



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



HURDA İNCİRDEN *Gluconacetobacter xylinus* İLE BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ

Yüksek Lisans Tezi

Merve YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**HURDA İNCİRDEN *Gluconacetobacter xylinus* İLE
BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ**

Merve YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Yekta GÖKSUNGUR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Hurda incirden *Gluconacetobacter xylinus* ile bakteriyel selüloz üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29/01/2024

Merve YILMAZ

ÖZET**HURDA İNCİRDEN *Gluconacetobacter xylinus* ile BAKTERİYEL
SELÜLOZ ÜRETİMİ**

YILMAZ, Merve

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Ocak 2024, 86 sayfa

Bakteriyel selüloz (BS), benzersiz yapısal ve mekanik özelliklere sahip, β -1,4-glikozidik bağlardan oluşan bir ekzopolisakkarittir. Bu çalışmada, hurda incir *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 tarafından BS üretimi için alternatif düşük maliyetli substrat olarak kullanılmıştır.

BS üretiminde substrat olarak hurda incir ekstraktı kullanıldığında Hestrin-Schramm ortam bileşenlerinin (maya ekstraktı, pepton, sitrik asit ve disodyum fosfat) taranması ve etkisinin belirlenmesi için Plackett-Burman (PB) tasarımı kullanılmıştır. PB tasarımıyla taranan bileşenler arasında maya ekstraktı BS üretimi üzerinde önemli bulunmuştur. Maya ekstraktı konsantrasyonunun, inokülasyon oranının, başlangıç pH değerinin, başlangıç substrat konsantrasyonunun ve inkübasyon sıcaklığının bakteriyel selüloz üretimine etkileri incelenmiştir. Yanıt yüzey metodu (YYM) kullanılarak başlangıç substrat konsantrasyonu (40-80 g/L), inkübasyon sıcaklığı (25-30°C) ve pH (5.5-7.5) proses parametrelerinin BS üretimine olan doğrusal, üssel ve interaksiyon etkileri belirlenmiştir. Yine YYM kullanılarak söz konusu parametrelerin maksimum BS konsantrasyonunun elde edilebileceği optimum seviyeleri belirlenmiştir. Şimdiye kadar bildirilen en yüksek bakteriyel selüloz konsantrasyonu arasında yer alan maksimum BS konsantrasyonu (8.45 g/L), fermantasyon değişkenlerinin optimum seviyelerinde (başlangıç pH 6.05, başlangıç substrat konsantrasyonu 62.75 g/L, inkübasyon sıcaklığı 30°C) elde edildi.

Optimum kültür koşulları kullanılarak elde edilen BS rneklerinin morfolojisi, yapısı ve kristalliği sırasıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM), zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) ve X-ışını kırınımı (XRD) analizleri ile karakterize edildi. Bu alışma atık incirlerden bakteriyel selüloz üretimi üzerine yapılan ilk detaylı çalışmadır ve çalışmanın sonuçları atık incirlerin bakteriyel selüloz üretimi için etkili bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Bakteriyel selüloz, *Gluconacetobacter xylinus*, hurda incir, optimizasyon, Plackett-Burman tasarımı, yanıt yüzey metodu, karakterizasyon

ABSTRACT**PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE BY
Gluconacetobacter xylinus USING WASTE FIGS**

YILMAZ, Merve

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

January 2024, 86 pages

Bacterial cellulose (BC) is an exopolysaccharide consists of β -1,4-glycosidic bonds, with unique structural and mechanical properties. In this study, waste figs were employed as alternative substrate for BC production. *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 was used for BC synthesis.

Plackett-Burman (PB) design was used for investigating the significance of Hestrin-Schramm medium components (peptone, yeast extract, citric acid and disodium phosphate) when waste fig extract was employed in BC production. Yeast extract emerged as a noteworthy factor in BC production during the screening of components by PB design. The effects of yeast extract concentration, inoculation ratio, initial pH value, initial substrate concentration and incubation temperature on BC synthesis was determined. The linear, quadratic and interaction effects of substrate concentration, (40-80 g/L), incubation temperature (25-35°C) and pH (5.5-7.5) on BC production was determined using response surface methodology (RSM). Maximum BC concentration of (8.45 g/L) which is among the highest bacterial cellulose concentration reported so far was achieved at optimum fermentation levels (initial pH 6.05, initial substrate concentration 62.75 g/L, incubation temperature 30°C).

The structural characterization of BC samples obtained using the optimum culture conditions were determined by Fourier transform infrared (ATR-FTIR), scanning electron microscope (SEM) and X-Ray diffraction (XRD) analyses,

respectively. This study is the first detailed study on bacterial cellulose production from waste figs which proved that waste figs were an alternative substrate for BC production.

Keywords: Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter xylinus*, waste fig, optimization, Plackett-Burman design, response surface methodology, characterization



ÖNSÖZ

“Hurda incirden *Gluconacetobacter xylinus* ile bakteriyel selüloz üretimi” başlıklı bu tez çalışmasının deneysel aşamaları, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Tez çalışmasında, bir atık olan hurda incir *Gluconacetobacter xylinus* ile bakteriyel selüloz üretiminde değerlendirilmiş olup laboratuvar ölçeğinde fermantasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırması sonucunda, substrat olarak hurda incirin kullanılması ile gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üretimi ve bu üretim koşullarının yanıt yüzey metodu ile (YYM) optimize edildiği herhangi çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa gerçekleştirilen üretimden elde edilecek olan optimizasyona ait verilerin ürün konsantrasyonu değerlerini iyileştirilmesi, üretim maliyetini düşürmesi, büyük ölçekte bakteriyel selüloz üretiminde izlenilecek yola katkıda bulunması ve literatürdeki bir boşluğu doldurması beklenmektedir. Ayrıca hurda incirin katma değeri yüksek bir ürün üretilmesinde değerlendirilmesi, bu atığın elde edildiği Ege Bölgesi başta olmak üzere tarımsal yöreler için cazip bir ekonomik alternatif oluşturacak ve atık yönetimine yardımcı olacaktır.

İZMİR

29 /01/2024

Merve YILMAZ

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| İÇ KAPAK | ii |
| KABUL ONAY SAYFASI | iii |
| ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI..... | v |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | ix |
| ÖNSÖZ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xxii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Bakteriyel Selülozun Yapısı ve Özellikleri | 3 |
| 2.2. Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları | 5 |
| 2.3. <i>Gluconacetobacter xylinus</i> | 7 |
| 2.4. Bakteriyel Selülozun Biyosentezi..... | 9 |
| 2.5. Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri | 11 |
| 2.6. BS Sentezine Etki Eden Faktörler | 14 |

| | |
|---|----|
| 2.7. Alt Akım İşlemleri | 15 |
| 2.8. Bakteriyel Selüloz Üretiminde Atıkların Kullanımı | 16 |
| 2.9. Hurda İncir | 18 |
| 2.10. Plackett-Burman Tasarımı | 21 |
| 2.11. Yanıt Yüzey Metodu..... | 23 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 25 |
| 3.1. Gereçler..... | 25 |
| 3.1.1. Mikroorganizma..... | 25 |
| 3.1.2. Substrat..... | 26 |
| 3.1.3. Enzim | 26 |
| 3.1.4. Kimyasallar | 27 |
| 3.1.5. Ekipmanlar | 27 |
| 3.2. Yöntemler..... | 27 |
| 3.2.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı | 27 |
| 3.2.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi | 28 |
| 3.2.3. Fermantasyon ve Üretim Parametreleri | 29 |
| 3.2.4. Yanıt Yüzey Metodu..... | 30 |
| 3.2.5. Analitik Yöntemler | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.2.5.1. Substrat analizleri | 32 |
| 3.2.5.2.1. Toplam şeker tayini | 32 |
| 3.2.5.1.2 HPLC Yöntemi ile Toplam Şeker ve Karbon Profilinin Belirlenmesi ... | 32 |
| 3.2.5.2. İndirgen Şeker Tayini | 32 |
| 3.2.5.3. Bakteriyel Selüloz Tayini | 33 |
| 3.2.5.4. pH | 33 |
| 3.2.5.5. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) .. | 33 |
| 3.2.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi | 34 |
| 3.2.5.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi Analizi | 34 |
| 3.2.5.8. X-Işını Kırınım (XRD) Analizi | 34 |
| 3.2.5.9. İstatistiksel Değerlendirme | 34 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 35 |
| 4.1. Substrat Analizleri | 35 |
| 4.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi . | 35 |
| 4.3. Maya Ekstraktı Konsantrasyonunun Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi..... | 38 |
| 4.4. İnokülasyon Oranının Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi | 40 |
| 4.5. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Bakteriye Selüloz Üretimine Etkisi..... | 41 |
| 4.6. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Bakteriyel Selüloz Üretimi Üzerine Etkisi | 43 |

| | |
|--|----|
| 4.7. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi..... | 46 |
| 4.8. Bakteriyel Selüloz Üretiminin Yanıt Yüzey Metodu (YYM) ile Optimizasyonu | 47 |
| 4.9. Bakteriyel Selüloz Üretim Kinetiği..... | 54 |
| 4.10.Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)..... | 56 |
| 4.11. Bakteriyel Selülozun Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi | 58 |
| 4.12. Bakteriyel Selülozun Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi..... | 60 |
| 4.13. Bakteriyel Selülozun X- ışını kırınım (XRD) analizi | 61 |
| 5. SONUÇ | 64 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 67 |
| TEŞEKKÜR..... | 84 |
| ÖZGEÇMİŞ | 86 |
| EKLER..... | |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Bakteriyel selülozun molekül içi ve moleküler arası hidrojen bağları ...4 | |
| Şekil 2.2. <i>G. xylinus</i> tarafından salgılanan 3 boyutlu ağ yapısı.....8 | |
| Şekil 2.3. Glikoz ve fruktozdan bakteriyel selüloz I ve II biyosentezinin şematik diyagramı..... 11 | |
| Şekil 2.4. Biyoreaktörler ve üretilen bakteriyel selülozların şekilleri. 14 | |
| Şekil 3.1. <i>G. xylinus</i> 'un gram boyama sonrası 100× büyütülmüş mikroskop görüntüsü25 | |
| Şekil 3.2. Firmadan temin edilen hurda incirlerin UV ışık altındaki görüntüleri..26 | |
| Şekil 3.3. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan hurda incir ekstraktı.....28 | |
| Şekil 3.4. Plackett-Burman deneme desenine göre hazırlanan fermantasyon ortamları.....29 | |
| Şekil 4.1. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi39 | |
| Şekil 4.2. Farklı aşırı oranlarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi 41 | |
| Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi43 | |
| Şekil 4.4. Başlangıç substrat konsantrasyonu denemesinde fermantasyon sonrası üretilen bakteriyel selülozlar.....44 | |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 4.5. Başlangıç substrat konsantrasyonunun bakteriyel selüloz sentezine etkisi | 45 |
| Şekil 4.6. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyel selüloz sentezine etkisi.... | 47 |
| Şekil 4.7. Sabit substrat konsantrasyonunda (60 g/L), Sıcaklık ve pH'nın eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği..... | 51 |
| Şekil 4.8. Sabit pH değerinde (6,5) sıcaklık ve substrat konsantrasyonu eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği..... | 52 |
| Şekil 4.9. Sabit sıcaklık değerinde (30°C) substrat konsantrasyonu ve pH eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği..... | 53 |
| Şekil 4.10. <i>G. xylinum</i> ATCC 700178 ile bakteriyel selüloz üretim kinetiği | 56 |
| Şekil 4.11. Optimum şartlarda elde edilen bakteriyel selüloz örneğinin SDS-PAGE bantları | 57 |
| Şekil 4.12. Standart HS ortamından elde bakteriyel selüloz örneğinin 100.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 58 |
| Şekil 4.13. Optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğinin 100.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 58 |
| Şekil 4.14. <i>Gluconacetobacter xylinus</i> ile hurda incir ekstraktı ortamından üretilen bakteriyel selülozun ATR-FTIR spektrumu | 61 |
| Şekil 4.15. Standart HS ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı..... | 62 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

Şekil 4.16. Belirlenen optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı63



ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1. Çeşitli suşların bakteriyel selüloz verimleri | 8 |
| Çizelge 2.2. Çeşitli atıklardan bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilen bazı çalışmalar | 17 |
| Çizelge 2.3. Kuru incirin bileşimi ve besin değerleri | 19 |
| Çizelge 2.4. Hurda incirin değerlendirilme yöntemlerine göre işletmelerin dağılımı | 19 |
| Çizelge 2.5. Türkiye’de yıllara bağlı kuru incir üretim miktarı..... | 20 |
| Çizelge 2.6. Farklı yıllarda Türkiye’de kuru incir ihracatı. | 20 |
| Çizelge 2.7. Plackett-Burman tasarımına ait 12 deney ve 11 adet faktörlü deneme deseni | 22 |
| Çizelge 3.1. Plackett-Burman tasarımında denenen besiyeri bileşenlerinin düşük (-) ve yüksek (+) seviyeleri..... | 28 |
| Çizelge 3.2. Bakteriyel selüloz üretiminde etkileri incelenen parametreler ve değer aralıkları | 29 |
| Çizelge 3.3. YYM’de kullanılan parametreler ve seviyeleri | 31 |
| Çizelge 4.1. Hurda incir ekstraktı kompozisyonu ve kullanılan yöntemler..... | 35 |
| Çizelge 4.2. Hurda incir ile hazırlanan fermantasyon ortamında yapılan PB deneme deseni ve fermantasyon sonucu üretilen bakteriyel selüloz miktarları | 35 |

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 4.3. Bakteriyel selüloz üretimi için tahmini etki değerleri ve katsayılar.. | 36 |
| Çizelge 4.4. Bakteriyel selüloz için varyans analizi | 37 |
| Çizelge 4.6. <i>G. xylinus</i> 700178 ile bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan deneysel tasarım ve cevaplar | 48 |
| Çizelge 4.7. İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi | 48 |
| Çizelge 4.8. Bakteriyel selüloz miktarları için tahmini regresyon katsayıları..... | 49 |
| Çizelge 4.9. Farklı substratlardan elde edilen bakteriyel selüloz miktarları..... | 54 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|--------------------|---|
| °C | Santigrat |
| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
| BS | Bakteriyel selüloz |
| PB | Plackett-Burman |
| HS | Hestrin-Schramm |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| ATR-FTIR | Zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi |
| XRD | X-ışını kırınımı |
| YYM | Yanıt Yüzey Metodu |
| FDA | Gıda ve İlaç Dairesi |
| GRAS | Genel olarak güvenli kabul edilen |
| DPw | Polimerizasyon derecesi |
| Glukoz 1-P | Glukoz 1-fosfat |
| Glikoz 6-P | Glikoz 6-fosfat |
| UDP-glukoz | Üridin difosfat glukozu |
| UTP | üridin trifosfat |
| Fruktoz1-P | fruktoz1-fosfat, fruktoz-6-fosfat |

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|--------------------|---|
| Fruktoz 6-P | fruktoz-6-fosfat |
| CI | Kristallik indeksi |
| CSL | mısır maserasyon sıvısı |
| UV | Ultraviyole |
| DE | Esterleşme derecesi |
| ANOVA | Varyans analizi |
| SPSS | İstatistik paket programı |
| AOAC | Association of Official Analysis Chemists |
| Adj R ² | Düzeltilmiş regrasyon katsayısı |
| gr | Gram |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| mL | Mililitre |
| nm | nanometre |
| R ² | Regresyon katsayısı |
| rpm | Devir/dakika (revolutions per minute) |
| g/L | Gram/Litre |
| % v/v | Hacimce yüzde |

| | |
|----------------------------------|---|
| dk | Dakika |
| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
| BS | Bakteriyel selüloz |
| PB | Plackett-Burman |
| BBD | Box-Behnken tasarımı |
| CCD | Merkez kompozit tasarım |
| FFD | Fraksiyonel faktöriyel tasarım |
| DNS | di-nitro salisilik asit |
| SDS-PAGE | Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi |
| Na ₂ HPO ₄ | Disodyum Fosfat |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| KOH | Potasyum hidroksit |
| Na ₂ CO ₃ | Sodyum karbonat |

1. GİRİŞ

Bakteriyel selüloz, su tutma özellikleri, polimerizasyon derecesi, yüksek kristallik, yüksek çekme mukavemeti, biyouyumluluk, saflık gibi özellikleri nedeniyle biyomedikal, gıda, kimya, tekstil, çevre ve mühendislik alanlarında çeşitli uygulamalara sahip, son zamanlarda oldukça dikkat çeken bir biyomateryaldir. *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella* ve *Sarcina* gibi bakteri cinslerince birincil metabolit olarak üretilen bakteriyel selülozun en verimli üreticisi selüloz çalışmalarında model organizma olarak da kullanılmış olan *Gluconacetobacter xylinus*'dur (Cerrutti et al., 2016; Castro et al., 2011)

Bakteriyel selülozun sahip olduğu eşsiz özellikler sebebiyle çeşitli alanlarda önemli bir materyal olarak kullanımı uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen yüksek fermantasyon maliyeti, düşük üretkenlik ve pahalı kültür ortamları sebebiyle sanayileştirilmesi ve büyük ölçekte üretimi günümüzde hala en büyük zorluğu oluşturmaktadır. Bu zorluğun ve eksikliğin giderilmesi için bu zamana kadar tarım, gıda, bira ve şeker endüstrileri, tekstil ve kâğıt hamuru fabrikalarından elde edilen atıklar düşük maliyetli substrat olarak bakteriyel selüloz üretiminde değerlendirilmiştir (Hussain et al., 2019). Fermantasyonda kullanılan ortamın maliyeti, toplam harcamanın yaklaşık olarak %50-65'ini oluşturmaktadır. Bu nedenle daha ucuz alternatif substratların biyoteknolojik proseslerde kullanılması ile ilgili yapılan çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda ciddi küresel çevresel sorunlar, atıkların sürdürülebilir kullanımını arttırmaktadır. Atıkların bakteriyel selüloz üretimi için kullanılması aynı zamanda atık yönetimine ve üretiminde kullanılan ortam maliyetinin düşürülmesine yardımcı olmaktadır (Vazquez et al., 2013; Velasquez-Riano and Bojaca, 2017).

Hurda incir (Endüstriyel incir), hasat öncesi, sonrası ve depolanması gibi aşamalarda oluşan hasarlar nedeniyle değer kaybeden, güneş yanığı oranı fazla olan, ekşiyen, genel olarak pazar payı olmayan çatlak meyvelerdir.

Bu tezin çalışmasının amacı, hurda incir düşük maliyetli substrat olarak kullanarak *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 ile bakteriyel selüloz üretimi

için ortam bileşenlerinin ve fermantasyon parametrelerinin optimizasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu doğrultuda çalışmada ilk olarak karbon kaynağı olarak hurda incir ekstraktı kullanıldığında Hestrin-Schramm ortam bileşenlerinin (maya ekstraktı, pepton, sitrik asit ve disodyum fosfat) taranması ve etkisinin belirlenmesi için Plackett-Burman tasarımı kullanılmıştır. Ardından maya ekstraktı konsantrasyonunun, inokülasyon oranının, başlangıç pH değerinin, başlangıç substrat konsantrasyonunun ve inkübasyon sıcaklığının bakteriyel selüloz üretimine etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın takip eden aşamasında, bakteriyel selüloz üretiminde önemli parametreler olan başlangıç substrat konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı, pH parametrelerinin bakteriyel selüloz sentezine olan etkilerini belirlemek ve maksimum selüloz üretiminin elde edildiği noktaları belirlemek amacıyla yanıt yüzey metodu (YYM) kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda bakteriyel selüloz üretim kinetiği incelenmiştir. SEM, ATR-FTIR ve XRD analizleri ile optimum koşullarda elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

Literatürde hurda incirden bakteriyel selüloz üretimi üzerine gerçekleştirilen detaylı bir optimizasyon çalışmasının bulunmaması nedeniyle çalışmadan elde edilen verilerin literatüre katkı sağlaması ve pilot ölçekli üretimlerde yol göstermesi beklenmektedir.

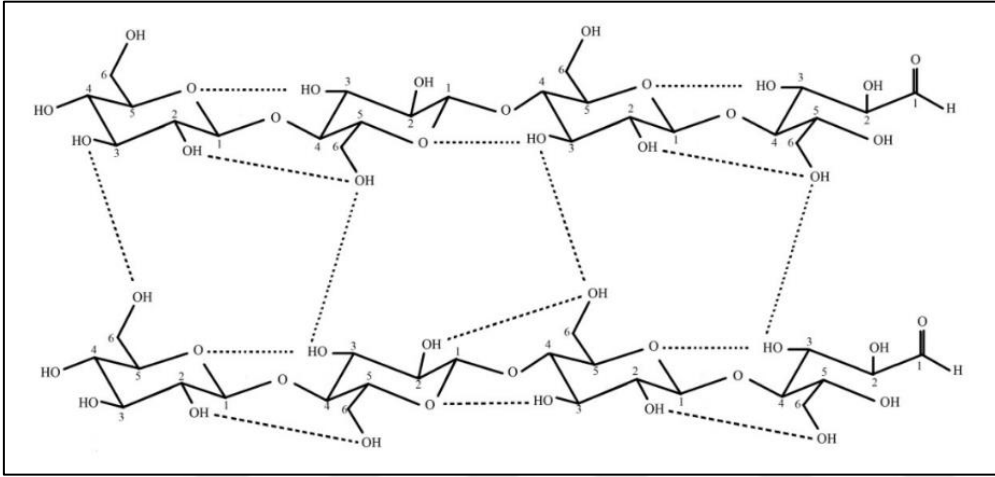
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriyel Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz doğada en bol bulunan biyopolimerdir. Dünya genelinde büyük ekonomik öneme sahiptir ve biyosferdeki en yaygın yenilenebilir biyolojik kaynak olarak kabul edilmektedir. Ana endüstriyel kaynağını sert ve yumuşak odun ağaçları, pamuk, keten, jüt, rami ve kenevir gibi çok hücreli bitkiler oluşturmakta olup, bunlardan elde edilen selüloz bazlı malzemeler binlerce yıldır kâğıt, yapı malzemesi, enerji, tekstil ve mobilya alanlarında temel mühendislik malzemeleri olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Zhong, 2020; Mishra et al., 2022).

Selülozun yapısal kimyası ilk kez 1837 yılında Fransız kimyager Anselma Payen tarafından keşfedilmiştir. Selüloz, glukoziltransferaz tarafından β -1,4 bağlarıyla bağlanan glukoz moleküllerinin doğrusal bir polimeridir. Glukan zincirleri hidrojen bağı veya Van der Waals etkileşimleri yoluyla çeşitli şekillerde paketlenerek farklı selüloz türlerini oluşturabilmektedir. Selüloz kristal formda Selüloz I, II, III, IV olarak bulunur. Selüloz I bitki, bakteri, alg gibi kaynaklardan doğal olarak elde edilirken Selüloz II ve III, Selüloz I'ın kimyasal modifikasyonundan üretilir. Selüloz IV ısı ile işleme üretilmektedir (Deshpande et al., 2023). Glukan zincirlerinin doğadaki en yaygın düzenlenme biçimini Van der Waals etkileşimleri yoluyla paralel katmanlar halinde istiflenmiş hidrojen bağı düzlemler oluşturmaktır. Bu istiflenmiş katmanlar selüloz I mikrofibrillerini veya doğal selülozu meydana getirir ve bunlar daha sonra birleşerek daha büyük diziler oluşturabilir. Selüloz I triklinik ($I\alpha$) ve monoklinik ($I\beta$) olmak üzere iki çeşit kristal yapıya sahiptir. Selüloz $I\beta$ esas olarak bitkilerde bulunmaktadır ve hücre duvarının önemli bir yapısal unsurudur (O'Sullivan, 1997; Azizi Samir et al., 2005). Selüloz $I\alpha$ 'nın hidrotermal işleme alkali bir çözeltide geri dönüşümsüz olarak selüloz $I\beta$ 'ya dönüştürülebildiği bilinmektedir, bu da selüloz $I\beta$ 'nın selüloz $I\alpha$ 'ya göre nispeten daha düşük bir termodinamik kararlılığı temsil ettiğini göstermektedir. Selüloz $I\alpha$ ve $I\beta$ 'daki hidrojen bağlanması farklıdır, bu durum termodinamik kararlılıklarındaki farklılıklara atfedilmektedir (Watanabe et al., 2007; Kose et al., 2011; Moon et al., 2011).

