

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI VE OPTİMİZASYON
ÇALIŞMASININ YAPILMASI**

Cansu GÜRİSOY

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Aytül SOFU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016**



© 2016 [Cansu GÜRSOY]

TEZ ONAYI

Cansu GÜRSOY tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyel Selüloz Üretim Potansiyelinin Araştırılması Ve Optimizasyon Çalışmasının Yapılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Yrd. Doç. Dr. Aytül SOFU**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Funda CENGİZ ÇALLIOĞLU**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Yrd. Doç. Dr. Devrim Demiray SOYASLAN**
Mehmet Akif ERSOY Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Doç. Dr. Yasin TUNCER**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Cansu GÜRSOY

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Selülozun Yapısı.....	5
2.2. Bakteriyel Selüloz'un Özellikleri.....	7
2.3. Bakteriyel Selüloz Üreten Bakteriler.....	10
2.4. Laktik Asit Bakterileri	12
2.5. Bakteriyel Selüloz'un Biyosentez Mekanizması.....	14
2.6. Bakteriyel Selüloz'un Üretim Teknikleri.....	18
2.7. Bakteriyel Selüloz Üretimine Etki Eden Faktörler	25
2.7.1. Karbon Kaynakları.....	25
2.7.2. Azot Kaynakları	26
2.7.3. Organik Asit İlavesi	27
2.7.4. pH'ın Etkisi	28
2.7.5. Sıcaklığın Etkisi.....	29
2.8. Bakteriyel Selüloz'un Kullanım Alanları	29
2.8.1. Medikal Alanda Bakteriyel Selüloz Kullanımı.....	29
2.8.2. Kağıt Endüstrisinde Bakteriyel Selülozun Kullanımı.....	33
2.8.3. Gıda Endüstrisinde Bakteriyel Selülozun Kullanımı	37
2.8.4. Bakteriyel Selüloz'un Diğer Kullanım Alanları	38
2.9. Taguchi Yöntemi Uygulanarak Deney Tasarımı.....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	45
3.1. Materyal.....	45
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Bakterileri Kültür Yöntemi ile Önzenginleştirme	45
3.2.2. PAS'dan Proteinlerin Uzaklaştırılması ve Besiyerlerin Hazırlanması	47
3.2.3. Bakterilerden Kültür Yöntem ile Bakteriyel Selüloz Üretimi	47
3.2.4. Bakteriyel Selüloz Üretiminin Optimizasyon Analizi.....	48
3.2.5. Taguchi Deney Tasarımı.....	48
3.2.5.1. Bakteriyel Selüloz'un Ayrılması	50
3.2.5.2. Analizlerin Yapılması.....	51
3.2.5.2.1. Su Bırakma Özelliği.....	51
3.2.5.2.2. Viskozite.....	52
3.2.5.2.3. Termal Analiz.....	52
3.2.5.2.4. Çözünürlük Testleri.....	53
3.2.5.2.5. FT-IR Analizi.....	53
3.2.5.2.6. Fe -SEM Analizi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	54
4.1. Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Saflaştırılması.....	54
4.1.1. Farklı Kültürlerden Bakteriyel Selüloz Üretim Sonuçları	58

4.2. <i>L.rhamnosus</i> Bakteriyel Selüloz ve YC-380 kültürü Bakteriyel Selüloz'un Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	59
4.2.1. Su bırakma özelliği	59
4.2.2. Viskozite	60
4.2.3. FTIR sonuçları	62
4.2.4. Termal özellikler	64
4.2.5. Çözünürlük testi sonuçları	66
4.2.6. Fe-SEM Analizi Sonuçları	66
4.3. Bakteriyel Selüloz Üretiminin Optimizasyonu	68
4.3.1. Deneysel Bulgular ve Taguchi Performans Analizi	68
4.3.2. Taguchi S/N Analizi Optimizasyonu	69
4.3.2.1. pH, Organik Kaynak Konsantrasyonu, Aktif Kültür, İnkübasyon Süresi'nin Bakteriyel Selüloz miktarı S/N oranı	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	78
5.1. Farklı Kültürlerden Bakteriyel Selüloz üretimi.....	78
5.2. <i>L.rhamnosus</i> Bakteriyel Selüloz ve YC-380 kültürü Bakteriyel Selüloz'un Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	79
5.3. <i>L.rhamnosus</i> Bakteriyel Selüloz üretiminin Taguchi Metodu ile Optimizasyonu.....	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI VE OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ YAPILMASI

Cansu GÜRSOY

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytül SOFU

Bu çalışmada, süt ürünleri fermentasyon üretiminde görevli Laktik asit (LA) bakterileri kullanılarak bakteriyel selüloz (BS) üretme potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada; BS'un ekonomik açıdan üretim maliyetini düşürmek için süt endüstrisinin önemli bir atığı olan ve arıtılmadan doğaya verildiğinde büyük zararlar veren Peynir altı suyu (PAS) karbon kaynağı olarak değerlendirilmiştir. STM-7, LB-12, YC-380 ve *Lactobacillus rhamnosus* kültürleri farklı sıvı besiyeri ortamında, eşit zamanlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu besiyeri yüzeyinde oluşan selüloz peletinden bakteri hücrelerini ve besiyeri bileşenlerini uzaklaştırmak için NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Son olarak ağartma işleminden sonra selüloz süzülerek kurutulmuştur. Elde edilen sonuçlar LA bakterilerinin yüksek selüloz üretme potansiyeline sahip olduğunu göstermiş ve ucuz ham maddeler kullanılarak selüloz üretiminin ekonomik olması sağlanmıştır. TAGUCHI metodu kullanılarak organik kaynak konsantrasyonu, pH, sıcaklık, inokülasyon miktarı ve inkübasyon süresi parametrelerinin optimizasyon çalışmaları yapılarak en iyi üretimin olduğu optimum ortam tesbit edilmiştir.

Çalışmada 4 bakteri grubu arasında en yüksek verimle BS üretimi gözlenen bakteri *Lactobacillus rhamnosus* olarak bulunmuştur. Taguchi metoduna göre *Lactobacillus rhamnosus* bakterisi ile en iyi BS üretimi; PAS(%75)+MRS(%25) sıvı besiyerinde, %20 aktif kültür aşılması yapılarak ortam pH' ı 5.0 olduğunda ve 12 gün inkübasyon süresi olarak tespit edilmiştir. *L.rhamnosus* ile üretilen BS'un hidrojel yapısından dolayı su tutma kapasitesi yüksektir. FTIR sonuçlarındaki OH gruplarına ait geniş bantlar bu durumu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri, Bakteriyel Selüloz
2016, 90 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

RESEARCH OF CELLULOSE PRODUCTION POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA AND MAKING THE OPTIMIZATION STUDY

Cansu GÜRSOY

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Bioengineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr Aytül SOFU

In the study, for decreasing bacterial cellulose production price, which is an important waste of milk industry ve if it is not refined, it can damage nature is evaluated as carbon source. ABT-4, STM-7, LB-12 ve YC-380 cultures are left to the incubation in different stockplaces at the same time. NaOH solution is used for removing cellulose bacterial cells which becomes at stock place surface at the result of incubation ve stockplace combines. Finally, after the whitening operations, cellulose is dried by filtering. The results shows that LA bacteria have high level cellulose production potential ve using cheap raw materials make cellulose production economical. TAGUCHI method using an organic source concentration, pH, temperature, amount of inoculation ve incubation time of performing optimization studies was determined optimum parameter setting that best production.

Working in 4 group of bacteria with high efficiency in the production of BS *Lactobacillus rhamnasus* observed bacteria was found. With *Lactobacillus rhamnosus* bacteria according to the method of Taguchi the best BS production: PAS(%75)+MRS(%25) liquid medium, the culture is made %20 active inoculum medium at pH 5.0 ve 12 days was determined as the incubation period. BS produced by *L.rhamnosus* use of the hydrogel structure, water holding capacity is high. FTIR results OH groups of the wide bands this supports.

Keywords: Bacterial Cellulose, LAB Culture, Whey
2016, 90 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Aytül SOFU'ya teőekkürlerimi sunarım.

4488-YL1-15 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Güleryüzlü ve eğlenceli kişiliğiyle her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Tuba TUNÇ'a ve hayat boyu maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan çok değerli aileme teőekkürü bir borç bilirim.



CANSU GÜR SOY
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Selülozun yapısı (Geyer vd., 1994)	6
Şekil 2. 2. Bitkisel (a) ve Bakteriyel (b) selülozun yapısı (Bielecki vd.,2001).....	6
Şekil 2. 3. <i>Acetobacter xylinum</i> 'un elektron mikroskobu görüntüsü (Brown 2006). 10	
Şekil 2. 4. Lineer glukan polimerlerinin oluşumu (Ross vd., 1991)	12
Şekil 2. 5. Lactobacillaceae filogenetik haritası (Makarova vd., 2006)	13
Şekil 2. 6. <i>Ga. xylinus</i> 'un selüloz üretim mekanizması (Ishikawa vd., 1998)	17
Şekil 2. 7. Statik yöntemle bakteriyel selüloz üretimi (Krystnowicz vd., 2002)	19
Şekil 2. 8. Statik yöntemle üretilen selülozun mikroskobik yapısı(Bielecki vd.,)	20
Şekil 2. 9. Karıştırılmalı yöntem ile üretilen selüloz (Czaja vd., 2004).....	21
Şekil 2. 10. Hava kaldırmalı reaktör kullanılarak üretilen selüloz (Chao, vd.,)	23
Şekil 2. 11. Dönen disk reaktörü (Zhu, 2005)	24
Şekil 2. 12. Yanık bölgelere yerleştirilen bakteriyel selülozu göstermektedir	31
Şekil 2. 13. Yanıkların tedavisinde kullanılmak üzere bakteriyel selülozdan üretilen eldiven	32
Şekil 2. 14. Bakteriyel selülozdan yapılmış yapay kan damarı (Klemm vd.,).....	33
Şekil 2. 15. Elektronik kağıtlar (Cunningham, 2006)	35
Şekil 2. 16. Nata-de-coco isimli tatlı (Garcia ve Bountox, 2006)	38
Şekil 2. 17. Sony tarafından üretilen, bakteriyel selüloz diyaframının kullanıldığı kulaklık.....	39
Şekil 3. 1. Otoklav ile sterilize işlemi.....	46
Şekil 3. 2. UV spektrofotometre ile mikroorganizma yoğunluğu ölçümü.....	47
Şekil 3. 3. Cam tavalarda (34×19) hazırlanma işlemi.....	50
Şekil 3. 4. İnkübasyon işlemi	50
Şekil 3. 5. BS 'un ayrışma işlemi.....	51
Şekil 3. 6. Kurutulmuş BS.....	51
Şekil 3. 7. Kurumaya bırakılmış selüloz	52
Şekil 4. 1. Petride BS üretimi.....	54
Şekil 4. 2. Beherde BS üretimi.....	55
Şekil 4. 3. Cam tavalarda (büyük hacimde) BS üretimi.....	55
Şekil 4. 4. BS 'un süzme işlemi	56
Şekil 4. 5. BS'un süzme işleminden sonraki görünümü	56
Şekil 4. 6. NaOH çözeltisinde ağartma işlemi.....	57
Şekil 4. 7. Kuru BS görünümü	57
Şekil 4. 8. Toz halindeki BS'un görünümü.....	58
Şekil 4. 9. YC-380 ve <i>L.rhamnosus</i> bakterilerinin ürettiği selülozun su bırakma özellikleri.....	59
Şekil 4. 10. <i>L.rhamnosus</i> BS çözeltisinin viskozitesi.....	60
Şekil 4. 11. YC-380 BS çözeltisinin viskozitesi	61
Şekil 4. 12. <i>L.rhamnosus</i> bakterisinin ürettiği selülozun FTIR diyagramı	63
Şekil 4. 13. YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun FTIR diyagramı.....	63

Şekil 4. 14. <i>L.rhamnosus</i> 'dan elde edilen selülozun termal analiz diyagramı.....	64
Şekil 4. 15. <i>L.rhamnosus</i> 'dan elde edilen selülozun TGA ve DTG grafiği	64
Şekil 4. 16. YC-380'den elde edilen selülozun termal analiz diyagramı.....	65
Şekil 4. 17. YC-380'den elde edilen selülozun TGA ve DTG grafiği.....	65
Şekil 4. 18. BS'un Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüsü (×400)	67
Şekil 4. 19. BS'un Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüsü (×24000)	67
Şekil 4. 20. BS miktarı değerleri S/N oranı	69
Şekil 4. 21. pH ve organik kaynak konsantrasyonuna bağlı BS miktarı	75
Şekil 4. 22. pH ve aktif kültüre bağlı BS miktarı	76
Şekil 4. 23. Organik kaynak konsantrasyonuna ve aktif kültüre bağlı BS miktarı	76
Şekil 4. 24. Organik kaynak konsantrasyonuna ve İnkübasyon süresine bağlı BS miktarı	77
Şekil 4. 25. Aktif kültür ve inkübasyon süresine bağlı BS miktarı.....	77



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1. Selüloz üretebilen mikroorganizmalar ve oluşan selülozun yapısı (Çakmakçı vd., 2008)	11
Çizelge 2. 2. Taguchi ortogonal dizi seçim tablosu (Gökçe, 2009).....	41
Çizelge 3. 1. Deney Faktörleri ve Seviyeleri.....	49
Çizelge 3. 2. Taguchi L9 orthogonal deney tasarımı	49
Çizelge 4. 1. BS üretim miktarları	58
Çizelge 4. 2. Taguchi L9 modeline göre elde edilen deney sonuçları	68
Çizelge 4. 3. Deneylerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları	70
Çizelge 4. 4. Deneylerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları (Devam)	71
Çizelge 4. 5. Deneylerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları (Devam)	72
Çizelge 4. 6. En yüksek BS üretimi	73
Çizelge 4. 7. En düşük BS üretimi	73
Çizelge 4. 8. Gerçek ve tahmin verilerinin karşılaştırılması.....	74
Çizelge 4. 9. Gerçek ve tahmin verilerin doğrulama grafiği	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
BS	Bakteriyel Selüloz
Cel-	Selüloz Üretmeyen Fenotip
Cm	santimetre
D-Glikoz	Aktif Glikoz Dekstroz
LAB	Laktik Asit Bakterileri
Mm	milimetre
µm	mikrometre
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükloetid
Nm	nanometre
OD	Optik Yoğunluk
PAS	Peynir Altı Suyu
UDP-Glikoz	Üridin Difosfo Glikoz
UDPG	Pirofosforilaz Üridin Difosfo Glikoz Pirofosforilaz
(w/v)	ağırlık/hacim
°C	Santigrat
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Biyoteknolojideki gelişen yöntemlerle endüstri ve bazı sanayi ürünlerinin teknolojik olarak üretimine olanak sağlanmaktadır. Selüloz, endüstride kullanılan en önemli kaynaklardan biridir. Selüloz, bitkilerde hücre duvarında temel yapı maddesi olarak bulunmakla birlikte ayrıca bir biyopolimerdir. Bitkilerin hücre duvarlarının ana bileşeni olan selüloz, β (1-4) bağlı glukoz moleküllerinden oluşan bir polisakkarittir.

Selüloz ağaçlar ve pamuk bitkisinin işlenmesi ve endüstriyel ürünlere dönüştürülmesiyle oluşmaktadır (Brown, 2004). Endüstride yaygın kullanılan yöntemde, lignin ve hemiselülozun ayırma işlemleri ile selülozdan ayrılması gerekmektedir (Saxena vd., 1997). Bu işlem, zor ve masraflıdır. Bilim insanları bitkiler olmadan da selüloz üretebilmenin yollarını aramışlardır. İlk kez Brown tarafından sirke fermantasyonu sırasında, sıvı yüzeyde oluşan jelatinimsi yapıdan izole edilen *Acetobacter xylinum*'un, uygun bir besi ortamında üretildiğinde, yüksek miktarda ekstraselüler jelatinimsi bir yapı sentezlendiği belirtilmiştir (Brown, 1886; Bielecki vd., 2000). Bir asetik asit bakterisi olan *Gluconacetobacter* türleri başta olmak üzere; bazı bakteriler, mantarlar, algler ve tulumlular olarak adlandırılan deniz canlılarının da selüloz üretebildikleri bilinmektedir. Son 30 yılda yapılan çalışmalar, selüloz ürettiği bilinen bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. Böylece; selüloz üretiminde ikinci yöntem olarak, selülozun çeşitli mikroorganizmalardan biyosentez yolu ile elde edilmesi üzerinde durulmaktadır (Klemm vd., 2001).

Selüloz I olarak da bilinen doğal bitki selüloz nanofibrilleri, bitki hücresinin çeperinde hemiselülozlar ve lignin ile beraber bulunmaktadır. Bu durum, selülozun elde edilmesi için ilave kimyasal işlemlerin yapılmasına ve maliyet artışına neden olmaktadır. Bakteriyel Selüloz (BS) nanofibrilleri ise kristal yapıda, yüksek molekül kütleli, hidrojen bağları ile bağlanmış saf selüloz l'e sahiptir.

BS'deki selüloz nanofibrillerinin Young modülü 138-150 GPa civarında olup çeliğin (200 GPa) değerine yaklaşmaktadır (Olsson vd., 2010, Wan vd., 2007). Diğer taraftan, BS yüksek derecede hidrofilik olup, su tutma kapasitesi kuru ağırlığının 100 katına kadar ulaşabilmekte ve daha kolay biyolojik parçalanabilme özelliği göstererek, doğal bitki selülozundan farklılık göstermektedir (Gama vd., 2013).

Günümüzde BS ile yapılan çalışmalar, tıp ve eczacılık gibi alanlarda önem kazanmaktadır. Özellikle, yapay damar yapımı, hidroksiapatit ile kemik dokusunun iyileştirilmesi, eklem protezleri ve yanık tedavisi, yara bantları ve kozmetik gibi uygulamaları yapılmaktadır (Wan vd., 2007; Svensson vd., 2005; Putra vd., 2009; Fu vd., 2013; Jonas ve Farah, 1998; Ioelovich, 2013).

BS kurutulduktan sonra, ses dalgalarını iyi bir şekilde iletebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı BS'un akustik membran olarak kullanılabilirdiği belirtilmiştir (Hu vd., 2014). BS, Nata de Coco ve Kombuçaya Çayı olarak da değerlendirilmektedir. Nata de Coco gıda olarak şekerlenerek tüketilmekte, Kombuçaya çayının ise fermantasyon sonucu oluşan sıvı kısmından faydalanılmaktadır (Gih vd., 2012). Mühendislikte ise kompozit malzemeler önem kazanmış durumdadır. Bu nedenle, malzemelerin fiziksel ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için farklı dolgu maddeleri kullanılmaktadır. Bu dolgu maddeleri inorganik veya organik olup farklı kullanım amaçlarına dönüktür. BS içerisine ilave parçacıklar katılarak oluşturulan kompozitler de elektronik alanda kullanım alanı bulmaktadır (Liang vd., 2012; Ateş ve Aztekin, 2011).

BS'un artan öneminden dolayı, üretim yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Statik ve bioreaktörlerde yapılan üretiminde; karbon kaynakları, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı optimize edilmeye çalışılmaktadır. Bu sayede, hem üretim miktarı hem de fermantasyon koşullarının kontrol edilmesi sayesinde selülozun yoğunluğu, kristalitesi, membran geçirgenliği, çekme direnci gibi özelliklerinin ayarlanabilmesi sağlanabilmektedir. Diğer taraftan, selülozu üreten bakteri kaynağının yapısında değişiklikler yapılarak, verimin artması sağlanabilmektedir

(Gama vd., 2013; Vandamme vd., 1998; Yamanaka vd., 2000; Watanabe vd., 1998; Bungay ve Serafica, 2000; Hungund ve Gupta, 2010).

Laktik Asit Bakteri'leri (LAB), fermente süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. LAB'lar geleneksel yöntemle yapılan peynirlerde doğal olarak bulduklarından olgunlaşmada temel florayı oluşturmaktadırlar. LAB'lar ürünlere özgü duyuşal ve yapısal özellikler kazandırırılar. Ayrıca LAB'lar oluşturdukları antimikrobiyal maddeler sayesinde sağlığı koruyucu ve terapötik etki göstermektedirler. Geleneksel yöntemle üretilen ürünlerde doğal olarak bulunan bu mikroorganizmalar, endüstriyel ürünlerde süte çok farklı kombinasyonlarda saf kültür (starter kültür) olarak ilave edilmektedirler.

Bu tez çalışmasında; fermente gıda ürünlerinde, fermantasyondan sorumlu gras özellik gösteren yararlı bakterilerden olan, laktik asit bakterilerinin (LAB), BS retim potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Laktik asit bakterileri; süt ürünlerinde, yaygın olarak saf kültür olarak kullanılmaktadır. LAB'lar çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilen, belirli spesifik bir çevreye adapte olmuş ve hemen hemen doğal habitatta bulunan organizmalardır.

LAB'lar prokaryot, heterotrof ve kemo-organotrof olan canlı grubu içinde yer alırlar. LAB'lar gram (+), immobil, spor oluşturmeyan, aneorob fakat oksijene toleransları olan organizmalardır. Katalaz enzimini içermezler (bazıları katalaz içerebilir), nitratı redükte etmezler, sitokromoksidaz enzimleri bulunmamaktadır. Hidrokarbonları fermente ederek önemli miktarda laktik asit üretmektedirler. Bu özelliklere uyan bakteriler arasında 4 bakteri sınıfı ayırt edilebilmektedir. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc*'lardır. Bazı laktobasil suşlarının hareketli ve endospor oluşturduğu, bazı streptokokların aerob ortamda yaşadığı, yine bazı laktobasil ve pediokok'larda katalaz pozitif reaksiyon verdikleri bilinmektedir.

Dünyada ve ülkemizde fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri daha üstün, daha hafif, daha az yer kaplayan, daha ucuz ve yeni işlemlere daha uygun, üstün

performans gösteren, katma değeri yüksek malzeme ihtiyacı sürekli artmaktadır. Bu amaçla hazırlanan tez çalışmasında;

- Kompleks organik madde içeriğine sahip atık su olarak değerlendirilen peyniraltı suyu (PAS) kullanılarak içinde bulunan laktozun yeniden kazanılması ve ham madde olarak kullanılması, bu çalışmaya geri dönüşüm - evre dostu uygulama avantajı sağlamaktadır.

- BS üretiminde farklı bakteri grupları ile özellikle asetik asit bakteri grupları ile çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Süt ürünleri fermantasyonu üretiminde görevli olan laktik asit bakterileri (LAB) grubunda yer alan literatürde BS üretimine yönelik daha önce çalışılmamış *Lactobacillus rhamnasus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* ve YC-380 (Chr-Hansen) karışık kültür (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) bakterileri kullanılarak bakteriyel selüloz (BS) üretimi gerçekleştirilmiştir.

- Tez çalışmasında yapılan deneyler sonucunda 4 farklı bakteri kültürü içinde en yüksek üretim potansiyeli gösteren *Lactobacillus rhamnosus* ile BS üretiminin taguchi yöntemi kullanılarak optimizasyon ve kimyasal ve fiziksel analizler ile karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

- Tez çalışmasının ilk olarak gerçekleşmesiyle ulusal ve uluslararası literatüre kaynak oluşturacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

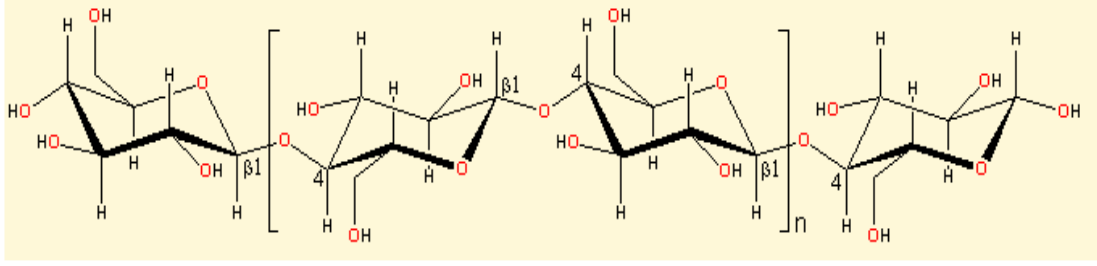
2.1. Selülozun Yapısı

Selüloz β -(1-4) glikosidik bağlarla birbirine bağlı D- anhidroglikopiranoz birimleri içeren lineer bir polimerdir. Her bir glikoz molekülü birbirine 180°'lik açı ile C1 ve C4 glikosidik oksijen bağları ile bağlıdır. Selüloz selubiyozun doğal polimeridir. Selubiyoz, selülozdaki glikoz moleküllerini içeren tekrarlayan yapısal birimdir (Maguire, A., 1997).

Selüloz, yüksek yapılı bitkilerde hücre duvarı yapısını oluşturan ve doğada en bol bulunan organik maddedir. Pamuk yaklaşık olarak saf selülozdur çünkü % 98'i selülozdan oluşmaktadır. Ketenin % 80'i, odunun ise % 40- 50'si selülozdan oluşur (Maguire, A., 1997).

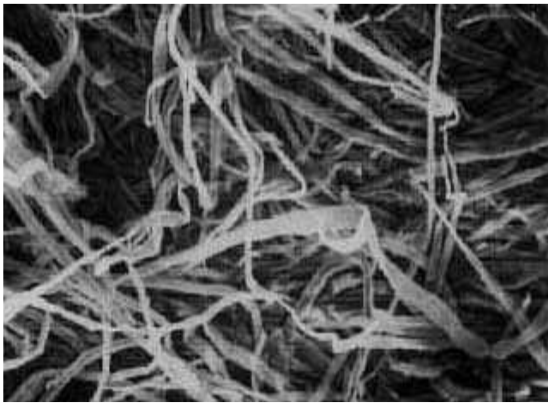
Selülozu, nişastadan ayıran özellik; selülozdaki asetal bağının β olmasıdır. Asetal bağdaki bu farklılık insan sindiriminde çok büyük bir farka neden olmaktadır. İnsanlar, selülozu sindiremez çünkü β asetal bağlarını parçalayacak enzime sahip değildirler. İnek, at, koyun gibi hayvanlar ve toprakta bulunan bakteriler β asetal bağlarını parçalayacak bu enzime sahiptirler (Chaplin, M., 2006).

Selüloz molekülü genişletildiğinde dışarıda hidroksil grupları bulunan ve bu sayede molekül içi ve hücre içi hidrojen bağları yapabilen düz bir kurdele yapıda olduğu görülür. Bu kurdelenin yüzeyi karbon atomlarına direkt bağlı hidrojen atomları içermektedir ve bu nedenle hidrofobiktir. Şekil 2.1'de selülozun moleküler yapısı gösterilmektedir (Geyer vd., 1994).

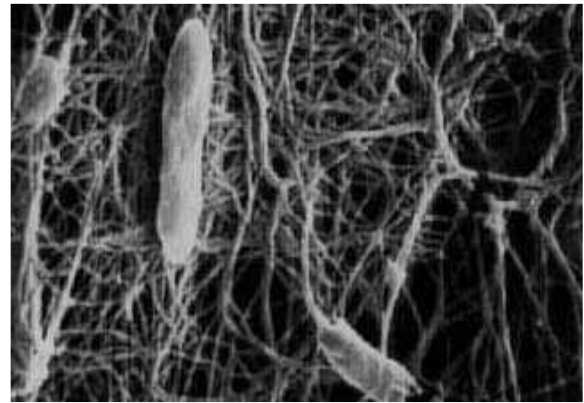


Şekil 2. 1. Selülozun yapısı (Geyer vd., 1994)

Doğada selülozun yapısını ve özelliklerini, moleküllerin kristalin yapıya birleşmesi ve yapısal liflere dönüşmesi belirler. Selüloz lifleri düşük çözünürlüğe sahiptir ve elastik değildirler. *Acetobacter xylinum* tarafından sentezlenen selüloz, uzun lifler şeklinde hücre dışına polimerize olur ve kimyasal olarak bitkilerden elde edilen selüloz ile aynı yapıya sahiptir. Her ikisi de β 1-4 glukandır. Bakteriyel selülozu, bitkisel selülozdan ayıran bir takım fiziksel özellikler vardır. Örneğin, kristallenme indeksi bitkisel selüloza göre oldukça yüksektir (%60'ın üzerinde) ve polimerizasyon derecesi bitkisel selülozdan farklıdır. Bakteriyel selülozun polimerizasyon derecesi, bazı durumlarda 16000 ve 20000 arasında değişirken, bitkisel selülozunki genellikle 13000 ile 14000 arasında değişmektedir. Şekil 2.2'de bakteriyel ve bitkisel selülozun yapısı gösterilmektedir (Bielecki vd.,2001) .



