

**T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ**

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM
DALI**

**KOMBUCHA VE SİRKE DEN SELÜLOZ ÜRETEN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Yaren Nida TİRYAKİ

Ocak 2021

ÇORUM

**KOMBUCHA VE SİRKE DEN SELÜLOZ ÜRETEN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

Yaren Nida TİRYAKİ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Gülçin ALP AVCI

Ocak 2021

ÇORUM

Yaren Nida TIRYAKI tarafından hazırlanan “Kombucha ve Sirkeden Selüloz Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu” adlı tez çalışması 06/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Gülçin AKÇA :

Doç. Dr. Gülçin ALP AVCI :

Doç. Dr. Emre AVCI :

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün Yönetim Kurulu’nun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile Yaren Nida TIRYAKI’nin Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Prof. Dr. Muhammed Asif YOLDAŞ

Müdür V.

TEZ BEYANI

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Yaren Nida TİRYAKİ

KOMBUCHA VE SİRKE DEN SELÜLOZ ÜRETEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

Yaren Nida TİRYAKİ

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Ocak 2021

ÖZET

Bakteriyel selüloz bakteriler tarafından üretilen bir biyopolimerdir. Benzersiz özelliklere sahiptir ve bitki selülozuna göre oldukça saf olarak elde edilmektedir. Biyoteknolojideki gelişmelerle beraber bakteriyel selülozun önemi ve kullanım alanı çeşitliliği gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın birinci hedefi ev yapımı sirke ve SCOBY (Symbiotic Colony of Bacterias and Yeasts) olarak da bilinen kombucha mantarı çayından, selüloz üreticisi olan mikroorganizmaların izole ve identifiye edilmesidir. Çalışmamızın ikinci hedefi ise tanımlanan bu bakterilerden bakteriyel selüloz üretiminin varlığının gösterilmesidir. Bu çalışmada, sirke ve kombucha mantarından kültür yöntemi ile mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için Hestrin Schramm (HS) kültür ortamında 30°C’de ve pH 6,0±0,02 kullanılmıştır. İzole edilen suşların identifikasyonu için klasik ve biyokimyasal testler uygulandı. Test sonuçlarına göre *Gluconacetobacter* cinsine ait oldukları belirlenen bakterilerin belirli oranlarda bakteriyel selüloz ürettikleri gözlenmiştir. Üreme süresince kültür ortamı pH’sı değişmiş ve kültür yüzeyinde membran tespit edilmiştir. Kalınlaşan membranların karakterizasyonu FTIR analizi ile yapılmıştır. Bakteriyel selüloz olduğu saptanan membranların lif kalitesini anlamak amacıyla kurutulup ağırlığı ölçüldükten sonra distile su içerisine daldırılıp yağ ağırlıkları ölçülüp su absorpsiyon oranları belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda hedeflenen bakteri türleri izole edilmiş ve selüloz üretimi gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bakteriler hakkında daha detaylı bilgi elde edildikten sonra ürettikleri bakteriyel selülozun kalitesini artırmak için gerekli çalışmalar sonrasında, ham madde olarak kullanılacak yeni bir ürün geliştirilmesi düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kombucha, Sirke, Gluconacetobacter, Bakteriyel Selüloz

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CELLULOSE PRODUCING MICROORGANISMS FROM KOMBUCHA AND VINEGAR

Yaren Nida TIRYAKI

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE EDUCATION INSTITUTE

January 2021

ABSTRACT

Bacterial cellulose is a biopolymer produced by bacteria. It has unique properties and is obtained quite pure compared to plant cellulose. With the developments in biotechnology, the importance and usage area of bacterial cellulose is increasing day by day. Therefore, the primary goal of our study is to isolate and identify cellulose-producing microorganisms from homemade vinegar and kombucha mushroom tea, also known as SCOBY (Symbiotic Colony of Bacteria and Yeasts). The second goal of our study is to show the existence of bacterial cellulose production from these bacteria. In this study, isolation of microorganisms was made from vinegar and kombucha mushrooms by culture method. For isolation, Hestrin Schramm (HS) culture medium at 30 ° C and pH $6,0 \pm 0,02$ was used. Classical and biochemical tests were applied for the identification of the isolated strains. According to the test results, it was observed that bacteria that were determined to belong to the genus *Gluconacetobacter* produced bacterial cellulose at certain rates. During the breeding, the pH of the culture medium has changed and the membrane was detected on the culture surface. Characterization of thickened membranes was made by FTIR analysis. In order to understand the fiber quality of the membranes found to be bacterial cellulose, they were dried and weighed, then immersed in distilled water, their wet weight was measured, and water absorption rates were determined. As a result of our study, targeted bacterial species were isolated and cellulose production

was observed. After obtaining more detailed information about the bacteria obtained in our study, it is planned to develop a new product that can be used as a raw material after the necessary studies to increase the quality of the bacterial cellulose they produce.

Keywords: Kombucha, Vinegar, Gluconacetobacter, Bacterial Cellulose

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın gerçekleşmesi için bana olanak sağlayan ve yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Gülçin ALP AVCI' ya teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca bana destek olan ve yardımını esirgemeyen tüm Fen Edebiyat Fakültesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hakkını asla ödeyemeyeceğim, en değerli destekçim olan annem Emine ŞİMŞEK ve babam Rüştü TİRYAKİ'ye, hep yanımda olan ve hayatıma değer katan tüm aileme sonsuz teşekkür ederim. Tez sürecimde her zaman destek olup beni yalnız bırakmayan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
RESİMLER DİZİNİ.....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 SELÜLOZ.....	3
2.2 BAKTERİYEL SELÜLOZ.....	5
2.3 BAKTERİYEL SELÜLOZUN YAPISI.....	7
2.4 BS ÜRETİMİ YAPAN MİKROORGANİZMALAR VE KOMBUCHA MANTARI.....	11
2.5 BS BİYOSENTEZİ VE MEKANİZMASI.....	16
2.5.1 Bakteriyel Selüloz Sentezi.....	19
2.6 BS ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER.....	21
2.6.1 Fermentasyon Yöntemleri.....	22
2.6.2 Karbon ve Azot Kaynakları.....	32
2.6.3 Sıcaklık ve pH Etkileri.....	35
2.6.4 Oksijen ve Karbondioksit Etkisi.....	36
2.7 BS ÜRETİMİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ.....	36
2.8 UYGULAMA ALANLARI.....	38
2.8.1 Sağlık.....	39
2.8.2 Gıda.....	43
2.8.3 Kağıt.....	45
2.8.4 Kozmetik.....	46

2.8.5	Diğer Uygulamalar	51
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	55
3.1	MATERYAL.....	55
3.1.1	Kimyasallar.....	55
3.1.2	Örnek temini	55
3.1.3	Besi ortamları ve hazırlanışı	55
3.1.4	Çözeltiler ve Boyalar	58
3.2	YÖNTEM.....	59
3.2.1	Bakteri İzolasyonu	59
3.2.2	Bakterilerin İdentifikasyonu	60
3.2.3	BS Saflaştırma	62
3.2.4	BS Karakterizasyonu	63
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	64
4.1	MİKROORGANİZMA İZOLASYONU SONUÇLARI.....	64
4.1.1	Gram boyama sonuçları	64
4.1.2	Biyokimyasal Test Sonuçları	67
4.1.3	Bakteriyel Selüloz Karakterizasyonu.....	68
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
	KAYNAKLAR	80
	ÖZGEÇMİŞ	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2. 1. Bakteriyel selülozun ayırt edici özellikleri (Krystynowicz ve Bieleck, 2001).....	6
Çizelge 2. 2. Bakteriyel ve bitki bazlı selüloz özelliklerinin karşılaştırılması (Jing ve ark., 2019)	9
Çizelge 2. 3. Selüloz üreten mikroorganizmaların üretim koşulları ve miktarları (Erminda ve ark., 2015).....	12
Çizelge 2. 4. Farklı yapılar ve biyolojik rollerle BS üretimi için bakteri kaynakları (Brown, 1886; Jonas ve Farah, 1998)	14
Çizelge 2.5. Bazı reaktörlerin üretim özellikleri, modifikasyonları ve avantajları (Wang ve ark., 2019).....	29
Çizelge 2. 6. Karbon kaynaklarının <i>A. xylinum</i> tarafından selüloz üretimi üzerindeki etkisinin yüzde oranları (Jonas ve Farah., 1998).....	33
Çizelge 2. 7. Bakteriyel selülozun gıda uygulamaları (Hanif ve ark., 2016).....	44
Çizelge 2. 8. Bakteriyel selülozun kozmetik uygulamaları (Hanif ve ark., 2016).....	48
Çizelge 2. 9. Bakteriyel selülozun diğer uygulamaları (Lin ve ark., 2013)	52
Çizelge 4. 1. İzolatların karbonhidrat fermentasyonu sonuçları	67
Çizelge 4. 2. İzolatların biyokimyasal özellikleri	67
Çizelge 4. 3. İzole edilen suşların benzerlik oranları	68
Çizelge 4. 4. HS besiyerinde üretilen bakteriyel selüloz ağırlıkları (30°C’de pH:6,0, 5 günlük inkübasyon sonucu).....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Selüloz yapısı (Geyer ve ark., 1994).....	3
Şekil 1. 2. Selüloz oluşumunun ana yolları (Nakatsubo ve ark., 1996).....	4
Şekil 1. 3. <i>G. xylinus</i> tarafından selülozun biyosentezine yönelik yolun varsayımsal modeli (Wilton ve ark., 2002).....	18
Şekil 1. 4. Selüloz sentazın şematik gösterimi (Wilton ve ark., 2015).....	20
Şekil 1.5. Selüloz sentezi ve translokasyonu için önerilen model (Wilton ve ark., 2015).....	21
Şekil 1.6. Hava kaldırmalı biyoreaktör şematik gösterimi (Chao ve ark., 2000).....	26

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. 1. Bakteriyel selüloz (BS) (Anonim, 2020)	5
Resim 1. 2. Acetobacter aceti gram boyama (Kowser ve ark., 2015).....	13
Resim 1. 3. Bakteriyel selüloz uygulamaları	38
Resim 1. 4. Bakteriyel selüloz sağlık uygulamaları (Hanif ve ark., 2016)	40
Resim 4. 1 Koloni morfolojisi örnekleri	64
Resim 4. 2. YNT-1 (A) ve YNT-2 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri.....	64
Resim 4. 3. YNT-3 (A) ve YNT-4 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri.....	65
Resim 4. 4. YNT-5 (A) ve YNT-6 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri.....	65
Resim 4. 5. YNT-8 (A) ve YNT-11/1a (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri..	65
Resim 4. 6. YNT-11/1b (A) ve YNT-12 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri	66
Resim 4. 7. YNT-14/1b (A) ve YNT-14/2a (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri	66
Resim 4. 8. YNT-14/2b suşunun ışık mikroskobu görüntüsü.....	66
Resim 4. 9. Üretilen bakteriyel selüloz örnekleri-1	69
Resim 4. 10. Üretilen bakteriyel selüloz örnekleri-2	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
β	Beta
Å	Ångström
μl	Mikrolitre
L	Litre
Mg	Miligram
g	Gram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Spp	Alt türler
pH	Hidrojen konsatrasyonunun eksi logaritması
Kisaltmalar	Açıklama
HS	Hestrin Schramm
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
BS	Bakteriyel Selüloz
SCOPY	Symbiotic Colony of Bacterias and Yeasts
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
UDPG	UDP- Glikoz
SS	Selüloz Sentaz
ATP	Adenin Trifosfat
TK	Terminal Kompleksi
c- diGMP	Siklik Diguanosin Monofosfat
PDEA	Fosfodiesteraz A
BCS	Selüloz Sentez Operonu
PCS- PDB	Dönen Disk Reaktörü
CMC	Karboksi Metil Selüloz
CSL	Mısır Dik Likörü

TCA	Trikloroasetik Asit
HDM	Hücre Dışı Matris
CMCK	Karboksi Metil Selüloz Köpük
RNP	Rutin Nazal Paketleme
DKH	Düz Kas Hücreleri
PEG	Poli Etilen Glikol
IPM	Antibiyotik İmipenem
STA	Selüloz Triasetat
STA- IPM	Selüloz Triasetat Sıkışmış IPM
EPTEE	Poli Tetrafloro Etilen
PET	Poli Etilen Tereftalat
BASYC	Bakteriyel Sentezlenmiş Selüloz
PCA	Domuz Karotis Arteri
GRAS	Gıda Olarak Güvenli
AgNP	Gümüş Nanopartikül
PANI/ BC	Poli Anilin Bakteriyel Selüloz
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
NCMFC	Mikrobiyal Yakıt Hücresi
OLED	Organik Işık Yayan Diyot
SAO	Su Absorbsiyon Oranı

1. GİRİŞ

Selüloz, ilk defa 1838'de Payen tarafından keşfedilmesiyle beraber suda çözünmeyen ve hidrofilik özellik taşıyan lineer bir organik polisakkariti ortaya çıkarmıştır (Payen, 1838). Selüloz yapı olarak D-glukopiranoz birimlerinin β -1,4-glikosidik bağları ile bağlanarak oluşan yüksek moleküler ağırlığı olan polimerdir (Park ve ark., 2010).

Selüloz biyosferde en çok bulunan yenilenebilir biyopolimerdir. Temel olarak hayvan, bitki, bakteri ve alg gibi çeşitli organizmalardan elde edilebilir (Peng ve ark., 2017; Qiu ve Hu, 2013; Kim ve ark., 2015). Farklı kaynaklardan elde edilmesine rağmen selüloz aynı kimyasal bileşime sahip olup, farklı fiziksel özelliklerde de bulunabilir (Vasconcelos ve ark., 2017).

Geleneksel olarak selüloz odundan elde edilmektedir ancak odunun yapısında lignin, hemiselüloz ve selüloz bir arada bulunmaktadır. Dolayısıyla odundan selüloz elde etmek amacıyla fazla maliyetli ve zararlı kimyasalların kullanıldığı bilinmektedir. Bu kimyasallar ilerleyen zamanlarda çevre kirliliğine de neden olacağından ve ağaçların kesilmesine engel olmak amacıyla selüloz üretimi için alternatif yollar üzerine çalışılmaktadır (Brown, 2006).

Selüloz çeşitli mikroorganizmalar tarafından da üretilmektedir (Cannon ve Anderson, 1991). Bakteriyel selüloz, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Escherichia*, *Salmonella* ve *Sarcina* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilen ekstraselüler bir polimerdir (Yamanaka ve Watanabe, 1989; Cannon ve Anderson, 1991). En iyi selüloz üreticileri arasında *Acetobacter xylinum* (sinonimleri: *A. aceti* ssp., *A. xylinus*) olmakla birlikte *Gluconacetobacter* türleri olan *G. hansenii*, *G. oboediens*, *G. europaeus*, ve *G. intermedius* da selüloz üreten bakteriler arasında bulunmaktadır (Yamada, 2000; Yamada ve ark., 1997).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen selüloz, çoğunlukla bakteriyel selüloz (BS) olarak adlandırılır (Klemm ve ark., 2005; Lisdiyanti ve ark., 2006). Bakteriden elde edilen selüloz birçok avantaja sahip olduğundan odundan elde edilen selüloza karşı bir alternatif oluşturmaktadır. Bakteriyel selüloz oldukça saftır, yapısında lignin

ve hemiselüloz içermez. Bundan dolayı özellikle kağıt sanayisi için oldukça önemli ve maliyetli olan delignifikasyon işlemine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu nedenle maliyet ve atık miktarı azalmaktadır (Anonim, 2005).

Bakteriyel selüloz hidrofilik bir yapıya sahiptir. Su tutma kapasitesi ağırlığının yaklaşık 500 katına ulaşabilmektedir. Bakteriyel selülozun, mükemmel mekanik kuvveti, düzgün lifli yapısı, biyolojik olarak parçalanabilir olması (biyo-bozunur), kimyasal olarak oldukça saf olması, yüksek su tutma kapasitesi ve bitkilere kıyasla daha kısa sürede üretilebilmesi gibi birçok önemli özelliği merak uyandırmaktadır (Vandamme, 1998). Bu özelliklere dayanarak BS, lastik, kağıt, tekstil, yüksek kaliteli hoparlör diyaframları, ayırma membranları ve elektronik kağıt gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır (Tabarsa ve ark., 2017; Khan ve ark., 2013; Zhong ve ark., 2013).

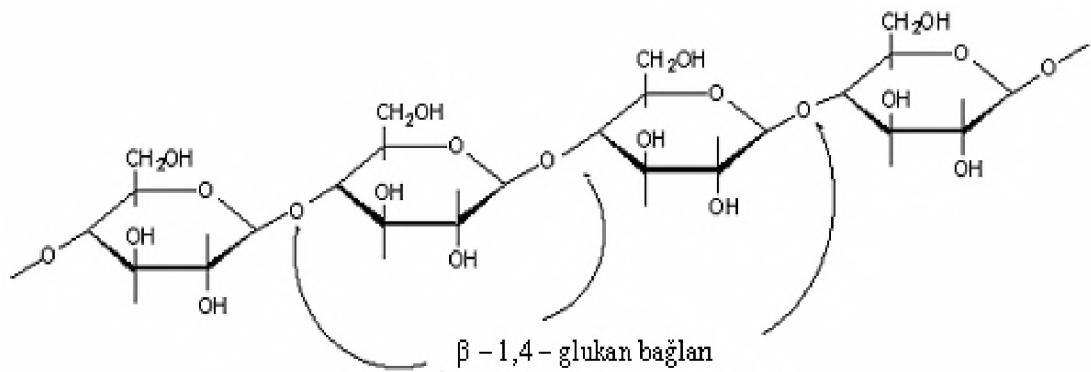
Biyoteknolojideki gelişmelerle beraber bakteriyel selülozun önemi ve kullanım alanı çeşitliliği gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın birinci hedefi ev yapımı sirke ve SCOBY (Symbiotic Colony of Bacterias and Yeasts) olarak da bilinen kombucha mantarı çayından, selüloz üreticisi olan mikroorganizmaların izole ve identifiye edilmesidir. Çalışmamızın ikinci hedefi ise tanımlanan bu bakterilerden bakteriyel selüloz üretiminin varlığının gösterilmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Selüloz

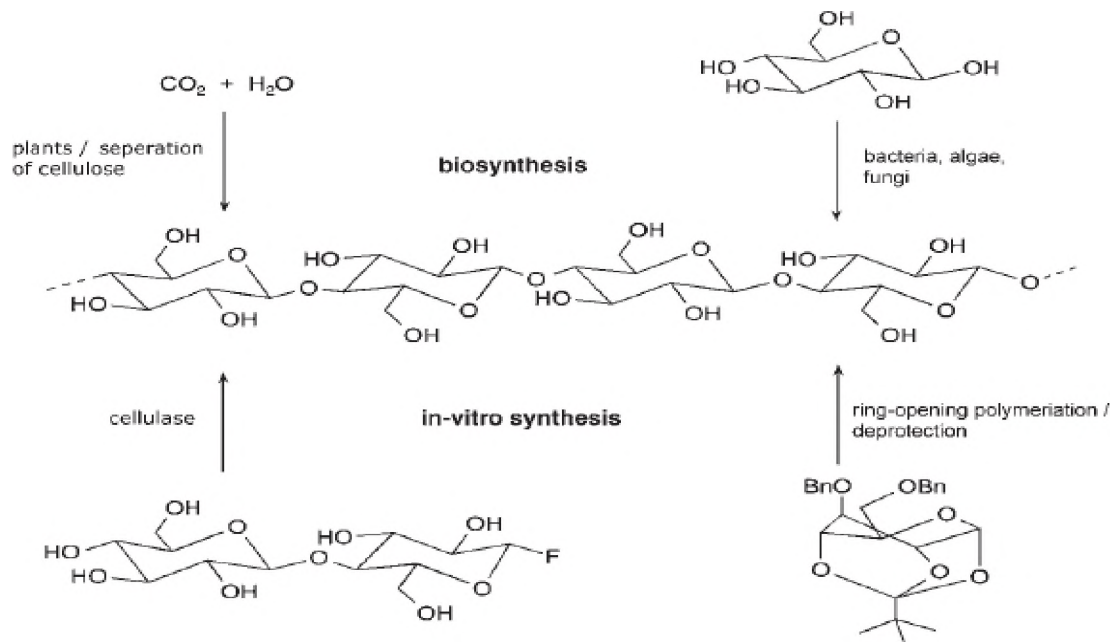
Selüloz, çoğu yeşil bitkilerin, çeşitli alglerin hücre duvarı yapısının temel bileşeni olduğundan doğada en bol bulunan biyopolimerdir. (Khandelwal, 2013). β -1,4 yapısında bağ yapmış olan anhidroglikoz homopolimeridir. Birçok β -1,4 bağlantıya sahip ve d-glikoz birimlerinden oluşan doğrusal bir zincire sahip polisakkarittir (Holtzaple, 2003). Bitki hücre duvarlarının mekanik kuvvetleri selüloz yapısına bağlıdır. Bu özellik bir polisakkarit için fazla sulu ortamlarda bile yarı kristalli agregasyon yapısını koruyabilmesine bağlı olduğu bilinmektedir (Aravamudhan ve ark., 2014, Zhang ve ark., 2013).

Selüloz esaslı ürünler ele alındığında en sık kullanılan ürünlere verilebilecek örnekler kağıt ve kartondur (Rose ve Palkovits, 2011). Uygun koşullarda selüloz işlendiğinde türevleri oluşturulabilir ve birçok ticari ürünün üretiminde kullanılabilir (Kalia ve ark., 2011). İnsanlar eski zamanlardan beri yapay selülozlu ipliklerin ve biyofilmlerin üretimi için çeşitli sanayi malzemeleri kullanılmasıyla selüloz türevi ürünlerin üretimi çok yönlü bir hizmet vermektedir (Serra ve ark., 2013). Odundan selülozun elde edilmesi yüksek maliyetli olduğundan ve selülozun oluşumu hala iyi bir şekilde anlamadığından dolayı araştırmalar selüloz biyosentezine yöneliktir (Li ve ark., 2015).



Şekil 1. 1. Selüloz yapısı (Geyer ve ark., 1994)

Selülozun kimyasal yapısına baktığımızda bir ucunda D-glukoz ve C₄-OH grubu non-indirgeyici uç, diğer uç yani sonlanma ucunda C₁-OH, indirgeyici aldehit yapısı bulunmaktadır. Bu moleküler yapı bazı önemli özellikleri belirler; parçalanabilirlik, hidrofiliklik ve kimyasal değişkenlik. Ayrıca yapısında bulunan hidrojen bağları selüloza kristalimsi lif yapıları eklemektedir. Şekil 1.2.'de selüloz oluşumunun dört yolu gösterilmiştir. En sık kullanılan yol bitkilerden selüloz üretimidir. Pamuktan elde edilen selüloz en saf haldedir. Fakat odunda selüloz, lignin ve diğer polisakkaritlerle bileşikler oluşturur. Odunda saf halde bulunmamasından dolayı saflaştırma işlemleri sırasında birçok kimyasal kullanılmaktadır. Odun dışında bazı bakterilerden, alglerden ve mantarlardan da selüloz üretilir (Nobles ve ark., 2001). Buna ek olarak 3,5 milyar yıl boyunca siyanobakterilerinde selülozu biyosentezledikleri bilinmektedir (Nakatsubo ve ark., 1996).



Şekil 1. 2. Selüloz oluşumunun ana yolları (Nakatsubo ve ark., 1996)

Selüloz yapısındaki hidroksil grupları arasındaki ağ hidrojen bağları ile oluşmasından dolayı sürekli bir araştırma konusu olmuştur. Yapının anlaşılması için X-ışını kırınımı, elektron mikroskopisi (SEM), NMR spektroskopisi gibi analiz yöntemleri uzun yıllardır yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemler hem doğal hem de doğal olmayan selülozların yapılarının ayrıntılı analizi için kullanılır (Gardner ve Blackwell, 1974).

Selüloz sadece doğada bulunduğu gibi değil farklı çeşitlerde de bulunabilir. Selüloz asetat, etilselüloz, hidroksipropil selüloz ve bakteriyel selüloz örnek gösterilebilir. Selüloz asetat, önemli bir selüloz esteridir. İşlenme şekline bağlı olarak membranlar, filmler ve lifler gibi uygulamalarda kullanılır (Esa ve ark., 2014). Etilselüloz, anhidroglikoz birimlerinin üzerindeki iyonik olmayan etil eter gruplarına değiştirilen bir selüloz türüdür. Özellikle ilaç salınım sistemlerinin mikrokapsüllemeye maddeyi bozulmaya karşı koruması için araştırmalar yapılmaktadır (Murtaza, 2012). Hidroksipropil selüloz, hem organik çözücülerde hem de suda çözünür. Kayganlaştırıcı bir madde olduğundan dolayı suni gözlerde de kullanılır (Juchs ve ark., 2010, McDonald ve ark., 2010, Sanford-Smith, 2003).

2.2 Bakteriyel Selüloz

Bakteriyel selüloz (BS), bazı bakteriler tarafından üretilen doğal hücre dışı bir polisakkarittir. İlk olarak Brown tarafından tanımlanmıştır. *Mycodermaacetii* (sirke mayası) fruktozlu bir ortamda yetiştirildiğinde membran benzeri yapılar üreten bir organizma keşfetmiştir. Bu organizmaya *Acetobacter xylinum* adını önermiştir. Brown'un orijinal makalesinde sirke mayasının uygun sıvı içinde büyürken üzerinde jöle benzeri yarı saydam bir yapı fark etmiştir. Oluşan yapıyı bir dizi deney sonrasında pamuk selülozuna benzediğini göstermiştir. Ayrıca bu jelatinimsi membranı yırtmaya çalışmasına rağmen oldukça sert olduğunu bulmuştur (Brown, 1886).



Resim 1. 1. Bakteriyel selüloz (BS) (Anonim, 2020)

Bakteriyel selüloz, odun selülozu ile aynı kimyasal formüle sahiptir. Kimyasal formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olup β -1,4- glikozidik bağlarla birbirine bağlı glikoz monomerlerinden oluşan ekzopolisakkarittir (Phisalaphong ve Jatupaiboon,2008; Sheykhnazari ve ark., 2011).

Çizelge 2. 1. Bakteriyel selülozun ayırt edici özellikleri (Krystynowicz ve Bieleck, 2001)

Özellik	Açıklama
Saflık	- Lignin veya hemiselüloz yokluğu -Tamamen biyobozunur ve geri dönüştürülebilir, yenilenebilir bir kaynak
Mükemmel mekanik dayanım	- Yüksek dayanımlı kristal selüloz - Boyutsal kararlılık - Yüksek çekme dayanımı - Hafiflik - Olağanüstü dayanıklılık
Olağanüstü emicilik	- Yüksek su tutma kapasitesi - Seçici gözenek yapısı - Yüksek yüzey hacmi
Biyosentezde direkt membran düzeneği	- Fibril yapılarına ara aşamalarında ekleme yapmak mümkündür - Son derece ince, mikron altı, optik şeffaf membranlar monte edilebilir
Selüloz oryantasyonu sırasında	- Dinamik lif sentezi oluşturma yetenekleri - Tek eksenli güçlendirilmiş membranlar

Çizelge 2. 1. Bakteriyel selülozun ayırt edici özellikleri (Krystynowicz ve Bieleck, 2001) (Devam)

Özellik	Açıklama
Selülozun doğrudan modifikasyonu	<ul style="list-style-type: none"> - Boyaların direkt kültür ortamına sokulması - Modifikasyon sırasında selülozun fiziksel özelliklerinin kontrolü (moleküler ağırlık ve kristallik)
Selüloz ürününün genetik modifikasyonu	<ul style="list-style-type: none"> - Selüloz türevlerinin doğrudan sentezi (örneğin selüloz asetat, karboksimetil selüloz, metil selüloz vb.) - Selüloz kristalin allomorfunun kontrolü (selüloz I veya selüloz II) - Selülozun molekül ağırlığının kontrolü

Yenilenebilir biyopolimerler, doğada yılda yaklaşık 100 milyar tona yakın artış göstermektedir (Klemm ve ark., 2005). Farklı selüloz türleri arasında jel benzeri üç boyutlu bir yapı olan bakteriyel selüloz %60'ın üzerinde yüksek kristallik derecesiyle benzersiz bir özellik sunmasıyla dikkat çekmektedir. Yüksek sıcaklıklara kadar (340-370°C) dayanabilir ve Young modülüne göre (en fazla 15 GPa) çekmeye karşı dayanıklılığı 200-300 MPa olması esnekliğini göstermiştir. Buna ek olarak bakteriyel selülozun geniş yüzey alanının olmasıyla büyük miktarlarda sıvıları absorbe edebilir ve enzimlerle güçlü etkileşimler kurabilir (Grande ve ark., 2009; Klemm ve ark., 2005).

2.3 Bakteriyel Selülozun Yapısı

X ışını incelemelerine dayanarak polimerlerin oryantasyon durumları tanımlanabilir. BS membranları tek kutuplu oryantasyon ve kurutma işlemine bağlı olarak ek bir eksenle yönlendirme bileşeni sergiler. Çizim koşullarına bağlı olarak tek eksenli yönelim çizilerek elde edilebilir (Bohn ve ark., 2000).

1984'te VanderHart ve Atalla, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile çeşitli selüloz numunelerini araştırdı ve tüm doğal selülozun hem I_{α} , hem de I_{β} formlarının bir kompleks olduğunu ve I_{α} 'nın içeriğinin BS'da yaklaşık % 65 olduğunu bulmuştur (VanderHart ve Atalla, 1984). I_{α} -selüloz içeriğinin azalmasının BS'da daha küçük mikrofiberlere yol açtığını gösterilmiştir (Hirai ve ark., 2009). Genel olarak, düzlemleri ile elyaf yüzeyine paralel tek yönlü bir doku ve çekme yönünde eksensel bir bileşen bulunmuştur. Islak numunelere kıyasla, numunelerin ağırlıkça % 8-10 arasında değişen konsantrasyonlarda NaOH çözeltilerine batırılmasıyla daha yüksek bir BS deformasyonu elde edilebilir. Geliştirilmiş oryantasyon, hidrojen bağlarının oluşturduğu fibriller arası köprüleme noktalarının sayısındaki NaOH kaynaklı bir azalmadan kaynaklanmaktadır (Bohn ve ark., 2000).

BS, amorf yapısı nedeniyle ağırlıkça % 99 su içeren bir jeldir. Ne yazık ki, farklı BS numunelerinin su tutma kapasitelerini karşılaştırmak zordur çünkü farklı yöntemler kullanılmıştır. Vakum altında kurutmanın (10 mm H₂O veya 98 Pa) ıslak ağırlığını belirlemeden önce numuneyi stabilize etmek için tercih edilmiştir. Bu basit yöntem, ölçümlerdeki standart sapmayı diğer yöntemlere kıyasla % 50 veya daha fazla azaltmıştır (Schrecker ve Gostomski, 2005). Dielektrik spektroskopisine ve elektron mikroskopuna göre, su moleküllerinin çoğu BS'a sıkıca bağlanırken, BS jellerinde bulunan ağırlıkça % 99 sudan sadece % 10'u serbest su gibi davranır (Gelin ve ark., 2007).

BS jel membranlarının absorpsiyon özellikleri polivinilpirolidon veya gümüş nanopartiküller içeren komplekse dahil edildiğinde BS'un kristal yapısı değişmemektedir. Damıtılmış su ile yıkanarak polivinilpirolidon, selüloz yapısında ve adsorbe edilmiş gümüş miktarında herhangi bir değişikliğe neden olmadan BS ve polivinilpirolidon kompozit jel filmlerinden kolayca çıkarılmıştır (Baklagina ve ark., 2005).