Bakteriyel selüloz (BS), bitki selülozu ile aynı moleküler formüle ($C_6H_{10}O_5$) sahiptir ve β -1 \rightarrow 4 glukan zincirinden oluşan doğrusal bir homopolisakkarittir. Glukan zincirleri Şekil 2.1’de sunulduğu gibi güçlü molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları aracılığıyla bir arada tutulur. Glukoz zincirlerinden mikrofibriller meydana gelirken, bu mikrofibrillerin bir araya gelmesiyle selüloz şeritleri oluşmaktadır. Bu şeritler ise sonrasında lifler arasında boşluk bulunan 3 boyutlu ağ şeklinde bir yapı meydana getirir (Esa et al., 2014).



Şekil 2.1. Bakteriyel selülozun molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları (Esa et al., 2014).

Bakteriyel selülozun mikrofibrilleri ilk olarak Muhlethalerin tarafından 1949 yılında tanımlanmış olup, bitki selülozuna kıyasla yaklaşık 100 kat daha incedir. Kimyasal yapısı bitki selülozuna benzer olmasına rağmen hemiselüloz, lignin, pektin, arabinoz gibi bileşenleri içermemektedir. Bu nedenle bitkisel selülozun saflaştırmasında kullanılan sert kimyasallara ve yüksek sıcaklıkların kullanımını gerektirmez. Fermantasyon sonrası bakteriyel selüloz kolayca ayrılabilen bakteri hücreleri, artık besin ve metabolik yan ürünleri içerir. Bu safsızlıkların giderilmesi kolay ve düşük enerjili bir işlemdir (Gayathry et al., 2014).

Selülozun benzersiz 3 boyutlu ağı yapısı, yüksek gerilme mukavemeti, geniş yüzey alanı, yüksek su tutma kapasitesi, mükemmel geçirgenlik, esneklik, dayanıklılık gibi farklı özellikler kazandırır. Selülozun hidrofıl özelliği, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve kimyasal olarak modifiye edilebilmesi yapısında

önemli miktar hidroksil grubu içermesine atfedilmektedir. (Heinze et al., 2018, Romling and Galperin, 2015).

Bakteriyel selüloz genellikle bitkisel selüloza kıyasla daha yüksek bir polimerizasyon derecesine sahip olup bu polimerizasyon derecesi kullanılan bakteri suşuna, fermantasyon koşullarına ve besin kaynakları gibi bir takım faktöre bağlı olarak değişmektedir. Pamuk, mısır, buğday samanı, jüt ve odun hamuru gibi bitki selülozu için ağırlık-ortalama polimerizasyon deresi (DP_w) sırasıyla 15.000, 1700, 2600, 1900 ve 4000 DP_w iken, farklı bakteri türleri için polimerizasyon derecesi 16.000'dir. (Hallac and Ragauskas, 2011).

Bakteriyel selüloz ayrıca %90 seviyelerine varan yüksek bir kristallik oranına sahiptir. Kristal bölgeler bakteriyel selülozun ana bileşenidir ve aralıklı olarak kısa düzensiz bölümler bulunmaktadır. Bu durum bakteriyel selülozun yüksek gerilme mukavemeti ve esnekliğine atfedilmektedir. Selüloz I'ın selüloz I α ve selüloz I β kristal yapıları biyolojik türlerde farklı oranlarda bir arada bulunur. Selüloz I α ~0,6 kütle oranı ile bakteriyel selülozda zenginken, selüloz I β ~0,8 kütle oranı ile yüksek bitkilerde baskındır. Bakterilerde selüloz I α oranları cinslere ve türlere bağlı olarak değişmektedir (Sijabat et al., 2020; Draushuk et al., 1997; Moon et al., 2011). Selüloz sentezleyen bakterilerin çoğu amorf selüloz üretir, ancak *Gluconacetobacter* de dahil olmak üzere birkaç cins selüloz I α mikrofibrilleri üretebilir. *Gluconacetobacter*'de, bu parakristalin selüloz mikrofibrilleri geniş şerit yapıları ve daha büyük diziler halinde toplanabilir ve ağırlıklı olarak saf selüloz I α olan kalın biyofilmlere yol açar. Ayrıca, sıcaklık, karıştırma ve katkı maddeleri gibi fermantasyon faktörleri de bakteriyel selülozdaki, selüloz I α ve I β oranlarını etkilemektedir (Yamamoto and Horn, 1994; Kose et al., 2011).

2.2. Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları

Bakteriyel selüloz doğal saflığı, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve toksik olmaması gibi özellikleri nedeniyle ticari ilginin büyük olduğu çok yönlü bir biyomateryaldir. Dünya çapında patent başvurularının 1980'den beri her yıl arttığı görülmekte olup, 2020 yılında yapılan patent başvuruları 7371'e ulaşmıştır. Üstün fiziksel ve mekanik özellikleri bakteriyel

selülozu çeşitli uygulama alanları için ideal malzeme haline getirmektedir (Gregory et al., 2021).

Gıda alanında, geleneksel tatlı, vejetaryen et, gıda katkı maddeleri ve gıda ambalajı gibi potansiyel kullanım alanları mevcuttur. Bakteriyel selülozun yapısı ve işlevi kullanılan fermantasyon yöntemine göre farklılıklar göstermektedir. Statik yöntemlerle üretilen pelikül şeklindeki selüloz çoğunlukla tatlı ve gıda bileşenleri için hammadde olarak kullanılırken, çalkalamalı yöntem ile üretilen bakteriyel selüloz hidrokolloid yapıya sahip olup, içeceklerde kıvam arttırıcı ve süspansiyon ajanları olarak kullanılabilir. (Azeredo et al., 2019; Zhong, 2020).

1992'den beri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından "genel olarak güvenli kabul edilen" (GRAS) olarak sınıflandırılan bakteriyel selüloz, diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltma potansiyeli olan yüksek lif içeren bir polimer olarak görülmektedir. Gıda alanındaki en eski kullanımlarında biri 'nata de coco' adı verilen geleneksel bir Filipin tatlısının üretimidir. Bu tatlıda karbon kaynağı olarak Hindistan cevizi suyu kullanılır ve fermantasyon sonrası elde edilen selülozlar küp şeklinde küçük parçalara ayrıldıktan sonra şeker şurubu kullanılarak tatlandırılır. Bunun dışına gıda endüstrisinde su bağlayıcı, jelleştirici, koyulaştırıcı, süspansiyon ve stabilize edici madde olarak kullanımları mevcuttur. Guo et al. (2018) çalışmalarında bakteriyel selülozu yağ içeriğini azaltma için dondurmada kullanmışlardır ve erimeye karşı daha yüksek direnç ile stabilite ve reolojik özelliklerde iyileşme gözlemlemişlerdir. Sahip olduğu ağısı ve gözenekli yapısı sayesinde havadaki toz ve mikroorganizmaları filtreleyerek gıdaların saklanması ve raf ömrünü uzatmak için gıda ambalajı olarak kullanımı da araştırılmaktadır (Iguchi et al., 2000; Shi et al., 2014; Klemm et al., 2006).

Bakteriyel selüloz sahip olduğu biyoyumluluğu, toksik olmaması, yara bölgesindeki nemi muhafaza etme ve gaz moleküllerinin geçişine izin verme gibi özellikleri nedeniyle yara iyileşmesi, doku mühendisliği ve ilaç taşınımı gibi biyomedikal alanlarda biyobazlı bakteriyel selüloz malzemelerine yönelik artan talep dikkat çekmektedir. Hücresel yapışmayı, hücre proliferasyonunu ve göçü uyararak hızlı yara iyileşmesini sağlaması nedeniyle doku mühendisliği ve yapay kan damarları alanları başta olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada

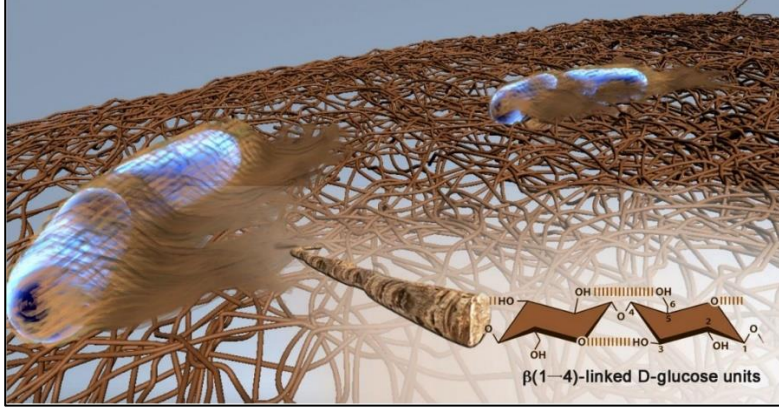
kullanımları öne çıkmaktadır. Diş implantları, yara pansuman malzemesi, yapay deri, kemik, kırıkta, retina ve kornea gibi uygulamaları çalışılmış olup, piyasada deri nakli, periodontal dokuların iyileştirilmesi, ikinci ve üçüncü derece ülser tedavisinde uygulanan pek çok ticari ürün mevcuttur. Kozmetik alanında yüz maskelerinde, kişisel temizlik formülasyonlarında ve kontak lenslerde kullanılmıştır. Bunların dışında, aynı zamanda tekstil, kâğıt endüstrisi, havacılık, inşaat mühendisliği gibi çeşitli alanlarda uygulamalara sahiptir. (Wang et al., 2017; El-Gendi et al., 2022; Ullah et al., 2016; Choi et al., 2022)

2.3. *Gluconacetobacter xylinus*

Bakteriyel selüloz, *Gluconacetobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* gibi farklı bakteri türleri dışında algler ve mantarlar tarafından da sentezlenebilen bir ekzopolisakkarittir. Bunlar arasında, *Gluconacetobacter xylinus* (önceki adıyla *Acetobacter xylinus*) en verimli bakteriyel selüloz üreticisi olup, endüstriyel ölçekte selüloz üretebildiği bilinen tek türdür. 1886 yılında Adrian J. Brown tarafından keşfedilen, birincil metabolitin bir parçası olarak iç içe geçmiş hücre dışı şeritler şeklinde selüloz üreten gram negatif, çubuk yapılı ve aerobik bakteridir. En son bakteri sistematüğinde *G. xylinus*, asetik asit bakterilerinin bakteri sistematüğüne yaptığı katkılardan dolayı japon mikrobiyolog Dr. Kazuo Komagata'nın onuruna adlandırılan *Komagataeibacter* cinsi altında birleştirilmiştir. (Hussain et al. 2019, Zhong, 2020).

Gluconacetobacter türlerinin yetiştikleri doğal ortamların arasında meyveler, çiçekler ve bozulmuş gıdalar yer alır. Tek bir *G. xylinus* bakterisi 200000 glukoz ünitesini β -1,4 glukoz zincirleri vasıtasıyla polimerleştirebilir ve bu sürede polimer zincirlerini 1 saniyede nanofiberler halinde düzenleyebilme kapasitesine sahiptir. (Chen et al., 2011). Bakteri tarafından sentezlenen selüloz ağının mikroorganizmayı UV ışınlarından koruduğu, oksijence zengin ortama temasını sağladığı, düşük su içeriği ve patojen mikroorganizmalar gibi istenmeyen çevresel koşullardan koruduğu bilinmektedir. Okamoto et al. (1994) tarafından aslında bakteriyel selülozun, besinlerin azalması durumunda mikroorganizma için tüketilebilecek bir besin rezervuarı olarak da rol oynadığı öne sürülmüştür (Avcioglu et al., 2021).

Şekil 2.2' de bakterilerden elde edilen selüloz fibrillerinin 3 boyutlu ağı sunulmuştur.



Şekil 2.2. *G. xylinus* tarafından salgılanan 3 boyutlu ağ yapısı (de Oliveira Barud et al., 2016).

Gluconacetobacter xylinus farklı karbon ve azot kaynaklarından nispeten yüksek selüloz üretebilme kapasitesi nedeniyle bakteriyel selüloz biyosentezi ve yapısı üzerine yapılan çalışmalarda model mikroorganizma olarak yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Glikoz, fruktoz, sükroz, mannitol gibi karbon kaynaklarından 25°C ila 30 °C arasındaki sıcaklıklarda ve 3 ila 7 arasındaki pH'da bakteriyel selüloz üretebilmektedir. Belirli azot kaynakları ile selüloz verimi maksimize edilir (Castro et al., 2011). Çeşitli suşların farklı substratlardan elde edilen selüloz verimleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli suşların bakteriyel selüloz verimleri (Lee et al., 2013).

| Mikroorganizma | Karbon kaynağı | İlave | İnkübasyon süresi (saat) | Verim/(g/L) |
|--|----------------|-----------------|--------------------------|-------------|
| <i>A. xylinum</i> BRC 5 | Glikoz | Etanol, oksijen | 50 | 15.30 |
| <i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP) | Glikoz | Oksijen | 48 | 1.72 |
| <i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP) | Glikoz | Etanol | 72 | 2.50 |
| <i>Acetobacter</i> sp. V6 | Glikoz | Etanol | 192 | 4.16 |
| <i>Acetobacter</i> sp. A9 | Glikoz | Etanol | 192 | 15.20 |
| <i>A. xylinum</i> BPR2001 | Melas | Yok | 72 | 7.82 |
| <i>A. xylinum</i> BPR2001 | Fruktoz | Agar oksijen | 72 | 14.10 |
| <i>A. xylinum</i> BPR2001 | Fruktoz | Agar | 56 | 12.00 |

| | | | | |
|--|----------|----------------|-----|-------|
| <i>A. xylinum ssp. sucrofermentans</i> BPR2001 | Fruktoz | Oksijen | 52 | 10.40 |
| <i>A. xylinum ssp. sucrofermentans</i> BPR2001 | Fruktoz | Agar oksijen | 44 | 8.70 |
| <i>A. Xylinum</i> E25 | Glikoz | Yok | 168 | 3.50 |
| <i>G. xylinus</i> K3 | Mannitol | Yeşil çay | 168 | 3.34 |
| <i>G. xylinus</i> IFO 13773 | Glikoz | Lignosülfonat | 168 | 10.10 |
| <i>A. xylinum</i> NUST4.1 | Glikoz | Sodyum aljinat | 120 | 6.00 |
| <i>G. xylinus</i> IFO 13773 | Melas | Yok | 168 | 5.76 |
| <i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5 | Gliserol | Yok | 144 | 5.63 |

2.4. Bakteriyel Selülozun Biyosentezi

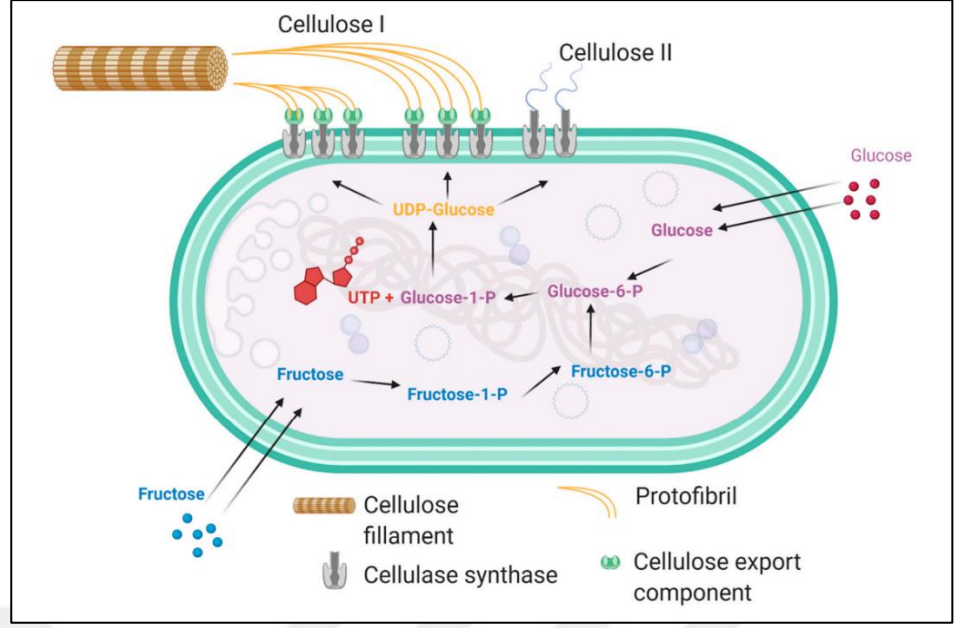
Bakteriyel selülozun biyosentezi, β 1-4-glukan zincirindeki glukoz kalıntılarının polimerizasyonu sonrası zincirlerin hücre dışına salgılanması, hidrojen köprüleri ve Van der Waals kuvvetleri aracılığıyla glukan zincirlerinin hiyerarşik olarak şeritler halinde düzenlenmesi ve kristalleşmesi, mikrofibril adı verilen sert üç boyutlu yapının oluşmasıyla sonuçlanan karmaşık bir süreçten meydana gelmektedir. *G. xylinum*'daki mikrofibrillerin kristalleşme mekanizması 2 selüloz formunun oluşmasını sağlar. Mikrofibrillerin paralel olarak düzenlenmesiyle selüloz I sentezlenirken, antiparalel olarak düzenlenmesinde selüloz II formu elde edilmektedir (Mensah et al., 2022).

G. xylinus'da selüloz üretimi glukoneogenez ile birlikte hücrenin fizyolojik durumuna göre pentoz-fosfat veya Krebs döngüsü gerçekleşir. Pentoz-fosfat döngüsü karbonhidratların oksidasyonunu içerirken, Krebs döngüsü oksalosüksinat ve α -ketoglutarat gibi asetat türevi karbonhidratların, yağ ve proteinlerin oksidasyonunu içerir. Ancak, *G. xylinus* glikozu anaerobik olarak metabolize edemez çünkü glikoliz için gerekli olan fosfofruktoz kinazdan yoksundur (Lustri et al., 2015).

Dış ortamdan sitoplazmaya taşınan glukozun dönüşümü dört enzim katalizli reaksiyon içerir. İlk olarak bir glikoz molekülü glukokinaz tarafından glikoz 6-fosfata (glikoz 6-P) dönüştürülür. Bir glukoz 6-P molekülü fosfoglukomutaz tarafından glukoz 1-fosfata (glukoz 1-P) izomerize edilir. Glukoz 1-P molekülü,

pirofosforilaz tarafından katalize edilen üridin difosfat glukozu (UDP-glukoz) oluşturmak için üridin trifosfat (UTP) ile reaksiyona girer. UDP-glukoz daha sonra selüloz sentaz A tarafından katalize edilerek doğrusal 1,4 glukoz zincirlerine dönüştürülür ve bu zincirler siklik-di GMP tarafından aktive edilir. Hücre içi polimerizasyondan sonra selüloz polimer zincirleri, Van der Waals kuvveti ve hidroksil grupları ile anhidroglukoz birimlerindeki oksijen atomları arasındaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağı tarafından yönlendirilen bir kendi kendine birleşme sürecini takiben bakteriler tarafından hücre zarından dışarı atılır. Bakteriyel selüloz üretiminde disakkaritler gibi diğer karbon kaynakları kullanıldığında glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritlere hidrolize edilirken, fruktoz kullanıldığında bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla fruktoz1-fosfat (fruktoz1-P), fruktoz 6-P ve glukoz 6-P'ye dönüştürülür (Mensah et al., 2022); Swingler et al., 2021; Zhong, 2020). Glikoz ve fruktozdan bakteriyel selüloz I ve II biyosentezinin şematik diyagramı Şekil 2.3'te sunulmuştur.

İlk olarak *Gluconacetobacter xylinum*'da tanımlanan *bcs*ABCD operonu, bakteriyel selüloz biyosentez yolundan sorumlu dört gen içermektedir. *Bcs*ABCD operonunun ilk geni olan *bcsA*, selüloz sentaz enziminin katalitik alt biriminin kodlanmasından sorumlu iken ikinci gen olan *bcsB*, selüloz sentaz üzerinde bulunan ve c-di-GMP'ye bağlanan düzenleyici bir alt birimin üretiminden sorumludur. Bu etkileşim selüloz üretimini tetiklediği için özellikle çok önemlidir. Diğer iki gen olan *bcsC* ve *bcsD* maksimum bakteriyel selüloz üretimini sağlayan hücre yüzeyindeki glukozun taşınması ve paketlenmesinden sorumludur (Mishra et al., 2022, Omadjela et al., 2013).



Şekil 2.3. Glikoz ve fruktozdan bakteriyel selüloz I ve II biyosentezinin şematik diyagramı (Swingler et al., 2021).

2.5. Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri

Bakteriyel selüloz en yaygın statik ve çalkalamalı fermantasyon yöntemleriyle üretilmektedir. Her iki yöntemle üretilen selülozun morfolojileri ve özellikleri birbirinden oldukça farklı olması nedeniyle kullanılacak olan yöntem bakteriyel selülozun nihai uygulamalarının yanında istenilen fiziksel, morfolojik ve mekanik özelliklere göre belirlenmektedir. Statik fermantasyon yönteminde selüloz hava-sıvı ara yüzeyinde jelatinimsi bir pelikül şeklinde oluşurken çalkalamalı fermantasyon yönteminde, şekil ve boyutu uygulanan dönme hızına bağlı olarak düzensiz küçük peletler şeklinde üretilir. İki yöntemle üretilen bakteriler selülozlar farklı morfoloji ve özelliklere sahip olsa da 3 boyutlu ağ yapısını korumaktadır (Azeredo et al., 2019).

Her iki yönteminde avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Statik fermantasyon yöntemi, düşük kesme kuvveti ortamına sahip olan nispeten basit bir teknik olması nedeniyle laboratuvar ölçeğinde selüloz üretimi için en çok tercih edilen yöntemdir. Statik fermantasyonda mikroorganizmalar sürekli yüksek verimde bakteriyel selüloz üretmek için daha yüksek genetik stabiliteye sahiptir. Fakat üretim verimliliği fermantasyon yöntemi tarafından sınırlanabilir. Ortamda

üretileen selüloz membran bakterileri hapsedme eğilimindedir, bu da oksijen tedarikini sınırlar ve besinler sürekli olarak tüketilir, böylece konsantrasyonları zamanla azalır, bu da BS üretimini sınırlar. Çalkalamalı yöntemde oksijenin sürekli olarak ortama karışması sağlanır, böylece selüloz statik kültüre kıyasla daha yüksek verimle üretilir ve bu da maliyetin düşürülmesine katkıda bulunur. Çalkalamalı fermantasyon yöntemi, büyük ölçekli endüstriyel üretime kolayca genişletilebilir olmasına rağmen bu üretim yöntemi bakterilerin selüloz üretmeyen mutantlara dönüşmesine neden olabilmekte ve üretim veriminin azalmasına sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra çalkalamalı yöntemle üretilen selülozun polimerizasyonu ve kristalinitesi statik yöntemle üretilene göre daha azdır. CP/MAS 13C NMR analizi sonucunda çalkalamalı yöntemle üretilen selülozun selüloz I α 'nın oranının, statik yöntemle üretilene göre daha düşük olduğu görülmüştür. Fakat çalkalamalı yöntemde elde edilen selüloz daha yüksek su tutma kapasitesine ve süspansiyon viskozitesine sahiptir. (Krystynowicz et al., 2002; Zhong, 2020; Lahiri et al., 2021).