(a)



(b)

Şekil 2. 2. Bitkisel (a) ve Bakteriyel (b) selülozun yapısı (Bielecki vd.,2001)

Selülozun, paralel glukoz zincirleri taşıyan mikrolifli yapıdaki bu kristalografik formu, Selüloz I (doğal selüloz) olarak bilinmektedir. Selüloz I'in, iki formu bulunmaktadır. Selüloz I daha çok alglerin ve bakteriyel selülozun yapısında bulunurken, selüloz II bitkilerin yapısında yer almaktadır. Selüloz I, paralel glukoz zincirlerine ve kuvvetli intramoleküler hidrojen bağlarına sahiptir. Selüloz II doğal selülozun alkali maddelerle çözülmesi, çökeltmesi veya muamele edilmesiyle ve daha sonra suyla yıkanmasıyla elde edilir. Suyla yıkama prosesi selülozu çözmeden Selüloz I'in Selüloz II'ye dönüşmesini sağlar (Maguire, 1997).

Lif terimi elektron mikroskopunda görülebilen en ince yapıyı belirtmek için kullanılmaktadır. Doğal selüloz lifleri 1 ila 25 nm arasında değişen genişliğe (10-250 zincir uzunluğunda) ve 2000-18000 glukoz içeren 1 ila 9 µm arasında değişen uzunluğa sahiptir. Genellikle farklı mikroorganizmalar arasında lif genişliği değişim gösteriyor olsa da, aynı türlerde birbirine oldukça yakındır. Liflerin görevi ve bulunduğu yerler canlıdan canlıya farklılık göstermektedir. Bitkilerde selüloz lifleri polisakkarit yapıdaki dayanıklı hücre duvarını oluştururken, *Acetobacter xylinum*'da lifler metabolik olarak inert ve oldukça saf olarak hücre dışına salınmaktadırlar (Geyer vd., 1994).

2.2. Bakteriyel Selülozun Özellikleri

Acetobacter xylinum tarafından sentezlenen selülozu, ağaçlardan ve pamuktan elde edilen selülozdan ayıran bir takım özellikler vardır. Bu özellikler; kimyasal olarak oldukça saf olması, hidrofilik olması, istenilen şekildeki selülozun direkt sentezlenebilmesi, yüksek su tutma kapasitesi ve biyolojik olarak parçalanabilir olması şeklinde sıralanabilir. Bunlara ilave olarak; *Acetobacter xylinum*'un selüloz sentezinde birçok farklı substratı'nın kullanabiliyor olması ve oluşan selülozun fiziksel özelliklerinin üretim esnasında kontrol edilip ayarlanabiliyor olması, bakteriyel selülozun kullanım alanlarını arttırmaktadır (Geyer vd., 1994).

Bakteriyel selüloz, üretim koşullarına göre farklılık gösteren, kuru ağırlığının 60 ile 700 katı arasında su tutma kapasitesine sahiptir. Statik kültürde üretilen

selüloz zarının toplam ağırlığının yalnızca % 1'i selüloz, geri kalan kısmı ise sudur. Bunun nedeni, selüloz liflerinin, sıvı besi yerine hücre dışına salınarak birleşmesidir. Bakteriyel selülozun hidrofilik özelliği üretimi esnasında ya da daha sonra hidrofilik maddelerin eklenmesiyle arttırılabilir (Geyer vd., 1994) .

Bakteriyel selüloz, geniş hidrojen bağlarına sahip ağ yapısında olduğundan, oldukça kuvvetli mekanik güce sahiptir. Kopmaya ve şeklini korumaya karşı direnci, bir çok sentetik ipliğin gösterdiği dirençten daha yüksektir (Geyer vd., 1994) .

Bakteriyel selülozun; makroskopik morfolojisi, üretilme şartlarına bağlıdır. Durgun koşullarda bakteri, selüloz ağını, oksijen açısından zengin olan sıvı besiyerinin yüzeyinde oluşturur. Selüloz alt iplikçikleri, bakteri hücrelerinin yüzeyindeki gözeneklerden doğrusal olarak hücre dışına salınır, mikro iplikçikleri oluşturmak üzere kristal yapı kazanır ve besiyerinin derinlerine doğru uzanır. Birbirinin üstüne binerek ve birbirine sarılarak paralel, fakat düzensiz bir şekilde uzanan deri benzeri bu zar, *Ga. xylinus* hücrelerini destekler. Çalkalamalı kültürlerde oluşan bakteriyel selüloza göre durgun kültürde oluşan bakteriyel selülozun komşu iplikçikleri daha az dallanmış ve birbiriyle daha az bağlantılıdır. Çalkalamalı kültürde düzensiz tanecikli, yıldız şeklinde ve lifli iplikçikler besiyerine çok iyi bir şekilde dağılmış olarak bulunur. Ağsı iplikçikler ızgara benzeri bir yapı oluşturmak üzere birbirine bağlanır ve hem düşey hem de paralel doğrultuda uzanır.

Selüloz doğada, yapısal olarak birbirinden farklı 4 şekilde bulunmaktadır;

- Selüloz I, paralel şekilde uzanan β -1,4 glukoz zincirlerini içerir. *Ga. xylinus* tarafından üretilen zar şeklindeki selülozdur. Kurutulmamış şekildeki selüloz I, doğal selüloz olarak adlandırılır (Ross vd., 1991; Brown, 1999).
- Selüloz II birbirine paralel olarak uzanmayan β -1,4 glukoz zincirlerini içerir. *Ga. xylinus*'un çalkalamalı kültürlerinde, selüloz I'in yeniden kristallenme ya da

endüstriyel merserize oluşturma işlemlerinden sonra elde edilir (Ross vd., 1991; Brown, 1999).

- Selüloz III, selüloz I'in kimyasal olarak işlenmesiyle elde edilir (Haigler ve Weimer, 1991).
- Selüloz IV, yüksek bitkilerin hücre duvarlarında bulunur ve selüloz II'nin kimyasal olarak işlenmesiyle elde edilir (Haigler ve Weimer, 1991).

Selüloz I ve II olarak bilinen bakteriyel selüloz çeşitleri birbirinden X-ışınları, nükleer manyetik rezonans, Raman spektroskopisi ve kızıl ötesi analizleri ile ayrılabilir (Johnson ve Neogi, 1989). Selüloz II'nin paralel yapıda olmaması ve yüksek sayıda hidrojen bağı içermesi ısı işlemlere dayanıklılığını arttırmaktadır. Çalkalamalı kültürde elde edilen selüloz, durgun kültürde üretilene kıyasla daha düşük kristallenme katsayısı ve daha küçük kristal boyutuna sahiptir (Watanabe vd., 1998).

Doğada selüloz II, bazı algler, küfler *Sarcina ventriculi* gibi bakteriler tarafından sentezlenmektedir (Jonas ve Farah, 1998).

Bunun yanı sıra doğal selüloz I, selüloz I_a ve I_β olarak adlandırılan iki kristal alt allomorf yapıdan oluşmaktadır. Selüloz I_a ve I_β kristal paketleri, moleküler yapısı ve hidrojen bağları açısından birbirinden farklılık gösterir ve bu farklılıklar selülozun fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkiler. Bazı alg ve bakterilerden elde edilen selüloz bol miktarda I_a içerirken, pamuk ve odun I_β açısından zengindir (Saxena ve Brown, 2005). *Ga. xylinus*'un sentezlediği selüloz, I_a daha fazla miktarda olmak üzere her iki yapıyı da içerir. Bu yapıların ayrımı ¹³CNMR (Masuda vd., 2003), elektron kırınım (difraksiyon), kızıl ötesi spektroskopisi ve X-ışınları kırınımı (Bohn vd., 2000; Astley vd., 2001) ile yapılabilmektedir.

BS'un sentez süresi de polimerin moleküler özellikleri üzerine etkilidir. Biyosentez süresi 6 güne kadar uzatıldığında, BS'un polimer oluşum derecesi artmaktadır. Sürenin 28 güne kadar uzaması, polimer oluşum derecesini düşürmekte ve polidispersiteyi artırmaktadır (Strobin vd., 2004).

2.3. BS Üreten Bakteriler

BS, bazı bakteri cinsleri tarafından üretilmekle birlikte, en fazla bilinenler *Ga. Xylinus* suşlarıdır. Gram negatif bakterilerin yanı sıra bazı gram pozitif bakteriler ve bazı fototrofik siyanobakterler de selüloz üreticisidir (Sutherland, 2001; Bielecki vd., 2004; Branda vd., 2005).

Selülozun en verimli üreticisi, gram negatif, asetik asit bakterisi *Acetobacter xylinum*'dur. *Acetobacter xylinum* ve onun ürettiği selüloz yaklaşık bir yüzyıl önce 1886 yılında Adrian Brown tarafından keşfedilmiştir ancak bakteriyel selüloz dikkatleri yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra çekmeye başlamıştır. Hestrin ve arkadaşları (1947 ve 1954) liyofilize *Acetobacter* hücrelerinin bakteriyel selüloz sentezlediğini ispatlamalarının ardından *Acetobacter xylinum* selüloz üretimi çalışmalarında model mikroorganizma olarak kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 2.3'de *Acetobacter xylinum*'un elektron mikroskobundaki görüntüsü yer almaktadır (Brown, 2006) .



Şekil 2. 3. *Acetobacter xylinum*'un elektron mikroskobu görüntüsü (Brown 2006)

Bu bakteri doğada çiçeklerin ve meyvaların yüzeylerinde yer almaktadır, şaraplardan ve diğer fermantasyon ürünlerinde sirke üretiminde çok önemli bir ticari öneme sahiptir. Bunlar çok kuvvetli aerobik (oksijene ihtiyaç duyan) organizmalardır ve genellikle maya gibi fermentatif organizmalarla aktivite gerçekleştikten sonra büyümektedirler. En önemli karakteristik özelliklerinden

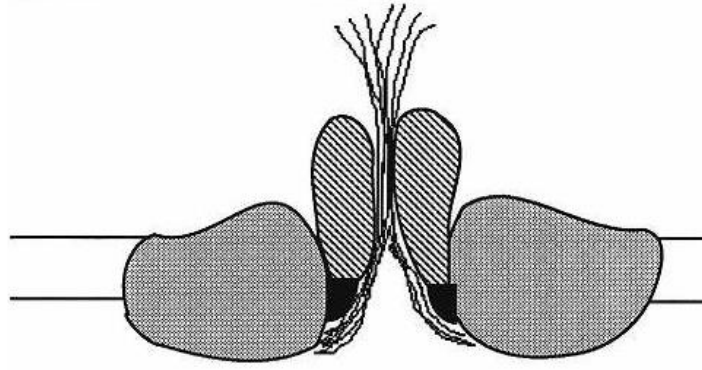
bir tanesi; etanolü asetik asite okside etmeleridir, bu nedenle genellikle asetik asit bakterileri olarak bilinmektedirler. Çizelge 2.1’de selüloz sentezleyebilen mikroorganizmalar ve sentez sonucunda oluşan selülozun yapısal özellikleri özetlenmiştir (Bielecki, 2001).

Çizelge 2. 1. Selüloz üretebilen mikroorganizmalar ve oluşan selülozun yapısı (Çakmakçı vd., 2008)

Cinsler	Selülozun yapısı
<i>Acetobacter</i>	Şeritlerden oluşmuş hücre dışı zar,
<i>Achromobacter</i>	iplikçikler
<i>Aerobacter</i>	iplikçikler
<i>Agrobacterium</i>	Kısa iplikçikler
<i>Alcaligenes</i>	iplikçikler
<i>Pseudomonas</i>	Belirgin olmayan iplikçikler
<i>Rhizobium</i>	Kısa iplikçikler
<i>Sarcina</i>	Amorf selüloz
<i>Zoogloea</i>	Tanımlanmamış

Fotosentetik olmayan bu organizma; glikoz, gliserol ve diğer organik substratları kullanarak bunları saf selüloza çevirmektedir. Tipik tek bir *Acetobacter xylinum* hücresi saatte ortalama 108 glikoz molekülünü selüloza dönüştürmektedir. β (1-4) glukoz zincirleri hücre dışında sentezlendiğinden, buldukları besi yerine salınmaktadırlar (Bielecki , 2001) .

Acetobacter xylinum’un tek bir hücresi, içerisinden glukoz zincir polimerinin lif şeklinde birleşerek çıktığı, lineer deliklere sahiptir. Bu yüzlerce delik glukoz polimer kabloları oluşturmaktadır ve sonuçta kurdele benzeri bir yapı ortaya çıkmaktadır. Bu karışık lif ağı birleşerek ince zar olarak bilinen jelatin membranı oluştururlar. Şekil 2.4’de selüloz oluşumu esnasında meydana gelen lineer glukoz zincirleri gösterilmektedir (Brown, 2006) .



Şekil 2. 4. Lineer glukon polimerlerinin oluşumu (Ross vd., 1991)

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik Asit Bakteri'leri (LAB) çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilen, belirli spesifik bir çevreye adapte olmuş ve hemen hemen doğal habitatta bulunan organizmalardır (örneğin; vajina, sıcak kanlıların bağırsağı, feçes, dudaklar meyve veya sebzelerde) (Holzapfel vd., 2001; Çakır, 2001; Temmerman vd., 2004).

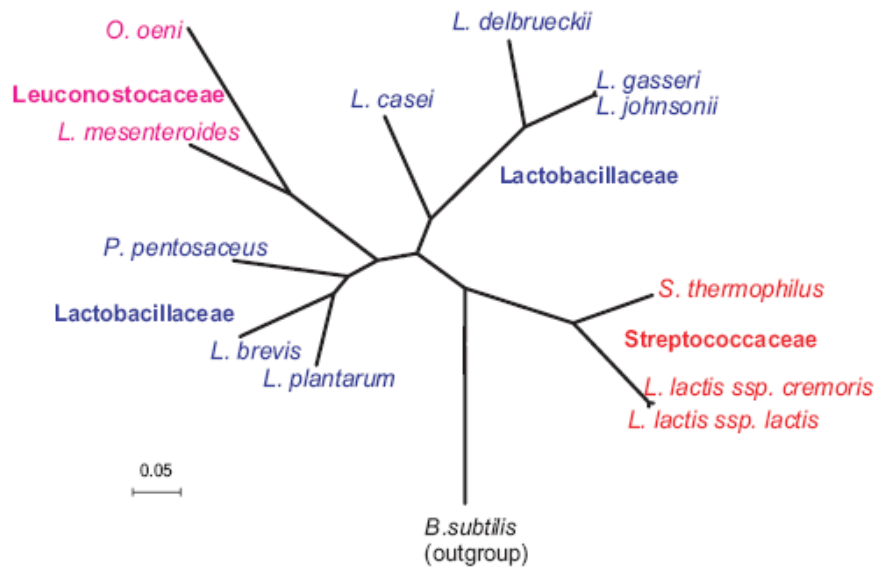
Ayrıca LAB'lar fermente süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemle yapılan peynirlerde doğal olarak bulduklarından olgunlaşmada temel florayı oluşturmaktadırlar. Ürünlere özgü duysal ve yapısal özellikler kazandırır. Ayrıca oluşturdukları antimikrobiyal maddeler sayesinde sağlığı koruyucu ve terapötik etki göstermektedirler. Geleneksel yöntemle üretilen ürünlerde doğal olarak bulunan bu mikroorganizmalar, endüstriyel ürünlerde süte çok farklı kombinasyonlarda saf kültür (starter kültür) olarak ilave edilmektedirler.

LAB'lar, Firmicutes sınıfına, alt sınıf olarak Bacilli ve Lactobacillales takımına aittir. Prokaryot, heterotrof ve kemo-organotrof olan canlı grubu içinde yer alırlar. Gram (+), immobil, spor oluşturmeyen, aneorob fakat oksijene toleransları olan organizmalardır. Katalaz enzimini içermezler (bazıları katalaz içerebilir), nitratı redükte etmezler, sitokromoksidaz enzimleri bulunmamaktadır. Hidrokarbonları fermente ederek önemli miktarda laktik asit

üretmektedirler. Bu özelliklere uyan bakteriler arasında 4 bakteri sınıfı ayırt edilebilmektedir. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc*'lardır. Bazı laktobasil suşlarının hareketli ve endospor oluşturduğu, bazı streptokokların aerob ortamda yaşadığı, yine bazı laktobasil ve pediokok'larda katalaz pozitif reaksiyon verdikleri bilinmektedir (Accolas, 1979; Braun vd. 1989; Vandamme vd. 1996; Kılıç, 2008).

Lactobacillales sınıflandırmasında, geleneksel bazlı fenotipik sınıflandırma ile rRNA bazlı filogenetik sınıflandırma arasında farklılıklar vardır. Tam genom, DNA ve DNA-RNA hibridizasyonu ve GC içeren çalışmalarda Lactobacillales yakın ilişkili grupların (Wood vd., 1995), *Leuconostoc* grup (*Le. mesenteroides* ve *O. oeni*), *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* grup (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *P. pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis*), ve *Lb. delbrueckii* grup (*Lb. delbrueckii*, *Lb. gasseri* ve *Lb. johnsonii*) (Vandamme vd., 1996); streptococci (*S. thermophilus*) ve lactococci (*Lc. lactis* ssp. *lactis* and *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) olduğu belirtilmektedir (Wood ve Holzapfel, 1995).

Lactobacillales filogenetik ağacı (Şekil 2.5.) oluşmasında tam genomunun tanımlanması, onların evrimsel ilişkilerinin daha kesin bir analizini sağlamaktadır (Makarova vd., 2006).



Şekil 2. 5. Lactobacillaceae filogenetik haritası (Makarova vd., 2006)

2.5. Bakteriyel Selüloz Biyosentez Mekanizması

Selüloz, dünyada en çok bulunan biyokimyasal madde olmasına rağmen, bitkilerdeki biyosentez mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok araştırmacı, *Acetobacter* türlerinin bakteriyel selüloz üretimini inceleyerek, bitkilerdeki biyosentez mekanizması hakkında fikir sahibi olmaya çalışmıştır. Marx-Figini, hücre duvarı selülozunun ve bakteriyel selülozun biyosentezini kıyaslamıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda; polimerizasyon derecesinin ve bitkisel selülozun molekül ağırlığının sabit olduğunu ve bunların sentez süresinden, selüloz veriminden ve reaksiyon koşullarından etkilenmediğini göstermişlerdir.

Bu durumun; bakteriyel selüloz için de aynı şekilde olup olmadığını araştırdıklarında, selülozun polimerizasyon derecesinin süre ile değiştiğini ve hücre sayısı ile paralel olarak bir artış gösterdiğini saptamışlardır. Hücreler daha hızlı büyürken polimerizasyon artmakta, büyüme durduğunda ise biyosentez de sona ermektedir. Bu sonuçlara dayanarak, bitkilerdeki ve bakterideki selüloz biyosentezinin farklı olduğunu ispatlamışlardır (Zhu, 2005).

Acetobacter cinsi organizmalar mutlak aerop olup, genellikle meyvelerde, sebzelerde, sirkede, meyve sularında ve alkollü içeceklerde bulunmaktadır (Skollek vd., 1998). *Ga. xylinus*, suda çözünebilir ve toksik olmayan D-glikozu kullanarak, birkaç gün içerisinde hücre dışı saf selüloz üretebilen ve patojen olmayan bir bakteridir. Bu bakteri tarafından üretilen selülozun moleküler ağırlığı bitkilerden elde edilen selülozunkine ile aynı olmasına rağmen, bitkilerden elde edilen selüloz polisakkaritinden farklı olarak lignin, pektin, hemiselüloz ve diğer biyojenik yan ürünleri içermemektedir. Hücre dışı mikrobiyel selülozun bitkisel selülozdan ayrılan diğer yanları, yüksek su tutma kapasitesi, ıslak fazda iken yüksek mekanik dayanımı, tam bir ağ yapısına ve çok düzgün bir miselli iç yapıya sahip olmasıdır. Polimer matris, çevresindeki sulu ortamdaki besin maddelerini yüksek düzeyde absorbe edebildiğinden, yapısında yer alan bakteri hücrelerinin besin maddesi gereksinimini karşılamada etkilidir (Jonas ve Farah, 1998). Aynı zamanda *Ga. xylinus*'un sentezlediği selülozun depo materyali görevi

üstlendiği ve açlık durumunda kullanılabilirdiği ileri sürülmektedir. Selüloz üreten bazı *Ga. xylinus* suşlarının sıvı besiyerindeki kültürlerinde selülozun parçalanmasını sağlayan ekzo ve endoglukanazların varlığı belirlenmiştir (Okamoto vd., 1994).

Selüloz tabakanın vizkozitesi ve hidrofilik özellikleri nedeniyle bakterileri kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) karşı koruduğu da bilinmektedir (Lynd vd., 2002). Bunun yanı sıra BS'un bakteri hücrelerini UV ışınlarından koruduğu da belirlenmiştir. Asetik asit bakterilerinin 1 saat süreyle UV ışınlarına maruz bırakılması sonucunda %23'ü canlılığını korumuştur. Bu koruyucu polisakkaritin uzaklaştırılması canlılıkta önemli bir azalmaya (sadece %3 canlılık) neden olmuştur (Ross vd., 1991).

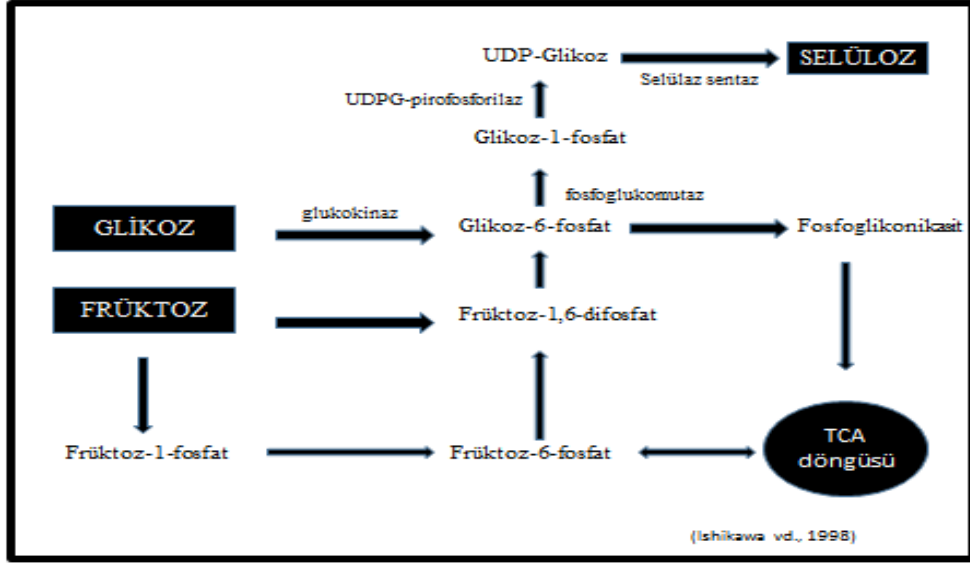
Günümüzde *Acetobacter xylinum*, selüloz biyosentezi çalışmalarında model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. *Acetobacter xylinum*'da iki ana karbon metabolizması bulunmaktadır. Karbonhidratların oksitlenmesinde pentoz fosfat döngüsü, organik asitlerin ve buna bağlı ürünlerin oksitlenmesinde ise sitrik asit döngüsü gerçekleşmektedir. *Acetobacter xylinum*'un anaerobik şartlarda glikozu metabolize edememesinin nedeni; glikoliz için gerekli olan fosfofruktokinaz enziminin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Okzaloasetat dekarboksilaz enziminin sıradışı düzenlenmesi sonucunda *Acetobacter xylinum*'da glikoneogenez gerçekleşmektedir.

Bu organizmada selüloz heksoz fosfatlardan oluşmaktadır. Heksoz fosfat karbonundan selüloz oluşması ya da pentoz döngüsünün gerçekleşmesi enerji bağlantılı kontrol mekanizması tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizmada kontrol noktası Adenozin trifosfata (ATP) hassas, Nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD)'ye bağlı glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimidir. *Acetobacter xylinum*' da bulunan iki farklı glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminden sadece bir tanesi ATP tarafından inhibe olmaktadır (Ross vd., 1991). *Acetobacter xylinum*'da selüloz sentezinde en yakın şeker nükleotit prekürsörü üridin difosfo glikoz (UDP-glikoz)'dur.

Selüloz sentezi, dış membran ile sitoplazmik membran arasında gerçekleşmektedir. Üretilen selüloz iplikçikleri, lipopolisakkarit membrandaki 120–150 Å çapındaki gözeneklerden hücre dışına salınmaktadır (Zaar, 1979). Bakteri yüzeyindeki gözeneklerle bağlantılı olarak çalışan selüloz sentez kompleksi, selüloz sentezinde görev almaktadır. Selüloz sintaz ise bu işlemdeki en önemli enzim olarak kabul edilmektedir. Bu enzim, saflaştırılmış ve selüloz iplikçiklerinin oluşumu, senteze uygun in vitro koşullarda ispatlanmıştır (Glaser, 1957; Lin vd., 1985). Cyclic diguanilmonofosfat (c-di-GMP) ise selüloz sintazın aktivatörü olan önemli bir moleküldür (Bureau ve Brown, 1987; Jonas ve Farah, 1998; Brown, 1999; Delmer, 1999; Camilli ve Bassler, 2006; Lee vd., 2007).

Aynı zamanda selüloz üretiminde bir çeşit hem bağlayan Per-ARNT-Sim bölgesi sensörü (hem-PAS) olan fosfodiesteraz A (PDEA) etkilidir. PDEA, anaerobik koşullarda c-di-GMP'yi etkili şekilde hidrolize ederek, selüloz sentezinin engellenmesine neden olmaktadır. Su-hava arayüzünde enzimin inaktif şekli olan oxy PDEA'nın meydana gelmesi, selüloz zarının oluşturulmasına imkân tanır (Tal vd., 1998; Gilles-Gonzalez ve Gonzalez, 2004).

Mikrobiyel selüloz, beş temel enzimatik dönüşüm sonucu olmaktadır (Şekil 2.6.). Bunlar: Glikoz permeaz, glikokinaz, fosfoglikomutaz, UDP-glikoz pirofosforilaz ve selüloz sintaz enzimleridir. Selüloz sintaz (UDP-glikoz: 1,4-D-glikoziltransferaz; EC 2.4.1.12), sentez işleminin temel enzimi olarak kabul edilmektedir. Selüloz sentaz ve akraba enzimler, 2- glikoziltransferazlar ailesindedir. Bu aile, a bağlı UDP-şeker vericilerini kullanarak, anomerik karbondaki b bağının oluşumunu da içeren glikozil aktarım tepkimelerini gerçekleştirir (Saxena ve Brown., 2000).



Şekil 2. 6. *Ga. xylinus*'un selüloz üretim mekanizması (Ishikawa vd., 1998)

Sentez işlemi glükozun, selüloz prekürsörü olan üridin difosfoglikoz (UDP-G) sentezini takiben β (1-4) glukoz zincirine polimerizasyonunu içerir. UDP glükoz selüloz üretiminde öncül maddedir. UTP ve glükoz-1-fosfattan üretilmektedir. UTP biyosentezi ise 5-florouridinle (5-FUR) artırılabilir. *A. xylinum* subsp. *nonacetoxidans* 757'nin 5-FUR'e dirençli mutantlarının selüloz üretimleri incelenmiş ve mutant FUR-35'in doğal suşa kıyasla %40 düzeyinde daha fazla selüloz ürettiği belirlenmiştir. FUR-35'de hücre içi UTP, UDP-G miktarları ve karbamil fosfat sintetaz II (KFS) aktivitesi doğal suşa kıyasla yüksek bulunmuştur. Mutant suşun selüloz üretiminin artması UTP biyosentezinin artmasına bağlı olarak UDP-G düzeyinin artmasına bağlanmıştır (Ishikawa vd., 1998).

Selüloz uzun zinciri tek tek moleküler olarak sentezlenir. Selülozun oluşumu sırasında iplikçikler hiyerarşik sırada biyosenteze uğrar. Tek tek selüloz zincirleri yaklaşık 3,5 nm,'lik bir çapa sahip temel fibrilli (protofibriller) oluşturmak üzere bir araya gelir (Frey-Wyssling, 1954).

Kaynağına bağlı olarak elementer liflerin çapı 2-20 nm aralığında değişebilir ve bunların düzenlenmeleri, biyosentezi yöneten koşullarına bağlıdır.

Mikroiplikçikler elementer liflerin yığılması ile oluşturulur ve yüzeyde serbest enerjiyi azaltmak için bir mekanizma olarak kullanılır. Bu agregasyon olgusu van der waals kuvvetleri gibi intra ve inter moleküler hidrojen bağları ile desteklenir (Peterlin vd., 1970) . Mikrofibrilleri oluşturmak için toplanan selüloz molekülleri kaynağına bağlı olarak farklı yönelimleri vardır. Mikrofibril agregalar, amorf bölgeleri oluşturmak için az sıralı zincirleri ile birlikte karmaşık ve güçlü hidrojen bağları ile stabilize edilmiş sıkı bir şekilde istiflenmiş kristalitleri oluşturan selüloz zincirleri oluşturmaktadır (Mazeau vd., 2003).

