

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİRKEDEN İZOLE
EDİLEN ASETİK ASİT BAKTERİSİ İLE SELÜLOZ ÜRETİMİ
VE BAKTERİYEL SELÜLOZ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK TOP

DENİZLİ, ARALIK - 2018

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**SİRKEDEN İZOLE EDİLEN ASETİK ASİT BAKTERİSİ İLE
SELÜLOZ ÜRETİMİ VE BAKTERİYEL SELÜLOZ
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK TOP

DENİZLİ, ARALIK - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Burak TOP tarafından hazırlanan “Sirkeden İzole Edilen Asetik Asit Bakterisi İle Selüloz Üretimi ve Bakteriyele Selüloz Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17.01.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

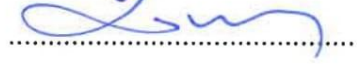
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN



Üye
Prof. Dr. Ahmet KOLUMAN



Üye
Doç. Dr. Selcen BABAĞLU AYDAŞ



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...13/02/2019 tarih ve ...07/20... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017FEBE018 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Burak TOP

ÖZET

SİRKE DEN İZOLE EDİLEN ASETİK ASİT BAKTERİSİ İLE SELÜLOZ ÜRETİMİ VE BAKTERİYEL SELÜLOZ KARAKTERİZASYONU YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK TOP

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, ARALIK - 2018

Bu yüksek lisans tezinde, üzüm sirkesinden (Denizli-Çal) izole edilen ve 16S rDNA ile tür tayini yapılan *Komagataeibacter xylinus* bakterisinden bakteriyel selüloz (BS) üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Besiyeri tipi, farklı karbon kaynakları, pH, sıcaklık, yüzey alanı ve inkübasyon sürelerinin selüloz üretimine etkisi incelenmiştir. En iyi BS üretimine M1A05P5 besiyerinde 30°C’de ve 1,06 cm⁻¹ yüzey alanı/hacim oranında ulaşılmıştır. 30°C ve 1,06 cm⁻¹ yüzey alanı/hacim oranında pH: 3,5’te inkübasyonun 21. gününde 1,303 g/L BS üretilmiştir. Tek karbon kaynağı olarak glukoz ilave edildiğinde maksimum üretim pH 6,5’te inkübasyonun 14. gününde 2,3635 g/L olmuştur. SEM analizlerine göre M1A05P5 besiyerinde selüloz lifleri daha çok fibril demetleri halinde olup, pH 3,5’te elde edilen selülozun fibril çapı 34,87-45,97 nm arasında iken aynı besiyerinde pH 6,5’te 29,71-102,3 nm’dir. TGA analizleri, BS örneklerindeki dehidrasyon basamağındaki kütle kaybının 50°C-150°C sıcaklıkları arasında, ikinci bozunma basamağının ise 215°C ile 228°C arasındaki sıcaklıklarda başladığını göstermiştir. BS örneklerin elektriksel iletkenliği, 300-400 K sıcaklık aralığında incelenmiş ve elektriksel iletkenliğinin sıcaklığa üstel olarak bağımlı olduğu ve artan sıcaklıkla birlikte iletkenliğin arttığı görülmüştür. Diğer bir deyişle, BS tipik yarı iletken davranışı göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Komagataeibacter xylinus*, Bakteriyel selüloz, Selüloz asetat, SEM, FT-IR, TGA, Elektrik iletkenliği

ABSTRACT

PRODUCTION OF CELLULOSE BY ACETIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM WINE VINEGAR AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE

MSC THESIS

BURAK TOP

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, DECEMBER 2018

In this research, bacterial cellulose (BC) was produced and characterized from *Komagataeibacter xylinus* bacterium isolated from wine vinegar (Denizli-Çal) and determined by 16S rDNA sequence analysis. The effect of types of nutrient, different carbon sources, pH, temperature, surface area and incubation period were detected on production of bacterial cellulose. The best BS production was found in M1A05P5 medium at temperature 30°C and 1,06 cm⁻¹ surface area/volume. Under these conditions (30°C and 1,06 cm⁻¹), BC was produced 1.303 g/L at pH 3.5 after 21 days incubation. When glucose as carbon source was added in medium, the amount of BC was found 2.3635 g/L at Ph 6.5 after 14 days incubation. According to SEM analysis, the diameters of bacterial cellulose fibers produced in M1A05P5 medium are 34.87-45.97 nm at pH 3.5 and 29.71-102.3 nm at pH 6.5. TGA analysis showed that the weight loss in the dehydration step in the BS samples started between 50°C and 150°C and the decomposition step started between 215°C and 228°C. The electrical conductivity of the BS samples was investigated in the temperature range of 300-400 K and the electrical conductivity was exponentially dependent on the temperature and the conductivity increased with increasing temperature. In other words, bacterial cellulose has shown typical semiconductor behavior.

KEYWORDS: *Komagataeibacter xylinus*, Bacterial cellulose, Cellulose acetate, SEM, FT-IR, TGA, Electrical conductivity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1 Bakteriyel selülozun endüstriyel uygulamaları	6
3. TEZİN AMACI.....	9
4. MATERYAL VE METOD	10
4.1 Materyal.....	10
4.2 Metod.....	10
4.2.1 Selüloz Üreten Asetik Asit Bakteri İzolasyonu	10
4.2.2 Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler	11
4.2.3 İzole Edilen Suşların Tanımlanması	11
4.2.4 16S rDNA Amplifikasyonu	12
4.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi	13
4.2.6 Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Kültür Şartları	14
4.2.7 Bakteriyel Selülozun Temizlenmesi	14
4.2.8 Bakteriyel Selülozdan Selüloz Asetat Sentezi	14
4.2.9 Selüloz Asetatın Sabunlaşma Reaksiyonu ile İkame Derecesinin Hesaplanması	15
4.2.10 Bakteriyel Selülozun Elektriksel İletkenliğinin Belirlenmesi	16
4.2.11 FT-IR, TGA ve SEM Analizleri	16
5. BULGULAR	17
6. TARTIŞMA	41
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
8. KAYNAKLAR.....	52
9. EKLER.....	63
10. ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 5.1: Bakterilerin gram mikroskopisi ve HS agar besiyerinde koloni görünümleri	17
Şekil 5.2: İzolasyonda kullanılan besiyerleri	18
Şekil 5.3: Jel görüntüleri.	20
Şekil 5.4: Bakteriyel selüloz üretimi ile ilgili görüntüler.	25
Şekil 5.5: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün farklı karbon kaynaklarından ürettiği bakteriyel selülozların SEM görüntüleri.....	31
Şekil 5.6: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün farklı pH'lardaki M1A05P5 besi yerinde üretmiş olduğu bakteriyel selülozun SEM görüntüleri.	32
Şekil 5.7: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün M1A05P5 besi yerinde üretmiş olduğu bakteriyel selülozdan elde edilen selüloz asetat görüntüleri	33
Şekil 5.8: Bakteriyel selüloz örneklerinin FTIR grafikleri	34
Şekil 5.9: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4 bakterisinin farklı karbon kaynağı ilaveli HS besiyerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin termogravimetrik analiz ve diferansiyel termal analiz eğrileri	37
Şekil 5.10: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4 bakterisinin M1A05P5 besiyerinde farklı pH değerlerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin ve o örneklerden elde edilen bakteriyel selüloz temelli selüloz asetatın termogravimetrik analiz eğrileri.....	38
Şekil 5.11: Bakteriyel selülozların elektriksel iletkenliğinin sıcaklığa göre değişimi	39

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan primerler.....	13
Tablo 5.1: İzolatların biyokimyasal karakterizasyonunda kullanılan testler	19
Tablo 5.2: 1491R-27F primer PCR ürünlerinin sekans analizi.....	21
Tablo 5.3: 1491R-529F primer PCR ürünlerinin sekans analizi.....	23
Tablo 5.4: İzolatların HS besiyerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları	24
Tablo 5.5: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4 bakterisinin HS besiyerinde inkübasyon süresine bağlı olarak ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları.....	24
Tablo 5.6: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün karbon kaynağı ilaveli HS besiyerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları	26
Tablo 5.7: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün M1A05P5 besiyerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları	27
Tablo 5.8: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün M1A05P5 besiyerinde pH:3,5'te ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları.....	28
Tablo 5.9: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün M1A05P5 besiyerinde pH: 6,5'te ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları.....	29
Tablo 5.10: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4'ün M1A05P5 besiyerinde farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları..	30
Tablo 5.11: <i>Komagataeibacter xylinus</i> S4 bakterisinin farklı karbon kaynağı ilaveli HS besi yerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin TGA-DTA eğrilerinden okunan bazı sonuçlar.....	36
Tablo 5.12: <i>Komagataeibacter. xylinus</i> S4 bakterisinin M1A05P5 besiyerinde farklı pH değerlerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin ve o örneklerden elde edilen bakteriyel selüloz temelli selüloz asetatın TGA-DTA eğrilerinden okunan bazı sonuçlar	39

SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

°C	:	Santigrad derece
µl	:	Mikrolitre
BS	:	Bakteriyel Selüloz
CaCO ₃	:	Kalsiyum Karbonat
cm ⁻¹	:	Yüzey Alanı/Hacim
dH ₂ O	:	Distile Su
FTIR	:	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
g	:	Gram
H ₂ S	:	Hidrojen Sülfür
H ₃ PO ₄	:	Fosforik Asit
HCl	:	Hidroklorik Asit
KOH	:	Potasyum Hidroksit
L	:	Litre
M	:	Molar
meV	:	Milielektron Volt
ml	:	Mililitre
N	:	Normal
Na ₂ HPO ₄	:	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
nm	:	Nanometre
SA	:	Selüloz Asetat
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	:	Termogravimetrik Analiz
V	:	Volt
v/v	:	Hacim/Hacim
w/v	:	Ağırlık/Hacim
Ω-cm	:	Ohm santimetre

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden bu yana mikrobiyolojiyi alanında vizyon ve becerilerimi geliştiren, tez ve laboratuvar çalışmalarım sırasında doğru ve yanlış gösteren, her konudaki düşüncelerimi sabırla dinleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, bana ve potansiyelime duyduğu güveni içtenlikle hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Çalışmalarımın kimya ve analiz kısımlarında bana yol gösteren, mühendis bakış açısının nasıl olduğunu öğrenmeme vesile olan sayın hocam Doç. Dr. Erdal UĞUZDOĞAN'a,

DNA sentezi ve PCR gibi biyokimyasal konularda bana yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a,

Elektrik iletkenliği çalışmalarındaki yardımlarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Orhan KARABULUT'a,

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvarda birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım, sıklıkla beyin fırtınası yaparak birlikte problemlere çözüm aradığımız ve birlikte araştırdığımız, zaman zaman "Ablayım ben!" diyerek her derdime koşarak desteğini esirgemeyen lab arkadaşım Merve TEPE'ye,

Kardeşim olsa anca bu kadar severim dediğim, iyi ve kötü günümde yanımda olan dostlarım Yaşarcan GÜLCAN ve Ömer AYCAN'a,

Küçüklüğümde bu yana bilim aşkımı destekleyen teyzelerim Rahime TANRIÖGEN ve Reyhan YILMAZ'a,

Yüksek enerjisi ve sevgisiyle her zaman yanımda olan nişanlım Gerda BABILAITE'ye,

Tüm hayatını bana adanmış olan, canımdan çok sevdiğim annem Nurgül TURHAN'a en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim.

1. GİRİŞ

$(C_6H_{10}O_5)_n$ kimyasal formülüne sahip olan selüloz, tekrar eden D-glukozların 1 – 4 β - glikozidik bağlarını içerir. Çok sayıda hidroksil grupları bulundurmasına rağmen suda çözünmez. Bitkilerin hücre çeperlerine katıldığından doğada en çok bulunan, yenilenebilir, düşük maliyetli, biyoyumluluk ve biyobozunur özellikleri ve geniş kullanılabilirliği olan organik polimerdir. Bu nedenden dolayı selüloz ve türevleri; kağıt, gıda, ilaç, tekstil gibi büyük endüstriyel alanlarda kendisine sıklıkla yer bulmuştur (Ang, 1991; Heinämäki ve diğ., 1994; Ren ve diğ., 2009).

Bitkisel kaynaklı liflerdeki selüloz miktarı kaynağa göre değişmekte ve yapısında çoğunlukla lignin, pektin ve hemiselüloz bulundurmaktadır. İntramoleküler ve intermoleküler hidrojen bağları sebebiyle termoplastik değildir, erime sıcaklığından önce ayrışır. Selüloz türevleri olan; selüloz esterleri (Nitroselüloz, Selüloz asetat) ve eterleri (Metilselüloz, Etilselüloz, Hidroksietilselüloz, hidroksipropilselüloz, karboksimetilselüloz) endüstriyel olarak kullanılmaktadır (Huang ve Li, 1998; Stevens, 1999).

Küresel ısınma, karbondioksit emisyonunun artması, petrol bazlı materyallerin biyobozunurluklarının uzun yıllar alması ve çevreyi kirletmeleri, nüfus artışından kaynaklanan ihtiyaçların ve ham madde ihtiyacının günden güne artması gibi sebepler bilim insanlarını biyomateryallere yönlendirmiştir. Tam da bu noktada; şeker, nişasta ve selüloz gibi biyokütle uygulamaları, plastik üretiminde fosil kaynakların kullanımının yerini alabilecek bir yaygın görüşü ortaya çıkarmıştır. Buna rağmen üretimlerinin maliyetli olması ve endüstriyel uygulamalar sırasındaki yüksek sıcaklıklar dezavantaj yaratmaktadır.

Selüloz, çoğunlukla bitkisel kaynaklardan ve onların atıklarından elde edildiğinden, ağaçların ve ormanların kesilmesi, hemiselüloz ve ligninin uzaklaştırılması sırasında uygulanan asit-baz uygulamaları da global çapta çevre sorunlarına sebep olmaktadır. Hayatımızın her alanında bulunan mikroorganizmalardan bazı bakteri türleri de bitkisel selüloza alternatif olabilecek hücre dışı polimerik madde olarak selüloz sentezlemektedirler. Bu nedenle, günümüzde “Bakteriyel Selüloz (BS)” üzerine yapılan çalışmalar giderek çoğalmaktadır.

Bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı moleküler formüle sahip olmasına rağmen, farklı makromoleküler özellikler (lignin, pektin ve hemiselülozdan serbest olması, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek polimerizasyon derecesi, yüksek mekanik mukavemet, yüksek kristallilik) barındırması bakteriyel selülozun endüstriyel kullanımındaki potansiyelini arttırmaktadır. Bu potansiyel göz önüne alındığında, yapılan çalışmalardaki artışı görmek mümkün hale gelmektedir (Yamanaka, 1989; Iguchi, 2000; Ul-Islam, 2012).

2. LİTERATÜR TARAMASI

Bakteriyel selüloz ilk olarak 1886 yılında Adrian J. Brown tarafından yayınlanmıştır. Sirke fermantasyonu sırasında besiyeri üzerindeki zar tabakası oluşumundan sorumlu organizma *Bacterium aceti* olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda *Acetobacteraceae* ailesi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* ve *Granulibacter* cinsleriyle sınıflandırılmıştır. 16s rRNA sekanlama ve teknolojiye ilerlemeler bazı *Gluconacetobacter* cinslerinde flagella bulunmasından dolayı tekrar adlandırılmıştır. Son olarak 2014 yılında Yamada flagellaya sahip hareketli bakterilerinin *Komagataeibacter* olarak adlandırılmasını önermiştir (Brown, 1886; Yamada, 2008; Yamada, 2012; Yamada, 2014).

Acetobacter, *Agrobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* ve *Sarcina* cinsleri de selüloz üretmelerine karşın, *Komagataeibacter xylinus* (*Gluconacetobacter xylinus*)'un farklı birçok karbon ve azot kaynaklarını kullanarak yüksek oranda bakteriyel selüloz üretim kapasitesi olduğundan halen model organizma olarak kullanılmaya devam etmektedir (Rangaswamy, 2015).

Komagataeibacter xylinus; gram negatif, çubuk ve hareketsizdir. Krem renkli yuvarlak, kenarları düz ya da pürüzlü koloni morfolojilerine sahiptir. Zorunlu aerobdurlar ve oksijen varlığında etanolü asetik asite, glukozu ise glukonik asite çevirirler (Yamada, 2012).

Yüksek selüloz üretim kapasitesi olan yeni bir bakteri türü bulabilmek için bilim insanları, meyvelerden (üzüm (Kojima ve diğ., 1998) ve çürük üzüm (Son ve diğ., 2002), elma suyu (Dellaglio ve diğ. 2005) ve çürük elma (Hungunt ve Gupta, 2010), kavun (Kojima ve diğ. 1998), limon ve papaya (Suwanposri ve diğ.,2013), çiçeklerden (passiflora (Suwanposri ve diğ.,2013)), fermente gıdalardan (sirke fermantasyonu atıklarından (Aydın ve Aksoy, 2009), malt (Jia ve diğ., 2004)), içeceklerden (kombucha çayı (Nguyen ve diğ., 2008)) bakteriyel selüloz üreten bakteri izole etmişlerdir.

Bakteriyel selüloz, bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı moleküler formüle sahip olmasına rağmen; lignin, pektin ve hemiselülozdan serbest olmasından dolayı saflığının yüksek olması, yüksek su tutma kapasitesi, katlama ve kaplamaya uyumlu olması, transparan olması, yüksek polimerizasyon derecesine sahip olması, yüksek kristallenme indeksi, nano ölçekli fibril yapıda olması, çekme mukavemetinin yüksek olması gibi farklı makromoleküler özellikler göstermektedir (Yamanaka, 1989; Iguchi, 2000; Ul-Islam, 2012; Yano ve diğ. 2005) Bakteriyel selülozun mikrofibriler yapısı Muhlethaler tarafından 1949 yılında elektron mikroskop çalışmalarıyla gösterilmiştir (Muhlethaler, 1949).

Besiyeri çeşitleri, bakteriyel selüloz üretimini etkileyen faktörler ve optimizasyon koşulları, genetik çalışmalar, yalnızca bakteri gelişimi için değil aynı zamanda selüloz üretiminin de verimini artırmaya yönelik çalışmalardır. Bakteriyel selüloz üretim maliyetini düşürmek için çok sayıda farklı besiyeri kombinasyonları, endüstriyel atıklar, meyve kabukları gibi ucuz kaynaklar araştırılmaktadır (Çakar ve diğ. 2014). BS üretiminde standart besiyeri olarak en çok tercih edilen Hestrin–Schramm (HS) besiyeri, az miktarda karbon kaynağı ve sitrik asit içermekle birlikte azot içeriği bakımından zengindir. Literatürde selüloz üretiminde karşılaşılan bir diğer besiyeri olan Yamanaka besiyeri ise bol miktarda karbon kaynağı bulundurur ve mineralce zengindir. Diğer taraftan, Zhou besiyeri ise HS ve Yamanaka besiyerlerinin kombinasyonlarından oluşmaktadır. Mısır likörü ve früktoz besiyeri; inositol, nikotik asit, timin, pantotenik asit ve zengin mineral içeriğiyle bilim insanları tarafından büyük çapta üretimler için kullanılmıştır. Literatürde farklı karbon kaynakları, melas gibi atık materyaller veya çeşitli besiyerlerinde selüloz üretimi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Jung ve diğ. 2010, Hungund ve diğ. 2010; Gomes ve diğ. 2013, Li ve diğ. 2015). *Enterobacter amnigenus* GH-1 HS besiyerinde 2.5 g selüloz üretirken, geliştirilmiş ortamda selüloz veriminin 4.1 g/l olduğu bildirilmiştir. Fruktoz, kazein hidrolizat, maya özütü, disodyum fosfat, sitrat ve metal iyonlarının eklenmesinin selüloz üretimi için uyarıcı olduğu bulunmuştur.