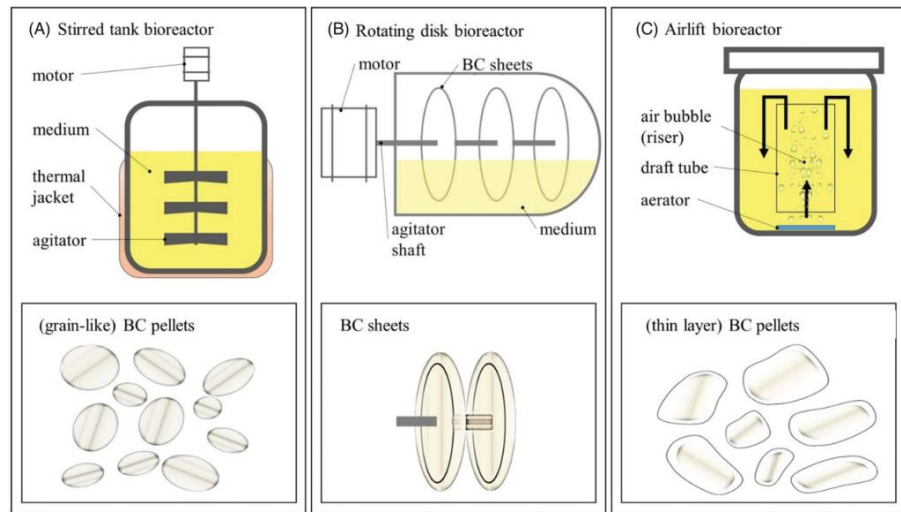
Statik ve çalkalamalı fermantasyon yöntemlerindeki sınırlamaların üstesinden gelmek için özelleştirilmiş biyoreaktörler kullanılmaktadır. Bakteriyel selüloz üretimi için çeşitli biyoreaktörlerin tasarımında odaklanılan temel zorluklar;

- Hava-sıvı arayüzeyini arttırmak,
- Kayma gerilimi nedeniyle selüloz üretmeyen mutantların çalkalamada artması,
- Karıştırmalı kültürler çoğunlukla pelet şeklinde selüloz üretmesi ve nihai selüloz şeklinin düşük mekanik mukavemeti ve kristalliği nedeniyle daha az uygulamaya sahip olması,
- Oksijen transfer oranı olarak sıralanabilir (Blanco Parte et al., 2021).

Bakteriyel selüloz üretiminde fermantasyon için kontrollü parametrelere sahip biyoreaktör sistemleri daha yüksek üretkenlik, düşük üretim maliyeti ve fermantasyon süresini kısaltma gibi avantajlar sunar. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörler oksijen transferi için yüksek hacimsel kütle transfer katsayıları sağlaması nedeniyle bakteriyel selülozun ticari üretiminde ilgi çeken bir reaktör çeşididir. Oksijen ve besin maddelerinin uygun şekilde kanalize edilmesi için bölmelere ve karıştırıcılara sahip olan bu reaktörde, kayma gerilimi sonucu

kristalinite indeksi, Young modülü ve polimerizasyon derecesi statik yöntemle üretilen selüloza kıyasla daha düşük olan lifli formda selüloz üretir. Ancak yüksek hücre yoğunluğuna sahip lifli bakteriyel selüloz miktarının ortamda artması ortamın viskozitenin artmasına ve oksijen transferinin sınırlanmasına neden olur. Bu durum daha yüksek karıştırma gücü gerektirir ve bu da yüksek enerji gereksinimi oluşturur. (Shoda ve Sugano, 2005; Cheng et al., 2009).

Bir diğer yaygın reaktör türü, oksijenin reaktör tabanından fermantasyon ortamına sürekli olarak aktarıldığı ve mikroorganizmanın gelişmesi ve ürün üretmesi için yeterli oksijen sağlayan hava kaldırmalı biyoreaktördür. Karıştırmalı tank tipi reaktörüne göre daha az kayma gerilimi ve fazla enerji verimliliği sağlar. Bununla birlikte, hava kaldırmalı biyoreaktör sistemlerinde daha düşük oksijen transfer hızları elde edilebilmektedir. Klasik biyoreaktör tiplerinde üretilen selülozun reaktörün değişik kısımlarına yapışması, bunun da homojeniteyi azaltması ve pelet şeklinde selüloz üretimi gibi dezavantajlarına çözüm olarak döner diskli reaktörler kullanılabilmektedir. Disklerinin yüzeyinin yarısı besiyerine batırılırken diğer yarısı atmosfere maruz kalacak şekilde tasarlanmıştır. Diskler sürekli olarak döndükçe, disklerin yüzeyi besiyeri ve atmosfer arasında gidip gelir ve disk yüzeyinde bulunan hücreler besiyerine daldırıldıklarında besin alırlar ve ortamdaki oksijeni kullanabilirler. Bu durum statik kültürlerin difüzyon sınırlamalarını azaltır ve bakteriyel selülozun disklere yapışık şekilde üretilmesi sayesinde ortam çalışma sırasında kontrol edilebilir (Wu et al., 2015; Chawla et al., 2009).



Şekil 2.4. Biyoreaktörler ve üretilen bakteriyel selülozların şekilleri A) karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör B) döner disk biyoreaktör C) hava kaldırma biyoreaktör (Blanco Parte et al., 2020).

2.6. BS Sentezine Etki Eden Faktörler

BS verimini arttırmak için çözülmüş oksijen, pH, sıcaklık gibi çeşitli parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Kullanılan kültür koşullarına bağlı olarak üretilen bakteriyel selülozun mikro yapısını belirleyen Kristallik indeksi (CI), kristalit polimorfu, selüloz I α oranları gibi özellikleri etkilenmektedir (Pandit et al., 2021).

Sıcaklık, mikroorganizmanın normal homeostatik fizyolojisini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmanın protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini denatüre olabilirken, düşük sıcaklıklar hücre gelişimi için düşük enerji sağlayarak hücre metabolizmayı yavaşlatabilir. Bu nedenle fermantasyon sıcaklığının kontrolü selüloz verimini için büyük öneme sahiptir. *G. xylinum* büyümesi için gereken optimum sıcaklık 25°C ile 30°C arasındadır (Pa'e et al., 2018). Volova et al. (2018), *K. xylinus* B-12068 şusu için hücre büyümesi ve bakteriyel selüloz üretimi için optimum sıcaklık aralığının 28-30°C olduğunu, fizyolojik sıcaklık aralığının ise 20-37°C olduğunu göstermiştir. Zahan et al. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *A. xylinum* ile 5-40°C arasında farklı sıcaklıklarda denemeler gerçekleştirilmiş olup optimum sıcaklık 28°C olarak belirlenmiştir. 5°C ve 40°C' de bakteriyel selüloz üretimi gözlenmemiştir.

Selüloz üretimine etki eden bir diğer faktör ortamdaki çözülmüş oksijendir. *A. xylinum* oksijen bazlı metabolizmaya sahip zorunlu aerobik bir bakteridir. Bu nedenle enerji elde etmek ve glukozu selüloza dönüştürmek için oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen kaynağı, bakterinin gelişimi ve selüloz üretimi için kısıtlayıcı faktördür. Çok yüksek konsantrasyonda çözülmüş oksijen glukonik asit üretimini desteklerken, çok düşük oksijen konsantrasyonunun mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli oksijenin yokluğundan bakteriyel selüloz üretimi olumsuz etkilenir (Pandit et al., 2021).

Bakteri türüne bağlı olarak hücre üremesi ve bakteriyel selüloz sentezi için optimum pH değeri genellikle 4.0-7.0 arasındadır. Fermantasyon ortamının pH'sı karbon ve azot kaynaklarının tükenmesi sırasında glukonik, asetik ve laktik asit gibi ikincil metabolitlerin birikmesiyle zamanla değişebilmektedir. Bu nedenle selüloz verimi için pH'nın fermantasyon süresince izlenmesi ve kontrolü önerilmektedir (Azeredo et al., 2019).

Fermantasyon sırasında mikroorganizmalar gelişmek için karbon kaynağı, azot kaynağı ve çeşitli eser elementlere ihtiyaç duyar. Bakteriyel selüloz üretimindeki diğer bir kritik faktör fermantasyon ortamının bileşimidir. Çeşitli monosakkarit, oligosakkaritler, alkoller ve asitler gibi farklı karbon kaynakları *G. xylinus* suşları tarafından bakteriyel selüloz verimini artırmak için araştırılmıştır. Örneğin en yüksek selüloz verimi *G. xylinus* ATCC 53524 suşunda sükröz ve gliserol kullanıldığında elde edilirken, *Acetobacter* sp. 4B-2 suşu için sükröz, *G. xylinus* ATCC 10245 için ise en iyi karbon kaynağı gliserol olarak belirlenmiştir (Mikkelsen et al., 2009; Pourramezan et al., 2009; Keshk and Sameshima, 2005). Selüloz sentezinde bir diğer önemli bileşen azot kaynağıdır. Selüloz verimini yükseltmek için kullanılan azot kaynağı bakteri türüne göre değişmektedir. Çoban and Biyik (2011) çalışmalarında en yüksek selüloz üretimini *Acetobacter lovaniensis* HBB5 suşu için maya ekstraktında tespit ederken, Rani ve Appaiah (2011) ise *G. hansenii* UAC09 için mısır maserasyon sıvısı (CSL) en etkili bir azot kaynağı olarak belirlemiştir. Nikotik asit, pridoksin, p-aminobenzoik asit ve biyotin benzeri vitaminler hücrel metabolizma ve büyümenin düzenlenmesinde yine etkili olup selüloz verimi arttırabilmektedir (Lahiri et al., 2021).

2.7. Alt Akım İşlemleri

Fermantasyon sonrası elde edilen bakteriyel selüloz, ortam bileşenleri, bakteri hücreleri ve metabolik yan ürünler gibi bazı safsızlıkları içermektedir. Bu nedenle yüksek saflıkta bakteriyel selüloz eldesi için saflaştırma işlemi gerekmektedir. Üretim sonrası öncelikle selüloz kültür ortamından ayrılır. Statik fermantasyonla üretilen selüloz pelikülü sıvı-hava arayüzeyinden basitçe toplanabilirken, çalkalamalı kültür ile üretilen selüloz filtrasyon ve santrifüj ile ortamdan ayrılabilir. Saflaştırmada en yaygın kullanılan prosedür, 15-20 dakika

boyunca 100 °C'de NaOH/KOH/Na₂CO₃ gibi çözeltilerle alkali işlemdir. Ardında çözülden izole edilen selüloz nötral pH değerine ulaşana kadar saf su ile yıkanır. Saflaştırılmış bakteriyel selüloz oda sıcaklığında, etüvde kurutma, dondurarak kurutma ve süperkritik kurutma gibi farklı yöntemlerle sabit tartıma kadar kurutulabilir. Gerekli saflaştırma seviyesi, uygulamanın türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Tıbbi uygulamalara yönelik saflaştırmalar, gıda ve gıda ambalajı uygulamalarına göre daha titiz bir prosedür gerektirmektedir (Chawla et al., 2009; Azeredo et al., 2019).

2.8. Bakteriyel Selüloz Üretiminde Atıkların Kullanımı

Bakteriyel selülozun sahip olduğu eşsiz özellikler sebebiyle çeşitli alanlarda önemli bir materyal olarak kullanımı uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen yüksek fermantasyon maliyeti, düşük üretkenlik ve pahalı kültür ortamları sebebiyle sanayileştirilmesi ve büyük ölçekte üretimi günümüzde hala en büyük zorluğu oluşturmaktadır. Bu zorluğun ve eksikliğin giderilmesi için bu zamana kadar tarım, gıda, bira ve şeker endüstrileri, tekstil ve kâğıt hamuru fabrikalarından elde edilen atıklar düşük maliyetli substrat olarak bakteriyel selüloz üretiminde değerlendirilmiştir (Hussain et al., 2019). Fermantasyonda kullanılan ortamın maliyeti toplam harcamanın yaklaşık olarak %50-65'ini oluşturmaktadır. Bu nedenle toplam ürün maliyetini düşürmek için daha ucuz olan alternatif üretim ortamlarının kullanımı büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda ciddi küresel çevresel sorunlar, atıkların sürdürülebilir kullanımını arttırmaktadır. Atıkların bakteriyel selüloz üretimi için kullanılması aynı zamanda atık yönetimine ve üretiminde kullanılan ortam maliyetinin düşürülmesine yardımcı olmaktadır (Vazquez et al., 2013; Velasquez-Riano and Bojaca, 2017). Çizelge 2.2'de çeşitli endüstriyel ve tarımsal atıkların farklı *Gluconacetobacter xylinus* suşlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışmalarda üretilen bakteriyel selüloz miktarları sunulmuştur.

Yapılan literatür taraması sonucunda, incir kullanılarak BS üretimi hakkında sadece bir çalışma bulunmaktadır. Abol-Fotouh et al. (2021), *Komagataeibacter saccharivorans* MD1 kullanarak hurma, incir ve şeker kamışı melası substratlarından bakteriyel nanoselüloz üretimi gerçekleştirmiştir. İncir ekstraktı

elde etmek için hidrotermal ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada herhangi bir optimizasyon tekniği kullanmadan melas ortamında 3.9 g/L ile en yüksek BS üretimini elde ederken, hurma ve incir ekstraktlarından sırasıyla 3.1 ve 1.1 g/L olarak elde edilmiştir.

Çizelge 2.2. Çeşitli atıklardan bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilen bazı çalışmalar (Hussain et al., 2019; Urbina et al., 2021).

| Substrat (Atık) | Mikroorganizma | Maksimum BS üretimi | Referans |
|---|---|---------------------|----------------------------|
| Atık duryan kabuğu | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001 | 2.67 g/L | Luo et al., (2017b) |
| Buğday samanının enzimatik hidrolizati | <i>Acetobacter xylinus</i> ATCC 23770 | 8.3 g/L | Chen et al., (2013) |
| Ekstrakte hurma şurubu | <i>Acetobacter xylinum</i> 0416 MARDI | 5.8 g/L | Lotfiman et al., (2016) |
| Portakal kabuğu sıvısı ve portakal kabuğu hidrolizati | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> BCRC 12334 | 3.40 g/L | Kuo et al., (2017) |
| Üzüm küspesi | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> NRRL B-42 | 8.0 g/L | Vazquez et al., (2013) |
| Seyreltik Dip Suyu (Thin stillage) | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> BCRC 12334 | 6.26 g/L | Wu and Liu, (2013) |
| Melas | <i>Acetobacter xylinum</i> BPR2001 | 5.30 g/L | Bae and Shoda, (2005) |
| Keçiboynuzu ve kuru fasulye ortamı | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 700178 | 3.2 g/L | Bilgi et al., (2016) |
| Atık maya biyokütlesi | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001 | 2.9 g/L | Luo et al., (2017a) |
| Pullulan polisakkarit fermantasyonu sonrası atık suyu | <i>Gluconacetobacter xylinum</i> BC- 11 | 1.177 g/L | Zhao et al., (2018) |
| Lipid fermantasyon atık suyu | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001 | 0.659 g/L | Huang et al., (2016) |
| Detoksifiye edilmemiş ham gliserol | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> BNKC19 | 12.31 g/L | Soemphol et al., (2018) |
| Biyodizel endüstrisinden gliserol | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> DSM 46604 | 2.87 g/L | Adnan, (2015) |

| | | | |
|--|--|----------|-----------------------------|
| Tütün atıkları | <i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23767 | 5.2 g/L | Ye et al., (2019) |
| Patates kabuğu | <i>Gluconacetobacter xylinum</i> ATCC 10245 | 2.61 g/L | Abdelraof et al., (2019) |
| Kahve kiraz kabuğu | <i>Gluconacetobacter hansenii</i> UAC09 | 8.2 g/L | Rani and Appaiah (2013) |
| İçki fabrikası atık suyu | <i>Gluconacetobacter oboediens</i> | 8.5 g/L | Jahan et al., (2017) |
| Üzüm posası ve mısır maserasyon sıvısı | <i>Acetobacter xylinum</i> NRRL B-42 | 6.7 g/L | Cerrutti et al., (2016) |
| Şeker kamışı ile karıştırılmış elma posası | <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> ID13488 | 2.5 g/L | Urbina et al., (2017) |
| Mango kabukları | <i>Komagataeibacter xylinus</i> | 6.32 g/L | García-Sánchez et al., 2020 |
| Çürük muz | <i>Komagataeibacter medellinensis</i> NBRC 3288 | 4.81 g/L | Molina-Ramírez et al., 2018 |
| Çürük domates | <i>Gluconacetobacter hansenii</i> PJK KCTC 10505BP | 3.71 g/L | Fatima et al., 2021 |
| Mısır sapı | <i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23,767 | 2.86 g/L | Cheng et al., 2017 |
| Havuç suyu | <i>Gluconacetobacter hansenii</i> ATCC 23,769 | 1.35 g/L | Gündüz and Aşık, 2018 |
| Pamuk esaslı atık tekstiller | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23,770 | 10.8 g/L | Hong et al., 2012 |
| Narenciye kabuğu ve posası | <i>Komagataeibacter xylinus</i> CICC 10,529 | 5.7 g/L | Fan et al., 2016 |
| Şilempe | <i>Komagataeibacter xylinus</i> PTCC 1734 | 7.02 g/L | Barshan et al., 2019 |

2.9. Hurda İncir

Latince ismi (*Ficus carica L.*) olan incir meyvesi tipik olarak Akdeniz kıyılarında yetişen bir meyvedir. İncirin yetişmesi için en uygun iklim ve ekolojik koşullar, Ege Bölgesi'ndeki Büyük ve Küçük Menderes havzalarında bulunmaktadır; bu havzalarda incir üretimi yapılan en önemli ille ise Aydın ve İzmir'dir. Ege Bölgesi'nde incirler kurutularak, diğer bölgelerde ise daha çok taze olarak değerlendirilmektedir (Gençdağ vd., 2019). Güneşte veya fırınlarda

kurutularak üretilen kuru incir, dünya genelinde yaygın olarak üretilen kurutulmuş meyveler arasında yer alır; zengin şeker içeriği (%48 fruktoz ve glukoz), zorunlu aminoasitler, tiyamin, karoten, riboflavin ve farklı mineralleri içermesiyle dikkat çeker. Ayrıca, düşük yağ içeriği incir meyvesinin kurutulmasını kolaylaştırmaktadır (Gençdağ vd., 2019; Slatnar vd., 2011). Kuru incirin bileşimi ve besin değerleri Çizelge 2.3'te sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Kuru incirin bileşimi ve besin değerleri (Anonim, 2020).

| Kuru İncir Besin Değerleri | Adet (20 g) |
|-----------------------------------|--------------------|
| Karbonhidrat (g) | 11,6 |
| Protein (g) | 1,2 |
| Yağ (g) | 0,5 |
| Lif (g) | 1,8 |
| Vitamin A (mg) | 6,4 |
| Vitamin C (mg) | 2 |
| Demir (mg) | 0,5 |

İncirlerin sergilerde bulunan kerevetlerde, güneş altında kurutulması (doğal kurutma) sırasında ortaya çıkan ve hurda olarak tabir edilen endüstriyel incirler ayrılmakta ve kalan sağlam incirler depolara kaldırılarak sınıflama işlemine tabi tutulmaktadır. Hurda incir, taze incirin hasat ve depolama gibi aşamalarda fiziksel hasara uğrayarak taze tüketim özelliğini kaybetmesiyle ortaya çıkan ürün olarak tanımlanmaktadır. Hurda incir sınıfına ayrılan meyveler genel olarak pazar payı olmayan, ekşiyen, akan, rengi koyulaşmış, güneş yanığı oranı fazla ve çatlak meyvelerdir. Besin değerinin yüksek olması sebebiyle özellikle hurda incirler alkol üretiminde, reçel, marmelat ve ezme gibi formülasyonların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Anonim, 2022; Gharibzahedi et al., 2019). Buna bağlı olarak ülkemizde de hurda incirin farklı değerlendirilme yöntemleri Çizelge 2.4.'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Hurda incirin değerlendirilme yöntemlerine göre işletmelerin dağılımı (Avşar ve Yalçın, 2007).

| Hurda İncir Değerlendirilme Yöntemleri | İşletme Sayısı (Adet) |
|--|-----------------------|
| Yerel Pazar | 20 |
| Ezme | 5 |
| Kesme | 3 |
| Reçel ve marmelat | 1 |
| Sirke ve alkol | 1 |

Ege İhracatçı Bilgileri verilerine göre ülkemizde üretilen kuru incirlerin yaklaşık %80'i ihraç edilmekte ve bu ihracatın da yaklaşık %50'si Avrupa Birliği ülkelerine gerçekleştirilmektedir. Yılda yaklaşık 90.000 ton üretim karşılığında 70 bin ton kuru incir ihraç eden ülkemize yılda 250 milyon dolara yakın döviz girdisi sağlandığı belirtilmektedir (Anonim, 2022). Çizelge 2.5'te ülkemizde yıllara bağlı olarak kuru incir üretim miktarları verilmiştir. Çizelge 2.6 'da sezonlar itibari ile Türkiye geneli kuru incir ve hurda incir ihracatı detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.5. Türkiye'de yıllara bağlı kuru incir üretim miktarı (Anonim, 2020).

| Yıllar | Üretim Miktarı (Ton) |
|---------|----------------------|
| 2009/10 | 56.590 |
| 2010/11 | 58.662 |
| 2011/12 | 55.653 |
| 2012/13 | 56.935 |
| 2013/14 | 61.909 |
| 2014/15 | 69.731 |
| 2015/16 | 74.505 |
| 2016/17 | 72.000 |
| 2017/18 | 78.200 |
| 2018/19 | 80.000 |
| 2019/20 | 87.010 |

Çizelge 2.6. Farklı yıllarda Türkiye'de kuru incir ihracatı (Anonim, 2022).

| Bütün Kuru İncir | Ezme Kuru İncir | Hurda/Kavrulmuş/Diğer Kuru İncir | Toplam Kuru İncir |
|------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------|
| | | | |

| Sezon | Miktar (ton) | Tutar (1000\$) | Miktar (ton) | Tutar (1000\$) | Miktar (ton) | Tutar (1000\$) | Miktar (ton) | Tutar (1000\$) |
|---------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| 2014/15 | 42.390 | 153.036 | 6.605 | 9.966 | 502 | 972 | 52.151 | 171.523 |
| 2015/16 | 42.427 | 149.835 | 4.433 | 6.908 | 652 | 1.384 | 50.210 | 165.634 |
| 2016/17 | 49.883 | 205.255 | 7.206 | 10.758 | 686 | 1.515 | 62.637 | 230.505 |
| 2017/18 | 49.812 | 244.556 | 8.466 | 14.190 | 1.453 | 4.307 | 64.742 | 278.154 |
| 2018/19 | 42.966 | 195.845 | 10.127 | 14.900 | 2.017 | 4.381 | 59.978 | 228.783 |
| 2019/20 | 51.537 | 209.120 | 11.678 | 16.680 | 1.363 | 2.806 | 69.706 | 241.796 |
| 2020/21 | 52.540 | 221.097 | 12.946 | 18.379 | 1.280 | 2.605 | 72.038 | 256.563 |
| 2021/22 | 36.501 | 162.248 | 6.398 | 9.028 | 940 | 1.893 | 47.147 | 183.100 |

*02 Nisan 2022 tarihi itibariyle.

2.10. Plackett-Burman Tasarımı

Bakteriyel selüloz araştırmalarında ana hedeflerden biri ekonomik olarak uygun bir üretim gerçekleştirilmesidir. Fermantasyon ortamı ve koşulları ürün konsantrasyonunu, verimini, alt akım işlemlerinde ürün ayırımının kolaylığını ve maliyetini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle bakteriyel selüloz sentezi için ortam bileşenlerinin ve fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu üretim süreci için büyük öneme sahiptir (Hegde et al., 2013).

İstatistiksel temellere dayalı deneysel tasarımların, geleneksel yöntemlere kıyasla daha verimli olduğu kanıtlanmış olup, her seferinde bir faktörün değiştirilirken diğer faktörlerin sabit tutulduğu geleneksel yöntemlerin zaman alıcı, karmaşık, pahalı, faktörler arası etkileşimlerin dikkate alınmaması gibi dezavantajlara sahiptir. Öte yandan istatistiksel deneysel tasarımlar, belirli hedeflere ulaşmak için birçok faktörün aynı anda çalışabildiği sistematik ve etkili deneme planı sunmaktadır. Bu istatistiksel tasarımlar arasındaki Plackett-Burman

2.11. Yanıt Yüzey Metodu (YYM)

1951 yılında Box ve Wilson'ca geliştirilen YYM, istenilen metabolitlerin üretim süreçlerini optimize etmek amacıyla faktöriyel tasarımları kullanmaktadır. YYM, çeşitli bağımsız değişkenlerin etkisinin değerlendirilmesi ve değişkenlerin optimum değerlerinin belirlenmesi için model oluşturmaya yönelik güçlü ve etkili matematiksel yaklaşımdır. Biyokimyasal ve biyoteknolojik süreçlerde YYM, fermantasyon değişkenlerini optimize etmek ve modellemek için başarıyla kullanılmış olup, son zamanlarda bu yöntemin kullanımını kolaylaştıran Design Expert ve Minitab gibi çeşitli yazılımlar sayesinde, farklı mikrobiyal ürünlerin optimizasyonunda kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca yeni ürünlerin tasarımı, geliştirilmesi ve formüle edilmesinin yanı sıra mevcut ürün tasarımlarının iyileştirilmesinde de önemli uygulamalara sahiptir (Nassiri Mahallati, 2020; Breig and Luti, 2011).