Moleküler arası etkileşimleri ve mevcut moleküler yönelimlere bağlı selülozun farklı polimorfları bulunabilir. Selüloz kaynağına bağlı olarak içeriği değiştirilebilir altı polimorflar (I, II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II}) tesbit edilmiştir (Brinchi vd., 2013). Ana selüloz, genel olarak selüloz I kristal yapısına sahiptir. Ancak, daha allomorphs I_a ve I_β 'ya bölünür (Atalla vd., 1984). I_β monoklinik kristalli bir yapıya sahip ise selüloz I_a bir triklirik yapıya sahiptir (Debzi vd., 1991).

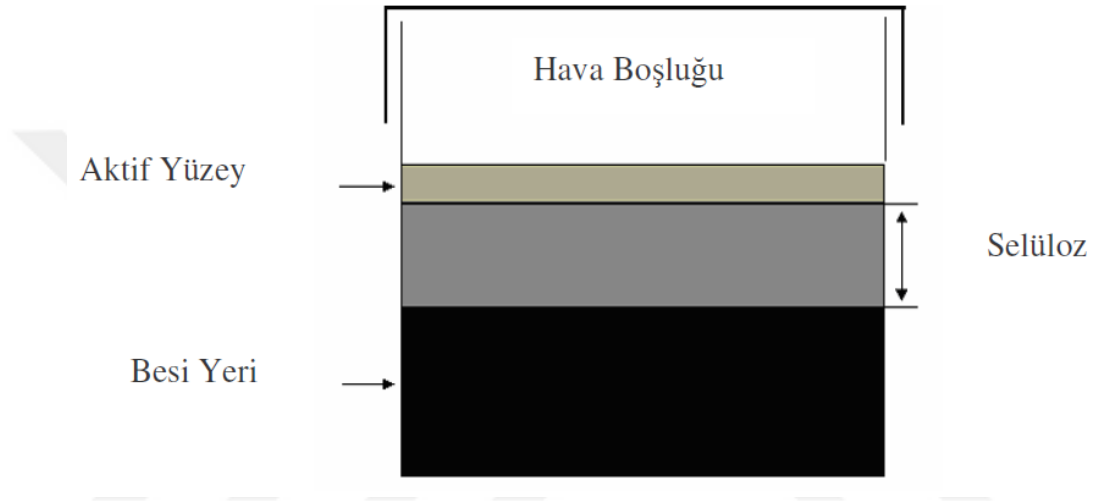
Yüksek bitkilerde selüloz oluşturucu hücre duvarları I_β açısından zengin iken mikrobik ve alg kaynaklardan elde edilen selüloz, I_a açısından zengindir. Bu mikrofibriller, makrofibrils denilen büyük birimleri ve onlar da selüloz liflerini oluşturmak için bir araya gelirler.

2.6. Bakteriyel Selüloz Üretim Teknikleri

Bakteriyel selüloz üretimi için değişik teknikler bildirilmiştir. Ekonomik ve ticari olarak uygulanma potansiyeli olan statik ve karıştırılmalı teknikler kullanılmaktadır (Watanabe et al. 1998). Ayrıca selüloz üretiminde yatay fermentörler, hava kaldırmalı reaktörler ve dönen disk reaktörleri de kullanılmaktadır (Krystnowicz vd., 2002) .

Bakteriyel selüloz'un üretim tekniği seçimi, elde edilecek biyopolimerin ticari hedefine bağlıdır. Seçilen kültür tekniği; selülozun yapısına, dolayısıyla fiziksel ve mekaniksel özelliklerine doğrudan etki etmektedir (Krystnowicz vd., 2002).

Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan geleneksel yöntem statik yöntemdir. Bu yöntem oldukça basittir ve zar halinde selüloz üretmek için en çok tercih edilen yöntemdir. Statik yöntemde inoküle edilmiş besi yeri, yayvan kaplara dökülür ve üzeri kapatıldıktan sonra zar kabın yüzeyini sarana kadar, yaklaşık 5 ila 20 gün arasında beklenmektedir. Yapılan araştırmalar, zarın sadece en üst kısmında üreme olduğunu, zarın alt kısmında kalan hücrelerin zamanla inaktif hale geçtiğini ve oksijen yetersizliği nedeniyle öldüğünü göstermektedir. Şekil 2.7'de statik yöntem ile selüloz üretimi şematize edilmiştir (Krystnowicz vd., 2002) .



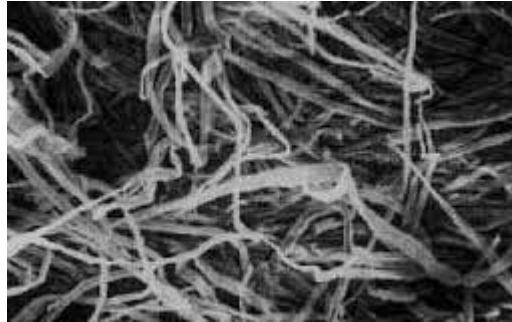
Şekil 2. 7. Statik yöntemle bakteriyel selüloz üretimi (Krystnowicz vd., 2002)

Statik yöntemde selüloz lifleri düzenli bir şekilde üst üste birikir. Bu nedenle karıştırmalı yöntemlere kıyasla statik yöntemle elde edilen selülozun yapısında paralel glukan zincirlerine ve kuvvetli molekül içi hidrojen bağlarına sahip Selüloz I daha fazla bulunmaktadır. Ayrıca statik yöntemle elde edilen selülozun kristallenme indeksi ve kristal boyutu, karıştırmalı yöntemle elde edilen selüloza göre daha fazladır (Bielecki,2001).

Statik yöntem oldukça basit olmasına ve üretim sonucunda zar şeklinde selüloz elde edilmesine rağmen bir çok dezavantaja da sahiptir. Bunlardan en önemlisi difüzyon sorunudur. Yüzeyde oluşan zar şeklindeki selüloz besi yerine yeteri kadar oksijen geçişine imkan vermemekte bu da alt kısımdaki hücrelerin zamanla ölmesine neden olmaktadır. Ayrıca statik yöntemde besi yeri inoküle edildikten

sonra fermentasyon süresi boyunca hiç hareket ettirilmemelidir. Bu da ölçüm alınmasını hemen hemen imkansız hale getirmektedir. Örneğin pH'ın ayarlanması ya da besi yerine ilave madde eklenmesi imkansızdır. Statik yöntem kullanılmasında diğer bir problem ise ölçek büyütme sorunudur. Bu yöntemde büyük yüzey alanlarına ihtiyaç duyulduğundan, büyük ölçek üretimde statik yöntemin kullanımı oldukça zordur (Zhu, 2005) .

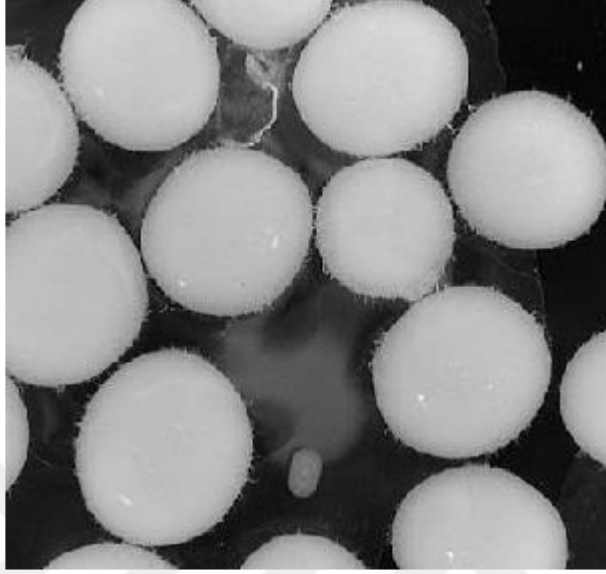
Statik kültür koşullarında yüzey/hacim oranı önemlidir. Bu oran yüksek havalandırmadan (gereksizdir) ve düşük havalandırmadan (hücre gelişimine ve selüloz sentezine etki eder) korunmalıdır. Araştırmacılar yüzey/hacim oranı için 0.7 cm^{-1} - 2.2 cm^{-1} aralığındaki değerleri vermişlerdir (Bielecki vd., 2001). Statik kültürde bakteriyel selüloz sentezinin kontrolü çok zordur. Önemli parametrelerin sürekli kontrol edilmesi gerekmektedir. Keto glikonik asidin birikmesinden dolayı pH düşmektedir. Dolayısıyla bakteriyel selüloz için uygun pH ortamı da kaybolmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için asetik asit kullanılmıştır. *Acetobacter* spp. asetik asidi karbondioksit ve suya parçalamıştır. Sonuçta istenen pH aralığı sağlanmıştır (Watanabe vd., 1998). Şekil 2.8.'de statik yöntemle üretilen selülozun mikroskobik yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2. 8. Statik yöntemle üretilen selülozun mikroskobik yapısı(Bielecki vd.,)

Ticari üretim için en fazla karıştırılmalı kültür tekniği tercih edilmektedir. Fakat yüksek bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilememektedir. Statik yöntemdeki zar şeklindeki selülozun aksine karıştırılmalı yöntemde lifli yapıda selüloz oluşmaktadır. Hareketten doğan kuvvetlerin yuvarlak, düzensiz yapıda selüloz oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Statik yönteme kıyasla selüloz

mikrolifleri karıştırmalı yöntemde daha ince, kristal büyüklükleri daha küçük ve polimerizasyon derecesi daha azdır. Şekil 2.9'da karıştırmalı yöntemle üretilen selüloz gösterilmektedir (Czaja vd., 2004).



Şekil 2. 9. Karıştırmalı yöntem ile üretilen selüloz (Czaja vd., 2004)

Karıştırmalı kültürlerde *Acetobacter* türleriyle yapılan selüloz üretiminde bir çok problemle karşılaşmaktadır. En büyük problem kültürün stabil olmamasıdır. Zamanla selüloz üretim yeteneği azalmaktadır ve bir süre sonra selüloz üretmeyen mutantların miktarı artmaktadır. Diğer bir problem de *Acetobacter* suşlarının glikozu, glikonik aside ve ketoglikonik asite dönüştürmesinden dolayı maliyeti artırmasıdır (Young vd., 1998).

Karıştırmalı kültür koşullarında bakteriyel selüloz üretiminde oksijen transfer kapasitesi ve karıştırma hızı çok iyi ayarlanmalıdır. Bakteriyel selüloz verimliliğini artırmak için yüksek oksijen teminine ve yüksek hacimli karıştırma gücüne ihtiyaç vardır. Bu yüksek enerji sarfiyatı gerektirmektedir. Uygun karıştırıcıda, kültür sıvısının alanı ile karıştırıcı gücü arasındaki fark küçük olmalıdır. Bu kültür sıvısının vizkozitesinin indirgenmesi için önemlidir. Oksijen transferi ile bakteriyel selüloz üretimi arasında korelasyon vardır (Kouda vd., 1997). Karıştırmalı kültürlerde bakteriyel selüloz üretiminde mikro yapıda

değişiklikler gözlemlenmiştir. Polimerizasyon derecesi ve kristallenme indeksi karıştırmalı kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozda daha düşük bulunmuştur.

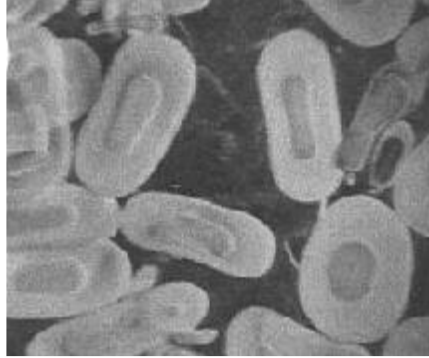
Ayrıca Young's modülü değeri de düşük olarak belirlenmiştir. Fakat su tutma kapasitesi ve süspansiyon vizkozitesi daha yüksek bulunmuştur (Watanabe vd., 1998). Statik ve karıştırmalı kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozun ağ şeklindeki yapısının mikroskopik morfolojisi benzerlik göstermektedir. Fakat dikkatli bir inceleme sonucunda bazı farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Statik kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozun fibrilleri oldukça uzundur.

Karıştırmalı kültür koşullarında üretilen selülozun fibrilleri bükülmüş ve karışık şekildedir. Ayrıca fibriller zayıf gözükmektedir. Watanabe vd., (1998) yaptıkları çalışmada her iki koşulda üretilmiş bakteriyel selüloz örneklerini X-ray difraktometri ile analizlerini yapmışlardır. Sonuçta statik kültür koşullarında üretilen selülozun kristallenme indeksi % 71, kristalitesi % 80, kristal boyutu 7,4 nm, polimerizasyon derecesini 14.400 olarak bulmuşlardır. Buna karşın karıştırmalı kültür koşullarında üretilen selülozun kristallenme indeksi % 63, kristalitesi 13 % 61, kristal boyutu 6,9 nm, polimerizasyon derecesini 10.900 olarak bulmuşlardır. Ayrıca selüloz I α oranı statik kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozda daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan bir diğer yöntem ise; hava kaldırmalı reaktörlerin kullanıldığı yöntemdir. Hava kaldırmalı reaktörler daha az kesme gerilimi oluşturduğundan, basit mekanik yapısından, düşük enerji tüketiminden ve yüksek hücre kütle veriminden dolayı bir çok mikrobiyal fermentasyonda tercih edilmektedir. Ancak hava kaldırmalı reaktörler bakteriyel selüloz besi yeri gibi viskoz sıvılar için çok uygun değildir. Chao ve arkadaşları iç bölmeli hava kaldırmalı reaktör kullanarak etkin bir karıştırma elde etmeyi başarmışlardır.

Ayrıca deneylerinde besi yerinde çözünmüş oksijen miktarını arttırmak için oksijence zengin hava kullanmışlar ve verimin oldukça yüksek olduğunu

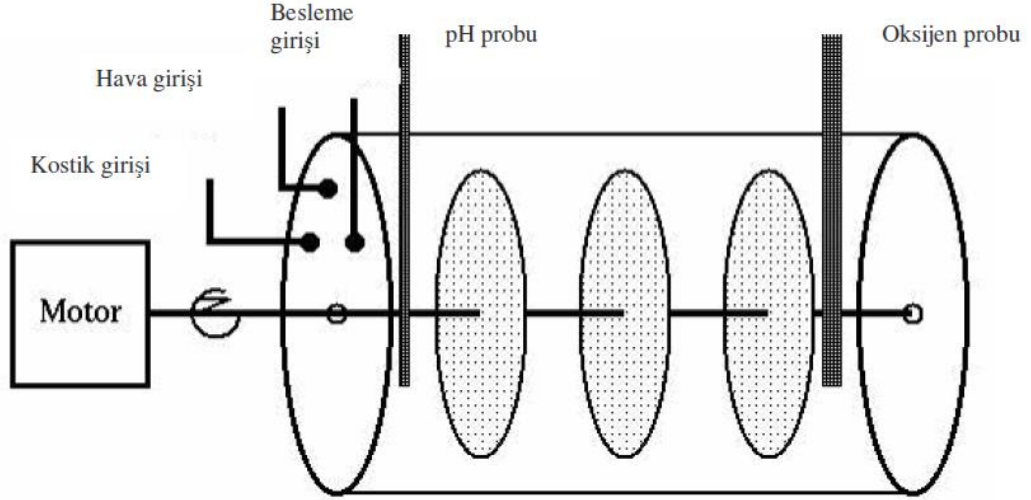
göstermişlerdir. Şekil 2.10'da hava kaldırmalı reaktörler kullanıldığında oluşan selülozun mikroskobik yapısı gösterilmektedir (Chao, vd., 2001).



Şekil 2. 10. Hava kaldırmalı reaktör kullanılarak üretilen selüloz (Chao, vd.,)

Ayrıca Chao ve arkadaşları hava kaldırmalı reaktörde üretilen bakteriyel selülozun; karıştırmalı reaktörde üretilen lifli yapıdaki selülozun aksine, eliptik misket şeklinde olduğunu göstermişlerdir. Eliptik misket şeklindeki selülozun polimerizasyon derecesi 16000'dir ve bu değer statik yöntemle elde edilen selüloza oldukça yakındır. Ayrıca statik yöntemdekinin aksine hava kaldırmalı yöntemde hücrelerin bölünme hızı çok daha yüksektir (Chao, vd., 2001) .

Bakteriyel selüloz üretiminde dönen disk reaktörlerin kullanımı da gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Bu sistemde yarısına kadar inoküle edilmiş besi yeri ile dolu silindirik yatak bulunmaktadır. Yatağın içerisindeki diskler motor yardımıyla döndürülmektedir. Hücreler diskin yüzeyine adsorbe olmakta ve burada zar yapısında selüloz oluşturmaktadırlar. 8-12 saat sonra bütün hücreler diskin üzerine geçmekte, besi yerinde yaklaşık olarak hiç hücre kalmamaktadır. Ağ yapılı ya da delikli diskler, katı disklere göre daha çok tercih edilmektedir çünkü delikler daha fazla besi yerinin disk üzerinde tutulmasını ve daha hızlı, kuvvetli film oluşumunu sağlamaktadır. Statik yöntemle kıyasla bu yöntemle, birim alanda daha fazla ıslak selüloz elde edilmektedir ve elde edilen selülozun su tutma kapasitesi statik yöntemle elde edilenin yaklaşık iki katıdır. Şekil 2.11.'de dönen disk reaktörü şematik olarak verilmiştir (Zhu, 2005) .



Şekil 2. 11. Döner disk reaktörü (Zhu, 2005)

Döner disk reaktörlerinin kullanımının statik yöntemle kıyasla bir takım üstünlükleri vardır. Her iki yöntemde de birim alan başına yaklaşık olarak eşit selüloz üretimi gerçekleşmektedir ancak hacimsel hızlar döner disk reaktörlerde daha fazladır. Disklerin düzgün ayarlanmasıyla; yüzey alanı/hacim oranı yaklaşık 5 kat artırılabilir ve aynı miktardaki besi yerinden çok daha fazla selüloz üretilebilir. Disk döndükçe diskin yarısı besi yerine temas ederken, diğer yarısı da havayla temas etmektedir. Bu durum statik yöntemde karşılaşılan difüzyon problemlerinin önlenmesini sağlamaktadır.

Ayrıca üretim esnasında selüloz besi yerinde değil de diskin üzerinde bulunduğu için; selüloz zarına herhangi bir zarar vermeden besi yerinden örnek alınabilir ve besi yeri kontrol edilebilir. Ayrıca substrat konsantrasyonu ve pH ayarlanarak optimum koşulların uzun süre devam etmesi sağlanabilmektedir (Zhu, 2005). Döner disk reaktörlerinin dezavantajları ise; diskler arasındaki mesafenin zarın boyutlarını sınırlandırması ve dönme etkisiyle selüloz üretmeyen mutant hücrelerin oluşmasıdır (Zhu, 2005).

2.7. Bakteriyel Selülozun Üretimine Etki Eden Faktörler

2.7.1. Karbon kaynakları

Acetobacter suşları ile bakteriyel selüloz üretiminde ana karbon kaynağı glikozdur. Selüloz biyosentezi için diğer karbon kaynakları olarak; 5 ve 6 karbonlu monosakkaritler, oligosakkaritler, nişasta, alkol ve organik asitler bildirilmiştir (El-saied vd., 2004).

Acetobacter xylinum, selüloz üretiminde bir çok farklı substratı kullanabilmektedir. Bu nedenle literatürde bakteriyel selüloz üretiminde farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı bir çok çalışma yer almaktadır. Selüloz üretiminde standart olarak Hestrin ve Schramm besi yeri kullanılmaktadır ve bileşiminde; % 2 (w/v) glikoz, % 0.5 (w/v) maya ekstratı, % 0.5 (w/v) polipepton, % 0.27 (w/v) disodyum fosfat ve % 0.15(w/v) sitrik asit monohidrat bulunmaktadır (Keshk ve Sameshima, 2005).

Bakteriyel selüloz üretiminde en büyük etkiyi karbon kaynakları yapmaktadır (Bielecki vd., 2001). Oikawa vd., (1995) yaptıkları çalışmalarında; statik kültürde karbon kaynağı olarak arabitol ve mannitol kullanıldığında glikoza oranla daha yüksek verim elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bunun nedenini de, arabitol ve mannitol kullanıldığında glukonik asit oluşmamasına ve pH'ın sabit kalmasına bağlamışlardır. Ancak Son vd., (2001) karıştırmalı yöntemle gerçekleştirdikleri deneylerinde; karbon kaynağı olarak fruktoz, trehaloz ve laktik asit kullanıldığında glikozdan daha iyi selüloz verimi elde ettiklerini göstermişlerdir. Bu sonuçlar Shoda vd., (2004) yaptıkları çalışma sonucunda elde ettiği verilerle paralellik göstermektedir. Shoda vd., (2004) da kullandıkları *Acetobacter xylinum* BPR2001 isimli suşun etkin olarak fruktoz kullandığını göstermiştir.

Ramana vd., (2000) yaptıkları çalışmada kullanılan karbon kaynağının selüloz verimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Deneylerinde sorbitol, glikoz, galaktoz, laktoz, asetik asit, mannitol, maltoz, nişasta ve sukrozu karbon kaynağı olarak kullanmışlardır. En yüksek verimin mannitollü besi yerinde elde edildiğini,

mannitolden sonra en uygun karbon kaynaklarının ise glikoz ve sukroz olduğunu göstermişlerdir. Sorbitol, galaktoz, maltoz, nişasta ve asetik asit kullanıldığında ise verimin oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bir araştırmada karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmıştır. Farklı karbon kaynakları da kullanılarak bakteriyel selüloz üretimi karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek bakteriyel selüloz verimi gliserol kullanımında tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla glikoz, fruktoz ve inositol izlemiştir. Karbon kaynağı olarak glikoz kullanılarak uygun konsantrasyonu belirlemek için denemeler yapılmış ve en yüksek bakteriyel selüloz üretimi % 1 konsantrasyonda elde edilmiştir. Glikoz konsantrasyonunun yükselmesi ile bakteriyel selüloz veriminin düştüğü gözlenmiştir (Keshk ve Sameshima, 2005).

Bakteriyel selüloz üretiminde D-xylose kullanımı ile ilgili bir çalışmada 17 tane farklı asetik asit bakterisi türü kullanılmıştır. D-xylose, D-glikoz ve D-xylose + D-xylulose karışımıyla hazırlanan besiyerleri karşılaştırılmıştır. D-xylose hiçbir asetik asit bakterisi tarafından metabolize edilemediği bulunmuştur. D-glikoz içeren besiyerinde yüksek bakteriyel selüloz üretimi belirlendiği belirtilmektedir (Ishihara vd., 2002).

2.7.2. Azot kaynakları

Bakteriyel selüloz üreten bakteriler azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. Bunun için maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu ve kazein hidrolizatları kullanılmaktadır. Yapılan bir çok çalışma standart Hestrin ve Schramm besi yerinin geliştirilmesi üzerinedir. Bu besi yerinde azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktı ve pepton yerine alternatif bir çok azot kaynağı denenmiştir. En etkili azot kaynağının mısır şurubu olduğu görülmüştür. Bu nedenle bir çok biyoteknolojik proste azot kaynağı olarak mısır şurubu kullanılmaktadır.

Son vd., (2001) selüloz verimi üzerine kullanılan azot kaynağının etkisini araştırmışlardır. *Acetobacter* sp. A9 ile gerçekleştirdikleri deneylerinde; et ekstraktını, mısır şurubunu, malt ekstraktını, polipeptonu, triptonu, maya

ekstratını, amonyum sülfatı, amonyum klorürü ve potasyum nitratı kullanarak verim hesabı yapmışlardır. Mısır şurubu, polipepton ve maya ekstratının, selüloz verimini önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir. Maya ekstratı bir çok büyüme faktörünün yanısıra çok miktarda azot bileşimi içermektedir. Bu nedenle en yüksek verim maya ekstratı kullanıldığında elde edildiği bildirilmiştir.

Jonas vd., (1998) yaptıkları çalışmada *Acetobacter* sp. A9 inorganik azot kaynaklarında herhangi bir büyüme göstermemiştir. Ancak maya ekstratı oldukça pahalı bir substrattır. Mısır şurubu kullanıldığında elde edilen verim, maya ekstratı kullanıldığında elde edilen verime oldukça yakındır. Bu nedenle proses fizibilitesini arttırabilmek için mısır şurubunun en etkili azot kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Acetobacter xylinum BPR 2001 için karıştırmalı kültürlerde besiyerindeki azot kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. % 0,24 (w/v) toplam azot olacak şekilde soytone, mısır ıslatma suyu, maya ekstraktı ve pepton kullanılmıştır. Sonuç olarak hücre gelişimini ve selüloz üretimini mısır ıslatma suyunun yüksek oranda teşvik ettiği belirlenmiştir. Bundan dolayı *Acetobacter xylinum* BPR 2001 suşu için en uygun azot kaynağı mısır ıslatma suyu olarak belirlenmiştir. Araştırmada bu etkinin nereden kaynaklandığını anlamak için diğer azot kaynakları ile birlikte kimyasal kompozisyonu incelenmiştir. En önemli fark olarak mısır ıslatma suyunun laktat içermesi bulunmuştur. Laktatın hücre gelişimi ve selüloz üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir (Tsuchida ve Yoshinaga, 1997).

2.7.3. Organik asit ilavesi

Besiyerine etanol, laktik asit, sitrik asit gibi organik asit ilavesi selüloz verimini arttırmaktadır. Organik asitler yardımcı substrat görevi yaparak hücre büyümesini hızlandırmaktadırlar. *Acetobacter xylinum*'da yüksek üridin difosfoglikoz fosforilaz aktivitesi görülmektedir. Bu enzim glikozdan, bakteriyel selüloz üretimi için gerekli prekürsürün sentezini gerçekleştirmektedir. Glikoz temel olarak enerji üretiminin aksine bakteriyel selüloz üretiminde kullanılmaktadır. Laktik asitin; büyümenin ilk evrelerinde glikoz akışını,

bakteriyel selüloz üretimi için gerekli şeker metabolik yolunun aksine Krebs döngüsüne yönlendirdiği düşünülmektedir. Bu da hücre büyümesini hızlandırmakta, daha çok bakteriyel selüloz üretilmesine neden olmaktadır (Son vd., 2003).

Son vd. (2001), bakteriyel selüloz üretiminde etanol ilavesinin etkisini de araştırmışlardır. Organik asitler içerisinde hücre bölünmesini en çok etanolün arttırdığını göstermişlerdir. Bunun nedenini ise; etanolün selüloz üretmeyen mutant hücrelerin (Cel-) oluşumunu engellemesi şeklinde açıklamaktadırlar. Karıştırmalı yöntemde oluşan Cel- mutantların önlenmesi selüloz verimini önemli ölçüde arttırmaktadır.

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

2.7.4. pH'in etkisi

Yapılan bir çok deneysel çalışma sonucunda, bakteriyel selüloz üretiminde optimum pH aralığının 4 ile 7 arasında değiştiği görülmüştür. Çoğu araştırmacı pH 5 ya da pH 6'da deneysel çalışmalarını gerçekleştirmektedir. Bakteriyel selüloz üretimi esnasında ortamda bulunan glikoz fazlası glukonik asite dönüşmektedir. Glukonik asit oluşumu ortamın pH'ında büyük bir düşüşe neden olmaktadır. Bu nedenle karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında pH ayarlanması, proses verimi üzerinde oldukça etkilidir (Jonas vd., 1998).

Acetobacter xylinum BRC5'in karıştırmalı kültürlerde selüloz üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada besiyeri pH'sı 6.0 olarak kullanılmıştır (Young vd., 1998).

Bakteriyel selüloz üretimi ile besiyerinin inkübasyonu esnasında ve sonrasında pH değişimlerinin birbiriyle etkileşimi incelenmiştir. Monosakkaritlerle hazırlanan besiyerlerinde son pH, başlangıç pH'sından düşük olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle glikozdan hazırlanan besiyerlerinde pH 3,9'a kadar düşmektedir. Fakat pH'nın düşüşü, tek başına selüloz üretimine etki etmemektedir (Keshk ve Sameshima 2005).

Acetobacter sp. A9 ile selüloz üretiminde başlangıç pH'sı 3-9 aralığında test edilmiştir. Selüloz üretiminin en yüksek olduğu pH aralığı 4,5-7,5 olduğu gözlemlenmiştir. pH: 6,5'ta maksimum selüloz verimine ulaşılmıştır (Son vd., 2001).