Son çalışmalar, atomik kuvvet mikroskopunun, lif merkezinin bilinen bir kuvvetle saptırıldığı bir nano ölçekli üç noktalı bükülme testi yaparak askıya alınan liflerin elastik modülünü ölçmek için kullanılabilirliğini göstermiştir. Uygulanan suşa göre yer değiştirmenin hesaplanmasıyla, tek bir BS fibrilinin sertliğinin tahmin edilebileceği gösterilmiştir. Bu kavramı göstermek için 78 ± 17 Gpa değerinde 35 ila

90 nm arasında değişen BS liflerinin Young modülünü ölçmüşlerdir. Bu değer, ayrı ayrı selüloz liflerinin mekanik mukavemetinden elde edilen tahminlerden önemli ölçüde daha yüksektir.

Çizelge 2. 2. Bakteriyel ve bitki bazlı selüloz özelliklerinin karşılaştırılması (Jing ve ark., 2019)

Özellikler	Bakteriyel selüloz	Bitki selülozu	Referanslar
Çekme mukavemeti (MPa)	20-300	25-200	Feng ve ark., 2015; Gibson, 2012
Young modülü (MPa)	Katman:20,000 Tek lif:130,000	2.5 – 0.170	Lynd ve ark., 2002; Nishi ve ark., 1990
Su tutma kapasitesi (%)	>95	>25-35	Rebelo ve ark., 2018; İslam ve ark., 2012; Boulos ve ark., 2000; Goto ve Yokoe, 1996
Liflerin boyutu (nm)	20-100	µm ölçeği	Monika ve ark., 2011; Genet ve ark., 2005
Kristallik (%)	74-96	40-85	Park ve ark., 2010
Bağıl hidrofilitiklik	40-50	20-30	Bishop, 2007
Saflık (%)	>99	<80	Klemm ve ark., 2005
Polimerizasyon derecesi	14000-16000	300-10000	Tahara ve ark., 1997
Gözeneklilik (%)	>85	<75	Elham ve Amir, 2013
Toplam yüzey alanı (m ² / g)	>150	<10	İslam ve ark., 2012; Alexander ve ark., 2002)

Young modülü, daha önce yayınlanmış verilere dayanarak ve tek bir fibrilin modülünü geri hesaplamak için Krenchel analizi kullanılarak bir Raman bandı kayması için bir kalibrasyon eğrisinden tahmin edilmiştir. Elde edilen değer (114 GPa) daha önce bildirilenlerden daha yüksektir, ancak kristalin selüloz-I (130-145 GPa) modülünden gelen tahminlerden daha düşüktür (Hsieh ve ark., 2008).

Fermentasyon süresi, hem bakteri sayısı hem de selüloz verimi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir, ancak mekanik özellikler üzerinde sadece küçük etkiler de vardır, bu da fermentasyon tekniğinin öngörülebilir özelliklere sahip selüloz üretimi için sağlam bir yöntem olduğunu göstermiştir. Fermentasyon süresindeki bir artışın mekanik mukavemette bir azalmaya yol açabileceğini gösterir ve Young modülünün önce 96 saat boyunca artması ve sonra azalması NaOH ile yapılan muamelenin mekanik özellikler üzerinde minimal etkileri olmuştur.

Tek eksenli gerilmedeki başarısızlık bölgesinin büyük ölçekli lif hizalaması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, bu mekanik özelliklerin önemli bir belirleyicisidir. Beklendiği gibi, tek eksenli gerilim altında elastik modülü ve başarısızlık stresi, çift eksenli gerilim altında elde edilen değerlerden daha düşüktür. Çünkü çift eksenli gerilim altında bir fiber hizalama mekanizması mevcut değildir.

Bakteriyel selüloz, viskoelastik bir malzeme gibi davranır, tek eksenli gerilim altında yaklaşık % 20 suşta ve 1,5 MPa stresinde kırılma başarısızlığına ulaşılır (McKenna ve ark., 2009). Sıkıştırma basıncının BS filmlerinin nihai mekanik özelliklerini kontrol eden önemli bir parametre olduğu bulunmuştur. Kalıplama basıncı hafifçe artırılmış gerilme mukavemeti ve deformasyon elde edilirken, modül artan film gözenekliliği ile neredeyse doğrusal olarak azalmıştır. Bu davranış, interfibriller boşluğu azaltan ve böylece interfibriller bağlanma olasılığını arttıran kalıp sıkıştırma basıncı altında daha yüksek yoğunlaşma ile ilişkilidir (Retegi ve ark., 2010).

Parçalanmış BS'un fibril genişliğini ve uzunluğunu değerlendirmek için reolojik analiz geliştirilmiştir. Parçalanma işleminin erken safhasında, BS parçacıkları gevşek elyafli agregalar oluşturur, ardından kısa elyaflar üreten parçalanmış fibriller kesilir. Öte yandan, parçalanma süreci boyunca fibril genişliği sürekli olarak azalmıştır. Fibril yapısı ile süspansiyon özellikleri arasındaki ilişkiler analiz edilmiştir.

Parçalanmış bakteriyel selüloz fibrilleri ne kadar ince ve uzun olursa, viskozite ve su tutma kapasitesi de o kadar yüksek olmuştur (Ougiya ve ark., 1998).

2.4 BS Üretimi Yapan Mikroorganizmalar ve Kombucha Mantarı

Bakteriyel selüloz, bazı bakteriler (*Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Sarcina*), küfler (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) ve algler (*Vallonia*) tarafından üretilmektedir. Fakat en fazla bilinen tür *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) türüdür (Klemm ve ark., 2001). Ayrıca bazı fototrofik siyanobakterler türleride selüloz üretmektedir (Sutherland, 2001; Branda ve ark., 2005). Aynı zamanda içerisinde kükürt bulunan sıcak su kaynaklarında karbonhidrat yapısında selüloz bulunmasıyla, bazı litotrofik bakterilerinde selüloz ürettiği düşünülmektedir (Ogawa ve Maki, 2003).

Tarihsel veriler, BS'un, hindistan cevizi kreması olarak bilinen, Filipinler'de geleneksel bir gıda üretiminde uzun süredir kullanıldığını göstermektedir (Lapuz ve ark., 1967). Halen, BS dünyanın çeşitli yerlerinde yiyecek olarak yaygın şekilde kullanılmaya devam etse de, diğer yandan benzersiz özellikleri ve farklı uygulama olanakları nedeniyle akademik ve sanayide artan ilgiye sahiptir. *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen BS, ilk olarak 1886'da, karbon kaynağı olarak glukoz kullanılarak, oksijen varlığında üretilen Brown tarafından rapor edilmiştir (Brown, 1886).

Yamada ve arkadaşları (1997) tarafından önerildiği ve ardından Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Dergisi tarafından onaylandığı gibi, *Acetobacter xylinum*, 16S ribozomal RNA'nın kısmi dizilerinin analizine dayanan filojeni özellikleri nedeniyle yeniden sınıflandırıldı ve bilimsel olarak *Gluconacetobacter xylinus* olarak kataloglandırıldı (Yamada ve ark., 1997).

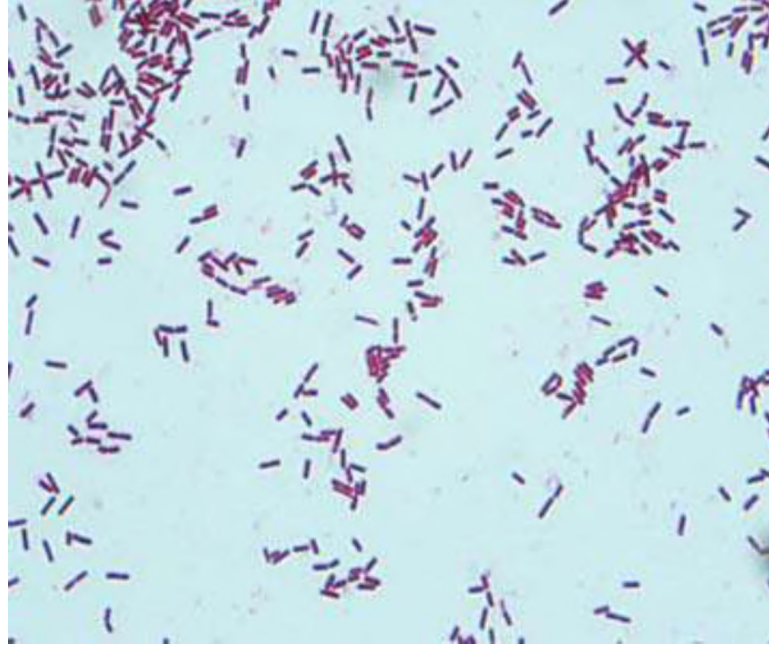
Acetobacteriaceae familyasına ait bu bakteri türleri, morfolojik olarak basil yapısındadır. Gram negatif, zorunlu aerobik, mannitol agarda parıldayan ve pürüzsüz olan küçük koloni zinciri oluşum kümelerinde tek tek düzenlenmiş olup patojenik değildir. Bu familyaya ait bakteriler, mannitol, glukoz, sakaroz, fruktoz, galaktoz, inositol, gliserol, (Sheyknazari ve ark., 2011; Ruka ve ark., 2012) gibi çeşitli karbon

kaynaklarını ve etanol (Yamada ve ark., 1997) gibi alkolleri tamamen okside edebilir ve hücre dışı olarak üretebilirler. 25- 30° C ve pH 3- 7 arasındaki sıcaklıklarda kağıt hamuru üretebilirler.

Çizelge 2. 3. Selüloz üreten mikroorganizmaların üretim koşulları ve miktarları (Erminda ve ark., 2015)

Bakteri Suşu	Fermentasyon Şekli	Karbon Kaynağı	BS (g/L)	Verim (g/L/d)
<i>Acetobacter aceti subsp. xylinus</i> ATCC 23770	Statik fermentasyon	Konjak tozu	2,1	0,26
<i>A.xylinum</i> NBRC 13693	Statik fermentasyon	Meyve suyu	5,9	0,42
<i>A.xylinum</i> BPR 2001 (ATCC 700178)	Çalkalamalı kültür (135rpm)	Akçaağaç şurubu	1,5	0,07
<i>Guconacetobacter xylinus</i> BCRC 12334	Statik fermentasyon	Pirinç şarabı	10,4	1,48
<i>G.xylinus</i> ATCC 23770	Statik fermentasyon	Buğday samanı hidrolizatları	8,3	1,18
<i>G.xylinus</i> ATCC 23770	Statik fermentasyon	Ladin hidrolizatları	8,2	0,59
<i>G.xylinus</i> NRRL B-42	Statik fermentasyon	Biyodizel üretim sürecinden olan gliserol	10	0,71
<i>G.xylinus</i> NRRL B-42	Statik fermentasyon	Şarap yapımından elde edilen üzüm küspesi	8	0,57
<i>G.xylinum</i> CGMCC 2955	Statik fermentasyon	Şekerlenmiş hünnap işleme endüstrisinin atık suları	2,2	0,37
<i>G.xylinus</i> CH001	Statik fermentasyon	Aseton- bütanol- etanol atık su fermentasyonunda	1,3	0,19
<i>A.xylinum</i> KJ1	30L statik kültür fermentörü	Şekerlenmiş yemek suları	18	3,6
<i>A.xylinum</i> KJ1	10L çalkalamalı kültür fermentörü	Şekerlenmiş yemek suları	16,8	3,36

Bakteriyel selüloz, hidrojen bağları üzerinden paralel olarak düzenlemeler sağlayabilir ve üç boyutlu bir ağ oluşturabilir. Membranın morfolojisi doğrudan ortama ve BS'un ekimi için kullanılan falkonun büyüklüğüne göre kolayca manipüle edilebilen kalın bir film oluşturduğu kültür ortamı ve havasına bağlıdır (Donini ve ark., 2010; Ruka ve ark., 2012).



Resim 1. 2. Acetobacter aceti gram boyama (Kowser ve ark., 2015)

Araştırmacılar, potansiyel endüstriyel uygulama ile biyopolimerleri üretebilecek yeni bakteri suşları aramaktadırlar (Ashtaputre ve ark., 1995). Pek çok organizma selüloz üretme kabiliyetine sahip olmasına rağmen, *Gluconacetobacter xylinus* bakterileri, endüstriyel ölçekte selüloz üretebildiği bilinen türlerdendir (Klemm ve ark., 2005).

Ek olarak, diğer *G. xylinus*, türlerinin selüloz üretebilecekleri kabul edilir, ayrıca *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* (Zogaj ve ark., 2001) ve *Pseudomonas spp.* (Sutherland, 2001; Souza ve Garcia-Cruz, 2004) gibi bazı türlerin selüloz sentezi genleri (MCsA, MCsB, MCsZ ve MCsC), *G. xylinus*'takilere benzerdir (Solano ve ark., 2002). Her ne kadar bu türler bakteri selülozu üretebilse de, çoğunun potansiyel olarak patojenik olması, bu biyopolimerlerin ticari kullanımını sınırlandırmaktadır (Sutherland, 2001; Souza ve Garcia-Cruz, 2004).

Çizelge 2. 4. Farklı yapılar ve biyolojik rollerle BS üretimi için bakteri kaynakları
(Brown, 1886; Jonas ve Farah, 1998)

	BİYOLOJİK ROL
<u>Fibril yapısı</u>	
Aerobacter	Atık suda flokülasyon
Agrobacterium	Bitkilere bağlanma
Alcaligenes	Atık suda flokülasyon
A. hansenii	Fermantasyonu aerobik biyoreaktörlerde
Rhizobium	Bitkilere bağlanma
<u>Serit yapısı</u>	
Acetobacter	Aerobik ortamın bakımı
Achromobacter	Atık suda flokülasyon
<u>3D ağ nanofiber</u>	
Gluconacetobacter	Aerobik ortam
<u>Amorf / tanımlanmamış yapılar</u>	
Pseudomonas	Atık suda flokülasyon
Sarcina	Bilinmiyor
Zoogloea	Bilinmiyor

Kombucha veya çay mantarı, kökenlerinin Çin’de olduğuna inanılan fermente bir içecek olup son zamanlarda dünyanın geri kalanı arasında hızla popülerlik kazanmıştır (Jayabalan ve ark., 2014). Bir bakteri (*G. xylinus*, *A. xylinoides* ve *Bacterium gluconicum*) kokültürünün şekerle desteklenmiş bir çay suyunun fermentasyonu ile hazırlanan fermente bir içecektir (Dufresne ve Farnworth, 2000). İçecek, şekerli siyah çayda kültürlenmiş kalın jöle benzeri bir zarda bakteri ve ozmofilik maya suşlarının simbiyotik biçimde büyütülmesiyle üretilir (Jayabalan ve ark., 2010). “Kombucha” terimi, içecek için ticari olarak en çok kullanılan isim olsa da, Chainii grib, Ling zhi, Kocha kinoko ve kırmızı çay mantarı gibi diğer isimlerle de bilinmektedir (Malbasa ve ark., 2011). İçeceğin üretimi için substrat, genellikle 20-28°C’ de minimum 7 gün olmak üzere aerobik koşullar statik olarak çay mantar

matı ile birlikte inkübe edilir (Jayabalan ve ark., 2007). İçeceğin üretiminde yer alan ve mikroorganizmaların izlediği çeşitli metabolik yollara bağlı olarak yan ürünlerden elde edilen çeşitli fermentasyon işlemleri bulunmaktadır. Kombucha fermentasyonu, bu tür üç yolun bir kombinasyonudur: Alkol, laktik ve asetik asit üretimi. Bu yollar esas olarak, fermentasyonun ozmotolerant mikroorganizmalar tarafından başlatıldığı ve nihayetinde aide toleranslı türlerin hakim olduğu ortamda bir arada bulunan birkaç maya ve bakterinin varlığı nedeniyle gerçekleşir (Villareal-Soto ve ark., 2018).

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda Kombucha'nın kültürü içinde *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*/ *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Brettanomyces*/ *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ve *Kluyveromyces* gibi birçok maya türü bulunmaktadır (Chakravorty ve ark., 2016; Coton ve ark., 2017; Marsh ve ark., 2014a,b). Kombucha çay kültürü bakterileri aerobik olan ve bu nedenle asetik asit oluşturmak için substrat olarak alkolü kullanabilen asetik sit bakterileridir (Villarreal-Soto ve ark., 2018). Ancak, mayanın aksine, bu bakteriler büyümeleri ve aktiviteleri için büyük miktarlarda oksijene ihtiyaç duyarlar (Villarreal-Soto ve ark., 2018). Çay, mantar içerisinde bulunan bakteri ve maya kültürleri için gerekli azot kaynaklarını sağlamaktadır (Sreeramulu ve ark., 2000).

Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında sıklıkla rapor edilen bakteri cinsinin *Gluconacetobacter* ya da *Komagataeibacter* olduğu görülmektedir. (Yamada ve ark., 2012). Bu cinslere ait birkaç bakteri türlerinin de selüloz üretebildiği bilinmektedir. Özellikle *Gluconacetobacter xylinus* selüloz üretimindeki verimi göz önüne alındığında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2018).

Selüloz üretimi için daha önce karakterize edilen hemen hemen tüm *G. xylinus* suşları taze meyve kaynaklarından izole edilmiştir ve kombuchadan izolatlar kapsamlı bir şekilde karakterize edilmemiştir. Meyvelerden elde edilen suşların, kombucha suşlarında olduğu gibi, statik koşullar altında uzun vadeli alt kültürde kullanılma olasılığı düşüktür. Fakat çaydaki bu tür uzun süreli kültürün, diğer kaynaklarla karşılaşılanlardan farklı selüloz üretme özelliklerine sahip bir tür ürettiği olduğu gözlemlenmiştir (Nyugen ve ark., 2008).

2.5 BS Biyosentezi ve Mekanizması

Birçok mikroorganizma türü selüloz üretme yeteneğine sahip olmasına rağmen, *G. xylinus* biyopolimerler için bir model organizma olarak kabul edilmektedir (Chavez ve ark., 2004). BS biyosentezi ilk olarak β -1,4-glukan zincirindeki glikoz kalıntılarının polimerizasyonu, bunun ardından glukan zincirlerinin doğrusal köprülerine son veren zincirlerin hücre dışı salgılanmasını ve glukan zincirlerinin hidrojen köprülerinden kristalleşmesini içeren karmaşık bir işlemde oluşur (Chavez ve ark., 2004; Ross ve ark., 1991; Saxena ve ark., 1994). Van der Waals bağları, şeritler halinde hiyerarşik olarak düzenlenmiştir ve bu da mikrofiber olarak adlandırılan sert bir üç boyutlu yapının oluşmasına neden olur (Ross ve ark., 1991).

Bu bakteri türleri tarafından üretilen BS, tek yönlü polarite ve değişken kalınlıktaki özellikleri bulunmaktadır. Mikrofiberlerin *G. xylinum* içindeki kristalizasyon mekanizması iki selüloz formuna yol açabilir; yönlendirilmiş mikrofiberler paralel düzen ile selüloz-I sentezlerken, antiparalel mikrofiberler ise selüloz-II sentezler (Chavez ve ark., 2004).

G. xylinus'ta BS sentezi sırasıyla, oksidasyon fonksiyonu karbonhidratları ve organik asitlerin oksidasyonunu gerçekleştiren pentozlara ve Krebs döngüsüne bağlıdır (Donini ve ark., 2010; Chavez ve ark., 2004; Ross ve ark., 1991). Bir özellik *G. xylinus*, glikolizi önleyen fruktoz-6-fosfat, fruktoz-1,6-bisfosfatın fosforilasyon reaksiyonunu katalizlemekten sorumlu olan bir enzim olan fosfofruktokinaz-1 eksikliğinden dolayı glikozu anaerobik olarak metabolize edememesidir. Bu nedenle, *G. xylinus* tarafından BS sentezi, doğrudan eksojen heksozun fosforilasyonu veya dolaylı olarak pentoz fosfat yolu ve glukoneogenez ile üretilen bir metabolik havuz heksoz fosfatının sonucudur. Selülozun heksoz fosfat dönüşümü doğrudandır ve ara bölüm karbon iskeletine bağlı değildir (Donini ve ark., 2010; Ross ve ark., 1991).

Dış ortamdan sitoplazmaya taşınan glikozun dönüşümü, glikoz-6-fosfat, fosfoglukomutaz veren enzim olan glukokinaz ile dört bakteriyel enzim tarafından katalize edilir. UDP-glikoz (UDPG) ve selüloz sentazın (SS) sentezinden sorumlu olan glikoz-6-fosfatın glikoz-1-fosfata, UDPG pirofosforilaza (ayrıca glikoz-1-fosfat uridililtransferaz olarak da bilinir) reaksiyon izomerizasyonunu katalize eder, UDPG

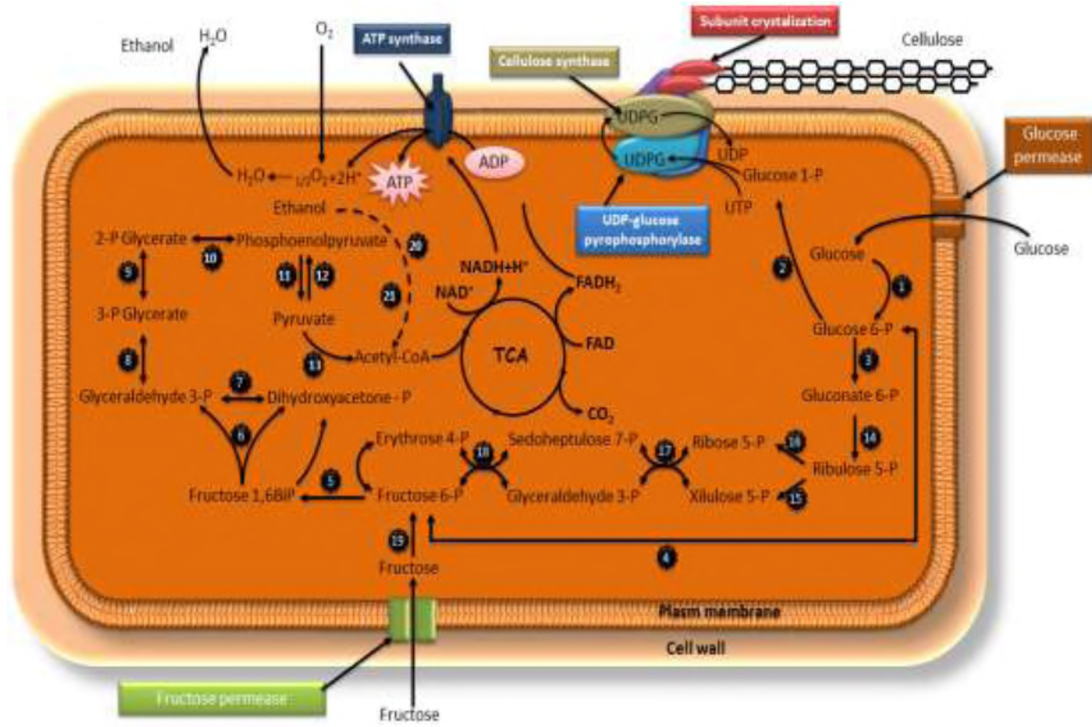
selülozun polimerizasyonundan sorumludur. Daha önce belirtildiği gibi, selüloz sentezi, glukoneogenez için endojen kaynaklardan da meydana gelebilir.

G. xylinus'ta, endojen kaynaklardan sentez, oksaloasetat ile piruvat enzimi piruvat karboksilazın etkisiyle pirüvata başlar. Piruvatın fosfoenolpiruvat içindeki dönüşümü, fosfoenolpiruvat karboksikinaz enziminin etkisiyle üretilir (Donini ve ark., 2010; Ross ve ark., 1991; Krystynowicz ve ark., 2005). SS sentezi reaksiyonu, bakteriyel metabolizmada üretilen ATP'nin yaklaşık %10'unu tüketir. Böylece, BS'un sentezi için kullanılan enerji aerobik metabolizmadan gelir. SS tarafından kullanılan alt tabaka için farklı seçenekler vardır. (Donini ve ark., 2010; Chavez ve ark., 2004). Terminal kompleksi (TK) olarak adlandırılan selüloz sentezinin enzimatik kompleksi (Brown,1985; Okuda,2002), *Gluconacetobacter spp.* içinde selüloz sentaz kompleksine karşılık gelen bir tür membran protein türü oluşturur (Sunagawa ve ark., 2012).

Önerilen bir hipotez, UDP-glikozun plazma zarının lipitlerine bağlanmasıdır (Donini ve ark., 2010; Chavez ve ark., 2004). Bir diğeri ise, çözünür prekürsörün SS ile doğrudan etkileşime girdiğini düşünmektedir (Brown ve Saxena, 200). SS, BS'ler olarak adlandırılan bir operon kromozomunda bulunan üç (AxCcSAB, AxCcSC ve AxCcSD) veya dört (AxCcSA, AxCcSB, AxCcSC ve AxCcSD) protein alt biriminden oluşan bir protein kompleksidir.

Korunmuş olan iki Asp tortusu (D), katalitik tortular için sıklıkla gözlenen bir pozisyon olan tahmin edilen ipliklerin karboksil-terminal (C-terminal) uçlarındaki ilmeklerde bulunur (Chavez ve ark., 2004; Römling, 2002). Alan B'deki hidrofobik kümelerin ikincil yapı açısından yorumlanması daha zordur. AxCcSA ve AxCcSAB, glukotransferazlarda korunmuş dizi motifi Gln (Q) Arg-Trp (R-W) ile birlikte tanımlanan kataliz için muhtemelen önemli olan alan, tek bir korunmuş Asp (D-D-D) tortusundan oluşan bir motife sahiptir (Donini ve ark., 2010; Kawano ve ark., 2005). SS'nin fonksiyonel bir analizi yoluyla, 83 kDa ile bu kompleksin A alt biriminin katalitik aktivite gösterdiği görülmektedir. 90 kDa'nın B alt birimi, pozitif bir allosterik regülatör, siklik diguanosin monofosfat (c-di GMP) ile birleşerek selüloz sentezi hızını artırır. C alt birimi (138 kDa) ve D (17 kDa) yapısal aktiviteye sahip görülmektedir. D alt birim üretimini kodlayan genin mutant suşlarının hala selüloz-II

üretebildiği için, selüloz D alt biriminin gözenek oluşumu ve ekstrüzyonuyla ilişkili C alt biriminin işlemin yeniden kristalleşmesi ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır (Saxena ve ark., 1994).



Şekil 1.3. *G. xylinus* tarafından selülozun biyosentezine yönelik yolun varsayımsal modeli (Wilton ve ark., 2002)

G. xylinus Bis-(3'-5') - siklik dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP), bakterilerde ikinci bir küresel haberci olarak kabul edilen bir selüloz biyosentez aktivatörü olarak tanımlanmıştır (Ross ve ark., 1987). Hücredeki serbest c-di-GMP'nin selüloz sentaz BcsA'yı allosterik olarak aktive ettiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, hücresel c-di-GMP'nin % 90'ı, selüloz sentaz ile yapısal olarak ilişkili bir zar proteini olan c-di-GMP bağlayıcı protein BcsB ile geri dönüşümlü olarak bağlanır (Kimura ve ark., 2001; Mayer ve ark., 1991). BcsB'den salınan c-di-GMP'nin selüloz sentazına yönlendirilmesi için uzaysal yakınlığın gerekli olduğuna inanılmaktadır. Bağlı ve serbest c-di-GMP arasındaki denge, hücre içi potasyum konsantrasyonu ile modüle edilir (Weinhouse ve ark., 1997). Serbest c-di-GMP seviyesi, iki PPI molekülünün salınımı altında iki GTP molekülünü ve c-di-GMP'yi parçalayan fosfodiesteraz A'nın (PDEA) döngüsünü veren iki enzimin, diguanilat siklazın (DGC) karşıt etkisi

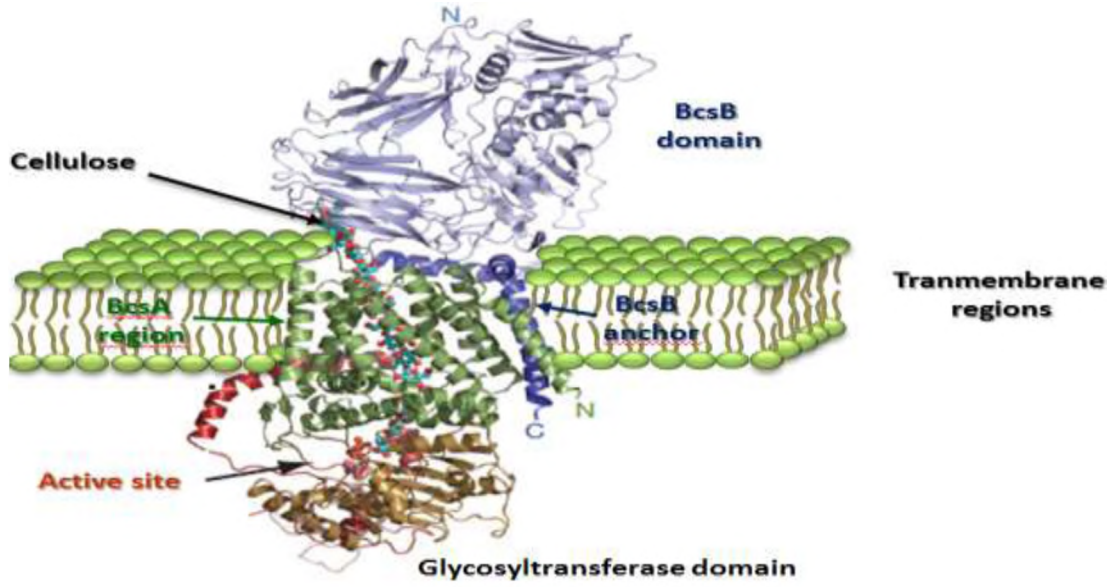
ile düzenlenir. İki PPI molekülü ve c-di-GMP'yi aktif olmayan 5'-pGpG'ye indirgeyen fosfodiesteraz A (PDEA) altında aktif olmayan GTP'ye bağlanır. *G. xylinus*, her biri PDEA / DGC çifti içeren üç farklı operona sahiptir, bu da c-di-GMP döngüsüne farklı seviyelerde katkıda bulunur (Tal ve ark., 1998; Fujiwara ve ark., 2013). Şekil 1.3.'te, *G. xylinus* tarafından selülozun biyosentezi için metabolik yolun bir modelini temsil etmektedir.

2.5.1 Bakteriyel Selüloz Sentezi

Genomda iki bakteriyel selüloz sentaz operonu (bcs) tanımlanmıştır, ancak sadece bir tanesi (bcsI) yapısal olarak tamamlanmıştır (Saxena ve ark., 1994). Bu operon, endo-1,4-beta-glukanaz enzimlerini kodlayan yedi genden oluşur, bir homolog CMCax, varsayılan bir beta glukosidaz endoglukanazdır. CPC, varsayılan alt dört birim SS'dir: BCSA, BBRC, BCSC ve BCSD ve beta-glukozidaz. Üç endoglukaz tanımlanmış olmasına rağmen BS biyosentezindeki kesin işlevi tam olarak anlayamamıştır (Koo ve ark., 1998). Genomik Analiz, bcsD geninin operonun bir parçası olarak korunduğunu ve altı suşun hepsinde tam olarak aynı uzunluğa sahip olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, bu gen, kristal yapıları yakın zamanda çözülmüş olmasına rağmen, fonksiyonu hala spekülasyon olan SS alt birimi D'yi kodlamaktadır.

Aktif olarak selüloz üreten hücrelerde, yaklaşık 50 selüloz sentezleyen çoklu enzim kompleksi, bakteriyel liflerin uzunlamasına eksen boyunca tek bir sıra halinde düzenlenir. Bu doğrusal terminal kompleks, dış zarda 35 Å gözenek olarak veya dış yapı kırıldığında çukurlar olarak dondurma kırığı kullanılarak elektron mikroskopisi ile görüntülenebilir (Donini ve ark., 2010; Mayer ve ark., 1991).

G. xylinus türünde selüloz sentaz kompleksi (BCS), sitoplazmik ve dış zar üzerinde bir zar kompleksi kodlayan en az üç gen, bcsA, bcsB ve bcsC içeren bir operonda kodlanan çok bileşenli bir protein kompleksidir (BcsA) ve c-di-GMP bağlayıcı proteinin (BcsB), Şekil 1.4.'te gösterildiği gibi sitoplazmik zarda lokalize olduğu düşünülmektedir. (Kimura ve ark., 2001; Mayer ve ark., 1991; Römling, 2002).



