

**MİKROBİYAL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ÜRETİM
KOŞULLARININ ARAŞTIRILMASI**

**PRODUCTION OF MICROBIAL CELLULOSE AND
INVESTIGATION OF PRODUCTION CONDITIONS**

CANSU SEVİM

PROF. DR IŞIL SEYİS BİLKAY

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Anneme,

ÖZET

MİKROBİYAL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ÜRETİM KOŞULLARININ ARAŞTIRILMASI

Cansu SEVİM

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Nisan 2021, 110 sayfa

Bu çalışmada, ev yapımı sirkelerden izole edilen selüloz üreten mikroorganizmaların tanımlanması ve bu mikroorganizmalar ile bitki çayları kullanılarak, düşük maliyetli mikrobiyal selüloz üretimi, mikrobiyal selüloz üretimine etki eden faktörlerin araştırılması ve selülozun özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Sirke örneklerinden izole edilen mikroorganizmalardan, selüloz üretim miktarı en yüksek olan bakteri ve mayanın belirli oranlarda bir araya getirilmesiyle karışık kültürler oluşturuldu. Elde edilen kültürlerin mikrobiyal selüloz üretim miktarları karşılaştırıldı. Mikrobiyal selüloz üretimindeki en etkili kültürün *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesi ile hazırlanan karışık kültür olduğu belirlendi. Hazırlanan bu kültür ile üç farklı bitki çayı (siyah çay, yeşil çay ve hibiskus çayı) üretim ortamı olarak kullanılarak, mikrobiyal selüloz üretim miktarları karşılaştırıldı. Bu bağlamda; mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif üretim ortamı olarak en etkili bitki çayının %10 oranındaki yeşil çay olduğu belirlendi. Farklı karbon kaynaklarındaki (glukoz, sukroz, laktoz, maltoz ve fruktoz)

mikrobiyal selüloz üretim miktarları karşılaştırılarak, en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin yeşil çay besiyerinde %10 glukoz ile gerçekleştiği belirlendi. Yeşil çay ve glukoz ile hazırlanan temel besiyerine üretimin artırılması amacıyla ilave azot kaynakları eklendiğinde, mikrobiyal selüloz üretiminde önemli oranda bir artış saptanmadı.

Mikrobiyal selüloz üretimine etki eden uygun fizyolojik koşulların belirlenmesi ve üretimin artırılması amacıyla farklı pH, ekim oranı, sıcaklık, çalkalama hızları ve farklı inkübasyon sürelerinde mikrobiyal selüloz üretimi araştırıldı. %10 yeşil çay ve %10 glukoz ile hazırlanan besiyerinde, mikrobiyal selüloz üretimi için en uygun fizyolojik koşulların; pH 5, %20 kültür konsantrasyonu, statik koşul, 30°C ve 168 saatlik inkübasyon olduğu belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda, Hestrin & Schramm besiyerinde elde edilen mikrobiyal selüloz miktarının yeşil çay besiyerinde 14,7 g/L'den 43,75 g/L'ye yükseldiği belirlendi. Işık faktörünün üretim üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla karanlık ve aydınlık ortamlarda üretim gerçekleştirildi ve ışığın mikrobiyal selüloz üretiminde bir etkisinin olmadığı belirlendi. Bunlara ek olarak, üretimin artırılması amacıyla besiyerine askorbik asit ve bitkisel yağlar ilave edildi. Selüloz üretim miktarının, besiyerine %1 v/v oranı ile eklenen %1 askorbik asit ile %2,4 artarak 44,8 g/L'ye ulaştığı belirlenirken, besiyerine ilave edilen %2 zeytinyağı ile üretimin %3,5 artarak 45,35 g/L olduğu belirlendi. Aynı zamanda zeytinyağı, ayçiçek yağı ve hindistancevizi yağının %2,5 konsantrasyona kadar mikrobiyal selüloz üretimini arttırdığı saptandı. Çalışmada kullanılan ve atık durumuna geçen yeşil çay aynı üretim ortamında tekrar kullanımı ile yüksek miktarda mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirildi ve düşük maliyetli yeşil çayın mikrobiyal selüloz üretiminde 10 kez üst üste kullanılabilirliği gösterildi. Çalışmamızda üretilen selüloz SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüsü ve FTIR (Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi), TGA (Termogravimetrik Analiz), analizleri ile karakterize edildi. Çalışma sonunda ev yapımı sirkelerden izole edilen mikroorganizmalar ile oluşturulan karışık kültür ile yeşil çay ortamında mikrobiyal selüloz üretiminin düşük maliyet ile sağlanabildiği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal Selüloz, *Komagataeibacter europaeus*, Biyopolimer, Sirke, Yeşil çay

ABSTRACT

PRODUCTION OF MICROBIAL CELLULOSE AND INVESTIGATION OF PRODUCTION CONDITIONS

Cansu SEVİM

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKEY

April 2021, 110 pages

The aim of this study is to identify cellulose producing microorganisms isolated from homemade vinegars and to investigate the production of low cost microbial cellulose using these microorganisms and herbal teas, factors affecting microbial cellulose production and properties of cellulose. For this reason, bacteria with the highest cellulose production and yeast were selected from the isolates and mixed cultures were prepared by combining them in certain proportions. The microbial cellulose productions of these cultures were compared. It was determined that the most effective culture for microbial cellulose production was the mixed culture prepared by combining *Komagataeibacter europaeus* and *Zygosaccharomyces parabailii* in a 2:1 ratio. Microbial cellulose productions were compared using this culture and three different herbal teas (black tea, green tea and hibiscus tea) as production medium. Accordingly; It was determined that the most effective herbal tea as an alternative production medium for microbial cellulose production was 10% green tea. By comparing the microbial cellulose productions of different carbon sources (glucose, sucrose, lactose, maltose and fructose), it was determined that the highest microbial cellulose production occurred with 10% glucose in

green tea medium. When additional nitrogen sources were added to the basic medium prepared with green tea and glucose to increase production, there was no significant increase in microbial cellulose production.

In order to determine the appropriate physiological conditions affecting the microbial cellulose production and to increase the production, microbial cellulose production was carried out at different pH, inoculum ratio, temperature, agitation rates and different incubation times. In the medium prepared with 10% green tea and 10% glucose, it was determined that the optimum physiological conditions for microbial cellulose production were achieved at; medium with pH 5, inoculation ratio of 20% and incubation under static conditions with an incubation period of 168 hours at 30°C. As a result of the study, it was determined that the amount of microbial cellulose obtained in Hestrin & Schramm medium increased from 14.7 g/L to 43.75 g/L in green tea medium.

In order to determine the effect of light on the production, production was carried out in dark and lighted conditions and it was determined that light had no effect on microbial cellulose production. Also in addition to these, ascorbic acid and vegetable oils were added to the medium in order to increase the production. It was determined that the cellulose production amount increased by 2.4% with 1% ascorbic acid added to the medium with 1% v / v ratio and reached 44.8 g/L, while, it was determined that with 2% olive oil added to the medium, the production increased by 3.5% to 45.35 g/L. It was also found that olive oil, sunflower oil and coconut oil increased microbial cellulose production up to 2.5% concentration. The high amount of microbial cellulose was produced with the reuse of green tea, which was used in the study and became waste, in the same medium again, and it was shown that the low-cost green tea can be used in microbial cellulose production 10 times in a row. Cellulose produced in our study was characterized by SEM (Scanning Electron Microscope) image, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) and TGA (Thermogravimetric Analysis) analyzes. As a result, it was shown that microbial cellulose production can be achieved with low-cost green tea medium using the mixed culture prepared with microorganisms isolated from homemade vinegar.

Keywords: Microbial Cellulose, *Komagataeibacter europaeus*, Biopolymer, Vinegar, Green tea

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgisi ve deneyimiyle yanımda olan, büyük bir sabırla çalışmalarına katkıda bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, sevgisini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e ve tez çalışmalarım süresince yardımları ve bilgisi ile bana destek olan Dr. Öğretim Üyesi Neslihan İDİL'e,

Lisans ve yüksek lisans öğrenimimin yanı sıra, tez çalışmam boyunca bilgi, tecrübe ve manevi destekleri ile her an yanımda olan, düştüğümde elimden tutup kaldıran, beni kardeşinden ayırmayan çok kıymetli hocam Dr. Nermin Hande AVCIOĞLU'na,

Yüksek lisansa başladığımdan beri kendimi bir aile ortamında hissetmemi sağlayan, Biyoteknoloji Anabilim Dalı üyeleri, değerli hocalarım, Dr. Sezen BİLEN ÖZYÜREK, Dr. Gülcan ŞAHAL ÖZBAKIR, Dr. Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ, Dr. Sinem DİKEN GÜR ve Dr. Doruk ARACAGÖK'e,

Varlıkları, gülen yüzleri ve manevi destekleriyle her an yanımda olan, sevincimi ve üzüntümü paylaştığım, her koşulda yanımda olan çalışma arkadaşlarım; Özgecan ERDEM, Hasan AKYIL, Kübra ERKAN TÜRKMEN, Meriç BİRBEN, Melike SAYIN, Tuğçe ERDOĞAN ve Kaan SOYUER'e,

Tanıştığımız günden beri güler yüzü, sonsuz sevgisi ve anlayışıyla yanımda olan, karşılaştığım her zorlukta yardımına koşan, güzel kalpli candostlarım Ekin, Gözde, Alara, Yasemin, Nihle, Altuğ, Melis ve Didem'e,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni bir an bile yalnız bırakmayan, karşılaştığım her zorlukta destekleriyle her daim yanımda olan, bana güç veren, güçlü olmayı, karşıma çıkan her zorlukta ayakta durmamı sağlayan canım annem Selma SEVİM'e

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sirke.....	4
2.1.1. Sirke Üretiminde Görev Alan Mikroorganizmalar	4
2.2. Selüloz.....	8
2.2.1. Mikrobiyal Selüloz.....	9
2.2.2. Mikrobiyal Selüloz Üreten Bakteriler	12
2.2.3. Mikrobiyal Selüloz Sentezi	14
2.2.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi	16
2.2.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimini Etkileyen Faktörler	21
2.2.6. Mikrobiyal Selülozun Kullanım Alanları.....	22
2.3. Yeşil Çay.....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Sirke Örnekleri	32
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	32
3.2.1. HS ve HSA Besiyeri (Hestrin-Schramm, Hestrin-Schramm Agar)	32
3.2.2. GYCA Besiyeri (Glukoz, Maya özütü ve Kalsiyum Agar)	33
3.2.3. Yamanaka Besiyeri	33
3.2.4. Frateur Besiyeri	34
3.2.5. Malt Özütü Agar.....	34
3.3. Çeşitli Sirkelerden Mikroorganizmaların İzolasyonu	35

3.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimini Belirlenmesi	35
3.5. Sirkeden İzole Edilen Mikroorganizmaların Selüloz Üretimlerinin Araştırılması.....	36
3.6. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Belirlenmesi	36
3.7. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Tanımlanması.....	37
3.7.1. Mikroorganizmaların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.7.2. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	38
3.7.3. Mikroorganizmaların Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması	40
3.8. Mikrobiyal Selüloz Üretimini Araştırılması	43
3.8.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim	43
3.8.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Alternatif Üretim Ortamlarının Araştırılması	43
3.8.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Çay Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	44
3.8.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon ve İlave Azot Kaynağının Belirlenmesi.....	44
3.9. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması	46
3.9.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	46
3.9.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi.....	46
3.9.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi	47
3.9.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı Çalkalama Hızlarının Etkisinin Belirlenmesi.....	47
3.9.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	47
3.10. Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etki Eden Diğer Faktörlerin Belirlenmesi	48
3.10.1. Üretim Ortamına Eklenen Çeşitli Maddelerin Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkilerinin Araştırılması	48
3.10.2. Işığın Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	48
3.11. Yeşil Çayın Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	48
3.12. Mikrobiyal Selülozün Yıkınması ve Kurutulması	49

3.13. Mikrobiyal Selülozun Karakterizasyonu.....	49
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	50
4.1. Çeşitli Sirkelerden Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	50
4.2. Sirkeden İzole Edilen Mikroorganizmaların Selüloz Üretimlerinin Araştırılması	51
4.3. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Belirlenmesi.....	52
4.4. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Tanımlanması	54
4.4.1. Mikroorganizmaların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	55
4.4.2. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	58
4.4.3. Mikroorganizmaların Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması	59
4.5. Mikrobiyal Selüloz Üretiminin Araştırılması	59
4.5.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim.....	59
4.5.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Alternatif Üretim Ortamlarının Belirlenmesi	60
4.5.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Çay Konsantrasyonunun Belirlenmesi	63
4.5.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon ve İlave Azot Kaynağının Belirlenmesi	65
4.6. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması.....	71
4.6.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun pH Değerinin Belirlenmesi	71
4.6.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi	73
4.6.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi	75
4.6.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı Çalkalama Hızlarının Araştırılması	77
4.6.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması.....	78
4.7. Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etki Eden Diğer Faktörlerin Belirlenmesi	80
4.7.1. Işığın Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkisi	80
4.7.2. Üretim Ortamına Eklenen Çeşitli Maddelerin Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkilerinin Araştırılması.....	80
4.8. Yeşil Çayın Tekrar Kullanılabilirliğinin Araştırılması	84

4.9. Mikrobiyal Selülozun Karakterizasyonu	87
5. YORUM.....	91
6. KAYNAKLAR	97
EKLER.....	109
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	109
ÖZGEÇMİŞ	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitki hücresindeki selülozun mikro yapısı.....	8
Şekil 2.2. Selüloz I'in yapısı	11
Şekil 2.3. Selüloz II'nin yapısı	11
Şekil 2.4. Glukoz ve Fruktozdan mikrobiyal selüloz biyosentezinin şematik gösterimi.	15
Şekil 2.5. Bakteri hücresinde selüloz biyosentezinin şematik gösterimi	16
Şekil 2.6. Selüloz üretiminde statik kültür yönetiminin şematik gösterimi	17
Şekil 2.7. Statik kültür yöntemi ile elde edilen mikrobiyal selüloz.	17
Şekil 2.8. Selüloz üretiminde çalkalamalı kültür yönteminin şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.9. Selüloz üretiminde dönen disk reaktörü kullanımının şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.10. Selüloz üretiminde Hava kaldırmalı reaktörün şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.11. Mikrobiyal selülozun dış implantı tedavisinde kullanılması	23
Şekil 2.12. Mikrobiyal selülozun yara tedavisinde yapay deri olarak kullanımı.	24
Şekil 2.13. Mikrobiyal selülozun yapay kan damarı olarak kullanılması.	25
Şekil 2.14. Nata de coco olarak satışı sunulan mikrobiyal selüloz	25
Şekil 2.15. Nata de coco üretimi.	26
Şekil 2.16. Mikrobiyal selüloz üreticisi bakteriler ile çay ve şekerin fermente edilmesiyle üretilen kombu çayı.	27
Şekil 2.17. Mikrobiyal selülozun kağıt olarak kullanılması.....	27
Şekil 2.18. Mikrobiyal selülozun gıda ambalajı olarak kullanılması	28
Şekil 2.19. Mikrobiyal selülozun tekstil uygulamalarındaki kullanımı	29
Şekil 2.20. Mikrobiyal selülozdan elde edilen elektronik kâğıt örneği.....	30
Şekil 3.1. İndol oluşum mekanizması	39
Şekil 4.1. Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin HS besiyerinde mikrobiyal selüloz üretimleri	52
Şekil 4.2. Karışık kültürlerin HS besiyerinde selüloz üretimlerinin belirlenmesi	54
Şekil 4.3. Sirkeden izole edilen CB1 kodlu bakterinin HSA ve GYCA besiyerindeki makroskobik görüntüsü.	55
Şekil 4.4. Sirkeden izole edilen CB1 kodlu bakterinin Frateur besiyerindeki makroskobik görüntüsü.....	56

Şekil 4.5. Sirkeden izole edilen CM1 kodlu mayanın HSA ve Malt Özütü Agar (MEA) besiyerindeki görüntüsü	56
Şekil 4.6. Sirkeden izole edilen CM1 kodlu mayanın GYCA besiyerindeki görüntüsü	57
Şekil 4.7. Sirkeden izole edilen mikroorganizmaların boyama sonucunda elde edilen mikroskopik görüntüleri	58
Şekil 4.8. Farklı üretim ortamlarında mikrobiyal selüloz üretiminin belirlenmesi.	61
Şekil 4.9. Farklı Yeşil çay konsantrasyonlarında mikrobiyal selüloz üretimlerinin belirlenmesi.....	64
Şekil 4.10. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun karbon kaynağının belirlenmesi.....	66
Şekil 4.11. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi	68
Şekil 4.12. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun ilave azot kaynağının ve konsantrasyonunun belirlenmesi.....	70
Şekil 4.13. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun başlangıç pH değerinin belirlenmesi.	72
Şekil 4.14. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun ekim oranının belirlenmesi.	74
Şekil 4.15. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.	76
Şekil 4.16. Çalkalamalı kültür yöntemi ile elde edilen mikrobiyal selüloz.....	77
Şekil 4.17. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi..	79
Şekil 4.18. Askorbik asitin mikrobiyal selüloz üretimine etkisi.....	81
Şekil 4.19. Bitkisel yağların mikrobiyal selüloz üretimine etkisi.....	83
Şekil 4.20. Yeşil çay dem sayısının mikrobiyal üretimine etkisi.....	85
Şekil 4.21. Mikrobiyal selülozun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (30.0 kx)...	87
Şekil 4.22. Mikrobiyal selülozun Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	88
Şekil 4.23. Mikrobiyal selülozun TGA analizi	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Mikrobiyal selüloz üreticisi bazı mikroorganizmalar, selülozun yapısı ve selüloz üretiminin hücresel görevi .	13
Çizelge 3.1. Mikrobiyal selüloz üretiminin araştırılması için hazırlanan karışık kültürler	37
Çizelge 4.1. Farklı sirke örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve mikroorganizmalara verilen kodlar.	51
Çizelge 4.2. Tanımlamada kullanılan özellikler	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
®	Tescilli

Kısaltmalar

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HS	Hestrin & Schramm
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
C	Karbon
H	Hidrojen
O	Oksijen
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
nm	Nanometre
g	Gram
mL	Mililitre
L	Litre
g/L	Gram/Litre

1. GİRİŞ

Polimerler gibi sentetik materyallerin kullanımı günlük yaşamın önemli bir parçası haline gelmiş olsa da, petrol türevi olan bu materyallerin tüketimi ekonomiyi ve çevreyi büyük bir ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle günümüzde sürdürülebilir doğal kaynaklardan biyomalzemelerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Dünya genelindeki sürdürülebilir biyokütlenin en önemli grubunu karbonhidratlar oluşturmaktadır ve selüloz ise 10 milyon ton yıllık üretim ile dünyadaki en büyük biyokütle kaynağıdır [1].

Literatüre ilk olarak 1839 yılında Fransız kimyager Anselme Payen'in bitki dokuları üzerindeki çalışmaları sonucunda giren ve kimyasal formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olan selüloz, kaynağı ne olursa olsun dallanmamış yapıdaki β -D-glukopiranoz birimlerinin birbirine (1-4) glikozid bağı ile bağlanan polimer zincirlerinden oluşmaktadır [2]. Selülozun en büyük kaynağı çok yıllık odunsu bitkilerdir ve bitkisel selüloz hemiselüloz ve lignin ile birlikte hücre duvarını meydana getirmektedir [3]. Tekstil, kağıt ve gıda gibi çeşitli endüstrilerde birbirinden farklı malzememe ve uygulamada kullanılan selüloz, yüksek kimyasal direnç, fiziksel dayanıklılık ve termal stabilite göstermesinin yanı sıra biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir [4]. Ancak, günümüzde bitkisel kaynaklı selülozun hem saf halde bulunmaması hem de selüloz eldesi için ormanların ve doğal kaynakların bertaraf edilmesi araştırmacıları alternatif yöntemler ve kaynaklar ile selüloz üretimine zorlamaktadır.

Endüstrinin gelişmesi, doğal kaynakların hızla tükenmesi ve küresel ısınma gibi önemli çevresel problemlerin ortaya çıkması hız kazanmakta, bu nedenle biyoteknolojik yöntemler ve mikroorganizmalar kullanılarak mikrobiyal ürünlerin üretimine olan ilgi artmaktadır. Geçtiğimiz 40 yıldan günümüze kadar ise selülozun mikrobiyal kaynaklardan üretimi önemli bir hal almıştır.

Mikrobiyal üretim, selüloz eldesinde en çok tercih edilen yöntemlerin başında yer almaktadır. Mikrobiyal selüloz literatüre 1886 yılında, sirke fermantasyonunu inceleyen ve besiyeri yüzeyinde asetik asit bakterileri tarafından sentezlenen selülozu "beyaz jelatinimsi zar" olarak tanımlayan Brown tarafından kazandırılmıştır [5]. Sonraki yıllarda ise öncelikli olarak farklı bakteri türleri gelmek üzere, fungus ve farklı alg türlerinin de mikrobiyal selüloz sentezledikleri saptanarak, selüloz üretimi için mikroorganizmaların kullanımı hız kazanmıştır [6].

Mikroorganizmalar tarafından ekstrasellüler olarak sentezlenen bir biyopolimer olan mikrobiyal selüloz, bitkisel kaynaklardan elde edilen selüloz ile aynı moleküler yapıda olmasına rağmen, yapısında hemiselüloz, lignin ve pektin gibi diğer bileşiklerin yer almaması, göstermiş olduğu mekanik direnç, su tutma kapasitesi ve polimerizasyon derecesinin bitkisel selüloza kıyasla daha yüksek olması nedeniyle, yüksek kullanım potansiyeline sahiptir [7]. Günümüzde selülozun kullanıldığı her alanda kendine bir yer bulan mikrobiyal selüloz, bunlara ek olarak yapay kan damarı geliştirilmesinde, kapsül formunda ilaç üretiminde, diş ile doku implantlarında ve çeşitli biyomedikal ürünlerde, kıvam arttırıcı olarak gıda endüstrisinde, adsorbent ve ayırıcı olarak çevre kirliliklerin giderilmesinde, yüz maskesi ve peeling gibi kozmetik ürünlerinde ayrıca elektronik endüstrinde de sıklıkla karşımıza çıkmaktadır [8, 9].

Başta sirke fermantasyonunda görev alan ve başlıca selüloz üreticisi olduğu bilinen asetik asit bakterileri olmak üzere; *Rhizobium*, *Agrobacterium* ve *Sarcina* cinslerine ait bakteriler kullanılarak üretilen mikrobiyal selülozun üretimi laboratuvar ortamında ve çevre koşullarından bağımsız olarak gerçekleştirilmekte ve üretim aşamasında selülozun kullanım alanına göre farklı özellikleri barındıracak şekilde tasarlanmasına ve sonrasında kimyasal yöntemler ile modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır [10, 11]. Ancak mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan sentetik besiyerinin maliyetinin yüksek olması, bitkisel kaynaklı selüloz ile rekabet düzeyini ekonomik olarak engellemektedir. Bu doğrultuda birbirinden farklı pek çok alanda kullanılabilen, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir polimer olan mikrobiyal selülozun, ticari olarak kullanımının yaygınlaşabilmesi için üretim maliyetlerinin en aza indirilmesi gerekmektedir.

Bugüne gelindiğinde, dünyanın farklı yerinden pek çok araştırmacı mikrobiyal selüloz üretimi için düşük maliyetli alternatif üretim ortamı arayışına girmiştir ve bu doğrultuda birçok farklı hammadde ile çeşitli üretim ortamlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Mikrobiyal selüloz üretimini hedef alan çalışmalarda uygun mikroorganizmanın doğru kaynaklardan izole edilmesi ve üretim ortamı olarak düşük maliyetli hammadde seçilmesi ile beraber koşulların optimize edilmesi, üretim oranının arttırılması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Dünya çapında yıllık olarak 6,3 milyar kilogram çay üretilmekte ve 2025 yılına gelindiğinde bu miktarın 7,4 milyar kilografa ulaşacağı tahmin edilmektedir [12]. Genellikle bitkilerin yaprakları kullanılarak elde edilen ve demlenerek kullanılan bitki

çayları, içeriğinde yer alan fenolik bileşikler, aminoasitler, antioksidan maddeler, mineral ve vitaminler nedeniyle içecek olarak tüketilmelerinin yanı sıra, zengin içerikleri ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda da tercih edilmektedir [13, 14]. Bitki çayları tekrar tekrar kullanılabilirliği nedeniyle de ayrıca önem kazanmakta bu sebeple hem atık değerlendirilmesine yönelik çalışmalarda hem de özellikle mikrobiyal selüloz gibi yüksek maliyetli biyomateryallerin üretiminde yadsınamaz bir hammadde kaynağı haline gelmektedir [15–17].

Çalışmamızda, farklı illerden temin edilen ev yapımı sirkelerden mikrobiyal selüloz üreticisi olan ve mikrobiyal selüloz üretimine yardımcı olduğu düşünülen mikroorganizmalar izole edilerek, tanımlandı. Söz konusu bu mikroorganizmaların farklı oranlarda bir araya getirilmesi ile yüksek miktarda mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştiren yeni bir kültür oluşturuldu. Oluşturulan bu kültür ve alternatif bir hammadde olan bitki çayları ile atık bitki çayları üretim ortamı olarak kullanılarak, düşük maliyetli alternatif bir besiyeri geliştirilmesi amaçlandı.

Bu bağlamda çalışmamızın sonucunda, belirli oranlarda bir araya getirilerek hazırlanan karışık kültür ile mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan bitki çayları arasından, üretimin en yüksek olduğu bitki çayı ve çay konsantrasyonu seçilerek (%10 yeşil çay), bu bitki çayı ile çeşitli karbon kaynakları ve karbon kaynağı konsantrasyonları denenip, en uygun karbon kaynağı belirlenerek (%10 glukoz) alternatif bir üretim ortamı geliştirildi. Mikrobiyal selüloz üretiminin fizyolojik koşullardan etkilenmesi nedeniyle pH değeri, sıcaklık, ekim oranı, inkübasyon süresi, çalkalama ve ışık gibi çeşitli parametrelerin optimize edilmesi sağlanarak, düşük maliyet ile kısa sürede mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirildi ve elde edilen mikrobiyal selülozun SEM, FTIR ve TGA ile karakterizasyonu yaptırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirke

Gıda endüstrisinde sıkça kullanılan sirke, meyve, sebze, tahıl ve süt ürünleri gibi karbonhidrat bazlı hammaddelerin mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucunda öncelikle alkole, ardından ise asetik asite dönüştürülmesi ile elde edilen geleneksel bir üründür. Birçok ülkede meyve, sebze ve tahıl ürünleri gibi çeşitli hammaddelerden elde edilen sirkeler günlük yaşamda ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır [18].

Sirke içeriğinde; asetik asit, laktik asit, malik asit ve sitrik asit gibi organik asitler, melonoidler, niasinik asit, vitamin B1, B2 ve B12 gibi vitaminler, fenolik bileşikler, kalsiyum, magnezyum ve çinko başta olmak üzere 21 farklı mineral ve alfa-glukan gibi pek çok biyoaktif bileşen yer almaktadır [19]. Sirke içeriğinde yer alan organik asitler ve fenolik bileşikler sirkeye antikarsinojenik ve antibakteriyel özellik kazandırırken, melanoidler metal iyonlarının redokslanmasını engelleyip, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak, sirkenin antioksidan özelliği göstermesine sebep olurlar [20]. Bu nedenle sirke gıda endüstrisinin yanı sıra geleneksel sağlık uygulamalarında da kullanılmaktadır. Sirke üretiminde görev alan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu ortaya çıkan bu bileşikler, sirkenin sahip olduğu antikarsinojenik, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerin başlıca sebebidir [21].

2.1.1. Sirke Üretiminde Görev Alan Mikroorganizmalar

Geleneksel sirke üretiminde kullanılan başlıca mikroorganizmalar asetik asit bakterileri ve mayalardır. Ancak, sirke üretiminde kullanılan hammaddeye göre bu mikroorganizmaların yanı sıra farklı mikroorganizmaların da sirke oluşumunda görev aldığı belirlenmiştir [21]. Örneğin, hammadde olarak süt ve süt ürünlerinin kullanıldığı sirkelerin florasında laktik asit bakterilerine de rastlanırken, pirinç ve buğday gibi tahılların hammadde olarak tercih edildiği sirkelerde ise küflerin de sirke oluşumunda yer aldığı bilinmektedir [22].

2.1.1.1. Asetik Asit Bakterileri

Karbonhidrat ve alkollerini asetik asit fermantasyonu ile okside ederek asetik asit oluşumuna neden olan asetik asit bakterileri, *Acetobacteriaceae* familyasının üyesidir.

Günümüzde; *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* ve *Tanticharoenia* olmak üzere tanımlanan 19 adet Asetik asit bakterisi cinsi bulunmaktadır [5,6]. Oksijen ihtiyacı yönünden tür bazında farklılık gözlemlense de genellikle zorunlu aerobik özellik gösteren asetik asit bakterileri, Gram negatif, sporsuz ve basil şeklindeki hareketli bakterilerdir. Asetik asit bakterilerinin üreme gösterdikleri sıcaklık değeri 5°C ve 45°C arasında değişirken, üreme gösterdikleri pH değeri ise 3,0-6,5 aralığındadır. Asetik asit bakterilerinin metabolizmalarında son elektron alıcısı oksijen olmasına rağmen, oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu koşullarda hidrojen gibi alternatif elektron alıcıları kullanarak metabolik faaliyetlerini yavaş da olsa sürdürmeye devam edebildikleri bilinmektedir [7,8].

Günümüze kadar tanımlanmış olan 18 adet asetik asit bakterisi cinsi arasından, sirke üretiminde kullanılan ve asetik asit fermantasyonunda görev alan başlıca asetik asit bakterileri; *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Komagataeibacter* cinslerine ait türlerdir [24]. Sirke bakterisi olarak bilinen ve etanol, asetat ve laktik asiti tam olarak okside ederek asetik asit oluşturan *Acetobacter* cinsi ise sirkeden izole edilerek tanımlanan ilk bakteri cinsidir. *Acetobacter* cinsine ait bakteri türlerinin glukozu güçlü bir şekilde fermente edemedikleri bilinmektedir. Sirke üretiminde sıklıkla kullanılan diğer bir bakteri cinsi olan *Gluconobacter* cinsine ait bakteri türleri ise *Acetobacter* cinsine kıyasla, glukozu kullanarak asetik asit fermentasyonu gerçekleştirebilirken, üretim ortamında asetat ve laktik asit bulunması durumunda, bu bileşikler fermantasyon ile okside edemezler. İlk olarak iki farklı alt grupta toplanan ancak sonrasında iki farklı cins oldukları belirlenen *Gluconacetobacter* ve *Komagataeibacter* cinslerinin ise etanolü güçlü bir şekilde okside ederek yüksek asetik asit konsantrasyonuna sahip sirke üretiminde görev aldıkları bilinmektedir [24]. Asetik asit bakterileri gıda endüstrisinde sirke üretimi amacıyla kullanımlarının yanı sıra *Acetomonas* cinsine ait *A. capsulata* türünün pigment ve *Gluconobacter* cinsine ait *G. oxydans* ve *G. japonicus* bakterilerinin ise C vitamini gibi ekonomik değere sahip bileşiklerin üretiminde, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Komagataeibacter* cinslerine ait bazı türleri ise mikrobiyal selüloz gibi önemli polisakkaritlerin üretiminde kullanılmaktadır [9,10].

2.1.1.2. Mayalar

Sirke üretiminde kullanılan başlıca mikroorganizmalardan bir diğeri ise mayalardır. Mayalar, *Ascomycetes* veya *Basidiomycetes* sınıfına ait funguslardır. Ökaryotik ve tek hücreli olan bu mikroorganizmalar, oval/küresel morfolojiye sahip ve hareketsizlerdir. Bakteri hücrelerinden daha büyük olan mayaların, kendilerine özgü üreme koşulları bulunmaktadır [11,12,13]. Genellikle düşük pH değerine sahip ortamlarda üreme gösteren mayalar için optimum pH değeri 4,0 ile 7,0 arasındayken, en uygun sıcaklık değerinin ise 25-37 °C olduğu belirtilmiştir [29]. Fakültatif anaerob olan mayalar, aerobik koşullarda karbonhidratları metabolik faaliyetleri için kullanarak, karbondioksit ve su oluştururken, anaerobik koşullarda ise etil alkol fermantasyonu ile karbonhidratları kullanarak, karbondioksit ve etil alkol oluşumuna neden olurlar [14,15].

Mayalar tarafından fermantasyon sırasında üretilen diğeri bir bileşik ise asetik asittir. Asetik asit üretimi sırasında, sirke ve alkollü içecekler gibi çeşitli gıda ürünlerinin aromalarını zenginleştiren çeşitli alkoller ve esterler de üretilir [29,33]. Ayrıca, üretim ortamındaki diğeri mikroorganizmaların aksine, metabolik faaliyetleri sona erdiğinde otolize uğrayan maya hücrelerinin sahip olduğu proteinler, nükleik asitler ve lipitler, sirke içeriğinde yer alan diğeri mikroorganizmalar için besin kaynağı haline gelir [29].

Sirke içeriğinde bulunan mikroorganizma cinsleri sirke üretiminde kullanılan hammaddeye göre değişkenlik göstermektedir. Meyve sirkesinde en çok bulunan maya türleri *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* cinslerine ait iken balsamik sirke ve bal sirkelerinde *Kluyveromyces* cinsine ait maya türlerine rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra farklı çalışmalarda *Hansenispora*, *Candida* ve *Pichia* cinslerine ait maya türlerinin de sirke florasında yer alabildiği gösterilmiştir. [6,12]

2.1.1.3. Laktik Asit Bakterileri

Hareketsiz ve Gram pozitif özellik gösteren laktik asit bakterileri, *Firmucutes* filumuna ait probiyotik bakterilerdir. Hücresel şekilleri basil veya kok olan laktik asit bakterileri, metabolik faaliyetleri için oksijen kullanmamalarına rağmen fakültatif anaerobiktirler. Laktik asit bakterileri için belirlenen optimal üreme koşulları genellikle 25-40 °C sıcaklık ve 4.0-6.0 arasında değişen asidik pH'dır [15, 16, 17] Gıda endüstrisinde fermente süt ve şarküteri ürünlerinin yapımında kullanılan laktik asit bakterileri, süt ve süt ürünlerinin hammadde olarak kullanıldığı sirkelerin içeriğinde de yer almaktadır. *Kluyveromyces* cinsine ait birkaç türün haricinde sirkede yer alan birçok mayanın, laktozu fermente

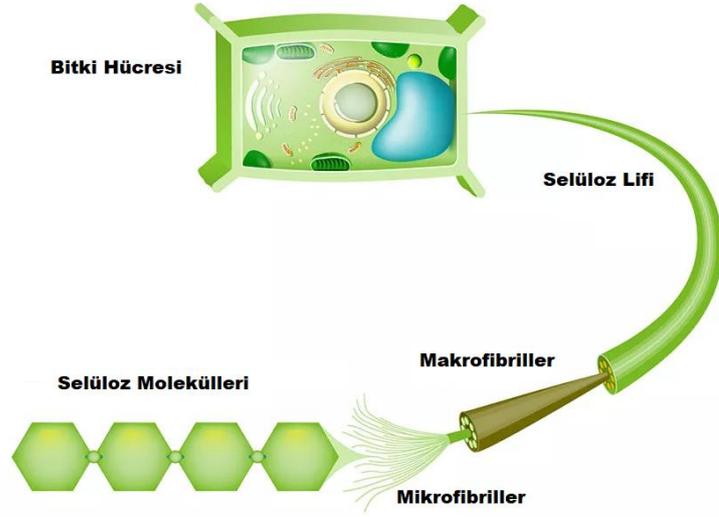
edemediği bilinmektedir [38]. Bu nedenle özellikle süt ve peynir altı suyundan elde edilen sirkelerde laktik asit bakterilerine sıklıkla rastlanmaktadır. Laktik asit bakterileri laktoz bazlı hammaddeyi hidrolize ederek glukoz ve galaktoz oluşumunu sağlamakta ve sirke fermantasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda; *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ve *L. brevis* sirke örneklerinden en çok izole edilen laktik asit bakterileridir [22,39].

