4 kat daha düşüktür. Glukozlu besiortamında yapılan deneme sonucunda en yüksek selüloz üretimine, yeast ekstrakt içeren besiortamında, en düşük selüloz üretimine de amonyum sülfat içeren besiortamında rastlanmıştır.

Fruktozun, karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin hücre kuru ağırlık miktarı 0,029 g/100ml, ürettiği selüloz miktarı da 0,0035 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 12,1 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren fruktozlu besiortamında, hücre kuru ağırlığı 0,028 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0031 g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise %11,1 olarak hesaplanmıştır.

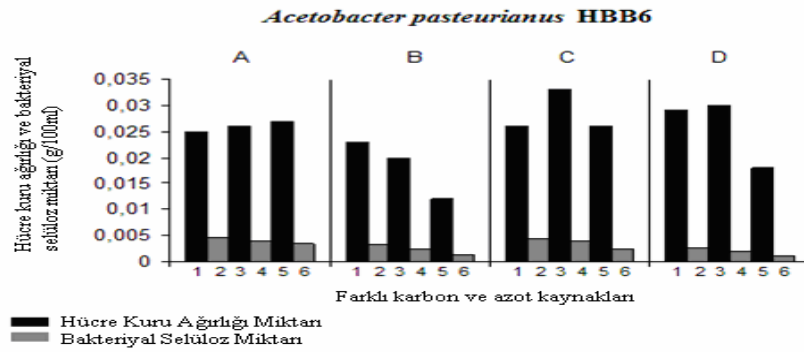
Amonyum sülfat içeren fruktozlu besiortamında, selüloz miktarı 0,0026 g/100ml, hücre kuru ağırlığı ise 0,030 g/100ml olarak bulunmuş ve verim % 8 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, amonyum sülfat içeren fruktozlu besiortamında hücre kuru ağırlığı, yeast ekstraktı ve kazein hidrolizatı içeren ortamdakine göre 1,1 kat daha fazla olmasına rağmen, selüloz miktarı 1,2 kat daha düşüktür.

Sukrozun karbon kaynağı olarak, yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin ürettiği selüloz miktarı 0,0029 g/100ml, hücre kuru ağırlığı miktarı da 0,029 g/100ml olup, verim % 10 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat içeren sukrozlu besiortamında üretilen selüloz miktarı 0,0023 g/100ml, hücre kuru ağırlığı da 0,032 g/100ml olarak bulunmuş ve verim % 7 olarak hesaplanmıştır. Amonyum sülfat içeren sukrozlu ortamda ise selüloz miktarı 0,0026 g/100ml, hücre kuru ağırlığı da 0,037 g/100ml bulunmuş ve verim % 7 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizat ve amonyum sülfat içeren sukrozlu ortamdaki yüzde verim miktarları eşit olmasına rağmen; amonyum sülfat içeren sukrozlu ortamdaki selüloz ve hücre kuru ağırlık miktarı, kazein hidrolizat içeren sukrozlu ortamdakine göre 1,1 kat daha fazladır. Kazein hidrolizat içeren sukrozlu ortamdaki hücre kuru ağırlık miktarı, yeast ekstrakt içeren ortamdakine göre 1,1 kat daha yüksek olmasına rağmen, üretilen selüloz miktarı 1,3 kat daha düşüktür.

Etanolün, karbon kaynağı olarak yeast ekstraktın da azot kaynağı olarak kullanıldığı besiortamında *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin ürettiği selüloz miktarı 0,0025 g/100ml, hücre kuru ağırlığı ise 0,031 g/100ml olarak bulunmuş ve verim % 8 olarak hesaplanmıştır. Amonyum sülfat içeren etanollü besiortamında 0,038 g/100ml, hücre kuru ağırlığı 0,0019 g/100ml, bulunmuş ve verim % 5 olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizatı içeren etanollü ortamda selüloz miktarı ise 0,0021 g/100ml, hücre kuru ağırlık miktarı da 0,030 g/100ml bulunmuş ve verim % 7 olarak hesaplanmıştır. Amonyum sülfat içeren etanollü besiortamında, hücre kuru ağırlığı miktarı, yeast ekstrakt içeren etanollü ortamdakine göre 1,2 kat daha yüksek olmasına rağmen, selüloz miktarı 1,3 kat daha düşüktür.

Çizelge 4.6 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları

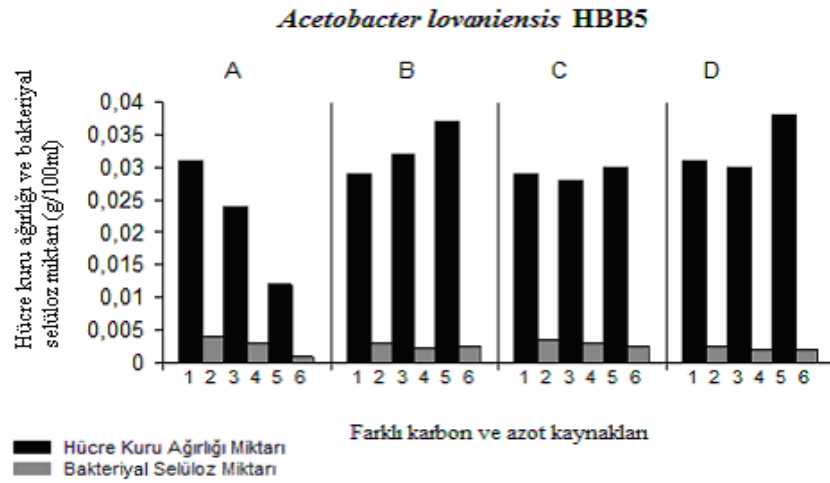
Besi ortamı içeriği	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm'de standart eğriye göre polisakkarit miktarı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
Glukoz+Yeast ekstrakt (Temel Ortam)	0,025	244,3	0,0045	0,18	18,0
Glukoz+Kazein hidrolizati	0,026	180,7	0,0040	0,154	15,4
Glukoz+Amonyum sülfat	0,027	154,3	0,0036	0,133	13,3
Sukroz+ Yeast ekstrakt	0,023	141,4	0,0033	0,143	14,3
Sukroz+Kazein hidrolizati	0,020	124,1	0,0025	0,125	12,5
Sukroz+Amonyum sülfat	0,012	92,1	0,0014	0,117	11,7
Fruktoz+ Yeast ekstrakt	0,026	217,1	0,0043	0,165	16,5
Fruktoz+Kazein hidrolizati	0,033	165,0	0,0039	0,118	11,8
Fruktoz+Amonyum sülfat	0,026	122,0	0,0024	0,092	9,2
Etanol+ Yeast ekstrakt	0,029	125,7	0,0027	0,093	9,3
Etanol+Kazein hidrolizati	0,030	121,4	0,0020	0,067	6,7
Etanol+Amonyum sülfat	0,018	705,0	0,0010	0,056	5,6



Şekil 4.16 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve bakteriyel selüloz miktarı
Karbon kaynakları: A: Glukoz, B: Sukroz, C: Fruktoz, D: Etanol.
Azot kaynakları: 1,2: Yeast ekstrakt, 3,4: Kazein hidrolizat, 5,6: Amonyum sülfat

Çizelge 4.7 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyel selüloz miktarları

Besiyortamı içeriği	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm'de standart eğriye göre polisakkarit miktarı(g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
Glukoz+Yeast ekstrakt	0,031	181,0	0,0040	0,129	12,9
Glukoz+Kazein hidrolizatı	0,024	126,2	0,0029	0,121	12,1
Glukoz+Amonyum sülfat	0,012	712,0	0,0011	0,092	9,2
Sukroz+Yeast ekstrakt	0,029	126,0	0,0029	0,100	10,0
Sukroz+Kazein hidrolizatı	0,032	121,5	0,0023	0,072	7,2
Sukroz+Amonyum sülfat	0,037	124,5	0,0026	0,070	7,0
Fruktoz+Yeast ekstrakt	0,029	144,1	0,0035	0,121	12,1
Fruktoz+Kazein hidrolizatı	0,028	140,8	0,0031	0,111	11,1
Fruktoz+Amonyum sülfat	0,030	124,0	0,0026	0,087	8,7
Etanol+Yeast ekstrakt	0,031	123,7	0,0025	0,081	8,1
Etanol+Kazein hidrolizatı	0,030	122,8	0,0021	0,070	7,0
Etanol+Amonyum sülfat	0,038	120,6	0,0019	0,050	5,0



Şekil 4.17 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin farklı karbon ve azot kaynaklarındaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyel selüloz miktarları. Karbon kaynakları: A: Glukoz, B: Sukroz, C: Fruktoz, D: Etanol. Azot kaynakları: 1,2: Yeast ekstrakt, 3,4: Kazein hidrolizat, 5,6: Amonyum sülfat

4.7.2. Farklı sıcaklık derecelerinin etkisi

Acetobacter pasteurianus HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, temel ve melas içerikli besi ortamlarında, farklı sıcaklık derecelerinde ürettikleri bakteriyel selüloz miktarları ve hücre kuru ağırlıkları ile yüzde verimleri incelenmiştir.

4.7.2.1. HS Broth ortamında farklı sıcaklık derecelerinin etkisi

HS broth besi ortamında 4 °C, 22 °C, 30 °C ve 37 °C’de üretilen bakteriyel selüloz miktarları ve hücre kuru ağırlıkları ile yüzde verimleri çizelge 4.8’de verilmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.18 ve şekil 4.19’da gösterildiği gibi çizilmiştir.

Acetobacter pasteurianus HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinde her ikisinde de 4 °C’de hücre gelişimi gerçekleşmemiş, buna bağlı olarak da bakteriyel selüloz üretimi olmamıştır. Yapılan denemeler sonucunda her iki

izolatda da 22 °C’de en düşük hücre kuru ağırlığı ve selüloz üretimi, 30 °C’de ise yine en yüksek hücre kuru ağırlığı ve selüloz üretimi tespit edilmiştir.

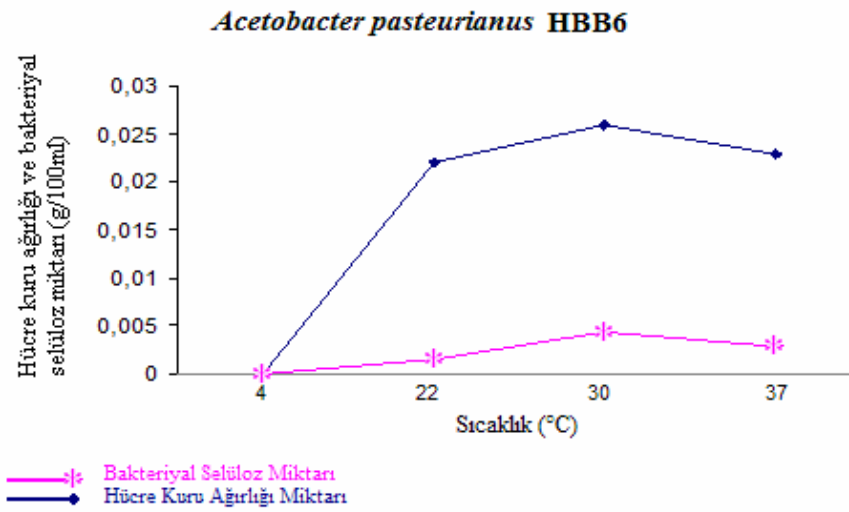
Acetobacter pasteurianus HBB6 straininde 22 °C’de selüloz miktarı 0,0016 g/100ml olmasına rağmen, 37 °C’de 0,0028 g/100ml, 30 °C’de ise 0,0043 g/100ml olarak bulunmuştur. Bu nedenle 30 °C’de elde edilen selüloz miktarının 22 °C’de elde edilenden 3,5 kat; 37 °C’de elde edilenden de 1,8 kat daha fazla olduğu görülmüştür.

Acetobacter lovaniensis HBB5 straininde de 22 °C’de üretilen selüloz miktarı 0,0011 g/100ml olmasına rağmen, 37 °C’de 0,0021 g/100ml, 30 °C’de ise 0,0038 g/100ml olarak bulunmuştur. Yani 30 °C’de elde edilen selüloz miktarının 22 °C’de elde edilenden 2,7 kat; 37 °C’de elde edilenden de 1,5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

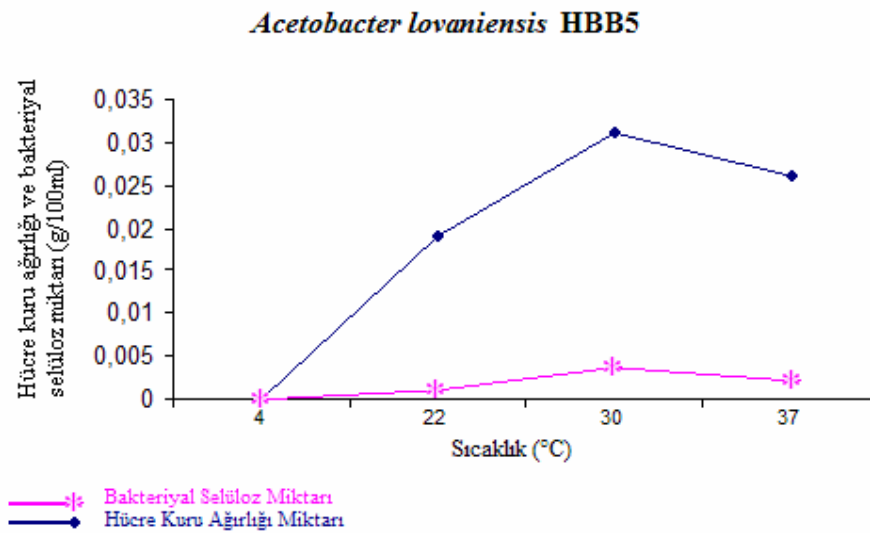
Elde edilen verilerden de anlaşıldığı üzere, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinde en düşük verim 22 °C’den elde edilirken, en yüksek verime 30 °C’de ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8 HS broth besi ortamında farklı sıcaklıkların etkisi

Sıcaklık (°C)	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm’deki standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6					
4	-	-	-		-
22	0,022	985,0	0.0016	0,073	7,3
30	0,026	216,9	0.0043	0,165	16,5
37	0,023	125,8	0.0028	0,122	12,2
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5					
4	-	-	-		-
22	0,019	713,0	0.0011	0,058	5,8
30	0,031	164,2	0.0038	0,123	12,3
37	0,026	122,6	0.0021	0,081	8,1



Şekil 4.18 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin HS besi ortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları



Şekil 4.19 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin HS besi ortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları

4.7.2.2. Melaslı besiortamında farklı sıcaklık derecelerinin etkisi

Melas içeren besiortamında, 4 °C, 22 °C, 30 °C ve 37 °C’de üretilen bakteriyal selüloz miktarları ve hücre kuru ağırlıkları ile yüzde verimleri çizelge 4.9’da verilmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.20 ve şekil 4.21’de gösterildiği gibi çizilmiştir.

Melas içerikli besiortamında *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin her ikisinde de, 4 °C’de hiçbir hücre gelişimi olmamış ve buna bağlı olarak da bakteriyal selüloz oluşumu gözlenmemiştir. Fakat 22 °C, 30 °C ve 37 °C’de hücre gelişimi ve selüloz üretimi gözlenmiştir.

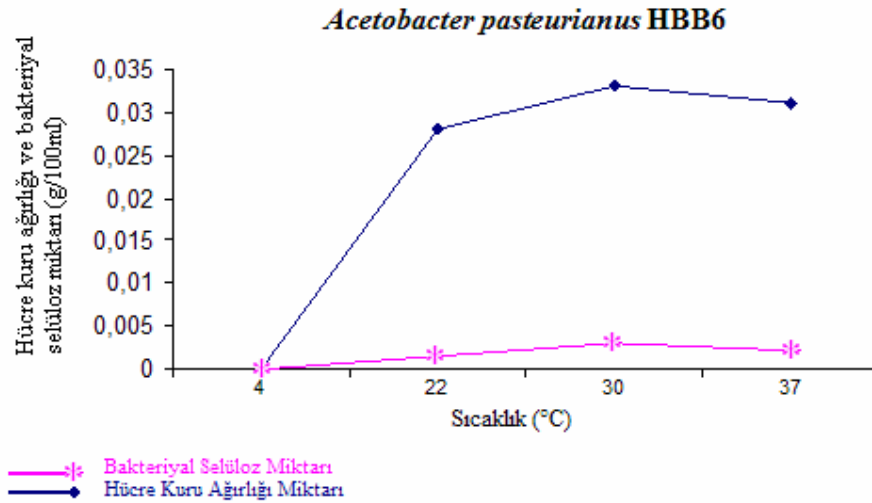
Acetobacter pasteurianus HBB6 straininde, 22 °C’de hücre kuru ağırlığı miktarı 0,028 g/100ml, üretilen selüloz miktarı ise 0,0015 g/100ml olup, yüzde verim % 5,3 olarak hesaplanmıştır. 30 °C’de hücre kuru ağırlığı 0,033 g/100ml, selüloz miktarı ise 0,030 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 9,1 olarak hesaplanmıştır. 37 °C’de ise hücre kuru ağırlığı 0,031 g/100ml, selüloz miktarı 0,0022 g/100ml olup, yüzde verim % 7,1 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, 30 °C’de hücre kuru ağırlığı 22 °C’ye göre 1,1 kat daha düşük olmasına rağmen, selüloz üretimi 2 kat daha fazladır. Ayrıca 30 °C’de üretilen selüloz miktarı da 37 °C’de üretilene göre 1,4 kat kat daha yüksektir. Bununla birlikte, bu izolatın 37 °C’de ürettiği hücre kuru ağırlığı miktarı, 22 °C’de ürettiğinden 1,2 kat daha düşük olmasına rağmen selüloz miktarı 1,5 kat daha fazladır.

Acetobacter lovaniensis HBB5 straininde ise, 22 °C’de en düşük selüloz üretimi 0,0009 g/100ml ve en düşük hücre kuru ağırlığı miktarı 0,025 g/100ml, yüzde verim de % 3,6 olarak gözlenmiştir. 30 °C’de hücre kuru ağırlığı miktarı 0,032 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0023 g/100ml olup, yüzde verim % 7,2 olarak hesaplanmıştır. 37 °C’de ise, hücre kuru ağırlığı 0,028 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0014 g/100ml olarak bulunmuş ve verim % 5,0 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, 37 °C’de hücre kuru ağırlığı 22 °C’ye göre 1,1 kat düşük olmasına rağmen, üretilen selüloz miktarı 1,6 kat daha fazladır. Ayrıca 30 °C’de üretilen selüloz

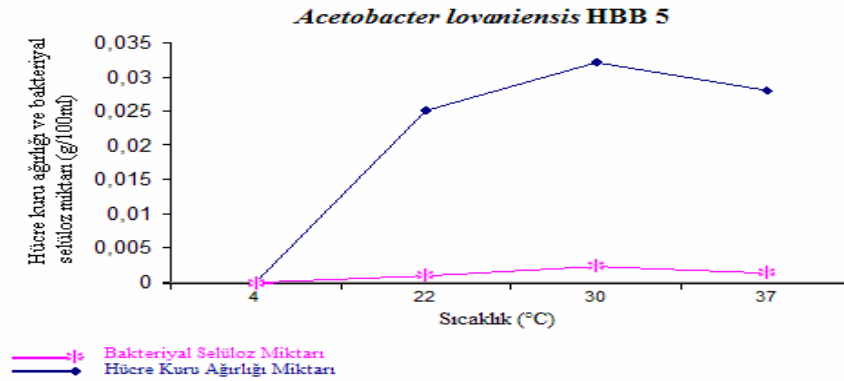
miktarı da 37 °C’de üretilenden 1,6 kat, 22 °C’de üretilenden ise 2,5 kat daha yüksektir.

Çizelge 4.9 Melas içerikli besiortamında farklı sıcaklıkların etkisi

Sıcaklık (°C)	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm’deki standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6					
4	-	-	-		-
22	0,028	954,0	0.0015	0,053	5,3
30	0,033	126,5	0.0030	0,091	9,1
37	0,031	123,4	0.0022	0,071	7,1
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5					
4	-	-	-		-
22	0,025	685,0	0.0009	0,036	3,6
30	0,032	124,7	0.0023	0,072	7,2
37	0,028	923,0	0.0014	0,050	5,0



Şekil 4.20 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin, melaslı besiortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyel selüloz miktarları



Şekil 4.21 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin, melaslı besi ortamında farklı sıcaklıklardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları

4.7.3. Farklı pH'ların etkisi

Temel ortam HS broth'da ve melas içerikli ortamda farklı pH'larda üretilen bakteriyal selüloz miktarları ve hücre kuru ağırlığı ile yüzde verimleri incelenmiştir.

4.7.3.1. HS Broth ortamında farklı pH'ların etkisi

Temel ortam olan HS Broth'un bütün içerikleri aynen alınıp, pH 2,5 - 8,5 aralığında üretilen bakteriyal selüloz ve hücre kuru ağırlığı miktarları çizelge 4.10'da verilmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de gösterildiği gibi çizilmiştir.

Veriler incelendiğinde, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinde, pH 2,5'da hücre gelişiminin olmadığı ve buna bağlı olarak da selüloz üretiminin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Ayrıca her iki strainde de en yüksek hücre kuru ağırlığı ile selüloz miktarının pH 6,5'da, en düşük hücre kuru ağırlığı ile selüloz miktarının da pH 3,5'da olduğu görülmüştür.

Acetobacter pasteurianus HBB6 straininde, pH 3,5'da en düşük hücre kuru ağırlığı miktarı 0,022 g/100ml, selüloz miktarı 0,0007 g/100ml bulunmuş ve

yüzde verim miktarı % 3,2 olarak hesaplanmıştır. pH 4,5'da ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,025 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0025 g/100ml bulunmuş olup, verim de % 10 olarak hesaplanmıştır. pH 6,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı ise 0,0040 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 15,4 olarak hesaplanmıştır. pH 7,5 ve pH 8,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı 0,018 g/100ml olup, selüloz miktarı birinde 0,0011 g/100ml, diğerinde ise 0,0009 g/100ml olarak bulunmuştur. Buna göre, pH 3,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı pH 7,5'da ve pH 8,5'da üretilenden 1,2 kat daha fazla olmasına rağmen, selüloz miktarı, pH 7,5'dan 1,6 kat, pH 8,5'dan ise 1,3 kat daha düşüktür. pH 7,5'da ve pH 8,5 hücre kuru ağırlığı miktarı eşit olmasına rağmen, üretilen selüloz miktarı pH 7,5'da , pH 8,5'dan 1,2 kat daha fazladır. pH 6,5 ve pH 4,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarları yaklaşık birbirine eşit olmasına rağmen pH 6,5'daki selüloz miktarı pH 4,5'dan 1,6 kat daha fazladır. pH 4,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarı, pH 7,5 ve pH 8,5'dakinden 1,4 kat daha fazladır ayrıca selüloz miktarı da pH 7,5'dan 2,3 kat pH 8,5'dan ise 2,8 kat daha yüksektir.

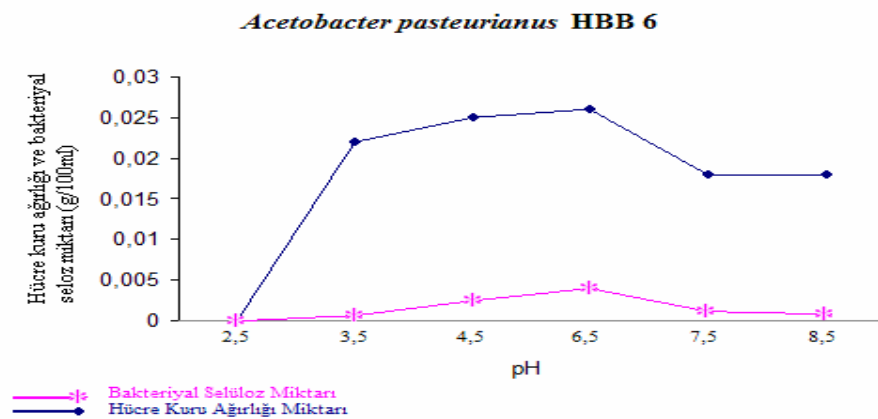
Acetobacter lovaniensis HBB5 straininde pH 3,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı 0,015 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0006 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim de % 4,0 olarak hesaplanmıştır. pH 4,5'da ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,028 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0023 g/100ml olup, yüzde verim ise % 8,2 olarak hesaplanmıştır. pH 6,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı 0,031 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0031 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim de % 11,3 olarak hesaplanmıştır. pH 7,5'da hücre kuru ağırlığı miktarı 0,020 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0014 g/100ml olup, yüzde verim de % 7,0 olarak hesaplanmıştır. pH 8,5'da ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,017 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0007 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim de % 4,1 olarak hesaplanmıştır.