YYM'unda modeller, faktörler (bağımsız değişkenler) ve cevap (bağımlı değişkenler) arasındaki bağlantıyı açıklayan deneysel tasarımdaki verilere bağlı olarak oluşturulur. YYM'nun optimizasyon için kullanılması birkaç aşamayı içerir. Deneysel tasarımda optimizasyon deneyi tasarlanmadan önce etkili olan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri belirlenir. Faktörlerin seviyeleri model doğruluğu üzerindeki etkisi nedeniyle önemlidir. Optimizasyon deneyleri genellikle Box-Behnken tasarımı (BBD), merkez kompozit tasarım (CCD) ve fraksiyonel faktöriyel tasarım (FFD) gibi deneysel tasarımlarla araştırılmaktadır. Bu tasarımlar arasındaki fark deneysel noktaların seçimine ve deney sayısına bağlıdır. Bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki matematiksel ilişki bir model denklemi kurularak belirlenmektedir. Birinci dereceden polinomial denklemler genellikle yetersiz kalmaktadır. Yanıt yüzeyi metodolojisi için, merkezi bir bileşik tasarım veya Box-Behnken tasarımından elde edilen deneysel sonuçlara dayalı olarak çeşitli faktörlerin bir yanıt üzerindeki etkilerini tanımlamak için genellikle aşağıda verilen ikinci dereceden bir polinom modeli (Denklem (1)) önerilir (Wang and Wan, 2009; Huerta-Ochoa et al., 2018).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Burada y tahimini cevap, β_0 sabit katsayı, x_i ve x_j bağımsız değişkenleri, β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla doğrusal, kuadratik ve interaksiyon etkileşim katsayılarıdır. Modelin yeterliliğinin kontrolünde regresyon katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının (R^2_{adj}) belirlenmesi için, tahmini kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) ve model uyumsuzluğu (lack of fit) testi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Breig and Luti, 2011).

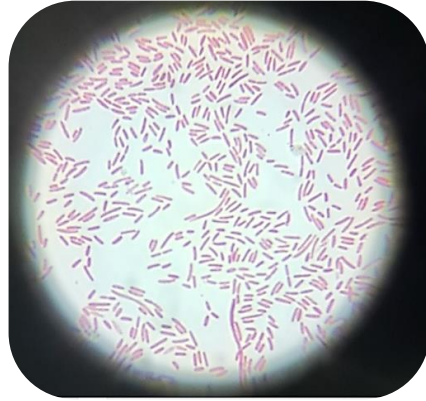


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Mikroorganizma

BS üretimi için kullanılan *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 (bu bakterinin ismi *Komagataeibacter xylinus* olarak değiştirilmiştir ancak çoğu yeni literatürde bile eski ismi kullanıldığı için, tez çalışmasında da eski ismi verilmiştir) bakterisi, E.Ü., Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ'den temin edilmiştir. Söz konusu suş 20 g/L glukoz, 5 g/L maya ekstraktı, 5 g/L pepton, 1.15 g/L sitrik asit ve 2.7 g/L Na₂HPO₄ (pH 5.0) içeren ve bakteriyel selüloz üretiminde en yaygın kullanılan standart Hestrin ve Schramm (HS) ortamında çoğaltılmıştır (Hestrin ve Schramm, 1954). 48 saat boyunca 30°C'ye dereceye ayarlanmış inkübatörde (Nüve, EN 400, Türkiye) statik olarak geliştirilen kültür her 4 haftada bir Hestrin ve Schramm besiyeri kullanılarak tazelenip, 4°C'de muhafaza edilmiştir. İnokulum kültüründeki hücre sayısı $6,50 \times 10^6$ cfu/mL'dir (Mikkelsen et al. 2009). Şekil 3.1'de *G. xylinus*'un gram boyama sonrası 100× büyütülmüş mikroskop görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.1. *G. xylinus*'un gram boyama sonrası 100× büyütülmüş mikroskop görüntüsü.

3.1.2. Substrat

Çalışmada substrat olarak kullanılan hurda incir Işık Tarım A.Ş.-İzmir tarafından tedarik edilmiş ve bileşimi, 70.42 ± 1.26 suda çözüner kuru madde (briks), 0.6 ± 0.03 su aktivitesi (aw), 15.8 ± 1.05 nem içeriği (%), 3.4 ± 0.4 protein miktarı (%), 2.6 ± 0.4 kül miktarı (%) olarak tedarikçi firma tarafından beyan edilmiştir. Hurda incirler ekstraksiyon işlemine kadar $+4$ °C sıcaklıkta, buzdolabında bozulmadan muhafaza edilmiştir. Hurda incirlerin UV ışık altındaki görüntülerinden de (Şekil 3.2) görülebileceği üzere incirler UV ışık altında mavi floresans renk vermemekte ve dolayısıyla aflatoksin içermemektedir.



Şekil 3.2. Firmadan temin edilen hurda incirlerin UV ışık altındaki görüntüleri

3.1.3. Enzim

Yapılan ekstraksiyon denemelerinde 40 g/L başlangıç şeker konsantrasyonundan itibaren, özellikle pH değerinin 6.5'a ayarlanmasıyla bir jelleşme görülmüştür. Bunun sebebinin incir meyvesindeki pektin gibi polimerik maddeler olduğu düşünülmüştür. Bu jelleşmenin engellenmesi ve homojen bir ekstrakt elde etmek amacıyla pektinaz ve selüloz aktiviteleri içeren ticari bir enzim preparatı olan Rapidase FC (DSM Food Specialties B.V., Hollanda) enzimi kullanılmıştır. Bu enzim *Aspergillus niger* pektinazları ve *Trichoderma longibrachiatum* selüloolitik aktivitelerinin sıvı bir karışımı olup, optimum sıcaklığı $45-55$ °C ve optimum pH'sı 4.0-5.0 aralığındadır. 1 litre incir ekstraktına 0.2 mL Rapidase FC ticari enzimi (tedarikçi tarafından beyan edildiği gibi 150-200 g/ton) eklenmiş ve 45 °C/1 saat inkübe edilmiştir.

3.1.4. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, Ek 1' de listelenmiştir.

3.1.5. Ekipmanlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, Ek 2' de verilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı

Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan hurda incirin, mikroorganizma tarafından kullanılabilir hale getirilmesi için ekstraksiyon işlemi gerekmektedir. Bu amaçla 50 gram hurda incir, 80°C'ye ısıtılmış 250 mL saf su ile yüksek devirli bir parçalayıcı kullanılarak 1 dakika düşük devir, 3 dakika yüksek devirde parçalanmıştır. 30 dakika beklemenin ardından karışım süzme bezi ile süzölmüş, kalan sıvı kısım 15 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen hurda incir ekstraktı görüntüsü Şekil 3.3'te sunulmuştur. Ardından elde edilen üst faz 20 g/L glikoz içerecek şekilde uygun oranlarda saf su ile seyreltilerek fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Aksi bildirilmediği sürece bütün fermantasyon denemelerinde 20 g/L glikoz oranı korunmuştur. Denemelerde, 250 mL'lik erlenmayerler içerisinde 100 mL fermantasyon ortamı hazırlanmış ve otoklavda sterilizasyon işlemi (121°C/15 dakika) sonrası aşılama için hazır hale getirilmiştir. Ekim işleminin %2 (v/v) oranın gerçekleştirilmesinin ardından, 30°C'de bir hafta statik olarak inkübasyon işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.3. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan hurda incir ekstraktı.

3.2.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında karbon kaynağı olarak hurda incir ekstraktının kullanıldığı Plackett-Burman tasarımıyla (Minitab Statistical Software (Release 13.20), Hestrin ve Schramm besiyeri bileşenlerinden (glikoz hariç) bakteriyel selüloz üretimi için önemli olanların tespiti gerçekleştirilmiştir. İki seviyeli bir tasarım olan Plackett-Burman tasarımında kullanılacak Hestrin ve Schramm besiyeri bileşenlerinin düşük (-) ve yüksek (+) seviyeleri yapılan diğer çalışmalardaki değerlere göre belirlenmiş ve Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Bu istatistiksel deneme için yüksek seviyeler orjinal Hestrin ve Schramm ortamındaki konsantrasyonlar olarak seçilmiş olup, düşük seviyeler ise, yüksek seviyelerin 1/10 oranına denk gelecek şekilde seçilmiştir. Şekil 3.4.'de de gösterilen 8 farklı fermantasyon ortamı (pH 5) ile fermentasyon deneyleri (30°C/7 gün) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Plackett-Burman tasarımında denenen besiyeri bileşenlerinin düşük (-) ve yüksek (+) seviyeleri

| Bileşen | Düşük seviye (g/L) (-) | Yüksek seviye (g/L) (+) |
|------------------|---------------------------|----------------------------|
| A-Maya ekstraktı | 0.5 | 5.0 |
| B-Pepton | 0.5 | 5.0 |
| C-Sitrik Asit | 0.115 | 1.15 |



Şekil 3.4. Plackett-Burman deneme desenine göre hazırlanan fermantasyon ortamları

3.2.3. Fermantasyon ve Üretim Parametreleri

Çeşitli parametrelerin bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen üretim parametreleri Çizelge 3.2’de sunulduğu gibi sırasıyla maya ekstraktı (3, 5, 7, 10, 13, 15 g/L), inokülasyon oranı (%1, 2, 3, 4 (v/v)), pH (4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0), substrat konsantrasyonu (20, 40, 60, 80 g/L) ve inkübasyon sıcaklığıdır (25, 30, 35 °C). Fermantasyon denemeleri statik kültür yöntemi ile 100 ml.’lik fermantasyon ortamlarında (30°C/7 gün) yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Bakteriyel selüloz üretiminde etkileri incelenen parametreler ve değer aralıkları.

| Parametreler | Değerler |
|---|-------------------------|
| Maya ekstraktı (g/L) | 3, 5, 7, 10, 13, 15 |
| İnokülasyon oranı % (v/v) | 1, 2, 3, 4 |
| pH | 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 |
| Başlangıç substrat konsantrasyonu (g/L) | 20, 40, 60, 80 |
| İnkübasyon sıcaklığı (°C) | 25, 30, 35 |

İlk olarak Plackett-Burman deneylerinden elde edilen sonuçlara göre bakteriyel selüloz üretiminde istatistiksel önemi belirlenen, azot kaynağı olarak eklenen maya ekstraktı konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Hurda incir ekstraktının %2 glukoz olacak şekilde seyreltilmesi ile hazırlanan fermantasyon

ortamlarına maya ekstraktı 3, 5, 7, 10, 13, 15 g/L oranlarında eklenmiş, 30°C’de, %2 inokülasyon oranında, pH değeri 5 olacak şekilde üretim denemeleri gerçekleştirilmiş ve en yüksek üretiminin olduğu maya ekstraktı konsantrasyonu tespit edilmiştir.

Selüloz üretimi için maya ekstraktının optimum konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından inokülasyon oranının üretime etkisini incelemek amacıyla farklı aşı oranlarında (%1, 2, 3, 4 (v/v)) denemeler gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel selüloz üretiminde başlangıç ortam pH’sının etkisini incelemek için farklı pH değerlerinde (4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0) denemeler yapılmıştır.

Başlangıç substrat konsantrasyonunun bakteriyel selüloz üretimine etkisinin belirlenmesi için 20, 40, 60 ve 80 g/L substrat (hurda incir ekstraktı) içeren fermantasyon ortamlarına 10 g/L maya ekstraktı ilave edilerek fermantasyon ortamları hazırlanmıştır. Hurda incir ortamında yüksek pH’larda jelleşmesi sebebiyle ortama Rapidase FC (*Aspergillus niger* ve *Trichoderma longibrachiatum*, optimum pH 4.0-5.0, optimum sıcaklık 10-55 °C) eklenmiştir ve geri kalan optimizasyon denemelerinde enzim eklenerek devam edilmiştir. Hurda incir ekstraktı (pH 4-5) enzim ile 45°C’de 1 saat muamele edildikten sonra fermantasyon ortamları hazırlanmasında kullanılmıştır.

Önceki denemelerde belirlenen optimum koşullarda bakteriyel selüloz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisini incelemek için 25°C, 30°C ve 35°C’de denemeler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Yanıt Yüzey Metodu (YYM)

Maksimum bakteriyel selüloz üretimi amacıyla başlangıç substrat konsantrasyonu, pH, ve sıcaklık faktörlerinin optimum seviyeleri YYM kullanılarak belirlenmiştir. Plackett-Burman tasarımı sonucunda istatistiksel öneme sahip olduğu tespit edilen maya ekstraktının selüloz üretimi üzerine etkisi, ikinci dereceden bir polinomiyal fonksiyon ile açıklanamayacağı için optimizasyon deneylerine dahil edilmemiştir. Maya ekstraktının parametre olarak alındığı bir

istatistiksel optimizasyon denemesinde, model uyumsuzluğu istatistiksel olarak önemli çıkacak ve model kullanılamayacaktır. Çizelge 3.3.'de optimizasyonu yapılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin ön denemelerle belirlenen seviyeleri verilmiştir. Çalışmada, yüzey merkezli istatistiksel tasarım tarafından verilen 20 deneme gerçekleştirilmiş olup, bu denemelerin 6 tanesi merkez noktada gerçekleştirilen tekrar denemeleridir. Kullanılan seviyeler -1, 0 ve +1 olarak sembolize edilmiştir, 0 merkez noktasıdır. Her faktöre ait merkez noktasındaki gerçek seviye değeri Denklem 2'ye göre belirlenmiştir.

$$Kodlanmış\ değer = \frac{Gerçek\ seviye - (yüksek\ seviye + düşük\ seviye) / 2}{(yüksek\ seviye - düşük\ seviye) / 2} \quad (2)$$

Proses değişkenlerinin bakteriyel selüloz üretimine etkisini belirlemek için kullanılan ikinci derece polinomial denklem $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_{12} + \beta_{22}X_{22} + \beta_{33}X_{32} + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$ şeklinde olup, bu denklemde bulunan $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{23}$ regresyon katsayılarını, X_1, X_2, X_3 bağımsız değişkenleri ifade etmektedir.

Elde edilen bu modelin, deneysel verilere olan uyumu varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. YYM ile bulunan modelin uygulanıp uygulanamayacağı uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz olması ile ($P > 0.05$) ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun önemli olması ($P < 0.05$) ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.3'te optimizasyon denemelerinde kullanılan başlangıç substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık seviyeleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. YYM'de kullanılan parametreler ve seviyeleri.

| Faktörler | Bağımsız değişkenler | Seviyeler | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| X_1 | Substrat konsantrasyonu (g/L) | 40 | 60 | 80 |
| X_2 | pH | 5.5 | 6.5 | 7.5 |
| X_3 | Sıcaklık (°C) | 25 | 30 | 35 |

3.2.5. Analitik Yöntemler

3.2.5.1. Substrat analizleri

Hurda incirden elde edilen ekstraktın özelliklerinin belirlenmesi için, toplam şeker ve protein yapılmıştır. Protein tayini, Tecator Digestion System 6 1007 Digestor ve Kjeltac System 1002 Distilling Unit cihazları ile (Kjeldahl yöntemi) yapılmıştır (Kjeldahl, 1883).

3.2.5.2.1. Toplam şeker tayini

Hurda incir ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen sıvı ekstrakta uygun oranlarda seyreltme yapıldıktan sonra Fenol-Sülfirik Asit yöntemi (Dubois et al., 1956) kullanılarak şeker tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanıp, standart bir grafik oluşturulmuştur. Elde edilen bu grafik yardımıyla örnekteki toplam şeker miktarı sakkaroz cinsinden belirlenmiştir. Tüm okuma işlemleri spektrofotometre (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis) kullanılarak 490 nm. dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1.2 HPLC Yöntemi ile Toplam Şeker ve Karbon Profilinin Belirlenmesi

Hurda incir ekstraktı numunelerinin toplam şeker ve karbon profilinin belirlenmesinde, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı SGS İstanbul Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. HPLC 1200 Infinity Series- RID Dedektör ile AOAC 977.20 analiz metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazda, Inertsil NH₂, 5 µm, 4,6x250mm (UP) kolon kullanılmıştır.

3.2.5.2. İndirgen Şeker Tayini

Bakteriyel selüloz üretim kinetiği aşamasında, fermantasyon sonunda ortamındaki indirgen şeker (glikoz) miktarının belirlenmesi için, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemine (Miller, 1959) göre 0.09, 0.18, 0.27, 0.36 mg/mL glikoz içeren

standart çözeltiler hazırlanmış ve 540 nm’de spektrofotometrik olarak (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis) absorbans değerleri okunmuş, standart grafik yardımıyla örnekteki indirgen şeker konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.5.3. Bakteriyel Selüloz Tayini

Fermentasyon sonrası bakteriyel selüloz miktarını tayin etmek öncelikle üretilen selüloz hava-sıvı arayüzeyinden toplanıp ve musluk suyu ile yıkanmıştır. Ardından %2’lik NaOH çözeltisi içinde 2 saat kaynatıldıktan yıkanıp ve tekrar %2’lik NaOH çözeltisinin içinde 30 °C’de 2 gün bekletilmiştir. Yıkanan bakteriyel selülozlar sabit tartıma kadar 60°C’de etüvde kurutulup ve üretim miktarı belirlenmiştir.

3.2.5.4. pH

Örneklerin pH değerleri WTW Series pH 720 marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5.5. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Optimum şartlarda elde edilen bakteriyel selüloz örneğine uygulanan saflaştırma yönteminin etkinliğinin incelenmesi amacıyla SDS- poliakrilamid jel elektrofrez gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sonrası elde edilen selülozdan saflaştırma öncesi ve sonrası örnek alınmış olup bu örnekler 1 gün tamponla (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl) karıştırıldıktan sonra üst fazlar yükleme boyasıyla 95°C’de 10 dk kaynatılarak kuyulara yüklenmiştir. Elektrofrezde %12’luk ayırma jeli ile %5’lik toplama jeli kullanılmıştır. 20 µl örneğin jele yüklenmesinin ardından, önce 80 voltta 10 dk, sonrasında 120 voltta 80 dk elektrik alan altında yürütülmüştür. Markör (belirteç, cetvel) olarak Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder kullanılmıştır. Elektrofrez sonrası jel, Coomassie-Brilliant ile boyanmış ve görüntülenmiştir.

3.2.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Saflaştırılmış ve kurutulmuş bakteriyel selüloz örneklerinin morfolojik özellikleri, 7.50 kV hızlandırılmış voltajda taramalı elektron mikroskobu (Thermo Scientific Apreo S, USA) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler iletkenliği artırmak için 7 nm altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Analiz, Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi Analizi

Optimum koşullarda elde edilen kurutulmuş bakteriyel selüloz örneğinin kızıl ötesi spektrumları, Zayıflatılmış Toplam Yansıma (ATR)- FTIR cihazı (Perkin Elmer Spectrum Two, ABD) kullanılarak 600-4000 cm^{-1} dalga boyunda 4 cm^{-1} çözünürlükte ölçülmüştür. Analiz, Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.8. X-Işını Kırınım (XRD) Analizi

Saflaştırılmış ve kurutulmuş bakteriyel selüloz örneklerinin XRD analizleri, Ultima IV model Rigaku marka X-ışını difraktometresi ve Cu K α radyasyonu ($\lambda = 1.542 \text{ nm}$) kullanılarak 10°-45° (2 θ) tarama aralığında gerçekleştirilmiştir. Analiz, Ege Üniversitesi Güneş Enerjisi Enstitüsü'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.9. İstatistiksel Değerlendirme

Denemelerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS programı (SPSS Inc., SPSS Statistics 25.0, Chicago, ABD) kullanılarak Duncan Testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Substrat Analizleri

Çalışmada substrat olarak kullanılan hurda incir ekstraktının bileşimi Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hurda incir ekstraktı kompozisyonu ve kullanılan yöntemler.

| Bileşen | Miktar | Analiz Metodu |
|---|-----------|------------------------------|
| Toplam şeker (%) | 9.36±0.01 | Fenol- Sülfirik asit yöntemi |
| Toplam Şeker ve Karbon Profili (g/100g) | | HPLC (AOAC 977.20) |
| • Toplam Şeker | 8.63 | |
| • Fruktoz | 4.33 | |
| • Glukoz | 4.30 | |
| Protein (%) | 4.13±0.49 | Kjeldahl yöntemi (6.25) |

4.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi

Plackett-Burman tasarımıyla, karbon kaynağı olarak hurda incirin kullanıldığı fermantasyon ortamına eklenen Hestrin ve Schramm besiyeri bileşenlerinden (Çizelge 4.3.) bakteriyel selüloz üretimi için istatistiksel öneme sahip olanların tespiti gerçekleştirilmiştir. İncelenen besiyeri bileşenlerinin düşük (-) ve yüksek (+) seviyelerinin programa girilmesiyle elde edilen PB deneme deseni ve bu deneme desenine göre gerçekleştirilen üretim sonuçları Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Hurda incir ile hazırlanan fermantasyon ortamında yapılan PB deneme deseni ve fermantasyon sonucu üretilen bakteriyel selüloz miktarları

| Deneme | Maya Ekstraktı | Pepton | Sitrik Asit | Na ₂ HPO ₄ | Bakteriyel Selüloz Miktarı (g/L) |
|--------|----------------|--------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | - | - | + | - | 0.64 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|------|
| 2 | - | - | - | - | 0.42 |
| 3 | + | + | - | - | 2.45 |
| 4 | + | - | + | + | 2.15 |
| 5 | + | - | - | + | 2.38 |
| 6 | - | + | - | + | 1.1 |
| 7 | - | + | + | + | 1.17 |
| 8 | + | + | + | - | 2.17 |

Yukarıda verilen bakteriyel selüloz miktarları incelendiğinde en yüksek üretim miktarının 3 numaralı besiyerinde (2.45 g/L), en düşük üretim miktarının ise 2 numaralı besiyerinde (0.42 g/L) olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Bakteriyel selüloz üretimi için tahmini etki değerleri ve katsayılar

| Faktör | Etki | Katsayı | Sh kat * | T | P |
|----------------------------------|----------|----------|----------|-------|---------|
| Sabit | | 3.76000 | 0.05995 | 62.72 | 0.000 |
| Maya ekstraktı | 1.45500 | 0.72750 | 0.05995 | 12.14 | 0.001** |
| Pepton | 0.32500 | 0.16250 | 0.05995 | 2.71 | 0.073 |
| Sitrik asit | -0.05500 | -0.02750 | 0.05995 | -0.46 | 0.678 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.28000 | 0.14000 | 0.05995 | 2.34 | 0.102 |

*Sh kat, standart katsayıları

Bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisi incelenen 4 besiyeri bileşenin her birinin önem seviyesinin ölçülmesi için varyans analiz (ANOVA) tablosu incelenmiştir. Çizelge 4.4.' de her bir bileşenin bakteriyel selüloz üretimi için program tarafından hesaplanan etki değerleri ve katsayıları verilmiştir. Katsayılar incelendiğinde sitrik asit bileşenin bakteriyel selüloz üretiminde negatif etkiye sahip olduğu, diğer 3 bileşenin pozitif etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bileşenlerin istatistiksel olarak önemi p değerine göre belirlenmektedir ve p değerinin 0.05'ten küçük olması ($P > 0.05$) bileşenin proses üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Çizelge 4.3' de verilen sonuçlara göre sitrik asit, pepton ve Na₂HPO₄ için hesaplanan P değerinin 0.05'den büyük olması, bu besin maddelerinin bakteriyel selüloz üretiminde istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Bu sebeple üretime herhangi anlamlı bir etkisi olmayan bu bileşenler fermantasyon ortamından maliyeti azaltmak amacı ile çıkarılmıştır. P değerlerinin 0.05'ten küçük olduğu besiyeri bileşenlerinden maya

ekstraktının bakteriyel selüloz üretiminde istatistiksel olarak önemli bir bileşen olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Bakteriyel selüloz için varyans analizi ($R-Sq = 98,2\%$ $R-Sq(adj) = 95,7\%$, $p < 0.05$)

| Kaynak | SD ^a | KT ^b | Düz. KT ^c | Düz. KO ^d | F | P |
|--------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------------|-------|---------|
| Ana etkenler | 4 | 4.60815 | 4.60815 | 1.15204 | 40.07 | 0.006** |
| Artık hata | 3 | 0.08625 | 0.08625 | 0.02875 | | |
| Toplam | 7 | 4.69440 | | | | |

^a Serbestlik derecesi, ^b Kareler toplamı, ^c Düzeltilmiş kareler toplamı, ^d Düzeltilmiş kareler ortalaması

Çizelge 4.4' de verilen ANOVA sonucuna göre p değeri ($p=0.006 < 0.05$), %5 güven aralığındadır. Bu nedenle elde edilen modelin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna varılır.