2.7.5. Sıcaklığın etkisi

Bakteriyel selüloz üretiminde optimum sıcaklık aralığı; 25-30°C arasında değişmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda daha çok 28-30°C arasındaki sıcaklıklar kullanılmaktadır. Son ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bir çok farklı sıcaklıkta (20-40°C) deneylerini gerçekleştirmişlerdir. 25°C'de herhangi bir selüloz üretiminin olmadığını ve 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise selüloz veriminin düştüğünü gözlemlemişlerdir (Son vd., 2001).

2.8. Bakteriyel Selüloz Kullanım Alanları

Yüksek saflık, güçlü mekanik özellikleri, ıslak fazda yüksek su tutma kapasitesi gibi sıradışı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı bakteriyel selüloz çok önemli kullanım alanlarına sahiptir. Bakteriyel selüloz en yaygın olarak; gıda, sağlık, kozmetik ve kağıt endüstrisinde, giyim sektöründe, ses sistemlerinde ve çevresel sistemlerde kullanılmaktadır (Klemm vd., 2001).

2.8.1. Medikal alanda bakteriyel selüloz kullanımı

Bakteriyel selüloz'un medikal alanda ticari kullanımıyla ilgili çalışmaları ilk olarak, 1980'li yılların başında Johnson & Johnson firması gerçekleştirmiştir.

Farklı yaraların iyileştirilmesinde bakteriyel selüloz kullanımını araştırmışlardır. Ancak Johnson & Johnson firması üretim veriminde ve büyük ölçek fermentasyonda karşılaştığı problemlerden dolayı, bu dönemde herhangi bir ürün piyasaya çıkarmamıştır. Daha sonra Biofill Produtos Biotechnologicos adlı Brezilya firması, *Acetobacter* tarafından sentezlenen bakteriyel selülozun yara iyileştirme sistemlerinde kullanımını araştırmış; Biofill®, Bioprocess® ve Gengiflex® adlı ürünleri piyasaya çıkarmıştır. Bu ürünlerden Biofill® ve Bioprocess®, ikinci ve üçüncü derece yanıkların ve ülserin tedavisinde geçici yapay deri olarak, Gengiflex® ise diş eti hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Czaja vd., 2006).

Durgun kültürde üretilen bakteriyel selüloz, yanık bölge üzerinde iyilestirici bir özelliğe de sahiptir (Bielecki vd., 2000).

Bakteriyel selüloz steril edilebilir, dokuya uyumludur, gözenekli, elastik ve elle tutulması kolaydır, suyu adsorbladığı için belli oranda nem içerir. Bu da yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar ayrıca yaralı bölgede ikincil enfeksiyonların oluşmasını engeller, yanan bölgedeki ısıyı adsorblayarak acıyı ve ağrıyı azaltır ve dokuda yaranın yayılmasını engellemektedir (Krystynowicz vd., 2000).

Hayvansal orijinli ürünlerdeki problemlerden dolayı kollagen kaplayıcılar yerine bakteriyel selüloz içerikli kaplayıcılar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan bakteriyel selüloz ürünleri Xylos Corp. firması tarafından Prima Cel™ olarak üretilmektedir. Bu polimer, Rensselaer Polytechnic Institute (USA)'de ülser tedavisinde yara kapatıcı olarak uygulanmıştır. Krystynowicz ve arkadaşları tarafından *A. xylinum*'dan elde edilen selülozun, farelerdeki yaralar üzerinde iyilestirici etkisinin olduğu da belirtilmiştir (Krystynowicz vd., 2000).

Yamanaka ve arkadaşları ortası çukur özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz fibrillerinin suni kan damarları ve üreterler olarak kullanılabileceğini de önermişlerdir. Köpeklerde aort ve boyun damarlarının yerine antitrombik özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz içeren suni damarlar kullanılmıştır (Yamanaka vd., 1990).

1990'lı yılların başında Japonya ve Polonya'da bakteriyel selülozun biyosentezi ve kullanım alanları ile ilgili çok kapsamlı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Polonya hükümetinin de desteklediği bu çalışmalar sonucunda çok çeşitli bakteriyel selüloz yara sargı malzemeleri ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca insanlar üzerinde klinik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır ve bu çalışmalar hala devam etmektedir. Şekil 2.12'de yanık bölgelere yerleştirilen bakteriyel selüloz gösterilmektedir.



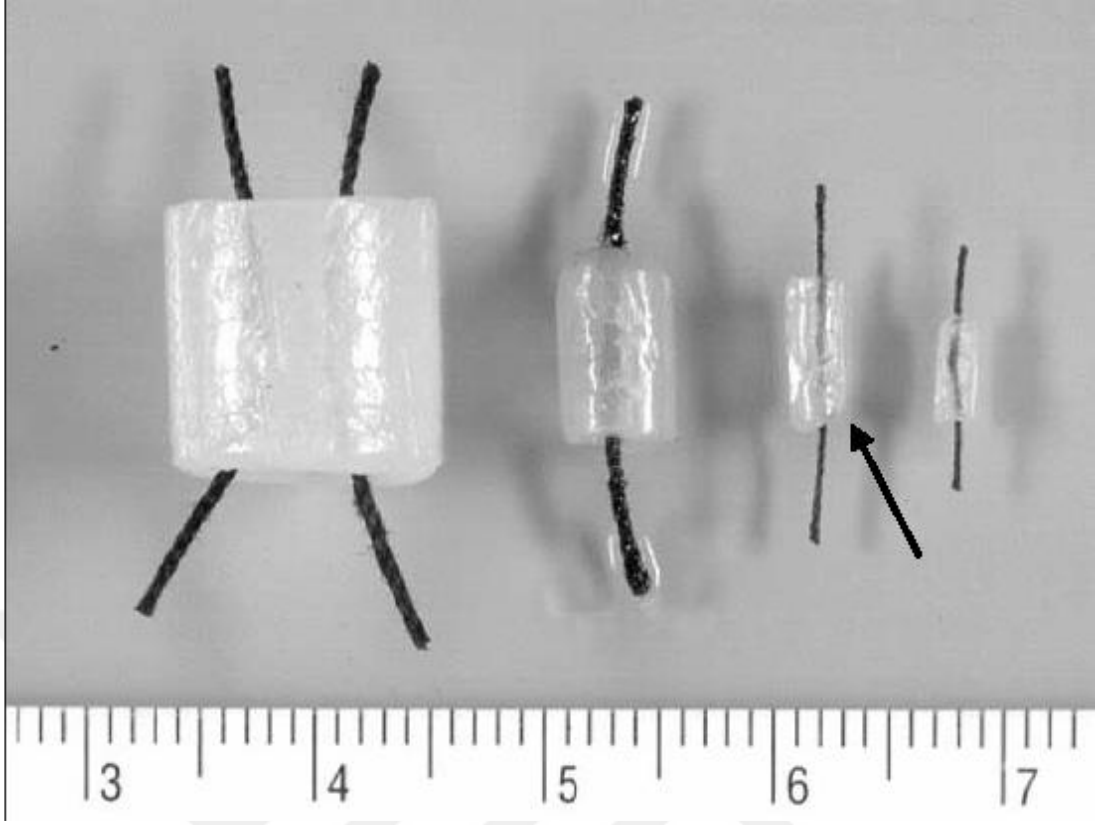
Şekil 2. 12. Yanık bölgelere yerleştirilen bakteriyel selülozu göstermektedir

Czaja vd., (2004) arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada, yanıklarda bakteriyel selüloz kullanımını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada; kurumayan bakteriyel selüloz membranları ile geleneksel gazlı bezlerin kullanılmasının etkileri karşılaştırılmıştır. Bakteriyel selüloz yaraya çok iyi yapışmıştır ve elastik özellikleri nedeniyle bulunduğu yerin şeklini kolaylıkla aldığı görülmüştür (ağız, burun gibi hareketli kısımlar da dahil). Ayrıca bakteriyel selüloz örtüsünün yaranın etrafında nem için gerekli ortamı yarattığı ve yüksek gözenekli yapısı sayesinde yara sızıntılarını absorpladığı da çalışmada gösterilmiştir. Şekil 2.13 'de yanıkların tedavisinde kullanılmak üzere bakteriyel selülozdan üretilmiş eldiven görülmektedir (Czaja vd., 2004).



Şekil 2. 13. Yanıkların tedavisinde kullanılmak üzere bakteriyel selülozdan üretilen eldiven

Yapay kan damarı olarak kullanabilmek için bakteriyel selülozu tüp formunda şekillendirmişlerdir. Cam tüpleri iç içe koyarak; bu katmanlar arasında statik kültürde, Hestrin-Schramm besi yeri kullanarak selüloz üretmişlerdir. Oluşturdukları deney düzeneği sayesinde *Acetobacter xylinum* tarafından bakteriyel selüloz sentezlenirken, aynı zamanda oluşan selüloz damar şeklini alarak büyümektedir. BASYC-tube adını verdikleri bu ürün; mikrocerrahi deneyleri için gerekli özelliklere sahiptir. İç çapı 1 mm, uzunluğu 5 mm ve cidar kalınlığı ise 0.7 mm'dir. Cam tüpler besi yerinden uzaklaştırılıp, suyla yıkamayla gerçekleştirilen basit bir saflaştırma işleminden sonra, BASYC-tube 4°C'de 6 hafta saklanabilmektedir. Şekil 2.14'de bakteriyel selülozdan yapılan yapay kan damarları görülmektedir (Klemm vd., 2001).



Şekil 2. 14. Bakteriyel selülozdan yapılmış yapay kan damarı (Klemm vd.,)

Plastik malzemelerden yapılan yapay kan damarları trombotik lezyonlara neden olmaktadır bu da damardan kan akışının durmasıyla sonuçlanmaktadır. Ancak Klemm ve arkadaşları, bakteriyel selülozdan yapılan yapay kan damarlarında trombotik lezyon görülmediğini belirtmektedirler. Klemm bu durumu; bakteriyel selülozun yüksek su tutma kapasitesine bağlamaktadır. Bakteriyel selüloz ağırlığının ortalama % 90'ı kadar su tutma kapasitesine sahip olduğundan, kan ile çok iyi etkileşmektedir (Brown, 2003).

2.8.2. Kağıt endüstrisinde bakteriyel selülozun kullanılması

Bakteriyel selüloz, çok iyi mekanik özelliklere sahip olduğundan birinci kalite kağıt üretiminde kullanılır. Bakteriyel selüloz içerikli kağıtlar, dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmeleri yanında aynı zamanda elastik, gecirgen, yırtılmalara-yanmalara dirençli ve suyu emme özelliğine de sahiptirler (Iguchi vd., 1988). Tarihi dökümanların tamirinde kullanılan el yapımı kağıtların

fibrillerine az miktarda bakteriyel selüloz ilave edilmesiyle yıpranmaya dirençli bir etki yaratılmış olur (Krystynowicz vd., 1999).

Bakteriyel selülozu % 1 oranında içeren kağıtlar ISO 9706:1994 standardında yer almaktadır. Ayrıca; bakteriyel selülozdan, yüzey kaplamada kullanılan kağıtlar da üretilmiştir. Bu kağıtlar cilalı, parlak, düzgün ve gözenekli bir görünüme sahiptir. Yüzde 3 oranında bakteriyel selüloz içeren kaplama kağıtları, % 20 oranında kaplamaya sahip olan rotogravuer kağıtlarına benzer yüzey direncine ve cila özelliklerine sahiptir (Johnson ve Neogi, 1989). Bakteriyel selülozun kağıt endüstrisinde en önemli kullanım alanlarından biri de, elektronik kağıt yapımıdır.

Bilgi ve iletişim çağında yaşadığımızdan dolayı, günümüzde iletişim için en çok bilgisayar ekranları, televizyon ekranları ve tabiki kağıtlar kullanılmaktadır. Ancak insanlar hala bilgileri bilgisayardan okumak yerine, kağıda basıp okumayı tercih etmektedirler. Kağıdın bilgi okumada tercih edilmesinin nedenleri; kontrast ve yansıtıcılığının yüksek olması, esnek ve taşınabilir oluşu, maliyetinin düşük olması ve geniş görüntüleme açısıdır. Bilgisayar ekranlarının dezavantajları ise; düşük yansıtıcılık, yüksek maliyet ve yüksek enerji tüketimidir.

Ayrıca ekranlar uzun süre kullanıldığında gözlere de zarar vermektedir. Bu nedenle kağıdın istenilen optik özelliklerini ve geleneksel gösteri ekranlarının dinamik özelliklerini birleştirecek, elektronik gösteri ekranları oluşturulmaya çalışılmaktadır. Literatürde, bu tür elektronik gösteri ekranları için 'elektronik kağıt' terimi kullanılmaktadır (Shah ve Brown, 2005).

Elektronik kağıt ilk defa, Palo Alto Araştırma Merkezi'nde (PARC) Xerox uzmanlarınca geliştirilmiştir. 'Gyricon' isimli ürünleri, 5 normal dosya kağıdı kalınlığında olan bir plastiktir. Bi-chomal tanecikler zıt elektrik akımı taşıyan bir siyah ve bir beyaz yarım küreden oluşmaktadır. Radyo sinyalleriyle gönderilen yazı ve grafik elektrik akımı sayesinde, elektronik kağıt üzerinde yazı ve grafiğe dönüştürülmektedir. Elektronik kağıdın içeriği bir çok defa değiştirilebildiğinden

tekrar tekrar kullanılabilir. Şekil 2.15’de elektronik kağıtlar görülmektedir (Cunningham, 2006).



Şekil 2. 15. Elektronik kağıtlar (Cunningham, 2006)

Elektronik kağıt ile gazete ve dergiler, televizyon gibi aynı anda okuyucularına ulaşabilecekler ve gün içerisinde elektronik kağıda basılan gazetelerde yer alan haberler güncellenebilecektir. Ayrıca bu teknolojinin reklam panolarına ve etiketlere de uygulanması hedeflenmektedir. Reklam panolarında yer alan bilgiler radyo dalgaları aracılığıyla, tek tuşla uzaktan güncellenebilecektir. Örneğin şişeye yapıştırılan etiketler yeni fiyat ve ambalaj bilgisiyle yüklenip tekrar kullanılabilir. Elektronik kağıt teknolojisinin gazete, dergi, kitap, poster, medya, yayıncılık, reklam ve pazarlama sektörlerinde yeni bir dönemi başlatması beklenmektedir (Cunningham, 2006).

Günümüzde elektronik kağıt yapımında esnek plastikler kullanılmaktadır. Brown ve Shah yaptıkları çalışma ile, elektronik kağıt yapımında kağıt benzeri yapılar kullanılması yerine direkt bakteriyel selüloz kullanımını araştırmışlardır. Yaptıkları deneysel çalışmada üç temel hedef belirlemişlerdir. Öncelikle bakteriyel selülozun, elektro-optik etkilerde kullanılabilmesi için iletkenliğini arttırmayı denemişlerdir.

Bunun için, mikrobiyal selülozu çeşitli iletkenlerle uyarılmışlardır. Bu uyarıcı iletkenler, sıvı besi yerine eklenmiş ve sıvı durumunda film oluşumu esnasında selülozun yapısına katılmıştır. Direnç değerleri farklı konsantrasyonlar

kullanılarak kalibre edilmiştir. Bu prosesten sonra membranlar, kağıda benzer optik ve yapısal özelliklerinin elde edilebilmesi için kurutulmuştur (Shah ve Brown, 2005).

İkinci hedef olarak selülozun yapısına dönüşümlü renk değişimi sağlayan elektronik boyaları katmışlardır. Kullandıkları elektronik boyaları, elektrokromik boyalar kategorisinden seçmişlerdir. Elektrokromik boyalar elektrik akımı uygulandığında optiksel değişime neden olan boyalardır. Temel olarak dönüşümlü redoks reaksiyon mekanizmasıyla; termodinamik olarak dayanıklı aynı fiziksel koşullarda, madde iki farklı durumda bulunmaktadır. Bu iki farklı hal absorpsiyon düzeylerinde farklılık göstererek gün ışığında farklı renklerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu iki hal, uygun elektrolitik çevrede elektrik akımının uygulanmasıyla elde edilmektedir. Seçilen boya aşağıda gösterilen reaksiyonla değişime neden olmaktadır (Shah ve Brown, 2005).

Hal A (renksiz) + e- Hal B (koyu mavi hal)

Oluşturulmaya çalışılan kağıttaki temel fikir; akım uygulandığında B durumunun oluşmasıdır. Koyu durum olan B hali ilave güç uygulanmadan bulunduğu durumu korumaktadır. Ters akım uygulandığında ise; renksiz olan A hali yeniden oluşmaktadır. Elektronik gösteri ekranlarına bir şekil yüklendiğinde ya da gösterildiğinde, güç kaynağı kapatılsa da bu şekil varlığını korumaktadır. Elektronik boya katılmış, iletken bakteriyel selüloz tabakaları temel elektronik kağıt birimlerini oluşturmaktadır (Shah ve Brown, 2005).

Hareketli, kalem şeklinde elektrotlar kullanılarak elektronik kağıt üzerine yazı yazılabilmektedir. Bu yazılar saklanabilmekte ve ters akım uygulanarak silinebilmektedir. Elektrotun kağıda değdiği yerlerde boya renk değiştirmektedir. Ters akım uygulandığında ise yazılar otomatik olarak yok olmaktadır. Bu prensip, tekrar yazılabilir kağıdın temelini oluşturmaktadır. Elektronik duvar kağıtlarında, reklam panolarında, gazetelerde ve kitaplarda bu sistemin kullanılması hedeflenmektedir.

2.8.3. BS'un gıda endüstrisinde kullanımı

Karbonhidratlar insan vücudunda bulunan temel biyokimyasal bileşiklerdir. Monosakkaritler ya da polisakkaritler olarak yer alırlar. En çok bilinen monosakkaritler glikoz, galaktoz ve fruktoz iken, en çok bilinen polisakkaritler ise selüloz, nişasta ve glikojendir. Bu polisakkaritler insan metabolizmasında çok büyük bir öneme sahiptir (Garcia ve Bountox, 2006).

Polisakkarit teknolojisi son yıllarda büyük gelişmeler göstermiştir ve bir çok ileri teknoloji ile üretilen ürünler oluşturulmuştur. Bunlardan bir tanesi de bakteriyel selülozdur. Bakteriyel selüloz gıda endüstrisinde temel olarak kıvam arttırıcı, stabilizör, bağlayıcı, jel yapıcı, yağ değiştirici olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel selüloz kullanılarak düşük kalorili dondurmalar ve cipsler yapılmakta ayrıca soslara da bakteriyel selüloz ilave edilmektedir (Garcia ve Bountox, 2006).

BS 1992'de ABD Gıda ve ilaç Dairesi (Food ve Drug Administration) tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle de gıdalarda kullanıma son derece elverişlidir. BS'un geleneksel bazı ürünlerde yer aldığı bilinmektedir.

Bakteriyel selüloz Filipinler'de uzun yıllardır *Nata-de-coco* isimli leziz bir tatlı olarak üretilmektedir ve çok tercih edilmektedir. Bitkisel selüloz ve BS kimyasal olarak aynı yapıda olmalarına rağmen, BS'un serum lipitleri ve kolesterol düşürme etkisinin bitkisel selülozdan daha yüksek olduğu da bulunmuştur (Chau vd., 2008). Ayrıca bağırsak kanseri, kalp damar hastalıkları kronik trombotik karşı koruyucu olduğuna ve idrarda glikoz düzeyinin ani yükselişini engellediğine inanılmaktadır. Bu nedenle *Nata de coco* sadece Asya'da değil Dünya'da da popüler hale gelmiştir. *Nata-de-coco* beyaz, jelatinimsi bir gıdadır. Tatlı meyve salatalarında, meyve kokteyllerinde, dondurmalarda ve içeceklerde çok miktarda kullanılmaktadır. Şekil 2.16'da bakteriyel selülozdan üretilen *Nata-de-coco* isimli tatlının ambalajı görülmektedir (Garcia ve Bountox, 2006).



Şekil 2. 16. Nata-de-coco isimli tatlı (Garcia ve Bountox, 2006)

Nata-de-coco üretiminde hindistan cevizi suyuna *Acetobacter xylinum* eklenerek fermentasyon gerçekleştirilmektedir. Fermentasyondan sonra ayırma, temizleme ve paketlenme işlemleri yapılmaktadır. Yağ ve kolesterol içermediğinden ve yüksek diyet lifi içerdiğinden dolayı özellikle Japonya'da çok tercih edilmektedir (Garcia ve Bountox, 2006).

BS içeren diğer bir gıda ürünü Kamboçya ya da Mançurya çayıdır. Çay özütü ve şeker içeren ortamda mayalar ve *Acetobacter*'in gelişmesiyle oluşur. Yüzeyde oluşan zar, sağlık için yararlı BS ve enzimleri içerir. Bu ürünün bazı kanser türlerine karşı koruyucu olduğuna inanılmaktadır (El-Saied vd., 2004; Khan vd., 2007).

2.8.4. BS'un diğer kullanım alanları

Bakteriyel selülozdan oluşan ilk hoparlör diyaframını geliştirmeyi Sony ve Ajinomoto firmaları ortaklaşa gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda başarmışlardır. Bakteriyel selülozun kendine has boyutsal dayanıklılığı ses geçiren membranların yapılmasına neden olmuştur. Şekil 2.17'de bakteriyel selülozdan üretilmiş diyaframın kullanıldığı kulaklık görülmektedir (Brown, 2006).



Şekil 2. 17. Sony tarafından üretilen, bakteriyel selüloz diyaframının kullanıldığı kulaklık

Yukarıda görülen, MDR-R10 isimli Sony tarafından üretilen kulaklıkta *Acetobacter acti* tarafından üretilen bakteriyel selüloz diyafram olarak kullanılmıştır. Bakteriyel selüloz diyaframlarının avantajı; alüminyum ve titanyum diyaframlarıyla aynı ses hızını üretmelerinin yanında, kağıt diyaframların sağladığı sıcak, hassas sesi de üretebiliyor olmasıdır (Garcia ve Bountox, 2006).

Bakteriyel selüloz organik ve inorganik malzemeler ile bakteriyel kompozit oluşturur. Kompozitlerinin uzun süre su tutma potansiyeline sahip olması yara iyileşmesinde büyük önem taşımaktadır. BC-Ch kompozitleri ile sıçanlarda yapılan deneyde cilt yaralarını iyileştirmiş, kompozitlerin hayvan hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığı görülmüştür (Lin., 2013).

BC-Ch kompozitleri biyoyumluluğu, hücre yapışması ve çoğalması gibi özellikleri arttırmış, yanık ve ülser yaralarında yara pansumanı olarak kullanılmıştır (Ciechanska., 2004).

Bakteriyel selüloz ayrıca tekstil sanayinde suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsortif materyal olarak, kozmetik sanayinde ise kremlerin, toniklerin, tırnak cilalarının emilimini kolaylaştırmada da kullanılır (Jonas ve Farah, 1998).

2.9. Taguchi Yöntemi Uygulanarak Deney Tasarımı

Taguchi yöntemi Dr. Genichi Taguchi tarafından 1950'ler de süreç eniyileme tekniği olarak geliştirilmiştir. "Taguchi'nin kalite alanına getirmiş olduğu en dikkat çekici katkı, kalite sistemini üretim öncesi (off-line) ve üretim süreci (on-line) olarak ikiye ayırarak bir ürünün kalitesini ve müşteri memnuniyetini, üretim öncesindeki aşamada tasarım ve geliştirmenin mükemmelliği ile yakından ilgili olduğunu gösteriyor olmasıdır" (Ranjit, 1990).

Taguchi yöntemi farklı parametrelerin, farklı seviyeleri arasından en iyi kombinasyonu saptamak için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Her bir parametrenin, her bir seviyesini içeren tüm kombinasyonlar için oldukça fazla deneysel çalışma yapılması gereken durumlarda Taguchi yönteminde ortogonal dizi tablosu kullanılarak (Çizelge 2.2.) çok daha az sayıda deneysel çalışmayla sonuca ulaşmak mümkündür (Güral, 2003).

Kalite mühendisliğinde tasarım kalitesi (robust design) 3 temel sürece dayanmaktadır. Bunlar ;

- Dikey dizilim (orthogonal arrays)
- Sinyal-gürültü oranı (S/N ratio)
- Kayıp fonksiyonu (loss function)"dur.

Taguchi tasarımında bir ürünün kalite sağlama seviyesi hem ürün tasarımı hem de süreç tasarımını kapsayan 3 tasarım üzerine kurulmuştur. Bunlar;

- Sistem tasarımı: kavram oluşturma aşamasıdır.
- Parametre tasarımı: ürün ve süreç için hedef oluşturma aşamasıdır.
- Tolerans tasarımı: sonucu istenen hedefe ulaşamadığında yapılan ilave çalışmalardır.

Sistem tasarımı: Bu adımda eldeki bütün materyaller değerlendirilirken mevcut teknolojik yenilikler araştırılır ve sistem içerisinde kullanılabilirliği üzerine

fizibilitesi yapılır. Bu adımda amaç en az maliyetle en iyi ürün tasarımı ve maksimum müşteri memnuniyetidir (Gökçe, 2009).

Çizelge 2. 2. Taguchi ortogonal dizi seçim tablosu (Gökçe, 2009)

Seviye Sayısı

2			3			4			5				
P=2	S=2	L4	P=2	S=3	L9	P=2	S=4	L16	P=2	S=5	L25		
P=3	S=2		P=3	S=3		P=3	S=4		P=3	S=5			
P=4	S=2		P=4	S=3		P=4	S=4		P=4	S=5			
P=5	S=2	L8	P=5	S=3	L18	P=5	S=4	L32	P=5	S=5	L50		
P=6	S=2		P=6	S=3		P=6	S=4		P=6	S=5			
P=7	S=2		P=7	S=3		P=7	S=4		P=7	S=5			
P=8	S=2	L11	P=8	S=3	L27	P=8	S=4	L32	P=8	S=5	L50		
P=9	S=2		P=9	S=3		P=9	S=4		P=9	S=5			
P=10	S=2		P=10	S=3		P=10	S=4		P=10	S=5			
P=11	S=2	L16	P=11	S=3	L36			L32	P=11	S=5	L50		
P=12	S=2		P=12	S=3		P=12	S=5						
P=13	S=2		P=13	S=3		P=13	S=5						
P=14	S=2	L32	P=14	S=3	L36			L32	P=14	S=5	L50		
P=15	S=2		P=15	S=3		P=15	S=5						
P=16	S=2		P=16	S=3		P=16	S=5						
P=17	S=2	L32	P=17	S=3	L36			L32	P=17	S=5	L50		
P=18	S=2		P=18	S=3		P=18	S=5						
P=19	S=2		P=19	S=3		P=19	S=5						
P=20	S=2	L32	P=20	S=3	L36			L32	P=20	S=5	L50		
P=21	S=2		P=21	S=3		P=21	S=5						
P=22	S=2		P=22	S=3		P=22	S=5						
P=23	S=2	L32	P=23	S=3	L36			L32	P=23	S=5	L50		
P=24	S=2		P=24	S=5									
P=25	S=2		P=25	S=5									
P=26	S=2	L32			L36			L32			L50		
P=27	S=2												
P=28	S=2												
P=29	S=2	L32			L36			L32			L50		
P=30	S=2												
P=31	S=2												

Parametre tasarımı: Süreç iyileştirme ve geliştirmenin en önemli adımı parametre tasarımıdır. Bu adımda üretilecek ya da geliştirilecek olan ürünün özelliklerinin en iyi seviyeye getirilebilmesi için üretimde kullanılan parametrelerin iyileştirilmesi sağlanır. Parametrelere en iyi seviyeler seçilir. Üretim esnasında ürünün kalitesini olumsuz etkileyecek kontrol edilemeyen etkiler belirlenir ve bunlara kontrol edilemeyen parametre adı verilir. Ardından bu parametrelerin etkileri en küçüklenir. Bu adımda parametreler bloklanırken Taguchi'nin geliştirmiş olduğu ortogonal diziler kullanılır.

Aynı zamanda sinyal gürültü oranı (S/N - Signal/Noise ratio) analizi ile de hesaplama yapılabilir. Parametreler belirlendikten sonra Çizelge 2.2'de ki Taguchi ortogonal dizisinden bir dizi seçmek gerekmektedir. Bu tabloya göre, bir araştırmacı 5 parametreye sahipse ve her bir parametrenin 3 seviyesi olduğu kabul edilirse L18 dizisi en uygun dizi olarak seçilir. Çizelge 2.2'de L16 ve L32 dizileri 4 seviyeli deneyler için kullanılmaktadır. Çizelge 2.2'nin dışında kalan parametre ve seviyeler için deney şartları daha zor olduğundan parametre ya da seviye küçültülerek uygun diziye getirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda ortalamalar ve gürültü oranı (S/N) değerleri de hesaplanarak kaydedilir (Gökçe, 2009).