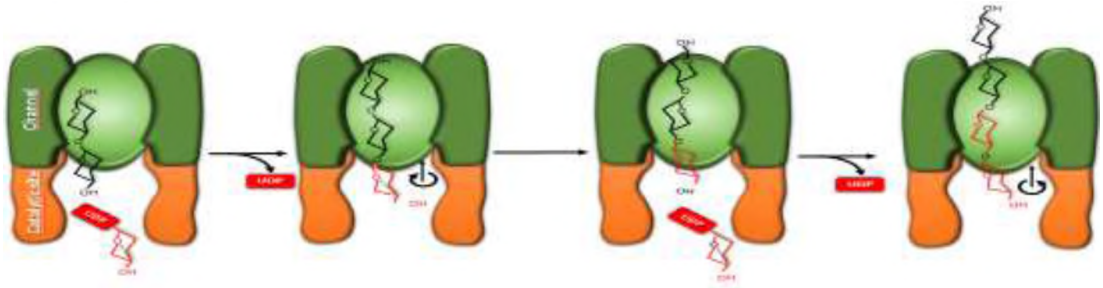
Şekil 1. 4. Selüloz sentazın şematik gösterimi (Wilton ve ark., 2015)

Selüloz sentezine ve iç bakteri membranı boyunca taşınmasına, membrana entegre katalitik BcsA alt biriminin (yeşil) ve membrana sabitlenmiş, periplazmik BcsB alanının (mavi) ve membrana bağlı bölgelerin BcsB transmembran çapasının (mavi) bir kompleksi aracılık eder. Glikosiltransferaz domaininin kahverengi olduğu gösterilmiştir (Morgan ve ark., 2013). BcsC'nin, dış zarda kompleks oluşturduğu ve bunun öncesinde muhtemelen kompleks montajda rol oynayan tetratrikopeptid tekrarlarını içeren büyük bir periplazmik alan oluşturduğu tahmin edilmektedir (Keiski ve ark., 2010; Omadjela ve ark., 2013).

Selüloz sentaz BcsA'ya karşılık gelen gen, türler arasındaki operon BS'ların en korunmuş geni olan 723-880 arasında amino asit kalıntısı sunan uzun bir dizi tarafından oluşturulur. Amino terminal (N- terminal) ve karboksil terminal bölümleri (C-terminal) çok korunmaz, çünkü homoloji A ve B alanlarını kapsayan sık analiz edilen D, D35Q (R, Q) ve RW motifi ile sınırlı değildir (Römling, 2002). C-di-GMP (Mayer ve ark., 1991) ile dolaylı etkileşim ile ilişkili BcsB proteini, türler arasında daha az korunmaktadır. Bununla birlikte, BcsB proteinlerinin *A. tumefaciens* ve *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, birkaç değişmez kalıntıya sahip proteinlerin tüm uzunluğu boyunca önemli homoloji (~% 40 benzerlik) göstermektedir. Bir alanin/prolin bakımından zengin alan, *A. aeolicus* hariç tüm proteinlerin N-terminal

bölgesinde bulunur. C-terminal uç kısımlarında bulunan bir zar ötesi domain, tüm BcsB proteinleri için çeşitli algoritmalar ile tahmin edilmiştir (Römling, 2002).

Önerilen model, glikozil terminal kalıntısının aktarılmasından ve ilavesinden sonra, glikoz molekülünün Şekil 1.5.'de gösterildiği gibi kanalı hizalamak için asetil glukozun bağlanması etrafında döndüğünü düşünülür. Allosterik etkileşimlerin dönme yönüne rehberlik ettiğine ve komşu birimin hidroksil gruplarının oksijen atomları arasındaki β -1,4 glukoz ile komşu birimin hidroksil gruplarının oksijen atomları arasında moleküller arası hidrojen bağına bağlanan 180° dönme özelliğine neden olduğuna inanılmaktadır (Morgan ve ark., 2013; Nishiyama ve ark., 2002).



Şekil 1.5. Selüloz sentezi ve translokasyonu için önerilen model (Wilton ve ark., 2015)

Bu polimerin kanala hareket etmesine izin vermek için yeterli olabilir. Alternatif olarak, uzatılmış glukozun translokasyonu için UDP-glikozu UDP ile değiştirme gerekir. Kanalı geçtikten sonra, BcsA-büküm BcsB arayüzündeki uyarılmış glukoz zinciri, CBD'lerin BcsB'si ile etkileşme (periplazmik karbonhidrat bağlama alanları) veya diğer glukozlarla agregasyon ayrıca polimerin tek yönlü hareketine katkıda bulunabilir (Morgan ve ark., 2013).

2.6 BS Üretimine Etki Eden Faktörler

Bakteriyel selülozun önemli üretim parametreleri vardır. Bu parametreler selülozun hem daha kaliteli hem de daha kısa sürede fazla verim alınması amacıyla uygulanmaktadır. Çeşitli fermentasyon yöntemleri, karbon ve azot kaynakları, pH, sıcaklık, oksijen ve karbondioksit basıncı önemli etkenlerdir (Shoda ve Sugano, 2005).

2.6.1 Fermentasyon Yöntemleri

BS hazırlığı için mevcut yöntemler arasında statik, çalkalamalı ve biyoreaktör sistemleri bulunmaktadır. Elde edilen bakteriyel selülozun makroskopik morfolojisi, mikro yapısı ve özellikleri oldukça farklıdır. Statik kültür yöntemi, besiyeri çözeltilisinin yüzeyinde jelatinimsi bir selüloz membranının birikmesiyle sonuçlanır (Rani ve Appaiah, 2011), ajite / çalkalama kültüründe yıldız biçiminde, küre benzeri, topak benzeri veya düzensiz sonuçlara neden olur. (Watanabe, Tabuchi, Morinaga ve Yoshinaga, 1998). Uygun yöntemin seçimi, BS'un nihai uygulamalarına ve ayrıca gereken fiziksel, morfolojik ve mekanik özelliklerine bağlıdır.

Statik kültür yöntemi, BS üretimi için geleneksel bir yaklaşımdır ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, uygun geniş kaplara taze ve steril besin çözeltisi doldurulur ve 1-14 gün boyunca uygun sıcaklık ve pH'da, yani 28-30°C ve 4 < pH < 7'de inkübe edilir. Statik kültür yöntemiyle üretilen BS yapı ve özellikleri bakımından mükemmel bir hidrojel tabakası olarak bulunmaktadır. Statik kültürde, BS membranının kalınlığı kültür süresindeki artışla artmaktadır. BS membranı besin çözeltilisinin yüzeyinde olduğundan, BS üretimi doğrudan hava-sıvı arayüzünün yüzey alanı ile ilgilidir. Selülozun alt fibrilleri, *A. xylinum*'un yüzeyindeki mikrofibrillere kristalize edilen doğrusal olarak sıralanmış gözeneklerden sürekli olarak üretilir. Bu nedenle, *A. xylinum* popülasyonunu destekleyen BS membranıyla, örtüşen ve iç içe geçmiş selüloz şeritleri içermekte olup, paralel fakat düzensiz düzlemler oluştururlar (Krystynowicz ve diğerleri, 2002). Daha sonra selüloz, ortamın yüzeyi üzerinde kalın bir zar haline gelir. Statik kültür yöntemi, düşük kesme kuvveti ortamına sahip nispeten basit bir tekniktir; bu nedenle laboratuvar ölçeğinde BS oluşumu için en sık kullanılan tekniktir.

Yüksek maliyet ve düşük üretim hızı, statik kültür sistemlerindeki en önemli iki temel sorundur. Bu sorunları çözmek için ajite / çalkalamalı bir kültür kullanılması önerilmiştir. Oksijen verilmesi doğrudan BS üretimi ile ilişkilidir ve statik kültür yönteminin büyük bir dezavantajı olarak bilinir. Bununla birlikte, aşırı oksijen verilmesi BS oluşumunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ajite / çalkalamalı kültürün tasarımının arkasındaki temel fikir, kültür sırasında bakterilere oksijen verilmesini arttırmaktır. Kültür ortamına oksijen verme oranının artırılmasına rağmen,

hem çalkalamalı hem de statik kültür ortamında, eşit bir süre boyunca aynı miktarda BS üretilmesine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bazı çalışmalar ajitasyon / çalkalama kültürü yöntemi ile statik kültür yöntemine göre daha az miktarda BS üretildiğini bildirmiştir (Czaja Romanovicz ve Brown, 2004; Inagaki ve Phillips, 1989; Toyosaki ve diğerleri, 1995).

Besi ortamına katkıda bulunan faktörler selüloz olmayan bir mutantın ortaya çıkmasına ve ajitasyon koşulları altında bakterilerin BS üretkenliğini azaltabilecek genetik dengesizliğe uğradıkları görülmüştür (Chawla, Bajaj, Survase ve Singhal, 2009; Yang ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar, ajitasyon / çalkalama kültürü yönteminin BS verimini arttırmak için tüm bakteri suşları için uygun olmadığını ortaya koymasına rağmen, bakterilerin 10 µm ila 10 mm çapında ve küresel olmak üzere çeşitli şekillerde BS üretmesine izin vermiştir. 1-9 mm ebadında, 3-5 mm ebadında elipsoidal, yıldız şeklinde, lifli süspansiyonlar, peletler veya düzensiz kütleler görülmüştür. BS'un boyutu ve şekli, kültür ortamındaki dönme hızı, kültür süresi ve katkı tipleri ile ilişkilidir (Watanabe vd., 1998). Dönme ile çalkalanan kültür sırasında sürekli kesme kuvveti, küresel bir yapı oluşturan ilk etkidir. Kültür süresi, küresel BS'ların büyüklüğünü ve miktarını etkileyen başka bir faktördür. Üretilen BS'lar süre uzadıkça büyür. Bununla birlikte, 60 saat sonra çeşitli araştırmacılar tarafından başka bir boyut değişikliği gözlemlenmemiştir (Czaja ve ark., 2004; Hu ve Catchmark, 2010a; Hu, Catchmark ve Vogler, 2013).

Bakteri konsantrasyonunun, küre benzeri BS'un büyüklüğünü ve miktarını etkileyebileceği de bulunmuştur. Daha yüksek bir bakteri konsantrasyonu, daha fazla BS küresinin üretimine yol açabilir (Hu ve diğ., 2013). Ajite bir kültürde dönme hızı da küre benzeri BS oluşumunda önemli bir rol oynar. 100 rpm'den daha düşük bir dönme hızı ile küre benzeri BS parçacıklarını bulmak zordur; daha ziyade sentezlenen BS'un düzensiz şekilleri gözlenmiştir. Yapılan deneyde, küresel BS şekli 125 rpm'de belirginleşmiş ve küre benzeri BS yaklaşık 8 mm'dir, bu da diğer hızlardan daha büyüktür. Dönme hızınının 150 rpm'ye yükseltilmesi, BS çapını yaklaşık 2,5 mm'ye düşürmüş şeklindeki değişikliğine neden olmuştur. 200 rpm'nin üzerindeki hızlarda, küre benzeri BS oluşumu engellenmiş ve çapı 1mm olan birkaç birbirine bağlı BS partikülü bulunmuştur. Dönme hızı 200 rpm'den çok daha büyük

olduğunda, kültür ortamında neredeyse küre benzeri herhangi bir BS bulunamayabilir. Kısaca dönme hızının artırılması BS üretim miktarını arttırmamıştır (Hu ve Catchmark, 2010a).

Genel olarak, bakteri suşunun dengesizliği, BS'un karıştırılması sırasında Newton dışı davranışlar ve yüksek kesme kuvveti, ajite / çalkalama yönteminin bazı dezavantajlarından. Bununla birlikte, ajite kültür tarafından üretilen BS, düşük derecede polimerizasyon, düşük kristallilik indeksi ve düşük mekanik özellikler gibi mikroyapı ve özelliklerinde bazı değişiklikler göstermektedir (Kouda ve ark., 1997a; Kouda ve ark., 1997b; Kouda ve ark., 1998; Kouda ve ark., 2016). Küre benzeri BS'un mikro yapısı, diğer kültür yöntemleriyle üretilenden oldukça farklıdır. Çünkü BS oluşum süreci ajitasyondan etkilenebilir. Küre benzeri BS'un geometrileri, statik ve çalkalanmış kültürler arasında oldukça farklıdır.

Statik kültürde besleyicinin hava-sıvı ara yüzünde bir BS zarı oluşturulabilirken, ajite/ çalkalama kültüründe BS, parçacığın merkezinden üretilir ve daha sonra dışarıya doğru gelişir. Bu nedenle, küre benzeri BS'un mikro yapısında katmanlı bir yapı gözlemlenebilir. Küre benzeri BS iç bölgesi boştur. Bakteriyel suşlar da içeren katmanlı yapı içinde BS önemli ölçüde daha yoğun lifler bulunmuştur (Hu ve Catchmark, 2010b). Bu sorunlara rağmen, bazı araştırmalar ajite kültürün ekonomik ölçekli üretim için en uygun teknik olabileceğini öne sürmüştür (Hu ve ark., 2013).

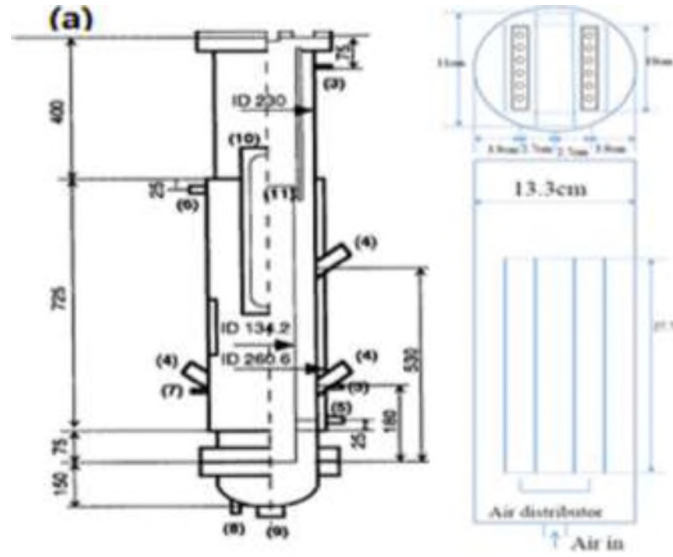
Daha önce açıklandığı gibi, ajite/ çalkalanan kültürün, düşük bir kesme gerilimi ve yüksek bir oksijen transfer hızı indükleyerek kütle aktarım hızını artırması önerilmiştir. Bununla birlikte, selüloz olmayan bir mutantın ortaya çıkması genellikle ajite / çalkalama kültüründe BS verimliliğinin azalması ile sonuçlanır. Bu tür kültür yöntemleri, düşük verimlilikleri ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle yüksek ölçeklendirme için sınırlı fayda sağlayabilir. Ajite kültür, statik kültüre kıyasla BS üretimini belirgin bir şekilde arttırmaz. Bu sorunu çözmek için, endüstriyel ölçekte üretim elde etmek ve BS uygulamalarını genişletmek, yüksek verimlilik, düşük üretim maliyeti ve kısa ekim süresi ile ekonomik bir üretim sürecinin oluşturulması gerekmektedir. Bu nedenle, oksijen kaynağını açmayı, kültür ortamına besin katmayı ve kültür ortamını geliştirmeyi içeren birçok çalışma yapılmıştır. BS üretimi, yüksek oksijen veya besin çözeltisi transfer oranı ile sürekli yetiştirme ile artırılabilir.

Bazı biyoreaktör kültürlerinin yüksek seviyede BS ürettiği bildirilmiştir. Son yıllarda, BS'un fermentasyon süreci ve hazırlama teknolojisi hakkında bazı araştırmalar, BS'un bazı biyoreaktör kültürlerini tanıtmıştır (Campano ve ark., 2016; Yang ve ark., 2014). Oksijenle zenginleştirilmiş hava altında BS üretmek, dönen bir disk kullanmak veya biyofilm desteği gibi işlevleriyle karakterize edilebilirler.

Oksijen iletimini arttırmak için karıştırılmış bir depo biyoreaktörü kullanılmıştır. Ancak, bu yöntem yüksek enerji tüketimi gerektirir. Bir başka yaygın fermentasyon reaktörü tipi hava kaldırmalı biyoreaktördür. Düşük güç kaynağı kullanan bir hava kaldırmalı biyoreaktörü ilk olarak Chao ve arkadaşları tarafından 1997'de kullanılmıştır (Chao ve ark., 1997). Bu reaktör enerji tasarrufludur ve BS üretimi sırasında yeterli miktarda oksijen sağlayabildiğinden karıştırılan tank reaktörlerine göre daha az kesme gerilimi üretir. Hava kaldırma biyoreaktörlerin kurulumuyla, bakteriler 67 saat kültürlendiğinde, 3,8 g BS hasat edilmiştir.

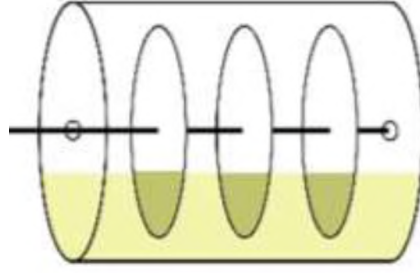
Başka bir çalışmada, Chao ve arkadaşları (2000) hava kaldırma reaktörünün verimliliğini dahili bir döngü aracılığıyla geliştirmiş ve böylece 10,4 g/l BS en yüksek konsantrasyonla toplanmıştır. Bu şekilde elde edilen BS, çalkalanmış bir kültürüne benzer pellet formunda ve düşük mekanik mukavemete sahiptir. Daha sonra, farklı fruktoz konsantrasyonlarının BS üretim hızı üzerindeki etkisini incelemek için bir iç döngü hava taşıma reaktörü geliştirilmiştir (Chao ve ark., 2001). Oksijenle zenginleştirilmiş hava kullanımı ile BS üretim hızı saatte 0,093 g/l yükselmiş ve BS verimi % 11'den %18'e yükseltilmiştir. Saatte 0,22 g/l en yüksek üretim oranı ile % 35'lik en yüksek BS verimi 60-70 g/l fruktozda gözlenmiştir. Dahili döngü hava kaldırma reaktörü kullanılarak, hava kaldırma biyoreaktörüne kıyasla daha fazla miktarda BS üretilmiştir.

Şekil 1.6.'da, bir iç çevrim hava kaldırmalı reaktörünün ve bir modifiye hava kaldırmalı biyoreaktörünün şematik diyagramlarını göstermektedir (Chao ve ark., 2000; Wu ve Li, 2015). Bununla birlikte, tüm bu hava kaldırmalı reaktör tipleri, eliptik pellet morfolojisi ile BS üretmektedir (Chao ve ark., 2000).



Şekil 1.6. Hava kaldırmalı biyoreaktör şematik gösterimi (Chao ve ark., 2000)

Daha fazla su tutma kapasitesine sahip BS membranı, modifiye edilmiş hava kaldırmalı biyoreaktör yoluyla toplanmıştır (Wu ve Li, 2015). Biyoreaktör, genel hava kaldırmalı biyoreaktörde kullanılan basit çekiş borusu yerine dikdörtgen net plakalar kullanılmıştır. BS'un özellikleri, net plakaların sayısı değiştirilerek manipüle edilebilir. Örneğin, BS daha fazla su tutma kapasitesi ve 6 net plaka kullanarak en yüksek Young modülü gösterilmiştir. Hava kaldırmalı biyoreaktör ile BS oluşumu ortam/pellikül arayüzünde gerçekleşmelidir ve bakteri suşları, ortamın başka bir yerinde BS oluşumu gözlenmeyecek şekilde bu arayüze yakın olmalıdır. Bu modifiye edilmiş hava kaldırmalı biyoreaktörde, ortam içinde BS oluşturulabilir ve biyoreaktörde BS membranı elde edilmiştir. Choi ve ark. (2009) tarafından bir başka modifiye edilmiş hava kaldırmalı tip kabarcık kolon biyoreaktörü bildirilmiştir. Bu yöntemle BS'u 2,27 g/l/gün yüksek verimlilikle üretmiştir (Song ve ark., 2009). Bu biyoreaktör düşük kesme gerilimi ve yüksek oksijen oranı sağlamaktadır. Büyütülmüş kültür koşullarına saf oksijen verildiğinde, BS seri üretimi için etkili bir yöntem ile 5,6-6,8 g/l üretilmiştir. Bununla birlikte, hazırlanan BS düşük mekanik özelliklere, düşük kristallığe, düşük moleküler ağırlığa ve düşük derecede polimerizasyona sahiptir.



Şekil 1.7. Dönen disk biyoreaktörü şematik gösterimi (Serafica ve ark., 2002)

Dönen bir disk biyoreaktör ile hazırlanan BS'un ilk raporu 2002 yılındadır (Serafica ve ark., 2002). Bu tasarımda, dönen bir merkezi şaft üzerine aşılama için bir giriş ile birkaç dairesel disk takılmıştır. Dönen bir disk biyoreaktörde, BS'a ve BS bazlı kompozitlerin özelliklerini geliştirmek için birçok farklı katı ve lif türü doğrudan ortama eklenebilir ayrıca selüloza dahil edilebilir. (Kuure ve ark., 2005; Mormino ve Bungay, 2003). Döner disk biyoreaktörün amacı homojen bir yapıya sahip BS elde etmektir. Dönen disk biyoreaktörde, dairesel diskler yüzeyleri alternatif olarak hava ve sıvı ortam ile etkileşime girerken dönmeye devam edebilir. Ek mekanik mukavemete sahip BS, disk yüzeylerine yapışabilir.

Döner disk biyoreaktör yoluyla hazırlanan BS homojen olmasına rağmen, verim, statik kültürden elde edilenden önemli ölçüde fazla değildir. Bu biyoreaktördeki BS verimliliğinin yaklaşık 0,24 g/l/gün'e ulaştığı bildirilmiştir. Üretilen BS, daha düşük kristallilik ve daha düşük mekanik özellikler sergilemiş, ancak statik kültür yoluyla elde edilen BS'a kıyasla benzer su içeriği ve termostabilite sergilemiştir (Mormino ve Bungay, 2003; Zahan ve ark., 2016). Genellikle biyoreaktörler, disklerin alanının yarısının ortama daldırılması ve diğer yarısı atmosfere maruz kalacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, her hasattan sonra yeniden aşılırlar. Bununla birlikte, dönen bir disk biyoreaktörünü (PCS-RDB) destekleyen plastik kompozitler, kültür ortamına tamamen daldırılabilir ve bakterilerin tutturulması için pürüzlü bir yüzey sağlayarak yüksek bir BS verimi sağlar. Aslında, PCS-RDB yeniden inokülasyon yapmadan BS üretebilir ve sonuç olarak en az beş döngü boyunca üretkenliğini korur. Bu biyoreaktör böylece BS'ü yarı sürekli bir şekilde üretebilir ve ticari üretimi karşılamak için ölçeklendirilmesi kolaydır (Lin ve ark., 2014).

Farklı katkı maddelerine sahip PCS-RDB sistemlerinin etkinliğini değerlendirmek için araştırmalar yapılmıştır. Örneğin, BS üretkenliğini ve özelliklerini arttırmak için PCS-RDB'ye karboksimetilselüloz (CMC), avicel, agar ve sodyum aljinat ilave edilmiştir. Ortamda CMC ve avicel mevcudiyetinin BS üretim hızını önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. En yüksek BS üretimine (0,64 g / dilim) biyoreaktöre % 0,8 avicel eklenerek ulaşılmıştır (Lin ve ark., 2016). Pellet formundaki nihai BS benzer su tutma kapasitesine sahiptir, ancak eklemeler olmadan bir biyoreaktör altında elde edilen BS'dan daha düşük mekanik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Dinamik kültürlerde, kültür sırasında bakterilere uygulanan kesme geriliminin, selüloz üreten hücrelerden daha zenginleştirilmiş ve üretkenliği azaltan selüloz negatif mutantları önemli ölçüde kolaylaştırabildiği bulunmuştur. Bu nedenle, basit ve az kesme gerilimi üreten statik kültür, düşük üretkenliğine, uzun kültür süresine ve önemli kaynaklara rağmen BS'u elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Fermantasyon sırasında, biyoreaktör zenginleştirilmiş bir oksijen transfer kapasitesi ile birleştirilebilirse, BS oluşumuna başarılı bir şekilde yol açabilir. Bu nedenle, BS üretimi için bir tür sirke üretim ekipmanı olan bir damlama yatağı reaktörü de kullanılmıştır (Lu ve Jiang, 2014). Statik kültür ve ajitasyon/çalkalama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, damlama yataklı reaktör yüksek oksijen konsantrasyonu ve düşük kesme kuvveti sağlayabilir. Yüksek biyokütle yoğunluklu sistemler sağlayan bu biyoreaktör, geleneksel bir statik kültürden daha büyük bir yüzey/hacim oranı sağlayabilir.

Damlatmalı yatak reaktöründen elde edilen BS, yüksek derecede -OH birleşiminin yanı sıra yüksek polimerizasyon, saflık, su tutma kapasitesi, gözeneklilik ve termal stabilite gibi mükemmel özelliklere sahiptir. BS üretimini geliştirmek için çeşitli katkı maddeleri veya modifiye edilmiş yöntemler kullanılmıştır.

Diğer biyoreaktörlerden toplanan BS, makroskopik morfoloji, mikroyapı, kristallik derecesi, kimyasal yapı, polimerizasyon derecesi, saflık, su tutma kapasitesi, gözeneklilik ve termogravimetrik yetenek gibi yapı ve özellikler açısından karakterize edilmiştir. Çizelge 2.5.'te farklı reaktörlerin üretim özelliklerini, modifikasyonlarını ve avantajlarını göstermektedir.

Çizelge 2.5. Bazı reaktörlerin üretim özellikleri, modifikasyonları ve avantajları (Wang ve ark., 2019)

Modifikasyon	BS üretimi için reaktörlerin avantajları, üretim özellikleri ve avantajları	Referans
Yüksek oksijen konsantrasyonu	BS konsantrasyonu: 28 saatte 5,63 g / L Verimlilik: 0,20 g / L Üretim 30 saat sonra kötüleşti <i>Avantajlar:</i> Yüksek oksijen aktarım hızı, düşük güç gereksinimi, daha yüksek verimlilik	Chao ve ark., 1997
Zenginleştirilmiş oksijenli dahili döngü hava asansörü	Üretim: 67 saatlik kültürde 3,8 g veya 0,116 g / L/ sa <i>Avantajları:</i> Eşsiz bir elips, yüksek hacimsel oksijen transferi, yüksek hidrodinamik karakteristik	Chao ve ark., 2000
pH kontrollü dahili döngü hava asansörü ve glikoz ortamı	En yüksek üretim oranı: 0,22 g / L / sa En yüksek konsantrasyon: 60 g/L fruktozda 10,4 g/L <i>Avantajları:</i> Benzersiz bir elips oluşturdu, yüksek hacimsel oksijen transferi, yüksek hidrodinamik karakteristik, düşük mekanik dayanım	Chao ve ark., 2001
Kontrollü pH / Hestrin ve Schramm ortamına sahip çalkalama şişesi	Membran tipi BS üretir <i>Avantajlar:</i> Yüksek su tutma kapasitesi, Young modülü, ağ plakalarının sayısı değiştirilerek değiştirilebilir	Wu & Li, 2015
Kontrollü pH Havalandırma hızına sahip kabarcık kolon: 1.0 vvm (30 L / dak)	<i>Avantajları:</i> Yüksek üretim: 5,6-6,8 g / L / 3 gün Düşük mekanik özellikler: 17,15 - 11,66 MPa Düşük kristallik:% 86 – 79,6 Düşük moleküler ağırlık ve polimerizasyon derecesi Düşük kesme gerilimi, yüksek oksijen transfer hızı Düşük konsantre çözelti durumu kültürü	Choi ve ark., 2009

Çizelge 2.5. Bazı reaktörlerin üretim özellikleri, modifikasyonları ve avantajları (Wang ve ark., 2019) (Devam)

Modifikasyon	BS üretimi için reaktörlerin avantajları, üretim özellikleri ve avantajları	Referans
BS üretimi için döner diskli biyoreaktörlerin üretim özellikleri		
Döner disk biyoreaktör	Tutarlı bir ürün Daha yüksek çekme dayanımı; BS gözenek boyutu: 10-15 µm; selülozik matris sağlam ve güçlü kalır	Mormino & Bungay, 2003; Zahan ve ark., 2016
Döner diski destekleyen plastik kompozitler Biyoreaktör	Yarı sürekli bir süreç Daha yüksek verimlilik: 0,24 g / L/ gün; düşük kristallik:% 66,9; daha düşük mekanik özellik (Young modülü 372,5 MPa); statik kültür ile elde edilen BS'ye benzer su içeriği ve termostabilite	Lin ve ark., 2014
Farklı eklemelerle döner disk biyoreaktörü destekleyen plastik kompozitler	Yarı sürekli bir süreç, yeniden aşılama yok; fruktoz konsantrasyonu 50'den 10 g / L'ye düşürüldü; oksijen konsantrasyonu ve disk dönüş hızı fermentasyon sürecini geliştirir; BS üretkenliği: 0,64 g / dilim; yüksek su tutma yeteneği (% 98.6-99); benzer gerilim ancak daha düşük gerilim; sırasıyla% 0,8 karboksimetilselüloz ve avicel ile en yüksek BS üretimi	Lin ve ark., 2016
Döner manyetik alan	Selüloz üretemeyen mutantların sayısını artırmadı Artan biyokimyasal özellikler; bakteri büyümesi üzerinde olumlu etki; artan su molekülleri; değiştirilmiş mikro yapı ve gözeneklilik derecesi ile BS elde edilmiştir.	Fijałkowski ve ark., 2015, 2016; Fijałkowski ve ark., 2017a, 2017b

Çizelge 2.5. Bazı reaktörlerin üretim özellikleri, modifikasyonları ve avantajları
(Wang ve ark., 2019) (Devam)

Modifikasyon	BS üretimi için reaktörlerin avantajları, üretim özellikleri ve avantajları	Referans
BS üretimi için diğer birkaç biyoreaktörün üretim özellikleri		
Döndürme filtresi ile donatılmış biyoreaktör	Yüksek hücre yoğunluğu selüloz + hücreleri bol miktarda selüloz - mutantlarına dönüştürülebilir Daha yüksek BS üretkenliği: 0,55'ten 1,61 g / l / gün Hücre kütlesi: 5,65'ten 11,52 g / L'ye (140 sa)	Jung ve ark., 2007
Fed batch prensibi	BS dilimleri veya katman (3-4 cm); En iyi zaman aralığı: 6 saat Yüksek çekme dayanımı: 114 N, DP: 5200; Yük diyagramındaki grafiğin gradyanı: 34,7 N/10mm	Hornung ve ark., 2007
Biyofilm reaktörü	Yüksek biyokütle yoğunluğu; Yüksek üretim: 7,05 g / L Daha yüksek kristallik:% 93; Kristal boyutu: 5,2 nm Daha iyi termal performans; Su tutma yeteneği:% 95	Cheng ve ark., 2009
Katkı maddeli biyofilm reaktör	Yüksek biyokütle yoğunluğu; Sürekli BS üretimi Yüksek üretim: 13 g / L; Düşük kristallik:% 80 Kristal boyutu: 4,2 nm; BS kağıt tabakalar: daha yüksek gerilme mukavemeti ve Young modülü	Cheng ve ark., 2011

2.6.2 Karbon ve Azot Kaynakları

BS üreten mikroorganizmaların büyümesi için gereken besinler karbon ve azot kaynakları, fosfor, kükürt, potasyum ve magnezyum gibi tuzlardır (Cherian ve ark., 2013). Bazen hücre büyümesini ve üretimini arttırmak için amino asitleri ve vitaminleri sağlayan karmaşık bir besi ortamı da kullanılmaktadır (Chawla ve ark., 2009). 1940-1960 yılları arasında Kudüs'teki İbranice Üniversitesindeki araştırmacılar, *G. xylinus* tarafından üretilen selülozun basitleştirilmiş üretim ve miktar tayininin biyokimyasını yoğun bir şekilde araştırmıştır. HS (Hestrin-Schramm) olarak adlandırılan bu besi ortamı günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hestrin ve Schramm, 1954).