Ayrıca pekmez, nişasta hidrolizatı, şeker kamışı suyu, hindistan cevizi suyu, hindistan cevizi sütü, ananas suyu, portakal suyu ve nar suyu gibi meyve su takviyesinin üretim maliyetini düşürerek, bakteriyel selülozun ticari olarak büyük ölçeklerde üretilmesi için önemli bir rol oynayacağı da rapor edilmiştir (Hungund ve Gupta, 2010). Benzer şekilde zeytinyağı fabrikası atık materyallerinden de umut verici selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir (Gomes ve diğ. 2013).

Bakteriyel selüloz üreten bakteri türleri üzerinde bakteriyel selüloz verimini artırmaya yönelik genetik manipülasyonlar da yapılmıştır. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Leuconostoc mesenteroides*'den alınan sükroz fosforilaz geninin *Acetobacter* suşuna aktarıldığında sükroz içeren besiyerinde 20. saatten sonra bakteriyel selüloz miktarında artış gözlenmiştir (Tonouchi ve diğ. 1998). Diğer taraftan, *E. coli*'den alınan *lacZ* geni *Acetobacter xylinus*' a eklendiğinde peynir altı suyunda 28 kat fazla BS üretimi ve 160 kat β -galaktozidaz aktivitesi görülmüştür (Bernardo ve diğ. 2004).

Glikoz içeren besi yerlerinde karşılaşılan sorunlardan bir tanesi inkübasyon sırasında *Komagataeibacter* bakterilerin glikozu glikonik asite çevirmesidir. Glikonik asit pH'ı düşürdüğünden selüloz üretiminin düştüğü görülmüştür. Kuo ve arkadaşları (2016) asetat tamponu ile pH'ı kontrol altına almaya çalışmışlar ve daha fazla verim elde ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda, *K. xylinus*' un sitoplazmik zarında bulunan glikoz dehidrogenaz geni homolog rekombinasyon ile susturularak mutant suşlar elde edilmiş ve mutant suşların %230 daha fazla selüloz ürettikleri belirtilmiştir (Kuo ve diğ. 2015).

Çalkalamalı ve havalandırılmı inkübasyon uygulamalarında genel kanı, BS üretimindeki düşüşün, selüloz üretmeyen mutantların (*sel -*) hızlı çoğalmalarından dolayı, selüloz üreten bakterilerin (*sel +*) önüne geçerek BS veriminin düşmesi yönündedir. Bu sorunun giderilmesi amacıyla son zamanlarda *sel -* mutantlarına *sel +* özellik kazandırma yönünde bilimsel çalışmalar yapılmaktadır (Krystynowicz ve diğ. 2002).

2.1 Bakteriyel selülozun endüstriyel uygulamaları

Bakteriyel selülozun ticari ve endüstriyel olarak üretiminde öne çıkan ilk önemli nokta bakteriyel selülozun yüksek miktarlarda üretilmesidir. Bunun için bilim insanları biyoreaktörleri kullanarak yüksek oranlarda verim elde etmeye çalışmışlardır. Chao ve arkadaşları (2001) hava köprülü biyoreaktör kullanarak 10.4 g/L bakteriyel selüloz elde etmişlerdir. Buna rağmen yüksek enerjiye ihtiyaç duyulması ve biyofilm oluşumu uzun zaman alması dezavantaj yaratmaktadır (Chao ve diğ. 2001). Hava köprülü biyoreaktörlerde bakteriyel selülozun inkübasyonu sırasında, şafta yapışmasından dolayı homojenite problemi ortaya çıkmaktadır (Lin ve diğ. 2013). Bu yüzden ilk olarak Serafica ve arkadaşları dönen disk biyoreaktörünü kullanmışlardır. Disklerin yüzeyi sürekli rotasyon ile besi yeri ve hava arasında yer değiştirir. Bu sayede bakteriyel selülozun statik inkübasyonda olduğu gibi mekanik özelliklerini kaybetmeden üretilmesi sağlanmış olur. Biyofilm reaktörleri, yüksek biyokütle yoğunluğuna sahip reaktör sistemi olarak sermaye maliyetini düşürebilecek sistemler olarak görülmekte iken, immobilize hücrelerin zamanla bozulması dezavantaj sağlamaktadır (Serafica ve diğ. 2002).

Pinto ve arkadaşları (2016) yaptıkları akut toksisite, sitotoksisite ve genotoksisite çalışmalarında BS'nin toksisitesine rastlamamışlardır (Pinto ve diğ. 2016). Bu yüzden bakteriyel selüloz; antimikrobiyal film (Dobre, 2012), yara iyileşiminde (Wen ve diğ. 2015), yapay deri ve cilt dokusu tamirinde (Fu ve diğ. 2012), yapay kan damarı (Wan ve diğ. 2011), yapay kıkırdak (Nimeskern ve diğ. 2013), kardiyak protezler (Millon ve Wan, 2006), yapay kornea (Wang ve diğ. 2010), kontak lens (Levinson ve Glonek, 2010), kemik iyileşiminde (Zimmermann ve diğ. 2011), dişlerde kanal tedavisinde (Yoshino ve diğ. 2013) kullanılmaktadır. Yanık ve yara tedavisinde yeniden epitel doku oluşumu o bölgenin nem tutmasıyla doğru orantılıdır (Winter, 1962). Yara iyileşiminde etkilerini test etmek için, ticari olarak kullanılan ürünlerle BS ürünleri karşılaştırılmış ve "*Biofill*"in geçici olarak cilt yerine geçebilecek özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Üstelik BS yüksek oranda su tutma kapasitesine sahip olduğundan, ameliyat sonrası rahatsızlıkta azalma, daha hızlı iyileşme, ağrıda ve enfeksiyonda azalma ve tedavi süresinde kısalma gibi pozitif klinik endikasyonlar da göstermiştir (Jonas ve Farah, 1998).

BS, gıda endüstrisinde ilk olarak Filipinler'de "Nata de Coco" adıyla ticari olarak kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar da Nata de Coco'nun bağırsak kanserini, koroner damarlarda kan pıhtılaşmasını ve glikoz intoleransını engellediği de bildirilmiştir (Esa ve diğ. 2014). *Monascus* mantarı – BS kompleksi vejeteryanlar için et veya deniz ürünleri yerine geçebilecek potansiyel göstermiştir (Keshk, 2014). BS, sükröz ve karboksimetilselüloz kombinasyonlarıyla gıda ürünlerinin dağılması engellenmiştir. Bu yüzden potansiyel olarak düşük kalorili katkı, koyulaştırıcı, stabilizatör, macun ve dondurma katkısı olarak da kullanılabilceği belirtilmiştir (Okuyama ve diğ. 1993; 1992^a; 1992^b).

Çalkalamalı inkübasyonda üretilen BS'nin yüksek kaliteli kağıt üretiminde uygun olduğu ilk olarak Johnson ve Neogi tarafından 1989 yılında yayınlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarla da desteklenmiştir. %15 BS eklenen kağıt, saf kağıt hamuruna oranla yaklaşık 4 kat daha fazla katlanma dayanıklılığı ve yaklaşık 2 kat fazla gerilme kuvveti göstermiştir (Iguchi ve diğ. 2000). Shah ve Malcolm Brown bakteriyel selülozu elektronik kağıt olarak kullanmışlardır. BS tabakları arasına elektrokromik boyalar yerleştirilmiştir. Daha sonra uygun voltaj uygulandığında, aynı açma kapama düğmesi gibi boyanın kağıt üzerinde görünmesi veya görünmemesi sağlanmıştır. Bu uygulamanın tekstil ve elektronik görüntüleme teknolojilerinde kullanılabilceği öngörülmüştür (Shah ve Malcolm Brown 2005; 2004).

BS esnek bir matris olarak elektronik ve manyetik alanlarda da kullanılmaktadır. İyi şeffaflık ve esnekliğe sahip olan çinko sülfid / BS / epoksi reçine nanokompozitinin yarı iletken olarak optoelektronik biyomedikal uygulamalarda potansiyeli olduğu belirlenmiştir (Guan ve diğ. 2016). Diğer benzer bir yaklaşım BS membranlarının glikoz ve oksijen kullanarak elektrik akımı üreterek medikal implantlar için enerji kaynağı olarak kullanılmasıdır. Oksijen indirgenmesi için kullanılan gümüş nanopartikülleri içeren BS, gümüş nanopartiküllerden daha yüksek akım yoğunluğu göstermiştir (Zhang ve diğ. 2015).

Selülozun yüksek ekonomik değere sahip ürünlere dönüşümü yeşil ve sürdürülebilir kimya alanlarında büyük ilgi görmüş ve yeni teknolojilerin geliştirilmesini sağlamıştır. Selüloz türevlerine sentezlenirken yüksek oranda saflık aranmaktadır. Endüstriyel anlamda selüloz asetat; düşük maliyetli, toksik ve yanıcı olmayan, yenilenebilir ve biyobozunur özelliklerinden dolayı en önemli selüloz esterlerindedir. Selüloz asetat, selülozun sülfürik asit varlığında asetik anhidrit ve asetik asitle tepkimesiyle sentezlenir (Candido ve diğ. 2017) ve daha önce bazı bilim insanları tarafından bakteriyel selülozdan sentezlenmiş, asetilasyon yöntemleri, fiziksel ve termal özellikleri üzerinde çalışılmıştır. Bakteriyel selülozun, selüloz asetat sentezinde bitkisel kaynaklı selüloza alternatif olabileceği belirlenmiştir (Barud ve diğ. 2008, Yamamoto ve diğ. 2006; Kim ve diğ. 2002; Tabuchi ve diğ. 1998).

Teknolojideki hızlı gelişmeler selüloz asetatın 3D yazılmasına imkan tanımıştır. Pattinson ve Hart (2017) yaptıkları çalışma ile aseton içeriğinde çözünmüş selüloz asetatı 3D yazıcı ile nesnelere dönüştürüp antimikrobiyal özellik kazandırmışlardır. 3D yazıldıktan sonra sodyum hidroksit ile muamele edilerek hidrojen bağları geri kazandırılmış ve sıklıkla kullanılan akrilonitril bütadien strin (ABS) ve polilaktik asit (PLA)'den daha güçlü ve sert materyal elde etmişlerdir (Pattinson ve Hart, 2017)

3. TEZİN AMACI

Bilindiği üzere selüloz, yoğun olarak bitki kaynaklarından elde edilmektedir. Bu da ciddi çevresel sorunlara yol açmaktadır. Ancak günlük yaşantımızın vazgeçilmez bir polimeri olan selülozun yerini alacak bir başka polimer de mevcut değildir. Dolayısıyla selüloz kaynaklarının akılcı olarak kullanılması ya da korunması stratejileri içine bakteriyel selüloz üretimi de dahil edilmelidir.

Bakteriyel selüloz söz konusu olduğunda, özellikle bakterilerin kısa sürede polimer üretebilmeleri, selülozun saflığı, yüksek su tutma kapasitesine sahip olması ve üretim sürecinde kolaylıkla yeni düzenlenmeler yapılabilmesi gibi çok sayıda avantajları mevcuttur. Diğer taraftan bakteriyel selüloz, çevre korunmasına karşı bitkisel selüloza alternatif olarak kabul edilse de üretim maliyeti fazladır. Bu nedenle bakteriyel selüloz ile ilgili araştırmalar, farklı mikroorganizmalardaki selüloz üretimi, farklı çevrelerden selüloz üreten yeni mikroorganizma izolasyonu, selüloz ürettiği bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilip üretiminin artırılmasına yönelik yeni düzenlemeler ya da çeşitli ve ekonomik karbon kaynaklarında gelişebilen mikroorganizmaların seçimine yöneliktir. Biz de ön çalışma niteliği taşıyan bu yüksek lisans tez projesinde, Denizli-Çal yöresine ait bir sirkeden selüloz üreten bakteri izole ederek, selülozun karakterizasyonunu yapmayı amaçladık. Bu amaca yönelik, literatürde selüloz üretiminde kullanıldığı bilinen standart gelişme ortamları kullanılmış ve yerel izolatomuzun selüloz üretim kapasitesi hakkında bilgi elde etmek için genel bir tarama yapılmıştır. Elde edilen bakteriyel selülozun SEM, FT-IR ve TGA analizleri yapılarak yapısı ve morfolojik görünümü incelenmiş ve elektriksel iletkenliği araştırılmıştır. Ayrıca selüloz asetat sentezi de gerçekleştirilerek endüstriyel uygulama alanlarında kullanılabilirliği hakkında ön bilgi hedeflenmiştir.

4. MATERYAL VE METOD

4.1 Materyal

Selüloz üreten asetik asit bakterileri, Pamukkale Üniversitesi Çal Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü tarafından, Çal ve bölgesinden toplanan üzümlerden 2015 yılında yapılan sirkeden izole edilmiştir. İzolasyon kaynağı, Dr. Öğr. Üyesi Aysel Yeşilyurt Er'den temin edilmiştir.

4.2 Metod

4.2.1 Selüloz Üreten Asetik Asit Bakteri İzolasyonu

Selüloz üreten asetik asit bakterisi izolasyonunda Hestrin-Schramm (HS) besiyeri, gelişme ve stok ortamı olarak kullanılmıştır (Hestrin ve Schramm, 1954). HS besiyeri hazırlamak için 20 g/L Glukoz, 2,7 g/L Na₂HPO₄, 1,15 g/L Sitrik asit, 5 g/L Pepton, 5 g/L Maya özütü ve 14 g/L Agar (katı besiyeri için) tartılmış ve 6 N HCl ve NaOH ile pH=6'ya ayarlanmıştır. Besiyeri, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Üzüm sirkesinden alınan örnekler dilüsyon yapılarak, hazırlanan HS agarlı besiyerlerine ekim yapılmıştır. Farklı koloni tiplerine sahip 12 örnek HS sıvı besiyerine ekilerek, besiyeri üzerinde jölemsi pelet tabakası oluşturup oluşturmadığı bakımından gözlenmiştir.

4.2.2 Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

İzolatların, geleneksel gram boyama prosedürü ile gram özellikleri, Carr ve Frateur (Kalsiyum karbonat – etanol) besiyerleri ile de izolatların asetik asit üretimlerinin kontrolü sağlanmıştır.

Carr besi yeri; 30 g/L Maya özütü, 0,022 g/L Bromkresol moru, 20 g/L Agar ve 20 ml/L Etanol ile hazırlanmıştır. pH 6'ya, %50 v/v H₃PO₄ ve 6 M KOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra, %2 v/v Etanol sonradan ilave edilmiştir. İçeriğinde kalsiyum karbonat bulunan Frateur besiyeri ise 0,5 g /L Glukoz, 3 g/L Pepton, 5 g/L Maya özütü, 15 g/L Kalsiyum Karbonat, 12 g/L Agar ve 15 ml/L Etanol kullanılarak hazırlanmış ve %50 v/v H₃PO₄ ve 6 M KOH ile pH=6'ya ayarlanmıştır. Besiyeri, 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra, %1,5 v/v Etanol sonradan ilave edilmiştir (Fugelsang ve Edwards, 2007).

İzolatların selüloz üretim aktivitesinin, besiyeri üzerinde gözlemlenmesi amacıyla selüloza bağlanan non spesifik bir flokrom olan fluorescent brightener 28 (FB28, Calcoflour beyazı) HS besi yerine 0,2 g/L oranında eklenerek UV altında incelenmiştir (Rangaswamy ve diğ. 2015).

4.2.3 İzole Edilen Suşların Tanımlanması

Bakteriyel izolatların, tür tayini 16S rDNA sekanslaması ile yapılmıştır. Bakteriyel DNA izolasyonu için, Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit kullanılmıştır. DNA saflaştırma aşamaları aşağıda verilmiştir.

- 0,25 g Selülaz 1200 µl distile suda çözülerek stok hazırlanmıştır.
- Hazırlanan bu stoktan 200 µl alınarak, 5 ml bakteri kültürü içine ilave edilmiş ve selüloz pelikülü içindeki bakterilerin serbest kalması için 30°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 2 ml bakteri hücre kültürü 10 dakika 5000 x g'de santrifüj edilmiştir.

- 180 µl Digestion çözeltisi ve 20 µl Proteinaz K eklenip homojen çözelti oluşana kadar vortekslenmiştir. 30 dakika boyunca 56°C'de çalkalamalı su banyosunda tamamen liziz olması sağlanmıştır.
- 20 µl RNase çözeltisi eklenip 10 dakika boyunca vortekslenen örneklerle 200 µl Liziz çözeltisi eklenmiş ve homojen çözelti elde edinceye kadar örnekler tekrar vortekslenmiştir.
- Daha sonra 400 µl %50 etanol eklenip vortekslenerek lizat elde edilmiştir. Elde edilen lizat GeneJET Genomic DNA saflaştırma kolonuna aktarılarak, 1 dak. 6000 x g santrifüjlenmiştir.
- Örneklerle, 500 µl etanol eklenmiş yıkama tamponu I konularak 1 dk 8000 x g satrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µl etanol eklenmiş yıkama tamponu II eklenmiş ve 3 dk maksimum hızda santrifüjlenmiştir.
- 200 µl Elüsyon tamponu eklenip oda sıcaklığında 1 dk 8000 x g satrifüjlendikten sonra elde edilen DNA analizler için -20°C ye kaldırılmıştır.