2.1.1.4. Funguslar

Funguslar, spor ile çoğalan, tek hücreli, hareketsiz ökaryotik mikroorganizmalardır. Kemoheterotrof mikroorganizmalar olan fungusların enerji kaynağı organik maddelerdir. Küf olarak isimlendirilen bu funguslar filamentli bir yapı gösterir ve çoğu zorunlu aerobiktir. Funguslar için belirlenen optimal üreme koşulları genellikle 25-40 °C sıcaklık ve 3.0-6.0 arasında değişen asidik pH'dır [40]. Funguslar, ürettikleri çeşitli bileşenler nedeniyle gıda endüstrisinde kıvam ve aroma artırıcı olarak kullanılmalarının yanı sıra pigment ürettikleri için renklendirici olarak da funguslardan yararlanılmaktadır [41]. Funguslar, genellikle tahıl ürünleriyle elde edilen sirke çeşitlerinin içeriğinde yer almaktadır [24]. Özellikle *Rhizopus* ve *Mucor* cinslerine ait fungus türlerinin karbonhidratların hidrolize edilmesinde büyük önem taşıyan amilaz ve glukoamilaz gibi enzimlere sahip olmaları fermantasyon işleminin hızlanmasını sağlamaktadır [25, 26]. Bitkisel ürünler kullanılarak elde edilen sirkelerin içeriğinde ise selüloz enzimi üreticisi olan *Aspergillus* türlerine sıklıkla rastlanmaktadır [44]. *Aspergillus* türlerinin selüloz ve nişastayı hidrolize ederek yapı taşlarına ayırması fermantasyonu kolaylaştırmaktadır [45]. Bunların yanı sıra sirkede yer alan fungusların sirkenin aromasını ve organik asit içeriğini de arttırdığı bildirilmektedir [24].

2.2. Selüloz

19. yüzyılda Fransız bilim insanı Anselme Payen, yürütmüş olduğu bir çalışmada bitki dokularını çeşitli kimyasallarla muamele etmiş ve esnemeye karşı direnç gösteren katı bir yapı ortaya çıkmıştır [1]. Payen, nişasta ile izomerik benzerlik gösteren bu yapının moleküler formülünü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olarak belirlemiş ve bu molekülü selüloz olarak adlandırmıştır [1]. Literatüre ilk defa bu çalışma ile kazandırılan selüloz, damarlı bitkilerin hücre duvarını oluşturan en önemli polisakkarittir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bitki hücresindeki selülozun mikro yapısı [46]

Selülozun dünya üzerinde en bol bulunan ve en kolay ulaşılan doğal polimer olduğu bilinmektedir [31]. Bitki hücrelerinin yanı sıra, alglerin, denizlerde yaşayan, boyları üç santimetreyi geçmeyen ve tunikat olarak isimlendirilen hayvanların ve bazı bakterilerin de selüloz ürettiği bilinmektedir [32, 33].

Yaşadığımız yüzyılda çevreye zarar vermeyen, yenilenebilir malzemelere olan ilgi artmış ve insanoğlu sürdürülebilir kaynaklara yönelmiştir. Bu bağlamda, en büyük yenilenebilir biyokütle olarak kabul edilen selülozun yıllık üretiminin 99 milyon tona ulaşması ve selüloza olan talebin her yıl artması nedeniyle selüloz üzerine yapılan çalışmalar hız kesmeden devam etmekte, selülozun çeşitli alanlarda kullanımı yaygınlaşmaktadır [34]. Geleneksel olarak kağıt, boya ve tekstil ürünlerinin üretiminde kullanılan selüloz, nanomateryal çalışmalarının artması ile birlikte, tıpta, gıda sanayiinde ve diğer endüstriyel alanlarda da kullanılabilir hale gelmiştir [35, 36].

Selüloz, ortalama olarak 10.000 adet glukoz molekülünün birbirine 180° 'lik açı yaparak glikosidik bağlar ile bağlanmasıyla oluşan zincir formunda bir biyopolimerdir [37, 38]. Selüloz molekülleri, glukoz monomerlerinde yer alan üç adet hidroksil grubunun birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmasıyla demet şeklini almakta ve bu yapıya mikrofibril adı verilmektedir [39]. Mikrofibriller bir araya gelerek makrofibrilleri ve selüloz liflerini meydana getirir [40]. Selüloz, fibrillerinde yer alan hidroksil grupları

nedeniyle oldukça hidrofilitir. Selülozu izomeri olduğu nişastadan ayıran en önemli fark, selüloz molekülünde yer alan glikosidik bağının β formunda olmasıdır [40]. Bu özellik, insanlarda β -glikosidik bağları parçalayan enzim bulunmadığı için insanlar tarafından selülozun sindirilmesini engellemektedir [41].

Selüloz bitkilerde hemiselüloz ve lignin gibi polimerlerle birlikte yer almakta ve böylece hücre duvarına destek sağlamaktadır [42]. Ancak bu polimerlerin selülozla beraber kompleks oluşturmaları nedeniyle, selülozun saf olarak elde edilmesi için karmaşık kimyasal yöntemler kullanılmaktadır [43]. Selüloz saflaştırma işlemlerinde büyük hacimlerde konsantre asit çözeltileri ve yüksek sıcaklık kullanıldığı için maliyet artmakta ve açığa çıkan atıklar çevreye zarar vermektedir [44]. Zahmetli ve maliyetli olan söz konusu saflaştırma işlemleri selülozun geniş kullanım alanını sınırlandırmaktadır. Ayrıca selüloz üretimi için çoğunlukla çok yıllık ağaçların tercih ediliyor olması, ormanların tahrip edilmesine ve doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Bu sebeple günümüzde selüloz eldesi için farklı kaynaklara yönelim başlamıştır [45].

2.2.1. Mikrobiyal Selüloz

Mikrobiyal selüloz terimi ilk olarak, bitkisel kaynaklı selülozun tanımlanmasından yaklaşık elli yıl sonra, 1886 yılında Brown tarafından ortaya sürülmüştür. Brown sirke fermantasyonu sırasında yüzeyde beliren yarı şeffaf membranın sirke bakterisi olarak da bilinen *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) tarafından üretildiğini ve bu jelatinimsi yapının bitkisel selüloza benzediğini bildirmiştir [46].

Bitkisel selülozdan farklı olarak mikrobiyal selüloz, lignin ve hemiselüloz içermediği için kimyasal olarak tamamen saf bir ekzopolisakkarittir. Tıpkı bitkisel selülozda olduğu gibi glukoz monomerlerinin β -1,4 glikozidik bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur [47]. Ancak mikrobiyal selüloz fibrilleri bitkisel selüloza kıyasla yaklaşık 100 kat daha incedir ve fibriller bir araya geldiğinde üç boyutlu bir ağ yapısı göstermektedirler [48]. Bu üç boyutlu ağ yapısında hidrojen bağlarına sahip olduğu için mikrobiyal selülozun su tutma kapasitesi ve hidrofilik özelliği bitkisel selülozdan kıyasla daha fazladır [49].

Bunlara ek olarak, bitkisel selüloz ile karşılaştırıldığında mikrobiyal selülozun göstermiş olduğu kristallinite ve polimerizasyon derecesinin de oldukça fazladır olduğu bilinmektedir [50]. Yapılan çalışmalarda, mikrobiyal selülozun kristallenme endeksinin yaklaşık % 70 olduğu ve polimerizasyon derecesinin 2000-8000 arasında olduğu

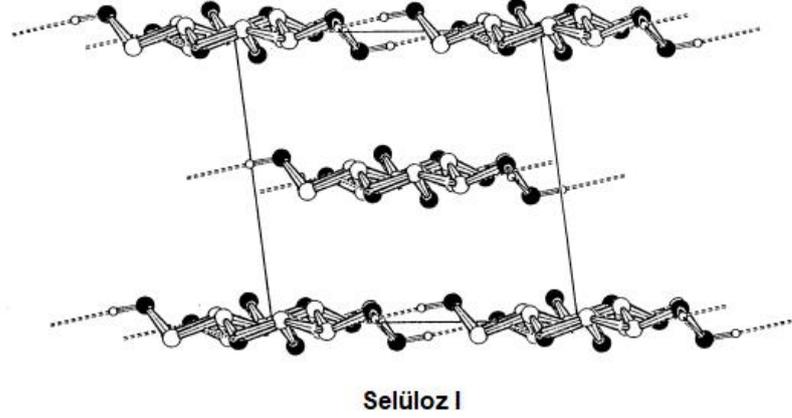
gösterilmiştir. Bitkisel selülozda polimerizasyon derecesi ise 13000-14000 arasındadır [50]. Mikrobiyal selülozun, gerilme katsayısı olarak da bilinen Young modül değeri ortalama olarak 25 Gigapaskal (GPa) iken gerilme kuvveti ortalama olarak 250 GPa'dır [51]. Bu değer polipropilen gibi sentetik iplikçiklerle karşılaştırıldığında neredeyse 10 kat fazladır ve bu özelliği de mikrobiyal selülozun mekanik kuvvetlere karşı direnme gücünün fazla olmasına olanak sağlamaktadır [52]. Selüloz yapısında yer alan hidrojen bağlarının neden olduğu bu özellikler, selüloza kendi kuru ağırlığının 700 katı kadar su tutma özelliğini de kazandırmaktadır. Dolayısıyla, mikrobiyal selülozun su tutma kapasitesi bitkisel selülozun neredeyse 300 katıdır [42].

Mikrobiyal selüloz üretimi çevre ve iklim koşullarından bağımsızdır ve geliştirilip modifiye edilebilir. Bu bağlamda, mikrobiyal selüloz üretimi, bitkisel selüloz üretimi ile kıyaslandığında ortaya çıkan en önemli unsur mikrobiyal selüloz üretiminin kontrol edilebilir olmasıdır [45].

Mikrobiyal selülozun fiziksel özellikleri üretim koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Selüloz üreten bakteriler, statik üretim ortamında selüloz fibrillerini oksijen miktarının yüksek olduğu sıvı yüzeyinde üretirler [53]. Selüloz moleküllerinden oluşan zincirler, bakteri hücrelerinden direkt olarak hücre dışına salınır. Sentezlenip hücre dışına verildiği için ekstrasellüler polisakkaritler olarak adlandırılan mikrobiyal selüloz molekülleri kristalleşerek önce mikrofibrilleri ardından da makrofibrilleri oluşturur ve sıvı besiyerinin yüzeyini kaplar [54]. Çalkalamalı üretim ortamında ise oksijen sıvı besiyerinin homojen bir şekilde bulunduğu için hücre dışına verilen selüloz fibrilleri küreler veya iplikçikler gibi düzensiz şekillerde bulunurlar [55].

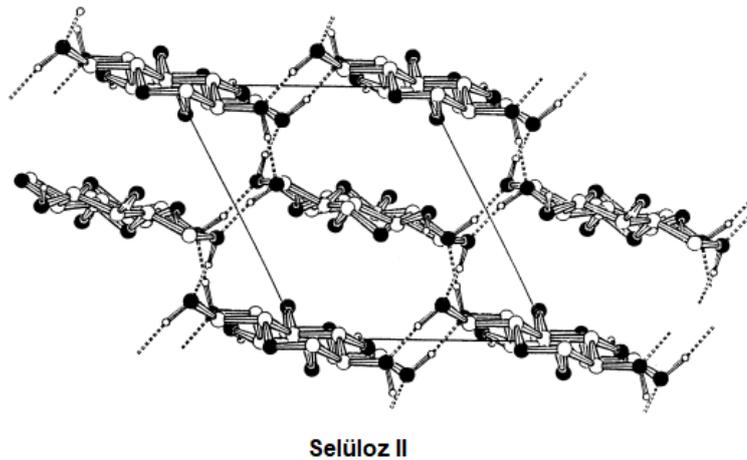
Mikrobiyal selülozun birbirinden; Raman spektroskopisi, X-ışını Kırınım Yöntemi (XRD) nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) gibi yöntemlerle analiz edilen dört farklı formu bulunmaktadır [55].

Selüloz I, keşfedilen ilk mikrobiyal selüloz şeklidir ve mikrobiyal selüloz denince akla gelen ilk selüloz formudur. Birbirlerine paralel şekilde uzanan β -1,4 glukoz zincirlerinin glikosidik bağ ile bir araya gelmesiyle oluşur (Şekil 2.2). Statik üretim yöntemiyle elde edilen membran şeklindeki selülozdur [55].



Şekil 2.2. Selüloz I'in yapısı [55].

Selüloz II, çalkalamalı üretim ortamında meydana gelen ve birbirine paralel olarak uzanmayan β -1,4 glukan zincirlerinin biraraya gelmesiyle oluşan selüloz formudur (Şekil 2.3). Selüloz II aynı zamanda doğal selülozun yeniden kristallendirilmesiyle elde edilebilmektedir. Doğada *Valonia* ve *Chaetomorpha spp.* gibi alglerin yanı sıra bazı mantarlar ve *Sarcina ventriculi* gibi bakteriler tarafından da üretilmektedir [54]. Selüloz II'de glukan zincirlerinin birbirine paralel olmaması, yapının hidrojen bağ sayısını arttırmaktadır. Hidrojen bağlarının artması ise selüloz II'nin ısı işlemlere ve mekanik kuvvetlere karşı olan dayanıklılığını artırırken, kristallenme katsayısını ve kristal boyutunu ise azaltmaktadır [55].



Şekil 2.3. Selüloz II'nin yapısı [55].

Selüloz III, selüloz I ve selüloz II formlarının, amonyak veya aminlerle muamele edilerek, modifiye edilmesiyle ortaya çıkan bir diğer selüloz formudur [56]. Selüloz IV ise, damarlı bitkilerin hücre duvarında yer alan selüloz formudur [57]. Aynı zamanda selüloz II'nin kimyasal olarak muamele edilmesiyle de elde edilebilmektedir [56].

2.2.2. Mikrobiyal Selüloz Üreten Bakteriler

Damarlı bitkilerin yanı sıra daha önce Selüloz II üretiminde belirtildiği gibi *Chaetomorpha spp.* ve *Valonia* gibi bazı alglerin ve moleküler biyolojide model organizma olarak kullanılan *Dictyostelium discoideum* gibi basit yapıdaki tek hücreli ökaryotların da yüksek saflıkta selüloz sentezledikleri bilinmektedir. Bakteriler gibi bu canlıların da ürettiği selüloz, mikrobiyal selüloz olarak adlandırılmaktadır [58].

Mikrobiyal selüloz, *Acetobacteraceae* familyasından *G. xylinus* başta olmak üzere *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* gibi Gram negatif bakteriler ile *Lactobacillus* ve *Sarcina ventriculi* gibi Gram pozitif bakteriler tarafından üretilmektedir (Çizelge 2.1.) [59, 60].

Çizelge 2.1 Mikrobiyal selüloz üreticisi bazı mikroorganizmalar, selülozun yapısı ve selüloz üretiminin hücresel görevi [61].

Cinsler	Selülozun Yapısı	Görevi
<i>Acetobacter</i>	Ekstraselüler fibrillerden oluşan membran	Oksijenli ortamda sıvı yüzeyinde kalmak
<i>Achromobacter</i>	Fibriller	Atık suda hücrelerin bir arada tutulması [62]
<i>Aerobacter</i>	Fibriller	Atık suda hücrelerin bir arada tutulması [61]
<i>Agrobacterium</i>	Kısa fibriller	Bitki dokusuna tutunma [63]
<i>Alcaligenes</i>	Fibriller	Atık suda hücrelerin bir arada tutulması [64]
<i>Pseudomonas</i>	Mikrofibriller	Atık suda hücrelerin bir arada tutulması [64]
<i>Rhizobium</i>	Kısa fibriller	Bitki dokusuna tutunma [62]
<i>Sarcina</i>	Amorf	Belirlenmemiş [64]

Çizelge 2.1.'de yer alan bakterilerin yanı sıra fotosentez yolu ile glukoz üreten *Synechococcus* sp. isimli siyanobakterin de selüloz sentezlediği bilinmektedir [65, 66]. Ayrıca sıcaklığın yüksek olduğu kükürtlü su kaynaklarında monomerik yapıda selüloz varlığının belirlenmesi, henüz tanımlanamamış bazı litotrofik bakterilerin de selüloz sentezliyor olabileceğine işaret etmektedir [67].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda belirlenen en önemli selüloz üreticisi *Acetobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif bir bakteri olan *Gluconacetobacter xylinus*'dur. Söz konusu mikroorganizma mikrobiyal selüloz üretiminin araştırılması için model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır [68]. Doğada *G. xylinus* özellikle çiçek, meyve ve bunların çürüdüğü ortamlarda ve bu ürünlerle beslenen meyve sinekleri gibi canlıların da mikrobiyotasında bulunmaktadır. Söz konusu bakteri, sirke

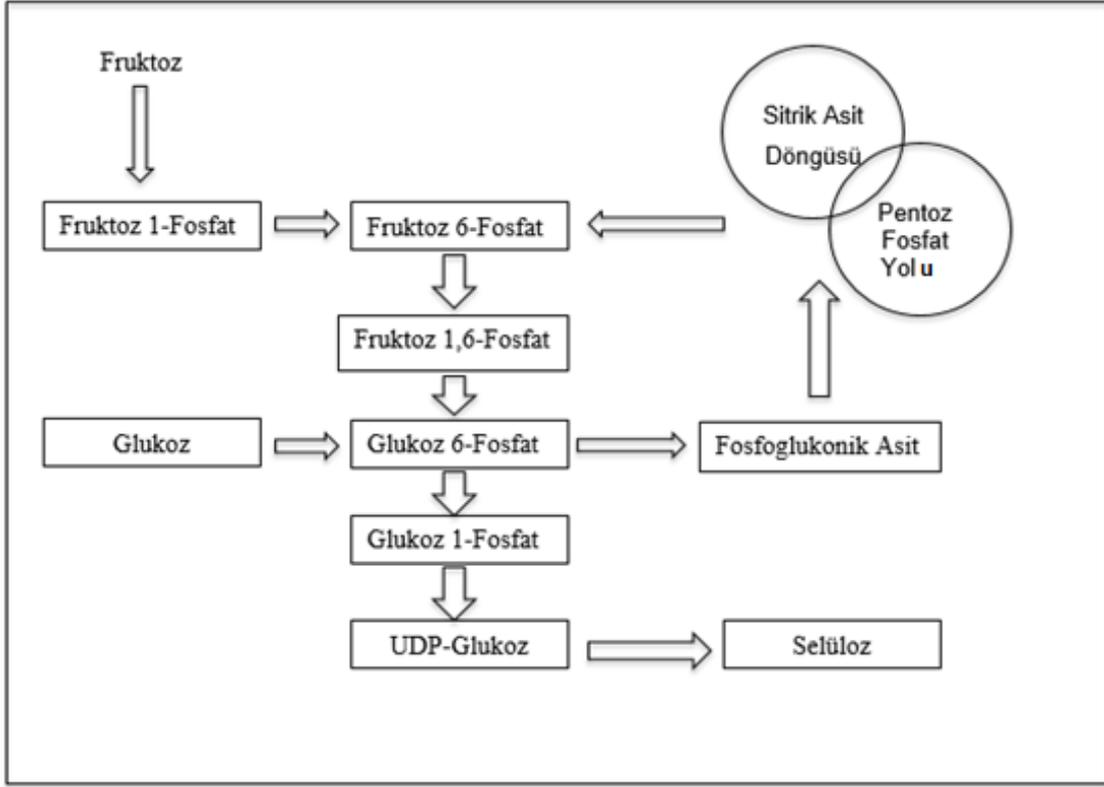
fermantasyonunda görev aldığı için gıda endüstrisinde de sıkça kullanılmaktadır [54]. Aerobik özellik gösteren bu bakterinin genellikle mayalar gibi fermentatif aktivite gösteren mikroorganizmalarla simbiyotik ilişki içinde olduğu bilinmektedir. *G. xylinus*'un selüloz üreticisi olmasının yanı sıra bilinen en önemli özelliği asetik asit üretmesidir. Bu bakteriler daha önce belirtildiği gibi oksijenli ortamda etanolü okside ederek asetik asit oluştururlar ve bu nedenle asetik asit bakterileri olarak adlandırılırlar [69].

2.2.3. Mikrobiyal Selüloz Sentezi

Dünya üzerinde en bol bulunan polimer olan selülozun birincil kaynağı bitkiler olmasına karşın, üretim kolaylığı nedeniyle birçok araştırmacı selülozun biyosentez mekanizmasının anlaşılabilmesi için asetik asit bakterilerini de model mikroorganizma olarak kullanmıştır [70].

Selüloz biyosentezinin açıklanmasında model mikroorganizma olarak kullanılan *G.xylinus*'da mikrobiyal selüloz biyosentezi sırasında ilk olarak, selüloz öncülü üridin difosfoglukoz sentezi gerçekleşirken, sonrasında glukoz monomerlerinin biraraya gelmesiyle oluşan 1,4- β -glukan zincirlerinin birbirlerine glikosidik bağ ile bağlanarak polimerizasyonu gerçekleşmektedir [71, 72].

G. xylinus, selüloz biyosentezi için pentoz fosfat yolu ve sitrik asit döngüsünü kullanmaktadır [73]. Pentoz-fosfat yolunu glukoz ve fruktoz gibi karbon kaynaklarının yanı sıra heksoz, gliserol ve pirüvat gibi karbonhidratların oksidasyonunu içerirken, sitrik asit döngüsü organik asitlerin ve organik asitlerden üretilen ürünlerin oksitlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.4.) [74].

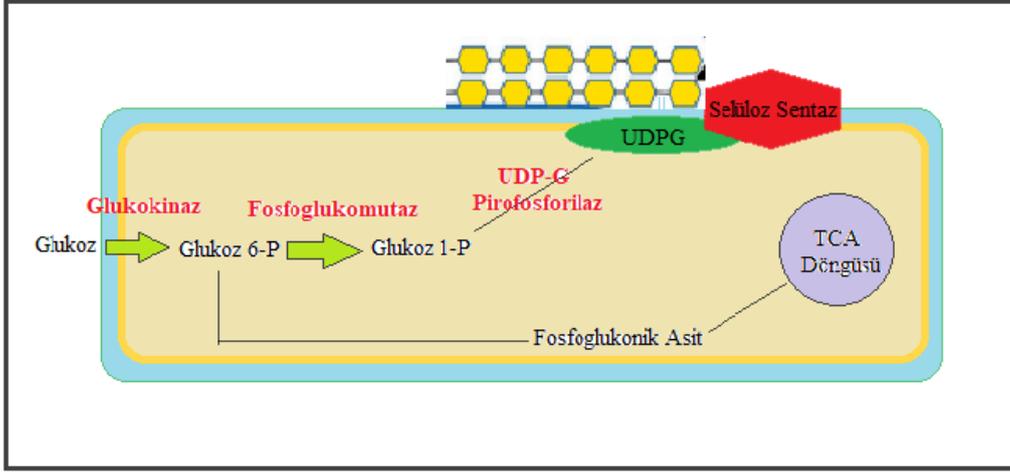


Şekil 2.4. Glukoz ve Fruktozdan mikrobiyal selüloz biyosentezinin şematik gösterimi [75].

K. xylinus'da selülozun biyosentezinden sorumlu olan selüloz sentaz, bakteri hücresinin sitoplazmik membranı ile dış membran arasında bulunmaktadır ve selüloz, heksoz-fosfatlardan oluşturularak hücre dışına verilmektedir [76]. Selüloz biyosentezinin kontrolü glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi ile sağlanırken mikrobiyal selülozun biyosentezinde 5 önemli enzimin görev aldığı bilinmektedir. Bunlar: glukokinaz, glukoz permeaz, fosfoglukomutaz, UDP-glukoz pirofosforilaz ve selüloz sentaz'dır [71], [77].

Sentez sırasında ilk olarak glukoz, glukokinaz enzimi ile fosforilize edilerek glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Daha sonra fosfoglukomutaz enzimi, glukoz-6-fosfatı izomerize ederek glukoz-1-fosfatı oluşturur. Ardından sentez işleminde anahtar görevi gören UDP-glukoz pirofosforilaz (UDP-G Pirofosforilaz), sentez işleminin öncülü olan üridin difosfo-glukoz (UDP) bileşiğini oluşturur. Sentezin son basamağında yalnızca bu işlem için kullanılan selüloz sentaz ile selüloz polimerinin uzun zincirleri ilk olarak moleküller halinde sentezlenmektedir (Şekil 2.5.). Selülozun uzayan zincir formunu alabilmesi, zincirin indirgeyici ucuna aktif glukoz monomerlerinin eklenmesi ile gerçekleşmektedir

[78], [79]. Uzayan bu zincirler selülozu oluşturmak için yaklaşık 3,5 nm'lik demetler halinde bir araya gelerek mikrofibrilleri oluşturmaktadır [55].



Şekil 2.5. Bakteri hücresinde selüloz biyosentezinin şematik gösterimi [71].

2.2.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi

Mikrobiyal selüloz üretiminde statik ve çalkalamalı üretim başta olmak üzere dört farklı üretim yöntemi bulunmaktadır [80].

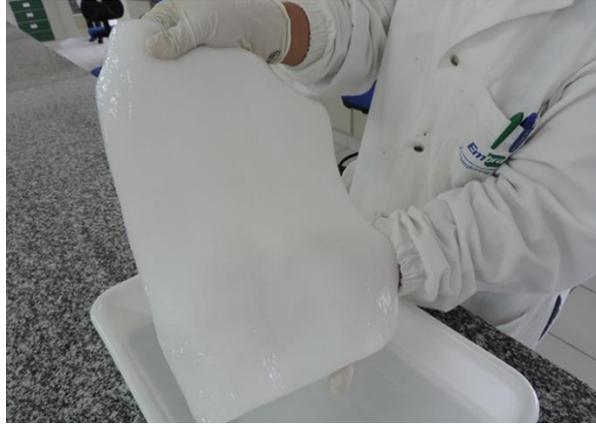
2.2.4.1. Statik Kültür Yöntemi İle Selüloz Üretimi

Statik kültür mikrobiyal selüloz üretiminde en çok tercih edilen yöntemdir. Statik kültür yöntemi ile elde edilen selülozun kristal boyutu ve kristallenme derecesi çalkalamalı yöntemle elde edilen selüloz II'den çok daha yüksek olduğu bilinmektedir [81]. Bu yöntemde, yüzey alanı geniş bir kaba alınan besiyerine kültürün ekimi gerçekleştirildikten sonra statik üretim ortamında üretim gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Selüloz üretiminde statik kültür yönetiminin şematik gösterimi [60].

Bu yöntemde selüloz fibrillerinin birbirlerine paralel olacak şekilde bir araya gelmesi nedeniyle Selüloz I formundaki mikrobiyal selüloz elde edilmektedir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Statik kültür yöntemi ile elde edilen mikrobiyal selüloz [60].

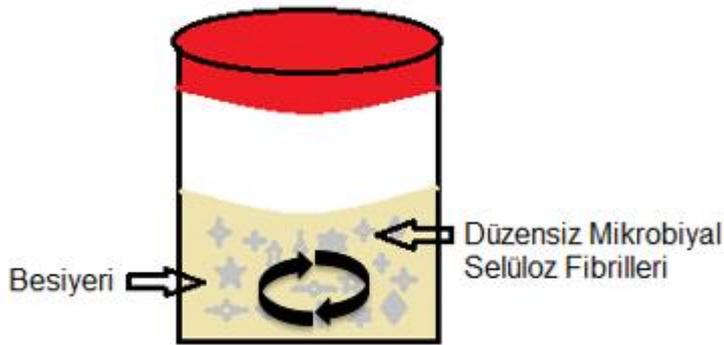
Statik kültür basit bir yöntem olmasına rağmen birçok dezavantaja da sahiptir. Bunlardan ilki oksijen difüzyonunun statik kültürde homojen olarak gerçekleştirilememesidir. Fermantasyon süresince yüzeyi kaplayan membran şeklindeki selüloz, besiyerine oksijen geçişini engellemekte ve bakteri hücrelerinin ölmesine neden olmaktadır [81]. Buna ek olarak, kültürün ortama ekimi gerçekleştirildikten sonra üretimin statik olarak

sürdürülmesi gerektiği için modifiye edilemez ve kontrol amaçlı yapılan ölçümler gerçekleştirilemez [60].

Mikrobiyal selüloz eldesinde statik üretim yönteminin kullanılmasının diğer bir dezavantajı ise bu yöntemin ölçek büyütme izin vermemesidir [82]. Bu yöntemde yüzey/hacim oranı büyük önem taşımaktadır ve geniş yüzey alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır [60] [83].

2.2.4.2. Çalkalamalı Kültür Yöntemi İle Selüloz Üretimi

Yüksek miktarda mikrobiyal selüloz üretimi olmamasına rağmen endüstriyel üretim için en çok tercih edilen yöntem çalkalamalı kültürdür. Mikrobiyal selüloz başlığında anlatıldığı gibi; çalkalamalı kültür yönteminde, glukon zincirleri birbirlerine paralel olmayacak şekilde bir araya geldiği için selüloz II olarak adlandırılan, kısa fibrilli, düzensiz şekilli mikrobiyal selüloz formu elde edilmektedir (Şekil 2.8.). Çalkalamalı kültür ile edilen mikrobiyal selülozun polimerizasyon ve kristallenme derecesi statik kültür ile üretilen selüloza kıyasla oldukça düşüktür. Bu nedenle mekanik kuvvetlere karşı göstermiş olduğu direncin de daha az olduğu bilinmektedir. Buna rağmen süspansiyon viskozitesinin ve su tutma kapasitesinin statik kültür ile üretilen mikrobiyal selüloza kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir [84].



Şekil 2.8. Selüloz üretiminde çalkalamalı kültür yönteminin şematik gösterimi [84].

Daha önce anlatıldığı gibi çalkalamalı kültür yönteminde model organizma olarak kullanılan *Gluconacetobacter* türleri ile yapılan çalışmalarda birçok problem ortaya çıkmaktadır. Bu problemlerin en önemlisi çalkalamalı kültür yönteminin stabil olmamasıdır [85]. Çalkalamalı kültürde fermantasyon süresince, kendiliğinden mutasyon geçiren bakterilerin mikrobiyal selüloz üretmeyen mutant bakteriler haline gelmesiyle kültür ortamında selüloz üreticisi olmayan bakterilerin popülasyonu artmakta ve kültür dağınık bir büyüme modeli kazanmaktadır [86]. Bunun yanı sıra çalkalamalı kültür yönteminde *Gluconacetobacter* türlerinin glukozu, ketoglukonik asit ve glukonik aside dönüştürmesi nedeniyle kültür ortamında pH değeri düşmekte ve sonuç olarak üretim koşulları değişerek maliyeti artmaktadır [87].

Çalkalamalı kültür yönteminde oksijen difüzyon kapasitesinin ve çalkalama hızının yüksek olması ve çok iyi ayarlanması gerekmektedir. Mikrobiyal selüloz üretim verimini arttırmak için fazla miktarda oksijene ve yüksek hacimli çalkalama gücüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu faktör de üretim maliyetini arttırmaktadır [87].

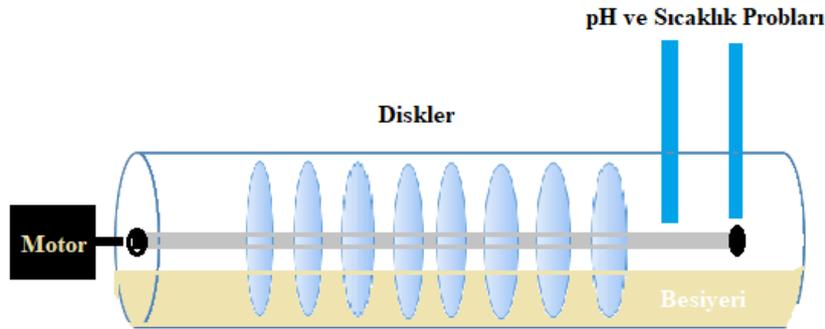
2.2.4.3. Dönen Disk Reaktörü İle Selüloz Üretimi

Dönen disk reaktörü ortasına dönen bir şafta sabitlenmiş olan dairesel disklerin yerleştirildiği bir kaptan oluşmaktadır (Şekil 2.9.). Dönen diskler kabın içindeki kültür ortamına temas etmekte ancak kültürün içerisine girmemektedir. Bakteri hücreleri bir süre sonra bu disklerin yüzeyine tutunur ve burada mikrobiyal selüloz üretirler [36]. Disklerin dönüyor olması bakteri hücrelerinin oksijen alışverişini kolaylaştırır ve kültür ortamındaki besinler diskler üstündeki delikler sayesinde kolayca difüze olur. Disklerin üzerinde yer alan bu delikler aynı zamanda daha büyük bir yüzey alanı oluşturduğu için bakteri hücrelerine daha fazla tutunma sağlar ve sonuç olarak daha dayanıklı yapıya sahip mikrobiyal selüloz elde edilebilmektedir [61].

Dönen diskli reaktör yönteminde statik kültür yöntemine kıyasla yüzey alanı daha fazla olduğu için, birim alandan elde edilen selüloz miktarı daha fazladır. Yapılan çalışmalar bu yöntemle elde edilen mikrobiyal selülozun su tutma kapasitesinin statik olarak elde edilenden iki kat daha fazla olduğunu göstermektedir [61].

Ayrıca bu yöntemde, bakteriler tarafından sentezlenen mikrobiyal selüloz disklerin üstünde yer aldığı için kültür ortamı sonradan kontrol edilerek modifiye edilebilmektedir [61].

Dönen disk reaktör yönteminin dezavantajları ise üretimin diskler arasındaki mesafe dar olduğu için sürekli olmaması, fermantasyon sürecinde tıpkı çalkalamalı kültürde olduğu gibi mutant bakterilerin sayıca artması ve bakteri hücrelerinin dönen sistem üzerinde kirlenmelere neden olmasıdır [61].

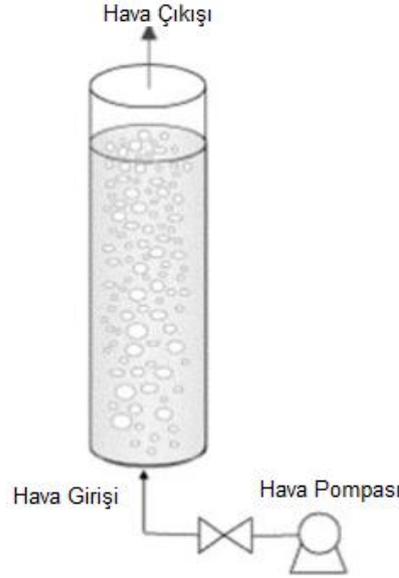


Şekil 2.9. Selüloz üretiminde dönen disk reaktörü kullanımının şematik gösterimi [36].

2.2.4.4. Hava Kaldırmalı Reaktör İle Selüloz Üretimi

Mikrobiyal selüloz üretiminde tercih edilen bir diğer yöntem ise; hava kaldırmalı reaktörlerdir. Bu yöntem basit bir mekanik yapıya sahiptir ve düşük enerji tüketimi ile yüksek verim sağlamaktadır (Şekil 2.10.). Bu nedenle hava kaldırmalı reaktörler birçok mikrobiyal fermantasyon işleminde tercih edilmektedir. Fakat hava kaldırmalı reaktör yöntemi mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan besiyeri ortamı gibi viskoz sıvılar için uygun değildir. Bu yöntemin mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılması için çeşitli modifikasyonlara gidilmiş ve etkin bir karıştırma hızı elde edilmiştir [88]. Hava kaldırmalı reaktörde elde edilen mikrobiyal selülozun; çalkalamalı kültür ile üretilen kısa fibrilli yapıdaki selülozun aksine, eliptik şekillerde olduğu gösterilmiştir. Bu eliptik şeklindeki mikrobiyal selülozun polimerizasyon derecesi statik kültür yöntemi ile elde edilen selüloza çok yakındır. Ayrıca hava kaldırmalı reaktör yönteminde hücre bölünme hızının da statik kültür yöntemine kıyasla yüksek olduğu belirtilmiştir [89].