Bakteriyel selüloz üretiminde genel karbon kaynakları arasında glikoz, sükroz, fruktoz, mannitol bulunur, fakat diğer karbon kaynakları arasında arabinoz, arabitol, etanol, sitrik asit, maltoz, etilen glikol, dietilen glikol, galaktoz, glikon lakton, inositol, laktoz, gliserin, mannoz, metanol, rhamnoz, riboz, nişasta, süksinik asit, trehaloz ve ksiloz gibi çeşitli kaynaklar açıklanmıştır (El-saied ve ark., 2006; Hutchens ve ark., 2006; Mikkelsen ve ark., 2009) ve *Gluconacetobacter* suşları ile bakteriyel selüloz üretimini en üst düzeye çıkarmak için araştırılmıştır (Ruka ve ark., 2012).

En iyi verim, fed-batch fermentasyonda, karbon kaynağı olarak glikoz kullanılarak 50 saatlik yetiştirme süresinde 15,3 g/L selüloz elde edilmiştir (Mikkelsen ve ark., 2009). *Acetobacter* veya *Gluconacetobacter xylinus* tarafından hücre dışı bakteri selülozu oluşumu için ana karbon kaynağı glukozdur. Selüloz verimi, tüketilen glikoza göre belirlenir. Fruktoz, gliserol ve glikoz ile neredeyse aynı selüloz verimini verdiği söylenmektedir (Masaoka ve ark., 1993).

Bir başka araştırmada, jel benzeri formlarda selüloz üretmek için tek bir karbon kaynağı olarak sitrik asit uygulamasının mümkün olduğunu, ancak karbon kaynağı olarak hem glikozun hem de sitratın varlığında ilk önce glikozun tüketileceğini ve sitratın sadece glikoz tüketiminden sonra kullanılacağını göstermiştir (Geyer ve ark., 1994). Karbon kaynaklarının *A. xylinum* tarafından selüloz üretimi üzerindeki etkisi, Çizelge 2.6.'da özetlenmiştir (Jonas ve Farah, 1998).

Çizelge 2. 6. Karbon kaynaklarının *A. xylinum* tarafından selüloz üretimi üzerindeki etkisinin yüzde oranları (Jonas ve Farah., 1998)

Karbon Kaynakları	Verim (%)
Monosakkaritler	
D- Glukoz	100
D- Fruktoz	92
D- Galaktoz	15
D- Mannoza	3
D- Ksiloz	11
L- Arabinoz	14
L- Sorbinoz	11
Disakkaritler	
Laktoz	16
Maltoz	7
Sükroz	33
Sellobiyoza	7-11
<i>Polisakkaritler</i>	
Starch	18
Alkoller	
Etanol	4
Etilen Glikol	1
Dietilen Glikol	1
Propilen Glikol	8
Gliserol	93
Myo- İnositol	17
D- Arabitol	620
D- Mannitol	380
Organik Asitler	
Sitrat	20
L- Malat	15
Süksinat	12
Diğerleri	
Glukon- Lakton	62
O-Metil- Glukoz	0.5
Karbon Kaynağı Olmayan	2

Romano ve arkadaşları bir karbon kaynağı olarak glukoz, galaktoz veya ksiloz kullanarak selüloz verimi ölçülmüştür. Galaktoz ve ksiloz, çoğunlukla yavaş büyüme oranları nedeniyle daha küçük verimler vermiştir. Sükrozdan elde edilen bakteri selülozunun verimi, glukozdan elde edilen verimin yarısı olduğunu, ayrıca *A. xylinum*'daki sükrozun daha düşük aktivitesine sahip olduğunu da bulmuşlardır (Romano ve ark., 1989).

Selüloz üreten türlerin ayrıca spesifik bir kompleks azot kaynağı gerektirmektedir. Çoğu araştırma çalışmanın temelinde Hestrin ve Schramm tarafından geliştirilen ve % 31 oranında maya özü ve pepton içeren ortam bulunmaktadır. Metiyonin ve glutamat gibi birçok aminoasit gerektiği daima belirtilmektedir (İshikawa ve ark., 1995; Matsuoka ve ark., 1996).

Bir çalışmada metiyoninin, hücre büyümesi ve selüloz üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca aminoasit içermeyen ortamlarla karşılaştırıldığında, metiyonin hücre büyümesi ve selüloz üretimi veriminin % 90'ını oluşturmaktadır (Matsuoka ve ark., 1996). Vitaminlerin azot kaynağı olarak mikrobiyal selüloz sentezi üzerindeki etkisinin araştırılması, piridoksin, nikotik asit, p-aminobenzoik asit ve biyotin vitaminlerinin hücre büyümesi ve selüloz üretimi için en uyarıcı madde olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fontana ve ark., 1991; İshikawa ve ark., 1995).

Kolin, betain ve yağ asitlerinin (tuzlar ve esterler) türevleri gibi *A. xylinum* suşları tarafından selüloz üretimini kuvvetle stimüle eden diğer bazı bileşikler de tanımlanmıştır (Hikawa ve ark., 1996) Mısır dik likörünün (CSL) de *A. xylinum subsp. sucrofermentans* BPR 2001 tarafından selüloz üretimi için uygun olduğu bulunmuştur (Hwang ve ark., 1999). Sadece CSL'de tespit edilen laktat, diğer azot kaynaklarını içeren kültür ortamına eklendiğinde selüloz üretimi, CSL ortamındakilere benzer seviyelere çıkmıştır (Fontana ve ark., 1991). Ana karbon kaynağı olarak laktat kullanılan bir kültürde, tüketilen laktatın % 77'sinin CO₂'te oksitlendiğini ve sadece % 6,9'unun bakteriyel selüloza dönüştürüldüğünü tespit etmiştir. Bu laktatın bakteriyel selüloz biyosentezi için bir substrat olarak değil bir enerji kaynağı olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Naritom ve ark., 1998).

2.6.3 Sıcaklık ve pH Etkileri

Bakterilerin büyümesi ve BS'un üretilmesi için optimum pH kullanılan bakterinin suşuna bağlıdır, ancak genellikle pH'nın 4-7 aralığında olduğu gösterilmiştir (Donald ve ark., 1989). BS üretimi 4,5 ila 7,5 arasında değişen geniş pH aralığında gözlemlendiğinde en yüksek BS üretimi pH 6,5'te gerçekleşmiştir (Son ve ark., 2001). Çoğu araştırmacı pH 5, (Ishikawa ve ark., 1995; Fiedler ve ark., 1989; Joris ve ark., 1990) veya 6'yı kullanmıştır (Hestrin ve Schramm, 1954; Masaoka ve ark., 1993). Bununla birlikte, BS membranlarının biyomedikal uygulamaları, yani Biofill ve Gengiflex gibi firmalardaki endüstriyel üretimi, BS kültürü sırasında besiyerinin kontaminasyonunu önlediğinden 4 ila 4,5 arasında düşük bir pH'ta gerçekleştirilir (Jonas ve Farah, 1998).

BS, geniş bir pH aralığında üretilirse de kültür ortamından bağımsızdır (Zeng ve ark., 2011). Ayrıca, kültür ortamının pH'sının, şekerin ve azot kaynaklarının tüketimi sırasında üretilen glukonik, asetik veya laktik asitler gibi sekonder metabolitlerin birikmesinden dolayı zamanın bir fonksiyonu olarak düşebileceği de belirtilmelidir. Bu nedenle, kültür ortamının pH'sının maksimum BS verimi için korunması önemlidir. Bu bağlamda, kültür ortamının pH'sını korumak için kültür ortamına bir tampon olarak mısır dik likörü eklenebilir. Bununla birlikte, viskoz mısır dik likörü, besiyerinin kültür bileşenlerinin homojen olmayan şekilde karışmasına neden olabileceği gibi besiyerinin viskozitesinde arttırmaktadır (Noro ve ark., 2004).

Besiyerinin pH'sına ek olarak bakteri selülozu verimi sıcaklığa da bağlıdır. Çalışmalar, selüloz üretimi için optimum büyüme sıcaklığının 25–30°C olduğunu göstermiştir (Cannon ve Anderson, 1991) Çoğu yazar, 20°C ila 30°C arasındaki sıcaklık aralığını kullanmıştır (Romano ve ark., 1989; Geyer ve ark., 1994). Hestrin ve Schramm ortamındaki *Acetobacter sp.* A9 tarafından üretilen BS'un verimine sıcaklığın etkisi, Son ve arkadaşları tarafından araştırıldığında BS üretimi için optimum sıcaklığın 30°C olduğu bulunmuştur (Son ve ark., 2001). Kültür sıcaklığını 25°C'ye düşürmek, BS verimini 30°C'ye kıyasla önemli ölçüde azaltmazken, sıcaklığı 35°C'ye yükseltmek BS verimini düşürmektedir (Wong ve ark., 1990). Bakteriyel selülozun üretiminde sıcaklığın etkisiyle morfolojik ve kristal yapıda etkilenmektedir. Hirai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HS ortamında *A. xylinum*

ATCC 23769 üretilen BS'un 4°C'deki selüloz II yapısı ile bant şeklinde oluşturulduğu, diğer yandan 28°C'de üretilen BS'un selüloz I şeritleri olduğunu bildirmiştir (Hirai ve ark., 1997).

2.6.4 Oksijen ve Karbondioksit Etkisi

Kültür ortamındaki çözünmüş oksijen içeriği, hücre metabolizması için önemlidir ve BS'un hem verimi hem de kalitesine bağlıdır (Shirai ve ark., 1994). Bununla birlikte, ortamdaki yüksek çözünmüş oksijen içeriğinin, glukonik asit konsantrasyonunda bir artışa yol açacağı bildirilmiştir (Tantatian ve ark., 2005). Bu da sonuçta BS verimini azaltan hücre canlılığını etkilemektedir. Düşük çözünmüş oksijen içeriği ise bakteri üremesini ve BS üretimini engellemektedir (Hwang ve ark., 1999).

Watanabe ve Yamanaka çalışmalarında, düşük O₂ gerilimleri altında büyüyen selülozun, yüksek O₂ gerilimleri altında büyüyen selüloza göre daha az tortuya sahip olması gerektiğini bulmuşlardır. Ayrıca, % 10'luk oksijen basıncının hücre büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadan %25 oranında daha yüksek bir selüloz üretimine yol açtığını gösterdiler (Watanabe ve Yamanaka, 1995). Ajitasyon kültürde bakteriyel selüloz üretimini arttırmak için oksijen miktarı için etkili bir prosedür belirlemek de önemlidir (Kouda ve ark., 1996; Kouda ve ark., 1997). Yüksek oksijen basıncı ve karbon dioksit basıncı, mikrobiyal büyümeyi ve aminoasitler gibi diğer malzemelerin üretimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Akashi ve ark., 1979; Yabannavar ve ark., 1992). Aşırı oksijen beslemesinin, doğrudan oksijen kullanımı nedeniyle substrat kaybına bağlı olarak bakteriyel selüloz verimliliğinde bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. (Yamanaka, 1988).

2.7 BS Üretimini İyileştirilmesi

Çeşitli araştırmacılar, bazı biyokimyasal sistemler ile selülozun verimliliğini *A. xylinum*'da arttırmaya çalışmışlardır. Bakteriyel selüloz üretiminin, kültür ortamına az miktarda bir selülaz kompleksi ilave edilmesiyle artırıldığı bildirilmiştir ve bu etkinin endüstriyel üretime uygulanabilir olması beklenmektedir. Bununla birlikte, sorumlu mekanizma henüz tanımlanmamıştır ve bu etkiyle ilgili olarak kafa karıştırıcı spekülasyonlar oldukça fazladır (Brown, 1988). "Selülaz kompleksi" endoglukanaz, ekzosellobioglukosidaz ve β -glukosidaz aktivitelerine ve selüloz

bağlama yeteneğine sahiptir. Fukaya ve arkadaşları bu selüloz kompleksinin arttırıcı etkisini selüloz bağlama aktivitesine atfetmiştir (Fukaya ve ark., 1994), ancak Nakamura ve arkadaşları β -glukozidaz aktivitesine atfedilebildiğini bildirmektedir (Nakamura ve ark., 1993). Tonouchi ve arkadaşları endoglukanaz aktivitesinin, selüloz bağlama yeteneğinin değil, bakteriyel selüloz üretimini arttırdığı tespit etmiştir (Tonouchi ve ark., 1995). Çalışmalar ayrıca, *A. xylinum*'un bakteriyel selüloz üretiminin CMC eklenerek artırıldığını ve ürünün daha kuvvetli mekanik mukavemete sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Tajima ve ark., 1995; Sakairi ve ark., 1998). Ticari bir sülfite hamur atık fraksiyonunun kültüre eklenmesinin, *G. xylinus*'un selüloz üretimi için verimliliğini arttırmıştır (Premjet ve ark., 1995).

Hem karbonhidratları hem de düşük moleküler lignosülfonat fraksiyonunu ortadan kaldırmak için saflaştırma etkilidir. Bir gözlem çalışması belirgin selüloz verimliliği, sodyum veya kalsiyum lignosülfonat ilavesiyle de gözlenmiştir (Siripong ve ark., 1995). İncelenen beş lignosülfonat numunesi, *A. xylinum* ATCC 0245'in bakteri selüloz membran verimini, diğer incelenen efektörlere (kalkoflor, kongo kırmızısı, karboksimetil selüloz, kafein ve teofilin) göre belirgin şekilde arttırmıştır. En yüksek verim, % 0,7'lik bir sodyum lignosülfonat numunesi eklendiğinde elde edilir.

Karboksimetil selüloz, kafein ve teofilin, selüloz membran verimi üzerinde düşük etkisi vardır, ancak kalkoflor ve kongo kırmızısında olumsuz etkileri görülmüştür. X-ışını kırınım analizi verilerinden yararlanarak, lignosülfonatın bakteriyel selüloz membran üretimi için yeni bir simülatör türü olarak kabul edilmesini önermiştir, çünkü yalnızca selüloz membran verimliliğinde değil, aynı zamanda selüloz membranların kristalliğinde de artış potansiyeli taşımaktadır (Siripong ve ark., 1996).

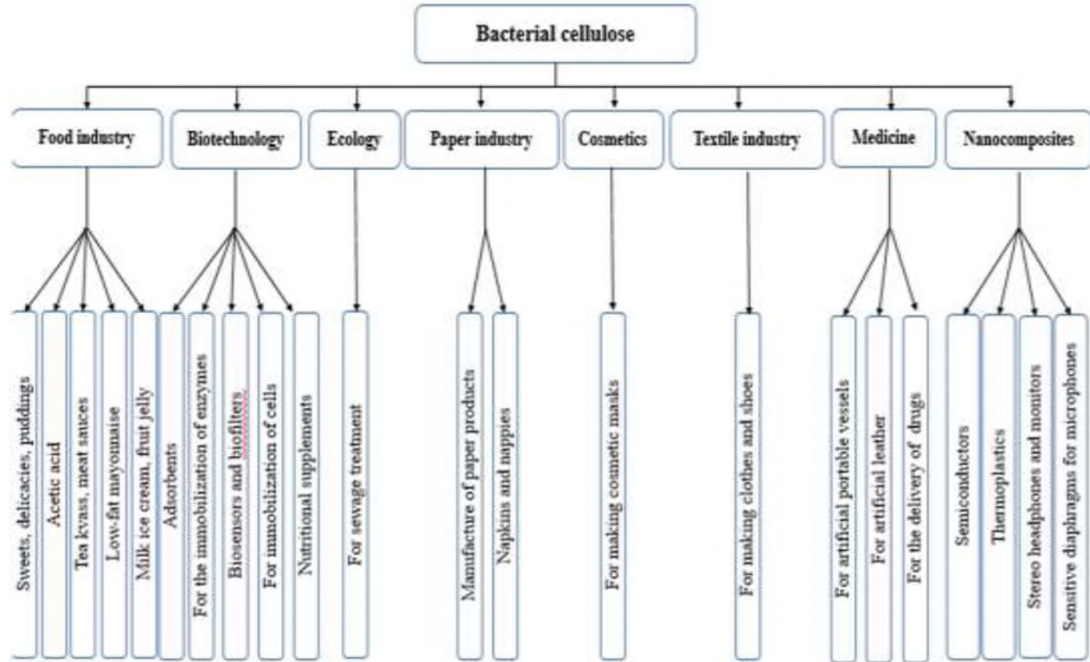
Selüloz üretimindeki kültür koşullarındaki değişikliklerle Yoshinaga ve arkadaşları kültüre karbonik asit ilavesinin hücre büyümesini ve selüloz üretimini arttırdığını bulmuşlardır (Yoshinaga ve ark., 1997). Kültür ortamına laktik asit eklenmesi de etkili olan yöntemlerden biridir. Bu etki hem laktat dehidrogenaz tarafından ATP oluşumunu hem de TCA döngüsünde üretilen piruvat tarafından aktivasyonu da aracılık eder. Genetik mühendisliğinin ayrıca selüloz üretimini arttırmak için yararlı bir yaklaşım sağlaması beklenmektedir. *A. xylinum* dışındaki organizmalardan çeşitli karbonhidratları kodlayan genlerin ekspresyonu, bakteriyel selüloz verimini

artırabilen ve besin fiyatını azaltabilen mevcut karbon kaynaklarının kapsamını arttırmaktadır. Bir örnek gösterecek olursak, *Acetobacter sp.* sükrözün bir karbon kaynağı olarak kullanılması ve selüloz üretiminin artmasıyla sonuçlanmıştır (Tonouchi ve ark., 1998).

Çalışmalarda ilgili suşların plazmitleri veya geniş konakçı menzilli plazmitlerin kullanılarak selüloz üreten *Acetobacter* için bir konak-vektör sistemi geliştirdi ve bunları selüloz üretimini arttırmak için selüloz sentaz genlerini tanıtmak için kullanılmıştır (Fujiwara ve ark., 1992; Valla ve ark., 1986).

2.8 Uygulama Alanları

Bakteriyel selüloz, bitki selülozünün zorlukla kullanılabildiği çok çeşitli uygulamalar sunmaktadır. Bunun başlıca nedeni, kristallik yapısına sahip yüksek saflık derecesi, yüksek su tutma kapasitesi ve ıslak haldeki mekanik mukavemettir. Temel potansiyellere bakıldığında birçok bakteriyel selüloz uygulamaları bulunmaktadır (El-Saied ve ark., 2004).



Resim 1.3. Bakteriyel selüloz uygulamaları

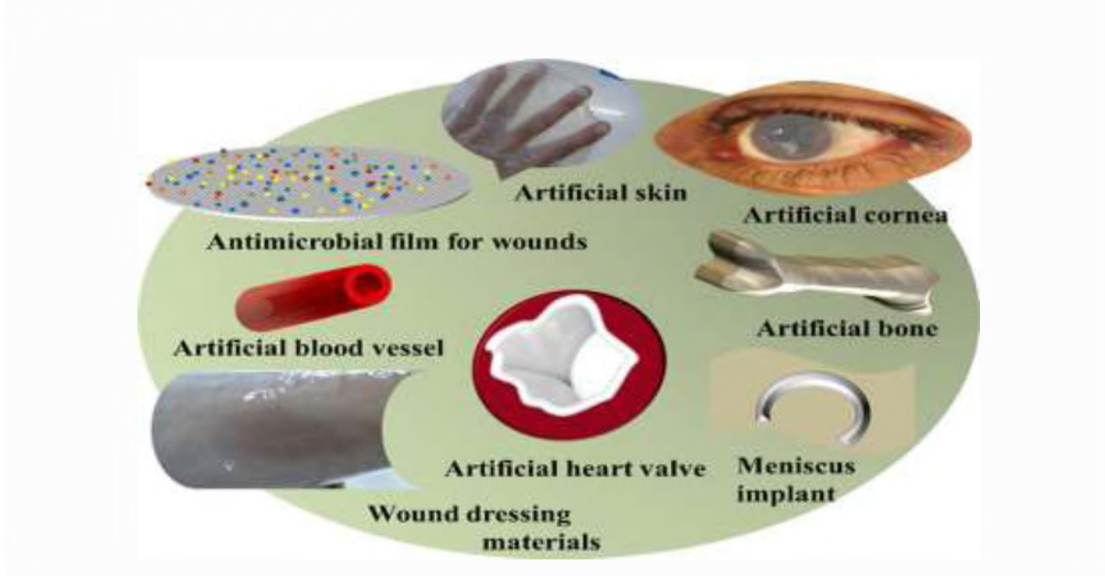
Selüloz, yüksek gerilme mukavemeti ve su içeriği gibi çeşitli benzersiz özellikler sergilediğinden, son yayınların birçoğunda uygulamalarına veya çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamalarına odaklanılmıştır. White ve Brown (1989) ilk önce bakteriyel selülozun özelliklerini ticari uygulamalar için değerlendirmişlerdir. Ana hatlarıyla belirtilen önemli özellikler arasında, işleme sırasında herhangi bir tadilat gerekmemektedir, hiç kurutulmamış gibi yüksek su tutma kabiliyeti, herhangi bir şekilde veya boyuta oluşturulma kapasitesi, çok çeşitli substratlardan oluşumu ve sentez sırasında kontrol edilebilen özellikleri bulunmaktadır.

2.8.1 Sağlık

Yara iyileşmesi, çeşitli hücre tiplerinin, hücre dışı matriks (HDM) moleküllerinin ve çözünür bileşiklerin karmaşık etkileşimini içeren dinamik bir süreçtir (Eming ve ark., 2002). Winter (1962), yaranın nemli tutulması durumunda iyileşmenin ve özellikle yeniden epitelizasyonun hızlandığını keşfetmiştir. Benzersiz özellikleri nedeniyle BS'un oldukça etkili bir yara örtüsü malzemesi olduğu gösterilmiştir (Winter, 1962; Alvarez ve ark., 2004; Legeza ve ark., 2004; Czaja ve ark., 2006; Czaja ve ark., 2007; Stanislaw ve ark., 2012).

Jonas ve Farah (1998), BS'un "Biofill" adlı geçici bir deri ikamesi olarak etkinliği üzerinde çalışmıştır. Yanıklara ve diğer cilt yaralanmalarına uygulandığında bazı klinik sonuçları tartışmışlardır. Biofill® ameliyat sonrası azalmış rahatsızlık, daha hızlı iyileşme, ani ağrının giderilmesi, enfeksiyon oranının azalması ve en önemlisi tedavi süresinin ve maliyetinin pozitif olarak değiştiğini göstermişlerdir. Meftahi ve ark. (2010), pamuklu gazlı bezle kaplanmış, doğal selüloz filminden % 30 daha fazla su emme kabiliyeti sergileyen ve yara sargıları için daha uygun yeni bir selüloz filmi rapor ettiler. Çözünebilir karboksimetil selüloz köpük (CMCK) yara örtüsünün fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisinde rutin nazal paketlemenin (RNP) yerini aldığı bildirilmiştir (Szczygielski ve ark., 2010). Sonuçlar, CMCK yara örtüsünün RNP ile karşılaştırıldığında daha düşük lokalize ağrı ve postoperatif kanama oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

BS'un yüksek su tutma kapasitesi, toksik olmaması ve alerjik yan etkisi olmadığı için kozmetik endüstrisinde mükemmel bir biyomateryal olduğunu belirtmişlerdir (Stanislaw ve ark., 2012).



Resim 1.4. Bakteriyel selüloz sağlık uygulamaları (Hanif ve ark., 2016)

BS pellicülünün memeli hücre kültürü için bir substrat olarak uygulanabilirliği de incelenmiştir. İlk ayrıntılı rapor Watanabe ve ark. (1993) tarafından yayınlanmıştır. Membran üzerinde plastik petri kaplarında elde edilenle karşılaştırılabilecek sekiz çeşit hücre kültürü bulunmaktadır. İyonik yük, zarın pürüzlülüğü ve kolajenin adsorpsiyonu, membran yüzeyine hücresel yapışmayı destekleyen önemli faktörlerdir.

Svensson ve ark. (2005), BS pellicülü üzerindeki sığır kondrositlerinin büyümesinin, bu BS pellicülünün, sığır kondrosit proliferasyonunu kollajenden gözlemlenenen yaklaşık %50 daha fazla desteklediğini bildirmişlerdir. Daha sonra, BS filmi üzerinde insan keratinositleri ve fibroblastların büyüme yöntemi geliştirildi (Sanchavanakit ve ark., 2006). Sonuçlar BS filmde ekimden sonra yaşayan keratinositlerin ve fibroblast hücrelerinin yüzdesinin polistiren kültür plakasının sonuçlarıyla karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, sadece keratinosit hücreleri BS filminin yüzeyine yayılabilirken, proliferatif fibroblastlar kümeler oluşturur.

Olası bir neden de fibroblastların BS filmine yapışmasının kendi aralarından daha az olmasıdır (Backdahl ve ark., 2006), BS ve düz kas hücreleri (DKH) arasındaki etkileşimini incelemişlerdir. BS'nin hem kompakt hem de gözenekli taraflarına DKH'ler tutturulmuştur. BS pelikle %99 su tutar ve bu nedenle hücre büyümesi ve çoğalması için alan bırakır. Sonuçlar, DKH'nin BS filmine yapıştığını ve çoğaldığını gösterdi. 2 haftalık uygulamadan sonra 40 µm DKH büyümesi gözlenmiştir. Cai ve Kim (2010), saf BS'den daha fazla fibroblast hücre yapışması ve proliferasyonu oluşturma kabiliyeti sergileyen bir BS/PEG kompoziti rapor etmiştir. Hücre büyümesi için bir destek görevi görmeyen yanı sıra, modifiye edilmiş BC filmi yapışma önleyici ve anti-proliferatif malzeme olarak da uygulanabilir.

Extremina ve ark. (2010), antibiyotik imipenem (IPM), selüloz triasetat (STA) sıkışmış (STA-IPM) bir zarının geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bakteriyel yapışma testleri, *Staphylococcus epidermidis*'in STA-IPM'ye yapışmasında tek başına STA'ya yapışma ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu buluşla, yapışma önleyici ve çoğalma önleyici özelliklere sahip bir BS membranı, in vivo klinik durumun daha iyi bir simülasyonunu sağlayabilir.

BS'un daha önce sadece düşük enflamatuar ve yabancı cisim reaksiyonları indüklediği bildirilmiştir (Klemm ve ark., 2001; Helenius ve ark., 2006). Bu nedenle BS, geleneksel yöntemler intimal hiperplazi, zayıf kan akışı ve yüzey trombojenitesine neden olabileceğinden yeni bir biyosentetik vasküler greft materyali önermişlerdir. Fink ve ark. (2010), geleneksel vasküler greft, genişletilmiş poli tetrafloroetilen (ePTFE) ve poli etilentereftalat (PET) yerine BS kullanmış ve sonuçlar BS'un yüzeyinde daha yavaş bir pıhtılaşma sürecini gösteren en uzun gecikme süresini göstermiştir.

Klemm ve ark. (2001) ayrıca bir Bakteriyel Sentezlenmiş Selülozun (BASYS[®]) tıbbi uygulamalar amacıyla yetiştirme sırasında boru şeklinde tasarlanmıştır. Mikrocerrahi çalışmasında, BS implantları, sıçanların karotis arterinin 1 yıl boyunca yapay bir kusuruna bağlandı. Bu uzun vadeli sonuç, BS'un aktif fibroblastların neointima ve büyümesi altında birleşmesini göstermiştir (Schumann ve ark., 2009). BS halkaları domuz karotis arterine (PCA) kıyasla benzer gerilme

sonuçları (kopma stresi ve Young modülü) göstermiştir. BS fibrillerinin oryantasyonu silikon tüpün eğriliği ile daha da kontrol edilebilir (Putra ve ark., 2008).

Birçok biyomedikal uygulamada, malzemenin zamanla insan vücudu tarafından metabolize edilebilen bir ürüne dönüşeceği biyo-emilebilirlik vurgulanır. Bir biyolojik yönden resorbe edilebilir. BS, selüloz azaltan enzimlerin dahil edilmesi ile gösterilmiştir (Hu ve Catchmark 2011a ; Hu ve Catchmark 2011b). Bu durumda, çoklu selüloz yüklü BS filmleri dondurularak kurutulmuş ve bozunma davranışı incelenmiştir. BS'un yaklaşık %97'si, kullanılan selülozlar için en uygun aralıkta lokal bir pH'ı korumak için tampon bileşenlerin de BS filmine dahil edildiği durumda 7 günlük bir süre boyunca glikoza dönüştürülmüş. Bundan başka hayvan çalışmalarında kullanılabilir enzimler ile ilişkili herhangi bir istenmeyen reaksiyonlar ortaya çıkmamıştır (Hu ve ark., 2011).

BS saflığı ile birlikte yüksek bir su tutma kapasitesi, büyük esneklik, yüksek ıslak mukavemet ve uyumluluğu olarak eşsiz özellikleri biyomedikal sahasında çok sayıda uygulama ile mükemmel bir biyomateryal olduğu görülmüştür (Klemm ve ark., 2011 ; Petersen ve Gatenholm, 2011). Suni deri veya yara örtüsü gibi biyomedikal uygulamaların çoğu, BS'un sadece statik kültürlerde üretilebilen bir film veya membran olarak uygun bir şekilde olmasını gerektirir (Park ve ark., 2009). Bununla birlikte, enzim immobilizasyon tekniği olarak Wu ve Lia (2008) tarafından BS peletlerinin kullanımı (ajitasyon koşullarından kaynaklanan) üzerinde bir araştırma yapılmıştır.

BS'da yetiştirilen endotelial hücreler, düz kas hücreleri, kondrositler ve osteoprogenitör hücreler ile *yapılan* in vitro çalışmalar, iyi hücre yapışması ve malzemeye göç olduğunu göstermiştir. Ayrıca, BS'un in vivo biyoyumluluğu Helenius ve ark. (2006) ve daha sonra Mendes ve ark. (2009) tarafından gösterilmiştir. Cai ve Kim (2010) ayrıca bir BS/ PEG kompozitin yara sargısı veya doku mühendisliği iskeleleri olarak biyoyumluluğunu değerlendirmiştir. 48 saat boyunca BS/PEG iskeleleri ile inkübe edilen 3T3 fibroblast hücreleri, hücre yapışması ve proliferasyonu oluşturabilir ve saf BS'den çok daha iyi biyoyumluluk

gösterebilir. BS'un in vitro ve in vivo doku rejenerasyonu için potansiyeli hala araştırılmaya devam etmektedir ve büyük umut vaat etmektedir.

Amin ve ark. (2012b), hidrojelere BS ve akrilik asit ile üretmek için elektron ışını radyasyon tekniğini kullanmıştır. BS, hidrojele şişme özelliklerini sınırlamadan mekanik mukavemet sağlarken, akrilik asit pH duyarlılığını getirir. Termal modifikasyonla birlikte bu modifikasyonlar hidrojellerin, çeşitli yollardan hareket eden antikorlar, antibiyotikler, enzimler ve hormonların verilmesi gibi birçok biyomedikal ve farmasötik uygulamada çok yönlü malzemeler olarak kullanılmasına izin verir. Ayrıca, hidrojellerin vücut sıcaklığında azalmış bir şişlik gösterdiklerini ve bunun sıcaklık kontrollü ilaç dağıtımı için uygulanabileceğini düşündürmektedir.

2.8.2 Gıda

Okiyama ve ark. (1992a , 1993b) gıda endüstrisinde BS için koyulaştırıcı ajanlar, düşük kalorili tatlılar, salatalar ve mamul gıdalar gibi çeşitli uygulamalar önermiştir. Ksantan zankı yerine bir çikolata içeceğine %3'lük bir selüloz macunu ilave edilmiş. Viskozite karşılaştırmaları karıştırıldıktan sonra hemen hemen aynıdır, ancak ısıl işlem, ksantan sakızı içeceği için viskozitede ciddi bir düşüşe neden olurken, selüloz için herhangi bir viskozite azalması gözlenmemiştir.

