

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ENZİM TUTUKLANMASINDA  
KULLANILMASI**

**YÜKSEK LİSANS**

**Fevziye ÜNLÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA**

**ARALIK 2024**

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ENZİM TUTUKLANMASINDA  
KULLANILMASI

YÜKSEK LİSANS

Fevziye ÜNLÜ  
(36233611001)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  
Eş Danışman: Doç. Dr. Filiz BORAN

ARALIK 2024

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ENZİM TUTUKLANMASINDA  
KULLANILMASI**

**Tezi Hazırlayan: Fevziye ÜNLÜ  
Yüksek Lisans**

## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca;

Her konuda bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum, her zaman örnek alacağım kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya,

Güleryüzü, samimiyeti, içtenliği ile her konuda hep yanımda olan, günün her saati her konuda bilgi ve desteğini esirgemeyen sabrına hayran kaldığım, örnek aldığım kıymetli eş-danışman hocam Sayın Doç. Dr. Filiz BORAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımın yanı sıra yardımlarını esirgemeyen arkadaşım doktora öğrencisi Eray TATLICI'ya, arkadaşlarım Bahar SAMYELİ ve Müge YALÇIN'a

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgememiş olan annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Fevziye ÜNLÜ

## ONUR SÖZÜ

Doktora veya yüksek lisans tezi olarak sunduğum “**Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Enzim Tutuklanmasında Kullanılması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fevziye ÜNLÜ



## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....	i
ONUR SÖZÜ .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SEMBOLLER VE KISALTMALAR .....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Selülozun Tanımı ve Yapısı .....	1
1.2 Bakteriyel Selülozun Yapısı ve Özellikleri .....	2
1.3 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Besiyerleri.....	3
1.4 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Bazı Mikroorganizmalar .....	4
1.5 Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri .....	5
1.5.1 Statik ve karıştırmalı kültür .....	5
1.5.2 Bakteriyel selüloz üretimi için biyoreaktörler .....	5
1.6 Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları .....	7
1.6.1 Bakteriyel selülozun medikal alanda kullanımı .....	7
1.6.2 Bakteriyel selülozun kağıt endüstrisinde kullanımı .....	8
1.6.3 Bakteriyel selülozun gıda endüstrisinde kullanımı.....	9
1.6.4 Bakteriyel selülozun diyet lifi takviyesi olarak kullanımı.....	9
1.6.5 Bakteriyel selülozun gıda ambalajı olarak kullanımı .....	9
1.6.6 Bakteriyel selülozun kozmetik uygulamalarda kullanımı .....	10
1.6.7 Bakteriye selülozun mikroorganizma ve enzim tutuklama desteği olarak kullanımı.....	10
1.7 Enzim Tutuklama Yöntemleri .....	12
1.8 Lakkaz Enzimi .....	12
1.9 Boyar Maddelerin Renginin Giderimi .....	14
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>24</b>
3.1 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Mikroorganizma.....	24
3.2 Çalışma Boyunca Kullanılacak Stok Aşılama Kültürünün Hazırlanması .....	24
3.3 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Fermentasyon Ortamı .....	24
3.4 Bakteriyel Selülozun Üretimi ve Saflaştırılması .....	25
3.5 Çeşitli Koşulların Bakteriyel Selüloz Verimi Üzerine Etkisi.....	26
3.5.1 İnkübasyon süresinin bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisi.....	26
3.5.2 Sıcaklığın bakteriyel selüloz üretimine etkisi.....	26
3.5.3 pH' nın bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisi.....	26
3.6 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyonu .....	26
3.7 Bakteriyel Selüloz Tabakalarına Lakkaz Enziminin Tutuklanması .....	27
3.7.1 Lakkaz enzim kaynağının elde edilmesi.....	27
3.7.2 Lakkaz enziminin bakteriyel selüloz tabakaları üzerine tutuklanması .....	28
3.8 Optimum pH ve Sıcaklığın Belirlenmesi.....	28
3.9 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz İle Boyar Madde Renk Giderimi Çalışmaları.....	28
3.10 Lakkaz Aktivitesinin Saptanması .....	29
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>30</b>
4.1 Optimizasyon Koşullarının Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi .....	30

4.1.1 İnkübasyon süresinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi.....	30
4.1.2 Sıcaklığın bakteriyel selüloz üretimine etkisi.....	31
4.1.3 Başlangıç pH'sının bakteriyel selüloz üretimine etkisi .....	32
4.2 Bakteriyel Selüloza Lakkaz Enziminin Tutuklanması .....	33
4.3 Enzim Tutuklanmamış Bakteriyel Selüloz ve Lakkaz Enzimi Tutuklanmış Bakteriyel Selüloz Örneklerinin Karakterizasyonu .....	34
4.4 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz Enziminin Aktivite Çalışmaları.....	42
4.4.1 Tutuklanmış lakkaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	42
4.4.2 Tutuklanmış lakkaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi .....	43
4.5 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz Enziminin Boyar Madde Renk Giderim Etkinliği .....	43
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİ .....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>61</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: (A) BS' nin kimyasal yapısı (B) BS'nin ağ benzeri yapısının şematik gösterimi (C) BS liflerinin şematik modellemesi. ....	3
Şekil 1.2: Tekstil boyalarının sınıflandırılması.....	15
Şekil 3.1: Kurutulmuş dut posası atığı .....	25
Şekil 4.1: Bakteriyel selüloz üretimine inkübasyon süresinin etkisi .....	31
Şekil 4.2: Bakteriyel selüloz üretimine sıcaklığın etkisi.....	31
Şekil 4.3: Bakteriyel selüloz üretimi üzerine pH' nın etkisi .....	32
Şekil 4.4: Dut atığı özütü ortamında optimum koşullarda üretilmiş saf formda yaş (a ve b) ve kuru (liyofilize) (c ve d) bakteriyel selüloz örnekleri. ....	33
Şekil 4.5: Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait FTIR spektrumları.....	35
Şekil 4.6: Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait Xray spektrumları .....	36
Şekil 4.7: Enzim tutuklanmamış selüloz yapısına ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri.....	37
Şekil 4.8: Lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz yapısına ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri.....	38
Şekil 4.9: Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait AFM görüntüleri .....	39
Şekil 4.10: Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait yüzey pürüzlülük değişimi ölçümleri .....	40
Şekil 4.11: Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait DTA termogramları .....	41
Şekil 4.12: Enzim tutuklanmış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait DSC termogramları.....	42
Şekil 4.13: Tutuklanmış lakkaz enziminin farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri .....	42
Şekil 4.14: Tutuklanmış lakkaz enziminin farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri .....	43
Şekil 4.15: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 171 boyasının renginin giderimi .....	45
Şekil 4.16: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 171 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar .....	46
Şekil 4.17: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 198 boyasının renginin giderimi .....	47
Şekil 4.18: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 198 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar .....	48
Şekil 4.19: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 5 boyasının renginin giderimi .....	49
Şekil 4.20: Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 5 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar .....	50

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
<b>ATR</b>	: Azaltılmış Toplam Yansıma
<b>BS</b>	: Bakteriyel Selüloz
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>DPAÖ</b>	: Dut Atığı Posası Özütü
<b>DSC</b>	: Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
<b>DTA</b>	: Diferansiyel Termal Analiz
<b>FE-SEM</b>	: Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopisi
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
<b>g</b>	: Gram
<b>GRAS</b>	: Genel Olarak Güvenli
<b>HS</b>	: Hestrin- Schramm
<b>L</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>pH</b>	: Power of hydrogen
<b>RB 171</b>	: Reaktif Mavi 171
<b>RB 191</b>	: Reaktif Mavi 191
<b>RB 5</b>	: Reaktif Siyah 5
<b>Rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolution Per Minute)
<b>SDB</b>	: Sabourond Dekstroz Broth
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TGA</b>	: Termgravimetrik analiz
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>XRD</b>	: X Işınları Toz Kırınımı

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE ENZİM TUTUKLANMASINDA KULLANILMASI

Fevziye ÜNLÜ

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

61+VIII sayfa

2024

Danışman: Prof. Dr.Özfer YEŞİLADA

Bakteriyel selüloz (BS) bazı bakteriler tarafından sentezlenen bir eksopolisakkarittir. BS selüloz yüksek saflık, yüksek su tutma kapasitesi, mekanik dayanıklılık, geniş yüzey alanı gibi üstün özellikleriyle oldukça dikkat çekici bir biyopolimerdir. Bu polimer pek çok uygulamada kullanılabilir. Üretimi ve uygulamaları üzerine pek çok çalışma vardır. BS'nin mikroorganizma ve enzim tutuklanmasında tutuklama ajanı olarak kullanımına yönelik çalışmalar da vardır.

Bu çalışmada, iyi bir BS üreticisi olan *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 (*Komagataeibacter xylinus*) kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle bu bakterinin dut posası atığı özütü besiyerinde BS üretim potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH'nın BS üretimi üzerine etkisi test edilmiştir. Daha sonra elde edilen BS'nin karakterizasyonu yapılmıştır.

Enzimleri tutuklamak için çeşitli matriksler (destek materyalleri) kullanılmaktadır. BS çevre dostu bir polimerdir ve enzim tutuklama matriksi olarak çevre dostu materyallerin kullanımı önemlidir. Bu nedenle, BS'nin enzim tutuklama matriksi olarak kullanılabilirliğini test etmek için *Trametes trogii* ATCC 200800 ile tekrarlı-kesikli koşullarda üretilmiş lakkaz enzimi (pek çok uygulamada kullanılabilen bir enzim) BS üzerine tutuklanmış ve tutuklanmış enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı saptanmıştır. Daha sonra da, tutuklanmış enzimin çevre kirliliği oluşturan boyar maddelerin renk gideriminde tekrarlı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Sonuçlar dut posası atığı besiyerinin BS üretiminde kullanılabilir iyi bir doğal besiyeri olabileceğini, bu ortamda üretilen BS'nin lakkaz enzimini tutuklamak için kullanılabilirliğini ve tutuklanmış enzimin tekstil boyalarının renginin gideriminde tekrarlı olarak uygulanabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteri selülozu, Boyar madde renk giderimi, Dut posası atığı özütü, Lakkaz, Tutuklama

## ABSTRACT

Master Thesis

### BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION AND ITS USE FOR ENZYME IMMOBILIZATION

Fevziye ÜNLÜ

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

61 +VIII page

2024

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Bacterial cellulose (BC) is an exopolysaccharide synthesized by some bacteria. It is a remarkable biopolymer with its superior properties such as high purity, high water retention capacity, mechanical strength and large surface area. This polymer can be used in many applications and there are many studies on production of BC and its applications.

In this study, *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 (*Komagataeibacter xylinus*), which is a good BC producer, was used. In the study, firstly, the BC production potential of this bacterium in the mulberry pomace waste extract medium was investigated. For this purpose, the effects of incubation time, temperature and pH on BC production were tested. Then, the obtained BC was characterized.

Various enzyme immobilization matrices (support materials) are used for the immobilization of enzymes. BC is an environmentally friendly polymer and the use of environmentally friendly materials as enzyme immobilization matrix is important.

Therefore, to test the usability of BC as an enzyme immobilization matrix, laccase enzyme (an enzyme that can be used in many applications) produced under repeated-batch conditions with *Trametes trogii* ATCC 200800 was immobilized on BC and the optimum temperature and pH of the immobilized enzyme were determined. Then, the repeated use of the immobilized enzyme in the decolorization of dyes that cause environmental pollution was investigated.

The results showed that mulberry pomace waste extract medium can be a good natural medium that can be used in BC production, BC produced in this medium can be used to immobilize laccase enzyme, and the immobilized enzyme can be applied repeatedly in textile dye decolorization.

**Keywords:** Bacterial cellulose, Dye decolorization, Immobilization, Laccase, Mulberry pomace waste extract

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Selülozun Tanımı ve Yapısı

Selüloz, dünyada yaygın olarak bulunan ve bitkiler, funguslar, algler, deniz canlıları ve bakteriler tarafından üretilen doğal bir biyopolimerdir. D-glukopiranoz birimlerinin  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bitkisel materyallerin yaklaşık %33'ü, pamuğun %90'ı ve odunun %40-50'si selülozdan oluşmaktadır (Gündüz vd. 2015; Barud vd. 2016; Jiyang vd. 2020; Pang vd. 2020).

Her yıl dünya genelinde tüketilen selüloz miktarı 100 ila 150 milyar ton arasındadır (Hon. 1994). Selüloz tüketimi sürekli artmaktadır ve kullanılan selüloz esas olarak bitkisel kaynaklıdır. Bitkilerde selüloz, hemiselüloz ve lignin ile bir karışım olarak bulunur.

Odun ve hidrokarbonların yanmasıyla atmosfere çok miktarda karbondioksit verilmesinin en önemli sonuçlarından bir tanesi de küresel ısınmadır. Küresel ısınmayı engellemenin en temel yolu, yeryüzündeki fotosentezi arttırarak daha fazla karbondioksitin bitkiler tarafından kullanılmasını sağlamaktır. Bu nedenle odun ve pamuğun selüloz üretiminde kullanımını sınırlandırmak için alternatif yöntemler aranmaktadır.

Bakteriler de selüloz üretebilirler. Bakterilerden elde edilen selüloz birçok avantaja sahip olduğundan bitkilerden elde edilen selüloza karşı önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Bakteriyel selüloz (BS), üretildiği besiyerinin doğal aromasını ve pigmentini de kazanabilir (Shi vd. 2014).

Bu çalışmada doğal ve zengin içerikli bir atık olan dut posası atığından elde edilen özüt ile hazırlanan besiyeri kullanılarak *Gluconacetobacter xylinus* B759 suşunun statik koşullarda BS üretim yeteneği araştırılmıştır (Unlu vd. 2023). Kullanılan bakterinin selüloz üretim yeteneği üzerine çeşitli koşulların etkisi de test edilmiş ve bu amaçla inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH'nın selüloz üretimine etkisi incelenmiştir. Daha sonra elde edilen bakteriyel selülozun enzim tutuklama ajanı olarak kullanılıp kullanılmayacağı test edilmiş ve tutuklanmış enzimin boyar madde renk giderim yeteneği araştırılmıştır. Tez çalışmalarında kullanılan dut posası atığı özütü literatür bilgilerimize göre bu tip bir çalışmada ilk kez kullanılmıştır.

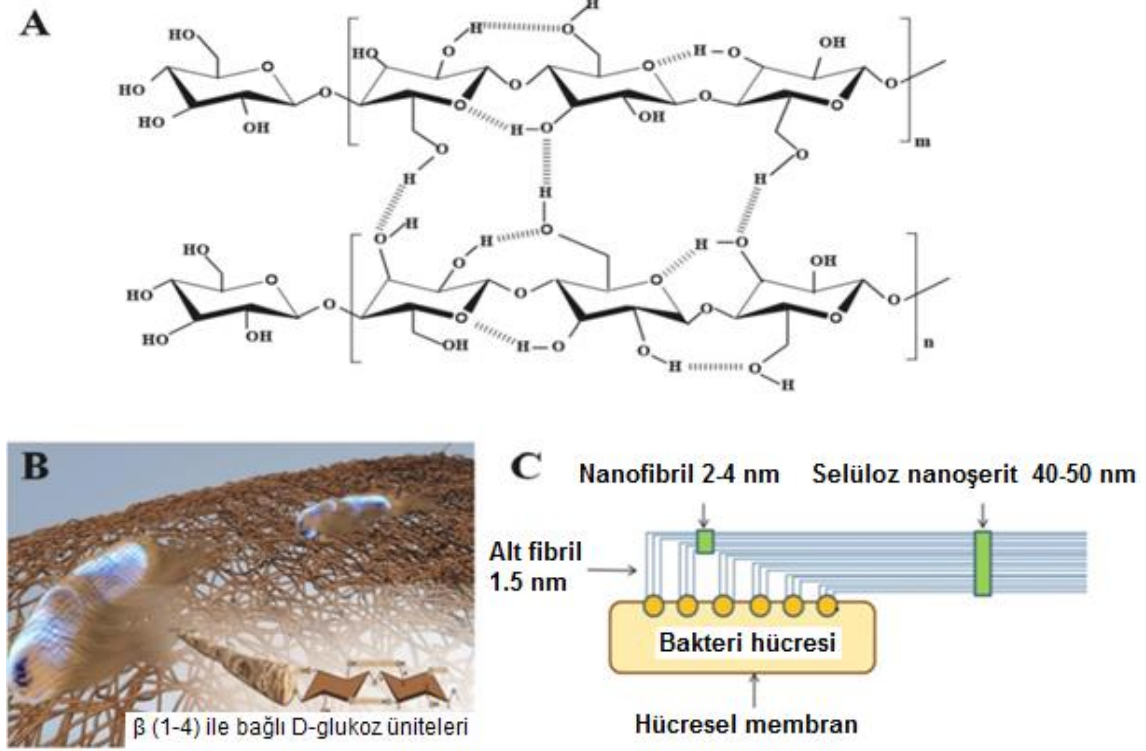
## 1.2 Bakteriye Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Bakteri metabolizmasının ilk ürünü olan BS'nin viskoz yapısı ve hidrofilik özellikleri, bakterileri kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) ve UV ışınına karşı korur (Çoban vd. 2008; Gündüz vd. 2015; Güzel vd. 2018).

Bakteriyel selüloz (BS) ve bitkisel selüloz kimyasal yapı açısından benzerdir. Fakat fiziksel özellikleri farklıdır. BS, nanogözenekli yapıya ve yüksek saflığa sahip bir polimerdir. Özellikle mekanik mukavemeti, alerjik olmama, şeffaflık, dinamik fiber şekillendirme yeteneği ve kalıplanabilirliği gibi özellikleri ile öne çıkmaktadır. BS'nin yapısında bitkisel yapıda bulunan lignin, hemiselüloz veya pektin gibi bileşenler bulunmaz. Bakteriye selüloz saf olduğundan, elde edilmesi için pahalı ekstraksiyon uygulamalarına ve yoğun saflaştırma işlemlerine gerek yoktur. Bu da, bitkisel selüloza göre önemli bir avantajdır (Shi vd. 2014; Cazon vd. 2020; Fernandes vd. 2020; Pang vd. 2020). Üretimde tarımsal ve endüstriyel atıklar gibi kaynaklar besiyeri olarak kullanılabilirliğinden, çevre kirliliği riski oluşturan atıklar da üretim sürecinde besiyeri olarak değerlendirilebilir. Çevre dostu olduğundan ve gıda güvenliği problemi oluşturmadığından çok geniş kullanım alanı vardır (Shi vd. 2014).

Bakteriyel selüloz çeşitli aerobik bakteriler tarafından sentezlenebilen çevre dostu birekzopolisakkarittir. Doğada biyolojik olarak kolay parçalanabilir olması, bitki selülozuna göre yaklaşık 100 kat daha ince yapısı ve 20-100 nm çaplı üç boyutlu fiber ağlara sahip olması önemli özellikleridir (Birben vd. 2019; Fernandes vd. 2020; Li vd. 2021).

BS, yapı olarak birkaç bine kadar polimerizasyon derecesine sahip  $\beta$ -D-glukopiranoz birimlerinden oluşan bir homopolimerdir. Reaktif birincil ve ikincil hidroksil grupları ile 6 üyeli bir siklik yapıdan oluşur.  $\beta$ -D-glukopiranoz halkası, tüm -OH gruplarının ekvatorial pozisyonda mevcut olduğu, iki bitişik zincir arasındaki moleküller arası H-bağında anahtar rol oynayan bir sandalye konformasyonuna sahiptir. BS, tip I $\alpha$  ve I $\beta$  selüloz kristal allomorflarının yanı sıra bazı para-kristal ve amorf alanları içerir. Bitki selülozu ile karşılaştırıldığında, BS, amorf selüloz formuyla interpolasyon yapılan daha az kristalli bir bölge ile çevrelenmiş oldukça kristalli bir çekirdekten oluşur (Foresti vd. 2017; Wahid vd. 2021). Şekil 1'de BS'nin kimyasal yapısı, BS'nin ağ benzeri yapısının şematik gösterimi ve BS liflerinin şematik modellenmesi görülmektedir (Barud vd. 2016; Cacicedo vd. 2016; Wahid vd. 2021).



**Şekil 1.1:** (A) BS' nin kimyasal yapısı (B) BS' nin ağ benzeri yapısının şematik gösterimi (C) BS liflerinin şematik modellenmesi.

BS'nin biyosentezi, çok sayıda enzimin işe karıştığı biyokimyasal bir süreçtir. Bu süreçte; şeker birimleri önce UDP-glikoza dönüştürülmekte ve daha sonra da selüloz zincirlerine polimerize edilmektedir (Güzel vd. 2018; Islam vd. 2017). Biyosentez sürecinde öncelikle glukoz, glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Daha sonra glukoz-6-fosfatdan, glukoz-1-fosfat sentezlenir ve glukoz 1-fosfattan da UTP kullanılarak UDP-glukoz sentezlenir. UDP-glukoz da selüloz zincirlerinin sentezinde kullanılır (Swingler vd. 2021).

### 1.3 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

BS üretimine ilişkin yapılan araştırmalar ek besin kaynakları içeren sentetik ortamlarda veya çeşitli atıklar, doğal ham maddeler ve atıksular ile hazırlanmış besiyerlerinde yürütülmektedir (Jozala vd. 2015).

BS verimi, maliyeti ve özelliği kullanılacak kültür ortamının çeşidine ve içeriğine bağlı olarak değişir. Tanımlanmış ortamların kullanıldığı çalışmalarda, öncelikle tanımlanmış ortamlardaki değişkenleri optimize etmek ve ardından da BS üretimi üzerindeki etkisini görmek için azot kaynağının yanı sıra kompleks karbon kaynaklarının test edilmesinin iyi bir strateji olacağı vurgulanmıştır (Singhania vd. 2021). Sentetik besiyerleri kullanıldığı

zaman besiyeri içeriğinin zenginleştirilmesi, BS'nin üretimini ve özelliklerini etkilemektedir. BS üretimi çeşitli sentetik besiyerlerinde test edilmiştir. *G. xylinus*'un statik koşullarda pirüvik asit, malik asit, laktik asit, sitrik asit ve süksinik asit gibi organik asitler eklenmiş sentetik ve tanımlanmış besiyerlerinde üretimini, BS verimini önemli ölçüde artırdığı ve ayrıca %4 etanol eklenmesinin de üretimi indüklediği rapor edilmiştir (Lu vd. 2011). Üretim ortamına sitrik asidin yanı sıra etanolün eklenmesi, sitrik asit döngüsünün (TCA döngüsü) ana yan ürününü azaltarak BS verimini arttırmaktadır (Li vd. 2012).

BS üretiminde, BS kalitesi üzerinde olumlu etkisi olacak doğal ham maddelerin, atıkların ve atıksuların besiyeri olarak kullanılmasının, hem işlem maliyetini hem de çevre kirliliği riskini azaltmak açısından olumlu etkilerinin olacağı açıktır. Yapılan çeşitli çalışmalarda tütün atığı özütü, akçaağaç şurubu, turunçgil suyu, beyaz kabak suyu, limon özütü artıkları, çin hurması sirkesi, elma sirkesi, küspe asidi, pirinç kabuğu, patates kabuğu, hurma şurubu, buğday sapı, kahve kabuğu, pamuk atıkları ve çeşitli meyve atıklarının besiyeri olarak kullanımı test edilmiştir. Peynir altı suyu, vinas gibi atıksular ve melas gibi zengin içerikli doğal ham maddelerin de üretim ortamı olarak kullanımı araştırılmaktadır (Çoban vd. 2008; Fernandes vd. 2020; Güzel vd. 2018; Pang vd. 2020).

#### **1.4 Bakteriye Selüloz Üretiminde Kullanılan Bazı Mikroorganizmalar**

Bakteri ile BS üretimi ilk kez 1886 yılında AdrianBrown tarafından gerçekleştirilmiştir. Brown, *Bacterium aceti* ile yaptığı asetik asit fermentasyonu sırasında kültür ortamının yüzeyinde jelatinimsi bir zar olduğunu gözlemlemiştir ve bu film hızla büyüyerek ortamın yüzeyini kaplamıştır. Bu aslında ilk kez BS'nin keşfidir. BS üreten mikroorganizma *Acetobacter xylinum* olarak adlandırılmıştır. Bu bakteriye keşfedilmesinden bu yana çeşitli isimler verilmiştir. BS üreten bakteri *A. xylinum* olarak adlandırıldıktan sonra *Gluconacetobacter xylinus* olarak adlandırılmıştır. Günümüz de ise *Komagataeibacter xylinus* olarak sınıflandırılmaktadır (Wahid vd. 2021).