Buna göre, pH 4,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarı, pH 3,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarından 1,9 kat, pH 8,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarından ise 1,6 kat daha yüksektir. Ayrıca pH 4,5'daki selüloz miktarı da pH 3,5'daki selüloz miktarından 3,8 kat, pH 8,5'daki selüloz miktarından ise 3,3 kat daha fazladır. pH 7,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarı, pH 6,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarından

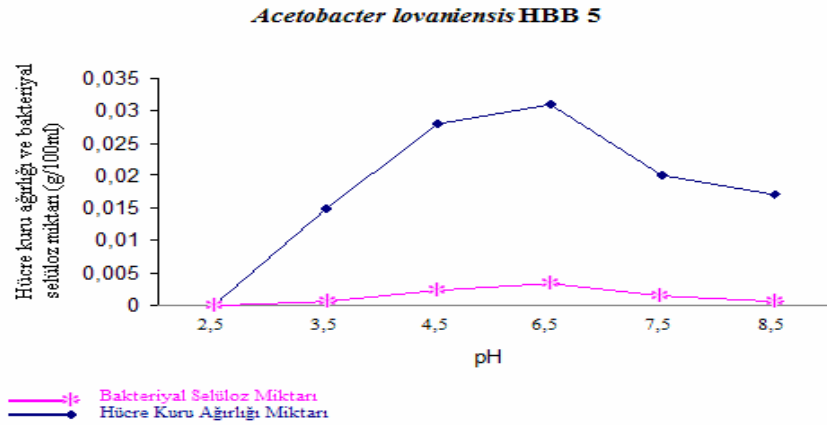
1,6 kat ve pH 7,5'daki selüloz miktarı da, pH 6,5'daki selüloz miktarından 2,5 kat daha düşüktür. Fakat pH 7,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarı, pH 3,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarından 1,3 kat ve selüloz miktarı da pH 3,5'daki selüloz miktarından 2,3 kat daha yüksektir. pH 8,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarı pH 6,5'daki hücre kuru ağırlığı miktarından 1,8 kat, selüloz miktarından ise 5,0 kat daha düşüktür.

Çizelge 4.10 HS broth'da farklı pH'ların etkisi

pH	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm'deki standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6					
2,5	-	-	-	-	-
3,5	0,022	665,0	0,0007	0,032	3,2
4,5	0,025	125,1	0,0025	0,10	10,0
6,5	0,026	198,5	0,0040	0,154	15,4
7,5	0,018	713,0	0,0011	0,061	6,1
8,5	0,018	687,0	0,0009	0,05	5,0
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5					
2,5	-	-	-	-	-
3,5	0,015	643,0	0,0006	0,04	4,0
4,5	0,028	124,8	0,0023	0,082	8,2
6,5	0,031	162,2	0,0035	0,113	11,3
7,5	0,020	923,0	0,0014	0,07	7,0
8,5	0,017	665,0	0,0007	0,041	4,1



Şekil 4.22 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin, HS besi ortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyel selüloz miktarları



Şekil 4.23 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin, HS besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları

4.7.3.2. Melas ortamında farklı pH'ların etkisi

Melas içeren besiortamının bütün içerikleri sabit tutulup, pH 2,5 - 8,5 aralığında üretilen bakteriyal selüloz ve hücre kuru ağırlığı miktarları çizelge 4.11'de verilmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.24 ve şekil 4.25'de gösterildiği gibi çizilmiştir.

Acetobacter pasteurianus HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin her ikisinde de pH 2,5 ve 3,5'da hücre gelişimi olmamış ve buna bağlı olarak da bakteriyal selüloz üretimi gözlenmemiştir. Her iki izolatda da en yüksek bakteriyal selüloz üretimine ve hücre kuru ağırlığı miktarına pH 6,5'da rastlanmıştır.

Acetobacter pasteurianus HBB6 straininde pH 4,5'da hücre kuru ağırlığı 0,028 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0017 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 6,1 olarak hesaplanmıştır. pH 6,5'da ise hücre kuru ağırlığı 0,036 g/100ml iken, bakteriyal selüloz miktarı 0,0029 g/100ml olarak bulunmuş ve yüzde verim % 8,1 olarak hesaplanmıştır. pH 7,5'da hücre kuru ağırlığı 0,025 g/100ml olup selüloz miktarı da 0,0010 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 4,0 olarak hesaplanmıştır.

pH 8,5’da ise hücre kuru ağırlığı 0,020 g/100ml olup, selüloz miktarı da 0,0006 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 3 olarak hesaplanmıştır.

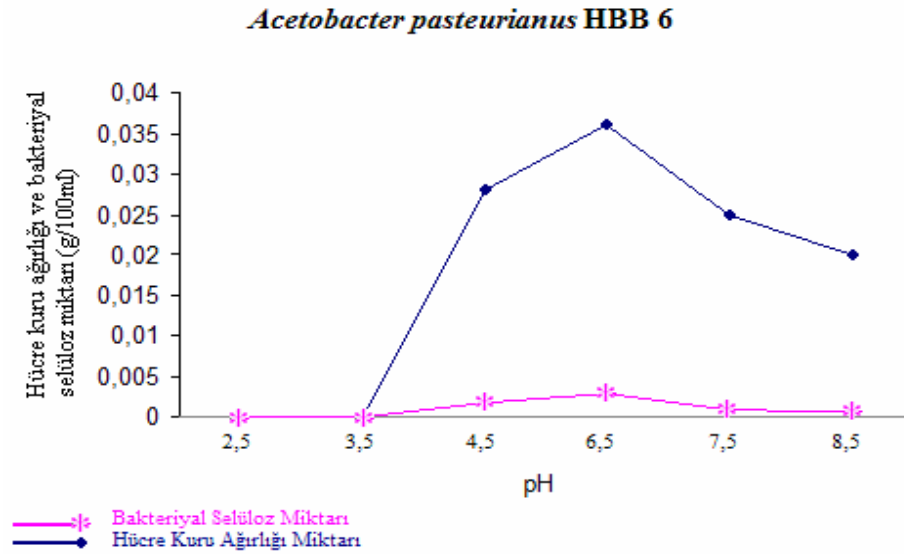
Acetobacter pasteurianus HBB6 straininde pH 6,5’da selüloz miktarının pH 4,5’dakinden 1,7 kat, pH 7,5’dakinden 2,9 kat ve pH 8,5’da üretilenden ise 4,8 kat daha fazla olduğu görülebilir. pH 7,5’da üretilen selüloz miktarı ise pH 4,5’da üretilen selüloz miktarından 1,7 kat daha düşük olmasına rağmen, pH 8,5’da üretilen selüloz miktarından 1,7 kat daha fazladır. Yapılan bu deneme sonucunda en yüksek selüloz üretimine pH 6,5’da en düşük selüloz üretimine de pH 8,5’da rastlanmıştır.

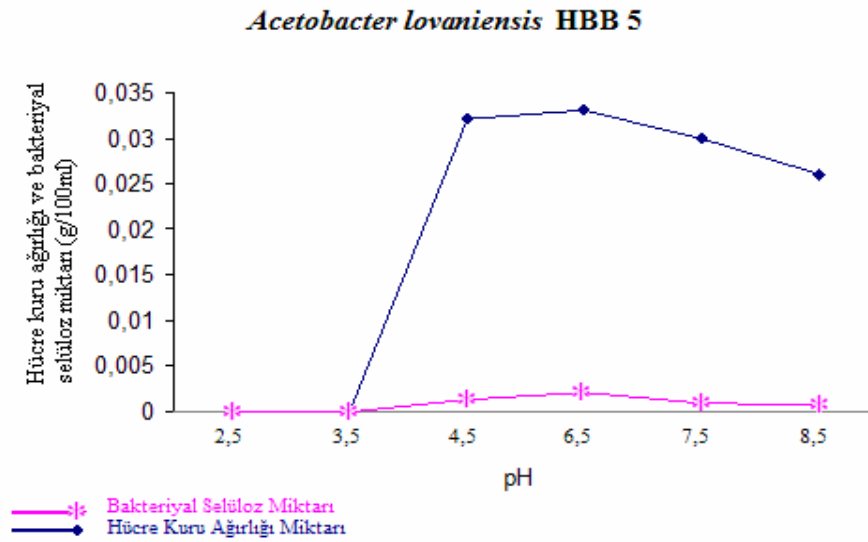
Acetobacter lovaniensis HBB5 straininin pH 4,5’da hücre kuru ağırlığı 0,032 g/100ml iken, bakteriyal selüloz miktarı ise 0,0013 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 4,1 olarak hesaplanmıştır. pH 6,5’da ise hücre kuru ağırlığı 0,033 g/100ml olup, bakteriyal selüloz üretimi de 0,021 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı % 6,4 olarak hesaplanmıştır. pH 7,5’da hücre kuru ağırlığı 0,030 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,0010 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 3,3 olarak hesaplanmıştır. pH 8,5’daki yüzde kuru ağırlığı miktarı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0008 g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise % 3,1 olarak hesaplanmıştır.

Acetobacter lovaniensis HBB5 straininde pH 6,5’da üretilen selüloz miktarının, pH 4,5’da üretilenden 1,6 kat, pH 7,5’da üretilenden 2,1 kat, pH 8,5’da üretilenden ise 2,6 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. pH 7,5’da üretilen selüloz miktarı ise pH 4,5’da üretilen selüloz miktarından 1,3 kat daha düşük olmasına rağmen pH 8,5’da üretilen selüloz miktarından ise 1,2 kat daha fazladır. Yapılan bu deneme sonucunda en yüksek selüloz üretimine pH 6,5’da en düşük selüloz üretimine de pH 8,5’da rastlanmıştır.

Çizelge 4.11 Melas içerikli besiortamında farklı pH'ların etkisi

pH	Hücre kuru ağırlığı (g/100ml)	470 nm'deki standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Y(p/x)	% Verim
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB6					
2,5	-	-	-	-	-
3,5	-	-	-	-	-
4,5	0,028	118,0	0,0017	0,061	6,1
6,5	0,036	126,4	0,0029	0,081	8,1
7,5	0,025	705,0	0,0010	0,040	4,0
8,5	0,020	596,0	0,0006	0,030	3,0
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB5					
2,5	-	-	-	-	-
3,5	-	-	-	-	-
4,5	0,032	911,0	0,0013	0,041	4,1
6,5	0,033	120,8	0,0021	0,064	6,4
7,5	0,030	706,0	0,0010	0,033	3,3
8,5	0,026	651,0	0,0008	0,031	3,1

Şekil 4.24 *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin, melaslı besiortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyel selüloz miktarları



Şekil 4.25 *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin, melaslı besi ortamında farklı pH'lardaki hücre kuru ağırlığı ve ürettiği bakteriyal selüloz miktarları

4.8. Atık Maddelerin ve Temel Ortamın, Bakteriyal Selüloz Üretimi ve Hücre Kuru Ağırlığı Üzerine Etkisi

Yapılan bu çalışmada temel ortam ve atık madde olan melas ve peynir altı suyu ile corn steep liquor içerikli besi ortamında *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 ve *Acetobacter aceti* DSM 3508 şahit strainleri ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyal selüloz üretim miktarları incelenmiştir. Elde edilen verilerin grafikleri, şekil 4.26'da gösterildiği gibi çizilmiştir.

HS besi ortamında şahit strainler ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin hücre kuru ağırlığı ve bakteriyal selüloz miktarları ile yüzde verim miktarları çizelge 4.12'de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre; *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini temel ortamda, en yüksek miktarda, hücre kuru ağırlığı, bakteriyal selüloz miktarı ile yüzde verim miktarını göstermiştir. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604

strainin, hücre kuru ağırlığı 0,049 g/100ml olup, bakteriyal selüloz miktarı 0,0075 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 15,3 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininde ise hücre kuru ağırlığı 0,045 g/100ml, bakteriyal selüloz miktarı 0,0022 g/100ml olarak olup, yüzde verim miktarı da % 4,9 olarak hesaplanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 strainin, hücre kuru ağırlığı 0,042 g/100ml, bakteriyal selüloz miktarı 0,0053 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 12,6 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininde, hücre kuru ağırlığı 0,035 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,0041 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 11,7 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininde ise hücre kuru ağırlığı 0,043 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,0040 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 9,3 olarak hesaplanmıştır.

Gluconacetobacter xylinus DSM 2004 straininin ürettiği bakteriyal selüloz miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strainine göre 1,4 kat daha düşük olmasına rağmen, *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainine göre 2,4 kat, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerine göre de 1,3 kat daha fazladır. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin sentezlediği bakteriyal selüloz miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininin sentezlediği miktardan 1,8 kat daha az olmasına rağmen *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainin sentezlediği miktardan 1,9 kat daha fazladır. *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainin hücre kuru ağırlığı miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 strainu, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainindeki miktardan daha fazla olmasına rağmen sentezlenen bakteriyal selüloz miktarı diğerlerine göre oldukça düşüktür. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin hücre kuru ağırlığı miktarı ise *Acetobacter pasteurianus* HBB6 strainininkinden yüksek olmasına rağmen sentezlenen selüloz miktarı yaklaşık birbirine eşittir.

Karbon kaynağı olarak kullanılan ve atık bir madde olan melaslı besi ortamında, şahit strainler ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyal selüloz miktarları ile yüzde verim miktarları çizelge 4.13'de verilmiştir.

Bu verilere göre; *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini, melaslı besiortamda en yüksek bakteriyal selüloz üretimi göstermiştir. *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininde ise en düşük selüloz üretimine rastlanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininde hücre kuru ağırlığı miktarı 0,041 g/100ml olup, bakteriyal selüloz miktarı ise 0,0046 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim % 11,2 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininde ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,037 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,0016 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 4,3 olarak hesaplanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straininde hücre kuru ağırlık miktarı 0,021 g/100ml, bakteriyal selüloz miktarı da 0,0022 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim %10,4 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininde hücre kuru ağırlık miktarı 0,032 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0031g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise % 9,8 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininde ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,033 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0025 g/100ml olup, yüzde verim miktarı ise % 7,5 olarak hesaplanmıştır.

Gluconacetobacter xylinus DSM 2004 straininin ürettiği selüloz miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininin ürettiği miktardan 2,1 kat daha düşük olmasına rağmen, *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininden ise 1,4 kat daha fazladır.

Acetobacter pasteurianus HBB6 ise *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straini ile *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininden yaklaşık 1,3 kat ve *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininden de 1,9 kat daha fazla selüloz üretmesine rağmen *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininden 1,5 kat daha düşük selüloz üretmiştir. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin ürettiği selüloz miktarı ise *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainundan 1,6 kat, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 strainundan ise 1,2 kat daha fazla olmasına rağmen *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strainundan 1,8 kat daha düşüktür.

Azot kaynağı olarak kullanılan corn steep liquor içerikli besiortamında, şahit strainler ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5

strainlerinin hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyal selüloz miktarları ile yüzde verim miktarları çizelge 4.14’de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre; *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini, corn steep liquor içerikli besiortamında en yüksek bakteriyal selüloz üretimini gösterirken, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straini ise en düşük selüloz üretimini göstermiştir.

Gluconacetobacter xylinus DSM 46604 straininin hücre kuru ağırlığı miktarı 0,037 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0031 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim ise % 8,3 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininde ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,041 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,0019 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı % 4,6 olarak hesaplanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straininde ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,037 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0028 g/100ml olup yüzde verim % 7,6 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininde hücre kuru ağırlık miktarı 0,031 g/100ml ve selüloz miktarı 0,0025g/100ml bulunmuş yüzde verim miktarı ise % 8,1 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininde ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,028 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0014 g/100ml olup yüzde verim miktarı ise % 5,0 olarak hesaplanmıştır.

Acetobacter aceti DSM 3508 strainin hücre kuru ağırlığı, diğer strainlere göre yüksek olmasına rağmen, yüzde verim miktarı en düşük olmuştur. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini ile *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 strainin hücre kuru ağırlığı miktarı aynı olmasına rağmen, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strainin selüloz miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straininin selüloz miktarından 1,1 kat daha fazladır.

Acetobacter aceti DSM 3508 straininin ürettiği bakteriyal selüloz miktarı, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininin ürettiği miktardan 1,4 kat daha fazla olmasına rağmen, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininden 1,6 kat,

Gluconacetobacter xylinus DSM 2004 straininden 1,5 kat ve *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininden de 1,3 kat daha düşüktür. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin yüzde verim miktarları yaklaşık olarak birbirine eşit olmasına rağmen, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininin ürettiği selüloz miktarı, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininin ürettiği selüloz miktarından 1,2 kat daha fazladır.

Karbon kaynağı olarak kullanılan ve atık bir madde olan peyniraltı suyunu içeren besiortamında, şahit strainler ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları ile yüzde verim miktarları çizelge 4.15’de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre; *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straini, peyniraltı suyunu içeren besiortamında en yüksek selüloz üretimini gösterirken, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straini ise en düşük selüloz üretimini göstermiştir.

Gluconacetobacter xylinus DSM 46604 straininde hücre kuru ağırlığı miktarı 0,032 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,026 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 8,1 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter aceti* DSM 3508 straininde ise hücre kuru ağırlığı miktarı 0,036 g/100ml, selüloz miktarı da 0,0012 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı ise % 3,3 olarak hesaplanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straininin hücre kuru ağırlığı miktarı 0,033 g/100ml olup, selüloz miktarı 0,022 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 6,7 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininde ise hücre kuru ağırlık miktarı 0,026 g/100ml, selüloz miktarı ise 0,0016 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim miktarı da % 6,1 olarak hesaplanmıştır. *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininde hücre kuru ağırlık miktarı 0,022 g/100ml olup, selüloz miktarı da 0,0007 g/100ml bulunmuş ve yüzde verim ise % 3,2 olarak hesaplanmıştır.

Acetobacter aceti DSM 3508 straini en yüksek hücre kuru ağırlığına sahip olmasına rağmen, ürettiği selüloz miktarı, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604

straininden 2,2 kat, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straininden ise 1,8 kat, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straininden ise 1,3 kat daha düşüktür. *Acetobacter lovaniensis* HBB 5 straini ile *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainin yüzde verim miktarları yaklaşık olarak birbirine eşit olmasına rağmen, *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainin hücre kuru ağırlığı ve selüloz miktarı, *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straininden yaklaşık 1,6 kat daha fazladır. *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 straini ile *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strainin hücre kuru ağırlığı yaklaşık olarak birbirine eşit olmasına rağmen, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 strainin selüloz miktarı ile yüzde verim miktarı *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 strainine göre 1,2 kat daha fazladır.

Çizelge 4.12 Farklı strainlerin, HS broth besiyortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve ürettikleri bakteriyel selüloz miktarları

İzolat No	Besi ortamı	Hücre Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	470 nm'de standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Y (p/x)	Verim (%)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> DSM 46604	HS	0,049	0,0075	759,0	0,1531	15,3
<i>Acetobacter aceti</i> DSM 3508	HS	0,045	0,0022	122,1	0,0488	4,9
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> DSM 2004	HS	0,042	0,0053	492,4	0,1262	12,6
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB 6	HS	0,035	0,0041	210,5	0,1171	11,7
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5	HS	0,043	0,0040	201,7	0,0930	9,3

Çizelge 4.13 Farklı strainlerin, melas içerikli besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve bakteriyel selüloz miktarları

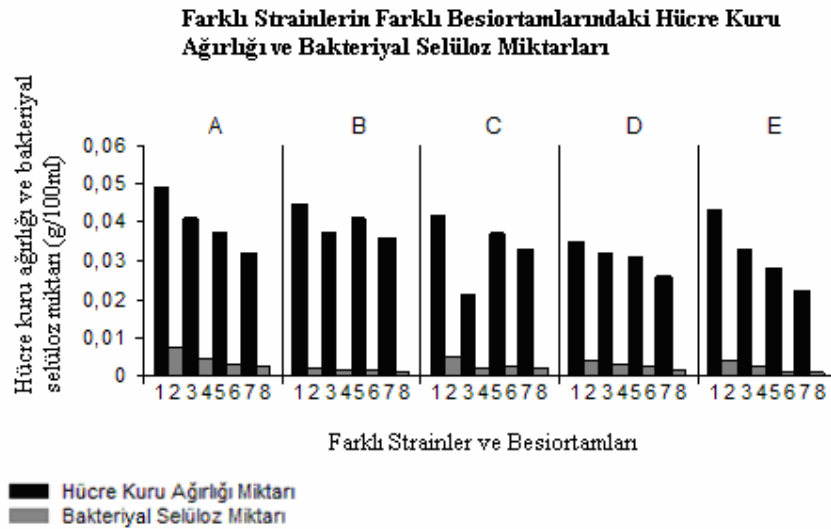
İzolat No	Besiortamı	Hücre Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	470 nm'de standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Y(p/x)	Verim (%)
<i>Gluconaceto bacter xylinus</i> DSM 46604	Melas	0,041	0,0046	278,2	0.1121	11,2
<i>Acetobacter aceti</i> DSM 3508	Melas	0,037	0,0016	996,0	0.0432	4,3
<i>Gluconaceto bacter xylinus</i> DSM 2004	Melas	0,021	0,0022	122,0	0.1047	10,4
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB 6	Melas	0,032	0,0031	143,2	0.0986	9,8
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5	Melas	0,033	0,0025	124,6	0.0757	7,5

Çizelge 4.14 Farklı strainlerin, CSL içerikli besiortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve ürettikleri bakteriyel selüloz miktarları

İzolat No	Besi ortamı	Hücre Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	470 nm'de standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Y(p/x)	Verim (%)
<i>Gluconaceto bacter xylinus</i> DSM 46604	CSL	0,037	0,0031	143,2	0,0838	8,3
<i>Acetobacter aceti</i> DSM 3508	CSL	0,041	0,0019	121,4	0,0462	4,6
<i>Gluconaceto bacter xylinus</i> DSM 2004	CSL	0,037	0,0028	128,5	0,0756	7,6
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB 6	CSL	0,031	0,0025	124,1	0,0806	8,1
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5	CSL	0,028	0,0014	922,0	0,05	5,0

Çizelge 4.15 Farklı strainlerin, peynir “altısu”yu içerikli besi ortamındaki hücre kuru ağırlıkları ve ürettikleri bakteriyel selüloz miktarları

İzolat No	Besi ortamı	Hücre Kuru Ağırlığı (g/100ml)	Ham Polisakkarit Kuru Ağırlığı (g/100ml)	470 nm’de standart eğriye göre glukoz miktarı (g/100ml)	Y(p/x)	Verim (%)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> DSM 46604	PAS	0,032	0,0026	124,5	0,0812	8,1
<i>Acetobacter aceti</i> DSM 3508	PAS	0,036	0,0012	803,0	0,0331	3,3
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> DSM 2004	PAS	0,033	0,0022	120,8	0,0666	6,7
<i>Acetobacter pasteurianus</i> HBB 6	PAS	0,026	0,0016	996,0	0,0636	6,4
<i>Acetobacter lovaniensis</i> HBB 5	PAS	0,022	0,0007	634,0	0,0318	3,2



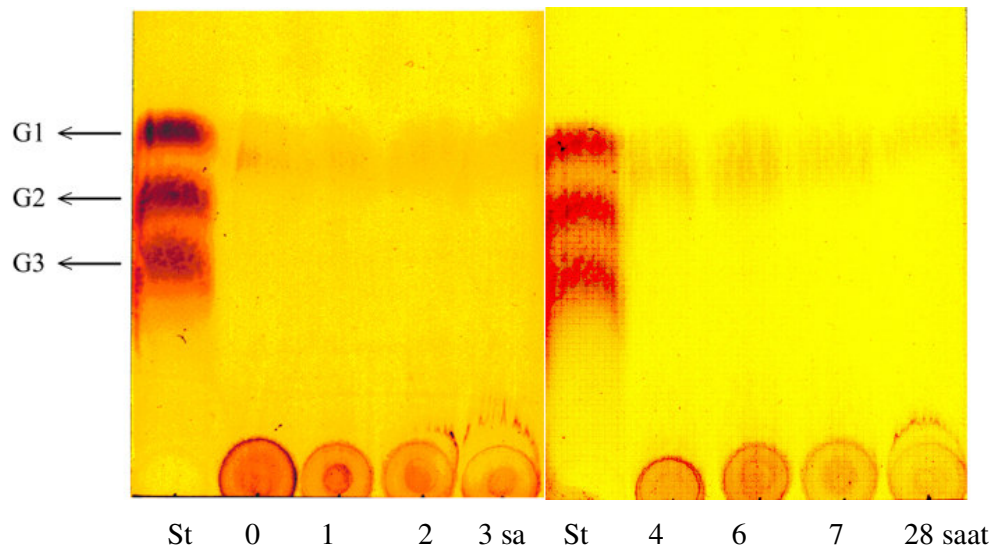
Şekil 4.26 Farklı strainlerin, farklı besi ortamlarındaki hücre kuru ağırlıkları ve ürettikleri bakteriyel selüloz miktarları.

A: *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604
 C: *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004
 E: *Acetobacter lovaniensis* HBB5
 1-2: HS 3-4: Melas 5-6: CSL

B: *Acetobacter aceti* DSM 3508
 D: *Acetobacter pasteurianus* HBB6
 7-8: PAS

4.9. Bakteriyal selülozun enzimatik (selülaz ile) hidrolizi

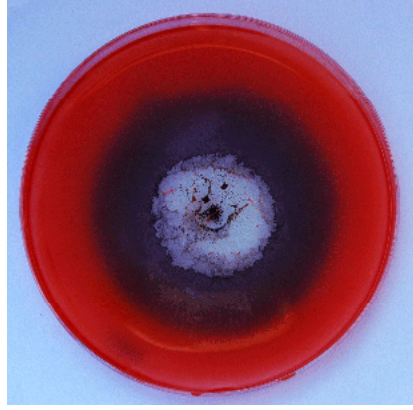
Bakteriyal selülozun, *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarından elde edilen selülaz enzimi ile, zamana bağlı (0,1,2,3,4,7 ve 28 saat) hidrolizi sonucunda oluşan son ürünün glukoz olduğu bulunmuştur. Oluşan son ürünün glukoz olmasından dolayı, elde edilen enzimin ekzoglukohidrolaz olduğu saptanmıştır (Şekil 4.27). Örneğin aldığı yolun (4,5 cm), çözücünün aldığı yola (8,5 cm) oranına göre, Rf değeri 0,529 olarak hesaplanmıştır.



