

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Acetobacter xylinum* 'un SUŞLARINDA SELÜLOZ ÜRETİMİ İLE YAĞ ASİDİ  
KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Arif KAYA

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2007

Her Hakkı Saklıdır.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Acetobacter xylinum*'un SUŞLARINDA SELÜLOZ ÜRETİMİ İLE YAĞ ASİDİ  
KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Arif KAYA

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Bu çalışmada, selüloz üreten bakterilerin farklı glikoz konsantrasyonlarında ürettikleri selüloz miktarları ile yağ asidi kompozisyonundaki değişimler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada referans suş olarak *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 ve *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-1034 kullanılmıştır. Ayrıca Manisa-Salihli'den ev yapımı sirkeden izole edilen iki farklı *Gluconacetobacter xylinus* suşu kullanılmıştır. Bu suşlar kullanılarak farklı glikoz konsantrasyonlarında selüloz miktarları ve yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir.

Denemeler sonucunda üretilen selüloz miktarı 0,057 g/l ile 2,400 g/l arasında bulunmuştur. Glikoz konsantrasyonu ile selüloz miktarı arasında belli bir ilişki gözlenmemiştir. En yüksek selüloz üretimi *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşundan elde edilmiştir. Yerel suşların selüloz verimi diğerlerine göre daha düşük düzeyde olduğu gözlemlenmiştir.

Selüloz üretimi için inkübe edilen besi yerlerinden elde edilen hücrelerde yağ asidi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda en fazla miristik asit bulunmuştur. Yağ asidi kompozisyonu ile; glikoz konsantrasyonunun değişmesi ve selüloz miktarı arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

**2007, 34 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *G. xylinus*, bakteriyel selüloz, yağ asidi

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF CELLULOSE PRODUCTION AND FATTY ACID COMPOSITION IN *Acetobacter xylinum* STRAINS

Arif KAYA

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

In this study, the interactions between the production of bacterial cellulose and fatty acid composition using cellulose producer bacteria in different glucose concentration were determined. *Gluconoacetobacter xylinus* NRRL B-759 and NRRL B-1034 were used as reference strains. In addition, two different *Gluconoacetobacter xylinus* strains from home made cider in Manisa-Salihli were also used. Cellulose production and fatty acid composition of all strains were investigated in various glucose concentrations.

Cellulose productions of strains were changed between 0,057 and 2,400 g/l. No interaction between cellulose production and glucose concentrations was observed. The best productive strain was *Gluconoacetobacter xylinus* NRRL B-759. Cellulose production of other strains were lower than that of reference strains.

Fatty acid analysis of cells obtained from media using for cellulose production were carried out. Miristic acid was found at high concentrations in all samples. No correlation was found among fatty acid composition, cellulose production and variations of glucose concentrations.

**2007, 34 pages.**

**Key Words:** *G. xylinus*, bacterial cellulose, fatty acid

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmamda beni destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli Hocam Sayın Prof. Dr. M. Lutfü ÇAKMAKÇI' ya, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışma konusunda beni sürekli gayrete getiren Sayın Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN' a, çalıőmalarımnda kullandığım suşları temin etmede yardımcı olan arkadaşım ve Hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR' a en içten őükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalıőmam sırasında ihmal ettiğim sevgili eőime ve çocuklarıma gösterdikleri anlayıőtan dolayı teşekkür ederim.

Arif KAYA

Ankara, Ocak 2007

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGE DİZİNİ .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	5
2.1 Bakteriyel Selülozun Yapısı .....	5
2.2 Bakteriyel Selülozun Fiziksel Yapısı .....	5
2.3 Bakteriyel Selüloz Üreten Bakteriler .....	6
2.4 Bakteriyel selüloz Üretimine Etki Eden Faktörler .....	6
2.4.1 Karbon Kaynakları .....	6
2.4.2 Azot Kaynakları .....	8
2.4.3 pH'nın Etkisi .....	10
2.4.4 Sıcaklığın Etkisi .....	10
2.5 Bakteriyel Selüloz Üretim Teknikleri ve Karşılaştırılması .....	11
2.6 Bakteriyel Selülozun Biyosentezi .....	13
2.6.1 Selüloz öncü maddesinin sentezi .....	14
2.6.2 Selüloz sentaz .....	15
2.7 Biyosentez Mekanizması .....	16
2.7.1 1,4-β-glukan zincirinin polimerize olması .....	16
2.7.2 Selüloz zincirlerinin bir araya gelmesi ve kristalizasyonu .....	17
2.8 Karbohidrat Metabolizması ile Yağ Asidi Sentezi Arasındaki İlişki ....	18
2.9 Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları .....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	21
3.1 Materyal .....	21
3.1.1 Mikroorganizmalar .....	21
3.1.2 Besiyeri .....	21
3.1.3 İnkübasyon Koşulları .....	22
3.2 Yöntem .....	23
3.2.1 Selüloz miktarının belirlenmesi .....	23
3.2.2 Yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi .....	23
3.2.2.1 Bakteri hücrelerinin toplanması .....	24
3.2.2.2 Yağ asitlerinin metilleştirilmesi .....	25
3.2.2.3 Gaz kromatografisi ile yağ asidi analizi .....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	26
4.1 Selüloz Miktarı Sonuçları .....	26
4.2 Yağ Asidi Kompozisyonu Sonuçları .....	27
5. SONUÇ .....	28
KAYNAKLAR .....	29
ÖZGEÇMİŞ .....	34

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Selülozun biyosentezi .....	14
Şekil 4.1 <i>G.xylinus</i> NRRL B-759 % 6 glikoz içeren besiyerinde inkübasyon sonrası görünümü .....	26
Şekil 4.2. Ortalama selüloz miktarlarının glikoz konsantrasyonuna göre değişim grafığı .....	27
Şekil 4.3 Yağ asitlerinin glikoz konsantrasyonuna bağlı değişimi grafığı .....	29
Şekil 4.4 <i>G.xylinus</i> NRRL B-1034 suşuna ait yağ asidi kromotogramı .....	29

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 4.1 Yağ asidi kompozisyonu tablosu .....	28
--	----

## 1. GİRİŞ

Selüloz dünyada en çok bulunan ve ekonomik değere sahip bir maddedir. Geleneksel olarak selüloz bitkisel kaynaklardan elde edilir. Pamuğun % 94'ünden fazlası, ağacın % 50'sinden fazlası selülozdan oluşmaktadır. Endüstride yaygın olarak kullanılan bu yöntemde lignin ve hemiselülozun selülozdan ayrılması gerekmektedir (Brown 1998).

Diğer bir yöntem ise selülozun mikroorganizmalardan biyosentez yoluyla elde edilmesidir. Bunlardan en çok bilinenleri algler (*Vallonia*), küfler (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) ve bakterilerdir (*Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcinia*, *Zooglea*) (Klemm *et al.* 2001).

Dünyada kağıt tüketimi sürekli olarak artmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde 1983 yılında 41 milyon ton kağıt tüketilirken, 1996 yılında bu değer 64 milyon tona çıkmıştır. 2010 yılında bu değer 105 milyon ton olacağı tahmin edilmektedir. A.B.D'de yıllık kağıt tüketimi 100 milyon tondur. Çin'de kağıt tüketimi 26 milyon ton, Kanada'da 18 milyon ton ve Almanya'da 16 milyon tondur (Öztürk 2005).

Her yıl dünyada ormanların % 1.3'ü yani yaklaşık 40 milyon hektarlık alan kağıt üretiminde kullanılmak üzere kesilmektedir. Bu Paraguay veya İsviçre büyüklüğünde bir alandır (Öztürk 2005).

Ayrıca kağıt fabrikalarının ciddi enerji tüketimi ve çevreyi kirletmeleri söz konusudur. Üretim esnasında önemli miktarda baca gazı emisyonu, atık su ve katı atık oluşmaktadır. Bu atık suların BOI (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) değerleri oldukça yüksektir. Ayrıca fosfor ve azot atık sulara karışıp doğaya salınmaktadır (Öztürk 2005).

Hızlı nüfus artışı, ağaç ve bitkilerden selüloz üretiminin devam etmesi bir çok alanda dünya çapında tehlikelere sebep olmaktadır. Bu olay doğrudan dünyanın karbon döngüsüne etki etmektedir. Bu koşullar altında dünya çapındaki karbon döngüsünde selülozun yerini iyi anlamamız gerekir. Dünyadaki karbon döngüsü; atmosferdeki CO<sub>2</sub>

in, fotosentez yoluyla ayrıştırılması, organik ürünlere fiksasyonu arasında çok geniş bir etkileşim söz konusudur. Endüstriyel çağın ortaya çıkmasıyla küresel ısınma tetiklenmiştir (Brown 1998).

Ağaç ve hidrokarbonların yanması sonucu atmosfere yüksek miktarda CO<sub>2</sub> salınmıştır. Yakıtların yanması sonucu atmosfere 1850-1998 yılları arasında karbondioksit olarak 270 milyar ton karbon atılmıştır. Bu miktarın yarısının fosil yakıtların yanması sonucu, geriye kalan kısmının ise ormanların yanması sonucu atmosfere atıldığı tespit edilmiştir. Atmosferde CO<sub>2</sub> konsantrasyonu %30 artmıştır. Yeryüzünün ısınmasına sebep olan, sera gazlarının başlıcaları insan kaynaklı faaliyetlerden oluşmaktadır. CO<sub>2</sub> emisyonunun yarısının bitki örtüsü tarafından yutulmasına karşın, CO<sub>2</sub> seviyesi her 20 yılda %10 artış göstermiştir.