4.2.4 16S rDNA Amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışımı; 15 µl Taq polimeraz master mix (2X Amp Master Taq Cat. No: 541-010), 2 µl 27F (forward) primer, 2 µl 1491R (reverse) primer, 2 µl 529F (forward) primer, 5 µl bakteri DNA'sı ve son hacim 30 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır. İlk denatürasyon 95°C'de 2 dakika, primer bağlanma 56°C'de 30 saniye, uzama 72 °C'de 1 dakika olarak 35 döngü ile PCR tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş, sekans analizi için TRIOPEN BİYOTEKNOLOJİ (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan primerler

	Sekans	TM©	GC%	Molekül Ağırlığı		Verim		Birim (µ)
				Hesaplanan	Ölçülen	OD	nmol	
1491R	5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT- 3'	59.4	47.62	6372.2	6378.3	6.5	30.0	0.05
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	58.4	50.0	6148.0	6152.1	6.5	30.0	0.05
529F	5'-GTG CCA GCM GCC GCG G-3'	61.0	81.25	4896.2	4903.1	5.2	32.0	0.05

4.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

%1 lik hazırlanan agaroz jel solüsyonu, yaklaşık 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra Etidyum bromid eklenerek jel kabına dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Polimerize olan jelden tarak çıkarıldıktan sonra DNA örnekleri 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış ve mikropipet yardımı ile kuyulara yüklenmiştir. Jelin yüzeyini kaplayacak şekilde yürütme tamponu ilave edilerek 100V altında örnekler jelde yürütülmüştür. Elektroferez işlemi tamamlandıktan sonra DNA bantları jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

4.2.6 Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Kültür Şartları

Bakteriyel selüloz (BS) üretimi için HS besiyeri (Hestrin ve Schramm, 1954), M1A05P5 besiyeri (Çakar ve diğ. 2014) ve Yamanaka besiyeri (Yamanaka ve diğ. 1989) kullanılmıştır. Ayrıca HS besiyerine ksiloz, arabinoz, laktoz, mannitol, früktoz ve sükroz ilave edilerek BS üretimine etkisi araştırılmıştır.

Bakteriyel selüloz üretimi üzerine sıcaklık (20, 25, 30 ve 35 °C), pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5) ve inkübasyon süresi (4, 7, 14 ve 21 gün) gibi çevresel faktörlerin etkisi de araştırılmıştır.

Yüzey alanının BS üretimine etkisinin incelenmesi için 200 ml bakteri kültürü farklı boyutlardaki erlenmayerlerde (0,39 cm⁻¹, 0,66 cm⁻¹, 1,06 cm⁻¹ yüzey alanı /hacim oranı ile) geliştirilmiştir.

4.2.7 Bakteriyel Selülozun Temizlenmesi

İnkübasyon süreci sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan bakteriyel selüloz nazikçe alınarak 0,1 M NaOH içerisinde 80 °C'de 1 saat bekletilmiştir. NaOH ile muameleden sonra BS örnekleri nötral pH'ya ulaşana dek distile su yıkanmıştır (McKenna ve ark. 2009). Nötral pH'ya ulaşan BS'ler, Thermo Fisher ModulyoD Freeze Dryer ve Telstar LyoQuest ile liyofilize edilmiştir. Liyofilize bakteriyel selüloz örnekleri FT-IR, TGA ve SEM analizleri için -20°C'de saklanmıştır.

4.2.8 Bakteriyel Selülozdan Selüloz Asetat Sentezi

10 g liyofilize edilmiş bakteriyel selüloz için; 0,5 g konsantre sülfürik asit içeren 50 ml asetik asit (%100) çözeltisi karıştırılarak, cam çubuk yardımıyla selülozün çözelti içerisinde homojen karışması sağlanmıştır. Yapılan ön işlem den sonra 50 ml asetik anhidrit ve 20 ml asetik asit (%100) çözeltisi eklenip, 50°C'de su banyosunda bir gece bekletilmiştir. Süre sonunda tepkime sonrasında arta kalan asetik anhidriti yıkmak için, çözelti içerisine 60°C'de 25 ml asetik asit (%80) çözeltisi eklenerek bu aşamada herhangi bir çökelim olmamasına dikkat edilmiştir.

25 ml distile su nazikçe eklendikten sonra ilave 200 ml distile su daha eklenerek selüloz triasetatın beyaz toz halinde çökmesi sağlanmıştır. Distile suyun eklenmesiyle oluşan çökelti, filtrelenip yıkandıktan sonra etüv içerisinde kurutulmuştur. Elde edilen kuru haldeki çökelti kloroform içerisinde çözülerek petri kabı üzerine dökülmüştür. Kloroform havada uçurularak kuruması sağlanmış ve elde edilen selüloz triasetat analizler için stoklanmıştır (Braun ve diğ. 2013).

4.2.9 Selüloz Asetatın Sabunlaşma Reaksiyonu ile İkame Derecesinin Hesaplanması

Sentezlenen ürünün selüloz asetat olarak karakterize edilmesi için ikame derecesi, sabunlaşma reaksiyonu ile belirlenmiştir (Filho ve diğ. 2008). İkame derecesi glikozidik birimlerdeki hidroksil gruplarının yerini alan asetil gruplarının ortalama değeridir. Sabunlaşma tepkimesi için 0,1 g selüloz asetat tartılmış, üzerine 5 ml NaOH (0,25 mol/L) ve 5 ml Etanol eklenerek oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda 10 ml HCl (0,25 mol/L) eklenmiştir. 30 dakika sonrasında standart 0,25 mol/L NaOH kullanılarak titrasyon yapılmıştır. İndikatör olarak fenolftalein kullanılmıştır. Titrasyon, çözelti tamamen pembeye dönene kadar devam etmiştir. Titrasyon sonucunda aşağıda verilen denklem yardımıyla, selüloz asetattaki asetil gruplarının oranı yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\%AG = \frac{[(vb_i + vb_t)\mu_b - v_a \cdot \mu_a] \cdot 43 \cdot 100}{m_{ca}} \quad (4.1)$$

(%AG= Yüzde asetil grupları, V_{b_i} =Sisteme eklenen hacimce NaOH miktarı, V_{b_t} = Hacimce titrasyonda harcanan NaOH miktarı, μ_b = NaOH konsantrasyonu, V_a = Sisteme eklenen hacimce HCl miktarı, μ_a = HCl konsantrasyonu, 43 = Asetil grubunun molekül ağırlığı, m_{ca} = Selüloz asetat örneğinin ağırlığı)

4.2.10 Bakteriyel Selülozun Elektriksel İletkenliğinin Belirlenmesi

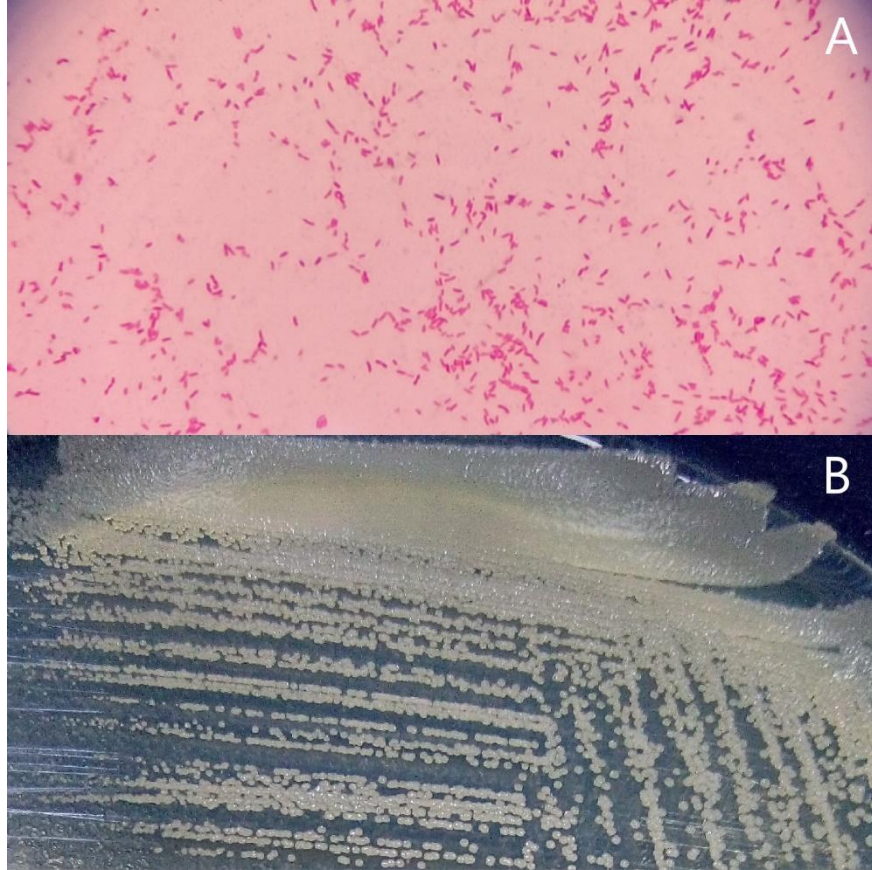
Bakteriyel selülozun elektriksel iletkenliği, 300-410 K sıcaklık aralığında incelenmiştir. Elektriksel ölçümleri yapılacak olan numunelere, elektriksel iletimi sağlaması için iletken ince teller gümüş pasta yardımı ile tutturulmuştur. Omik kontakları alınan BS örnekleri Janis marka kriyostat içerisine yerleştirilmiş, sıcaklık kontrolü ise LakeShore 331 sıcaklık kontrol ünitesi ile sağlanmıştır. Sistemde akım kaynağı olarak KEITHLEY 2400 akım-voltaj kaynak-ölçüm cihazı kullanılmıştır.

4.2.11 FT-IR, TGA ve SEM Analizleri

Liyofilize edilen bakteriyel selülozun ve sentezlenen selüloz asetatın elektron mikroskop analizleri PAÜ-İLTAM ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskop biriminde yaptırılmıştır. Termal analizler Pamukkale Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazım USTA'nın laboratuvarında, FT-IR analizleri ise Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM)'inde yapılmıştır.

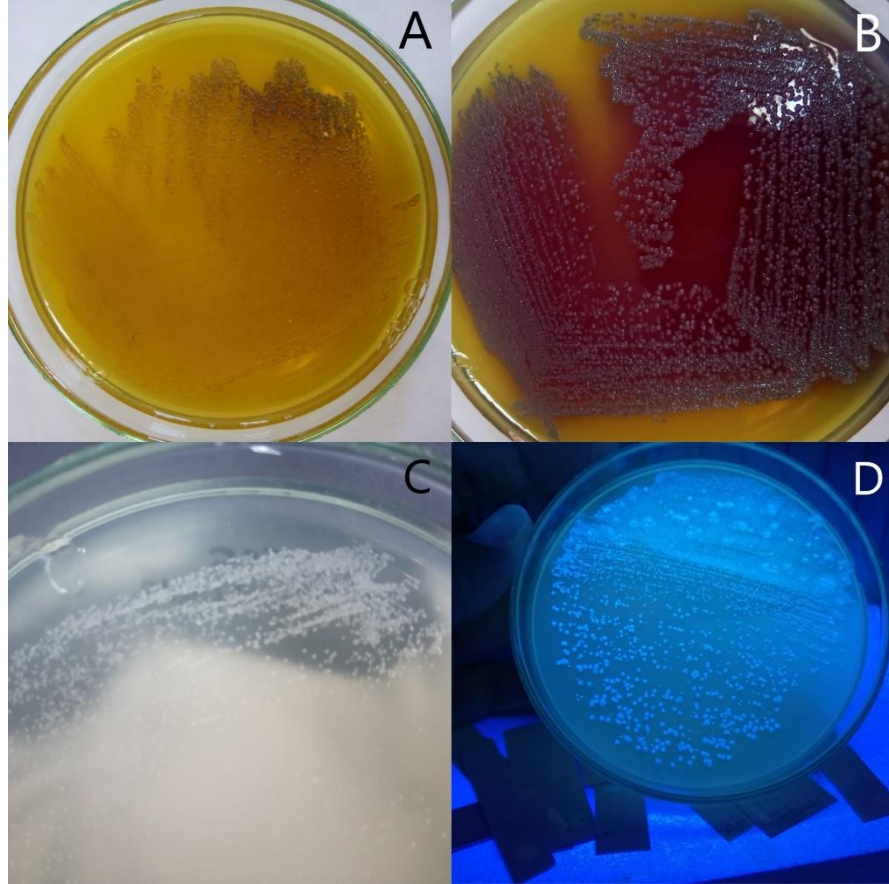
5. BULGULAR

HS agar besiyeri yüzeyinde oluşan farklı görünüme sahip toplam 12 izolat, HS sıvı besiyeri yerine ekimi yapılmış ve 30°C’de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yüzeyde pelet tabakası oluşturan 4 izolat selüloz (+) olarak kaydedilmiştir. Mikroskop altında incelendiğinde gram negatif ve çubuk olan izolatlar +4°C’ de stoklanmıştır. İzolatların koloni morfolojileri, yuvarlak, konveks ve köşeleri düzdür (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Bakterilerin gram mikroskopisi (A) ve HS agar besiyerinde koloni görünüşleri (B)

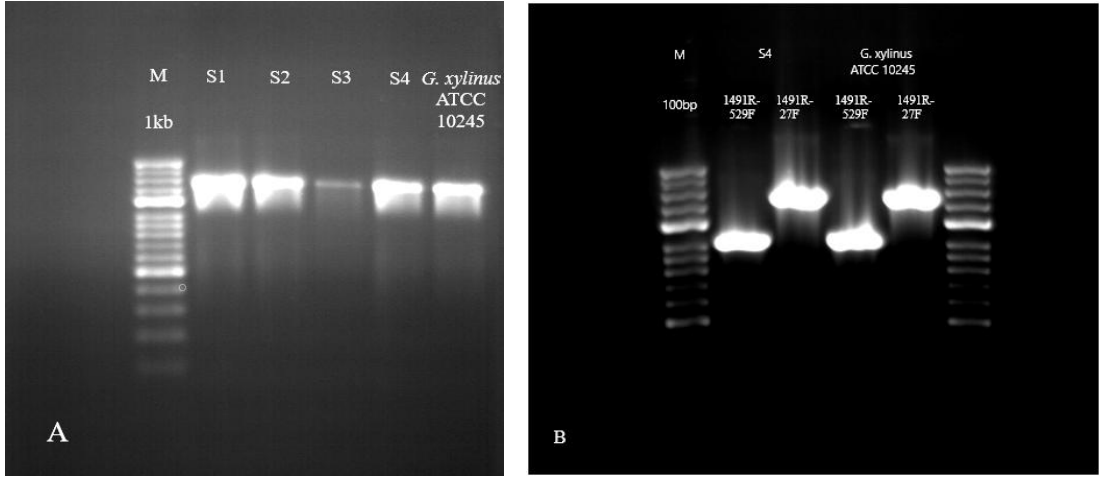
HS besi yerinde pelet oluşturan ve selüloz ürettiği düşünülen asetik asit bakteri izolatlarının, asetik asit üretimleri test edilmek amacıyla Carr ve Freuter besiyerine ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların ürettikleri asit nedeniyle besi yerinin rengi sarıya dönmüş ve asetik asit bakterileri oldukları doğrulanmıştır (Şekil 5.2 A ve Şekil 5.2 B). İzolatların Calcoflour Agara ekimleri yapılmıştır. Besiyerinde bulunan Flourescent brightener 28, selüloz liflerine bağlandığı için selüloz üreten koloniler UV ışık altında parlayarak selüloz üretmeyen kolonilerden ayrılmıştır (Şekil 5.2 D). CaCO₃ içeren Freuter besiyerinde ise koloniler etrafında şeffaf zonlar gözlenmiştir (Şekil 5.2 C). İzolatların bazı biyokimyasal testleri Tablo 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.2: İzolasyonda kullanılan besiyerleri. A ve B: Carr besiyerinde gözlemlenen renk değişimleri, C: CaCO₃ içeren Frauter besiyerinde koloni etrafında oluşan şeffaf zonlar, D: Calcoflour (FB28) içeren HS besiyerinde selüloz pozitif bakteri kolonilerinin UV ışık kaynağı altında görünümü

Tablo 5.1: İzolatların biyokimyasal karakterizasyonunda kullanılan testler

	S1	S2	S3	S4
Katalaz	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-
İndol üretimi	-	-	-	-
Sodyum sitrat kullanımı	-	-	-	-
Metil kırmızısı	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-
Üre kullanımı	-	-	-	-
Selüloz üretimi	+	+	+	+
Jelatin hidrolizi	-	-	-	-
CaCO ₃ ortamında gelişim	+	+	+	+
pH= 2'de gelişim	+	+	+	+
Glikozdan asit oluşumu	+	+	+	+
Sükrozdan asit oluşumu	+	+	+	+
Früktozdan asit oluşumu	-	+	+	+
Laktozdan asit oluşumu	-	-	+	+
Maltozdan asit oluşumu	+	-	-	+



Şekil 5.3: Jel görüntüleri A:İzolatların DNA izolasyonu sonrası jel görüntüleri, B: PCR ürünleri jel görüntüleri

İzole edilen suşların tanımlanması için Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolatlarının, 16S rDNA sekanslamasında sıklıkla kullanılan 1491R, 27F ve 527F primerleri kullanılarak amplifikasyonu sağlanmıştır. *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. Jel görüntüleri Şekil 5.3 ve identifikasyon sonuçları Tablo 5.2 ve Tablo 5.3'te verilmiştir.

Tablo 5.2: 1491R -27F primer PCR ürünlerinin sekans analizi (538 baz çifti olarak değerlendirilmiştir)

Örnek kodu	Tür/Cins	Max. Skor	Total Skor	Örtüşme Oranı	Ident Oranı	Erişim
S1-27F	Komagataeibacter sp. DS1MA.65B isolate DS1MA.65B	974	974	97	100	LN884053.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.66 isolate DS1MA.66	974	974	97	100	LN884049.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	974	974	97	100	LN884048.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.59B isolate DS1MA.59B	974	974	97	100	LN884045.1
	Komagataeibacter xylinus strain NBCR 13693	974	974	97	100	KX216693.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	974	974	97	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain HM_06 16S	974	974	97	100	KU695733.1
S2-27F	Komagataeibacter sp. DS1MA.65B isolate DS1MA.65B	974	974	97	100	LN884053.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.66 isolate DS1MA.66	974	974	97	100	LN884049.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	974	974	97	100	LN884048.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.59B isolate DS1MA.59B	974	974	97	100	LN884045.1
	Komagataeibacter xylinus strain NBCR 13693	974	974	97	100	KX216693.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	974	974	97	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain HM_06 16S	974	974	97	100	KU695733.1
S3-27F	Komagataeibacter sp. DS1MA.65B isolate DS1MA.65B	974	974	97	100	LN884053.1

Tablo 5.2: 1491R -27F primer PCR ürünlerinin sekans analizi (Devamı)

	Komagataeibacter sp. DS1MA.66 isolate DS1MA.66	974	974	97	100	LN884049.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	974	974	97	100	LN884048.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.59B isolate DS1MA.59B	974	974	97	100	LN884045.1
	Komagataeibacter xylinus strain NBCR 13693	974	974	97	100	KX216693.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	974	974	97	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain HM_06 16S	974	974	97	100	KU695733.1
S4- 27F	Komagataeibacter sp. DS1MA.65B isolate DS1MA.65B	974	974	97	100	LN884053.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.66 isolate DS1MA.66	974	974	97	100	LN884049.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	974	974	97	100	LN884048.1
	Komagataeibacter sp. DS1MA.59B isolate DS1MA.59B	974	974	97	100	LN884045.1
	Komagataeibacter xylinus strain NBCR 13693	974	974	97	100	KX216693.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	974	974	97	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain HM_06 16S	974	974	97	100	KU695733.1

Tablo 5.3: 1491R-529F primer PCR ürünlerinin sekans analizi (699 baz çifti olarak değerlendirilmiştir)

Örnek kodu	Tür/Cins	Max. Skor	Total Skor	Örtüşme Oranı	Ident Oranı	Erişim
S1 – 529F	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	1291	1291	100	100	LN884048.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	1291	1291	100	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain IM_07	1291	1291	100	100	KU686736.1
S2 - 529F	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	1291	1291	100	100	LN884048.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	1291	1291	100	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain IM_07	1291	1291	100	100	KU686736.1
S3 - 529F	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	1284	1284	100	99	LN884048.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	1284	1284	100	99	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain IM_07	1284	1284	100	99	KU686736.1
S4 - 529F	Komagataeibacter sp. DS1MA.62A isolate DS1MA.62A	1291	1291	100	100	LN884048.1
	Komagataeibacter xylinus strain ATCC 10245	1291	1291	100	100	KX216690.1
	Komagataeibacter intermedius strain IM_07	1291	1291	100	100	KU686736.1

İzolatların ürettikleri selüloz miktarları, HS besiyerinde test edilmiştir. BS üretim ile ilgili görseller Şekil 4’te verilmiştir. BS’nin yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 5.4’te verilmiştir. İzolatların ürettikleri selülozların kuru ağırlıkları birbirine yakın olmakla birlikte S4 bakterisinin diğer izolatlardan daha fazla selüloz ürettiği belirlenmiştir. Çalışmada, *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisi kullanılmıştır.