Hava kaldırmalı reaktör yönteminin dezavantajı sistem kurulumunun uzun sürüyor olması ve verimin artması için yapılan modifikasyonların maliyeti arttırmasıdır [89].



Şekil 2.10. Selüloz üretiminde Hava kaldırmalı reaktörün şematik gösterimi [88].

2.2.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimini Etkileyen Faktörler

1950'li yıllardan günümüze kadar birçok farklı bakteri ile çeşitli besiyeri ve üretim yöntemi kullanılarak mikrobiyal selüloz üretimi yapılmaktadır. Mikrobiyal selüloz üretimi, kültür ortamındaki bakterinin, ortamdaki karbon kaynaklarını hidrolize ederek glukoz oluşturması ve bu monomeri selüloza polimerize etmesi ile gerçekleştirilir. Ancak biyosentez işlemini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır [90].

Mikrobiyal selüloz üretimine etki eden en önemli faktörler, üretimde tercih edilen karbon ve azot kaynaklarıdır. Mikrobiyal selülozun biyosentezinde başta glukoz olmak üzere, 5-6 karbona sahip monosakkaritler olan mannoz, galaktoz ve fruktoz, iki veya daha fazla monosakkaritin bir araya gelmesiyle oluşan maltoz, sukroz ve laktoz gibi disakkaritler, nişasta gibi kompleks karbonhidratlar ile alkol ve organik asitler gibi birçok karbon kaynağı kullanılmaktadır [90], [91] Mikrobiyal selüloz üretimi için üretim ortamında azot kaynağına da ihtiyaç duymaktadır. Mikrobiyal selüloz üretiminde azot kaynağının etkisinin araştırıldığı birçok çalışmada, geleneksel olarak tercih edilen ticari besiyerinde

azot kaynağı olarak kullanılan maya özütü ve peptonun yerine geçebilecek azot kaynakları araştırılmaktadır [92]. Yapılan araştırmalarda maliyeti yüksek olan bu bileşiklerin yerine peynir altı suyu, mısır meserasyon sıvısı ve malt özütü gibi düşük maliyetli alternatif kaynakların kullanılabilmesi gösterilmiştir [68],[93],[94]

Mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan optimum sıcaklık aralığı; 25-30°C arasındadır. Ancak yapılan çalışmalar mikrobiyal selüloz üretiminde sıcaklık faktörünün etkisinin, tercih edilen üretim yöntemine göre de değişkenlik gösterebileceğini ortaya çıkarmaktadır. Örneğin çalkalamalı kültür yönteminde 30 °C'deki selüloz üretimi 37 °C'ye göre daha yüksekken, statik kültür her iki sıcaklık değerinde de verim sabit kalmıştır [95]. Bunun yanı sıra, farklı sıcaklıklarda üretilen mikrobiyal selülozların su tutma kapasitelerinin de birbirinden farklı olduğu bulunmuştur [96].

Mikrobiyal selüloz üretimi süresince kültür ortamındaki glukozun bir kısmı glukonik asite dönüşmekte, bunun yanı sıra fermantasyon sırasında bakteriler tarafından çeşitli organik asitler de oluşturulmaktadır [97]. Bu asitlerin oluşumu fermantasyon ortamının pH değerini düşürmekte ve sonuç olarak selüloz üretim verimi de etkilemektedir. Bu nedenle fermantasyon ortamında pH değerinin iyi ayarlanması gerekmektedir [96]. Yapılan çalışmalarda, mikrobiyal selüloz üretiminde tercih edilen optimum pH aralığının 4 ila 7 değerleri arasında değiştiği görülmüştür. Ancak birçok araştırmacı deneylerinde pH 5-6 arasındaki değerleri tercih etmektedir [96].

Mikrobiyal selüloz üretimini etkileyen diğer bir faktör ise oksijen miktarı ve oksijenin kültür ortamı içindeki difüzyon hızıdır [98]. Bakteri hücrelerinin mikrobiyal selüloz biyosentez hızının ve elde edilen selüloz formunun oksijen difüzyonu ile doğrudan doğruya ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra ortamda karbondioksit miktarının artmasıyla biyosentez hızının düştüğü ve hücre gelişiminin yavaşladığı belirtilmiştir [60].

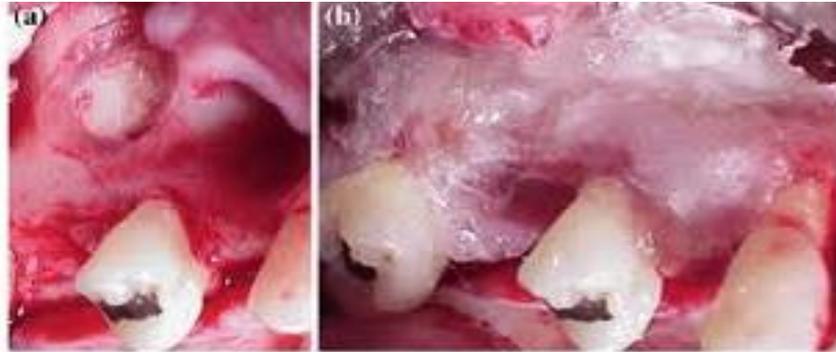
2.2.6. Mikrobiyal Selülozun Kullanım Alanları

Mikrobiyal selüloz göstermiş olduğu yüksek derecede saflık, polimerizasyon, kristallenme ve yüksek su tutma kapasitesi gibi dikkat çeken özellikleri nedeniyle birçok farklı kullanım alanına sahiptir. Mikrobiyal selüloz yaygın olarak; sağlık, kozmetik, gıda ve kâğıt endüstrilerinde kullanılırken, giyim, elektronik ve akustik sistemleri gibi pek çok yeni kullanım alanında da ön plana çıkmaktadır [99].

2.2.6.1. Tıbbi Alanlarda Mikrobiyal Selüloz Kullanımı

Jelatin benzeri bir yapıya sahip olan mikrobiyal selüloz yüksek mekanik direnç gösterirken, aynı zamanda da sıvılar ve gazlara karşı yüksek geçirgenliğini korumaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra, biyolojik olarak uyumlu bir materyal olması ve su tutma kapasitesinin yüksek olması nedeniyle dermatolojik olarak güvenilir olarak kabul edildiği için tıbbi alanda kullanımı oldukça yaygındır. Mikrobiyal selülozun tıbbi alanda ticari olarak ilk kullanımı, Johnson & Johnson markası tarafından 1980 yılında yapılmıştır. Marka mikrobiyal selülozu yara iyileştirici ve örtücü olarak kullanmak istemiş ancak üretimde karşılaştığı problemlerden dolayı ürünü piyasaya sürememiştir [99].

Daha sonra bir Brezilya firması olan Biofill Produtos Bioteχνologicos, *Gluconacetobacter* tarafından üretilen mikrobiyal selülozun aynı amaçla kullanımını araştırarak piyasaya üç ürün çıkarmıştır. Piyasaya sürülen bu ürünlerden biri, diş eti hastalıklarında ve diş implantlarında hızlı bir iyileştirici olarak kullanılırken (Şekil 2.11.), diğerleri, yapay deri olarak ikinci ve üçüncü derece yanıkların ve deri ülseri gibi rahatsızlıkların oluşturduğu önemli cilt problemlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.12.) [100].



Şekil 2.11. Mikrobiyal selülozun diş implantı tedavisinde kullanılması [101].

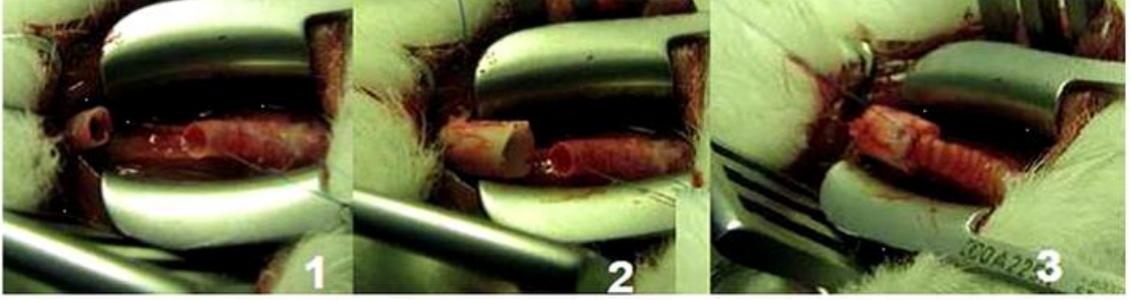


Şekil 2.12. Mikrobiyal selülozun yara tedavisinde yapay deri olarak kullanımı [102].

Geçici yapay deri ve iyileştirici olarak kullanılan mikrobiyal selüloz, statik kültür ile üretilmektedir. Statik kültür ile elde edilen mikrobiyal selüloz pürüzsüz, gözenekli ve elastik bir yapıya sahiptir. Su tutma kapasitesi yüksek olduğu için, nem içeren mikrobiyal selülozun dokulara karşı göstermiş olduğu uyum oldukça yüksektir. Steril edilebilir olması ve iyileşmeye destek sağlaması nedeniyle ikincil enfeksiyonları önleyen mikrobiyal selüloz, yaralı bölgede ısı yalıtımı sağlayarak, ağrıyı da azaltmaktadır [103].

Mikrobiyal selüloz katmanının ortasında bir çukur oluşacak şekilde üretilmesiyle bu materyalin yapay kan damarı ve üreter olarak kullanılabilmesi ve diğer yapay kan damarlarına oranla daha düşük kan pıhtılaşma riski taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 2.13.). Kalp atar damarlarının sertleşmesi nedeniyle hastalara bypass işlemi yapılmakta ve bu damarlar, yapay damarlarla değiştirilmektedir. Kullanılacak bu yapay damarların ameliyat öncesi ve sonrasındaki mekanik strese ve vücut içinde kan basıncına karşı dirençli olması gerekmektedir. Mikrobiyal selülozun sahip olduğu yüksek gerilme direnci, söz konusu materyalin bu alanda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, memelilerde selüloz sindirim enzimi olan selülaz olmadığı için mikrobiyal selülozdan elde edilen materyaller vücut içinde sindirime uğratılamaz ve sağlığını korumaktadır [103]. Propilen malzemelerden üretilen yapay kan damarları, kan akış hızının önce yavaşlamasına daha sonra da durmasına neden olan trombotik lezyonlara sebep olmaktadır. Fakat mikrobiyal selülozdan üretilen yapay kan damarlarının su tutma

kapasiteleri yüksek olduğu için trombotik lezyon oluşumuna müsaade etmediği belirtilmektedir [95,103, 104].



Şekil 2.13. Mikrobiyal selülozun yapay kan damarı olarak kullanılması [104].

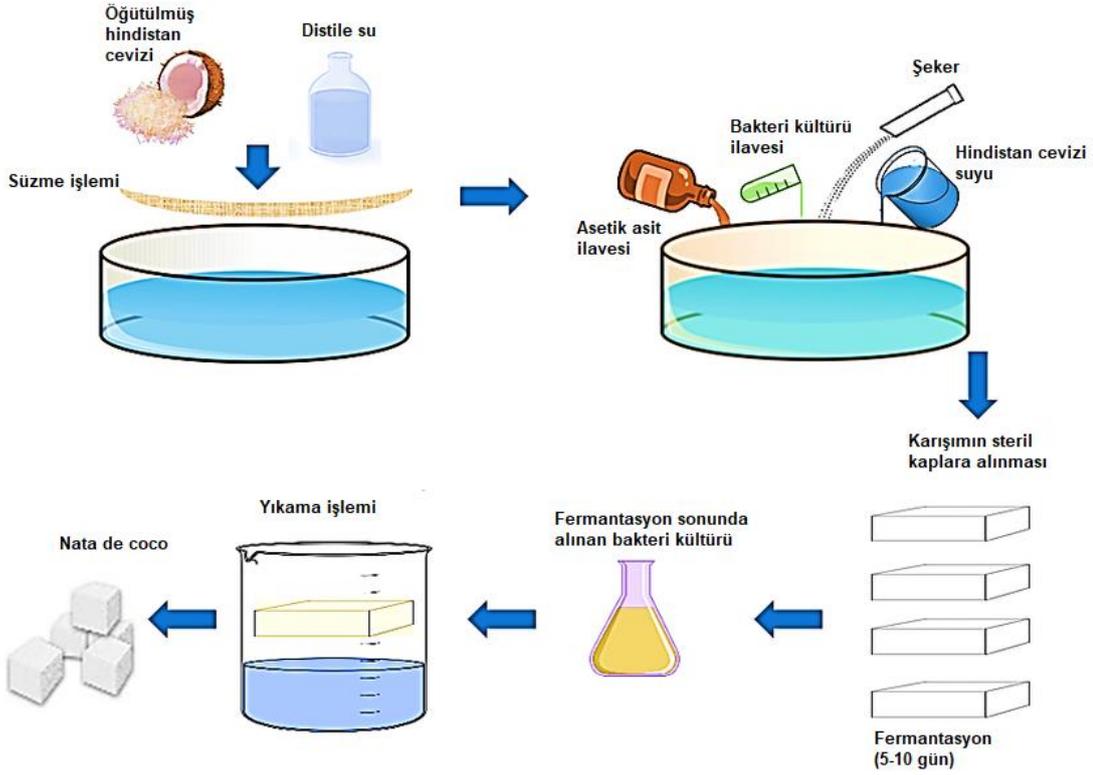
2.2.6.2. Gıda Endüstrisinde Mikrobiyal Selüloz Kullanımı

Mikrobiyal selülozun, 1992 senesinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: Food and Drug Administration) tarafından, gıda ve gıda katkı maddesi olarak kullanımı güvenli olan maddeler sınıfına dâhil edilmesiyle birlikte, gıda endüstrinde kullanımı geniş yer bulmuştur [105] [106].

Güneydoğu Asya ülkesi olan Filipinler’de hindistan cevizi ve ananasın karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla elde edilen mikrobiyal selüloz, Nata de coco, nata de pana isimli bir tatlı olarak tüketilmektedir (Şekil 2.14.). Bu tatlının üretimi sırasında *Gluconacetobacter xylinus* tarafından sentezlenen selüloz tabakası yıkanıp steril edilerek şeker şurubu ve meyve aromalarıyla tatlandırılmaktadır (Şekil 2.15.). Filipinler bölgesinde geleneksel bir tatlı olan Nata de coco’nun yüksek lif içeriğine sahip olduğu, kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü bilinmektedir [107].



Şekil 2.14. Nata de coco olarak satışı sunulan mikrobiyal selüloz [107].



Şekil 2.15. Nata de coco üretimi [108].

Mikrobiyal selüloz, dondurma ve çözdürme gibi işlemlerde fiziksel özelliğini koruması nedeniyle, dondurma, mayonez, hamur ürünleri ve çeşitli işlenmiş gıdalarda kıvam arttırıcı, su bağlayıcı ve süspanse edici olarak da kullanılmaktadır [109]. Mikrobiyal selülozun nem tutucu özelliği sayesinde gıda ürünlerinin raf ömrünü uzattığı, sert olması gereken gıda ürünlerinde, sertlik ve esnekliği düzenlediği bilinmektedir [110].

Mikrobiyal selüloz bakteriler tarafından sentezlendiği için vegan ve vejetaryen ürünlerde de hayvansal gıdaların yerine rahatlıkla kullanılabilir. Özellikle kırmızı pigmente sahip olan *Monascus purpureus* türünün özütü ile birleştirilen mikrobiyal selülozdan, kırmızı renkli tadı sığır etine benzeyen yüksek lifli, düşük kalorili vegan et ürünleri hazırlanabilmektedir [107, 111].

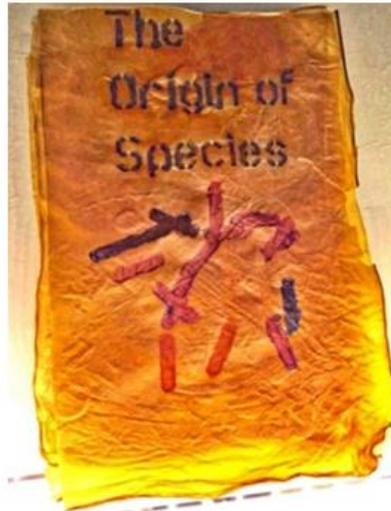
Mikrobiyal selüloz üreticisi bakterilerin ve çeşitli bitki çaylarının statik kültür yöntemiyle fermente edilmesiyle oldukça sağlıklı olduğu bilinen, probiyotik ve prebiyotik özellikler gösteren kombu çayı da elde edilmektedir (Şekil 2.16.) [113,104].



Şekil 2.16. Mikrobiyal selüloz üreticisi bakteriler ile çay ve şekerin fermente edilmesiyle üretilen kombu çayı [112].

2.2.6.3. Kâğıt ve Tekstil Endüstrisinde Mikrobiyal Selüloz Kullanımı

Fiziksel özellikleri nedeniyle mikrobiyal selülozun kâğıt endüstrisinde önemli bir yeri vardır. Mikrobiyal selülozu oluşturan mikrofiber zincirleri kâğıt hamuruna ilave edildiğinde yırtılmaya ve yanmaya karşı dayanıklılığının arttırdığı görülmüştür (Şekil 2.17.). Mikrobiyal selüloz kâğıt hamuruna eklenerek birinci kalite kâğıt elde edilmenin yanı sıra hasarlı kâğıtların onarılması için de kullanılmaktadır [114].



Şekil 2.17. Mikrobiyal selülozun kâğıt olarak kullanılması [115].



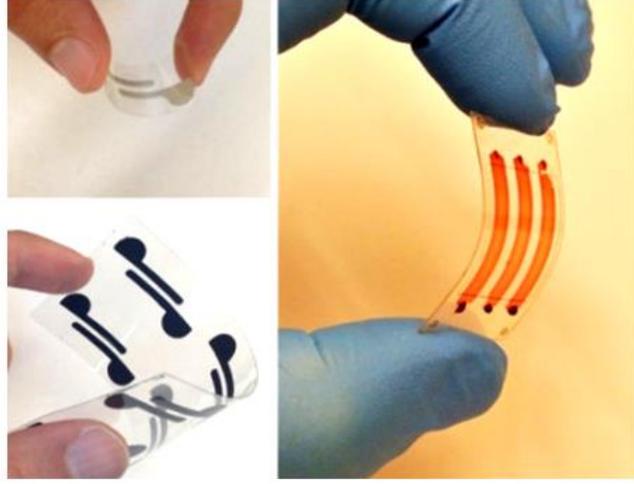
Şekil 2.19. Mikrobiyal selülozün tekstil uygulamalarındaki kullanımı [115].

Mikrobiyal selüloz üretiminin tamamen doğal olması ve üretim sonucunda atık oluşmaması nedeniyle günümüzde birçok moda markası tarafından tekstil alanında da kullanılmıştır [119].

2.2.6.4. Elektronikte Mikrobiyal Selüloz Kullanımı

Günümüzde teknoloji ve bilişim gün geçtikçe gelişmektedir. Endüstriyel hammadde arayışına dair rekabetin yüksek olması yenilenebilir doğal materyallere olan ilgiyi arttırmıştır. Mikrobiyal selüloz, sahip olduğu fiziksel özellikler nedeniyle teknolojik birçok üründe de kullanılmaya başlanmıştır.

Sony firması, selülozün ses iletkenliği oldukça yüksek olduğu için, mikrobiyal selülozdan hoparlör diyaframı ve kulaklık üretmiş ve üretilen bu ürünler satış rekorları kırmıştır. Bunun yanı sıra kâğıdın optik özelliklerini taşıması amacıyla geliştirilen elektronik kâğıtların yapımında ve OLED ekranlarda mikrobiyal selülozun kullanılabilirliği gösterilmiştir (Şekil 2.20.) [115]. Mikrobiyal selülozün kitosan ve pullulan gibi farklı polisakkaritler ile modifiye edilerek, sahip olduğu özelliklerin güçlendirilmesi ile elde edilen bu nanokompozit materyaller de yarı saydam olmaları, görüntüyü ve sesi iletmeleri nedeniyle, biyokatalizörler, elektronik kâğıtlar ve çeşitli görüntüleme cihazlarında kullanılmaktadır [120, 121].



Şekil 2.20. Mikrobiyal selülozdan elde edilen elektronik kâğıt örneği [115].

2.3. Yeşil Çay

Çay, *Camellia sinensis* bitkisinin yaprakları ve taze sürgünlerinin hasat edildikten sonra kurutulması ve su ile demlenmesi ile elde edilen aromatik bir içecektir. Çaygiller ailesine ait, beyaz çiçekli ve çok yıllık bir bitki olan *Camellia sinensis* bitkisi tropikal iklime sahip olan bölgelere özgü bir bitki iken, bu bitki ile elde edilen çay dünya üzerinde sudan sonra en çok tüketilen içecektir [122]. Çay tarihinin günümüzden 5000 yıl öncesine kadar dayandığı düşünülmektedir. Çin imparatoru Shen Nung tarafından hastalıkları tedavi etmek amacıyla keşfedildiği düşünülen bu içecek uzak doğudan dünyanın her yerine yayılmıştır [123] [124]. Çay üretimi, çay bitkisinin bol yağış alan iklimlere özgü bir bitki olması sebebiyle Çin, Hindistan, Endonezya, Japonya ve Kenya gibi ülkelerde 12 ay boyunca devam ederken, Türkiye ve İran gibi yüksek enlemlerde yer alan ülkelerde ise 6 ay ile sınırlıdır [125]. Türkiye’de siyah çay üretimine, Batum ve Doğu Karadeniz çevresine araştırma yapmak üzere gönderilen ziraat mühendisleri tarafından 1917 yılında başlanırken, yeşil çay üretimine ise, 1986 senesinde Artvin Arhavi Çay Fabrikası’nda başlanmıştır [124]. Yeşil çayı siyah çaydan ayıran en önemli özellik üretim basamaklarındaki farklılıklardır. Siyah çayın aksine, yeşil çay üretiminde, hasattan hemen sonra fabrikaya getirilen çay yaprakları direkt olarak kısa süreli yüksek sıcaklığa maruz bırakılmakta ve enzim aktiviteleri durdurulmaktadır [126]. Enzimlerin inaktif hale geçmesiyle birlikte yapraklarda bulunan klorofiller parçalanmadan kalmakta ve çay rengini korumaktadır. Çay yaprakları siyah çay üretimindeki gibi fermente edilmediği

için yeşil çay, siyah çaya özgü aroma ve renge de sahip değildir. Yeşil çayın kendisine özgün olmasından sorumlu olan bileşikler polifenollerdir [127]. Kuru ağırlığın % 30'unu oluşturan yeşil çay polifenolleri flavanol, flavandiol, flavonoid ve fenolik asitlerden oluşur. Ancak, yeşil çaya ait polifenollerinin çoğu, kateşinler olarak da bilinen miritesin ve kuarsetin gibi flavonollerdir [128]. Bu polifenoller sıcak suda çözünebilir formda oldukları için insan sağlığı için de kullanılabilir. Bu nedenle yeşil çayın düzenli kullanımıyla birlikte kolestrol, tansiyon ve kalp rahatsızlıkları gibi dolaşım sistemi rahatsızlıklarına karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [129]. Yeşil çayın antioksidan kapasitesi, fenolik madde içeriği yüksek olduğu için oldukça fazladır. Dahası, yeşil çay ve yeşil çaydan elde edilmiş olan kateşin ve epikateşinlerin de, antikarsinojenik etkisi olduğu, bunun yanı sıra oksidatif stres ve nörolojik hastalıkları önlemede de etkili oldukları gösterilmiştir [130,131]

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Çalışmada Kullanılan Sirke Örnekleri

Bu çalışmada, selüloz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla; farklı illerden temin edilen, elma sirkesi (Çubuk, Ankara, 2018; Polatlı, Ankara, 2018 ve Sazlıca, Niğde, 2020), üzüm sirkesi (Ayaş, Ankara, 2018), nar sirkesi (Etimesgut, Ankara, 2019) ve kiraz sirkesi (Etimesgut, Ankara, 2017) kullanıldı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Mikrobiyal selüloz üretiminin ve üretim koşullarını etkileyen faktörlerin araştırıldığı bu çalışmada ev yapımı sirke örneklerinden, mikrobiyal selüloz üreten bakterilerin izole edilmesi amacıyla Hestrin-Schramm besiyeri (HS), Hestrin-Schramm Agar besiyeri (HSA), Glukoz, Maya özütü ve Kalsiyum Agar (GYCA) besiyeri, Yamanaka Agar ve Frateur Agar besiyerleri kullanılırken, mayaların izolasyonu ise Malt Özütü Agar besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi [1, 2]

3.2.1. HS ve HSA Besiyeri (Hestrin-Schramm, Hestrin-Schramm Agar)

HS besiyeri içeriği g/L olarak;

D-Glukoz	20
Maya özütü	5
Pepton	5
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7
Sitrik asit	1,15

250 ml'lik erlenmayerde 100 ml olacak şekilde hazırlanan besiyerinin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6' ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Bu besiyeri selüloz üreticisi bakteriler için seçici olmasının yanı sıra selüloz üretiminin belirlenmesi için de kullanıldı [47]. HS besiyerine %1,5 g olacak şekilde agar eklenmesi ile hazırlanan HSA besiyeri ise sterilizasyon sonunda steril

petrilere dökülerek, mikroorganizma izolasyonu ve makroskopik incelemeler için kullanıldı.

3.2.2. GYCA Besiyeri (Glukoz, Maya özütü ve Kalsiyum Agar)

GYCA besiyeri içeriği g/L olarak;

D-glukoz	50
Maya özütü	10
CaCO ₃	30
Agar	15

Asetik asit üreticisi olan bakteriler için seçici olan bu besiyeri 250 ml'lik erlenmayerde 100 ml olacak şekilde hazırlandı. Besiyerinin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6'ya ayarlanarak 110 °C'de 1.5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi [49]. Sterilizasyon sonunda steril petrilere dökülerek, mikroorganizma izolasyonu ve makroskopik incelemeler için kullanıldı.

3.2.3. Yamanaka Besiyeri

Yamanaka besiyeri, içeriğinde farklı karbon, azot ve mineral kaynakları bulunduğu için, çalışmada kullanılan farklı sirke çeşitlerinden HS besiyeri kullanılarak izole edilemeyen diğer mikroorganizma türlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Yamanaka besiyeri içeriği g/L olarak;

Sukroz	50
Maya özütü	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
KH ₂ PO ₄	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,005
Agar	15

250 ml'lik erlenmayerde 100 ml olacak şekilde hazırlanan besiyerinin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6' ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Sterilizasyon sonunda steril petrilere dökülerek, selüloz üreticisi bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanıldı [50].

3.2.4. Frateur Besiyeri

Frateur besiyeri içeriği g/L olarak;

D-glukoz	5
Pepton	10
Maya özütü	5
CaCO ₃	15
Agar	15

Hazırlanan besiyerinin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6' ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, steril edilen besiyerine %3 etanol (%80 v/v) ilave edildi ve steril petrilere döküldü. Bu besiyeri, etanolü de karbon kaynağı olarak kullanan mikroorganizmaların izolasyonu için kullanıldı [51].

3.2.5. Malt Özütü Agar

Malt Özütü Agar besiyeri içeriği g/L olarak;

Malt özütü	30
Pepton	5
Agar	15

Hazırlanan besiyerinin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 5.5' e ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi ve steril petrilere döküldü. Bu besiyeri maya ve fungusların izolasyonu için kullanıldı [51, 52].

3.3. Çeşitli Sirkelerden Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışmada, sirkeden mikroorganizmaların izolasyonu için De Wulf et al.'nin önerdiği yöntem kullanıldı [48]. İzolasyon kaynağı olarak kullanılan ev yapımı sirkelerden steril koşullar altında 1'er ml alınarak, test tüplerinde hazırlanan 9 ml'lik HS besiyerine ekim yapıldı ve statik koşullar altında 30°C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (MİPROLAB® MLİ120, Ankara/Türkiye). İnkübasyon sürecinin sonunda, kültürler seri sulandırma yöntemi ile 10⁻³'e kadar seyreltildi. Sulandırım yapılan tüplerden 0,1 ml alınarak izolasyon için hazırlanan HSA, GYCA, Yamanaka Agar, Frateur Agar ve Malt Özütlü Agar besiyerlerine tek koloni ekim tekniği ile ekildi ve 30 °C'de 168 saat boyunca statik koşullarda inkübasyona tabii tutuldu (MİPROLAB® MLİ120, Ankara/Türkiye).

İnkübasyon sürecinin sonunda farklı koloni morfolojilerine sahip örnekler HS besiyerine sıvı süspansiyon ekim tekniği ile ekilerek, 30°C'de 72 saat statik koşullarda inkübe edildi (MİPROLAB® MLİ120, Ankara/Türkiye). İnkübasyonun ardından besiyeri yüzeyinde membran şeklinde mikrobiyal selüloz tabakasının oluşumu değerlendirildi.

HS besiyerinde selüloz ürettiği belirlenen ve Gram boyama yöntemiyle morfolojileri ve gram özellikleri değerlendirilen izolatlar, HSA ve GYCA besiyerlerine ekilip, stok kültürler +4 °C'de muhafaza edildi. Ayrıca, söz konusu mikroorganizmalar diğer çalışmalarda kullanılmak üzere %15'lik gliserollü HS besiyerine ekilerek, -20 °C'de saklandı [53].

3.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimini Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretimini belirlenmesi amacıyla uygun üretim ortamında inkübasyon sürecinin tamamlanması sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan mikrobiyal selülozlar toplanıp distile su ile temizlendikten sonra, 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edilerek besiyeri ve mikroorganizmaların selüloz tabakalarından uzaklaştırılması sağlandı [54]. Santrifügasyonun ardından selüloz tabakaları 30°C'de kurutulup hassas terazi ile tartıldı. Mikrobiyal selüloz miktarı kuru ağırlık cinsinden g/L olarak aşağıdaki formüle göre belirlendi.

$$\text{Litrede Üretim (g/L)} = \text{Mikrobiyal Selüloz Miktarı (g/ ml)} \times 1000$$

3.5. Sirkeden İzole Edilen Mikroorganizmaların Selüloz Üretimlerinin Araştırılması

İzole edilen mikroorganizmalar HS besiyeri bulunan deney tüplerine ekilerek 30 °C’de 72 saat boyunca zenginleştirildi. 72 saatlik inkübasyon sürecinin ardından zenginleştirilen kültürler HS besiyerlerine %10 ekim oranı ile ekildi ve statik koşullar altında 30 °C’de 168 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı belirlendi. Böylece izolatlar arasından selüloz üretim miktarı en yüksek olan bakteriler selüloz üreticisi olarak seçildi.

Sirke örneklerinden izole edilen ve HS besiyerinde zenginleştirilen maya türleri ise GYCA besiyerine yayma plak ekim tekniği ile ekildi ve 30°C’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda beyaz renkteki GYCA besiyerinde etanol üreterek renk değişikliğine neden olduğu belirlenen maya izolatları etanol üreticisi olmaları nedeniyle selüloz üretimine yardımcı olabilecekleri öngörülerek çalışmaya dahil edildi.

3.6. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılacak olan mikroorganizmaların ve karışık kültürlerin belirlenmesi amacıyla, HS besiyeri kullanıldı. HS besiyerine 30 °C’de 72 saat boyunca inkübe edilerek zenginleştirilen saf haldeki iki bakteri ve iki maya izolatı farklı oranlarda karıştırılması ile hazırlanan farklı kültürler ile ekim gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1.’de gösterildiği gibi, ilk olarak nar sirkesinden izole edilen CM1 kodlu maya ve kiraz sirkesinden izole edilen CM2 kodlu maya, nar sirkesinden izole edilen ve mikrobiyal selüloz üreticisi olduğu belirlenenen CB1 kodlu bakteri ile 1:1, 1:2, 2:1 oranlarında bir araya getirilerek karışık kültürler hazırlandı. Daha sonra bu maya izolatları, mikrobiyal selüloz üreticisi olduğu belirlenen ve kiraz sirkesinden izole edilen CB2 kodlu bakteri ile aynı oranlarda bir araya getirilerek karışık kültürler hazırlandı (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. Mikrobiyal selüloz üretiminin araştırılması için hazırlanan karışık kültürler

Bakteri/Maya	1:1 (B/M)	1:2 (B/M)	2:1 (B/M)
CB1+CM1	1CB1/1CM1	1CB1/2CM1	2CB1/1CM1
CB1+CM2	1CB1/1CM2	1CB1/2CM2	2CB1/1CM2
CB2+CM1	1CB2/1CM1	1CB2/2CM1	2CB2/1CM1
CB2+CM2	1CB2/1CM2	1CB2/2CM2	2CB2/1CM2

Hazırlanan kültürler ile son hacim %10 olacak şekilde HS besiyerlerine ekim gerçekleştirilerek, statik koşullarda 30 °C'de 168 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve en yüksek miktarda selüloz üretimini gerçekleştiren kültürler saptanarak, çalışmaya bu karışık kültürler ile devam edildi.

3.7. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Tanımlanması

3.7.1. Mikroorganizmaların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Sirke örneklerinden izole edilen bakteriler, HSA, Frateur Agar ve GYCA besiyerlerine, çalışmada kullanılmak üzere seçilen maya izolatları ise HSA, GYCA ve Malt Özütü Agar besiyerlerine tek koloni ekim tekniği ile ekildi ve 30 °C'de 168 saat boyunca inkübe edildi. Petrielerde oluşan koloniler makroskobik ve mikroskobik yöntemlerle incelendi.

Sirke örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların Gram özelliklerinin ve morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla Gram boyama ve metilen mavisi boyama yöntemleri kullanıldı. HSA ve GYCA besiyerlerinde 72 saat boyunca 30°C'de statik koşullarda inkübe edilen kültürlerden alınan örnekler lam üzerine distile su ile yayılarak preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Gram boyama ve metilen mavisi boyama yöntemleri ile boyanarak, 100x'lik objektifte incelendi. Bu yöntemle izolatların Gram özellikleri ve morfolojileri belirlendi [55].

3.7.2. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

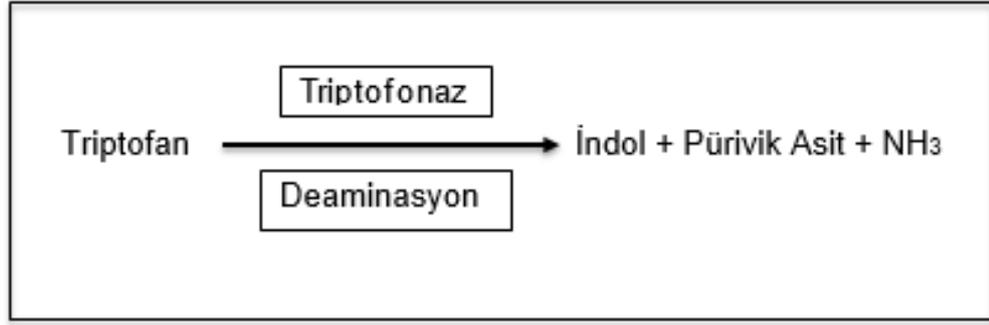
Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve tür düzeyinde tanımlanmaları Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı, 1984 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) kriterleri esas alınarak yapıldı [51,56]

3.6.2.1. Hareketlilik Testi

Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin hareketlilik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, deney tüplerinde dik olarak dondurulmuş olan 9 ml'lik yarı katı HS besiyerlerine, 72 saat boyunca HS besiyerinde ön inkübasyonu gerçekleştirilen bakteri kültürlerinden, batırma ekim tekniği ile ekim yapıldı. Kültürler 72 saat boyunca 30 °C'de statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda bakterilerin hareketi belirlendi. Besiyerinin tamamına yayılan üreme pozitif sonuç olarak değerlendirilirken, izolatın yalnızca ekim çizgisi boyunca gözlenen üremesi, negatif sonuç olarak değerlendirildi [51].