Bilgi et al. (2016), keçiyoynuzu ve kuru fasulye kullanarak selüloz sentezinde önemli faktörleri değerlendirmek için PB tasarımını kullanmış ve protein konsantrasyonu, fermantasyon süresi ve inokulum oranının bakteriyel selüloz üretiminde önemli parametreler olduğunu belirlemişlerdir. Zeng et al. (2011), substrat olarak akçaağaç şurubu kullanarak BS üretiminde kültür koşullarını istatistiksel olarak optimize etmişlerdir. Plackett-Burman tasarımını kullanarak, fermantasyon süresi, akçaağaç şurubu konsantrasyonu, çalkalama hızı ve inokulum boyutunun BS üretimi üzerinde önemli etkileri olduğunu bulmuşlardır.

Hedge et al. (2013), Plackett-Burman tasarımını sonucunda HS bileşenlerinden karbon kaynağı glikoz ve azot kaynakları pepton ve maya ekstraktının bakteriyel selüloz üretimde öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada elde edilen sonuçlara göre azot kaynakları karşılaştırıldığında, *Gluconacetobacter persimmonis* tarafından gerçekleştirilen selüloz üretimi için en iyi azot kaynağının maya ekstraktı olarak bulunmuş ve içeriğindeki bol miktardaki nitrojen bileşenleri ve büyüme faktörlerinin selüloz üretimini uyardığı sonucuna varılmıştır.

Calderón-Toledo et al. (2021), PB tasarımıyla *Komagataeibacter rhaeticus* SU12 suşunun kullanıldığı selüloz üretimde inkübasyon süresi, maya ekstraktı, etanol ve atık mango ekstraktı konsantrasyonlarının istatistiksel olarak önemli

olduğunu tespit etmişlerdir. Saleh et al. (2020), yaptıkları çalışmada PB tasarımı sonucu *K. hansenii* AS.5 ile gerçekleştirilen selüloz üretiminde öneme sahip faktörleri MgSO₄, etanol, pH ve maya ekstraktı olarak belirlemişlerdir.

Tez çalışmasında, HS besiyeri besin maddeleri bakteriyel selüloz üretimi için taranmış olup bakteriyel selüloz üretiminde tek önemli faktör maya ekstraktı olarak bulunmuştur. Yapılan literatür çalışması neticesinde, maya ekstraktının içeriğindeki bol miktardaki nitrojen bileşenleri ve proteinlerin bakteri hücrelerinin %8-14'ünü oluşturması gibi nedenler azot kaynaklarının *G. xylinus*'un büyümesinde, dolayısıyla selüloz üretiminde önemli olmasını desteklemektedir.

4.3. Maya Ekstraktı Konsantrasyonunun Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi

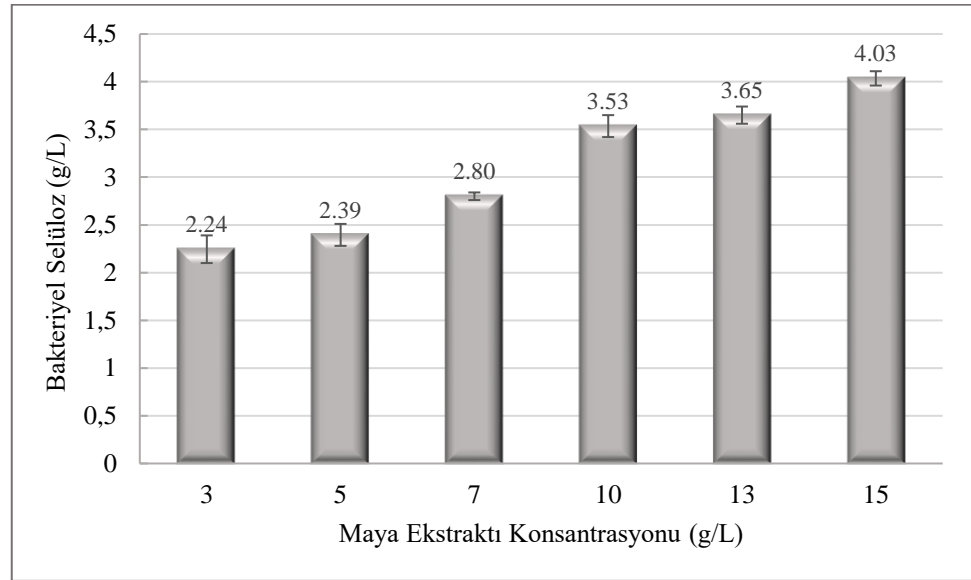
Azot protein moleküllerinin yapısal bileşenidir ve birçok bakteri türü için hücre gelişimi ve selüloz biyosentezinde çok önemlidir (Chawla et al., 2009). Plackett-Burman tasarımı sonucunda bakteriyel selüloz üretiminde istatistiksel olarak önemli tek bileşen maya ekstraktı olarak tespit edilmiştir. Maya ekstraktı konsantrasyonunun bakteriyel selüloz üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (3-15 g/L) maya ekstraktı içeren fermantasyon ortamlarında denemeler gerçekleştirilmiştir. Maya ekstraktları, hurda incir ekstraktının 20 g/L olacak şekilde seyreltilmesi ile hazırlanan fermantasyon ortamlarına uygun oranlarda eklenmiş ve pH 5.0 değerine ayarlanmasının ardından 30°C'de 7 gün statik olarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.1'de de görüldüğü üzere, maya ekstraktı konsantrasyonu *G. xylinus* ATCC 700178'in BS üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bakteriyel selüloz üretimi en yüksek 15 g/L maya konsantrasyonunda, 4.03 g/L olarak elde edilmesine rağmen 10 g/L, 13 g/L ve 15 g/L konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple ekonomik ve işlemin uygulanabilirliği açısından fermantasyon denemelerinde 10 g/L konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir ve sonraki denemelerde bu konsantrasyon üzerinden devam edilmiştir.

Son et al. (2001), çeşitli nitrojen kaynaklarının bakteriyel selüloz üretimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada mısır maserasyon sıvısı (CSL), polipepton ve maya ekstraktı eklenen ortamlarda, diğer azot kaynaklarına kıyasla çok daha yüksek üretim gözlemlenmiş olup, maya ekstraktını (2,87 g/L) *Acetobacter* sp. A9 için en uygun azot kaynağı olarak belirlemiştir.

Carreira et al. (2011), tarımsal ormancılık endüstrilerinde elde edilen çeşitli atıkları bakteriyel selüloz üretiminde değerlendirmişler. Substrat olarak ham gliserol kullanıldığında, en yüksek iyileşme kültür ortamına maya ekstraktı+ KH_2PO_4 karışımı eklendiğinde gözlemlenmiştir.

Bekatorou et al. (2019), frenk üzümü atığı ekstraktına nitrojen kaynağının (pepton ve maya ekstraktı) eklenmesinin bakteriyel selüloz verimini iki katına çıkardığını bildirmişler. Kurosumi et al. (2009) portakal ananas gibi çeşitli meyve sularına pepton ve maya ekstraktı eklemiştir. Bahsedilen nitrojen kaynaklarının eklenmesiyle bakteriyel selüloz üretiminde artış gözlemlenmiştir. Literatürdeki bulgularla tutarlı olarak sonuçlar, maya ekstraktının *K. xylinus* ATCC 700178 tarafından bakteriyel selüloz sentezini desteklediğini kanıtlar niteliktedir.

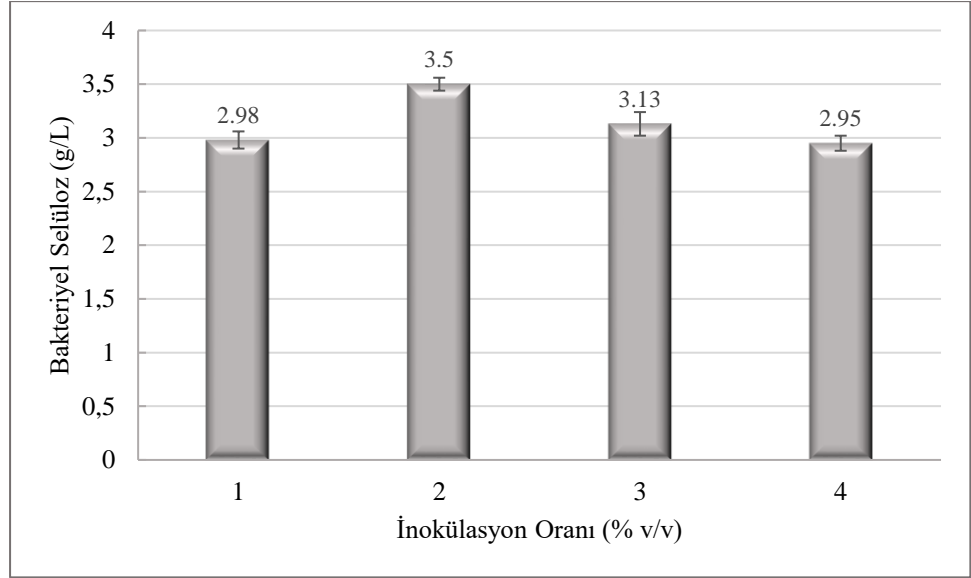


Şekil 4.1. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi (Fermantasyon koşulları: 30°C, pH 5.0, 20 g/L glukoz, %2 inokülasyon oranı, 7 gün)

4.4. İnokülasyon Oranının Bakteriyel Selüloz Sentezine Etkisi

Bakteriyel selüloz üretimine inokülasyon oranının etkisini incelemek amacıyla 20 g/L glukoz, 10 g/L maya ekstraktı içeren fermantasyon ortamlarına %1, 2, 3 ve 4 (v/v) oranlarında ekim yapılmış ve 30°C'de 7 gün statik kültür yöntemi ile BS üretimleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2.'den de görülebileceği gibi en yüksek bakteriyel selüloz miktarı (3.5 g/L) %2 (v/v) inokülasyon oranında elde edilmiştir. %2'den düşük ve yüksek inokülasyon oranlarında bakteriyel selüloz üretiminde azalma gözlenmiştir. Fermantasyon ortamına fazla inokülüm aşılması besin maddelerinin kullanımında bakteriler arasında rekabete yol açtığı ve bu nedenle bakteriyel büyüme ve bakteriyel selüloz üretiminin olumsuz etkilendiği düşünülmektedir. İnokulum oranının belirli bir düzeyin altında olması durumunda da fermantasyon ortamında selüloz sentezleyen bakteri hücrelerinin sayısı sebebiyle fermantasyonun etkinliği düşebilmektedir (Rahman et al., 2021).

Ramgaswamy et al. (2015), *Gluconacetobacter* sp. RV28 suşunu kullanarak %1-10 (v/v) arasında değişen aşı oranlarının bakteriyel selüloz üretimine etkisini incelemişler ve %5 aşı oranı değerinin üstünde ve altın üretimin düştüğünü belirtmişlerdir. Alemam et al. (2021), *K. xylinus* SB3.1'in aşı oranının etkisini incelemek amacıyla %1 ile %12 arasında değişen oranlarda üretim gerçekleştirmişler ve 3.1 g/L verim elde ile optimum aşı oranını %8 olarak belirlemişlerdir. Rahman et al. (2021), immobilize *Gluconacetobacter kombuchae* kullanarak %1 ile %7 (v/v) arasında değişen inokülüm oranlarında gerçekleştirilen 15 günlük inkübasyon sonunda en yüksek üretimi %5 inokülüm oranında elde etmişlerdir.



Şekil 4.2. Farklı inokülasyon oranlarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi (Fermantasyon koşulları: pH 5.0, 30°C, 10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L glukoz, 7 gün)

4.5. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Bakteriye Selüloz Sentezine Etkisi

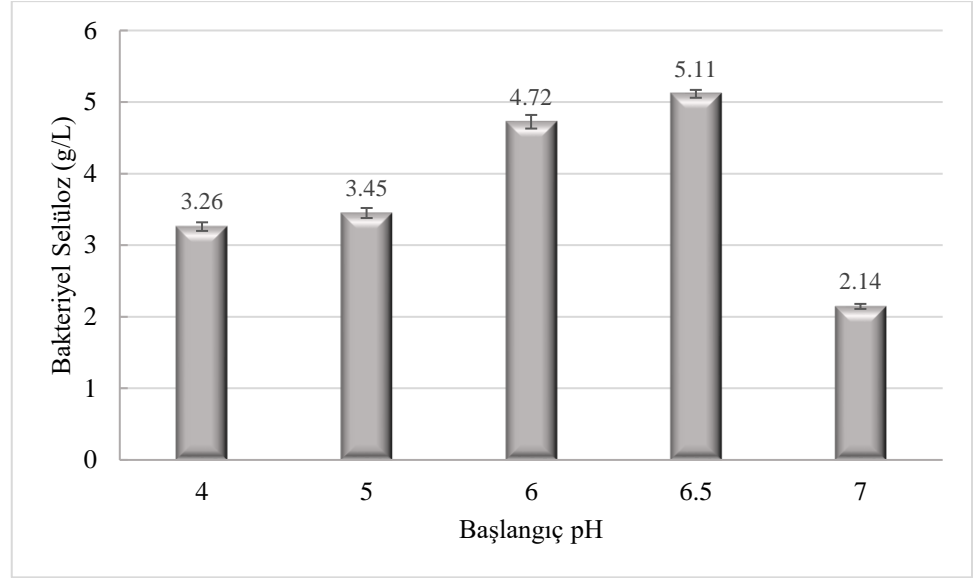
Besin çözünürlüğü, besin alımı, enzim aktivitesi ve oksidatif-indirgeyici reaksiyonları gibi faktörleri dolayısıyla mikroorganizmanın fizyolojisinde etkileyen pH için bakteriyel selülozun sentezinde önemli bir parametredir (Panesar et al., 2012). Bakteriyel selüloz üretiminde farklı pH değerlerinin etkisini incelemek amacıyla seçilen pH aralıklarında (4.0-7.0) denemeler gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon sonrası ortamların pH değerlerinde düşüş görülmesi sebebiyle sterilizasyon öncesi ve sonrası ölçümler alınarak istenilen pH değerlerine ulaşılmıştır. Steril fermentasyon ortamlarına %2 (v/v) oranında bakteri aşılansmış ve 30°C’ de 7 gün fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Üretim sonunda elde edilen bakteriyel selüloz miktarları Şekil 4.3.’de sunulmuştur. En yüksek bakteriyel selüloz üretimi pH 6.5’te (5.11 g/L) elde edilirken, en düşük bakteriyel selüloz üretimi pH 7’de (2.14 g/L) gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, *G. xylinus* ATCC 700178’in geniş bir pH spektrumunda (4.0-6.5) önemli miktarlarda bakteriyel selüloz ürettiğini ve en yüksek selüloz konsantrasyonun pH 6.5’te olduğu göstermektedir. Son et al. (2001), *Acetobacter* sp. A9 kullanarak ortamın pH değerinin selüloz sentezi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. En yüksek selüloz konsantrasyonunu (3,8 g/L) başlangıç pH 6.5

değerinde, sonuçlarımızla paralel olarak elde edilmişlerdir. Benzer şekilde Hungund and Gupta (2010), *G. xylinus* ile standart HS besiyerinde gerçekleştirdiği üretim için optimum başlangıç pH değerini 6.5 olarak belirlemiştir.

Rani and Appaiah (2011), selüloz üretimi için farklı başlangıç pH değerlerini test etmişlerdir ve *G. hansenii* kullanarak sabit koşullar altında en yüksek üretimi (7.40 g/L) başlangıç pH 5.5 değerinde elde etmişlerdir. Yang et al. (2019), *G. xylinus* ile başlangıç pH değerinin selüloz üretimi üzerindeki etkisini incelemiş ve pH 5.0'de 5.68 g/L olarak en yüksek selüloz konsantrasyonunu bulmuşlardır. Ayrıca pH 3.0'den 5.0'e yükseldikçe selüloz üretiminin arttığını ve pH 8,0'de bakteriyel selüloz sentezinin neredeyse sıfır olduğunu belirtmişlerdir. Rangaswamy et al. (2015), HS ortamını kullanarak *Gluconacetobacter* sp. RV28 suşu ile gerçekleştirdiği üretimde pH etkisini araştırmış ve optimum pH 6.0 değerinde 2.10 g/L bakteriyel selüloz verimi elde etmiştir.

Tez kapsamında selüloz üretimine etkisi incelenen 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 ve 7.0 başlangıç pH değerlerinin bir haftalık fermantasyon sonrası nihai değerleri sırasıyla 3.51, 4.02, 4.19, 4.44 ve 4.54 olarak ölçülmüştür. *G. xylinum* tarafından gerçekleştirilen bakteriyel selüloz sentezinde hücre zarına bağlı glikoz dehidrojenaz enzimi, glikozu oksitler ve pH değerinin 3.0'e kadar düşmesine neden olan glukonik asit üretilir. pH'daki bu düşüş bakteriyel selüloz üretimini inhibe edebilmektedir (Bilgi et al., 2016; Zeng et al. 2011). Krystynowicz et al. (2022), bakteriyel selüloz üretiminde glikozun önemli bir kısmının keto ve glukonik asitlere metabolize edildiğini ve sonucunda fermantasyon ortamının asitliğinin pH 3.5'e düşürdüğü bildirmişlerdir. Zeng et al. (2011), bakteriyel selüloz üretimi için karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı tamponlu fermantasyon ortamının pH'ının 3.7'ye düştüğünü bildirmişlerdir. Hurda incir ekstraktının substrat olarak kullanıldığı bu tez çalışmasında fermantasyon sonrası ortamların pH değerlerinin yalnızca 4.0-4.5 seviyelerine (başlangıç pH değeri 4.0 olan ortamlar hariç) düştüğü görülmüştür. Bu duruma besin ve bileşenlerle zengin kompleks hurda incir fermantasyon ortamının tamponlama kapasitesinin neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi (Fermantasyon koşulları: 30°C, 10 g/L maya ekstraktı, %2 inokülasyon oranı, 20 g/L glukoz, 7 gün)

4.6. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Bakteriyel Selüloz Üretimi Üzerine Etkisi

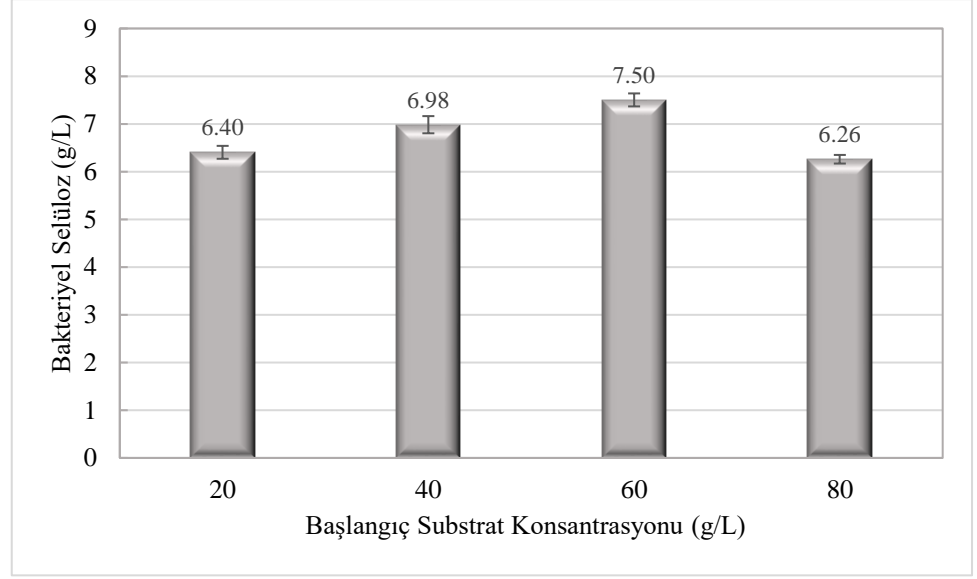
Bakteriyel selüloz üretimine başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 20, 40, 60 ve 80 g/L substrat (hurda incir ekstraktı) konsantrasyonlarında fermantasyon ortamları hazırlanmıştır. Fermantasyon ortamlarının öncesindeki denemelerde optimum olarak belirlenen pH 6.5 değerine ayarlanmasının ardından, 40, 60 ve 80 g/L substrat konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde muhtemelen pektin gibi kompleks bileşiklerin varlığından kaynaklanan yoğun bir jelleşme görülmüştür. Bu jelleşmenin giderilmesi amacıyla başlangıç substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığının etkisinin incelendiği denemelerde fermantasyon ortamlarına “3.2.Yöntemler” bölümünde ayrıntılı olarak açıklandığı üzere, pektinaz ve selüloz aktiviteleri içeren ticari bir enzim preparatı (Rapidase FC) eklenerek ilerlenmiştir. Enzim ile jelleşmesi önlenmiş fermantasyon ortamlarında 30°C’ de 7 gün statik olarak üretim gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4’de fermantasyon sonunda elde edilen selülozların görüntüsü verilmiştir. Deneme sonunda elde edilen bakteriyel selüloz miktarları Şekil 4.5 sunulmuş olup, en yüksek bakteriyel selüloz miktarı 60 g/L substrat konsantrasyonunda 7.5 g/L olarak bulunmuştur. 60 g/L substrat konsantrasyonunun altında ve üzerindeki değerlerde selüloz üretiminde azalma gözlenmiştir. 20, 40 ve

80 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlarında elde edilen selüloz konsantrasyonları sırasıyla 6.40, 6.98 ve 6.26 g/L'dir.



Şekil 4.4. Başlangıç substrat konsantrasyonu denemesinde fermantasyon sonrası üretilen bakteriyel selülozlar

Sonuçlarımızla benzer şekilde, Son et al. (2001) ve Rani and Appaiah (2011), bakteriyel selüloz üretiminin %4 glikoz konsantrasyonuna kadar arttığını ancak %4'ün üzerindeki konsantrasyonlarda üretimin azaldığını bildirmişlerdir. Yang et al. (2019), *Gluconacetobacter xylinus* KCCM 41431 ile saf ve ham gliserolden statik kültür koşullarında bakteriyel selüloz üretimini incelemiştir. Gliserolün üretime etkisi için 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L ve 50 g/L konsantrasyonları araştırılmış ve en yüksek 20 g/L gliserol konsantrasyonunda 5.68 g/L selüloz elde etmişlerdir. Ayrıca gliserolün 30 g/L'den daha yüksek konsantrasyonlarında inhibitör etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Masaoka et al. (1993), yüksek substrat konsantrasyonlarında bakteriyel selüloz üretimindeki azalmaya, fermantasyon ortamında oluşan aşırı glukonik asit üretiminin neden olduğunu bildirmiştir. Bu aşırı üretim, ortam pH'sının optimum seviyelerin altına düşmesine neden olmuş ve sonuç olarak büyümeyi ve BS üretimini engellemiştir.



Şekil 4.5. Başlangıç substrat konsantrasyonunun bakteriyel selüloz üretimine etkisi (Fermantasyon koşulları: 30°C, %2 inokülasyon oranı, 10 g/L maya ekstraktı, pH 6.5, 7 gün)

Çalışmada, Rapidase FC enziminin atık incir ekstraktının hazırlanmasına dahil edilmesinin, 60 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu ve pH 6.5 koşulları altında selüloz konsantrasyonu 5.11'den 6.40 g/L'ye arttırmasına yol açtığı görülmüştür. Bu artış, incir ekstraktındaki şeker ve diğer besin maddelerinin çözünürlüğünün artmasına ve sonuç olarak bu besin maddelerinin *K. xylinus* için daha erişilebilir ve kolay kullanılabilir hale gelmesine bağlanabilir. Mahmoodi et al. (2017), elma suyunun pektinazla muamelesi sonucu doğal şekerin arttırıldığını bildirmiştir. Uygun miktarda enzim ile elma suyundaki çözünür şekerin %7 oranında artmıştır.