Dünyada atmosfere atılan yıllık karbon emisyon ve absorblama dengesi:

#### **Emisyon**

Fosil yakıtların yanması	6,3 milyar ton
Ormanların tahribatı	1,6 milyar ton
TOPLAM	7,9 milyar ton (29 milyar ton CO <sub>2</sub> /yıl)

#### **Absorblama**

Deniz ve göller	2,3 milyar ton
Artan biokütle	2,3 milyar ton
Atmosferde kalan	3,3 milyar ton
TOPLAM	7,9 milyar ton (29 milyar ton CO <sub>2</sub> /yıl)

1850’li yıllarda atmosferdeki karbon dioksit konsantrasyonu 285 ppm iken 2000’li yıllarda bu değer yaklaşık olarak 360 ppm’e çıkmıştır (Öztürk 2005).

Fosil yakıt kullanımındaki artış ile ağaç yetiştirme ve kullanılmış kağıtların geri kazanılması aynı oranda gelişmezse CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki artışın 2050 yılında 500-700 ppm arasında olacağı tahmin edilmektedir (Öztürk 2005).

Nüfus artış hızına paralel olarak ormanlık alanların azalmasının engellenmesi için alternatif kaynaklardan selüloz elde edilmesi gittikçe önem kazanmakta ve bir zorunluluk haline gelmiştir.

Bakteriyel selüloz, diğer kaynaklardan elde edilen selüloza göre yüksek kalitede ve önemli özelliklere sahiptir. Çok ince ağ yapısı, yüksek kristalize değerine ve önemli oranda mekaniksel dirence sahiptir. Bu özelliklerinden başka uzun zincir yapısına sahip olması, yüksek oranda kimyasal saflığa sahip, su tutma kapasitesi yüksek, katlanınca şeklini koruyabilen, üretim esnasında modifikasyonlara uygun bir polimerdir. Bu özelliklerinden dolayı kullanım alanı çok geniştir. Dayanıklı kağıt üretiminde, gıda, kozmetik ve deri sanayinde kullanma potansiyeli yüksektir. Yüksek su tutma kapasitesinden dolayı plastik cerrahide ve özellikle de yanıkların tedavisinde kullanılması üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Çok başarılı uygulamaları olmuştur (Bielecki *et al.* 2001).

Bakteriyel selülozun bu kadar üstün özellikleri yanında ekonomik açıdan üretim maliyeti yüksektir. Bu sebeple bakteriyel selüloz üzerine yapılan araştırmaların temel noktaları; yüksek selüloz üretme kapasitesine sahip suşların bulunup, ucuz hammaddeleri kullanarak selüloz üretiminin ekonomik yapılmasını sağlamaktır.

Ülkemizde, bakteriyel selüloz üzerine çalışmalardan en önemlisi Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yapılmaktadır. Tübitak'ın desteklediği “Selüloz Üretiminde Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu, Moleküler Tanısı ve Mikrobiyel Selülozun Gıda Sanayinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması” projesi bu konuda yapılan en kapsamlı çalışmadır. Bu araştırma projesinin amacı elde edilecek olan üstün nitelikli bakteriyel selülozun başta gıda sanayi olmak üzere değişik alanlarda uygulamaları için yeni açılımlara yardımcı olmaktır. Bunun yanı sıra bir kültür koleksiyonu oluşturmaktır.

Asetik asit bakterileri karbon metabolizması yoluyla asetil Co-A'yı öncül madde olarak kullanarak hem selülozu hem de yağ asitlerini sentezlemektedir (Bielecki *et al.* 2001). Burada saptanacak ilişki ile yağ asidi sentezi baskılanarak selüloz üretimini artırmak mümkün olabilir. Bu nedenle bu çalışmada asetik asit bakterilerinin selüloz üretimi ve hücresel yağ asidi kompozisyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Bakteriyel Selülozun Yapısı

Selüloz  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose ünitelerinin  ${}^4C_1$  konformasyonunda doğrusal dizilmiş polimerlerdir. 2.000–14.000 arasında glikopiranoz biriminden oluşur. Kristal formda bulunmaktadır. Molekül içerisinde O3-H $\rightarrow$ O5' ve O6 $\rightarrow$ H-O2' ye şeritler arasında O6 $\rightarrow$ H-O3' hidrojen bağlarıyla bağlanır. Bundan dolayı ağ yapısı sabit kalır. Her glikopiranoz şeridi bir sonraki sentezlenen zincirle aynı zamanda 180 ° döner. Tek glikopiranoz şeridi ne az hidrofiliktir, ne de çok hidrofobiktir. Bu özelliğinden dolayı molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarıyla, sulu çözeltilerde çözünmez bir yapı oluşturur (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html> 2006).

### 2.2 Bakteriyel Selülozun Fiziksel Yapısı

Bakteriyel selüloz makromoleküler yapı ve özellikleri bakımından bitkisel selülozdan farklılık gösterir. Bakteriyel selülozun olgunlaşmamış zincirleri, öncül fibril yapısındadır. Yaklaşık olarak 1,5 nm genişliğindedir. Bakteriyel selüloz öncül fibrilleri birikerek mikrofibrillere kristalize olur. Bunlar da yığın oluşturarak şerit halini alır. Bu şeritlerin boyutları şu şekildedir; kalınlığı 3-4 nm, genişliği 70-80 nm olarak bildirilmiştir. Farklı araştırmacılar 3,2 x 133 nm ve 4,1 x 117 nm olarak belirtmişlerdir (Bielecki *et al.* 2001).

Doğal selüloz mikrofibrillerinin 1-25 nm genişlik aralığında olduğunu ve yaklaşık 10-250 sayısında zincirden oluştuğunu, 1-9  $\mu$ m uzunluğunda ve 2.000–18.000 glikoz biriminden oluştuğu belirtilmiştir (Ross *et al.* 1991).

Bakteriyel selüloz, bitkisel selülozdan çok yüksek kristallenme indeksi değerine sahiptir. Kristallenme indeksi % 60'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Başka bir araştırmada % 70 civarında olduğu bulunmuştur (Valjamae *et al.* 1999).

Polimerizasyon derecesi de selüloz kaynağına ve hazırlanma prosedürüne göre 1.000 ile 15.000 arasında değişmektedir (Valjamae *et al.* 1999). Bakteriyel selülozun polimerizasyon derecesi 2.000 ile 6.000 arasında değişmektedir. Bitkisel selülozun ise 13.000–14.000 arasındadır (Bielecki *et al.* 2001).

### **2.3 Bakteriyel Selüloz Üreten Bakteriler**

Selüloz; bitkiler, mayalar, funguslar, bakteriler ve bazı algler tarafından yapı ve enerji depo materyali olarak sentezlenmektedir (Bielecki *et al.* 2001).

Selüloz biyopolimeri değişik yollarla elde edilmektedir. Bunlardan en iyi bilineni selülozun bitkilerden elde edilmesidir. Diğer bir yol ise selülozun çeşitli mikroorganizmalardan biyosentez yoluyla elde edilmesidir. Bunlardan en iyi bilinenleri algler (*Vallonia*), küfler (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) ve bakterilerdir (*Acetobacte*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcinia*, *Zoogloea*) (Klemm *et al.* 2001). Römling (2002) *Enterobacteriaceae* grubundan *Salmonella* spp., *E.coli*, *K.pneumoniae* ve değişik *cyanobacteria* türlerinin de selüloz ürettiğini belirtmiştir.

Selüloz üreten bu mikroorganizmalar içinde en etkin olanı Gram negatif asetik asit bakterisi *Acetobacter xylinum*'dur. İlk defa 1886 yılında A.J. Brown tarafından selüloz ürettiği bildirilmiştir. Yamada *et al.* (1997) tarafından yeni sınıflandırmada adı *Gluconacetobacter xylinus* olmuştur (Kornmann *et al.* 2003). Bundan dolayı bakteriyel selülozun biyosentezi, kristalizasyon işlemleri ve yapısal özelliklerinin araştırılmasında model mikroorganizma olmuştur (Klemm *et al.* 2001, Rezaee *et al.* 2005).

### **2.4. Bakteriyel Selüloz Üretimine Etki Eden Faktörler**

#### **2.4.1 Karbon kaynakları**

*Acetobacter* suşları ile bakteriyel selüloz üretiminde ana karbon kaynağı glikozdur. Selüloz biyosentezi için diğer karbon kaynakları olarak; 5 ve 6 karbonlu

monosakkaritler, oligosakkaritler, nişasta, alkol ve organik asitler bildirilmiştir (El-Saied *et al.* 2004).

Bakteriyel selüloz üretiminde en büyük etkiyi karbon kaynakları yapmaktadır (Bielecki *et al.* 2001). Karbon kaynağı olarak mono-, di- ve polisakkaritler, alkoller, organik asitler ve diğer bileşikler karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda karbon kaynağı olarak arabitol ve D-mannitol kullanımında daha fazla bakteriyel selüloz üretimi tespit edilmiştir. Glikoz ile karşılaştırıldığında arabitol kullanımında 6,2 kat, D-mannitol kullanımında ise 3,8 kat daha fazla selüloz üretilmiştir (Jonas and Farah 1998).

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

Yeni izole edilen *Acetobacter* sp. A9 'un bakteriyel selüloz üretimi için fermentasyon koşullarının optimizasyonu için yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak % 2 oranında glikoz, fruktoz, maltoz, şeker, trenaloz, mannitol, arabitol, asetik asit, laktik asit ve süksinik asit kullanılmıştır. Sonuç olarak en yüksek verim 2,7 g/l ile glikoz eklenen besiyerinden elde edilmiştir. Bu değere en yakın 2,53 g/l ile fruktoz ve 2,57 g/l ile trenaloz kullanılan besiyerlerinden elde edilen değerler izlemiştir. Ayrıca glikoz farklı konsantrasyonlarda eklenerek bakteriyel selüloz üretimi izlenmiştir. % 4 glikoz konsantrasyonuna kadar selüloz üretimi artarken, daha fazla konsantrasyonlarda ise selüloz üretimi düşmüştür (Son *et al.* 2001).