3.7.2.2. İndol Halkası Oluşumu

İndol, bir aminoasit olan triptofanın triptofanaz enzimi ile parçalanması ile ortaya çıkan aromatik bir bileşiktir ve ortama ilave edilen kovaks çözeltisi ile tepkimeye girerek kırmızı renkte halka oluşumuna neden olur (Şekil 3.1). Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin triptofanaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlenmesi amacıyla, HS besiyerinde üretilen kültürlerden 1'er ml alınarak, hazırlanan 9 ml'lik Triptonlu besiyerlerine (20 g Tripton, 5 g NaCl, 1000 mL distile su) ekim yapıldı [51]. Kültürler 30°C'de statik koşullar altında 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda kültür ortamına, Triptofanın triptofanaz enzimi ile hidrolize edilmesiyle ortaya çıkan indol ile reaksiyona giren p-dimetilaminobenzaldehit bulunan kovaks çözeltisi damlatıldı ve tüplerde kırmızı halka oluşumu değerlendirildi. Tüp yüzeyinde kırmızı renkte halka oluşumu triptofanaz enzimi varlığını göstermesi nedeniyle pozitif sonuç olarak kabul edilirken, söz konusu izolatın açık kahverengi halka oluşumu ise negatif sonuç olarak değerlendirildi [51,57].



Şekil 3.1. İndol oluşum mekanizması [51].

3.7.2.3. Karbohidrat Fermentasyonu Testi

İzole edilen bakterilerin karbohidratları fermente etme özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla glukoz, fruktoz, sukroz ve laktoz kullanıldı. Söz konusu karbon kaynaklarını içeren ve indikatör olarak içeriğinde fenol kırmızısı bulunan sıvı besiyerlerine %10 oranında ekim yapıldı ve kültürler 30 °C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda, karbohidratların mikroorganizmaların hidrolaz enzimleri ile hidrolize edilmesi sonucunda asit oluşumu nedeniyle, besiyeri renginin sarıya dönmesi ve fermentasyon sonucunda ortaya çıkan gazın, durham tüplerinde gaz kabarcıkları oluşturması, pozitif sonuç olarak kabul edildi [58].

3.7.2.4. Nitrat Redüksiyonu Testi

Çalışmada izole edilen bakterilerin nitratı, nitrite redükte etme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, nitrat redüksiyon testi yapıldı. Sirke örneklerinden izole edilen bakteri örnekleri Nitrat besiyerine (3 g Et özütü, 5 g Pepton, 1 g KNO₃, 1000 mL distile su) ekildi ve 30 °C'de 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerden 1'er ml alınarak üzerlerine, ortamdaki nitritin varlığında karışımının pembemsi-kırmızı renk almasını sağlayan sülfanilik asit çözeltisi ve α -naftol çözeltisi ilave edildi. Söz konusu rengin oluşumu nitrat redüksiyonu için pozitif sonuç olarak kabul edilirken, renk değişiminin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi. Buna ek olarak nitratın amonyağa kadar parçalanması durumunda gözlemlenebilecek sonucu elemek amacıyla, test tüplerine Nessler ayracı ilave edilerek test tüpünde amonyak varlığı araştırıldı. Test

tüpünde renk değişimi pozitif sonuç olarak değerlendirilirken, renk değişiminin olmaması negatif sonuç olarak kabul edildi [58,59].

3.7.2.5. Jelatin Hidrolizi Testi

Sirke örneklerinden izole edilen bakteriler %10 jelatin içeren nutrient broth besiyerine iğne uçlu öze kullanılarak ekildi ve 30°C’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda jelatin içeren besiyerinde jelatinin parçalanması ve besiyerinin sıvı hale gelmesi mikroorganizmada jelatinaz enzimi varlığı açısından pozitif sonuç olarak kabul edilirken, besiyerinin katı formunu koruması negatif sonuç olarak değerlendirildi. [58].

3.7.2.6. Katalaz Testi

Sirke örneklerinden izole edilen bakteri kültüründen alınan örnekler öze ile lam üzerine yayıldı. Kültürlerin üzerine % 3’lük 1ml hidrojen peroksit çözeltisi damlatılarak lam yüzeyinde hava kabarcıklarının oluşumu değerlendirildi. Hava kabarcıklarının oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edildi [58, 60].

3.7.3. Mikroorganizmaların Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması

Sirke örneklerinden izole edilen ve çalışmada kullanılmak üzere seçilen mikroorganizmalar, genotipik yöntemlerle tanımlandı. Bunun için HS besiyerine ekilen ve üreme hızının düşük olması nedeniyle standart DNA izolasyonu prorokülünden farklı olarak, 72 saat boyunca 30 °C’de 100 rpm çalkalama hızında inkübasyona tabii tutulan mikroorganizma kültürleri kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi [61]. Agaroz jel elektroforezi ile DNA bantları gözlenen örnekler, 16S rRNA analizi ve 18S rRNA analizlerinin gerçekleştirilmesi için BM Biyoteknoloji Merkezi’ne gönderildi ve tür bazında tanımlama yapıldı.

3.7.3.1. DNA İzolasyonu

Sirke örneklerinden izole edilen ve çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmaların DNA izolasyonları, NucleoSpin® Microbial DNA Kit (Macherey - Nagel) protokülü ile yapıldı.

NucleoSpin® Microbial DNA kiti DNA izolasyon protokolü:

- HS besiyerine ekilen ve 72 saat boyunca 30 °C’de 100 rpm çalkalama hızında inkübasyona tabii tutulan mikroorganizma kültürleri, steril ependorf tüplere alınarak, 8000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldı ve pelete 40 µl elüsyon tamponu eklenerek ‘NucleoSpin Bead Tube Type B’ye aktarıldı.
- Tüp içinde yer alan karışıma, 40 µl MG tamponu (bağlama tamponu) ve 10 µl Proteinaz K eklendi. Bakteri izolatları için 4 dakika, maya izolatları için ise 12 dakika boyunca çalkalanarak DNA dışındaki hücre materyallerinin parçalanması sağlandı.
- Çalkalama işleminin ardından elde edilen homojen karışıma 600 µl MG tamponu eklendi ve karışım 12000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminin ardından 500 µl örnek alındı ve içinde silika membran bulunan Mikrobiyal DNA Kolonu’na aktarıldı, 12000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüje tabii tutuldu. Böylece DNA’nın kolon içerisinde yer alan silika membrana tutunması sağlandı.
- Kolon içinde yer alan silika membranın yıkanması BW (yıkama tamponu) ve B5 (liziz tamponu) tamponlarından sırasıyla 500’er µl ilave edilip 12000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj işleminden sonra DNA kolonunun altındaki sıvı uzaklaştırılarak, kolonun yer aldığı tüp tekrar 12000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüj edildi ve böylece silika membranın kurutulması sağlandı.
- Kurutma basamağının ardından DNA kolonu steril ependorf tüplerinin içine yerleştirildi ve DNA’nın bağlanmış olduğu silika membranın üstüne 100 µl elüsyon tamponu ilave edilerek, kolon 12000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüje tabii tutuldu. Böylece DNA’nın silika membrandan ayrılarak, steril ependorf tüpünün içine aktarılması sağlandı.

İzole edilen DNA örnekleri jel elektroforezinde yürütülmek üzere -20°C 'de muhafaza edildi.

3.7.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Sirke örneklerinden izole edilen ve çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalardan izole edilen DNA'ların gözlenmesi amacıyla agaroz jel elektroforez yöntemi aşağıda belirtilen şekilde uygulandı [15].

- DNA fragmentlerinin ayrımı için, 1 gram agaroz tartılarak, pH değeri 8,3'e ayarlanan 100 ml 1X TBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA; 10,8 g Tris Base, 5,5 g Borik Asit, 1,488 g EDTA) içerisine eklendi ve karışım mikrodalga fırında eritildi. Homojen bir karışım elde edildikten sonra, hazırlanan jelin oda sıcaklığında $50-60^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulması sağlandı.
- Soğuyan jele, DNA zincirlerine bağlanarak DNA'nın UV ışık altında gözlenmesini sağlayan etidyum bromür boyasından $4\ \mu\text{l}$ (5mg/ml) ilave edildi ve jel hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dikkatlice karıştırılarak daha önceden tarak yerleştirilmiş olan yatay elektroforez tankına döküldü ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için soğumaya bırakıldı.
- Polimerizasyon işleminin ardından tanka jelin üstünü kaplayacak miktarda 1X TBE tamponu eklendi. Böylece jel DNA yüklemeye hazır konuma getirildi.
- Yüklemeye hazır konuma gelen jele ilk olarak, DNA örneklerinin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi amacıyla birinci kuyucukta olacak şekilde $5\ \mu\text{l}$ 1kb boyutundaki DNA marker'ı (Invitrogen- Thermo Fisher) yüklendi. Devamında ise DNA örneklerinden $3\ \mu\text{l}$ alındı ve $2\ \mu\text{l}$ yükleme tamponu ile karıştırılarak birer kuyucuk aralık bırakacak şekilde yükleme gerçekleştirildi.
- Yükleme işleminin ardından elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak örnekler 100V altında 1 saat boyunca yürütüldü.
- Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra jel, elektroforez tankından çıkartılarak jel görüntüleme cihazına yerleştirildi ve DNA bantları görüntüledi.

3.7.3.3. Moleküler Tanımlama

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların tür bazında tanımlamaları, gen dizileme yöntemi ile BM Biyoteknoloji Merkezi'nde (Ankara) yapıldı.

3.8. Mikrobiyal Selüloz Üretimine Araştırılması

3.8.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim

Mikrobiyal selüloz üretiminde zenginleştirme ortamı olarak kullanılan HS besiyerinde 30 °C'de 72 ve 168 saat süresince ön inkübasyon gerçekleştirildi. *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan kültür HS besiyerine %10 oranında ekildi. 72 ve 168 saat süren inkübasyon sürelerinin sonunda, %1 yeşil çay besiyerine %10 oranında ekilerek, statik koşullarda 30 °C de 168 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, besiyerleri üzerinde oluşan mikrobiyal selüloz tabakaları toplanıp mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi.

3.8.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Alternatif Üretim Ortamlarının Araştırılması

Çalışmamızda mikrobiyal selüloz üretimi için kullanılan ve ticari olarak temin edilen HS besiyerine alternatif olacak üretim ortamının belirlenmesi hedeflenmektedir.

Mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilebilmesi için alternatif bir besiyerinin araştırılmasının amaçlandığı çalışmamızda, üretim ortamı olarak hibiskus çayı, siyah çay ve yeşil çay kullanıldı. Bunun için %1 çay konsantrasyonu olacak şekilde hassas terazi ile tartılan çay yaprakları 5 dakika boyunca 100°C'deki distile su ile demlendi. Demleme sürecinin sonunda, hazırlanan her bir çaya %4 oranında D-glukoz ilave edildi. Besiyerinin pH değeri 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile pH 6'ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen çay besiyerlerine, HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen, *Komagataeibacter europaeus* ve *Komagataeibacter europaeus* ile *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan kültürler %10 oranında ayrı ayrı ekim yapıldı ve hazırlanan kültürler 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. Böylelikle,

aynı zamanda farklı bitki çaylarında iki kültürün mikrobiyal selüloz üretim miktarlarının karşılaştırılması sağlandı.

İnkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu çay belirlenerek çalışmaya bu çay ile devam edildi.

3.8.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Çay Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda düşük maliyetli mikrobiyal selüloz üretimi amacıyla 3 çeşit bitki çayı arasından en yüksek selüloz üretiminin gerçekleştirildiği yeşil çay, üretim ortamı olarak kullanıldı. Yeşil çay konsantrasyonunun mikrobiyal selüloz üretimine etkisini araştırmak amacıyla %1-%15 arasında değişen konsantrasyonlarda yeşil çay, 5 dakika boyunca 100°C'deki distile su ile demlendi. Demleme sürecinin sonunda, hazırlanan her bir çaya %4 oranında D-glukoz ilave edildi. Besiyerinin pH değeri 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile pH 6'ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen çay besiyerlerine, *Komagataeibacter europaeus* ile *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür ile %10 oranında ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu çay konsantrasyonu belirlenerek çalışmaya söz konusu çay konsantrasyonu ile devam edildi.

3.8.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon ve İlave Azot Kaynağının Belirlenmesi

3.8.4.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon Kaynağının Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan karbon kaynağının mikrobiyal selüloz üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, %10 yeşil çay ile hazırlanan besiyerine %4 oranında; D-glukoz, sukroz, laktoz, maltoz, fruktoz ve galaktoz ayrı ayrı ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile pH 6'ya ayarlanarak 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen besiyerlerine, *Komagataeibacter europaeus* ile *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir

araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür ile %10 ekim oranında ekildi ve 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürecinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarları (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu karbon kaynağı belirlenerek çalışmaya söz konusu karbon kaynağı ile devam edildi.

3.8.4.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon Kaynağı Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretiminde en yüksek verimin sağlandığı karbon kaynağının (D-glukoz) farklı konsantrasyonlarının mikrobiyal selüloz üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla %10 yeşil çay ile hazırlanan besiyerine seçilen karbon kaynağı %2-%16 oranında ayrı ayrı ilave edildi. Besiyerinin pH'sı 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6'ya ayarlanıp 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen besiyerlerine *Komagataeibacter europaeus* ile *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür ile %10 oranında ekilerek 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarları (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu karbon kaynağı konsantrasyonu belirlenerek çalışmanın devamında kullanıldı.

3.8.4.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için İlave Azot Kaynağının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çaya ilave edilen azot kaynağının ve azot kaynağı konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilen çay konsantrasyonu (%10 yeşil çay) ve karbon kaynağı (%10 D-glukoz) kullanılarak hazırlanan yeşil çay besiyerine, sırasıyla % 0,5, %1 ve %1.5 oranında maya özütü, pepton, KNO₃, NH₄SO₃ ve kazein ayrı ayrı ilave edildi. Besiyerinin pH'sı 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 6'ya ayarlanıp 110 °C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen besiyerlerine HS besiyerinde 168 saat boyunca

zenginleştirilen *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan kültür %10 ekim oranı ile ekilerek 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi. Çalışmanın devamında, mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu ilave azot kaynağı belirlenen konsantrasyonda besiyerine ilave edildi.

3.9. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması

3.9.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

Üretim ortamına ait başlangıç pH değerinin mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla pH 2,0 ile 8,0 arasında değişen pH' larda hazırlanan yeşil çay besiyerine (%10 yeşil çay, %10 glukoz), *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür %10 oranında ayrı ayrı ekildi ve 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu pH değeri belirlenerek çalışmanın devamında bu pH değeri kullanıldı.

3.9.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi

Kültürlerin farklı konsantrasyonlarının mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, %10-%30 arasında değişen oranlarda ayrı ayrı ekilerek 30°C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretimin en yüksek olduğu ekim miktarı belirlenerek çalışmanın devamında seçilen ekim miktarı kullanıldı.

3.9.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi

İnkübasyon sıcaklık değerinin mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, seçilen ekim oranı (%20) ile ayrı ayrı ekilerek, 4°C, 25°C, 30°C ve 37°C'lik etüvlerde, 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlendi ve mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek olduğu sıcaklık değeri belirlenerek çalışmanın devamında seçilen sıcaklık değeri kullanıldı.

3.9.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı Çalkalama Hızlarının Etkisinin Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun inkübasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, seçilen ekim oranı (%20) ile ayrı ayrı ekilerek, 30°C'de 168 saat boyunca, 0 rpm, 50 rpm, 100 rpm ve 200 rpm çalkalama hızlarında 168 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlenerek, çalkalama hızının mikrobiyal selüloz üretimine etkisi belirlendi ve çalışmanın devamında seçilen inkübasyon yöntemi kullanıldı.

3.9.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin, mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, seçilen ekim oranı (%20) ile ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 30°C'de, statik ortamda, 24, 72, 120, 168, 240, 360 ve 480

saat olacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlenerek, inkübasyon süresinin mikrobiyal selüloz üretimine etkisi belirlendi ve çalışmanın devamında seçilen inkübasyon süresi kullanıldı.

3.10. Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etki Eden Diğer Faktörlerin Belirlenmesi

3.10.1. Üretim Ortamına Eklenen Çeşitli Maddelerin Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Üretim ortamına ilave edilen farklı bileşiklerin, mikrobiyal selüloz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan çay besiyerine (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5), % 1, % 1,5 ve % 2 oranında farklı maddeler (Askorbik asit, Ayçiçek yağı, Zeytinyağı, Hindistan cevizi yağı) ilave edildi. Hazırlanan besiyerlerine, HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin kültürü, %20 oranında ayrı ayrı ekilerek, 30°C'de 168 saat boyunca statik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlenerek, bu bileşiklerin mikrobiyal selüloz üretimine etkisi araştırıldı.

3.10.2. Işığın Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Işığın mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisinin saptanması amacıyla seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, seçilen ekim oranı (%20) ile ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon, karanlık ve aydınlık ortamlarda 30°C'de 240 saat boyunca statik olarak gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlenerek ışığın mikrobiyal selüloz üretimine etkisi araştırıldı.

3.11. Yeşil Çayın Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Çalışmamızda düşük maliyetli mikrobiyal selüloz üretiminin sağlanması amacıyla, alternatif üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çayın, atık olarak tekrar değerlendirilebilmesi de araştırıldı. Bunun için alternatif üretim ortamının hazırlanması

sonucunda ortaya çıkan atık yeşil çay yaprakları 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 kez tekrar demlenerek kullanıldı. Bunun için seçilen çay konsantrasyonu, karbon kaynağı ve pH değeri (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) kullanılarak hazırlanan çay besiyerine *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür, seçilen ekim oranı (%20) ile ayrı ayrı ekildi ve 30 °C'de 168 saat boyunca statik inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonunda, mikrobiyal selüloz üretim miktarı (g/L) belirlenerek, atık yeşil çayın mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılabilirliği araştırıldı.

3.12. Mikrobiyal Selülozun Yıkınması ve Kurutulması

Belirlenen en uygun besiyerinde (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5), *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür ile gerçekleştirilen inkübasyon süreci sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan mikrobiyal selüloz tabakaları toplanarak öncelikle distile su ile yıkandı. Sonrasında 70 °C'deki 0,1 M NaOH çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Daha sonra % 1'lik asetik asit ile muamele edilen mikrobiyal selüloz, rengi açılıp, pH değeri 7 olana kadar distile su ile birkaç kez yıkanarak 30 °C'de kurutuldu [62].

3.13. Mikrobiyal Selülozun Karakterizasyonu

Çalışma sonucunda elde edilen ve temizlenip, kurutulan mikrobiyal selülozun özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (HÜNİTEK) hizmet alımı yapılarak, karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Mikrobiyal selülozun yüzey görüntüsü, taramalı elektron mikroskobu (SEM), yapısındaki elementler ve bu elementlerin birbiriyle bağlanmaları ise Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve termal kararlılık değeri ise Termogravimetrik Analiz cihazı (TGA) ile karakterize edildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Endüstriyel ürünlere olan talep her geçen gün artmaktadır. Günümüzde, malzeme biliminin en önemli ilgi alanlarından biri sürdürülebilir doğal kaynaklardan, farklı ve gelişmiş özelliklere sahip olan biyomateryallerin üretilmesidir. Enerji, yakıt ve malzeme gibi endüstriyel öneme sahip olan ürünlerin üretimi için hammadde olarak yenilenebilir kaynaklara yönelim artmıştır. Bu bağlamda ise doğal kaynaklardan elde edilen polisakkaritler ve polimerler malzeme ve materyal endüstrisinde önemli ölçüde öne çıkmaktadır. Selüloz da doğada en bol bulunan biyopolimerlerden bir tanesidir ve birçok farklı uygulamada kullanılabilen tükenmez bir hammadde kaynağıdır. Doğadaki selülozun ana kaynağı çok yıllık bitkiler olmasına karşın, bakteriler de hücre dışında selüloz üretebilmektedir. Bakteriler tarafından üretilen bu polimer mikrobiyal selüloz olarak adlandırılmaktadır ve bitkilerden elde edilen selüloz ile kıyaslandığında, hemiselüloz ve lignin gibi bileşiklerle bir arada bulunmaması ve saflık derecesinin yüksek olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Mikrobiyal selüloz geleneksel olarak sentetik ve yüksek maliyetli besiyerleri kullanılarak üretilmekte, bu da mikrobiyal selülozun büyük ölçekli kullanımını sınırlamaktadır. Bu noktada günümüzde mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif üretim ortamları araştırılmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda farklı sirkelerden izole edilen mikroorganizmalar ile oluşturulan karışık kültürler ile bitki çaylarından hazırlanan üretim ortamında mikrobiyal selüloz üretimi amaçlandı.

4.1. Çeşitli Sirkelerden Mikroorganizmaların İzolasyonu

Mikrobiyal selülozun *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Sarcina* cinslerine ait bakteriler tarafından sentezlendiği bilinmesine rağmen, endüstriyel amaçlı mikrobiyal selüloz üretiminde en çok kullanılan bakteriler sirke bakterisi olarak da bilinen *Acetobacter* cinsine aittir ve bu bakterilerin doğal kaynağının sirke olduğu bilinmektedir [28, 63]. Bu bağlamda bu çalışmada, mikrobiyal selüloz üreticisi olan mikroorganizmaların izolasyonu için ev yapımı; nar, üzüm, elma ve kiraz sirkeleri kullanıldı. Ev yapımı sirkelerden steril koşullar altında alınan örnekler, HS besiyerine ekilerek zenginleştirildikten sonra, seri sulandırma yöntemi ile seyreltilerek izolasyon için hazırlanan HSA, GYCA, Yamanaka Agar, Frateur Agar ve Malt Özütü Agar besiyerlerine tek koloni ekim tekniği ile ekildi ve statik koşullar altında 30°C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

İki farklı ilden temin edilen, ev yapımı 6 farklı sirke örneğinden inkübasyon sürecinin sonunda farklı koloni morfolojilerine sahip olduğu belirlenen 15 adet mikroorganizma izole edildi ve saf kültürleri elde edilen bu izolatlar birer kod ile isimlendirildi (Çizelge 4.1). İzolasyon sonrasında ilk olarak, elde edilen 15 mikroorganizmanın HS besiyerinde selüloz üretimleri değerlendirildi.

Çizelge 4.1. Farklı sirke örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve mikroorganizmalara verilen kodlar.

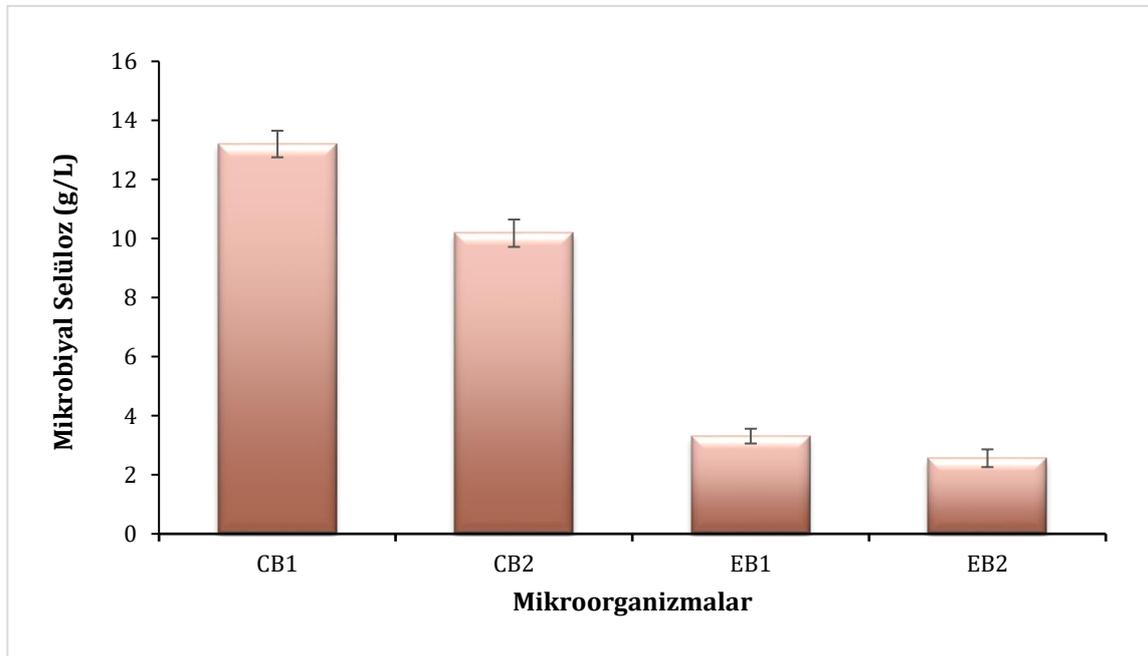
Mikroorganizmanın İzole Edildiği Sirke	İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Kodları
Elma Sirkesi (Çubuk, Ankara,2018)	EB1, EM1
Üzüm Sirkesi (Ayaş, Ankara,2018)	ÜB1, ÜB2,ÜB3, ÜM1
Elma Sirkesi (Polatlı, Ankara,2018)	EB2, EB3, EB4
Nar Sirkesi (Bağlıca, Ankara,2019)	CB1,CM1,
Kiraz Sirkesi (Bağlıca, Ankara, 2017)	CM2
Elma Sirkesi (Niğde, 2020)	CB2, NB1,NB2

HS besiyerinde selüloz üretimleri değerlendirilen bu 15 mikroorganizmadan, nar (CB1) ve elma sirkelerinden izole edilen (CB2, EB1, EB2) bakterilerin mikrobiyal selüloz ürettiği, geriye kalan 11 izolata ise HS besiyerinde selüloz üretmediği saptandı. Selüloz üretmeyen izolatlardan nar ve kiraz sirkesinden izole edilen (CM1, CM2) mayaların ise GYCA besiyerinde, etanol üreterek besiyerinin pH değerini değiştirdikleri ve besiyerinde renk değişimine neden oldukları belirlendi. Literatür taraması yapıldığında, asetik asit bakterileri tarafından glukonik asit ve asetik aside okside edilen etanolün üretimini gerçekleştirdikleri için, mikrobiyal selüloz üretiminde etkili olabilecekleri öngörülen bu mikroorganizmalar da çalışmanın devamında kullanılmak üzere, selüloz üreticisi olduğu belirlen bakteri örnekleri ile birlikte %15'lik gliserollü HS besiyerine ekilerek, -20 °C'de saklandı [64 - 66].

4.2. Sirkeden İzole Edilen Mikroorganizmaların Selüloz Üretimlerinin Araştırılması

Sirke örneklerinden izole edilen ve selüloz üreticisi olduğu belirlenen nar sirkesi (CB1) ve elma sirkesinden (CB2, EB1, EB2) izole edilen bakteri izolatları, HS besiyerine ekilerek 30 °C'de 168 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, en

yüksek mikrobiyal selüloz üretim miktarının 13,2 g/L olarak Ankara ilinden temin edilen nar sirkesinden izole edilen bakteri (CB1) tarafından gerçekleştirildiği belirlenirken, Niğde ilinden temin edilen elma sirkesinden izole edilen bakteriye (CB2) ait mikrobiyal selüloz üretiminin 10,18 g/L olduğu belirlendi ve bu bakteriler çalışmanın devamında kullanılmak üzere, mikrobiyal selüloz üreticisi olarak seçildi. İzolatlar arasından, en düşük mikrobiyal selüloz üretiminin Ankara'nın Çubuk ve Polatlı ilçelerinden temin edilen elma sirkelerinden izole edilen bakteriler (EB1, EB2) tarafından sırasıyla 3,31 g/L ve 2,56 g/L olmak üzere gerçekleştirildiği belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin HS besiyerinde mikrobiyal selüloz üretimleri

4.3. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Hemiselüloz, lignin gibi ikincil bileşikler içermeyen saf bir biyopolimer olan mikrobiyal selülozun endüstride pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak üretimin düşük verim ve yüksek maliyet ile gerçekleştirilmesi selülozun endüstriyel düzeyde kullanımı için büyük bir problem yaratmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın amaçlarından biri yüksek

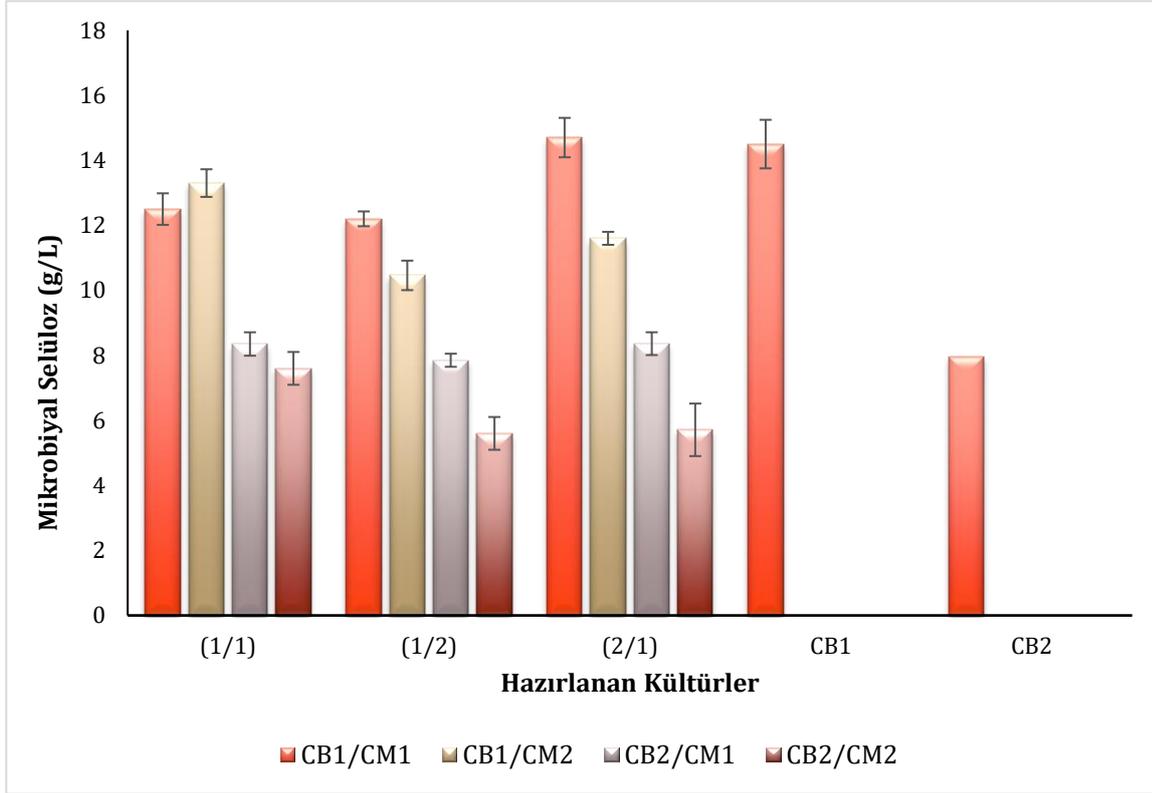
verimle selüloz üretimidir. Mikrobiyal selüloz endüstriyel olarak genellikle asetik asit bakterilerinin saf kültürleri ile üretilmektedir [1].

Çalışmamızda, mikrobiyal selüloz üretim veriminin arttırılması amacıyla ev yapımı sirkelerden izolasyonu gerçekleştirilen mikroorganizmaların hazırlanan karışık kültürleriyle selüloz üretimi araştırıldı.

Bunun için Bölüm 3.5.'de verildiği gibi izolatların farklı oranlarda bir araya getirilmeleri ile hazırlanan kültürler %10 ekim oranı sabit kalacak şekilde HS besiyerine ekilerek statik koşullar altında 168 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin ardından, en yüksek miktarda selüloz üretimini gerçekleştiren kültürler belirlendi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre optimizasyon öncesinde, nar sirkesinden izole edilen bakteri (CB1) ile yine nar sirkesinden izole edilen mayanın (CM1), 2:1 (2CB1/1CM1) oranında bir araya getirilmesiyle elde edilen kültür ile HS besiyerinde 14,7 g/L mikrobiyal selüloz elde edildiği ve bu karışık kültürün araştırılan karışık kültürler arasında en yüksek mikrobiyal selüloz üretimini gerçekleştirdiği belirlendi. Nar sirkesinden izole edilen bakterinin (CB1), HS besiyerindeki selüloz üretim miktarı 14.05 g/L iken, bakteri ve mayanın 2:1 oranında bir araya getirilmesiyle elde edilen kültürün (2CB1/1CM1) kullanılmasıyla elde edilen selüloz miktarının saf kültüre kıyasla %5 oranında arttığı saptandı. Bu nedenle çalışmaya nar sirkesinden izole edilen bakteri (CB1) ve nar sirkesinden izole edilen mayanın (CM1) 2:1 (bakteri/maya) oranında bir araya getirilmesi ile hazırlanan kültür (2CB1/1CM1) ile devam edildi.

Bunun yanı sıra, nar sirkesinden izole edilen bakterinin (CB1) saf kültürü ile elde edilen selüloz miktarı 14,01 g/L iken, kiraz sirkesinden izole edilen maya (CM2) ile 1:1, 1:2 ve 2:1 (bakteri/maya) oranlarda bir araya getirilmesiyle hazırlanan üç kültür ile elde edilen selüloz miktarının sırasıyla; 13.3, 10.46 ve 11.6 g/L olduğu ve üretimin saf kültür ile karşılaştırıldığında düştüğü belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Karışık kültürlerin HS besiyerinde selüloz üretimlerinin belirlenmesi

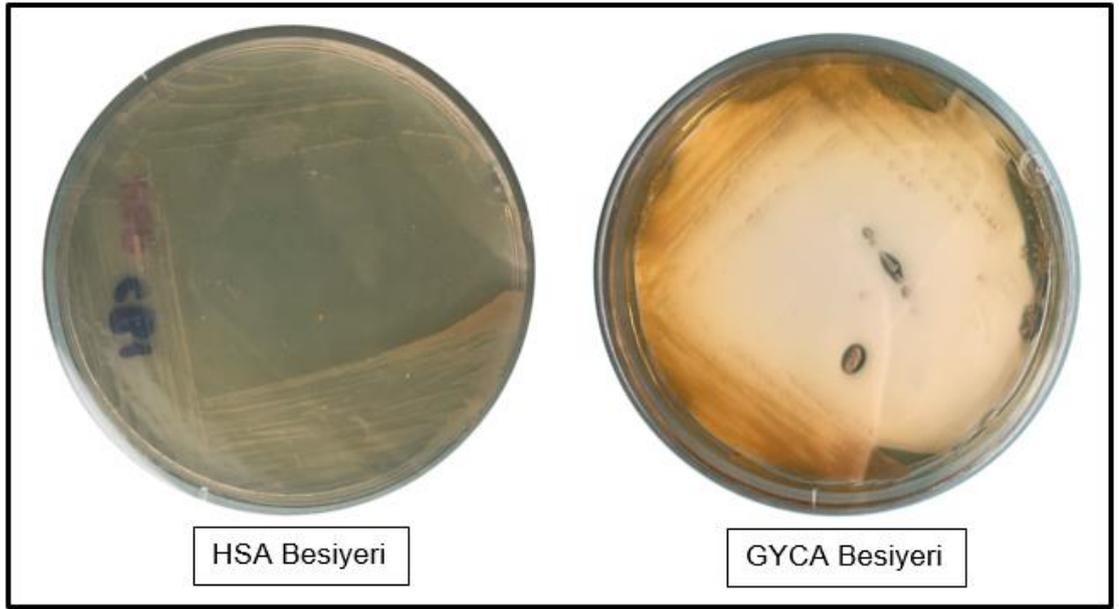
Fan ve arkadaşları tarafından, *Komagataeibacter xylinus* ile mikrobiyal selüloz üretimini araştırdıkları bir çalışmada, HS besiyerinde mikrobiyal selüloz üretiminin optimizasyon sonrasında 3,9 g/L olduğunu belirlenirken, Dubey ve arkadaşları ise *Komagataeibacter europaeus* SGP37 ile üretimin 9,98 g/L olarak belirlemiştir [67, 68]. Jacek ve arkadaşlarının *Komagataeibacter rhaeticus* K3 suşunu mikrobiyal selüloz üreticisi olarak kullandıkları bir çalışmada ise HS besiyerinde üretimin 5,46 g/L olduğunu bildirilmiştir [69].