*Gluconacetobacter* ve *Acetobacter* olarak bilinen *Komagataeibacter* ve ayrıca *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ve *Alcaligenes* cinsleri BS üretebilmektedir. Bunlar arasında *Gluconacetobacter* cinsi en verimli BS üreticilerindedir (Zhang vd. 2017; Lin vd. 2020; Chen vd. 2022; Singhania vd. 2022). *G. xylinus* olarak da bilinen *K. xylinus* yüksek düzeyde BS üreten bir türdür (Lu vd. 2020). Belirtildiği gibi gram negatif bir bakteri olan *K. xylinus* diğer türlere kıyasla daha fazla ve ayrıca yüksek saflıkta BS ürettiğinden dolayı ve üretilen

BS de bitkisel selüloza çok benzediği için çoğu çalışmada odak noktası olmuştur (Ahmed vd. 2020).

## **1.5 Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri**

### **1.5.1 Statik ve karıştırmalı kültür**

Bakteriyel selüloz, farklı fermentasyon koşullarında, farklı uygulamalarla üretilebilir. Geleneksel olarak statik veya çalkalamalı kültür yöntemleri ile üretilmektedir (Shi vd. 2014; Campano vd. 2016; Güzel vd. 2020). Bakteriyel selüloz statik kültürde, ortam ve hava arasındaki hava-sıvı arayüzünde aerobik bakteriler tarafından ince bir film (selüloz tabakası) şeklinde üretilir (Cazon vd. 2020; Pang vd. 2020). Selüloz üreten bakteriyel suşlar statik kültür koşullarında çalkalamalı kültürlerle nazaran daha fazla selüloz oluşturabilir (Shi vd., 2014; Güzel vd. 2018). Bununla birlikte statik koşullarda bakteri üremesi ve BS üretimi yavaştır (Lee vd. 2014). BS üretiminde ticari başarının elde edilmesinin önündeki en önemli engel büyük ölçekli üretimde karşılaşılan zorluklardır. BS fermentasyonunda ilk kullanılan yöntem statik yöntemdir. Bu yöntemde BS, hava/sıvı ara yüzeyinde oluşmaktadır. Statik yöntem kullanılarak verimi arttırmanın en önemli yollarından biri de yüzey alanının genişletilmesidir. Bu da büyük ölçekli üretimde sorun yaratır (Son vd. 2001).

Statik üretimde bakteri üremesi ve BS üretimi uzun bir zaman alır. Uygulamaya göre selüloz oluşumu 5-15 gün alabilir. BS üretiminde ihtiyaç duyulan üretim zamanını kısaltmak için çalkalamalı kültür yapılabilmektedir (Lee vd. 2014). Karıştırma sırasında daha fazla oksijen sağlanmasının yanı sıra yeterli sıvı, katı ve gaz karışımı sağlanabilir. *G. xylinus* çok fazla oksijene ihtiyaç duyduğundan, karıştırmayla hava sirkülasyonunun sağlanması verimi arttırmaktadır. Ancak karıştırmalı kültürde, karıştırıcının oluşturduğu kuvvet selüloz üretmeyen mutant hücrelerin oluşmasına bu da statik yönteme kıyasla verimin biraz daha düşük olmasına neden olmaktadır. Ayrıca statik yöntemle zar yapısında selüloz elde edilirken, karıştırmalı yöntemde lifli yapıda selüloz üretilmektedir. Lifli yapıdaki bu selüloz ortam viskozitesinin artmasına, karıştırma problemlerine ve oksijen transferinde sorunlara neden olmaktadır (Son vd. 2001).

### **1.5.2 Bakteriyel selüloz üretimi için biyoreaktörler**

Biyoreaktörlerin tasarımı, BS'nin yapısını ve verimini belirlemede önemli bir faktördür (Ul-Islam vd. 2015). Biyoreaktörler kullanılarak BS üretimi artırılabilir, bakteride mutasyon oluşması engellenebilir ve ayrıca işçilik azaltılabilir. Bu amaçla test edilen biyoreaktörler

arasında tepsi biyoreaktör, karıştırılmalı tank biyoreaktör, hava yüklemeli biyoreaktör, aerosol biyoreaktör, membran biyoreaktör, döner (dönen) disk biyoreaktör ve döner (dönen) tambur biyoreaktör gibi biyoreaktörler sayılabilir (Lee vd. 2014).

Karıştırılmalı tank biyoreaktörü, kültür ortamının mekanik karıştırıcıyla karıştırıldığı ve buna bağlı olarak oksijenin sağlandığı bir uygulamadır. Mekanik karıştırma yapıldığı için oksijen sağlanması kolaydır. Bu, fermantasyon sürecini hızlandırır (Kouda vd. 1996;Chao vd. 2001; Wahid vd. 2021). Pelet şeklinde selüloz oluşur. Bu sürecin bir dezavantajı mekanik karıştırıcının hücreler üzerinde kesme gerilimi yaratmasıdır.

Karıştırılmalı tank biyoreaktöründen farklı olarak, hava yüklemeli biyoreaktörde ortama oksijen sağlanması ve karıştırma, havalandırma ile yapılır. Hava yüklemeli reaktörlerdehavayla karıştırma yapıldığı için kesme gerilimi azaltılıp uygulanan oksijence zengin hava sayesinde de besiyerindeki çözünmüş oksijen miktarı arttırılmakta böylelikle yüksek selüloz verimi elde edilmektedir. Hava yüklemeli reaktörlerde enerji ihtiyacı daha azdır (Cheng vd. 2002).

Tepsi biyoreaktör ise tepsi benzeri biyoreaktörlerden oluşan statik bir uygulamadır. Burada kültür ortamının yüzeyinde jelatinimsi bir membran üretilir(Chen vd. 2019).

Aerosol biyoreaktör, kültür ortamının oksijenle karıştırıldığı ve suşların üremesi ve BS üretimini teşvik etmek için BS peliküllerinin yüzeyine püskürtüldüğü bir biyoreaktördür (Hornung vd. 2007; Wahid vd. 2021). Bu kültür süresini azaltır. Aerosol biyoreaktörde yüksek kristalikte ve gerilme mukavemetine sahip BS üretilir (Dudman. 1960; Wahid vd. 2021).

Membran biyoreaktörü kullanılarak da BS üretilebilmektedir. Membran biyoreaktörde, besinleri ve hücreleri ayırmak için hidrofilik bir polietersulfon membran kullanılır ve böylece hücreleri etkilemeden besinler geçebilir (Lee vd. 2014; Wahid vd. 2021).

Döner (dönen) disk biyoreaktöründe diskler bir mil üzerine yerleştirilir ve mil bir motor aracılığıyla döndürülür. Disklerin yaklaşık yarısı besiyeri içerisine batmış ve diğer yarısı da dışarda kalacak şekilde tasarlanır. Disklerin sürekli belirli bir hızda döndürülmesi sırasında disklerin yüzeyi hem besiyerine girip çıkar. Disk yüzeyinde biyofilm şeklinde üreyen bakteriler dışarı çıktığında sıvı yüzeyde çözünmüş oksijeni alır. Besiyerine girdiğinde ise besin maddelerini oksitlerler ve bakteriyel selüloz üretimi gerçekleşir (Güzel vd.2020).

Döner tambur biyoreaktörü, döner disk biyoreaktörüne benzer. Fakat burada, ayrı ayrı diskler yerine tambur vardır ve bakterinin üreme sürecinde tambur yüzeyinde BS oluşur. Dönüş hızı, havalandırma ve havalandırma kontrol edilir (Chen vd. 2019).

## **1.6 Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları**

BS; yüksek nano gözenekli yapısı, yüzey fonksiyonel grupları, yüksek saflığı, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek kristal yapısı, ultra ince fiber ağ yapısı, mükemmel gerilme mukavemeti ve çevre dostu olması gibi benzersiz fiziko-mekanik özellikleri nedeniyle farklı alanlardaki uygulamalarda dikkate değer bir ilgi görmektedir (Islam vd. 2017; Jusko vd. 2020).

### **1.6.1 Bakteriyel selülozun medikal alanda kullanımı**

Özellikleri ve biyouyumluluğu nedeniyle BS, doku onarımı ve kontrollü ilaç salınımı dahil olmak üzere biyomedikal uygulamalarında büyük ilgi uyandırmaktadır (Almeida vd. 2014; Chen vd. 2022).

Deri, yapay kan damarları, yapay kalp kapakçıkları, ilaç taşıyıcıları, geniş yanıkları olan hastalar için yara sargılarında ve diş implantlarında BS kullanılmaktadır (Barud vd. 2016; Jusko vd. 2020). BS; mükemmel biyouyumluluk, esneklik, yüksek gözeneklilik, iyi su tutma kapasitesi ve iyi gaz ve sıvı geçirgenliği gibi özelliklerinden dolayı yara iyileştirici pansumanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut yara bakım malzemeleri, kuru yara yüzeylerine yapışan gazlı bezler gibi iyi emilim ve geçirgenlik göstermektedir. Bununla birlikte, çıkarıldığı zaman yara bölgesinde travmaya ve hasara neden olabilir. Yüksek saflıkta kimyasal bileşime sahip bakteriyel selülozlar ise cilt dostu ve mekanik açıdan sağlam olmaları nedeniyle yara pansumanı için ideal adaylardır (Ahmed vd. 2020; Pang vd. 2020; Ma vd. 2020; Islam vd. 2017).

BS membranı, modern yara örtüleri, yara dehidrasyonunun önlenmesi, iyileşmenin desteklenmesi ve enflamatuvar ve bağışıklık tepkilerinin azaltılması dahil olmak üzere çeşitli işlevleri kolaylaştırmak için geliştirilmiştir (Gutierrez vd. 2019). Bu membran, enfeksiyonu önlemek ve lokal ağrıyı azaltmak için kullanılabilir mükemmel bir pansuman malzemesidir (Sharma vd. 2019). Piyasada çeşitli yara örtüleri bulunmaktadır. Yara pansuman malzemelerinin antibakteriyel olması, rahatlık ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliklerini sağlanması istenir. Fiziksel özellikler açısından bakıldığında, BS'nin mükemmel biyouyumluluk, esneklik, yüksek gözeneklilik, su tutma kapasitesi, gaz ve sıvı geçirgenliği, ultra ince ve yüksek derecede düzenli nanofibril ağ yapısı, hücre dışı matrisin yapısal özelliklerini taklit etmektedir. Bu da, BS malzemesi kaplanmış bir yara bölgesine hücre göçünü kuvvetle destekler (Chen vd. 2022).

Bakteriyel selüloz, yanık bölge üzerinde iyileştirici bir özelliğe sahiptir. BS steril edilebilir, dokuya uyumludur, gözeneklidir, elastiktir ve elle tutulması kolaydır. Suyu adsorbladığı için belli oranda nem içerir bu da yanıkların daha hızlı iyileşmesini sağlar. Ayrıca yanık bölgede ikincil enfeksiyonların oluşmasını engeller, yanık bölgedeki ısıyı emerek acıyı ve ağrıyı azaltır ve yaranın dokuda yayılmasını engeller (Güzel vd. 2018; Çoban vd. 2008).

BS, sinir sisteminin Schwann hücreleri ile iyi bir biyouyumluluğa sahiptir. İnsan osteoblastlarının ve L929 fibroblast hücrelerinin yapışmasını ve çoğalmasını destekler (Islam vd. 2017). BS'nin *invivo* biyouyumluluğunun ayrıntılı bir araştırması Wistar sıçanları üzerinde yapılmıştır. BS'nin membranlara subkutan implantasyonunun hiçbir inflamasyon belirtisi göstermediği ve 12 hafta boyunca şeklini koruduğunu gösterilmiştir (Islam vd. 2017). Kıkırdağın sınırlı rejeneratif yetenekleri, doktorlar için çeşitli zorluklar yaratır. Kıkırdak replasmanında kullanılan malzemeler sert, elastik, toksik olmamalı ve zamanla biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Bu gereksinimler BS'yi kıkırdak replasmanı için ideal bir aday malzeme yapar. Bakteriyel selülozda büyüyen kıkırdak kondrositleri yüksek proliferasyon ve kollajen tip II üretimi göstermiştir (Islam vd. 2017). BS benzersiz özellikleri nedeniyle, kemik dokusu mühendisliğinde ilgi çekmektedir. BS kompozitlerinin kemik hasarını onarma yeteneğini geliştirmek için, bir miktar kemik hidroksiapatit, kemik iliği mezenkimi gibi onarım bileşenleri, kök hücreler, büyüme faktörleri ve hücre dışı matriks proteini ve östrojen bakteriyel selüloz yapılarına emdirilmiştir (Pang vd. 2020). Zaborowska ve ark. vasküler endotel büyüme faktörünü bakteriyel selüloz iskelelerine dahil ederek yeni damar oluşumunu, kemikleşmesini ve olgunlaşmasını arttırmak amacıyla fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda farelerde femoral kırıklarda kemik oluşumunu gözlemlemişlerdir (Pang vd. 2020).

### **1.6.2 Bakteriyel selülozun kağıt endüstrisinde kullanımı**

BS, çok iyi mekanik özelliklere sahip olduğundan iyi kalitede kâğıt üretiminde kullanılır. Bakteriyel selüloz içerikli kâğıtlar, dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmelerinin yanısıra elastik, geçirgen, yırtılmalara-yanmalara dirençli ve suyu emme özelliğine de sahiptirler. Tarihi dokümanların tamirinde kullanılan el yapımı kâğıtların fibrillerine az miktarda bakteriyel selüloz ilave edilmesiyle yıpranmaya dirençli bir etki yaratılmış olur. Ayrıca bakteriyel selülozdan yüzey kaplamada kullanılan kağıtlar da üretilmiştir. Bu kâğıtlar cilalı, parlak, düzgün ve gözenekli bir görünüme sahiptir (Çoban vd. 2008).

### **1.6.3 Bakteriye selülozun gıda endüstrisinde kullanımı**

Gıda endüstrisinde çeşitli BS uygulamalarını görebilmekteyiz. Bunlar arasında en yaygın uygulamalar olarak Güneydoğu Asya'da geleneksel olarak üretilen Nata de coco tatlısı ve Kombucha çayı vardır. Nata de coco tatlısı üretiminde, elde edilen BS küçük parçalara bölünür ve Nata adı verilen şeker şurubuna batırılır. Bu ürün, yumuşak ve pürüzsüz yüzeye sahip bir tatlı olup basit üretim süreci nedeniyle tüm dünyada çok popüler hale gelmiştir. Nata de coco'nun yüksek lif içeriğinden dolayı serum ve kolesterol düşürücü etki yaptığı da rapor edilmiştir (Çoban vd. 2008; Güzel vd. 2018; Sriplai vd. 2020).

Çin tarzı köfteye BS eklenmesinin doku üzerinde olumsuz bir etkisinin olmamasının yanı sıra raf kararlılığı özellikleri açısından da kontrol grubuna kıyasla benzer kalitede görüldüğü gösterilmiştir. Ayrıca en az 1 aylık saklama süresi boyunca nemini koruyabildiği için köftelere sululuk ve çiğneme özelliği sağladığı da belirlenmiştir (Lin vd. 2014; Shi vd. 2014).

Doğal kırmızı pigmentli küf ile oluşturulan Monascuse-BS kompleksinin lezzeti ete benzer ve vejeteryanlar için önemli bir gıdadır (Lin vd. 2020; Shi vd., 2014; Güzel vd. 2018). BS, 1992 yılında Japonya'da diyet içeceklerle ilave edilmeye başlanmıştır.

BS üretebilen *Acetobacter* cinsi bakteriler ile çay ve şeker fermente edilmekte, ürünler Kombucha ya da Mançurya çayı olarak tüketilmektedir (Güzel vd. 2018).

### **1.6.4 Bakteriye selülozun diyet lifi takviyesi olarak kullanımı**

BS'un insülin direncini, karaciğer hasarını ve inflamasyonu azaltarak, antioksidan savunma sistemini güçlendirerek, adipositokinlerin ve adipogenez ile ilişkili proteinlerin salgılanmasını düzenleyerek farelerde obeziteyi etkili bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. BS takviyesi villus hücrelerinin uzunluğunu, kolon mukozası ve kas kalınlığını etkili bir şekilde artırabilir. Böylece kolonik düz kas hücrelerini apoptoza karşı koruyabilir. Bu bulgular, bakteriye selülozun kabızlığı hafifletmek ve kısa zincirli yağ asitleri ile bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek için umut verici bir diyet lifi olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Shi vd. 2014; Lin vd. 2020).

### **1.6.5 Bakteriye selülozun gıda ambalajı olarak kullanımı**

BS'nin gıda paketlenme uygulamalarında birçok avantajı bulunmaktadır. Poli laktik asit ile birleştirilen bakteriye selülozun, gıda paketlenmesi için artırılmış bir hidrofobiklik, özel yüzey ve bariyer özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Shi vd. 2014; Lin vd. 2020).

### **1.6.6 Bakteriye selülozun kozmetik uygulamalarda kullanımı**

Tüm selülozlar doğal ortamda biyolojik olarak bozunabildiği için BS, kozmetik alanında çığır açan araştırmaların hedefi olmuştur. BS; nemli bir ortam sağladığı, patojenlere karşı etkili bir fiziksel bariyer olduğu, doku yenilenmesi için iyi koşullar oluşturduğu ve geçici cilt yara örtüsü için tavsiye edildiğinden yanıklar dahil yara bakımında 1980'den beri kullanılmaktadır (Bianchet vd. 2020).

BS'nin beyazlatıcı etkisine bağlı akne ve sivilce tedavisi sağlayan bir maske elde etmenin yanı sıra nemlendiriciler ve yaşlanma karşıtı ajanlar gibi hidrofilik aktiflerin cilde nüfuz etmesinde de kullanılabilmesi bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada BS iki ay boyunca haftada üç kez 69 gönüllü üzerinde maske olarak kullanılmıştır. Maske, cilde iyi bir yapışma sağlamıştır ve cildin nem oranını %76 artırarak cilt tedavileri için umut verici bir alternatif olabileceğini ortaya koymuştur (Islam vd. 2017; Bianchet vd. 2020).

Hyaluronik asit içeren bir BS maskesi de geliştirilmiştir. Maske, cilt için yüksek nemlendirme gücü göstererek, nem kaybını önlemiş ve mükemmel cilt sonuçları sağlamıştır (Bianchet vd. 2020). Kozmetik alanında Mary Kay™, Bio Enzymes™ Leaders™ gibi firmalar biyo-selüloz yüz maskeleri üretmektedir. (Fernandes vd. 2020).

### **1.6.7 Bakteriye selülozun mikroorganizma ve enzim tutuklama desteği olarak kullanımı**

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen bazı polimerler (selüloz, hyaluronik asit, dekstran ve skleroglukan vb.) biyoteknolojik süreçte başarıyla kullanılabilir. Bu polimerler arasında bulunan BS, son zamanlarda özellikle hücrelerin ve çeşitli biyoaktif maddelerin tutuklanması (immobilizasyon) uygulamalarında ilgi çekmektedir. BS parçacığındaki moleküller düzenli, sıralı ve üç boyutlu bir yapıdadır. Bu özellikler BS'yi mekanik ve esneklik açısından son derece güçlü kılar. BS, toksik değildir ve biyolojik olarak uyumludur. Mikroorganizmaların tutuklanmasının önemli bir avantajı, tutuklanmış hücrelerin tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Hücre tutuklanmasında kullanılan sentetik malzemeler (örneğin, poliakrilamid, poliüretan, ve polietilen) biyolojik olarak parçalanamazlar ve hücre açısından toksik etkileri olabilir. Doğal taşıyıcıların ise düşük üretim maliyeti ve toksik olmaması gibi birçok avantajı vardır. Bununla birlikte, doğal taşıyıcıların bazı sınırlamaları da vardır. Kimyasal endüstriyel işlemler sırasında kararlı değildirler, heterojendirler ve bu nedenle de ön işlem gerektirirler. Ayrıca, mekanik dayanıklılıkları tatmin edici değildir ve hücre çoğalmasının yetersiz olduğu kabul edilmektedir. (Żywicka vd. 2016)

Yapılan alışmalar BS'nin tutuklama ve fermentasyon surecini desteklemek amacıyla maya için bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Tutuklanmış mayaların önemli ölçüde yüksek metabolik aktivite sergilediği ve fermentasyon sırasında elverişsiz koşullara yüksek direnç gösterdikleri görülmüştür. Tutuklanmış mayaların etkin bir şekilde tekrar tekrar kullanılabilirdiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. BS, *Saccharomyces cerevisiae* tutuklanması için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. *G. xylinus*'un farklı suşları tarafından farklı zaman dilimlerinde üretilen BS üzerinde tutuklanan *S. cerevisiae*'nin alkol üretimindeki etkinliği rapor edilmiştir (Żywicka vd. 2016).

BS, enzim tutuklanması çalışmalarında da kullanılmıştır. Özellikle lakkaz enziminin tutuklanmasında yüksek işlev göstermektedir. Lakkaz, yani p-difenol: dioksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.2), yaygın olarak *Trametes* cinsi fungusları tarafından üretilen enzimdir. Lakkaz enzimi çeşitli organik bileşikleri oksitlemede, atık su arıtımında, biyoremediasyon ve spesifik özellikler gösteren polimerlerin üretiminde önemlidir (Drozd vd. 2018).

Lakkaz yüksek oksidasyon kapasitesinden dolayı araştırıcıların ilgisini çekmektedir. Ancak serbest lakkaz enzimi sıcaklık, metal iyonları ve pH gibi dış vreysel faktörlerden etkilenebilir. Ayrıca serbest lakkazsıvı ortamda zndğnde onu bu ortamdan geri almak zordur ve bu da enzimin tekrar tekrar kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle lakkaz enzimi hem tekrar tekrar kullanılabilmek hem de çeşitli açılardan kararlılığını sağlamak için tutuklanır. Lakkaz, aktivitesini korumak için taşıyıcı üzerine adsorpsiyon, çapraz bağlama ve kovalent bağlama yoluyla tutuklanabilir ve böylece enzim tekrar tekrar kullanılabilir ve ayrıca toksik vrelere iyi tolere edebilir. Adsorpsiyon uygulaması ek reaktifler gerektirmese de, enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşim zayıftır ve enzimin taşıyıcıdan salınması kolaydır. Çapraz bağlama yöntemi ise enzim tutuklanmasında kullanılan kararlı bir yöntemdir. En yaygın kullanılan çapraz bağlayıcı glutaraldehittir ve enzim ile taşıyıcı arasında bir aracı olarak işlev görür (Qiao vd. 2022).

Lakkaz tutuklanmasında kullanılacak taşıyıcıların ucuz, kolay elde edilebilir ve vre dostu olmaları avantaj sağlar. BS, lakkaz enziminin tutuklanmasında kullanılacak doğal ajanlardan (desteklerden) biridir. *Komagataeibacter xylinus* suşları tarafından sentezlenen BS, yüksek mekanik mukavemet, su emilimi için büyük kapasite ve düşük safsızlık seviyesi gibi benzersiz özellikleri sayesinde biyokatalizör tutuklanması için çok yönlü bir taşıyıcı olarak kabul edilir (Drozd vd. 2018).

## 1.7 Enzim Tutuklama Yöntemleri

Enzimatik reaksiyonlarda, çözünür enzim kullanıldığı zaman reaksiyon sonrası enzim çözündüğü için enzimi tekrar tekrar kullanabilmek mümkün değildir. Tutuklanmış (immobilize) enzimlerin kullanılması bu sorunu çözer. Enzimleri tutuklayarak, tekrar tekrar ve buna bağlı olarak ekonomik bir şekilde kullanmak olasıdır. Enzimleri adsorpsiyon, çapraz bağlama ve içeride tutuklama uygulamaları ile tutuklayabiliriz. Enzimlerin tutuklanması genellikle katı matrislere adsorpsiyon ve/veya kovalent bağlanma ile ve ayrıca membran, jel veya kapsül içerisine alarak gerçekleştirilir. Tutuklama genellikle, belirli işlem koşulları altında enzim kararlılığının artmasıyla da sonuçlanır (Chi Wu vd. 2008).

Enzim protein yapıda biyolojik bir katalizördür. Dolayısıyla zararsız organik bir bileşiktir. Lakkaz, çeşitli substratların (fenol ve aromatik gruplar gibi) oksidasyon reaksiyonunu katalize edebilen, böylece moleküler oksijeni H<sub>2</sub>O' ya indirgeyen bir enzimdir (Bassanini vd. 2021). Lakkaz enzimi çok önemli bir biyoteknolojik enzimdir. Bu enzimin serbest veya tutuklanmış formunu çeşitli uygulamalarda kullanabilmek için araştırmalar yapılmaktadır (Bakar vd. 2024; Kolak vd. 2023). Serbest lakkaz enzimini tekrar tekrar kullanabilmek ve ayrıca katalitik özelliklerini yararlı yöne geliştirmek için yapılan tutuklama çalışmaları gün geçtikçe artmakta ve çeşitlenmektedir.