Dondurmaya selüloz ilavesi, artan kayma gerilmesinin bir sonucu olarak erimeden sonra akışı önler. Selüloz macunun tofu, macun çeşnileri ve haşlanmış balık ezmesine eklendiğinde benzer sonuçlar gösterilmiştir. Bu nedenle yazarlar, BS'un gıda endüstrisinde yaygın olarak uygulanabilir olduğu sonucuna varmışlardır. BS'un "genel olarak güvenli" (GRAS) olduğu belirlenmiş ve 1992 yılında Gıda ve İlaç İdaresi tarafından kabul edilmiştir. Çeşitli gıda formülasyonlarında, özellikle düşük kullanım seviyeleri, lezzet etkileşimlerinin olmaması, köpük stabilizasyonu ve geniş pH aralığı, sıcaklık ve donma-çözülme koşullarında stabilite gerektiğinde önemli uygulamalara sahiptir. BS, sakaroz ve CMC gibi diğer ajanlarla kombinasyon halinde ürünün dispersiyonunu artırır. Potansiyel uygulamalar arasında düşük kalorili katkı maddesi, kıvam arttırıcı, stabilizatör, doku değiştirici, macun çeşnileri ve dondurma katkı maddesi bulunur.

Çizelge 2. 7. Bakteriyel selülozun gıda uygulamaları (Hanif ve ark., 2016)

Gıda ile ilgili ürün veya süreç	BS formu	BS'un Amacı	Referanslar
Nata de coco	BS dilimleri	Ana yapı	Iguchi ve ark.,2000
Düşük kolesterol diyeti	Pudralı BS	Yağ adsorban	Chau ve ark.,2008; Lin ve Lin 2004; Stephens ve ark., 1990
Vejetaryan et	BS levhalar	Yapısal bileşen, yağ adsorban	Juzlova ve ark., 1996; Purwadaria ve ark.,2010; Wonganu ve Kongruang, 2010
Hamur işi yiyecekler ve reçeller	Sulu macun	Isıya dayanıklı askıya alma ve toplu şekillendirme ajanı	Okiyama ve ark., 1992
Soya peyniri	Sulu macun	Jelleştirici ajan	Okiyama ve ark., 1993
Kamboko	Sulu macun	Sertleştirici, doku değiştirici	Okiyama ve ark.,1993
Çikolata içeceği	Sulu macun	Isıya karşı kararlılık	Okiyama ve ark.,1993
Dondurma	Sulu macun	Sertleştirici ajan, donma-çözülme sürecine karşı stabilite	Okiyama ve ark.,1993
Glukoamilaz	Boncuk	Enzimatik aktiviteyi artırmak için sağlam destek	Wu ve Lia, 2008; Wu ve ark., 2013
Şarap	BS parçaları	Maya aktivitesini artırmak için sağlam destek	Montealegre ve ark., 2012; Nguyen ve ark., 2009; Ton ve Le 2011
Mantar lakkazı	BS sünger	Lakkaz aktivitesini artırmak için sağlam destek	Chen ve ark.,2015
Yemek paketlenme	BS levhalar, film ve toz halinde BS	Hidrofobik ve antimikrobiyal paketlenme	Dobre ve ark., 2012; Jipa ve ark.,2012; Tome ve ark.,2010

Yüksek kristalliği, yüksek su tutma kapasitesi, geniş yüzey alanı, esneklik, mekanik mukavemet ve biyouyumluluk, BS'un hücre immobilizasyonu için bir destek olarak kullanılmasını sağlar (Rezaee ve ark., 2008a, b). Ton ve Le (2011a), BS üzerindeki hareketsizleştirilmiş mayaların, serbest mayalara kıyasla, şarap fermentasyonu sırasında çok daha yüksek metabolik aktivite ve olumsuz koşullara karşı direnç sergilediğini kanıtladılar. Daha sonra, Ton ve Le (2011a) şarap yapımında tekrarlanan bir parti fermentasyonu gerçekleştirmek için BS üzerinde hareketsizleştirilen şarap mayalarının uygunluğunu araştırdı. Sonuçlar, tekrarlanan kesikli fermentasyonun 10 ardışık döngüsü sırasında, hareketsizleştirilmiş mayanın şeker alım oranınının 1,71 g/l/saat' den (döngü 1) 3,28 g/l/ saate (döngü 7) yükseldiğini ve daha sonra 2,75 g/l/saat'e (döngü 10) düştüğünü gösterdi. Şarap yapımında maya immobilizasyonunun uygulanmasının, aşılama preparatındaki maliyet azalması ve mayalamanın sonunda mayanın basitçe ayrılması nedeniyle üretim hattının ekonomik etkinliğini arttırdığı sonucuna varmışlardır.

Son zamanlarda, Mikkelsen ve ark. (2011), çözünür polisakkarit içeren BS kompozitinin bir beslenme çalışmasında bitki diyet liflerinin in vitro fermentasyonu için faydalı bir model olduğunu bulmuşlardır. George ve Siddaramaiah (2012), gıda ambalaj uygulamaları için yenilebilir, biyolojik olarak parçalanabilen ve yüksek performanslı jelatin nanokompozit filmlerin üretiminde BS nanokristallerinin kullanılmasını önerdi. Benzer şekilde Yang ve ark. (2012a) gıda paketleri ve su sterilizasyonu için antimikrobiyal bir malzeme olarak BS/gümüş nanoparçacık (AgNP'ler) kompozitinin kullanılmasını önerdi. Çizelge 2.7.'de gıda uygulamaları örnekleri gösterilmiştir.

2.8.3 Kağıt

Johnson ve Neogi (1989) ajitasyon kültüründen üretilen yüksek dallı, retiküle BS peletlerinin yüksek kaliteli kağıt üretimi için uygun olduğunu bildirmiştir. Ayrıca cam elyafları, kalsiyum karbonat ve bakır tozu içeren kompozitler geliştirdiler. Yamanaka ve Watanabe (1994) ayrıca, kağıt hamuruna parçalanmış BS'un eklenmesinin daha yüksek gerilme mukavemetine sahip bir kağıt oluşturulmasını mümkün kıldığını göstermiştir.

Bakteriyel selüloz fragmanlarının da kağıt hamuru kağıtlarını güçlendirmek ve katlanma dayanıklılığını arttırmak için etkili olduğu bulunmuştur (Iguchi ve ark., 2000). BS'un %15 ilavesiyle, kompozit kağıt saf kağıt hamuru kağıdına kıyasla yaklaşık dört kat daha yüksek katlanma dayanıklılığı sergilemiştir. Ek olarak, Young modülü BS ilavesiyle 2,0'dan 3,5GPa'ya yükseltildi. Çalışmada CMC-BC kağıdının mekanik dayanımı da değerlendirilmiştir. Sonuçlar, CMC-BC kağıt tabakalarının normal kağıtlara kıyasla daha yüksek gerilme mukavemeti ve Young modülü sergilediğini göstermiştir (Cheng ve ark., 2011). Hu ve ark. (2011), anilinin oksidatif polimerizasyonu ile yerinde yeni bir iletken polianilin/bakteriyel selüloz (PANI/BC) nanokompozit membran sentezlemiştir. Gutierrez ve ark. (2012b), TiO₂ iletken özelliklerinin değerlendirilmesi nanopartiküller ve TiO₂/BC hibrit inorganik/organik lifler oluşturmuşlardır. Sonuçlar, TiO₂/BC hibrit liflerinin, uygulanan voltajın işaretinden (-3, 0 ve 3V) bağımsız olarak uygulanan yanlılığa yanıt verdiğini göstermektedir.

2.8.4 Kozmetik

Kozmetik, insan vücudunun bazı organoleptik özelliklerini iyileştirmek için kullanılan maddelerdir. Kozmetik, normal vücut fonksiyonlarını veya yapısını etkilemeden insan vücuduna uygulanan, görünüşü değiştirmek, çekiciliği arttırmak, vücut kısımlarını temizlemek veya güzelleştirmek için uygulanan ürünleri içerir (Hasan ve ark., 2012). Şu anda, kozmetiklerin çoğu müşteriler tarafından, örneğin parabenlerle ilişkili toksisite endişeleri gibi vücut üzerindeki kötü etkileri göz önünde bulundurmadan güzelliklerini artırmak için kullanılmaktadır (Nagel ve ark., 1977; Darbre ve Harvey, 2008).

Tüketicilere zararlı etkilerden kaçınmak için bitkisel veya doğal içerikler kullanan doğal cilt bakım ürünleri önerilmektedir (Hasan ve ark., 2012). Bu bağlamda, selüloz fibriller, herhangi bir yüzey aktif madde eklenmeden, su içinde yağ (O/W) emülsiyonunu stabilize etmek için kozmetikte uygulanır. Bu tür formülasyonlar, herhangi bir yüzey aktif madde bulunmadığından hassas cilt için tahriş edici olmayabilir (Hasan ve ark., 2012). BS'un kozmetikte kullanım için istisnai bir alerjenik olmayan biyopolimer olduğu da bildirilmiştir. BS yüz maskeleri, biyolojik olarak parçalanabilirliği, düşük toksisitesi ve cildi nemlendirme yeteneği nedeniyle

kuru cildi tedavi etmek için kozmetik ürünler olarak büyük ilgi görmektedir (Amnuait ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada, bir grup gönüllüden 25 dakika süreyle yüzlerine nemli havlu koymaları istenirken, ikinci gruba aynı dönem için yarı saydam BS yüz maskeleri uygulaması tahsis edilmiştir. Sonraki hafta, gruplar alternatif tedaviye değiştirildi. Cildin donukluğu, dokusu, elastikiyeti, sebum içeriği, nem içeriği ve deskuamasyon seviyeleri, havlu ve deneme ürününü uygulamadan önce ve 5 dakika sonra çıkarıldıktan sonra rutin cilt danışmanlığı için kullanılan bir sistem kullanılarak değerlendirildi. BS maskesiyle ilgili kullanıcı memnuniyeti de araştırıldı. BS maskeleri, tek bir tedavide cildin nem içeriğini nemli havlulara göre önemli ölçüde artırdı. Derinin diğer özellikleri üzerinde hiçbir belirgin etki gözlenmedi. BS yüz maskeleri, memnuniyet derecelendirme ölçeğine göre 5 üzerinden 4 civarında derecelendirilmiştir. BS maskesi, cildin nem içeriğini artırmak için kullanılabilir.

Anket tabanlı çalışmada kullanıcı memnuniyeti ile ilgili yanıtlar, BS yüz maskesinin tüketici için kabul edilebilir olduğunu ortaya koymuştur (Amnuait ve ark., 2011). Benzer şekilde, gliserin içeren ve içermeyen BS, insan deneklerde cilt tahrişi potansiyeli açısından değerlendirildi (Almeida ve ark., 2014). Hafif cilt tahrişi olan birkaç denek dışında, sıfır klinik skorla transepidermal su kaybı (yani bariyer bozulmasının olmaması) ve eritem açısından anlamlı bir fark yoktu. Dahası, gliserin ilavesi, cildi nemlendirme etkisinin önemli ölçüde daha yüksek olmasını sağladı, bu da yüz maskesini nemlendirme potansiyelini ortaya koydu (Almeida ve ark., 2014).

Bir patentte, BS yüz maskesi gözler, ağız ve burun için deliklerle üretilmiştir. Yazar, böyle bir maskenin cildi güzelleştirme amaçlı, cildi besleyici, nemlendirici ve kozmetik etkiler için tekrarlanan veya uzun süreli kullanım için uygun olabileceğini iddia etti (Zhong, 2008). Benzer şekilde, ginseng özleri içeren BS membranından oluşan yüz maskesi, 30 yaş üstü kadınlarda nem hissi, genel kullanıcı memnuniyeti ve cilt elastikiyeti açısından umut verici sonuçlar göstermiştir (Lee ve ark., 2011). Domuz derisi kullanılarak yapılan soyma testi üzerine, BS bazlı jelin kağıt maskeye göre biyolojik olarak uyumlu ve daha az yapışkan (ağrısız soyulmuş) olduğu ortaya çıktı (Aramwit ve Bang, 2014).

Çizelge 2. 8. Bakteriyel selülozun kozmetik uygulamaları (Hanif ve ark., 2016)

Kozmetik ürün	BS formu	BS'un Amacı	Referanslar
Yüz maskesi	BS levhalar	Nemlendirici	Amnuait ve ark., 2011
Yüz maskesi	BS-gliserin kompozitler	Nemlendirici	Almeida ve ark., 2014
Yüz maskesi	BS membranı	Nemlendirici	Zhong, 2008
Yüz maskesi	BS-ginseng	Nemlendirici ve taşıyıcı	Lee ve ark., 2011
Yüz maskesi	BS-serisin kompozitler	İpek serisin için nemlendirici ve taşıyıcı	Aramwit ve Bang, 2014
Yüz fırçası	Pudralı BS	Viskozite arttırıcı	Hasan ve ark., 2012
Yüz fırçası	BS parçaları	Nemlendirici, sebum emici ve cilt peelingi	Lin ve ark., 2015
Kozmetik olarak aktif bileşenler için taşıyıcı	BS parçaları	Kozmetik olarak aktif bileşenin cilt yüzeyi ile temas süresini uzatır	Lin ve ark., 2015
Fondöten makyajı	BS parçaları	Daha az sayıda rötuş ve daha az miktar gerektiren stabil makyaj	Lin ve ark., 2015
Kişisel temizlik ürünü	BS lifleri	Hassas ciltler için yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon	Ougiya ve ark., 1997
Kişisel temizlik ürünü	BS parçacıkları	Temizleme ve pul pul dökülme	Heath ve ark., 2012
Kontakt lens	Rejenere BS	Film oluşturan ajan	Levinson ve Glonek, 2010
Kontakt lens	BS bazlı hidrojel	Film oluşturan ajan	Li ve ark., 2010

Hazırlanan jel, ilaçlı kozmetiklerde kırışıklık önleyici, yaşlanma önleyici ve nemlendirici yüz maskesi gibi potansiyel uygulamalar bulabilir. Yukarıdaki çalışmaları göz önünde bulundurarak, bahsedilen uygulamaya ek olarak, BS bazlı membranların ayrıca kseroz, atopik dermatit ve sedef hastalığı dahil olmak üzere çeşitli cilt durumlarının tedavisinde de kullanılabileceğini ve böylece farmakoterapiye ek olarak nemlendirici etkiye ihtiyaç duyulduğunu belirtmek gerekir.

Toz BS ve zeytinyağı, askorbik asit (Vitamin C), aloe vera özütü ve toz haline getirilmiş yapışkan pirinç gibi doğal bileşenler içeren bir yüz yıkama jeli formüle edilmiştir (Hasan ve ark., 2012). Hem ticari hem de formüle edilmiş yüz yıkama jelleri, plaka-plaka reometresini kullanarak kesme incelmesi davranışı gösterir (Newtonian olmayan sıvı). Formüle edilmiş yüz yıkama jelleri, ticari olana kıyasla daha düşük kesme hızlarında nispeten daha yüksek viskoziteye sahiptir, ancak her ikisi de daha yüksek kesme oranlarında neredeyse karşılaştırılabilir viskozitelere sahiptir. Test edilen numuneler 30°C'de 10 dakika sonra kuruma kapasitesine sahiptir.

Ana bileşen olarak BS içeren bu yeni formüle edilmiş yüz peelingi, doğal içerikli yüz fırçalamanın geliştirilmesi için kozmetik formülatörlerinin dikkatini çekiyor ve cilt için güvenli hale getiriyor. Ayrıca Lin ve ark. (2015), ağırlıkça % 0,05-1,0 aralığında BS film parçalarını içeren kozmetik olduğunu iddia etti. Kozmetikte BS fragmanlarını ekleyerek sadece kozmetikte bulunan aktif bileşenlerin transdermal nüfuzunu iyileştirmekle kalmadı, aynı zamanda cildi nemlendirme işlevi, sebum emilimi ve cilt soyulmasını da sağladı. Yüksek su tutma kapasitesi ve iyi gaz geçirgenliği nedeniyle BS'un, salisilik asit gibi nemlendiriciler veya kojik asit veya ursolik asit gibi hiyalüronik asit beyazlatıcı bileşenler, kırışıklık önleyici gibi kozmetik açıdan aktif bileşenler için uygun bir taşıyıcı olduğu da iddia edilmiştir. Ayrıca yazarlara göre BS bazlı formülasyon, dudak, cilt ve tırnak bakım ürünleri ve uzun ömürlü parfüm tasarımında kapsamlı uygulamalar bulabilir (Lin ve ark. 2015; Tournilhac ve Lorant, 2003).

Kişisel temizlik formülasyonlarının amacı kiri temizlemek, sebumu ve eksojen kirleticileri azaltmak ve kötü koku ve cilt mikroflorasını kontrol etmektir. Hijyenik

faydalara ek olarak, bu tür formülasyonlardaki yüzey aktif maddeler cilt bileşenlerine zarar verir ve yıkamadan sonra stratum korneumda dolaşabilir (Kuehl ve ark., 2003; Walters ve ark., 2012). Bu, özellikle hassas cilt durumunda alerjik reaksiyonlara ve cilt tahrişine yol açabilir (Draelos ve ark., 2013; Kuehl ve ark., 2003). Bu bağlamda, çalkalanmış kültür koşullarında (Ag-BS) biyosentezlenen BS, incelenen tüm selüloz bazlı malzemeler arasında O / W emülsiyonu için en yüksek stabilize edici etkiyi sergilemiştir (Ougiya ve ark 1997).

BS ince fibrillerin, bir iskele yapısı ve mekanik bir bariyer görevi görerek yağ damlacıklarının birleşmesini kesintiye uğrattığı kanıtlandı. Bu nedenle emülsiyon, yüzey aktif maddeler (örn., Sorbitan monolorat) durumunda olduğu gibi ara yüzey gerilimini azaltmadan stabilize edildi. Daha ince fibrilleri sayesinde Ag-BS, diğer selüloz bazlı malzemelerden mekanik bariyer formundaki yağ damlacıklarının daha geniş bir yüzey alanını koruyacaktır. Ayrıca bu emülsiyon, sıcaklık ve pH değişimlerine karşı ve ksantan zamkı ve sorbitan monolorat bazlı formülasyonlara kıyasla tuz ilavesine karşı da stabildi. Bu O/W tipi emülsiyonun potansiyel uygulamalarından biri, özellikle hassas ciltler için vücut parçalarını temizleme ürünlerinin formülasyonu olabilir.

Bir patentte, hem BS ağı hem de katyonik bir polimer, örneğin katyonik nişasta türevleri ve katyonik selüloz türevleri veya bunların karışımlarını içeren sıvı matris, yani su, bir köpükleştirici yüzey aktif madde ve bir harici yapılandırma maddesinden oluşan kişisel bir temizleme formülasyonu talep edilmiştir (Heath ve ark., 2012). Bu tür bileşimler, herhangi bir istenmeyen ince ince tabaka veya sümüksü el hissi olmaksızın iyi köpürme ve kolayca durulama özellikleri sağladı. Partiküllü maddelerin varlığı, ciltte herhangi bir tahriş veya hasar olmaksızın, yumuşatma yararları ile temizliği ve pul pul dökülmeyi iyileştirir. Yaklaşık pH 4,0 değerinin altında salisilik asit formülasyonları için özellikle tercih edilir (Heath ve ark., 2012). Bu tür formülasyon, özellikle tüketicinin el hissini önemli olduğu vücut kısımlarında herhangi bir tahriş olmaksızın hassas ciltler için vücut temizliği için kullanılabilir. Bu tür formülasyonlar cilt lekelerini ve sivilceleri temizlemek ve önlemek için kullanılabilir. Bunlar aynı zamanda pul pul dökülme veya aşırı cilt büyümesi olan cilt durumlarının tedavisi için de kullanılabilir (Heath ve ark., 2012).

2.8.5 Diğer Uygulamalar

Yamanaka ve Watanabe (1994), ilk gıda dışı değeri yüksek uygulama olan akustik transdüserler alanındaki BS ve kompozitlerinin potansiyel ve olası uygulamalarını bildirmiştir. Young Modül olarak ölçülen BS'un olağanüstü şekil tutma kabiliyeti, malzemenin yüksek iç kaybı ile birleştiğinde, hoparlör diyaframları için idealdir. Yeni diyaframlar iki ayırt edici özellik gösterdi: yüksek sonik hız ve düşük dinamik kayıp ve Sony Corp tarafından hoparlörler ve kulaklıklar olarak pazarlandı (Iguchi ve ark., 2000).

BS'un bir filtrasyon malzemesi olarak spesifik uygulaması Takai (1994) tarafından incelenmiştir. PEG, CMC, karboksimetil kitin ve diğer selüloz esaslı polimerler gibi çeşitli polimerler, materyalleri basitçe başlangıç ortamına ilave ederek selüloza dahil edildi. Bu polimerlerin bazıları çok yüksek çözünen reddi gösterdi, bu da onları ultrafiltrasyon ve pervaporasyon için yararlı kılar.

Başka bir çalışma, BS'un filtrasyon özelliklerinin değerlendirilmesine odaklandı ve diyaliz membranı olarak yararlılığını test ettiler (Shibazaki ve ark., 1994). Rejenere selülozdan yapılan ticari bir diyaliz membranı ile karşılaştırıldığında, BS filmi önemli ölçüde daha yüksek bir nüfuz etme oranı ve daha büyük bir moleküler ağırlık kesmesi gösterdi. Malzemenin rejenere selüloz ile karşılaştırıldığında ilave bir yararı, ilave mekanik mukavemetin daha ince bir zarın kullanılmasına izin vermesiydi. Yeni BS kompozitlerini yapmak için diğer bileşenlerle modifikasyon ve dahil etme, BS uygulamalarının spektrumunu genişletir. Bir grafit film, BS'un pirolizi ile hazırlanmıştır (Yoshino ve ark., 1996). Çok yüksek elektrik iletkenliğine sahip, oldukça grafitize edilmiş bir film, 2.900 ° C'de piroliz ile yapılmıştır.

Shah ve Brown (2005), iletken yol sağlamak için mikrofibrillerin etrafına iyonlar bırakarak ve daha sonra mikro yapı içindeki elektrokronik boyaları hareketsiz hale getirerek bir elektrik iletken (veya yarı iletken) BS tabakası ürettiler. Cihazın e-kitap tabletleri, e-gazeteler, dinamik duvar kağıtları, yeniden yazılabilir haritalar ve öğrenme araçları gibi çeşitli uygulamalara yayılma potansiyeli vardır.

Çizelge 2. 9. Bakteriyel selülozun diğer uygulamaları (Lin ve ark., 2013)

Tür	Açıklama	Referanslar
Akustik dönüştürücü diyafra		
Akustik hoparlör diyafra	BS membranı akustik filmleri işlemek için uygulanabilir	Yamanaka ve Watanabe, 1994; Iguchi ve ark., 2000
Filtreleme		
Filtrasyon malzemesi	Ultraretiküler yapısını kullanarak kirliliği süzmek için kullanılır	Takai, 1994; Chen ve ark., 2009a, b
Diyaliz zarı	Çözünen maddeler veya ozmoz ile difüzyon için kullanılabilir	Shibazaki ve ark., 1994
Elektriksel iletkenlik uygulaması		
Elektronik kağıt	BS, nanoaltın ve nanokarbon gibi nanopartiküller ile birleştirilirse iyi bir elektrik iletkenliği sergiler.	Hu ve ark., 2011; Gutierrez ve ark., 2012a, b; Choi ve ark., 2012; Ifuku ve ark., 2009; Sun ve ark., 2010; Kang ve ark., 2012; Shah ve Brown 2005; Zhang ve ark., 2011; Nogi ve Yano 2008; Legnani ve ark., 2008; Ummartyotin ve ark., 2012
Diğer uygulama		
Enzim immobilizasyonu	BS, enzimi kullanarak immobilize etmek için iskele sağlar, BS yüzeyinde kimyasal modifikasyon	Wu ve Lia, 2008
Fotokataliz uygulaması	Modifiye BS, CdS elementi ile birleştirilerek sağlam görünür ışığa duyarlı fotokatalistler olarak umut verici bir adaydır.	Yang ve ark., 2011
Biyosensör	Biyoreaksiyonu tespit etmek için biyosensör olarak	Feng ve ark., 2012; Yang ve ark., 2012c; Vitta ve ark., 2010

Yoon ve ark. (2006) ayrıca yüksek elektrik ileten polimerik membranlar üretmek için BS pelliküllerine çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT'ler) dahil etmiştir. Başka bir uygulama amperometrik glikoz sensörü bir zar gibidir (Ammon ve ark. 1995). Hem in vitro hem de in vivo testler BS ve ahşap selülozdan yapılan sensörleri karşılaştırdı. Tüm veriler, BS'dan yapılan membranların, ahşaptan yapılanlardan altı ila yedi kat daha uzun süre dayanıklı olduğunu gösterdi.

BS uygulamaları pelet tipini nadiren kullansa da, BS boncukları (0,5-1,5 mm) enzim immobilizasyonu için bir substrat olarak da kullanılmıştır (Seo ve ark., 2009). Hareketsizleştirilmiş glukoamilaz, pH değeri ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı stabilitesini göstermiştir.

Seo ve ark. (2009), bölmesiz bir mikrobiyal yakıt hücresi (NCMFC) rapor etmiş ve katot materyali olarak yarı geçirgen selüloz asetat filmi benimsemiş olup, protonları seçici bir şekilde tutabilmekte ve böylece anot ve katot arasındaki redoks potansiyel farkını muhafaza edebilmektedir. Selüloz asetatın hidrofilikliğı de değiştirilebilir.

Matama ve ark. (2010), tasarlanmış bir kütinazların, hidroksil grubunun selüloz asetat elyafları üzerine ikame derecesini geliştirebileceğini bildirmiştir. Fiber yüzeyindeki hidroksil gruplarında bir artış, 24 saatlik bir işlemde sonra sırasıyla diasetat için %25 ve triasetat için %317 idi. BS uygulamalarındaki son eğilimler, bu biyomateryalin çok yönlülüğünü artıran yeni nano kompozitlerin oluşumunda yatmaktadır. Mikro/ nano partiküllerinin farklı tipte selüloz lifler oluşması sırasında bakteriler, kültür ortamı içinde süspansiyon haline edilebilir (Grande ve ark., 2009; Sun ve ark., 2010; Trovatti ve ark., 2010; Zhijiang ve Guang, 2011; Ashori ve ark., 2012; Yang ve ark., 2012c).

Bakteriyel selüloz nanokompozitlerinin in situ biyoprodüksiyon ve bileşimi hakkında bir patent de bulunmaktadır (Laborie ve Brown, 2008). Elektronik cihazlarda BS kullanımı ile ilgili kapsamlı çalışmalar vardır (Nogi ve Yano, 2008 ; Feng ve ark., 2012; Juntaro ve ark., 2012). Son çalışmalar ayrıca esnek optoelektronik ve fotonik cihazlar için nanoselülozun substrat olarak potansiyelini ortaya koydu. Legnani ve diğ. (2008), SiO₂ esnek bakteriyel selüloz sayfasını kullanarak bir

organik ışık yayan diyot (OLED) aygıtı hazırlamıştır. Maksimum ışıma 1200 cd/m olarak ölçülmüştür. Ummartyotin ve ark. (2012) ayrıca substrat olarak şeffaf bir bakteriyel selüloz nanokompozit film kullanılarak OLED ekranın başarılı bir şekilde üretildiğini bildirmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasallar

NaCl (Merck), Glikoz (Merck), Yeast Ekstrat (Lab M), Pepton (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), Sikloheksimid (Sigma), Agar-Agar (Merck), Bromkresol purple (Sigma), Sükröz (Merck), Maltoz (Merck), Fruktöz (Riedel d.h), Mannitol (Merck), Arabinoz (Merck), İnülin (Alfasol), Galaktoz (Merck), Sorbitol (Merck), Dipotasyum fosfat (Merck), Lisin Iron Agar (Fluka), Urea broth (Fluka), Jelatin (Merck), Sitrik asit (Merck), Laktoz (Merck), Krisatal viole, Lugol (Merck), Etanol (Merck), Bazik Fuksin, Hidrojen peroksit %30'luk (Merck), Buffered pepton (Himedia), Metil red (Merck), KOH (Merck), α -naftol (Merck), Lisin Iron Agar (Fluka), Urea Broth (Fluka).

3.1.2 Örnek temini

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan kombucha mantarı ve ev yapımı olarak üretilen sirke kullanılmıştır.

3.1.3 Besi ortamları ve hazırlanışı

1- Hestrin- Schramm Broth

Glikoz	20g/L
Yeast Ektract	5g/L
Pepton	5g/L
Disodyum hidrojen fosfat	2,7g/L
Sitrik Asit	1,15g/L
Distile su	pH 6,0± 0,02

Bu besiyeri bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Besiyeri malzemeleri tartıldıktan sonra distile su eklenip karıştırıldıktan sonra pH ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri tüplere 5ml olacak şekilde dağıtılmıştır ve otoklavda 121° C'de 15 dakika steril edilmiştir.

2- Hestrin-Schramm Agar

Glikoz	20g/L
Yeast Ektract	5g/L
Pepton	5g/L
Disodyum hidrojen fosfat	2,7g/L
Sitrik Asit	1,15g/L
Sikloheksimid	50 mg/L
Agar	15g/L
Distile su	pH 6,0± 0,02

Bu besiyeri bakteri izolasyonunda kullanılmıştır. Besiyeri malzemeleri tartıldıktan sonra erlen içerisine alınmıştır ve üzerine distile su eklenip karıştırılmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH'sı ayarlandıktan sonra agar eklenmiştir ve tekrar karıştırılmıştır. Besiyeri 121° C de 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril edilmiş petrilere besiyeri dağıtılmıştır.

3- Karbonhidrat Fermentasyon Ortamları

Yeast Ektract	5g/L
Pepton	5g/L
Disodyum hidrojen fosfat	2,7g/L
Sitrik Asit	1,15g/L
Bromkresol purple	% 0,04g
Karbonhidratlar	% 2g
Distile su	

Bu besiyeri identifikasyon testi için kullanılmıştır. Karbonhidratları eklemeden bu besiyeri hazırlandı. Daha sonra tartımı ayrı ayrı yapılan karbonhidratlar (glukoz, sükroz, maltoz, fruktoz, mannitol, laktoz, arabinoz, inülin, galaktoz ve sorbitol) eklendi ve tüplere 2ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C de 5 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavlanamayan karbonhidratlar için filtre kullanılarak besiyeri steril edilmiştir.

4- Jelatin Agar

Pepton	5g/L
Meat ekstrakt	3g/L
Jelatin	4g/L
Agar	15g/L
Distile su	pH 7,4± 0,02

Bakterilerin jelatinaz aktivitelerini gözlemlemek amacıyla hazırlanmıştır. Tüplere 5ml bölünen besiyeri karıştırıldıktan sonra pH'sı ayarlandı. Besiyeri 121°C de 15 dakika otoklavlanmıştır.

5- Lysin Iron Agar

Lysin Iron Agar	32g/L
Distile su	

Bakterilerin lizin kullanıp kullanmadığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Hazırlanan besiyeri tüplere 5ml bölünüp 121° C de 15 dakika otoklavlandı. Besiyerinin donması için 45°lik açıyla yatık agar hazırlandı.

6- Urea Broth

Urea broth	38,7g/L
Distile su	

Bakterilerin üreli ortamdaki gelişim durumlarını incelemek için kullanıldı. Hazırlanan besiyeri uygun filtre kullanılarak steril edildi ve tüplere 5ml olacak şekilde bölündü.

7- Glukoz Fosfat Pepton

Buffered Pepton	7g/L
-----------------	------

Dekstroz	5g/L
Dipotasyum fosfat	5g/L
Distile su	pH 6,9± 0,02

Bu besiyeri metil red ve voges proskauer testleri için hazırlandı. Hazırlanan besiyerinin pH'sı ayarlandıktan sonra tüplere 5ml olacak şekilde bölünüp 121° C de 15 dakika otoklavlandı.