4.4. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Kullanılacak Olan Mikroorganizmaların Tanımlanması

Çalışmanın devamında kullanılacak olan mikroorganizmaların tanımlanması için izolatların; kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Bölüm 3.5’de verildiği şekilde araştırıldı.

4.4.1. Mikroorganizmaların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

HSA, Frateur Agar ve GYCA besiyerlerine ekilen nar sirkesinden izole edilen selüloz üreticisi bakterinin (CB1), HSA ve Frateur besiyerinde krem renkte, küçük, konveks yapıda, mukoid ve düz kenarlı koloniler oluşturduğu saptanırken, GYCA besiyerinde ise beyaz renkte, küçük, konveks yapıda, düz kenarlı koloniler oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Ayrıca GYCA besiyerinde kalsiyum karbonatın asetik asit oluşumu ile çözülmesiyle birlikte besiyerinde şeffaf zon oluşumuna neden olduğu saptandı (Şekil 4.3).

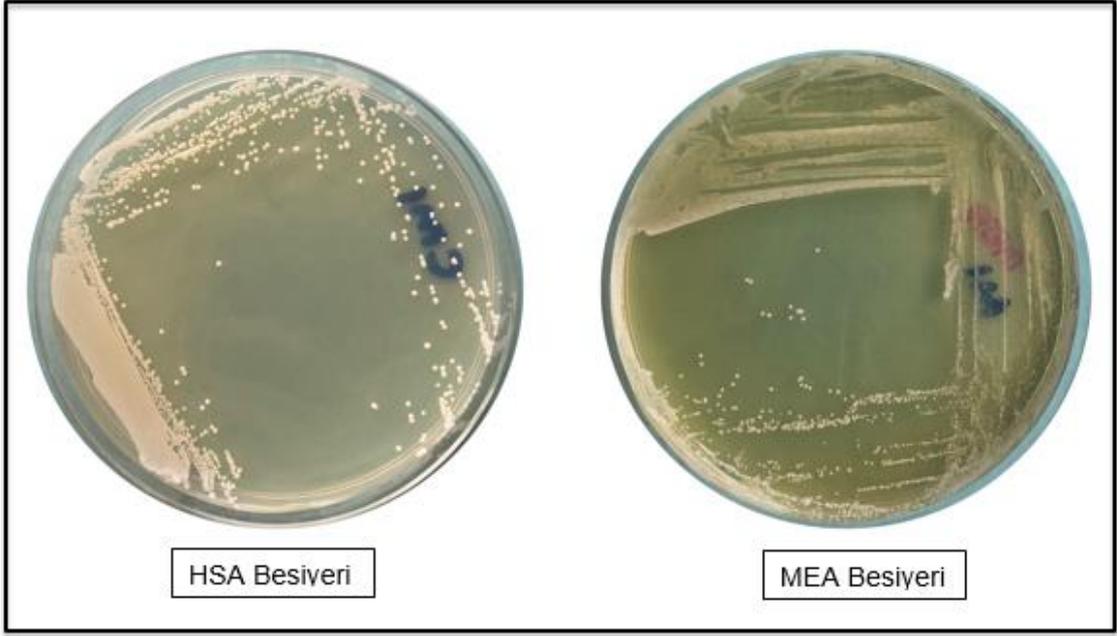


Şekil 4.3. Sirkeden izole edilen CB1 kodlu bakterinin HSA ve GYCA besiyerindeki makroskobik görüntüsü.

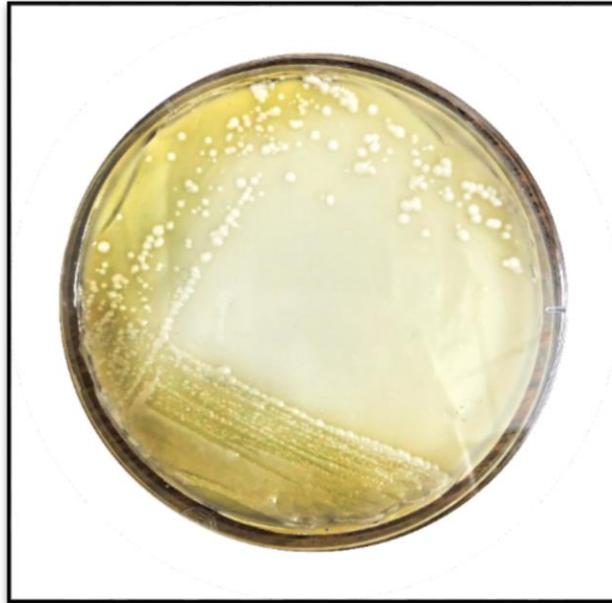


Şekil 4.4. Sirkeden izole edilen CB1 kodlu bakterinin Frateur besiyerindeki makroskopik görüntüsü

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen ve nar sirkesinden izole edilen maya (CM1), HSA, GYCA ve Malt Özütü Agar besiyerlerine ekilerek, inkübasyon süresinin ardından makroskopik olarak incelendi. İncelemenin sonunda HSA besiyerinde, beyaz renkte, büyük, konveks yapıda ve düz kenarlı koloniler oluşturduğu saptanırken, Malt Özütü Agar besiyerinde krem renge küçük, konveks yapıda ve düz kenarlı koloniler oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.5). Bunun yanı sıra GYCA besiyerinde renk değişimine neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).



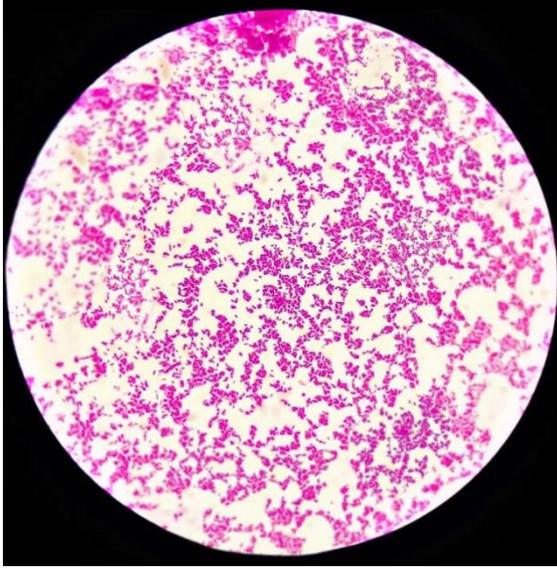
Şekil 4.5. Sirkeden izole edilen CM1 kodlu mayanın HSA ve Malt Özütü Agar (MEA) besiyerindeki görüntüsü.



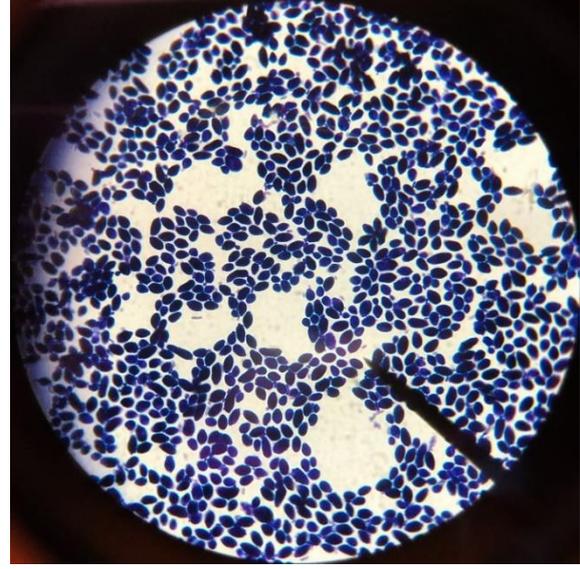
Şekil 4.6. Sirkeden izole edilen CM1 kodlu mayanın GYCA besiyerindeki görüntüsü

Sirke örneklerinden izole edilen ve çalışmada kullanılmak üzere seçilen bakteri ve mayaların makroskobik incelemelerle koloni morfolojileri belirlenirken, bakterilerin Gram boyama yöntemi, mayaların ise Metilen mavisi ile boyanmasıyla mikroskobik

olarak incelemeleri yapıldı. Boyama yapıldıktan sonra 100x'lik objektif ile incelenen bakterinin Gram negatif, basil şeklinde, küçük hücre yapısına sahip olduğu saptandı. Maya izolatının ise büyük, elipsoidal bir hücre yapısına sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.7).



a)



b)

Şekil 4.7. Sirkeden izole edilen mikroorganizmaların boyama sonucunda elde edilen mikroskopik görüntüleri

- a) Nar sirkesinden izole edilen bakterinin (CB1) Gram boyama yöntemi ile boyanması sonucunda elde edilen mikroskopik görüntüsü
- b) Nar sirkesinden izole edilen mayanın (CM2) Metilen boyası ile boyanması sonucunda elde edilen mikroskopik görüntüsü

4.4.2. Mikroorganizmaların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Sirke örneklerinden izole edilen bakterinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve tür tanımlanması için Bölüm 3.5.3'de belirtildiği gibi Bergey Sistemik Bakterioloji Kılavuzu, 1984 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) kriterleri esas alınarak, kullanılan testler buna göre yapıldı ve Çizelge 4.2'de verilen sonuçlar elde edildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde nar sirkesinden izole edilen bakterinin asetik asit bakterilerinden *Acetobacter* genusuna ait olduğu kabul edildi.

Çizelge 4.2. Tanımlamada kullanılan özellikler

Özellikler	CB1
Hareketlilik	-
İndol	-
Glukoz Fermantasyonu (Asit ve Gaz Oluşumu)	+
Fruktoz Fermantasyonu (Asit ve Gaz Oluşumu)	+
Sukroz Fermantasyonu (Asit ve Gaz Oluşumu)	+
Laktoz Fermantasyonu (Asit ve Gaz Oluşumu)	+
Nitrat Reaksiyonu	-
Jelatin Hidrolizi	-
Katalaz Testi	+

4.4.4. Mikroorganizmaların Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması

Sirke örneklerinden izole edilen ve çalışmada kullanılmak üzere seçilen mikroorganizmaların tanımlanmasında 16S rRNA ve 18S rRNA gen dizileme yöntemi kullanıldı. Sonuç olarak nar sirkesinden izole edilen CB1 kodlu bakteri, %99 benzerlik oranı ile *Komagataeibacter europaeus* ve nar sirkesinden izole edilen CM1 kodlu maya ise %99 benzerlik oranı ile *Zygosaccharomyces parabailii* olarak belirlendi.

4.5. Mikrobiyal Selüloz Üretiminin Araştırılması

4.5.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim

Mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı pek çok çalışmada, kullanılan kültür üretim süresinin kısaltılması ve kültür miktarının artırılması için 72 saat ile 240 saat arasında değişen ön inkübasyona tabii tutulmaktadır [70-72]. Zenginleştirme olarak isimlendirilen bu üretim basamağı, üretim süresini etkilediği için maliyeti etkileyen faktörlerden biridir. Bu nedenle çalışmamızda, üretim süresini kısaltmak ve maliyeti düşürmek amacıyla iki farklı zenginleştirme süresi değerlendirildi. Bunun için, *Komagataeibacter europaeus* ve

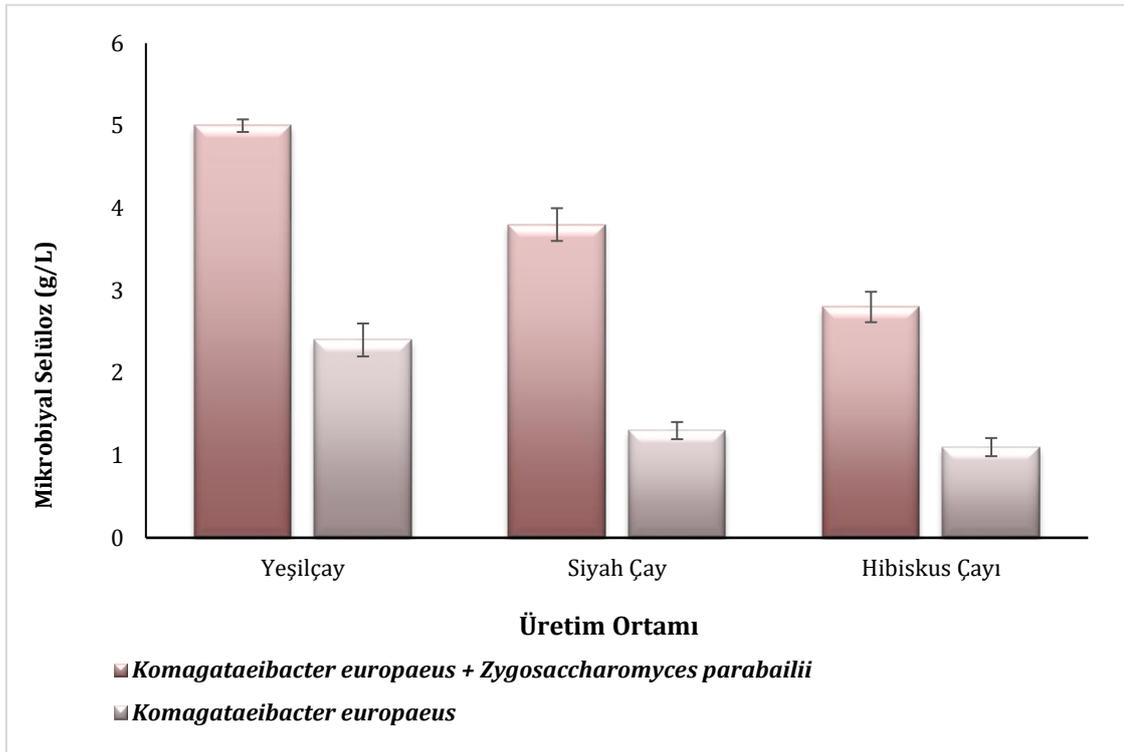
Zygosaccharomyces parabailii'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan kültür, zenginleştirme ortamı olarak kullanılan HS besiyerinde 30 °C'de 72 ve 168 saat boyunca inkübasyona bırakılarak, inkübasyon sürecinin sonunda, HS besiyerine ekildi ve statik koşullarda 30 °C de 168 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 72 saatlik zenginleştirme süreci sonunda 11.6 g/L (\pm 0,25) selüloz elde edilirken, 168 saatlik zenginleştirme süreci sonucunda 14.9 g/L (\pm 0,30) selüloz elde edildi Çalışmanın devamında mikroorganizmaların HS besiyerinde 30 °C'de 168 saatlik zenginleştirme süresi ile mikrobiyal selüloz üretimine devam edildi.

4.5.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Alternatif Üretim Ortamlarının Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz geleneksel olarak, yüksek maliyetli ticari besiyerleri kullanılarak üretilmekte, bu da mikrobiyal selülozun büyük ölçekli kullanımını sınırlamaktadır. Bu noktada günümüzde mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif üretim ortamları araştırılmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda mikrobiyal selüloz üretimi için kullanılan ve ticari olarak temin edilen HS besiyerine alternatif olacak üretim ortamlarının araştırılması hedeflendi.

Mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilebilmesi için alternatif bir besiyerinin araştırılmasının amaçlandığı çalışmamızda, HS besiyerinin yerine, alternatif üretim ortamı olarak %1 oranında hibiskus çayı, siyah çay ve yeşil çay kullanıldı. Hazırlanan besiyerlerine *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan karışık kültür ve yalnızca *Komagataeibacter europaeus* %10 oranında ekilerek farklı bitki çaylarında iki kültürün mikrobiyal selüloz üretim miktarlarının karşılaştırılması sağlandı.

Mikrobiyal selüloz üretiminin maliyetinin düşürülmesi amacıyla, üretim ortamı olarak kullanılan bu 3 farklı bitki çayı arasından en yüksek selüloz üretiminin *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan karışık kültür tarafından yeşil çay ile hazırlanan besiyerinde 4,9 g/L olarak gerçekleştirildiği belirlenirken, aynı besiyerinde *Komagataeibacter europaeus* tarafından 2,4 g/L mikrobiyal selüloz üretimi olduğu belirlendi (Şekil 4.8). Bu nedenle çalışmanın devamında, *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan karışık kültürün mikrobiyal selüloz üreticisi olarak kullanılmasına devam edildi ve yeşil çay üretim ortamı olarak kullanıldı. %1 oranında yeşil çay ile elde edilen selüloz miktarı, HS besiyerinde elde edilen miktar ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu için alternatif üretim ortamı olarak seçilen yeşil çay kullanılarak, çay konsantrasyonu, karbon kaynağı, karbon kaynağı konsantrasyonu ve ilave azot kaynağı gibi üretimi etkileyen koşullar optimize edilerek yüksek verim ve düşük maliyet ile mikrobiyal selüloz üretimi araştırıldı.



Şekil 4.8. Farklı üretim ortamlarında mikrobiyal selüloz üretiminin belirlenmesi.

Azot, yeşil çay özütünün yaklaşık %6'sını oluşturmaktadır ve çay yapraklarında, nükleik asitler ve amino asitlerin oluşumunda da görev almaktadır [73]. Yeşil çayın toplam azot içeriğinin yaklaşık %50'sini kafein ve kafeinle ilişkili olan alkaloidler gibi bileşikler

oluşturmaktadır. Buna ek olarak çay içeriğinde yer alan kateşinlerin de yüksek oranda azot içerdiği bilinmektedir [74]. Bu bağlamda mikrobiyal selüloz üretim çalışmaları araştırıldığında, yeşil çayın azot kaynağı olarak değerlendirildiği görülmektedir.

Literatürde, selüloz üreticisi olarak kombucha karışık kültürünün kullanıldığı ve yeşil çay, siyah çay, mısır püskülü çayı ve rooibos çayının kullanıldığı bir çalışmada, diğer bitki çayları ile kıyaslandığında yeşil çay ile selüloz üretim veriminin %243'e kadar ulaştığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada siyah çay ile elde edilen mikrobiyal selüloz kalınlığının yeşil çaydakinden fazla olduğu ve mikroorganizmaların çayı azot kaynağı olarak kullandığı bildirilmiştir [75].

Moda endüstrisinde kullanılmak üzere, kombucha karışık kültürü ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı bir çalışmada ise, siyah çay ve yeşil çay azot kaynağı, sukroz ise karbon kaynağı olarak kullanılarak 28 °C'de, statik koşullar altında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da çalışmamıza paralel olarak, en yüksek selüloz üretim miktarının yeşil çay ile elde edildiği belirlenmiştir [76].

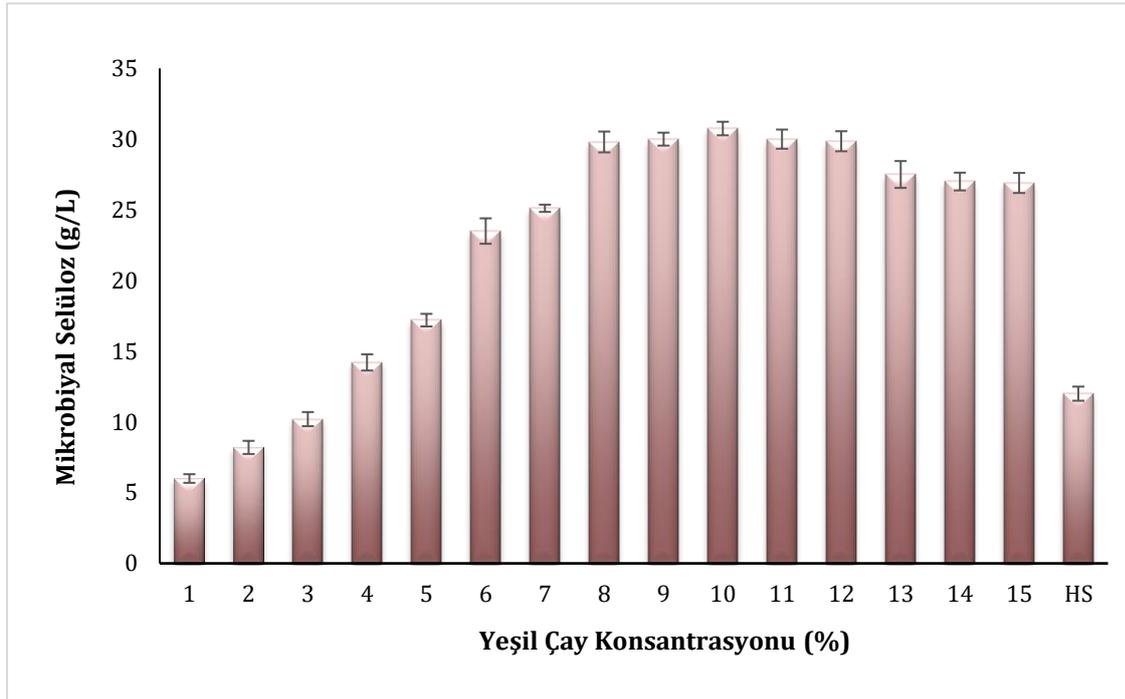
Yim ve arkadaşları, kombucha karışık kültürü ile azot kaynağı olarak yeşil çay, karbon kaynağı olarak ise glukoz kullanıldığında mikrobiyal selüloz üretiminin artmasını, yeşil çayın antioksidan aktivitesinin fazla olması ve azot içeriğinin diğer çaylardan yüksek olması ile açıklamaktadır [75].

Yeşil çay olarak isimlendirilen *Camellia sinensis* bitkisi, en çok flavonoid barındıran bitkilerden biri olmasının yanı sıra içeriğinde binlerce bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenlerin başında kateşinler, flavonoller, fenolik asitler, ve proantosiyanidinler gelmektedir [77, 78]. Polifenollerin yanı sıra çay içeriğinde potasyum, magnezyum, klor, fosfor ve bakır gibi elementler ile eser miktarda lipid ve karbonhidrat da bulunmaktadır. Özellikle çay bitkisinden elde edilen yeşil çay, içerik bakımından en zengin çay çeşidi olarak bilinmektedir. İçeriğinde yer alan 4000'den fazla bileşen, yeşil çayın antioksidan, antiinflamatuvar ve antidiyabetik etki göstermesinin başlıca nedenidir [79, 80]. Bu bağlamda yeşil çayın zengin içeriği ve yukarıda belirtildiği gibi azot kaynağı olarak da önemli olması çalışmamızda en yüksek selüloz üretim ortamının yeşil çay olması nedeni olarak belirtilebilir.

4.5.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Çay Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Birçok bilim insanı tarafından mikrobiyal selüloz üretiminde geleneksel olarak kullanılan ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle üretimi sınırlandıran HS besiyerinin yerine daha düşük maliyetli ve daha yüksek verim ile mikrobiyal selüloz üretiminin sağlanması için alternatif üretim ortamları araştırmaktadır. Özellikle son yıllarda mikrobiyal selüloz üretiminde bitki çaylarının kullanılması araştırılmaktadır. Siyah çay, roobios çayı ve yeşil çay gibi bitki çayları, %0,25 ile %15 arasında değişen konsantrasyonlarda mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılmış ve üretimde kullanılan bitki çayı kadar bitki çayı konsantrasyonunun da etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda da mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif üretim ortamı olarak seçilen yeşil çay için öncelikle uygun çay konsantrasyonu araştırılarak çay konsantrasyonunun mikrobiyal selüloz üretimindeki etkisi değerlendirildi.

Çalışmamızda, alternatif üretim ortamı olan yeşil çayın %1-%15 arasında değişen konsantrasyonları kullanılarak, en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin sağlandığı çay konsantrasyonunun %10 olduğu ve Şekil 4.2'de belirtilen HS besiyerinden elde edilen mikrobiyal selüloz miktarı ile kıyaslandığında, %10 oranında yeşil çay konsantrasyonu kullanılarak elde edilen selülozun litrede yaklaşık olarak %110 daha fazla olduğu belirlendi. Yeşil çayın %1 konsantrasyonu ile elde edilen mikrobiyal selüloz miktarı ile karşılaştırıldığında, %10 yeşil çay ile üretimin, 6 g/L'den, 30,75 g/L'ye çıktığı ve üretimin %500 arttığı ve çay konsantrasyonunun mikrobiyal selüloz üretimi için etkin bir parametre olduğu belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Farklı Yeşil çay konsantrasyonlarında mikrobiyal selüloz üretimlerinin belirlenmesi

Fahim ve Montazer *Komagataeibacter xylinus* ile mikrobiyal selüloz üretimini araştırdıkları bir çalışmada azot kaynağı olarak %3 yeşil çay kullanarak 0,24 g/L selüloz elde ederken, Garza ve arkadaşları kombucha karışık kültürü ile azot kaynağı olarak kullanılan %0,36 konsantrasyonundaki yeşil çay ve dekstroz ile 10 g/L selüloz elde etmiştir [81,82].

Yim ve arkadaşları, kombucha karışık kültürü ile azot kaynağı olarak yeşil çayın kullanıldığı bir çalışmada %0,2 ile %0,3 arasında değişen çay konsantrasyonlarını denemiş ve en yüksek üretimin %0,25 yeşil çay ile elde edildiğini, çay konsantrasyonunun mikrobiyal selüloz üretiminde ve mikrobiyal selüloz kalınlığında etkili olduğunu bildirmiştir [75]. *Komagataeibacter xylinus* ile tekstil endüstrisinde kullanılmak üzere mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise %10 yeşilçay ve %5 sukroz ile 13,8 g/L mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirildiğini ve üretilen selülozun tekstilde kullanılan pamuk kumaşlara kıyasla daha esnek ve dayanıklı olduğu bildirilmiştir [83].

Mikrobiyal selüloz üretiminde alternatif besiyeri olarak kullanılan yeşil çayın içeriğinde yaklaşık olarak %10 azot bulundurmaktadır. Bu bağlamda, yeşil çay konsantrasyonunun artması paralel olarak azot kaynağının artışıdır. Azot kaynağı mikroorganizmaların üremesini, metabolik faaliyetlerini, primer ve sekonder metabolitlerin üretiminin etkilemektedir [84]. Ancak üretim ortamında fazla miktarda azot bulunması mikroorganizmalar için toksik etki yaratarak üremenin durmasına neden olabilmektedir [85]. Buna ek olarak ortamdaki azot kaynağının artmasıyla birlikte pH değerinin arttığı ve besiyerinin asetik asit bakterileri için olumsuz bir hal aldığı bilinmektedir [86]. Çalışmamızda, üretimde kullanılan ve içeriğinde azot bulunduğu için *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii* tarafından azot kaynağı olarak kullanılan yeşil çay konsantrasyonunun artmasıyla, üretimin artması beklenirken, mikrobiyal selüloz üretiminin, %11 ve %15 konsantrasyonları arasında düştüğü saptandı. Çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak, azot kaynağı olarak siyah çayın kullanıldığı bir çalışmada, azot kaynağı konsantrasyonunun mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla % 0,5-12 oranında siyah çay kullanılmış ve en yüksek selüloz üretiminin %1 siyah çay ile elde edildiği belirlenmiştir. Mikrobiyal selüloz üreticisi olarak kombucha karışık kültürünün kullanıldığı bu çalışmada mikrobiyal selüloz üretim veriminin azot kaynağının artan konsantrasyonlarında düştüğü belirlenmiş bu düşüş pH değerinin yükselmesi ve azot konsantrasyonunun artışının mikroorganizmalar üzerinde toksik etki oluşturmaları ile değerlendirilmiştir [87].

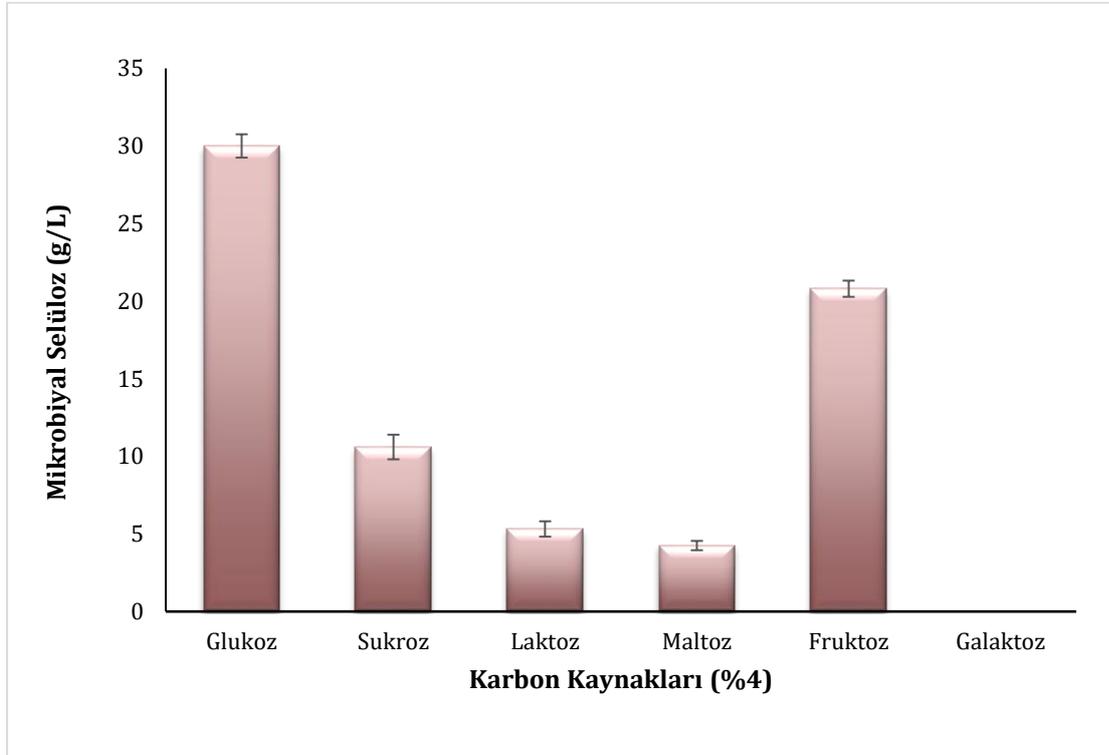
4.5.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon ve İlave Azot Kaynağının Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretim miktarı üretimde kullanılan mikroorganizma kadar üretim ortamı ile de ilişkilidir ve üretimi etkileyen en önemli parametreler karbon ve azot kaynaklarıdır. Bu nedenle alternatif üretim ortamı olarak yeşil çayı kullandığımız çalışmamızda, üretim ortamında farklı karbon ve ilave azot kaynakları kullanılarak yüksek verimli mikrobiyal selüloz eldesi ve mikrobiyal selüloz üretimini etkileyen faktörlerin araştırılması amaçlandı.

4.5.4.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon Kaynağının Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretiminde uygun karbon kaynağının belirlenmesi, üretim veriminin artırılması ve üretim süresinin azaltılması için oldukça önemlidir. Yeşil çayda, eser miktarda lipid ve karbonhidrat bulunduğu ortama ilave edilmesi gereken uygun karbon kaynağının araştırılması gerekmektedir [79, 80].

Çalışmamızda, yeşil çay besiyerinde karbon kaynağının mikrobiyal selüloz üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı karbon kaynakları kullanıldı. Mikrobiyal selüloz üretimi için, 6 farklı karbon kaynağı %4 oranında, %10 yeşil çaya ilave edilerek hazırlanan besiyerlerinde, en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin glukoz içeren besiyeri ortamında 30 g/L olarak gerçekleştiği belirlendi. Glukozlu besiyerinden sonra en yüksek selüloz üretimi ise glukoz gibi bir monosakkarit olan fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde, 20,8 g/L olarak elde edildi. Galaktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde mikrobiyal selüloz üretimi gözlenmezken, en düşük selüloz üretimi sırasıyla maltoz (4,25 g/L), laktoz (5,32 g/L) ve sukroz (10,6 g/L) disakkaritlerinin kullanıldığı besiyerlerinde gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun karbon kaynağının belirlenmesi.

Özellikle karbon kaynağı gibi substratlar, mikrobiyal selüloz biyosentezinin süresini etkilemektedir. Asetik asit bakterilerinin mikrobiyal selüloz üretiminde karbon kaynağı olarak monosakkaritleri tercih ettiği bilinmektedir [88],[89],[90]. Mikrobiyal selüloz üretiminde en çok kullanılan karbon kaynağının ise glukoz olduğu ve glukozun diğer karbon kaynaklarının aksine, sadece bir enerji kaynağı olarak değil, aynı zamanda mikrobiyal selülozun sentezlenmesinde öncü olarak görev aldığı pek çok çalışma ile gösterilmektedir [91- 93].

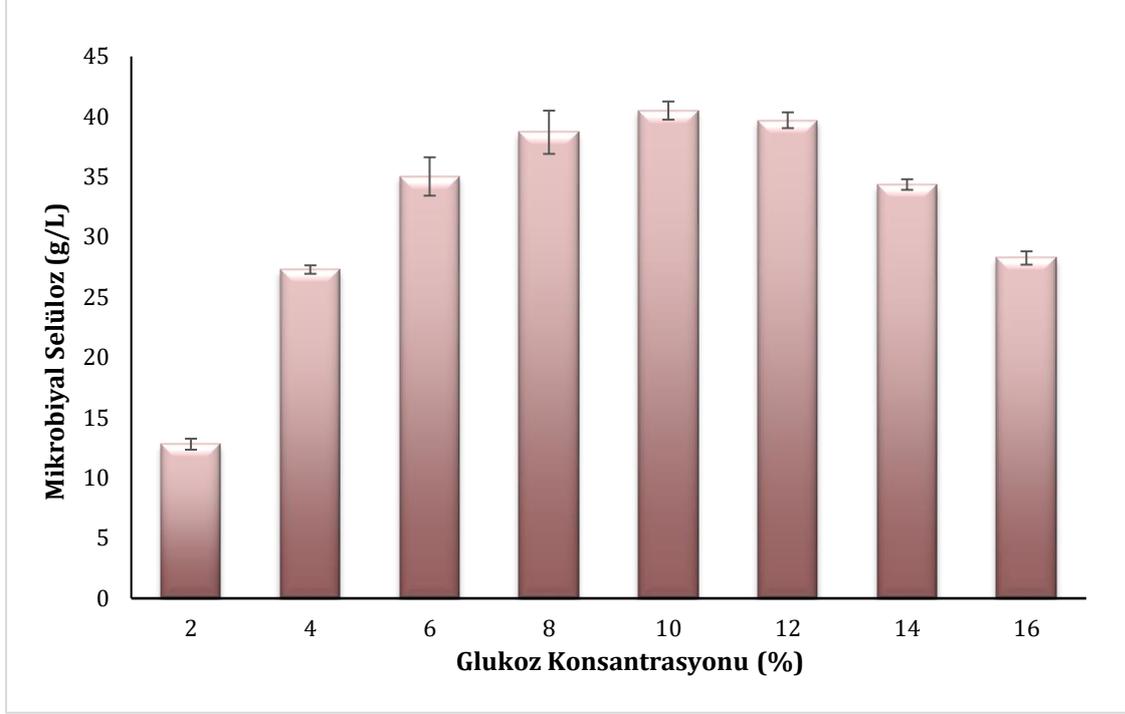
Bir monosakkarit olan galaktozun, suda çözünürlüğünün az olması nedeniyle asetik asit bakterileri tarafından kullanılamaması, bu monosakkaritin karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde, mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilememesini açıklamakta ve bu monosakkaritin mikrobiyal selüloz üretimi için uygun bir karbon kaynağı olmadığını ortaya çıkarmaktadır [94].

Disakkaritler selüloz üretimi için karbon kaynağı olarak kullanıldığında, mikrobiyal selüloz biyosentezi disakkaritlerin glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritlere hidroliz edilmesi ile başlamakta ve biyosentez süresi uzamaktadır, bu nedenle disakkaritlerin kullanıldığı besiyerlerinde mikrobiyal selüloz üretimi monosakkaritlerin kullanıldığı besiyerlerine kıyasla daha düşüktür [94-96].