Enzimleri katı malzemeler üzerinde hareketsiz hale getirmek için genellikle basit bir adsorpsiyon yöntemi benimsenmiştir. Bu uygulamanın dezavantajı enzimlerin taşıyıcıdan kolay ayrılmasıdır. Bu problemi önlemek için, enzim molekülleri kovalent bağlama ile katı desteklere bağlanabilir. Bunun da dezavantajları bulunmaktadır. Genel olarak enzim tutuklama stratejileri, taşıyıcılı ve taşıyıcısız uygulamaları içerir. Taşıyıcısız tutuklama, basitliğinden ve yüksek aktiviteyi koruma özelliğine sahip kararlı katalizörler sağlayan ölçeklenebilirliği nedeniyle çok caziptir. Taşıyıcısız tutuklanmış enzimler, enzimlerin çapraz bağlanmasıyla hazırlanabilir. Taşıyıcılı ve taşıyıcısız tutuklanmış enzimlerin avantajlarını birleştirerek endüstriyel uygulamalar için uygun süreçler oluşturulabilir (Fathali vd. 2019). Lakkaz enzimini tutuklamak için içeride tutuklama, adsorpsiyon, kovalent bağlama ve enzimlerin birbirine çapraz bağlanması uygulamaları yapılmaktadır (Fernández vd. 2013).

## 1.8 Lakkaz Enzimi

Lakkaz (EC 1.10.3.2), ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından *Rhus vernicifera* ağacının salgısında keşfedilmiş daha sonra ise 1985 yılında Bertrand tarafından fungal enzim (metal

içeren oksidaz) olarak karakterize edilmiştir (Thurston vd. 1994; Kyomuhimbo vd. 2023).Esas olarak çoklu bakır oksidazlardan olan bu enzim, funguslardan, çeşitli bitkilerden, bakterilerden ve böceklerden elde edilir. Bununla beraber, mikrobiyal kökenli olan lakkazlar (özellikle odun çürükçülü funguslara ait), yüksek oksidasyon yeteneği ve daha geniş bir substrat özgüllüğü nedeniyle ilgi çekmektedir (Morsi vd. 2020). Lakkaz, çok çeşitli aromatik ve inorganik substratların oksidasyonunu eş zamanlı olarak oksijenin suya indirgenmesiyle katalizleyen bir enzimdir (Rekuc vd. 2009).Bakır merkezlerine göre, bu enzimler tip 1 (mavi), tip 2 (normal) ve tip 3 (çift çekirdekli) olmak üzere üç gruba ayrılır. Tip 1 ve tip 2 lakkazlar bir Cu atomu içerirken, tip 3 iki Cu atomuna sahiptir (Ouzounis vd. 1991). Lakkazlar, sentez/dönüşüm, tekstil işleme, gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi, biyoremediasyon, lignoselülozik materyallerin modifikasyonu, yeni malzemelerin üretiminin yanı sıra biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin yapımı, atık su arıtımı, ve spesifik özellikler gösteren polimerlerin üretiminde büyük bir potansiyele sahiptir(Rochefort vd. 2004).

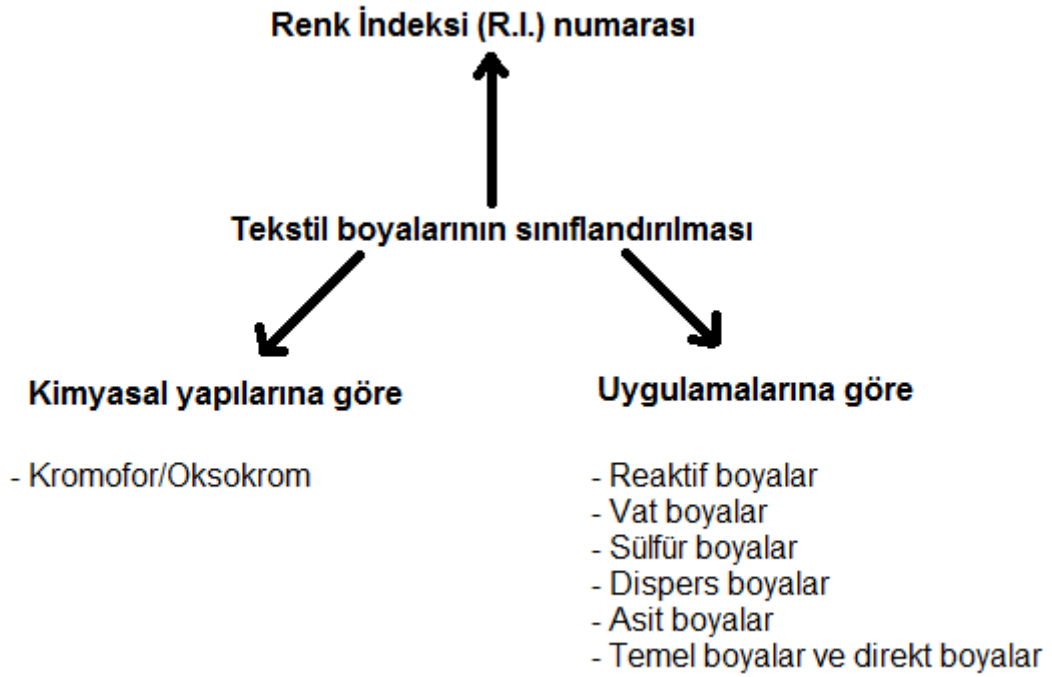
Lakkazların endüstride geniş kullanımını üretim maliyetleri, düşük kararlılıkları, pH ve sıcaklığa karşı hassasiyetleri ve yeniden kullanımlarındaki zorluklar gibi koşullar engellenmektedir (Shokri vd. 2021). Lakkazlarının yüksek oksidasyon yeteneği önemlidir ancak serbest lakkazlar sıcaklık, metal iyonları ve pH gibi çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Ayrıca serbest ve su da çözünür lakkazları reaksiyon ortamından ayırmak zordur. Bu da tekrar tekrar kullanımını engellemektedir. Bu sorunların üstesinden gelmek için araştırmacılar, lakkazları tutuklamaktadırlar.Tutuklama; enzimlerin sıcaklık, pH ve depolama kararlılıklarının artırılması açısından da önemlidir (Chen vd. 2015; Rahmani vd. 2015; Shokri vd. 2021). Lakkazın tutuklanması tekrar tekrar kullanılabilmesini sağlarken ve aktiviteyi etkileyecek maddelere ve koşullara karşı hassasiyet gibi sorunları da çözer (Mokhtar vd. 2019 Zdarta vd. 2019). Tutuklama için kullanılacak desteklerin ucuz, kolay temin edilebilir ve çevre dostu olmaları avantaj sağlar. BS,lakkazın tutuklanacağı doğal taşıyıcılardan biridir (Drozd vd. 2018). BS mikrofibrillerinin yoğunluğu ve gözenek boyutları su tutma kapasitesinde ve su salınım hızında farklılıklara neden olur (Drozd vd. 2018). Biyoteknolojik açıdan önemli olan lakkazın BS'ye tutuklanmasının araştırılması uygulamanın yeniliği, uygunluğu ve çevresel avantajları nedeniyle oldukça anlamlıdır (Chen vd. 2015).

## 1.9 Boyar Maddelerin Renginin Giderimi

Boya, uygulandığı malzemeye renk vermek için kullanılan organik bir bileşiktir. Boyaların evrensel bir özelliği, renk üretmek için görünür bölgedeki (400-700 nm) ışığı absorbe etme veya yayma yetenekleridir. Ayrıca rezonans ve dolayısıyla renk kazandırmak için genellikle karmaşık bir aromatik konjuge sistem gereklidir. Bir boyanın bu aromatik halkaları, kromoforlar olarak adlandırılan renk taşıyan gruplardan ve kromoforların rengini yoğunlaştıran veya değiştiren ve boyaların sabitlenmesine izin veren köprü grupları (yardımcı kromlar) gibi diğer kimyasal gruplardan oluşur (Herath vd. 2024).Günümüzde boyalar tekstil, kağıt, plastik, kauçuk, otomotiv, denizcilik, gıda endüstrisi, boya endüstrisigibi birçok endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.Boyalar genellikle onları ışığa, oksidasyona ve biyolojik olarak parçalanabilen işlemlere karşı dayanıklı kılan karmaşık bir yapıya sahiptir (Panda vd. 2021).

Boyalar temel olarak iyonik ve iyonik olmayan boyalar olarak sınıflandırılır. Boyalar ayrıca renklerine ve kimyasal yapıya bağlı fonksiyonel gruba göre de sınıflandırılır. İyonik boyalar ayrıca katyonik ve anyonik boyalara ayrılır. İyonik olmayan boyalar; Vat boyaları ve dispers boyalar olarak ikiye ayrılabilir. Genel olarak iyonik boyalar reaktiviteleri ve kanserojen doğaları nedeniyle daha yüksek risk oluşturur (Panda vd. 2021).

Boyalar kimyasal yapılarına veya kromofor gruplarına göre ise azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antrakinin, ftalosiyenin, triarilmetan, indigoid, diarilmetan, oksazin, azin, tiyazin, ksanten, nitro, nitrozo, metin, indamin, tiyazol, indofenol, aminoketon, lakton, hidroksi keton stilben ve kükürt boyaları olarak sınıflandırılır (Herath vd. 2024). Tekstil boyalarının kimyasal yapılarına ve uygulamalarına göre sınıflandırılması Şekil 1.2'de görülmektedir (Benkhaya vd. 2020).



**Şekil 1.2:** Tekstil boyalarının sınıflandırılması

Günümüzde birçok endüstriyel alanda çeşitli sentetik boya türleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekstil boyaları, tekstil ve boyama endüstrisinin atık sularındaki ana kirleticilerdir. Kullanılan boyaların yaklaşık %5-10'u atık su ile çevreye salınmaktadır (Boran vd. 2019). Bu endüstrilerden yüksek miktarlarda boya içeren atık su oluşmaktadır ve bu atık sular deşarj edildiğinde su kaynaklarında önemli ölçüde kirliliğe neden olup insan sağlığını da ciddi şekilde tehdit etmektedir (Secula vd. 2008). Boyar maddelerin uzaklaştırılması, önemli bir çevresel sorundur ve zorunludur. Sürdürülebilir ve uygun çözümler için atık sudaki zararlı kirleticileri uzaklaştırarak çevreyi korumak gereklidir.

Enzimatik bozunma (biyolojik) ve adsorptif (fiziksel) boya giderme en etkili boya giderme teknikleri olarak kabul edilmektedir. Enzimlerin yüksek aktivitesi, seçiciliği, etkinliği, güvenliği ve özgülüğü nedeniyle boyar madde gideriminde kullanılması, zararlı kimyasalların nazik katalitik koşullarda giderimi açısından önemlidir (Asgher vd. 2008). Boyar maddelerin renginin gideriminde enzim kullanmanın başlıca avantajları, enzimlerin hızlı renk giderme yetenekleri ve elverişsiz koşullar altında bile aktivitelerini sürdürebilmeleri olabilir (Yeşilada vd. 2014). Lakkazın boya renk giderimi için etkili bir enzim olduğu rapor edilmiştir (Yeşilada vd. 2014). Daha önce belirttiğimiz gibi serbest

lakkazın tekrar tekrar kullanılmama gibi dezavantajlara sahip olması (Huang vd. 2023), bu enzimin boyar madde gideriminde tutuklanarak kullanılmasını da öne çıkarmaktadır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Güzel ve Akpınar (2018) yapmış oldukları çalışmada narenciye kabuklarından (limon, mandalina, portakal ve greyfurt kabukları) hazırladıkları ortamlarda *Komagataeibacter hansenii* GA2016'nın bakteriyel selülozun üretimini ve karakterizasyonunu araştırmışlardır. Kabuklar seyreltik asit ile hidrolize edilmiş ve hidrolizatlar BS üretimi için kullanılmıştır. BS üretimi, statik koşullar altında 28-32 °C'de 21 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Çalışmada BS verimleri %2,06-%3,92 arasında bulunmuştur. Narenciye kabuğu hidrolizatlarında üretilen BS'lerin FTIR spektrumlarının, ticari olarak üretilen BS'ye benzer olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, narenciye kabuklarından üretilen tüm BS'lerin yüksek su tutma kapasitesine, ince fiber çapına, yüksek sıcaklık kararlılığına ve yüksek kristaliteye sahip olduğunu göstermiştir (Güzel vd. 2018).

Bir diğer çalışmada Souza ve arkadaşları (2020) Hestrin ve Schramm besiyeri (HS), kaju meyvesi suyu ve soya fasulyesi melasını kullanarak *Gluconacetobacter xylinus* ile bakteriyel selüloz üretimini test etmişlerdir. Statik inkübasyonla üretilen BS; X-ışını kırınımı, FITR ve termogravimetrik analiz ile karakterize edilmiştir. Çalışmada karbon kaynağı olarak kaju meyvesi suyu (20 g/L) ve azot kaynağı olarak soya melası (10 g/L) kullanılan ortamlardaki BS üretiminin (4,50 g/L), HS ortamlarındakinden (4,03 g/L) daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Morfolojik analizler, tarımsal-endüstriyel yan ürünlerle üretilen bakteriyel selülozların, HS ortamından elde edilen BS tabakalarına benzer olduğunu göstermiştir (Souza vd. 2020).

Atykyan ve arkadaşları yaptığı çalışmada (2020) besiyeri olarak melas kullanmışlar ve statik ortamda *Gluconacetobacter sucrofermentans*'ın doğal ve tutuklanmış formları kullanılarak elde ettikleri BS'lerin yapısal farklılıklarını Raman ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada bakteriyel selülozun üretiminde melas ortamına %1.5 etanol (%75.62) ilavesinin kristaliteyi arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyel selüloz kristalitesinin çalkalamalı ve havalandırmalı ortamda statik ortamdan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Statik ortamda elde edilen BS kristallik derecesi %73.5 iken çalkalamalı ve havalandırmalı ortamında sırasında bu değer %75.6 olarak

hesaplanmıştır. Maksimum BS içeriği, melas ve doğal hücreler içeren üretim ortamına %0.5 askorbik asit eklendiğinde gözlenmiştir (Atykyan vd. 2020).

Barshan ve arkadaşları (2019) ise yaptıkları çalışmada, *Komagatacibacter xylinus* PTCC 1734 suşu ile vinas ortamında BS üretimini araştırmışlardır. Optimize edilmiş koşullarda üretilen BS (%40 vinas ve 10 gün) karakterize edilmiş ve Hestrin-Schramm ortamında üretilen BS ile karşılaştırılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu ile BS'nin 3 boyutlu ağ yapısı doğrulanmıştır. Ortalama fibrillerin çapının 30-120 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada bir atık su olan vinasın, üretim için ucuz ve uygun bir karbon kaynağı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Barshan vd. 2019).

Bir diğer çalışmada, Jozala ve arkadaşları (2015) çürümüş meyve ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atıklar ve standart kültür ortamı olarak da HS besiyerinde *Gluconacetobacter xylinus*'un BS üretimini araştırmışlardır. Ayrıca, farklı koşullarda üretilen BS'nin yapısını da belirlemişlerdir. Çalışmada en yüksek BS verimi (60 mg/mL) çürük meyve kültürü ortamı ile elde edilmiştir. Sonuçlar çürük meyvenin BS üretimi için kullanılabileceğini göstermiştir (Jozala vd. 2015).

Rangaswamy ve arkadaşları (2015) çalışmalarında çürük meyve ve çürük sebze gibi doğal kaynaklardan 30 selüloz üreticisinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çürük nar, çürük tatlı patates ve çürük patatesten elde edilen *Gluconacetobacter sp.* RV28, *Enterobacter sp.* RV11 ve *Pseudomonas sp.* RV14 bakteri izolatları morfolojik ve biyokimyasal analizlerle tanımlanmıştır. *Gluconacetobacter sp.* RV28'nin BS üretim verimi sıcaklık, pH, ekim miktarı, çalkalama, karbon ve azot kaynakları gibi çeşitli faktörler ve koşullarda test edilmiştir. Bu suş, optimum üreme koşullarında (30 °C sıcaklık, pH 6.0, %2 sükröz, %0.5 pepton ve ekim miktarı %5) 4.7 g/L selüloz üretmiştir. Mikrobiyal selülozun karakterizasyonu ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır (Rangaswamy vd. 2015).

Bir diğer çalışmada daha ucuz ve ikili karbon kaynakları kullanarak *Gluconacetobacter persimmonis* ile BS üretimi test edilmiştir. Çalışmada BS üretimi için ananas, nar, kavun, karpuz, domates, portakal gibi çeşitli meyve sularının yanı sıra pekmez, nişasta hidrolizatı, şeker kamışı suyu, hindistan cevizi suyu, hindistan cevizi sütü bakteriyel selüloz üretiminde alternatif karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bunlar içerisinde kavun, 8.08 g/L ile en yüksek selüloz verimini vermiştir. Ayrıca glukoz, fruktoz, sükröz, maltoz, laktoz, mannitol, inositol ve gliserol ikili karbon kaynakları olarak ikili kombinasyonda (1:1) kullanılmıştır.

Bu ikili karbon kaynaklarından, fruktoz ve sükroz (1:1) kombinasyonu 8.79 g/L ile en yüksek selüloz verimini vermiştir. Bu çalışmada doğal ucuz karbon kaynakları kullanılarak BS üretim ortamının maliyeti düşürülmeye çalışılmıştır (Hungund vd. 2013).

Tsouko ve arkadaşları çalışmalarında (2015) biyodizel ve şekerleme endüstrilerinden gelen atık ve yan ürünleri fermantasyon ortamı olarak kullanarak BS'nin yüksek verimle üretilip üretilmeyeceğini test etmişlerdir. Çalışmada ilk olarak, ticari şekerler ve ham gliserol kullanılarak sentetik ortamda *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 bakterisi suşunun kesikli fermentasyonu araştırılmıştır. Bu ortamda en yüksek BS konsantrasyonu ham gliserol için 3.2 g/L ve sakkaroz için de 4.9 g/L olarak elde edilmiştir. Fermantasyon ortamı olarak ham gliserol ve ayçiçeği unu hidrolizatlarının kombinasyonu, 13.3 g/L' lik BS üretimi ile sonuçlanmıştır. Benzer sonuçlar (13 g/L), şekerleme endüstrisinden üretilen un açısından zengin hidrolizatlar kullanıldığında da elde edilmiştir. Bu çalışma, biyodizel endüstrisinden gelen yan ürünlerin ve şekerleme endüstrilerinden gelen atıkların, ticari besin kaynaklarıyla üretilenlerle benzer özelliklere sahip BS üretimi için besin kaynağı olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Tsouko vd. 2015).

Bir diğer çalışmada Carreira ve arkadaşları (2011) çeşitli atıkları kullanarak yüksek kalitede BS üretimini araştırmışlardır. Bu amaçla üzüm kabukları özütü, peynir altı suyu, ham gliserol ve sülfite hamuru sıvısını BS üretimi için ekonomik karbon ve besin kaynakları olarak değerlendirmişlerdir. Şarap ve kağıt hamuru endüstrilerinin atıklarının kullanıldığı ortamlarda elde edilen BS miktarları sırasıyla 0.6 ve 0.3 g/L iken, bu miktar biyodizel ham atığı ve peynir altı suyu için 96 saatlik inkübasyondan sonra yaklaşık 0.1 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları, ham gliserol ve üzüm kabukları kültür ortamına diğer besin kaynaklarının (maya özütü, azot ve fosfat) eklenmesi ile BS üretiminin sırasıyla yaklaşık %200 ve %100 oranında artırılabilirliğini göstermiştir (Carreira vd. 2011).

*Gluconacetobacter xylinus* ile yapılan bir çalışmada BS üretiminde substrat olarak lipid fermentasyon atık suyu kullanılmıştır. 5 günlük fermentasyondan sonra, en yüksek BS verimi 0.659 g/L olarak elde edilmiştir. Lipid fermentasyon atık suyunda üretilen BS numunelerinin kristalliğinin fermentasyon sırasında kademeli olarak arttığı gözlemlenmiş, FE-SEM, FTIR ve XRD analizleri geleneksel HS ortamındakine kıyasla BS yapısı üzerinde az bir etkinin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada karbonhidrat polimeri içeren lipid fermentasyon atık sularının BS üretimi için besiyeri olarak kullanılabilirliği rapor edilmiştir (Huang vd. 2016).

Mohammadkazemi ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmada karbon kaynaklarının ve kültür ortamının BS'nin üretimi ve yapısal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fermantasyon ortamı olarak ise Hestrin-Schramm, Yamanaka ve Zhou ortamlarını kullanmışlardır. Bu ortamlara hurma şurubu, glukoz, mannitol, sükroz ve saf suya saflığında sükroz olmak üzere beş farklı karbon kaynağı eklemiştir. Bakteri olarak *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 suşu kullanılmış ve bu ortamlarda BS nanofibrilleri sentezlenmiştir. Üretilen tüm BS tabakaları; termogravimetrik analiz (TGA), x-ışını kırınımı (XRD) ve alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile kuru ağırlık belirlenmesi, biyokütle üretim verimi, sıcaklık kararlılığı, kristalite ve morfoloji açısından karakterize edilmiş ve iyi bir azot kaynağı olan mannitolün en yüksek ürün etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Kompozitlerin sıcaklık kararlılığında en yüksek artış ise Hestrin-Schramm ortamında mannitol kullanıldığında elde edilmiştir. Ayrıca Hestrin-Schramm ortamında oluşan BS'nin kristalitesi diğer ortamlara göre daha yüksek olmuştur (Mohammadkazemi vd. 2015).

Kızıldaş ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (2015) *Acetobacter xylinus* 23769 suşu için odun sıcak su özütlerinden nispeten düşük maliyetli olan bir kültür ortamı geliştirmişlerdir. Odun sıcak su özütü esas olarak monomerik şekerler, organik asitler ve organiklerden oluşur. Bu çalışmada farklı pH (5, 6, 7 ve 8) ve sıcaklıkların (26, 28 ve 30 °C) etkileri de incelenmiştir. En iyi BS üretimi (0.15 g/L), pH 8.0 ve 28 °C sıcaklıkta elde edilmiştir (Kızıldaş vd. 2015).

Birben (2019) yaptığı tez çalışmasında Kombucha çayındaki karışık kültürden selüloz üreticisi bakteri olan *Komagataeibacter saccharivorans* LN886705 suşunu ve bunun yanı sıra *Brettanomyces anomalus* KY103303 ve *Brettanomyces bruxellensis* MH393498 mayalarını izole etmiştir. Elde edilen mikrobiyal selüloz ile Malaşit Yeşilli, Bromfenol Mavisi, Bismark Kahverengisi Y, Oranj G, Reaktif Mavi 221, Akridin Turuncusu, Trifan Mavisi, Reaktif Yeşil 19 ve Indigo Karmin boyar maddelerinin renklerinin giderimleri araştırılmıştır. En yüksek renk giderimi Trifan Mavisi ve Akridin Turuncusu boyaları için belirlenmiştir. Mikrobiyal selüloz kullanılması sonucunda Trifan Mavisi ve Akridin Turuncusu boyalarının yarım saatteki renk giderim oranlarının sırasıyla %75 ve %79, bir saatteki oranların %89 ve %80 ve yirmi dört saatteki oranlarında %99 ve %93 olduğu rapor edilmiştir (Birben, 2019).

Boran (2022) çalışmasında *Gluconacetobacter xylinus* ile üretilmiş saf bakteriyel selülozun yaş ve kuru formlarının renk giderimindeki etkinliğini araştırmıştır. Çalışmada Reaktif Mavi

171 (200 mg/L), Remazol Parlak Mavi R (150 mg/L) ve Chrocion Yeşil H-E4BD (100 mg/L) boyaalarının renginin giderimi test edilmiştir. Çalışmada, en yüksek renk giderimi oranları 30°C, 150 rpm' de 24 saatlik inkübasyondan sonra Reaktif Mavi 171, Remazol Parlak Mavi R ve Chrocion Yeşil H-E4BD boyaaları için sırasıyla %51, %52 ve %54 olarak yaş BS ile ilk kullanımda elde edilmiştir. Bu değerler aynı boyaalar için ilk kullanım sonunda BS' nin kuru formları için ise %11, %21 ve %20 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda BS'nin yapısı ve morfolojisi SEM, XRD ve FTIR analizi ile belirlenmiştir (Boran, 2022).