3.1.4 Çözeltiler ve Boyalar

1- Fizyolojik Tuzlu Su

NaCl	0,85g
Distile su	100ml

2- Metil Red İndikatörü

Metil red	0,1g
Etil alkol	300ml
Distile su	200ml

3- %70'lik Etanol

Etil alkol	70ml
Distile su	30ml

4- %4'lük NaOH Çözeltisi

NaOH	4g
Distile su	100ml

5- α -naftol Çözeltisi

α -naftol	5g
Etil alkol	100ml

6- %40' lık KOH Çözeltisi

KOH	40g
Distile su	100ml

7- Kristal Violet Boyası

1-Kristal viole	2g
%95'lik etanol	20ml
2-Amonyum okzalit	0,8g
Distile su	80ml

Bu iki çözelti hazırlandı ve karıştırıldı.

8- Bazik Fuksin Boyası

Bazik fuksin	1g
Distile su	1L

3.2 YÖNTEM**3.2.1 Bakteri İzolasyonu**

Kombucha mantarı çayından ve ev sirkesi örneklerinden bakteri suşlarının izolasyonunun yapılması işlemi için kültür yöntemi kullanıldı. HS broth besiyerine (pH: 6,0 \pm 0,02) iki paralel olmak üzere çaydan ve sirkeden 1ml alınıp sıvı besiyerine eklendi. Bakterilerin ortam koşullarına uyum sağlaması ve çoğalması için 24 saat

boyunca 30°C’de inkübasyona bırakıldı. Bu tüplerden HS agara drigalski yardımıyla yayma ekim yapıldı ve 48 saat 30°C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında koloniler morfolojik olarak değerlendirildi ve seçilen kolonilerin her birinden HS Broth besiyerine ekildi. Tüpler 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakıldı. Aktifleşen kültürler Gram boyama yöntemi kullanılarak mikroskopik olarak inceleme yapıldı. Gram negatif basil görülen tüplerden HS Agara çizgi ekim yapıldı. Koloniler tekrar seçilip HS Broth besiyerine aktarıldı ve 30°C de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Aktifleşen kültürden Gram boyama yapıldıktan sonra stok almak amacıyla ikinci aktiflik yapıldı. İnkübasyon sonrasında 600µl steril gliserol içerisine 400µl kültür eppendorf tüplerine eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra ağızları parafilmlelenerek -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.2 Bakterilerin İdentifikasyonu

Bakterilerin tanımlanması için klasik ve biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinden yararlanıldı. Bu yöntemleri belirlemek için Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (1984) kitabından yararlanıldı.

3.2.2.1 Morfolojik Özellikleri

Bakterilerin koloni morfolojisini gözlemledikten sonra Gram boyama yapılarak mikroskop morfolojileri incelendi. Sıvı besiyerinden alınan izolatlar lam üzerine yayıldıktan sonra kurutulup bek alevinden geçirilerek fiksasyonu yapıldı. Hazırlanan preparat kristal viole ile 1 dakika boyunca muamele edildi ve distile su ile yıkandı. Daha sonra preparat lügol çözeltisinde 1 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı. Preparat etil alkol içerisine daldırılarak 10-15 saniye muamele edildikten sonra distile su ile tekrar yıkandı. Son olarak preparat bazik fuksin ile 30 saniye boyandı ve distile su ile yıkandı. Havada kurutulan preparatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta görüntülendi (10X, 40X ve 100X).

3.2.2.2 Biyokimyasal Özellikleri

Tür tanımlama için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) ve Sievers, M. ve Swings, J. (2015) kriterleri referans alınarak sonuçlar buna göre belirlenmiştir.

Karbonhidrat fermentasyonu

Bakterilerin hangi şekerleri fermente edebildiği metabolizmanın bulunduğu o bakteri suşu için oldukça önemlidir. Bakterinin üreyebileceği besiyerine testi yapılacak olan karbonhidratlar (glukoz, sükroz, maltoz, fruktoz, mannitol, laktoz, arabinoz, inülin, galaktoz ve sorbitol) ayrı ayrı eklendi. İnkübasyon sonunda şekeri fermente ettiyse ortam pH'sı 5,5 sınır değerinin altına düşmektedir. Saf kültürlerden tek karbonhidrat içeren ortama inokülasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında besiyerinin sarı renge dönmesi pozitif, renk değişimi olmaması negatif olarak değerlendirildi.

Katalaz testi

Tüp içindeki sıvı besiyerinde geliştirilen mikroorganizmalar öze yardımı ile alındı ve temiz bir lam üzerine konuldu. Üzerine %30'luk H₂O₂ ilave edildi ve karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının olması pozitif olarak değerlendirildi.

Üre testi

Üre broth besiyeri hazırlandı ve öze ile inokülasyon yapılarak 24 saat boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Besi ortamındaki renk değişimi gözlemlendi. Besiyerinin rengi pembeye dönerse pozitif, her hangi bir değişiklik olmazsa negatif olarak değerlendirildi.

Lisin dekarboksilaz testi

Lisin iron agar hazırlanarak tüplere bölündü ve otoklavlandı. 45°'lik açıyla besiyerinin donması beklendikten sonra yatık agarın hem yüzeyine sürme hem de dibine daldırma işlemi yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında tüplerin dip kısmında sarı renk olması negatif, viole olması pozitif, siyah olması ise H₂S olduğunu gösterir. Yatık agarın yüzeyinde kırmızı- kahverengi renk oluşumu lisin deaminasyonunu olarak değerlendirildi.

Metil red testi

Glukoz fosfat pepton besiyerine inokülasyon yapılarak 30°C’de 96 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine hazırlanan metil red çözeltisinden birkaç damla eklendikten sonra karıştırıldı. Belirgin kırmızı bir renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Voges proskauer testi

Glukoz fosfat pepton besiyerine besiyerine inokülasyon yapılarak 30°C’de 96 saat inkübasyona bırakıldı. Üzerine %40’lık KOH hazırlandı ve ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra içerisine çok az miktarda α -naftol çözeltisi damlatıldı. 15 dakika içinde sıvının üst yüzeyinde kırmızı halka oluşumu pozitif, halkanın oluşmaması negatif olarak değerlendirildi.

Jelatinaz testi

Jelatinli besiyerinde üreyen bakterilerin jelatinaz aktivitesi varsa koloni etrafında zon oluşumu gözlemlenir. Mikroorganizma iğne öze ile alınıp tüpün içindeki besiyerine batırıldı. 24 saat geçtikten sonra her gün düzenli olarak kontrol edildi. Koloni etrafında jelatinin dekompoze olarak yarı sıvı kıvamına gelmesi incelendi. Jelatinde böyle bir sıvılaşıma pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3 BS Saflaştırma

HS broth besiyerinde oluştuğu gözlemlenen selüloz partikülleri santrifüj tüplerine alındı ve 4000g’de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Kalan kültürü uzaklaştırmak amacıyla deiyonize su ile yıkandı. Selüloz içerisine hapsolmuş bakterileri uzaklaştırmak için 30 dakika boyunca 80°C’de 0,1M NaOH ile işlendi. Çözelti süzüldü ve içerindeki selülozlar alınıp %5’lik asetik asit ile nötralleştirildi. Son olarak distile su ile bolca yıkandı ve kurutma işlemi için hazırlandı.

3.2.4 BS Karakterizasyonu

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Kurutulmuş bakteriyel selüloz örneklerinin FT-IR analizi Thermo Scientific Nicolet IS50 cihazı ile HİTÜ Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapıldı.

Su Absorbsiyon Oranı (SAO)

Kuru BS numuneleri distile su içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 100 rpm'de sürekli olarak karıştırıldı. Kuru ağırlıkları bilinen örnekler distile su içerisinden alındı ve hızlıca kurutma kağıdına bırakılıp alındı. Numunelerin tartımı yapıldı. Su absorpsiyon oranı aşağıdaki formül ile hesaplanır:

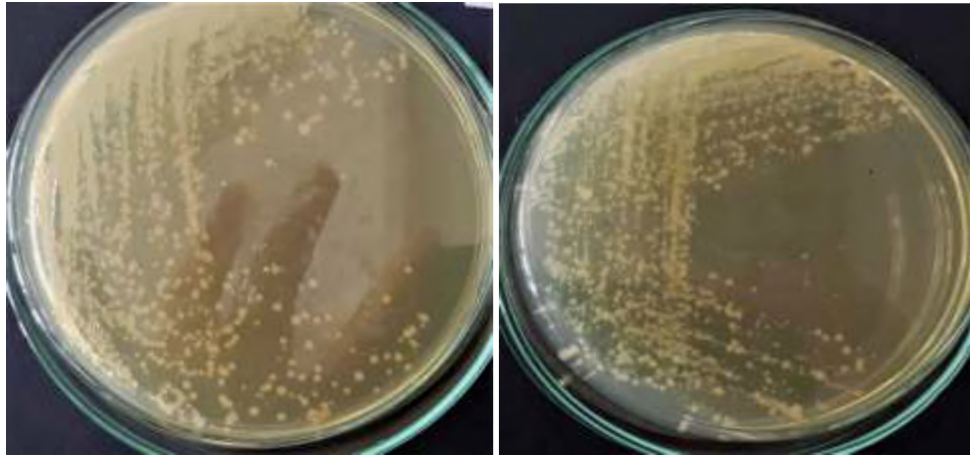
$$SAO (\%) = \frac{W1 - W}{W} \times 100$$

W (g), kuru BS numunesinin ağırlığıdır; W1 (g), BS suyu emdikten sonraki ağırlığıdır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1 Mikroorganizma İzolasyonu Sonuçları

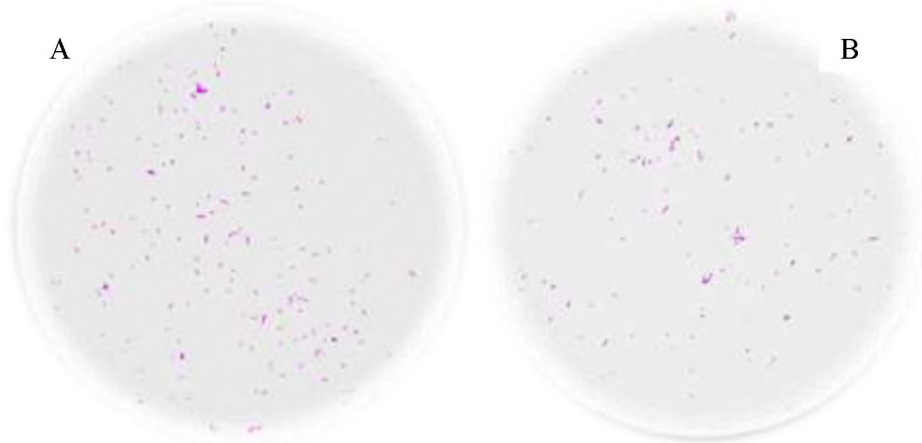
Çalışmamızda kombucha mantarı ve ev yapımı sirkeden bakteriyel selüloz üretmi yapabilen mikroorganizmaların izolasyonu yapıldı. Kombucha ve ev sirkesinden alınan örnekler ile yapılan çalışmalar sonucunda toplam 13 suş izole edildi. İzole edilen mikroorganizmalar krem renkli, mukoz yapıda ve konveks koloni morfolojisine sahiptir.



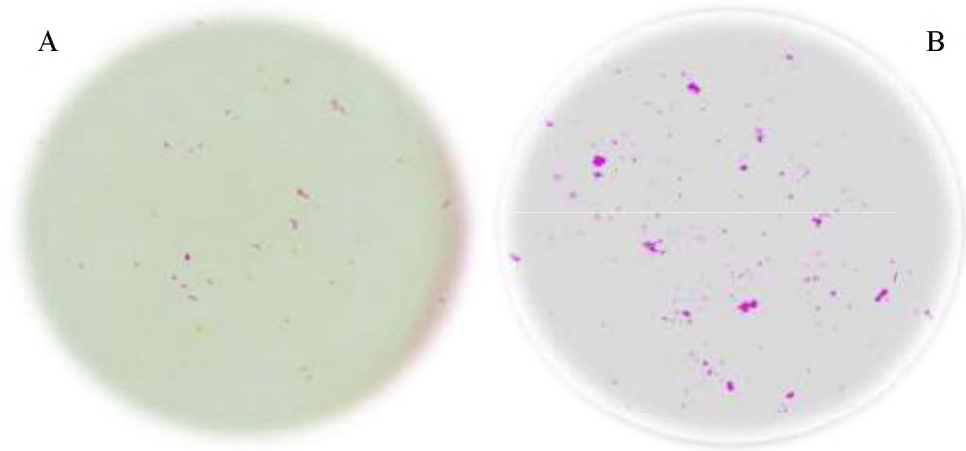
Resim 4. 1 Koloni morfolojisi örnekleri

4.1.1 Gram boyama sonuçları

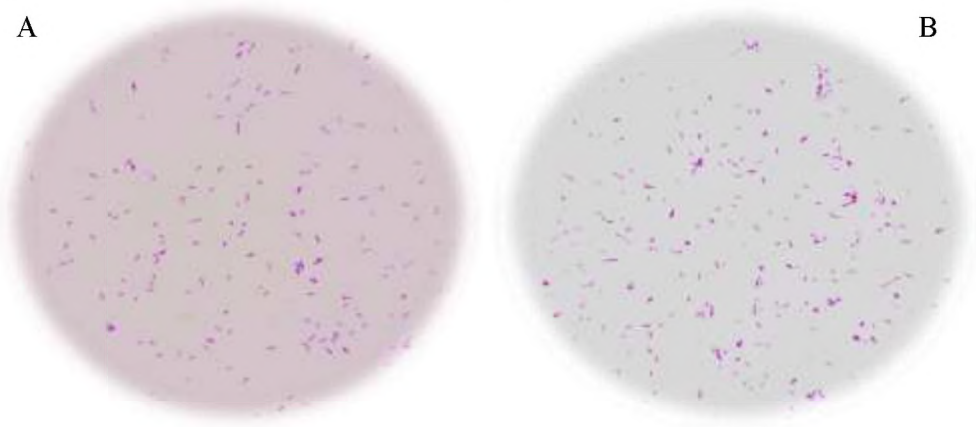
Yapılan gram boyama sonuçlarında mikroorganizmaların gram negatif ve kısa basil morfolojide olduğu görülmüştür.



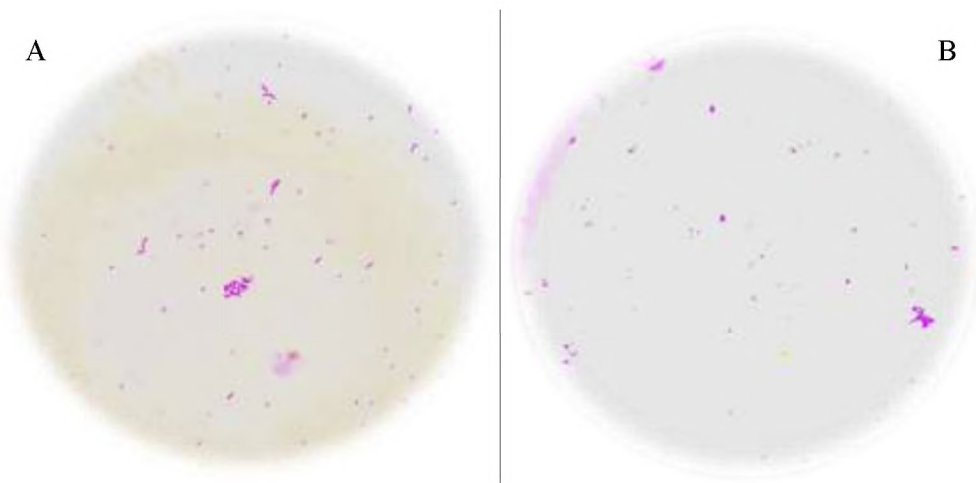
Resim 4. 2.YNT-1 (A) ve YNT-2 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



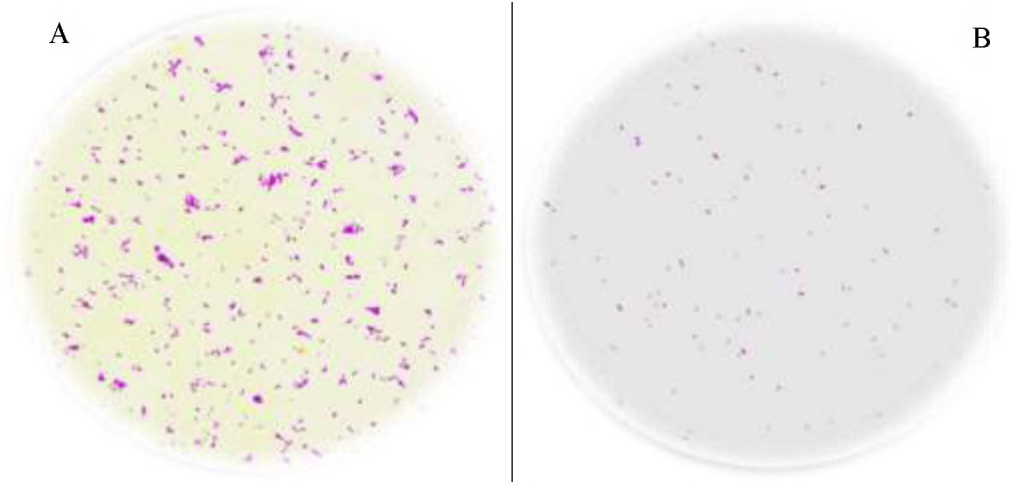
Resim 4. 3. YNT-3(A) ve YNT-4 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



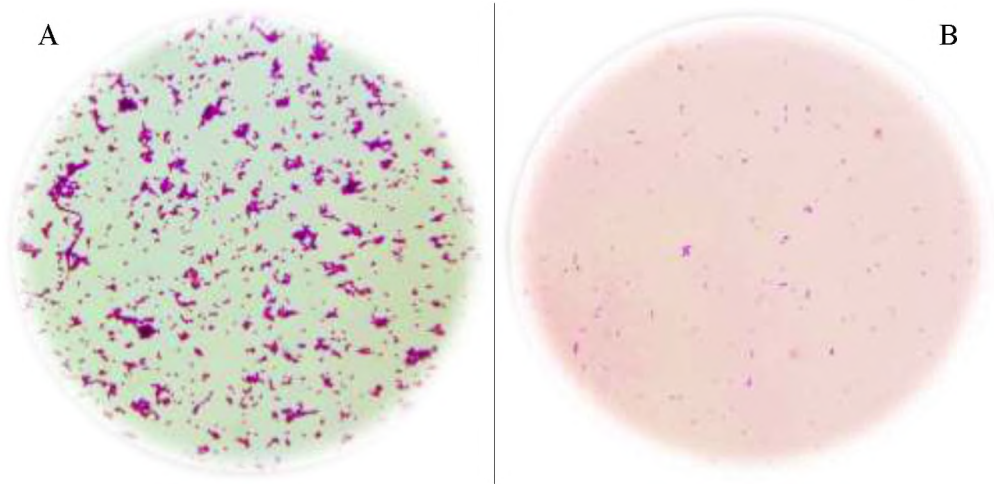
Resim 4. 4. YNT-5 (A) ve YNT-6 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



Resim 4. 5. YNT-8 (A) ve YNT-11/1a (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



Resim 4. 6. YNT-11/1b (A) ve YNT-12 (B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



Resim 4. 7. YNT-14/1b(A) ve YNT-14/2a(B) suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri



Resim 4. 8. YNT-14/2b suşunun ışık mikroskobu görüntüsü

4.1.2 Biyokimyasal Test Sonuçları

Karbonhidrat fermentasyon sonuçları ve biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4. 1. İzolatların karbonhidrat fermentasyonu sonuçları

KH Suşlar	Glukoz	Galaktoz	Fruktoz	Inositol	Sorbitol	Mannitol	Arabinoz	Laktoz	Sakkaroz	Maltoz
YNT-1	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
YNT-2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	±
YNT-3	+	-	±	-	+	+	-	-	±	-
YNT-4	+	±	+	-	+	+	+	+	+	-
YNT-5	+	+	±	+	-	+	+	+	±	-
YNT-6	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
YNT-8	+	-	±	+	-	+	-	+	+	-
YNT- 11/1a	+	-	-	-	±	-	+	±	-	-
YNT- 11/1b	+	±	±	-	+	-	+	-	+	±
YNT-12	+	+	-	-	±	+	+	-	+	+
YNT- 14/1b	+	+	-	-	±	+	+	-	+	+
YNT- 14/2a	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
YNT- 14/2b	+	±	±	-	-	+	+	+	-	+

+: pozitif, -: negatif, ±:değişken

Çizelge 4. 2. İzolatların biyokimyasal özellikleri

Testler Suşlar	Katalaz	Üreaz	Metil Red	Voges Proskauer	Lisin Dekarbok- silaz	Jelatin
YNT-1	+	-	-	-	-	-
YNT-2	+	-	-	-	-	-
YNT-3	+	-	-	-	-	-
YNT-4	+	-	-	-	-	-
YNT-5	+	-	-	-	-	-

Çizelge 4. 2. İzolatların biyokimyasal özellikleri (Devam)

Testler Suşlar	Katalaz	Üreaz	Metil Red	Voges Proskauer	Lisin Dekarbok -silaz	Jelatin
YNT-6	+	-	-	-	-	-
YNT-8	+	-	-	-	-	-
YNT- 11/1a	+	-	-	-	-	-
YNT- 11/1b	+	-	-	-	-	-
YNT-12	+	-	-	-	-	-
YNT- 14/1b	+	-	-	-	-	-
YNT- 14/2a	+	-	-	-	-	-
YNT- 14/2b	+	-	-	-	-	-

+: pozitif, -: negatif

Yapılan karbonhidrat fermentasyon ve diğer biyokimyasal testler literatürdeki veriler ve Sievers ve Swings (2015) kriterleri ile kıyaslandığında, izole edilen 13 suşun 4 tanesi *Gluconacetobacter xylinus*, 3 tanesi *Gluconacetobacter hansenii*, 2 tanesi *Gluconacetobacter oxydans*, 2 tanesi *Gluconacetobacter sucrofermentans* ve 2 tanesi *Acetobacter tropicalis* türü ile benzerlik göstermektedir. Benzerlik oranları Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3 İzole edilen suşların benzerlik oranları

Suşlar	Benzerlik Oranları (%)
YNT-1, YNT-2, YNT-4, YNT-5	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> (% 98- 99)
YNT-3, YNT-8, YNT-14/2a	<i>Gluconacetobacter hansenii</i> (% 87- 95)
YNT-11/1b, YNT-14/1b	<i>Gluconacetobacter oxydans</i> (% 77- 82)
YNT-12, YNT-14/2b	<i>Gluconacetobacter sucrofermentans</i> (% 87- 90)
YNT-11/1a, YNT-6	<i>Acetobacter tropicalis</i> (% 84- 89)

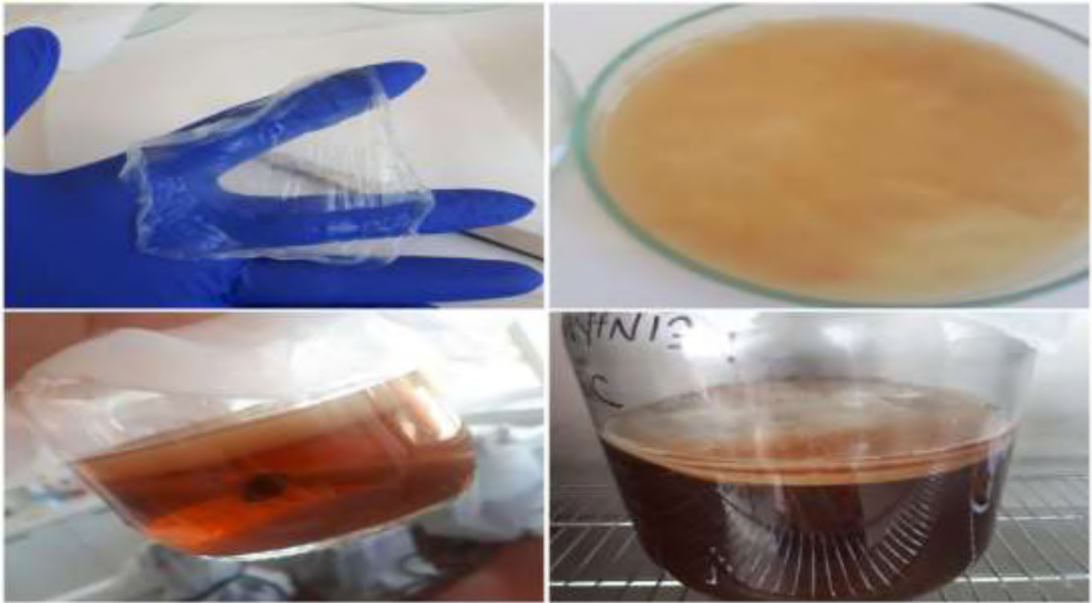
4.1.3 Bakteriyel Selüloz Karakterizasyonu

Elastik, çekme kuvvetine karşı dirençli ve lifli bir yapı özelliklerine sahip selüloz üretimi gözlemlendi.

Üretilen bakteriyel selüloz örnekleri Resim 4.8. ve Resim 4.9.'da gösterilmiştir.



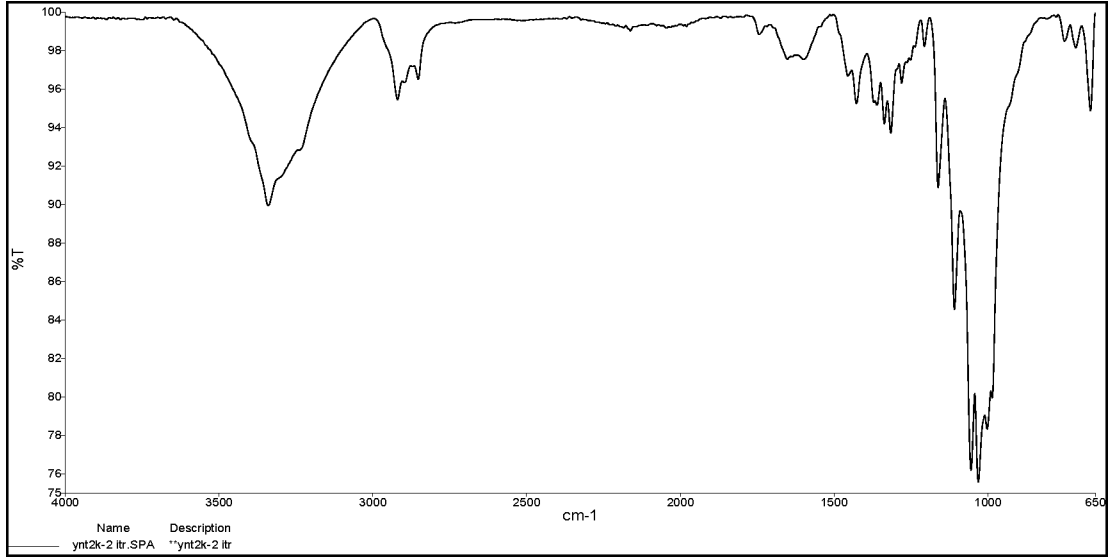
Resim 4. 9. Üretilen bakteriyel selüloz örnekleri-1



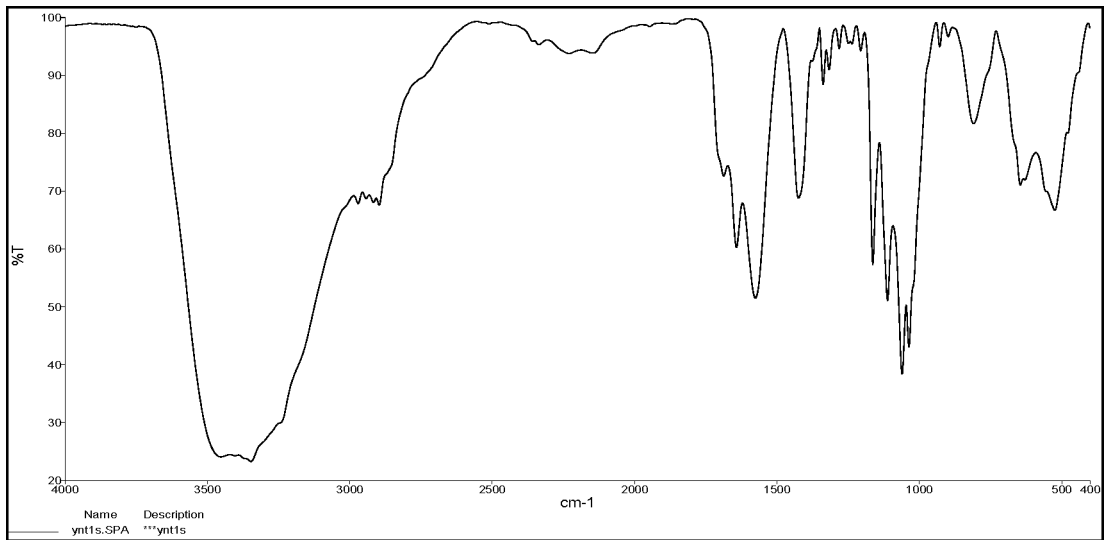
Resim 4. 10. Üretilen bakteriyel selüloz örnekleri-2

Çalışmamızda elde edilen bakteriyel selülozların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için FTIR ve su absorpsiyon oranları belirlenmiştir. FTIR analizi hidrojen bağ kuvvetinin değerlendirilmesi için önemlidir. Analiz sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen

değerler, saf selülozun pik değerleri ile kıyaslanmıştır. Kombuchadan izole edilen bakteriler tarafından üretilen selüloz için; 3340 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} , 1205 cm^{-1} , 1160 cm^{-1} , 664 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Sirkeden izole edilen bakteriler tarafından üretilen selüloz için; 3453 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} , 1641 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1205 cm^{-1} , 1162 cm^{-1} , 627 cm^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 1. Kombuchadan izole edilen mikroorganizmanın ürettiği bakteriyel selülozun FTIR analizi



Şekil 4. 2. Sirkeden izole edilen mikroorganizmanın ürettiği bakteriyel selülozun FTIR analizi

Bakteriyel selüloz, lifli yapısından dolayı yüksek su absorpsiyon oranına sahiptir. Kuru ağırlığının yaklaşık 700 katına kadar suyu absorbe edebilir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir. Analiz sonucunda su absorpsiyon oranları % 200- 340 arasında olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4. 4. HS besiyerinde üretilen bakteriyel selüloz ağırlıkları (30°C’de pH: 6,0’da 15 günlük inkübasyon sonucu)

Suşlar	Yaş Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
YNT-1	0,241	0,059
YNT-2	0,146	0,041
YNT-3	0,285	0,078
YNT-4	0,093	0,024
YNT-5	0,257	0,059
YNT-6	0,114	0,038
YNT-8	0,087	0,021
YNT- 11/1a	0,063	0,016
YNT- 11/1b	0,091	0,023
YNT-12	0,165	0,045
YNT- 14/1b	0,102	0,032
YNT- 14/2a	0,237	0,054
YNT- 14/2b	0,108	0,036

Günümüzde polimerlerin hem üretimde hem de kullanım alanlarında birçok avantajının olduğu bilinmektedir. Üretim maliyetinin yüksek olması ve saflık derecesinin düşük olması en önemli sorunlar arasındadır. Biyoteknoloji uygulamalarıyla beraber sorunların çoğuna çözüm bulunmuştur. Bakteriyel selülozun üretimiyle doku mühendisliğinden elektronik kağıt yapımına, gıda ürünlerinden kulaklık diyaframına kadar birçok farklı alanda kullanımı vardır (Tabarsa ve ark., 2017; Khan ve ark., 2013; Zhong ve ark., 2013). Bu nedenle verimli mikroorganizmaların izolasyonu ve kaliteli bakteriyel selülozun üretimi oldukça önemlidir.