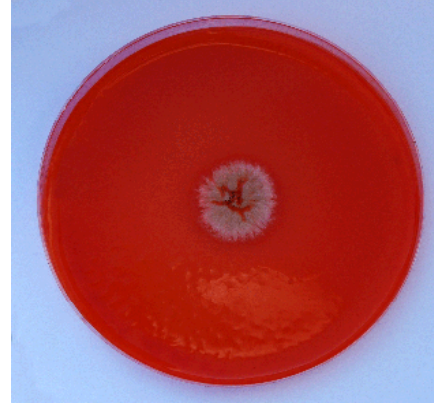
Şekil 4.27 Bakteriyal selülozun, enzimatik hidrolizi. G1: Glukoz, G2: Sellobiyoz, G3: Sellotrioz, St: Standart

4.9.1. *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarından selülaz enziminin eldesi

Czapek dox agarda geliştirilen *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarının kolonileri üzerine, % 1'lik kongo kırmızısı ve 1M NaCl çözeltisi damlatılmış ve 15-30 dakika sonra kolonilerin etrafında koyu renkli zon oluşumu gözlenmiştir. Zon oluşumunun varlığı, kullanılan fungusların, selülaz enzimini üretme yönünden pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 4.28).



Zon oluşumu var

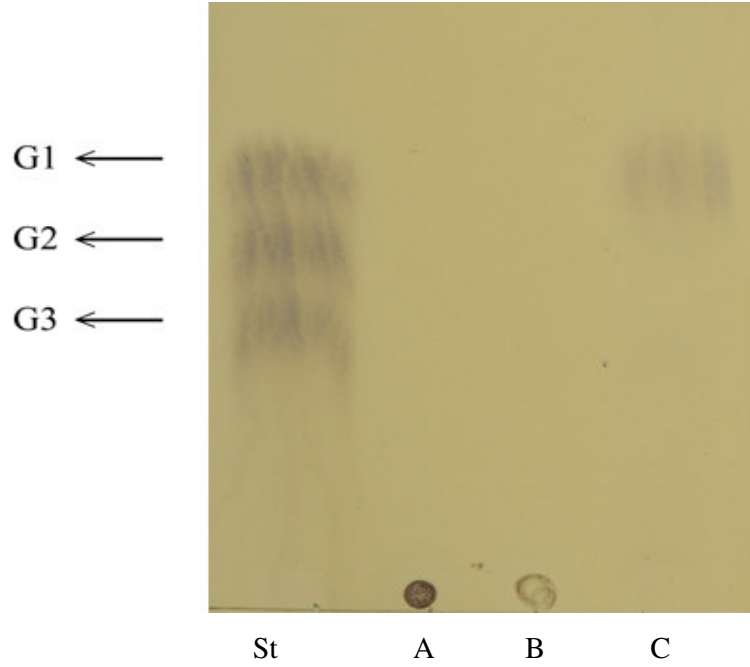


Zon oluşumu yok

Şekil 4.28 *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 funguslarının kalitatif olarak selülotik aktivitelerinin belirlenmesi

4.9.2. Bakteriyal selülozun Trifluoroasetik asit (TFA) ile hidrolizi

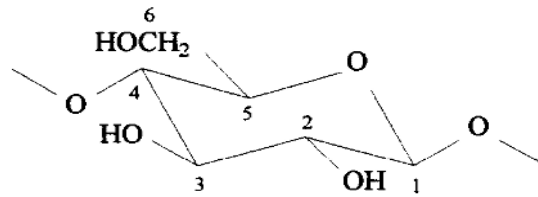
Bakteriyal selülozun trifluoroasetik asit (TFA) ile hidrolizi sonunda oluşan son ürünün glukoz olduğu belirlenmiştir. Oluşan son ürünün glukoz olmasından dolayı, elde edilen enzimin ekzoglukohidrolaz olduğu da saptanmıştır (Şekil 4.29). Örneğin aldığı yolun (4,5 cm), çözücünün aldığı yola (8,5 cm) oranına göre, Rf değeri 0,529 olarak hesaplanmıştır.



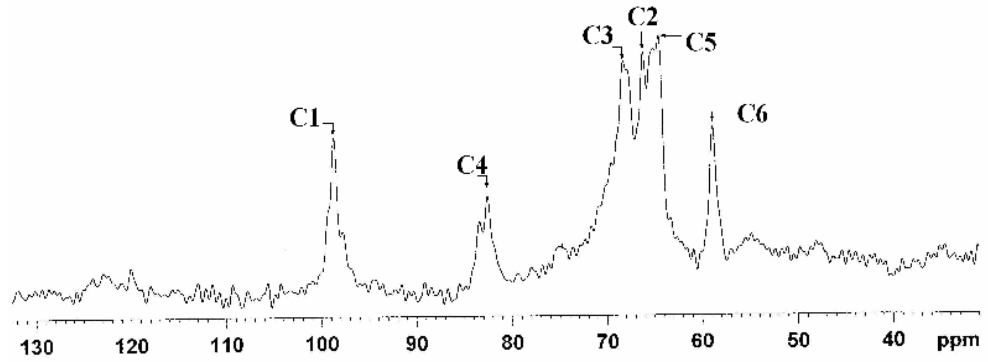
Şekil 4.29 Bakteriyal selülozun TFA ile hidrolizi. G1: Glukoz, G2: Sellobiyoz, G3: Sellotrioz, St: Standart, A: Hidrolize olmamış avicel selüloz, B: Hidrolize olmamış bakteriyal selüloz, C: TFA ile hidrolize olmuş bakteriyal selüloz

4.10. Bakteriyal Selülozun CP/MAS ^{13}C Katı NMR Analizi

Selülozun altı karbonlu genel yapısı şekil 4.30'da gösterilmiştir. Durgun kültürde üretilen bakteriyal selüloz, önce % 4'lük NaOH ile daha sonra % 6'luk asetik asit ile yıkayıp, liyofilizatörde kurutulmuş ve örneğin CP/MAS ^{13}C katı NMR spektrofotometre analizi yapılarak, grafik sonucu şekil 4.31'de verilmiştir.



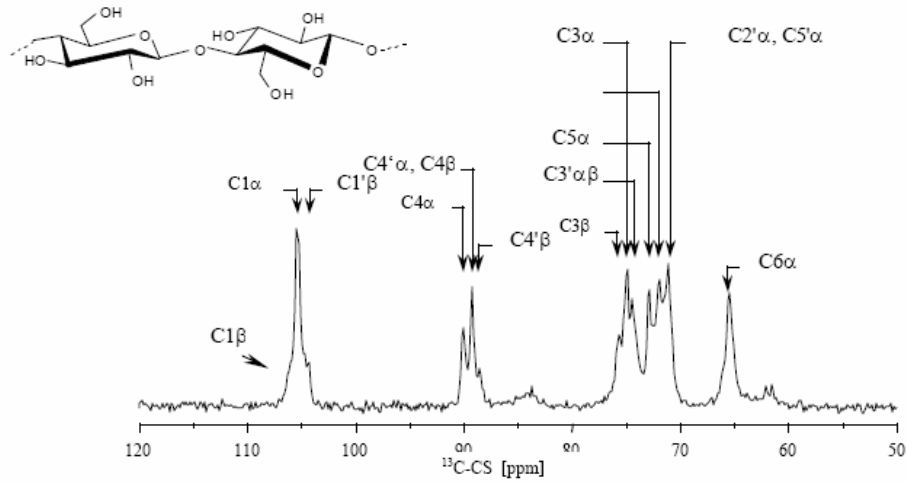
Şekil 4.30 Selülozun kimyasal yapısı (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html>)



Şekil 4.31 Bakteriyal selülozun, CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiği

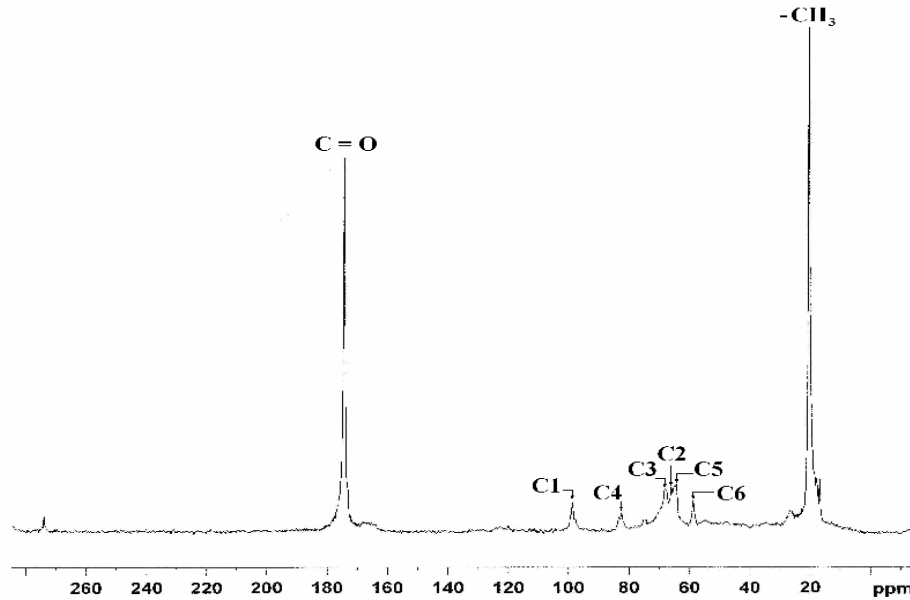
Analiz sonucunda, yaklaşık 100 ppm de C1'in, 85 ppm de C4'ün, 70-62 ppm'de C2,C3 ve C5'in 59 ppm de C6'nın olduğu bulunmuştur (Şekil 4.31).

Hesse ve Jäger (2005), selülozun katı NMR araştırması sonunda; 105 ppm'de C1, 90 ppm'de C4, 76-70 ppm'de C3, C2, C5 ve 65 ppm'de de C6'nın olduğunu göstermişlerdir (Şekil 4.32).



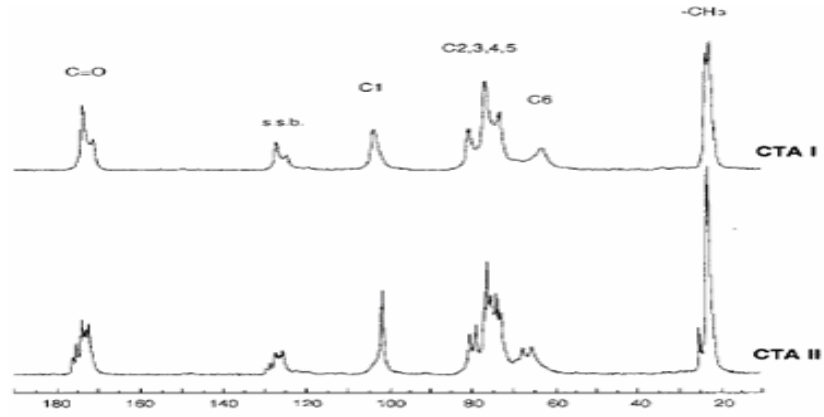
Şekil 4.32 Selülozun, CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiği (Hesse ve Jäger, 2005)

Hesse ve Jäger (2005), selülozun CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiğinde C1, C4, C2,3,5 ve C6'nın bulunduğu yer ile bizim çalışmadan elde ettiğimiz bakteriyel selülozun C1, C4, C2,3,5 ve C6'nın bulunduğu yer arasında yaklaşık 5 ppm'lik bir sapma gözlenmiştir. Bu sapmanın, saflaştırma sırasında kullandığımız asetik asitin örneğimizde, eser miktarda kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü bakteriyel selülozun CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiğinde şekil 4.33'de görüldüğü gibi, 180 ppm ve 20 ppm'de iki pik belirlenmiştir. Özellikle 180 ppm'deki pik, selülozun yapısındaki C1, C4, C2,3,5 ve C6'a ait olan piklerin sağa doğru kaymasına neden olmuştur. Bu analiz sonucunu, Kono et al. (2002)'nin yaptıkları çalışmadan elde ettikleri veriler desteklemektedir.



Şekil 4.33 Bakteriyel selülozun CP/MAS ^{13}C katı NMR analiz grafiğinde, 180 ppm ve 20 ppm'deki pikler

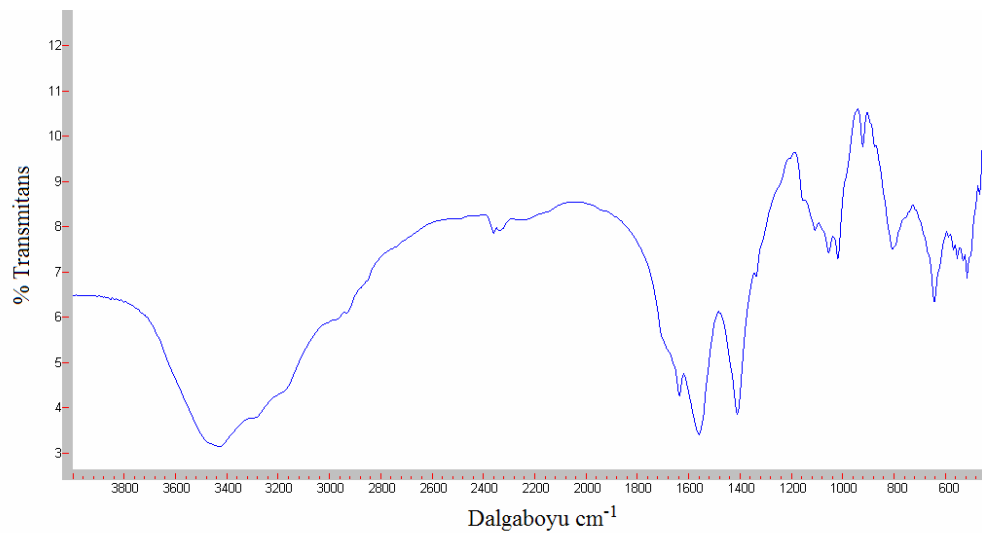
Kono et al. (2002), selüloz triasetat polimorflarının (CTA I ve CTA II) katı NMR araştırması sonunda; CTA I için, 102 ppm'de C1'in, 63 ppm'de C6'nın olduğunu ayrıca CTA II için de, 100 ppm'de C1'in, 65-67 ppm'de ise C6'nın olduğunu belirtmişlerdir. 180 ppm'de C=O ve 20 ppm'de $-\text{CH}_3$ bağlarını içeren iki pik gözlemişlerdir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 Selüloz triasetat polimorflarının (CTA I ve CTA II) katı NMR analiz grafiği

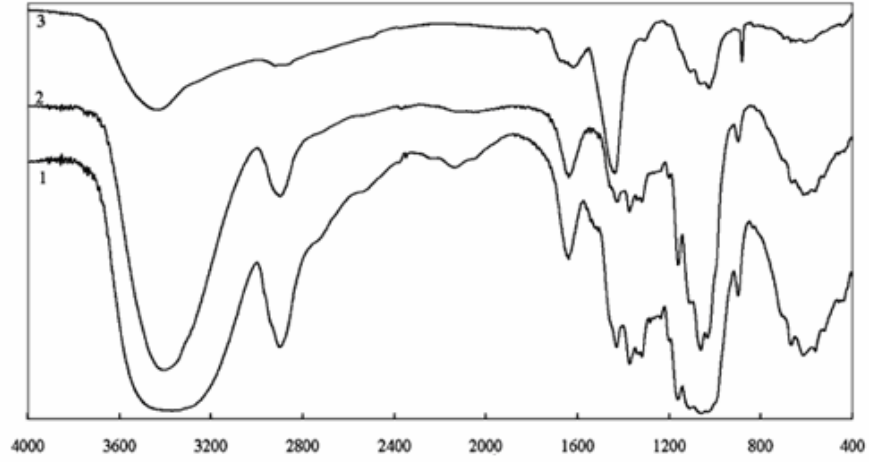
4.11. Bakteriyal Selülozun FT-IR (Fourier Transformed Infrared) Spektrometresi ile Analizi

Çalışmamızda elde ettiğimiz bakteriyal selülozun FT-IR spektrofotometre analiz sonucunda, selülozdaki OH gruplarına 3400 cm^{-1} bant bölgesinde, H-O-H gruplarının ise 1635 cm^{-1} bölgesindeki bantta rastlanmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Durgun kültürde üretilen bakteriyal selülozun, FT-IR spektrofotometre analiz sonucu

Bulduğumuz bu sonuç, Cao et al. (2002)'nin yaptığı çalışma bulgularını desteklemektedir. Bu çalışmaya göre, selülozdaki C-O-C gruplarının 1160 cm^{-1} yakınlarındaki bantta, H-O-H gruplarının ise 1635 cm^{-1} bölgesindeki bantta, OH gruplarının da 3400 cm^{-1} bölgesindeki bantlarda olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.36).



Dalga boyu cm^{-1}

Şekil 4.36 Selülozun FT-IR analizi (Cao et al., 2002). 1. Orijinal selüloz 2. enzimle hidrolize olmuş selüloz 3. Sodyum hidroksitle yumuşatılmış selülozun enzimatik hidrolizi

5. TARTIŞMA

Canlılar aleminde mikroorganizmalar; tekstil, kağıt, gıda endüstrisi ile farmokoloji ve tıpta geniş kullanım alanına sahip, ekstrasellular polisakkaritler (EPS) sentezlemektedirler. Ekstrasellular polisakkaritler, hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan, bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Sutherland, 1998; Ramesh et al., 2003). Bakteriler tarafından sentezlenen ekstrasellular polisakkaritler genellikle immunojeniktirler. In vitro çalışmalarda ekstrasellular polisakkaritlerin varlığı, katı besiortamında mukoid koloni, sıvı besiortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Gugliandola et al.; 2003). Bakterinin dış yüzeyini kaplayan ekstrasellular polisakkarit, kapsül veya slime (cıvık tabaka) formda olabilir. Kapsüller ekstrasellular polisakkarit, hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Sutherland, 1990; Costerton, 1994).

Ekstrasellular polisakkaritler, glukozidik bağlar ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bunların bazıları düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazıları ise tek tip şekerden meydana gelen homopolisakkarit yapıdadır. Ekstrasellular polisakkaritleri (EPS) oluşturan homopolisakkaritlerin çoğu nötr olmasına rağmen, birçok bakteriyal EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir. Ayrıca polisakkaritler, hidrofilik özellik taşımakla birlikte, çoğu polimer lipofilik, hidrofobik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Kenne et al., 1983; Calazans, 1997; Gugliandola et al., 2003).

EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça karışıktır ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar, hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ayrıca EPS üretimi, ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarılardan etkilenir (Shankar et al., 1995).

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. EPS'ler, üretici strainler tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Fakat mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur ve ekstrem şartlardan etkilenmesine engel olur (Ophir et al., 1994; Moriello et al. 2003). Ayrıca EPS'ler bakteriyi, antibiyotiklere karşı da fiziksel olarak korur. Ortamdaki metalik iyonların da tutulmasını sağlarlar. Bitki, hayvan ve insan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virülans faktörler oldukları da bilinmektedir (Denny, 1995; Gugliandola et al., 2003). EPS'ler yapışkan bir şekilde bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar ya da ortamda serbest olarak bulunurlar. Yüksek moleküler yapıya sahip olan EPS'ler, bakterilerin dış ortama karşı direncini ve kararlılığını artırır (Allison, 1998).

EPS'ler pek çok fiziki ve kimyasal özelliklerinden dolayı tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri, atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, kozmetik, farmakoloji ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Yalpani et al., 1987; Becker et al., 1998).

EPS'ler antitümör, antivirüs ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde kaplama materyali olarak, pek çok fizyolojik aktivitenin artırılmasına katkıda bulunurlar. Ayrıca interferon, trombosit yığınlarının birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılırlar (Kitazawa et al., 1991). Tıpta en çok kullanılanları 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sephadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler (Calazans et al., 1997; Margaritis et al., 1985).

Yapılan çalışmalar sonucunda EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine de sahip olduğu belirlenmiştir (Kenne et al., 1983; Tavernier et al., 1997). Ayrıca EPS'lerden kimya alanında incelti olarak da yararlanıldığı belirtilmiştir (Lee et al., 1997).

Üzerinde yoğun araştırmalar yapılan ve günümüzde ticaret ürünü olarak pazarlanan biyopolimerler şunlardır: *Xanthomonas campestris* tarafından sentezlenen ksantan zımkı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından sentezlenen gellan, *Pseudomonas* türleri tarafından sentezlenen alginatlar, *Acetobacter xylinum* bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz, *Streptococcus equii* tarafından sentezlenen hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen suksinoglikan gibi ürünler yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (Margaritis et al.,1985; Sutherland, 1996).

Günümüzde ticari olarak piyasada pazarlanan biyopolimerler içinde en önemlilerinden biri de bakteriyel selülozdur. Doğal bir polimer olan selüloz, dünyada çok yaygın olması nedeniyle, kağıt ve pamuk endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Biyoteknologlar, bitkiler olmadan da selüloz üretebilmenin yollarını ararlarken, asetik asit bakterilerinden olan *Acetobacter xylinum* adlı bir bakteri türünün ürettiği selülozun, yüksek bitkilerin ürettiklerine benzer olduğunu bulmuşlardır (Brown, 1886). *Acetobacter xylinum*'dan elde edilen selüloz, oldukça güçlü, katlanınca şeklini koruyan ve esnek olan bir yapıya sahiptir. Bu nedenle kumaş ve tıbbi malzemelerde ham madde olarak kullanılması mümkündür. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Bizim çalışmamızda, bitkisel selüloza alternatif olarak düşünülen ekstrasellüler bir polisakkarit olan bakteriyel selülozun; bazı asetik asit bakterilerinden elde edilerek, bunun uygun fermentasyon ortamlarında pilot düzeyde üretimini sağlamak ve bu ürünün endüstriyel kuruluşlarda kullanılmasını yaygınlaştırarak, ticari anlamda ülkemiz ekonomisine katkı sağlayabilmesi amaçlanmıştır.

Asetik asit bakterileri, *α -Proteobacteria* sınıfında ve *Acetobacteraceae* familyasında yer almaktadır (Gills et al.,1980; Stackebrandt et al.,1988). *Acetobacteraceae* familyasına ait asetik asit bakterileri fenotipik olarak, düşük pH'da gelişebilme ve etanolü, asetik aside okside edebilme yetenekleri ile karakterize edilmişlerdir (De Ley et al., 1984; Swings, 1992). Asetik asit bakterileri, *Acetobacter* (Beijerinck,1989), *Gluconobacter* (Asai,1935),

Acidomonas (Urakami et al.,1989), *Gluconacetobacter* (Yamada et al.,1997), *Asaia* (Yamada et al.,2000) ve *Kozakia* (Lisdiyanti et al.,2002) olmak üzere altı genus içerir. Asetik asit bakterileri, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de, *Acetobacter* ve *Gluconobacter* olarak iki genus altında incelenmiştir (De Ley et al., 1984; Swings, 1992; Poblet, 2000). Fakat bu grup asetik asit bakterilerinin klasifikasyonu, tartışmalara konu olmuştur (Fuentes-Ramirez et al., 2001). Örneğin; metilotrofik türlerin transferi ile yeni bir tür olarak nitelendirilen *Acetobacter methanolicus*, *Acidomonas* olarak önerilmiş (Urakami et al.,1989) ve 5S rRNA sekans verileri ile desteklenmiştir (Bulygina et al., 1992). Fakat bu yeni genusun ortaya çıkışı eleştirilmiş ve kabul edilmemiştir (Sievers et al., 1994; Swings, 1992). Benzer şekilde *Gluconoacetobacter* subgenusunun da ortaya çıkışı sorulara neden olmuştur (Yamada ve Kondo, 1984; Swings, 1992). Son zamanlarda, asetik asit bakterileri, 16S rRNA sekans analizleri göz önüne alınarak, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* ve *Acidomonas* olarak dört genera ayrılmış (Yamada et al., 1997). Bu öneriye göre; *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter* genusu içinde yer alırken; *Acetobacter diazotrophicus*, *Acetobacter europaeus*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter liquefaciens* ve *Acetobacter xylinum*, *Gluconoacetobacter* genusu içinde yer almış ve bu sonradan *Gluconacetobacter* olarak düzeltilmiştir (Yamada et al., 1998). Yamada et al. (1997), yaptığı çalışma sonunda, *Acetobacter oboediens* ve *Acetobacter pomorum* türlerini eklemiş ve bunları tanımlamıştır (Sokollek et al. 1998). *Acetobacter oboediens*, *Acetobacter intermedius* ile birlikte *Gluconacetobacter* genusuna dahil edilmiştir (Franke et al., 1999; Yamada, 2000). Son zamanlarda, *Gluconacetobacter sacchari*' de asetik asit bakterilerinde yeni tür olarak tanımlanmıştır (Franke et al., 1999).