Żywicka ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2016) çeşitli *Gluconacetobacter xylinus* suşları ile üretilen kuru ve yaş formdaki BS'leri maya tutuklaması için destek materyali olarak kullanmışlardır. Çalışmada üç farklı *Gluconacetobacter xylinus* suşundan 72, 120 ve 168. saatlerde elde edilen BS membranları *Saccharomyces cerevisiae*'nin tutuklanması için kullanılmıştır. Çalışma ayrıca BS yüzeyine maya tutuklanmasında etkili olan fermentasyon işlemi ile birlikte glukoz tüketimi ve alkol üretiminin analizlerini de içermektedir. 3 günlük inkübasyondan sonra elde edilen yaş BS membranları, maya tutuklanmasında taşıyıcı olarak en uygun özellikleri göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, tutuklanmış maya hücrelerinin sayısının selüloz sentezleyen suşun tipine, selüloz formuna ve sentez süresine bağlı olduğunu göstermektedir. Üç gün inkübasyon sonrası elde edilen yaş formdaki BS'nin maya tutuklaması için en uygun özelliklere sahip destek materyali olduğu belirlenmiştir. Formuna bakılmadan BS üzerine maya hücrelerinin tutuklanması serbest hücrelere karşın üretilen alkol miktarını artırmıştır (Żywicka vd. 2016).

Chen ve arkadaşları (2015) doğal BS'nin lakkaz enzimi tutuklama ajanı olarak kullanılabilmesini test etmişlerdir. *Gluconacetobacter* tarafından sentezlenen BS, mannitol içeren ortamda statik olarak üretilmiş ve saflaştırma işleminden sonra BS'nin dondurulup kurutulmuş formu kullanılmıştır. Çalışmada *Trametes versicolor* lakkazı fiziksel adsorpsiyon ve glutaraldehit ile çapraz bağlanma yoluyla bakteriyel selüloza tutuklanmıştır. ABTS substrat olarak kullanıldığında adsorpsiyon ile tutuklanmış lakkaz için optimum pH 3.5 olarak belirlenirken çapraz bağlama örneğinde pH 4.0 olarak tespit edilmiştir. Tutuklanmış lakkazın yedi kez kullanımdan sonra bile aktivitesini %69 oranında koruduğu gözlenmiştir (Chen vd. 2015).

Frazao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ticari lakkaz enzimini kuru bakteriyel selüloza adsorpsiyonla tutuklamışlardır. Enzim konsantrasyonun lakkaz tutuklamasında önemli olduğunu belirtmişlerdir. Tutuklanmış lakkazın uygulama kararlılığının yüksek olduğu ve ABTS kullanımında başlangıç aktivitesinin %86'sını 7 biyokatalitik döngü sürecinde

koruduğu rapor edilmiştir. Tutuklama sonucunda Vmax değeri de 9.9 kat düşmüştür (Frazao vd. 2014).

Yüksek maliyet ve düşük işlem kararlılığı lakkazın tekstil boyalarının renginin gideriminde olası kullanımını sınırlayan en önemli zorluklardır. Bu nedenle çeşitli çalışmalarda lakkazı tutuklamak için farklı desteklerin (matriks) kullanımı da test edilmiştir. Örneğin Bakar ve arkadaşları (2024) bu zorlukların üstesinden gelmek için çalışmalarında poli-vinilpirolidon (PVP) kaplı manyetik nanopartiküller (MNP'ler) üretmiş ve karakterize etmişlerdir. Bu çalışma *Trametes trogii* ATCC 200800 suşunun ürettiği lakkaz enziminin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PVP MNP'ler üzerine tutuklanmasını araştıran ilk çalışmadır. Lakkazın bu matriks üzerine başarılı bir şekilde tutuklanmıştır. Tutuklanmış lakkazın biyokimyasal özellikleri ve kararlılığı saptanmış ve ayrıca iki farklı tekstil boyasının (RBBR ve İndigo Karmin) tekrarlı gideriminde verimliliği ortaya konmuştur. Tutuklanmış lakkaz yedi kez tekrarlı kullanımdan sonra orijinal aktivitesinin yaklaşık %58'ini korurken, oda sıcaklığında 28 gün depolamanın ardından orijinal aktivitesinin %25'e kadarını korumuştur. Lakkaz tutuklanmış matriksten 20 mg kullanıldığı zaman, tekrarlı kullanım sürecinde RBBR (8. tekrar) ve İndigo Karmin (6. tekrar) için ilk kullanımda sırasıyla %78 ve %76 renk giderimi elde edilirken son kullanımda her iki boya için de %32 oranında renk giderimi elde edilmiştir (Bakar vd. 2024).

Kolak ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada lakkaz tutuklamak için polikaprolakton (PCL)/polietilenimin (PEI) elektrospun fiberleri yeni, ucuz, çevre dostu ve sürdürülebilir bir malzeme olarak önermişlerdir. Bu fiberler, elektrospınleme tekniği ile optimize edilmiş ve hazırlanmıştır. Çalışmada lakkaz içermeyen ve lakkaz tutuklanmış elektrospun fiberlerin morfolojisini ve yapısını araştırmak amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ham lakkaz enzimleri, beyaz çürükçül funguslar olan *T. trogii* (TT) ve *T. versicolor* (TV)'dan elde edilmiştir. Elektrospun fiberler yaklaşık 560 nm ortalama çapa sahip pürüzsüz bir yüzey gösterirken lakkaz tutuklaması sonrası daha büyük çaplar gözlemlenmiştir. Tutuklama lakkazın depolama ve işlem kararlılığı gibi özelliklerini arttırmıştır. Ayrıca lakkaz tutuklanmış PCL/PEI/TTL ve PCL/PEI/TVL'nin, Orange II ve Malaşit Yeşili boyalarının renginin gideriminde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. PCL/PEI/TTL'nin pH 5 ve 50°C'de 8 kez tekrarlı kullanım sonrasında dahi Orange II ve Malaşit Yeşili boyalarının rengi sırasıyla %86 ve %46 oranında giderilebilmiştir. Sonuçlar bu yöntemle etkili bir biyolojik sistemin elde edilebileceğini göstermektedir (Kolak vd. 2023).

Yapılan diğer bir çalışmada, Kobalt (Co) ve Bakır (Cu) bazlı metal-organik çerçeveler (MOF) hazırlanmış ve lakkaz iki farklı MOF üzerinde kapsülleme yoluyla tutuklanmıştır.

Karakterizasyon sonuçları lakkazın MOF desteklerine iyi bir şekilde tutuklandığını göstermiştir. Tutuklanmış lakkazlar etkin şekilde tekrarlı olarak kullanılabilmiştir. Tutuklanmış biyolojik sistem yüksek sıcaklıkta kararlı kalmış ve ayrıca yüksek depolama kararlılığı göstermiştir. Örneğin; Lac/Co-MOF ve Lac/Cu-MOF, oda sıcaklığında 4 haftalık depolamanın ardından aktivitelerinin %58'den fazlasını korumuşlardır. Lac/Co-MOF ve Lac/Cu-MOF'un 12 kez tekrarlı kullanımdan sonra bile başlangıç aktivitelerinin %57 ve %56'sını korudukları belirlenmiştir. Lac/Co-MOF'un Reaktif Mavi 171 ve Reaktif Mavi 198 boyları için renk giderim aktivite değerleri 5. tekrarda sırasıyla %78 ve %61 olarak saptanmıştır (Birhanli vd. 2022).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada bakteriyel selüloz üretimi için *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B- 759 (*Komagataeibacter xylinus*) suşu kullanılmıştır. Bu suş, Hestrin Schramm (HS) agar içeren petrielerde 30 °C'de 48 saat üretildikten sonra +4 °C buzdolabında depolanmakta ve her ay düzenli olarak taze HS agar besiyerine pasajlanarak devamlılığı sağlanmaktadır. Çalışmada kullanılan HS agar besiyerinin içeriği şöyledir (g/L); glukoz (20 g), pepton (5 g), maya özütü (5 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.7 g), sitrik asit (1.15 g), agar (15 g). Bu çalışmada kullanılan bakteri İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

#### 3.2 Çalışma Boyunca Kullanılacak Stok Aşılama Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada bakteri üretimi için HS sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır. Bu ortam (g/L); glukoz (20 g), pepton (5 g), maya özütü (5 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.7 g), sitrik asit (1.15 g) içermektedir. *G. xylinus* stok katı kültüründen öze ile bir miktar alınarak steril koşullarda 50 ml HS sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere ekim yapılmış ve örnekler 30 °C'de 10 gün boyunca statik olarak inkübe edilmiştir. 10 gün sonra elde edilen kültürden 1 mL alınarak 50 mL HS içeren 100 mL'lik erlenlere transfer edilmiştir. Örnekler 30 °C'de 10 gün boyunca statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. 10 günlük inkübasyonun ardından elde edilen bu kültür çalışma boyunca stok bakteri kültürü olarak kullanılmıştır.

#### 3.3 Bakteriyel Selüloz Üretiminde Kullanılan Fermentasyon Ortamı

Dut posası atığı özütü, bakteriyel selüloz üretiminde fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Bu ortam, düşük maliyetli atık bir yan ürün ve doğal ve zengin içeriğe sahip olması sebebiyle tercih edilmiştir. Dut meyvesi; flavonlar, flavonoller, izoflavanoller, stilbenler, lignanlar, tanenler, antosiyaninler, kateşinler gibi polifenoller açısından zengindir. Ayrıca dut yaprağı ve meyveleri; proteinler, karbonhidratlar, lipitler, vitaminler, mineraller (demir, bakır, çinko, potasyum, sodyum, magnezyum, kalsiyum ve manganez),

aminoasitler ve organik asitler gibi bileşenlere sahiptir (Rohela vd. 2020). Çalışmada kullanılan dut posası atığının özütünü elde etmek için dutlar öncelikle ezilip kaynatılarak pekmez elde edilmiş ve daha sonra da geriye kalan posa kurutularak dut posası atığı oluşmuştur (Şekil 3.1). Bu atıktan 80 g alınarak 1000 mL distile su içinde 10 dk kaynatıldıktan sonra süzölmüş ve dut posası atığı özütü elde edilmiştir. Elde edilen özüt, BS üretiminde temel fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır (Unlu vd. 2023).



Şekil 3.1: Kurutulmuş dut posası atığı

### 3.4 Bakteriye Selülozün Üretimi ve Saflaştırılması

Bölüm 3.3' te bahsedildiği gibi hazırlanan dut posası atığı özütü 40'ar mL olacak şekilde 250 mL'lik erlenlere eklenmiş ve tüm ortamlar 121 °C'de 20 dakika boyunca otoklavize edilmiştir. Ortamlar steril edildikten sonra her bir erlene *G. xylinus* kültüründen 1'er mL olacak şekilde ekilmiştir ve kültürler 30°C'de 10 gün boyunca statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. 10. günün sonunda, oluşan bakteriyel selüloz tabakaları süzölmüş ve ardından birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen bu BS tabakaları, saflaştırmak amacıyla 0.1 N NaOH içerisinde konularak 2 saat boyunca 75 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilmiştir. 2 saat sonunda BS tabakaları birkaç defa distile su ile yıkanarak saf BS tabakaları elde edilmiştir. Elde edilen BS örnekleri -20 °C'de derin dondurucuda bekletilmiş ve daha sonra da bu BS örnekleri 16 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Çalışma boyunca elde edilen tüm BS tabakaları bu şekilde saf ve kuru formda elde edilmiştir. Her bir BS örneğinin ağırlığı hesaplanarak g/L cinsinden belirlenmiştir. Çalışmalar 3 tekrarlı olacak şekilde yürütölmüştür.

### **3.5 Çeşitli Koşulların Bakteriyel Selüloz Verimi Üzerine Etkisi**

#### **3.5.1 İnkübasyon süresinin bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisi**

İnkübasyon süresinin BS verimi üzerine etkisini test etmek amacıyla dut posası atığı özütü (40 mL /250 mL erlen) besiyerlerine *G. xylinus* (1 mL) ekilmiş ve kültürler 30 °C’de statik koşullarda 20 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinde 3, 5, 7, 10, 15 ve 20. günlerde BS örnekleri alınarak saf ve kuru formdaki BS’lerin ağırlıkları belirlenmiştir.

#### **3.5.2 Sıcaklığın bakteriyel selüloz üretimine etkisi**

Bakteriyel selüloz üretimine sıcaklığın etkisini test etmek için bakteri farklı sıcaklıklarda (20, 25, 28, 30, 32, 35 ve 40 °C) 15 gün statik olarak inkübe edilmiş ve bu süreçte üretilen BS örnekleri saf ve kuru formda elde edilmiş ve bakteriyel selüloz ağırlıkları g/L olarak hesaplanmıştır.

#### **3.5.3 pH’ nın bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisi**

pH’nın BS verimi üzerine etkisini test etmek amacıyla hazırlanan dut posası atığı özütü besiyerlerinin pH’ları, NaOH ve HCl ile pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm bu ortamlar 121 °C’de 20 dk otoklavize edilmiştir.

Sterilizasyon işleminden sonra 1’er mL *G. xylinus* ekilen bu ortamlar 32 °C’de 15 gün süresince statik olarak inkübe edilmiştir. 15 gün sonrasında elde edilen BS tabakaları saflaştırılıp kuru formları elde edildikten sonra bakteriyel selüloz verimi açısından kıyaslanmıştır.

### **3.6 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyonu**

Bakteriyel selüloz ve ayrıca lakkaz tutuklanmış selüloz yapılarının kimyasal karakterizasyonu Perkin Elmer Spektrum 2 FTIR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Spektrum analizleri 400-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlük ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizlerinde numuneler ATR modu ile analizlenmiştir. BS ve modifiye BS yapılarının kristalite yapıları X ışını kristalografisi ile belirlenmiştir. X ışını kristalografisi analizlerinde Rigaku RAD W-Dmax2 powder X ışını diffraktometre cihazı kullanılmıştır. 2  $\Theta$  (theta) değerleri 2 ° ile 80 ° aralığında 0.04 ° duyarlılıkla belirlenmiştir. X ışını kristalografisi analizinde Cu K alfa radyasyonu ( $\lambda = 2,2897$  angstrom kullanıldı) kullanılmıştır. Morfolojik analizler sırasında ise Leo-Evo 40 SEM analiz cihazı kullanılmıştır. SEM analizleri sırasında

her bir numune 20 nm altın paladyum ile kaplanmıştır. Analizler, 1000x, 5000x ve 10000x olmak üzere gerçekleştirilmiş ve birbirleri ile kıyaslanmıştır. Elde edilen fiber yapılarının detaylı karakterizasyonu sırasında park sistem XE100 AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sırasında non kontakt mod kullanılmış ve 40 µm x 40 µm, 20 µm x 20 µm, 10 µm x 10 µm metre boyutlarında olacak şekilde farklı büyütme uygulamıştır. Enzim tutuklanmış BS yapısında enzim miktarının tespiti ve termal özelliklere enzim tutuklanmasının etkisini görebilmek için DTA ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. DTA analizlerinde Shimadzu DTA50 cihazı kullanılmış ve analizler 10°/dak. ısıtma hızı ile hava atmosferi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DSC analizleri Shimadzu DSC-60 model bir DSC cihazı ile yapılmıştır. Analizler 5°/dak. ısıtma hızında 20-400 °C aralığında gerçekleştirilmiştir. DSC analizlerinde statik hava atmosferi kullanılmıştır. Hem DSC hem de DTA analizlerinde alfa-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> referans maddesi tercih edilmiştir. X ışını kristalografisi ve SEM analizleri İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (İBTAM) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.7 Bakteriyel Selüloz Tabakalarına Lakkaz Enziminin Tutuklanması**

#### **3.7.1 Lakkaz enzim kaynağının elde edilmesi**

Bakteriyel selüloza enzim tutuklaması çalışmasında *Trametes trogii* ATTC200800'ün lakkaz enzimi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan lakkaz enzimi *T. trogii*'nin tekrarlı kesikli fermentasyonu sürecinde 4. tekrarda elde edilen enzim kaynağıdır. Bu amaçla öncelikle yatık agarda üretilmiş *T. trogii* kültürü üzerine steril distile su eklenmiş ve kültür steril koşullarda öze ile homojenize edilmiştir. Daha sonra bu kültürden 100 mL Sabouraud Dextroz Broth/250 mL erlen olacak şekilde hazırlanmış besiyerine ekim yapılmış ve kültür 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür, homojenizatör ile düşük devirde homojenize edilmiş ve homojenize kültürden 600 mL Sabouraud Dextroz Broth (SDB) içeren 1000 mL'lik erlene 7 mL ekilmiştir. Hazırlanan bu kültür 30 °C' de 150 rpm' de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen peletler steril şartlarda süzülüş ve tekrarlı kesikli süreçte kullanılmıştır. Bu süreçte 0.5 mM bakır içeren (CuSO<sub>4</sub>. 5 H<sub>2</sub>O) stok bazal ortam (SBM) fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Elde edilen fungal peletler steril koşullarda hazırlanmış 250 ml'lik erlenlere 30'ar gram olacak şekilde eklenmiş ve üzerlerine steril 50'şer ml SBM + 0.5 mM Cu ilave edilmiştir. Kültürler 24 saat boyunca 30°C 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte kültür sıvısı süzülüş uzaklaştırılmış ve peletlerin üzerine tekrar steril taze SBM ortamı eklenmiştir. Her bir

tekrarda (24 saat) uzaklaştırılan kültür sıvıları depolanmıştır. 4. tekrarda elde edilen kültür sıvısı ise enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Yesilada vd. 2014b).

### **3.7.2 Lakkaz enziminin bakteriyel selüloz tabakaları üzerine tutuklanması**

Liyofilize BS tabakaları (5 mm x 5 mm) boyutlarında kesilmiş ardından lakkaz enzimi bu tabakaların üzerine tutuklanmıştır. Tutuklama işlemi sırasında adsorpsiyon ve sonrasında glutaraldehit ile kovalent bağlama yapılmıştır.

Tutuklanma aşamasında bakteriyel selüloz örneklerinin üzerine 10 mL lakkaz enzim kaynağı eklenmiş ve örnekler 30 °C 100 rpm'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler buzdolabında 24 saat boyunca bekletilmiştir. 24 saat sonra örneklerin üzerine 0.5 mL % 2.5 glutaraldehit solüsyonu eklenip 30°C 100 rpm'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz tabakaları (lakkaz/BS) süzölmüş ve pH 4.0 sodyum asetat tamponuyla yıkanmıştır. Elde edilen bu örnekler çalışmada kullanılacak lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz örnekleridir. Lakkaz/BS örnekleri kullanılana kadar buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edilmiştir (Unlu vd. 2023).

### **3.8 Optimum pH ve Sıcaklığın Belirlenmesi**

Bakteriyel selüloza tutuklanmış lakkaz enziminin optimum pH değerini saptamak için çalışmalar pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 aralıklarında yürütölmüştür. Bunun için lakkaz/BS içeren reaksiyon ortamlarında lakkaz aktivitesi, farklı pH aralıklarında ve 40 °C'de 1 dakika süresince belirlenmiştir. Tutuklanmış lakkaz enziminin optimum sıcaklık değeri ise pH 4.0'da 20, 25,30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C'lerde 1 dakika süresince saptanmıştır (Unlu vd. 2023).

### **3.9 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz İle Boyar Madde Renk Giderimi Çalışmaları**

Çalışmada tekstil boyaları olan azo boyaları Reaktif Mavi 171 (RB 171), Reaktif Mavi 198 (RB 198) ve Reaktif Siyah 5 (RB 5) kullanılmıştır. RB 171 boyasının stok solüsyonu 200 mg/L boya konsantrasyonunda pH 3.0 sodyum sitrat tamponu ile hazırlanırken RB 198 boyasının stok solüsyonu 150 mg/L boya konsantrasyonunda pH 4.0 sodyum asetat tamponu ile hazırlanmıştır. RB 5 boyası ise 30 mg/L boya konsantrasyonunda pH 3.0 sitrat tamponunda hazırlanmıştır. Tüm boyaların öncelikle spektrofotometrik olarak maksimum

dalga boyları belirlenmiştir. RB 171 boyasının maksimum dalga boyu 616 nm, RB 198 boyasının 629 nm ve RB 5 boyasının dalga boyu ise 598 nm olarak saptanmıştır. Lakkaz/BS'nin tekrarlı kullanım sürecinde bu üç boyanın rengini giderim aktivitesi test edilmiştir. Bu amaçla, lakkaz/BS örnekleri 12 kuyucuklu plate içerisine 3, 6 ve 12 parça olacak şekilde eklenmiş ve her bir kuyucuğa 3 mL boya solüsyonu ilave edilmiştir. Ardından örnekler 40 °C ve 160 rpm'de RB 171 boyası için 45 dakika ve RB 198 ve RB 5 boyları için de 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Her bir uygulama sonrası (tekrar) boya solüsyonu uzaklaştırılarak lakkaz/BS örneklerinin üzerine taze boya solüsyonu tekrar eklenmiştir. Çalışma her RB 171 ve RB 198 boyları için 8 tekrarlı, RB 5 boyası içinse 3 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Her üç boyanın maksimum dalga boyundaki absorbans değişimi spektrofotometrik olarak belirlenip yüzde renk giderimi olarak ifade edilmiştir.

### **3.10 Lakkaz Aktivitesinin Saptanması**

Tutuklanmış lakkaz enziminin aktivitesinin hesaplanması için 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin enzimatik oksidasyonu bağlı olarak 420 nm'de oluşan absorbans değişimi saptanmış ve buna bağlı olarak da enzim aktivitesi hesaplanmıştır. 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite (U) olarak ifade edilmiştir (Birhanli vd.2006; Boran vd. 2011).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bakteriyel selüloz yüksek saflık, yüksek su tutma kapasitesi, mekanik dayanıklılık, geniş yüzey alanı gibi üstün özellikleriyle oldukça dikkat çekici bir biyopolimerdir. Bu üstün özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar, biyomalzeme üretimi, gıda, kozmetik ve tutuklama gibi birçok alanda uygulamaları bulmaktadır (Drozd vd. 2018; Revin vd. 2018; Bagewadi vd. 2020; Boran, 2022).

Bakteriyel selülozün bu avantajlarının yanı sıra önemli bir dezavantajı temel üretim ortamının yüksek maliyetli olması sebebiyle üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu da BS'nin büyük ölçekli üretimini kısıtlamaktadır. Bu nedenle, BS'nin üretimi sürecinde düşük maliyetli veya ek bir maliyet getirmeyen besiyerlerinin kullanılması öne çıkmaktadır. Araştırmacılar üretim maliyetini azaltmak için çeşitli ucuz ham maddelerinin veya atık ürünlerin kullanımına yönelmektedir. Bundan dolayı, tez çalışmasında ucuz, doğal ve zengin içerikli dut posası atığı özütü besiyeri olarak kullanılmıştır.

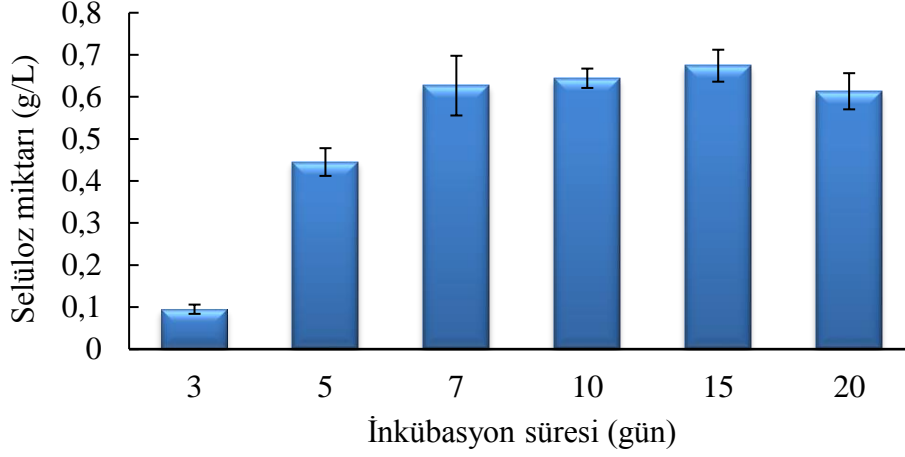
### 4.1 Optimizasyon Koşullarının Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi

Üretimde kullanılan besiyeri çeşidi ve ayrıca inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH gibi üretim koşulları BS üretim verimini etkilemektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında farklı üretim koşullarının BS üretimine etkisi test edilmiştir (Unlu vd. 2023).

#### 4.1.1 İnkübasyon süresinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi

Bölüm 3.2. deki gibi hazırlanan dut posası atığı özütü ortamları için üretim sürecinde 3, 5, 7, 10, 15 ve 20. günlerde BS üretimi incelenmiştir. Bu amaçla, ilgili günlerde BS örnekleri süzildükten sonra birkaç kez distile suyla yıkanmış ve saf BS örneklerini elde etmek için elde edilen bakteriyel selülozlar 0.1 N NaOH içerisine konulmuş ve 75 °C'de su banyosunda 2 saat boyunca bekletilmiştir. 2 saatin sonunda elde edilen saf selüloz örnekleri distile su ile birkaç kez yıkanarak nötralize edilmiştir. İlgili günlerde elde edilen saf BS örnekleri -20 °C derin dondurucuda dondurulduktan sonra örnekler 16 saat boyunca liyofilize edilerek saf, kuru formda BS örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen bu örnekler tartılarak BS verimi g/L olarak hesaplanmıştır. Çalışmada Şekil 4.1' de görüldüğü gibi BS verimi açısından en etkin

inkübasyon süresi 15 gün olarak belirlenmiştir (0.674 g/L). BS verimi 3, 5, 7, 10, 15 ve 20 günler için sırasıyla 0.095, 0.445, 0.627, 0.644, 0.674 ve 0.613 g/L olarak hesaplanmıştır.