4.5.4.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Karbon Kaynağı Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan karbon kaynağının konsantrasyonu da üretimde kullanılan karbon kaynağı gibi selüloz üretimini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Çalışmamızda, %10 yeşil çay ile mikrobiyal selüloz üretimi için en uygun karbon kaynağı olarak seçilen glukozun, %2-16 arasında değişen konsantrasyonlarla ilave edilmesiyle hazırlanan besiyerlerinde, en düşük mikrobiyal selüloz üretiminin %2 glukoz içeren besiyerinde, 12,8 g/L olarak gerçekleştiği belirlenirken, en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin, %10 oranında glukoz içeren besiyeri ortamında, 40,5 g/L olarak gerçekleştiği ve besiyerine ilave edilen glukozun %4'den %10'a çıkarılması ile mikrobiyal selüloz üretiminin yaklaşık olarak %150 arttığı belirlenerek, çalışmaya %10 glukoz konsantrasyonu ile devam edildi.

Mikrobiyal selüloz üretiminin, besiyerine ilave edilen glukoz oranı %10'a ulaşana kadar arttığı belirlenirken, glukoz oranının artırılmasıyla birlikte üretimin azaldığı belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi.

Besiyerinde kullanılan karbonhidrat kaynağı konsantrasyonunun, mikrobiyal selüloz üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir ve karbonhidrat kaynağı konsantrasyonunun optimize edilmesi, mikrobiyal selüloz üretimini arttırmak için önemli bir parametredir [96, 97]. Mikrobiyal selülozun üretiminde kullanılan HS besiyerine ilave edilen glukoz miktarı %2 iken, bu oranın artırılmasıyla daha fazla selüloz üretimi gerçekleştiği bilinmektedir [98,99].

Garza ve arkadaşları kombucha karışık kültürü ve yeşil çay ile mikrobiyal selüloz üretimini araştırdıkları çalışmada en yüksek selüloz üretiminin %12,5 glukoz ile 12,8 g/L olarak gerçekleştiğini ve çalışmada kullanılan karbon kaynağının selüloz üreticisi mikroorganizma ve mikrobiyal selüloz üretimi için oldukça önemli olduğunu bildirmiştir. [81]. Kombucha karışık kültürü ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı başka bir

çalışmada ise siyah çay ile hazırlanan besiyerine %10 ile %45 arasında değişen konsantrasyonlarında sukroz ilave edilmiş ve en yüksek selüloz üretim veriminin %20 sukroz konsantrasyonu ile %1 olarak elde edildiği belirtilirken, artan sukroz konsantrasyonlarının üretimi düşürdüğü gösterilmiştir [100].

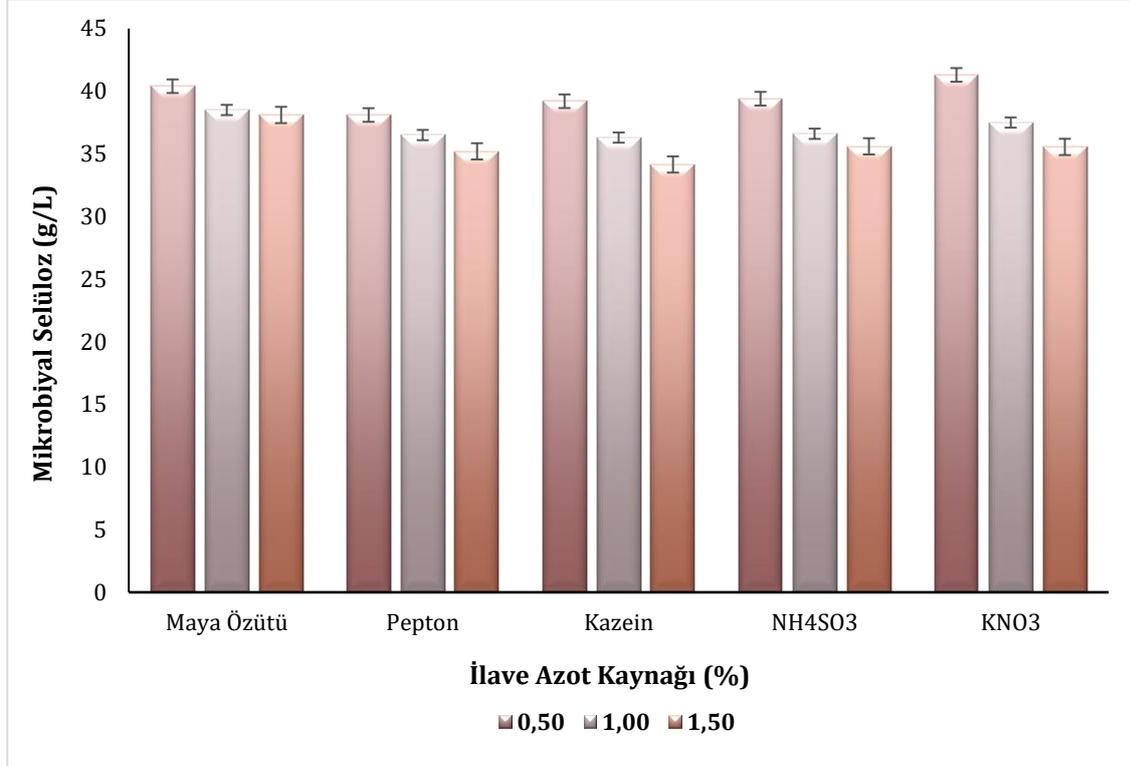
Yapılan bir çalışmada besiyerindeki karbonhidrat kaynağı konsantrasyonunun artmasıyla, hücre içi ozmotik basınç değerinin değişmesi ve su aktivitesi azalması nedeniyle mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkarit üretiminin azaldığı gösterilmiştir [101,102]. Buna ek olarak Schramm ve arkadaşları, artan glukoz konsantrasyonunun, besiyerindeki glukonik asit miktarını artırarak, ortamının pH değerini düşürdüğünü ve selüloz üretimini engellediğini belirtmiştir [103].

4.5.4.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun İlave Azot Kaynağının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA, RNA ve nükleik asitler gibi önemli birçok molekülün yapıtaşını oluşturan azot, bu bileşiklerin yanı sıra enzimlerin ve proteinlerin de ana bileşenlerinden bir tanesi olması nedeniyle mikroorganizmalar için hayati öneme sahip olan bir elementtir [84]. Mikroorganizmalar gelişimleri için gerekli olan bu elementi, toprak ve atmosfer gibi farklı kaynaklardan, organik asitler, tuzlar ve amino asitler gibi farklı formlarda temin edebilmektedir [104].

Mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı pek çok çalışmada, üretimde kullanılan geleneksel besiyeri olan HS besiyerindeki azot kaynakları olan pepton ve maya özütünün yerine KNO_3 , NH_4SO_3 , kazein ve soyton gibi farklı azot kaynakları kullanılarak farklı azot kaynaklarının üretimdeki etkisi değerlendirilmiştir [105, 106]. Yapılan bu çalışmalarda kullanılan farklı azot kaynaklarının ilave edildikleri besiyerlerinde üretimi önemli ölçüde arttırması nedeniyle çalışmamızda, üretimde etkili oldukları belirlenen bu azot kaynakları yeşil çay ile hazırlanan besiyerine ilave edilerek, ilave azot kaynaklarının mikrobiyal selüloz üretimindeki etkileri değerlendirildi [107, 108]. Bu bağlamda, mikrobiyal selüloz üretimi için alternatif bir üretim ortamının belirlenmesinin amaçlandığı çalışmamızda, selüloz üretim miktarının arttırılması amacıyla %10 yeşil çay ve %10 glukoz ile hazırlanan besiyerine % 0.5, 1 ve 1.5 oranlarında 5 farklı azot kaynağı ilave edildi. Hazırlanan bu besiyerlerinde en yüksek üretimin %0.5 oranındaki KNO_3 ile 41.3 g/L olarak gerçekleştirildiği belirlenirken, yeşil çay ile hazırlanan besiyerine ilave

edilen farklı azot kaynaklarıyla mikrobiyal selüloz üretiminin 40,5 g/L'den 41,3 g/L'ye çıktığı ve önemli ölçüde değişmediği, buna ek olarak ilave azot kaynağı konsantrasyonunun artmasıyla mikrobiyal selüloz üretiminin düştüğü belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun ilave azot kaynağının ve konsantrasyonunun belirlenmesi.

Bölüm 4.5.2.'de de anlatıldığı gibi alternatif üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çayın ve yeşil çay içeriğinde yer alan kateşinlerin azot içerdiği bilinmektedir [73,74]. Azot, mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri ve üremeleri için önemli bir faktör olmasına rağmen, üretim ortamına ilave edilen fazla miktardaki azotun mikroorganizmalar üzerinde toksik etki oluşturduğu ve besiyerinin pH değerini düşürerek üretimi olumsuz etkilediği gösterilmiştir [86]. Üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çay konsantrasyonunun artması ile birlikte mikrobiyal selüloz üretiminin düşmesinde olduğu gibi, üretim ortamına ilave edilen azot kaynağının konsantrasyonunun artmasıyla birlikte üretimin düştüğü ve üretim ortamına eklenen ilave azot kaynağının üretim maliyetini arttırmasına rağmen mikrobiyal selüloz üretiminde kayda değer bir artış sağlanmaması nedeniyle çalışmaya üretim ortamına farklı azot kaynağı ilave edilmeden devam edildi.

4.6. Mikrobiyal Selüloz Üretiminde Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması

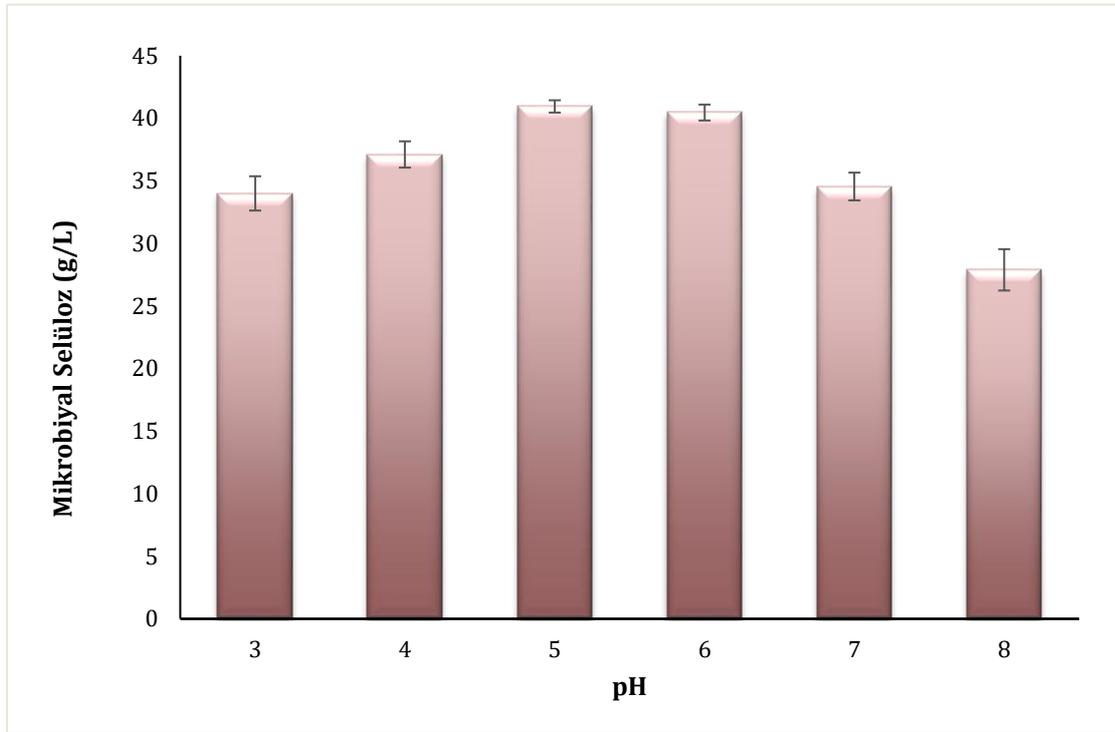
Günümüzde endüstriyel ürünlere olan talep her geçen gün artmaktadır. Bununla birlikte endüstride petrol kaynaklı hammaddelerin kullanılması ekonomik ve çevresel anlamda büyük bir endişe yaratmaktadır. Bu nedenle, enerji, yakıt ve malzeme gibi endüstriyel öneme sahip olan ürünlerin üretimi için hammadde olarak yenilenebilir kaynaklara yönelim artmıştır. Bu doğrultuda mikrobiyal selüloz, yüksek su tutma kapasitesi, mekanik kuvvetlere karşı yüksek direnç göstermesi ve oldukça hidrofilik olması nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. Mikrobiyal selülozun endüstriyel kullanımının önündeki en büyük engel ise üretim maliyetidir ve üretim maliyetinin düşürülmesi ise uygun üretim ortamlarının kullanılması ve üretim koşullarının optimize edilmesine bağlıdır.

Çalışmamızda *K. europaeus* ve *Z. parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesi ile elde edilen karışık kültür tarafından, düşük maliyet ile yüksek miktarda mikrobiyal selüloz üretiminin sağlanması amacıyla geliştirilen alternatif besiyerinde, üretim verimini en üst düzeye çıkarmak için azot ve karbon kaynağı gibi parametrelerin yanı sıra, besiyerinin pH değeri, ekim oranı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi dahil olmak üzere diğer parametreler ve bu parametrelerin mikrobiyal selüloz üretimi üzerine olan etkileri de araştırıldı.

4.6.1. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun pH Değerinin Belirlenmesi

Mikrobiyal selüloz üretimini etkileyen önemli faktörlerden biri üretim ortamının pH değeridir. Besiyerinin pH değeri mikroorganizmalar için yaşamsal önem taşımakta ve hücre zarının geçirgenliğini, besin maddelerinin hücre içine alınımını, primer ve sekonder metabolitlerin sentezini etkilemektedir [109,110]. Optimum pH değerinin belirlenmesi besin maddelerinin çözünürlüğü ve mikrobiyal selüloz üretiminin artırılması için gereklidir.

Besiyerinin başlangıç pH değerinin mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin araştırılması amacıyla, %10 yeşil çay ve %10 glukoz içeren besiyerinin pH değeri 2.0-8.0 arasında hazırlanarak, HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürü ile %10 oranında ekim gerçekleştirildi. Farklı pH değerlerinde hazırlanan bu besiyerlerinde en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin pH 5’de 40,95 g/L olduğu belirlenirken, pH değerinin artmasıyla birlikte selüloz üretim miktarının azaldığı belirlendi. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların üremeleri için gerekli olan optimum pH değeri genellikle hafif asidik pH değerleri olmasına rağmen oldukça asidik olan pH değerlerinde de nispeten büyük miktarda mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirildiği belirlendi. (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun başlangıç pH değerinin belirlenmesi.

Zahan ve arkadaşları, *Komagataeibacter xylinus* ile döner disk reaktöründe mikrobiyal selüloz üretimini araştırdıkları çalışmada, çalışmamıza paralel olarak en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin pH 5 değerinde elde edildiğini belirtirken, en düşük üretimin ise pH 3,5 ve 7,5 değerlerinde elde edildiğini bildirmiştir [111]. *Komagataeibacter xylinus* ile pH değerinin mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin

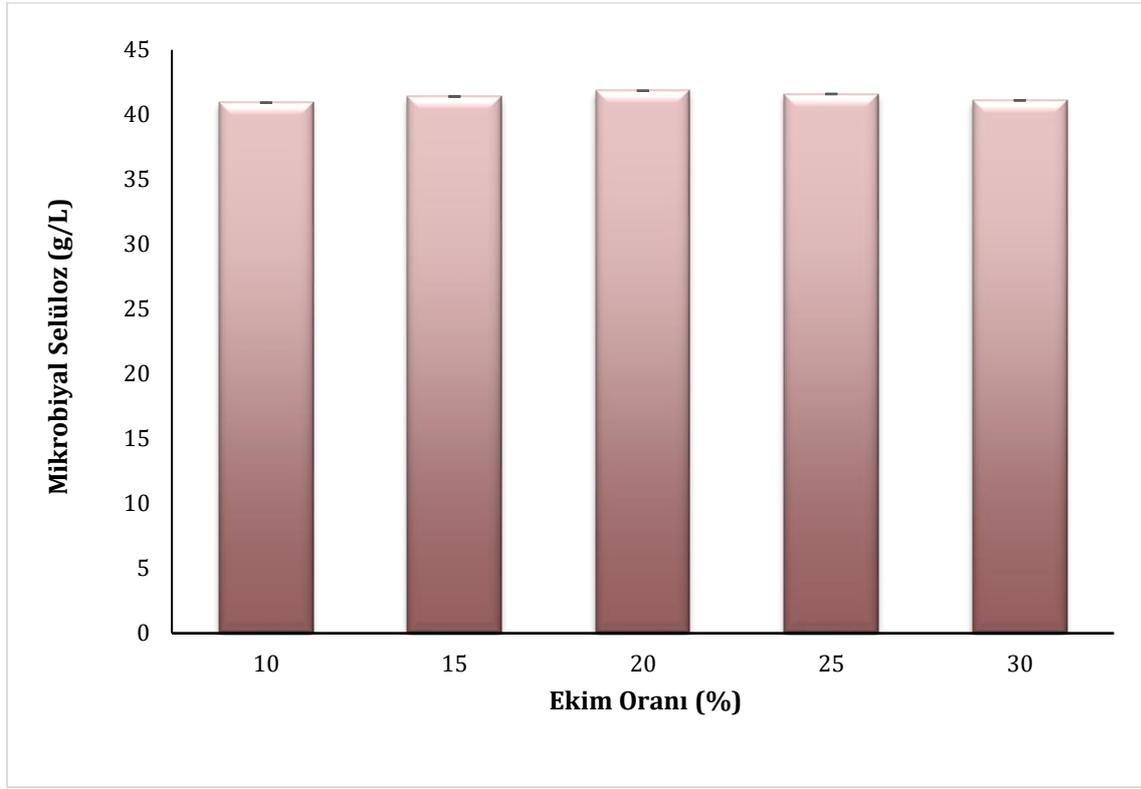
araştırıldığı başka bir çalışmada ise glukozun glukonik aside metabolize edilebilmesi için en uygun pH değerinin 4,5 olduğu belirlenirken, mikrobiyal selüloz üretimi için optimal pH değerinin 5,5 olduğu belirlenmiştir [112].

Acetobacter senegalensis ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı bir çalışmada pH 4'ün altında ve pH 9'da mikrobiyal selüloz üretimi gözlenmezken, en yüksek selüloz üretiminin pH 4,5 değerinde elde edildiği belirtilmiştir [105]. Çalışmamıza ait sonuçlara paralel olarak literatürdeki çalışmalarda da mikrobiyal selüloz üretimi için bazik pH koşullarının uygun olmadığı belirlenirken, mikrobiyal selüloz üretiminin düşük pH değerlerinde devam etmesi mikrobiyal selüloz üretiminin endüstriyel ölçekte gerçekleştirilmesi sırasında oldukça arzu edilen bir durumdur [113, 114]. Çünkü inkübasyon süresi uzadıkça besiyerinin pH değerinin düşmesi üretimlerde sıkça rastlanan ve üretimi olumsuz etkileyen bir parametredir. Buna ek olarak mikrobiyal selüloz üretiminin düşük pH aralıklarında gerçekleştirilmesi, çoğu mikroorganizma bu kadar düşük pH ortamında yaşayamadığı için mikrobiyal kontaminasyonu sınırlama avantajı sunmaktadır [114].

Mikrobiyal selüloz üretimi için optimum pH'ın değerinin üretimde kullanılan mikroorganizmaya bağlı olduğu bilinirken, ancak üretimin genellikle nötr ila hafif asidik pH aralığında olduğu pek çok çalışma ile gösterilmektedir [36, 115, 116].

4.6.2. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi

Biyopolimerlerin üretimindeki en önemli faktörlerden biri de, uygun metabolik aktiviteye sahip olan mikroorganizmaların ortamda yeterli miktarda bulunmasıdır [91]. Ekim oranının artırılması, adaptasyon fazının (lag fazı) uzunluğunu kısalttığı için, mikroorganizmalar tarafından daha fazla miktarda ekzopolisakkarit üretimine olanak sağlayarak, fermantasyonun toplam süresini de kısaltmaktadır. Bu doğrultuda, çalışmamızda ekim oranının mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan besiyerine *K. europaeus* ve *Z. parabailii*'nin 2:1 oranından bir araya getirilmesiyle hazırlanan ve HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen kültür ile %10, %15, %20, %25 ve %30 oranında ekim gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda, en yüksek mikrobiyal selüloz üretiminin %20 ekim oranıyla 41,85 g/L olduğu belirlenirken, ekim oranının %30'a çıkarılmasıyla birlikte selüloz üretim miktarının 41.1 g/L 'ye düştüğü belirlendi (Şekil 4.14)



Şekil 4.14. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun ekim oranının belirlenmesi.

Bilgi ve arkadaşlarının *Komagataeibacter xylinus* ile bakteriyel selüloz üretimini araştırdıkları çalışmada ekim oranının bakteriyel selüloz üretimine olan etkisi yaklaşık %10 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, en yüksek selüloz üretiminin %15 ekim oranı ile gerçekleştiği belirtilirken, ekim oranı arttıkça besiyeri pH değerinin, inkübasyon süresi boyunca daha hızlı düştüğü ve selüloz üretim veriminin azaldığı belirtilmiştir [117]. Du ve arkadaşlarına ait bir çalışmada ise ekim oranının artmasıyla birlikte selüloz üretiminin de artacağı öngörülmüş, fakat çalışmanın sonucunda ekim oranının artmasıyla birlikte üretimin düştüğü saptanmıştır. Bu çalışmada Bilgi ve arkadaşlarının aksine, üretimin dengeli bir şekilde sabitlenmesi ve ardından düşmesi nedeniyle ekim oranının mikrobiyal selüloz üretiminde etkili olduğu belirtilmiştir [118].

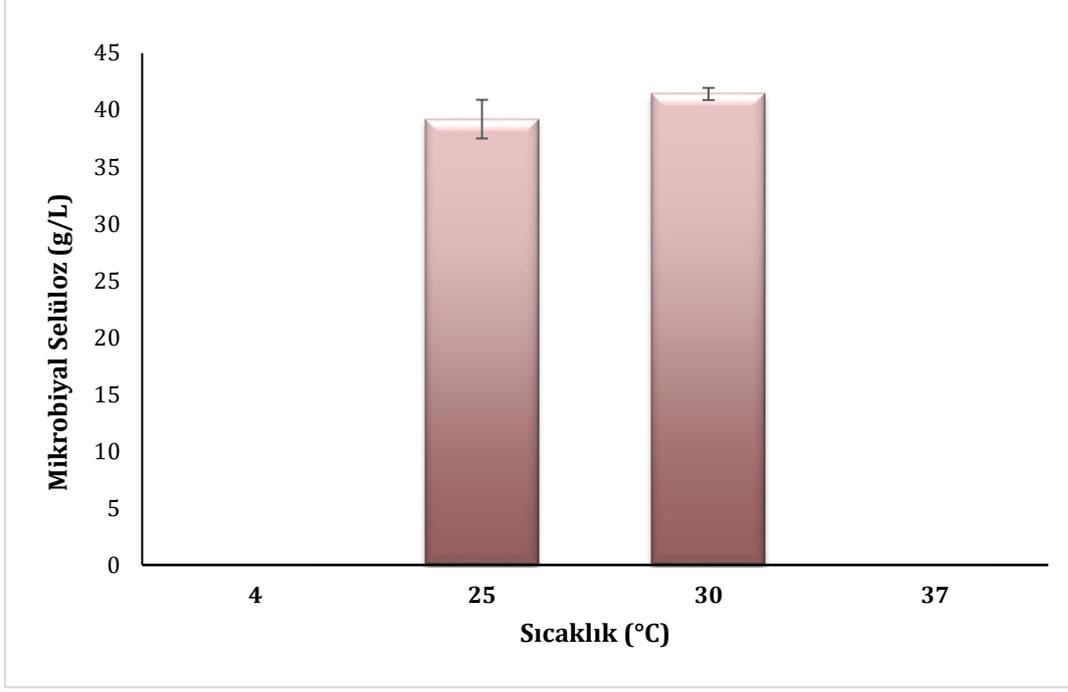
Gluconacetobacter kombuchae ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, %1 ile %7 arasında değişen ekim oranları kullanılarak ekim oranının mikrobiyal selüloz üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada en yüksek selüloz üretimi %5 ekim oranı ile gerçekleştirilirken, ekim oranının artırılması ile üretimin düştüğü gözlemlenmiştir [119]. Birçok araştırmacı bu düşüşün sebebini, üretim

ortamındaki mikroorganizma miktarının fazla olması nedeniyle ortamdaki besin miktarının hızla azalması ve oksijen miktarın düşüşü nedeniyle mikrobiyal selüloz gibi ekzopolisakkaritlerin sentezinin tamamlanamaması olarak açıklamaktadır [120- 122]. Yapılan bu araştırmalar çalışmamızda olduğu gibi, ekim oranının da mikrobiyal selüloz üretiminde etkili olduğunu göstermekte ve ekim oranının artmasıyla birlikte mikrobiyal selüloz üretiminin düştüğünü desteklemektedir.

4.6.3. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi

İnkübasyon sıcaklığı, mikrobiyal selüloz gibi ekzopolisakkaritlerin üretiminin gerçekleştirildiği mikroorganizmaların besiyeri içeriğini metabolize edebilme hızlarına etki göstermektedir [107]. Asetik asit bakterileri için en uygun üreme sıcaklığının 25-30 °C olduğu ve mikrobiyal selüloz üretimi için en uygun sıcaklık aralığının da bu dereceler arasında değiştiği bilinmektedir [63,64 ,87]. İnkübasyon sıcaklığının en uygun değerlerin altına inmesi metabolik aktiviteyi düşüreceği gibi, en uygun değerlerin üstüne çıkması da mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır. Bu bağlamda, inkübasyon sıcaklığının optimize edilmesi mikrobiyal selüloz üretiminin artırılması ve üretim süresinin kısaltılması için oldukça önemli bir parametredir.

Çalışmamızda, inkübasyon sıcaklığının mikrobiyal selüloz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan yeşil çay besiyerine HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürünün ekimleri gerçekleştirilerek, 4°C– 37 °C arası değişen sıcaklıklar değerlerinde, statik inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonucunda, 30°C’de selüloz üretimi 41,41 g/L iken, 25 °C’de ise yaklaşık %5 düşerek 39,2 g/L olarak belirlendi. 4 °C ve 37 °C’de ise mikrobiyal selüloz üretimi görülmedi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.

Mezofilik bakteriler grubunda yer alan asetik asit bakterilerinin, mikrobiyal selüloz üretimi için optimal sıcaklık aralığı olarak 25 ile 30 °C'yi tercih ettiği bilinmektedir [125],[126]. Wang ve arkadaşları *Komagataeibacter sp. ile en yüksek selüloz üretiminin 30 ° C'de elde edildiğini* bildirirken, Güzel ve arkadaşları *Komagataeibacter hansenii* için de aynı sıcaklıkta en yüksek selüloz üretimini gerçekleştirdiğini bildirmiştir [115], [127]. *Gluconacetobacter xylinus* ile mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirildiği pek çok çalışmada üretim için optimal sıcaklık aralığının 25 ile 30 °C arasında değiştiği gösterilmiştir [128], [129]. Literatür araştırmaları, asetik asit bakterilerinin mikrobiyal selüloz üretimi için tercih ettiği optimal sıcaklık değerinin tür bazında değiştiğini gösterse de, pek çok araştırmada çalışmamızdaki sonuçlara paralellik göstererek mikrobiyal selüloz üretimi için optimum sıcaklık aralığı 25 ile 30°C arasında bulunmaktadır. Buna ek olarak, inkübasyon sıcaklığının artması asetik asit bakterileri için fenotipik değişikliklere neden olduğu gibi *Komagataeibacter* cinsine ait bakterilerin yüksek sıcaklıklarda yüksek miktarda etanol fermantasyonu gerçekleştirerek besiyerinin pH değerini de değiştirdiği gösterilmiştir [130].

4.6.4. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı Çalkalama Hızlarının Araştırılması

Mikrobiyal selüloz biyosentezi aerobik koşullarda gerçekleşen oldukça önemli bir süreçtir. Mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilebilmesi için inkübasyon ortamında yüksek miktarda oksijen gerekmektedir. Mikrobiyal selüloz üretiminde kullanılan kültür yöntemleri başlıca statik ve çalkalamalı kültür yöntemleridir ve mikrobiyal selülozun morfolojisi, üretimde kullanılan kültür yöntemine bağlı olarak değişmektedir. [131,132].

Bu doğrultuda çalışmamızda, çalkalama hızının mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan yeşil çay besiyerine HS besiyerinde 168 saat boyunca zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürünün ekimleri gerçekleştirilerek, 30°C’de farklı çalkalama hızlarında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonunda statik kültür yöntemi ile elde edilen mikrobiyal selüloz miktarı 41,8 g/L olarak belirlenirken, denenen üç farklı çalkalama hızında da mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleşmediği gözlemlendi.

Statik kültür ile elde edilen mikrobiyal selüloz, kültür yüzeyini kaplayan bir membran şeklindeki, çalkalamalı kültür ile elde edilen selüloz ise düzensiz şekiller ve kütleler halindedir (Şekil 4.16).



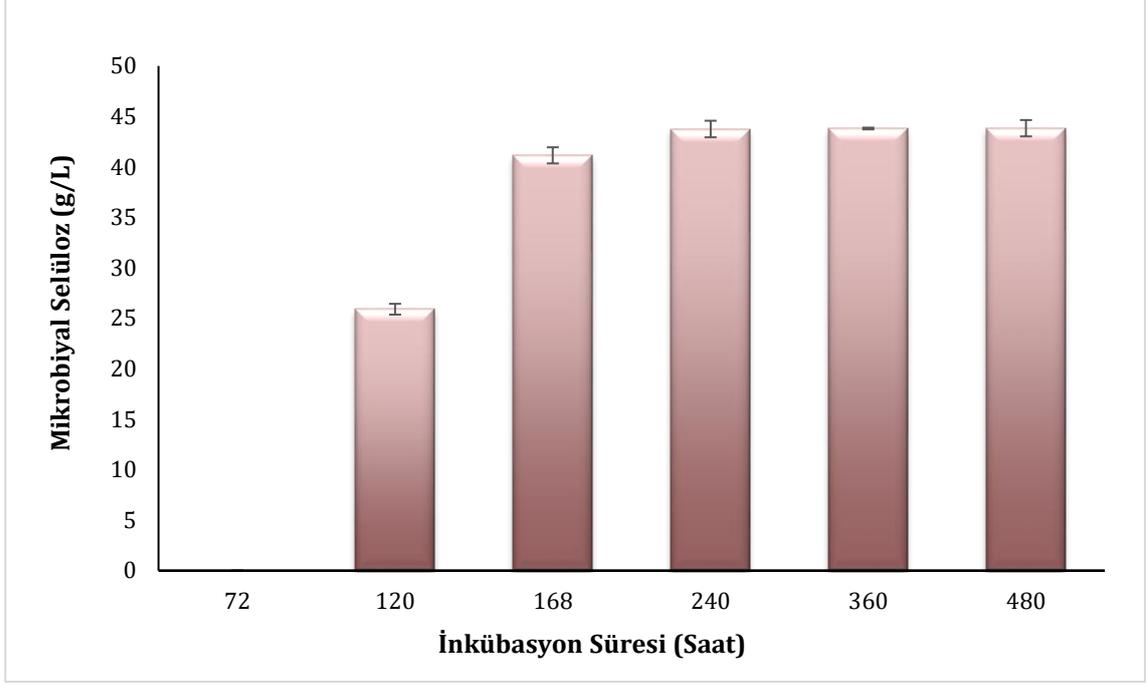
Şekil 4.16. Çalkalamalı kültür yöntemi ile elde edilen mikrobiyal selüloz

Statik kültür yöntemiyle elde edilen mikrobiyal selülozun üretim verimi daha yüksek olmasına rağmen doğru havalandırma yöntemleri kullanıldığında mikrobiyal selülozun büyük ölçekli, endüstriyel üretimi için çalkalamalı kültür yöntemi kullanılmaktadır [133].

Çalkalamalı üretimde oksijen transferinin artması nedeniyle, selüloz üretiminin de artması beklenirken birçok çalışmada üretimin düştüğü gösterilmektedir [99, 134]. Bunun en önemli sebebinin çalkalamalı kültürde bakteri hücrelerinin kendiliğinden mutasyona uğrayarak selüloz sentezinde görev alan fosfoglukomutaz ve üridin difosfoglukoz pirofosforilaz enzimlerinin inaktive hale geçmesi olduğu bildirilmiştir [134]. Araştırmacılar tarafından bu problemin önüne geçilmesi ve mutasyonun etkisinin azaltılması için farklı stratejiler geliştirilmektedir. Bunlar arasında en önemlileri besiyerine etanol ve agar gibi takviyelerin ilave edilmesi, üretimde mutasyona dirençli suşların kullanılması, mutasyona dirençli suşların geliştirilmesi ve çalkalamalı üretim yönteminin farklı pervane tipleri ve inkübatörler kullanılarak modifiye edilmesidir [66,135,136].

4.6.5. Mikrobiyal Selüloz Üretimi için Farklı İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması

İnkübasyon süresi mikrobiyal selüloz üretim miktarını ve sentezlenen selüloz fibril yapısını etkilemekle birlikte üretim maliyeti için de oldukça önemli bir parametredir. İnkübasyon süresinin düşürülmesi, üretim için kullanılan hammadde ve harcanan enerji miktarını da azaltmaktadır. Bu doğrultuda düşük maliyetli mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilmesi için ucuz üretim ortamı kadar inkübasyon süresinin de kısaltılması önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, inkübasyon süresinin mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan yeşil çay besiyerine HS besiyerinde zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürünün ekimleri gerçekleştirilerek, 30°C’de farklı sürelerde inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süreçlerinin tamamlanmasının ardından, 240 saatlik inkübasyon süresi sonunda 168 saatlik inkübasyon süresine kıyasla %5 artış ile 43,75 g/L selüloz elde edilirken, artan sürelerde üretimde yalnızca %1 artış olduğu ve bunun sabitlenerek devam ettiği belirlendi (Şekil.17). İnkübasyon süresinin kısa tutulması, üretimin maliyetini de azaltacağı için 168 saatlik inkübasyon süresi tercih edildi.



Şekil 4.17. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi.

Bitkisel kaynaklı selüloz eldesi ile kıyaslandığında mikrobiyal selüloz üretiminin oldukça kısa sürede ve düşük maliyetle gerçekleştiği bilinmektedir. Sheykhnazari ve arkadaşları inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte mikrofibril yapısının ve demet sayısının azaldığını belirtirken en yüksek selüloz üretiminin 7 ve 10 günlük inkübasyon süreleri arasında gerçekleştiğini belirtmişlerdir [137].

Ruka ve arkadaşları *Komagataeibacter xylinus* ile mikrobiyal selüloz üretimi veriminin, 14 günlük inkübasyon süresi boyunca doğrusal olarak arttığını ve bu büyümenin çoğunun ilk yedi günde meydana geldiğini belirtirken, 14. günden itibaren ise selüloz üretiminin sabitlendiğini belirtmişlerdir [138]. *Komagataeibacter xylinus* ile mikrobiyal selüloz üretimini araştırıldığı bir çalışmada en yüksek üretimin 15. günde elde edildiğini artan günlerde ise üretim miktarının sabitlendiği gösterilmiştir [139]. Araştırmacılar inkübasyon süresinin üretimde kullanılan suş, üretim ortamı, sıcaklık ve pH gibi farklı faktörlerden etkilendiğini bildirirken birçok çalışma, çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte üretim miktarının sabitlendiğini belirtmektedir [87,140,141].

4.7. Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etki Eden Diğer Faktörlerin Belirlenmesi

4.7.1. Işığın Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkisi

Mikroorganizmaların ortamdaki ışığa göre farklı çevre koşullarında farklı tepkiler verdiği bilinmekte ve mikroorganizmaların ışığı algılama ve tepki verme yeteneği evrimsel olarak korunan bir mekanizma olarak kabul edilmektedir [142]. Mikrobiyal büyüme ve sekonder metabolitlerin üretimi için sıcaklık, pH ve oksijen miktarı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra ışık da oldukça önemlidir [143]. Mikroorganizmalar, ekzopolisakkaritler ve pigmentler gibi sekonder metabolitleri; sıcaklık, basınç ve ışık gibi çevresel etmenlere karşı bir yanıt olarak üretmektedir [144]. Örneğin bakteriyel ve fungal pigment üretiminde sıcaklık kadar ışığın da etkili olduğu belirtilmektedir [145].