Tablo 2.4: İzolatların HS besiyerinde ürettiği selülozun* yaş ve kuru ağırlıkları (g/L)

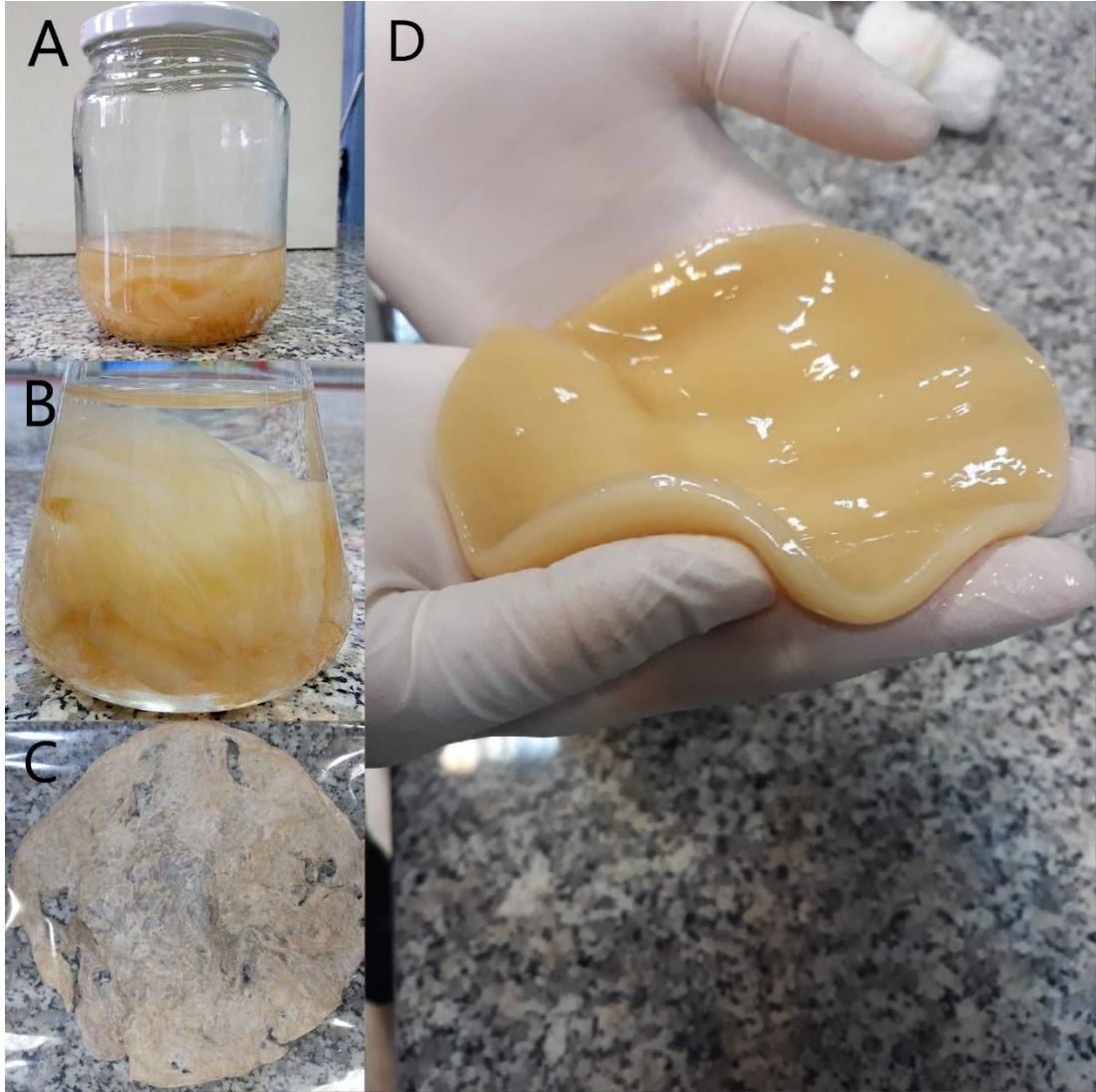
Bakteri kodu	Yaş ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
S1	52,858	0,253
S2	50,68	0,2586
S3	52,566	0,291
S4	57,45	0,3154
Ana Kaynak	195	1,378

*Bakteri izolatları standart besiyerinde 3 gün inkübe edilmişlerdir.

Selüloz üretimine kimyasal ve çevresel faktörlerin (besiyeri tipi, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, karbon kaynakları, yüzey alanı/hacim) etkisi çalışılmış ve ilgili sonuçlar Tablo 5.6 – 5.10’da verilmiştir.

Tablo 5.5: *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisinin HS besiyerinde inkübasyon süresine bağlı olarak ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L)

Bakteri Suşu	5. Gün		7. Gün		10. Gün		14. Gün	
	Kuru Ağırlık	Yaş Ağırlık	Kuru Ağırlık	Yaş Ağırlık	Kuru Ağırlık	Yaş Ağırlık	Kuru Ağırlık	Yaş Ağırlık
S4	0,632	51,8	0,512	53,552	0,44	40,964	0,65	55,478



Şekil 5.4: Bakteriyel selüloz üretimi ile ilgili görüntüler. A: İzolasyon için kullanılan sirke ana kaynak, B: Selülozun yıkama aşaması, C: Liyofilize edilen ve stoklanan bakteriyel selüloz, D: İzolasyon sonrasında M1A05P5 besiyerinde *Komagataeibacter xylinus* S4 suşunun 4 günlük inkübasyon sonunda üretmiş olduğu bakteriyel selüloz

Tablo 5.6: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün karbon kaynağı ilaveli HS besiyerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L; sıcaklık 30°C; başlangıç pH 6; inkübasyon süresi 4 gün)

Karbon kaynakları	Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)	Son pH
Ksiloz	17,25	0,095	4,89
Arabinoz	8,88	0,026	5,22
Laktoz	8,78	0,018	5,57
Mannitol	22,6	0,1901	5,54
Fruktoz	33,1	0,233	5,35
Sükroz	32,41	0,273	5,45
Glukoz (HS; Kontrol)	57,45	0,3154	3,65

HS besiyerindeki glukoz yerine, karbon kaynağı olarak ksiloz, arabinoz, laktoz, mannitol, fruktoz ve sükroz ilave edilerek bakterinin BS üretimi test edilmiştir (Tablo 5.6).

Tablo 5.7: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün M1A05P5 besiyerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L; sıcaklık 30°C; inkübasyon süresi 4 gün)

Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)	Başlangıç pH'sı	Son pH
170,7	0,36	3,00	2,57
152,7	0,721	3,50	2,89
192,7	0,5415	4,00	3,15
195,55	0,6015	4,50	3,39
176,8	0,5345	5,00	3,54
184,9	0,619	5,50	3,68
180,65	0,522	6,00	3,7
158,6	0,753	6,50	3,75

pH'nın BS üretimine etkisi incelendiğinde besiyerinin başlangıç pH'sı 3 - 6,5 arasında araştırılmış ve en iyi üretimin 3,5 (0,721 g/L) ve 6,5 (0,753 g/L)'ta olduğu görülmüştür (Tablo 5.7). Buna göre her iki pH'da BS üretimine sıcaklık ve yüzey alan etkisi beraber araştırılmıştır (Tablo 5.8 – 5.9). Yüzey alanı arttıkça BS üretiminin arttığı bulunmuştur. En iyi üretim 30°C' de gerçekleşmiştir (1,182 g/L).

Tablo 5.8: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün M1A05P5 besiyerinde pH:3,5'ta ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L; inkübasyon süresi 4 gün)

Yüzey alanı/Hacim* , Sıcaklık	Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
A1, 20°C	23,265	0,2025
A2, 20°C	60,3045	0,315
A3, 20°C	93,054	0,674
A1, 25°C	66,0185	0,3065
A2, 25°C	117,911	0,5425
A3, 25°C	154,075	0,8065
A1, 30°C	136,878	0,6325
A2, 30°C	210,7815	1,038
A3, 30°C	228,5775	1,182
A1, 35°C	154,858	0,6285
A2, 35°C	193,65	1,007
A3, 35°C	96,7025	0,7165

*A: Yüzey alanı/Hacim (A1: 0,39 cm⁻¹, A2: 0,66 cm⁻¹, A3: 1,06 cm⁻¹)

Tablo 5.9: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün M1A05P5 besiyerinde pH: 6,5 'ta ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L; inkübasyon süresi 4 gün)

Yüzey Alanı/Hacim*, Sıcaklık	Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
A1, 20°C	33,038	0,124
A2, 20°C	51,2725	0,217
A3, 20°C	102,8955	0,5005
A1, 25°C	42,388	0,1535
A2, 25°C	128,008	0,5655
A3, 25°C	175,1765	0,771
A1, 30°C	86,347	0,2725
A2, 30°C	209,596	0,97
A3, 30°C	253,343	1,358
A1, 35°C	146,9185	0,6365
A2, 35°C	209,513	0,9045
A3, 35°C	263,8215	1,2795

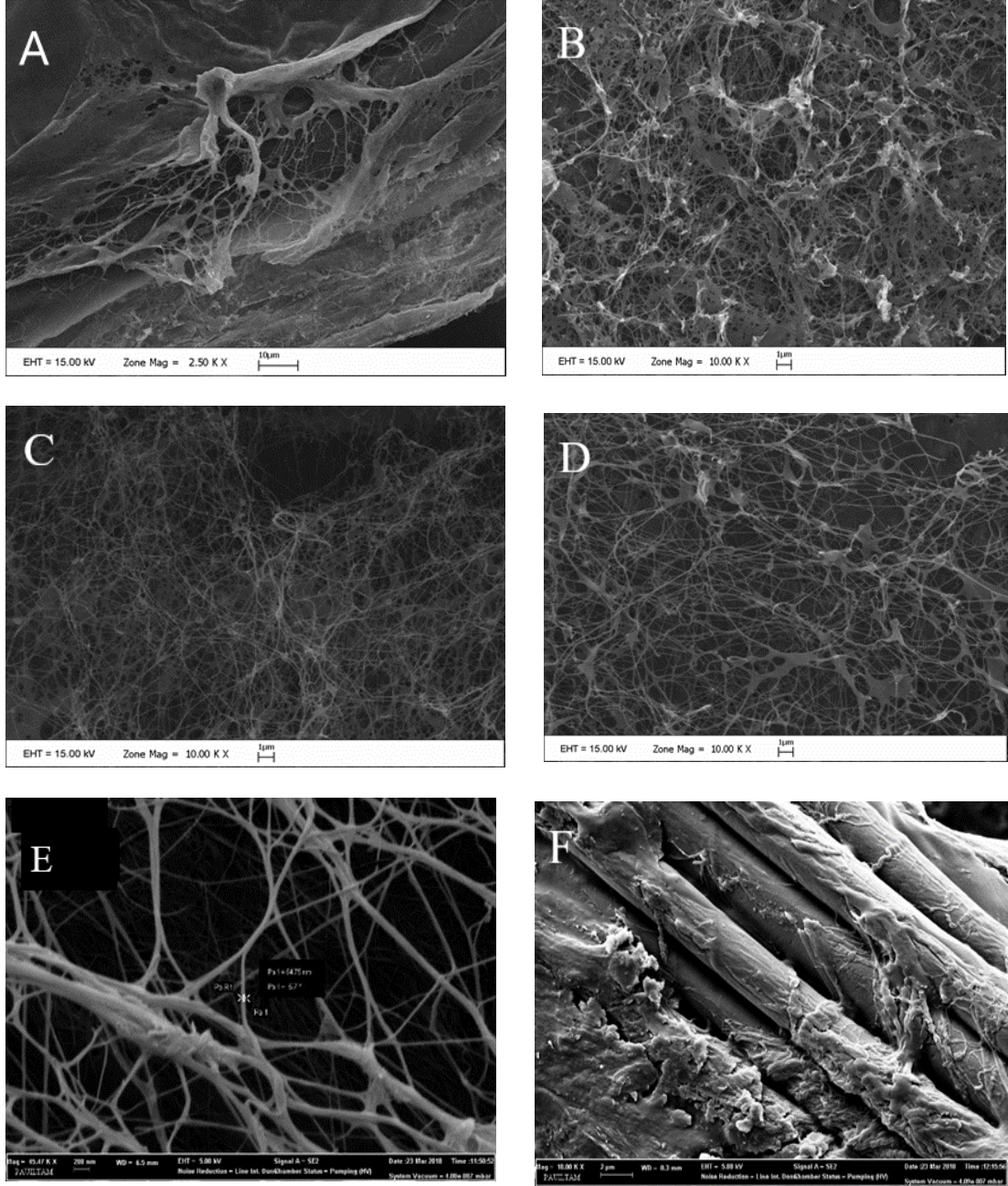
*A: Yüzey alanı/Hacim (A1: 0,39 cm⁻¹, A2: 0,66 cm⁻¹, A3: 1,06 cm⁻¹)

Tablo 5.10: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün M1A05P5 besiyerinde farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği selülozun yaş ve kuru ağırlıkları (g/L, A3*:1,06 cm⁻¹, 30°C)

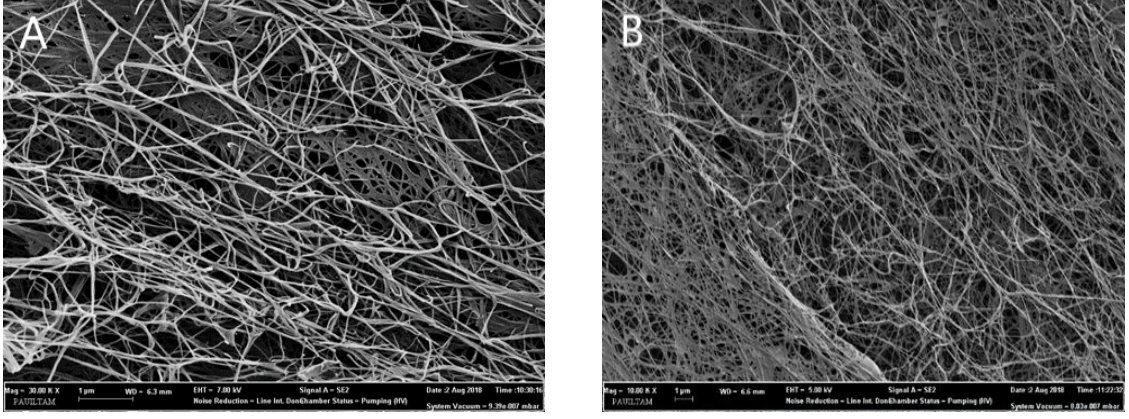
	Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)	Son pH
Başlangıç pH:3,5			
7. gün	117,085	1,145	3,11
14. gün	207,85	1,161	3,2
21. gün	204,1	1,303	3,12
Başlangıç pH:6,5			
7. gün	274,605	1,535	5,8
14. gün	463,8	2,3635	8,23
21. gün	335,6	1,8945	8,23

*A: Yüzey alanı/Hacim (A1: 0,39 cm⁻¹, A2: 0,66 cm⁻¹, A3: 1,06 cm⁻¹)

Komagataeibacter xylinus S4'ün farklı besi yeri ortamlarında üretmiş olduğu bakteriyel selülozun ipliksi yapıları ve farklılarının incelenmesi amacıyla SEM incelemeleri yapılmıştır. Yapılan SEM analizlerinde *Komagataeibacter xylinus* S4'ün üretmiş olduğu bakteriyel selüloz örnekleri literatür ile uygunluk göstermektedir (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6).