Günümüzde selüloz birçok alanda kullanılmaktadır. Üretim maliyeti yüksek ve elde etme aşamasında kullanılan kimyasallar çevreye zarar vermektedir. Ayrıca diğer bir çevresel etki ise ağaçların kesilmesiyle ortaya çıkan sorunlardır. Bunlara ek olarak üretim sürecinin uzun olması da dezavantajları arasındadır. Bilim insanları da biyoteknolojinin ilerlemesiyle beraber selüloz üretebilen mikroorganizmaları izole etmişlerdir. Önceki çalışmaların çoğunda çürüyen meyveler (Dellaglio ve ark.,2005) sebzeler, çiçekler, sirke, meyve suları (Jia ve ark., 2004) , fermente gıdalardan (Park ve ark., 2003) ve alkollü içecekler üzerinde bulunan *Gluconacetobacter* cinsi olarak yeniden sınıflandırılan bir *Acetobacter xylinum* suşunu kültürleyerek selüloz üretimini tarif etmektedir. Bu ailenin üyeleri etanolü asetik asite dönüştürür. *Gluconacetobacter spp.*'yi izole etmek için çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Asetik asit bakterilerinin habitatları ve biyolojileri, bu bakterilerin endüstride neden olduğu önemli ekonomik kar ve zararlar nedeniyle nispeten iyi bilinmektedir. Asetik asit bakterilerini tanımlamasından bu yana, bu organizmalar hakkında geniş bir literatür birikmiştir. Bu bilgi, en son Asai (1968) tarafından birçok kez incelenmiştir. Doğada, asetik asit bakterileri özellikle şekerli veya alkollü çözeltilere iyi adapte olmuş görünmektedir. Eski literatürde sirke üretiminde kullanılan asetik asit bakterilerine bira ve şaraplardaki rollerine odaklanmaktadır. Diğer nişler çiçek, meyve, arı kovanı, “çay mantarı” ve hurma şarabıdır. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların *Gluconobacter* cinsine ya da *Acetobacter* cinsine atanması genellikle çok az sorun yaratır.

Fermentasyon, en eski gıda saklama yöntemlerinden biridir. Ayrıca gıdanın güvenliğini sağlamak için gerekli olan düşük maliyetli bir enerji koruma sistemidir. Fermentasyon sırasında birçok biyokimyasal değişiklik meydana gelir ve besleyici bileşikleri dolayısıyla biyoaktivite ve sindirilebilirlik gibi ürünün bazı özelliklerini etkileyebilir. Son zamanlarda, bu biyoproses yiyecek ve içecek endüstrilerindeki bitkilerden biyoaktif bileşiklerin üretimi ve ekstraksiyonu için uygulanmıştır (Hur ve ark, 2014). Kombucha çayı fermentasyonu doğal bir fermentasyon olarak düşünülebilir, çünkü fermentasyon süreci, belirli bir miktarda kombucha fermentasyonu eklenerek başlatılır (Jayabalan ve ark., 2014; Chakravorty ve ark., 2016; Dufresne ve ark., 2000; May ve ark., 2019). Bu uygulama, aynı

zamanda ekşi hamur, fermente etler ve tahıllar, su kefir ve süt kefir gibi diğer birçok doğal gıda fermentasyon işleminin üretimi için de kullanılan geri tepme olarak adlandırılır (Hutkins, 2006; Laureys ve Du Vuyst, 2014). Bu uygulama, kombucha fermentasyonunun belirli koşulları altında gelişen mikroorganizmaları seçer. Kombucha fermentasyonu tipik olarak çok çeşitli içerikler ve tariflerle ev düzeyinde gerçekleştirildiğinden, kombuchadan elde edilen mikroorganizmaların çeşitliliği çok geniştir (Jayaban ve ark., 2014; Coton ve ark., 2017; Greenwalt ve ark., 2000; Chakravorty ve ark., 2016; De Flippis ve ark., 2018; Liu ve ark., 1996; Gaggia ve ark., 2019). Kombucha fermentasyonlarındaki en karakteristik mikroorganizmalar asetik asit bakterileri ve mayalardır. Laktik asit bakterileri oluşabilir, ancak her zaman bulunmadıkları için kombucha mikrobiyal ekosisteminin önemli bir parçası gibi görünmemektedir. İpliksi mantarlar (küfler) de bazen ortaya çıkabilir, ancak mikotoksinlerle ve sağlıkla ilgili olumsuz etkilerle ilişkili oldukları için bozucu mikroorganizmalar olarak kabul edilir (Murhy ve ark., 2018).

Kombucha, birçok geleneksel fermente gıda arasında popüler bir içecektir. Ortamda bulunan bakteri ve mayalar, kirletici mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen güçlü bir simbiyoz oluşturur (Vitas ve ark., 2013). İki aşamadan oluşur: yüzen bir biyofilm ve ekşi sıvı faz. Asetik asit, glukonik asit ve etanol sıvıdaki ana bileşenlerdir, ancak aynı zamanda büyük su emme kapasitesi nedeniyle biyofilmde de bulunur (Czaja ve ark., 2006). Aerobik koşullar altında kombuchanın simbiyotik konsorsiyumu, birkaç asit, aminoasit, vitamin ve bazlardan oluşan hafif karbonatlı, hafif ekşi ve ferahlatıcı bir içecekte 7 ila 10 günlük bir süre içinde şekeri ve çayı dönüştürebilmektedir (Malbasa ve ark., 2011). Kombucha çay kültürünün baskın bakterileri, asetik asit oluşturmak için alkolü substrat olarak kullanabilen aerobik bakteriler olan asetik asit bakterileridir. Bu bakteriler, büyümeleri ve aktiviteleri için büyük miktarlarda oksijene ihtiyaç duyar. Metabolik süreç, asetaldehitin etanole ve asetaldehit hidratin asetaldehit dehidrojenaz enzimi ile asetik aside dönüştürülmesine dayanır (Jayabalan ve ark., 2007). Asetik asit bakterilerinin bilinen 17 cinsi olmasına rağmen kombuchada bulunanlar; *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Komagataeibacter* cinslerine aittir (Wang ve ark., 2015). Özellikle, *Komagataeibacter xylinus*'un kombucha fermentasyonunun en karakteristik mikroorganizması olduğu ve selüloz zarının üretiminden sorumlu

olduğu düşünülmektedir (Jayabalan ve ark., 2014; Gaggia ve ark., 2019). Bununla birlikte, bu mikroorganizma literatürde *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti subsp.*, *Gluconobacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus* gibi bazı ek türler vardır (Robert ve ark., 2013; Sayers ve ark., 2019).

Çalışmamızda kombucha çayı ve sirke örneklerinden 13 bakteri suşu elde edilmiştir. Klasik ve biyokimyasal identifikasyon çalışmaları sonucunda izolatların 4 tanesi *Gluconacetobacter xylinus*, 3 tanesi *Gluconacetobacter hansenii*, 2 tanesi *Gluconacetobacter oxydans*, 2 tanesi *Gluconacetobacter sucrofermentans* ve 2 tanesi *Acetobacter tropicalis* türü ile benzerlik göstermektedir. Ev yapımı sirkeden toplam 5 tane izolat elde edilmiştir. Bunlardan ikisi *Gluconacetobacter xylinus* ile %98, diğerleri ise *Gluconacetobacter hansenii* ile %95 benzerlik göstermektedir. Aydın ve Aksoy (2009)'un yaptığı çalışmada sirkeden elde edilen örneklerin *Gluconacetobacter xylinus* ve *Gluconacetobacter hansenii* olduğu görülmüştür. Güzel ve Akpınar (2017)'in çalışmasında evsel sirkeden izole edilen ve bakteriyel selüloz üretebilme yeteneğine sahip olan bakterinin *Komagataeibacter hansenii* olduğu tanımlanmıştır. Kim ve ark. (2017), tarafından narenciye meyve sularından yapılan çalışmada *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 suşu izole edilmiştir. Zhao ve ark. (2018)'nin çalışmasında, Çin hurması sirkesinden izole edilen bakteriyel selüloz üreten suşların *G. xylinus* olarak tanımlanmıştır. Kombucha mantarı çayından toplam 8 tane izolat elde edilmiştir. Bunlardan ikisi *Gluconacetobacter xylinus* ile %98, bir tanesi *Gluconacetobacter hansenii* ile %87, iki tanesi *Gluconacetobacter oxydans* ile %77- 82, iki tanesi *Gluconacetobacter sucrofermentans* ile %87-90 ve iki tanesi *Acetobacter tropicalis* ile %84- 89 oranında benzerlik göstermektedir. Revin ve ark. (2018)'nin çalışmasında kombucha çayından *G.sucrofermentans* B-11267'nin bakteriyel kültürü izole edilmiştir. Benzer şekilde Machado ve ark. (2018)'da kombucha çayından *Komagataeibacter rhaeticus* izole etmişlerdir. Görüldüğü gibi yapılan çalışmaların çoğunda evsel sirke ve kombucha çayı kullanılmıştır. Bunlara ek olarak Rangaswamy ve ark.(2015)'nin çalışmasında çürümüş meyvelerden ve sebzelerden bakteriyel selüloz ürettiği gözlemlenen ondan fazla bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlardan yapılan testler sonucunda *Gluconacetobacter* spp RV28 adını verdikleri bakterileri elde etmişlerdir. Literatürde benzer birçok yayın olmasına rağmen genellikle tek bir tür üzerine çalışma

yapılmıştır. Çalışmamızı diğerlerinden ayıran özellik ise her iki kaynaktan izole edilen suşların ve bunların ürettiği bakteriyel selülozun karşılaştırılmasıdır.

Bakteriyel selüloz birçok kaynaktan elde edilmesine rağmen kombucha çayında bulunan diğer mikroorganizmalarla simbiyotik ilişki içerindedir. Bu nedenle üretim koşullarında sirkeye göre bazı farklılıklar bulunmaktadır. Ev yapımı sirkelerde içerisinde bulunan asit kombucha çayında bakteriyel bir atık olarak üretilmektedir. Bu nedenle bir süre sonra ortamda bulunan mikroorganizmalar üremeyi durdurur hatta ölürler. Her mikroorganizma gibi buldukları ortamın pH'sı oldukça etkilidir. Genellikle *Gluconacetobacter* için optimum pH 4,0 ile 6,0 arasındadır (Kadere ve ark., 2008). Çalışmamızda pH $6,0 \pm 0,02$ ayarlandıktan sonra inkübasyona bırakılan örneklerin üzerinde selüloz pelletleri oluşmaya başladığında ortam pH'sının $5,4 \pm 0,02$ olduğu gözlemlenmiştir. Çaydan izole edilen suşlarda pH $6,0 \pm 0,02$ ayarlanmış ve selüloz pelletleri oluştuğunda ortam pH'sı $5,7 \pm 0,02$ olarak ölçülmüştür. Her iki örnekte 20 günlük inkübasyon sonunda kalın bir selüloz tabakası oluşmuştur. Örnekler sıvı yüzeyinden alındıktan sonra ortam pH'sı tekrar ölçüldüğünde her ikisinde de ciddi bir asidik ortam oluşmamış ve 0,5 ile 0,8 arasında bir pH düşüşü gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ortam sıcaklığı değiştirilmemiş olup optimum sıcaklık olan 30°C 'de sabit tutulmuştur. Çünkü sıcaklık, hücre büyümesi ve selüloz üretimini doğrudan etkilediği için çok önemli bir rol oynamaktadır. Sıcaklığın selüloz üretimi üzerindeki etkisini *Gluconacetobacter* spp. suşlarında oldukça net görülmektedir (Rangaswamy ve ark., 2015). Literatürde bulunan çalışmalarda göz önüne alınarak karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmıştır. Glukozun yanı sıra sükroz ve mannitol en sık kullanılan karbon kaynakları arasındadır. Bakteriyel selüloz verimini artırmak için farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. Rangaswamy ve ark. (2015)'nin çalışmasında karbon kaynağının selüloz üretimi üzerindeki etkisini incelemek için, maltoz, mannitol, sükroz, laktoz, glukoz ve fruktoz gibi karbon kaynakları, standart Hestrin-Schramm ortamında %2 (w/v) oranında takviye edilmiştir. Test edilen tüm suşlar karbon kaynaklarını kullanmıştır ve en az yüzde verim laktozdan olmuştur. En yüksek selüloz üretimi sükrozda gözlenmiş, ardından mannitol $1,58\text{--}2,35$ g/L selüloz verimi vermiştir. Kim ve ark. (2017), çalışmalarında çeşitli meyve suları kullanmak

besi ortamı hazırlamışlardır. Optimum kültür ortamını 30°C’de %10 narenciye suyu, %10 sükröz, %1 asetik asit ve %1 etanol, pH 3,5 şeklinde belirlemiştir. *Gluconacetobacter* sp. SEA623-2 tarafından statik bir kültürde üretilen BS, hava/sıvı yüzeyinde bulunur ve kültür süresi ile birlikte kalınlığı arttığı gösterilmiştir. Ring ve ark. (1987)’nin çalışmasında HS kültür ortamında *A.xylinum* bakterisinin selüloz üretebilme yeteneğini ve mannitol, sorbitol, fruktoz, galaktoz, gliserol, laktoz, maltoz gibi farklı karbon kaynaklarını kullanarak bakteriyel selüloz üretebilmeyi denemiştir. Yapılan birçok çalışmaya bakıldığında verimi en yüksek karbon kaynağı glukozdur ve çalışmamızda bunu desteklemiştir.

İzole edilen bakteri suşlarını tanımlamak için yaptığımız çeşitli biyokimyasal testler sonucunda literatürde bulunan çalışmalarla karşılaştırma yapılmıştır. Yapılan gram boyama yöntemiyle izole edilen mikroorganizmaların gram-negatif, kısa basil oldukları görülmüştür. İzole edilen bakterileri standart HS kültür ortamındaki çoğaltma işleminden sonra tüplerden alınan bir miktar örneğin üzerine %30’luk H₂O₂ damlatılmıştır. Bu işlem sonucunda kabarcık oluşumu gözlemlendi ve katalaz pozitif olduğu kaydedilmiştir. Üreaz testi için kültür ortamında inkübe edilen bakterilerin üremediği ve buna bağlı olarak kültür ortamının renginin pembe olarak kalması test sonucunun negatif olduğunu göstermektedir. Metil red ve voges proskauer testleri için besiyeri hazırlandı. Her ikisi içinde belirteç olarak hazırlanan kimyasallar tüplere eklendiğinde kırmızı halka oluşumu gözlenmediğinden test sonuçlarının negatif olduğu kaydedildi. Son yapılan lizin dekarboksilaz testi için besiyerine inkübe edilen mikroorganizmalarda tüplerin dipleri sarımsı renkte olduğundan dolayı negatif sonuç elde edilmiştir. Du ve ark.(2018) yaptığı çalışmada asetat oksidasyonu, laktat oksidasyonu, katalaz reaksiyonu, indol testi, gliserol ketogenezi, arginin dehidrolaz, lizin dekarboksilaz için pozitif ve MR-VP, jelatin sıvılaştırma, nitrat azaltma için negatif sonuç vermiştir. D-glukoz, D-sukroz, D-fruktoz, D-maltoz, D-trehaloz ve D-mannoz, tek karbon kaynağı olarak kullanılabilir, ancak L-arabinoz, laktoz, galaktoz, rafinoz, D-ksiloz ve D-riboz kullanılmaz. Bu sonuçlar *G. xylinus*’un karakteristiğine uygun olarak bulunmuştur. Kim ve ark. (2017)’nin yaptığı identifikasyon çalışmaları ve referans olarak kullanıkları mikroorganizmalarda arjinin dihidrolizi, lizin dekarboksilaz, indol, üreaz, jelatin sıvılaştırma, ONPG ve nitrat redüksiyon

testlerinin sonucu negatiftir. Bu sonuçlara dayanarak *Gluconacetobacter xylinus*'a ait suşların %98- 99; *Gluconacetobacter hansenii*'ye ait suşların %87- 95; *Gluconacetobacter oxydans*'a ait suşların %77- 82; *Gluconacetobacter sucrofermentans*' a ait suşların %87- 90 ve *Acetobacter tropicalis*'e ait suşların %84- 89 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi ve literatürdeki diğer çalışmalarla desteklenmiştir.

FTIR spektrumunda moleküler bağ yapılarının karakterizasyonu yapılarak organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, yapıyı oluşturan bağların durumu ve bağlanma yerleri belirlenmektedir (Fabio ve ark., 2013). BS membranının çeşitli fonksiyonel gruplarının tepe pozisyonları Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. 3500-3250 cm^{-1} 'deki bant moleküler arası ve moleküler içi hidrojen bağlarını göstermektedir. BS membranı önceki gözlemlere uyan sırasıyla 3453 cm^{-1} ve 3340 cm^{-1} 'de -OH gerilmesi için karakteristik pik göstermiştir. BS'deki yüksek polar hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle, moleküler bağlar arası ve moleküller arası hidrojen bağları ile etkileşime girer (Jung ve ark., 2010). BS membranları sırasıyla 2917 cm^{-1} ve 2919 cm^{-1} 'de -CH gerilme titreşimi için pik göstermiştir. 3000- 2800 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bağları CH_2 ve CH_3 fonksiyonel gruplarının simetrik ve anti-simetrik -CH esnemesini gösterir (Shahabi ve ark., 2015). -CH grubunun varlığı, daha önce bildirildiği gibi, 1450–1200 cm^{-1} 'de -CH bükülme titreşimlerine karşılık gelen birkaç zirvenin ortaya çıkmasıyla daha da desteklendi (Ul-Islam ve ark., 2011). Karboksilik grupların varlığı 1620- 1650 cm^{-1} 'de görülmektedir. BS membranında COOH için sırasıyla 1641 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} 'de görülen piklerin varlığı ile desteklenmiştir. Karbonil grubunun varlığı 1420- 1440 cm^{-1} 'de pik verir ve BS membranları sırasıyla 1423 cm^{-1} ve 1426 cm^{-1} 'de pik verdi. 1160 cm^{-1} ' de C-O-C gerilme titreşiminden kaynaklanan pikler 1162 cm^{-1} ve 1160 cm^{-1} ' de vermiştir (Park ve ark., 2003b; Halib ve ark., 2012; Gao ve ark., 2014; Gayathry ve Gopaldaswamy, 2014). Ek olarak, yaklaşık 1150-600 cm^{-1} 'deki bir başka karakteristik pik, selülozdaki C-O-C grupları için uzanan anti-simetrik köprüye bağlanır. Bu değerler önceden bildirilmiş olan bakteriyel selüloza uygundur (Gomes ve ark., 2013; Çoban ve Bıyık, 2011; Amin ve ark., 2014; Lin ve ark., 2014b). Çalışmamızda elde ettiğimiz FT-IR sonuçları literatürde bildirilen sonuçlar ile tutarlıdır.

HS besi ortamında üretilen bakteriyel selülozun oldukça verimli olduğu gözlemlenmiştir. Çoğu çalışmada selülozun su absorpsiyon kapasitesinin yüzdesi verilmiştir. Kaliteli bir BS membranının su absorpsiyon kapasitesi %95'i bulmaktadır (Rebelo ve ark., 2018; İslam ve ark., 2012). Çalışmamız su absorpsiyon kapasitesini ve BS membranının kalitesinin iyi bir derecede olduğunu desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada kombucha çayından ve sirkeden selüloz üretimine sahip olacağı düşünülen mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen suşların klasik ve biyokimyasal yöntemler ile identifikasyon çalışmaları yapılarak izolatların *Gluconacetobacter* spp. olduğu belirlenmiştir. İnkübasyon sonucunda elde edilen yapının bakteriyel selüloz olduğu FTIR analizi ile desteklendi. Sonuç olarak;

1. Kombucha çayı ve sirkede *Gluconacetobacter* cinsi mikroorganizmaların bulunduğunu gözlemlenmiştir.
2. İzole ettiğimiz mikroorganizmaların *G. xylinus*, *G. hansenii*, *G. oxydans* *G. sucrofermentans* ve *Acetobacter tropicalis* türleri ile % 77- 99 arasında benzerlik göstermektedir.
3. İzole edilen suşların her birinin farklı oranlardabakteriyel selüloz üretimine sahip olduğu belirlendi. Aynı koşullar altında başlatılan inkübasyon süreci izlendiğinde bakterilerin üreme hızlarında farklılıklar olduğu ve farklı pH koşullarında değişiklik gösterdikleri tespit edildi.
4. Bakteriyel selüloz yapısı FTIR analizi ile desteklendi. Ayrıca izolatların yüksek su absorpsiyon oranlarına sahip olduğu belirlendi.

Bu çalışmada bakteriyel selüloz ürettiği bilinen bazı mikroorganizmaların, kombucha mantarı ve ev sirkesinden izole edilip tanımlaması hedefine ulaşılmıştır. Bu tez çalışması ile hem mikroorganizmaların hem de bakteriyel selülozun önemi vurgulanmıştır. Ticari olarak bakteriyel selüloz üretim için gerekli ortam koşullarının sağlanması, daha hızlı üretim, verimi artırımı oldukça önemlidir. Bakterilerin gelişim koşullarını etkileyen faktörlerde modifikasyonlar yapılarak aktif olarak kullanılabilen daha kaliteli üretim yapmak mümkün görünmektedir. Çalışmamızın çevreye zararlı olmadığı bilinen polimerlerin kullanılması konusunda da farkındalık oluşturulacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akashi, K., Shibai, H., & Hirose, Y. (1979). Effect of Oxygen Supply on l-Lysine, l-Threonine and l-Isoleucine Fermentations. *Journal of Fermentation Technology*, 57, 317.
- Alexander, B., Ibon, A.-A., & Jürgen, S. (2002). Surface characterization of flax, hemp and cellulose fibers; Surface properties and the water uptake behavior. *Polymer Composites*, 5(23), 872–894.
- Almeida, I., Pereira, T., Silva, N., Gomes, F., Silvestre, A., Freire, C., Costa, P. (2014). Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86,332–336.
- Alvarez, D., Petty, J., Huckins, J., Jones-Lepp, T., Getting, D., Goddard, J., & Manahan, S. (2004). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1640–1648.
- Amin, M., Abadi, A., Ahmad, N., Katas, H., & Jamal, J. (2012). Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 465–473.
- Amin, M., Abadi, G., & Katas, H. (2014). Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles. *Carbohydrate Polymers*, 99, 180-189.
- Ammon, H., Ege, W., Oppermann, M., Gopel, W., & Eisele, S. (1995). Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. *Analytical Chemistry*, 67(2), 466–471.
- Annuaikit, T., Chusuit, T., Raknam, P., & Boonme, P. (2011). Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. *Medical Devices: Evidence and Research*, 4, 77–81.
- Anonim. (2020). <https://www.celluloselab.com/our-products/bacterial-cellulose/> adresinden alınmıştır
- Aramwit, P., & Bang, N. (2014). The characteristics of bacterial nanocellulose gel releasing silk sericin for facial treatment. *BMC Biotechnology*, 14, 104.
- Aravamudhan, A., Ramos, D., Nada, A., & Kumbar, S. (2014). Natural polymers: Polysaccharides and their derivatives for biomedical applications. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 67-89.
- Asai, T. (1968). Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. içinde Tokyo: University of Tokyo Press; Baltimore: University Park Press.

- Ashori, A., Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Shakeri, A., & Golalipour, M. (2012). Bacterial cellulose/silica nanocomposites: preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 413–418.
- Ashtaputre, A., & Shah, A. (1995). Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1159-1162.
- Aydin, Y., & Deveci Aksoy, N. (October 20-22, 2009). Isolation of Cellulose Producing Bacteria from Wastes of Vinegar Fermentation. *Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science*. San Francisco, USA.
- Backdahl, H., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2011). Observations on bacterial cellulose tube formation for application as vascular graft. *Materials Science and Engineering C*, 31(1), 14–21.
- Baklagina, Y. G., Khripunov, A. K., Tkachenko, A. A., Kopeikin, V. V., Matveeva, N. A., Lavrent'ev, V. K., ; Nilova, V. K.; Sukhanova, T. E.; Smyslov, R. Y.; Zनावeskina, I. S.; Klechkovskaya, V. V.; Feigin, L. A. (2005). Sorption properties of gel films of bacterial cellulose. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 78 (7), 1176-1181.
- Bishop, C. (2007). Vacuum deposition onto webs, films, and foils. *Engineering (General)* (3rd edition), 165–190.
- Bohn, A., Fink, H. P., Ganster, J., & Pinnow, M. (2000). X-ray texture investigations of bacterial cellulose. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201 (15), 1913-1921.
- Boulos, N.-N., Greenfield, H., & Wills, R. B.-H. (2000). Water holding capacity of selected soluble and insoluble dietary fibre. *International Journal of Food Properties*, 3(2), 217–231.
- Branda, S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, 13(1), 20–26.
- Brown Jr, R. (1985). Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. *Journal of cell science- Supplement*, 2, 13–32.
- Brown, A. (1886). On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society Transactions*, 49, 172.
- Brown, J., & Saxena, I. (2000). Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 57-67.
- Brown, M. (2006).
<http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html>
 adresinden alınmıştır
- Brown, R. (1988). Handprinted symbol recognition system. *Pattern Recognition*, 21(2), 91-118.

- Cai, Z., & Kim, J. (2010). Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose*, 17(1), 83–91.
- Campano, C., Ana Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review. *Cellulose*, 23(1), 57–91.
- Cannon, R., & Anderson, S. (1991). Biogenesis of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Microbiology*, 17, 435–447.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72.
- Chao, Y.-P., Ishida, T., Sugano, Y., & Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 345–352.
- Chao, Y.-P., Sugano, Y., & Shoda, M. (2001). Bacterial cellulose production under oxygenenriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 673–679.
- Chao, Y.-P., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., & Shoda, M. (1997). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. *Biotechnology Techniques*, 11(11), 829–832.
- Chávez-Pacheco, J., Martínez-Yee, S., Contreras-Zentella, M., & Escamilla-Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7, 18–25.
- Chawla, P.-R., Bajaj, I.-B., Survase, S.-A., & Singhal, R.-S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chen, S., Shen, W., Yu, F., & Wang, H. (2009a). Kinetic and thermodynamic studies of adsorption of Cu²⁺ and Pb²⁺ onto amidoximated bacterial cellulose. *Polymer Bulletin*, 63(2), 283–297.
- Chen, S., Zou, Y., Yan, Z., Shen, W., Shi, S., Zhang, X., & Wang, H. (2009b). Carboxymethylated bacterial cellulose for copper and lead ion removal. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2–3), 1355–1359.
- Cheng, K.-C., Catchmark, J.-M., & Demirci, A. (2009). Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering*, 3(12), 1–10.

- Cheng, K.-C., Catchmark, J.-M., & Demirci, A. (2011). Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules*, 12, 730–736.
- Cherian, B., Leão, A., Souza, S., Oliveira, G., Costa, L., Brandão, C., & Narine, S. (2013). Bacterial nanocelulose for medical implants. S. Thomas, P. Visakh, & A. Mathew içinde, *Advances in natural polymers*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Choi, C.-N., Song, H.-J., Kim, M.-J., Chang, M.-H., & Kim, S.-J. (2009). Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 136–140.
- Coban, E., & Biyik, H. (2011). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnology*, 10, 5346-5354.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiou, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., & al., e. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 1-16.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown Jr, R. (2006). Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145–151.
- Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R.-M. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11, 403–411.
- Czaja, W., Young, D., Kawecki, M., & Brown Jr, R. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1–12.
- Darbre, P., & Harvey, P. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 28, 561–578.
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different Temperatures Select Distinctive Acetic Acid Bacteria Species and Promotes Organic Acids Production during Kombucha Tea Fermentation. *Food microbiology*, 73, 11–16.
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelbeen, K., Janssens, D., & Marzotto, M. (2005). Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (6), 2365–2370.
- Donini, Í., De Salvi, D., Fukumoto, F., Lustrì, W., Barud, H., Marchetto, R., . . . Ribeiro, S. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química Journal*, 35, 165-173.

- Draelos, Z., Hornby, S., Walters, R., & Appa, Y. (2013). Hydrophobically modified polymers can minimize skin irritation potential caused by surfactant-based cleansers. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12, 314–321.
- Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. *Carbohydrate Polymers*, 194, 200–207.
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, 409–421.
- Elham, E.-A., & Amir, K.-A. (2013). Influence of fermentation condition and alkali treatment on the porosity and thickness of bacterial cellulose membranes. *TOJSAT*, 3(2), 194–203.
- El-Saied, H., Basta, A., & Gobran, R. (2004). Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products (Bacterial Cellulose and Its Application). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 43(3), 797-820.
- El-Saied, H., El-Diwany, A., Basta, A., Atwa, N., & El-Ghwas, D. (2008). Production and characterization of economical bacterial cellulose. *BioResources*, 3, 1196-1217.
- Eming, S., Smola, H., & Krieg, T. (2002). Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs*, 172(2), 105–117.
- Esa, F., Tasirin, S., & Rahman, N. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.
- Extremina, C., Fonseca, A., Granja, P., & Fonseca, A. (2010). Antiadhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(2), 164–168.
- Fabio, P., Nuno, H., Trovatti, E., Serafim, L., Duarte, M., Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Carmen, S. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass Bioenergy*, 55, 205-211.
- Feng, X.-C., Niamat, U., Wang, X.-J., Sun, X.-C., Li, C.-Y., & Bai, Y. (2015). Characterization of bacterial cellulose by *gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917. *Journal of Food Science*, 80(10), E2217–E2227.
- Feng, Y., Zhang, X., Shen, Y., Yoshino, K., & Feng, W. (2012). A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 644–649.

- Fiedler, S., Fussel, M., & Sattler, K. (1989). Production and application of bacterial cellulose: I. A survey on state of research and investigations concerning fermentation kinetics. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 144, 473.
- Fijałkowski, K., Drozd, R., Zywicka, A., Junka, A.-F., Kordas, M., & Rakoczy, R. (2017). Biochemical and cellular properties of *Gluconacetobacter xylinus* cultures exposed to different modes of rotating magnetic field. *Polish Journal of Chemical Technology*, 19(2), 107–114.
- Fijałkowski, K., Rakoczy, R., Gywicka, A., Drozd, R., Zielińska, B., Wenelska, K., & al, e. (2016). Time dependent influence of rotating magnetic Field on bacterial cellulose. *International Journal of Polymer Science*, 1, 1–13.
- Fijałkowski, K., Zywicka, A., Drozd, R., Junka, A.-F., Peitler, D., Kordas, M., & et al (2017). Increased water content in bacterial cellulose synthesized under rotating magnetic fields. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 36(2), 192–201.
- Fijałkowski, K., Zywicka, A., Drozd, R., Niemczyk, A., Junka, A.-F., Peitler, D., & et al (2015). Modification of bacterial cellulose through exposure to the rotating magnetic field. *Carbohydrate Polymers*, 133, 52–60.
- Final Thesis. (2005). <http://www.rpi.edu/~weberd/Final%20Thesis.doc> adresinden alınmıştır
- Fink, H., Faxalv, L., Molnar, G., Drotz, K., Risberg, B., Lindahl, T., & Sellborn, A. (2010). Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials. *Acta Biomater*, 6(3), 1125–1130.
- Fontana, J., Franco, V., de Souza, S., Lyra, I., & de Souza, A. (1991). Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* (“tea fungus”) biofilm used in skin therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28(29), 341.
- Fujiwara, M., Fukushi, K., Takai, M., Hayashi, J., Fukaya, M., Okumura, H., & Kawamura, Y. (1992). Construction of shuttle vectors derived from *Acetobacter xylinum* for cellulose-producing bacterium *Acetobacter xylinum*. *Biotechnology Letters*, 14, 539–542.
- Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I., & Yao, M. (2013). The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431, 802-807.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejia, J. L., et al (2019). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology. Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*, 11, 1.
- Gao, C., Yan, T., Du, J., He, F., Luo, H., & Wan, Y. (2014). Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocolloids*, 36, 204-211.