İncirin (*Ficus carica L.*) tohum, kabuk, posa gibi yan ürünleri, fenolik asitler, uçucu bileşikler, antosiyanin, pektin ve fisin gibi pek çok biyoaktif bileşen içermektedir. Koyulaştırıcı, renklendirici, emülgatör ve jelleştirici olarak uygulamalara sahip pektin, incir kabuklarının hücre duvarında baskın olan kompleks bir polisakkarittir (Ayuso et al., 2022). Pektinin jelleşmesini pektinin yapısı dışında, şeker konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve çapraz bağlama ajanlarının varlığı gibi faktörler etkilemektedir. Yüksek metoksi pektinler 3.5'tan düşük pH değerlerinde ve %55'ten yüksek şeker konsantrasyonlarında jelleşme gösterirken, düşük metoksi pektinler Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonların varlığında ve 3.0-7.0

gibi geniş bir pH aralığında jelleşme göstermektedir. (Alba et al., 2015; Gawkowska et al., 2018).

Gharibzahedi et al., (2019), *Ficus carica* kabuğundan düşük metoksi pektin (DE = 33.65%) ekstrakte elde etmişlerdir. Yang et al. (2018), tarafından yapılan çalışmada düşük metoksi pektinin jelleşmesi pH 3.5'tan 9.5 değerine artırılarak incelenmiştir. Galakturonik asit kalıntılarının ayrışma derecesindeki bir artış ardından pektinin esterleşmesinin giderilmesiyle bağlantılı olan jel sertliğinde bir artış gözlenmiştir. Çalışma en kompakt jelleşmeye pH 8.5 da elde etmişlerdir.

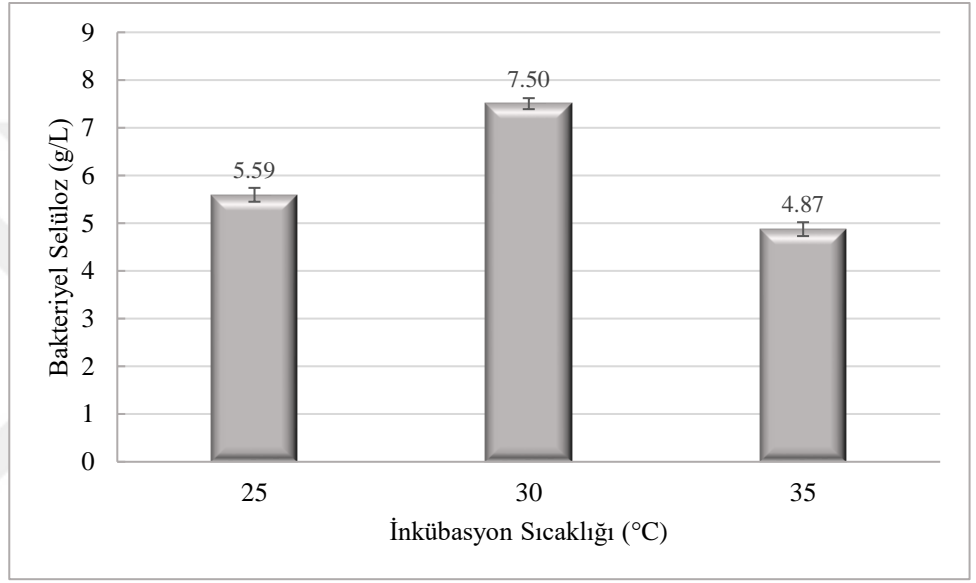
Sadia et al. (2014), tarafından yapılan çalışmada kuru incir ekstraktında potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor ve Demir gibi elementlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada *Ficus carica*'nın test edilen tüm meyveler arasında en yüksek kalsiyuma ($10,94 \pm 2,75$) mg/g kuru ağırlık) sahip olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak düşük metoksi pektinlerin jelleşmesi, Ca^{2+} , Fe^{2+} ve Mg^{2+} , vb. gibi başlıca iki değerlikli ve üç değerlikli katyonların varlığını gerektirir (Gawkowska et al., 2018).

4.7. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Bakteriyel Selüloz Üretimine Etkisi

İnkübasyon sıcaklığı hem mikrobiyal büyüme hem de bakteriyel selüloz üretiminde çok öneme sahiptir. İnkübasyon sıcaklığının selüloz üretimine etkisini araştırmak amacıyla 25, 30 ve 35 °C'de, 60 g/L başlangıç şekeri (pH 6.5) ve 10 g/L maya ekstraktı içeren hurda incir ekstraktı ortamlarında denemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6.'dan da görüleceği üzere en yüksek selüloz üretimi 7.50 g/L ile 30 °C'de elde edilirken, 5.59 ve 4.87 g/L bakteriyel selüloz konsantrasyonları sırasıyla 25 ve 35 °C'de elde edilmiştir.

Rani and Appaiah (2011), selüloz üretimi için farklı sıcaklıklar (18-40 °C) incelemiş ve en yüksek selüloz konsantrasyonunu 27 °C'de 7.04 g/L olarak bulmuşlardır. Rangaswamy et al. (2015), *Gluconacetobacter* sp. RV28 suşunu kullanarak bakteriyel selüloz sentezi için 20 ila 45 °C arasında sıcaklığın etkisini araştırmıştır ve ideal sıcaklığın 28-30°C arasında olduğunu bildirmişlerdir. Son et

al. (2001), *Acetobacter* sp. A9 için 25–30 °C arasında sıcaklığın üretime etkisini incelemiş ve en yüksek üretimin 30 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Hungund and Gupta (2010), HS ortamında 14 gün boyunca 28, 30, 32 ve 35°C'de sıcaklığın üretime etkisi incelemiştir ve *G. xylinus* NCIM 2526'ın selüloz üretimi için optimum sıcaklık değerini 30°C olarak bildirmişlerdir. Alemam et al. (2021), 15 ila 40°C arasında inkübasyon sıcaklığının etkisini araştırmıştır. *K. xylinus* SB3 ile gerçekleştirilen selüloz üretimi için optimum sıcaklığı (5.2 g/L) 30°C olarak belirlemişlerdir.



Şekil 4.6. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyel selüloz üretimine etkisi (Fermantasyon koşulları: 60 g/L glukoz, 7 gün, %2 aşı oranı, 10 g/L maya ekstraktı, pH 6.5)

4.8. Bakteriyel Selüloz Üretiminin Yanıt Yüzey Metodu (YYM) ile Optimizasyonu

Yapılan ön denemeler sonucunda bakteriyel selüloz üretiminde etkili olan proses parametreleri olarak başlangıç substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık tespit edilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin etkilerinin incelenmesinde ve optimum seviyelerinin belirlenmesinde YYM kullanılmıştır. YYM'nda kullanılan deneysel tasarım noktaları ve analizden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da, varyans analiz tablosu Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. *G. xylinus* 700178 ile bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan deneysel tasarım ve cevaplar

| Deney Sırası | Faktörler | | | Bakteriyel Selüloz Miktarı (g/L) |
|--------------|-------------------------------|-----|----------|----------------------------------|
| | Substrat Konsantrasyonu (g/L) | pH | Sıcaklık | |
| 1 | 60 | 7.5 | 30 | 6.35 |
| 2 | 80 | 7.5 | 35 | 3.41 |
| 3 | 80 | 6.5 | 30 | 6.67 |
| 4 | 60 | 6.5 | 35 | 5.07 |
| 5 | 40 | 7.5 | 25 | 4.01 |
| 6 | 80 | 5.5 | 25 | 4.19 |
| 7 | 60 | 6.5 | 30 | 7.50 |
| 8 | 60 | 5.5 | 30 | 7.69 |
| 9 | 40 | 6.5 | 30 | 6.52 |
| 10 | 60 | 6.5 | 25 | 5.79 |
| 11 | 60 | 6.5 | 30 | 7.62 |
| 12 | 40 | 7.5 | 35 | 2.80 |
| 13 | 40 | 5.5 | 35 | 3.64 |
| 14 | 60 | 6.5 | 30 | 7.70 |
| 15 | 40 | 5.5 | 25 | 4.18 |
| 16 | 60 | 6.5 | 30 | 7.93 |
| 17 | 80 | 7.5 | 25 | 3.44 |
| 18 | 60 | 6.5 | 30 | 7.67 |
| 19 | 60 | 6.5 | 30 | 7.66 |
| 20 | 80 | 5.5 | 35 | 5.31 |

Çizelge 4.7. İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi ($R^2 = 0.988$)

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|-----------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Regresyon | 9 | 60.1902 | 60.1902 | 6.6878 | 180.58 | 0.000 |
| Lineer | 3 | 3.0401 | 3.0401 | 1.0134 | 27.36 | 0.000 |
| İkinci derece | 3 | 55.3916 | 55.3916 | 18.4639 | 498.54 | 0.000 |
| Etkileşim | 3 | 1.7584 | 1.7584 | 0.5861 | 15.83 | 0.000 |
| Artık hata | 10 | 0.3704 | 0.3704 | 0.0370 | | |
| Uyum eksikliği | 5 | 0.2710 | 0.2710 | 0.0542 | 2.73 | 0.148 |

| | | | | |
|-----------------|----|---------|--------|--------|
| Saf hata | 5 | 0.0994 | 0.0994 | 0.0199 |
| Toplam | 19 | 60.5606 | | |

SD: serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

Deneysel ve tahmin edilen verilerin ne derece uyumlu olduğunu gösteren ilişki katsayısı değeri (R^2) 0.988 olarak bulunmuş olup elde edilen değer deneysel verilerin %98.8 doğrulukta ifade edilebileceğini göstermektedir. Bu sonuç, gerçekleştirilen matematiksel ve istatistiksel çalışmanın bakteriyel selüloz üretiminde kullanılabileceğini kanıtlamaktadır.

Çizelge 4.7 incelendiğinde F testinin anlamlı ($P < 0.05$), uyum eksikliği değerinin (lack of fit) ise önemsiz olduğu ($P > 0.05$) görülmektedir. Bu veriler oluşturulan modelin *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 hücreleri ile BS üretimini başarı ile açıklayabildiğini göstermektedir.

Deneylerde elde edilen verilere regresyon analizi uygulanmasıyla bulunan regresyon katsayılarının (Çizelge 4.8) kullanılmasıyla elde edilen ikinci dereceden denklem aşağıda verilmiştir.

$$Y = -108.011 + 0.277X_1 + 9.174X_2 + 5.292X_3 - 0.0025X_1^2 - 0.5918X_2^2 - 0.087X_3^2 - 0.01025X_1X_2 + 0.00355X_1X_3 - 0.0455X_2X_3$$

$$Y = \text{Bakteriyel selüloz konsantrasyonu}$$

X_1, X_2, X_3 = İncelenen parametrelerin gerçek seviyeleri (sırasıyla substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık)

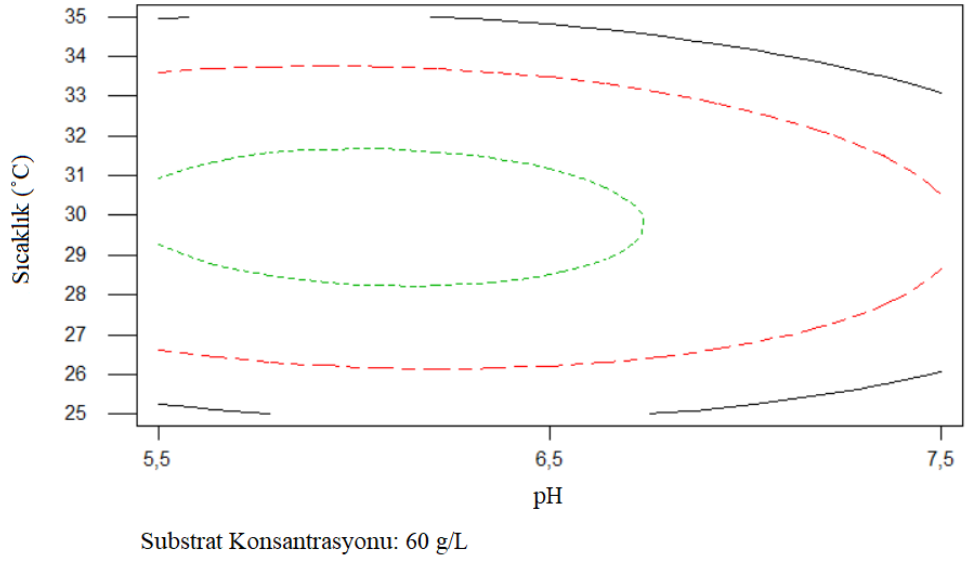
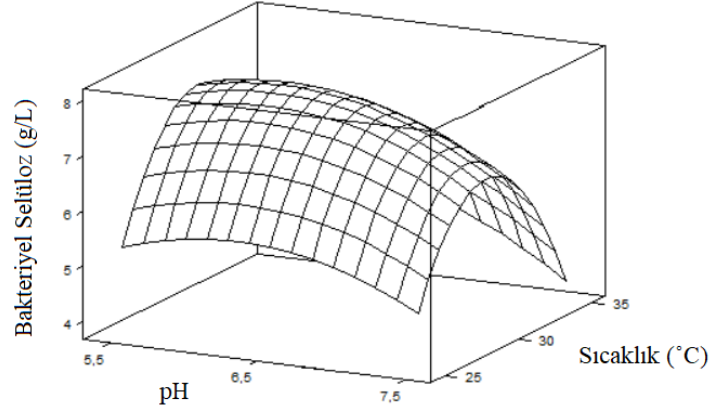
Çizelge 4.8. Bakteriyel selüloz miktarları için tahmini regresyon katsayıları

| Terim | Katsayılar | SH kat. | T | P |
|----------|------------|---------|---------|-------|
| Sabit | -108.011 | 0.06616 | 115.672 | 0.000 |
| Substrat | 0.274520 | 0.06086 | 3.073 | 0.012 |
| pH | 9.17364 | 0.06086 | -8.216 | 0.000 |
| Sıcaklık | 5.29151 | 0.06086 | -2.268 | 0.047 |

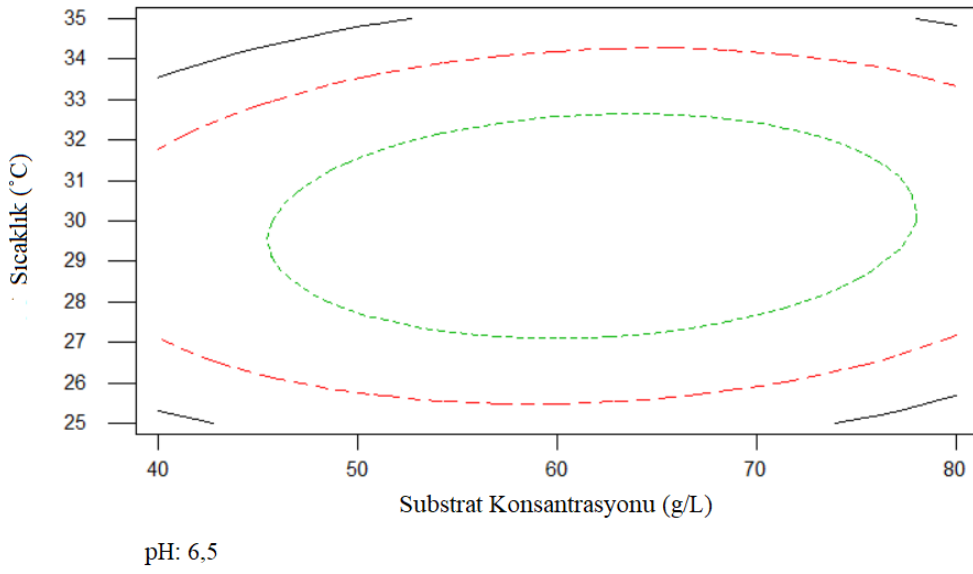
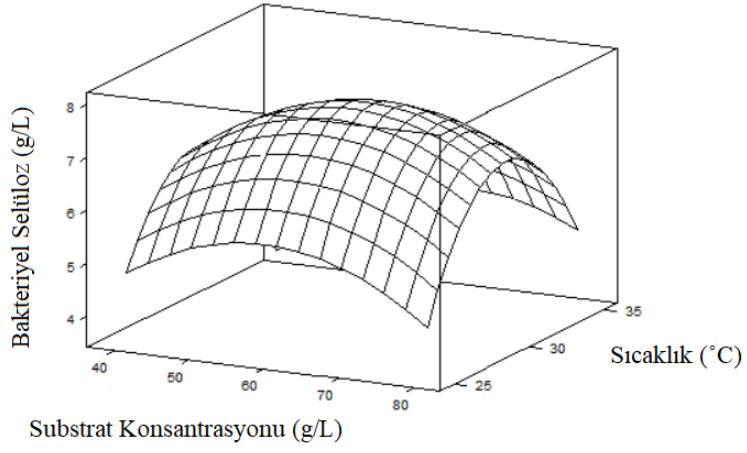
| | | | | |
|--------------------|-------------|---------|---------|-------|
| Substrat*Substrat | -0.00254205 | 0.11605 | -8.762 | 0.000 |
| pH*pH | -0.591818 | 0.11605 | -5.100 | 0.000 |
| Sıcaklık *Sıcaklık | -0.0872727 | 0.11605 | -18.801 | 0.000 |
| Substrat*pH | -0.0102500 | 0.06804 | -3.013 | 0.013 |
| Substrat*Sıcaklık | 0.00355000 | 0.06804 | 5.217 | 0.000 |
| pH*Sıcaklık | -0.0455000 | 0.06804 | -3.344 | 0.007 |

SH kat. : Standart Hata Katsayıları

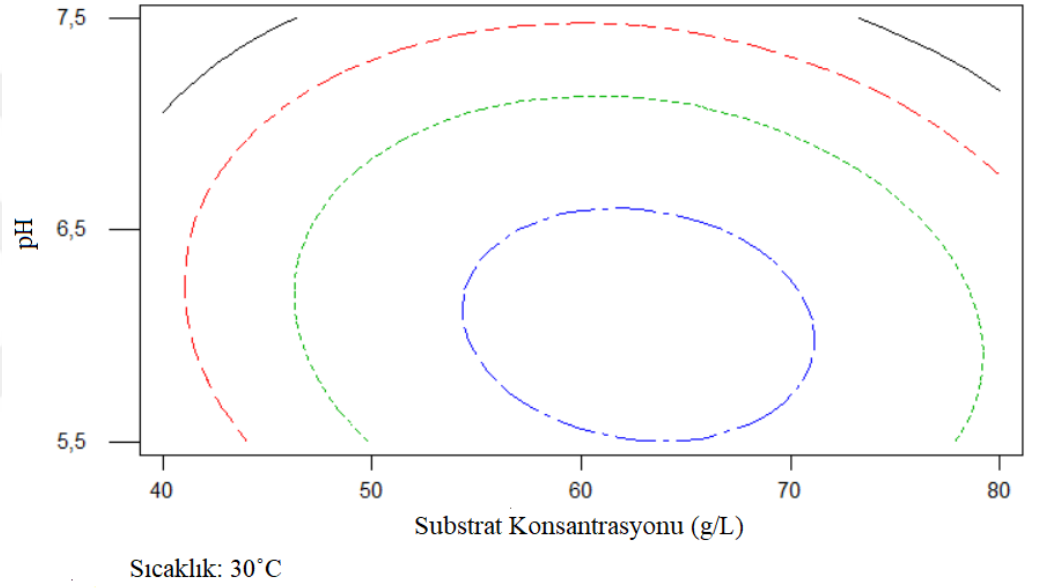
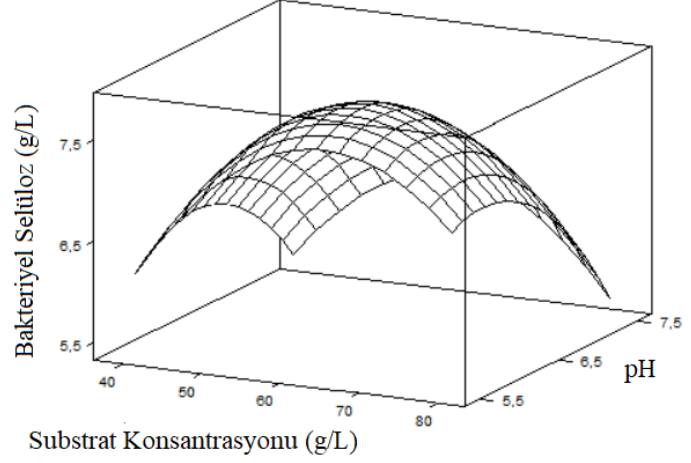
Çizelge 4.8.'deki P değerlerinden de anlaşılacağı üzere ($P < 0.05$), substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık parametrelerinin BS üretimine olan etkileri istatistiksel olarak önemli düzeydedir. Parametrelerin katsayıları incelendiği zaman, en yüksek katsayıya (9.174) sahip olan pH parametresinin prosese olan etkisinin en fazla olduğu görülmektedir. pH parametresini, sırasıyla substrat konsantrasyonu (0.277) ve sıcaklık (5.292) izlemektedir. Aynı tabloda her üç parametrenin üssel etkilerinin ise önemli olduğu görülmektedir. Parametrelerin üssel etkilerinin negatif olması, parametre konsantrasyonu arttıkça BS üretiminin belirli bir noktaya kadar artacağını, daha sonra ise azalacağını göstermektedir. Çizelge 4.8.'deki parametreler arasındaki interaksiyon etkileri incelendiği zaman, bütün interaksiyonların istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) görülmektedir. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'daki eş yükselti ve yüzey grafiklerinde parametrelerin bir tanesi sabitken, diğer iki parametredeki artışın BS üretimine olan etkisi incelenmiştir. Bütün parametrelerin seviyeleri düşükten yükseğe giderken selüloz konsantrasyonunun arttığı, belirli bir orta noktadan sonra ise parametre seviyelerinde yapılan artışın BS konsantrasyonunu olumsuz etkilediği görülmektedir.



Şekil 4.7. Sabit substrat konsantrasyonunda (60 g/L), sıcaklık ve pH'nın eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği



Şekil 4.8. Sabit pH değerinde (6,5) sıcaklık ve substrat konsantrasyonu eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği



Şekil 4.9. Sabit sıcaklık değerinde (30°C) substrat konsantrasyonu ve pH eş yükselti eğrisi ve yüzey grafiği

Modelin verdiği regresyon katsayılarından matris çözümlenmesi yapılarak parametrelerin maksimum BS konsantrasyonunu veren değerleri olan; başlangıç substrat konsantrasyonu 62.75 g/L (X_1), pH 6.05 (X_2) ve sıcaklık 30.0 °C (X_3) değerleri elde edilmiştir. Bu koşullarda yine aynı denklem kullanılarak fermantasyon sonunda maksimum 8.36 g/L bakteriyel selüloz üretilebileceği model tarafından belirtilmiştir. Bu veriler *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178'su ile hurda incir ekstraktı ile hazırlanan fermantasyon ortamında maksimum bakteriyel selüloz üretimi için en uygun seviyelerdir.

Doğrulama deneyi, model kullanılarak elde edilen optimum başlangıç substrat konsantrasyonu (62.75 g/L), başlangıç pH (6.05) ve sıcaklık (30.0 °C) seviyeleri ile atık incir ortamı kullanılarak yapılmıştır. Fermantasyonun 7. gününde, model kullanılarak elde edilen değerden (8.36 g/L) minimum düzeyde daha yüksek olan 8.45 g/L'lik bir bakteriyel selüloz konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen nihai bakteriyel selüloz konsantrasyonundan (8.45 g/L), daha düşük ve yüksek olan bazı çalışmalar Çizelge 4.9 da gösterilmiştir. Çizelge 4.9'dan da anlaşılacağı gibi yapılan bu çalışmadaki bakteriyel selüloz konsantrasyonu, literatürde elde edilen en yüksek değerlerden bir tanesidir.