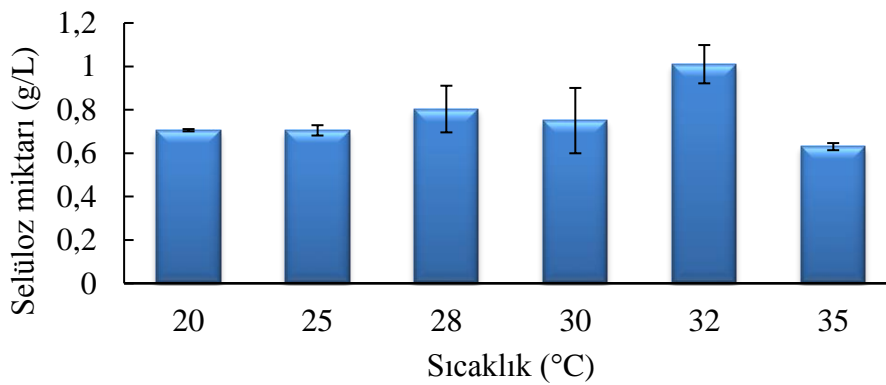


Şekil 4.1: Bakteriyel selüloz üretimine inkübasyon süresinin etkisi

#### 4.1.2 Sıcaklığın bakteriyel selüloz üretimine etkisi

Sıcaklık, BS üretimini etkileyen bir diğer faktördür. Bu nedenle sıcaklığın bakteriyel selüloz verimi üzerine etkisini test etmek amacıyla kültürler 20, 25, 28, 30, 32, 35 ve 40 °C’de 15 gün statik olarak üretilmiş ve yukarıda belirtildiği gibi elde edilen saf, kuru BS örnekleri tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir.

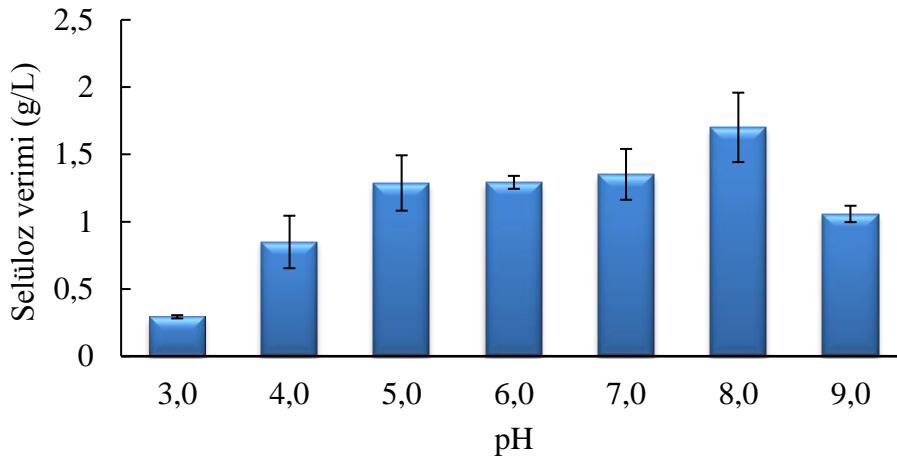
Şekil 4.2’de de görüldüğü gibi BS miktarı 32 °C’ye kadar artarken 35 °C’de azalmaya başlamıştır. Hatta 40 °C’de BS oluşumu gözlenmemiştir. Çalışmada en yüksek BS miktarı 32 °C’de 1.01 g/ L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Bakteriyel selüloz üretimine sıcaklığın etkisi

### 4.1.3 Başlangıç pH'sının bakteriyel selüloz üretimine etkisi

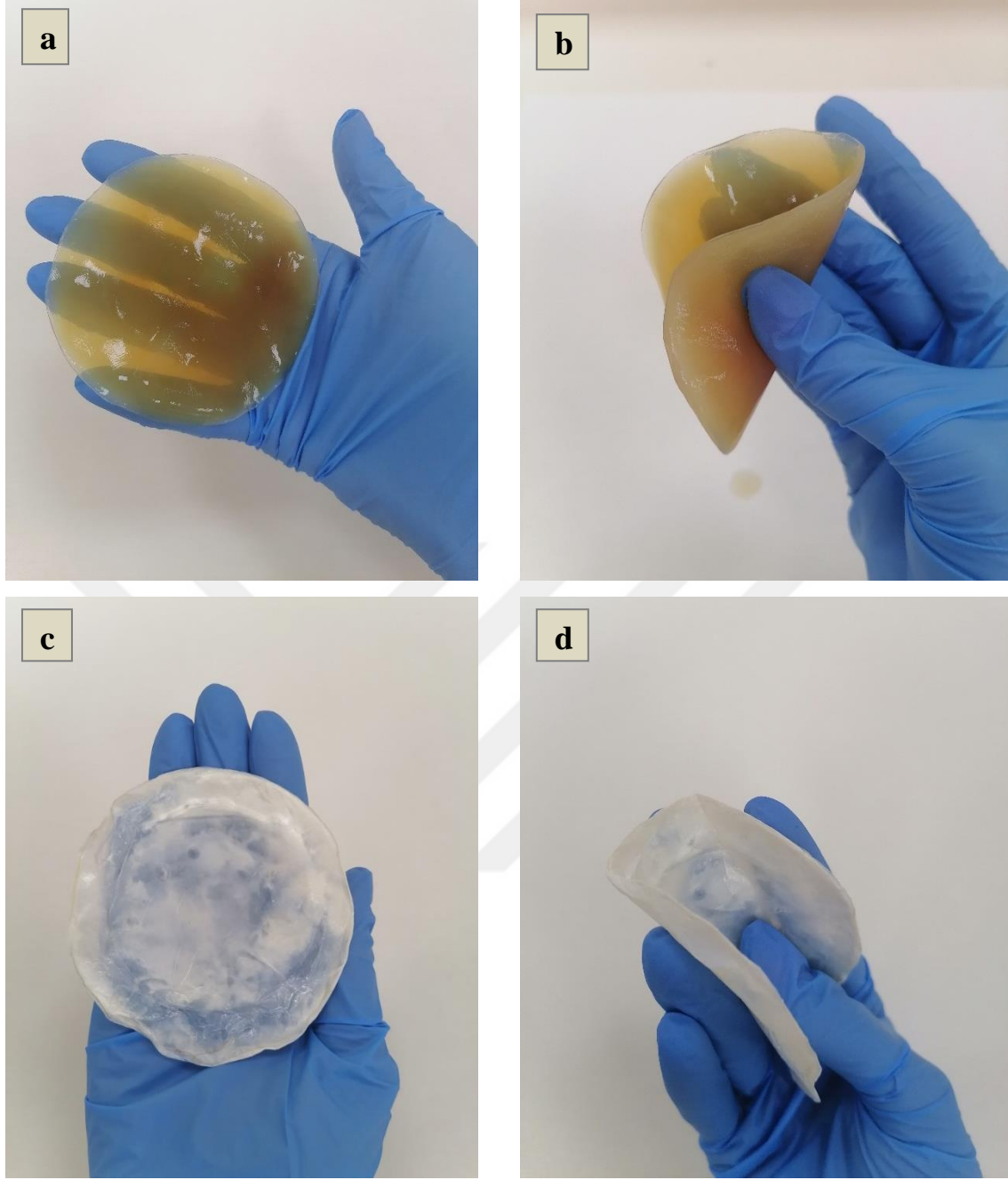
Ortam pH'sının BS üretimine etkisini test etmek amacıyla üretim ortamı olan dut atığı özütünün pH'sı NaOH ve HCl ile ayrı ayrı olmak üzere pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olarak ayarlanmıştır. Sterilizasyon sonrası bakteri ekimi yapılan örnekler 32 °C'de 15 gün boyunca statik olarak inkübe edilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi en yüksek BS miktarı pH 8.0 ortamında 1.701 g/L olarak tespit edilirken pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 9.0 ortamlarında sırasıyla 0.293, 0.849, 1.288, 1.293, 1.352 ve 1.058 g/L kuru BS belirlenmiştir.



**Şekil 4.3:** Bakteriyel selüloz üretimi üzerine pH' nın etkisi

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında BS üretimi için en uygun üretim koşulları olan pH 8.0, 32 °C ve 15 günde üretilen saf BS örnekleri kullanılmıştır.

Şekil 4.4' de dut atığı özütü ortamında optimum koşullarda üretilmiş saf yaş ve kuru BS örnekleri görülmektedir.



**Şekil 4.4:** Dut atığı özütü ortamında optimum koşullarda üretilmiş saf formda yaş (a ve b) ve kuru (liyofilize) (c ve d) bakteriyel selüloz örnekleri.

#### 4.2 Bakteriyel Selüloza Lakkaz Enziminin Tutuklanması

Enzimler uygulamalarda serbest ve tutuklanmış olarak kullanılabilir. Eğer uygulama için uygun ise ve ek avantajlar getiriyorsa enzimin tutuklanmış olarak kullanılması daha öne çıkmaktadır. Bir enzimin tutuklanmış olarak kullanımının tekrar tekrar kullanılabilme, enzimin üründen ayrı kalması, kararlılık ve ekonomiklik gibi önemli avantajları vardır.

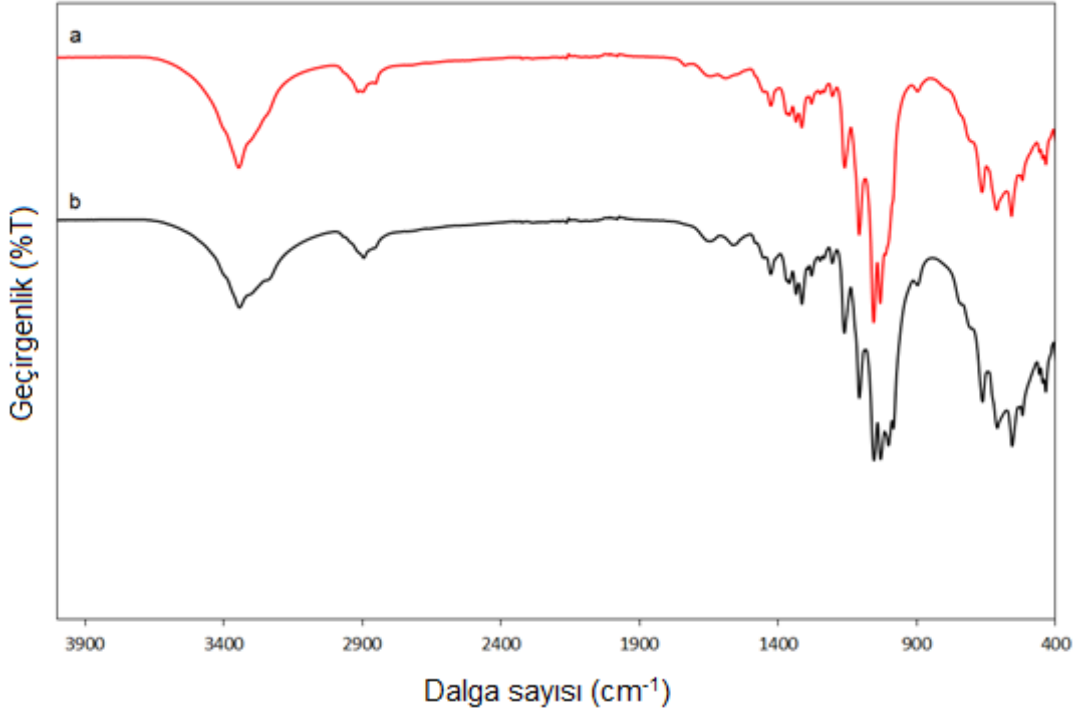
Lakkaz, bakır içeren bir fenoloksidaz enzim olup birçok uygulamada kullanılan önemli bir enzimdir (Pezzella vd. 2015). Lakkazın hem serbest hem de tutuklanmış formda kullanımına yönelik çalışmalar vardır (Yeşilada vd. 1998; Yesilada vd. 2014b; Ulu vd. 2020). Tutuklanmış enzimin serbest enzim kullanımına kıyasla öne çıkan avantajlarından dolayı son yıllarda bu enzimin doğal bir materyal olan BS'ye tutuklanmasına yönelik de çalışmalar öne çıkmaktadır (Sampaio vd. 2016).

Bu tez çalışmasında *Trametes trogii* ATCC200800 suşunun tekrarlı kesikli üretiminin 4. tekrarından elde edilen ham lakkaz enzimi, *G. xylinus* B759'un optimum koşullarda 15 gün üretimi sonucu elde edilen liyofilize BS'ye tutuklanmıştır. Enzim BS'ye fiziksel adsorpsiyon ve glutraldehitte kovalent bağlama uygulaması sonucu tutuklanmıştır (Unlu vd. 2023).

### **4.3 Enzim Tutuklanmamış Bakteriyel Selüloz ve Lakkaz Enzimi Tutuklanmış Bakteriyel Selüloz Örneklerinin Karakterizasyonu**

BS'nin yapısı öncelikle kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon işlemi için FTIR spektroskopisi kullanılmış ve elde edilen FTIR spektrumu lakkaz tutuklanmış BS yapısına ait FTIR spektrumu ile kıyaslanmıştır. Her iki yapıya ait FTIR spektrumları kıyaslamalı olarak Şekil 4.5'de verilmiştir. Bu spektrumlara bakıldığında enzim tutuklanmamış BS yapısına ait spektrumda, 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında selüloz yüzeyinde bulunan serbest OH gruplarının H bağı gerilme titreşimleri belirgin bir bant piki olarak görülmektedir. Ayrıca BS yapısında bulunan alifatik  $\text{CH}_2$  ünitelerine ait CH gerilme titreşimi 2800-2950  $\text{cm}^{-1}$  aralığında izlenmektedir. Heksoz üniteleri arasında bulunan C-O-C ve heksoz üniteleri dahilinde bulunan C-O-C eterik gerilme titreşimleri yaklaşık 1030 ve 1053  $\text{cm}^{-1}$ 'de keskin pik olarak görülmektedir. CC ana zincir titreşimleri ise 1315  $\text{cm}^{-1}$  civarında tespit edilmiştir. BS yapısındaki beta 1,4 bağı ise 662  $\text{cm}^{-1}$ 'de ince ve keskin olarak görülmektedir. Bu sonuçlar elde edilen yapının bir selüloz molekülü olduğunu bize ispatlamaktadır. Ayrıca 555  $\text{cm}^{-1}$  civarında alifatik CH düzlem içi eğilmesi piki de görülmektedir (Atykyan vd. 2020).

Şekil 4.5'deki enzim tutuklanmış BS yapısına ait FTIR spektrumunda ise selüloz yapısından kaynaklanan yaklaşık 3600, 2950, 1050 ve 660  $\text{cm}^{-1}$  deki piklere ilaveten enzim yapısındaki proteinlerden kaynaklı olarak 1640 amid 1 piki 1550 amid 2 piki görülmektedir. Ayrıca peptid bağından kaynaklı olarak, 1430  $\text{cm}^{-1}$  civarında CN gerilme titreşimi görülmektedir. 3000-3300  $\text{cm}^{-1}$  aralığında CN yapısına ait grupların H bağı gerilme titreşimi de selüloz yapısı üzerine tutuklanmış enzim yapısını ispatlamaktadır.

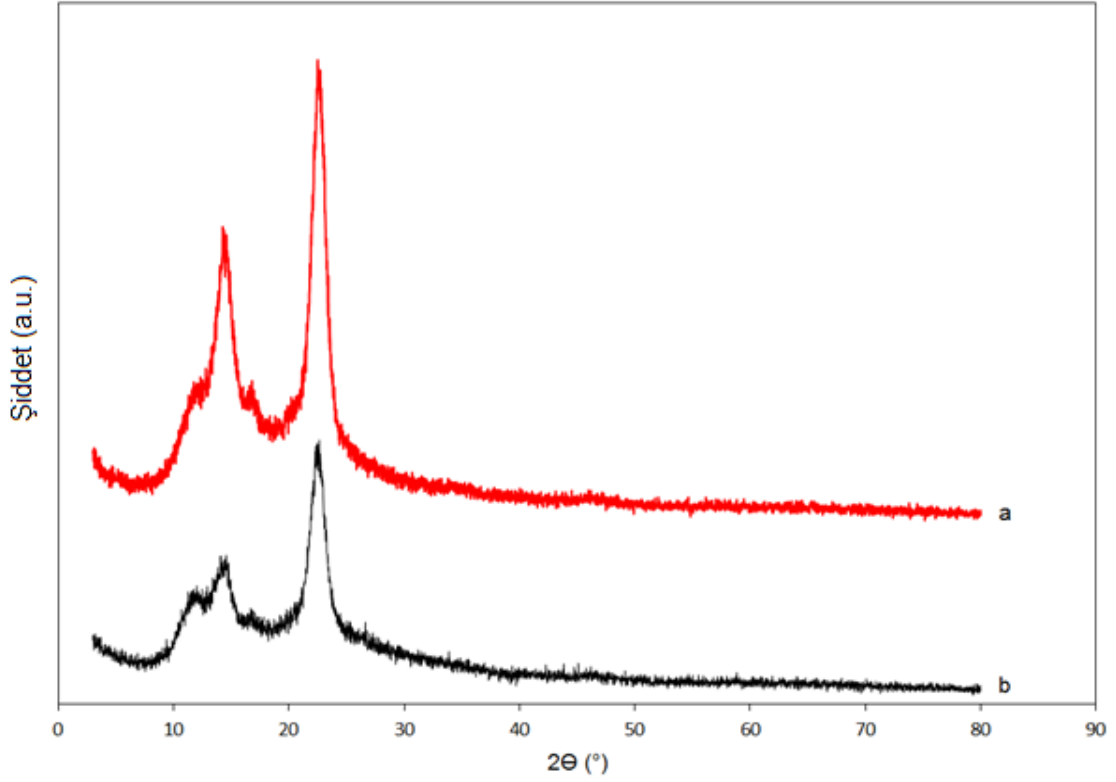


**Şekil 4.5:** Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait FTIR spektrumları

Çalışılan örneklerin Xray analizleri de yapılmış ve enzim tutuklanmamış BS yapısına ait Xray spektrumu ile enzim tutuklanmış BS yapısına ait Xray spektrumu kıyaslamalı olarak Şekil 4.6'da verilmiştir. Elde edilen spektrum üzerinde 2 temel selüloz piki net olarak görülmektedir. Birinci pik 110 piki olup  $14,58^\circ$ , 2. pik ise 200 piki olup  $22,50^\circ$  değerinde görülmüştür. Bu 2 pikin varlığı literatürle uyumlu olup BS yapısını doğrulamaktadır. Enzim tutuklanmasından sonra elde edilen piklerin keskinliği azalmakta ve daha amorf bir karakter oluşmaktadır. Enzim tutuklanmasıyla beraber pik yapısında bir değişme olmamakla birlikte pik şiddetleri düşmüştür. Enzim tutuklanmış yapıda  $14,78^\circ$  ve  $22,50^\circ$  değerlerinde 110 ve 200 pikleri görülmüştür. Amorf karakterin artışı kontrol etmek amacıyla her iki yapıda da % kristalite değerleri hesaplanmıştır. % kristalitenin belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır (Terinte vd. 2011).

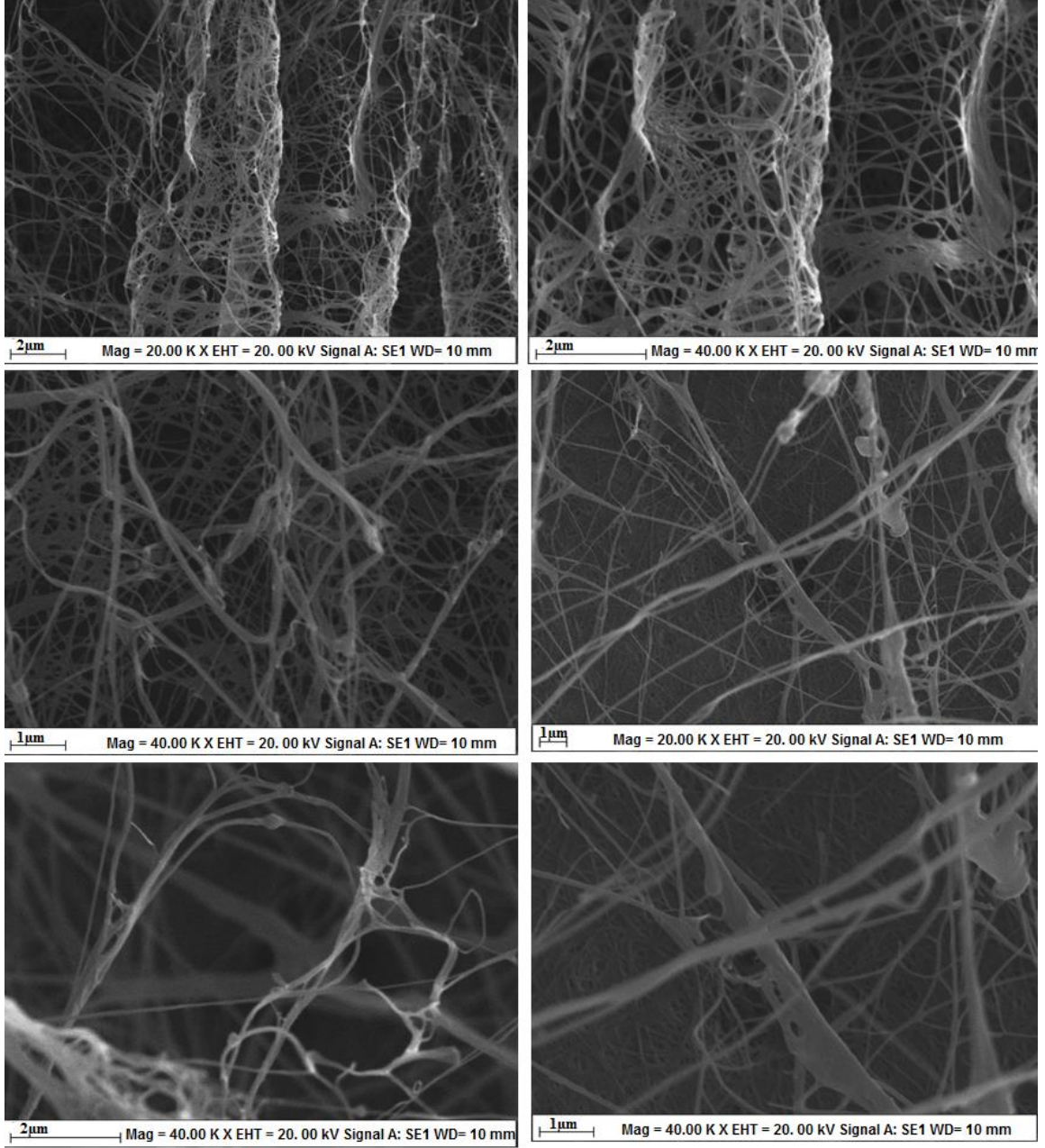
$$C = 100 \cdot \frac{I_{200} - I_{non-cr}}{I_{200}} [\%]$$

Yapılan hesaplama göre enzim tutuklanmamış selüloz yapısına ait % kristalite değeri %93.28, enzim tutuklanmış yapıda ise %83.42 olarak saptanmıştır. Bu düşüşün nedeni enzim yapısının selüloz zincirleri arasına dahil olarak ikinci etkileşimleri azaltmasıdır. Amorf karakterdeki artış aynı zamanda yapıya dahil olan enzimin yapısını da ispatlamaktadır.