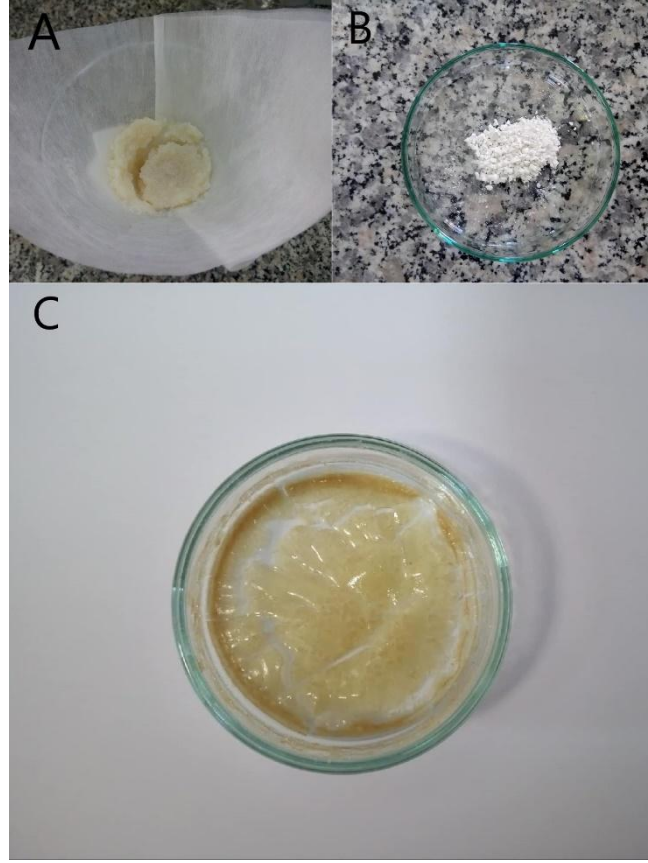


Şekil 5.5: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün farklı karbon kaynaklarından ürettiği bakteriyel selülozların SEM görüntüleri. A; Ana kaynaktan alınan bakteriyel selüloz, B; Standart HS besiyeri, C; Fruktöz ilaveli HS, D; Süktroz ilaveli HS, E; Laktoz ilaveli HS, F; Mannitol ilaveli HS



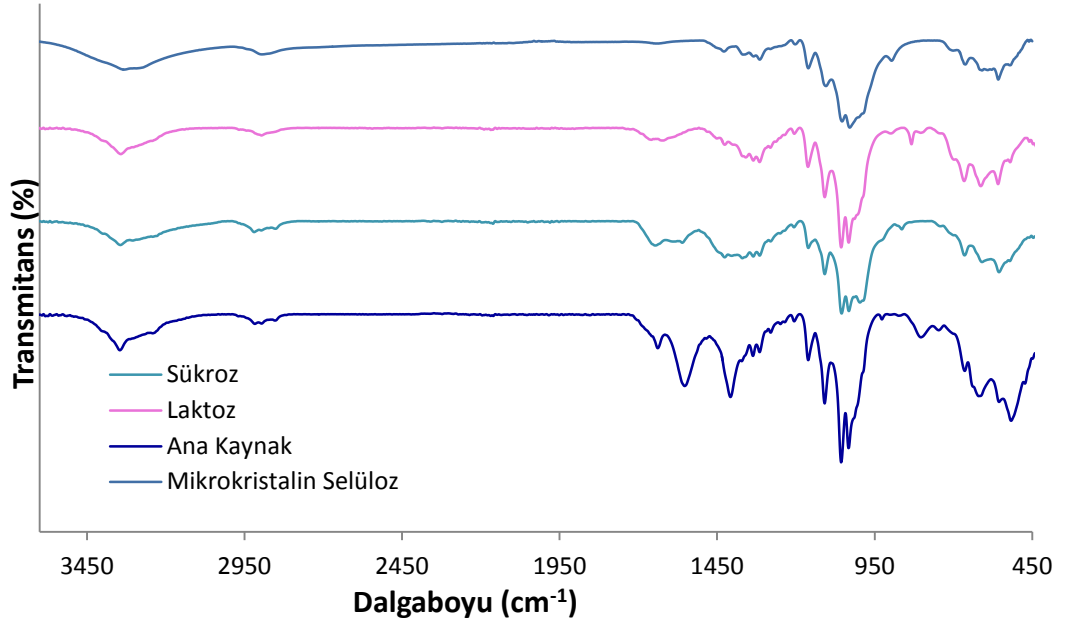
Şekil 3.6: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün farklı pH'lardaki M1A05P5 besi yerinde üretmiş olduğu bakteriyel selülozun SEM görüntüleri. A; pH 3,5 B; pH 6,5

Bakteriyel selülozdan sentezlenen selüloz triasetatın sahip olduğu asetil gruplarının oranı (4.1) denklemi kullanılarak %50.5 olarak bulunmuştur (Şekil 5.7). Bu örneğin karakterizasyonu FT-IR, TGA ve SEM analizleri ile yapılmıştır.

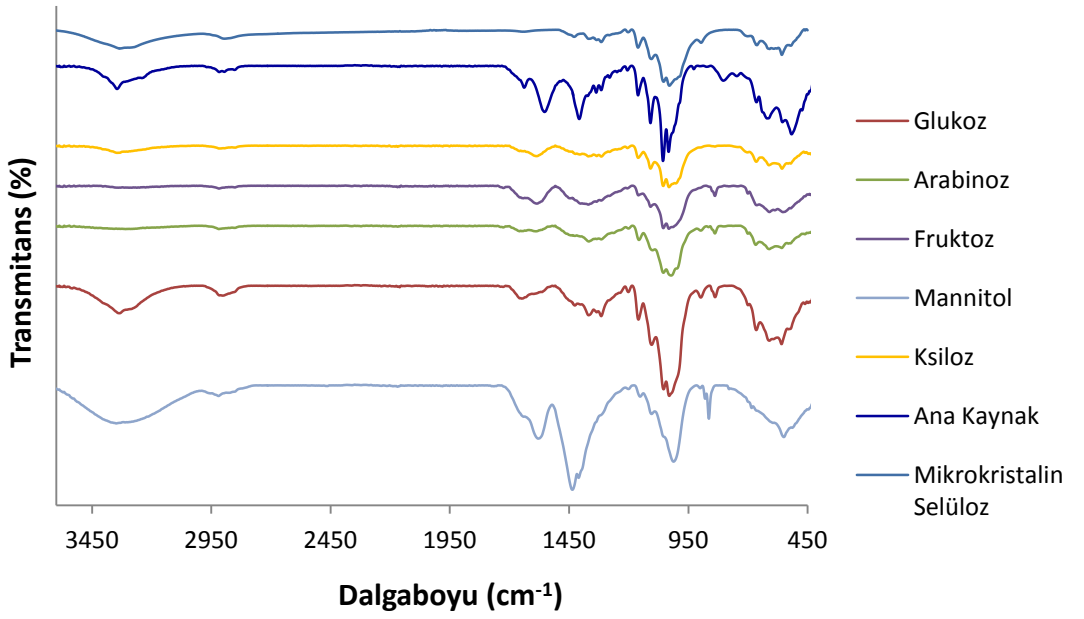


Şekil 5.7: *Komagataeibacter xylinus* S4'ün M1A05P5 besi yerinde üretmiş olduğu bakteriyel selülozdan elde edilen selüloz asetat görüntüleri A: Asetilasyon sonrası filtreleme işlemi B: Kuru haldeki bakteriyel selüloz asetat, C: DS 50.5 SA

Bakteriyel selüloz örneklerinin ATR-FTIR spektrumları 400 ve 4000 cm^{-1} dalga boyları arasında ATR-FTIR spektrofotometre (Bruker Vertex 70V, Germany) kullanılarak kaydedilmiştir (Şekil 5.8).

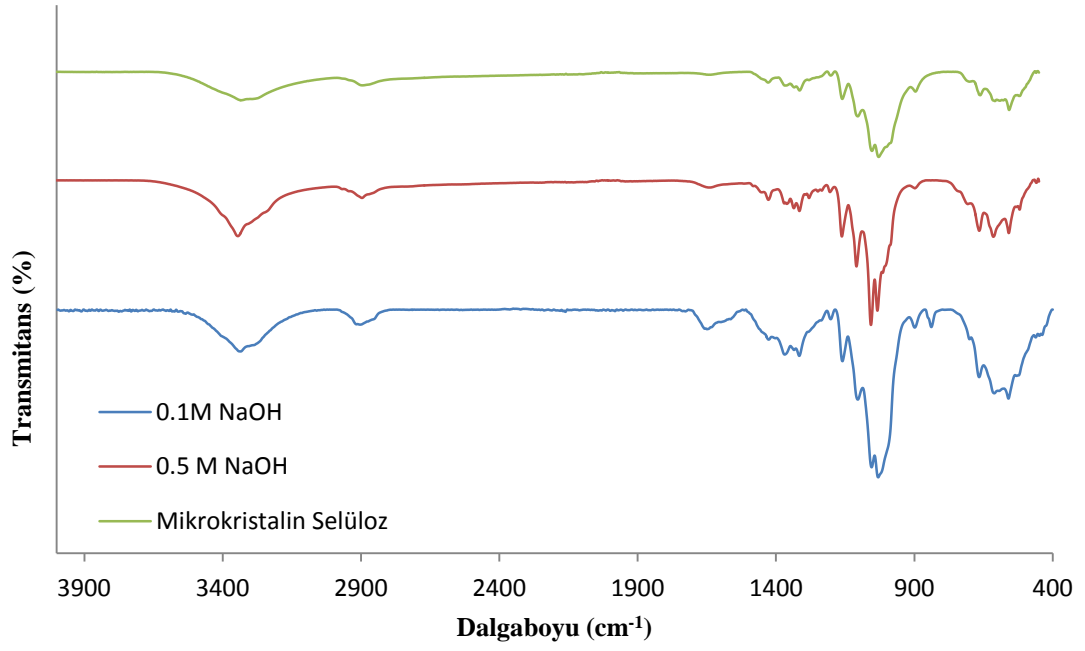


A

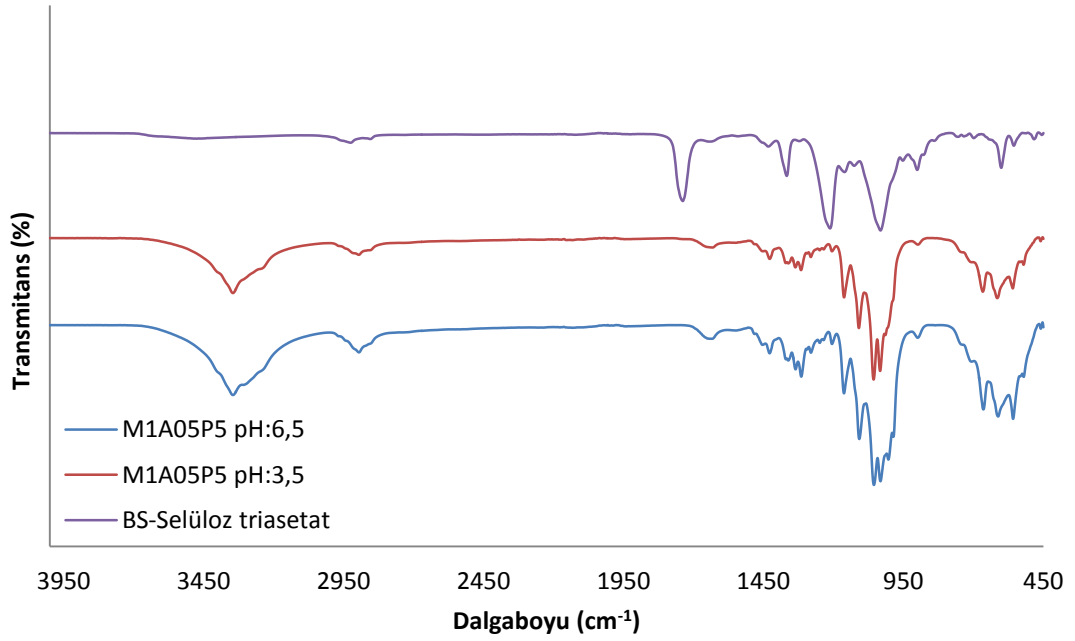


B

Şekil 5.8: Bakteriye selüloz örneklerinin FTIR grafikleri. A; Karbon kaynağı olarak monosakkaritler, B; Karbon kaynağı olarak disakkaritler, C; Yıkama prosedüründeki farklı konsantrasyondaki NaOH'ın etkisi, D; farklı pHlardaki M1A05P5 besiyerinde üretilen bakteriye selüloz ve bakteriye selülozdan sentezlenen selüloz triasetat.



C



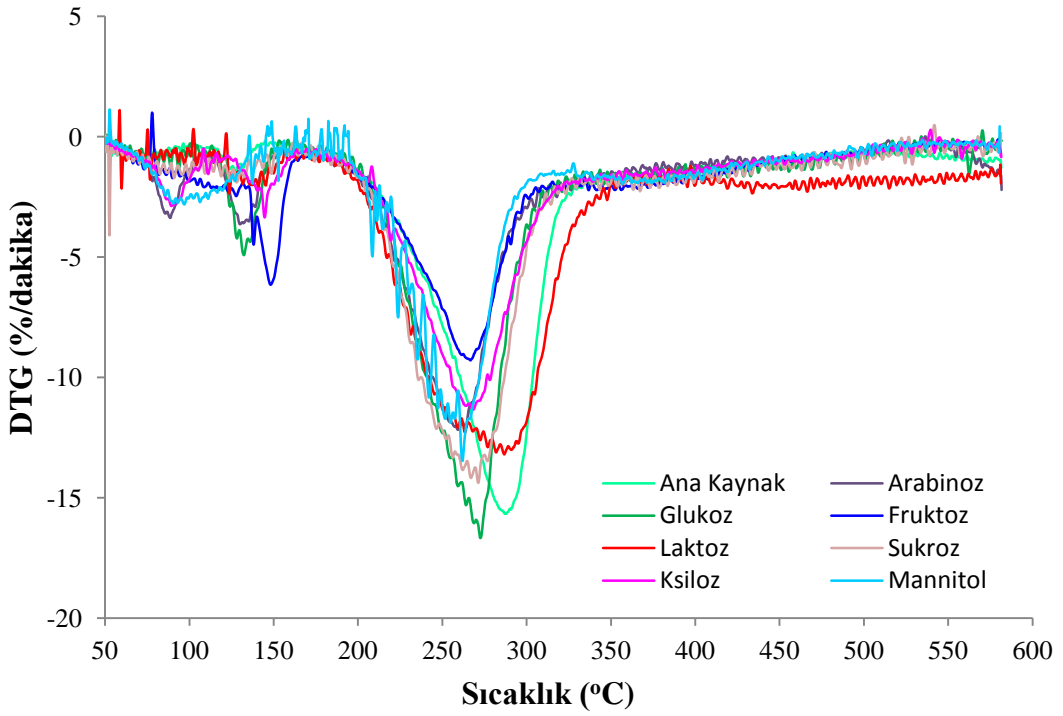
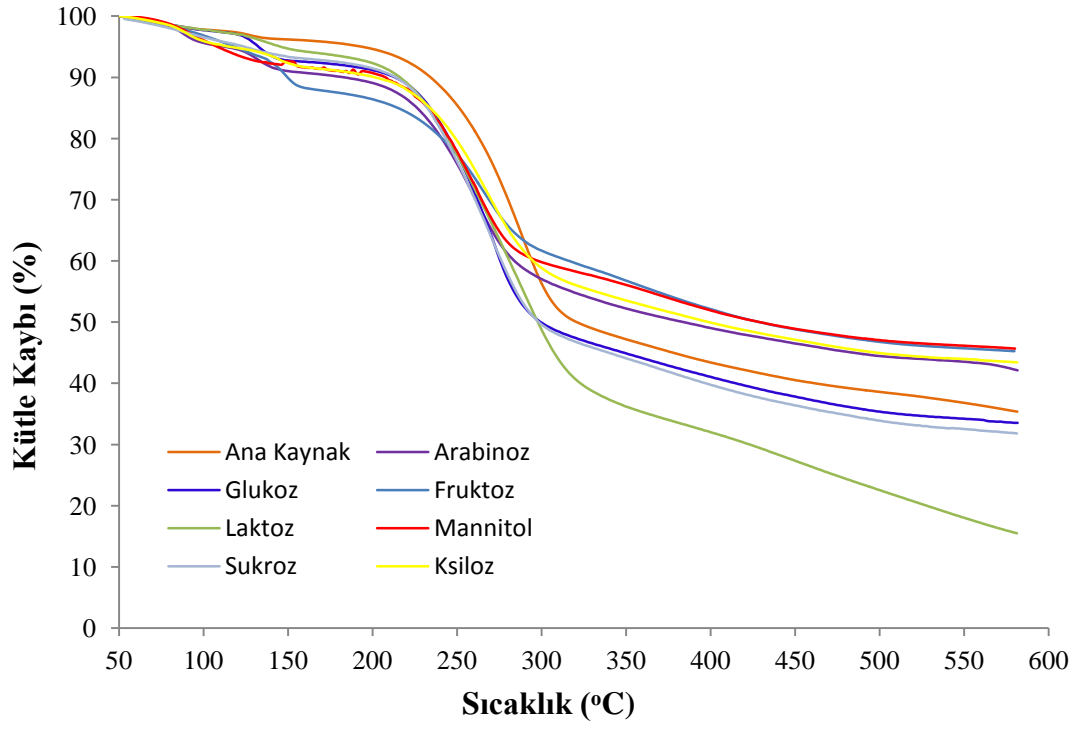
D

Şekil 5.8: Bakteriyel selüloz örneklerinin FTIR grafikleri. A; Karbon kaynağı olarak monosakkaritler, B; Karbon kaynağı olarak disakkaritler, C; Yıkama prosedüründeki farklı konsantrasyondaki NaOH'ın etkisi, D; farklı pHlardaki M1A05P5 besiyerinde üretilen bakteriyel selüloz ve bakteriyel selülozdan sentezlenen selüloz triasetat.

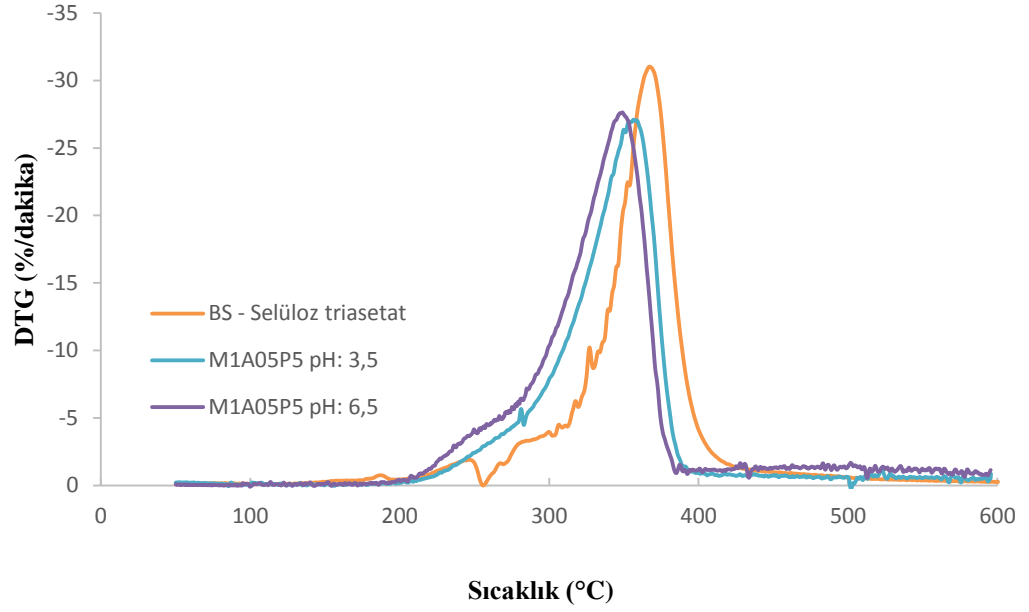
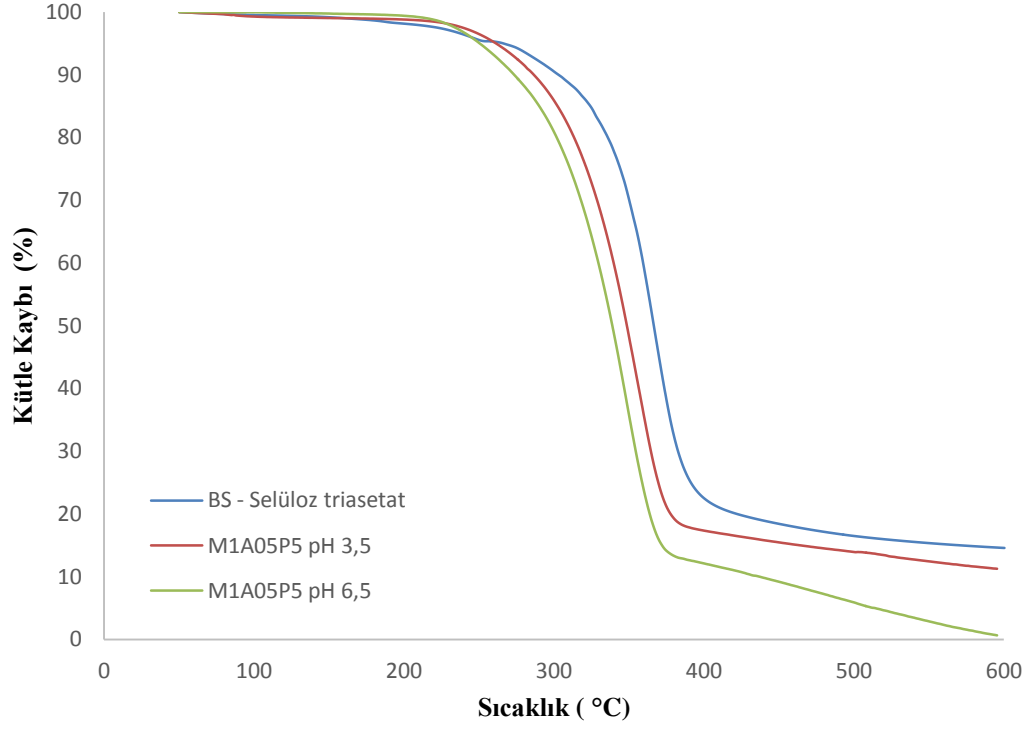
Farklı deney koşullarında üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin ısıl bozunma karakteristikleri, Perkin-Elmer Diamond marka termogravimetrik analiz (TG/DTA) cihazı ile elde edilmiştir. Bütün analizler dinamik azot ortamında (200 ml/dk akış hızında), 50°C ile 600°C sıcaklıkları arasında ve 20°C /dak ısıtma hızıyla seramik numune kaplar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde yaklaşık 5mg bakteriyel selüloz örnekleri kullanılmıştır.