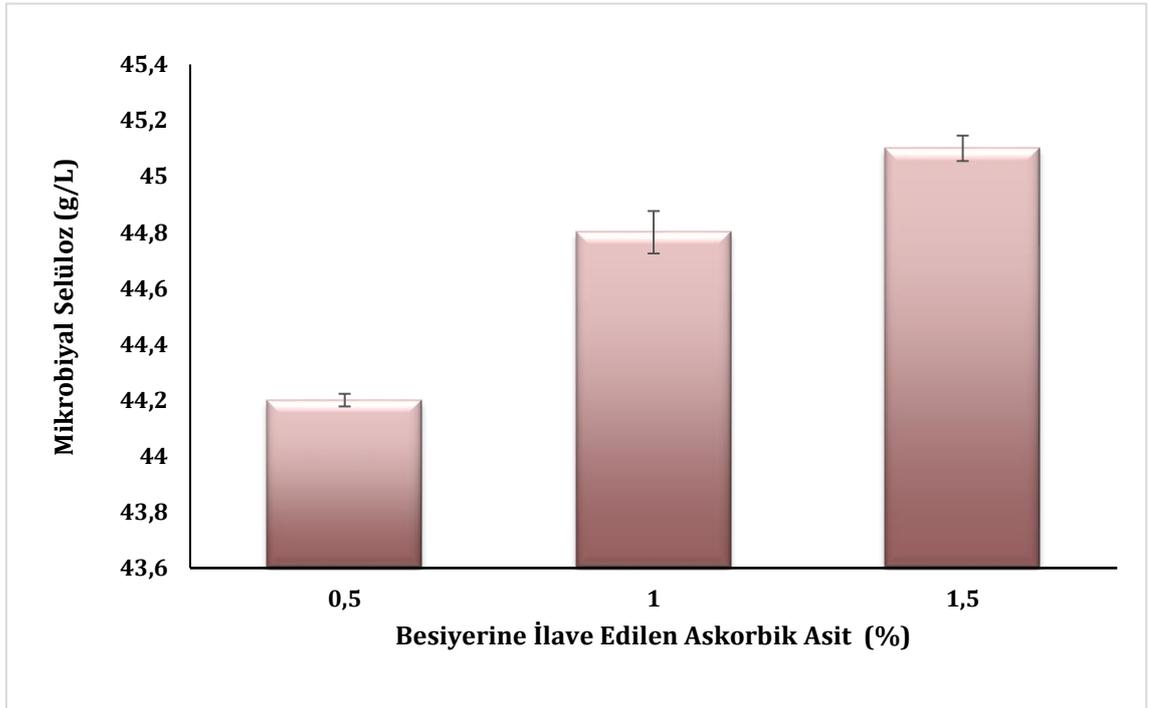
Literatürde, ışığın mikrobiyal selüloz üretimi üzerindeki etkisine dair bir çalışma olmamasına rağmen, probiyotik ve prebiyotik özelliklere sahip olması nedeniyle günümüzde kullanımı oldukça yaygınlaşan ve mikrobiyal selüloz üretiminde de kullanılan kombucha çayının üretimi geleneksel olarak karanlık ortamlarda gerçekleştirilmektedir [146, 147]. Bu bağlamda çalışmamızda, ışığın mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan yeşil çay besiyerine (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5), HS besiyerinde zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürünün ekimleri yapılarak, 30°C’de karanlık ve aydınlık etüv ortamlarında 168 saatlik statik inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonunda, karanlık ve aydınlık üretim ortamında elde edilen mikrobiyal selüloz miktarları sırasıyla 43,80 g/L ve 43,78 g/L olduğu ve üretim ortamları arasında fark olmadığı gözlemlenmedi. Bu doğrultuda, ışığın mikrobiyal selüloz üretimi üzerinde bir etkisi olmadığı sonucuna varıldı.

4.7.2. Üretim Ortamına Eklenen Çeşitli Maddelerin Mikrobiyal Selüloz Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Üretim ortamına ilave edilen farklı maddeler, mikrobiyal selüloz üretimini etkilemektedir. Üretim ortamına eklenen az miktardaki endoglukonaz enziminin, mikrobiyal selüloz üretimini ve polimerin kristalizasyon derecesini değiştirdiği bilinmektedir [148]. Literatürde agar, karboksimetil selüloz, sodyum aljinat ve ksiloglukan gibi farklı maddelerin besiyerine ilave edilmesiyle birlikte, hem statik hem de çalkalamalı üretimlerde mikrobiyal selüloz üretiminin arttığı belirtilmektedir [149],

[150], [151]. Çalışmamızda da üretim ortamı olarak hazırlanan çay besiyerine (%10 yeşil çay, %10 glukoz, pH=5) Askorbik asit, ayçiçek yağı, zeytinyağı, hindistancevizi yağları ayrı ayrı %0.5, %1 ve %1.5 oranlarında ilave edilerek bu maddelerin mikrobiyal selüloz üretimine olan etkisi araştırıldı. Üretim ortamına ilave edilen askorbik asitin üç farklı konsantrasyonda da mikrobiyal selüloz üretiminin doğrusal olarak arttırdığı belirlendi. Besiyerine ilave edilen %0,5 oranında askorbik asit ile üretim miktarı %1.02 artarak, 43,8 g/L'den 44,2 g/L'ye ulaştığı belirlenirken, askorbik asitin %1 ve % 1.5 oranlarında ilave edilmesiyle üretimin sırasıyla %2.4 ve %3 oranında arttığı belirlendi (Şekil 4.18).

Üretim ortamına ilave edilen C vitamini konsantrasyonu %0,5'den %1'e çıkarıldığında üretim miktarı yaklaşık olarak %6 artarken, konsantrasyonun %1'den %1,5 değerine çıkarılması ile bu artışın yalnızca % 0,6 oranında olduğu ve üretim maliyeti dikkatte alındığında, üretim maliyetininin arttırılmaması amacıyla C vitamininin daha yüksek konsantrasyonları üretim ortamına ilave edilmedi. Çalışmamıza paralel olarak, literatürde de yapılan çalışmalarda, üretim ortamına en fazla % 0,5 oranında askorbik asit ilave edildiği belirlendi [152].



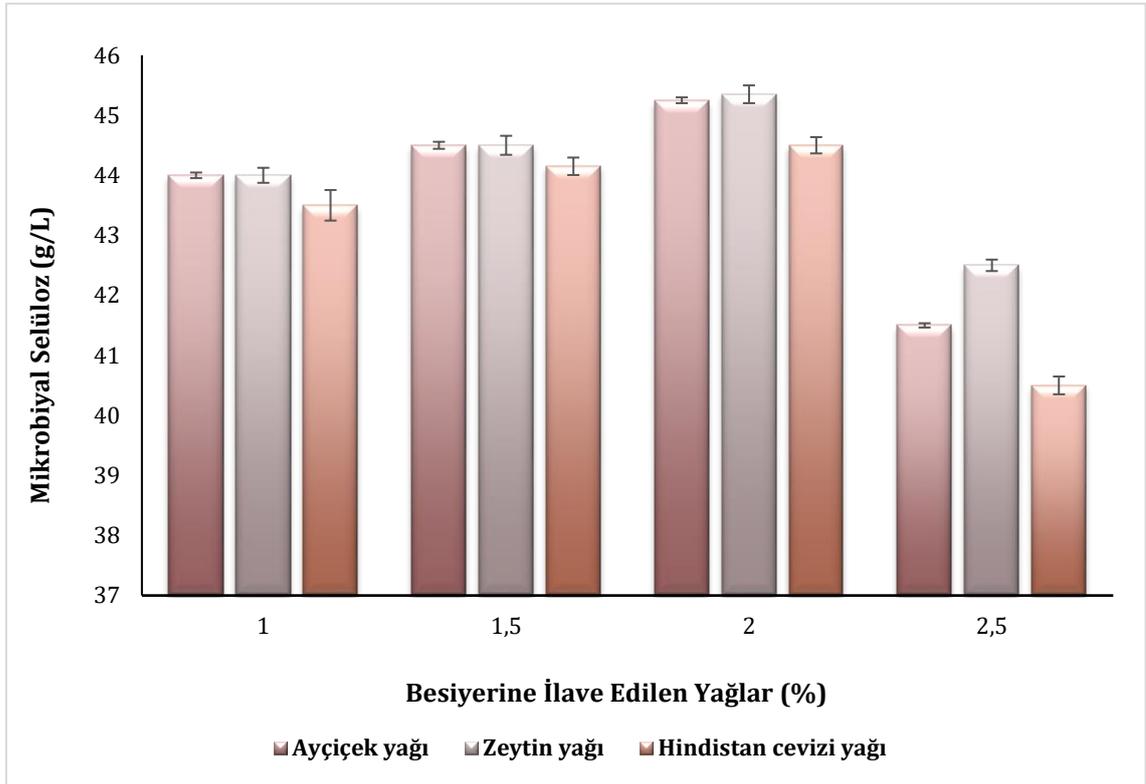
Şekil 4.18. Askorbik asitin mikrobiyal selüloz üretimine etkisi.

C vitamini olarak da bilinen Askorbik asit güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra enzimatik reaksiyonlar için indirgeyici bir ajan olarak görev almaktadır ve bu nedenle farklı mikroorganizmaların ve ekzopolisakkaritlerin üretiminde kullanılmaktadır [153]. Keshk ve arkadaşları çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak, endüstriyel üretim ortamı olarak kullanılan HS besiyerine %0,5 oranında ilave edilen askorbik asitin (C vitamini) mikrobiyal selüloz üretimini yaklaşık 2 katına çıkardığını ve bunun askorbik asitin antioksidan özellik göstermesinin yanı sıra, glukuronik asit üretimini düşürmesiyle birlikte üretim ortamının pH değerindeki değişimin yavaşlamasıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir [152].

Komagataeibacter xylinus ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı başka bir çalışmada ise üretim ortamına tamamlayıcı ajan olarak ilave edilen %0,04 oranındaki askorbik asitin üretim verimini arttırdığı, ayrıca üretim ortamına ilave edilen askorbik asitin mikrobiyal selülozun kimyasal yapısında bir değişiklik meydana getirmemesine rağmen, termal kararlık ve kristalizasyon derecesini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir [154].

Mikrobiyal selüloz eldesinde, besiyerine eklenen farklı maddelerin üretimi etkilediği bilinmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda üretim ortamına, literatürde etkili oldukları gösterilen, bitkisel yağlar (zeytinyağı, ayçiçek yağı, hindistancevizi yağı) ve askorbik asit ilave edildi. Yeşil çay ile hazırlanan temel besiyerine %2 oranında zeytinyağı ilavesiyle üretimin %3,5 arttığı gösterilirken, artan yağ konsantrasyonunda üretimin düştüğü belirlendi.

Çalışmamızda askorbik asite ek olarak üretim ortamına, ayçiçek yağı, zeytinyağı ve hindistancevizi yağı olmak üzere üç farklı bitkisel yağ, %1, %1.5 ve %2 oranlarında ilave edilerek, bu bitkisel yağların da mikrobiyal selüloz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışma sonucunda, üretim ortamına %2 oranında zeytinyağı ilave edilmesi ile üretimin %3,5 artarak 43,8 g/L'den, 45,35 g/L'ye ulaştığı belirlenirken, aynı orandaki ayçiçek yağı ile üretimin %3 artarak 45,25 g/L'ye, hindistancevizi yağı ilavesiyle ise %1,5 artarak 44,5 g/L'ye ulaştığı belirlendi. Bunun yanı sıra, üretim ortamına ilave edilen yağ oranının artması ile üretim miktarının düştüğü belirlendi (Şekil 4.19).

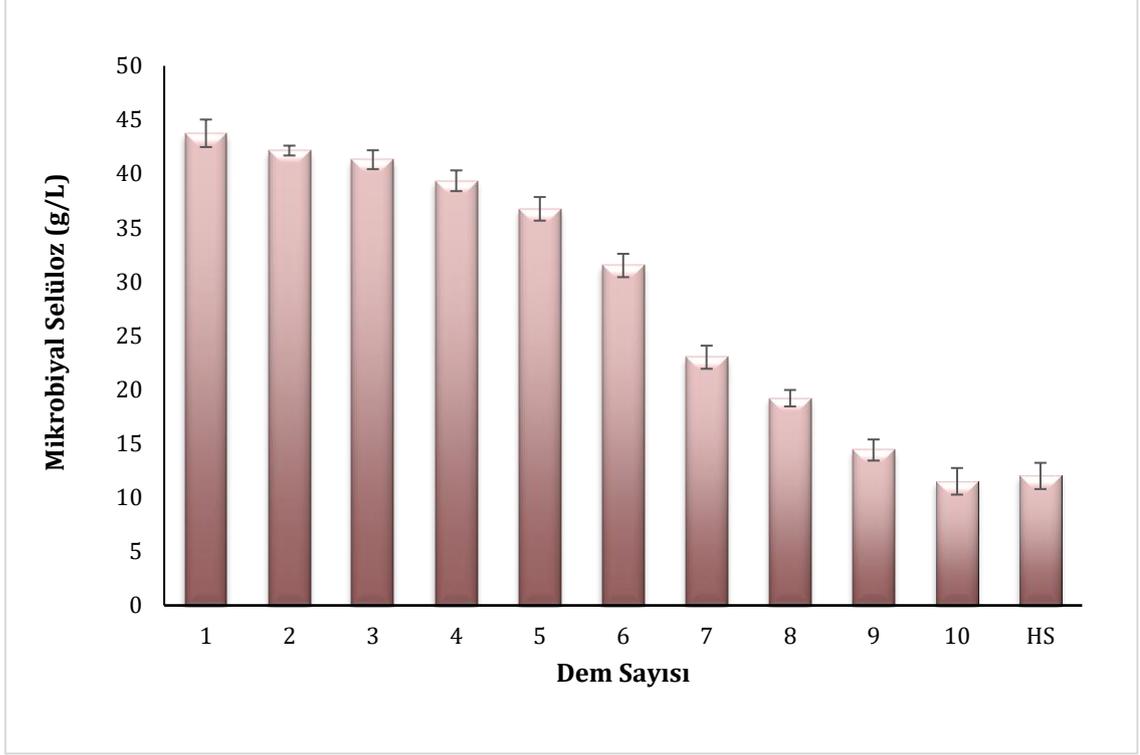


Şekil 4.19. Bitkisel yağların mikrobiyal selüloz üretimine etkisi.

Zywicka ve arkadaşları, *Komagataeibacter xylinus*'un HS besiyerine %1 oranında bitkisel yağ eklenmesi ile %500 oranında daha fazla selüloz ürettiğinin ve üretilen selülozun yağsız ortamda üretilen selüloza kıyasla daha yüksek gerilme kuvveti sergilediğini göstermiştir. Araştırmacılar bu durumun ardındaki mekanizmayı, üretim ortamına ilave edilen %1 oranındaki yağın tüm kültür ortamı yüzeyini kaplamaması nedeniyle mikrobiyal selüloz biyosentezinin ilk aşamasında oksijen geçişini sağlayarak selüloz üretmesine izin verilmesi ve sonrasında ise oksijenli ortam ve besiyeri arasında bir membran oluşturarak bakterilerin oksijene ulaşımını kolaylaştırması olarak açıklanmıştır. Üretim ortamına ilave edilen yağ çeşitleri ile üretim miktarının değişmesini ise, ilave edilen bitkisel yağların yoğunluklarının farklı olması ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak, yağ hacminin artırılması ile biyosentezin ilk aşamasının sekteye uğraması nedeniyle üretimde önemli bir düşüş belirlenmiştir [155].

4.8. Yeşil Çayın Tekrar Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Biyoteknolojik çalışmalarda atık malzemelerin pigment, antibiyotik ve biyopolimerler gibi değerli bileşiklerin biyosentezi için hammadde olarak kullanılması, yenilenemeyen malzemelerin kullanımının azaltılması ve çevreye verilen zararın en aza indirilebilmesi amacıyla oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, çalışmamızda mikrobiyal selüloz üretimi için üretim ortamı olarak kullanılan ve atık durumuna geçen yeşil çay yapraklarının mikrobiyal selüloz üretiminde tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Bunun için üretimde kullanılan çay yaprakları 10. deme kadar tekrar tekrar demlenerek mikrobiyal selüloz üretimi için belirlenen besiyeri (%10 yeşil çay, % 10 glukoz, pH=5) hazırlandı. Hazırlanan besiyerine, HS besiyerinde zenginleştirilen *K. europaeus* ve *Z. parabailii* kültürünün %20 oranında ekimleri yapılarak, 30°C'de 168 saatlik statik inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinin sonunda ilk kez demlenen yeşil çay ile mikrobiyal selüloz üretimi 43,75 g/L olurken en düşük üretimin 10. dem ile 11,5 g/L olarak elde edildiği ve üretimin dem sayısının artmasıyla birlikte doğrusal olarak düştüğü gözlemlendi. Bu düşüşe rağmen 10. dem ile elde edilen mikrobiyal selüloz miktarının HS besiyerinde elde edilen miktar ile aynı olduğu belirlendi (Şekil 4.20). Elde edilen bu sonuçlar, kullanılmış ve atık durumuna geçmiş olan çay yaprakları kullanılarak hazırlanan besiyerinin dahi iyi bir üretim ortamı olabileceğini ve bu nedenle mikrobiyal selüloz üretimi için düşük maliyetli denebilecek bir ortam olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.20. Yeşil çay dem sayısının mikrobiyal üretime etkisi

Sharma ve arkadaşları, kombucha karışık kültürü ve %5 siyah çay ile mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, üretim ortamı olarak 2. kez demlenen çay yapraklarının kullanılmasıyla 12,8 g/L mikrobiyal selüloz elde ederken, ilk kez demlenen çay yaprakları ile bu miktarın 13,3 g/L olduğunu ve ikinci dem ile üretimin yalnızca %4 oranında düştüğünü bildirmiştir. Çalışmamızda ise ilk kez kullanılan yeşil çay ile elde edilen selüloz miktarı 43,75 g/L iken, ikinci kez demlenerek kullanılan yeşil çay ile %3,5 düşüş ile 42,15 g/L mikrobiyal selüloz elde edildi. Çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak, bu çalışmada da atık çayın mikrobiyal selüloz üretiminde tekrar değerlendirilmesiyle üretim maliyetinin düşürüldüğü belirtilmiştir [156].

Atık yeşil çayın kombucha karışık kültürü ile mikrobiyal selüloz üretiminde değerlendirildiği başka bir çalışmada ise yeşil çay yapraklarının ikinci kez demlenmesi ile 21 g/L mikrobiyal selüloz elde edildiği belirlenirken bu değer ilk kez demlenen siyah çaya kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir, bu durum yeşil çay içeriğindeki azot ve antioksidan madde miktarının siyah çaya kıyasla fazla olması ile açıklanmıştır [15].

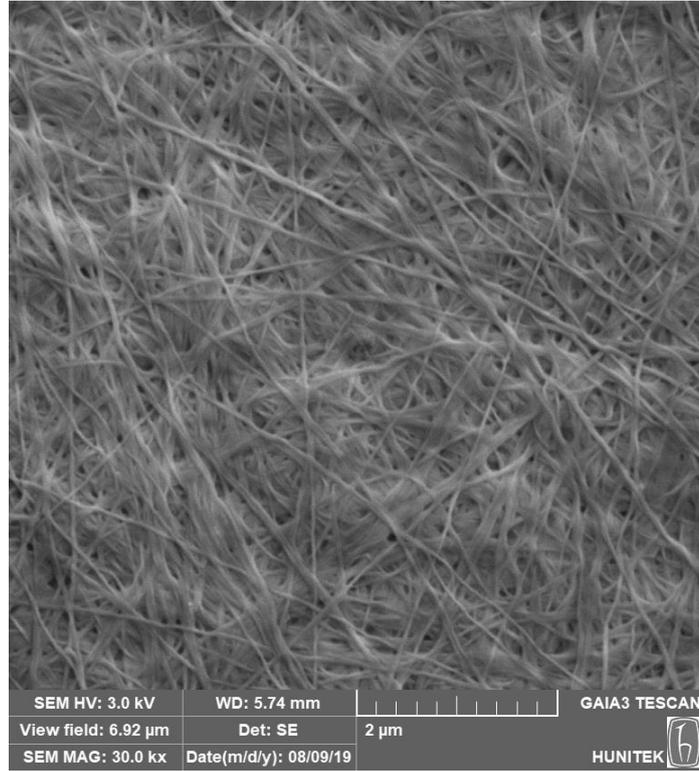
Dünya çapında yıllık çay tüketimi yaklaşık olarak 2,5 milyon tondur ve tüketilen çay türlerinin % 20'sini yeşil çay oluşturmaktadır. Tüketimin ardından atık haline gelen çay yaprakları genellikle çöpe atılmakta ve evsel atıklarla birlikte yakılarak bertaraf edilmektedir. Atıkların yakılması pahalı olduğu gibi çevresel sorunlara da neden olmaktadır. Üstelik atık haline geçen değerli materyallerin değerlendirilmesi çevresel ve ekonomik açıdan oldukça avantajlıdır. Atık yeşil çay içeriği yeşil çay içeriğiyle tamamen aynıdır, ancak demleme sayısının artmasıyla birlikte içerik konsantrasyonu azalmaktadır bu nedenle, atık yeşil çay yaprakları yüksek organik madde ve nitrojen içeriği nedeniyle toprak verimliliğinin artırılması amacıyla kompostlama malzemesi olarak kullanılmasının yanı sıra kümse hayvanları için yem malzemesi olarak da değerlendirilmektedir [157,158]. Atık yeşil çay yaprakları endüstriyel biyoteknoloji çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin yapılan farklı çalışmalarda, atık çay yapraklarından ile etkili ve düşük maliyetli adsorbent materyal olarak yararlanılmaktadır [159]. Buna ek olarak biyoplastikler gibi çeşitli ekzopolisakkaritlerin üretiminde de düşük maliyetli hammadde olması nedeniyle yeşil çay yaprakları tercih edilmektedir [160].

Çalışmamızda da mikrobiyal selüloz üretimi için yüksek maliyete sahip olan HS besiyerinin yerine yeşil çay kullanılarak üretim maliyeti azaltılırken, dem sayısının artırılması ile maliyetin iyice düşürüldüğü belirlendi.

4.9. Mikrobiyal Selülozun Karakterizasyonu

Çalışma sonucunda elde edilen ve yıkanıp, kurutulan mikrobiyal selülozun karakterizasyon işlemleri, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜNİTEK) gerçekleştirildi.

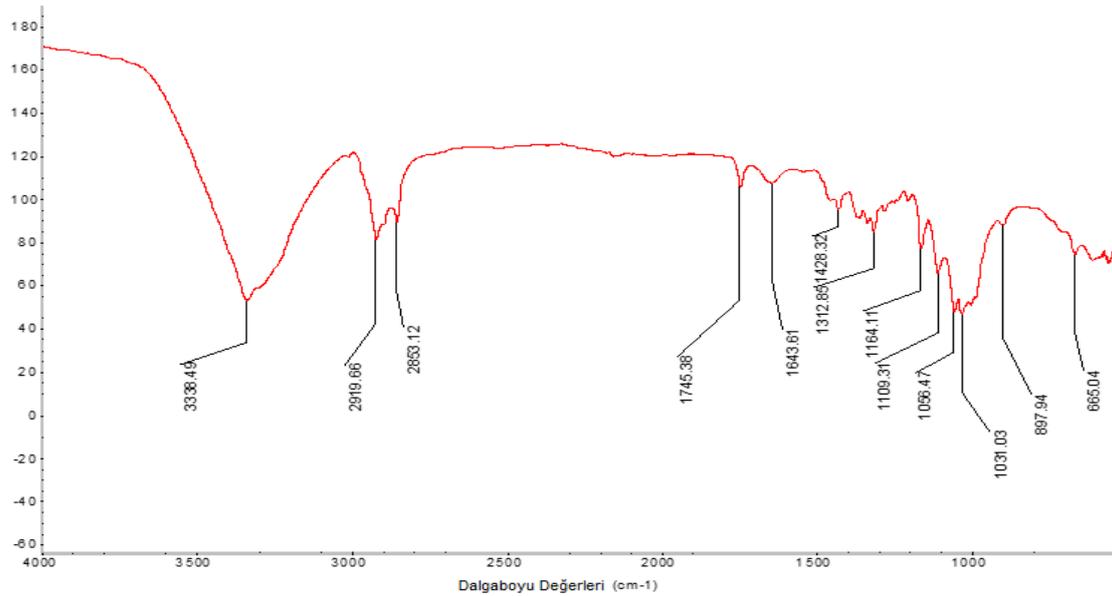
Çalışmada elde edilen mikrobiyal selülozun yüzey morfolojisinin incelenmesi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edildi. Mikrobiyal selülozun yapısının, rastgele ve düzensiz bir şekilde bir araya gelen, nanofiberlerden oluşan üç boyutlu bir ağ yapısı gösterdiği belirlendi (Şekil 4.21). Mikrobiyal selülozun yapısında yer alan nanofiberler, mikrobiyal selülozun gerilme mukavemeti, su buharı geçirgenliği, esneklik, gerilme direnci ve su tutma kapasitesi gibi bazı avantajlar sağlamaktadır [161,162].



Şekil 4.21. Mikrobiyal selülozun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (30.0 kx).

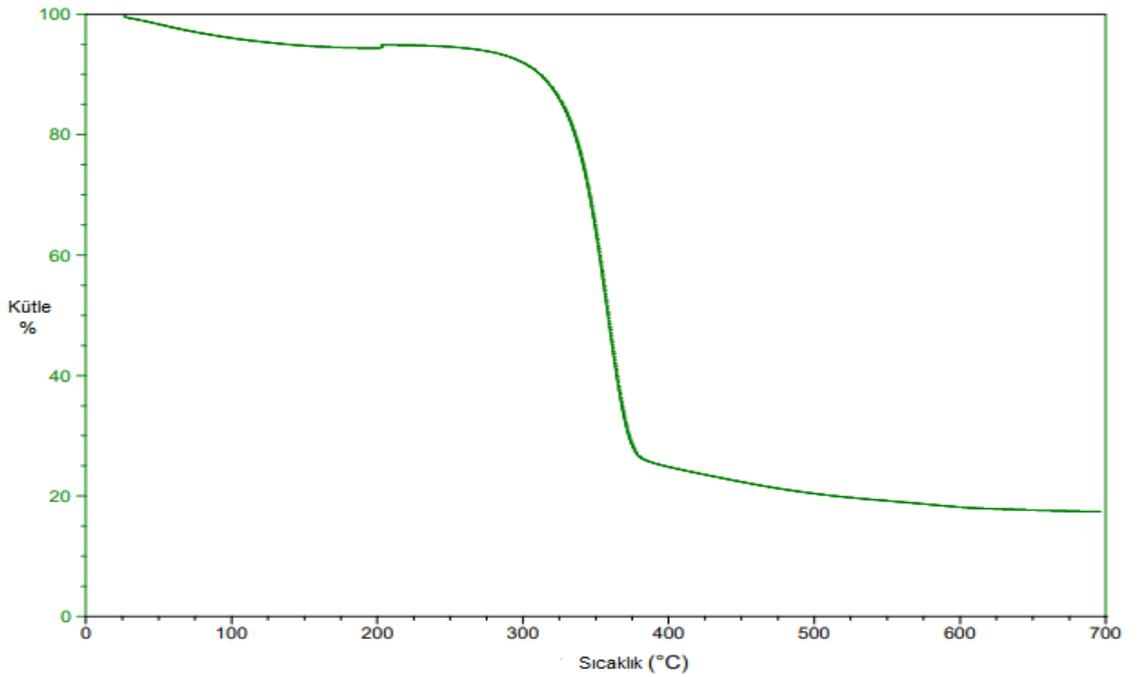
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) taraması ile çalışmada elde edilen mikrobiyal selülozun yapısındaki elementler ve bağ yapısı incelendi (Şekil 4.22). FT-IR spektrumlarındaki piklerin konumu ve yoğunluğu çalışmamızın sonunda, farklı çalışmalar

ile elde edilen ve polimerik bir form gösteren mikrobiyal selüloz örnekleri ile özdeş yapıya sahip olan mikrobiyal selülozun elde edildiğini doğrulamaktadır [163, 164]. Mikrobiyal selüloz örneklerinin karakteristik olarak yaklaşık 3340, 2930, 1650 ve 1050 cm^{-1} dalga boyunda pikler verdiği bilinmektedir [165]. 3280 ve 3340 cm^{-1} aralığında görülen pik, tip 1 selülozun zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağlarının gerilme titreşimlerini ve hidroksil gruplarının (-OH) varlığını gösterirken, 2915 ile 2930 cm^{-1} bandında görülen pik, hidroksimetil gruplarının varlığına işaret etmektedir [166, 167]. 1650 cm^{-1} ve 1420 cm^{-1} aralığında gözlenen pik değeri, mikrobiyal selüloz fibrilleri tarafından adsorbe edilmiş su molekülünün, O-H bağlanmalarını göstermekteyken, 1750 ile 1050 arasında görülen pikler, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen tip 1 selülozun içerdiği CH₂ moleküllerinin katlanmalarını göstermektedir [166, 168]. Ayrıca grafikte görülen 897 cm^{-1} dalga boyunda görüntülenen pikin selüloz I için karakteristik bir pik değeri olduğu ve β -glukozidik bağların antisimetrik faz dışı halka gerilmesi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir [169].



Şekil 4.22. Mikrobiyal selülozun Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Çalışmada üretilen mikrobiyal selülozun termal kararlılık değeri TGA metoduyla elde edildi (Şekil 4.23). Analiz sonucunda ortaya çıkan verilere göre, yaklaşık olarak %5 olan ilk kütle kaybının 200-225 °C arasındaki sıcaklıkta görülmektedir. Bu kütle kaybının nedeni üretilen mikrobiyal selüloz tarafından absorbe edilen suyun buharlaşmasıdır [170]. Yaklaşık olarak %10 olan ikinci kütle kaybı, hidroksil ve hidroksi metil gruplarının parçalanması nedeniyle yaklaşık 215°C ile 375°C arasındaki sıcaklık değerlerinde gerçekleşirken, üçüncü ve son kütle kaybı ise, piran olarak isimlendirilen, glukoz monomerlerindeki altı karbonlu halkasal yapılarının yıkılması nedeniyle 375°C ile 600°C aralığındaki yüksek sıcaklık değerlerinde görülmektedir [171]. Termogravimetrik analiz yöntemi sonucunda elde edilen mikrobiyal selülozun yaklaşık olarak 200-400°C aralığında, yüksek termal karakterizasyon sergilediği belirlendi.



Şekil 4.23. Mikrobiyal selülozun TGA analizi

Toplam kütle kaybı, bakteriyel selülozun kütlelerinin yaklaşık %80'ine denk gelmektedir ve dekompozisyon ve depolimerizasyon gibi termal bozulmalarla ilişkilendirilmektedir [172]. Analiz sonucunda, mikrobiyal selülozun kütlelerinin yaklaşık %85'ini depolimerizasyon ve dekompozisyon sonucunda kaybettiği belirlendi [173].

Polimerik malzemelerin göstermiş olduğu termal kararlılık, polimerin sıcaklığa dayanma ve mekanik özelliklerini belirli bir sıcaklık aralığında muhafaza etme kabiliyeti ile ilişkilidir [174]. Mikrobiyal selülozun göstermiş olduğu bu özellik, polimerik zincirdeki moleküler ağırlığı, kristalizasyon derecesi ve kimyasal yapısından büyük ölçüde etkilenmektedir. Termal stabilite değeri mikrobiyal selülozun kullanım alanını da etkilemektedir. Termal kararlık derecesi 200-375 °C arasında değişen mikrobiyal selüloz-çinko nanokompoziti antibakteriyel uygulamalarda kullanılırken, termal kararlılık derecesi 200-450°C olan mikrobiyal selüloz doku mühendisliğinde kullanılmaktadır [175].

5. YORUM

Enerji, malzeme ve yakıt gibi önemli endüstriyel ürünlerde petrol türevi sentetik ürünlerin kullanılması beraberinde çevre kirliliği ve enerji krizi gibi önemli problemleri getirmiştir. Bu problemlerin en aza indirilmesi ve insanların doğaya verdiği zararın hafifletilebilmesi açısından malzeme ve polimer biliminin en önemli ilgi alanlarından biri, yenilenebilir doğal malzemelerden elde edilen ve fonksiyonel özelliklere sahip olan biyomateryallerin oluşturulmasıdır. Bu bağlamda selüloz, dünyada en bol miktarda bulunan biyopolimer olması, sürdürülebilir ve parçalanabilir bir materyal olması nedeniyle pek çok alanda kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan selülozun büyük bir kısmı odunsu bitkilerden elde edilmektedir. Bu da, her geçen gün yangınlar, doğal afetler, tarım ve kentleşme nedeniyle orman alanları azalmaktadır. Ayrıca, bitkilerden elde edilen selülozun lignin, hemiselüloz ve pektin gibi bileşiklerle bir arada bulunması saf haldeki selülozun eldesi için iş yükünü ve yüksek olan maliyeti daha da arttırmaktadır. Bu nedenle, kağıt sanayisindeki değişmez hammadde olmasının yanı sıra, tekstil ve paketleme gibi pek çok farklı endüstriyel alanda kullanılan selülozun farklı doğal kaynaklardan elde edilmesi elzemdir. Bu noktada, Mikrobiyal selüloz, bitkisel kaynaklardan elde edilen selüloza iyi bir alternatif olmaktadır. Mikrobiyal selüloz, bitkisel selüloz ile kıyaslandığında göstermiş olduğu yüksek su tutma kapasitesi, mekanik direnç ve polimerizasyon derecesi gibi sahip olduğu pek çok özellikler nedeniyle gelecekte bitkisel selülozun yerini almaya adaydır [176].

Funguslar ve algler tarafından da sentezlendiği bilinen mikrobiyal selüloz başta asetik asit bakterileri olmak üzere, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium* ve *Sarcina* gibi farklı bakteri cinsleri tarafından ekstraselüler olarak sentezlenmektedir. Kimyasal formülü, bitkisel selüloz ile aynı olan mikrobiyal selüloz, iklim, sıcaklık ve bitki patojenleri gibi çevresel faktörlere bağlı olmaksızın, laboratuvar ortamında kesintisiz olarak üretilebilmekte ve üretim sonunda da kullanım alanına göre kimyasal yöntemler ile modifiye edilebilmektedir. Ayrıca, mikroorganizmalarca ekstraselüler olarak sentezlenen mikrobiyal selüloz hemiselüloz gibi bileşiklerden bağımsızdır ve bu nedenle herhangi bir saflaştırma işlemine ihtiyaç duyulmamaktadır [4].

Mikrobiyal selüloz, mekanik kuvvetlere karşı dirençli, gözenekli, biyouyumlu ve parçalanabilir bir biyopolimer olması sebebiyle bitkisel selülozun kullanıldığı her alanda kullanılmasının yanı sıra, tıp, kozmetik, elektronik ve gıda endüstrileri gibi pek çok

alanda tercih edilmektedir [8]. Mikrobiyal selülozun ticari olarak üretilmesi için genellikle sentetik besiyeri kullanılmakta bu da üretim maliyetini arttırarak ticari üretimi sınırlandırmaktadır. Mikrobiyal selülozun üretiminde etkin mikroorganizmanın saptanması ve uygun besiyerinin belirlenip kullanılması, üretimi arttırıp maliyeti düşürerek, mikrobiyal selülozun birçok farklı alanda, ticari olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal selüloz üretebilen mikroorganizmaların belirlenmesi ve düşük maliyetli üretim ortamlarının araştırılması son yıllarda önemle araştırılan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Günümüzde dünya çapındaki yıllık çay üretimi 6,3 milyar kilograma ulaşmakta ve çay içeriğinde yer çeşitli maddeler nedeniyle gıda endüstrisinin yanı sıra biyoteknolojik uygulamalar için de bir hammadde haline gelmektedir. Son yıllarda yenilenebilir kaynakların alarm vermesiyle birlikte özellikle endüstriyel biyoteknoloji uygulamalarında doğal ve ucuz hammaddeler kullanılarak, mikrobiyal ürünlerin üretilmesi ile ilgili araştırmaların sayısında artış olmuş, çay da sürdürülebilir ve ucuz bir hammadde olması nedeniyle mikrobiyal selüloz üretimi gibi pek çok araştırmanın konusu haline gelmiştir [177].