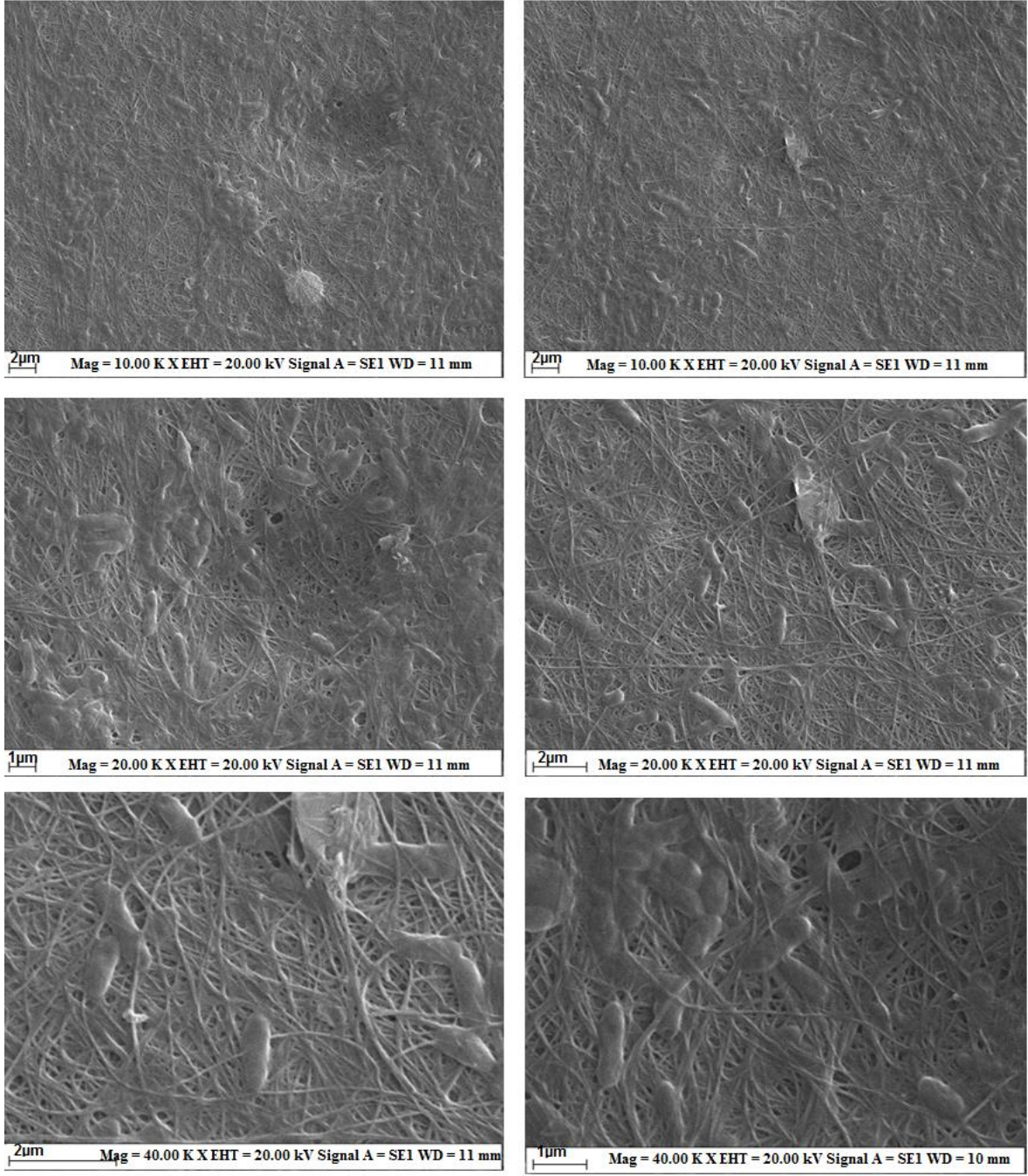


**Şekil 4.6:** Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait Xray spektrumları

Çalışmada ayrıca örneklerin fiber yapıları da belirlenmiştir. Bu amaçla, BS fiber yapılarına ait morfolojik özellikler ve fiber boyut ölçümleri SEM analizleri ile detaylı olarak incelenmiştir. Farklı büyütmelerde alınan SEM ölçümleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde düzgün dağılıma sahip fiber ağ yapısı olduğu görülmektedir. Özellikle fiber boyutları yaklaşık 130-150 nm aralığında değişmekte olup yer yer fiber birleşmeleri nedeniyle fiber kalınlığının da arttığı görülmektedir. Ancak, elde edilen BS membran yapısının büyük çoğunluğu belirgin bir boyut aralığında elde edilmiş fiber yapılarından oluşmaktadır. Bu yapı enzim tutuklanmış BS yapısıyla kıyaslandığında enzim tutuklanmış yapıda fiberlerin boyutlarının yaklaşık 5-10 nm kadar arttığı ve fiber yapılarının birbiri içerisine geçerek daha düzgün bir yüzey oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Ayrıca yüzeyde, enzim yapısına ait proteinlerin bazı kümelenmeler şeklinde birikim yaptığı izlenmektedir (Şekil 4.8). Bu değişim enzim tutuklanmamış BS yapısına ait SEM görüntüsüyle kıyaslandığında enzimin yüzeye net bir şekilde tutunduğunu bize ispatlamaktadır.



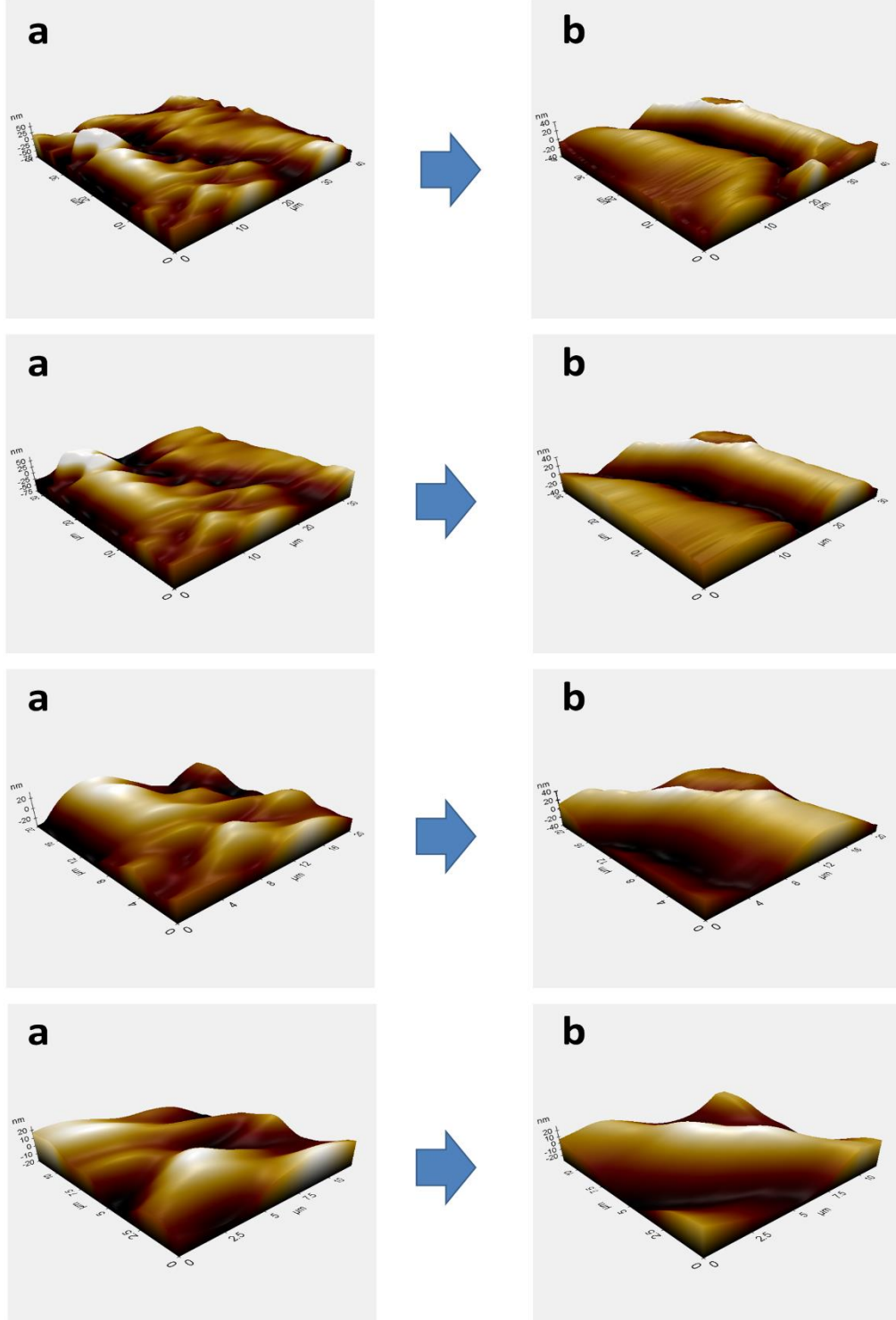
**Şekil 4.7:** Enzim tutuklanmamış selüloz yapısına ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri



**Şekil 4.8:** Lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz yapısına ait farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri

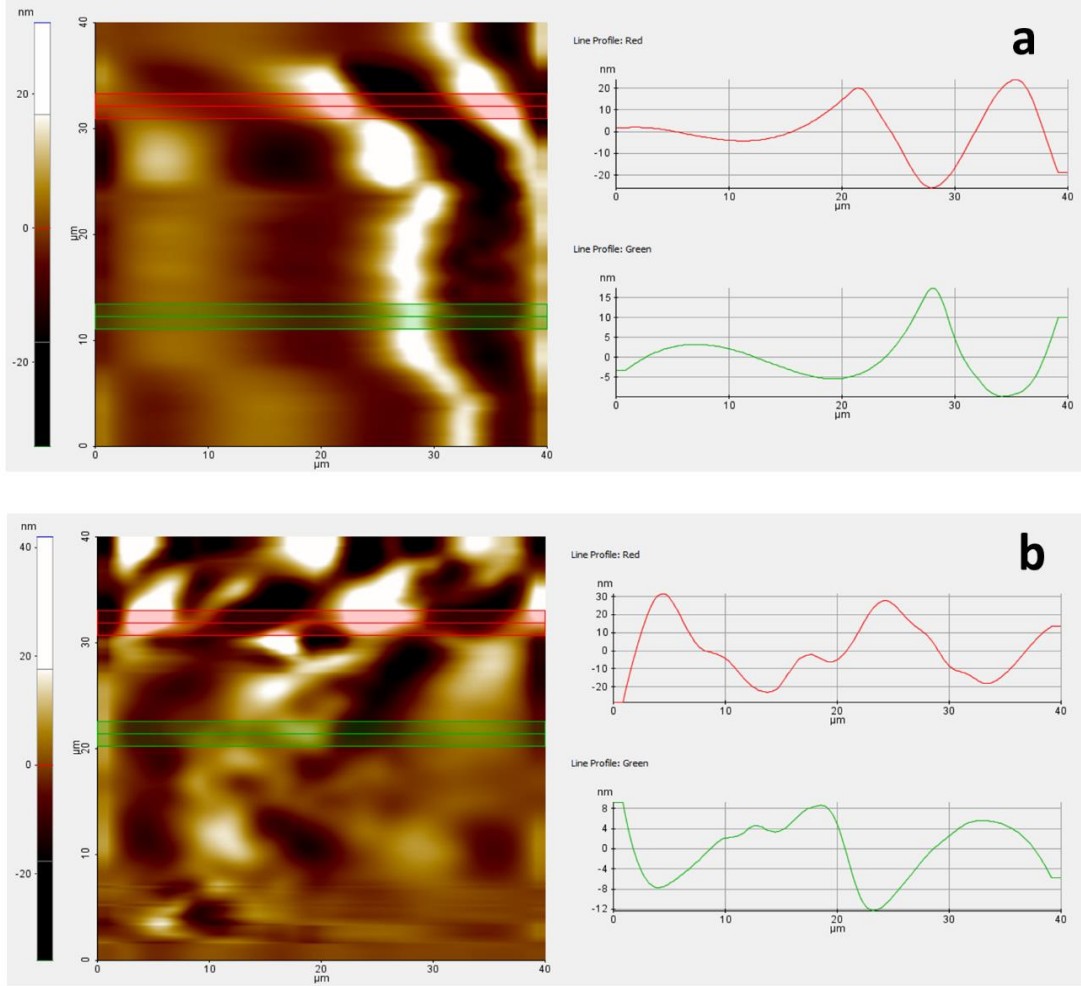
BS selüloz yapısındaki fiber boyutlarının enzim bağlanmasıyla olan değişimi SEM yapısında net olarak görülmesine rağmen bu fiber yapısındaki boyut değişimini daha detaylı belirleyebilmek için farklı büyütme ölçeklerinde AFM ölçümleri gerçekleştirildi. AFM ölçümlerine göre elde edilen yüzey görüntüleri ve yüzey pürüzlülük ölçümleri Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Şekil 4.9'daki AFM görüntülerine göre BS membran yüzeyindeki fiber yapıları net bir şekilde görülmektedir. Fiber yapılarının belirli bir yönde değil gelişigüzel bir dağılım gösterdiği ancak süreklilik arz ettiği gözlemlenmiştir. Bu yapı üzerine enzim tutuklanması

gerçekleştikten sonra ise yüzeydeki fiber yapısının kısmen dağıldığı ve yüzey pürüzlülüğünün azaldığı görülmektedir. Bunun fiber yapısının dağılmasından kaynaklı olmadığı sadece yüzeye bağlanan enzimin fiber yapısı üzerine kaplanmasından kaynaklı olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.9:** Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait AFM görüntüleri

Yüzey yapısındaki pürüzlülüğün değişimi Şekil 4.10’da net olarak görülmektedir. Enzim tutuklanmamış fiber yapısındaki yüzey pürüzlülük değeri yaklaşık olarak 110 nm civarında iken enzim tutuklanmış BS’nin yüzey yapısında tutuklanmış protein tabakalarından kaynaklı olarak pürüzlülük değerinin yer yer 80 nm yer yer de 90 nm değerine düştüğü tespit edildi. Tüm bu değişimler yüzeye bağlanan enzimin varlığını bize ispatlamaktadır (Unlu vd. 2023).

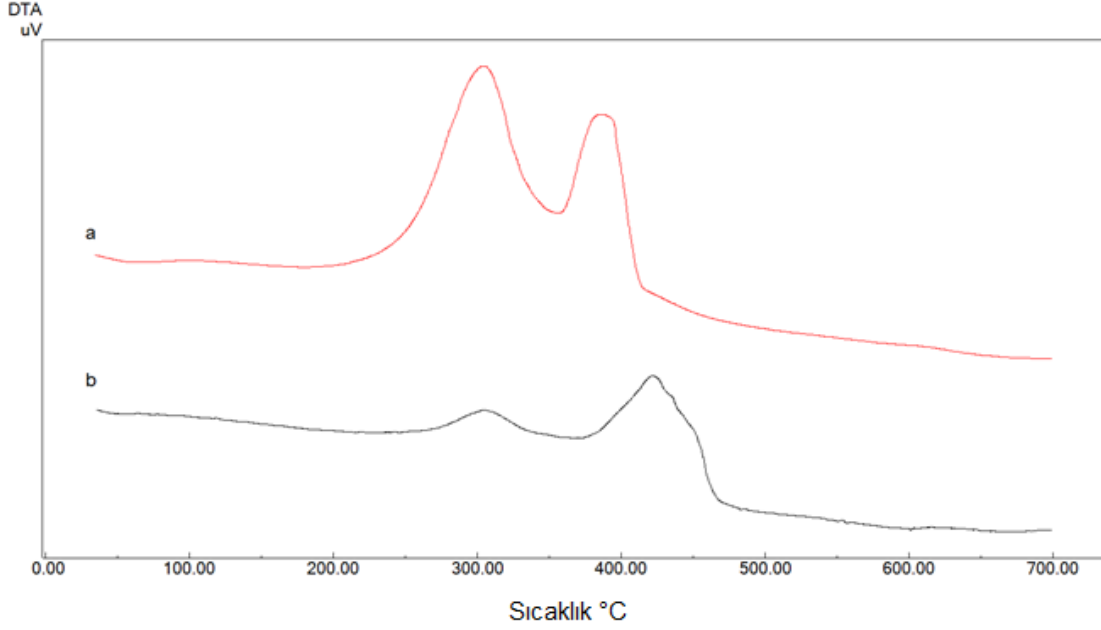


**Şekil 4.10:** Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait yüzey pürüzlülük değişimi ölçümleri

Enzim tutuklanmış sistemlerde diğer bir önemli bulgu ise enzim tutuklanmamış BS ve enzim tutuklanmış BS’lerin termal kararlılıklarıdır. Bu nedenle yapılan çalışmada, serbest ve tutuklanmış enzim yapıları için DSC ve DTA ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Unlu vd. 2023).

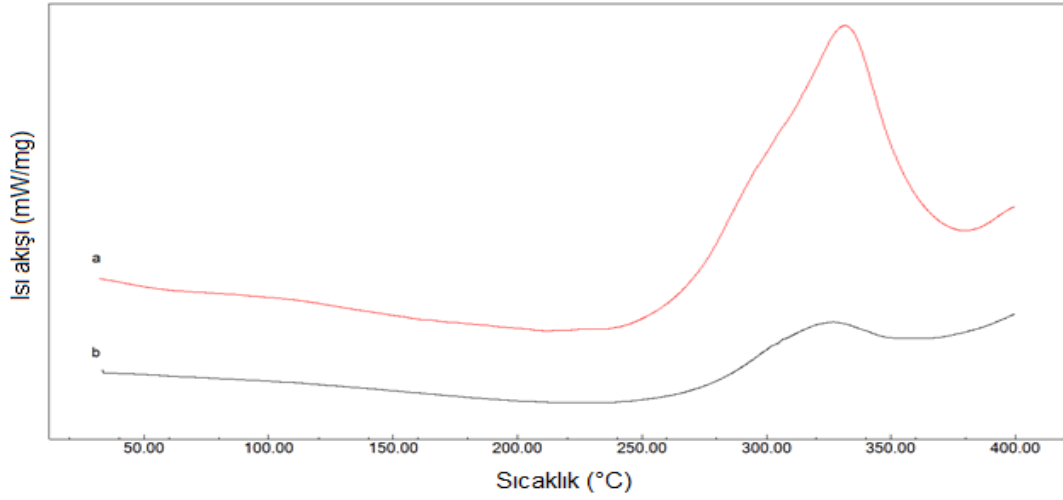
Elde edilen DTA ölçüm sonuçları Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Enzim tutuklanmamış BS yapısına ait DTA termogramında 2 temel ekzotermik pik görülmektedir. Birinci pik 215 °C’ de başlayıp 357 °C’ de sonlanmaktadır. 1. pik BS yapısında bulunan çapraz bağlanma noktalarının kırılması ve 3 boyutlu selüloz kristalinin yapısının dağılmasından

kaynaklanmaktadır. 2. pik ise 357 °C' de başlayıp 413 °C'de sonlanmakta olup tüm polimerik yapıyı termal degradasyonundan kaynaklanmaktadır. İlgili yapıya lakkaz enziminin tutuklanmasıyla pik şiddetlerinde önemli ölçüde düşüş görülmüştür. Özellikle 1. pik yapısında enzim moleküllerinin yapıya dahil olmasıyla, 3 boyutlu kristalin yapının değişmesi nedeniyle pik şiddetinde önemli bir azalma görülmüştür. 2. pik ise selüloz ve lakkaz yapılarının birlikte bozulmasından kaynaklı olup oldukça genişlemiştir. Pik şiddetindeki bu genişleme yapıya lakkaz gruplarının da dahil olduğunu ispatlamaktadır.



**Şekil 4.11:** Enzim tutuklanmamış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait DTA termogramları

Şekil 4.12'deki DSC termogramı incelendiğinde ise özellikle 240 ve 380 °C aralığında belirgin ve net bir pik görülmektedir. Bu pik özellikle BS yapısındaki beta 1,4 bağlarının kırılmasından kaynaklanan ve 3 boyutlu yapının dağılmasına neden olan piktir. Saf BS yapısına ait termogramda oldukça şiddetli görülmesine rağmen enzim tutuklanmış BS yapısında, bağlı enzim gruplarının 3 boyutlu yapıya dahil olmasında kaynaklı olarak pik şiddetinin belirgin oranda azaldığı görülmüştür. Tüm bu bulgular yapıdaki enzimin varlığını ispatlamaktadır (Unlu vd. 2023).

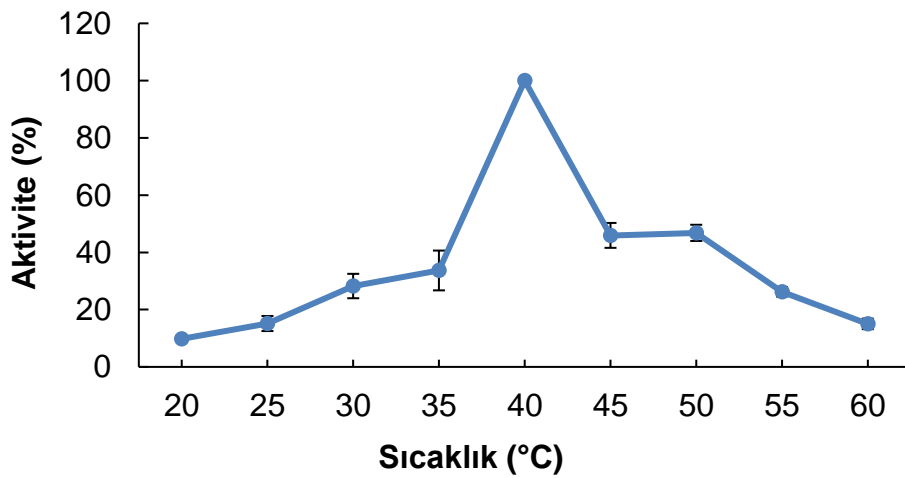


**Şekil 4.12:** Enzim tutuklanmış bakteriyel selüloz (a) ve lakkaz tutuklanmış bakteriyel selüloz (b) yapılarına ait DSC termogramları

#### 4.4 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz Enziminin Aktivite Çalışmaları

##### 4.4.1 Tutuklanmış lakkaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

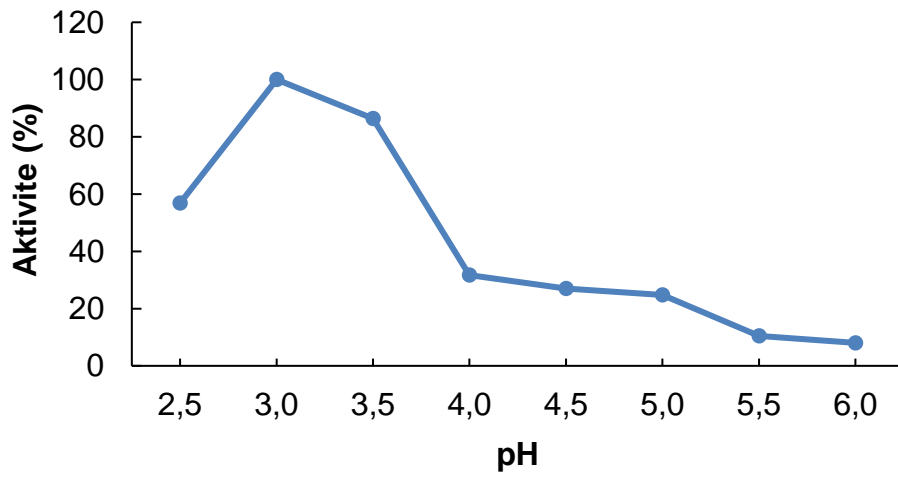
Sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. Enzimin optimum sıcaklık ihtiyacı enzimin elde edildiği tür hatta suşa bağlı olarak değişebilmektedir (Yesilada vd. 2014a). Enzimin tutuklanması da enzimin sıcaklık aralığını değiştirebilmektedir (Lassouane vd. 2019). Bu nedenle çalışmada öncelikle BS'ye tutuklanmış lakkaz'ın optimum sıcaklık aralığı araştırılmıştır. Bu amaçla enzim aktivitesi 20-60 °C sıcaklık aralığında izlenmiştir. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi tutuklanmış enzimin optimum sıcaklık aralığı 40 °C olarak belirlenmiştir (Unlu vd. 2023).