Çizelge 4.9. Farklı substratlardan elde edilen bakteriyel selüloz miktarları

| Substratlar | Bakteriyel selüloz üretimi | Referanslar |
|---|----------------------------|--------------------------|
| Melas | 3.9 g/L | Abol-Fotouh et al., 2020 |
| Hurma ekstraktı | 3.1 g/L | Abol-Fotouh et al., 2020 |
| İncir ekstraktı | 1.1 g/L | Abol-Fotouh et al., 2020 |
| Keçiboynuzu ve kuru fasulye | 1.8 g/L | Bilgi et al., 2016 |
| Akçaağaç şurubu | 1.51 g/L | Zeng et al., 2011 |
| Şekerlenmiş hünnap işleme endüstrisinin atık suyu | 2.25 g/L | Li et al., 2015 |
| Ananas kabuğu suyu | 2.8 g/L | Castro et al., 2011 |
| Ladin hidrolizatı | 8.2 g/L | Guo et al., 2013 |
| Ananas kalıntıları | 3.24 g/L | Algar et al., 2014 |
| Tütün atığı ekstraktı | 5.2 g/L | Ye et al., 2019 |
| Pamuk bazlı atık tekstiller | 10.8 g/L | Hong et al., 2012 |
| Frenk üzümü atığı ve peynir altı suyu karışımı | 18.9 g/L | Bekatorou et al., 2019 |

4.9. Bakteriyel Selüloz Üretim Kinetiği

G. xylinum ile bakteriyel selüloz üretimi kinetiği, on günlük inkübasyon süresince optimize edilmiş koşullar altında incelenmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonu 62.75 g/L, pH değeri 6.05 olarak ayarlanmıştır. 250 mL'lik

erlenlerde 100 ml'lik fermantasyon ortamlarına %2 inokülasyon oranında ekim yapılmış olup, 30 °C on gün boyunca inkübe edilmiştir.

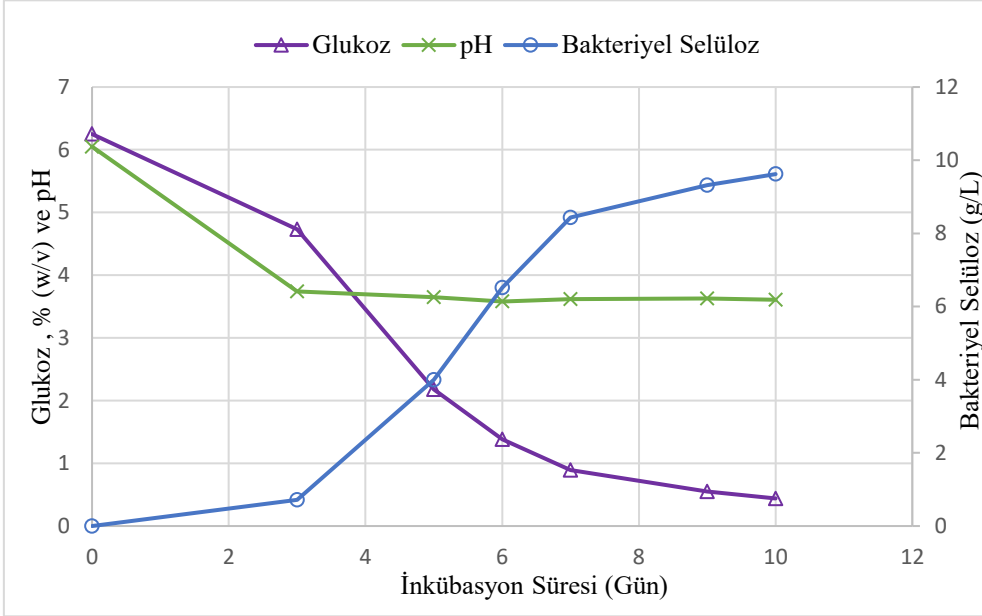
Bakteriyel selüloz üretiminin, ortamda bulunan glukoz konsantrasyonu ve pH'nın zamana bağlı değişimini veren grafik Şekil 4.10'da görülmektedir. Fermantasyon ortamındaki indirgen şeker DNS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Başlangıçta ortamda 62.50 g/L konsantrasyonda bulunan indirgen şeker, fermentasyon boyunca mikroorganizmanın kullanımına bağlı olarak 7. günde 8.9 g/L, 10. günde ise 4.4 g/L değerine düşmüştür. Glukoz konsantrasyonundaki bu düşüş, ortamda bulunan şekerlerin beklenildiği gibi mikrobiyal üreme ve BS üretiminde kullanıldığını göstermektedir. Şekil 4.10'da sunulan grafik incelendiğinde başlangıçta 6.05 olan pH değeri, glukoz miktarı ile 3. Güne kadar hızla düşmüş, ardından 3.74-3.58 pH değerleri arasında sabit kalmıştır. *G. xylinus* ile bakteriyel selüloz sentezinde glukoz dehidrojenaz enzimi, glukozu oksitler ve pH'da düşüşe neden olan glukonik asit üretmektedir (Bilgi et al., 2016; Zeng et al. 2011). Krystynowicz et al. (2022), bakteriyel selüloz üretiminde glikozun önemli bir kısmının keto ve glukonik asitlere metabolize edildiğini ve ortam pH değerinin 3.5 seviyelerine düşürdüğü bildirmiştir. Bu doğrultuda glukozun bir kısmının glukonik asite dönüştüğü ve ortamın pH değerini düşürdüğü fakat besin ve bileşenlerce zengin kompleks hurda incir fermantasyon ortamının tamponlama kapasitesi sayesinde pH değerinin 3.60 seviyelerinde sabit kaldığı düşünülmektedir. Grafiğe göre pH düşüşünün selüloz üretimini inhibe etmediği görülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre 10 günlük fermantasyon sürecinde maksimum bakteriyel selüloz miktarı 9.62 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek üretimin 10.günde elde edilmesine rağmen üretilen selülozların içerdikleri besiyeri ve mikroorganizma gibi safsızların 7.günden itibaren yeterince giderilemediği görülmüştür.

Alemam et al. (2021), *K. xylinus* SB3.1 ile maksimum selüloz üretimi elde etmek amacıyla 1-10 gün arasında farklı inkübasyon sürelerinin üretime etkisini incelemiştir. Tüm inkübasyon sürelerinde selüloz üretimi gözlenmiş fakat en yüksek üretim 8. Günde 3.12 g/L olarak elde etmişlerdir. Aswini et al. (2020), *Acetobacter senegalensis* MA1 suşu ile inkübasyon süresinin bakteriyel selüloz

üretimine etkisini 2-30 gün arasında araştırmıştır. İnkübasyon süresinin artışıyla bakteriyel selülozun üretiminin kademeli olarak arttığını ve sonuç olarak en yüksek üretimin 30 günde (17 g/L) elde edildiğini bildirmişlerdir.

Yanti et al. (2018), sıvı sago atığından bakteriyel selüloz üretimini incelemiştir. *Acetobacter xylinum* LKN6 ile selüloz üretimine inkübasyon süresinin etkisi 5 ila 20 gün arasında araştırılmıştır ve 15. gününde maksimum (13.85 g/L) üretimi elde etmişlerdir. Fermantasyon süresinin 15 günün üstüne çıktığında üretimde azalma gözlenmiş olup, inkübasyon süresi uzadıkça ortamdaki besin maddelerinin azaldığı dolayısıyla bakteri büyümesi ve selüloz üretiminin azaldığını belirtmişlerdir.

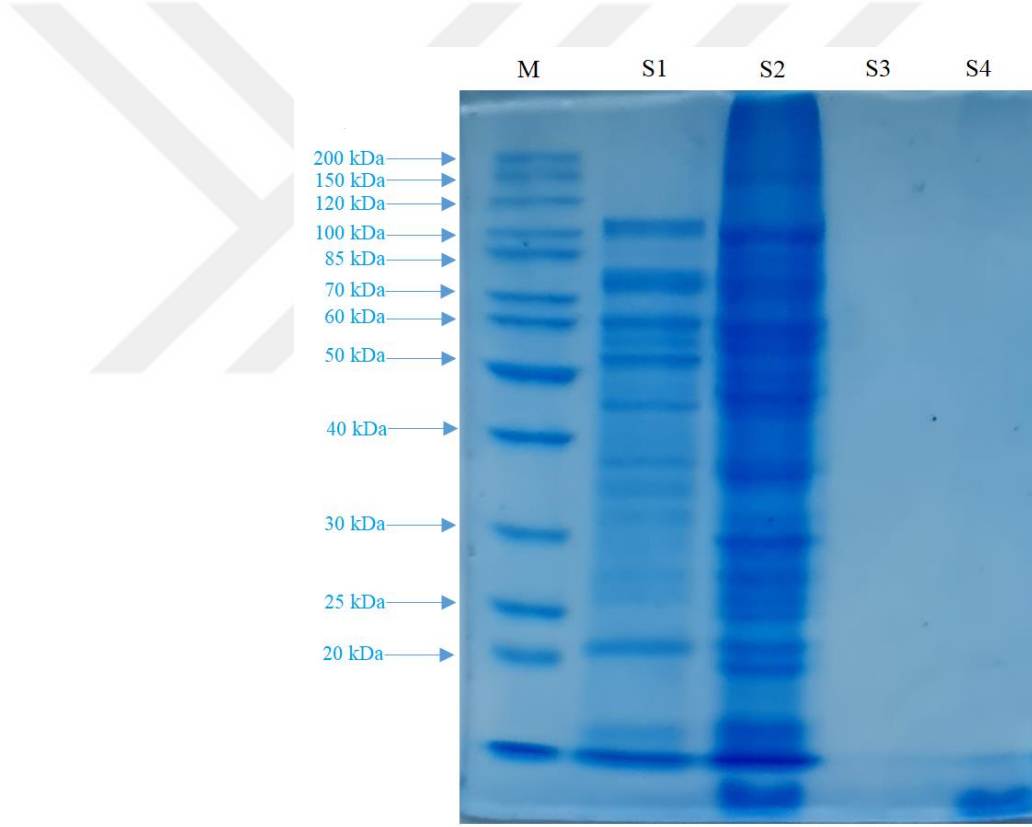


Şekil 4.10. *G. xylinum* ATCC 700178 ile bakteriyel selüloz üretim kinetiği (Fermantasyon koşulları: 62.50 g/L glukoz, 7 gün, %2 inokülasyon oranı, 10 g/L maya ekstraktı, pH 6.5)

4.10.Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Fermantasyon sonrası elde edilen bakteriyel selüloz hücreler ve ortam bileşenleri gibi safsızlıkları içermektedir. Bu safsızlıkların uzaklaştırılmasında en yaygın olarak sodyum hidroksit ya da potasyum hidroksit çözeltileri ile alkali muamele kullanılmaktadır. Tez kapsamında saflaştırma yöntemi olarak selülozlar %2'lik NaOH çözeltisi içinde 2 saat kaynatıldıktan ve tekrar taze %2'lik NaOH

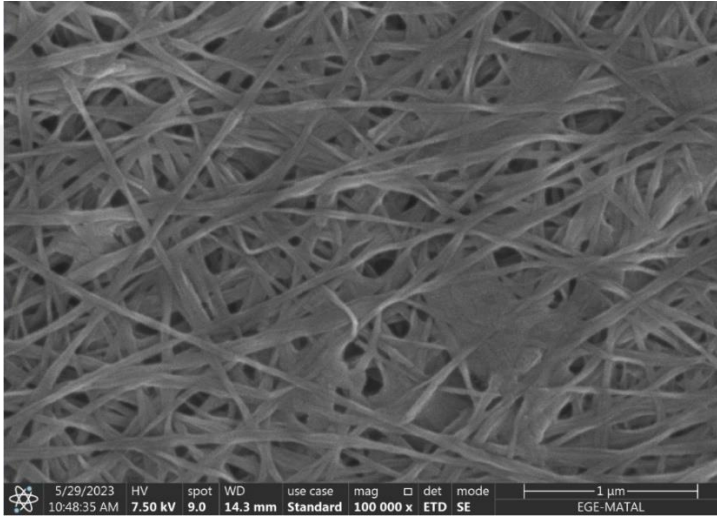
çözeltisinin içinde 30 °C’de 2 gün bekletilip yıkanmıştır. YYM sonrası belirlenen optimum koşullarda üretilen bakteriyel selülozdan saflaştırma öncesi ve sonrası örnek alınıp elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez), proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin elektrik alan altında, ağırlıklarına göre ayrılarak görüntülenmesini sağlayan bir yöntemdir. Elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil.4.11’de sunulmuştur. S1 ve S2 bakteriyel selülozun saflaştırma öncesine örneğine aitken S3 ve S4 saflaştırma sonrası örneğe aittir. Elektroforez görüntüsü incelendiğinde beklendiği gibi S1 ve S2’de çeşitli moleküler ağırlıklarında bantlar oluşurken, S3 ve S4 için jelde bant oluşmadığı görülmektedir. Bu durum saflaştırma işleminin hücrel safsızlıkların giderilmesinde başarılı olduğunu göstermektedir.



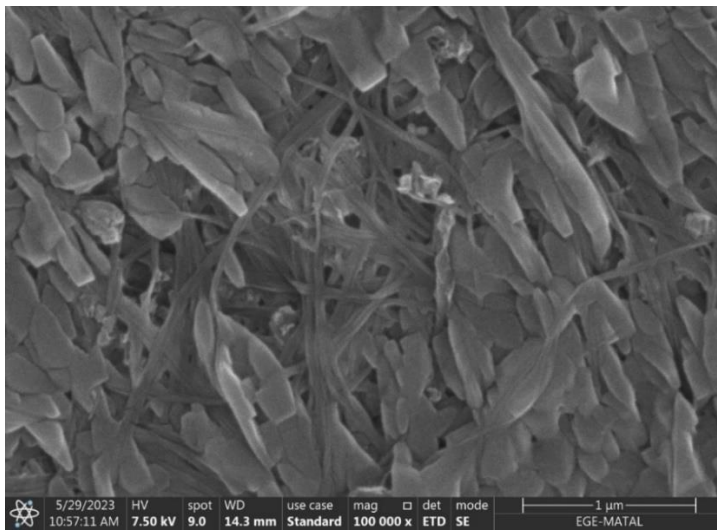
Şekil 4.11. Optimum şartlarda elde edilen bakteriyel selüloz örneğinin SDS-PAGE bantları (M:Protein markörü, S1 ve S2 saflaştırılma işlemi uygulanmamış bakteriyel selüloz örneği, S3 ve S4 saflaştırılmış bakteriyel selüloz örneği)

4.11. Bakteriyel Selülozun Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Saflaştırılıp kurutulmuş olan bakteriyel selüloz örneklerinin morfolojisi SEM analizi ile incelenmiştir. Standart HS ortamında üretilen bakteriyel selüloz örneğine ait SEM analizi görüntüsü Şekil 4.12’de sunulurken, belirlenen optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait SEM analizi görüntüsü Şekil 4.13’te sunulmuştur. SEM görüntüleri 100.000× büyütme ile alınmıştır.



Şekil 4.12. Standart HS ortamından elde bakteriyel selüloz örneğinin 100.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



Şekil 4.13. Optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğinin 100.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

Farklı substratların kullanıldığı ortamlardan elde edilen bakteriyel selülozların fibril çapı ve morfolojik görünümü gibi özellikleri farklılık göstermektedir (Lektemür Alpan ve ark., 2022). Bakteriyel selülozun ince liflere sahip olması polimerin gerilme mukavemetini ve uzama özelliklerini artırmasının yanında su buharı geçirgenliğini azaltır ve daha düzgün bir yapı oluşmasını sağlar. Selüloz fibril çapının daha ince olması nedeniyle polimerin yüzey alanı artar bu sayede daha gözenekli bir hidrojel tabakası sağlanır (Güzel and Akpınar, 2018). Hestrin ve Schramm ortamında elde edilen bakteriyel selülozun fibril çapı 24-42 nm arasında olup, ortalama fibril çapı 33 nm olarak bulunmuştur. Hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz fibril çapı ise 30-49 nm arasında değişmek olup, ortalama fibril çapı 44 nm'dir. Her iki ortama ait mikrograflar incelendiğinde, rastgele düzenlenmiş şeritler halinde ultra ince liflerden oluşan 3 boyutlu ağ yapısı görülmektedir. SEM analizi sonucunda HS ve hurda incir ortamından elde edilen bakteriyel selüloz liflerinin çapları arasında önemli bir farklılık görülmemiş olup literatürle benzerdir.

Volova et al. (2018), *Komagataeibacter xylinus* B-12068 şuşunu kullanılarak çeşitli üretim koşullarında ve farklı karbon kaynaklarıyla bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir. En düşük mikrofibril çapını ortalama 40 nm olarak galaktoz ile zenginleştirilmiş HS ortamından elde ederlerken, en yüksek mikrofibril çapını ortalama 74 nm ile sükrozla zenginleştirilmiş ortamdan üretmişlerdir. Vazquez et al. (2013), çeşitli karbon kaynaklarından elde edilen bakteriyel selülozların 35-70 nm arasında değişen fibril çaplarına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Cheng et al. (2016), *Acetobacter xylinum* ile karbon kaynağı küspe (bagas) hidrolizatı kullanarak selüloz üretimi gerçekleştirmiştir ve SEM analizi sonucu fibril çapını 30-80 nm arasında olduğu tespit etmişlerdir. Jittaut et al. (2023), ananas kabuğu ve muz ekstraktı gibi tarımsal atıklardan *Gluconacetobacter xylinus* ile selüloz üretimi gerçekleştirmiş ve elde edilen selüloz fibril çaplarının 40-70 nm arasında değiştiğini bildirmiştir. Li et al. (2015), *Gluconacetobacter xylinum* CGMCC No.2955 ile atık hünnap suyu kullanarak 6 günlük inkübasyon sonrası elde ettikleri bakteriyel selülozların fibril çapının 3-14 nm arasında olduğunu bulmuşlardır. Surma-Ślusarska et al. (2008), *Acetobacter xylinum* tarafından

sentezlenen selüloz fibrillerinin 70 ila 200 nm arasında değişen çaplara sahip olduğunu bildirmişlerdir.

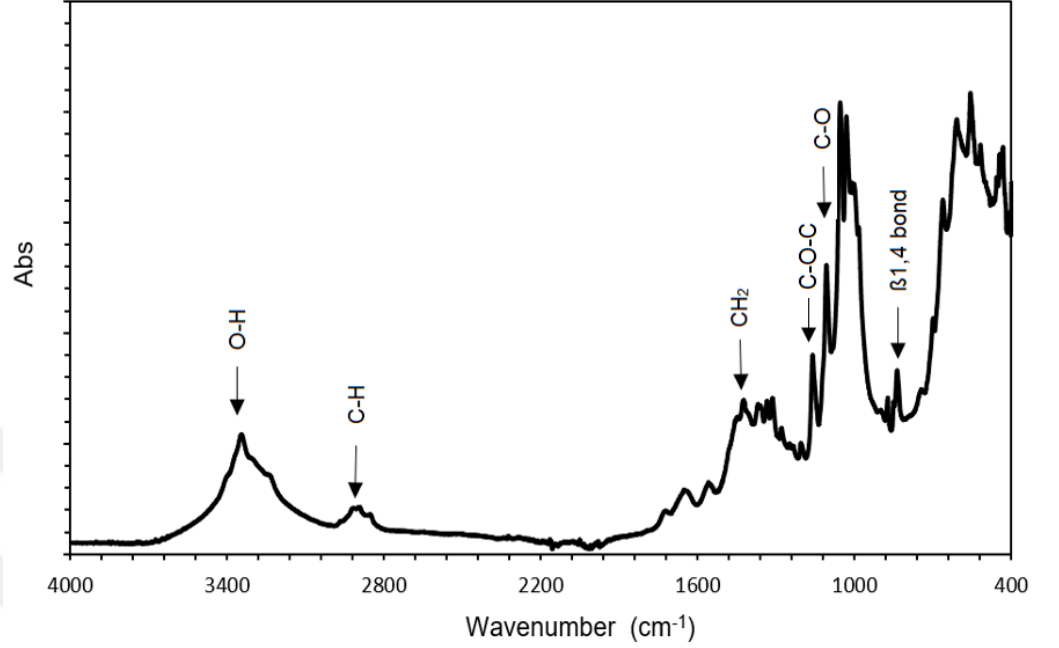
4.12. Bakteriyel Selülozun Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Belirlenen optimum koşullarda hurda incir ekstraktından elde edilen bakteriyel selülozun örneğinin yapısındaki fonksiyonel grupların tanımlanmasında azaltılmış toplam yansıma-Fourier dönüşüm kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. Analize ait sonuçları Şekil 4.14'te sunulmuştur.

FTIR spektrumundaki 3346 cm^{-1} ve 2894 cm^{-1} bölgesindeki pikler sırasıyla OH gruplarının ve C-H gruplarının gerilme titreşimlerini ifade eder (Atykyan et al. (2020)). 1424 cm^{-1} bölgesindeki pik, CH_2 simetrik bükülme ve yüzey karboksilat grupları ile ilişkilendirilir. 1314 cm^{-1} 'deki bant CH_2 salınımına karşılık gelir. 1161 cm^{-1} 'deki bant, selüloz C-O-C köprüleri ile 1056 cm^{-1} 'deki bant ise eter C-O-C işlevleriyle ilişkilendirilmektedir. 1108 cm^{-1} 'deki bant C-O bağının gerilmesini ifade eder (Vazquez et al. 2013). $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki bantlar, C-O-C gerilmesi ve C-O titreşimleriyle bağlantılıdır. 847 cm^{-1} bölgesindeki pik ise $\beta\text{-}1,4$ bağ titreşimlerini karakterize etmektedir. (Atykyan et al. (2020)).

Çeşitli çalışmalarda, saf selüloz için 3350 cm^{-1} ve 3400 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} bölgesindeki piklerin O-H gerilmesini, 2800 cm^{-1} - 2900 cm^{-1} 'in C-H gerilmesini, 1160 cm^{-1} 'in C-O-C gerilmesini, 1035 cm^{-1} - 1060 cm^{-1} 'in C-O gerilmesini, 1300 cm^{-1} 'in C-H bükülmesini, 1400 cm^{-1} CH_2 bükülmesini temsil ettiğini bildirilmiştir (Ramírez-Flores et al., 2009; Marchessault and Sundararajan, 1993). Tez çalışması kapsamında elde edilen bakteriyel selüloz örneğinin, saf bitkisel selüloz ile benzer kimyasal bağlara ve fonksiyonel gruplara sahip olduğu görülmektedir. Spektrum selüloz I'e özgü pikler göstermiştir. Literatür araştırması sonucunda, melas, elma ve yeşil ile siyah çay karışımı, tofu sıvı atığı ve pirinç yıkama suyu, mango kabuğu gibi alternatif fermantasyon ortamlarının bakteriyel selüloz üretiminde kullanıldığı çeşitli çalışmalar sonuçlarımızı desteklemektedir. (Çakar et al., 2014; Atkyan et al., 2020; Amorim et al., 2023; Apriyana et al., 2019, Hasanin 2013). Bakteriyel

selülozun FTIR spektrumları, *G. xylinum* ATCC 700178 tarafından üretilen malzemenin selüloz olduğunu kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.14. *Gluconacetobacter xylinus* ile hurda incir ekstraktı ortamından üretilen bakteriyel selülozun ATR-FTIR spektrumu

4.13. Bakteriyel Selülozun X- ışını kırınım (XRD) analizi

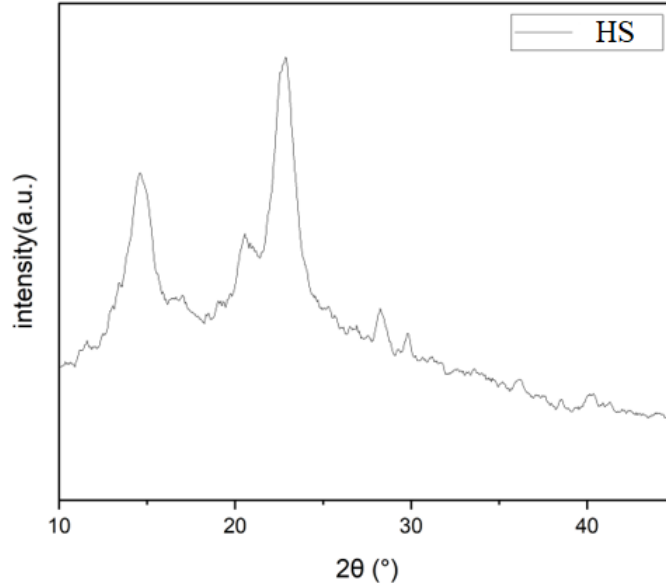
Çalışmada elde edilen bakteriyel selüloz örneklerinin kristal yapı analizinde X-ışını kırınımı (XRD) kullanılmıştır. Standart HS ortamında üretilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı Şekil 4.15'te sunulurken, belirlenen optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı Şekil 4.16'te sunulmuştur.