Tolerans tasarımı: Tolerans tasarımında parametre belirleme çalışmaları sonucu istenilen hedefe ulaşamadığında yapılan ilave çalışmalardır. Bu aşamada gözlenen değerlerden faydalanılarak ürünün hedef değerden sapma göstermesinin getirdiği kayıplar bulunarak sapmalar azaltılır (Gökçe, 2009).

Taguchi kayıp fonksiyonu olarak bilinen ve aynı zamanda gürültü oranı (S/N Sinyal/Noise ratio) fonksiyonu olarak da ifade edilen 3 farklı amaca uygun fonksiyon bulunmaktadır. Buna göre, amacın "en küçük en iyi", "en büyük en iyi" ve "nominal en iyi" olmasına göre aşağıdaki eşitlikler (Eş. 2.1.-2.5.) kullanılarak S/N oranları hesaplanır.

En düşük (küçük) en iyi olduğu durumda:

$$S/N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_i^n y_i^2 \right) \quad (2.1.)$$

En yüksek (büyük) en iyi olduğu durumda:

$$S/N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_i^n \frac{1}{y_i} \right) \quad (2.2.)$$

Nominal en iyi olduğu durumda:

$$S/N = 10 \log \left(\frac{y^{-2}}{S^2} \right) \quad (2.3.)$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (2.4.)$$

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.5.)$$

Eşitliklerde y_i : Performans yanıtının i . gözlem değeri, n : bir denemedeki test sayısı, \bar{y} :Gözlem değerlerinin ortalaması ve S^2 : Gözlem değerlerinin varyansını ifade etmektedir.

Literatür incelendiğinde Taguchi yöntemiyle gerçekleştirilen birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Örneğin dört adet iki seviyeli, bir adeti ise dört seviyeli olan beş faktörün performans karakteristiğine olan etkilerini araştırmak üzere Taguchi yöntemi kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda bir firmanın imalat süreci iyileştirilerek firmanın iyileşme neticesinde önemli oranda kar elde etmesi sağlanabilmiştir (Ross vd., 1989).

Dovey ve Matthews (1998) çalışmalarında matkap uçlarının PVD (Physical Vapor Deposition) tekniği kullanılarak TiN(Titanium Nitrit) kaplaması uygulamasında performans istatistiği olarak kayıp fonksiyonunu ele almışlardır. Taguchi yöntemi uygulaması sonucunda, kaplama maliyetlerinde %25 oranında bir artış olmasına rağmen matkap uçlarının paslanmaya karşı olan dayanımlarında %40'luk bir kalite sağlanmıştır.

Yang ve Tarngın (1998) gerçekleştirdiği başka bir çalışmada, S45C çelik barların tornalanma sürecinde kesici takım parametrelerinin en iyi seviyelerinin belirlenmesi için Taguchi yöntemi kullanılmıştır. Her biri üç seviyeli üç temel faktörün tornalama işlemi üzerindeki etkilerini görmek için L9(34) ortogonal dizi uygulanmıştır.

Başka bir çalışmada Kağnıcıoğlu, termik santrallerden çıkan kükürtdioksit gazının giderilmesi için sitrat yönteminin kullanılmasını araştırmıştır. Yöntemin en iyi sonuçları Taguchi yöntemi yardımıyla bulunmuştur (Kağnıcıoğlu, 1998).

Ke vd. (2002) ise, çalışmalarında manyetik alanın kuvveti ve düzgünlüğünü gösterge olarak kullanarak, ince tip CD/DVD sürücü için en iyi manyetik tasarımı Taguchi Yöntemini uygulayarak önermişlerdir

Başka bir çalışmada Durmaz (2008), kauçuk işleme prosesinde Taguchi yöntemini kullanarak kalite kayıplarını önlenmeye çalışmıştır. Ürünü ve süreci etkilediği düşünülen yedi adet faktör belirlenmiş, L16 ortogonal dizisi seçilmiş, denemeler beşer kez tekrar edilmiş ve hata faktörlerinin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır Çalışma sonucunda hatalı çıkan ürün sayısı, en iyi üretim şartları sağlandığında %60 azalmıştır.

Taguchi yönteminin çok farklı alanlarda bir çok çalışmada kullanıldığı ve çalışmalar neticesinde süreç veya ürün performanslarında önemli iyileşmeler sağlanabildiği görülmektedir. Yöntemin gerek geniş kullanım alanına sahip olması, gerekse daha az deney yaparak hem zaman kazancı, hem de daha az maliyetle sonuçların elde edilmesine imkân sağlaması gibi avantajlar sunması, tez kapsamında Taguchi yönteminin kullanılmasında etkili olmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında *Lactobacillus rhamnasus* (DSM, DELVO-ADD 100R, Netherlands), *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Lb. 12, Chr Hansen, Denmark), *Streptococcus thermophilus* (STM-7, Chr Hansen, Denmark) ve *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* (YC-380, Chr Hansen, Denmark) bakteri kültürleri kullanılmıştır. Besiyeri amacıyla organik kaynağı olarak Peynir altı suyu (PAS) Isparta Ünsüt Firmasından temin edilerek +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Yöntem

Tez çalışması 5 aşamada gerçekleşmiştir. Her bir aşamada uygulanan prosedür aşağıda ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3.2.1. Bakterileri kültür yöntemi ile özenginleştirme

MRS Broth-Sıvı besiyeri (Lactobacillus Broth acc. To De Man, Rogosa and Sharpe, Merck, USA 1.10661) (Merck, Darmstadt, Germany) bileşimi; kazein 10,0 g/L; et ekstraktı 8,0 g/L; maya-küf ekstraktı 4,0 g/L; D(+) glukoz 20,0 g/L; K₂HPO₄ 2,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; di-Amonyum hidrojen sülfat 2,0 g/L; sodyum asetat 5,0 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; MnSO₄ 0,04 g/L .

MRS sıvı besiyeri hazırlanışı; Dehidre besiyeri 52,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde manyetik karıştırıcı yardımı ile eritilip, otoklavda (ALP, Japonya) (Şekil 3.1.) 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahve renkli olup 25°C'de pH'ı 5,7 ± 0,2'dir.



Şekil 3. 1. Otoklav ile sterilize işlemi

Çalışmada *Lactobacillus rhamnosus*, STM-7 (*S. thermophilus*), LB-12 (*L. lactis*) ve YC-380 (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) bakteri kültürleri kullanılmıştır. Ön aktifleştirme işlemi için; bakteri stok kültürleri, toplam hacim 10 ml olacak şekilde, MRS sıvı besiyeri içinde % 10 oranında aşılansmış ve 24 saat 37°C'de etüvde bakteriler kültüre edilmiştir.

MRS sıvı besiyerinde inkübasyon tamamlandıktan sonra mikroorganizma optikal yoğunluğunu belirlemek amacıyla 600 nm UV spektrofotometre (Şekil 3.2.) kullanılmıştır. Spektrofotometre, optik tekniğe dayalı olarak çalışan bir cihazdır. Bu cihaz, istenilen dalga boyuna sahip bir ışık oluşturur ve ışığı özel olarak hazırlanmış bir küvet içine konulmuş örnekten geçirir ve örnekten geçen ışığın şiddetini ölçer. Ölçüm yapılacak örnek bu özel hazırlanmış olan küvetlere konulur. Daha sonra spektrofotometre cihazının içinde özel hazırlanmış odaya yerleştirilir. Cihaz çalışmaya başladığında ışık kaynağından ölçüm yapılacak moleküllere göre ayarlanmış dalga boyunda ışık odaya odaklanır, oda içinde bulunan küvetin içinden geçen bu ışık, hassas algılayıcılar tarafından algılanır. Örnek içindeki molekül miktarı algılayıcıya ulaşacak ışık miktarını

değiştirecektir. Algılayıcının algıladığı ışık miktarına göre Optik Dansite (OD) değeri verir. Bu çalışmada spektrofotometre, bir solüsyondaki çözünmüş maddelerin derişimlerinin ve saflık derecelerinin belirlenmesi ve bakteri sayısının ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3. 2. UV spektrofotometre ile mikroorganizma yoğunluğu ölçümü

3.2.2. PAS'dan proteinlerin uzaklaştırılması ve besiyerlerinin hazırlanması

PAS'dan 121 °C'de 20 dakika denatürasyonla proteinler uzaklaştırılmıştır.

Aşağıdaki oranlarda 3 farklı besiyeri hazırlanmıştır.

1. Besi yeri: %50 PAS - %50 MRS
2. Besi yeri: %75 PAS - %25 MRS
3. Besi yeri: % 100 PAS

3.2.3. Bakteriler'den kültür yöntemi ile BS üretimi

Çalışmada kullanılan 4 farklı bakteri grubu için aşağıdaki oranlarda besiyerleri 34×19 cm cam tavalarda son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmış ve 28 °C'de 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Çakmakçı vd., 2008).

- %50 (PAS) + %50 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5
- %25 (PAS) + %75 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5
- %75 (PAS) + %25 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5
- %50 (PAS) + %50 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5 + % 5 Gliserol
- %25 (PAS) + %75 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5 + % 5 Gliserol
- %100 PAS (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5 + % 5 Gliserol

3.2.4. BS üretiminin optimizasyon analizi

Selüloz üretim koşullarını optimize edebilmek için; farklı pH, farklı karbon kaynakları, karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonları ve farklı kültür koşulları denenmiş ve selüloz veriminin en yüksek olduğu koşullar saptanmıştır.

Deney tasarım ve analiz yöntemi olarak Taguchi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin ana basamakları,

- (1) faktör ve etkileşimlerin belirlenmesi,
- (2) her bir faktörün seviyelerinin belirlenmesi,
- (3) uygun orthogonal matrisin seçilmesi,
- (4) faktör ve etkileşimlerin orthogonal matrislerin sütunlarına aktarılması,
- (5) deneylerin yapılması,
- (6) verilerin analizi ve optimal seviyelerin belirlenmesi, ve
- (7) doğrulama deneylerinin yapılmasıdır (chen vd., 1996).

3.2.5. Taguchi deney tasarımı

BS üretim potansiyeli gösteren kültür seçimi çalışmasında, en fazla BS üretimi *Lactobacillus rhamnosus* bakterisinden elde edildiği için çalışmalar bu bakteri üzerinden yapılmıştır.

Taguchi tekniğiyle en uygun parametreler seçilerek, selüloz veriminin en yüksek olduğu koşulların saptanması amaçlanmıştır. Literatür bilgileri incelenerek belirlenen parametreler ve bunların seviyeleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Deneyleerde 4 farklı parametre olan pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür miktarı, inkübasyon süresi ve her bir parametre için de 3 ayrı seviye belirlenmiştir.

Çizelge 3. 1. Deney Faktörleri ve Seviyeleri

Faktörler	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3
Organik Kaynak Kons.(A)	PAS+MRS %50 %50	PAS+MRS %25 %75	PAS+MRS %75 %25
Aktif Kültür Miktarı (B)	%10	%20	%30
pH (C)	5.0	5.5	6.0
İnkübasyon Süresi (D)	8 (gün)	10 (gün)	12 (gün)

Çizelge 3.1’deki parametreler dikkate alınarak deneysel çalışma için en uygun tasarım olarak Taguchi L9 orthogonal dizin seçilmiştir. Minitab 16 yazılımı yardımıyla belirlenen L9’luk deney Çizelge 3.2’de görülmektedir.

Çizelge 3. 2. Taguchi L9 orthogonal deney tasarımı

Deney No	Organik kaynak konsantrasyonu	Aktif kültür	pH	İnkübasyon süresi
1	50	10	5	8
2	50	20	5.5	10
3	50	30	6	12
4	25	10	5.5	12
5	25	20	6.0	8
6	25	30	5.0	10
7	75	10	6.0	10
8	75	20	5	12
9	75	30	5.5	8

Taguchi deney tasarımı dikkate alınarak deneysel çalışma için Şekil 3.3'de 9 adet (34×19 cm) cam tava hazırlandı.



Şekil 3. 3. Cam tavaların (34×19) hazırlanma işlemi

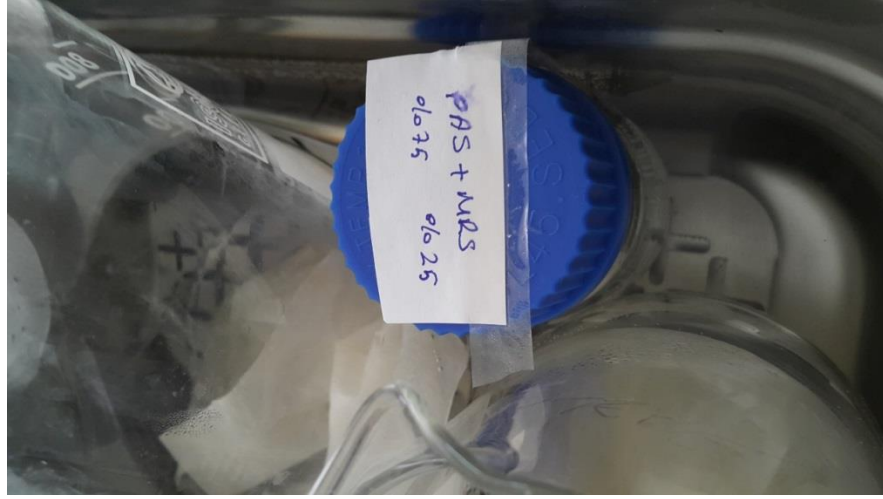
Lactobacillus rhamnosus bakteri grubu için Taguchi deney tasarımında bulunan parametreler ve seviyelere bağlı olarak besiyerler 34×19 cm cam tavalarda son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmış ve Şekil 3.4'de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3. 4. İnkübasyon işlemi

3.2.5.1. BS' un ayrılması

İnkübasyon işlemi sonrasında 1 M NaOH (Sigma Aldrich, Germany) solüsyonu ile bakteri hücrelerinden selüloz uzaklaştırılmış, 4 saat süreyle 60 °C'ye hazırlanmış su banyosunda 0,1 M NaOH solüsyonu ile ağartma işlemi yapılmıştır (Çakmakçı vd., 2008) .



Şekil 3. 5. BS 'un ayrışma işlemi

Son olarak; üretilen BS, süzme işlemi ile ayrıştırılarak 28 °C'de kurumaya bırakılmıştır (Çakmakçı vd., 2008).



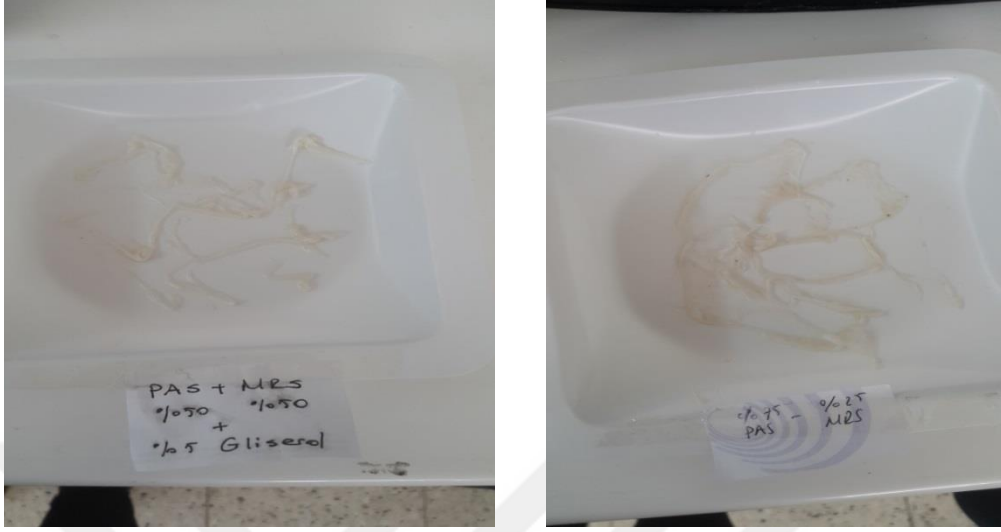
Şekil 3. 6. Kurutulmuş BS

3.2.5.2. Analizlerin yapılması

3.2.5.2.1. Su bırakma özelliği

Selülozun su bırakma özelliğinin belirlenmesinde, Watanabe vd. (1998) tarafından önerilen yöntem esas alınmıştır. Selüloz örnekleri, 28 °C'de kurutma

kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmış ve 10 saat boyunca her saat başı ağırlıkları ölçülerek su bırakma oranları hesaplanmıştır.



Şekil 3. 7. Kurumaya bırakılmış selüloz

3.2.5.2.2. Viskozite

İnkübasyon sonucunda elde edilen mikrobiyel selüloz, yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra laboratuvar tipi değirmende (Retsch GE) öğütülerek, 40 mesh boyutunda parçalanmıştır. Viskozimetre ölçümleri 35 ml hazneli küvetlerde gerçekleştirilip 3,5 gr selüloz saf su ile 35 ml'ye tamamlanarak süspansiyon elde edilmiştir. %10'luk bu süspansiyondan her defasında 1/1 oranında seyreltilmiş ve viskozimetrik değerleri (Vibro Viscometer SU-10), 20-21 °C aralığında, 30 Hertz frekansta, sabit titreşimde, her 5 sn'de bir okuma yapılarak mPa.s cinsinden ölçülmüştür (Watanabe vd. 1998)

3.2.5.2.3. Termal analiz

Termal gravimetrik analiz, sıcaklık doğrusal olarak artırıldığında analiz yapılan maddenin ağırlık kaybını ölçmektedir. Yöntem, numunenin ağırlık kaybına uğradığı sıcaklığı saptamaktadır. Bu kayıp örneğin bozunduğunu ya da buharlaştığını göstermektedir. Ayrıca ağırlık kaybının olmadığı sıcaklığı da gösterir. Bu da materyalin ısıl kararlılık durumunu ifade eder (Kebapçı, 2012).

Mikrobiyel selülozun termal bozunma davranışları TGA/TDA cihazı (Perkin Elmer diamond, USA) kullanılarak 0-900 °C aralığında incelenmiştir.

3.2.5.2.4. Çözünürlük testleri

Çeşitli çözücüler kullanılarak mikrobiyel selülozun çözünürlük özellikleri belirlenmiştir. Çözünürlük testleri için kullanılan çözücüler toluene, aseton, kloroform, benzen, karbon tetraklorür, dimetilformamittir. Denemede 10 ml çözücü içerisine 0.1 g örnek konulmuş ve tüpler oda sıcaklığında 24 saat süreyle çalkalanarak, çözücülerdeki çözünme yetenekleri tespit edilmiştir (Çakmakçı vd., 2008).

3.2.5.2.5. FT-IR analizi

Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen BS örneklerinin elementel içeriklerinin tesbit edilmesi amacıyla FT-IR Spektroskopisinde görüntülenmiştir. Selüloz örneğine ait FT-IR bantlarındaki elementel C içeriğinin sayısal yüzdesinden saf selüloz elde edilip edilmediği sonucuna varılmıştır. FTIR analizi Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.5.2.6. Fe -SEM analizi

Sıvı besiyerinde 28 °C'de 10 gün inkübasyon sonunda elde edilen ve kurutulan selüloz örneklerin yüzey yapısının belirlenmesinde taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Fe-SEM analizi Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Enerji Araştırmaları ve Araştırma Uygulama Merkezinde yapılmıştır. TEM ile görüntüleri üç boyutlu inceleyerek numunelerin mikro yapıları ve morfolojisini değerlendirilmiştir.

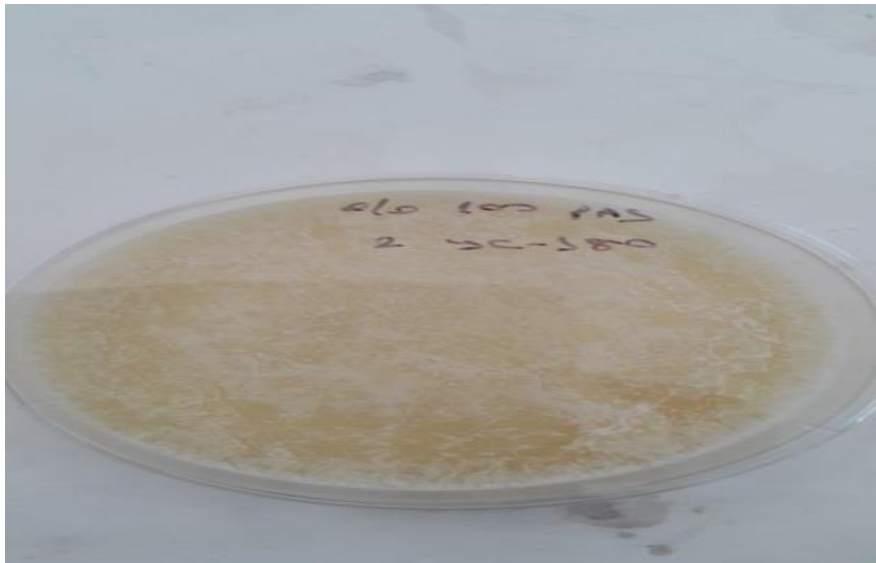
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların bulguları 3 bölüm altında toplanmıştır. Her bölümde çalıŐmanın teorik alt yapısı ve amacı tanımlanarak elde edilen bulgular tartıŐılmıŐtır.

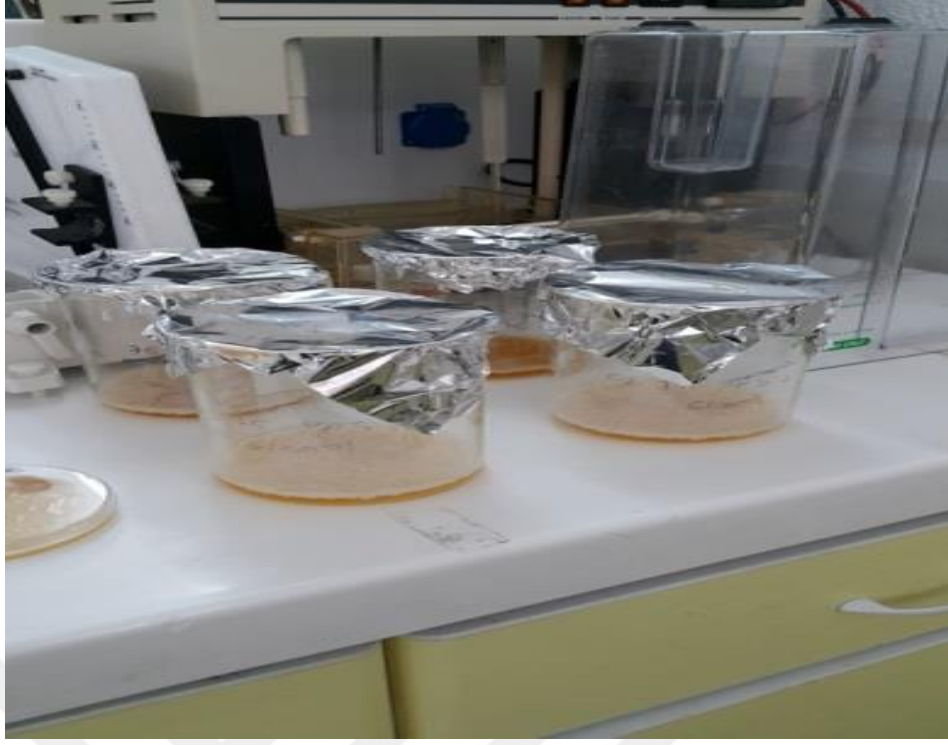
4.1. BS retimi ve Saflaştırılması

BS retiminde en yüksek verimin elde edildiği üretim koşullarının belirlenmesi için 4 farklı bakteri kültürü ile MRS broth ve PAS besiyerlerinin farklı bileŐimleri kullanılarak laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir. LAB'lar durgun kültür koşullarında farklı büyüklükteki kaplarda selüloz üretim miktarları belirlendikten sonra medikal alandaki bazı denemelerde kullanılmak üzere yüzey alanı geniş sterilize edilebilir cam tavalarda büyük ölçekte üretimler gerçekleştirilmiştir.

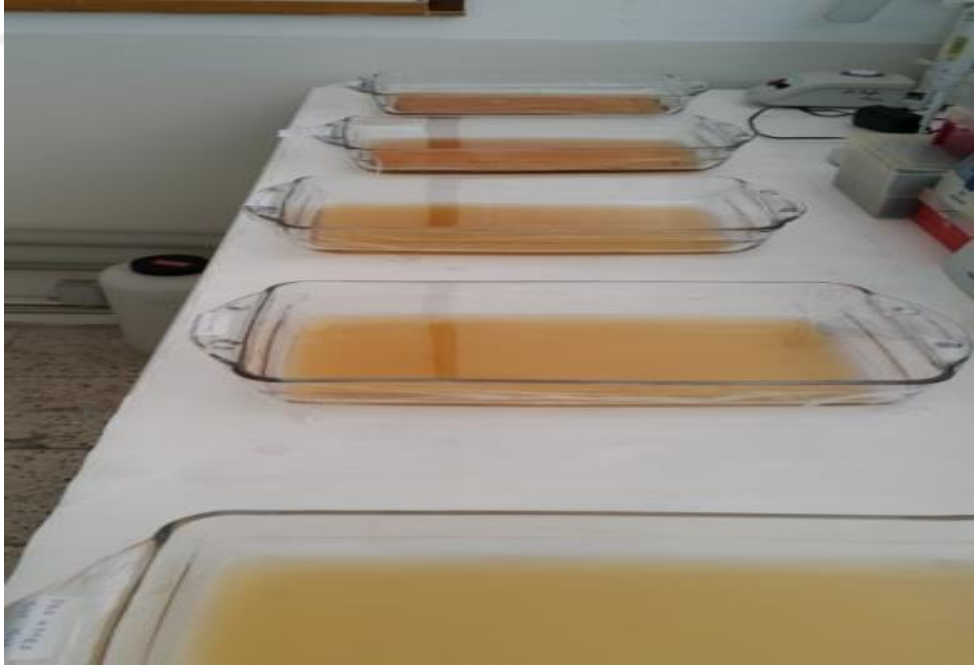
İnkübasyon sonucu üretilen selüloz önce süzülerek besiyerinden ayrılmıŐ, daha sonra ağartma işlemi uygulanarak rengi beyazlatılmıŐtır. Selüloz retiminde uygulanan üretim (durgun kültür), süzme, renk açma, kurutma ve toz haline getirme işlemleri sırasıyla Şekil 4.1 - 4.8'de görülmektedir.



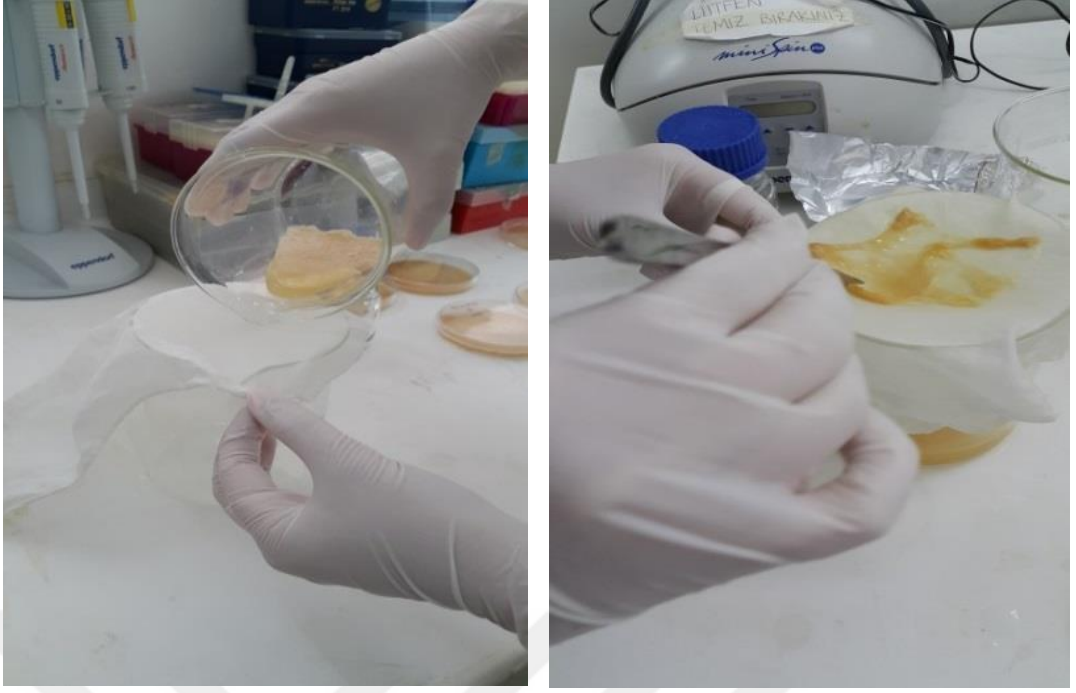
Şekil 4. 1. Petride BS retimi



Şekil 4. 2. Beherde BS üretimi



Şekil 4. 3. Cam tavalarda (büyük hacimde) BS üretimi



Şekil 4. 4. BS 'un süzme işlemi



Şekil 4. 5. BS'un süzme işleminden sonraki görünümü



Şekil 4. 6. NaOH çözeltisinde ağartma işlemi



Şekil 4. 7. Kuru BS görünümü



Şekil 4. 8. Toz halindeki BS'un görünümü

4.1.1. Farklı kültürlerden BS üretim sonuçları

İnkübasyon işlemi sonunda *Lactobacillus rhamnosus* ve YC-380 bakterileri ile yapılan çalışmalar BS üretim potansiyelinin olduğunu gösterdi. En yüksek verimle BS üretimi *Lactobacillus rhamnosus* %75 (PAS) + %25 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5 (3,06 g) numunesinden elde edildi ve bu sebepten BS üretim çalışmalarına *Lactobacillus rhamnosus* bakterisi ile devam edildi. Çizelge 4.1'de çalışılan 4 bakteri grubuna ait BS üretim sonuçları verilmiştir.