Çalışmamızda, selüloz üreticisi olan mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için doğal bir ortam olan ev yapımı sirkelerden mikrobiyal selüloz üreticisi olan bakteriler ve etanol üreticisi olmaları nedeniyle mikrobiyal selüloz üretimine yardımcı olan mayalar izole edilerek bu mikroorganizmalar ile karışık kültürler oluşturuldu. Bu karışık kültürlerin mikrobiyal selüloz üretimleri karşılaştırıldığında, en yüksek üretimin *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*'nin 2:1 oranında bir araya getirilmesi ile oluşturulan karışık kültür ile elde edildiği belirlendi ve çalışmanın devamında bu kültür selüloz üreticisi olarak seçildi. Bu kültür mikrobiyal selüloz üretiminde, alternatif ve ucuz üretim ortamı olarak kullanılmak üzere seçilen üç farklı bitki çayı (siyah çay, yeşil çay ve hibiskus çayı) ile hazırlanan besiyerine %10 oranında ekildi ve en yüksek miktarda üretimin, 30 °C'de gerçekleştirilen 168 saatlik statik inkübasyon sonucunda % 10 yeşil çay ve % 10 glukoz kullanılarak hazırlanan besiyerinde 40,5 g/L gerçekleştiği belirlendi. Üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çayın optimize edilmemiş koşullarda dahi sentetik HS besiyerinden çok daha etkili bir üretim ortamı olduğu belirlendi. Mikrobiyal selüloz üretimi için uygun fizyolojik koşulların pH 5'de, %20 kültür konsantrasyonunda statik olarak 30 °C'de 10 günde gerçekleştiği saptandı.

Mikrobiyal selüloz üretiminde, üretim ortamı olarak tercih edilen alternatif hammaddenin içeriği ve hammadde konsantrasyonu oldukça önemlidir. Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan yeşil çay içeriğinin fenolik bileşikler, amino asitler, vitamin ve mineraller açısından zengin olması, buna ek olarak antioksidan aktivitesinin diğer çaylara kıyasla fazla olması, üretimin artırılmasını etkileyen başlıca parametrelerden bir tanesidir. Yeşil çay, içeriğinin zengin olmasının yanı sıra, yıllık üretim miktarının fazla, maliyetinin düşük olması ve kolaylıkla temin edilebilmesi nedeniyle de mikrobiyal selüloz üretiminde tercih edilebilir uygun bir hammadde olarak belirlendi. Çalışmamızda, üretim ortamı olarak kullanılan yeşil çay konsantrasyonunun %1'den %10'a artırılmasıyla birlikte elde edilen mikrobiyal selüloz miktarının %500 arttığı ve bu miktarın sentetik besiyeri ile elde edilen miktardan %110 fazla olduğu saptandı.

Mikrobiyal selüloz üretiminin artırılmasında üretim ortamına eklenen karbon kaynağı ve karbon kaynağı konsantrasyonu da büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda, mikrobiyal selüloz üreticisi olan kültürün karbon kaynağı olarak kolay metabolize edilebilen bir bileşik olan glukozun kullanılmasıyla mikrobiyal selüloz üretiminin arttırdığı saptandı. Glukoz konsantrasyonunun %4'den %10'a çıkarılması ile mikrobiyal selüloz üretiminin %150 oranında arttığı belirlendi. Buna ek olarak glukoz konsantrasyonunun %10'dan fazla konsantrasyonlara çıkarılması ile üretim miktarının hücre içi ozmotik basınç değerinin değişmesi ve su aktivitesi azalması nedeniyle düştüğü gözlemlendi.

Mikrobiyal selüloz üretiminin en yüksek verim ile gerçekleştirilmesinde, üretim ortamına eklenen ilave azot kaynaklarının da etkisi de araştırıldı. Çalışmamızda, temel besiyeri olarak kullanılan ve içeriğinde yaklaşık olarak %10 oranında azot bulunan yeşil çaya ilaveten, üretim ortamına organik ve inorganik azot kaynakları eklenerek mikrobiyal selüloz üretim miktarları değerlendirilmiş ve ilave azot kaynaklarıyla birlikte üretimin yalnızca %2 oranında arttığı saptanırken, bu ilave azot kaynaklarının üretim maliyetini önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. Çalışmamızda düşük maliyet ile yüksek verim hedeflendiğinden çalışmanın devamında, üretim ortamı olarak seçilen yeşil çay besiyerine ilave azot kaynağı eklenmedi.

Mikrobiyal selüloz üretiminde uygun pH değerinin, üretimde kullanılan mikroorganizmaya göre değiştiği bilinse de, bu aralığın 4,5 – 6,5 olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal selüloz üretimi sırasında inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte besiyerinin pH değeri düşmektedir. Bu nedenle mikrobiyal selüloz üretiminin düşük pH değerlerinde gerçekleşmesi hem bu problemi ortadan kaldırmakta hem de birçok mikroorganizma

düşük pH'larda yaşayamadığı için mikrobiyal kontaminasyonu önlemektedir. Bu bağlamda çalışmamızda mikrobiyal selüloz üretimin pH=5'de gerçekleşmesi avantaj sağlamaktadır.

Ekstraselüler polimerlerin üretimindeki diğer bir önemli faktörde üretimde kullanılan mikroorganizmanın ortamda uygun ve yeterli miktarda bulunmasıdır. Üretim ortamına ekilen mikroorganizma miktarının fazla olması adaptasyon fazını kısaltıp, üretimi arttırarak avantaj sağlayacağı gibi, eşğin aşılması besin rekabetini arttırarak üretimi olumsuz etkileyebilmektedir. Çalışmamızda %10 yeşil çay ve % 10 glukoz ile hazırlanan ve pH=5 olan üretim ortamında ekim oranının %10'dan % 20'ye çıkarılması ile üretimin %2,5 arttığı belirlenirken, artırılan ekim oranlarında ise üretimde önemli bir artış görülmediği ve sonrasında ise sabitlendiği saptandı.

Ekzopolisakkaritlerin üretiminde inkübasyon sıcaklığının mikroorganizmaların besiyeri içeriğini metabolize edebilme yetenekleri üzerinde etkin olduğu dolayısıyla üretimi etkilediği bilinmektedir. Mikrobiyal selüloz üretiminde tercih edilen potent suşlar olan asetik asit bakterilerinin üremeleri için uygun sıcaklık aralığı 25-30 °C'dir ve mikrobiyal selüloz üretimi de bu sıcaklık aralığında gerçekleşmektedir. Çalışmamızda *Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii* ile hazırlanan karışık kültür ile 30°C'de 41,4 g/L mikrobiyal selüloz elde edilirken 25 °C'de bu miktar 39,2 g/L'dir. Kültürün düşük sıcaklıkta da yüksek miktarda üretim gerçekleştirmesi; söz konusu türlerin değişen sıcaklık aralığında da mikrobiyal selüloz üretiminde etkili olabileceklerini göstermektedir. Böylece söz konusu kültürün, oda sıcaklığı olarak kabul edilen 25 °C'ye dahi adapte olabileceği ve sıcaklık kontrolünün zor olduğu büyük inkübasyon ortamlarında kullanılabileceğini işaret etmektedir.

Mikrobiyal selülozun üretiminde kullanılan kültür yöntemi, elde edilen selülozun morfolojik yapısını etkilemektedir. Statik kültür yöntemi ile membran şeklinde selüloz elde edilirken, çalkalamalı kültür yöntemi ile düzensiz şekillere sahip olan selüloz kütleleri elde edilmektedir. Farklı morfolojilerde elde edilen selülozların kullanım alanları da farklıdır. Örneğin membran şeklindeki selüloz, kağıt, yapay kan damarı, doku ve diş implantı gibi ürünlerde tercih edilirken, düzensiz şekillerdeki selüloz ise gıdalarda kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal selüloz biyosentezi aerobik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir ve üretim için inkübasyon ortamına oksijen girişi gerekmektedir. Bu nedenle mikrobiyal selüloz üretiminde sıklıkla çalkalamalı kültür yöntemleri de tercih edilmektedir. Ancak üretimin çalkalamalı kültür

yöntemi ile gerçekleştirilmesi, üretim için gerekli olan enerji miktarını ve buna bağlantılı olarak maliyeti arttıracığı için dikkat edilmesi gereken bir husustur. Çalışmamızda, statik kültür yöntemi ile membran şeklinde, 41,8 g/L selüloz elde edilirken, çalkalamalı kültür yöntemiyle düzensiz kütleler halinde üretilen selülozun, kurutulduktan sonra kütlelerinin yaklaşık %99'unu kaybederek 0,0025 g/L selüloz elde edildiği belirlendi.

İnkübasyon süresi biyopolimerlerin üretim miktarını ve sentezlenen polimerin yapısını etkilemekle birlikte üretim maliyeti için de oldukça önemli bir parametredir. İnkübasyon süresinin kısaltılması, üretim için kullanılan hammadde miktarını ve harcanan enerjiyi azaltacağı için, düşük maliyet ile gerçekleştirilmesi istenen üretim uygulamalarının es geçilemeyecek bir basamağıdır. Çalışmamızda, üretim süresinin 168 saatten 240 saate çıkarılması ile üretimin %5 oranında arttığı ancak inkübasyon süresinin arttırılması ile üretim miktarının sabitlendiği görüldü. İnkübasyon süresinin uzatılmasıyla birlikte üretim maliyeti artacağı için, mikrobiyal selüloz üretimi için sürenin dikkatli seçilmesi gerektiği sonucuna varıldı. İnkübasyon süresinin uzatılmasıyla birlikte üretim maliyeti artacağı için, mikrobiyal selüloz üretimi için en uygun inkübasyon süresinin 168 saat olduğuna karar verildi.

Farklı çevresel koşullara adapte olmuş mikroorganizmaların çevre koşullarından etkilendiği ve farklı çevre koşullarında farklı tepkiler verdiği bilinmektedir. Işık da mikroorganizmalar için metabolik faaliyetlerini etkileyen önemli bir dış etkidir. Çay ve kombucha karışık kültürü ile elde edilen fermente bir içecek olan ve mikrobiyal selüloz üretiminde de kullanılan kombucha üretiminin geleneksel olarak karanlık ortamlarda gerçekleştirildiği bilinmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda ışığın mikrobiyal selüloz üretiminde etkili olabileceği değerlendirilerek karanlık ve aydınlık ortamlarda üretim gerçekleştirildi. Literatürde de bu konuda yapılan bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışma sonucunda iki ortamda da aynı miktarda mikrobiyal selüloz elde edildi ve ışığın mikrobiyal selüloz üretimi üzerinde bir etkisi olmadığı saptandı. Böylece, üretimin karanlık ve aydınlık inkübasyon ortamı fark etmeksizin gerçekleştirilebileceği gösterildi.

Mikrobiyal selüloz eldesinde, besiyerine eklenen farklı maddelerin üretimi etkilediği bilinmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda üretim ortamına, literatürde etkili oldukları gösterilen, bitkisel yağlar (zeytinyağı, ayçiçek yağı, hindistancevizi yağı) ve askorbik asit ilave edildi. Yeşil çay ile hazırlanan temel besiyerine %2 oranında zeytinyağı ilavesiyle üretimin %3,5 arttığı gösterilirken, artan yağ konsantrasyonunda üretimin düştüğü belirlendi. Besiyerine, ekzopolisakkaritlerin üretiminde de kullanılan askorbik asitin

ilavesiyle üretimin arttığı belirlenirken, askorbik asit konsantrasyonunun %0,5'den %1'e çıkarılması ile selüloz üretimi %6 artarken, %1'den %1,5'a çıkarılmasıyla üretimin yalnızca %0,6 oranında artması ve askorbik asitin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasıyla birlikte üretim maliyetinin yükselmesi nedeniyle üretim ortamına daha fazla miktarda askorbik asit ilavesi yapılmadı.

Biyoteknolojik uygulamalarda atık malzemelerin değerli materyallerin biyosentezi için hammadde olarak kullanılması, petrol türevi sentetik malzemelerin kullanımının azaltılması, çevreye verilen zararın en aza indirilebilmesi ve üretim maliyetinin düşürülebilmesi amacıyla oldukça önemlidir. Çalışmamızda kullanılan yeşil çay yapraklarının 10. deme kadar tekrar kullanılmasıyla birlikte, mikrobiyal selüloz üretiminde yeşil çayın yanı sıra atık yeşil çayın da kullanılabilmesi ve yüksek miktarda selüloz elde edilebileceği gösterildi. Yeşil çayın ilk kez kullanılmasıyla 43,75 g/L selüloz elde edilirken, aynı çayın 10. kez kullanılmasıyla birlikte 11,5 g/L selüloz elde edildiği ve bu miktarın sentetik besiyerinde elde edilenden yalnızca 0,5 g/L düşük olduğu saptandı. Böylece, hem yeşil çayın hem de atık yeşil çay yapraklarının alternatif üretim ortamı olarak kullanılabilmesi ve düşük maliyet ile mikrobiyal selüloz üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterildi.

Sonuç olarak çalışmamızda, doğal ortamlarından izole edilen ve tanımlanan mikroorganizmaların belirli oranlarda bir araya getirilmesi ile oluşturulan karışık kültür ile mikrobiyal selüloz üretimi gerçekleştirildi ve; düşük maliyetli ve kolay temin edilebilir bir hammadde olan yeşil çay üretim ortamı olarak alternatif bir besiyeri hazırlandı. Hazırlanan bu besiyeri kullanılarak, mikrobiyal selüloz üretimine etki eden koşullar araştırıldı ve bu koşulların optimize edilmesiyle, kısa sürede, düşük maliyetli selüloz üretimi gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, mikrobiyal selüloz üretimi için etkinliği belirlenen ve doğal ortamlarından izole edilen mikroorganizmaların (*Komagataeibacter europaeus* ve *Zygosaccharomyces parabailii*) belirli oranlarda bir araya getirilmesiyle hazırlanan karışık kültür ile literatürde mikrobiyal selüloz üretiminin araştırıldığı benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda; hem mikroorganizmaların belirli oranlarda bir araya getirilmesi ile hazırlanan karışık kültürün hem de yeşil çayın mikrobiyal selüloz üretiminde kullanımı için yeni bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar etkin kültür ve düşük maliyet ile mikrobiyal selüloz üretimini hedefleyen çalışmalara katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Koç, C. A. Zıba, S. Akarsu, B. Orhan, and M. Dolaz, *KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 19 (2016) 3.
- [2] Liu, K., Du, H., Zheng, T., Liu, H., Zhang, M., Xie, H., *Carbohydrate Polymers*, (2021) 117740.
- [3] Li, Y. Y., Wang, B., Ma, M. G., & Wang, B., *International Journal of Polymer Science*, (2018).
- [4] Lavanya, D. K. P. K., Kulkarni, P. K., Dixit, M., Raavi, P. K., Krishna, L. N. V., *International Journal of Drug Formulation and Research*, 2 (2011) 19-38
- [5] Brown, A. J. , *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49 (1886) 432-439
- [6] Basu, A., Vadanam, S. V., Lim, S., *Scientific Reports*, 8 (2018) 1-8.
- [7] Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S., *Food Technology and Biotechnology*, 47 (2009) 107-124.
- [8] Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A., *Angewandte Chemie International Edition* , 50 (2009) 5438-5466.
- [9] M. Ul-Islam, S. Khan, M. W. Ullah, J. K. Park, , *Biotechnology. Journal.*, 10 (2015) 1847–1861.
- [10] R. Jonas, L. F. Farah, *Polymer. Degradation and Stability*, 59 (1997) 101–106.
- [11] Sharma, C., & Bhardwaj, N. K., *Materials Science and Engineering*, 104 (2019) 109963.
- [12] J. Shi, Y. Zhu, Y. Zhang, Z. Lin, H. P. Lv, *Lwt*, 103 (2019) 27–33
- [13] Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Jyoti, S., *Food research international*, 53 (2013) 568-584.
- [14] Coskun, F., & Kayisoglu, S., *Global Journal of Research In Engineering*, 20 (2020)
- [15] Gargey, I. A., Indira, D., Jayabalan, R., & Balasubramanian, P., *In Green Buildings and Sustainable Engineering*, (2019) 337-346.
- [16] Hopfe, S., Flemming, K., Lehmann, F., Möckel, R., Kutschke, S., Pollmann, K. *Waste Management*, 62 (2017) 211-221.

- [17] Angga, W. A., Rizal, Y., Mahata, M. E., Yuniza, A., Mayerni, R., Pakistan Journal of Nutrition, 17 (2018) 287-293.
- [18] Zhang, Q., Fu, C., Zhao, C., Yang, S., Zheng, Y., Xia, M., Wang, M. LWT, 133 (2020) 109868.
- [19] Ghosh, P. R., Fawcett, D., Sharma, S. B., Poinern, G. E. J., International journal of food science, (2016)
- [20] Xia, T., Duan, W., Zhang, Z., Li, S., Zhao, Y., Geng, B., Wang, M., Food Research International, 140 (2021) 110064.
- [21] Ordóñez, J. L., Callejón, R. M., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., Food chemistry, 141 (2013) 2713-2719.
- [22] Peng, Q., Yang, Y., Guo, Y., Han, Y., Current microbiology, 71 (2015) 195-203
- [23] Bortesi, L., Fischer, R., Biotechnology advances, 33 (2015) 41-52
- [24] Kılıç, G., Geleneksel Yöntemlerle Üretilen İncir Sirkesinin Mikrobiyolojik, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2017
- [25] Jackson, R. S., Wine science, (2014) 535-676.
- [26] Gomes, R. J., Borges, M. D. F., Rosa, M. D. F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A., Food technology and biotechnology, 56 (2018) 139-151.
- [27] Noman, A. E., Al-Barha, N. S., Sharaf, A. A. M., Al-Maqtari, Q. A., Mohedein, A., Mohammed, H. H. H., Chen, F., Scientific reports, 10 (2020), 1-17.
- [28] Gullo, M., Verzelloni, E., Canonico, M., Process Biochemistry, 49 (2014) 1571-1579.
- [29] Masschelein, C. A., Journal of the Institute of Brewing, 92 (1986) 213-219.
- [38] Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M., Food chemistry, 115 (2009) 691-696.
- [39] Lu, Z. M., Liu, N., Wang, L. J., Wu, L. H., Gong, J. S., Yu, Y. J., Xu, Z. H., Applied and environmental microbiology, 82 (2016) 5860-5868.
- [40] Marshall, K. C., & Alexander, M., Journal of bacteriology, 80 (1960) 412.
- [41] Kamra, D. N., Singh, B., In Developments in Fungal Biology and Applied

- Mycology (2017) 125-134.
- [42] Rodrigues Reis, C. E., Bento, H. B., Carvalho, A. K., Rajendran, A., Hu, B., De Castro, H. F., Critical reviews in biotechnology, 39 (2019) 555-570.
- [43] Fernandez Nunez, E. G., Barchi, A. C., Ito, S., Escaramboni, B., Herculano, R. D., Mayer, C. R. M., de Oliva Neto, P., Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 92 (2017) 684-692.
- [44] Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., & Khan, S. A., New Biotechnology, 25 (2009) 437-441.
- [45] Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. Bioresource technology, 91 (2004) 153-156.
- [46] Meng, X., Yoo, C. G., Li, M., & Ragauskas, A. J., Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering, 1 (2016).
- [47] Schramm, M., & Hestrin, S., Microbiology, 11 (1954) 123-129.
- [48] De Wulf, P., Joris, K., & Vandamme, E. J., Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 67 (1996) 376-380.
- [49] Du Toit, W. J., & Lambrechts, M. G., International journal of food microbiology, 74 (2002) 57-64.
- [50] Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S. Journal of Materials Science, 25 (1990) 2997-3001.
- [51] Çoban, E. P., Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi ile Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2007.
- [52] Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Van Rensburg, P., Journal of applied microbiology, 91 (2001) 182-190.
- [53] Hu, Y., & Catchmark, J. M., Biomacromolecules, 11 (2010) 1727-1734.
- [54] Çoban, E. P., Bıyık, H. H., Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6 (2008) 19-26.
- [55] Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K., The Journal of general and applied microbiology, 47 (2001) 119-131.

- [56] Sjøstedt, A. B., J. Brenner, J. T. Staley, and N. R. Krieg, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, no. March, **2005**
- [57] MacWilliams, M. P., *American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*,. December **(2009)** 1–9
- [58] Sharafi, S. M., Rasooli, I., Beheshti-Maal, K. *Iranian Journal of Microbiology*, 2 **(2010)** 38.
- [59] Beevers, L., Hageman, R. H., *Amino Acids Derivation.*, **(2011)** 115–168
- [60] Reiner, K, November **(2010)** 1–9, 2010.
- [61] Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 **(2000)** 1981-1987.
- [62] Keskin, Z., Urkmez, A. S., Hames, E. E., *Materials Science and Engineering*, 75 **(2017)** 1144-1153.
- [63] Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V., Gupta, S. G., *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, **5 (2013)**. 31-33.
- [64] Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85 **(1998)** 598-603.
- [65] Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., & Devanthi, P. V. P., *Life Sciences*, **(2020)** 111–127.
- [66] Jung, J. Y., Park, J. K., & Chang, H. N., *Enzyme and Microbial Technology*, 37 **(2005)** 347-354.
- [67] Fan, X., Gao, Y., He, W., Hu, H., Tian, M., Wang, K., Pan, S., *Carbohydrate polymers*, 151 **(2016)** 1068-1072.
- [68] Dubey, S., Sharma, R. K., Agarwal, P., Singh, J., Sinha, N., Singh, R. P., *International journal of biological macromolecules*, 96 **(2017)** 52-60.
- [69] Jacek, P., da Silva, F. A. S., Dourado, F., Bielecki, S., & Gama, M. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2 **(2021)** 100022.
- [70] Jozala, A. F., & Pértile A., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 **(2015)** 181-1190.
- [71] Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., Yoshinaga,

- F., *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59 (1995) 1498-1502.
- [72] Abdelraof, M., Hasanin, M. S., El-Saied, H., *Carbohydrate polymers*, 211 (2019) 75-83.
- [73] Wang, Y. J., Li, L. Q., Shen, S. S., Liu, Y., Ning, J. M., Zhang, Z. Z., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (2020) 3803-3811.
- [74] Bureekaew, S., Shimomura, S., Kitagawa, S., *Science and technology of advanced materials*, 9 (2008) 014108.
- [75] Yim, S. M., Song, J. E., & Kim, H. R. *Process Biochemistry*, 59 (2017) 26-36.
- [76] Ng, M. C. F., & Wang, W., *Research Journal of Textile and Apparel.*, 19 (2015) 65–69.
- [77] Choi, S. J., Park, S. Y., Park, J. S., Park, S. K., Jung, M. Y., *Food chemistry*, 204 (2016) 94-101.
- [78] Liu, Y., Luo, L., Liao, C., Chen, L., Wang, J., & Zeng, L., *Food chemistry*, 269 (2018) 24-34.
- [79] Elmas, C., Gezer, C., *Akademik Gıda*, 17 (2019) 417-428.
- [80] Chen, D., Chen, G., Sun, Y., Zeng, X., Ye, H. *Food Research International*, (2020) 109584.
- [81] Treviño-Garza, M. Z., Guerrero-Medina, A. S., González-Sánchez, R. A., García-Gómez, C., Guzmán-Velasco, A., Báez-González, J. G., Márquez-Reyes, J. M., *Coatings*, 10 (2020) 1132.
- [82] Fahim, N., Montazer, M., Effect of *Althaea officinalis* and Green Tea Extracts on the Bacterial Cellulose Production, 14 th International Seminar on Polymer Science and Technology, November, 2020, p. 7–9.
- [83] Rathinamoorthy, R., Aarthi, T., Aksaya Shree, C. A., Haridharani, P., Shruthi, V., & Vaishnikka, R. L., *Journal of Natural Fibers*, (2019) 1-14.
- [84] Amon, J., Titgemeyer, F., & Burkovski, A., *FEMS microbiology reviews*, 34 (2010) 588-605.
- [85] Müller, T., Walter, B., Wirtz, A., & Burkovski, A. *Current microbiology*, 52 (2006) 400-406..

- [86] Ramana, K. V., Tomar, A., & Singh, L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2000) 245-248.
- [87] AL-Kalifawi, E. J., & Hassan, I. A., *Baghdad Science Journal*, 11 (2014) 1420-1428.
- [88] Zhong, C., Zhang, G. C., Liu, M., Zheng, X. T., Han, P. P., & Jia, S. R., *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (2013) 6189-6199.
- [89] Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., & Horinouchi, S., *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60 (1996) 1377-1379.
- [90] Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., & Kumar, A., *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3 (2001) 445-456.
- [91] Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A., *Journal of materials science*, 35 (2000) 261-270.
- [92] Castro, C., Cleenwerck, I., Trček, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Ganan, P., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (2013) 1119-1125.
- [93] Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S., *Progress in Polymer Science*, 26 (2001) 1561-1603.
- [94] Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., & Gidley, M. J., *Journal of Applied Microbiology*, 107 (2009) 576-583.
- [95] Moniri, M., Boroumand Moghaddam, A., Azizi, S., Abdul Rahim, R., Bin Ariff, A., Zuhainis Saad, W., Mohamad, R., *Nanomaterials*, 7 (2017) 257.
- [96] Keshk, S. M., & Sameshima, K., *African Journal of Biotechnology*, 4 (2005) 478-482.
- [97] Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J., *Biotechnology and applied biochemistry*, 33 (2001) 1-5.
- [98] Ruka, D. R., Simon, G. P., & Dean, K. M., *Carbohydrate polymers*, 89 (2012) 613-622.
- [99] Abdelhady, H. M., Enas, A. H., Sohir, S. A. E., & Abdullah, S. M., *Nature and Science*, 13 (2015) 30-40.
- [100] Ata, S., & Ali, H. M., *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 15

(2017) 41-47.

- [101] Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Roukas, T., Izydorczyk, M., Applied biochemistry and biotechnology, 97 (2002) 1-22.
- [102] Rodríguez, M., Canales, E., Borrás-Hidalgo, O., Biotecnología Aplicada, 22 (2005) 1-10.
- [103] Schramm, M., Gromet, Z., & Hestrin, S., Nature, 179 (1957) 28-29.
- [104] Degeest, B., & De Vuyst, L., Applied and Environmental Microbiology, 65 (1999) 2863-2870.
- [105] Aswini, K., Gopal, N. O., & Uthandi, S., BMC biotechnology, 20 (2020) 1-16.
- [106] Costa, A. F., Almeida, F. C., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A., Frontiers in microbiology, 8 (2017) 2027.
- [107] Mohite, B. V., Salunke, B. K., & Patil, S. V., Applied biochemistry and biotechnology, 169 (2013) 1497-1511.
- [108] Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., & Yoshinaga, F. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 60 (1996) 575-579.
- [109] Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., & Yun, J. W., Bioresource Technology, 96 (2005) 1175-1182
- [110] Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X., Carbohydrate polymers, 78 (2009) 275-281.
- [111] Zahan, K. A., Pa'e, N., & Muhamad, I. I., Arabian Journal for Science and Engineering, 40 (2015) 1881-1885.
- [112] Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S., Journal of Bioscience and Bioengineering, 88 (1999) 183-188.
- [113] Yassine, F., Bassil, N., Flouty, R., Chokr, A., El Samrani, A., Boiteux, G., & El Tahchi, M. Carbohydrate polymers, 146 (2016) 282-291.
- [114] Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E., & Kawamura, Y., Journal of fermentation and bioengineering, 84 (1997) 228-231.
- [115] Güzel, M., & Akpınar, Ö., Gıda, 42 (2017) 620-633.
- [116] Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R., & Li, Z., Bioresource Technology, 151 (2014)

113-119.

- [117] Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., & Hames, E. E., *International Journal of Biological Macromolecules*, 90 (2016) 2-10.
- [118] Du, R., Wang, Y., Zhao, F., Qiao, X., Song, Q., Li, S., Zhou, Z. *Waste and Biomass Valorization*, 11 (2020) 1681-1690.
- [119] Rahman, S. S. A., Vaishnavi, T., Vidyasri, G. S., Sathya, K., Priyanka, P., Venkatachalam, P., & Karuppiyah, S., *Scientific Reports*, 11 (2021) 1-15.S. S.
- [120] Hamieh, A., Olama, Z., Holail, H., *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2 (2013) 54-64.
- [121] Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C. G., & Vaikousi, H., *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (2002) 122-132.
- [122] Zhang, Z., O'Hara, I. M., & Doherty, W. O., *Bioresource Technology*, 120 (2012) 149-156.
- [123] Abdelraof, M., Hasanin, M. S., Farag, M. M., & Ahmed, H. Y., *International Journal of Biological Macromolecules*, 138 (2019) 975-985.
- [124] Alonso, E., Faria, M., Mohammadkazemi, F., Resnik, M., Ferreira, A., & Cordeiro, N. *Carbohydrate Polymers*, 183 (2018) 254-262.
- [125] Steels, H., James, S. A., Bond, C. J., Roberts, I. N., & Stratford, M., *FEMS Yeast research*, 2 (2002) 113-121.
- [126] Mohite, B. V., & Patil, S. V., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25 (2014) 2053-2065.
- [127] Wang, S. S., Han, Y. H., Ye, Y. X., Shi, X. X., Xiang, P., Chen, D. L., Li, M., *RSC advances*, 7 (2017) 45145-45155.
- [128] Abd Rahman, M. R., Muhamad, I. I., & Zaidel, D. N. A, *Chemical Engineering Transactions*, 78 (2020) 559-564.
- [129] Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., ... & Koutinas, A., *International journal of molecular sciences*, 16 (2015) 14832-14849.
- [130] Taweecheep, P., Naloka, K., Matsutani, M., Yakushi, T., Matsushita, K., Theeragool, G. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189 (2019), 144-159.

- [131] Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F., *Cellulose*, 5 (1998) 187-200.
- [132] Hungund, B. S., & Gupta, S. G.. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2 (2010) 127-133..
- [133] van Zyl, E. M., Coburn, J. M., *Current Opinion in Chemical Engineering*, 24 (2019) 122-130.
- [134] Nguyen, V. T., Flanagan, B., Mikkelsen, D., Ramirez, S., Rivas, L., Gidley, M. J., & Dykes, G. A., *Carbohydrate Polymers*, 80 (2010) 337-343.
- [135] Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (2004) 33-38.
- [136] Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H., *Biotechnology Letters*, 25 (2003) 2055-2059.
- [137] Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A., & Golalipour, M., *Carbohydrate polymers*, 86 (2011), 1187-1191..
- [138] Ruka, D. R., Simon, G. P., & Dean, K. M. (2012)., *Carbohydrate Polymers*, 89 (2012) 613-622.
- [139] Yanti, N. A., Ahmad, S. W., & Muhiddin, N. H.. Evaluation of inoculum size and fermentation period for bacterial cellulose production from sago liquid waste. In *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 1116, No. 5, 2018, p. 052076
- [140] Kongruang, S., In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, (2007) 763-774
- [141] Moosavi-Nasab, M., Yousefi, A. R., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 44, (2010) 1258-1263.
- [142] Rehman, N. N. M. A., Dixit, P. P., *Journal of King Saud University-Science*, 32 (2020) 745-752.
- [143] Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., *Molecular microbiology*, 64 (2007) 5-15. .
- [144] Ergene, E., Avcı, A., *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20 (2016) 193-202.
- [145] Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Elhifnawy, H. N., Amin, M. A. *Biotechnology reports*, 14 (2017) 47-53.

- [146] Dutta, H., Paul, H. K., *Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects*, Elsevier, Amsterdam, **2019**.
- [147] Kapp, J. M., Sumner, W., *Annals of epidemiology*, 30 (**2019**) 66-70.
- [148] Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., Horinouchi, S., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (**1995**) 805-808.
- [149] Cheng, K. C., Catchmark, J. M., Demirci, A., *Cellulose*, 16 (**2009**) 1033-1045.
- [150] Seifert, M., Hesse, S., Kabrelian, V., Klemm, D., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42 (**2004**) 463-470..
- [151] Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H., Horii, F., *Cellulose*, 5 (**1998**) 201-213.
- [152] Keshk, S. M., *Carbohydrate Polymers*, 99 (**2014**) 98-100.
- [153] Razack, S. A., Velayutham, V., Thangavelu, V., *Turkish Journal of Biology*, 37 (**2013**) 280-288.
- [154] Raiszadeh-Jahromi, Y., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., Amiri, S., *Journal of Food Science and Technology*, 57 (**2020**) 2524-2533.
- [155] Żywicka, A., Junka, A. F., Szymczyk, P., Chodaczek, G., Grzesiak, J., Sedghizadeh, P. P., Fijałkowski, K., *Carbohydrate polymers*, 199 (**2018**) 294-303.
- [156] Sharma, C., & Bhardwaj, N. K., *International journal of biological macromolecules*, 132 (**2019**) 166-177.
- [157] Sekar, S., Lee, Y., Kim, D. Y., Lee, S., *Nanomaterials*, 9 (**2019**) 871.
- [158] Al-Maliki, S., Al-Masoudi, M., *Plants*, 7 (**2018**) 63.
- [159] Hussain, S., Anjali, K. P., Hassan, S. T., Dwivedi, P. B., *Applied Water Science*, 8 (**2018**) 1-16.
- [160] Liu, M., Arshadi, M., Javi, F., Lawrence, P., Davachi, S. M., Abbaspourrad, A., *Journal of Cleaner Production*, 276 (**2020**) 123353.
- [161] Güzel, M., & Akpınar, Ö., *International Journal of Biological Macromolecules*, 162 (**2020**) 1597-1604.
- [162] Amarasekara, A. S., Wang, D., & Grady, T. L., *SN Applied Sciences*, 2 (**2020**) 1-7.
- [163] Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N.,

- Bilotti, E., & Peijs, T., *Bioresource technology*, 102 (2011) 9105-9110.
- [164] Rastogi, A., Banerjee, R., *Process Biochemistry*, 91 (2020) 297-302.
- [165] Basu, A., Vadan, S. V., Lim, S., *Carbohydrate polymers*, 207 (2019) 684-693.
- [166] Kose, R., Sunagawa, N., Yoshida, M., Tajima, K., *Cellulose*, 20 (2013) 2971-2979.
- [167] Ghozali, M., Meliana, Y., Chalid, M. *Materials Today: Proceedings*, (2021).
- [168] Kiziltas, E. E., Kiziltas, A., Gardner, D. J., *Carbohydrate Polymers*, 124 (2015) 131-138.
- [169] Vasconcellos, V., Farinas, C., *Chemical Engineering Transactions*, 64, (2018) 145-150.
- [170] Barshan, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., Amiri, S., *International journal of biological macromolecules*, 136 (2019) 1188-1195.
- [171] Xu, Y., Liu, X., Jiang, Q., Yu, D., Xu, Y., Wang, B., Xia, W., *Carbohydrate Polymers*, 260 (2021) 117778.
- [172] Abrial, H., Mahardika, M., Handayani, D., Sugiarti, E., & Muslimin, A. N., *International journal of biological macromolecules*, 135 (2019) 591-599.
- [173] Keshk, S. M., *Journal of Bioprocess Biotechnology*, 4 (2014) 2.
- [174] Birben, M., *Mikrobiyal Selülozun Boya Gideriminde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.*
- [175] Torgbo, S., Sukyai, P., *Polymer Degradation and Stability*, (2020) 109232.
- [176] Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., Park, J. K., *International journal of biological macromolecules*, 102 (2017) 1166-1173.
- [177] Büyüktuncel, E., *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17 (2013) 93-103.