Statik kültürde optimum fermentasyon besiyeri bileşiminin dizayn edilmesi ile ilgili bir çalışmada farklı karbon kaynakları bir arada kullanılmıştır. Fruktoz 70 g/l, glikoz 35 g/l

asetik asit 75 g/l kullanıldığında 28,4 g/l selüloz üretimi bulunmuştur (Vandamme *et al.* 1998).

Bakteriyel selüloz üretiminde D-xylose kullanımını ile ilgili bir çalışmada 17 tane farklı Asetik asit bakterisi kullanılmıştır. D-xylose, D-glikoz ve D-xylose + D-xylulose karışımıyla hazırlanan besiyerleri karşılaştırılmıştır. D-xylose hiçbir Asetik asit bakterisi tarafından metabolize edilemediği bulunmuştur. D-glikoz içeren besiyerinde yüksek bakteriyel selüloz üretimi belirlenmiştir (Ishihara *et al.* 2002).

#### 2.4.2 Azot kaynakları

Bakteriyel selüloz üreten bakteriler azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. Bunun için maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu ve kazein hidrolizatları kullanılmaktadır. Hestrin and Schramm (1954) tarafından geliştirilen model besiyerinde maya ekstraktı ve pepton kullanılmıştır (Bielecki *et al.* 2001).

*Acetobacter* sp. A9 suşunun karıştırmalı kültürlerde fermentasyon koşullarının optimizasyonu için yapılan bir çalışmada farklı azot kaynakları kullanılmıştır. Bu azot kaynakları şunlardır; et ekstraktı, mısır ıslatma suyu, malt ekstraktı, polipepton, proteoz pepton, tripton, maya ekstraktı,  $(\text{NH}_1)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve  $\text{KNO}_3$ 'tür. Bütün azot kaynakları besiyerine % 0,5 oranında eklenmiştir. En yüksek bakteriyel selüloz üretimi 2,87 g/l ile maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Polipeptonla 2,65 g/l ve mısır ıslatma suyu ile 2,59 g/l üretilmiştir. Bu sonuçlara göre *Acetobacter* sp. A9 suşu için en iyi azot kaynağı, maya ekstraktı bulunmuştur. Maya ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakteriyel selüloz üretimine etkisi de incelenmiştir. En iyi sonuç % 0,1 konsantrasyonda bulunmuştur. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise bakteriyel selüloz üretimi düşmeye başlamıştır (Son *et al.* 2001).

Matsuoka *et al.* (1995) *A. xylinum* subsp. *sucrafermentans* BPR 2001 için en uygun azot kaynağı olarak mısır ıslatma suyunu bildirmiştir.

Uygun maya ekstraktı konsantrasyonunu belirlemek için glikoz, fruktoz ve şeker içeren besiyerleri ile yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon olarak % 4 bulunmuştur (Young *et al.* 1998).

Ayrıca bazı amino asitlere ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Örneğin methionin ve glutamat gibi. Methionin'in hücre gelişimi ve selüloz üretimi üzerine önemli etkileri olduğu gösterilmiştir. Methionin içermeyen besiyeri ile karşılaştırıldığında % 90'nın üzerinde hücre gelişimi ve selüloz üretimi arasında fark gözlemlenmiştir (Jonas and Farah 1998, El-Saied *et al.* 2004).

Farklı karbon kaynakları ile azot kaynaklarının uygun kombinasyonlarının belirlenmesi için yapılan bir araştırmada şeker ve mannitolün eklendiği besiyerlerine azot kaynağı olarak kazein hidrolizatları ile pepton kullanılmıştır. En yüksek selüloz üretimi mannitol kullanıldığında elde edilmiştir. Değişik azot kaynaklarının değerlendirilmesi sonucu pepton/Amonyum sülfat ve kazein hidrolizatlarının uygun olduğu bulunmuştur (Ramana *et al.* 2000).

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

### 2.4.3 pH'nin etkisi

*Acetobacter xylinum* suşlarının bakteriyel selüloz üretimi için optimum pH aralığı 4–7 aralığında kabul edilmektedir. Hestrin and Schramm pH'nın 7'nin altında olmasının önemli olduğunu belirtmiştir (Jonas and Farah 1998).

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

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

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

Birçok araştırmacı pH: 5,0-6,0 aralığını önermektedir (Jonas and Farah 1998).

### 2.4.4 Sıcaklığın etkisi

Bakteriyel selüloz üretimi için uygun sıcaklık aralığı 25–30 °C'dır. Birçok araştırmacı 28–30 °C sıcaklık derecelerini kullanmaktadır (Jonas and Farah 1998).

*Acetobacter* sp. A9 için farklı sıcaklık derecelerinin etkisi standart besiyeri ile test edilmiştir. Bakteriyel selüloz üretimi için optimum sıcaklık derecesi olarak 30 °C bulunmuştur (Son *et al.* 2001).

Jonas and Farah (1998) 24 °C'de fermentasyon işlemini takip etmişler. İlk 72 saatte selüloz üretimini % 50 fazla olduğunu, fakat sonuç itibarıyla istenilen sonucun elde edilemediğini bildirmişlerdir.

## 2.5 Bakteriyel Selüloz Üretim Teknikleri ve Karşılaştırılması

Bakteriyel selüloz üretimi için değişik teknikler bildirilmiştir. Ekonomik ve ticari olarak uygulanma potansiyeli olan statik ve karıştırmalı teknikler kullanılmaktadır (Watanabe *et al.* 1998).

Bakteriyel selülozun üretim tekniği seçimi elde edilecek biyopolimerin ticari hedefine bağlıdır. Seçilen kültür tekniği selülozun yapısına, dolayısıyla fiziksel ve mekaniksel özelliklerine doğrudan etki eder (Krystynowics *et al.* 2002).

Bakteriyel selüloz statik kültür koşullarında üretildiğinde jelatinimsi membran, kültür ortamının yüzeyinde birikir. Buna karşın karıştırmalı kültür koşullarında üretilen bakteriyel selüloz değişik boyutlarda (10 µm-1 mm) ve şekillerde (yuvarlak, elipsoit, şerit şeklinde veya yıldız benzeri) çok iyi çözülmüş süspansiyon halinde oluşur (Watanabe *et al.* 1998).

Statik kültür koşullarında yüzey/hacim oranı önemlidir. Bu oran yüksek havalandırmadan (gereksizdir) ve düşük havalandırmadan (hücre gelişimine ve selüloz sentezine etki eder) korunmalıdır. Araştırmacılar yüzey/hacim oranı için  $0.7 \text{ cm}^{-1}$ -  $2.2 \text{ cm}^{-1}$  aralığındaki değerleri vermişlerdir (Bielecki *et al.* 2001).

Statik kültürde bakteriyel selüloz sentezinin kontrolü çok zordur. Önemli parametrelerin sürekli kontrol edilmesi gerekmektedir. Keto-glikonik asidin birikmesinden dolayı pH düşmektedir. Dolayısıyla bakteriyel selüloz için uygun pH ortamı da kaybolmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için asetik asit kullanılmıştır. *Acetobacter* spp. asetik asidi karbondioksit ve suya parçalamıştır. Sonuçta istenen pH aralığı sağlanmıştır (Watanabe *et al.* 1998).

Ticari üretim için en fazla karıştırmalı kültür tekniği tercih edilmektedir. Fakat yüksek bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilememektedir. Karıştırmalı kültürlerde *Acetobacter* türleriyle yapılan selüloz üretiminde bir çok problemle karşılaşmaktadır. En büyük problem kültürün stabil olmamasıdır. Zamanla selüloz üretim yeteneği azalmaktadır ve bir süre sonra selüloz üretmeyen mutantların miktarı artmaktadır. Diğer bir problemde *Acetobacter* suşlarının glikozu, glikonik aside ve ketoglikonik asite dönüştürmesinden dolayı maliyeti artırmasıdır (Young *et al.* 1998).

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

Karıştırmalı kültürlerde bakteriyel selüloz üretiminde mikro yapıda değişiklikler gözlemlenmiştir. Polimerizasyon derecesi ve kristallenme indeksi karıştırmalı kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozda daha düşük bulunmuştur. Ayrıca Young's modülü değeri de düşük olarak belirlenmiştir. Fakat su tutma kapasitesi ve süspansiyon vizkozitesi daha yüksek bulunmuştur (Watanabe *et al.* 1998).

Statik ve karıştırmalı kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozun ağ şeklindeki yapısının mikroskobik morfolojisi benzerlik göstermektedir. Fakat dikkatli bir inceleme sonucunda bazı farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Statik kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozun fibrilleri oldukça uzundur. Karıştırmalı kültür koşullarında üretilen selülozun fibrilleri bükülmüş ve karışık şekildedir. Ayrıca fibriller zayıf gözükmektedir. Watanabe *et al.* (1998) yaptıkları çalışmada her iki koşulda üretilmiş bakteriyel selüloz örneklerini X-ray difraktometri ile analizlerini yapmışlardır. Sonuçta statik kültür koşullarında üretilen selülozun kristallenme indeksi % 71, kristalitesi % 80, kristal boyutu 7,4 nm, polimerizasyon derecesini 14.400 olarak bulmuşlardır. Buna karşın karıştırmalı kültür koşullarında üretilen selülozun kristallenme indeksi % 63, kristalitesi

% 61, kristal boyutu 6,9 nm, polimerizasyon derecesini 10.900 olarak bulmuşlardır. Ayrıca selüloz I $\alpha$  oranı statik kültür koşullarında üretilen bakteriyel selülozda daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Statik kültür koşulları ile ilgili oldukça başarılı araştırmalar yapılmıştır. Karıştırmalı kültür koşullarında ise birçok problem ortaya çıkmıştır. Suşların stabil olmaması, bakteriyel selülozun non-Newtonian davranış göstermesi, özel olarak oksijen temin edilmesi gerekliliği gibi problemler. Mikro yapıdaki düzensizlik karıştırma esnasında hareket kuvvetinden dolayı oluşmaktadır. Selülozun yapısında oluşan değişiklikleri karşılaştırmak için X-ray difraksiyon analizleri yapılmıştır. Karıştırmalı kültürlerde, karıştırma sırasında oluşan stres koşullarından dolayı, olgunlaşmamış mikrofibrillerin kristalizasyonunu işlemi karışmaktadır. Selüloz I $\alpha$  ve I $\beta$  kısımlarının kesin tanımlanması için FT-IR spektra uygulanmıştır. Karıştırmalı kültür koşullarında üretilen selülozdan hazırlanan örneklerde Selüloz I $\alpha$  miktarı düşük çıkmıştır. *Acetobacter* suşlarının karıştırma esnasında maruz kaldıkları çevresel stres Selüloz I $\alpha$  azalmasını açıklayabilmektedir (Czaja *et al.* 2004).