Tablo 5.11: *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisinin farklı karbon kaynağı ilaveli HS besi yerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin TGA-DTA eğrilerinden okunan bazı sonuçlar

Karbon Kaynağı	T_{onset} (°C)	T_{offset} (°C)	T_{max} (°C)	550°C'de Piroliz Oranı (%)
Ana Kaynak	214,49	325,84	287,46	36,8
HS-Fruktoz	227,91	299,92	266,76	45,71
HS-Ksiloz	227,11	290,72	268,25	43,97
HS-Sukroz	223,97	294,16	271,36	32,50
HS-Laktoz	221,32	318,48	286,64	18,021
HS-Arabinoz	216,9	279,22	259,72	43,53
HS-Mannitol	221,74	276,33	261,99	46,14
HS-Glukoz	227,23	288,1	272,72	34,19



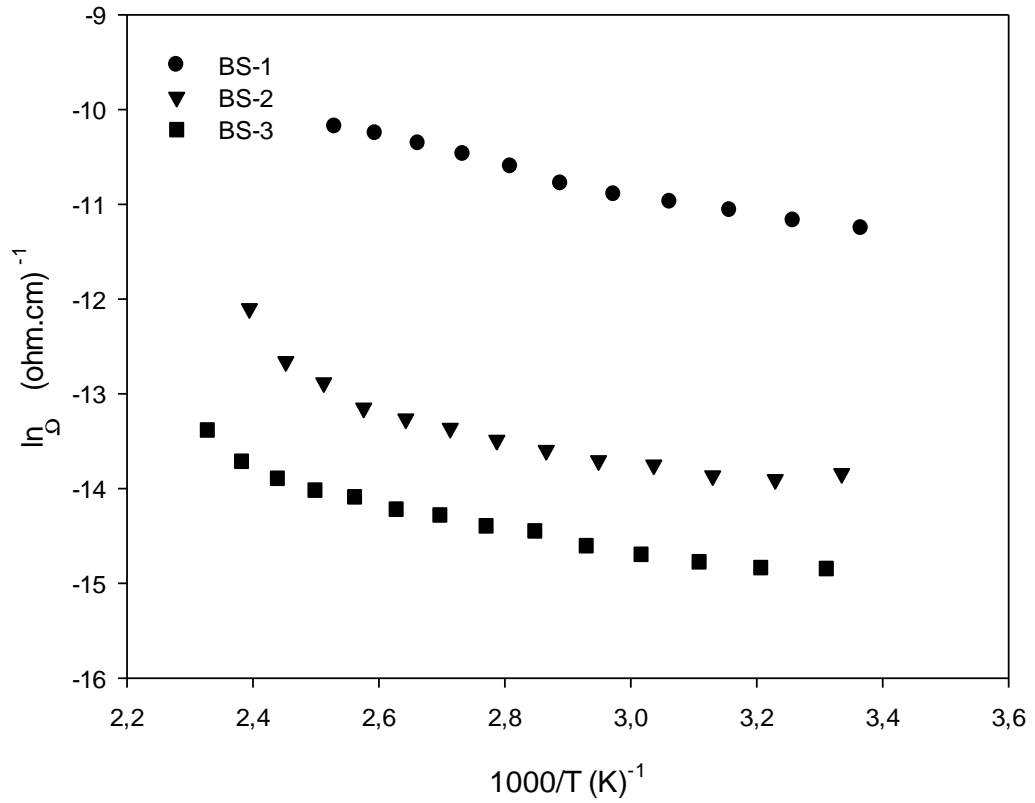
Şekil 5.9: *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisinin farklı karbon kaynağı ilaveli HS besiyerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz eğrileri



Şekil 5.10: *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisinin M1A05P5 besiyerinde farklı pH değerlerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin ve o örneklerden elde edilen bakteriyel selüloz temelli selüloz asetatın termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz eğrileri

Tablo 5.12: *Komagataeibacter xylinus* S4 bakterisinin M1A05P5 besiyerinde farklı pH değerlerinde üretilen bakteriyel selüloz örneklerinin ve o örneklerden elde edilen bakteriyel selüloz temelli selüloz asetatın TGA-DTA eğrilerinden okunan bazı sonuçlar

	T_{onset} (°C)	T_{offset} (°C)	T_{max} (°C)	550°C'de Piroliz Oranı (%)
M1A05P5, pH3.5	308,85	379,12	356,67	12,42
M1A05P5, pH6.5	301,27	375,38	349,15	2,89
BS - Selüloz triasetat	332,52	395,02	367,11	15,36



Şekil 5.11: Bakteriyel selülozların elektriksel iletkenliğinin sıcaklığa göre değişimi (BS-1: HS besiyerinden elde edilen selüloz, BS-2: M1A0P05, pH: 3,5'tan elde edilen selüloz; BS-3: M1A0P05, pH: 6,5'tan elde edilen selüloz)

Bütün sıcaklık aralığında üretilen selülozların elektriksel iletkenliğinin sıcaklık bağımlılığı;

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-E_a/kT) \quad (5.1)$$

iletkenlik ifadesi kullanılarak analiz edilmiştir. Burada σ_0 bir sabittir, E_a iletkenlik için termal aktivasyon enerjisi, k Boltzman sabitidir. Bu ifadeye göre, Şekil 1’de gösterilen $\ln(\sigma)-(1000/T)$ grafiğinin lineer olduğu her değişik sıcaklık bölgesi o sıcaklık aralıklarındaki E_a aktivasyon enerjilerini verecektir. Üretilen filmler için Şekil 1’den de görüleceği üzere tek eğim bölgesi dolayısı ile tek aktivasyon enerjisi söz konusudur. Bakteriyel selülozlar için 310-410 K sıcaklık aralığında hesaplanan aktivasyon enerjileri; BS-1 için 123 *meV*, BS-2 (pH 3,5) için 115 *meV* ve BS-3 (pH 6,5) için ise 103 *meV* olarak hesaplanmıştır.

6. TARTIŞMA

Sunulan yüksek lisans çalışmasının ilk aşamasında, ana kaynak ve bakteri izolasyon ortamı olarak kullanılan üzüm sirkesi örneği, Pamukkale Üniversitesi Çal Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Şarap Üretim Teknolojileri Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Aysel Yeşilyurt Er'den temin edilmiştir. Selüloz üreten bakteriler standart HS besiyeri yanı sıra Freuter besi yeri, Carr besi yeri ve Calcoflour beyazı içeren besiyerleri kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen gram negatif çubuk olduğu belirlenen 4 bakteri suşunun 16S rDNA analizleri sonunda *Komagataeibacter xylinus* (Gen Bank No; KX216693.1 ve KX216690.1) olduğu belirlenmiştir. İzole edilen suşlar *Komagataeibacter xylinus* S1, *Komagataeibacter xylinus* S2, *Komagataeibacter xylinus* S3 ve *Komagataeibacter xylinus* S4 olarak adlandırılmış ve Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarı bakteri kültür koleksiyonuna eklenmiştir.

Acetobacter grubu bakteriler, etanolü karbondioksit ve suya parçalarken, *Gluconacetobacter*'ler son ürün olarak asetik asit oluştururlar. Ortamda oluşan asetik asit, Frauter besiyerinde bulunan CaCO_3 'ü parçalar ve bakteri kolonilerinin etrafında şeffaf zon oluşur (Şekil 5.2 C). Carr besiyerinde oluşan asetik asit, pH indikatörü olan boyanın renginin asitlikten dolayı sarıya dönmesini sağlar (Şekil 5.2 A). Asetik asit üretmeyen bakterinin geliştiği besiyerinde ise renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 5.2 B). Calcoflour beyazı (FB28) selüloza bağlanan non spesifik bir flokromdur. Bakteri tarafından sentezlenen selülozik yapılara bağlanarak UV altında görüntülenmesini sağlar. Bu nedenle izolatların boya bulunan ortamda geliştirilerek selüloz üreticisi olup olmadıkları görsel olarak da test edilmiştir (Şekil 5.2 D). Selüloz ürettiği tespit edilen izolatlara, *K. xylinus* bakterilerinin karakterize olduğu bazı biyokimyasal testler de uygulanmıştır (Tablo 5.1). İzolatların biyokimyasal özellikleri genel olarak birbiriyle uyumlu iken, izolatlar arasında sadece S1, fruktoz ve laktozda, S2 izolatu, laktoz ve maltozda, S3'te ise maltozdan asit oluşumu gözlenmemiştir. S4 izolatının kullanılan tüm karbon kaynaklarında asit oluşturduğu görülmüştür. *K. xylinus* türünün karbon kaynaklarından asit oluşturma özelliklerinin değişken olduğu Lavasani ve diğ. (2017) tarafından da rapor edilmiştir.

Bakterilerin mikroskop görüntüleri ve agarlı yüzeyde koloni morfolojileri Şekil 1’de verilmiştir. Tür tayini yapılan bakteri izolatların HS besiyerinde selüloz üretimleri incelenmiştir. Bakterilerin M1A05P5 besiyerinde ürettikleri selülozun görünümü, liyofilize edilmiş selüloz ve bakterilerin izole edildiği ana kaynak Şekil 4’te verilmiştir.

Kullanılan izolatın hangi besiyerinde daha iyi selüloz ürettiğinin belirlenmesi amacıyla, literatürde selüloz üretiminde sıklıkla kullanılan bazı farklı besiyerleri (HS besiyeri, M1A05P5 besiyeri ve Yamanaka besiyeri) araştırılmıştır. Ayrıca HS besiyerindeki tek karbon kaynağı olarak glukoz yerine sükroz, fruktoz, mannitol, arabinoz, ksiloz ve laktoz ilave edilerek karbon kaynaklarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi de incelenmiştir. Buna ilaveten; sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve yüzey alanı/hacim gibi çevresel faktörlerin etkileri de izole edilen yeni suşun bakteriyel selüloz üretimini arttırmak amacıyla araştırılmıştır.

Bakterilerin selüloz üretim miktarlarının belirlenmesi ve en yüksek üretim yeteneğine sahip izolatın seçilmesi için genel bir tarama yapılmıştır. Ön denemelerde bakterilerin 100 ml HS besiyerinde 30°C’de pH=6’da 3 gün inkübasyon süresi ile belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında ürettikleri selülozun yaş ve kuru ağırlıkları hesaplanmış (Tablo 5.4) ve üretilen selülozun ortalama olarak birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. En yüksek selülozu S4 (0,3154 g/L) bakterisi üretirken, S1, S2 ve S3 izolatları sırasıyla 0,253, 0,2586 ve 0,291 g/L selüloz sentezlemiştir. Yaptığımız çalışmalarda S4 izolatının daha kararlı olduğu, diğer izolatların ise sıklıkla gelişim problemi yaşadığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmalarımız *K. xylinus* S4 üzerinden devam etmiştir.

Büyük ölçekte selüloz üretiminin gerçekleştirilmesi için uzun yıllardır çok sayıda çalışma yapılmakla birlikte, seri üretime geçilememesinin en büyük nedeni hiç kuşkusuz ekonomik ve ucuz üretim teknolojisine sahip olunmamasıdır. Esas hedef, en düşük maliyetle bakteriyel selüloz üretmek için yöntemler geliştirmek ya da mevcut üretici suşları modifiye ederek yüksek üretim kapasitesine ulaşmaktır. Özellikle farklı karbon kaynakları ya da atık materyaller kullanılarak üretimi daha cazip hale getirmek önemlidir.

Yapılan ön çalışmalarda hem stabil olması hem de izolatin gelişim problemi yaşamaması nedeniyle bakteriyel selüloz üretimi için *K. xylinus* S4 bakterisi seçilmiş ve farklı karbon kaynaklarında selüloz üretimi incelenmiştir. Bunun için standart HS besiyerinde bulunan glukoz çıkarılmış, yerine %2 (w/v) oranında laktoz, ksiloz, arabinoz, mannitol, fruktoz ve sükroz ilave edilmiştir. Aslında selüloz üreten bakterilerin bulunduğu ortamda karbon ve azot kaynaklarının olması ve ortamın pH'sının uygunluğu selüloz üretimi için yeterli olmaktadır. Ancak bakterinin bulunduğu ortama karbon ve enerji kaynağı olarak farklı karbon kaynakları ilavesi ile selüloz üretiminin artacağı da düşünülmektedir. Bu amaçla yukarıda belirtilen miktarlarda HS besiyerine karbon kaynağı ilavesi ile selüloz üretimi incelenmiş, ilgili veriler Tablo 5.6'de sunulmuştur. Buna göre karbon kaynaklarında selüloz üretimi glukoz> sükroz> fruktoz> mannitol> ksiloz> arabinoz> laktoz şeklinde sıralanmıştır. Tablodaki veriler incelendiğinde en iyi üretim tek karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda gerçekleşmiştir. Bakteri glukozlu HS besiyerinde 0,3154 g/L selüloz üretmiştir. Glukozdan sonra selüloz üretimi üzerine sükroz (0,273 g/L), fruktoz (0,233 g/L) ve mannitol (0,1901 g/L) olumlu etki yaparken tek karbon kaynağı olarak HS besiyerine ksiloz (0,095 g/L), arabinoz (0,026 g/L) ve laktoz (0,018 g/L) ilavesinin selüloz üretimine olumlu yönde etki etmediği görülmüştür.

Genelde selüloz üreten birçok bakterinin hücre membranında bulunan glikoz dehidrojenaz enzimi, glukozu glukonik asit ve ketoglukonik asite dönüştürmektedir. Enzim aktivitesi yüksek olan türlerde oluşan asit, kültür ortamının pH'sını düşürmekte ve selülozun üretimi engellenmektedir. Bu nedenle de glukozun selüloza dönüşüm verimi genel olarak üretim sürecinde düşmektedir (Trovatti ve diğ. 2011, Shigematsu ve diğ. 2005, Jonas ve diğ. 1998). Ancak glukoz dehidrojenaz enzim aktivitesi düşük olan bazı suşlarda glukozdan yüksek selüloz üretilebilmektedir. Seto ve diğ. (1997), glukoz içeren ortamda 3,1 g/L selüloz üreten 757 suşunun düşük glukoz dehidrojenaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Hem bakterilerin farklı karbon kaynaklarının bulunduğu ortamda ilk olarak tercih etmeleri hem de endüstride kolay ulaşılabilir bir karbon kaynağı olması nedeniyle glukoz sıklıkla kullanılır. Diğer bir deyişle, endüstriyel üretimlerde karbon kaynağı konsantrasyonu çok çalışılan bir konudur. Glukoz konsantrasyonunun

selüloz üretimine etkisini araştıran bir çalışmada, yüksek bakteriyel selüloz verimi elde etmek için başlangıç glukoz konsantrasyonu artışı araştırılmıştır. Glukoz artışına bağlı olarak glukonik asit konsantrasyonunda artış ve selüloz veriminde azalma olmuştur. Aslında tüketilen glukozla kıyasla selüloz veriminin azaldığı, depolanan glukuronik asitin selüloz verimini etkilemediği de rapor edilmiştir (Masaoka ve diğ. 1993). Literatürde farklı karbon kaynakları, melas gibi atık materyaller veya çeşitli besiyerlerinde selüloz üretimi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Li ve diğ. 2015, Gomes ve diğ. 2013, Ruka ve diğ. 2012, Hungund ve diğ. 2010, Jung ve diğ. 2010). *Enterobacter amnigenus* GH-1'in HS besiyerinde 2.5 g/L selüloz üretirken, geliştirilmiş ortamda selüloz veriminin 4.1 g/L olduğu bildirilmiştir. Fruktoz, kazein hidrolizat, maya özütü, disodyum fosfat, sitrat ve metal iyonlarının eklenmesinin selüloz üretimi için uyarıcı olduğu bulunmuştur. Ayrıca pekmez, nişasta hidrolizatı, şeker kamışı suyu, hindistan cevizi suyu, hindistan cevizi sütü, ananas suyu, portakal suyu ve nar suyu gibi meyve su takviyesinin üretim maliyetini düşürerek, bakteriyel selülozun ticari olarak büyük ölçeklerde üretilmesi için önemli bir rol oynayacağını da rapor etmişlerdir (Hungund ve Gupta, 2010). Benzer şekilde zeytinyağı fabrikası atık materyallerden de umut verici selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir (Gomes ve diğ. 2013).