Çalışmamızda kullanılmak üzere, çeşitli bölgelerden toplanan şarap ve sirke örnekleri ile üzüm, elma ve turşu suyundan asetik asit bakterileri izole edilmiştir. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu için Tsuchida et al. (1997)'nin belirttiğine göre, bağ toprağı da kullanılmasına rağmen, çalışmamızda topraktan asetik asit bakterisi izole edilememiştir. Çünkü toprak, alkol ve şeker oranı oldukça düşük olan bir ortamdır. Asetik asit bakterileri ise doğada genel olarak, şeker ve alkol

oranı yüksek ortamlarda bulunmaktadır (Swings, 1992). Bu nedenle, asetik asit bakterilerinin çiçek, meyve, arı kovani ile üzüm, elma ve hurma şarabından izole edilebileceği belirtilmiştir (Swings, 1992). Dupuy (1957), Güney Fransa'da şaraplardan % 75 *Acetobacter pasteurianus* ve % 19 *Acetobacter aceti* izole etmiştir. Peynaud ve Domercq (1961), çoğu hasarlı olan olgun üzümlerden asetik asit bakterilerini izole etmiştir. Blackwood et al. (1969), Bordeaux bölgesinin olgun üzümlerinden *Acetobacter* yanında % 73 *Gluconobacter* asetik asit bakterilerini izole etmiştir. Kahlon ve Vyas (1972), üzümlerden *A. aceti*, *A. xylinum* ve *A. pasteurianus* izole etmişlerdir. Kahlon ve Vyas (1972), üzümlerden *Gluconobacter* strainlerini izole edememiş olmasına rağmen Ameyama (1975), üzümlerden *Gluconobacter oxydans* strainini izole etmiştir. Passmore ve Carr (1975), kurumuş ve ergin üzümler ile sirkeden *Gluconobacter* izole etmişlerdir fakat *Acetobacter* izole edememişlerdir. Takahashi (1907), sake'den (Japonlara özgü pirinç rakısı) *Acetobacter pasteurianus* izole etmiştir. Faparusi (1972,1973) ve Bassir (1972), hurma şarabından *Acetobacter* türlerini izole etmişlerdir. Aynı şaraptan, Simonart ve Laudelout (1951), *A. pasteurianus* ve *A. xylinum* strainlerini izole etmişlerdir. Passmore ve Carr (1975), elma şarabından *Acetobacter* ve *Gluconobacter* strainlerini izole etmişlerdir. Maugenet (1962), Fransa'da elma şarabından *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter pasteurianus* strainlerini izole etmiştir. Fratur ve Simonart (1952), sirkede, asite dirençli bakterileri incelemişler ve küçük koloniler halinde gelişen *A. pasteurianus* ve *A. xylinum* strainlerini izole etmişlerdir. Bu türler, daha çok alkol ve şeker oranı yüksek olan substratlarda bulunurlar (Swings, 1992). Shimwell (1954), sirkeden *A. aceti* strainini izole etmiştir. Turtura et al.,(1973), sirkeden ve sıkılmış üzümünden % 56 *A. pasteurianus*, % 34 *A. aceti* ve % 10 *A. xylinum* strainlerini izole etmişlerdir. Asetik asit bakterileri elma, kayısı, incir, üzüm, armut, şeftali ve domates gibi çeşitli meyvelerden de izole edilmiştir (Asai,1968; Kahlon ve Vyas, 1972; Bhat ve Rijsinghani, 1955).

İzolasyon işleminde zenginleştirme besiortamı olarak, içinde glukoz, yeast ekstrakt, polipepton, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve sitrik asit içeren HS sıvı ortam kullanılmıştır (Hestrin ve Schramm, 1957). Koloni gelişimleri için HS Agar, GYC

Agar ve Mannitol Agar besiortamları kullanılmış (Hestrin ve Schramm, 1957; Du Toit, 2002) ve bu ortamlardaki koloni gelişimleri incelenmiştir. Besiortamında gelişen küçük, bej, beyaz renkte, yüksek ya da konveks ve kompakt olan koloniler seçilmiştir. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu için değişik ortamlar önerilmiştir. Vaughn (1942), maya özütü ve malt şurubu içeren “wort medium”(arpa mayası) ortamlarını kullanmıştır. Frateur (1950), *A. pasteurianus* izolasyonu için içinde % 0,5 asetik asit bulunan modifiye “Hoyer medium” denilen bir besiortamını kullanmıştır. Frateur (1950), etanolla zenginleştirilmiş ortamlarda, asetik asit bakterilerinin, özellikle de *Acetobacter* strainlerinin, geliştirilebileceğini belirtmiş ve bu nedenle, *Acetobacter aceti* ve *Gluconobacter oxydans* için, içinde maya özütü, glukoz, etanol, kalsiyum karbonat bulunan besiortamını kullanmıştır. Frateur ve Simonart (1952), asetik asit bakterilerinin izolasyonu için de, içinde maya özütü, glukoz, kalsiyum karbonat ve agar bulunan katı bir besiortamı kullanmışlardır. Shimwell (1954), içinde yeast ekstrakt, kalsiyum laktat ve agar bulunan besiortamını kullanmıştır. Suomalainen et al. (1965) da, içinde etanol, yeast ekstrakt ve agar bulunan besiortamını kullanmışlardır. Frateur ve Simonart (1952), çiçek ve meyvelerde asetik asit bakterilerinin izolasyonu sırasında zenginleştirme besiortamına, maya ve fungusları inhibe edici madde olarak 100 ppm sikloheksimid ilave etmişlerdir. Du Toit ve Lambrechts (2002), kırmızı şaraptan asetik asit bakterilerinin izolasyonu için, ortamdaki maya ve laktik asit bakterilerini inhibe etmek amacıyla, ortama 50 mg/l pimarisin ve 50 mg/l nisin maddeleri ilave edilmiştir. Yaptığımız çalışmada asetik asit bakterilerinin izolasyonu sırasında, maya ve laktik asit bakterilerini inhibe etmek amacıyla, zenginleştirme besiortamına (HS besiortamı) 100 ppm sikloheksimid ilave edilmiştir.

Asetik asit bakterilerinin, bira ve şaraplarda etil alkolü, aerobik koşullarda oksidatif bir reaksiyonla asetik aside dönüştürdüğü ve bunun da sirke endüstrisinde kullanıldığını bilinmektedir. Fuhrmann (1905), asetik asit bakterilerinin yüksek alkol toleransını incelemiş ve alkol oranı yüksek olan şaraptan, fazla sayıda asetik asit izole edilmiştir.

İzolasyon sonunda elde ettiğimiz izolatların identifikasyonu Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e göre yapılmıştır. İdentifikasyon sonunda elde ettiğimiz izolatların asetik asit bakterisi olduğu belirlenmiştir. Asetik asit bakterilerinin Gram negatif veya Gram değişken, 0,6-0,8 ile 1,0-4,0 µm boyutunda ve çubuk şeklinde oldukları tanımlanmıştır (De Ley et al., 1984). Frateur (1950), asetik asit bakterilerinin identifikasyonu için, bu bakterilerin genel taksonomik özelliklerini listelemiştir. Ayrıca asetik asit bakterilerinin identifikasyonu için etanolü okside edebilme yetenekleri, sodyum asetat ve dulsitolde gelişebilme, gliserolün ketogenesisi ve GYC besiortamında kahverengi pigment üretme gibi özelliklerini belirleyen, biyokimyasal ve fizyolojik testler hakkında bilgi verilmiştir (Drysdale ve Fleet, 1988). Leifson (1954), hareketli olan asetik asit bakterilerinde, iki farklı flagella tipini incelemiştir. Birincisi *Acetobacter*'lerde peritrik flagella tipidir ve bunlar asetik ve laktik asidi CO₂ ve H₂O'ya okside ederler. Diğerisi ise *Gluconobacter*'lerde polar flagella tipidir ve bunlar da asetik ve laktik asidi CO₂'e okside edemezler. Frateur (1950), maya özütü, etanol, kalsiyum karbonat ve agar içeren katı ortamda, asetik asitin, kalsiyum karbonatı çözerek şeffaf bir zon oluştuğunu bildirmiştir. Çalışmamızda kullandığımız iki izolatın da, GYC besiortamında, kolonilerinin çevresinde şeffaf bir zon oluşturduğunu saptadık. Carr (1968), *Acetobacter* ve *Gluconobacter* strainlerini birbirinden ayırmak için, içinde yeast ekstrakt, etanol, bromcresol green ve agarın bulunduğu besiortamını kullanmıştır. Bu besiortamında, *Gluconobacter* tarafından üretilen asetik asit, indikatör boyanın rengini yeşilden sarıya dönüştürmekte, fakat *Acetobacter*'lerde ise asetik asit, indikatör boyanın rengini, yeşilden maviye dönüştürmektedir (Carr, 1968). Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, seçilen iki izolatın bromcresol green'li besiortamındaki gelişimi incelenerek gelişim sonunda, besiortamının renginin, yeşilden maviye dönmesi nedeniyle izolatlarımızın *Acetobacter* genusuna ait olduğunu saptanmıştır.

Asetik asit bakterileri fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerinde çalışılarak, klasik taksonomi ile tanımlanmıştır (De Ley et al., 1984). Fakat bu metotlar tamamen güvenilir değildir ve zamanla çürütülebilir (González et al., 2004). Bu

amaçla, klasik taksonomiye tamamlayan, DNA ve rRNA hibridizasyon metotları (Urakami et al., 1989), sekans analizi (Yamada et al., 1994) ya da PCR teknikleri gibi moleküler metotlar geliştirilmiştir (Ruiz et al., 2000; Bartowsky et al., 2003). Son zamanlarda, asetik asit bakterilerinin farklı genus ve türlerini tespit etmek için, PCR'la çoğaltılmış, 16S rDNA'nın RFLP analizi kullanılmıştır (Ruiz et al., 2000). Bu metot, şarap fermentasyonundan izole edilen asetik asit bakterilerinin tanımlanması için, kolay ve hızlı bir metottur (González et al., 2004). ERIC-PCR, REP-PCR gibi diğer PCR teknikleri de, çeşitli strainler için önerilmiştir (González et al., 2004). Son günlerde, bakteri strainleri arasındaki akrabalık ilişkilerini saptamak için, bakteriyal strainlerin tanısında bu teknikler kullanılmaktadır (Versalovic et al., 1991; Pooler et al., 1996; Matheson et al., 1997; Beyer et al., 1998; Sander et al., 1998; Nanda et al., 2001).

Çalışmamızda, şarap ve sirkeden izole edilen, 31c ve 8a kodlu iki izolatın tanısı önce klasik taksonomiye yapılmıştır. Klasik taksonomi ile elde ettiğimiz veriler ışığında, bu iki izolatın, *Acetobacter* genusuna ait olduğu belirlenmiştir. Fakat günümüzde, klasik taksonomi, her ne kadar oldukça önemli olsa dahi, bu tanı yönteminin moleküler yönden de desteklenmesi gerekmektedir. Bu düşünce ile izolatlarımızın DNA sekans analizleri, Pennsylvania State University Hershey Medical Center, Department of Pathology Laboratuvarlarında yapılmış ve sekanslar, gen bankasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Nucleotide Blastn programı ile karşılaştırılarak, izolatların diğer bakteriler ile akrabalık ilişkileri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda 31c izolatının, *Acetobacter pastorianus* HBB6 ve 8a izolatının da *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olduğu belirlenmiştir.

Birçok araştırmacı izole edilen asetik asit bakterilerinin taramalı elektron mikroskopunda (SEM), görüntülenmesini sağlamıştır (Molinari et al., 1998; Moonmangmee et al., 2002; Chávez-Pacheco et al., 2005). Moonmangmee et al. (2002), *Acetobacter aceti* S ve R strainlerini sıvı besi ortamında geliştirdikten sonra santrifüjleyerek, hücrelerin bir araya toplanmasını sağlamışlardır. Hücreleri 50 mM (pH 6,5) potasyum fosfat tamponunda yıkamışlar ve sonra % 2'lik

gluteraldehit ile fikse etmişlerdir. Hücreleri, % 50-% 100'lük etanol serilerinden geçirip, kritik nokta tekniği kullanarak, nemin tamamen uzaklaştırılmasını sağlamışlardır. Daha sonra hücre örneklerini, JEOL JSM 6100 taramalı elektron mikroskobunda incelemişlerdir. Chávez-Pacheco et al. (2005), hücre örneklerini önce % 2,5 gluteraldehit tamponunda ve sonra % 1 osmiyum tetroksit içinde fikse etmişlerdir. Fikse edilen örnekleri, $0,1 \text{ mol}^{-1}$ pH 7,0'de olan potasyum fosfat tamponu ile yıkamışlardır ve % 30-% 100 alkol ile dehidre etmişlerdir. Örnekleri, kritik noktada kurutup, JEOL JSM-5410LV taramalı elektron mikroskobunda incelemişlerdir (Molinari et al., 1998). Çalışmamızda kullandığımız *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainleri, Moonmangmee et al. (2002)'in önerdiği yöntemle göre hazırlanmış, liyofilize edilmiş ve nemin tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kurutulan hücre örneği, TÜBİTAK MAM'da JEOL/JSM-6335F markalı taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

Asetik asit bakterilerinin özellikle de *Acetobacter* türlerinin bakteriyel selüloz üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Valla ve Kjosbakken, 1982; Sutherland, 1996). Asetik asit bakterilerinin selüloz üretimlerini belirlemek için kullanılan en uygun besiortamı, Hestrin ve Schramm (1954) tarafından geliştirilen, sıvı HS kültür ortamıdır. Yaptığımız çalışmada, izole edilen asetik asit bakterilerinin selüloz üretimlerini belirlemek amacıyla Johnson et al. (1989)'nın modifiye ettikleri Y3-3 besiortamı ile Hestrin ve Schramm (1954) tarafından geliştirilen HS besiortamı kullanılmıştır. Denemeler sonucunda HS besiortamında selüloz üretiminin daha iyi olduğu görülmüş ve çalışmaya bu besiortamı kullanılarak devam edilmiştir. İnceleme sonunda, kuru madde ağırlığına göre, selüloz üretimi en yüksek olan iki izolat seçilmiş ve bunlar, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olarak tanımlanmıştır. Çalışmaya bu iki izolat ile devam edilmiştir.

Mynatt (1982)'de izole edilen bazı bakteri ve funguslardan selüloz üretimini araştırmıştır. Brown (1983)'de şekerli meyvelerden izole ettiği *Acetobacter xylinum* bakterisinin sıvı HS besiortamında, selüloz pelliklerinin oluşumunu

incelemiştir. Ring et al.(1987), *Acetobacter xylinum*'un sıvı HS besiortamında selüloz üretimini incelemiş ve ayrıca fruktoz, mannitol, sorbitol, gliserol, galaktoz, laktoz, sukroz, maltoz içerikli besiortamlarında selüloz üretimlerini araştırmıştır. Iguchi et al (1988), *Acetobacter aceti subsp: xylinum* (ATCC 10821) bakterisini kullanarak, sıvı HS besiortamında selüloz üretimini incelemiş ve oluşan selülozun fiziksel özelliklerini araştırmıştır. Johnson et al. (1989), *Acetobacter xylinum* strainini sıvı HS besiortamında kültüre edip, durgun ve çalkalamalı koşullardaki selüloz üretimini incelemişlerdir. Byrom (1990), *Acetobacter xylinum* ATCC 23769'dan sıvı HS besiortamında selüloz pelliğlerinin oluşumunu incelemiştir. Stephens et al. (1990), *Acetobacter* genusuna ait strainin sıvı HS besiortamında oluşturduğu selüloz pelliğinin, kollesterol üzerindeki etkisini incelemiştir. Saxena et al. (1990), *Acetobacter xylinum* ATCC 23769 ve *Acetobacter xylinum* ATCC 53582 strainlerinin sıvı HS besiortamında selüloz pelliğinin üretimini incelemiş ve fiziksel ve kimyasal özelliklerini araştırmıştır. Brown et al. (1990), *Acetobacter xylinum* ATCC 53582 straininin sıvı HS besiortamında oluşturduğu selüloz pelliğini, elektron mikroskopunda görüntülemiş ve selüloz ipliklerini incelemiştir. Ayrıca Brown (1990), *Acetobacter xylinum* straininin hem sıvı HS besiortamında hem de içinde bir polisakkarit türevi olan CMC (karboksimetil selüloz) modifiye besiortamında selüloz üretimini incelemiştir. Westland et al. (1993), *Acetobacter* genusuna ait straininin, sıvı HS besiortamında selüloz oluşumu incelemiş ve bakteriyal selülozu bağlayan ajanlar üzerinde araştırma yapmıştır. Kouda et al. (2000), *Acetobacter* genusuna ait strainin sıvı HS besiortamında ve CSL-Fruktoz olarak modifiye edilmiş besiortamında selüloz üretimini incelemiştir. Watanabe et al. (2000), *Acetobacter xylinum* BPR (2001)'un sıvı HS besiortamında ve CSL-Fruktoz olarak modifiye edilmiş besiortamında, durgun ve çalkalamalı koşullarda selüloz oluşumunu incelemiştir. Bungay et al. (2000), *Acetobacter xylinum* straininden sıvı HS besiortamında oluşan bakteriyal selülozun, makroskobik ve mikroskobik özelliklerini incelemiştir.

Sıvı HS besiortamında oluşan selüloz pelliğini saflaştırmak ve miktarını belirlemek için araştırmacılar çeşitli yöntemler kullanmıştır. Bungay et al. (2000),

oluşan selüloz pelliğini, % 2'lik NaOH ile 30 dakika muamele etmiş ve deiyonize su ile yıkamıştır. Bakteri hücrelerinden ve besiortamından uzaklaştırılan pellik, 55⁰C'de bir gece bekletilerek, kurutulmuş ve ağırlığı, kuru madde miktarı olarak belirlenmiştir. Watanabe et al. (2000), oluşan selüloz pelliğini, % 1'lik NaOH ile 80 ⁰C'de bir gece muamele etmiş ve deiyonize su ile yıkamıştır. Pelliği, sülfürik asit ile nötrleştirdikten sonra tekrar su ile yıkamıştır. Bakteri hücrelerinden ve besiortamından uzaklatırılan pellik, 55 ⁰C'de bir gece bekletilerek, kurutulmuş ve ağırlığı, kuru madde miktarı olarak belirlenmiştir. Stephens et al. (1990), selüloz pelliğini 0,5 M NaOH ile 60 ⁰C'de 2 saat muamele etmiş ve deiyonize su ile yıkamıştır. Pelliği, 105 ⁰C'de kurutmuş ve ağırlığını, kuru madde miktarı olarak belirlemiştir. Park et al. (2003), selüloz pelliklerini toplamak için kültür sıvı ortamını 3580 g'de 20 dakika santrifüjlemiş ve iki kez distile su ile yıkamıştır. Pelliği, 0,3 M NaOH ile 100 ⁰C'de 5 dakika muamele etmiş ve distile su ile tekrar yıkamıştır. -50 ⁰C'de dondurup, kurutarak liyofilize etmiş ve ağırlığını belirlemiştir. Bae et al. (2004), selüloz pelliğini 0,1 N NaOH ile 80 ⁰C'de 20 dakika muamele etmiş ve deiyonize su ile yıkamıştır. Saflaştırılan selüloz pelliği 80 ⁰C'de 8 saat kurutulmuş ve ağırlığını, kuru madde miktarı olarak belirlemiştir. Ishihara et al. (2002), oluşan pelliği, 5300 rpm'de 15 dakika santrifüj etmiş ve distile su ile yıkamıştır. Daha sonra, önce % 4'lük NaOH ile 80 ⁰C'de 1 saat muamele etmiş ve sonra % 6'lık asetik asit ile nötrleştirmiştir. Pelliği, 105 ⁰C'de kurutup, ağırlığını, kuru madde miktarı olarak belirlemiştir. Çalışmamızda, elde edilen selüloz pelliği, 5300 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra, pellik önce % 4'lük NaOH ile 80 ⁰C'de 1 saat muamele edilmiş, sonra % 6'lık asetik asit ile nötrleştirilmiştir. Saflaştırılan pellik, 105 ⁰C'de kurutulup, ağırlığı, kuru madde miktarı olarak belirlenmiştir.

Bakteriyal selülozun ağsı yapısı, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenebilir (Johnson ve Neogi, 1989). Birçok araştırmacı, SEM'de selülozun üç boyutlu ağsı yapısını görüntülemişlerdir (Ben-Bassat et al.,1992; Brown et al., 1990; Bungay et al., 2000). Çalışmamızda, durgun kültürde elde edilen selüloz, liyofilize edilerek kurutulmuş ve TÜBİTAK MAM'da JEOL/JSM-6335F markalı taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

Toplam şeker tayininde kullanılan en uygun yöntem, Dubois et al. (1956)'un önerdiği, spektrofotometrik fenol-sülfürik asit yöntemidir. Tominaga et al. (1999), selulo-oligosakkaritlerin şeker içeriklerini, fenol-sülfürik asit yöntemiyle belirlemiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz selüloz polimerinin, şeker içeriğinin belirlenmesinde, oldukça kolay ve güvenilirliği yüksek olan fenol-sülfürik asit metodu kullanılmıştır.

Kurutulmuş saf selülozun alkalın, asidik ve enzimatik hidrolizi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Wong et al. (1990), saf selülozu, % 5 sülfürik asit ve % 5 hidroklorik asit ile hidrolize etmişlerdir. Fakat kurutulmuş saf selülozun, asit ile hidrolizi için, daha çok trifloroasetik asit (TFA) kullanılmaktadır. Moonmangmee et al. (2002), saflaştırılan selülozu, 2 N trifloroasetik asit ile 100 °C'de 16 saat muamele ederek, hidrolize etmiştir. Deeraksa et al. (2005) da saflaştırılan selülozu, 2M trifloroasetik asit ile 120 °C'de 2 saat muamele ederek hidrolize etmiş ve 40 °C'de evapore ederek, TFA'nın uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Nakai et al. (2002), saflaştırılan selülozu, 0,2 N trifloroasetik asit ile 100 °C'de 6 saat muamele ederek, hidrolize etmiştir. Kornmann et al. (2003), saflaştırılan selülozu 2 M trifloroasetik asit ile 100 °C'de 8 saat muamele ederek, hidrolize etmiştir. Matthyse et al. (1995), saflaştırılan selülozu, 0,01 M TFA ile 95 °C'de 20 dakika muamele ederek, hidrolize etmiştir. Çalışmamızda, liyofilize edilerek kurutulan saf selüloz, 1 ml 2M TFA çözeltisi içinde, 120 °C'de 2 saat muamele edilerek hidrolize edilmiş ve 40 °C'de evapore ederek, TFA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır.

White et al. (1981), Zhang et al. (2006), *Trichoderma reesei* fungusundan saflaştırılmış olan sellobiohidrolaz I ve endoglukonaz IV enzimlerini kullanarak, selülozu hidrolize etmişlerdir. Hurst et al. (1977), *Aspergillus niger* fungusundan selülaz enzimi saflaştırıp, bunu selüloz hidrolizinde kullanmışlardır. Boisset et al. (2000), *Aspergillus oryzae* fungusundan elde ettikleri selülaz enzimi ile selülozu hidrolize etmişlerdir. Amano et al. (2002), *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus niger* funguslarından elde ettikleri selülaz enzimini, selüloz hidrolizinde

kullanmışlardır. Selülag aktivitesi ise 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (Miller, 1959).

Funguslardan selülag enzimi elde etmek için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Gopinath et al. (2005), bazı fungus türlerinin, selülotik enzim aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesinde Czapek dox agar besiortamını kullanmışlar ve önce % 1'lik kongo kırmızısı sonra 1 M NaCl damlatarak, plaklarda zon oluşumunu incelemişlerdir. Onsori et al. (2005), bazı *Aspergillus* türlerinin, selülotik enzim aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesinde karboksimetilselülag agar (CMC-Agar) besiortamını kullanmışlar ve plaklarda zon oluşumunu incelemişlerdir. Strauss et al. (2001), *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida* gibi bazı mayaların selülotik enzim aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesinde yeast ekstrakt, pepton, gliserol, etanol ve karboksimetil selülag içeren YPD Agar kullanmışlar ve plaklarda zon oluşumunu incelemişlerdir.

Kalitatif olarak selülag aktiviteleri belirlenen funguslar, selülag enzimini sentezleyebilmeleri için uygun bir fermentasyon ortamında geliştirilmiştir. Muthuvelayudham et al. (2006), *Trichoderma reesei* QM9414 fungusunu, Mandels ve Weber (1969) fermentasyon ortamında geliştirmişler ve sentezlenen enzimin aktivitesini incelemişlerdir. Onsori et al. (2005) ve Chand et al. (2005) de, bazı *Aspergillus* türlerinin Mandels ve Weber (1969) fermentasyon ortamında sentezledikleri, selülag enzimin aktivitesini incelemişlerdir. Ojumu et al (2003), *Aspergillus flavus* fungusunun selülag enzimini üretmesi için de, Mandels ve Weber (1969) fermentasyon ortamını kullanmıştır.

Çalışmamızda, ADÜ FEF Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuvarında kayıtlı olan funguslar arasından selülag enzimi üretenleri seçmek amacıyla önce kalitatif olarak tarama yapılmıştır. Kalitatif tarama sonucunda, selülag aktivitesi yüksek olan *Aspergillus niger* HBB 40 ve *Trichoderma sp.* HBB 110 funguslarından, Mandels ve Weber (1969) fermentasyon ortamında, selülag enzimi üretilmiştir. Selülag aktivitesi ise 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir.

Funguslardan elde edilen selüloz enzimi ile ön işlem görmüş bakteriyal selüloz örneği, 55 °C’de 1 saat inkübasyon sonunda hidrolize edilmiştir.