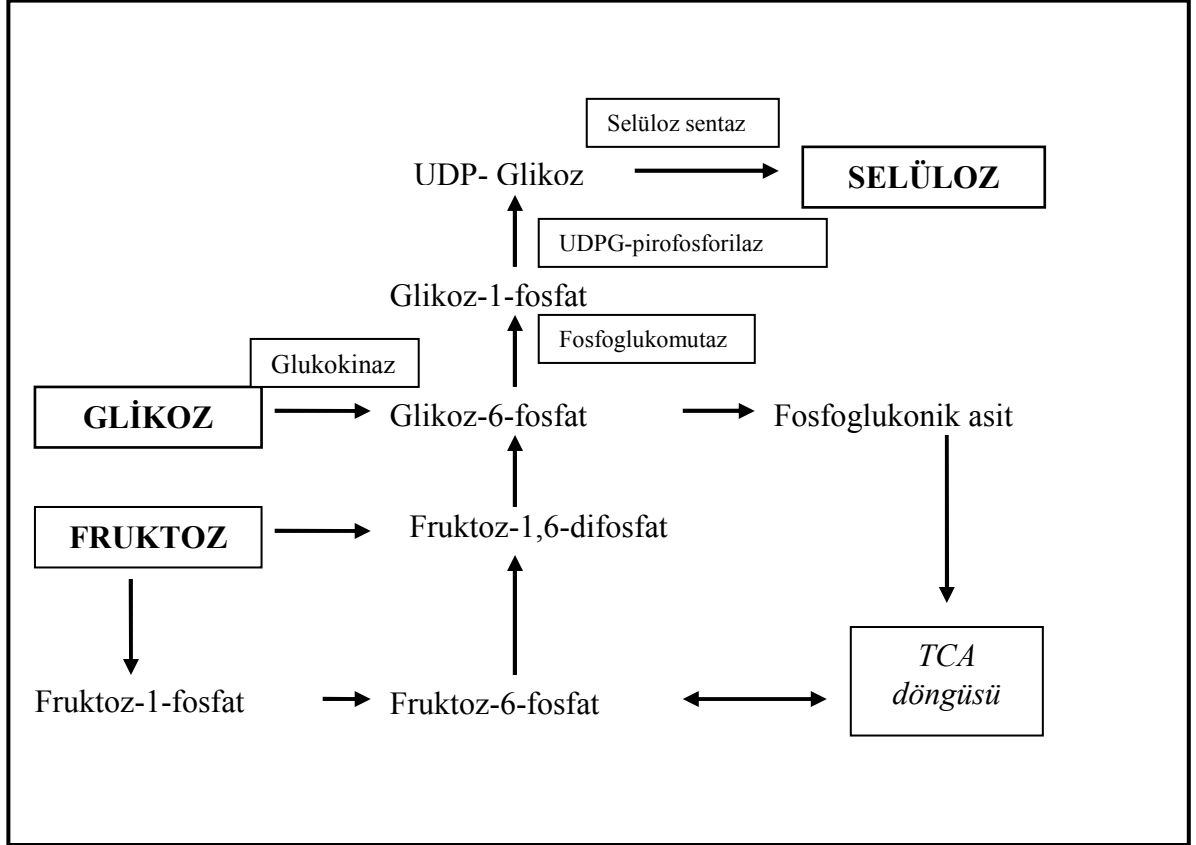
## 2.6 Bakteriyel Selülozun Biyosentezi

Bakteriyel selülozun biyosentezi, birçok adımdan oluşmaktadır. Çok sayıda enzim, katalitik kompleksler ve düzenleyici proteinler içerir. Bunların birçoğunun yapısı henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Bu işlem uridin difosfoglikoz (UDPGlc) sentezini de içermektedir. UDPGlc, selüloz sentezinin öncü maddesidir (Ross *et al.* 1991). Daha sonra glikoz polimerize olarak  $\beta$ -1,4-glukan zinciri oluşur. Olgunlaşmamış bu zincirler bir araya gelerek tipik şerit benzeri yapıya dönüşür. Bunların, binlercesi bir araya gelerek selüloz zincirlerini oluşturur. Bakteriyel selüloz daha sonra hücreden dışarıya salgılanır (Bielecki *et al.* 2001).

Bakteriyel selüloz sentezi dört basamakta oluşur:

- Glikoz, glukokinaz enzimi (E.C. 2.7.1.2) ile glikoz-6-fosfata fosforilize olur.
- Glikoz-6-fosfat, fosfoglukomutaz enzimi (E.C. 5.4.2.2) yardımıyla, glikoz-1-fosfat dönüşür.

- Glikoz-1-fosfat, UDPG-pirofosforilaz enzimi (E.C. 2.7.7.9) yardımıyla UDP-glikoz sentezlenir.
- UDP-glikoz, selüloz sentaz enzimi (E.C. 2.4.1.12) yardımıyla selüloza dönüşür.



Şekil 2.1 Selülozun biyosentezi (Ross *et al.* 1991, Holmes 2004, Krystynowics *et al.* 2005)

### 2.6.1 Selüloz öncü maddesinin sentezi

*A.xylinum*'un karbon metabolizmasının son ürünü selülozdur. Hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak pentoz fosfat döngüsünü veya krebs döngüsünü içerir. Glukoneogenesis ile birbirine bağlanır. Asetik asit bakterileri kritik enzim olan fosfofruktokinazı sentezleyemediğinden dolayı glikolizisi gerçekleştirememektedir. Bakteriyel selüloz üretimi diğer anabolik işlemlerle girişim yapmaz (Ross *et al.* 1991).

*A.xylinum*, değişik karbon kaynaklarını örneğin; heksozlar, gliserol, dihidroksi aseton, pürivik asit ve dikarboksilik asidi selüloza dönüştürür. Genellikle % 50 etkinlikle gerçekleştirir. Son oluşan bileşikler krebs döngüsüne girer ve oksalasetat dekarboksilasyondan dolayı pürivat yoluyla glikogenesis üzerinden heksozlara dönüştür. UDPGlc selülozun öncü maddesidir. Birçok mikroorganizma ve bitkilerde bulunur (Bielecki *et al.* 2001).

Selüloz sentezinin son aşamasında görülen UDPG pirofosforilaz enziminin çok önemli olduğu bildirilmiştir. Selüloz negatif mutantlarda bu enzim özellikle aranmış ve bulunamamıştır (Bielecki *et al.* 2001).

*A. xylinum* suşları arasında pirofosforilaz aktivitesi farklılık göstermektedir. Çok yüksek üretim etkinliği gösteren suşlarda pirofosforilaz aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; *A.xylinum* sp. *sucrofermentans* BPR2001 suşunda gözlemlenmiştir. Bu suş aynı zamanda karbon kaynağı olarak fruktozu tercih eder, yüksek fosfoglukoizomeraz aktivitesi gösterir ve fosfotransferaz sistemine sahiptir. Bu sistem fruktozun, fruktoz-1-fosfata dönüşmesini hızlandırır. Ayrıca fruktoz-1,6-difosfata da dönüştürür (Bielecki *et al.* 2001).

### **2.6.2 Selüloz sentaz**

*A.xylinum*'da selüloz sentaz enzimi; tipik, membrana bağlanmış bir proteindir. Molekül ağırlığı 400-500 kDA olarak hesaplanmıştır (Lin and Brown 1989). Stoplazmik membrana sıkıca bağlanmışdır. Burada bulunmasından dolayı selüloz sentazın saflaştırılması çok zordur. Membran fraksiyonlarından izole edilebilmesi için öncelikle selüloz sentazın çözündürölüp saflaştırılmasına gerek duyulmaktadır. İzolasyonu için digitonin veya deterjanlar örneğin; triton x-100 kullanılarak membrandan uzaklaştırılır. Tyrosinele muamele edildikten sonra selüloz üzerine tutulmuş şekilde elde edilir (El-Saied *et al.* 2004).

Lin and Brown (1989) tarafından yapılan çalışmalarda saflaştırılmış selüloz sentaz preparatlarında alt birimlerin üç farklı tipten oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Bunlar

sırasıyla 90, 67 ve 54kDa molekül ağırlığına sahiptir. Saxena and Brown (1989) polipeptitlerin sadece iki tip olduğunu ve 83 ve 93 kDa molekül ağırlığına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Son sonucun daha uygun olduğu yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Selüloz sentaz operonunun yapısıyla ilgili olarak Wong *et al.* (1990) rapor ettiğine göre iki genin, *bcsA* ve *bcsB*'nin boyutları, her iki alt ünitenin ağırlıklarına uygun gelmektedir.

## 2.7 Biyosentez Mekanizması

*A.xylinum* ve diğer selüloz üreten organizmalar bitkilerde dahil olmak üzere yarı kararlı selüloz I'in sentezinde iki ara basamak bulunur. İlk basamakta glikoz moleküllerinin doğrusal olarak 1,4-  $\beta$ -glukan zincirine polimerize olmasıdır. İkinci basamak olgunlaşmamış polimer zincirlerin bir araya gelmesi ve kristalize olmasıdır (Bielecki *et al.* 2001).