Selülozun yapısı, morfolojik görünümü, polimerizasyonu, kristallenmesi de bakteriyel selülozun endüstrinin hangi alanında kullanılacağını belirlediği için önemlidir. Mikkelsen ve diğ. (2009) ile Ramirez ve diğ. (2017)'lerine göre selülozun yapısı karbon veya azot kaynak tipinden etkilenmemektedir. Diğer taraftan, yüksek sıcaklık ve santrifüjleme ile in vitro sentezlenen selülozun yapı oluşumu ve zincir uzunluğunun etkilendiği ve bu tür faktörlerin tartışılması gerektiği de vurgulanmıştır (Penttila ve diğ. 2016). Ortama gliserol ilavesiyle kristallik indeksinde artış olurken, bakteriyel selülozun su tutma kapasitesinde ve viskozitesinde azalma olmuştur (Jung ve diğ. 2010). Mohammadkazemi ve diğ. (2015) yıllanmış şurup, glukoz, mannitol, sükroz ve gıda sükrozunu kıyaslamışlar; mannitol ve sükrozlu ortamda en yüksek selüloz üretimine ulaşmışlardır. Selülozun termal stabilitesi mannitollü ortamda maksimum olmuştur. FESEM mikrograflarında da mannitol ve sükroz içeren ortamlarda üretilen BS liflerinin arasındaki güçlü ara yüzey yapışmasını göstermişlerdir. Bu da aslında bakteri türünün, tipinin ve hatta suş farklılığının

selülozun yapısı, morfolojisi ya da üretim verimini etkileyen önemli faktörler olduğunu göstermektedir.

Model organizma olmasına rağmen *K. xylinus* ile selüloz üretimi için optimum koşullar henüz oluşturulamamıştır. Her bakteri izolatının optimizasyon şartları kendi içinde yapılmalıdır. Bu da yüksek ölçekte üretime neden hızlı bir şekilde geçilemediğini göstermektedir. Tablo 5.6'da da görüldüğü üzere, *K. xylinus* S4 bakterisi kullanılan karbon kaynakları arasında glukoz, sükroz, fruktoz ve mannitolde daha iyi selüloz üretirken, laktoz, arabinoz ve ksilozun selüloz üretimi için iyi bir karbon kaynağı olmadığı bulunmuştur. Bu sonucun, ilgili karbon kaynaklarının bakteri tarafından çok iyi metabolize edilememiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan ortamdaki karbon kaynaklarının tüketim oranı da selüloz verimini etkilemektedir (Keshk ve Sameshima 2005). Çalışmamızda ortama ilave edilen karbon kaynaklarının ne kadarının bakteri tarafından tüketildiği araştırılmamıştır. Ancak laktoz, arabinoz ve ksilozlu ortamda selüloz üretiminin düşük olmasının, bakterinin bu karbon kaynaklarında gelişmesine rağmen yeterli oranda tüketmediği için selüloz üretiminin az olduğu kanısına varılmıştır. Bu karbon kaynaklarının aksine sükroz ve fruktozlu ortamda mannitole kıyasla az da olsa bir artış olduğu görülmüştür.

Tonouchi ve diğ. (1996), yaptıkları bir çalışmada fruktozun selüloz üretimini artırdığını rapor etmişlerdir. pH dirençli *Komagataeibacter medellinensis* ile yapılan bir diğer çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda glukoz, fruktoz ve sükrozlu ortamda üretim seviyeleri glikoz > sükroz > fruktoz şeklindedir (Ramirez ve diğ. 2017). Hungund ve Gupta (2010), karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz, laktoz, sükroz, mannitol, maltoz ve inositolun BS üretimine etkisini incelemişler ve en yüksek verime fruktozlu ortamda elde etmişlerdir. Mikkelsen ve diğ. (2008) de glukoz, mannitol, gliserol, fruktoz, sükroz ve galaktoz ilavesi ile modifiye ettikleri HS besiyerinde selüloz üretimini araştırmışlar ve *G. xylinus* ATCC 53524'un 96 saatlik fermentasyon sonunda sükroz ve glukozlu ortamda en yüksek BS üretimini rapor etmişlerdir. Tüm çalışmalar dikkate alındığında bakteri tipi, cinsi, kullanılan besiyeri içeriği ya da karbon kaynaklarının selüloz üretiminde farklılıklar oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu da her bakteri izolatına göre optimizasyon çalışmalarının detaylı olarak yapılması gerektiğini göstermektedir. Ancak genel olarak çalışmamızdan elde

edilen verilerle literatür verileri kıyaslandığında bakterilerin glukoz, sükroz ve fruktozlu ortamı tercih ettiğini göstermektedir.

Literatürde selüloz üretimi için standart HS besiyeri dışında Yamanaka ve M1A05P5 besiyerleri de kullanılmaktadır (Yamanaka ve diğ. 1989, Çakar ve diğ. 2014). Çalışmamızda izolatımızın HS besiyeri dışında literatürde kullanılan farklı besiyeri tiplerinde de selüloz üretimleri taranmıştır. *K. xylinus* S4 izolatı Yamanaka besiyerinde selüloz üretmezken, M1A05P5 besiyerinde pH: 3-6,5 aralığında 0,36-0,75 g/L miktarında selüloz üretmiştir. HS besiyerinde maksimum 0,3157 g/L (pH: 6) selüloz üretirken M1A05P5 besiyerinde maksimum 0,75 g/L (pH: 6,5) selüloz üretmiştir. M1A05P5 besiyerinde aynı zamanda başlangıç pH'larının selüloz üretimine etkisi de test edilmiş ve en iyi pH değerleri saptanmıştır. Bakteri pH:3,5'te 0,721 g/L selüloz üretirken pH: 6,5'te 0,753 g/L selüloz üretmiştir. Birbirinden farklı iki pH aralığında üretilen selüloz miktarının yakın olması nedeniyle her iki pH seçilerek sıcaklık, yüzey alanı ve inkübasyon süreleri çalışılmış ve selüloz üretimindeki değişiklik araştırılmıştır. Tablo 5.8 ve Tablo 5.9'da verilen sonuçlara göre selüloz üretimi için en iyi sıcaklık ve yüzey alanı/hacim oranı sırasıyla 30°C ve 1,06 cm⁻¹ 'dir. Buna göre BS üretimi en iyi pH, sıcaklık ve yüzey alanı/hacim oranında pH: 3,5'te inkübasyonun 21. gününde 1,303 g/L ve pH 6.5'te inkübasyonun 14. gününde 2,3635 g/L olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızın aksine Çakar ve diğ. (2014) M1A05P5 besiyerinde pH 6 ve üzerinde inkübasyonun ilk günlerinde bakteriyel selüloz veriminin düştüğünü belirtmişlerdir. *K. xylinus* S4 bakterisi ise pH 6,5'te da selüloz üretmeye devam etmiş ve inkübasyonun 14. gününde maksimum selüloz (2,3635 g/L) ürettiği gözlenmiştir. S4 bakterisinin BS miktarında pH 3,5'e göre pH 6,5'te yaklaşık olarak %81,4 oranında bir artış olmuştur. Ayrıca yüzey alanı/hacim oranındaki artışa bağlı olarak BS miktarında da artış olmuştur.

Bakteriyel selülozun morfolojik karakterizasyonu SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri Akdeniz Üniversitesi Elektron Mikroskop Birimi ile Pamukkale Üniversitesi İLTAM merkezinde yapılmıştır. Bakterilerin izole edildiği ana kaynak ile glukoz, mannitol, sükroz, laktoz ve fruktoz ilaveli HS besiyeri ve M1A05P5 besiyerinde üretilen bakteriyel selülozun morfolojik görünümü ve fibriler yapısını gösteren mikrograflar Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'da verilmiştir.

Bakteriyel selülozun genel morfolojik görünümü birbirine benzerlik gösterse de fibril kalınlıklarının farklı olduğu anlaşılmaktadır. Liflerin kalınlıkları 29,71 nm ile 102,3 nm arasındadır. Mannitol hariç diğer ortamlardan elde edilen selülozun fibriler yapısının ince olduğu görülmüştür. Ayrıca her bir besiyerindeki selülozun fibril dağılımı ve ara yüzey yapışması farklılık göstermiştir. Tek karbon kaynağı olarak laktozlu ortamda üretilen selüloz hariç diğer karbon kaynaklarında daha kararlı ve kompakt ağ yapısı dikkati çekmiştir. Diğer bir deyişle, laktozlu ortamda daha seyrek fibriler yapı gözlenmiş ve fibrilin çapının 64.75 nm olduğu bulunmuştur. Mannitol içeren ortamda ise oldukça ilginç olarak tek eksenli yönlendirilmiş selüloz şeritleri gözlenmiş olup selüloz lifleri arasındaki güçlü ara yüzey yapışması şekil 5'te görülmektedir. Diğer taraftan M1A05P5 besiyerinde selüloz lifleri daha çok fibril demetleri halinde olup, pH 3,5'te elde edilen selülozun fibril çapı 34,87-45,97 nm arasında iken aynı besiyerinde pH 6,5'te 29,71-102,3 nm'dir. Jung ve diğ. (2010^b)'ne göre BC örnekleri, ultra ince selüloz fibrillerinden oluşan retiküle yapıdadır. Gliserol ilaveli ortamdan elde edilen BC şeritlerinin ortalama genişliği yaklaşık 65-80 nm iken, glukoz ortamında yaklaşık 75-90 nm'dir. Vazquez ve diğ. (2013), modifiye HS, gliserol ve melas içeren ortamdan elde edilen selülozun fibriler ağ yapısında olduğu ve fibril çapının 35-70 nm arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *Acetobacter xylinum* selülozik fibrillerinin 128-207 nm arasında değiştiği ve saf mikrokristalin selüloz fibrilleriyle benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Gayathry ve Gopalswamy, 2014).

BS örneklerin FT-IR analiz sonuçları birbirine benzerdir (bkz. Şekil 5.8). Dalga boyları 3329-3352 cm⁻¹ arasındaki piklerin OH uzaması, 2876-2898 cm⁻¹ arası asimetric CH₂ uzaması, 1649-1666 cm⁻¹ arası absorbe haldeki su, 1458 cm⁻¹'daki pikin CH₂'nin simetric uzaması veya yüzeydeki karboksilat grupları olabileceği, 1425-1435 cm⁻¹'daki pikin düzlem içi HCH, OCH uzaması, 1357-1378 cm⁻¹'daki zayıf pikin CH, 1332 cm⁻¹'daki pikin düzlem içi CH₃ veya OH eğilmesi, 1160- 1168 cm⁻¹'daki pikin C-O-C asimetric uzaması, 1110-1112 cm⁻¹'daki pikin C-C halkası uzaması, 1041-1046 cm⁻¹'daki pikin karbonhidratlardaki C-O eğilmesi ve 888-900 cm⁻¹'daki pikin şeker birimleri arasındaki β- glikozidik bağlarını ifade etmektedir. Bu sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir (Barud ve diğ. 2008, Gea ve diğ. 2011, Vazquez ve diğ. 2013).

Elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin termokimyasal dönüşümü sırasında ısıl bozunma davranışlarını daha iyi anlamak amacıyla örneklerin Termogravimetrik analizleri (TGA) yapılmıştır. TGA analizi sonuçları örnek geometrisi, örnek kütlesi ve ısıtma hızı gibi birçok parametreye bağlı olduğundan dolayı yapılan, analizler sırasında bu parametrelerin aynı olmasına dikkat edilmiştir. Besiyerinde farklı karbon kaynakları kullanılarak elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin sıcaklık değişimine karşı kütledeki azalma belirlenmiş ve termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz eğrileri Şekil 5.9'da verilmiştir. Ayrıca TGA ve DTG eğrilerinden elde edilen bozunmanın başlangıç sıcaklığı, bozunmanın bitiş sıcaklığı, maksimum bozunma sıcaklığı ve örneğin 550°C sıcaklığa ısıtılması sonrasındaki piroliz değeri gibi bazı sonuçlar Tablo 5.11'de verilmiştir.

Bakteriyel selülozun ısıl bozunma davranışı dehidrasyon ve ana polimer ağının depolimerizasyonu gibi kütle kaybı basamaklarından meydana gelir (de Oliveira ve diğ., 2017). Bakteriyel selüloz örneklerindeki fiziksel olarak adsorplanmış ve hidrojen bağıyla bağlanmış su moleküllerinin (yani selüloz fibrillerine bağlı olan su molekülleri) kaybıyla ilişkili olan dehidrasyon basamağındaki kütle kaybı, 50°C- 150 °C sıcaklıkları arasında gerçekleşmektedir. Bu sonuçlar literatürde aynı konuda yapılan diğer çalışmalarda bulunan sonuçlarla da uyumludur (Faria-Tischer ve diğ. 2016, Vazquez ve diğ. 2013, George ve diğ. 2011, Barud ve diğ. 2007). Selüloz, orta termal kararlılığa sahip bir polimer olarak sınıflandırılabilir ve genellikle selüloz 250°C-350°C sıcaklıkları arasında hızlı şekilde kimyasal ayrışmaya uğramaktadır (Klemm ve diğ. 1998). Daha yüksek yüzde kütle kaybının olduğu ana bozunma basamağı bütün bakteriyel selüloz örneklerinde 215°C ile 290°C sıcaklıkları arasında gerçekleşmiştir. İkinci bozunma basamağının verilen şekillerden görüleceği gibi 215°C ile 228°C arasındaki sıcaklıklarda başladığı gözlenmektedir. Ayrıca örneklerin termal analizinden elde edilen DTG eğrileri bu bozunmanın maksimum ağırlık kaybı hızının 260°C-288°C sıcaklıkları arasında olduğunu göstermektedir. Farklı karbon kaynaklarıyla elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinde bozunmanın sonlandığı sıcaklık değerleri ise tabloda görüldüğü gibi 277°C ile 326°C sıcaklıkları arasındadır. Bu değerler literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında göreceli olarak düşük değerlerdir (Vazquez ve diğ. 2013, Halib ve diğ. 2012, Surma-Ślusarska ve diğ. 2008, Barud ve diğ. 2007, Sun ve diğ. 2005). Isıl bozunma davranışını; selüloz fiberlerinin oryantasyonu, kristalinitesi ve moleküler

ağırlığı gibi bazı yapısal parametrelerin etkilediği bilinmektedir (Barud ve diğ. 2007). Bu yapısal parametrelerin yanında; örneklerin saflaştırılmasında kullanılan temizleme prosedürü, örneklerin termal analize hazırlanma yöntemi, örneklerin morfolojisi, örnek boyutu vb. gibi birçok sebep de ısıl bozunma davranışına etki edebilmektedir (Bottom, 2008). Yukarıda değinilen literatüre göre göreceli bu sapmanın büyük ölçüde örneklerin saflaştırılma yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü; yapılan çalışmanın bir diğer bölümünde elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin temizlenmesinde uygulanan yıkama prosedürü değiştirilerek elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin bozunma basamağının literatürdeki elde edilen sonuçlara daha uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan bu değerlendirmenin doğruluğunu tabloda verilmiş olan; örneklerin 550°C sıcaklığa ısıtılması sonrasındaki piroliz değerlerinin yüksek olması da desteklemektedir.

Selüloz triasetat termal analizlerde farklı davranışlar göstermiştir. Bakteriyel selülozun 550°C'de piroliz oranları %2,89 - 12 arasında değişmekte iken selüloz triasetatın piroliz oranı %15,36 olarak bulunmuştur. Maksimum kütle kaybı 369°C'de gerçekleşmiştir. Sentez sonrasında yüksek sıcaklıklara karşı selüloza göre bir direnç olduğu ve daha az kütle kaybına uğradığını söyleyebiliriz. Termal analiz sonuçları da selüloz asetat sentezini doğrulamaktadır. Yaptığımız çalışmada asetilasyon süresi 24 saat olarak çalışılmıştır. Barud ve diğerleri (2008)'ne göre, asetilasyon süresi ile termal analizde kütle kaybı arasında anlamlı ilişkiler bulunmaktadır. Araştırmacılar, 1 saat, 6 saat ve 24 saat asetilasyon sürelerinde çalışmışlar ve 24 saat asetilasyon süresinde kristalliliğin ve termal stabilitenin arttığını rapor etmişlerdir.

Günümüzde organik veya inorganik komponentlerle modifiye edilmiş biyopolimerler, organik elektronik materyal üretimi ve tıp için umut verici, eşsiz kompozitlerdir. Sensörler, esnek elektrotlar, iyi mekanik özelliğe sahip iletken esnek ekran uygulamalarında polimerik filmler, elektrolit jeller, kapasitorler, karbon nanotup veya hücre rejenerasyon özellikleri nedeniyle doku mühendisliği gibi yeni potansiyel uygulama alanları da BS temelli malzemelerin önemli çalışma konularını oluşturmaktadır (Kotatha ve diğ. 2018, Ccorahua ve diğ. 2017, Zhou ve diğ. 2017, Lee ve diğ. 2015, Feng ve diğ. 2012, Liang ve diğ. 2012, Shi ve diğ. 2012, Hu ve diğ. 2011).

Bu amaçla çalışmamızda *K. xylinus* S4 bakterisinden elde edilen 3 adet bakteriyel selüloz örneklerin elektriksel iletkenliği, 300-400 K sıcaklık aralığında incelenmiştir. Şekil 5.11’de BS örneklerin elektriksel iletkenliklerinin sıcaklığa bağlı değişimi verilmiştir. BS’lerin elektriksel iletkenliğinin sıcaklığa üstel olarak bağımlı olduğu ve artan sıcaklıkla birlikte iletkenliklerinin arttığı açıkça görülmektedir. BS örneklerinin oda sıcaklığındaki öz dirençleri BS-1 için, $1,23 \times 10^5 \Omega\text{-cm}$, BS-2 (pH 3,5) için $1,03 \times 10^6 \Omega\text{-cm}$ ve BS-3 (pH 6,5) için ise $2,80 \times 10^6 \Omega\text{-cm}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bakteriyel selülozun sıcaklığa bağlı elektriksel iletkenlik ölçümlerinden tipik yarı iletken davranışı gösterdiği anlaşılmıştır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya nüfusundaki artışa bağlı olarak her geçen gün artan selüloz ihtiyacı, özellikle alternatif selüloz ham materyallerin üretiminin gerekli olduğunu göstermektedir. Özellikle dünyadaki bitkisel kaynakların gittikçe tükenmesi, selüloz üretimi için yeni kaynaklar bulunmasının oldukça akıllıca olacağını göstermektedir. Hiç kuşkusuz bakterilerden üretilen selüloz, henüz ucuz ve ekonomik değildir. Ancak insanoğlu dünya kaynaklarını akılcı bir şekilde kullanmak zorunda olduğunu bilmektedir. Bu çalışmada Denizli Çal bölgesinden selüloz üreten asetik asit bakterisi izole edilmiştir. Bakterinin tür tayini yapılmış, 16S rDNA sekansına göre *Komagataeibacter xylinus* olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen izolatın selüloz üretim yeteneği farklı karbon kaynağı ilaveli HS besiyerinde ve M1A05P5 besiyerinde incelenmiştir. Elde edilen bakteriyel selülozun SEM, FT-IR ve termal analizlerle karakterizasyonu yapılmış ve elektriksel iletkenliği araştırılmıştır. Mannitol ilaveli HS besiyerinde tek yönlü selüloz fiberler ve fibrillerin arasındaki ara yüzey yapışması belirlenirken, diğer karbon kaynaklarında ve M1A05P5 besiyerinden elde edilen bakteriyel selülozun fibrillerinin ağsı görünümde olduğu SEM ve FESEM analizleriyle gösterilmiştir. Modifiye edilmemiş doğal selülozun yarı iletken özelliği ve selüloz asetat üretimi, yerel izolatın üzerinde çalışılmaya değer olduğunu göstermektedir. Özellikle daha detaylı çalışmalar yapılarak, daha büyük ölçeklerde üreterek, bakteriyel selülozun örneğin iletken özelliği geliştirilerek doku mühendisliğinden malzeme mühendisliğine kadar geniş bir yelpazede değerlendirilebileceği anlaşılmaktadır. Ayrıca elde edilen selüloz asetatın özellikle 3 boyutlu yazıcı için önemli bir doğal materyal olarak üzerinde çalışılmaya değer olması heyecan vericidir.