Asidik veya enzimatik olarak hidrolize edilen selüloz örneklerinin şeker içeriği, ince tabaka kromatografisi yapılarak belirlenmiştir. Aquino et al. (2003), TLC için mobil faz olarak, n-butanol, etanol, su (5:3:2 v/v) kullanmışlar ve enzimatik hidroliz sonucu son ürünün glukoz olduğunu belirlemişlerdir. Oikawa et al. (1997), TLC için mobil faz olarak, n-butanol, piridin, su (6:4:1 v/v) kullanmışlar ve enzimatik hidroliz sonucu oluşan son ürünün glukoz olduğunu göstermişlerdir. Cohen (2005), TLC için mobil faz olarak etil asetat, su, metanol (40:15:20 v/v) kullanmış ve enzimatik hidroliz sonucu sellopentozdan, son ürün olan glukoz doğru bir parçalanmanın olduğunu göstermişlerdir. Ito et al. (2005), TLC için mobil faz olarak kloroform, metanol, su (90:65:15 v/v) kullanmış ve enzimatik hidroliz sonucu son ürünün glukoz olduğu belirlemişlerdir. Moonmangmee et al. (2002), TLC için mobil faz olarak n-propil alkol, distile su (85:15 v/v) kullanmış ve asidik hidroliz sonucu son ürünün glukoz olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, hem asit hem de enzim hidrolizi ile elde edilen örnek, TLC’ye uygulanmıştır. TLC için mobil faz olarak, n-butanol, etanol, su (5:3:2 v/v) kullanılmış ve hidroliz sonucu oluşan son ürünün glukoz olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyal selülozun CP/MAS ¹³C katı NMR ve FT-IR spektrofotometrik analizleri yapılarak, elde edilen ekstraselular polisakkaritin doğruluğu tespit edilmiştir. Hesse ve Jäger (2005), selülozun katı NMR araştırması sonunda; 105 ppm’de C1, 90 ppm’de C4, 76-70 ppm’de C3, C2, C5 ve 65 ppm’de de C6’nın olduğunu göstermişlerdir. Watanabe et al. (1998), durgun kültürden elde ettikleri selülozun katı NMR araştırması sonunda da; 106 ppm’de C1, 91-89 ppm’de C4, 78-70 ppm’de C3, C2, C5 ve 63 ppm’de de C6’nın olduğunu belirtmişlerdir. Keshk ve Sameshima (2006b), yaptıkları çalışmada elde ettikleri selülozun katı NMR araştırması sonunda; 105 ppm’de C1, 90 ppm’de C4, 78-70 ppm’de C3, C2, C5 ve 65 ppm’de de C6’nın olduğunu belirtmişlerdir. Kono et al. (2002), selüloz triasetat polimorflarının (CTA I ve CTA II) katı NMR araştırması sonunda; CTA I için, 102 ppm’de C1’in, 63 ppm’de C6’nın olduğunu ayrıca CTA II için de, 100

ppm'de C1'in, 65-67 ppm'de ise C6'nın olduğunu belirtmişlerdir. Bizim bulgularımız da kaynakları desteklemektedir.

FT-IR spektrofotometresi, selülozun karakteristik piklerini 1000-1200 cm^{-1} etrafında gösterir (Cao et al., 2002). Cao et al. (2002)'nin yaptığı çalışmada, selülozdaki C-O-C gruplarının 1160 cm^{-1} yakınlarındaki bantta, H-O-H gruplarının ise 1635 cm^{-1} bölgesindeki bantta, OH gruplarının da 3400 cm^{-1} bölgesindeki bantlarda olduğunu göstermişlerdir. Keshk ve Sameshima (2006b), *A. xylinum* ATCC 10245 straininde HS ve melaslı besi ortamında ürettikleri selülozun FT-IR analizini yapmışlar ve analiz sonucunda OH gruplarının 3500-3000 cm^{-1} bölgesindeki bantlarda olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettiğimiz bakteriyel selülozun FT-IR analiz sonucu, kaynaklarda belirtilen bulgular ile benzerdir.

Bakteriyel selülozun, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırılmasında ve nata de coco, ses diyaframları, yara kapatıcı ve onarıcı gibi materyallerin ticari olarak üretiminde, fermentasyon yöntemi olarak, genellikle durgun kültür seçilir. Durgun kültürde yüzey/hacim oranı önemlidir ve üretilen selüloz, fermentasyon sıvısının üst yüzeyinde, kalın, jelatin membran şeklinde oluşur. Çalkalamalı kültürlerde ise selüloz, düzensiz yığınlar halinde, pellet ya da küre şeklinde oluşur ve bu fermentasyon tipi, üretim miktarını artırmak amacıyla kullanılır. Fakat, çalkalamalı kültürde strainlerin stabilitesi, spontan mutasyonlar ya da selüloz üretmeyen hücrelerin baskın hale gelmesi ile bozulur. Bu nedenle bu fermentasyon tipinde, selüloz üretim miktarında bir kayıp söz konusu olabilir ve bu kayıp, hücrelerin, fizyolojik faktörlerinden ziyade, mutasyonla genetik açıdan selüloz üretmeyen hücrelere dönüşmesine bağlıdır (Johnson et al., 1989). Çalkalamalı kültür ile selüloz üretiminde böyle bir dezavantajın olmasından dolayı, çalışmamızda asetik asit bakterilerinden, selüloz üretimi ve optimizasyon denemeleri durgun kültürde gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, temel besiortamındaki içeriklerin miktarları (% 2 glukoz; % 0,5 yeast ekstrakt; % 0,5 polipepton; % 0,675 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; % 0,115 sitrik asit) sabit tutularak, sadece karbon ve azot kaynakları değiştirilmiş ve fermentasyon ortamı modifiye edilmiştir. Karbon kaynağı olarak % 2 glukoz yerine % 2 fruktoz, % 2 sukroz ve % 2 etanol; azot kaynağı olarak da; % 0,5 yeast ekstrakt yerine, % 0,5 kazein hidrolizatı ve % 0,5 amonyum sülfat kullanılmıştır.

Selüloz sentezleyen *Acetobacter xylinum* strainin en karakteristik özelliği, glukozdan, selüloz sentezinde öncül madde olarak üretilen üridin difosfoglukoz pirofosforolaz (UDP) aktivitesinin yüksek olmasıdır (Ross et al.,1986). Bu glukoz selüloz sentezinde kullanılır ama bundan enerji üretilemez. Hücre gelişiminin ilk safhalarında, laktat, şeker metabolik yolunu değiştirerek, selüloz üretiminden hücre gelişimini stimüle eden TCA döngüsüne katılır (Matsuoka et al., 1996). Bu nedenle laktatın, TCA döngüsünde hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu belirtmiştir (Dudman,1959). Laktattan başka, TCA döngüsüne katılarak, hücre gelişimini ve selüloz üretimini stimüle eden pirüvat, aldehit, etanol ve asetat gibi başka substratlar da vardır.

Yaptığımız bu çalışmada her iki izolatta da en yüksek selüloz ve yüzde verim miktarının glukoz varlığında, daha sonra sırasıyla fruktoz, sukroz ve etanol varlığında olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımız: *Acetobacter pasteurianus* HBB6 straini için glukoz + yeast ekstrak' da % 18, sukroz + yeast ekstrak % 14,3 fruktoz + yeast ekstrak % 16,5, etanol + yeast ekstrak' da % 9,3 bulunmuştur; *Acetobacter lovaniensis* HBB5 straini için glukoz + yeast ekstrak' da % 12,9, sukroz + yeast ekstrak % 10 fruktoz + yeast ekstrak % 12,1, etanol + yeast ekstrak' da % 8,1 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu veriler aynı parametreler için yapılan deneysel çalışmalarla paralellik sağlamıştır. Bu araştırmalarda, örneğin Masaoka et al. (1993), yaptığı çalışmada selüloz üretiminin glukoz varlığında % 100, fruktoz varlığında % 92, sukroz varlığında % 33 ve etanol varlığında da % 4 olduğunu göstermiştir. Son et al. (2001), *Acetobacter sp.* V6 izolatının % 2 oranında farklı karbohidratları içeren standart besiortamında ürettiği selüloz miktarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda glukoz varlığında 2,7 g/l, fruktoz

varlığında 2,53 g/l ve sukroz varlığında 0,83 g/l selüloz üretiminin olduğunu tespit etmişlerdir. Yang et al. (1998), *Acetobacter xylinum* BRC5 straininin, fruktozlu besiortamında 2,88 g/l ve sukrozlu besiortamında da 0,55 g/l selüloz ürettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları başka bir çalışmada da selüloz üretiminin glukoz varlığında 4,06 g/l ve fruktoz varlığında da 3,49 olduğunu tespit etmişlerdir. Toda et al (1997), *Acetobacter xylinum* straininin çeşitli karbon kaynaklarındaki, selüloz üretimini incelemişler ve en yüksek üretimin glukozda sonra fruktoz ve sukrozda olduğunu gözlemişlerdir. Chávez-Pacheco et al. (2005), *Gluconacetobacter xylinum* IFO 13693 strainin glukoz içerikli besiortamında kültüre edilmesi sonucunda, hücre gelişimi ve selüloz üretiminde, sukroz içerikli besiortamındakine göre, bir artış olduğunu gözlemişlerdir.

Ayrıca sukroz içerikli temel ortama, % 1,4 etanol eklenmesi ile hücre gelişiminin 1,9 kat, selüloz üretiminin de 1,1 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Matsuoka et al. (1996), Naritomi et al. (1998a), Krystynowicz et al. (2002) ve Park et al. (2003), yaptıkları çalışmalarda etanol varlığında hücre gelişiminin ve selüloz üretiminin arttığını gözlemişlerdir. Fakat etanol miktarının %1,5'dan fazla olması, sıvı kültürde asetat miktarının artışına, pH'ın da düşmesine neden olduğu için, hücre gelişimi ve selüloz üretiminde bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir (Naritomi et al. 1998a; Park et al. (2003).

Son et al. (2001), çalkalamalı kültürde, *Acetobacter sp.* V6 izolatu ile yaptıkları çalışmada, karbon kaynağı olarak; fruktoz, glukoz, maltoz, sukroz, trehaloz, mannitol, arabitol, asetik asit, laktik asit ve suksinik asit kullanmışlar ve bunları içeren standart besiortamında üretilen selüloz miktarını incelemişlerdir. Çalışma sonunda, glukozdan sonra en yüksek selüloz üretiminin fruktoz, trehaloz ve laktik asit varlığında olduğunu saptamışlardır. Fakat Oikawa et al. (1995), durgun kültürde, *Acetobacter xylinum* straininde, en yüksek selüloz üretiminin mannitol ve arabitol varlığında olduğunu saptamışlardır. Ancak, Tonouchi et al. (1996), çalkalamalı kültürde, *A. xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001 straininde en yüksek selüloz üretiminin, fruktoz varlığında olduğunu belirtmişlerdir.

Farklı karbon kaynaklarının selüloz verimi ile kendi izolatlarımızın kullanımı ile yapılan denemeler, en iyi karbon kaynağının glukoz olduğunu göstermiş ve literatür bulguları bunu desteklemiştir.

Bakteriyal selüloz üretiminde kullanılan karbon kaynaklarının konsantrasyonu da önemlidir. Yapılan araştırmalarda, Son (2001), % 4 glukoz içeren besiortamında selüloz üretiminin arttığını fakat glukoz konsantrasyonu, % 4'ün üzerine çıktığında ise selüloz üretiminin düştüğünü gözlemişlerdir. Masaoka (1993), glukoz miktarının artmasıyla, selüloz üretiminin azaldığını bildirmişlerdir. Son et al. (2003), *Acetobacter sp.* V6 straininde, % 0,5 ile % 5 oranındaki glukoz konsantrasyonunun, selüloz üretimi üzerine etkisini araştırmışlar ve en yüksek selüloz üretiminin % 2 glukoz konsantrasyonunda olduğunu saptamışlardır.

% 2'nin üzerindeki glukoz konsantrasyonu, selüloz üretimini azalttığı için, kesikli kültürde selüloz üretimi, düşük glukoz konsantrasyonu ile başlar. Çünkü *Acetobacter xylinum* hücreleri glukozu, glukonik aside okside ederek kültür ortamının pH'ını düşürür ve bu da hücre gelişimini ve selüloz üretimini inhibe eder (Schramm et al.; 1957). Bu nedenle çalışmamızda % 2 konsantrasyonda, farklı karbon kaynakları denenmiştir.

Yapılan araştırmalar sonunda, bazı bileşiklerin hücre gelişimini stimüle ederek, selüloz üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Son et al. (2001), *Acetobacter sp.* A9 straininde, selüloz üretimi için etanol, asetik asit, fumarik asit, laktik asit, malik asit, pirüvik asit ve süksinik asit kullanmışlardır. Bu bileşikler içinde selüloz üretiminde en etkili olanın etanol, daha sonra da pirüvik asit olduğunu belirlemişlerdir. Bakteriyal selüloz sentezinde besiortamındaki etanol konsantrasyonu, oldukça önemlidir. Heo et al. (2002), *Acetobacter sp.* A9 straininin, % 1,4 etanol varlığında ürettiği selüloz miktarının, etanol yokluğunda ürettiği selüloz miktarından 19 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. *Acetobacter sp.* V6 straini, % 0,6 etanol içeren besiortamında, etanol bulunmayan besiortamından 3,1 kat daha fazla selüloz ürettiğini bulmuşlardır (Son et al. 2003).

Besiortamı içinde etanol konsantrasyonunun % 1,5 'dan fazla olması, ortamda fazla miktarda asetat birikmesine neden olur ve ortamın pH'ını düşürür. Bu da hücre gelişimini dolayısıyla selüloz üretimini inhibe eder (Naritomi et al.,1998a; Park et al., 2003; Krisch et al.,1997; Ory et al.,1998). Dudman (1959), durgun kültürde, yüksek konsantrasyondaki etanolün, *Acetobacter acetigenum* gelişimini stimüle ettiğini fakat selüloz üretimini artırmadığı belirtmiştir.

Çalışmamızın sonunda her iki izolata da, % 2 etanol varlığında besiortamında sentezlediği selüloz miktarının, % 2 glukoz, fruktoz ve sukroz varlığında sentezlediği miktardan daha düşük olduğu gözlenmiştir. % 2 etanolun bulunduğu besiortamında selüloz üretiminin diğer karbon kaynaklarına göre düşük olması besiortamındaki asetik asidin fazla miktarda birikmesi sonucunda pH'ın düşmesi ve bununla hücre gelişimini ve selüloz üretimini inhibe etmesi ile açıklanabilir.

Çalışmamızda azot kaynağı olarak yeast ekstrakt, kazein hidrolizat ve amonyum sülfatın kullanıldığı besiortamlarındaki selüloz ve yüzde verimleri incelenmiştir. Her iki izolatta da en yüksek selüloz üretimi ve yüzde verim miktarı, yeast ekstrakt varlığında, daha sonra sırasıyla kazein hidrolizat ve amonyum sülfat varlığında saptanmıştır. Son et al. (2001), *Acetobacter sp.* A9 straininin, en yüksek selüloz üretiminin, % 0,5 oranında kullanılan CSL, polipepton ve yeast ekstrakt varlığında olduğunu saptamışlar ve selüloz üretiminde, en iyi azot kaynağının yeast ekstrakt olduğunu bildirmişlerdir (Son et al., 2001). Yeast ekstraktan başka, selüloz üretimini stimüle eden beef ekstrakt, malt ekstrakt, pepton ve tripton gibi azot kaynakları da olmasına rağmen, bunların selüloz üretimi daha düşüktür (Son et al., 2001). Matsuoka et al. (1996), *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* straininin, azot kaynağı olarak kullanılan yeast ekstrakt, CSL, soyton ve pepton içerikli besiortamında ürettiği selüloz miktarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda en yüksek selüloz miktarının, 4,13 g/l olarak yeast ekstrakt içerikli besiortamında olduğunu bulmuşlardır. Selüloz üretiminde azot kaynağı olarak kullanılan yeast ekstraktın konsantrasyonu, selüloz üretimini fazlaca etkilememektedir. *Acetobacter sp.* A9 straininden, en yüksek selüloz üretimi, % 0,1 yeast ekstrakt varlığında gerçekleşmiştir bu oranın üzerindeki

konsantrasyonlarda selüloz üretimi miktarı hemen hemen aynı kalmıştır (Son et al. ,2001).

Yang et al. (1998), yapmış olduğu çalışmada *Acetobacter xylinum* BRC5 straininden % 2 oranında farklı karbon kaynaklarının olduğu besi ortamına % 0,5- % 6 oranında değişen yeast ekstrakt ilave etmişler ve en yüksek selüloz üretimini, % 0,4 yeast ekstrakt varlığında belirlemişlerdir. Bu konsantrasyonun üzerinde ise selüloz üretimi etkilenmemiştir.

Son et al. (2001), yaptıkları çalışma sonucunda yeast ekstrakt varlığında 2,87 g/l, polipepton varlığında 2,65 g/l selüloz miktarına rastlarken, amonyum sülfat varlığında ise selüloz üretiminin olmadığını gözlemişlerdir. Fakat Heo et al. (2002), *Acetobacter sp.* A9 straininin, % 0,3 oranında azot kaynağı olarak kullanılan, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonyum sülfat), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (amonyum dihidrojen fosfat) ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (amonyum hidrojen fosfat) besiortamındaki selüloz üretim miktarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda amonyum sülfat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarının 4,69 g/l, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ varlığında 3,19 g/l ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ varlığında da 2,93 g/l olduğunu gözlemişlerdir. Buna göre selüloz üretimine en uygun azot kaynağının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olduğu görülmüştür. Chávez-Pacheco et al. (2005), *Gluconacetobacter xylinum* IFO 13693 strainin, amonyum sülfat içerikli besiortamında selüloz üretiminin, kazein hidrolizat içerikli ortamda üretilenden daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat bizim yaptığımız çalışmada, her iki izolatta da kazein hidrolizatın, amonyum sülfattan daha fazla selüloz ürettiği belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada her iki izolatta da, glukoz ve kazein hidrolizat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarının, sukroz ve kazein hidrolizat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki izolatta da, glukoz ve amonyum sülfat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarının, sukroz ve amonyum sülfat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarından daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ramana et al. (2000), *Acetobacter xylinum* strainin, glukoz ve amonyum sülfat içerikli besiortamında

ürettiği selüloz miktarının, sukroz ve amonyum sülfat içerikli besiortamında ürettiği selüloz miktarından daha fazla olduğunu saptamışlardır. Fakat aynı strainin, glukoz ve kazein hidrolizat içerikli besiortamında ürettiği selüloz miktarının, sukroz ve kazein hidrolizat içerikli besiortamında ürettiği selüloz miktarından daha az olduğunu tespit etmişlerdir (Ramana et al.; 2000). Budhiono et al. (1999), yaptıkları çalışmada, glukoz ve amonyum sülfat içerikli besiortamında üretilen selüloz miktarının, sukroz ve amonyum sülfat içerikli ortamdakine göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda, farklı karbon ve azot kaynaklarında üretilen selüloz miktarında değişimler olduğu görülmüştür.

Selüloz üretiminde fosfat konsantrasyonun da etkisini saptamak için, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 'nin %0-%1 konsantrasyonlarındaki selüloz üretimi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonunda en yüksek selüloz üretiminin % 0,8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ varlığında olduğu tespit edilmiştir. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonun % 0,8 oranından düşük ya da fazla olması, selüloz üretimini düşürmektedir (Son et al., 2001). Çalışmamızda, % 0,675 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kullanılmış ve bu da strainlerin selüloz üretimleri için gerekli fosfat iyonu miktarını karşıladığı görülmüştür.

Selüloz üretiminde, % 0,5'in üzerindeki sitrik asit konsantrasyonlarının da etkisi araştırılmıştır. Sitrik asit eklenmesinin, selüloz üretim miktarını etkilemediği bildirilmiştir (Son et al., 2001). Fakat yaptığımız çalışmada, temel ortamın içerisine % 0,115 sitrik asit eklenmiştir.

Yapılan çalışmada temel ve melaslı besiortamlarında her iki izolataın, farklı sıcaklık ve farklı pH'daki selüloz üretimleri ve yüzde verim miktarları incelenmiştir. Her iki izolatta da hem temel besiortamında hem de melaslı besiortamında 4 °C'de hiçbir hücre gelişimi olmamış ve buna bağlı olarak da selüloz üretimi gerçekleşmemiştir. En yüksek hücre gelişimi ve selüloz üretimi, 30 °C'de görülmüş, bunu 37 °C ve 22 °C izlemiştir.

Skinner et al (2000), *Acetobacter xylinum*'un 4 °C, 22 °C, 30 °C ve 37 °C'de HS besiortamında selüloz üretimini araştırmışlardır. En düşük selüloz üretiminin 4 °C'de, en yüksek selüloz üretiminin ise 30 °C'de olduğunu bildirmişlerdir. Son et al. (2001), HS'de çalkalamalı kültürde, *Acetobacter sp.* A9 straininde, 20 - 40 °C sıcaklıklardaki selüloz üretimini incelemişler ve selüloz üretimi için optimum sıcaklığın 30 °C olduğunu bildirmişlerdir. 25 °C'de önemli bir farklılık görmemişler fakat 35 °C'nin üzerinde selüloz üretiminin düştüğünü belirtmişlerdir (Son et al. 2001). *Acetobacter aceti*'nin 15-40 °C'deki gelişimi ve selüloz üretimi incelenmiştir. Optimum sıcaklığın 30 °C olduğu ve 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hücre gelişiminin ve selüloz üretiminin giderek düştüğü gözlenmiştir (Ory et al., 1998).

Yaptığımız çalışmada temel ve melaslı besiortamında pH 2,5; 3,5; 4,5; 6,5; 7,5 ve 8,5'da selüloz üretimi ve yüzde verim miktarı incelenmiştir. Çalışmanın sonunda temel besiortamında, her iki izolatta da, pH 2,5'da hiçbir hücre gelişimi olmamış ve selüloz üretimi gözlenmemiştir. Melaslı besiortamında ise her iki izolatta da, pH 2,5 ve pH 3,5'da hiçbir hücre gelişimi olmamış ve selüloz üretimi gözlenmemiştir. Fakat her iki izolatın da, hem temel besiortamında hem de melaslı besiortamında, pH 6,5'da ve daha sonra pH 4,5'da en yüksek selüloz üretimini gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Son et al. (2001), *Acetobacter sp.* A9 izolatının, pH 3,0-9,0 aralığında selüloz üretimini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda, pH 4,5- 7,5 aralığında selüloz üretiminin yüksek olduğunu fakat optimum pH'ın 6,5 olduğunu bildirmişlerdir (Son et al. 2001). Fakat genel olarak *Acetobacter xylinum*'dan, selüloz üretiminde optimum pH aralığı, 4,0-7,0 olarak kabul edilmektedir (Delmer et al., 1995). Ishihara et al. (2002), yaptıkları çalışmada, *Acetobacter xylinum*, *A. pasteurianus* ve *A. hansenii* izolatlarının, pH 3,0-7,0 aralığındaki selüloz üretimlerini incelemişler ve en yüksek selüloz üretiminin pH 6,5 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004, *Acetobacter aceti* DSM 3508, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, temel besiortamında

ürettikleri selüloz ve yüzde verim miktarları ile melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu ve corn steep liquor'lu besiortamında ürettikleri selüloz ve yüzde verim miktarları incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, maliyet olarak daha ucuz ve bazı endüstri kuruluşlarının atık maddesi olarak nitelendirdiğimiz ürünlerin (melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu vb), bakteriyal selüloz üretiminde substrat olarak kullanılıp, değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, asetik asit bakterilerinden selüloz üretiminde, içerisinde organizmanın büyümesi için gerekli birçok besin maddesini bulundurması, yüksek oranda fermente edilebilir şeker (% 5 sukroz) içermesi, ülkemizde bol miktarda bulunması ve ucuz olması nedeniyle, şeker fabrikalarının bir atığı olan pancar melası karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bae et al (2004), *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001strainini kullanarak bir jar fermentörde ve melaslı besiortamında BS üretmişlerdir. Yapılan çalışmada melas, H₂SO₄-ısı işlemine tabi tutulmuştur ve bu işleme maruz bırakılmayan melasla olan BS üretim verimi farkına bakılmıştır. Isı işlemine bırakılan melasda BS veriminin diğerine göre iki kat olduğunu bulunmuştur.

Keskhk et al.(2006a), *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 kullanarak, toplam şeker miktarının %57 olduğu pancar melaslı besiortamında, glukozun kullanıldığı besiortamına göre daha fazla BS elde etmişlerdir.

Keskhk et al (2006b), BS lignosülfonat varlığında ve yokluğunda şeker kamışı % 35 sukroz ve % 16 redüktör şekerli melasda BS üretimini durgun kültürde incelemişler, *Acetobacter xylinum* ATCC10245 ve IFO13693, IFO13772, IFO13773, IFO14815, IFO15237 strainlerini kullanmışlar ve melaslı ortamda BS üretiminin daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Yaptığımız bu çalışmada, melaslı ortamda optimum şartlarda elde edilen bakteriyal selüloz miktarı, temel ortama (glukozlu ortam) göre daha düşük çıkmıştır. Örneğin; glukozlu ortamda *Acetobacter pasteurianus* HBB6' da selüloz

üretiminin yüzde verim miktarı % 11,7 iken, melaslı ortamda % 9,8'e düşmüştür. Aynı şekilde *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604'de glukozlu ortamda yüzde verim miktarı % 15,3 iken, melaslı ortamda % 11,2'e düşmüştür. Diğer organizmalarda da buna benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Melaslı besiortamında, başka mikroorganizmaların, PHB (Polihidroksibütirat) sentezi ve yağ üretimi gibi fermentasyon denemeleri de yapılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda da, melaslı besiortamından elde edilen ürün miktarının, temel ortamlardan elde edilen ürün miktarlarından daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bıyık (1993), funguslardan, yağ üretimi üzerine yaptığı çalışmada, *Aspergillus terreus* NRLL 13030'da, yağ yüzdesini temel ortamda (sukrozlu ortam) % 37 bulurken, melaslı ortamda % 10,9 olarak bulmuştur. Aynı konuda çalışma yapmış olan Hassanien et al. (1986), *Aspergillus niger*'in yağ yüzdesini temel ortamda (sukrozlu ortam) % 37-57 olarak bulurken, melaslı ortamda % 7 olarak bulmuştur. Bu sonuçlar, Ratledge (1989)'nin belirttiği gibi, melas fermente edilmeyen bileşikleri ve azotları bulundurması nedeniyle, saf sukrozdan elde edilen yağlara nazaran melaslı ortamdan daha az yağ elde edilmiştir, şeklinde değerlendirilmiştir (Bıyık, 1993). Ateş (1997), mikroorganizmalardan PHB üretimi ile ilgili yaptığı çalışmada, *Alcaligenes latus* IAM 12599'da, sukrozlu temel ortamda PHB verimini % 49,18 olarak bulurken, melaslı ortamda % 43,16 olarak bulmuştur. Ayrıca aynı çalışmada kullandığı *Pseudomonas extorquens* DSM 1337'de de, sukrozlu temel ortamda PHB verimini % 24,86 olarak bulurken, melaslı ortamda % 22,98 olarak bulmuştur. Yapılan bu çalışmadaki sonuçlar; melasın, PHB üretimini arttırdığı fakat sukrozlu temel ortamdaki kadar yüksek olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir (Ateş, 1997).