### 2.7.1 1,4- $\beta$ -glukan zincirinin polimerize olması

Bakteriyel selülozun formasyonu, selüloz sentaz kompleksleriyle *A.xylinum*'un sitoplazmik membranında doğrusal olarak dizilir. Bu kompleksler 200.000'den fazla glikozun 1,4-  $\beta$ -glukan zincirine polimerize olmasını sağlar. Polimerizasyon işlemi oldukça hızlı yürümektedir. Reaksiyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda farklı hipotezler ortaya konmuştur (Bielecki *et al.* 2001).

Bakteriyel biyosentezde bu işlem sitoplazmik membranda bulunan üç enzim ile yapılmaktadır. Bunlar; selüloz sentaz, lipid pirofosfat:UDPGlc fosfotransferaz (LP:UDPGlc-PT) ve lipid pirofosfat fosfohidrolaz (LPP)'dir.

İlk reaksiyon basamağı, LP:UDPGlc-PT ile katalizlenmektedir. Bu reaksiyonda lipid monofosfattaki fosfat grubu, UDPGlc'deki glikoza transfer olarak bağlanır. UMP ve lipid pirofosfat- $\alpha$ -D-glikoz oluşur. UMP bu reaksiyonun ikincil ürünü olarak serbest kalır.

İkinci reaksiyon basamağını selüloz sentaz (CS) katalize eder. Glikoz birimlerinin polimerizasyonları gerçekleşir ve selüloza dönüşür. Bu reaksiyon basamağında lipid pirofosfat glukopiranozil ünitelerindeki D-glikozun 4-hidroksil grubu, diğer lipid pirofosfat glukopiranozil ünitesindeki D-glikozun 1-hidroksil grubuna bağlanır. Bu aşamada glikoz birimleri transferlerle konfigürasyonu değişir ve  $\beta$ -1,4 bağıyla disakkarit olur.

Üçüncü reaksiyon basamağını ise lipid pirofosfat fosfohidrolaz (LPP) katalize etmektedir. Lipid pirofosfattan fosfat grupları hidrolize olur. Lipid monofosfatın fosfatı, UDPGlc'ye bağlanarak lipid pirofosfat glukopiranosil ünitesine dönüşür. Bu üçüncü reaksiyon döngüsünde uygun uzunlukta  $\beta$ -1,4-glukan zinciri oluşur. Bu mekanizma glikoz birimlerinde anumerik karbonun konfigürasyonun değişmesinde içerir.  $\beta$ -1,4-glukan zincirinin akseptörü, daima tek  $\alpha$ -D-glikoz birimidir. Polimerizasyon sisteminde iki LPP molekülünden biriyle bağlanır. Bunun anlamı zincir uzaması indirgenmiş uçta oluşur. Olgunlaşmamış selüloz zincirlerinin indirgenmemiş uçları hücreden dışarıya doğru uzar (Han and Robyt 1998).

### 2.7.2 Selüloz zincirlerinin biraraya gelmesi ve kristalizasyonu

Glikopiranoz moleküllerinin 1,4-  $\beta$ -glukan zincirine polimerize olmasıyla bakterilerde selüloz sentezi tamamlanır. Selülozun mükemmel yapısı ve sahip olduğu özellikler, polimer zincirlerin salgılanması, bu zincirlerin salgılanması ve bir araya gelerek alacağı supramolekuler yapıya bağlıdır. Bu işlemde selüloz sentazın multimerik komplekslerinin kendine özgü organizasyonu çok önemlidir (Bielecki *et al.* 2001).

*A.xylinum* hücreleri dakikada 2 nm zincir oluşturur. Her bakteri hücresi saatte  $10^8$  glikoz molekülünü 1,4-  $\beta$ -glukan zincirine polimerize edebilir. Boşlukta  $\beta$ -1,4 -glukan zincirleri birbiri ardına dizilir. İlk aşamada 10-15 olgunlaşmamış  $\beta$ -1,4 -glukan zinciri bir araya gelerek öncül fibril formunu alır. Bu forma aynı zamanda protomikrofibril de denir. 1.5 nm çapındadır. Bu halde çubuk şeklinde değildir. Sola dönmüş üçlü heliks şeklindedir. Bir sonraki aşamada yığın şeklini alır ve gevşek bir haldedir. Yaklaşık 1000 civarında zincir bir araya gelerek şerit halini alır (Ross *et al.* 1991, Bielecki *et al.* 2001).

## 2.8 Karbohidrat Metabolizması ile Yağ Asidi Sentezi Arasındaki İlişki

Asetik asit bakterileri krebs döngüsü yada pentoz fosfat izyolunu glikoneogenesisle birlikte yürüterek selülozu oluşturmaktadır. Krebs döngüsünün başlangıç maddesi olan asetil-CoA aynı zamanda yağ asidi sentezinin de öncül maddesidir. Asetik asit bakterileri karbon metabolizması yoluyla hem selülozu hem de yağ asitlerini sentezlemektedir (Bielecki *et al.* 2001).

Glikolitik yol reaksiyonları sonunda ve fermentasyon reaksiyonlarının son basamaklarında pirüvik asit ortaya çıkmaktadır. Bu madde pek çok bileşiğin sentezlendiği önemli bir kavşak noktasında bulunmaktadır.

Pirüvik asitin asetil-CoA'ya dönüşmesi, karbohidrat metabolizmasında yer alan en karmaşık reaksiyonlardan birisidir. Pirüvatın asetil-CoA'ya oksidasyonunu katalizleyen pirüvat dehidrogenaz enzim sistem, 3 enzimin bir arada bulunduğu komplike bir sistemdir.

Karbohidrat ve lipit metabolizmasında rol alan bu bileşiğe asetil-CoA adı verilmiştir. Asetil-CoA, asetilasyon ve kondensasyon reaksiyonlarına katılmaktadır. Koenzim A, asetatin sitrik asit döngüsüne girmesine, yağların sentezine, asetilasyon reaksiyonlarına, steroidlerin sentezine ve diğer bazı önemli metabolik reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadır.

Asetil-CoA yağ asidi sentezine girmek için bir CO<sub>2</sub> molekülünün asetil-CoA karboksilaz enzimi aracılığı ile moleküle katılmasıyla malonil-CoA meydana gelir. Asetil-CoA karboksilaz kompleks bir enzimdir. Yağ asidi sentezinde ilk ve regülasyonu sağlayan bir enzimdir.

Yağ asidi sentezinin başlangıcında, asetil-CoA'daki metil karbonuna CO<sub>2</sub>'in bağlanmasıyla malonil-CoA meydana gelir. Malonil-CoA yağ asidi sentezinde öncü

moleküldür. Yağ asidi sentezinde zincir uzaması malonil-CoA'dan iki karbonun zincire katılması ile olmaktadır.

Malonil-CoA, asetil-CoA ile 3-Ketoaçil-ACP sentetaz enzimi yardımıyla asetoasetil-CoA bir sonraki kademede  $\beta$ -hidrosibutiril-CoA'ya, daha sonra krotonil-CoA'ya, bir sonraki safhada ise butiril-CoA'ya dönüşmektedir. İki karbonla başlayan yağ asidi sentezi dört karbonlu bileşik haline dönüşmekte ve butiril-CoA'ya 1mol su katılmasıyla dört karbonlu butirik asit serbest hale geçmektedir. Tekrar asetil-CoA ilavesi ile zincir uzamakta ve 16-24 karbonlu yağ asitleri sentezlenmektedir.

Yağ asidi sentetaz sisteminin normal ürünü olan palmitik asit uzun zincirli yağ asitlerinin öncül molekülüdür. İki karbon daha ilave edilerek 18 karbonlu stearik asit yada daha fazla karbon ilave edilerek daha uzun zincirli yağ asitleri meydana gelmektedir.

Yedi malonil-CoA'nın ve bir asetil-CoA'nın reaksiyona girmesiyle dört yağ asidi sentez basamağının yedi defa tekrar etmesi ile 16 karbonlu palmitil-S-ACP sentezlenmektedir. Palmitil-S-ACP zincir uzaması ile oluşan 16 karbonlu yağ asididir. Yağ asidi biyosentez hızı, asetil-CoA'dan malonil-CoA sentezi yapan Asetil-CoA karboksilaz tarafından ayarlanmaktadır (Gözükara 2001).

## **2.9 Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları**

Bakteriyel selüloz, uzun zincir yapısına sahip, diğer kaynaklardan elde edilen selüloza göre kimyasal olarak daha saf, su tutma kapasitesi yüksek, katlanınca şeklini koruyabilen, üretim esnasında modifikasyonlara uygun GRAS olarak kabul edilen bir polimerdir. Bakteriyel selülozun temel özelliklerini şu şekilde sıralayabiliriz;

- Kimyasal olarak yüksek saflığa sahiptir.
- Yüksek kristalize derecesine sahiptir.
- Ağaç pulpundan elde edilen selülozdan daha büyük yüzey alanına sahiptir.
- 300'den 900 kgm<sup>-3</sup>'e kadar yoğunluktadır.
- Düşük kağıt yoğunluğunda yüksek gerilme direncine sahiptir.

- Yüksek absorbanansa sahiptir.
- Yüksek su tutma kapasitesine sahiptir.
- Yüksek elastikiyet, esneklik ve dayanıklılık gösterir.
- Toksik değildir.
- Metabolik olarak inörttür.
- Biyolojik olarak uyuşabilmektedir.
- Biyolojik olarak parçalanabilmektedir.
- Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı kolayca uyum sağlar.

Bu üstün özelliklerinden dolayı çok geniş kullanım alanına sahiptir (Brown 1998).