- Gardner, K., & Blackwell, J. (1974). The Structure of native Cellulose. *Biopolymers*. Wiley Online Library, 13,1975-2001.
- Gayathry, G., & Gopaldaswamy, G. (2014). Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 39, 93-96.
- Gelin, K., Bodin, A., Gatenholm, P., Mihranyan, A., Edwards, K., & Stromme, M. (2007). Characterization of water in bacterial cellulose. *Polymer*, 48 (26), 7623-7631.
- George, J., & Siddaramaiah. (2012). High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2031–2037.
- Geyer, U., Heinze, T., Stei, A., Klenn, D., Marsch, S., Schumann, D., & Schmauder, H. (1994). Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16,343-347.
- Gibson, L.-J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface* , 9, 2749–2766.
- Gomes, F., Silva, N., Trovatti, E., Serafim, L., Duarte, M., & Silvestre, A. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy*, 55, 205-211.
- Goto, M., & Yokoe, Y. (1996). Ammoniation of barley straw. Effect on cellulose crystallinity and water-holding capacity. *Animal Feed Science Technology*, 58, 239–247.
- Grande, C., Torres, F., Gomez, C., & Bano, M. (2009). Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomater*, 5, 1605–1615.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*, 63, 976–981.
- Gutierrez, J., Fernandes, S., Mondragon, I., & Tercjak, A. (2012a). Conductive photoswitchable vanadium oxide nanopaper based on bacterial cellulose. *ChemSusChem*.
- Gutierrez, J., Tercjak, A., Algar, I., Retegi, A., & Mondragon, I. (2012b). Conductive properties of TiO₂/bacterial cellulose hybrid fibres. *Journal of Colloid and Interface Science*, 377(1), 88–93.
- Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2017). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. *GIDA*, 42 (5), 620-633.
- Halib, N., Iqbal, M. C., Amin, M., & Ahmad, I. (2012). Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysiana*, 41(2), 205–211.

- Hasan, N., Biak, D., & Kamarudin, S. (2012). Application of bacterial cellulose (BC) in natural facial scrub. *IJASEIT*, 2, 1–4.
- Heath, B., Coffindaffer, T., Kyte III, K., Smith III, E., & McConaughy, S. (2012). Patent No. 8097574 B2. Personal cleansing compositions comprising a bacterial cellulose network and cationic polymer. US.
- Helenius, G., Backdahl, H., Bodin, A., Nannmark, U., Gatenholm, P., & Risberg, B. (2006). In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76A(2), 431–438.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58, 345-352.
- Hikawa, S., Hiroshi, T., Takayasu, T., & Yoshinaga, F. (1996). Patent No. 96,316,922, . Japanese .
- Hirai, A., Inui, O., Horii, F., & Tsuji, M. (2009). Phase Separation Behavior in Aqueous Suspensions of Bacterial Cellulose Nanocrystals Prepared by Sulfuric Acid Treatment . *Langmuir*, 25 (1), 497-502.
- Holtzapple, M. (2003). Cellulose. B. Caballero içinde, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (s. 998-1007).
- Hornung, M., Ludwig, M., & Schmauder, H.-P. (2007). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle. *Engineering in Life Sciences*, 7(1), 35–41.
- Hsieh, Y. C., Yano, H., Nogi, M., & Eichhorn, S. J. (2008). An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. *Cellulose*, 15 (4), 507-513.
- Hu, W., Chen, S., Yang, Z., Liu, L., & Wang, H. (2011). Flexible electrically conductive nanocomposite membrane based on bacterial cellulose and polyaniline. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(26), 8453–8457.
- Hu, Y., & Catchmark, J. (2011a). In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2835–2845.
- Hu, Y., & Catchmark, J. (2011b). Integration of cellulases into bacterial cellulose: toward bioabsorbable cellulose composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 97B(1), 114–123.
- Hu, Y., & Catchmark, J.-M. (2010a). Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by acetobacter xylinum JCM 9730 strain. *Biomacromolecules*, 11, 1727–1734.
- Hu, Y., & Catchmark, J.-M. (2010b). Studies on sphere-like bacterial cellulose produced by acetobacter xylinum under agitated culture. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Pennsylvania*, June 20-23.

- Hu, Y., Catchmark, J.-M., & Vogler, E.-A. (2013). Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth. *Biomacromolecules*, 14, 3444–3452.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y., Choi, I., & Kim, G. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356.
- Hutchens, S., Benson, R., Evans, B., O'Neill, H., & Rawn, C. (2006). Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*, 27, 4661–4670.
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Hwang, J., Yang, Y., Hwang, J., & Pyun, Y. (1997). Microbial cellulose fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 183.
- Ifuku, S., Tsuji, M., Morimoto, M., Saimoto, H., & Yano, H. (2009). Synthesis of silver nanoparticles templated by TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose nanofibers. *Biomacromolecules*, 10(9), 2714–2717.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose- a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270.
- Ishikawa, A., Masuoka, M., Tsuchida, T., & Yoshinaga, F. (1995). Increase in Cellulose Production by Sulfaguanidine-resistant Mutants Derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 2259.
- Islam, M.-U., Taous, K., & Joong, K.-P. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596–603.
- Jayabalan, R., Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., & Sathishkumar, M. (2014). A review on Kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538–550.
- Jayabalan, R., Malini, K., Muthuswamy, S., Swaminathan, K., & Yun, S. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 19, 843–847.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392–398.
- Jia, S., Ou, H., Chen, G., & et al. (2004). Cellulose production from *Gluconobacter oxydans* TQ-B2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(3), 166–170 .
- Johnson, D., & Neogi, A. (1989). Patent No. US4863565. Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. Us.

- Jonas, R., & Farah, L.-F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 101–106.
- Jung, H., Lee, O., Jeong, J., Jeon, Y., Park, K., Kim, H., Son, H., et al, (2010). Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a cost-effective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 162(2), 486–497.
- Jung, J.-Y., Khan, T., Park, J.-K., & Chang, H.-N. (2007). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(2), 265–271.
- Juntaro, J., Ummartyotin, S., Sain, M., & Manuspiya, H. (2012). Bacterial cellulose reinforced polyurethane-based resin nanocomposite: a study of how ethanol and processing pressure affect physical, mechanical and dielectric properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2464–2469.
- Kadere, T., Miyamoto, T., Oniango, R., Kutima, P., & Njoroge, S. (2008). Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*, 7 (16), 2963-2971.
- Kalia, S., Dufresne, A., Cherian, B., Kaith, B., Avérous, L., Njuguna, J., & et al, (2011). Cellulose based bio and nanocomposites: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 35.
- Kang, Y., Chun, S., Lee, S., Kim, B., Kim, J., Chung, H., Kim, W., & et al, (2012). All-solid-state flexible supercapacitors fabricated with bacterial nanocellulose papers, carbon nanotubes, and triblock-copolymer ion gels. *ACS Nano*, 6(7), 6400–6406.
- Kawano, S., Yasutake, Y., Tajima, K., Satoh, Y., Yao, M., Tanaka, I., & Munekata, M., (2005). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the cellulose biosynthesis-related protein CMCax from *Acetobacter xylinum*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 61, 252-254.
- Keiski, C., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A., Yip, P., Robinson, H., Howell, P. & et al, (2010). AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure*, 18, 265-273.
- Khandelwal, M., & Windle, A. (2013). Hierarchical Organisation in the Most Abundant Biopolymer Cellulose. *MRS Proceedings*, 1504.
- Kim, S., Lee, S., Park, K., Park, S., An, H., Hyun, J., & Choi, Y. (2017). *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice,. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 314–319.
- Kimura, S., Chen, H., Saxena, I., Brown Jr, R., & Itoh, T. (2001). Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5668-5674.

- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H., & Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 3358–3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: a new family of naturebased materials. *Angewandte Chemie*, 50(24), 5438–5466.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhard, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26, 1561–1603.
- Koo, H., Song, S., Pyun, Y., & Kim, Y. (1998). Evidence that a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Acetobacter xylinum* plays an essential role for the formation of cellulose fiber. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 2257-2259.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1997). Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2), 124–127.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 318–321.
- Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1997). Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4), 371–376.
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kaminoyama, M., & Kamiwano, M. (1996). Characterization of non-Newtonian behavior in the mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 382–386.
- Kowser, J., Aziz, M. G., & Uddin, M. B. (2015). Isolation and characterization of *Acetobacter aceti* from rotten papaya. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 13(2), 299–306.
- Krystynowicz, A., & Bielecki, S. (2001). Biosynthesis of bacterial cellulose and its potential application in the different industries. *Polish Biotech Database, News Copyright by Bio-Tech Consulting*.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(4), 189–195.
- Krystynowicz, A., Koziolkiewicz, M., Wiktorowska-Jeziarska, A., Bielecki, S., Klemenska, E., Masny, A., & Płucienniczak, A. (2005). Molecular basis of

- cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 691-698.
- Kuehl, B., Fyfe, K., & Shear, N. (2003). Cutaneous cleansers. *Skin Therapy Letter*, 8(3), 1-4.
- Kuure-Kinsey, M., Weber, D., Bungay, H.-R., Plawsky, J.-L., & Bequette, B.-Y. (2005). Modeling and Predictive Control of a Rotating Disk Bioreactor. ThC13.5 Modeling and Predictive Control of a Rotating Disk Bioreactor (s. 3259-3264). Portland: American Control Conference.
- Laborie, M., & Brown, E. (2008). Patent No. US7968646. Method of in situ bioproduction and composition of bacterial cellulose nanocomposites. US.
- Lapuz, M., Gallardo, E., & Palo, M. (1967). The nata organism-cultural requirements, characteristics and identity. *The Philippine journal of science*, 96, 91-108.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2564-2572.
- Lee, C., Hsu, K., Cho, J., Kim, Y., & Han, S. (2011). Patent No. 20130244977 A1. Cosmetic bio-cellulose mask pack sheet and method for manufacturing same. US.
- Legendre, J. (2008). Patent No. 20090041815 A1. Assembly comprising a substrate comprising biocellulose, and a powdered cosmetic composition to be brought into contact with the substrate. US.
- Legeza, V., Galenko-Yaroshevskii, V., Zinov'ev, E., Paramonov, B., Kreichman, G., Turkovskii, I., Khripunov, A. & et al, (2004). Effects of new wound dressings on healing of thermal burns of the skin in acute radiation disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 138(3), 311-315.
- Legnani, C., Vilani, C., Calil, V., Barud, H., Quirino, W., Achete, C., Cremona, M. & et al, (2008). Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. *Thin Solid Films*, 517(3), 1016-1020.
- Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose synthesis and its regulation. *The Arabidopsis Book Vol.12. BiOne Complete(Open Access)* (s. e0169). içinde
- Lin, S.-P., Hsieh, S.-C., Chen, K.-I., Demirci, A., & Cheng, K.-C. (2014). Semi-continuous bacterial cellulose production in a rotating disk bioreactor and its material properties analysis. *Cellulose*, 21, 835-844.
- Lin, S.-P., Liu, C.-T., Hsu, K.-D., Huang, Y.-T., Shih, T.-Y., & Cheng, K.-C. (2016). Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. *Cellulose*, 23, 367-377.

- Lin, Y., Wey, Y., Lee, M., & Lin, P. (2015). Patent No. 20150216784. Cosmetic composition containing fragments of bacterial cellulose film and method for manufacturing thereof. US.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R., Uchimura, T., & Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2101–2111.
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., & Liao, C. C. (1996). The Isolation and Identification of Microbes from a Fermented Tea Beverage, Haipao, and their Interactions during Haipao Fermentation. *Food microbiology*, 13, 407–415.
- Lu, H.-M., & Jiang, X.-L. (2014). Structure and properties of bacterial cellulose produced using a trickling bed reactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 172, 3844–3861.
- Luchs, J., Nelinson, D., & Macy, J. (2010). Efficacy of Hydroxypropyl cellulose ophthalmic inserts (LACRISERT) in subsets of patients with dry eye syndrome: Findings from a patient registry. *Cornea*, 29(12), 1417-1427.
- Lustri, W., Barud, H., Barud, H., Peres, M., Gutierrez, J., Tercjak, A., Ribeiro, S. & et al, (2015). Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications, Additional information is available at the end of the chapter. Intect Open.
- Lynd, L.-R., Weimer, P.-J., van Zyl, W.-H., & Pretorius, I.-S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577.
- Machado, R., Meneguim, A., Sábio, R., Franco, D., Antonio, S., Gutierrez, J., Baruda, H. & et al, (2018). *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. *Industrial Crops & Products*, 122, 637–646.
- Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., & Čanadanović-Brunet, J. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727-1731.
- Marsh, A., Hill, C., Ross, R., & P.D., C. (2014). Fermented beverages with healthpromoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 38(2), 113-124.
- Marsh, A., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R., & Cotter, P. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171-178.
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. J. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 18.

- Matama, T., Araujo, R., Gubitz, G., Casal, M., & Cavaco-Paulo, A. (2010). Functionalization of cellulose acetate fibers with engineered cutinases. *Biotechnology Progress*, 26(3), 636–643.
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: A Novel Model System for Cooperation and Conflict in a Complex Multi-Species Microbial Ecosystem. *PeerJ*, 7, e7565-e7565.
- Mayer, R., Ross, P., Weinhouse, H., Amikam, D., Volman, G., Ohana, P., Benziman, M. & et al, (1991). Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 5472-5476.
- McDonald, M., D'Aversa, G., Perry, H., Wittpenn, J., & Nelinson, D. (2010). Correlating patient-reported response to hydroxypropyl cellulose ophthalmic insert (LACRISERT®) therapy with clinical outcomes: Tools for predicting response. *Current Eye Research*, 35(10), 880-887.
- McKenna, B. A., Mikkelsen, D., Wehr, J. B., Gidley, M. J., & Menzies, N. W. (2009). Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Cellulose*, 16 (6), 1047-1055.
- Meftahi, A., Khajavi, R., Rashidi, A., Sattari, M., Yazdanshenas, M., & Torabi, M. (2010). The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose*, 17(1), 199–204.
- Mendes, P., Rahal, S., Pereira-Junior, O., Fabris, V., Lenharo, S., de Lima-Neto, J., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2009). In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 12.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B., Dykes, G., & Gidley, M. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 576-583.
- Monika, S.-C., Justyna, C., & Artur, Z. (2011). Sensing the structural differences in cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR spectroscopy. *Sensors*, 11, 5543–5560.
- Morgan, J., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493, 181-187.
- Mormino, R., & Bungay, H. (2003). Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 503–506.
- Murphy, T. E., Walia, K., & Farber, J. M. (2018). Safety Aspects and Guidance for Consumers on the Safe Preparation, Handling and Storage of Kombucha: A

- Fermented Tea Beverage. International Association for Food Protection, 38, 329–337.
- Murtaza, G. (2012). Ethylcellulose microparticles: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 69(1), 11–22.
- Nagel, J., Fuscaldo, J., & Fireman, P. (1977). Paraben allergy. *JAMA*, 237, 1594–1595.
- Nakatsubo, F., Kamitakahara, H., & Hori, M. (1996). Cationic ring-opening polymerization of 3,6-di-O-benzyl- α -D-glucose 1,2,4-Orthopivalate and the first chemical synthesis of cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 118(7), 1677–1681.
- Nguyen, V., Flanagan, B., Gidley, M., & Dykes, G. (2008). Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Current Microbiology*, 449–453.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., & al, e. (1990). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 25(6), 2997–3001.
- Nishiyama, Y., Langan, P., & Chanzy, H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose Ib from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 9074–9082.
- Niyazbekova, Z., Nagmetova, G., & Kurmanbayev, A. (2018). An Overview of Bacterial Cellulose Application. *National Center for Biotechnology*, 17–25.
- Nobles, D., Romanovicz, D., & Malcolm Brown, R. (2001). Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase. *Plant Physiology*, 127, 529–542.
- Nogi, M., & Yano, H. (2008). Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation in the electronics device industry. *Advanced Materials*, 20(10), 1849–1852.
- Noro, N., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 199.
- Ogawa, K., & Maki, Y. (2003). Cellulose as extracellular polysaccharide of hot spring sulfur-turf bacterial mat. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(12), 2652–2654.
- Okuyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1992a). Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. *Food Hydrocolloids*, 6(5):479–487.
- Okuyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1993). Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food Hydrocolloids*, 6(6), 503–511.

- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., & Yamanaka, S. (1992b). Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 471–477.
- Okuda, K. (2002). Structure and phylogeny of cell coverings. *Journal of Plant Research*, 115, 283–288.
- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., & Zimmer, J. (2013). MCsA and MCsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110, 17856–17861.
- Ougiya, H., Watanabe, K., Matsumura, T., & Yoshinaga, F. (1998). Relationship between suspension properties and fibril structure of disintegrated bacterial cellulose. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62 (9), 1714–1719.
- Ougiya, H., Watanabe, K., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1997). Emulsion-stabilizing effect of bacterial cellulose. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1541–1545.
- Park, J. K., Park, Y. H., & Jung, J. Y. (2003). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(2), 83–88.
- Park, J., Khan, T., & Jung, J. (2009). Bacterial cellulose. *Handbook of hydrocolloids* Cambridge. içinde UK.
- Park, S., Baker, J., Himmel, M., Parilla, P., & Johnson, D. (2010). Research cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(10), 10.
- Payen, A. (1838). Memoir on the composition of the tissue of plants and of woody. *Comptes Rendus*, 7, 1052–1056.
- Peng, X., Li, C., Liu, J., Yi, Z., & Han, Y. (2017). Changes in composition, cellulose degradability and biochemical methane potential of *Miscanthus* species during the growing season. *Bioresource Technology*, 235, 389–395.
- Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277–1286.
- Phisalaphong, M., & Jatupaiboon, N. (2008). Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose- chitosan film. *Carbohydrate Polymers*, 78, 482–488.
- Premjet, S., Ohtani, Y., & Saeshima, K. (1995). The Contribution of High Molecular Lignosulfonate to the Powerful Bacterial Cellulose Production System with *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. *Bioresource Technology*, 52, 119.
- Putra, A., Kakugo, A., Furukawa, H., Gong, J., & Osada, Y. (2008). Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer*, 49(7), 1885–1891.

- Qui, X., & Hu, S. (2013). Smart materials based on cellulose: A review of the preparations, properties, and applications. *Materials*, 6(3), 738–781.
- Rangaswamy, B., Vanitha, K. P., & Hungund, B. (2015). Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Polymer Science, 8.
- Rani, M.-U., & Appaiah, A. (2011). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology*, 61, 781–787.
- Rebelo, A.-R., Archer, A.-J., Chen, X.-L., Liu, C.-Q., Yang, G., & Liu, Y. (2018). Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties. *Science and Technology of Advanced Materials*, 19(1), 203-211.
- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 198, 258-261.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Pena, C., Zuluaga, R., Castro, C., Ganan, P., Mondragon, I., & et al, (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructuremechanical property relationships. *Cellulose*, 17 (3), 661-669.
- Revin, V., Liyaskina, E., Nazarkina, M., Bogatyreva, A., & Shchankin, M. (2018). Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 151-159.
- Rezaee, A., Godini, H., & Bakhtou, H. (2008a). Microbial cellulose as support material for the immobilization of denitrifying bacteria. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(5), 589.
- Rezaee, A., Godini, H., Dehestani, S., Reza Yazdanbakhsh, A., Mosavi, G., & Kazemnejad, A. (2008b). Biological denitrification by *Pseudomonas stutzeri* immobilized on microbial cellulose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2397–2402.
- Ring, D., Nashed, W., & Dow, T. (1987). Patent No. 4,655,758. Microbial polysaccharide articles and methods of production. US .
- Robert, V., Vu, D., Amor, A. B., van de Wiele, N., Brouwer, C., Jabas, B., Daoud, S. B. & et al, (2013). MycoBank Gearing up for New Horizons. *IMA Fungus*, 4, 371–379.
- Romano, M., Franzosi, G., Seves, A., & Sora, S. (1989). Study of the production of cellulose gel and cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Cellulose Chemistry and Technology*, 23, 217.
- Rose, M., & Palkovits, R. (2011). Cellulose-based sustainable polymers: State of the art and future trends. *Macromolecular Rapid Communications*, 32(17), 1299-1311.

- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 55, 35-58.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Benziman, M. & et al, (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325, 279-281.
- Römling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology.*, 153, 205-212.
- Ruka, D., Simon, G., & Dean, K. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89, 613-622.
- Sakairi, N., Suzuki, S., Ueno, K., Han, S., Nishi, N., & Tokura, S. (1998). Biosynthesis of hetero-polysaccharides by *Acetobacter xylinum* - Synthesis and characterization of metal-ion adsorptive properties of partially carboxymethylated cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 37, 409.
- Sanchavanakit, N., Sangrungraungroj, W., Kaomongkolgit, R., Banaprasert, T., Pavasant, P., & Phisalaphong, M. (2006). Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnology Progress*, 22(4), 1194–1199.
- Saxena, I., Kudlicka, K., Okuda, K., & Brown Jr, R. (1994). Characterization of genes in the cellulose synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *Journal of Bacteriology*, 176, 5735-5752.
- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., & Clark, K. (2019). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 47, 23–28.
- Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnology Letters*, 27 (19), 1435-1438.
- Schumann, D., Wippermann, J., Klemm, D., Kramer, F., Koth, D., Kosmehl, H., Salehigelani, S. & et al, (2009). Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. *Cellulose*, 16(5), 877–885.
- Seo, H., Lee, W., Hwang, T., & Park, D. (2009). Electricity generation coupled with wastewater treatment using a microbial fuel cell composed of a modified cathode with a ceramic membrane and cellulose acetate film. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 1019–1027.
- Serafica, G., Mormino, R., & Bungay, H. (2002). Inclusion on of solid particle in bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 756–760.

- Serra, D., Richter, A., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5540-5554.
- Shah, J., & Brown, R. (2005). Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 352–355.
- Shahabi-Ghahafarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Yousefi, H. (2015). Preparation and characterization of nanocellulose from beer industrial residues using acid hydrolysis/ ultrasound. *Fibers and Polymers*, 16 (3), 529.
- Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A., & Gosalipour, M. (2011). Bacterial synthesized cellulose nanofibers. Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1187-1191.
- Shibazaki, H., Kuga, S., & Onabe, F. (1994). Mechanical properties of papersheet containing bacterial cellulose. *Japan Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 48, 1621–1630.
- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S. I., Ogawa, M., Nishi, N., & Tokura, S. (1994). Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, 297.
- Shoda, M., & Sugano, Y. (2005). Recent Advance in Bacterial Cellulose Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 1-8.
- Sievers, M. ve Swings, J. (2015). *Gluconacetobacter. Bergey'in Arke ve Bakterilerin Sistematigi El Kitabı, 1-11.*
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J., Gamazo, C., & Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43, 793-808.
- Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33, 1.
- Song, H.-J., Li, H., Seo, J.-H., Kim, M.-J., & Kim, S.-J. (2009). Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 141–146.
- Souza, D., & Garcia-Cruz, C. (2004). Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, 25, 331-340.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2589-2594.

- Stanislaw, B., Halina, K., Alina, K., Katarzyna, K., Marek, K., & Manude, G. (2012). Wound dressings and cosmetic materials from bacterial nanocellulose. *Bacterial nanocellulose. Perspectives in nanotechnology* (s. 157–174). içinde New York: CRC Press.
- Sun, D., Yang, J., & Wang, X. (2010). Bacterial cellulose/TiO₂ hybrid nanofibers prepared by the surface hydrolysis method with molecular precision. *Nanoscale*, 2(2), 287–292.
- Sunagawa, N., Fujiwara, T., Yoda, T., Kawano, S., Satoh, Y., Yao, M., Dairi, T. & et al, (2013). Cellulose factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 607-612.
- Sutherland, I. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 663–674.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D., Brittberg, M., & Gatenholm, P. (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4), 419–431.
- Szczygielski, K., Rapiejko, P., Wojdas, A., & Jurkiewicz, D. (2010). Use of CMC foam sinus dressing in FESS. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267(4), 537–540.
- Tabarsa, T., Sheykhnazari, S., Ashori, A., Mashkour, M., & Khazaeian, A. (2017). Preparation and characterization of reinforced papers using nano bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 334–340.
- Tahara, N., Tabuchi, M., Watanabe, K., Yano, H., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1997). Degree of polymerization of cellulose from *acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(11), 1862–1865.
- Tajima, K., Fujisawa, M., Takai, M., & Hayashi, J. (1995). Synthesis of bacterial cellulose composite by *Acetobacter xylinum* I. Its mechanical strength and biodegradability. *Mokuzai Gakkaishi*, 41, 749.
- Takai, M. (1994). Bacterial cellulose composites. R. Gilbert içinde, *Cellulose polymer blends composites* (s. 233–240). Munich: Hanser.
- Tal, R., Wong, H., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A., Volman, G., Benziman, M. & et al, (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology*, 180, 4416-4425.
- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P., & Phunsri, A. (2005). Effect of Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter* sp. *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University*, 30, 179.

- Ton, N., & Le, V. (2011a). Application of immobilized yeast in bacterial cellulose to the repeated batch fermentation in wine-making. *International Food Research Journal*, 18(3), 983–987.
- Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., & Horinouchi, S. (1995). Addition of a Small Amount of an Endoglucanase Enhances Cellulose Production by *Acetobacter xylinum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 805.
- Tournilhac, F., & Lorant, R. (2003). Patent No. 6534071 B1. Composition in the form of an oil-in-water emulsion containing cellulose fibrils, and its uses, especially cosmetic uses. US.
- Trovatti, E., Oliveira, L., Freire, C., Silvestre, A., Pascoal Neto, C., Cruz Pinto, J., & Gandini, A. (2010). Novel bacterial cellulose– acrylic resin nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 70(7), 1148–1153.
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Koutinas, A. & et al, (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 14832-14849.
- Ul- İslam, M., Khan, T., & Park, J. (2012). Water Holding and Release Properties of Bacterial Cellulose Obtained By In Situ and Ex Situ Modification. *Carbohydrate Polymers*, 88 (2), 596-603.
- Ul-Islam, M., Ha, J. H., Khan, T., & Park, J. K. (2013). Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 360–366.
- Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J. H., & Park, J. K. (2011). Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(8), 1736.
- Ullah, H., Santos, H., & Khan, T. (2016). Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*, 23, 2291.
- Ullah, M., Ul-İslam, M., Khan, S., Kim, Y., & Park, J. (2015). Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line. *Carbohydrate Polymers*, 132, 286–294.
- Ummartyotin, S., Juntaro, J., Sain, M., & Manuspiya, H. (2012). Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 92–97.
- Valla, S., Coucheron, D., & Kjosbakken, J. J. (1987). The plasmids of *acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. *Molecular and General Genetics MGG*, 209,412.

- Vandamme, E., Baets, D., Vanbaelen, Joris, K., & Wulf, D. (1998). Improved Production Of Bacterial Cellulose and Its Application Potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 93-99.
- VanderHart, D. L., & Atalla, R. H. (1984). Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-state¹³C NMR. *Macromolecules*, 17, 1465-1472.
- Vasconcelos, N. F., Feitosa, J. P., da Gama, F. M., Morais, J. P., Andrade, F. K., & de Souza, M. S. (2017). Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. *Carbohydrate Polymers*, 155, 425–431.
- Villarreal-Soto, V., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha tea fermentation: A review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.
- Vitas, J., Malbasa, R., Grahovac, J., & Loncar, E. (2013). The antioxidant activity of Kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19(1), 129–139.
- Vitta, S., Drillon, M., & Derory, A. (2010). Magnetically responsive bacterial cellulose: synthesis and magnetic studies. *Journal of Applied Physics*, 108(5), 053905–053907.
- Walters, R., Mao, G., Gunn, E., & Hornby, S. (2012). Cleansing formulations that respect skin barrier integrity. *Dermatology Research and Practice*, ID 495917.
- Wang, B., Shao, Y., Chen, T., Chen, W., & Chen, F. (2015). Global Insights into Acetic Acid Resistance Mechanisms and Genetic Stability of *Acetobacter pasteurianus* Strains by Comparative Genomics. *Scientific Reports*, 5, 18330.
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2015). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63–76.
- Watanabe, K., Eto, Y., Takano, S., Nakamori, S., Shibai, H., & Yamanaka, S. (1993). A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate. *Cytotechnology*, 13(2), 107–114.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, 5, 187–200.
- Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., & Benziman, M. (1997). C-di- GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Letters*, 416, 207-211.
- White, D., & Brown Jr, R. (1989). Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose. Schuerch C (ed) *Cellulose and wood-chemistry and technology* (s. 573). içinde New York: Wiley.

- Winter, G. (1962). Formation of scab and rate of epithelization of superficial wounds in skin of young domestic pig. *Nature*, 193(4812), 293.
- Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoun, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Emerick, A. W. & et al, (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 8130.
- Wu, S., & Lia, Y. (2008). Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54(3–4), 103–108.
- Wu, S.-C., & Li, M.-H. (2015). Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4), 444–449.
- Yabannavar, V., Singh, V., & Schaefer, E. (1992). Effect of pressure on an aminoglycoside fermentation mediated by dissolved oxygen. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73, 66.
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2225–2227.
- Yamada, Y., Hoshino, K., & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1244–1251.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Lan Vu, H., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *Journal of General Applied Microbiology*, 58, 397–404.
- Yamanaka, S. (1988). *Cellulose Utilization: Research and Rewards in Cellulose*. Elsevier Applied Science, 175.
- Yamanaka, S., & Watanabe, K. (1994). *Applications of bacterial cellulose in cellulosic polymers*. R. Gilbert. içinde *Cincinnati*: Hanser Publishers Inc.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., & et al, (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 24 (9), 3141–3145.
- Yang, G., Xie, J., Deng, Y., Bian, Y., & Hong, F. (2012a). Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/AgNPs composite: a “green” route for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2482–2487.
- Yang, H., Zhu, C.-L., Yang, J.-Z., Nie, Y., Chen, C.-T., & Sun, D.-P. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21(1), 1–30.

- Yang, J., Yu, J., Fan, J., Sun, D., Tang, W., & Yang, X. (2011). Biotemplated preparation of CdS nanoparticles/bacterial cellulose hybrid nanofibers for photocatalysis application. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1–2), 377–383.
- Yang, Z., Chen, S., Hu, W., Yin, N., Zhang, W., Xiang, C., & Wang, H. (2012c). Flexible luminescent CdSe/bacterial cellulose nanocomposite membranes. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 173–178.
- Yoon, S., Jin, H., Kook, M., & Pyun, Y. (2006). Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes. *Biomacromolecules*, 7(4), 1280–1284.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 219.
- Yoshino, T., Asakura, T., & Toda, K. (1996). Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(1), 32–36.
- Zahan, K.-A., Pa'e, N., & Muhamad, I.-I. (2016). An evaluation of fermentation period and discs rotation speed of rotary discs reactor for bacterial cellulose production. *Sains Malaysiana*, 45(3), 393–400.
- Zhang, W., Chen, S., Hu, W., Zhou, B., Yang, Z., Yin, N., & Wang, H. (2011). Facile fabrication of flexible magnetic nanohybrid membrane with amphiphobic surface based on bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1760–1767.
- Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., & Qiang, T. (2018). Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 705-713.
- Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R., & Kohn, J. (2013). *Biodegradable Polymers*. I. Elsevier içinde, *Principles of Tissue Engineering* (s. 441-473).
- Zhijiang, C., & Guang, Y. (2011). Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). *Materials Letters*, 65(2), 182–184.
- Zhong, C. (2008). Patent No. 200610075040.8. Bacterial cellulose gel face mask. CN .
- Zhong, C., Zhang, G. C., Liu, M., Zheng, X. T., Han, P. P., & Jia, S. R. (2013). Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6189–6199.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39, 1452-63.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : TİRYAKİ, Yaren Nida

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2018
Lise	Ondokuzmayıs Anadolu Lisesi	2014

Yabancı Dil

İngilizce

Bildiriler

1. Emre Avcı, Seda Tercan, Yaren Nida Tiryaki, Gülçin Alp Avcı, Şafak Bulut (2019). Obruk Dam Lake Water Quality's Physicochemical Evaluation. 1st International Symposium on Biodiversity Research, Çanakkale, Türkiye, 2-4 Mayıs 2019
2. Yaren Nida Tiryaki, Gülçin Alp Avcı (2019). Şeker Atığı Melastan Bakteriyel Selüloz Üretimi. Uluslararası Katılımlı 20. Biyoteknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019.