Bizim çalışmamızda da, melaslı ortamda selüloz üretimi, diğer atık madde içeren besiortamlarına göre daha fazla olmuştur fakat selüloz üretiminin, temel ortamdaki (glukozlu ortam) kadar yüksek olmadığı gözlenmiştir. *Acetobacter* strainlerinin, glukoz içerikli besiortamında, sukroz içerikli besiortamına göre, daha fazla selüloz ürettiği bildirilmiştir (Masaoka et al.,1993; Jonas ve Farah, 1998). Elde ettiğimiz bu sonuçlar; melasın şeker olarak sukroz içermesi ve

sukrozun da, glukozdan daha düşük miktarda selüloz üretmesi, şeklinde değerlendirilmiştir. Fakat laboratuvar çalışmalarında glukozlu temel ortamda selüloz üretimi daha avantajlı görülmekteyse de, endüstriyel çapta selüloz üretimi düşünüldüğünde melas, glukozu göre çok ucuz olduğu için, melaslı ortamda selüloz üretmek daha ekonomik olacaktır.

Çalışmamızda atık madde olarak kullanılan melas, peynir altı suyu ve zeytin karasuyundan başka selülozun ekonomik üretimi için, ucuz azot kaynağı olarak yeast ekstrakt yerine corn steep liquor de kullanılmıştır.

Bakteriyal selüloz üretiminde azot kaynağı olarak kullanılan yeast ekstrakt ekonomik değildir. Bu nedenle selülozun ekonomik üretimi için yeast ekstrakt yerine kullanılabilecek, ucuz organik kaynaklar araştırılmış ve yeast ekstrakt yerine, CSL kullanımının uygun olduğu önerilmiştir (Son et al., 2001). Birçok araştırmacı da selüloz üretiminde CSL'nin azot kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (Chao et al., 1997; Kouda et al., 1997; Toyasaki et al., 1995; Yang et al., 1998). Selüloz üretiminde fermentasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılan CSL'nin konsantrasyonu da önemli olup, %1 - %10 (v/v) arasındaki konsantrasyonlar tercih edilir ve çalkalamalı kültürlerde % 3'lük CSL uygundur (Johnson ve Neogi, 1989). Johnson ve Neogi (1989), % 4 glukoz, % 1 CSL içeren fermentasyon ortamında 1306-11 ve 1306-21 *Acetobacter* strainlerinin selüloz üretimini incelemişlerdir. Bazı araştırmacılar, ayrıca % 4 fruktoz, % 5 (w/v) CSL içeren fermentasyon ortamında da selüloz üretimini araştırmışlardır (Johnson ve Neogi, 1989; Westland et al., 1993; Kouda et al., 2000; Ben-Bassat et al., 1992).

Çalışmamızda selüloz üretiminde kullanılan temel besi ortamında % 0,5 yeast ekstrakt yerine % 0,5 CSL kullanılmıştır. Yaptığımız çalışma sonunda, CSL içerikli besi ortamında elde edilen selüloz üretimi ile yüzde verim miktarı, temel ortam ve melaslı ortama göre daha düşük olmasına rağmen, PAS'lı ortama göre daha yüksek çıkmıştır. Örneğin; *Acetobacter pasteurianus* HBB6'nın CSL

ortamındaki selüloz üretimi 0,0025 g/ml olmasına rağmen, temel ortamda 0,0041 g/ml, melaslı ortamda 0,0031 g/ml ve PAS'lı ortamda ise 0,0016 g/ml'dir.

Diğer strainlerde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Son et al., (2001), % 0,5 konsantrasyonunda farklı azot kaynaklarında glukozlu ortamdaki selüloz üretimini incelemişler ve yeast ekstraktın (2,87 g/l), CSL'den (2,59 g/l) daha fazla selüloz ürettiğini gözlemişlerdir. Matsuoka et al., (1996), selüloz üretiminde azot kaynağı olarak CSL, soyton, yeast ekstrakt ve pepton kullanmışlar ve selüloz üretiminin yeast ekstrakttan sonra en fazla CSL'de olduğunu görmüşlerdir. Yang et al. (1998), % 0,5 glukoz, % 1,5 fruktoz içerikli fermentasyon ortamında CSL konsantrasyonunun etkisini incelemişler ve CSL % 6'nın üzerindeki konsantrasyonlarda selüloz üretiminin düştüğünü gözlemişlerdir. Bae et al. (2004), corn steep liquor-fruktoz'lu fermentasyon ortamında fermentörde, selüloz üretimini incelemişlerdir. Noro et al. (2004), *Acetobacter xylinum*' un bakteriyel selüloz üretiminde CSL'nin tamponlama kapasitesini araştırmışlardır. Stanburg et al., 1984, CSL'nin, proteinler, peptitler ve aminoasitler gibi besi ortamında, tamponlama kapasitesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Ülkemiz tarım ülkesi olduğu için, tarımsal ürünler açısından oldukça zengindir. Kullanım fazlası tarım ürünlerinin ve tarımsal atıkların değerlendirilmesi düşüncesiyle, araştırmamızda tarımsal bir atık olan peynir altı suyu karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Yurdumuzda yılda yaklaşık olarak 1,784,000 ton peyniraltı suyunun üretildiği bilinmektedir. Bu büyük miktardaki peynir altı suyu büyük işletmeler tarafından değerlendirilebilirken, küçük ve orta büyüklükteki işletmeler tarafından, yüksek yatırım ve işletme maliyeti nedeniyle değerlendirilememektedir ve doğaya bırakılmaktadır. Bu da önemli bir çevre sorununa neden olmaktadır. Bir ton sütün işlenmesi ile yaklaşık olarak 150-200 kg peynir elde edilmesine karşın, 800-850 kg peynir altı suyunun atık hale dönüşmesi ve bunun içinde bulunan protein, yağ, mineral maddeler ve özellikle laktozun değerlendirilmeden atılması büyük bir kayıp olarak düşünülmektedir (Katırcıoğlu, 1995). Peynir altı suyu % 5 laktoz, % 1 azotlu bileşikler ve % 0,5 mineral madde

içerdiğinden, fermentasyon endüstrisi için uygun bir hammadde özelliğini taşımaktadır.

Battad–Bernardo et al. (2004), *A. xylinus*'un ait olduğu *Acetobacteraceae* familyasındaki bazı türlerin peynir altı suyundaki laktozu fermente edemediğini belirtilirken, bazı çalışmalarda ise laktozun BS üretiminde özellikle *Acetobacter*'lerin bazı üyeleri tarafından büyüme ve selüloz üretiminde kullanıldığı belirtilmiştir (Embuscado et al., 1994; Masaoka et al., 1993).

Çalışmamızda bakteriyal selüloz üretimi için kullanılan fermentasyon ortamında, tarımsal bir atık olan PAS karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Tüm strainlerin, PAS'lı ortamda ürettikleri selüloz miktarının, temel ortam, melaslı ve CSL'li ortamlarda ürettikleri miktardan daha düşük olduğu saptanmıştır. Örneğin; *Acetobacter lovaniensis* HBB5 PAS'lı ortamda 0,0007 g/100ml selüloz üretirken, temel besiortamında 0,0040 g/100ml, melaslı ortamda 0,0025 g/100ml ve CSL'li ortamda ise 0,0014 g/100ml selüloz üretmiştir. Diğer strainler de buna benzer sonuç göstermiştir. Şimdiye kadar dünyada ve ülkemizde, *Acetobacter* strainlerinin, PAS'lı besiortamında selüloz üretiminde kullanılması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Fakat peynir altı suyu, başka organizmalar tarafından fermentasyon çalışmalarında, özellikle de tek hücre proteini çalışmalarında oldukça fazla kullanılan iyi bir substrattır (Beyatlı, 1996; Çevik, 1987).

Acetobacter strainlerinin, laktoz içerikli besiortamına göre, glukoz ve sukroz içerikli besiortamında daha fazla selüloz ürettikleri bildirilmiştir (Masaoka et al., 1993; Jonas ve Farah, 1998). Elde ettiğimiz bu sonuçlar; PAS'ın şeker olarak %5 laktoz içermesi ve laktozun da, glukozdan ve sukrozdan daha düşük miktarda selüloz üretmesi, şeklinde değerlendirilmiştir.

Türkiye dünyada önemli zeytin üreticisi ülkeler arasında olup, İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (UNEP, 1998). Zeytinyağı, insan gıdası olarak yüksek değer taşıması, hiçbir işlem yapılmadan yenilmesi ve

aromasının güzel olması nedeniyle çok aranan bir üründür. Zeytinyağı işletmelerinde, zeytinlerin sıkılması sonucu zeytinyağı ile birlikte çeşitli atıklar ortaya çıkmaktadır. Bu atıklardan pirina ekonomik yönden önem taşımakta olup, zeytin karasuyu ise birtakım sorunları beraberinde getirmektedir (Işıklı, 1992; Martinez-Nieto et al., 1993). Koyu kahverengi, asidik, yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı gösteren karasuyun, deşarjı önemli çevre problemlerine yol açmaktadır (Ursinos, 1983; Hamdi, 1991). Karasuyun yarattığı kirliliğin, yedi milyon kişinin yarattığı evsel kirliliğe eşit olduğu bildirilmiştir (Martinez-Nieto et al., 1993; Scioli et al., 1997). Daha çok Ege ve Akdeniz kıyılarında bulunan zeytinyağı işletmelerinin ürettikleri karasu, nehir ve denizleri tehdit etmektedir. Karasuyun bileşiminin % 35-40'ı su, diğer kısmı da suda çözünen polimer ve monomer bileşikler (şeker, tanen, polifenol, polialkol), suda çözünmeyen yağlar, pektin ve selüloz liflerinden oluşur. Pektin ve selüloz parçalanabilirse, bunların mikroorganizmaların şeker ihtiyacı için iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde önemli zeytin üreticisi ülkeler, karasuyu arıtmak veya karasuyu ekonomik şekilde değerlendirmek için çeşitli araştırmalar yapmaktadırlar. Karasuyun; tarımsal alanların sulanmasında, gübre ve kompost olarak toprağı ıslah etmede (Vassilev et al., 1997), pirina ile karıştırılarak, briket ve yakacak üretiminde (Ursinos, 1983), anaerobik proseslerde biyogaz oluşturmada üretim ortamı olarak (Hamdi, 1991, 1993; Hamdi ve Garcia, 1991), mikrobiyal fermentasyon yolu ile biyokütle üretiminde (Özyurt, 1975; Öcal ve ark., 1977; Karapınar ve Worgan, 1983) pektinaz enzimi üretiminde (Şahin ve ark., 1983; Federici et al., 1988; Acuna-Arguelles et al., 1994; 1995; Huerta et al., 1995; Nair et al., 1995), kozmetik ve ilaç alanında hammadde olarak (Ramos-Cormenzana et al., 1995) kullanılabileceği belirtilmektedir.

Zeytin karasuyu ile ilgili çok sayıda literatür çalışması bulunmakla birlikte, bugüne kadar zeytin karasuyu için ne ticari bir değerlendirme ne de ekonomik bir arıtma önerisi hazırlanmıştır. Yapılan araştırmalar, önerilen prosesin ekonomik olabilmesi için, oluşan ürünün yüksek katma değere sahip olması gerektiğini

göstermektedir. Bu nedenle biyoteknolojik olarak üretimi yapılabilecek ürünler için, zeytin karasuyunun hammadde olarak kullanılması önerilmiştir. Karasuyun değerlendirilmesiyle, hem çevre kirliliği azalacak hem de geleneksel yöntemlerle yağ işleyen küçük çaptaki sanayiye, yeni bir iş alternetifi sunulmuş olacaktır (Gürbüz, 2000).

Aydın ili sınırları içerisinde, endüstriyel veya sanayi kaynaklı sıvı atıklardan ziyade, bu bölgeye özgü olan zeytinyağı üretimi sonucunda oluşan atık sular daha büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bunların arıtılmadan alıcı ortama verilmesi, ciddi çevre sorunlarına neden olmaktadır. Zeytin karasuyunun arıtılması ile ilgili olarak, ilimiz hatta ülke genelinde gerçek anlamda bir çözüm oluşturulamamıştır. Hancıoğlu (2005), de zeytinyağı tesislerinden çıkan atık suyun kirleticilik ve ekotoksikolojik özelliklerini incelemiş ve içerdiği polifenollerden dolayı, biyolojik olarak arıtılmasının da çok zor olduğunu belirtmiş fakat anaerobik arıtımla kısmen kullanılabileceğini bildirmiştir. Ergüder et al. (2000) de zeytin karasuyunun anaerobik arıtımla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, zeytin karasuyunu bakterilerden selüloz üretiminde, besin kaynağı olarak kullanarak zeytin karasuyunun endüstriyel anlamda değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilimizde ve hatta ülkemizde en önemli kirlilik kaynaklarından biri olan zeytin karasuyunun, bir atık olmaktan çıkarılarak, faydalanılabilir bir materyal olarak, ülke ekonomisine kazanç sağlayabileceği düşünülmüştür. Fakat çalışma sonunda arıtılması ve değerlendirilmesi oldukça zor olan zeytin karasuyunda, hiçbir hücre gelişimi görülmemiş ve buna bağlı olarak da selüloz üretimi olmamıştır. Bu nedenle, zeytin karasuyunun asetik asit bakterilerinin gelişimi ve selüloz üretimi için uygun bir substrat olmadığı saptanmıştır.

Çalışma sonunda elde ettiğimiz verilere göre, kullandığımız strainlerin, temel besiortamındaki selüloz üretimlerinin ve yüzde verim miktarlarının, diğer besiortamlarında ürettikleri miktardan daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu strainler, temel besiortamından sonra melaslı besiortamında yüksek oranda selüloz

üretmişler ve bunu sırasıyla CSL ve PAS'lı besiortamı izlemiştir. Kullandığımız besiortamları içerisinde en düşük selüloz üretimi ve yüzde verim miktarına, PAS'lı besiortamında rastlanmıştır.

Şimdiye kadar yapılan yurt içi çalışmalarda, asetik asit bakterilerinden, selüloz üretiminde atık maddelerin değerlendirilmesi konusu üzerinde durulmamış olması, bilimsel bir eksikliktir. Yaptığımız çalışmanın, özellikle de melas, PAS, zeytin karasuyu gibi atık maddelerin, bakteriyal selüloz üretim verimliliği hakkında bilgi vermesi açısından bilim dünyasına katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Ayrıca bu çalışma sonunda elde edilen bulguların, ileride bu konuda çalışacak olan diğer araştırmacılar için de yol gösterici olacağına inanmaktayız.

Yaptığımız çalışmada *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004, *Acetobacter aceti* DSM 3508, *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, melas, corn steep liquor ve peyniraltı suyunda selüloz ürettiklerini, fakat peynir altı suyundaki selüloz üretimlerinin, kullanılan melas ve corn steep liquor'e göre daha az olduğu saptanmıştır. Türler arasında karşılaştırma yapılacak olursa, kullanılan tüm besiortamlarında, yüzde verim miktarı olarak, en fazla selüloz üretimine *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604'da rastlandığı söylenebilir. Ayrıca, melas ve corn steep liquor'de en az selüloz üretimi *Acetobacter aceti* DSM 3508 ile yapılan denemelerde gözlenirken, peyniraltı suyu içerikli ortamda *Acetobacter aceti* DSM 3508 ve birlikte *Acetobacter lovaniensis* HBB5 ile yapılan denemelerde gözlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, bitkilerden elde edilen selüloza alternatif olarak, bazı asetik asit bakterilerinin, bakteriyal selüloz üretimlerini araştırmak ve bizim gibi tarım ülkelerinde, melas, peynir altı suyu, zeytin karasuyu vb. ucuz atık maddelerden, selüloz üreten bakterilerin üretimini sağlayarak, çevre kirliliği için sorun olan bu atık maddeleri biyoteknolojik olarak değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada asetik asit bakterilerinin izolasyonu için ev yapımı şarap, sirke ile üzüm, elma şırası gibi örnekler kullanılmış ve izolasyon için özellikle de *Acetobacter*'ler için en iyi izolasyon kaynağının, alkol ve şeker oranı yüksek olan şarap ve sirke olduğu saptanmıştır.

İzolasyonu yapılan asetik asit bakterilerinin, selüloz üretim verimleri incelenmiş ve selüloz üretimi en yüksek olan 31c ve 8a kodlu iki izolat, çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Seçilen iki izolatın, klasik taksonomiye göre identifikasyonu, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e göre yapılmış ve bu izolatların, *Acetobacter* genusuna ait oldukları belirlenmiştir. Klasik taksonomi, moleküler taksonomi ile desteklenmiş ve 16s rRNA sekans analizi sonucunda, 31c kodlu izolatın *Acetobacter pasteurianus* HBB6, 8a kodlu izolatın ise *Acetobacter lovaniensis* HBB5 olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin hücre şekilleri ve bu strainlerin ürettiği selülozun ağsı yapısı, taramalı elektron mikroskopunda (SEM)'de görüntülenmiştir.

Saflaştırılan selülozun toplam şeker tayini yapılmış ve ayrıca asit ve enzim hidrolizi sonucunda oluşan şeker, ince tabaka kromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisi sonucunda selülozun, tamamen glukoz moleküllerinden oluştuğu belirlenmiştir.

Acetobacter pasteurianus HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinden, HS fermentasyon ortamında, durgun koşullarda selüloz üretimleri sağlanmış ve karbon, azot kaynakları ile sıcaklık, pH gibi parametreler optimize edilmiştir.

Yapılan denemeler sonucunda her iki izolat için, en iyi karbon kaynağının glukoz, en iyi azot kaynağının da yeast ekstrakt olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sıcaklık ve pH denemeleri sonucunda da; en iyi sıcaklık derecesinin 30 °C, en iyi pH'ın da 6,5 olduğu saptanmıştır.

DSMZ Kültür koleksiyonu merkezinden sağlanan *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604, *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2004 ve *Acetobacter aceti* DSM 3508 strainleri ile *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerinin, kullandığımız atık maddeler içinde en çok, melaslı besiortamında selüloz ürettiği gözlenirken, zeytin karasuyu içerikli ortamda ise hücre gelişimi ve selüloz üretiminin olmadığı belirlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışma sonunda; kullandığımız temel besi ortamı HS ve melaslı, CSL'li ve peyniraltı suyu içerikli besiortamlarında yüzde verim miktarı olarak en yüksek selüloz üretimi *Gluconacetobacter xylinus* DSM 46604 straininde, yine yüzde verim miktarı olarak en düşük selüloz üretimi *Acetobacter aceti* DSM 3508 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 strainlerin de saptanmıştır.

Yurt dışında oldukça yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen, ülkemizde bakteriyel selüloz ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar az sayıdadır. Çalışmamız ülkemizde bakterilerden selüloz elde edilmesi konusunun işlenmesi açısından öncülük yapmakta ve ileride bu konuda çalışacak olan araştırmacılar için ön bilgi vermektedir.

Ormanlarımız, kağıt endüstrisinin birinci derecede vazgeçilmez varlığıdır. Orman alanları bakımından zengin bir ülkeye sahip olmamıza rağmen, her geçen gün çıkan yangınlar ve buna benzer nedenler ile ormanlarımızın azalması, kağıt endüstrimizi ciddi anlamda tehlikeye sokmaktadır. Bu nedenle kağıt endüstrisinde

kullanılan en önemli madde olan selülozun, bakteriler gibi başka alternatif kaynaklardan elde edilebilmesi önemli bir bilimsel gelişmedir. Ayrıca bakterilerden elde edilen selülozun özellikle de plastik cerrahide, ciltteki yarıkların tedavisinde kullanılması da bakteriyal selülozun üstün bir özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ülkemizde başlangıcını oluşturduğumuz bu çalışma ile ileriki günlerde, selüloz üreten bakterilerden daha fazla ürün alabilmek için klonlama denemelerinin yapılması ayrıca elde edilen selülozun özellikle tıp alanında olmak üzere farklı endüstri alanlarında kullanımlarının yaygınlaştırılması ve ülke ekonomisine katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- ACUNA-ARGUELLES, M., GUTIERREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZALES, G. and FAVELA-TORRES, E. 1994. The effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, **16**(1): 23-28.
- ACUNA-ARGUELLES, M., GUTIERREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZALES, G. and FAVELA-TORRES, E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.**, **43**(5):808-14.
- ALLISON, D.G. 1998. Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. **Biofilm**, Vol.3. Erişim [<http://www.bioline.org.br/request?bf98002>].
- AMANO, Y., NOZAKI, K.; ARAKI, T., SHIBASAKI, H., KUGA, S. and KANDA, T. 2002. Reactivities of cellulases from fungi towards ribbon-type bacterial cellulose and band-shaped bacterial cellulose. **Cellulose**, **0**:1-8.
- AMEYAMA, M. 1975. *Gluconobacter oxydans* subsp. *sphaericus* new subspecies isolated from grapes. **Int. J. of Syst. Bacteriol.**, **25**:365-370.
- AQUINO, A.C.M.M., JORGE, J.A., TERENZI, H.F. and POLIZELI, M.L.T.M. 2003. Studies on thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **61**:323-328.
- ARAT, Ö. 2007. *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 143s., Aydın.
- ASAI, T. 1935. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, **11**:674-708.
- ASAI, T. 1968. Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. University of Tokyo Pres, Tokyo and University Park Pres, Baltimore.
- ATEŞ, M. 1997. Batık kültür fermentasyonu yöntemiyle bazı bakterilerden PHB üretimi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir.

- BAE, S., SUGANO, Y. and 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.
- BARTOWSKY, E.J., XIA, D., GIBSON, R.L., FLEET, G.H. and HENSCHKE, P.A. 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. **Letters in Appl. Microbiol.**, **36**:307-314.
- BASSIR, O. 1972. Some Nigerian wines. **West African Journal for Biological and Appl. Scienc.**, **5**:67-85.
- BATTAD-BERNARDO, E., McCRINDLE, S.L., COUPERWHITE, I. and NEILAN, B.A. 2004. Insertion of an *E. coli* lacZ gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. **FEMS Microbiology Letters**, **231**:253- 260.
- BECKER, A., KATZEN, F., PUHLER, A. and LELPIE, L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **50**:145-152.
- BEIJERINCK, M.V. 1898. Ueber die arten der essigbakterien. **Zentralblatt für bakteriologie, parasitenkunde, infektionskrankheiten and hygiene 2Abt.**, **4**, pp. 209-216.
- BEN-BASSAT, A. and BRUNER, R. 1992. Reticulated cellulose and methods and microorganisms for the production thereof. US Patent 5,079,162.
- BEN-BASSAT, A., CALHOON, R.D., FEAR, A.L., GELFAND, D.H., MEADE, J.H., TAL, R., WONG, H. and BENZIMAN, M. 1993. Methods and nucleic acid sequences for the expression of the cellulose synthase operon. US Patent 5,268,274.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O (eds). *Methods in enzymology*, Vol.1, pp.149-158. New York: Academic Press.
- BEYATLI, Y. 1996. *Biyoteknoloji ve biyoprotein üretimi*. Kükem Derneği bilimsel yayınlar, No: 5, Ankara.

- BEYER, W., MUKENDI, F.M., KIMMING, P. and BOHM, R. 1998. Suitability of reproductive-DNA-sequence based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. **Journal of Clinical Microbiol.**, **36**:1549-1554.
- BHAT, J.V. and RIJSINGHANI, K. 1955. Studies on *Acetobacter*. I. Isolation and characterization of the species. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, **41**:209-219.
- BIELECKI, S., KRYSTYNOWICZ, A., TURKIEWICZ, M. and KALINOWSKA, H. 2000. Bacterial Cellulose. In: Steinbuchel A (Ed), Biopolymers: Polysaccharides I, Vol.7, pp. 37-90. **Wiley-VCH Verlag GmbH**, Munster, Germany.
- BIYIK, H. 1993. Bazı fungus türlerinden yüzey kültür fermentasyonu yöntemi ile mikrobiyal yağ üretimi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 139s., İzmir.
- BLACKWOOD, A.-C., GUIMBERTEAU, G. and PEYNAUD, E. 1969. Sur les bactéries acétiques isolées de raisins. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D.**, **269**:802-804.
- BOISSET, C., CHANZY, H., HENRISSAT, B., LAMED, R., SHOHAM, Y. and BAYER, E.A. 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. **Biochem J.**, **340**:829–835.
- BOISSET, C., FRASCHINI, C., SCHULEIN, M., HENRISSAT, B. and CHANZY, H. 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. **Appl Environ Microbiol.**, **66**(4):1444–1452.
- BROCK, T.D. and MADIGAN, M.T. 1994. Biology of Microorganisms, Seventh Edition, pp. 899, **Prenice-Hall International Inc.**
- BROWN, R.M. , WILLISON, JR., J.H. and RICHARDSON, C.L. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. **Proc Natl Acad Sci.**, **73**(12):4565–4569.