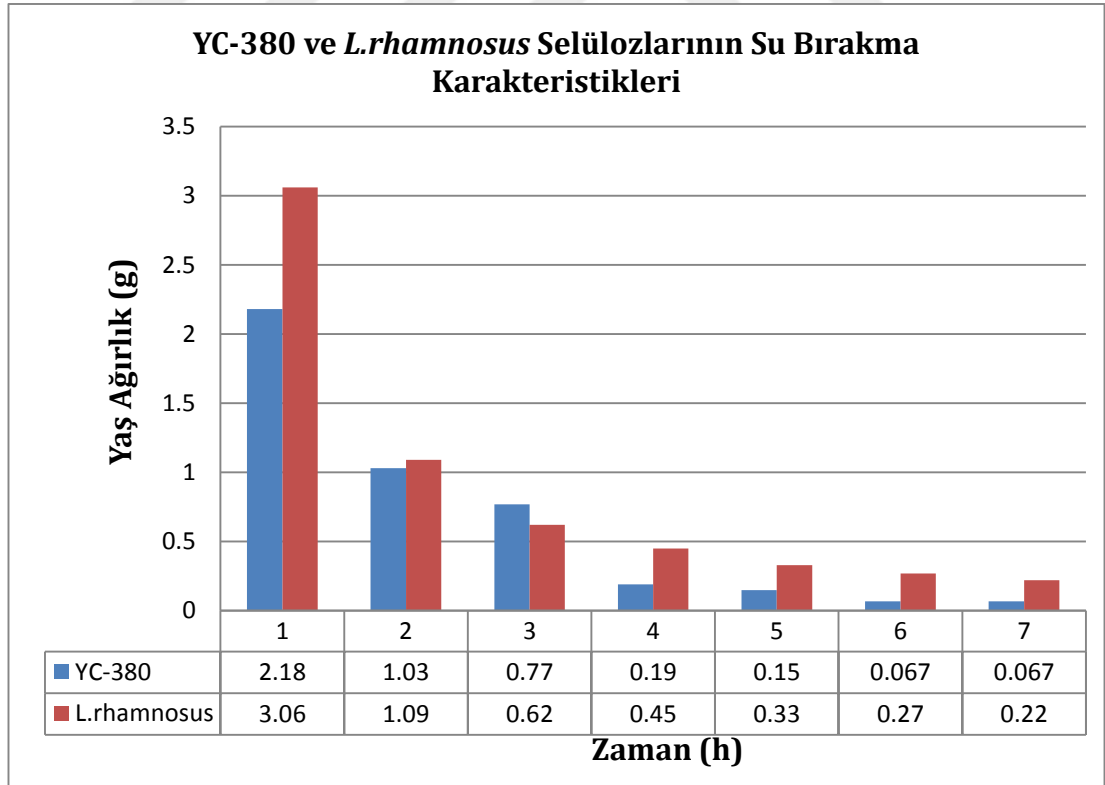
Çizelge 4. 1. BS üretim miktarları

Bakteri Grubu	BS Üretim Miktarı
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3.06 g
YC-380	2.18 g
LB-12	0 g
STM-7	0 g

4.2. *L.rhamnosus* BS ve YC-380 Kültürü BS'un Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

4.2.1. Su bırakma özelliği

Deney çalışmaları sonucunda gözle görülebilen BS üretimi YC-380 kültürü ve *L.rhamnosus* bakterileri tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu 2 farklı bakteri kültürünün ürettiği selülozda su bırakma özellikleri incelenmiştir. Üretilen selüloz besiyerinden ayrılıp, suyu süzülükten sonra tartılarak yaş ağırlığı belirlenmiştir. Buna göre 100 ml besiyerinden YC-380 bakterisi tarafından 2,18 g BS üretimi gerçekleşmiş, *L.rhamnosus* bakterisi tarafından ise 3,06 g (1.4 kat daha fazla) BS üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.9.). Bakteriyel selüloz verimi yaş ağırlığın zaman orantısına bağlı olarak hesaplanmaktadır (Çakmakçı vd., 2008) . YC-380 kültürü BS verimi 44,54 g/l, *L.rhamnosus* bakterisi için 60,4 g/l olarak belirlenmiştir.



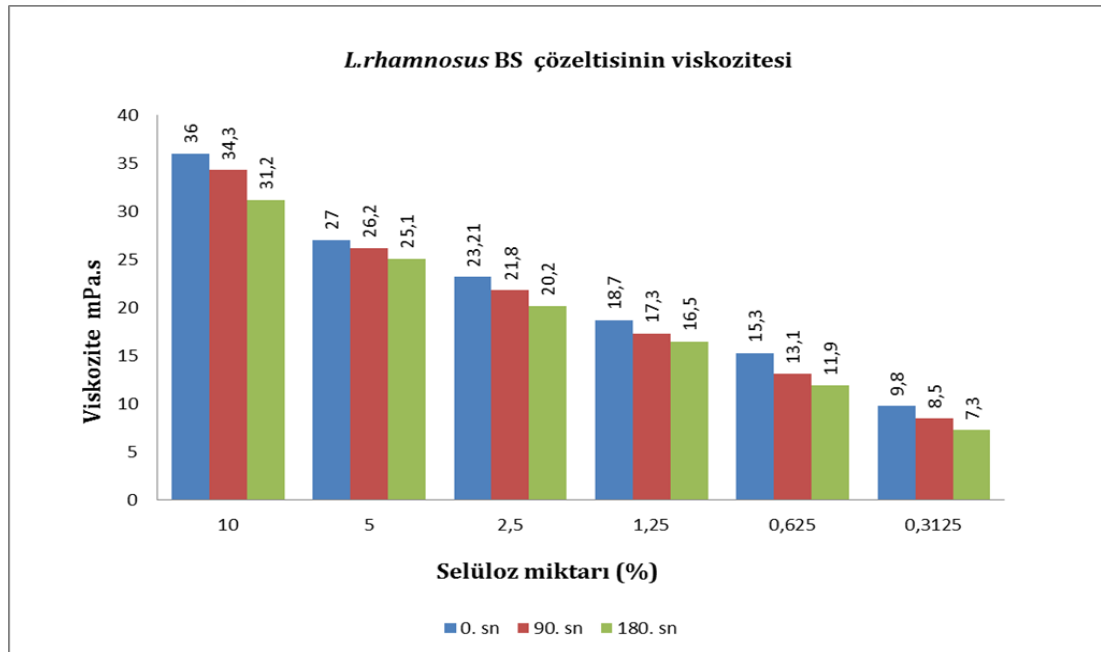
Şekil 4. 9. YC-380 ve *L.rhamnosus* bakterilerinin ürettiği selülozun su bırakma özellikleri

Şekil 4.9 incelendiğinde, YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun 1. saat sonundaki su bırakma oranı %52,76 iken, *L.rhamnosus* bakterisinin ürettiği selülozun su bırakma oranı %64,4 olarak tespit edilmiştir. Kurutma süresi boyunca selülozların su bırakma oranları sırasıyla %21,13 ve %28,4 olarak tesbit edilmiştir.

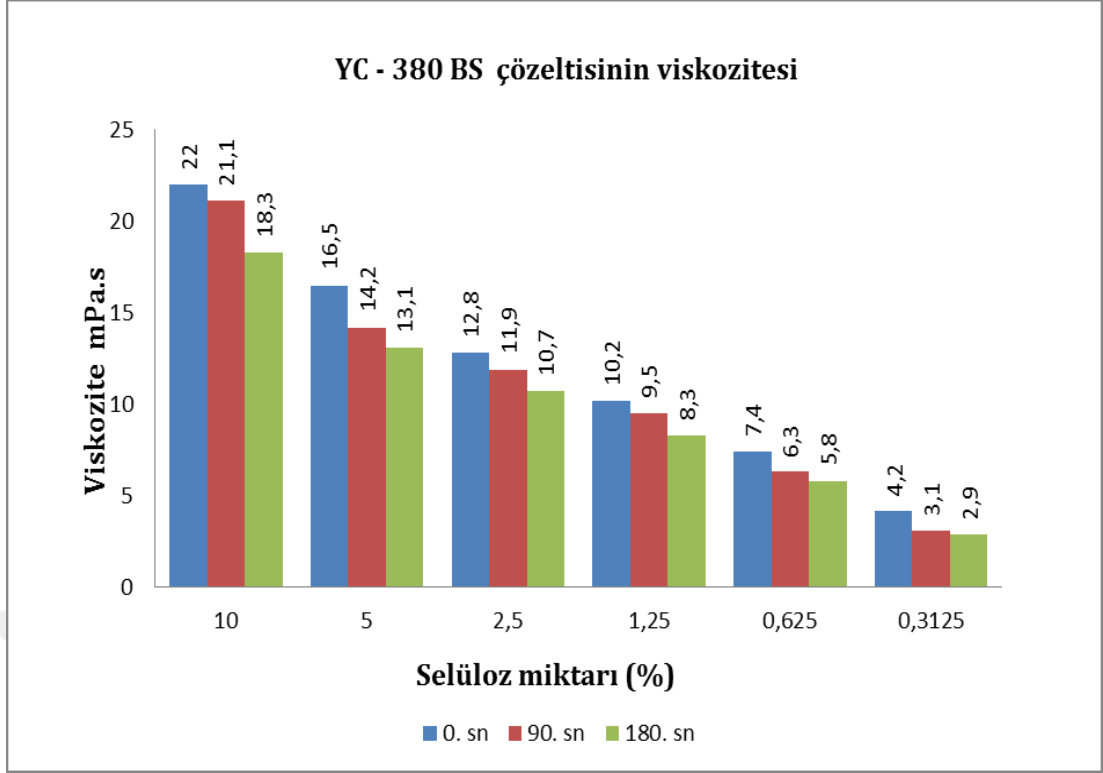
YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun 5. saat sonunda su bırakma işlemi sona ermiştir. *L.rhamnosus* bakterisinden elde edilen selülozun ise bu sürece 7. saatte ulaştığı belirlenmiştir. Buna göre *L.rhamnosus*'dan elde edilen BS'un su tutma kapasitesinin, YC-380 kültüründen elde edilen BS'a göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çakmakçı vd. (2008) asetik asit bakterileri ile yapmış oldukları çalışmada A0602 suşundan elde edilen BS'un 8. saat sonunda su bırakması sona ermiştir.

4.2.2. Viskozite



Şekil 4. 10. *L.rhamnosus* BS çözeltilisinin viskozitesi



Şekil 4. 11. YC-380 BS çözeltilisinin viskozitesi

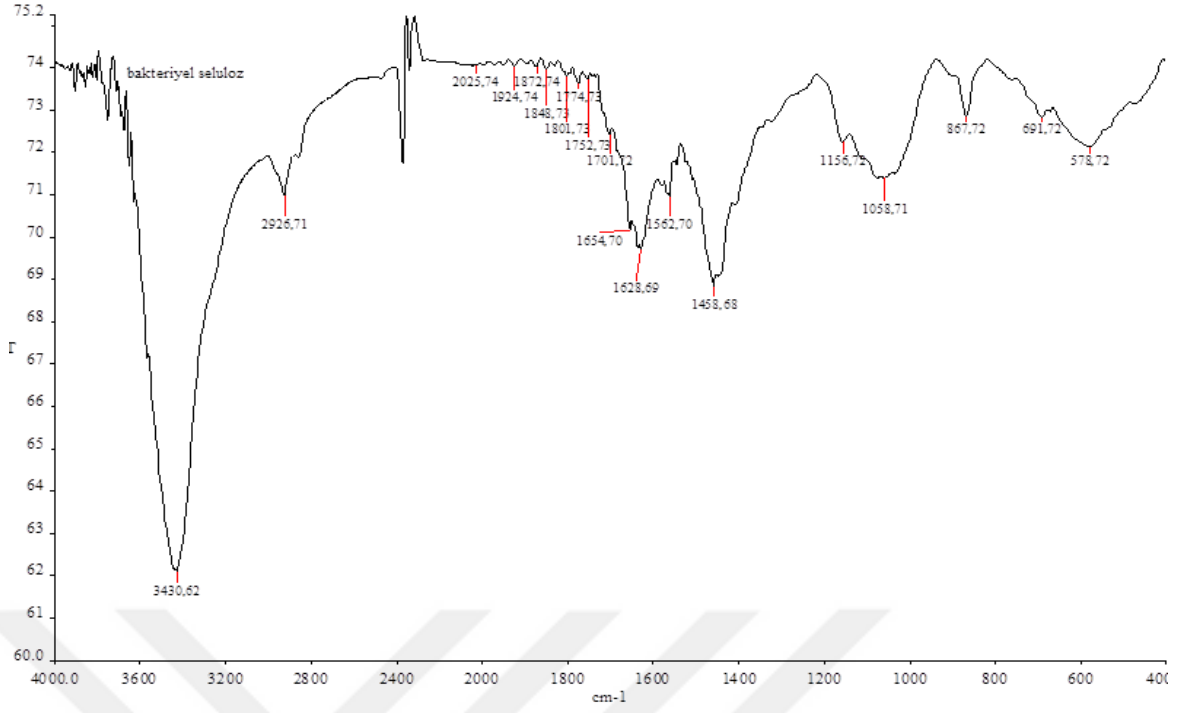
L.rhamnosus ve YC-380 BS çözeltilerinin viskozite değerleri incelendiğinde *L.rhamnosus*'dan elde edilen BS çözeltilisinin viskozite değeri 0. Saniye'de 36 mPa.s iken YC-380'den elde edilen BS çözeltilisinin 0. Saniye'de viskozite değeri 22 mPa.s bulunmuştur. İki grafikte'de BS çözeltilerinin seyreltilmesi ile viskozite değerlerinde lineer bir düşüş gözlenmiştir. başlangıca göre 3. dakikada bir azalış olduğu ve viskozitenin 36 mPa.s'den 31,2 mPa.s'a düştüğü belirlenmiştir.

Çakmakçı vd. (2008) asetik asit bakterileri ile yapmış oldukları çalışmada bizim sonuçlarımızdan farklı olarak ürettikleri selülozun %10'luk çözeltilisinin viskozitesinde başlangıca göre 3.dakikada bir artış olduğu ve viskozitenin 10,43 mPa.s'den 12,35 mPa.s'ye yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca bizim çalışmamızda da olduğu gibi söz konusu selüloz çözeltilisinde viskozite zamana bağlı olarak değişim göstermemiştir.

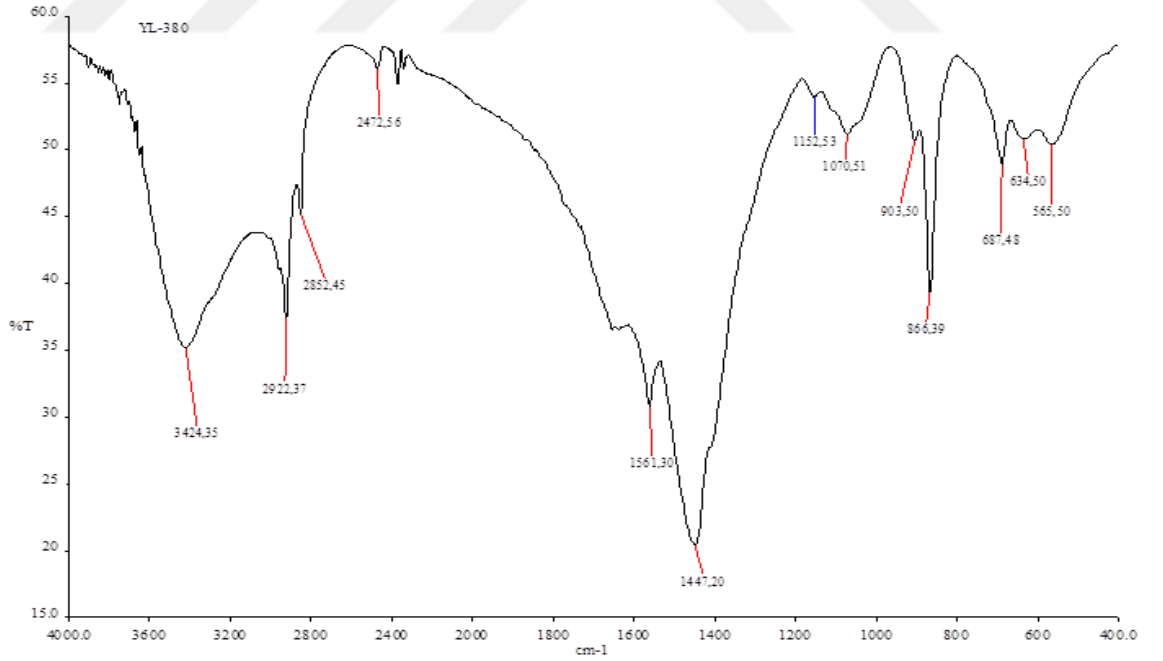
4.2.3. FTIR sonuçları

Analiz sonuçlarına göre, *L.rhamnosus*'dan elde edilen BS örneğinin FTIR spekturumunda görülen 3200–3600 cm^{-1} deki geniş bant molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağı O-H gerilme, 3100-2700 cm^{-1} deki gözlenen bant C-H gerilme, 1625 cm^{-1} de görülen karakteristik bant hidroksil grubuna komşu –O- gerilme ve 1450 cm^{-1} civarındaki bant ise düzlem içi C-O-H eğilme titreşimini gösteren banttır. 2926 cm^{-1} de alifatik C-H'lere ait bandın şiddetinin fazla olması alifatik karbon gruplarının (CH_2) çok fazla bulunduğunun göstergesidir C-O-C bandı ise 1156 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir (Şekil 4.12.). Mikrokristalli selüloz ve bambu lifleri ile yapılan bir çalışmada (Wang vd., 2007), H bağlı OH grupları 3340-3412 cm^{-1} dalga boyunda görülmekte ve tez çalışmasında ise daha geniş bant aralığı görülmüş ve C-H gerilimi ise tez çalışmasına benzer şekilde 2968-2900 cm^{-1} arasında gerçekleştiği görülmüştür. Diğer bir çalışmada ise 1630 cm^{-1} bandının suyun absorblanması ile ilgili olduğu ortaya konmuştur (Sun vd., 2008).

L.rhamnosus ve YC-380 bakterisinden elde edilen selüloz örneklerine ait FTIR bantları birbirine benzemekle birlikte, 2900 ve 1625 cm^{-1} de mevcut bantların şiddetlerinde farklılık gözlenmiştir. YC-380 kültürü örneğinde 1561 cm^{-1} de görülen bandın *L.rhamnosus* örneğine göre zayıf olması konjuge dien yapısının ve aromatik yapıların (glikoz halkası) daha düşük oranda olduğunu göstermektedir. 2900 cm^{-1} de alifatik C-H'lere ait bandın *L.rhamnosus*'dan elde edilen selülozda daha şiddetli olduğu saptanmıştır. Bu pikin şiddetinin fazla olması alifatik karbon gruplarının ($-\text{CH}_2-$) daha fazla bulunduğunun göstergesidir.



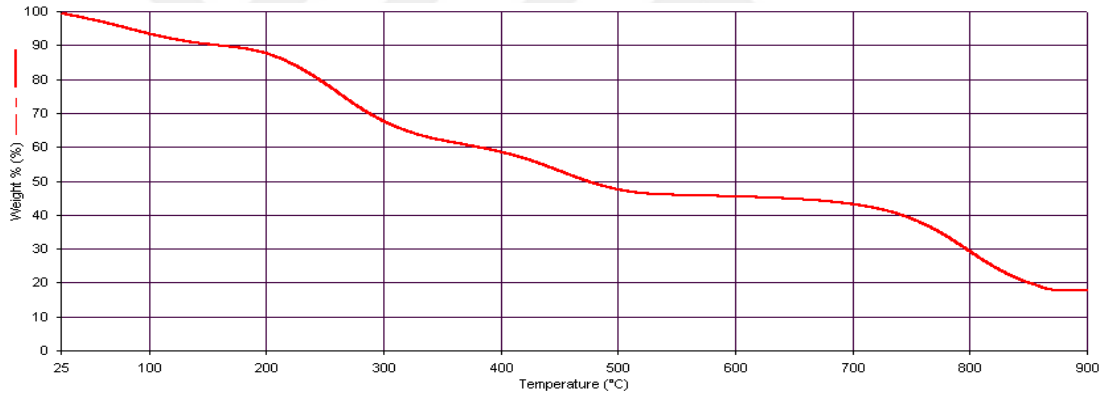
Şekil 4. 12. *L.rhamnosus* bakterisinin ürettiği selülozun FTIR diyagramı



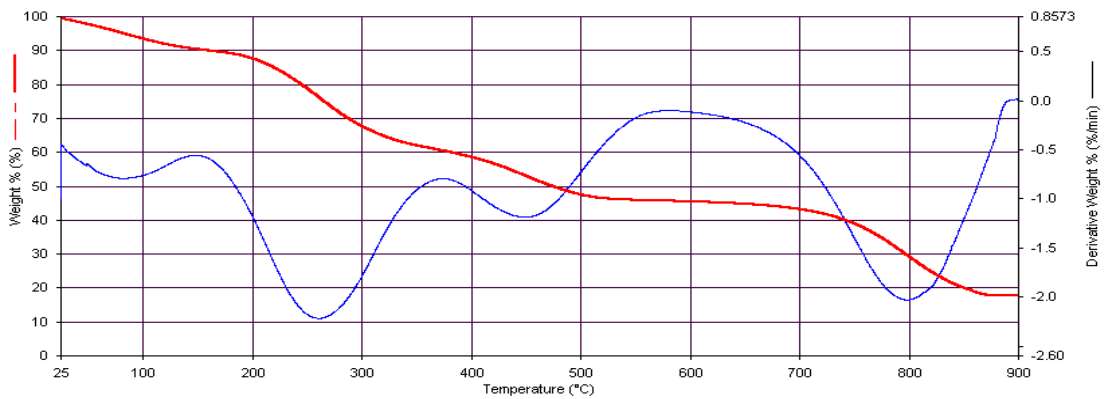
Şekil 4. 13. YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun FTIR diyagramı

4.2.4. Termal özellikler

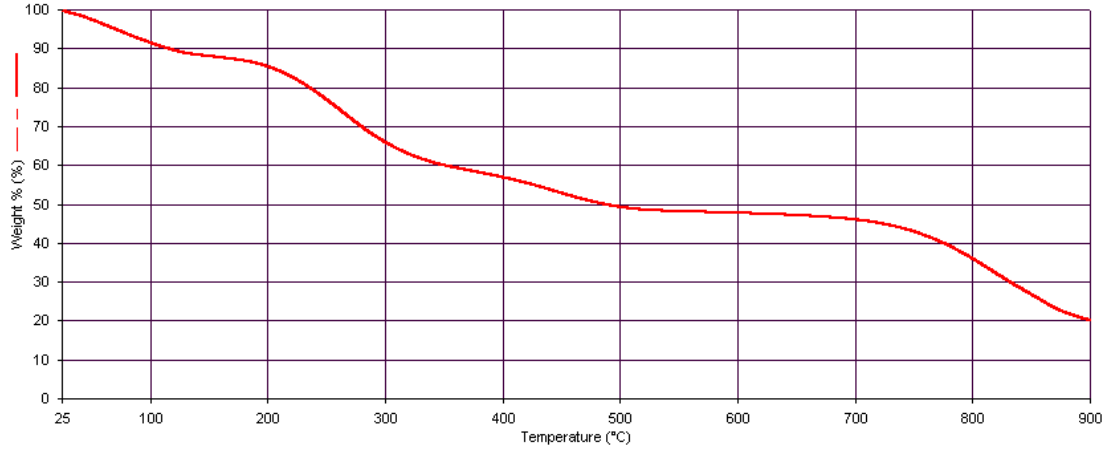
L.rhamnosus ve YC-380 kültürünün ürettiği selülozların termal bozunma davranışları incelenmiş ve bozunma sıcaklıkları belirlenmiştir. Her iki numune de iki bozunma sıcaklığı göstermiştir (Şekil 4.14. ve 4.16.). İlk bozunma sıcaklıkları 290°C'de gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta dekarboksilasyon ve demetoksilasyon yoluyla CO, CO₂, H₂O, CH₄, CH₃OH gibi basit yapılar uzaklaşmaktadır. İkinci bozunma 780°C'de gözlenmiştir. Bu basamakta muhtemelen daha yavaş bir şekilde aromatik bileşenler ayrılmaktadır. Bu basamağın aromatik yapıların fazla olduğu düşünülen *L.rhamnosus* örneğinde şiddetli olması FTIR analiz sonuçlarını destekler nitelik taşımaktadır. Bu sonuç, üretilen bakteriyel selüloz örnekleri arasında farklılıkların bulunabileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14 ve 4.16'da verilmiştir.



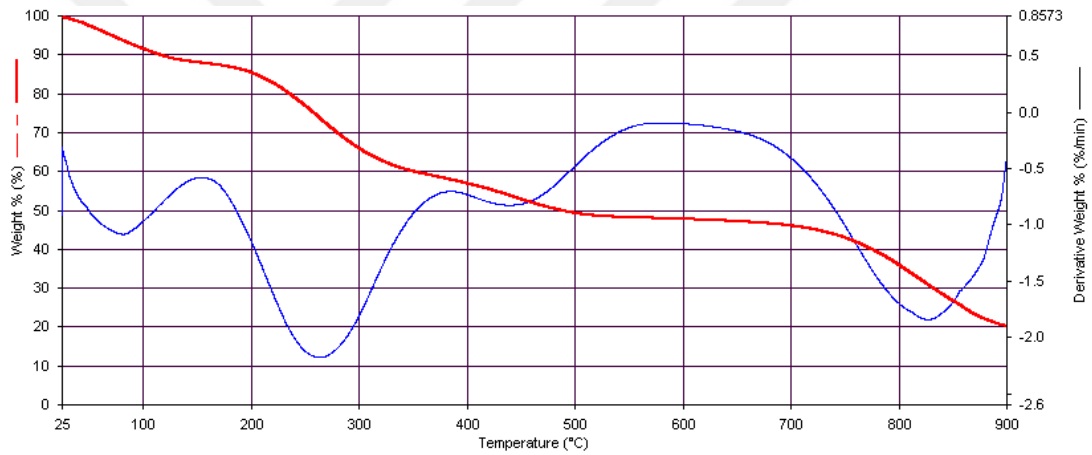
Şekil 4. 14. *L.rhamnosus*'dan elde edilen selülozun termal analiz diyagramı



Şekil 4. 15. *L.rhamnosus*'dan elde edilen selülozun TGA ve DTG grafiği



Şekil 4. 16. YC-380'den elde edilen selülozun termal analiz diyagramı



Şekil 4. 17. YC-380'den elde edilen selülozun TGA ve DTG grafiği

Çiftçi vd. (2015), Nanokil katkılı PVA/Kitosan nanoliflerin sentezi ile ilgili yaptıkları çalışmada 25°C- 900°C sıcaklık aralığında elde edilen sıcaklığa bağlı % kütle değişim grafiğinde bizim çalışmamızda olduğu gibi 2 adımda bozunma görülmektedir. Çiftçi vd. (2015), ilk aşamada yapıdan %10'luk kütle kaybının nem kaybından kaynaklandığı ve yaklaşık 210-500 aralığında gerçekleşen %75'lik kütle kaybının ise yapının zincirlerinde meydana gelen bozunmadan kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Karaçay vd, (2012) ilk aşamada meydana gelen kütle kaybının su kaybı olduğunu, ikinci aşamadaki kaybın ise pirojenik ayrışma ve moleküler zincirlerinin ablasyonuna karşılık geldiğini düşünmüştür. Çakmakçı

vd., (2008) A0602 ve B-759 suşları ile ürettiği selülozların termal bozunma davranışlarını incelemiş ve bu tez çalışmasında da olduğu gibi iki bozunma sıcaklığı görülmüştür, çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak ilk bozunma sıcaklığı 290°C'de görülmektedir.