**Şekil 4.13:** Tutuklanmış lakkaz enziminin farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri

#### 4.4.2 Tutuklanmış lakkaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi

pH, enzim aktivitesini etkileyen bir diğer önemli faktördür (Yesilada vd. 2014a). Tutuklanmış enzimin optimum pH aralığının değişebileceği rapor edilmiştir (Teerapatsakul vd. 2017; Lassouane vd. 2019; Ulu vd. 2020) Enzim aktivitesi reaksiyon pH'sından etkilendiğinden bakteriyel selüloza tutuklanmış lakkaz enziminin optimum sıcaklık aralığı da araştırılmıştır. Bu amaçla farklı pH değerlerinde (pH 2.5-6.0) enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi pH 3.0' de gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



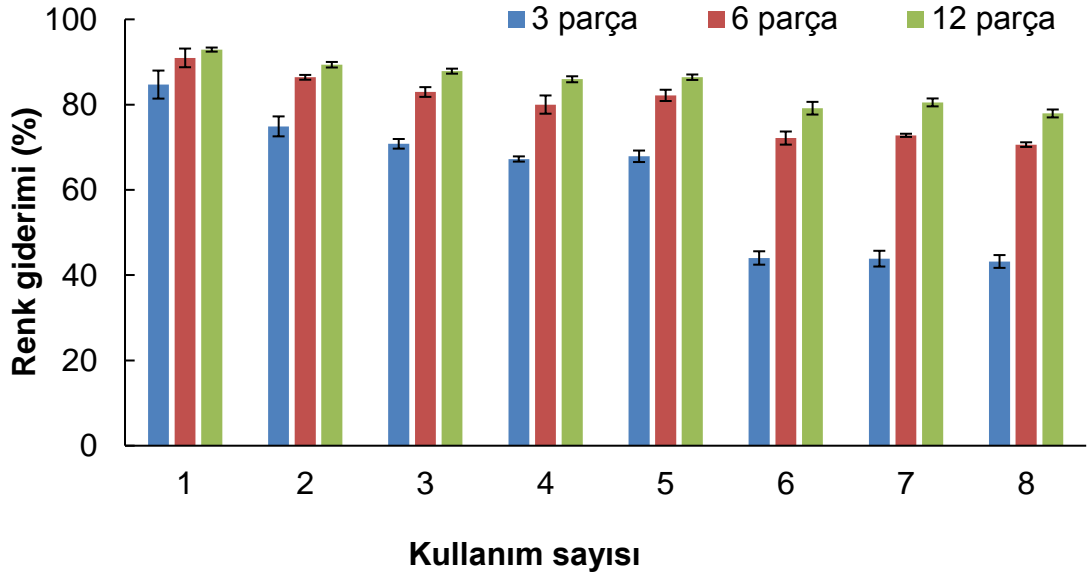
**Şekil 4.14:** Tutuklanmış lakkaz enziminin farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri

Tutuklanmış enzimin optimum pH ve sıcaklık aralığındaki kaymanın sebebi kullanılan desteğe bağlanmasına bağlı olarak enzim konformasyonunda oluşan değişim olabilir (Patel vd. 2014). Enzimin tutuklandığı destek tipi ve mikroçevrenin değişimi de optimum ihtiyacı etkileyebilmektedir (Lassouane vd. 2019).

#### 4.5 Bakteriyel Selüloza Tutuklanmış Lakkaz Enziminin Boyar Madde Renk Giderim Etkinliği

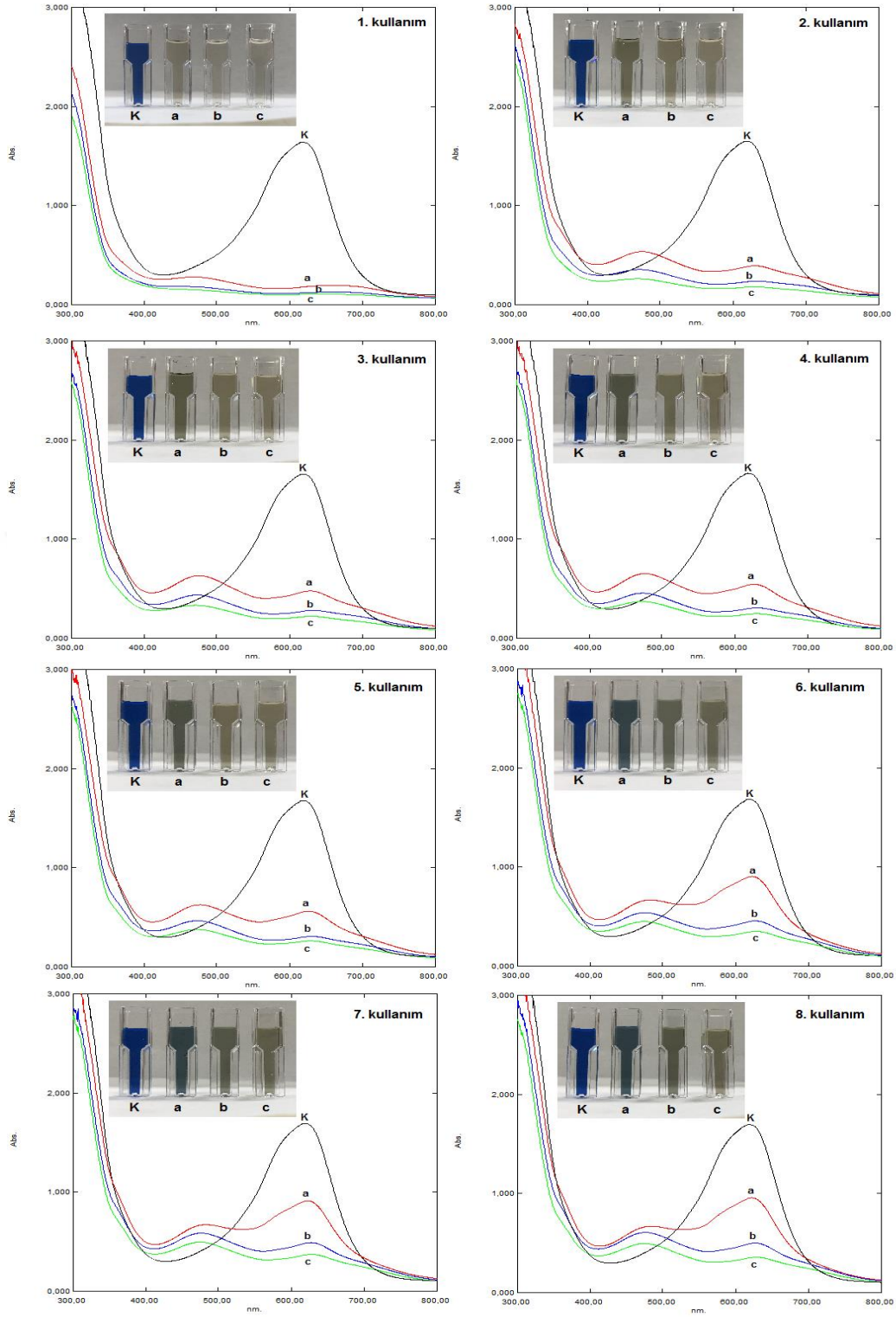
Tekstil fabrikaları boyamada kullandıkları boyar maddelerin, renk azalmasına karşı dirençli olmasını istemektedir. Bu nedenle, tekstil fabrikalarının kullandıkları ve boyama sonrası tekstil fabrikası atıksuları içerisinde kalan boyar maddeler geleneksel yöntemlerle renklerinin giderilmesine karşı oldukça dirençlidir. Bundan dolayı, boyar maddelerin rengini gidermek için etkili bir biyoteknolojik sisteme ihtiyaç vardır. Beyaz çürükçül funguslar ve

bunların enzimleri ile çeşitli boya renklerinin giderimine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Yesilada vd. 2010; Bakar vd. 2024). Lakkaz enzimi boyar maddelerin rengini gidermek amaçlı olarak yoğun bir şekilde test edilmektedir. Bu enzim çoğu uygulamada serbest formda kullanılmakla birlikte yüksek maliyet, düşük kararlılık ve tekrarlı kullanılamama gibi dezavantajları olduğundan tutuklanmış olarak kullanımına yönelik olarak çalışmalar da yapılmaktadır. Serbest enzimin bu tip dezavantajlarının üstesinden gelmek için lakkaz enzimi tutuklanmış formda kullanılabilir. Bu çalışmada *T. troglodytes* lakkaz enzimi liyofilize bakteriyel selüloz üzerine tutuklanmış (lakkaz/BS) ve tutuklanmış enzim renk giderimi etkinliği açısından test edilmiştir (Unlu vd. 2023). Öncelikle lakkaz/BS tabakaları 5mm x 5mm boyutlarında kesilerek 3, 6 ve 12 parça şeklinde 12 kuyucuklu mikrotelate içerisine konulmuştur. Bunun üzerine, Reaktif Mavi 171 (RB 171), Reaktif Mavi 198 (RB 198) ve Reaktif Siyah 5 (RB 5) boya çözeltileri eklenmiş ve tutuklanmış enzimlerin tekrarlı kullanımını sürecinde renk giderimi izlenmiştir. Çalışma, 40 °C ve pH 3.0'de yürütülmüştür. RB 171 boyasının renginin giderimi sürecinde lakkaz/BS örneklerinin üzerine 3'er mL pH'sı 3.0 olan boya çözeltisi eklenip örnekler 40 °C 160 rpm'de 45 dakika inkübe edilmiştir. 45 dakika muamele sonrası tutuklanmış enzim içeren kuyucuklardan boya madde çözeltisi uzaklaştırılmış ve kuyucukta kalan lakkaz/BS örnekleri üzerine tekrar 3 mL taze boya çözeltisi eklenmiştir. Bu süreç 8 kez tekrarlanmıştır. Şekil 4.15'te görüldüğü gibi ilk renk giderim uygulamasında 3, 6 ve 12 parça lakkaz/BS örnekleri için renk giderim yüzdeleri sırasıyla %85, %91 ve %93 olarak belirlenmiştir. Tutuklanmış enzimin 8. kullanımında dahi renk aktivitesinin halen yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu kullanımda 3, 6 ve 12 parça lakkaz/BS örnekleri için renk giderim yüzdeleri sırasıyla %43, %71 ve %78 olarak belirlenmiştir.



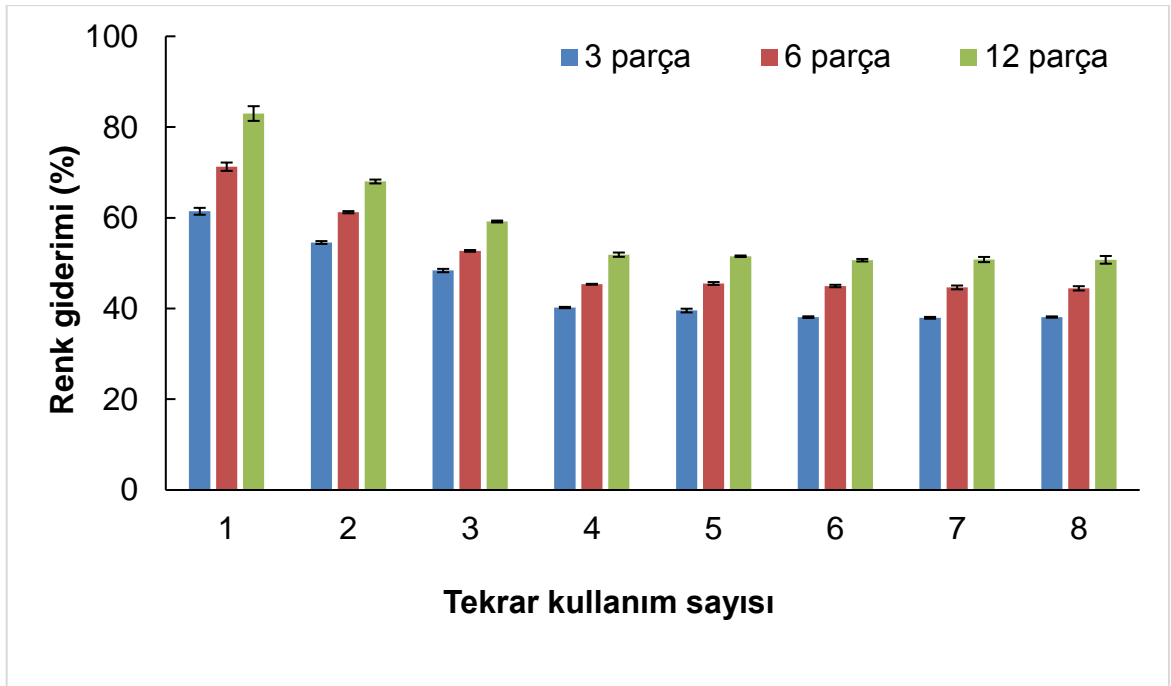
**Şekil 4.15:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 171 boyasının renginin giderimi

RB 171 boyasının Lakkaz/BS ile tekrarlı olarak muamele edilmesine bağlı olarak her kullanım sonrası boyar maddenin renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik tarama sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir.



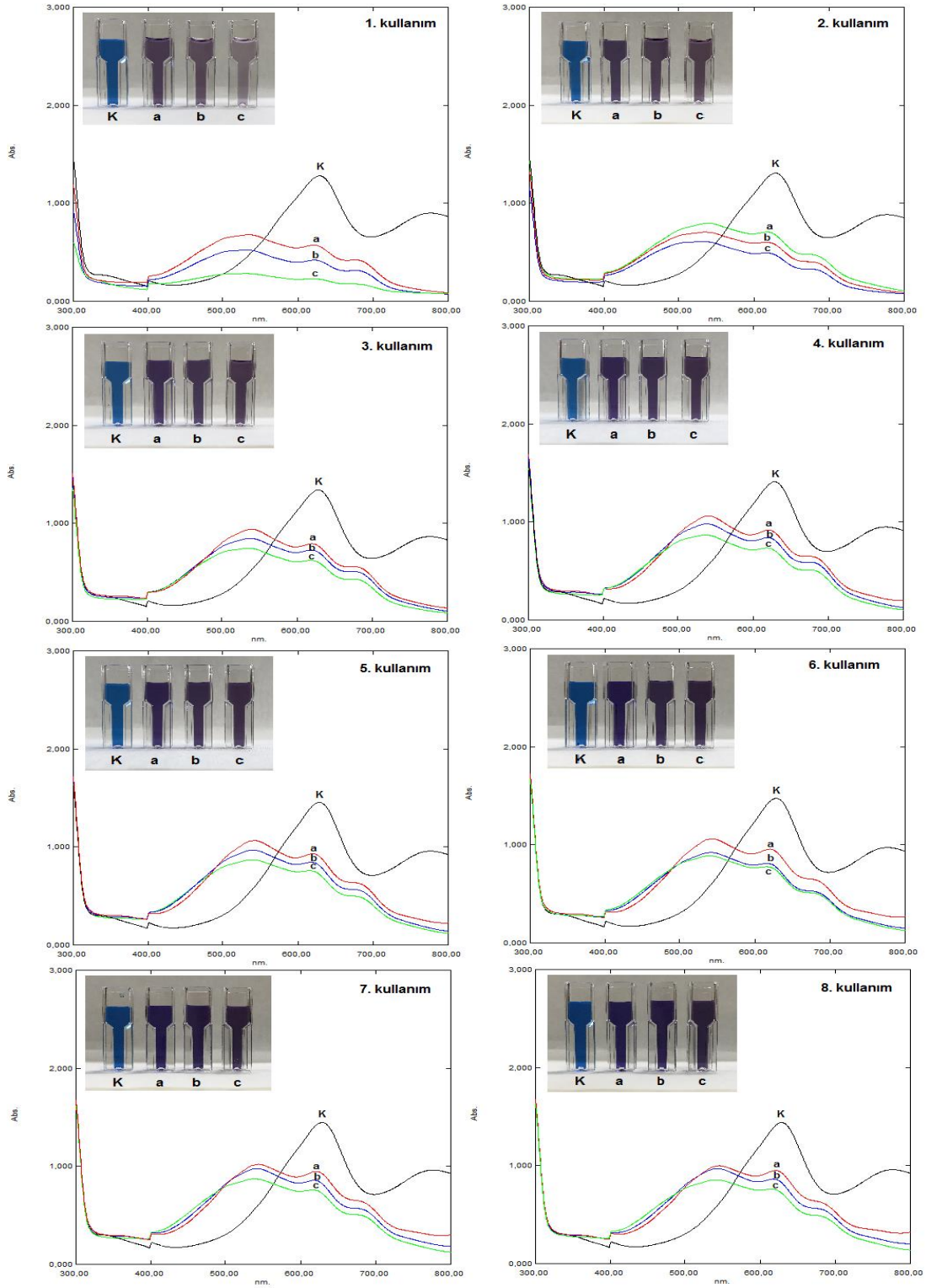
**Şekil 4.16:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımını sürecinde RB 171 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar. K: enzimle muamele edilmemiş boya çözeltisi (kontrol), a: 3 adet lakkaz/BS parçası, b: 6 adet lakkaz/BS parçası, c: 12 adet lakkaz/BS parçası

Çalışmada ayrıca tutuklanmış lakkaz enziminin tekrarlı kullanımı sürecinde RB 198 boyasının rengini giderim aktivitesi de test edilmiştir. Bu çalışmada enzim-boya muamele süresi 1 saat olarak kullanılmış ve çalışma 8 kez tekrarlı olacak şekilde farklı miktarlarda lakkaz/BS parçaları (3, 6 ve 12 parça) ile yürütülmüştür. Diğer çalışmada olduğu gibi her bir kullanımda ortamdaki boya çözeltisi uzaklaştırılıp lakkaz/BS örneklerinin üzerine tekrar 3 mL taze RB 198 boya çözeltisi eklenmiştir. Şekil 4.17’de görüldüğü gibi tüm kullanımlarda etili bir şekilde renk giderimi gerçekleşmiştir. İlk kullanımda 3, 6 ve 12 parça lakkaz/BS ile sırasıyla %61, %71 ve %83 renk giderimi elde edilirken 8. kullanımda bu değerler sırasıyla % 38, %44 ve %51 olarak belirlenmiştir.



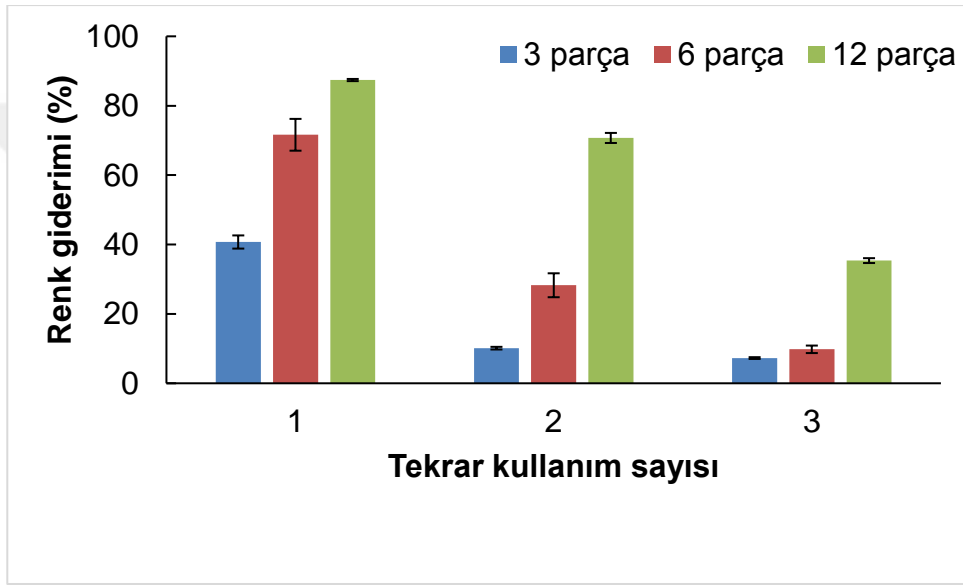
**Şekil 4.17:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 198 boyasının renginin giderimi

RB 198 boyasının Lakkaz/BS ile tekrarlı olarak muamele edilmesine bağlı olarak her kullanım sonrası boyar maddenin renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik tarama sonuçları Şekil 4.18’da verilmiştir.



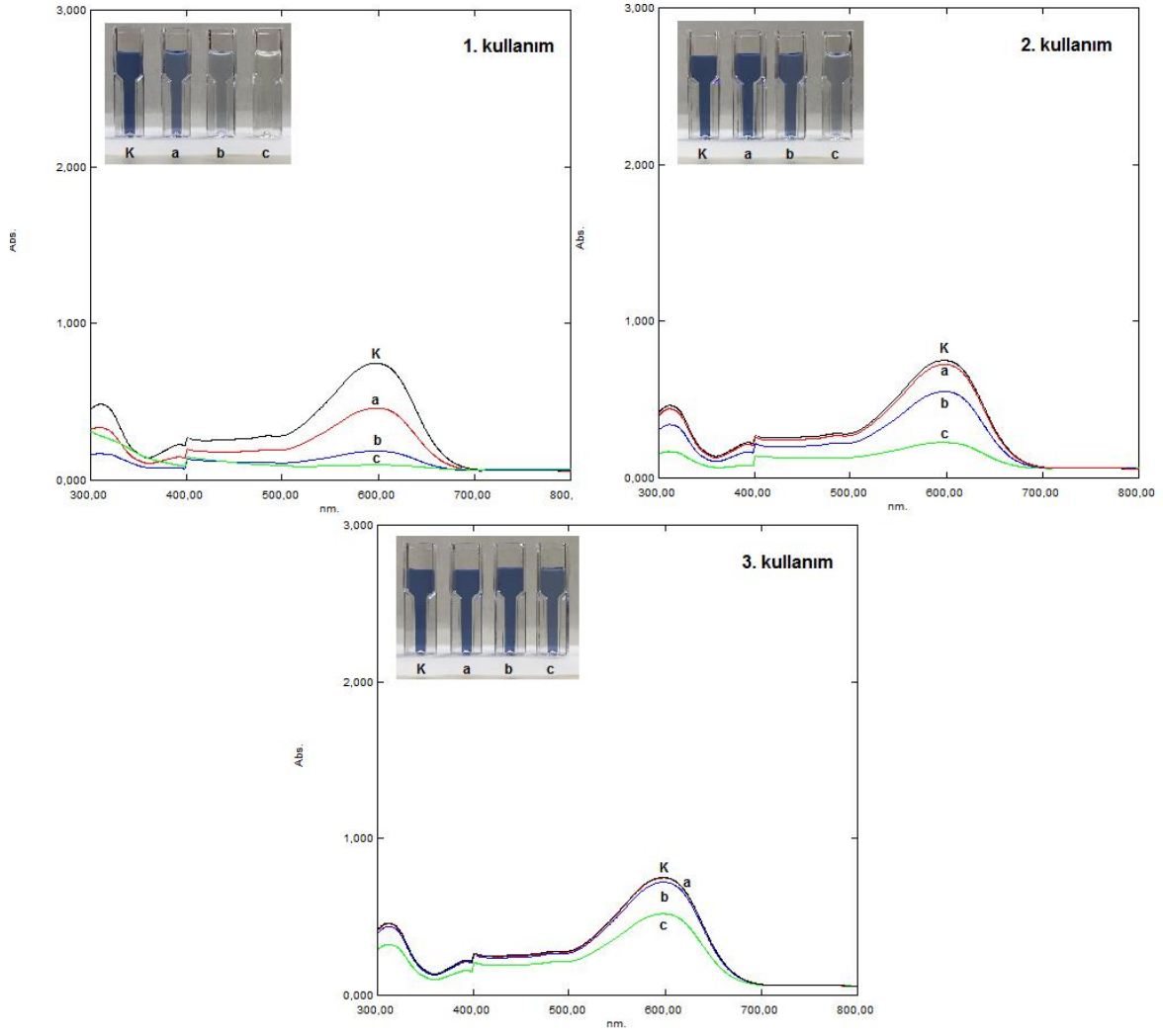
**Şekil 4.18:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımını sürecinde RB 198 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar. K: enzimle muamele edilmemiş boya çözeltisi (kontrol), a: 3 adet lakkaz/BS parçası, b: 6 adet lakkaz/BS parçası, c: 12 adet lakkaz/BS parçası

Çalışmada tutuklanmış enziminin tekrarlı kullanımı sürecinde RB 5 boyasının rengini giderim aktivitesi de test edilmiştir. Bu çalışmada da enzim-boya muamele süresi 60 dakika olarak kullanılmış ve çalışma 3 kez tekrarlı olacak şekilde farklı miktarlarda lakkaz/BS parçaları (3, 6 ve 12 parça) ile test edilmiştir. Diğer çalışmalardaki gibi her bir kullanımda ortamdaki boya çözeltisi uzaklaştırılıp lakkaz/BS örneklerinin üzerine tekrar 3 mL taze RB 5 boya çözeltisi eklenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi ilk kullanımda 3, 6 ve 12 parça lakkaz/BS ile sırasıyla %41, %72 ve %87 renk giderimi elde edilirken 2. kullanımda bu değerler sırasıyla %10, %28 ve %71 olarak belirlenmiştir. 3. kullanımda ise renk giderimi değerleri sırasıyla %7, %10 ve %35 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.19:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 5 boyasının renginin giderimi

RB 5 boyasının Lakkaz/BS ile tekrarlı olarak muamele edilmesine bağlı olarak her kullanım sonrası boyar maddenin renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik tarama sonuçları Şekil 4.20'de verilmiştir.



**Şekil 4.20:** Tutuklanmış lakkazın (3, 6 ve 12 parça) tekrarlı kullanımı sürecinde RB 5 boyasının renginin giderimine ait fotoğraflar ve spektrofotometrik taramalar. K: enzimle muamele edilmemiş boya çözeltisi (kontrol), a: 3 adet lakkaz/BS parçası, b: 6 adet lakkaz/BS parçası, c: 12 adet lakkaz/BS parçası

## 5. SONUÇ VE ÖNERİ

Selüloz bitkilerin yanı sıra bazı bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bakterilerin ürettiği selüloza bakteriyel selüloz (BS) denilmektedir. BS ekzopolisakkarit olan polimer bir materyaldir. Bu polimerin bitki selülozundan önemli bir farkı da saf olmasıdır. BS pek çok uygulamada kullanılacak çevre dostu bir polimerdir.