8. KAYNAKLAR

Ang, J.F., ‘‘Water retention capacity and viscosity effect of powdered cellulose’’, *J Food Sci*, 56(6), 1682-1684, (1991).

Aydin, Y. A., Aksoy, N. D., ‘‘Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A’’, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 1065–1075, (2014).

Barud, H. S., de Araujo Junior, A. M., Santos, D. B., de Assunção, R. M. N., Miereles, C. S., Cerqueira, D. A., Filho, G. R., Ribeiro, C. A., Messaddeq, Y., ‘‘Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogenous acetylation of bacterial cellulose’’, *Thermochimica Acta*, 471, 61-69, (2008)

Beraich, F. Z., Bakasse, M., Arouch, M., ‘‘Synthesis and characterization of cellulose acetate extracted from paper waste’’ *2016 International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC)*, DOI: 10.1109/IRSEC.2016.7983970, (2016).

Bernardo, E. B., McCrindle, S. L., Couperwhite, I., Neilan, B. A., ‘‘Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey’’, *FEMS Microbiology Letters*, 231, 253-260, (2004).

Braun, D., Cherdron, H., Rehahn, M., Ritter, H., Voit, B., ‘‘Polymer Synthesis: Theory and Practice’’, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2013).

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., Negro, C., ‘‘Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review’’, *Cellulose*, 23, 57-91, (2016).

Candido, R. G., Godoy, G. G., Gonçalves, A. R., ‘‘Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse’’, *Carbohydrate Polymers*, 167, 280-289, (2017).

Ccorahua, R., Toroncoso, O. P., Rodriguez, S., Lopez, D., Torres, F. G., ‘‘Hydrazine treatment improves conductivity of bacterial cellulose/graphene nanocomposites obtained by a novel processing method’’, *Carbohydrate Polymers*, 171, 68-76, (2017).

Çakar, F., Katı, A., Özer, I., Demirbağ, D. D., Şahin, F., Aytekin A. Ö., ‘‘Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production,’’ *Biochemical Engineering Journal*, 92, 35–40, (2014).

Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelbeen, K., Janssens, D., Marzotto, M., ‘‘Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp nov and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp nov., isolated from Italian apple fruit’’, *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 2365–2370, (2005).

Dobre, L. M., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jipa, I., Dobre, T., Ferdes, M., ‘‘Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films’’, *Chemical Papers*, 66 (2), 144–151, (2012).

Esa, F., Tasirin, S. M., Rahman, N. A., ‘‘Overview of Bacterial Cellulose Production and Application’’, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113 – 119, (2014).

Feng, Y., Zhang, X., Shen, Y., Yoshino, K., & Feng, W., ‘‘A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite’’, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 644–649, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.039>, (2012).

Filho, G. R., Monteiro, D. S., Meireles, C. S., Assunção, R. M. N., Cerqueira, D. A., Barud, H. S., Ribeiro, S. J. L., Messadeq, Y., ‘‘Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper,’’ *Carbohydrate Polymers*, 73, 74-82, (2008).

Fu, L., Zhang, Y., Li, C., Wu, Z., Zhuo, Q., Huang, X., ‘‘Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method’’, *Journal of Materials Chemistry*, 22(24), 12349–12357, (2012).

Fugelsang, K. C., Edwards, C. G., “Wine Microbiology”, Springer US, (2007).

Gayathry, G., Gopalaswamy, G., “Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*”, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 39, 93-96, (2014).

Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., Peijs, T., “Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two step purification process”, *Bioresource Technology*, 102, 9105-9110, (2011).

Gomes, F. P., Silva, N. H. C. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Duarte, M. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Freire, C. S. R., “Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue” *Biomass and bioenergy*, 55, 205-211, (2013).

Guan, F., Chen, S., Yao, J., Zheng, W., Wang, H., “ZnS/bacterial cellulose/epoxy resin (ZnS/BC/E56) nanocomposites with good transparency and flexibility”, *J. Mater. Sci. Technol.*, 32, 153–157, (2016).

Heinämäki, J. T., Lehtola, V. M., Nikupaavo, P., Yliruusi, J. K., “The mechanical and moisture permeability properties of aqueous-based hydroxypropyl methylcellulose coating systems plasticized with polyethylene glycol”, *International Journal of Pharmaceutics*, 112(2), 191-196, (1994).

Hestrin, S., Schramm, M., “Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose”, *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352, (1954).

Hu, W., Chen, S., Yang, Z., Liu, L., Wang, H., “Flexible electrically conductive nanocomposite membrane based on bacterial cellulose and

polyaniline'', *J. Phys. Chem. B.*, 115(26), 8453-8457, DOI: 10.1021/jp204422v, (2011).

Huang, M-R., Li, X-G., ''Thermal degradation of cellulose and cellulose esters'', *Applied Polymer*, 68(2), 293-304, (1998).

Hungund, B. S., Gupta, S. G., ''Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple'', *World J Microbiol Biotechnol*, 26, 1823–1828, (2010).

Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono A., ''Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's art'', *Journal of Materials Science*, 35, 261-270, (2000).

Jia, S. R., Ou, H. Y., Chen, G. B., Choi, D. B., Cho, K. A., Okabe, M., Cha, W. S., ''Cellulose production from *Gluconobacter oxydans* TQ-B2'', *Biotechnol Bioprocess Eng*, 9, 166–170, (2004).

Jonas, R., Farah, L. F., ''Production and application of microbial cellulose'' *Polym Degrad Stabil*, 59(1–3), 101–106, (1998).

Jung, H. I., Lee, O. M., Jeong, J. H., Jeon, Y. D., Park, K. H., Kim, H. S., An, W. G., Son H. J., ''Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium'', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 486–497, (2010).

Keshk, S. M., ''Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications'', *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4(2), (2014).

Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Yamada, Y., ''The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. nonacetoxidans subsp. nov.'', *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 185–187, (1998).

Kotatha, D., Morishima, K., Uchida, S., Ogino, M., Ishikawa, M., Furuike, T., Tamura, H., ‘‘ Preparation and characterization of gel electrolyte with bacterial cellulose coated with alternating layers of chitosan and alginate for electric double-layer capacitors’’, *Res Chem Intermed*, 44, 4971-4987, (2018).

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S., ‘‘Factors affecting yield and properties of bacterial cellulose’’, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, 189 – 195, (2002).

Kuo, C. H., Chen, J. H., Liou, B. K., Lee, C. K., ‘‘Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*’’, *Food Hydrocolloids*, 53, 98-103, (2016).

Kuo, C. H., Teng, H. Y., Lee, C. K., ‘‘Knock-out of glucose dehydrogenase gene in *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production enhancement’’, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 18-25, (2015).

Lee, S. H., Lim, Y. M., Jeong, S. I., An, S. J., Kang, S. S., Jeong, C. M., Huh, J. B., ‘‘The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration’’, *J Adv Prosthodont*, 7(6), 484-495, (2015).

Levinson, D. J., Glonek, T. ‘‘*Microbial cellulose contact lens*’’, US Patent, US7832857 B2, (2010),

Li, Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H., ‘‘Production of nano bacterial cellulose from waste water of candiedjujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*’’, *Carbohydrate Polymers*, 120, 115–119, (2015).

Liang, H., Guan, Q., Zhu-Zhu, Song, L., Yao, H., Lei, X., Yu, S., ‘‘ Highly conductive and stretchable conductors fabricated from bacterial cellulose’’, *NPG Asia Materials*, 4, DOI:10.1038/am.2012.34, (2012).

Lin, S., Calvar, I. L., Catchmark, J. M., Liu, J., Demirci, A., Cheng, K., ‘‘Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose’’, *Cellulose*, 20, 2191-2219, (2013).

McKenna, A. B., Mikkelsen, D., Bernhard Wehr, J., Gidley, M. J., Menzies N. W., ‘‘Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524’’, *Cellulose*, 16, 1047–1055, (2009).

Millon, L., & Wan, W., ‘‘The polyvinyl alcohol-bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications’’, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 79(2), 245–253, (2006).

Mühlethaler, K., ‘‘The structure of bacterial cellulose’’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 3, 527-535, (1949).

Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., Dykes, G. A., ‘‘Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha’’, *Curr Microbiol*, 57, 449–453, (2008).

Nimeskern, L., Avila, H. M., Sundberg, J., Gatenholm, P., Müller, R., & Stok, K. S. ‘‘Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement’’, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 22, 12–21, (2013).

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanaka, S., ‘‘Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials’’, *Food Hydrocol*, 6(5), 479–487, (1992^b).

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanaka, S., ‘‘Bacterial cellulose IV. Application to processed foods’’, *Food Hydrocol*, 6(6), 503–511, (1993).

Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., Yamanaka, S., ‘‘Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*’’, *Food Hydrocol*, 6(5), 471–477, (1992^a).

Pattinson, S. W., Hart, A. J., ‘‘Additive Manufacturing of Cellulosic Materials with Robust Mechanics and Antimicrobial Functionality’’, *Adv. Mater. Technol*, 2, 1600084, DOI: 10.1002/admt.201600084, (2017).

Pinto, F. C. M., De-Oliviera, A. C. A. X., De-Carvalho, R. R., Gomes-Carneiro, M. R., Coelho, D. R., Lima, S. V. C., Paumgarten, F. J. R., Aguiar, J. L. A., ‘‘Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses’’, *Carbohydrate Polymers*, 137, 556–560, (2016).

Rangaswamy, B. E., Vanitha, K. P., Hungund B. S., ‘‘Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit’’, *International Journal of Polymer Science*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/280784>, (2015).

Ren, X., Kocer, H. B., Worley, S.D., Broughton, R.M., Huang, T.S., ‘‘Rechargeable biocidal cellulose: Synthesis and application of 3-(2,3-dihydroxypropyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione’’, *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 683-687, (2009).

Schramm, M., Hestrin, S., ‘‘Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*’’, *Journal of General Microbiology*, 11(1), 123–129, (1954).

Serafica, G., Mormino, R., Bungay, H., ‘‘Inclusion of solid particules in bacterial cellulose’’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 756-760, (2002).

Shah, J., Malcolm Brown Jr, R., ‘‘Compositions, methods and systems for making and using electronic paper’’. US patent 60/507,961, (2004).

Shah, J., Malcom Brown Jr, R., ‘‘Towards electronic paper displays made from bacterial cellulose’’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 352-355, (2005).

Shi, Q., Li, Y., Sun, J., Zhang, H., Chen, L., Chen, B., Yang, H., Wang, Z., ‘‘The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2’’, *Biomaterials*, 33, 6644-6649, (2012).

Son, C., Chung, S., Lee, J., Kim, S., ‘‘Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures’’, *J Microbiol Biotechnol*, 12, 722–728, (2002).

Stevens, M. P., ‘‘Polymer Chemistry’’, 3rd Edition, New York, Oxford University Press, 484-489, (1999).

Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y., Ochaikul, D., ‘‘Identification and biocellulose production of *Gluconacetobacter* strains isolated from tropical fruits in Thailand’’, *Maejo Int J Sci Technol*, 7, 70–82, (2013).

Tonouchi, N., Horinouchi, S., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., ‘‘Increased cellulose production from sucrose by *Acetobacter* after introducing the sucrose phosphorylase gene’’, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62 (9), 1778-1780, (1998).

Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K., ‘‘Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification’’, *Carbohydrate Polymers*, 88, 596–603, (2012).

Ullah, H., Wahid, F., Santos, H. A., Khan, T., ‘‘Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites’’, *Carbohydrate Polymers*, 150, 330–352, (2016).

Vanquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M., ‘‘Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*’’, *Journals of Polymers and the Environment*, 21(2), 545-554, (2013).

Wan, Y., Gao, C., Han, M., Liang, H., Ren, K., Wang, Y., ‘‘Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds’’, *Polymers for Advanced Technologies*, 22(12), 2643–2648, (2011).

Wang, J., Gao, C., Zhang, Y., Wan, Y., ‘Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial’, *Materials Science and Engineering: C*, 30(1), 214-218, (2010),

Wen, X., Zheng, Y., Wu, J., Yue, L., Wang, C., Luan, J., ‘In vitro and in vivo investigation of bacterial cellulose dressing containing uniform silver sulfadiazine nanoparticles for burn wound healing’, *Progress in Natural Science: Materials International*, 25(3), 197–203, (2015).

Winter, G. D., ‘Formation of scab and rate of epithelization of superficial wounds in skin of young domestic pig’, *Nature*, 193, 293-294, (1962).

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura N., ‘The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose’, *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141–3145, (1989).

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M., ‘The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose’, *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141-3145, (1989).

Yano, H., Sugiyama, J., Nakagaito, A. N., Nogi, M., Matsuura, T., Hikita, M., Handa, H., ‘Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers’, *Advanced Materials*, 17(2), 153-155, (2005).

Yoshino, A., Tabuchi, M., Uo, M., Tatsumi, H., Hideshima, K., Kondo, S., Sekine, J., ‘Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment’, *Acta Biomaterialia*, 9(4), 6116-6122, (2013).

Zhang, T., Zheng, Y., Liu, S., Yue, L., Gao, Y., Yao, Y., ‘Bacterial cellulose membrane supported three-dimensionally dispersed silver nanoparticles used as membrane electrode for oxygen reduction reaction in phosphate buffered saline’, *J. Electroanal. Chem.*, 750, 43–48, (2015).

Zhou, Z., Yang, Y., Han, Y., Guo, Q., Zhang, X., Lu, C., ‘‘In situ doping enables the multifunctionalization of templately synthesized polyaniline@cellulose nanocomposites’’, *Carbohydrate Polymers*, 177, 241-248, (2017).

Zimmermann, K. A., LeBlanc, J. M., Sheets, K. T., Fox, R. W., Gatenholm, P., ‘‘Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications’’, *Materials Science and Engineering: C*, 31(1), 43-49, (2011).

EKLER

9. EKLER

EK A

HS besi yeri:

20 gr/l Glukoz

2,7 gr/l Disodyumhidrojenfosfat

1,15 gr/l Sitrik asit

5 gr/l Pepton

5 gr/l Maya özütü

14 gr/l Agar (katı besiyerleri için)

pH 6 (HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.)

HS besiyeri içeriği olarak farklı C kaynakları (Ksiloz, Arabinoz, Laktoz, Mannitol, Fruktoz ve Sükroz) ile modifiye edilmiştir.

Carr besi yeri:

30 gr/l Maya özütü

0,022 gr/l Bromcresol green (Bu çalışmada Bromcresol purple kullanılmıştır.)

20 gr/l Agar

20 mL/l Etanol

pH 6 (pH H₃PO₄ ve KOH kullanılarak ayarlanmıştır.)

Etanol yüksek sıcaklık ve basınç altında bozulacağından besi yeri 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra %2 v/v Etanol (20 mL) eklenmiştir.

Frauter (CCE) Besi yeri:

0.5 gr /l Glukoz

3 gr /l Pepton

5 gr/l Maya özütü

15 gr/l Kalsiyum Karbonat

12 gr/l Agar

15 mL/l Etanol

pH 6 (pH H₃PO₄ ve KOH kullanılarak ayarlanmıştır.)

Etanol yüksek sıcaklık ve basınç altında bozulacağından besi yeri 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra %1.5 v/v Etanol (15 mL) eklenmiştir.

HS - Flourescent brightener 28 besi yeri :

22 gr/l Glukoz

3,38 gr/l Disodyumhidrojenfosfat

1,255 gr/l Sitrik asit

5 gr/l Pepton

5 gr/l Maya özütü

14 gr/l Agar (katı besiyerleri için)

0.2 gr/l Flourescent brightener 28

pH 6 (HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.)

M1A05P5 Besi yeri:

10 gr/l Glukoz

10 gr/l Maya özütü

7 gr/l Pepton

1.5 ml/l Asetik asit

5 ml/l Etanol

Besi yeri içeriğinde bulunan asetik asit 118,1 °C 'de kaynama noktasına ulaştığından ve Etanol yüksek sıcaklık ve basınç altında bozulacağından dolayı, 105 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra Etanol eklenmiştir.

Yamanaka Besi yeri:

50 gr/l Sükroz

5 gr/l Maya özütü

5 gr/l (NH₄)₂ SO₄

3 gr/l KH₂ PO₄

0.05 gr/l MgSO₄.7H₂O

EK B

		Lot numarası
GeneJet Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific	508599
Glacial Acetic acid (%100)	Merck	1000562500
Chloroform	Isolab	LR0442106AGQ
Hydrochloric acid (%37)	Sigma Aldrich	SZBA2250
Sulfuric acid (% 95-97)	Sigma Aldrich	SZBB1870V
Bacteriological Peptone	Oxoid	438683
Citric acid -1- hydrate	Riedel-de Haen	21410
D(+) Glucose monohydrate	Sigma Aldrich	BCB121010V
di-sodiumhydrogen phosphate dihydrate	Merck	1065801000
Ethidium bromide	Sigma Aldrich	MKBV5661U
Agarose	Nzytech	16011
Trizma Base	Sigma Aldrich	SLBR8406U
Bromocresol Purple	Sigma Aldrich	LO11028825
Cycloheximide	Sigma Aldrich	113K0648
Cellulase from <i>Aspergillus niger</i>	Sigma Aldrich	BCBS4400V
Fluorescent Brightener 28	Sigma Aldrich	SLBM3344V
Fenol Ftalein İndicator	Tekkim	130317343001

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burak TOP

Doğum Yeri ve Tarihi : DENİZLİ / 11.03.1990

Lisans Üniversitesi : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : buraktop@hotmail.com

İletişim Adresi : Emek cad. Makbule Hanım Apt. No:64
Pamukkale/ DENİZLİ

Yayın Listesi :

• Kaska, A., Yildirim, S., **Top, B.**, Celebi-Toprak, F., Alan, A.R., ‘‘In vitro propagation of leek (*Allium ampeloprasum* L.)’’, *Acta Hortic.*, 1143, 55-60 DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1143.9, (2016).

Konferans listesi :

• **Top, B.**, Tepe, M., Mercan Doğan, N., ‘‘Production of bacterial cellulose and isolation of acetic acid bacteria from wine vinegar’’, *The International Symposium on Euroasian Biodiversity*, July 5 – 8, 2017, Belarusian State University, Minsk, BELARUS

• **Top, B.**, Uğuzdoğan, E., Mercan Doğan, N., ‘‘ Cellulose acetate synthesis from bacterial cellulose’’, *VII. Polymer Science and Technology Congress with International Participation*, p: 29, September 9-12, 2018, Eskişehir, TURKEY