Gıda alanında uygulamaları: Filipinlerde yaygın olarak tüketilen Nata de Coco adlı gıdanın üretiminde, Japonya'da diet içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu gıda plazmada kolesterolü düşürücü ve bazı kanser türlerine etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca fonksiyonel gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Koyulaştırıcı ve kalori düşürücü olarak rol oynar (El-Saied *et al.* 2004).

Medikal uygulamaları: Statik kültürden elde edilen selüloz ped, modern yanık tedavisinde kullanılabilecek kalitede kullanıma hazır bir sargı malzemesidir. Bu materyal sterilize edilebilir, biyolojik olarak uyumlu, gözenekli, elastik, kullanımını ve saklanması kolay, salgıları emebilen, optimum rutubeti temin edebilir. İkincil enfeksiyonlardan ve mekaniksel yaralanmalardan koruyabilmektedir. Ayrıca yenilenen dokulara yapışmaz. Yanıklarda sığağı emerek acıyı hafifletmeye yardımcı olur. Bakteriyel selüloz pedleri tedavi için kullanılan preparatların taşınması için çok uygundur ve iyileşme sürecini hızlandırmaktadır (Bielecki *et al.* 2001).

Bu amaçla Biofill, Bioprocess, Gengiflex gibi patent almış ticari markalar medikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Jonas and Farah 1998).

Kağıt sanayinde; dayanıklı ve yüksek kalitede kağıt üretiminde kullanılmaktadır (Brown 1998).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Mikroorganizmalar

*Gluconacetobacter xylinus* (S1): Manisa/Salihli'den ev yapımı sirkeden izole edilmiştir.

*Gluconacetobacter xylinus* (S2): Manisa/Salihli'den ev yapımı sirkeden izole edilmiştir.

*Glucanacetobacter xylinus* 759 NRRL B-759 (Synonyms: *Acetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus*) ve

*Glucanacetobacter xylinus* 1034 NRRL B-1034 (Synonyms: *Acetobacter xylinus*, *Acetobacter xylinus* subsp. *xylinus*)

suşları Amerika Tarım Bakanlığı kültür koleksiyonları standart suşlarından olup Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünden temin edilmiştir.

##### 3.1.2 Besiyeri

Hestrin and Schramm (1954) tarafından önerilen besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri bileşimi şu şekildedir:

- Pepton: 0.5 g
- Maya ekstraktı: 0.5 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O : 0.675 g
- Sitrik asit 0.15g.
- Saf su: 1000 ml.

pH:6.0 (1 N NaOH ve 1 N HCl ile ayarlanmıştır.)

Glikoza bağlı selüloz üretimini takip etmek için sırasıyla % 0, % 2, % 4, % 6 oranında glikoz eklenmiştir. Erlenlere 75 ml olarak dağıtılmıştır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

### **3.1.3 İnkübasyon koşulları**

Stok kültürden önce agarlı besiyerine (Caso brotha 15 g/l agar eklenerek hazırlanmıştır) sürme yapılarak 30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Burada amaç tek koloni düşmesini sağlamaktır. Çalışmalar saf kültürler kullanılarak yapılmıştır. Tek koloniden caso brotha ekim yapıp aynı şekilde 30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Selüloz üretimi amacıyla bu şekilde aktiveleştirilen kültürden, besiyerlerine % 1 oranında ekim yapılmış ve 30 °C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Selüloz miktarının belirlenmesi**

İnkübasyon sonunda selüloz miktarı Son *et al.* (2001) tarafından önerilen şekilde yapılmıştır. Asetik asit bakterileri tarafından oluşturulan selülozu, besiyerinden ayırmak için 5000 devir/dakika’da 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonunda üstteki faz atılmıştır. Çökelen selüloz üzerine saf su eklenerek iki kere daha aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Selülozdan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla 50 ml 0.5 M NaOH eklenerek 90 °C’lık su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Bu işlemi takiben, darası alınmış kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Kaba filtre kağıdından NaOH tamamen uzaklaştırılıncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Süzme işlemi bittikten sonra kaba filtre kağıdı 105 °C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar tutulmuştur. Daha sonra soğuması için desikatörde yeterince bekletildikten sonra hassas terazide tartılmıştır. Aradaki fark hesaplanarak litrede selüloz miktarı gram olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.2 Yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi**

#### **3.2.2.1 Bakteri hücrelerinin toplanması**

İnkübasyon sonunda kültür ortamı, yağ asidi kompozisyonu analizinde kullanılacak bakteri kültürünü elde etmek amacıyla santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan

kısım atılmıştır. Saf su eklenerek iki kere daha santrifüj edilmiştir. Bu şekilde hücreler toplanmıştır.

### 3.2.2.2 Yağ asitlerinin metilleştirilmesi

Yağ asitlerinin metilleştirilmesi Sasser (1990)'ın önerdiği şekilde yapılmıştır.

Kullanılan çözeltiler:

- Çözelti 1: (Sabunlaştırma) 45 g sodyum hidroksit, 150 ml metanol ve 150 ml saf su ile hazırlanmıştır.
- Çözelti 2 (Metilleştirme): 325 ml 6.0 N hidroklorik asit ve 275 ml metanol ile hazırlanmıştır. Ortam pH'sının 1.5'un altına düşmesi ve yağ asitlerinin metilleşmesini sağlamak için kullanılmıştır.
- Çözelti 3 (Ekstraksiyon): 200 ml hekzan ile 200 ml metil tert-bütil eter ile hazırlanmıştır. Yağ asitlerinin metil esterlerinin gaz kromatografisi ile analizi için organik faza alınması için kullanılmıştır.
- Çözelti 4 (Yıkama): 10.8 g sodyum hidrosit 900 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Kirlilik oluşturan etkenlerin uzaklaştırılması için hazırlanmıştır.

### Analiz Yöntemi

- Hücrelerin toplanması: Kültür ortamı santrifüj edilerek çökelekte hücreler toplanmıştır. Buradaki hücrelerden 40 mg alınarak temiz bir tüpe alınmıştır.
- Sabunlaştırma: Tüpe 1.0 ml çözelti 1 eklenmiştir. Temiz bir kapakla sıkıca kapatılarak vortekste 5-10 saniye karıştırılmıştır. Sonra kaynayan su banyosunda 5 dakika tutulmuştur. Tekrar vortekste 5-10 saniye karıştırılıp kaynayan su banyosuna konarak 25 dakika daha bekletilmiştir. Süre sonunda tüp hemen soğutulmuştur.
- Metilleştirme: Soğutulan tüpe 2.0 ml çözelti 2 eklenmiş ve kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra 80 °C  $\pm$ 1 'lik su banyosunda 10 $\pm$ 1 dakika bekletilerek yağ asitlerinin metilleşmesi sağlanmıştır.
- Ekstraksiyon: Soğutulmuş tüplerin kapakları açılarak 1.25 ml çözelti 3 eklenmiş ve tüpler tekrar kapatılmıştır. Sonra alt-üst olacak şekilde yavaşça 10

dakika karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra alt kısımdaki sulu faz pipet yardımıyla alınarak uzaklaştırılmıştır.

- Yıkama: Tüpte kalan organik fazın üzerine 3.0 ml çözelti 4 eklenmiştir. 5 dakika alt-üst olacak şekilde karıştırma işleminden sonra kapak açılarak üstteki organik fazın 2/3'ü pipet yardımıyla alınarak gaz kromatografisinde analiz için viallere alınmıştır.

- 

### **3.2.2.3 Gaz kromatografisi ile yağ asidi analizi**

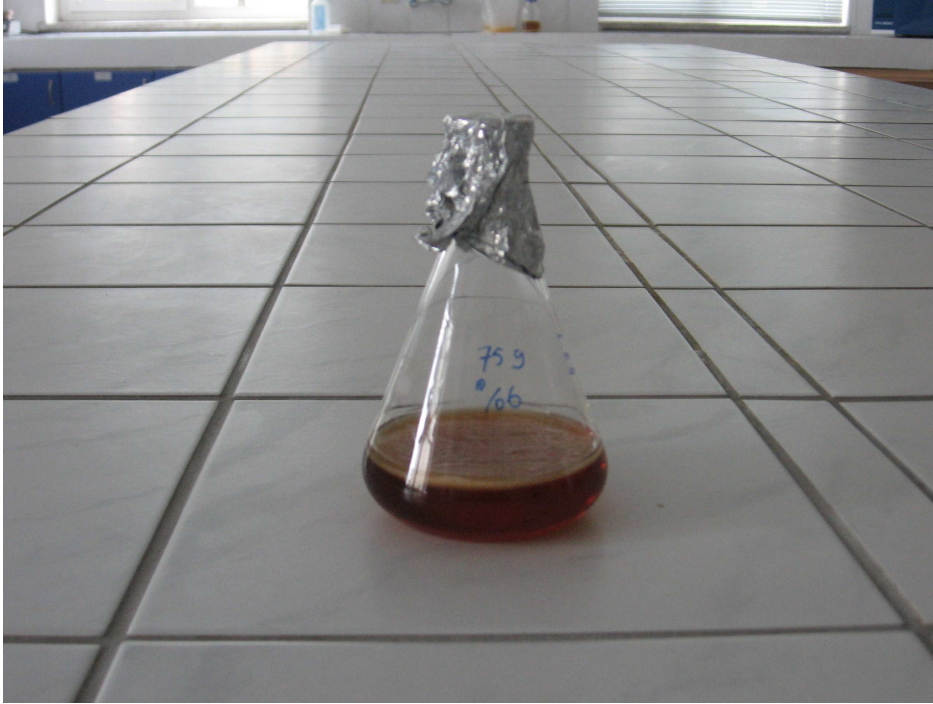
Gaz kromatografisi analizleri Agilent 6890 serisi gaz kromatografisi cihazında, FID dedektör ve DB 1 (30.0 m x 250 µm x 0.25 µm) kolon kullanılarak yapılmıştır.