4.2.5. Çözünürlük testi sonuçları

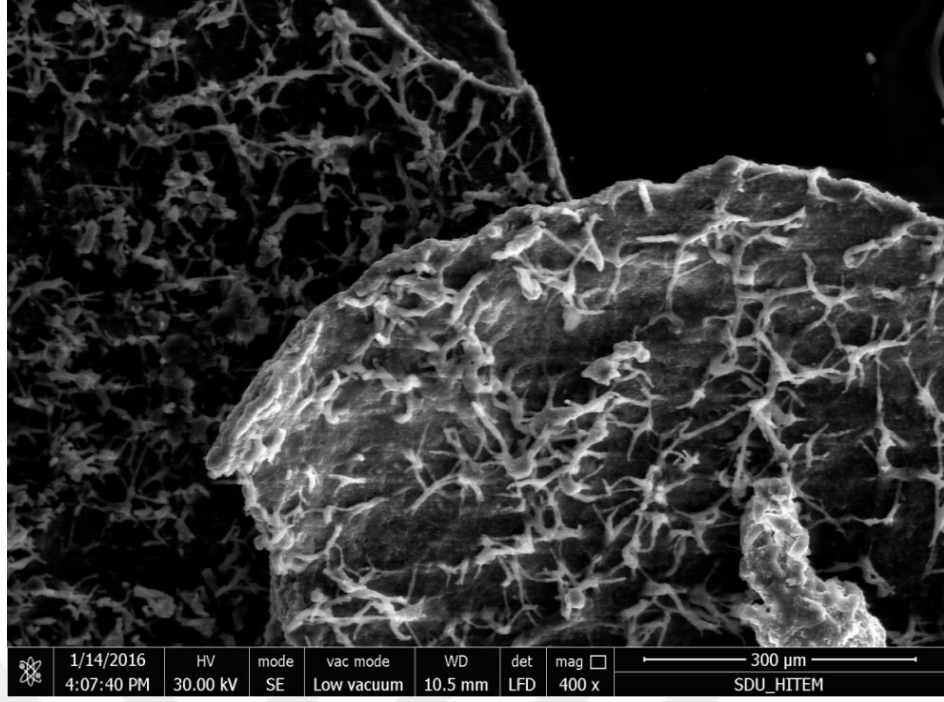
Selülozun çözünmesi pek çok faktöre bağlı bulunmaktadır. Bunlar arasında selülozun yapısı, molekül ağırlığı ve orijini gelmektedir. Pek çok araştırmacı selülozun inorganik ve organik çözücülerdeki davranışları üzerinde araştırmalar yapmıştır (Laszkiewicz, 1998).

Çeşitli çözücülerde çözünme özelliği, BS'un tekstil sanayinde kullanımı açısından önem taşımaktaysa da organizma farklılıklarının selülozun bileşimi üzerindeki etkilerini ortaya koymak açısından da önemlidir. Her iki bakterinin ürettiği selüloz örneklerinin çözünürlük testleri için toluene, aseton, kloroform, benzen, karbon tetraklorür ve dimetilformamit çözücüleri kullanılmıştır. Denemede 10 ml çözücü içerisine 0.1 g örnek konulmuş ve tüpler oda sıcaklığında 24 saat süreyle çalkalanarak, çözücülerdeki çözünme yetenekleri tespit edilmiştir. Çözünürlük testi sonucunda, iki bakterinin de ürettiği selüloz'un 80°C su banyosunda sadece toluen çözücüsünde çözüldüğü belirlenmiştir.

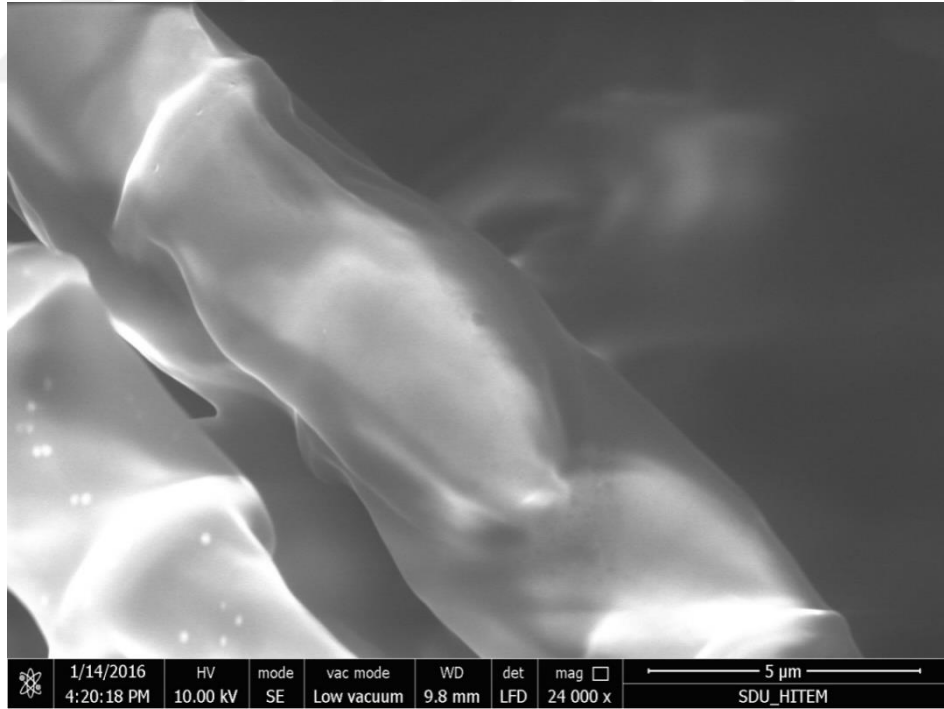
4.2.6. Fe-SEM analizi sonuçları

L.rhamnosus bakterisine ait Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüleri ürettiği selülozun yapısının, ×400 ve ×24000 büyütme ile elde edilen görüntüler sırasıyla Şekil 4.18 ve 4.19'de verilmiştir.

Şekiller incelendiğinde selülozun lifleri bir tubuler bir ağ yapısı oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu görüntülerdeki selüloz lifler, kimyasal ve fiziksel özelliklerin saptanmasıyla pekiştirilmiştir. Bunlar arasında FTIR pikleri, çeşitli çözücülerdeki çözünürlük özellikleri sayılabilir.



Şekil 4. 18. BS'un Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüsü ($\times 400$)



Şekil 4. 19. BS'un Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüsü ($\times 24000$)

4.3. BS Üretiminin Optimizasyonu

Çalışmada, Taguchi metodu ile L9 (3**4) standart ortogonal dizisinde belirlenen farklı pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür miktarı, inkübasyon süresine göre deneyler gerçekleştirilmiştir. Modele göre 9 deney üç kez tekrar edilerek yapılmış ve değerlerin ortalaması alınmıştır. Taguchi metodu kullanılarak ara deney sonuçları türetilmiştir. Bunun sebebi deney verilerinin genel değerlendirmelerini yapabilmektir. Sonuçta 9'u deney sonucu 55'i tahmin edilerek 64 adet en yüksek verim sonuçları elde edilmiştir. Bulunan sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılmıştır.

4.3.1. Deneysel bulgular ve taguchi performans analizi

Taguchi metodu L9 deney tasarımına göre pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür miktarı ve inkübasyon süresi ile deneyler yapılmış ve BS miktarı yaş ağırlık değerleri bulunmuş ve Çizelge 4.2'de tablo halinde verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Taguchi L9 modeline göre elde edilen deney sonuçları

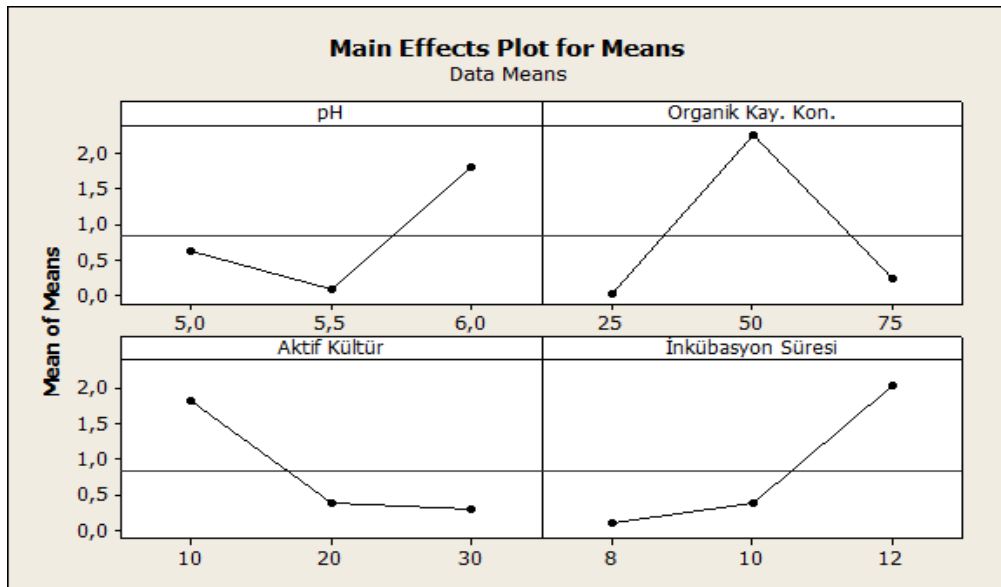
Deney No	PH	Organik kaynak kons.	Aktifleştirilmiş kültür	İnkübasyon süresi	BS miktarı
1	5,0	25	10	8	0.06 gr
2	5,0	50	20	10	1.13 gr
3	5,0	75	30	12	0.67 gr
4	5,5	25	20	12	0
5	5,5	50	30	8	0.23 gr
6	5,5	75	10	10	0
7	6,0	25	30	10	0
8	6,0	50	10	12	5.41 gr
9	6,0	75	20	8	0

4.3.2. Taguchi S/N analizi optimizasyonu

Deney tasarımına göre yapılan deney sonuçları Taguchi metodu ile sinyal/gürültü (S/N) oranları optimize edilmiştir. Dr. Genichi Taguchi tarafından geliştirilen bu yaklaşımda, sonuçları analiz edebilmek için S/N oranı olarak bilinen bir istatistiksel performans ölçüsü kullanılır. S/N oranındaki S sinyal faktörünü, N ise gürültü faktörünü ifade etmektedir. Sinyal faktörü sistemden alınan gerçek değeri, gürültü faktörü ise deney tasarımına katılmayan fakat deney sonucuna etki eden faktörleri ifade etmektedir.

4.3.2.1. pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür, inkübasyon süresi'nin BS miktarı S/N oranı

Taguchi metodu ile elde edilen tüm optimizasyon girdi parametrelerinin BS miktarı değerlerinin S/N oranları grafiksel olarak Şekil 4.20'de verilmiştir. S/N oranının nominal olması tercih edilmiştir. BS miktarı deney parametrelerinin, S/N oranının en yüksek değerinde en yüksek, en düşük S/N oranında da ise en düşük değerdedir.



Şekil 4. 20. BS miktarı değerleri S/N oranı

Çizelge 4. 3. Deneylelerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları

Deney No	pH parametresi	Organik kaynak konsantrasyonu	Aktif kültür parametresi	İnkübasyon süresi	BS miktarı
1	5.0	50	10	8	2.29 g
2	5.0	50	10	10	2.57 g
3	5.0	50	10	12	4.22 g
4	5.0	50	20	8	0.85 g
5	5.0	50	30	8	0.77 g
6	5.0	25	10	8	0.06 g
7	5.0	75	10	8	0.26 g
8	5.0	25	20	8	-1.38 g
9	5.0	25	30	8	-1.46 g
10	5.0	25	10	12	1.99 g
11	5.0	25	20	10	-1.10 g
12	5.0	25	20	12	-1.10 g
13	5.0	75	20	8	-1.83 g
14	5.0	75	30	12	0.67 g
15	5.0	75	10	10	0.54 g
16	5.0	75	10	12	2.19 g
17	5.0	75	20	10	-0.90 g
18	5.0	75	20	12	0.74 g
19	5.0	75	30	10	0.98 g
20	5.0	50	10	12	4.22 g
21	5.0	25	20	8	-1.38 g
22	5.5	50	10	8	1.75 g
23	5.5	25	10	8	-0.48 g

Çizelge 4. 4. Deneylelerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları (Devam)

Deney No	pH parametresi	Organik kaynak konsantrasyonu	Aktif kültür parametresi	İnkübasyon süresi	BS miktarı
24	5.5	75	10	8	-0.28 g
25	5.5	50	20	8	0.30 g
26	5.0	75	30	12	0.67 g
27	5.5	50	10	10	2.03 g
28	5.5	50	10	12	3.68 g
29	5.5	25	10	10	-0.20 g
30	5.5	25	10	12	1.44 g
31	5.5	25	20	8	-1.93 g
32	5.5	25	20	10	-1.65 g
33	5.5	25	20	12	0 g
34	5.5	25	30	8	-2.00 g
35	5.5	25	30	10	-1.72 g
36	5.5	25	30	12	-0.07 g
37	5.5	75	20	8	-1.72 g
38	5.5	75	30	8	-1.80 g
39	5.5	75	20	10	-1.44 g
40	5.5	75	20	12	0.20 g
41	5.5	75	30	10	-1.52 g
42	5.5	75	30	12	0.12 g
43	5.5	50	20	8	0.30 g
44	5.5	50	20	10	0.58 g
45	6.0	75	20	8	0 g
46	6.0	75	30	10	0.20 g

Çizelge 4. 5. Deneylerden elde edilen ve tahmin edilmiş BS miktarları (Devam)

Deney No	pH parametresi	Organik kaynak konsantrasyonu	Aktif kültür parametresi	İnkübasyon süresi	BS miktarı
47	6.0	75	10	12	3.37 g
48	6.0	75	20	8	0 g
49	6.0	50	10	8	3.48 g
50	6.0	25	10	8	1.24 g
51	6.0	75	10	8	1.44 g
52	6.0	50	20	8	2.03 g
53	6.0	50	30	12	3.88 g
54	6.0	50	10	10	3.76 g
55	6.0	50	10	12	5.41 g
56	6.0	25	20	8	-0.20 g
57	6.0	25	20	10	0.07 g
58	6.0	25	20	12	1.72 g
59	6.0	75	20	10	0.28 g
60	6.0	75	20	12	1.93 g
61	6.0	75	30	8	-0.07 g
62	6.0	75	30	10	0.20 g
63	6.0	75	30	12	1.85 g
64	6.0	50	30	12	3.88 g

Taguchi L9 modelindeki BS üretim optimizasyonu için yapılan deneylerden deney sonuçları elde edilmiştir. Aynı parametreler kullanılarak deney çalışmasında yapılmayan farklı kombinasyonlardaki sonuçlar tahmin edilmiş ve veri sayısı 64'e tamamlanmıştır.

Çizelge 4.3’de elde edilen toplam 64 adet BS üretim miktarı sonuçları verilmiştir. Çizelgede 6, 11, 14, 33, 38, 41, 46, 48 ve 55. satırlar deneysel ve geri kalan satırlar tahmin verilerini içermektedir.

Taguchi deney dizaynı ile yapılan deney ve tahmin verileri değerlendirildiğinde;

Çizelge 4. 6. En yüksek BS üretimi

	pH	Organik Kaynak kons.	Aktif Kül.	İnkübasyon Süresi	BS miktarı
Deney sonucu	6.0	%50	10	12	5.41 g
Tahmin sonucu	5.0	%50	10	12	4.22 g

Çizelge 4. 7. En düşük BS üretimi

	pH	Organik kaynak kons.	Aktif kültür	İnkübasyon süresi	BS miktarı
Deney sonucu	6.0	%25	30	10	0 g
Tahmin sonucu	5.5	%25	30	8	-2.00 g

pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür ve inkübasyon süresi parametreleri kullanılarak oluşturulan taguchi analizi sonucunda Çizelge 4.4’de

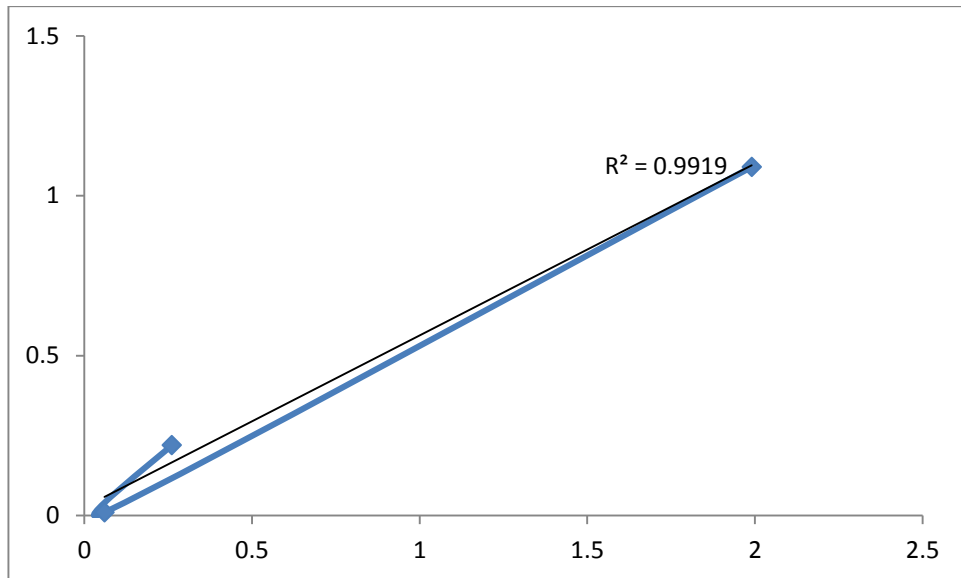
en yüksek BS üretimi %50 organik kaynak konsantrasyonu, %10 aktif kültür, 12 gün inkübasyon süresi ve pH 6 besiyeri ortamında (5,41 g), Çizelge 4.5’de en düşük BS üretimi ise %25 organik kaynak konsantrasyonu, %30 aktif kültür, 8 gün inkübasyon süresi ve pH 5.5 besiyeri ortamında (-2,00 g) bulunmuştur.

Taguchi deney dizaynı sonucu verilen tahmin değerlerinin doğrulama testleri gerçek deneyler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek deneyler sonucunda elde edilen verilerle, tahmin verileri karşılaştırılmış ve aralarındaki ilişki en küçük kareler metoduna göre 0,9919 bulunmuştur. Çizelge 4.7’de ki grafikten %99’luk doğruluk payı elde edilmiştir.

Çizelge 4. 8. Gerçek ve tahmin verilerinin karşılaştırılması

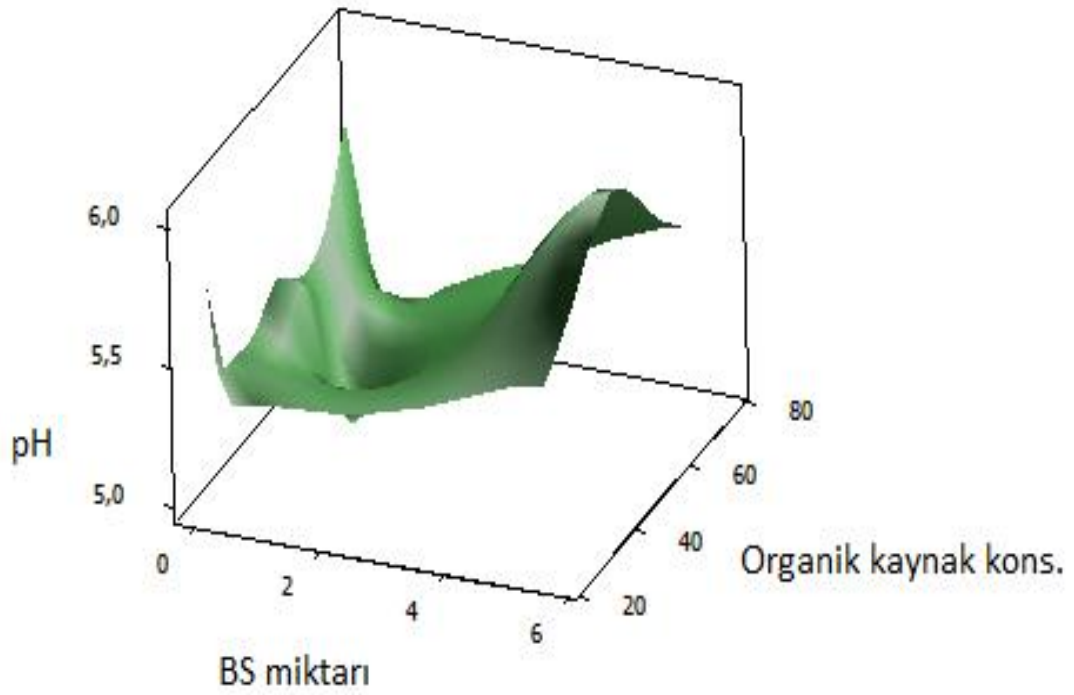
pH	Organik kaynak kons.	Aktif kültür	İnkübasyon süresi	Deney sonucu BS miktarı	Tahmin sonucu BS miktarı
5.0	%25	10	12	1,09 g	1,99 g
5.0	%25	10	8	0,01 g	0,06 g
5.0	%75	10	8	0,22 g	0,26 g

Çizelge 4. 9. Gerçek ve tahmin verilerin doğrulama grafiği



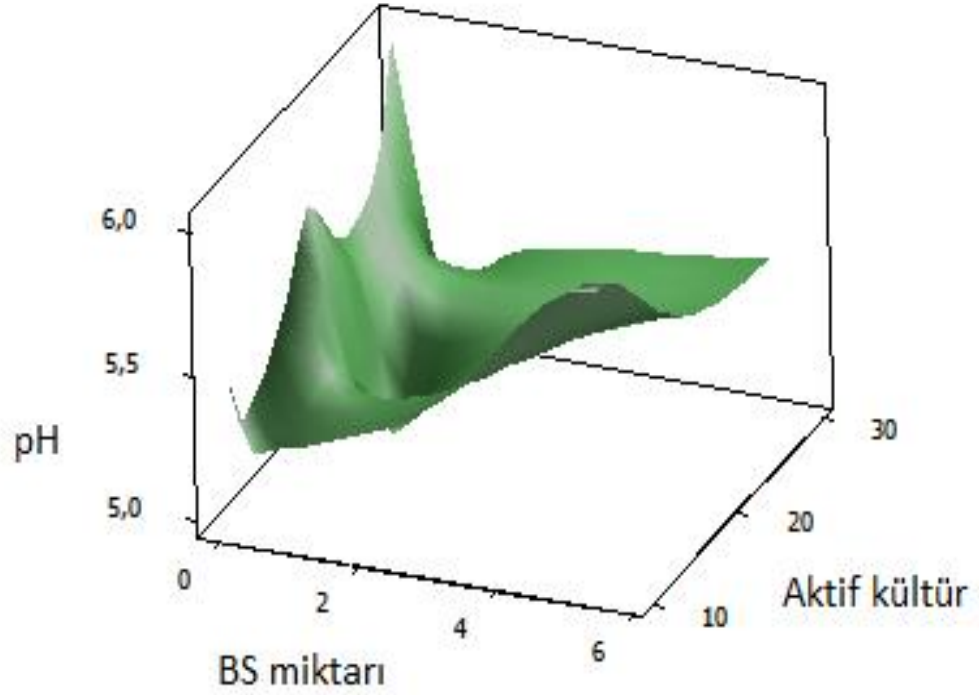
Taguchi metodu sonucuna göre BS üretim miktarını en çok etkileyen parametrenin sırasıyla;

- organik kaynak konsantrasyonu,
- inkübasyon süresi,
- pH,
- aktif kültür miktarı olarak bulunmuştur.



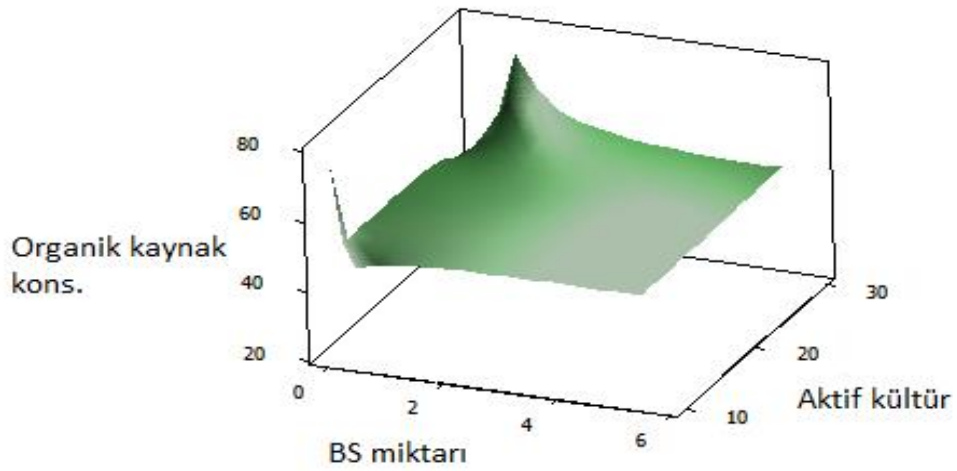
Şekil 4. 21. pH ve organik kaynak konsantrasyonuna bağlı BS miktarı

Yukarıdaki Şekil incelendiğinde de pH 5,8 iken organik kaynak konsantrasyonu %40 olduğu durumda BS miktarı 4,3 g dır.



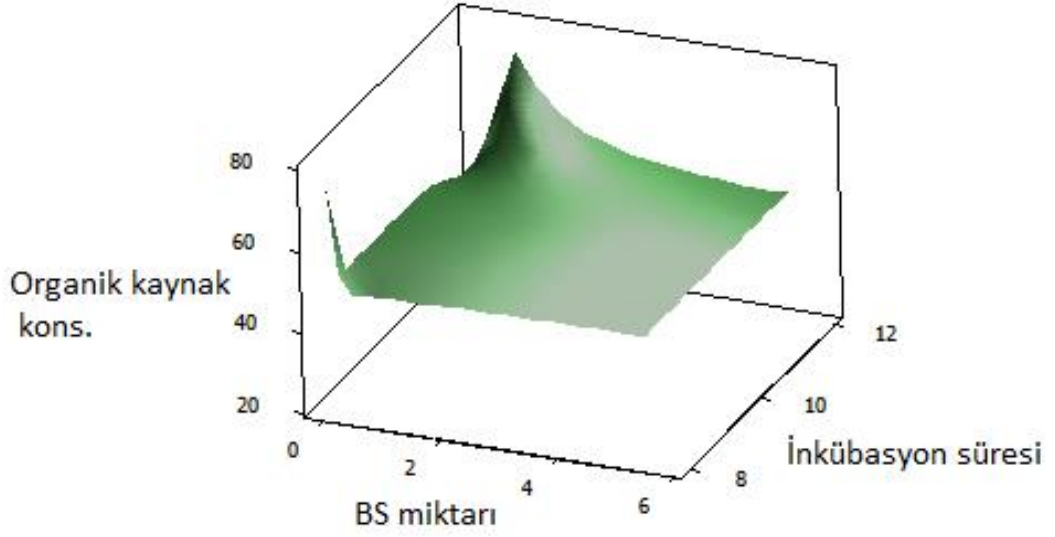
Şekil 4. 22. pH ve aktif kültüre bağlı BS miktarı

Yukarıdaki Şekil incelendiğın de pH 5,5 iken aktif kültür miktarı %10 olduğu durum da BS miktarı 5 g dır.



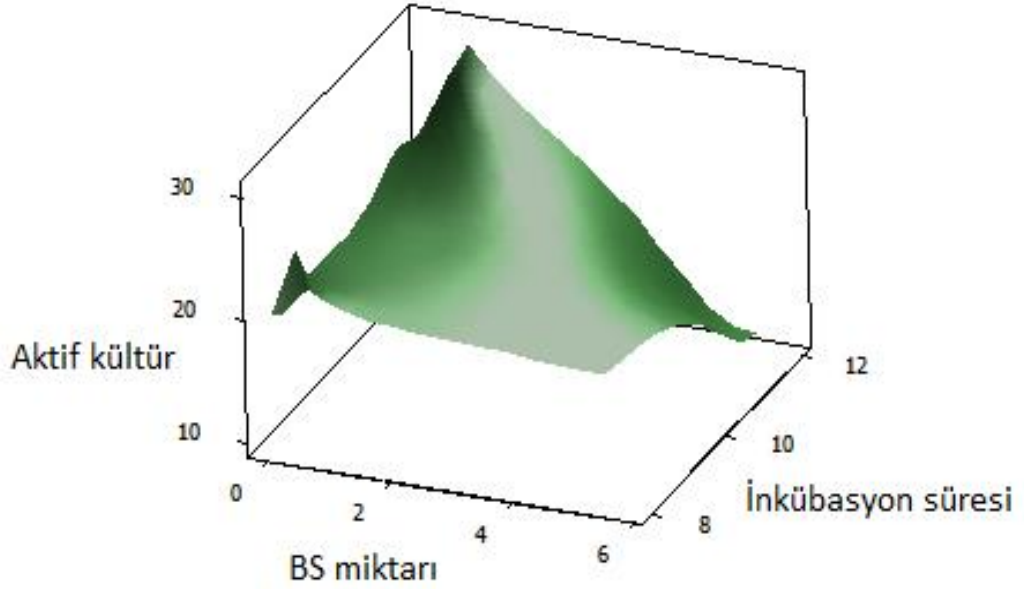
Şekil 4. 23. Organik kaynak konsantrasyonuna ve aktif kültüre bağlı BS miktarı

Yukarıdaki Şekil incelendiğın de organik kaynak konsantrasyonu %70 iken aktif kültür miktarı %25 olduğu durum da BS miktarı 2 g dır.