- BROWN, A.J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. **J.Chem. Soc.**, **49**:432-439.
- BROWN, R.M., JR. 1983. Production of a cellulose-synthetic polymer composite fiber. US Patent 4,378,431.
- BROWN, R.M., JR. 1989a. Microbial cellulose composites and processes for producing same. WO 89/11783.
- BROWN, R.M., JR. 1989b. Microbial cellulose as a building block resource for specialty products and processes thereof. WO 89/12107.
- BROWN, R.M., JR. 1989c. Use of cellulase preparations in the cultivation and use of cellulose- producing microorganisms. European patent 0258038A3.
- BROWN, R.M., JR., MALCOLM, R., LIN, L. and FONG, C. 1990. Multiribbon microbial cellulose. US Patent 4,954,439.
- BROWN, R.M., JR. 1992. In *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*, ed. Mz. Ladisch and A.Bose, **Proceedings of the 9th International Biotechnology Symposium and Expos**, American Chemical Society, Washington,
- BROWN, R.M., JR. 1996. The biosynthesis of cellulose. **Pure Appl. Chem.**, **33**:1345-1373.
- BROWN, R.M., JR., SAXENA, I.M. 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. **Plant Physiol. Biochem.**, **38**:57-60.
- BUDHIONO, A., ROSIDI, B., TAHER, H. and IGUCHI, M. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, **40**:137-143.
- BULYGINA, E.S., GULIKOVA, O.M., DIKANSKAYA, E.M., NETRUSOV, A.I., TOUROVA, T.P. and CHUMAKOV, K.M. 1992. Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. **J. Gen Microbiol.**, **138**:2283-2286.
- BUNGAY, H.R. and SERAFICA, G. 1997. Production of microbial cellulose using a rotating disc film bioreactor. WO 97/05271.

- BUNGAY, H.R. and SERAFICA, G.C. 2000. Production of microbial cellulose. US Patent 6,071,727.
- BYROM, D. 1990. Process for the production of microbial cellulose. US Patent 4,929,550.
- CALAZANS, G.M.T., LOPES, C.E., LIMA, R.M.O.C. and de FRANC, F.P. 1997. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnol. Lett.**, **19**:19-21.
- CANNON, R.E. AND ANDERSON, S. M. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. **Critical Reviews in Microbiology**, **17**:435-447.
- CAO, Y. and TAN, H. 2002. The properties of enzyme-hydrolyzed cellulose in aqueous sodium hydroxide. **Carbohydrate Research**, **337**:1453-1457.
- CARR, J.G. 1968. Methods for identifying acetic acid bacteria, p. 1-8. In: Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. (ed), Identification methods for microbiologists, part B. Academic Pres, London.
- CHAND, P. ARUNA, A., MAQSOOD, A.M. and RAO, L.V. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. **Journal of Appl. Microbiol.**, **98**:318-323.
- CHANG, X., MINNAN, L., XIAOBING, W., HUIJUAN, X., ZHONGAN, C., FENGZHANG, Z. and LIANGSHU, X. 2006. Screening and characterization of the high-cellulase-producing strain *Aspergillus glaucus* XC9. **Front. Biol. China**, **1**:35-40.
- CHAO, Y., SUGANO, Y., KOUDA, T., YOSHINAGA, F. and SHODA, M. 1997. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. **Biotechnol. Tech.**, **11**:829-832.
- CHAO, Y., ISHIDA, T., SUGANO, Y. and SHODA, M. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50 L internal-loop airlift reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, **68**:345-352.
- CHÁVEZ-PACHECO, J.L., MARTÍNEZ-YEE, S., CONTRERAS, M.L. and GÓMEZ-MANZO, S. 2005. Partial bioenergetic characterization *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. **Journal of Appl. Microbiol.**, **99**:1130-1140.

- COHEN, R., SUZUKI, M.R. and HAMMEL, K.E. 2005. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl. and Environmental Microbiology**, **71**(5):2412-2417.
- COLVIN, J.R. 1957. Formation of cellulose microfibrils in a homogenate of *Acetobacter xylinum*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **70**:294-295.
- COLVIN, J.R. and LEPPARD, G.G. 1977. The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. **Can. J. Microbiol.**, **23**: 701-709.
- COLVIN, J.R., SOWDEN, L.C., DAOUST, V. and PERRY, M. 1979. Additional properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. **Can. J. Biochem.**, **57**:1284-1288.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D. and JAMES, G. 1994. Biofilms the customized microniche. **J. Bacteriol.**, **176**:2137-2142.
- COSTERON, J.W. 1999. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **22**:551-563.
- CRESCENZI, V., DENTINI, M. and COVIELLO, T. 1991. Solution and Gelling Properties of Polysaccharides. **Polyelectrolytes. Vol. 41**:61-71.
- ÇEVİK, S. 1987. *Saccharomyces cerevisiae* ile tek hücre proteini üretimi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- DE LANNINO, N., CUOSO, R.O. and DANKERT, M.A. 1988. Lipid-linked intermediates and the synthesis of acetan in *A. xylinum*. **J.Gen. Microbiol.**, **134**: 1731-1736.
- DE LEY, J., GILLIS, M. and SWINGS, J. 1984. Family *Acetobacteraceae*. pp. 267-268.
- DE WULF, P., JORIS, K. and VANDAMME, E.J. 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, **67**(4):376 – 380.

- DEERAKSA, A., MOONMANGMEE, S., TOYAMA, H. YAMADA, M., ADACHI, O. and MATSUSHITA, K. 2005. Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *polE*, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. **Microbiol.**, **151**:4111-4120.
- DEKKER, R.F.H., RIETSCHEL, E.T. and SANDERMANN, H. 1977. Isolation of α -glucan and lipopolysaccharide fractions from *Acetobacter xylinum*. **Arch. Microbiol. Vol. 115**, pp. 353-357.
- DELMER, D.P. and AMOR, Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7, pp. 987-1000.
- DENNY, T.P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, **33**:173-197.
- DIĞRAK, M. ve OĞUZ, K. 2003. *Acetobacter xylinum* DA tarafından bakteriyal selüloz üretimi. MEF Türkiye Lise Öğrencileri Arası 12. Araştırma Projeleri Yarışması, 123-132s., İstanbul.
- DORAN, J. 2006. Final Report for Screening of *Aspergillus niger* strains for enzyme production in sugar beet pulp fermentations to produce fuel ethanol. **Central Michigan University, Office of Research and Sponsored Programs**, 251 Foust Mt. Pleasant, MI 48859, Federal Identification number: 38-6004447.
- DRYSDALE, G.S. and FLEET, G.H. 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. **Am. J. Enol. Vitic.**, **39**:143-154.
- DU TOIT, W.J., LAMBRECHTS, M.G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. **International journal of Food Microbiology**, **74**:57-64.
- DUBOIS, M., GILLES, A.K., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. 1956. *Analytical Chemistry*. Vol. 28, pp. 350-356.
- DUDMAN, W.F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium. **J. Gen. Microbiol.**, **2**:327-337.
- DUPUY, P. 1957. Les *Acetobacter* du vin. Identification de quelques souches. **Annales de Technologie**, **2**:217-233.
- DUPUY, P. and MAUGENET, J. 1963. Metabolisme de l'acide lactique par *Acetobacter rances*. **Ann. Technol. Agric.**, **12**:5-14.

- EMBUSCADO, M.E., MARKS, J.S. and BE MILLER, J.N. 1994. Bacterial cellulose I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Food Hydrocolloids**, **8**:407-418.
- ERGÜDER, T.H., GÜVEN E. ve DEMİRER, G.N. 2000. Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. **Process Biochemistry**, **36**(131):243-248.
- FAPARUSI, S.I. and BASSIR, O. 1972. Factors affecting the quality of palm wine. II. Period of storage. **West-African Journal of Biological and Appl. Chem.**, **15**:24-28.
- FAPARUSI, S.I. 1973. Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis quineensis*). **J. of Appl. Bacteriol.**, **36**:559-565.
- FEDERICI, F., MONTEDORO, G., SERVILI, M. and PETRUCCIOLI, M. 1988. Pectic enzyme production by *Cryptococcus albidus* var. *albidus* on olive vegetation waters enriched with sunflower calahide meal. *Biological Wastes*.
- FONTANA, J.D., GEBARA, M., BLUMEL, M., SCHNEIDER, H., MACKENZIE, C.R., FOHNSON, K.G. 1988. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.**, **160**:560-571.
- FRANKE, I.H., FEGAN, M., HAYWARD, C., LEONARD, G., STACKEBRANDT, E. and SLY, L.I. 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. Nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **49**:1681-1693.
- FRATEUR, J. 1950. Essai su la systématique des *Acetobacters*. **La Cellule**, **53**: 287-392.
- FRAUTER, J. and SIMONART, P. 1952. Etude de la flore bactérienne d'un acétificateur de vinaigre d'alcool. **IX Congresso Internazionale Industrie Agrarie**, Roma.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E, BUSTILLOS-CRISTALES, R., TAPIA-HERNÁNDEZ, JIMÉNEZ-SALGADO, WANG, E.T., MARTINEZ-ROMERO, E. and CABALLERO-MELLADO, J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and

- Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **Int. J. of Syst. And Evolutionary Microbiology**, **51**:305-1314.
- FUHRMANN, F. 1905. Morphologisch-biologische Untersuchungen über ein neues Essigsäure bildendes Bakterium. **Botanisches Centralblatt. Beihefte Abt. 1**, **19**:1-33.
- GALAS, E., KRYSTYNOWICZ, A., TARABASZ-SZYMANSKA, L., PANKIEWICZ, T. AND RZYSKA, M. 1999. Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis. **Acta Biotechnol.**, 19:251-260.
- GERHARDT, P. 1981. Manual of methods for general bacteriology, Gerhardt,P., et al. (Eds). American Society for Microbiol., pp.791, Washington, D.C.
- GERHARDT, P. and DREW, S.W. 1994. Growth yield calculations, pp. 244-246. Methods for general and molecular bacteriology, Gerhardt,P., et al. (Eds). American Society for Microbiol., pp. 584, Washington, D.C.
- GHOSE, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, 59(2):257-268.
- GILLS, M. and DE LEY, J. 1980. Intra and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **30**:7-27.
- GONZÁLEZ, Á., HIERRO, N., POBLET, M., ROZÈS, N., MAS, A. and GUILLAMÒN, JM. 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. **Journal of Appl. Microbiol.**, **96**:853-860.
- GOPINATH, S.C.B, ANBU, P. and HILDA, A. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, **46**: 119-126.
- GÖZÜKARA, E.M. 1994. Biyokimya 1. İnönü Üniversitesi Yayınları, 2. Baskı, 189-241s., Malatya.
- GUGLIANDOLA, C., MAUGERI, T.L., CACAMO, D. and STACHEBRANDT, E. 2003. *Bacillusaeolius* sp. nova thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy). **Systematic and Appl. Microbiol.**, **26**(2):172-176.

- GÜRBÜZ, D. 2000. Zeytin karasuyunun mikrobiyal yol ile yeniden değerlendirilmesi ve çevreye zararsız hale getirilmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- HAMDİ, M. and GARCIA, J.L. 1991. Comparison between anaerobic contact process for fermented olive mill wastewater. **Bioresource Technology**, **38**: 23-29.
- HAMDİ, M. 1991. Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater. **Bioresource Technology**, **36**(2): 173-178.
- HAMDİ, M. 1993. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry International**, **28**: 155-159.
- HAN, N.S. and ROBTY, J.F. 1998. The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. **Carbohydr. Res.**, **313**(2):125-133.
- HANCIOĞLU, H.S. 2005. Zeytin karasuyunun kimyasal ve anaerobik biyolojik yöntemlerle arıtımının incelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- HASSANIEN, R.F., RAGAB, M. and EL-MAKHZANGY, A. 1986. Studies on the possibility of producing fats from food wastes by using microorganisms. I: Factors affecting fat production from different fungi. **Fette. Seifen. Anstrichmittel**, **88**(1):33-38.
- HEO, M.S. and SON, H.J. 2002. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter sp.* A9 in shaking cultures. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, **36**:41-45.
- HESSE, S. and JÄGER, C. 2005. Determination of the ^{13}C -chemical shift anisotropies of cellulose I and cellulose II. **Cellulose**, **12**:5-14.
- HESSE, S. and KONDO, T. 2005. Behavior of cellulose production of *Acetobacter xylinum* in ^{13}C -enriched cultivation media including movements on nematic ordered cellulose templates. **Carbohydrate Polymers**, **60**:457-465.

- HESTRIN, S., ASCHNER, M., MAGER, J. 1947. Synthesis of cellulose by resting Cells of *Acetobacter xylinum*. **Nature**, **159**:64-65.
- HESTRIN, S. and SCHRAMM, M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem. J.**, **58**:345.
- HIKAWU, S., HIROSHI, T., TAKAYASU, T., YOSHINAGA, F. 1996. Manufacture of bacterial cellulose by addition of cellulose formation stimulators. Japanese patent, 96316922.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Edition. pp. 71, 84, 103, 107, 117, 126, 142. Williams & Wilkins, Baltimore.
- HUERTA, S., FAVELA-TORRES, E., LOPEZ-ULIBARRI, R., FONSECA, A., VINIEGRA-GONZALES, G. and GUTIERREZ-ROJAS, M. 1995. Absorbed substrate fermentation for pectinase production. *Biotechnology Letters*.
- HURST, P.L., NIELSEN, J., SULLIVAN, P.A. and SHEPHERD, M.G. 1977. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. **Biochem. J.**, **165**: 33-41.
- IGUCHI, M., MITSUHASHI, S. and ICHIMURA, K. 1988. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength. US Patent 4,742,164.
- IGUCHI, M., YAMANAKA, S., BUDHIONO, A. 2000. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, **35**(2):261-270.
- ISHIHARA, M., MATSUNAGA, M., HAYASHI, N., TISLER, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, **31**:986-991.
- ISHIKAWA, A., MATSUOKA, M., TSUCHIDA, T. and YOSHINAGA, F. 1995. Increasing of bacterial cellulose production by sulfoguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **59**:2259-2263.

- ISHIKAWA, A., TSUCHIDA, T. and YOSHINAGA, F. 1996a. Production of bacterial cellulose using microbial strain resistant to inhibitor of DHO-dehydrogenase. Japanese patent, 08009965A.
- ISHIKAWA, A., TSUCHIDA, T. and YOSHINAGA, F. 1996b. Production of bacterial cellulose with pyrimidine analogue- resistant strain. Japanese patent, 08000260.
- IŞIKLI, T. 1992. Farklı teknoloji uygulayan zeytinyağı fabrikalarında elde edilen karasuyun analitik özelliklerinin tesbiti üzerine bir araştırma. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
- ITO, F., AMANO, Y., SHIROISHI, M., NOZAKI, K., SAXENA, I.M., BROWN, M.R. JR. and KANDA, T. 2005. Accumulation of cello-oligosaccharides during bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **J. Appl. Glycosci.**, **52**:27-30.
- JOHNSON, D.C. and NEOGI, A.N. 1989. Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US Patent, 4863565.
- JONAS, R., FARAH, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, **59**:101-106.
- JORIS, K., BILLIET, F., DRIEGHE, S., BRACHX, D. and VANDAMME, E. 1990. Microbial production of β -1,4 glucan. Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. **Gent.**, **55**:1563-1566.
- KAČURÁKOVÁ, M., SMITH, A.C., GIDLEY, M.J. and WILSON, R.H. 2002. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, **337**:1145-1153.
- KAHLON, R.S. and VYAS, S.R. 1972. Isolation and identification of acetic acid bacteria from different ecosystems. **Proceedings of the Indian Academic of Sciences, sect. B.**, **74**:293-300.
- KARABOZ, İ. 1986. Batık kültür yöntemi ile tek hücre proteini (THP) üretiminde *Morchella conica* var. *costata* vent. miselyumunun kullanılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, İzmir.
- KARAPINAR, M. and WORGAN, T. 1983. Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**

- KATIRCIOĞLU, H.K. 1995. Tek hücre proteini eldesi ve bunun *Drosophila* gelişimine etkisi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- KENNE, L. and LINDBERG, B. 1983. The polysaccharides. In Aspinall G.O., (ed). Vol. 2, pp. 287-363, Academic Pres, New York.
- KESKHK, M. and SAMESHIMA, K. 2006b. The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Vol. 72:291-296.
- KESKHK, SM., RAZEK, T.M.A. and SAMESHIMA, K. 2006a. Bacterial cellulose production from beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, 5 (17):1519-1523.
- KILIÇ, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, 1. Basım, 193-194s., İzmir.
- KIM, S.K., KONG, I.S., KWON, K.J., RHA, C., SINSKEY, A.J. and KONG, J.Y. 1994. Exopolysaccharides produced by *Z. ramigera* mutants and analysis of structural change by solutions properties. **Biotechnol. Letters.**, 16:789-794.
- KIM, D., KIM, Y.M. and PARK, D.H. 1999. Modification of *Acetobacter xylinum* bacterial cellulose using dextransucrase and alternansucrase. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 9:704-708.
- KITAZAWA, H., TOBA, T., ITOH, T., KUMANO, N., ADACHI, S. and YAMAGUCHI, T. 1991. Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis subsp. cremoris* isolated from Scandinavian Ropy, Sour Milk, “viili”. **Animal Sci. Technol.**, 62:277-283.
- KLEMM, D., SCHUMANN, U., UDHARDT, U. and MARSCH, S. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, 26(9):1561-1599.
- KONO, H., ERATA, T. and TAKAI, M. 2002. CP/MAS ^{13}C NMR Study of Cellulose and Cellulose Derivatives. 2. Complete Assignment of the ^{13}C Resonance for the Ring Carbons of Cellulose Triacetate Polymorphs. **J. Am. Chem. Soc.**, 124:7512-7518.
- KORNMAN, H., DUBOC, P., MARISON, I. and STOCKAR, UV. 2003. Influence of nutritional factors on the nature, yield and composition of

- exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. **Appl. and Environmental Microbiol.**, **69**(10):6091-6098.
- KOUDA, T., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1997. Effect of agitator configuration on the productivity of bacterial cellulose production. **J. Ferment. Bioeng.**, **83**:371-376.
- KOUDA, T., NARITOMI, T., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1998. Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. **J. Ferment. Bioeng.**, **85**:318-321.
- KOUDA, T., NARITOMI, T., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 2000. Process for the production of bacterial cellulose. US Patent 6,017,740.
- KRISCH, J. and SZAJÁNI, B. 1997. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. **Biotechnology Letters**, **19**(6):525-528.
- KRYSTYNOWICZ, A., CZAJA, W., WIKTOROWSKA-JEZIERSKA A., GONÇALVES-MIŚKIEWICZ, M., TURKIEWICZ, M., BIELECKI, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **29**(4):189-95.
- KRYSTYNOWICZ, A., CZAJA, W. and BIELECKI, S. 1999. Biosynthesis and application of bacterial cellulose. **Zywnosc.**, **3**:22-33.
- KRYSTYNOWICZ, A., CZAJA, W., POMORSKI, L., KOŁODZIEJCZYK, M. and BIELECKI, S. 2000. The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material. **14th Forum for Applied Biotechnology**, pp. 213-220. Gent, Belgium, Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent, Proceedings Part I.
- KRYSTYNOWICZ, A., GALAS, E. and PAWLAK, E. 1997. Method of bacterial cellulose production. Polish Patent, P-299907.
- KRYSTYNOWICZ, A., TURKIEWICZ, M., DRYNSKA, E. and GALAS, E., 1995. Bacterial cellulose-biosynthesis and application. **Biotechnologia.**, **30**:120-132.
- KUDLICKA, K. 1989. Terminal complexes in cellulose synthesis. **Postępy biologii komórki**, **16**:197-212 s., (abstract in English).

- LABOUREUR, P. 1988. Process for producing bacterial cellulose from material of plant origin. WO 88/09381.
- LASZKIEWICZ, B. 1997. Solubility of bacterial cellulose and its structural properties. **J. Appl. Polymer Science**, **67**:1871-1876.
- LEE, I.Y., SEO, W.T., KIM, G.J., KIM, M.K., AHN, S.G., KWON, G.S. and PARK, Y.H. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, **16**(2):71-75.
- LEE, J.W., DENG, F., YEOMANS, W.G., ALLEN, A.L., GROSS, R.A. and KAPLAN, D.L. 2001. Direct incorporation glucosamine and N-acetylglucosamine into exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* (= *Acetobacter xylinum*) ATCC 10245: Production of chitosan-cellulose and chitin-cellulose exopolymers. **Appl. and Environmental Microbiol.**, **67**(9):3970-3975.
- LEIFSON, E. 1954. The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology**, **20**:102-110.
- LIN, F.C. and BROWN, R.M., JR. 1989. Purification of cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*, in: Cellulose and Wood Chemistry and Technology, pp. 473-492. (Schmerck, C., Ed.), New York: John Wiley & Sons.
- LIN, F.C., BROWN, R.M., JR., DRAKE, R.R., JR., HALEY, B.E. 1990. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. **J. Biol. Chem.** **265**:4782-4784.
- LISDIYANTI, P., KAWASAKI, H., WIDYASTUTI, Y., SUSONO, S., SEKI, T., YAMADA, Y., UCHIMURA, T. and KOMAGATA, K. 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. Nov., a novel acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **52**:813-818.
- MANDELS, M. and WEBER, J. 1969. Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, **95**:391-414.

- MARGARITIS, A. and PACE, G.W. 1985. Microbial polysaccharides. In Blanch H.W., Drew S., Wang D.I.C. (eds). **Comprehensive Biotechnology**, 3: 1005-44. The practice of biotechnology: Current commodity products. Oxford: Pergamon Pres.
- MARTINEZ-NIETO, L., GARRIDO-HOYOS, S.E., CAMACHO-RUBIO, F., GARCIA PAREJA, M.P. and RAMOS-CORMENZANA, A. 1993. The biological purification of waste products from olive oil extraction. **Biosource Technology**, 43:215-219.
- MASAOKA, S., OHE, T. AND SAKOTA, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **J. Ferment. Bioeng.**, 75:18-22.
- MATHESON, G.V., MUNAKATA-MARR, J., HOKINS, D.G., MCCARTHY, L.P., TREDJE, M.J. and FORNEY, J.L. 1997. A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. **Appl. and Env. Microbiol.**, 63:2863-2869.
- MATSUOKA, M., TSUCHIDA, T., MATSUSHITA K., ADACHI, O. and YOSHINAGA, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60(4):575-579.
- MATTHYSSE, A.G., THOMAS, D.L. and WHITE, A.R. 1995. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, 177(4):1076-1081.
- MAUGENET, J. 1962. Les *Acetobacters* du cidre: Identification de quelques souches. Annales de Technologie Agricole. **Conservation et Transformation des Produits Agricoles.**, 11:45-53.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3):426-428.
- MOLINARI, J.L., TATO, P., RODRIGUEZ, D., SOLANO, S., RUBIO, M. and SEPÚLVEDA, J. 1998. Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium metacestodes* in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. **Parasitol Res**, 84:173-180.
- MONDAL, I.H. and KAI, A. 2000. Control of the crystal structure of microbial cellulose during nascent stage. **J. Appl. Polym. Sci.**, 79:1726-1734.

- MOONMANGMEE, S., KAWABATA, K., TANAKA, S. 2002. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **93**(2):192-200.
- MORIELLO, V.S., LAMA, L., POLI, A., GUNGLIANDOLA, C., MAUGERI, T.L., GAMBACORTA, A. and NICOLAUS, B. 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganisms isolated from a marine hot spring in Flegrean Areas. **Journal of Microbiol. and Biotechnol.**, **30** (2):95-101.
- MUTHUVELAYUDHAM, R. and VIRUTHAGARI, T. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, **5**(20): 1873-1881.
- MYNATT, R:L. 1982. Fiber production from continuous cultivation of microorganisms. US Patent 4,320,198.
- NAIR, S.R., RAKSHIT, S. and PANDA, K.T. 1995. Effect of carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus*. **Bioprocess Engineering**, **13**(1): 37-40.
- NAKAI, T., TONOUCHI, N., KONISHI, T., KOJIMA, Y., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F., SAKAI, F. and HAYASHI, T. 1999. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. **Proc Natl Acad Sci.**, **96**(1): 14-18.
- NAKAI, T., NISHIYAMA, Y., KUGA, S., SUGANO, Y. and SHODA, M. 2002. ORF2 gene involves in the construction of high-order structure of bacterial cellulose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **295**:458-462.
- NANDA, K., TANIGUCHI, M., UJIKE, S., ISHIHARA, N., MORI, H., ONO, H. and MUROOKA, Y. 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentations of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. **Appl. and Environ.Microbiol.**, **67**:986-990.

- NARITOMI, T., KOUUDA, T., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1998a. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **J. Ferment Bioeng.**, **85**:598-603.
- NARITOMI, T., KOUUDA, T., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1998b. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **J. Ferment. Bioeng.**, **85**:89-95.
- NELSON, D.L., COX, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Ankara, 293-324 s.
- NICHOLS, S.E. and SINGLETARY, G.W. 1998. Cellulose synthesis in the storage tissue of transgenic plants. US patent 5723764.
- NORO, N., SUGANO, Y. and SHODA, M. 2004. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **64**:199-205.
- OHANA, P., DELMER, D.P., VOLMAN, G. AND BENZIMAN, M. 1988. Glycosylated triterpenoid saponin: a specific inhibitor of diguanylate cyclase from *Acetobacter xylinum*. **Plant Cell Physiol.**, **39**:153-159.
- OIKAWA, T., OHTORI, T. and AMEYAMA, M. 1995. Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. **Biosci. Biotech.**, **59**: 331-332.
- OIKAWA, T., KAMATANI, T., KAIMURA, T., AMEYAMA, M. and SODA, K. 1997. Endo- β -glucanase from *Acetobacter xylinum*: Purification and characterization. **Curr. Microbiol.**, **34**(5):309-313.
- OJUMU, T.V., SOLOMON, B.O., BETIKU, E., LAYOKUN, S.K. AMIGUN, B. 2003. Cellulose production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnol.**, **2**(6):150-152.
- OKAMOTO, T., YAMANO, S., IKEAGA, H. and NAKAMURA, K. 1994. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **42**(4): 563-568.