- Gaz kromatografisi koşulları aşağıda belirtildiği gibidir:
  - İnlet: 220 °C, Akış: 11.2 ml/dak.
  - Taşıyıcı gaz: Helyum
  - Fırın sıcaklığı: 150 °C'de 3 dakika, 5 °C/dakika artışla 180°C, 0.5 °C /dakika, 200 °C'de 15 sabit tutulmuştur (Anonim 1996).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

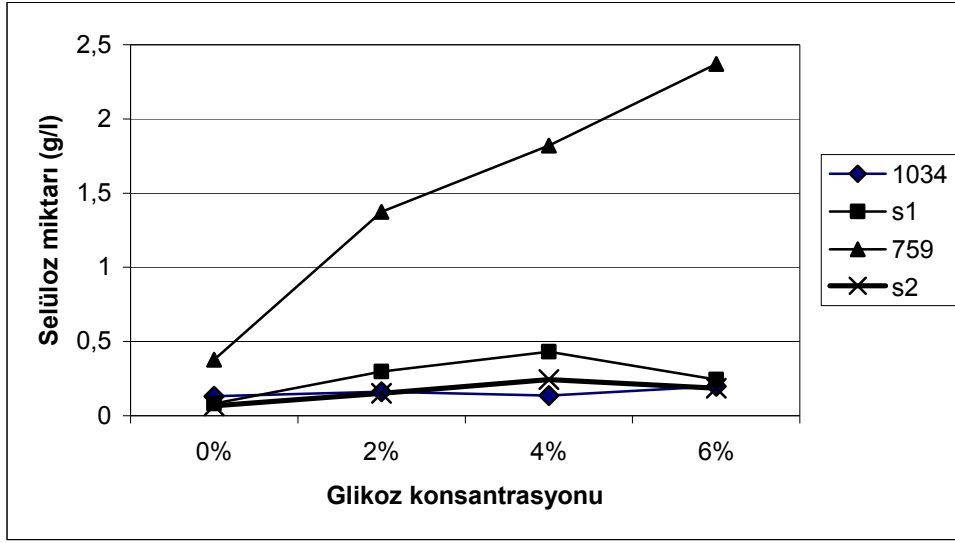
### 4.1 Selüloz Miktarı Sonuçları

Çalışmamızda % 0, % 2, % 4 ve % 6'lık glikoz içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Bu besiyerlerine, tohum kültürden % 1 oranında aşılama yapılmış ve daha sonra 30 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun üçüncü ve dördüncü günlerinden itibaren besiyerinde bulanıklık ve pelikül oluşumu gözlemlenmeye başlanmıştır. *G. xylinus* NRRL B-759 suşunda oluşan pelikül elips şeklinde kalın bir tabaka halinde oluşmuştur. Diğer suşların oluşturduğu peliküller ise yüzeyde oluşmakla birlikte besiyerine dağılmış bir görünüm vermiştir.



Şekil 4.1 *G.xylinus* NRRL B-759 % 6 glikoz içeren besiyerinde inkübasyon sonrası görünümü.

Selüloz miktarının belirlenmesi için Son *et al.* (2001) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.



Şekil 4.2 Ortalama selüloz miktarlarının glikoz konsantrasyonuna göre değişim grafiği

Glikoz konsantrasyonu ile selüloz miktarı arasında bir ilişki olduğu Keshk and Sameshima (2005) ve Son *et al.* (2001) tarafından bildirilmekle birlikte *G.xylinus* (S1) suşunda selüloz üretiminin % 4 glikoz konsantrasyonuna kadar arttığı, % 6 glikoz konsantrasyonundan itibaren düştüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde *G.xylinus* NRRL B-1034 ve *G.xylinus* (S2) suşunda; % 4'e kadar artmış, % 6 glikoz konsantrasyonunda çok az bir düşüş olmuştur. Ancak *G.xylinus* NRRL B-759 suşunda % 6 glikoz konsantrasyonunda en yüksek miktarda selüloz üretimi tespit edilmiştir. Glikoz konsantrasyonu arttıkça selüloz üretimi de artmıştır. Bu noktadan hareketle suşlara göre karbon kaynağı konsantrasyonunda farklılıklar gözlenmiştir. Buradan da endüstriyel üretimlerde suşların karbon kaynaklarını kullanım oranlarının belirlenmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Burada dikkati çeken husus % 0 glikoz konsantrasyonunda selüloz üretiminin saptanmış olmasıdır. Benzer bulgular Keshk and Sameshima (2005) tarafından yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir. Organizmalar ortamda karbon bulunmadığında proteinlerin bünyesindeki karbonu da kullanarak metabolit üretebilmektedir.

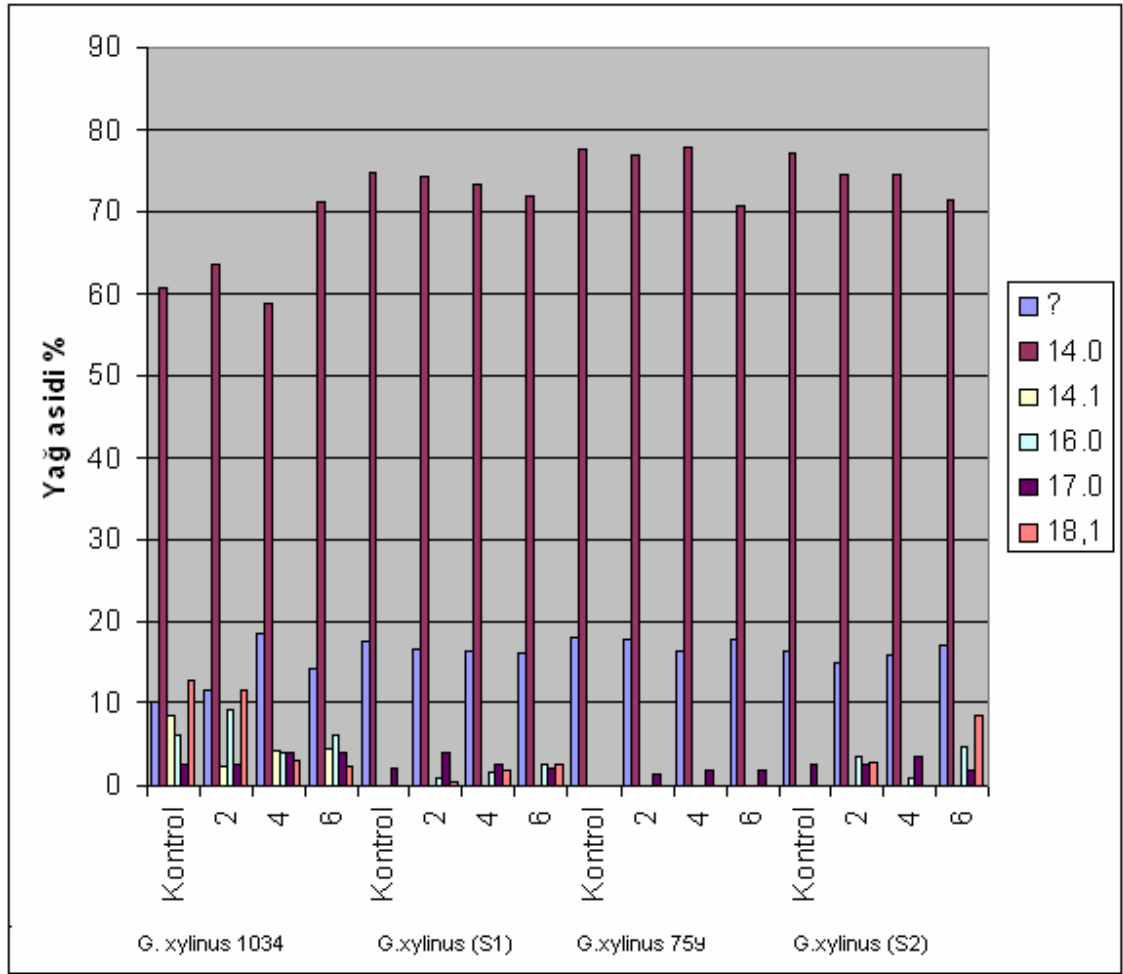
## 4.2 Yağ asidi kompozisyonu sonuçları

İnkübasyon sonunda besiyerleri santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve saf su ile iki kez yıkanmıştır. Gaz kromatografisinde analiz edebilmek için yağ asitleri metilleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Metilleştirme işleminden sonra gaz kromatografisi cihazına enjeksiyon yapılarak örnekler analiz edilmiştir.