Şekil 4. 24. Organik kaynak konsantrasyonuna ve İnkübasyon süresine bağlı BS miktarı

Yukarıdaki Şekil incelendiğın de organik kaynak konsantrasyonu %70 iken inkübasyon süresi 10 gün olduğu durum da BS miktarı 2 g dır.



Şekil 4. 25. Aktif kültür ve inkübasyon süresine bağlı BS miktarı

Yukarıdaki Şekil incelendiğın de aktif kültür miktarı %20 iken inkübasyon süresi 10 gün olduğu durum da BS miktarı 0. 2 g dır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Laktik asit bakteri grubuna ait *Lactobacillus rhamnosus* (DSM, DELVO-ADD 100R, Netherlands), *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Lb. 12, Chr Hansen, Denmark), *Streptococcus thermophilus* (STM-7, Chr Hansen, Denmark) ve karışık kültür olan *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* (YC-380, Chr Hansen, Denmark) bakteri kültürleri kullanılmıştır.

Laktik Asit Bakteri'leri (LAB) çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilen, belirli spesifik bir çevreye adapte olmuş ve hemen hemen doğal habitatta bulunan organizmalardır (örneğin; vajina, sıcak kanlıların bağırsağı, feçes, dudaklar meyve veya sebzelerde) (Holzapfel vd. 2001; Çakır, 2001 Temmerman vd. 2004).

Ayrıca LAB'lar fermente süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemle yapılan peynirlerde doğal olarak bulduklarından olgunlaşmada temel florayı oluşturmaktadırlar. Ürünlere özgü duyuşsal ve yapısal özellikler kazandırırılar. Ayrıca oluşturdukları antimikrobiyal maddeler sayesinde sağlığı koruyucu ve terapötik etki göstermektedirler. Geleneksel yöntemle üretilen ürünlerde doğal olarak bulunan bu mikroorganizmalar, endüstriyel ürünlerde süte çok farklı kombinasyonlarda saf kültür (starter kültür) olarak ilave edilmektedirler.

Tez kapsamında üç bölüm şeklinde gerçekleştirilen çalışmaların bulguları 3 bölüm altında toplanmıştır.

Tez kapsamındaki çalışma 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

5.1. Farklı Kültürlerden BS üretimi

Farklı Kültürlerin BS üretim potansiyelleri araştırılarak en verimli üretim yapan bakteri kültürü tesbit edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda *Lactobacillus*

rhamnosus ve YC-380 bakterileri ile yapılan çalışmalar BS üretim potansiyeli gösterdi. En yüksek verimle BS üretimi *Lactobacillus rhamnosus* %75 (PAS) + %25 (MRS) + %10 aktifleştirilmiş kültür + pH 5 (3,06 g) numunesinden elde edildi ve bu sebepten BS üretim çalışmalarına *Lactobacillus rhamnosus* bakterisi ile devam edildi.

BS üretim çalışmaları sonucunda *Lactobacillus rhamnosus* 3.06 g, YC-380 2.18 g BS üretimi gösterirken, LB-12 ve STM-7 bakteri kültürleri BS üretim potansiyeli göstermediler. Karışık kültür olan *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* (YC-380) bakteri kültürü BS üretim potansiyeli gösterirken tek tek bakteri kültürleri kullanıldığında BS üretimi gözlenememektedir.

5.2. *L.rhamnosus* BS ve YC-380 kültürü BS'un Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Su bırakma özelliği

Deney çalışmaları sonucunda gözle görülebilen BS üretimi YC-380 kültürü ve *L.rhamnosus* bakterileri tarafından gerçekleşmiştir. Bu 2 farklı bakteri kültürünün ürettiği selülozda su bırakma özellikleri incelenmiştir. Üretilen selüloz besiyerinden ayrılıp, suyu süzildükten sonra tartılarak yaş ağırlığı belirlenmiştir. Buna göre 100 ml besiyerinden YC-380 bakterisi tarafından 2,18 g BS üretimi gerçekleşmiş, *L.rhamnosus* bakterisi tarafından ise 3,06 g (1.4 kat daha fazla) BS üretimi gerçekleşmiştir. Bakteriyel selüloz verimi yaş ağırlığın zaman orantısına bağlı olarak hesaplanmaktadır (Çakmakçı vd., 2008) . YC-380 kültürü BS verimi 44,54 g/l, *L.rhamnosus* bakterisi için 60,4 g/l olarak belirlenmiştir.

YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun 1. saat sonundaki su bırakma oranı %52,76 iken, *L.rhamnosus* bakterisinin ürettiği selülozun su bırakma oranı %64,4 olarak tespit edilmiştir. Kurutma süresi boyunca selülozların su bırakma oranları sırasıyla %21,13 ve %28,4 olarak tesbit edilmistir.

YC-380 bakterisinin ürettiği selülozun 5. saat sonunda su bırakma işlemi sona ermiştir. *L.rhamnosus* bakterisinden elde edilen selülozun ise bu sürece 7. saatte ulaştığı belirlenmiştir. Buna göre *L.rhamnosus*'dan elde edilen BS'un su tutma kapasitesinin, YC-380 kültüründen elde edilen BS'a göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çakmakçı vd. (2008), asetik asit bakterileri ile yapmış oldukları çalışmada A0602 suşundan elde edilen BS'un 8. saat sonunda su bırakması sona ermiştir.

Viskozite

L.rhamnosus ve YC-380 BS çözeltilerinin viskozite değerleri incelendiğinde *L.rhamnosus*'dan elde edilen BS çözeltisinin viskozite değeri 0. Saniye'de 36 mPa.s iken YC-380'den elde edilen BS çözeltisinin 0. Saniye'de viskozite değeri 22 mPa.s bulunmuştur. İki grafikte'de BS çözeltilerinin seyreltilmesi ile viskozite değerlerinde lineer bir düşüş gözlenmiştir, başlangıca göre 3. dakikada bir azalış olduğu ve viskozitenin 36 mPa.s'den 31,2 mPa.s'a düştüğü belirlenmiştir.

FTIR analizi

L.rhamnosus ve YC-380 bakterisinden elde edilen selüloz örneklerine ait FTIR bantları birbirine benzemekle birlikte, 2900 ve 1625 cm^{-1} de mevcut bantların şiddetlerinde farklılık gözlenmiştir. YC-380 kültürü örneğinde 1561 cm^{-1} de görülen bandın *L.rhamnosus* örneğine göre zayıf olması konjuge dien yapısının ve aromatik yapıların (glikoz halkası) daha düşük oranda olduğunu göstermektedir. 2900 cm^{-1} de alifatik C-H'lere ait bandın *L.rhamnosus*'dan elde edilen selülozda daha şiddetli olduğu saptanmıştır. Bu pikin şiddetinin fazla olması alifatik karbon gruplarının (-CH₂-) daha fazla bulunduğunun göstergesidir.

Mikrokristalli selüloz ve bambu lifleri ile yapılan bir çalışmada (Wang vd., 2007), H bağlı OH grupları 3340-3412 cm^{-1} dalga boyunda görülmekte ve tez çalışmasında ise daha geniş bant aralığı görülmüş ve C-H gerilimi ise tez

çalışmasına benzer şekilde 2968-2900 cm⁻¹ arasında gerçekleştiği görülmüştür. Diğer bir çalışmada ise 1630 cm⁻¹ bandının suyun absorblanması ile ilgili olduğu ortaya konmuştur (Sun vd., 2008).

Termal özellikler

L.rhamnosus ve YC-380 kültürünün ürettiği selülozların termal bozunma davranışları incelenmiş ve bozunma sıcaklıkları belirlenmiştir. Her iki numune de iki bozunma sıcaklığı göstermiştir. İlk bozunma sıcaklıkları 290°C'de gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta dekarboksilasyon ve demetoksilasyon yoluyla CO, CO₂, H₂O, CH₄, CH₃OH gibi basit yapılar uzaklaşmaktadır. İkinci bozunma 780°C'de gözlenmiştir. Bu basamak da muhtemelen daha yavaş bir şekilde aromatik bileşenler ayrılmaktadır. Bu basamağın aromatik yapıların fazla olduğu düşünülen *L.rhamnosus* örneğinde şiddetli olması FTIR analiz sonuçlarını destekler nitelik taşımaktadır. Bu sonuç, üretilen bakteriyel selüloz örnekleri arasında farklılıkların bulunabileceğini göstermektedir.

Çiftçi vd. (2015), Nanokil katkılı PVA/Kitosan nanoliflerin sentezi ile ilgili yaptıkları çalışmada 25°C- 900°C sıcaklık aralığında elde edilen sıcaklığa bağlı % kütle değişim grafiğinde bizim çalışmamızda olduğu gibi 2 adımda bozunma görülmektedir. Çiftçi vd. (2015), ilk aşamada yapıdan %10'luk kütle kaybının nem kaybından kaynaklandığı ve yaklaşık 210-500 aralığında gerçekleşen %75'lik kütle kaybının ise yapının zincirlerinde meydana gelen bozunmadan kaynaklandığı düşünülmüşlerdir. Karaçay vd, (2012) ilk aşamada meydana gelen kütle kaybının su kaybı olduğunu, ikinci aşamadaki kaybın ise pirojenik ayrışma ve moleküler zincirlerinin ablasyonuna karşılık geldiğini düşünmüştür.

Çözünürlük testi

L.rhamnosus ve YC-380'in ürettiği BS örneklerinin çözünürlük testleri için toluene, aseton, kloroform, benzen, karbon tetraklorür ve dimetilformamit çözücüleri kullanılmıştır. Çözünürlük testi sonucunda, iki bakterinin de ürettiği selüloz'un 80°C su banyosunda sadece toluen çözücüsünde çözüldüğü

belirlenmiştir. Çakmakçı vd. (2008), asetik asit bakterileri ile yaptıkları mikrobiyel selüloz üretim çalışmasında bu çalışmadaki benzer çözücülerini kullanmış ürettikleri selüloz bu çalışmada olduğu gibi toluende çözülmüştür.

Fe-SEM analizi

L.rhamnosus bakterisine ait Fe-SEM elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde selülozun liflerinin tubuler bir ağ yapısı oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu görüntülerdeki selüloz lifler, kimyasal ve fiziksel özelliklerin saptanmasıyla pekiştirilmiştir. Bunlar arasında FTIR pikleri, çeşitli çözenlerdeki çözünürlük özellikleri sayılabilir.

5.3. *L.rhamnosus* BS üretiminin Taguchi Metodu ile Optimizasyonu

Taguchi metodu sonuçları pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür ve inkübasyon süresi parametreleri'nin BS üretiminde önemli olduğunu göstermiştir. FTIR spektroskopisi ve SEM görüntüleri BS üretiminin gerçekleştiğini desteklemektedir.

Deney sonuçlarının pH, organik kaynak konsantrasyonu, aktif kültür ve inkübasyon süresi parametreleri kullanılarak oluşturulan taguchi analizi sonucunda BS üretim miktarını en çok etkileyen parametrenin organik kaynak konsantrasyonu olduğu tesbit edilmiştir. Gerçek deneylerle elde edilen BS üretim miktarı sonuçlarını taguchi analizi ile elde edilen tahmini deney sonuçları desteklemektedir. En yüksek BS üretimi %50 organik kaynak konsantrasyonu, %10 aktif kültür, 12 gün inkübasyon süresi ve pH 6 besiyeri ortamında 5,41 g bulunmuştur, bu değer gerçek deneyler sonucunda elde edilmiş olup taguchi metoduna göre oluşturulan tahmini deney değeri ile aynıdır. Ayrıca tahmin verilerinin R² analiz sonucu 0,9919 doğruluk oranı verdiği için sonuçlar doğru kabul edilir.

En düşük BS üretimi %25 organik kaynak konsantrasyonu, %30 aktif kültür, 8 gün inkübasyon süresi ve pH 5.5 besiyeri ortamında -2,00 g bulunmuştur.

Taguchi analizi ile elde edilen tahmini deney sonuçlarına göre organik kaynak konsantrasyon, aktif kültür, ve inkübasyon süresi sabit tutulduğunda pH 5.0'da BS üretim miktarı 0,15 g iken pH 5.5'de 2,03 g olarak bulunmuştur, pH değerindeki artış BS üretim miktarını olumlu yönde etkilemiştir.

Taguchi analizi ile elde edilen tahmini deney sonuçlarına göre pH, aktif kültür ve inkübasyon süresi sabit tutulduğunda organik kaynak konsantrasyonu %50'de BS üretim miktarı 3,94 g, organik kaynak konsantrasyonu %25 olduğunda ise BS üretim miktarı 0,96 g olarak bulunmuştur organik kaynak konsantrasyonundaki azalma BS üretim miktarını olumsuz yönde etkilemiştir.

L.rhamnosus bakterisi tarafından üretimi gerçekleştirilen BS çevre dostu gras bir bakteri tarafından üretildiği için ambalaj materyali olarak gıda sanayide medikal sektöründe, yara tedavisi, ilaç kaplama, damar üretimi vb., alanlarda kullanılabilme potansiyeli ortaya konmuştur. Tez çalışması sonucunda elde edilen BS'un hidrojel yapısı ve su tutma kapasitesinin yüksek olması vb., özelliklerinden yararlanarak, medikal ve gıda sanayinde kullanılmak üzere farklı polimerle fonksiyon kazandırılmış nanolif, nanokarbon üretimi daha sonraki yapılacak çalışmalar arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

- Atalla RH, Vanderhart DL. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*. 1984;223:283–285.
- Astley Om., Chanliaud E., Donald Am., Gidley Mj., Structure Of Acetobacter Cellulose Composites In The Hydrated State, *International Journal Of Biological Macromolecules*, 29, 193–202, (2001).
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. And Kalinowska, H. 2000. Bacterial Cellulose. In: Steinbuchel A (Ed), *Biopolymers: Polysaccharides I*, Vol.7, Pp. 37-90. Wiley- Vch Verlag Gmbh, Munster, Germany.
- Bielecki, S., Krystynowics, A., Turkiewics, M. And Kalinowska, H. 2001. Bacterial Cellulose. In Steinbuchel A (Ed), *Biopolymers: Vol. 7. Polysaccharides I*. Wiley-Vch Verlag Gmbh, Munster, Germany, 37-90.
- Bielecki S., Krystynowicz, A., Turkiewicz M., Kalinowska H., Bacterial Cellulose, In: *Biopolymers*, Ed: Steinbüchel A., Marchessault Rh., Vol. 5, Wiley-Vch, Weinheim, 2004.
- Bielecki1, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. And Kalinowska, H., Bacterial Cellulose, 40-46.
- Bielecki1 2006. [w3.rpi.edu/dept/chem-eng/biotech environ/cellulose/axylin.html](http://w3.rpi.edu/dept/chem-eng/biotech%20envirron/cellulose/axylin.html)
- Bohn A., Fink Hp., Ganster J., Pinnow M., X-Ray Texture Investigations Of Bacterial Cellulose, *Macromolecular Chemistry And Physics*, 201, 1913–1921, (2000).
- Branda Ss., Vik Å., Friedman L., Kolter R., Biofilms: The Matrix Revisited, *Trends In Microbiology*, 13(1), 20-26, (2005).
- Brinchi L, Cotana F, Fortunati E, Kenny JM. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications. *Carbohydr Polym*. 2013;94:154–169.
- Brown Jr. Rm., Cellulose Structure And Biosynthesis, *Pure Applied Chemistry*, 71(5), 767- 775, (1999).
- Brown, M.R., 2003. www.otc.utexas.edu/events/oct2003/brown.pdf
- Brown, M.R., 2004. washingtontimes.com/upi.breaking/20040402-105340-9744r.html
- Brown,M.R., 2006. w3.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown.html

- Buraeu Te., Brown Jr. Rm., In Vitro Synthesis Of Cellulose Ii From A Cytoplasmic Membrane Fraction Of Acetobacter Xylinum, Proceedings Of The National Academy Of The Sciences Of The United States Of America, 84, 6985-6989, (1987).
- Camilli A., Bassler Bl., Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways, Science, 311, 1113- 1116, (2006).
- Chao, Y., Sugano, Y. And Shoda, M., 2001. Bacterial Cellulose Poduction Under Oxygen-Enriched Air At Different Fructose Concentrations İn A 50 Liter, İnternal-Loop Airlift Reactor, Applied Microbial Biotechnology, 55, 673-679.
- Chaplin, M., 2006. www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html
- Chen Hp., Brown Rm., Immunochemical Studies Of The Cellulose Synthase Complex İn Acetobacter Xylinum, Cellulose, 3(2), 63-75, (1996).
- Czaja, W., Romanovics, D. And Brown, R.M. Jr. 2004 Structural İvestigations Of Microbial Cellulose Produced İn Stationary And Agitated Culture. Cellulose 11:403-411, 2004
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. And Brown, M.R., 2006. Microbial Cellulose- The Natural Power To Heal Wounds, Biomaterials, 27, 145-151.
- Çakmakçı M.L., Karahan A.G., Çakır İ., Gündoğdu A., Ekim 2008. Selüloz Üretiminde Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu, Moleküler Tanısı ve Mikrobiyel Selülozun Gıda Sanayinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması Proje No: 1050156
- Çiftci Ş., Özek S., Aksoy S., Aksoy K., Göde F., SDU Journal of Science (E-Journal), 2015, 10 (1): 118-128
- Debzi EM, Chanzy H, Sugiyama J, Tekely P, Excoffier G. The $I\alpha \rightarrow I\beta$ transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums. Macromol. 1991;24:6816-6822
- Delmer Dp., Cellulose Biosynthesis: Exciting Times For A Difficult Field Of Study, Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology, 50, 245-276, (1999).
- El-Saied, H., Basta, A.H. And Gobran R.H. 2004. Research Progress İn Friendly Environmental Technology Fr The Production Of Cellulose Products (Bacterial Cellulose And Its Application). Polymer-Plastic Technology And Engineering, 43: 797-820.
- Frey-Wyssling A. The fine structure of cellulose microfibrils. Science. 1954;119:80-82.

- Geyer, U., Heinze, T., Stei, A., Klenn, D., Marsch, S., Schumann, D. And Schmauder, H., 1994. Formation, Derivatization And Applications Of Bacterial Cellulose, *Int. J. Biol. Macromol*, 16, 343-347.
- Gilles-Gonzalez Ma., Gonzalez G., Signal Transduction By Heme-Containing Pasdomain Proteins, *Journal Of Applied Physiology*, 96, 774-783, (2004).
- Glaser L., The Synthesis Of Cellulose In Cell-Free Extracts Of *Acetobacter Xylinum*, *The Journal Of Biological Chemistry*, 627-636, (1957).
- Gökçe G, Tağgetiren S., Kalite İçin Deney Tasarımı Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi” .Cilt:6, No:1 (71-83), 2009.
- Güral, G., Gaz Kaynağında Proses Parametrelerinin Optimizasyonu, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Eylül, İzmir, 2003.
- Hagler Ch., Weimer Pj., Biosynthesis And Biodegradation Of Cellulose, Marcel Dekker, New York, Ny. (1991).
- Y. Hu, J.M. Catchmark, E.A. Vogler
Factors Impacting the formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and Their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth Biomacromolecules, 14 (10) (2013), pp. 3444-3452
- Iguchi, M., Mitsuhashi, S. And Ichimura, K. 1988. Bacterial Cellulose-Containing Molding Material Having High Dynamic Strength. Us Patent 4,742,164.
- Ishikawa A., Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Breeding Of A 5-Fluorouridineresistant Mutant With Increased Cellulose Production From *Acetobacter Xylinum* Subsp. Nonacetoxidans, *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 62(7), 1388-1391, (1998).
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. And Tisler, V. 2002. Utilization Of D-Xylose As Carbon Source For Production Of Bacterial Cellulose. *Enzyme And Microbial Technology* 31 (2002) 986-991.
- Jonas R., Farah Lf., Production And Application Of Microbial Cellulose, *Polymer Degradation And Stability*, 59, 101-106, (1998).
- Johnson, D.C. And Neogi, A.N. 1989. Sheeted Products Formed From Reticulated Microbial Cellulose. Us Patent, 4863565.
- Kağncıoğlu, C.H., Üretim Öncesi Kalite Kontrolünde Taguchi Yöntemi Ve Kükürtdioksit Giderici Sitrata Yöntemine Uygulanması, Anadolu Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Öğretim Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 216s., 1998.

- Keshk, S.M.A.S. And Sameshima, K., 2005. Evaluation Of Different Carbon Sources For The Bacterial Cellulose Production, *African Journal Of Biotechnology*, 4, 478-482.
- Khan T., Park Jk., Kwon Jh., Functional Biopolymers Produced By Biochemical Technology Considering Applications In Food Engineering, *Korean Journal Of Chemical Engineering*, 24(5), 816-826, (2007).
- Klemm, D., Schumann D., Ulrike U. And Marsch S. 2001. Bacterial Synthesized Cellulose-Artificial Blood Vessels For Microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1561-1603.
- Kouda, T., Yano, H. And Yoshinaga, F. 1997. Effect Of Agitator On Bacterial Cellulose Productivity In Aerated And Agitated Culture. *Journal Of Fermentation And Bioengineering Vol. 83, No. 4*, 371-376.
- Krystynowicz, A., Czaja, W. And Bielecki, S. 1999. Biosynthesis And Application Of Bacterial Cellulose. *Zywnosc.*, 3:22-33.
- Krystynowics, A., Czaja, W., Wiktorowska- Jezierska, A., Gonçaves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M. And Bielecki, S. 2002. Factors Affecting The Yielde And Proporties Of Bacterial Cellulose. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 29, 189-195.
- Laszkiewicz B., Solubility Of Bacterial Cellulose And Its Structural Properties. *Journal Of Applied Polymeric Science*, 67, 1871-1876, (1998).
- Lee Vt., Matewish J M., Kessler Jl., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S., A Cyclic-Di-Gmp Receptor Required For Bacterial Exopolysaccharide Production, *Molecular Microbiology*, 65(6), 1474-1484, (2007).
- Lin Fc., Brown Jr. Rm., Cooper Jb., Demler Dp., Synthesis Of Fibrils In Vitro By Solubilized Cellulose Synthase From *Acetobacter Xylinum*, *Science*, 230, 822-825, (1985).
- Maguire, A., 1997. Bacterial Cellulose Based Medical Devices, Master Of Engineering Science, The University Of Western Ontario, London.
- Masuda K., Adachi M., Hirai A., Yamamoto H., Kaji H., Horii F., Solid-State ¹³C And ¹H Spin Diffusion Nmr Analyses Of The Microfibril Structure For Bacterial Cellulose, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 23, 198-212, (2003).
- Mazeau K, Heux L. Molecular dynamics simulations of bulk native crystalline and amorphous structures cellulose. *J Phys Chem B.* 2003;107:2394-2404.
- Okamoto Y., Kawashima M., Yamamoto K., Hatada K., Chromatographic Resolution .6. Useful Chiral Packing Materials For High-Performance Liquid-Chromatographic Resolution -Cellulose Triacetate And

- Tribenzoate Coated On Macroporous Silica-Gel, *Chemistry Letters*, 5, 739-742. (1984).
- Peterlin A. Ingram P. Morphology of secondary wall fibrils in cotton. *Textile Res J.* 1970;40:345-354.
- Ranjit, K.R., *A Primer On The Taguchi Method*: Van Nostrand Reinhold, 1990.
- Ross P., Mayer R., Benziman M., *Cellulose Biosynthesis And Function In Bacteria*, *Microbiological Reviews*, 55(1), 35-58, (1991).
- Ross, W., Sykes, S., *Optimization Of A Hot-Stamping Process*, American Supplier Institute Inc., Michigan, 1989.
- Shah, J. And Brown, M.R., 2005. Towards Electronic Paper Displays Made From Microbial Cellulose, *Applied Microbial Biotechnology*, 66, 352-355.
- SAXENA IM, Brown RM Jr., Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW, *Cellulose*, 4, 33-49, (1997).
- Saxena Im., Brown Rm Jr., *Cellulose Synthases And Related Enzymes*, *Current Opinion In Plant Biology*, 3, 523-531, (2000).
- Saxena Im., Brown Rm Jr., *Cellulose Biosynthesis: Current Views And Evolving Concepts*, *Annals Of Botany*, 96, 9-21, (2005).
- Skollek Sj, Hertel C, Hammes Wp., *Cultivation And Preservation Of Vinegar Bacteria*. *Journal Of Biotechnology*, 60, 195-206, (1998).
- Son, H.-J., Heo, M.S., Kim, Y-G. And Lee, S.-J. 2001. Optimization Of Fermentation Conditions For The Production Of Bacterial Cellulose By A Newly Isolated *Acetobacter Sp. A9* In Shaking Cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2001) 33, 1-5. (Printed In Great Britain).
- Son, H.J., Kim, H.G., Kim, K.K., Kim, H.S., Kim, Y.G. And Lee, S.J., 2003. Increased Production Of Bacterial Cellulose By *Acetobacter Sp. V6* In Synthetic Media Under Shaking Culture Conditions, *Bioresource Technology*, 86, 215- 219.
- Strobin G., Wlochowicz A., Ciechanska D., Boryniec S., Struszczyk H., Sobczak S., *Gpc Studies On Bacterial Cellulose*, *International Journal Of Polymeric Materials*, 53, 889-900, (2004).
- Sun Y., Lin L., Deng H., Li J., He B., Sun R., Ouyang P., *Structural Changes Of Bamboos Cellulose In Formic Acid*, *Bioresources* 3(2), 297-315, (2008).
- Sutherland Iw., *Microbial Polysaccharides From Gram-Negative Bacteria*, *International Dairy Journal*, 11, 663-674, (2001).

- Tal R., Wong Hc., Calhoon R., Gelfand D., Fear Al., Volman G., Mayer R., Ross P., Amikam D., Weinhouse H., Cohen A., Sapir S., Ohana P., Benziman M., Three Cdg Operons Control Cellular Turnover Of Cyclic Di-Gmp In Acetobacter Xylinum: Genetic Organization And Occurrence Of Conserved Domains In Isoenzymes, *Journal Of Bacteriology*, 180(17), 4416- 4425, (1998).
- Tsuchida, T. And Yoshinaga, F. 1997. Production Of Bacterial Cellulose By Agitation Culture Systems. *Pure & Appl.*, Vol. 69, No. 11, Pp. 2453-2458, 1997
- Wang L., Han G., Zhang Y., Comparative Study Of Composition, Structure And Properties Of Apocynum Venetum Fibers Under Different Pretreatments, *Carbohydrate Polymers*, 69, 391-397, (2007).
- Watanabe K., Tabuchi M., Ishikawa A., Takemura H., Tsuchida T., Morinaga Y., Yoshinaga F., Acetobacter Xylinum Mutant With High Cellulose Productivity And An Ordered Structure, *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 62(7), 1290-1292, (1998).
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. And Yoshinaga, F. 1998. Structural Features And Properties Of Bacterial Cellulose Produced In Agitated Culture. *Cellulose* (1998) 5, 187-200.
- Yamanaka, S., Watanabe, K. And Suzuki, Y. 1990. Hollow Microbial Cellulose, Process For Preparation Thereof, And Artificial Blood Vessel Formed Of Said Cellulose. European Patent 0396344a2.
- Young, Y.K., Park, S.H., Hwang, J.W., Pyun, Y.R. And Kim, Y.S. 1998. Cellulose Production By Acetobacter Brc5 Under Agitated Condition. *Journal Of Fermentation And Bioengineering* Vol. 85, No. 3, 312-317.
- Zaar K., Visualization Of Pores (Export Sites) Correlated With Cellulose Production In The Envelope Of The Gram-Negative Bacterium Acetobacter Xylinum, *Journal Of Cell Biology*, 80, 773-777, (1979).
- Zhu, L., July 2005. Parallel Logic Simulation of Million-Gate VLSI Circuits Final Thesis www.rpi.edu/~weberd/final%20thesis.doc

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cansu GÜRSOY
Doğum Yeri ve Yılı : Şişli, 1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : cansu_gursoyy@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Erenköy Kız Lisesi, 2010
Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2014