- ONSORI, H., ZAMANI, M.R., MOTELLEBI, M. and ZARGHAMI, N. 2005. Identification of over producer strain of endo-1,4-glucanase in *Aspergillus species*: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. **African Journal of Biotechnol.**, **4**(1):26-30.
- OPHIR, T. and GUTNICK, D.L. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 740-745.
- ORY, I.de, ROMERO, L.E. and CANTERO, D. 1998. Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **49**:189-193.
- OURA, E. 1982. Biomass from carbohydrates in biotechnology. (Ed. H. Dellweg) Vol. 3, pp. 35-36, Florida.
- ÖCAL, Ş., ARAN, N. ve ÇELİKKOL, E. 1977. Zeytin kara suyu ve peynir suyundan mikrobiyal protein elde olunması. **TÜBİTAK-MAE Beslenme ve Gıda Ünitesi Yayınları**.
- ÖNER, M. 1984. Mikrobiyoloji laboratuvar kılavuzu. **Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Teksirler Serisi**, No: 55, 37, 79, 82-85, 90.
- ÖZDEMİR, G. 1997. Aktif Çamurda Flok Oluşturan Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkili Faktörler. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir.
- ÖZYURT, M. 1975. Conversion of black water olive waste to microbial protein. Cekmece Nuclear Research and Training Center.
- PARK, J.K., JUNG, J.Y. and PARK, Y.H. 2003. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. **Biotechnol. Lett.**, **25**:2055-2059.
- PASSMORE, S.M. and CARR, J.G. 1975. The ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. **Journal of Appl. Bacteriol.**, **38**:151-158.
- PERCIVAL, Y.H. and LYND, L.R. 2006. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. **Biotechnol. Bioengineering**, **94**(5):888-898.

- PEYNAUD, E. and DOMERCQ, S. 1961. Présence de bactéries lactiques sur les raisins mûrs. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Série D.**, Vol. 252: 3343-3344.
- POBLET, M., ROZÈS, N., GUILLAMÓN, J.M. and MAS, A. 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. **Lett. Appl. Microbiol.**, **31**:63-67.
- POOLER, M.R., RITCHIE, D.F. and HATUNG, J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for identification of this phytopathogen. **Appl. and Environmental Microbiol.**, **62**:3121-3127.
- RAMANA, K.V., TOMAR, A. and SINGH, L. 2000. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **16**:245-248.
- RAMESH, H.P. and THARANATHAN, R.N. 2003. Carbohydrates the renewable raw materials of high biotechnological value. **Crit. Rev. Biotechnol.**, **23**:149-173.
- RAMOS-CORMENZANA, A., MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. and LOPEZ, M.J. 1995. Bioremediation of alpechin. **Int. Biodeter. And Biodegrad.**, pp. 249-268.
- RATLEDGE, C. 1989. Production of fatty acids and lipid by a *Candida sp.* Growing on a fraction of n-alkanes predominating in Tridecane. **Biotechnology and Bioengineering**, **10**:511-533.
- RING, D., NASHED, W. and DOW, T. 1986. Liquid loaded pad for medical applications. US Patent 4,588,400.
- RING, D., NASHED, W. and DOW, T. 1987. Microbial polysaccharide articles and methods of production. US Patent 4,655,758.

- ROSS, P., WEINHOUSE, H., ALONI, Y., MICHAELI, D., WEINBERGER-OHANA, P. and BENZIMAN, M. 1986. Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the activator of the cellulose synthetase. **Carbohydr. Res.**, **149**:101-117.
- ROSS, P., WEINHOUSE, H., ALONI, Y., MICHAELI, D., WEINBERGER-OHANA, P., MAYER, R., BRAUN, S., de VROOM, E., van der MAREL, G.A., van BOOM, J.H. and BENZIMAN, M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. **Nature**, **325**:279– 281.
- ROSS, P., MAYER, R. and BENZIMAN, M. 1991. Cellulose biosynthesis and fuction in bacteria. **Microbiol. Rev.**, **55**:35-58.
- RUIZ, A., POBLET, M., MAS, A. and GUILLAMON, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rRNA and 16S-23S rRNA intergenic spacer. **International Journal of Syst. And Evolutionary Microbiol.**, **50**:1981-1987.
- SAKAIR, N., ASAMO, H., OGAWA, M., NISHI, N. and TOKURA, S. 1998. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. **Carbohydr. Polym.**, **35**:233-237.
- SALDAMLI, I. 1998. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, s.38-105, Ankara.
- SAMEJIMA, M., SUGIYAMA, J., IGARASHI, K. and ERIKSSON, K.E.L. 1997. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Carbohydr. Res.**, **305**:281-288.
- SANDER, A., RUESS, M., BERESWILL, S., SCHUPPLER, M. and STEINBRUECKNER, B. 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of Bartonella henselae isolates. **Journal of Clinical Microbiol.**, **36**:2973-2981.
- SATTLER, K. and FIEDLER, S. 1990. Production and application of bacterial cellulose. II. Cultivation in a rotating drum fermentor. **Zbl. Microbiol.**, **145**:247-252.
- SAVIDGE, R.A. and COLVIN, J.R. 1985. Production of cellulose and soluble polysaccharides by *Acetobacter xylinum*. **Can. J. Microbiol.**, **31**:1019-1025.

- SAXENA, I.M. and BROWN, R.M., JR. 1989. Study of cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: a genetic approach. In: Cellulose and Wood-Chemistry and Technology, Ed. C. Schuerch. John Wiley & Sons, Inc. N. Y., pp. 537-557.
- SAXENA, I.M., ROBERTS, E.M. and BROWN, R.M., JR. 1990a. Modification of cellulose normally synthesized by cellulose-producing. US Patent 4,950,597.
- SAXENA, I.M., ROBERTS, E.M., BROWN, R.M., JR. 1990b. Modification of cellulose normally synthesized by cellulose-producing microorganisms. US patent 4950597.
- SAXENA, I.M., LIN, F.C. and BROWN, R.M., JR. 1991. Identification of a new gene in an operon for cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **Plant Molecular Biology**, **16**(6):947-954.
- SAXENA, I.M., BROWN, R.M., JR., FEVRE, M., GEREMIA, R.A. and HENRISSAT, B. 1995. Multidomain architecture of betaglycosyl transferases: implications for mechanism of action. **J. Bacteriol.**, **177**:1419-1424.
- SAXENA, I.M. and BROWN, R.M., JR. 1997. Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW'. **Cellulose**, **4**(17),1:33-49.
- SCHRAMM, M., GROMET, Z. and HESTRIN, S. 1957. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinus* III.: Substrates and inhibitors. **Biochem. J.**, **67**:669-679.
- SCIOLI, C. and VALLARO, L. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters, **Wat. Res.**, **31**(10):2520-2524.
- SETO, A., KOJIMA, Y., TONOUCHE, N., TSUCHIDA, T. and YOSHINAGA, F. 1997. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for sucrose as a carbon source. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **61**:735.
- SHANKAR, S., YE, R.W., SCHLICHTMAN, D., CHAKRABARTY, A.M. 1995. Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and regulation of gene expression. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.**, **70**:221-255.

- SHARMA, A., KHARE, S.K. and GUPTA M.N. 2001. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase. **Bioresource Technol.**, **78**:281-284.
- SHIMWELL, J.L. 1954. Pure culture vinegar production. **Journal of the Institute of Brewing**, **60**:136-141.
- SIEVERS, M., LUDWIG, W. and TEUBER, M. 1994. Revival of the species *Acetobacter methanolicus* (ex Uhlig et al. 1986) nom. **Rev. Syst Appl Microbiol**, **17**:352-354.
- SIMONART, P. and LAUDELOUT, H. 1951. Etude microbiologique et biochimique du vin de palme. **Bulletin de l'Institut Royal Colonial Belge**, **22**:385-401.
- SKINNER, P.O.N. and CANNON, R.E. 2000. *Acetobacter xylinum*: An inquiry into cellulose biosynthesis. **The American Biology Teacher**, **62**:442-444.
- SOKOLLEK, S.J., HERTEL, C. and HAMMES, W.P. 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. Nov. and *Acetobacter pomorum* sp. Nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. **Int.J. Syst. Bacteriol.**, **48**:935-940.
- SON, H.J., HEO, M.S., KIM, Y.G. and LEE, S.J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, **33**:1-5.
- SON, H.J., KIM, H.G., KIM, K.K., KIM, H.S., KIM, Y.G. and LEE, S.J. 2003. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, **86**:215-219.
- SRISODSUK, M., KLEMAN-LEYER, K., KERÄNEN, S., KIRK, T.K. and TEERI, T.T. 1998. Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei*. **Eur. J. Biochem.**, **251**:885-892.
- STACKEBRANDT, E., MURRAY, R.G.E. and TRUPER, H.G. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **38**:321-325.

- STANBURG, P.F. and WHITAKER, A. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Pres, Oxford, pp. 78-82.
- STANDAL, R., IVERSEN, T.G., COUCHERON, D.H., FJAERVIK, E., BLATNY, J.M. and VALLA, S. 1994. A new gene required for cellulose production and A gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the BSs operon. **J. Bacteriol.**, **176**:665-672.
- STEPHENS, R.S, WESTLAND, J.A. and NEOGI, A.N. 1990. Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component. US Patent 4,960,763.
- STRAUSS, M.L.A., JOLLY, N.P., LAMBRECHTS, M.G. and RENSBURG, P.V. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Appl. Microbiol.**, **91**:182-190.
- SUOMALAINEN, H., KERÄNEN, E.J.A. and KANGASPERKO, J. 1965. Production of spirit vinegar by the quick process with a pure culture of *Acetobacter rances* Beijerinck. **Journal of the Institute of Brewing**, **71**: 41-45.
- SUTHERLAND, I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge.
- SUTHERLAND, I.W. 1996. Extracellular polysaccharides. In: Rehm H.J., Reed G. (eds). Biotechnology, Weinheim VCH., Vol. 6, pp. 615-57.
- SUTHERLAND, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech.**, **38**:41-47.
- SUTHERLAND, I.W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram negative bacteria. **Int. Dairy J.**, **11**:663-674.
- SWINGS, J. 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In Balows, Trüper, Dworkin, Harder and Schleifer (eds), The Prokaryotes, 2nd ed., Vol. III, Springer-Verlag, New York, pp. 2268-2286.
- ŞAHİN, I., DÖNMEZ, S. and KILIÇ, O. 1983. Study on pectolytic enzyme production from some agricultural wastes by some fungi. **Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.**

- TAHARA, N., YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1997. Two types of cellulase activity produced by a cellulose-producing *Acetobacter* strain. **J. Ferment. Bioeng.**, **83**:389-392.
- TAHARA, N., TONOUCI, N. YANO, H. and YOSHINAGA, F. 1998. Purification and characterization of exo-1,4-beta-glucosidase from *Acetobacter xylinum* BPR2001. **J. Ferment. Bioeng.**, **85**:589-594.
- TAKAHASHI, T. 1907. Studies on diseases of sakè. **Buketin of the College of Agriculture of the University of Tokyo.**, **7**:531-563.
- TAKAI, M. 1994. Bacterial cellulose composites. In: Gilbert RD (ed) cellulose polymers. Hanser, Cincinnati, Ohio, pp. 233-240.
- TAKAI, M. and ERATA, T. 1998. Biosynthesis and application of bacterial cellulose. **Biosci. Ind.**, **56**:808-12.
- TAL, R., WONG, H.C., CALHOON, R., GELFAND, D., FEAR, A.L., VOLMAN, G., MAYER, R., ROSS, P, AMIKAM, D., WEINHOUSE, H., COHEN, A., SAPIR, S., OHANA, P. and BENZIMAN, M. 1998. Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. **J. Bacteriol.**, **180**:4416-4425.
- TAMER, A.Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OĞULTEKİN, R. 1989. Mikrobiyoloji laboratuvar kılavuzu, 3. Baskı, **Ege Üniv. Fen Fak. Teksirler Serisi**, No: 55, İzmir.
- TAVERNIER, P., PORTAIS, J.C., NAVA SAUCEDO, J.E., COURTOIS, J., COURTOIS, B. and BARBOTIN, J.N. 1997. Exopolysaccharide and poly-b-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**:21-26.
- TAYAMA, K., MINAKAMI, H., FUJIYAMA, S., MASAI, H. and MISAKI, A. 1985. Structure of an acidic polysaccharide elaborated by *Acetobacter sp.* NBI 1022. **Agric. Biol. Chem.**, **49**:959-966.
- TEATHER, R.M. and WOOD, P.J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. and Environmental Microbiol.**, **43**(4):777-780.

- TEERI, T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends Biotechnol.**, **15**:160–167.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N. 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGE), Yayın no: 2.
- TODA, K., ASAKURA, T., FUKAYA, M., ENTANI, E. and KAWAMURA, Y. 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **84**(3):228-231.
- TOKOH, C., TAKABE, K., FUJITA, M and SAKAI, H. 1998. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, **5**:249-261.
- TOKOH, C., TAKABE, K., SUGIYAMA, J. and FUJITA, M. 2002. CP/MAS ^{13}C NMR and electron diffraction study of bacterial cellulose structure affected by cell wall polysaccharides. **Cellulose**, **9**:351-360.
- TOMINAGA, R., SAMEJIMA, M., SAKAI, F. and HAYASHI, T. 1999. Occurrence of cello-oligosaccharides in the apoplast of auxin-treated pea stems. **Plant Physiology**, **119**:249-254.
- TONOUCHI, N., TAHARA, N., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F., BEPPU, T. and HORINOUCI, S. 1995. Addition of a small amount of an andoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **59**:805-808.
- TONOUCHI, N., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F. and BEPPU, T. 1996. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **60**(8):1377-1379.
- TONOUCHI, N., TAHARA, N. and KOJIMA, Y. 1997. A beta-glucosidase gene downstream of the cellulose synthase operon in cellulose-producing *Acetobacter*. **Biosci, Biotechnol. Biochem.**, **61**:1789-1790.
- TONOUCHI, N., YANASE, H., KOJIMA, Y., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F. and HORINOUCI, S. 1998. Increased cellulose production from sucrose with reduced levan accumulation by an *Acetobacter* strain harboring a recombinant plasmid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **62**:833-836.

- TOPAL, Ş. 1982. Çeşitli tarımsal ve gıda sanayi atıklarının mikrobiyolojide besi ortamı olarak kullanılabilme olanaklarının araştırılması. TÜBİTAK-MAE Beslenme ve Gıda Ünitesi Yayınları, No: 58.
- TOYOSAKI, H., KOJIMA, Y., TSUCHIDA, T., HOSHINO, K., YAMADA, Y. and YOSHINAGA, F. 1995. The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. nov., **J. Gen. Appl. Microbiol.**, **41**:307-314.
- TSUCHIDA, T. and YOSHINAGA, F. 1997. Production of bacterial cellulose by agitation culture systems. **Pure Appl. Chem.**, **69**:2453-2458.
- TURTURA, G.C., CASALICCIO, F. and BIAVATI, B. 1973. Isolamento e identificazione di acetobatteri. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, **23**:157-164.
- UNEP (United Nations Environmental Programme) 1998. Regional activity centre for cleaner production mediterranean action plan, meeting on experts on olive oil production and electroplating industry.
- URAKAMI, T., YAMAOKA, J., SUZUKI, K. and KOMAGATA, K. 1989. *Acidomonas* gen. Nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **39**:50-55.
- URSINOS, J.A.F. 1983. Valorization of olive by-products, meeting the working group organized by regional Project on the improvement of olive production. **Madrid, FAO; IOOC.USA.**, **96**(1):14-18.
- ÜNLÜTÜRK, A. 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi, İkinci Baskı, 13s., İzmir.
- VALLA, S. and KJOSBAKKEN, J. 1981. Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose-negative strain of *Acetobacter xylinum*. **Can. J. Microbiol.**, **27**:599-603.
- VALLA, S. and KJOSBAKKEN, J. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.**, **128**:1401-1408.

- VALLA, S., COUCHERON, D.H., FJAERVIK, E., KJOSBAKKEN, J., WEINHOUSE, H., ROSS, P., AMIKAM, D. and BENZIMAN, M. 1989. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinus*: complementation of cellulose negative mutant by UDPG pyrophosphorylase structure gene. **Mol. Gen. Genet.**, **217**:26-30.
- VANDAMME, E.J., DE BAETS, S., VANBAELEN, A., JORIS, K., DE WULF P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, **59**(7),1:93-99.
- VASSILEV, N., FENICE, M., FEDERICI, F. and AZCON, R. 1997. Olive mill waste treatment by immobilized cells of *Aspergillus niger* and its enrichment with soluble phosphate, process biochemistry, **Elsevier**, **0**(0):14.
- VAUGHN, R.H. 1942. The acetic acid bacteria. **Wallerstein Laboratories Communications**, **5**:5-26.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. and LUPSKI, R.J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, **19**:6823-6831.
- WATANABE, K., TABUCHI, M., MORINAGA, Y., YOSHINAGA, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, **5**:187-200.
- WATANABE, K., SHIBATA, A., OUGIYA, H., HIOKI, N. and MORINAGA, Y. 2000. Method for processing bacterial cellulose. US Patent 6,153,413.
- WEINHOUSE, R. 1977. Regulation of carbohydrate metabolism in *Acetobacter xylinum*, PhD thesis, Hebrew University of Jerusalem. Jerusalem, Israel.
- WEINHOUSE, H., SAPIR, S., AMIKAM, D., SHILO, Y., VOLMAN, G., OHANA, P., BENZIMAN, M. 1997. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. **FEBS Lett.** **416**(2):207-11.
- WESTLAND, J.A., STEPHENS, R.S., SCOTT, R., JOHNSTON, JR., WILLIAM, C. and ROSENKRANS, H.J. 1993. Bacterial cellulose binding agent. US Patent 5,207,826.

- WHITE, A.R. and BROWN, R.M., JR. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Visual characterization of the process. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **78**(2):1047-1051.
- WINFREY, M.R., ROTT, M.A. and WORTMAN A.T. 1997. Unraveling DNA-molecular biology for the laboratory. Prentice-Hall, Inc., New York, pp. 370.
- WILIAMS, W.S. and CANNON, R.E. 1989. Alternative Environmental-Roles For Cellulose Produced by *Acetobacter-xylinum*. **Applied And Environmental Microbiology**, **55**(10):2448-2452.
- WINKELMAN, J.W. and CLARK, D.P. 1984. Proton suicide: general method for direct selection of sugar transport- and fermentation-defective mutants. **J. Bacteriol.**, **Vol. 160**(2):687-690.
- WLOCHOWICZ, A. 2001. Personal communication.
- WONG, H.C., FEAR, A.L, CALHOON, R.D., EICHINGER, G.H., MAYER,R., AMIKAM, D., BENZIMAN, M., GELFAND,D.H., MEASDE, J.H., EMERICK, A.W., BRUNER, R., BEN-BASSAT, A. and TAL, R. 1990. Genetic Organization of the Cellulose Synthase Operon in *Acetobacter xylinum*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **87**: 81308134, USA.
- YALPANI, M. and SANDFORD, P.A. 1987. Commercial polysaccharides: Recent trends and developments. In: Yalpani, M. (ed)., Industrial polysaccharides genetic engineering, structure/property relations and applications. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 311-35.
- YAMADA, Y. and KONDO, K., 1984. *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, **30**:297-303.
- YAMADA, Y., HOSHINO, K.I. and ISHIKAWA, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, **61**:1244-1251.

- YAMADA, Y., HOSHINO, K. and ISHIKAWA, T. 1998. *Gluconacetobacter* corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). In Validation of Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List No. 64. **Int. J. Syst Bacteriol.**, **48**:327-328.
- YAMADA, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **50**:2225-2227.
- YAMAMOTO, H., HORII, F. and HIRAI, A. 1996. In situ crystallization of bacterial cellulose. 2. Influence of different polymeric additives on the formation of celluloses Ia and Ib at the early stage of incubation. **Cellulose**, **3**:229-242.
- YAMANAKA, S. and SUGIYAMA, J. 2000. Structural modification of bacterial cellulose. **Cellulose**, **7**(13),3:213-225.
- YAMANAKA, S. and WATANABE, K. 1994. Applications of Bacterial Cellulose in Cellulosic Polymers., Gilbert, R., Ed., Hanser Publishers Inc., Cincinnati, OH.
- YAMANAKA, S., WATANABE, K., KITAMURA, N., IGUCHI, M., MITSUHASHI, S., NISHI, Y. and URYU, M. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **J. Mater. Sci.**, **24**:3141-3145.
- YAMANAKA, S., WATANABE, K. and SUZUKI, Y. 1990. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. European patent 0396344A2.
- YANG, Y.K., PARK, S.H., HWANG, J.W., PYUN, Y.R. and KIM, Y.S. 1998. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **85**(3):312-317.
- YOSHINAGA, F., TONOUCI, 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.

- YOSHII Z., TANAKA, S., KONISHI, H., TAKAMURA, A., KOBAYASHI, M.
and IWASAKI, A. 1977. Studies on the specimen preparation methods for
scanning electron microscopy. **Med J.**, **26**:197-203.
- ZAAR, K. 1977. The biogenesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*.
Cytobiologie, **16**:1-15.
- ZHANG, Y.H.P. and LYND, L.R. 2006. A functionally based model for
hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. **Biotechnology and
Bioengineering**, **94**(5):888-898.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esin POYRAZOĞLU (ÇOBAN)
Doğum Yeri ve Tarihi : AYDIN/1975

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

-Diğer

1. Betül Bürün, **E. Poyrazoğlu (Çoban)**. "Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.)" Turk J Biol, 26:175-180,2002
2. Levent Tuna, Betül Bürün , İbrahim Yokaş , **E. Poyrazoğlu (Çoban)** . "The Effects of Heavy Metals on Pollen Germination and Pollen Tube Length in the Tobacco Plant". Turk J Biol, 26: 109-113,2002

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

1. **Poyrazoğlu(Çoban)**, E.; İşman, B.; Bıyık, B.B. "Coriolus versicolor'dan Polisakkaropeptit (PSP) Eldesi ve PSP'nin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi". 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006. Kuşadası
2. İşman, B.; Şahiner, A.; **Poyrazoğlu(Çoban)**, E.; Bıyık, H.H. "Tarihi Yapılarda Üreyen Funguslar Üzerinde Dezenfektan Denemeleri". 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006. Kuşadası.
3. Başbülbul, G.; Ateşlier, Z.B.B.; İşman, B.; **Poyrazoğlu(Çoban)**, E.; Oryaşın, E.; Metin, K.; Bıyık, H.H. "Menderes Nehri' ne verilen bazı fabrika arıtım tesisleri çıkış sularının mutajenitelerinin, AMES/Salmonella test sistemiyle belirlenmesi". 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006. Kuşadası.
4. H. Ünsal, M. Baklaya, H. Bıyık, C. Ünsal, G. Başbülbul, **E. Poyrazoğlu**, D. Kozacı. "Wistar Sıçanlarında Kalitatif ve Kantitatif Protein Malnutrisyonunun Sekal Mikrobiyotaya Zamana Bağlı Etkileri" 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ağustos-03 Eylül 2004, Konya.

5. **E. Poyrazoğlu (Çoban)**, M.Kırmacı, B.Cicioğlu Arıdoğan, S.Yaşar, A.Gül Karahan.”Bazı Karayosunu Ekstraktlarının Antibakteriyal Etkilerinin Belirlenmesi”. 13. Biyoteknoloji Kongresi,2003. Çanakkale.
- 6.B.Bürün, F.Altan, M.Ateş, **E. Poyrazoğlu (Çoban)**, H.Bıyık. “Muğla Yöresinde Yetişen Bazı Bitkilerin Kallus Kültürü ve Kallusların Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması” 13. Biyoteknoloji Kongresi,2003. Çanakkale.
7. **E. Çoban**, M. Işıloğlu.” Bazı Yenen Mantarların Antimikrobiyal Aktiviteleri” Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi, 20-22 Eylül 2000.Bergama.
8. **E. Çoban**, M. Işıloğlu.” Antimicrobial Activity of Some Macrofungi” Second Balcan Botanical Congress, 14-18 Mayıs 2000. İstanbul.

c) Katıldığı Projeler

1. “Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi”. ADÜ Bilimsel Araştırma Komisyonu. Proje no: FEF-04002. Proje elemanı.
2. “Çalkamalı (Havalandırılmalı) Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi”. TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje No: 1006T448. Proje elemanı.
3. “Aydın İli Evsel ve Endüstriyel Atık Sularının Mutajenik Etkilerinin Ames Testiyle Belirlenmesi. ADÜ Bilimsel Araştırma Komisyonu”. Proje No: A.D.Ü-FEF-3012. Proje elemanı.
- 4.Öğrenci Projesi: “Doğal Kaynaklardan (karınca yumurtası, karınca toprağı ve normal toprak) Yoğurt Yapımı ve Yoğurt Yapımında Etkili Olan Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanısı”. (TÜBİTAK- Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / 1999-2001
Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / 2001-2007

İLETİŞİM

E-posta Adresi : epoyrazoglu@adu.edu.tr
Tarih : 20.08.2007