BS'nin yüksek saflık, yüksek su tutma kapasitesi, mekanik dayanıklılık, geniş yüzey alanı gibi üstün özellikleri onun öne çıkmasına neden olmuştur. Biyomedikal uygulamalar, biyomalzeme üretimi, gıda, kozmetik ve tutuklama gibi birçok alanda kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle bu ekzopolisakkaritin üretimi ve çeşitli alanlarda kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Sentetik ve doğal kaynakları BS üretimi için besiyeri olarak kullanmak mümkündür. Doğal besiyerleri sentetik besiyerlerine göre ucuz kaynaklar olduğundan çeşitli doğal besiyerlerinin BC üretiminde kullanılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, doğal bir besiyeri olarak dut posası atığı özütü (DPAÖ) kullanılmış ve verimli bir BC üreticisi olan *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B- 759 (*Komagataeibacter xylinus*) un bu besiyerinde üretimi sürecinde BS üretimi incelenmiştir. Yapılan çalışmada öncelikle inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH'nın BS üretimine etkisi test edilmiştir. Çalışma sonuçları DPAÖ'den hazırlanan besiyerinde BS üretilebileceğini ve koşullar optimize edilerek BS üretim veriminin indüklenebileceğini göstermiştir. DPAÖ ucuz ve doğal bir kaynak olduğundan üretimde besiyeri olarak kullanılması maliyeti düşürecek önemli bir unsurdur.

BS'nin enzim tutuklanmasında tutuklama matriksi olarak kullanımına ve bunun tekrar tekrar kullanılabilme potansiyeline yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Tutuklamanın önemli avantajları arasında tutuklanmış enzimin tekrar tekrar kullanılabilmesi ve buna bağlı olarak uygulamaya ekonomiklik sağlaması sayılabilir. Enzimleri tutuklamak için çeşitli matriksler (destek materyalleri) kullanılabilir. Tutuklama matriksleri arasında sentetik tutuklama matrikslerinin yanı sıra doğal tutuklama matriksleri de vardır. Doğal matrikslerin en önemli avantajları çevre dostu olmalarıdır.

BS çevre dostu bir polimerdir. Bundan dolayı, çalışmanın ikinci aşamasında, optimum koşullarda üretilen BS'nin lakkaz enzimini tutuklama matriksi olarak kullanılabilirliği test edilmiştir. Lakkaz enzimi biyoteknolojik olarak çok önemli bir enzimdir ve enzim biyoteknolojisi, gıda biyoteknolojisi, fermentasyon biyoteknolojisi, çevre biyoteknolojisi ve tıbbi biyoteknoloji gibi çeşitli uygulamalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle, iyi bir lakkaz üreticisi olduğu bilinen *Trametes troglodytes* ATCC200800'ün tekrarlı-kesikli koşullarda üretimi sürecinde lakkaz enzimi üretilmiş ve ham lakkaz enzimi elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen lakkaz enzimi fiziksel adsorpsiyon ve glutaraldehit ile uygulamasıyla BS'ye başarılı bir şekilde tutuklanmıştır. Hem BS hem de lakkaz tutuklanmış-BS; FTIR analizleri, Xray analizleri, SEM analizleri, AFM ölçümleri, DSC ve DTA ölçümleri kullanılarak karakterize edilmiş ve enzimin BS üzerine başarılı bir şekilde tutuklandığı gösterilmiştir.

Sıcaklık ve pH enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerdir. Herhangi bir uygulama yapılmadan önce kullanılacak biyolojik katalizörün optimum sıcaklık ve pH aralığının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle, BS üzerine tutuklanmış enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri saptanmıştır. Çalışma sonucu enzimin en yüksek aktivitesi 40 °C ve pH 3.0'de belirlenmiştir.

Tekstil ve boyama fabrikaları gibi fabrikaların atıksularının içerisinde boyamada kullanılan boyar maddeler bulunur ve bu atıksular alıcı su ortamlarına verildiklerinde çevre kirliliği oluştururlar. Boyar maddelerden gelen renk de alıcı su ortamlarında renklenmeye yol açtığından fotosentez/solunum dengesini bozan önemli bir kirlilik göstergesidir. Bu nedenle, boyar maddelerin yıkımına ve renginin giderimine yönelik çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Lakkaz enzimi de bu amaçla test edilen çok önemli bir enzimdir. Bundan dolayı, bu tez çalışmasında oluşturulan BS'ye tutuklanmış lakkaz enziminin boyar madde renk gideriminde tekrarlı kullanılabilirliği araştırılmıştır. Sonuçlar, BS'ye tutuklanmış lakkaz enziminin boyar madde renk gideriminde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, doğal bir besiyeri olan DPAÖ çevre dostu ve ucuz bir besiyeri olarak BS üretiminde kullanılabilir ve elde edilen BS'ye lakkaz enzimi tutuklanarak boyar madde renk giderim uygulamalarında kullanılabilir. DPAÖ'nün farklı uygulamalarda da besiyeri olarak kullanılabilecek olması ve BS'nin farklı biyolojik sistemleri tutuklamak için de tutuklama matriksi olarak kullanılabilecek olması çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed, J., Gultekinoglu, M. & Edirisinghe, M.** (2020). Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications, *Biotechnology Advances*,41,1-14.
- Almeida, I. F., Pereira, T., Silva, N. H. C. S., Gomes, F. P., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., ... & Costa, P. C.** (2014). Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(3), 332-336.
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M. & Legge, R. L.** (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system, *Biodegradation*,19, 771-783
- Atykyan, N., Revin, V.& Shutova, V.** (2020). Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media, *AMB Express*, 10(1), 84.
- Bagewadi, Z. K., Bhavikatti, J. S., Muddapur, U. M., Yaraguppi, D. A. & Mulla, S.I.** (2020). Statistical optimization and characterization of bacterial cellulose produced by isolated thermophilic *Bacillus licheniformis* strain ZBT2, *Carbohydrate Research*,491,1-13.
- Bakar, B., Birhanlı, E., Ulu, A., Boran, F., Yeşilada, Ö. & Ateş, B.** (2024). Immobilization of *Trametes trogii* laccase on polyvinylpyrrolidone-coated magnetic nanoparticles for biocatalytic degradation of textile dyes, *Biocatalysis and Biotransformation*,42 (2), 194-211.
- Barshan, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H. & Amiri, S.** (2019). Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by *Komagatacibacter xylinus* PTCC 1734 using vinasse as a cheap cultivation medium, *International Journal of Biological Macromolecules*,136, 1188–1195
- Barud, H. G. O., Silvac, R. R., Barud, H.S., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W. R., Junior, O. B. O. & Ribeiro, S.J.L.** (2016). A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*,153, 406–420
- Bassanini, I., Ferrandi, E. E., Riva, S. & Monti, D.** (2021). Biocatalysis with laccases: An updated overview, *Catalysts*,11, 26
- Benkhaya, S., Rabet, S. M. & Harfi, A.** (2020). A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes, *Inorganic Chemistry Communications*,115,1-35.
- Bianchet, R. T., Cubas, A. L. V., Machado, M. M. & Moecke, E. H. S.** (2020). Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review, *Biotechnology Reports*, 27, 1-6.
- Birben, M.**(2019). Microbial Selülozun Boya Gideriminde Kullanımının Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Birhanli, E. & Yesilada, O.** (2006). Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode, *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (6), 1286- 1293.
- Birhanli, E., Noma, S. A. A., Boran, F., Ulu, A., Yeşilada, Ö. & Ateş, B.** (2022). Design of laccase–metal–organic framework hybrid constructs for biocatalytic removal of textile dyes, *Chemosphere*, 292, 1-11.
- Boran, F. & Yesilada, O.** (2011). Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition, *BioResources*, 6(4), 4404-4416.
- Boran, F., Birhanli, E., Yeşilada, Ö. & Özbey, E.** (2019). Comparison of indigo carmine decolorization by *Pseudomonas aeruginosa* and crude laccase enzyme from *Funalia trogii*, *Turkish Journal of Biological*, 43 (1), 37-46.
- Boran, F.** (2022). Dye removing with dry and wet forms of pure bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*, *Commagene Journal of Biology*, 1, 1- 5.
- Cacicedo, M. L., Castro, M. C., Servetas, I., Bosnea, L., Boura, K., Tsafrakidou, P., Dima, A., Terpou, A., Koutinas, A. & Castro, G.R.** (2016). Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications, *Bioresource Technology*, 213, 172-180
- Campano, C. & Balea, A. & Blanco, A. & Negro, C.** (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review, *Cellulose*, 23, 57–91.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C., Silvestre, A. & Neto, C. P.** (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose, *Bioresource Technology*, 102, 7354–7360.
- Cazón, P. & Vázquez, M.** (2020) Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material, *Food Hydrocolloids*, 113, 1-9.
- Chao, Y., Sugano, Y. & Shoda, M.** (2001). Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55, 673-679.
- Chen, L., Zou, M. & Hong, F.F.** (2015). Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose, *Front Microbiol*, 6, 1245.
- Chen, G., Chen, L., Wang, W., Hong, F. F. & Zhu, M.** (2019). Manufacture of a novel anisotropic bacterial nanocellulose hydrogel membrane by using a rotary drum bioreactor, *Carbohydrate Polymers*, 211, 281–288.
- Chen, C., Ding, W., Zhang, H., Zhang, L., Huang, Y., Fan, M., Yang, J. & Sun, D.** (2022). Bacterial cellulose-based biomaterials: From fabrication to application, *Carbohydrate Polymers*, 278, 1-14.
- Cheng, H. P., Wang, P. M., Chen, J. W., & Wu, W. T.** (2002). Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(2), 125-132.
- Chi Wu, S. & Lia, Y.K.** (2008). Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54, 103–108.

- Çoban, E. P. & Bıyık, H. H.** (2008). Asetik asit bakterilerinden elde edilen alternatif selüloz, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)*,06(2), 19-26 [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080202.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080202.pdf).
- Das, R., Mishra, H., Srivastava, A. & Kayastha, A.M.** (2017). Covalent immobilization of b-amylase onto functionalized molybdenum sulfide nanosheets, its kinetics and stability studies: A gateway to boost enzyme application, *Chemical Engineering Journal*, 328, 215–227.
- Drozd, R., Rakoczy, R., Wasaka, A., Junkac, A. & Fijalkowski, K.** (2018). The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 462–470.
- Dudman, W. F.** (1960). Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture, *Microbiology*, 22(1), 25-39.
- Fathali, Z., Rezaei, S., Faramarzi, M.A. & Rezaei, M.H.** (2019). Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates, *International Journal of Biological Macromolecules*,122, 359–366.
- Fernandes, I. A. A., Pedro, A. C., Ribeiro, V. R., Bortolini, D. G., Ozaki, M. S. C., Maciel, G. M. & Haminiuk, C. W. I.** (2020). Bacterial cellulose: From production optimization to new applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2598- 2611.
- Fernández, M., Sanromán, A.M. & Moldes, D.** (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances*,31, 1808–1825.
- Foresti, M. L., Vázquez, A., & Boury, B.** (2017). Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances, *Carbohydrate Polymers*, 157, 447-467.
- Fraza, C.J.R., Silva, N.H.C., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Xavier, A.M.R.B. & Tavares, A.P.M.**(2014). Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization, *Engineering in Life Sciences*, 14(5), 500-508.
- Gutierrez, E., Burdiles, P. A., Quero, F., Palma, P., Olate-Moya, F., & Palza, H.** (2019). 3D printing of antimicrobial alginate/bacterial-cellulose composite hydrogels by incorporating copper nanostructures, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(11), 6290-6299.
- Gündüz, G., Aşık, N., Aydemir, D. & Kılıç, A.** (2015). Bakteriye selüloz üretimi ve karakterizasyonu, *Ormanlık Dergisi*, 10(2),1-10.
- Güzel, M. & Akpınar, Ö.** (2018). Bakteriye selülozların üretimi ve özellikleri ile gıda ve gıda dışı uygulamalarda kullanımı, *Akademik Gıda*, 16(2), 241-251.
- Güzel, M. & Akpınar, Ö.** (2020). Preparation and characterization of bacterial cellulose produced from fruit and vegetable peels by *Komagataei hanseii* GA2016. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1597-1604
- Herath, I. S., Udayanga, D. & Jayasanka D.J & Hewawasam, C.** (2024). Textile dye decolorization by white rot fungi. *Bioresource technology reports*,25,1-17.

- Hon, D. N. S.** (1994). Cellulose: a random walk along its historical path, *Cellulose*, 1, 1-25.
- 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 (Part 3). *Engineering in Life Sciences*, 7(1), 35-41.
- Huang, C., Guoa, H., Xionga, L., Wang, B., Shi, S., Chena, X., Xiao-Qing, X., Wanga, C., Luoa, J. & Chena, X.** (2016). Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydrate Polymers*, 136,198–202.
- Huang, Y., Tan, L., Chen, M., Jiao, Y., Tian, J., Li, L., ... & Lu, L.** (2023). Laccase immobilization on hierarchical micro/nano porous chitin/graphene oxide beads prepared via Pickering emulsion template for dye decolorization, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 661, 130858.
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V. & Gupta, S.G.** (2013). Production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using dual and cheaper carbon sources, *Microbial & Biochemical Technology*, 5, 2, 031-033.
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khana, S., Shahe, N. & Park, J. K.** (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose, *International Journal of Biological Macromolecules*,102, 1166–1173.
- Jiang, Y., Yu, G., Zhou, Y., Liu, Y., Yuhong Feng, Y. & Li, Y.** (2020). Effects of sodium alginate on microstructural and properties of bacterial cellulose nanocrystal stabilized emulsions, *Colloids and Surfaces A*, 607 1-11.
- Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., Santos, C.A., Santos-Ebinuma, V. C., Seckler, M. M., Gama, F. M. & Pessoa, A.**(2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99,1181–1190.
- Jusko, D.C., Zywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M. & Fijalkowski, K.** (2020) Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings, *Carbohydrate polymers*, 253, 1-13.
- Kiziltas, E. E., Kiziltas, A. & Gardner, D. J.** (2015). Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars, *Carbohydrate Polymers*, 124, 131–138.
- Kolak, S., Birhanli, E., Boran, F., Bakar, B., Ulu, A., Yeşilada, Ö. & Ates, B.** (2023). Tailor-made novel electrospun polycaprolactone/polyethyleneimine fiber membranes for laccase immobilization: an all-in-one material to biodegrade textile dyes and phenolic, *Chemosphere*, 313, 1-13.
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kaminoyama, M., & Kamiwano, M.** (1996). Characterization of non-Newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor, *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(4), 382-386.
- Kyomuhimbo, H.D. & Brink, H. G.** (2023). Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review, *Heliyon*, 9, e13156.

- Lassouane, F., Aït-Amar, H., Amrani, S. & Rodriguez-Couto, S.** (2019). A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions, *Bioresource Technology*, 271, 360–367.
- Lee, K., Buldum, G., Mantalaris, A. & Bismarck, A.** (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing and in advanced fiber composites, *Macromol Biosci.*, 14, 10–32.
- Li, Y., Tian, C., Tian, H., Zhang, J., He, X., Ping, W., & Lei, H.** (2012). Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1479-1487.
- Li, Y., Azi, F., Dong, J., Liu, L., Ge, Z. & Dong, M.** (2021). Green and efficient in-situ biosynthesis of antioxidant and antibacterial bacterial cellulose using wine pomace, *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2183-2191.
- Lin, K.W. & Lin, H.Y.** (2014). Quality characteristics of Chinese style meatballs containing bacterial cellulose, *J.Gida Sci*, 69 (3), SNQ107-SNQ111
- Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S. & Yang, X.** (2020). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1007–1019.
- Lu, T., Gao, H., Liao, B., Wu, J., Zhang, W., Huang, J., Liu, M., Huang, J., Chang, Z., Jin, M., Yi, Z. & Jiang, D.** (2020). Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis, *Carbohydrate Polymers*, 232, 1-14.
- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., & Sun, B.** (2011). Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*186, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2281-2285.
- Ma, L., Bi, Z., Xue, Y., Zhang, W., Huang, Q., Zhang, L., & Huang, Y.** (2020). Bacterial cellulose: an encouraging eco-friendly nano-candidate for energy storage and energy conversion, *Journal of Materials Chemistry A*, 8(12), 5812-5842.
- Mohammadkazemi, F., Azinb, M. & Ashori, A.** (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media, *Carbohydrate Polymers*, 117,518–523.
- Mokhtar, A., Nishioka, T., Matsumoto, H., Kitada, S., Ryuno, N. & Okobira, T.** (2019). Novel biodegradation system for bisphenol A using laccase-immobilized hollow fiber membranes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 737–744.
- Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Ashraf, S. S.** (2020). Laccases and peroxisades: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants, *Science of the Total Environment*, 714, 1-20.
- Natsia, A., Tsouko, E., Pateraki, C., Efthymiou, M., Papagiannopoulos, A., Selianitis, D., Pispas, S., Bethanis, K. & Koutinas, A.** (2022). Valorization of wheat milling by-products into bacterial nanocellulose via ex-situ modification following circular economy principles, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29,1-12.

- Ouzounis, C., & Sander, C.** (1991). A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. *FEBS letters*, 279(1), 73-78.
- Panda, S.K., Aggarwal, I., Kumar, H., Prasad, L., Kumar, A., Sharma, A., Vo, D-V., N., Thuan, D.V. & Mishra, V.** (2021). Magnetite nanoparticles as sorbents for dye removal: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 19, 2487-2525.
- Pang, M., Huangb, Y., Mengc, F., Zhuanga, Y., Liua H., Dua, M., Ma, Q., Wangd, Q., Chene, Z., Lianyu Chene, L., Caig, T. & Cai, Y.** (2020). Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering, *European Polymer Journal*, 122, 1-9.
- Patel, S. K. S., Kalia, V. C., Choi, J.H., Haw, J.R., Kim, I.W. & Kul, J.** (2014). Lee immobilization of laccase on SiO<sub>2</sub> nanocarriers improves its stability and reusability, *Microbiol. Biotechnol.*, 24(5), 639–647.
- Pezzella, C., Guarino, L., & Piscitelli, A.** (2015). How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 923-940.
- Rahmani, K., Faramarzi, M.A., Mahvi, A.H., Gholami, M., Esrafil, A., Forootanfar, H. & Farzadkia, M.** (2015). Elimination and detoxification of sulfamethoxazole assisted by laccase immobilized on porous silica beads, *Biodeterioration & Biodegradation*, 97, 107-114.
- Rangaswamy, B. E., Vanitha, K. P. & Hungund, B. S.** (2015). Microbial cellulose production from bacteria isolated from rotten fruit, *International Journal of Polymer Science*, 280784
- Rekuc, A., Jastrzemska, B., Liesiene, J. & Bryjak, J.** (2009). Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, 216-223.
- 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.
- Rochefort, D., Leech, D., & Bourbonnais, R.** (2004). Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp, *Green Chemistry*, 6(1), 14-24.
- Rohela, G. K., Shukla, P., Kumar, R., & Chowdhury, S. R.** (2020). Mulberry (*Morus* spp.): An ideal plant for sustainable development, *Trees, Forests and People*, 2, 1-17.
- Sampaio, L.M., Padrao, J., Faria, J. & Silva, J.P., Silva, C.J. & Dourado, F. & Zille, A.** (2016). Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties, *Carbohydr Polym.*, 145, 1-12.
- Secula, M.S., Suditu, G. D., Poulos, I., Cojocaru, C. & Cretescu, I.** (2008). Response surface optimization of the photocatalytic decolorization of a simulated dyestuff effluent, *Chemical Engineering Journal*, 141, 18-26.
- Sharma, C., & Bhardwaj, N. K.** (2019). Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives, *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109963.
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillip, G. O. & Yang, G.** (2014). Utilization of bacterial cellulose in food, *Food Hydrocolloids*, 35, 539-545.

- Shokri, Z., Seidi, F., Shiva, K., Chengcheng, L., Saeb, M.C. & Xiao, H.** (2021). Laccase immobilization onto natural polysaccharides for biosensing and biodegradation, *Carbohydrate Polymers*, 262, 1-15.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Tsai, M. L., Chen, C. W., & Di Dong, C.** (2021). Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications, *Bioengineered*, 12(1), 6793-6807.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Tseng, Y., Kumar, V., Chen, C., Haldar, D., Saini, J.K. & Dong, C.** (2022). Developments in bioprocess for bacterial cellulose production, *Bioresource Technology*, 344,1-10.
- 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), 1-5.
- Song, J.E., Su, J., Noro, J., Cavaco-Paulo, A., Silva, C. & Kim, H.R.** (2018). Bio-coloration of bacterial cellulose assisted by immobilized laccase, *AMB Expr*, 8, 19.
- Souza, E. F., Furtado, M. R., Carvalho C. W. P., Freitas- Silva, O. & Gottschalk L. M. F.** (2020). Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses, *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 285- 289.
- Sriplai, N. &Pinitsoontorn, S.**(2020). Bacterial cellulose-based magnetic nanocomposites, *Carbohydrate Polymers*, 254, 1-21.
- Swingler, S., Gupta, A., Gibson, H., Kowalczyk, M., Heaselgrave, W. & Radecka, I.** (2021). Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine, *Polymers*, 13(3), 412.
- Teerapatsakul, C., Parra, R., Keshavarz, T. & Chitradon, L.** (2017). Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 52-57.
- Terinte, N., Ibbert, R. & Schuster, K. C.** (2011). Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by x-ray diffraction (waxd): comparison between measurement techniques, *Lenzinger Berichte*,89,118-131.
- Thurston, C. F.** (1994). The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V. & Koutinas A.** (2015). Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams, *Int. J. Mol. Sci.*,16,14832-14849.
- Tsouko, E., Maina, S., Ladakis, D., Kookos, L.K. & Koutinas, A.** (2020). Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams, *Renewable Energy*, 160, 944-954.
- Ul- Islam, M., Khan, T. &Park, J. K.** (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., Khan, S., Ullah, M. W., & Park, J. K.** (2015). Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields, *Biotechnology journal*, 10(12), 1847-1861.
- Ulu, A., Birhanli, E., Boran, F., Köytepe, S., Yesilada, O. & Ateş, B.** (2020). Laccase-conjugated thiolated chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hybrid composite for biocatalytic degradation of organic dyes, *International journal of biological macromolecules*, 150, 871-884.
- Unlu, F., Boran, F., Yesilada Ö., Koytepe, S.** (2023). Laccase immobilization on bacterial cellulose produced in a mulberry pomace waste extract medium: Characterization and use for dye decolorization, *Applied Polymer*, 140, 24
- Wahid, F., Huang, L., Zhao, X., Li, W., Wang, Y., Jia, S. & Zhong, C.** (2021). Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 53, 1-31.
- Wen, X., Zeng, Z., Du, C., Huang, D., Guangming Zeng, G., Xiao, R., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Wan, J., Hu, L., Yin, L., Zhou, C. & Deng, R.** (2019). Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline, *Chemosphere*, 222, 865-871.
- Qiao, W., Zhang, Z., Qian, Y., Xu, L. & Guo, H.** (2022). Bacterial laccase immobilized on a magnetic dialdehyde cellulose without cross-linking agents for decolorization, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 632, 1-10.
- Yesilada, Ö., Birhanli, E., Ercan, S. & Özmen, N.** (2014a). Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*, *Turkish Journal of Biology*, 38, 103- 110.
- Yesilada, Ö., Birhanli, E., Özmen, N. & Ercan, S.** (2014b). Highly stable laccase from repeated batch culture of *Funalia trogii* ATCC 2008001, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 55–61.
- Yesilada, Ö. & Özcan, B.** (1998). Decolorization of orange II dye with the crude culture filtrate of white rot fungus, *Coriolus versicolor*, *Turkish Journal of Biology*, 22, 463-476.
- Yesilada, Ö., Yildirim, S. C., Birhanli, E., Apohan, E., Asma, D. & Kuru, F.** (2010). The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 33- 39.
- Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowskia, Y. & Pineloc, M.** (2019). Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review, *Biotechnology Advances*, 37, 1-21.
- Zhang, Y., Zhou, Z., Wen, F., Yuan, K., Tan, J., Zhang, Z., & Wang, H.** (2017). Tubular structured bacterial cellulose-based nitrite sensor: preparation and environmental application, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21, 3649-3657.
- Żywicka, A., Peitler, D., Rakoczy, R., Junka, A.F & Fijalkowski, K.** (2016). Wet and dry forms of bacterial cellulose synthesized by different strains of *Gluconacetobacter xylinus* as carriers for yeast immobilization, *Appl Biochem Biotechnol*, 180, 805–816.

## ÖZGEÇMİŞ