Çizelge 4.1 Yağ asidi kompozisyonu tablosu

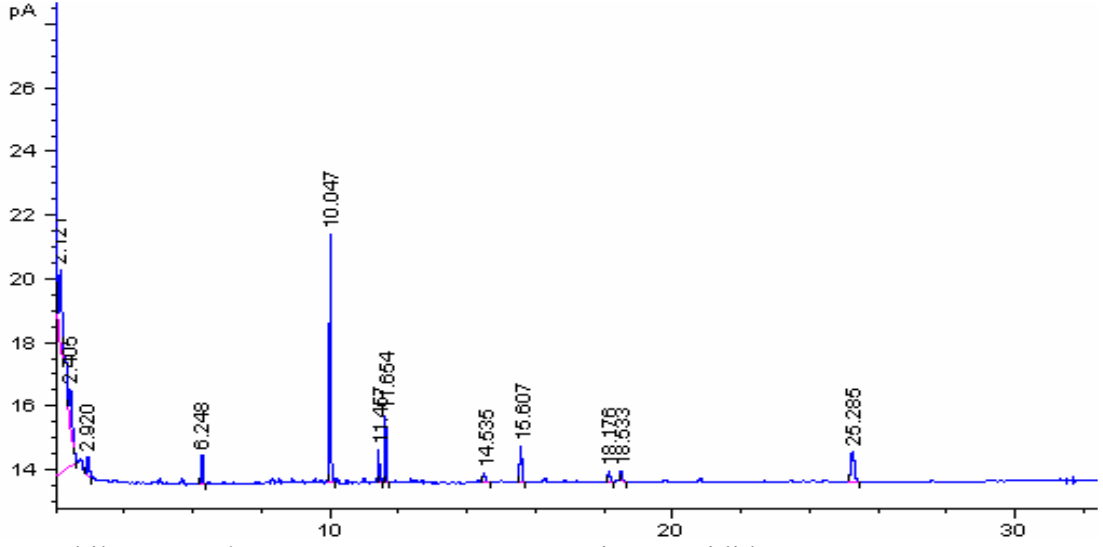
	Glikoz kons.	?*	14.0 *	14.1 *	16.0 *	17.0 *	18.2 *
1034	Kontrol	10,277	60,705	8,453	6,115	2,458	12,917
	2	11,756	63,612	2,388	9,150	2,581	11,631
	4	18,487	58,882	4,318	4,191	4,018	2,870
	6	14,254	71,142	4,653	6,219	4,043	2,324
s1	Kontrol	17,779	74,770			2,009	
	2	16,681	74,360		0,933	4,104	0,526
	4	16,308	73,161		1,546	2,511	1,848
	6	16,133	71,972		2,613	2,085	2,474
759	Kontrol	18,230	77,700				
	2	17,843	76,898			1,341	
	4	16,456	77,928			1,823	
	6	17,797	70,703			1,887	
s2	Kontrol	16,386	77,073			2,426	
	2	14,906	74,647		3,675	2,445	2,766
	4	15,887	74,688		0,893	3,457	
	6	17,301	71,426		4,892	1,845	8,547

\* (12:0 Laurik asit, 14:0 Miristik Asit, 14:1 Miristoleik asit, 16:0 Palmitik asit, 17:0 Margarik asit, 18:0 Stearik asit, 18:1 Oleik asit, 18:2 Linoleik asit). Laurik asit, stearik asit ve oleik asit bulunamadığından tablodan çıkarılmıştır. Yağ asidi analizleri iki paralel yapılmış olup ortalamaları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Yağ asitlerinin glikoz konsantrasyonuna bağlı değişimi grafiği

Şekil incelendiğinde 14.0 Miristik asidin ve 17.0 Margarik asidinin tüm şuşlarda % oranlarının fazla olduğu saptanmıştır. Diğer yağ asitlerinin ise şuşların özelliklerine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4 *G.xylinus* NRRL B-1034 suşuna ait yağ asidi kromotogramı

Yağ asidi kompozisyonu sonuçları incelendiğinde miristik asit en fazla bulunan yağ asidi olduğu saptanmıştır. Fakat bu yağ asidinden önce gelen yağ asitleri ise standart olmadığı için belirlenememiştir.

Üzerinde durduğumuz yağ asitlerindeki değişimin, glikoz konsantrasyonu ve selüloz miktarı arasındaki ilişkinin saptanması bu aşamada ortaya konamamıştır. Ancak daha ileride yapılacak olan çalışmalarda yağ asitleri konsantrasyonları esas alınarak miktar belirlenmeye çalışıldığında sonuçlarda farklılıkların belirlenmesinin mümkün olabileceği, kromotogramların incelenmesinden anlaşılmış bulunmaktadır.

## 5. SONUÇ

1. Bu çalışmada kullanılan referans suşlardan *G.xylinus* NRRL B-759 ile en yüksek selüloz üretim miktarına ulaşılmıştır.
2. Glikoz miktarı belli bir konsantrasyondan sonra selüloz üretim miktarına etki etmemektedir. Yüksek konsantrasyonlar gereksiz maliyete sebep olabilir.
3. Yağ asidi kompozisyonunda glikoz konsantrasyonuna bağlı bir değişim gözlemlenmemiştir.
4. Selüloz miktarındaki değişim ile araştırılan yağ asitlerinin miktarlarındaki değişim arasında ilişki kurulamamıştır.
5. Bu sonuçların yağ asitleri konsantrasyonu esas alınarak belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonim. 1996. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisiyle Analizi. TS 4664 EN ISO 5508.
- Anonymous. 2006. Web sitesi: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html> Erişim Tarihi: 05.06.2006.
- Bielecki, S., Krystynowics, A., Turkiewics, M. and Kalinowska, H. 2001. Bacterial cellulose. In Steinbuechel A (Ed), Biopolymers: Vol. 7. Polysaccharides I. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany, 37-90.
- Brown, R.M. Jr. 1998. Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Products (<http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.htm>) Position Paper. Erişim Tarihi: 08.06.2006.
- Czaja, W., Romanovics, D. and Brown, R.M. Jr. 2004 Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. Cellulose 11:403-411, 2004.
- El-Saied, H., Basta, A.H. and Gobran R.H. 2004. Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products ( Bacterial cellulose and Its Application ). Polymer-Plastic Technology and Engineering, 43: 797-820.
- Gözükara, E.M. 2001. Biyokimya Cilt 2, Sayfa 577-1258.
- Han, N.S. and Robyt, J.F. 1998. The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. Carbohydrate Research 313 (1998) 125-133.
- Hestrin, S. and Schramm, M. 1954. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochem J. 58 (2): 345-352.
- Holmes, D. 2004 Bacterial cellulose. A Thesis Presented for the Degree of Master of Engineering in Chemical and Process Engineering .Department of Chemical and Process Engineering University of Canterbury Christchurch, New Zealand 2004 1-74.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. and Tisler, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. Enzyme and Microbial Technology 31 (2002) 986-991.
- Jonas, R. and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose.

Polymer Degradation and Stability 59 (1998) 101-106.

- Keshk, S.M.A.S. and Sameshima, K. 2005. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (6), pp. 478-482, June 2005.
- Klemm, D., Schumann D., Ulrike U. and Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. Prog. Polym. Sci. 26 (2001) 1561-1603.
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I. and Stockar, U. 2003. Influence of Nutritional Factors on the Nature, Yield and Composition of Exopoly saccharides Produced by *Gluconateobacter xylinus* I-2281. Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2003, p. 6091-6098.
- Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1997. Effect of Agitator on Bacterial Cellulose Productivity in Aerated and Agitated Culture. Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 83, No. 4, 371-376.
- Krystynowics, A., Czaja, W., Wiktorowska- Jezierska, A., Gonçalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2002) 29, 189-195.
- Krystynowics, A., Koziolkiewicz, M., Wiktorowska-Jezierska, A., Bielecki, S., Klemenska, E., Masny, A. and Plucienniczak, A. 2005. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. Acta Biochimica Polonica. Vol. 52 No. 3/2005, 691-698.
- Lin, F.C. and Brown, R.M. Jr. 1989. Purification of cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*. Cellulose and Wood Chemistry and Technology. (Schmerck, C..Ed.) 473-492.
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. and Yoshinaga, F. 1995: A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. Biosci. Biotech. Biochem., 59, 2259-2262 (1995).
- Öztürk, M. 2005. Kullanılmış Kağıtların Geri Kazanılması Kullanılmış Kağıttan Kağıt Üretimi. <http://www.cevreorman.gov.tr/belgeler1/kagit.doc> 1-24. Erişim Tarihi: 09.05.2006.
- Ramana K.V., Tomar, A. and Singh, L. 2000. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 245-248.
- Rezaee, A., Sanaz, S. and Forozandemogadam, M. 2005. Role of Plasmid in Production of *Acetobacter xylinum* Biofilms. American Journal of Biotechnology 1 (3): 121-125.

- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. *Microbiological Review*, Mar. 1991, p. 35-58.
- Römling U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology* 153 (2002) 205-212.
- Sasser, M. 1990. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Technical Note # 101 Revised February 2001. 1-6.
- Saxena, I. M. and Brown, R.M. Jr. 1989. Study of cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: a genetic approach. In: Cellulose and Wood -Chemistry and Technology, Ed. C. Schuerch. John Wiley and Sons, Inc. N. Y., 537-557.
- Son, H.-J., Heo, M.S., Kim, Y-G. and Lee, S.-J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter sp. A9* in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2001) 33, 1-5.(Printed in Great Britain).
- Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1997. Production of bacterial cellulose by agitation culture systems. *Pure & Appl.*, Vol. 69, No. 11, pp. 2453-2458, 1997
- Väljamäe, P., Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G. and Johanson, G. 1999. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *Eur. J. Biochem.* 266, 327-334 (1999) © FEBS 1999.
- Vandamme, E.J., De Baets S., Vanbaelen, A., Joris, K and De Wulf P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* 59 (1989) 93-99.
- Yamada Y., Hoshino K. and Ishikawa T. 1997 . The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA, *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, 47, 37-44
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. and Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* (1998) 5, 187-200.
- Wong, C.H., Fear, A.L., Calhoon, R.D., Eichinger, G.H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D.H., Meade, J.H., Emerick, A.W., Bruner, R., Ben-Baset, A. and Tal, R. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 87, pp. 8130-8134, October 1990.
- Young, Y.K., Park, S.H., Hwang, J.W., Pyun, Y.R. and Kim, Y.S. 1998. Cellulose Production by *Acetobacter BRC5* under Agitated Condition. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol. 85, No. 3, 312-317.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Arif KAYA

Doğum Yeri : EĞİRDİR

Doğum Tarihi : 02.10.1972

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Ankara Laborant Meslek Lisesi (1989)

Lisans :Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi  
Bölümü (1994)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği  
Anabilim Dalı (Eylül 2005-Ocak 2007)

### **Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:**

Bolu İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 1995-2000

Isparta İl Kontrol laboratuvar Müdürlüğü 2000-