Selülozun yapısı *kristal* olarak adlandırılan düzenli ve *amorfl* olarak adlandırılan daha az düzenli bölgelerden oluşmaktadır. X-ışını difraktogramlarında örneğin kristal bölgesi keskin kırınım piki oluştururken, amorf bölgesi dağınık pikler oluşturmaktadır (Park et al., 2010). Uluslararası Kırınım Veri Merkezi (ICDD®), doğal selülozun kırınım piklerinin $2\theta = 14.90^\circ$, 16.49° ve 22.84° civarında bulunduğunu ve bunların sırasıyla (001), (110) ve (002) kristal düzlemlerine karşılık geldiğini belirtmektedir (Rusdi et al., 2022). Şekil 4.13 ve

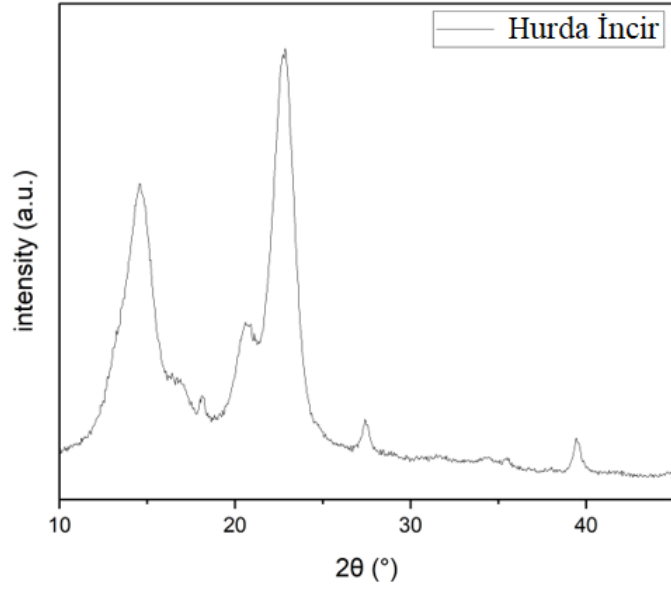
Şekil 4.14'te sunulan difraktogramlar incelendiğinde HS ortamından elde edilen selüloz için XRD pikleri $2\theta = 14.60^\circ$, 16.65° ve 22.85° 'de bulunurken, hurda incir ortamında XRD pikleri $2\theta = 14.55^\circ$, 16.40° ve 22.85° 'de bulunmuştur. Bu pikler, elde edilen örneklerin selüloz I yapısında olduğunu göstermektedir.

Amorim et al. (2023) ve Vazquez et al. (2013) düşük maliyetli üretim ortamlarından bakteriyel selüloz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada sonuçlarımızla benzer pikler elde etmiş olup üretilen selülozların selüloz I kırılma profili gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Standart HS ortamından ve Hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selülozların kristalinite derecesi sırasıyla %61 ve %70 olarak bulunmuştur. Karbon kaynağı, pH, çalkalama hızı, üretim yöntemi, fermantasyon süresi, sıcaklık ve kurutma yöntemi gibi parametreler üretilen bakteriyel selülozun kristalliğini etkilemektedir. Bakteriyel selüloz üretimine yönelik çalışmalarda, farklı substratlardan ve mikroorganizmalardan üretilen bakteriyelin selülozların kristalinite derecesinin %46.7 ile %91.62 arasında değiştiği belirtilmektedir (Volova et al. 2018; Güzel and Akpınar, 2018).



Şekil 4.15. Standart HS ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı



Şekil 4.16. Belirlenen optimum koşullarda hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz örneğine ait X-ışını difraktogramı

5. SONUÇ

Son yıllarda, dünya çapındaki ekonomik ve çevresel problemler nedeniyle sürdürülebilir biyobazlı kaynaklara yönelim artmaktadır. Bu bağlamda bakteriyel selüloz değerli ürünler üretmek için gıda, biyomedikal ve endüstriyel biyoteknoloji gibi sektörlerde büyük potansiyele sahip sürdürülebilir bir biyomalzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Ancak yüksek fermantasyon maliyeti, pahalı kültür ortamları ve düşük üretkenlik gibi nedenler büyük ölçekte endüstrileşmesini zorlaştırmaktadır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için tarım, gıda, bira ve şeker endüstrileri, tekstil fabrikaları gibi çeşitli endüstrilerden elde edilen atıkların düşük maliyetli substrat olarak bakteriyel selüloz gibi biyoürünlerin üretiminde değerlendirilmesine yönelik çalışmalara odaklanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, hurda incir bakteriyel selüloz üretiminde substrat olarak değerlendirilmiş olup, *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 ile gerçekleştirilen üretim için ortam bileşenleri ve fermantasyon parametreleri optimize edilmiştir. Çalışmada ilk olarak Plackett-Burman tasarımı kullanılarak hurda incir ekstraktının karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarına, tasarım sonucu elde edilen deneme desenine göre eklenen Hestrin-Schramm ortam bileşenlerinden (maya ekstraktı, pepton, sitrik asit ve disodyum fosfat) bakteriyel selüloz üretiminde önemli etkiye sahip olanlar belirlenmiştir. PB tasarımıyla taranan bileşenler arasında sadece maya ekstraktı selüloz üretiminde istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup üretime herhangi anlamlı bir etkisi olmayan geri kalan HS bileşenleri fermantasyon ortamından maliyeti azaltmak amacı ile çıkarılmıştır. Ardından maya ekstraktı konsantrasyonunun, inokülasyon oranının, başlangıç pH değerinin, başlangıç substrat konsantrasyonunun ve inkübasyon sıcaklığının selüloz üretime etkileri incelenmiştir. Bu parametrelerin en yüksek selüloz üretiminin gerçekleştiği seviyeleri, maya ekstraktı 10 g/L, inokülasyon oranı %2, pH 6.5, başlangıç substrat konsantrasyonu 60 g/L, inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak bulunmuş olup bu koşullar altında üretilen selüloz miktarı 7.50 g/L olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında, başlangıç substrat konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı, pH parametrelerinin bakteriyel selüloz üretimine etkilerinin

incelenmesi için seçilmiş ve bu amaçla YYM kullanılmıştır. Modelin verdiği noktalarda deneyler yapılmış ve elde edilen verilerin istatistiksel ve matematiksel olarak işlenmesi ile ikinci dereceden polinomial bir denklik elde edilmiştir. Modelin ilişki katsayı değeri olan R^2 değeri 0.988 olarak bulunmuş olup, bu değer modelin selüloz üretimini başarı ile açıkladığının bir göstergesidir. Modelin verdiği regresyon katsayıları kullanılarak 3 değişken için matris çözümlenmesi yapılmış ve sonuç olarak başlangıç pH 6.05, başlangıç substrat konsantrasyonu 62.75 g/L, inkübasyon sıcaklığı 30°C maksimum BS konsantrasyonunu elde etmede parametrelerin optimum seviyeleri olarak belirlenmiştir. Önceden 7.50 g/L olarak elde edilen BS konsantrasyonunun, optimizasyon sonrası 8.45 g/L seviyesine ulaşması, YYM'nin bakteriyel selüloz optimizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Optimum kültür koşulları kullanılarak elde edilen BS örneklerinin morfolojisi, yapısı ve kristallliği sırasıyla SEM, ATR-FTIR ve XRD analizi ile karakterize edildi. SEM analizi sonucunda, standart HS ortamında elde edilen bakteriyel selülozun ortalama fibril çapı 33 nm olarak bulunurken, hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selüloz ortalama fibril çapı 44 nm olarak bulunmuş olup her iki ortama ait mikrograflar incelendiğinde, rastgele düzenlenmiş şeritler halinde ultra ince liflerden oluşan 3 boyutlu ağ yapısı görülmüştür. FTIR analizi bakteriyel selüloz örneğinin saf bitkisel selüloz ile benzer kimyasal bağlara ve fonksiyonel gruplara sahip olduğu göstermektedir. Standart HS ortamından ve Hurda incir ekstraktı ortamından elde edilen bakteriyel selülozların kristalinite derecesi sırasıyla %61 ve %70 olarak bulunmuştur. XRD VE FTIR sonuçları örneklerin selüloz I yapısında olduğu göstermiştir.

Bu çalışma, substrat olarak hurda incir kullanılarak bakteriyel selüloz üretim koşullarının optimize edildiği ilk detaylı çalışmadır. Bu sebeple çalışmadan elde edilen sonuçların ürün konsantrasyonu değerlerini iyileştirmesi, üretim maliyetini düşürmesi, pilot üretim için izlenecek yola ve literatüre katkı bulunmaması beklenmektedir.

Çalışma hurda incirlerin bakteriyel selüloz üretimi için uygun maliyetli ve verimli bir substrat olduğunu göstermiştir. Hurda incirler, katma değeri yüksek

başka biyoürünlerin üretilmesi için bir substrat görevi görebilir. Ayrıca gerekli koşulların sağlanması durumunda aflatoksinli hurda incirlerinde bakteriyel selüloz üretiminde kullanılması mümkündür. Hurda incirin katma değeri yüksek bir ürün üretilmesinde değerlendirilmesi bu atığın elde edildiği Ege Bölgesi başta olmak üzere tarımsal yöreler için cazip bir ekonomik alternatif oluşturacak ve atık yönetimine yardımcı olacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelraof, M., Hasanin, M.S. and El-Saied, H.,** 2019, Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 211, 75–83.
- Abol-Fotouh, D., Hassan, M. A., Shokry, H., Roig, A., Azab, M. S., and Kashyout, A. E.-H. B.,** 2020, Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: Low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1, *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
- Adnan, A.B.,** 2015, Production of bacterial cellulose using lowcost media, Doctoral dissertation, University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
- Alba, K., Kasapis, S. and Kontogiorgos, V.,** 2015, Influence of pH on mechanical relaxations in high solids LM-pectin preparations, *Carbohydrate Polymers*, 127, 182–188.
- Alemam, A.M., Shaheen, T.I., Hassan,S.E.D., Desouky, S.E. and El-Gamal, M.S.,** 2021, Production enhancement of bacterial cellulose nanofiber using local *Komagataeibacter xylinus* SB3.1 under static conditions, *Egypt. J. Chem.*, 64, 2213–2221.
- Algar, I., Fernandes, S.C.M., Mondragon, G., Castro, C., Garcia-Astarin, C., Gabilondo, N., Retegi, A. and Eceiza, A.,** 2014, Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(1):41237p.
- Amorim, L.F.A., Li, L., Gomes, A.P., Fangueiro, R. and Gouveia, I.C.,** 2023, Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products as alternative sources of nutrients, *Cellulose*, 30, 5589–5606.
- Anonim.,** 2020, 2019 Yılı Kuru İncir Raporu, T.C.Ticaret Bakanlığı Esnaf, Sanatkarlar Ve Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
- Anonim.,** 2022, Ege Kuru Meyve ve Mamülleri İhracatçıları Birliği 2021/2022 Sezonu Çalışma Raporu ve Faaliyet Planı, Ege İhracatçılar Birliği.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- AOAC.** 1990. Official method of analysis 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Apriyana, A.Y., Andriani, D. and Karina, M.,** 2020, Production of bacterial cellulose from tofu liquid waste and rice- washed water : morphological property and its functional groups analysis, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 483, 012005.
- Aswini, K, Gopal, N.O. and Uthandi, S.,** 2020, Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1, *BMC Biotechnology* 20(1):46.
- Atkyan, N., Revin, V. and 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 Expr* **10**, 84.
- Avcioglu, N. H., Birben, M., and Seyis Bilkay, I.,** 2021, Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry*, 108, 60–68.
- Avşar, D. ve Yalçın, İ.,** 2007, Aydın yöresindeki incir işletmelerinin yapısal durumunun belirlenmesi, *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(1-2), 63-67.
- Ayuso, M., Carpena, M., Taofiq, O., Albuquerque, T.G., Simal-Gandara, J., Oliveira, M.B.P. and Barros, L.,** 2022, Fig “*Ficus carica L.*” and its by-products: A decade evidence of their health-promoting benefits towards the development of novel food formulations, *Trends Food Sci. Technol.*, 127:1–13.
- Azeredo, H. M., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., Claro, A. M.,** 2019, Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications, *Front. Sustain. Food Syst.*, 3:7.
- Azizi Samir, M. A., Alloin, F. and Dufresne, A.,** 2005, Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field, *Biomacromolecules* 6, 612–626.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bae, S.O. and Shoda, M.**, 2005, Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentör, *Applied Microbiology Biotechnology*, 67(1), 45–51.
- Barshan, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H. and Amiri, S.**, 2019, Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by *Komagatacibacter xylinus* PTCC 1734 using vinasse as a cheap cultivation medium, *Int. J. Biol. Macromol.*, 136,1188–1195.
- Bekatorou, A., Plioni, I., Sparou, K., Maroutsiou, R., Tsafrakidou, P., Petsi, T., and Kordouli, E.**, 2019, Bacterial Cellulose Production Using the Corinthian Currant Finishing Side-Stream and Cheese Whey: Process Optimization and Textural Characterization, *Foods*, 8(6), 193.
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A. and Hames, E.E.**, 2016, Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 2–10.
- Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C.-C., Verma, V., Wang, H.-T., Ismadji, S. and Cheng, K.-C.**, 2020, Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose, *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3):397-414.
- Breig, S. J. M. and Luti, K. J. K.**, 2021, Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures, *Materials Today: Proceedings*, 42, 2277–2284.
- Calderón-Toledo, S., Horue, M., Alvarez, V. A., Castro, G. R., and Zavaleta, A. I.**, 2021, Isolation and partial characterization of *Komagatacibacter sp.* SU12 and optimization of bacterial cellulose production using *Mangifera indica* extracts, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., and Neto, C. P.,** 2011, Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose, *Bioresource Technology*, 102(15), 7354–7360.
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I. and Gañán, P.,** 2011, Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96–102.
- Cerrutti, P., Roldán, P., García, R.M., Galvagno, M.A., Vázquez, A., and Foresti, M.L.,** 2016, Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics, *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14), 1–9.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Shrikant, A. S. and Singhal, R. S.,** 2009, Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (2) 107–124.
- Chen H. H., Chen L. C., Huang H. C. and Lin S. B.,** 2011, In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus*. *Cellulose* 18, 1573–1583.
- Chen, L., Hong, F., Yang, X.X. and Han, S.F.,** 2013, Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism, *Bioresource Technology*, 135,464-468.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M. and Demirci, A.,** 2009, Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis, *Journal of Biological Engineering*, 3(1), 12.
- Cheng, Z., Yang, R. and Liu, X.,** 2016, Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* through utilizing acetic acid hydrolysate of bagasse as low-cost carbon source. *BioResources*, 12, 1190–1200.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cheng, Z., Yang, R., Liu, X., Liu, X., and Chen, H.,** 2017, Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source, *Bioresource Technology*, 234, 8–14.
- Choi, S. M., Rao, K. M., Zo, S. M., Shin, E. J. and Han, S. S.,** 2022, Bacterial Cellulose and Its Applications. *Polymers*, 14, 1080.
- Çakar, F., Özer, I., Aytakin, A.Ö. and Şahin, F.,** 2014, Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium, *Carbohydrate Polymers*, 106, 7–13.
- Çoban, E. P. and Biyik, H.,** 2011, Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5, *African J. Biotechnol.*, 10, 5346-5354.
- de Oliveira Barud, H. G., da Silva, R.R., da Silva Barud, H., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W.R., de Oliveira, O. B, J. and Ribeiro, S. J. L.,** 2016, A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 20;153:406-420.
- Deshpande, P., Wankar, S., Mahajan, S., Patil, Y., Rajwade, J. and Kulkarni, A.,** 2023, Bacterial Cellulose: Natural Biomaterial for Medical and Environmental Applications, *Journal of Natural Fibers*, 20(2), 2218623.
- Drahushuk, A. T., Choy, C. O., Kumar, S., McReynolds, J. H., Olson, J. R.,** 1997, Modulation of cytochrome P450 by 5,5'-bis-trifluoromethyl-2,2'-dichlorobiphenyl, a unique environmental contaminant. *Toxicology* 120, 197–205.
- El-Gendi, H., Taha, T.H., Ray J.B. and Saleh A.K.,** 2022, Recent advances in bacterial cellulose: a low-cost effective production media, optimization strategies and applications. *Cellulose* **29**, 7495–7533.
- Esa, F., Tasirin, S. M. and Rahman, N. A.,** 2014, Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113–119.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fan, X., Gao, Y., He, W., Hu, H., Tian, M., Wang, K., and Pan, S.,** 2016, Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*, *Carbohydrate Polymers*, 151, 1068–1072.
- Fatima, A., Yasir, S., Khan, M.S., Manan, S., Ullah, M.W. and Ul-Islam, M.,** 2021, Plant extract-loaded bacterial cellulose composite membrane for potential biomedical applications, *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(1), 26–32.
- García-Sánchez, M., Robledo-Ortiz, J., Jiménez-Palomar, I., González-Reynoso, O. and González-García, Y.,** 2020, Production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* using mango waste as alternative culture medium, *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 19, 851–865.
- Gawkowska, D., Cybulska, J., and Zdunek, A.,** 2018, Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review, *Polymers*, 10(7), 762.
- Gayathry, G. and Gopalaswamy, G.,** 2014, Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*, *Indian Journal of fibre and Textile Research*, 39, 93–96.
- Gençdağ, E., Görgüç, A. ve Yılmaz, F.M.,** 2019, Kuru İncirin İşlenmesi, Kalite Problemleri ve Gıda Endüstrisinin Geliştirdiği Yenilikçi Yöntemler, *Akademik Gıda*, 17 (3), 378-388.
- Gharibzahedi, S.M.T., Smith, B. and Guo, Y.,** 2019. “Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig (*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity, *Carbohydrate Polymers*, 222(2),114992.
- Gregory, D. A., Tripathi, L., Fricker, A. T. R., Asare, E., Orlando, I., Raghavendran, V., and Roy, I.,** 2021, Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 145, 100623.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, X., Cavka, A., Jönsson L. J. and Hong, F.,** 2013, Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production, *Microbial Cell Factories*, 12(1):93p.
- Guo, Y., Zhang, X., Hao, W., Xie, Y., Chen, L., Li, Z., Zhu, B. and Feng, X.,** 2018, Nano-bacterial cellulose/soy protein isolate complex gel as fat substitutes in ice cream model, *Carbohydrate Polymers*, 198, 620–630.
- Gündüz, G. and Aşık, N.,** 2018, Production and characterization of bacterial cellulose with different nutrient source and surface-volume ratios, *Drvna Industrija: Znanstveni Časopis Za Pitanja Drvne Tehnologije*, 69:141–148.
- Güzel, M. and Akpınar, Ö.,** 2018, Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus Peels, *Waste and Biomass Valorization*, 10(8), 2165–2175.
- Hallac, B. B. and Ragauskas, A. J.,** 2011, Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(2), 215–225.
- Hasanin, M.S., Abdelraof, M., Hashem, A.H. and El Saied, H.,** 2023, Sustainable bacterial cellulose production by *Achromobacter* using mango peel waste, *Microbial Cell Factories*, 22, 24.
- Hegde, S., Bhadri, G., Narsapur, K. and Koppal, S.,** 2013, Statistical optimization of medium components by response surface methodology for enhanced production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter persimmonis*, *J. Bioprocess. Biotech.*, 4(1), 1–5.
- Heinze, T., El Seoud, O. A., and Koschella, A.,** 2018, Production and Characteristics of Cellulose from Different Sources, Cellulose Derivatives, Cham: Springer, 1-38pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S. F., Yang, G. and Jönsson, L. J.,** 2012, Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment *Bioresource Technology*, 104:503-508pp.
- Huang, C., Guo, H.J., Xiong, L., Wang, B., Shi, S.L., Chen, X.F. and Chen, X.D.,** 2016, Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydrate Polymers* ,136, 198–202.
- Huerta-Ochoa, S., Castillo-Araiza, C. O., Guerrero, A. R., and Prado-Barragán, A.,** 2018, Whole-Cell Bioconversion of Citrus Flavonoids to Enhance Their Biological Properties, *Studies in Natural Products Chemistry*, 335–367.
- Hungund, B.S. and Gupta, S.G.,** 2010, Factors affecting production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526, *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, 12, 31-36.
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T. and Wahid, F.,** 2019, Production of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes: A Review. *Cellulose*,26, 2895–2911.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. and Budhiono, A.,** 2000, Bacterial cellulose— a masterpiece of nature’s arts, *J. Mater. Sci.*, 35:261–270.
- Jahan, F., Kumar, V. and Saxena, R.K.,** 2017, Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance, *Bioresource Technology*, 250, 922–926.
- Jittaut, P., Hongsachart, P., Audtarat, S. and Dasri, T.,** 2023, Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* BNKC 19 using agricultural waste products as nutrient source, *Arab J. Basic and Appl. Sci.* 30, 221–30.
- Keshk, S. M. A. S. and Sameshima, K.,** 2005, Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production, *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (6), 478-482 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H-P. and Marsch, S.,** 2006, Nanocelluloses as innovative polymers in research and application, *Advances in Polymer Science*, 49–96.
- Kose R., Mitani I., Kasai W. and Kondo T.,** 2011, Nanocellulose as a single nanofiber prepared from pellicle secreted by *Gluconacetobacter xylinus* using aqueous counter collision, *Biomacromolecules* 12, 716–720.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Gonçalves-Mis'kiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S.,** 2002, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189–195.
- Kuo, C.H., Huang, C.Y., Shieh, C.J., Wang, H.M.D. and Tseng, C.Y.,** 2017 Hydrolysis of orange peel with cellulase and pectinase to produce bacterial cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*, *Waste Biomass Valorization*, 10,1–9.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y. and Nakamura, Y.,** 2009, Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrates Polymers*, 76(2):333-335pp.
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H.A., Abdul Kari, Z., Mohd Noor, N.H. and Ray, R.R.,** 2021, Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *Int J Mol Sci.*, 22(23):12984.
- Lee, K.-Y., Buldum, G., Mantalaris, A., and Bismarck, A.,** 2013, More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites, *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 10–32.
- Lektemür Alpan, A., Doğan, N.M., Denizli, T.H. ve Özmen, Ö.,** 2022, Ratlarda Oluşturulan Kritik Boyutlu Kalvaryal Defektlerde Bakteriyel Selüloz Temelli Hidroksiapatit (BS-HAp) Nanokompozitinin Kemik Oluşumu Üzerine Etkisi, *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.*, 12(2):242-250.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J. and Liu, H.,** 2015, Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*, *Carbohydrate Polymers*, 120, 115–119.
- Lotfiman, S., Biak, A., Radiah, D., Ti, T.B., Kamarudin, S. and Nikbin, S.,** 2016, Influence of date syrup as a carbon source on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 0416, *Advances in Polymer Technology*, 37(4),21759.
- Luo, M.T., Huang, C., Chen, X.F., Huang, Q.L., Qi, G.X., Tian, L.L. and Chen, X.D.,** 2017a, Efficient bioconversion from acid hydrolysate of waste oleaginous yeast biomass after microbial oil extraction to bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(10),1025–1031.
- Luo, M.T., Zhao, C., Huang, C., Chen, X.F., Huang, Q.L., Qi, G.X. and Chen, X.D.,** 2017b, Efficient using durian shell hydrolysate as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*, *Indian Journal of Microbiology*, 57(4), 393–399.
- Lustri, W. R., de Oliveira Barud, H. G., Silva Barud, H. d., Peres, M. F. S., Gutierrez, J., Tercjak, A., de Oliveira Junior, O. B., and Ribeiro, S. J. L.,** 2015, Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications, *Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends*, 1:133-57.
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D. and Mohammadi, M.,** 2017, Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace, *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4123–4128.
- Marchessault, R. H., and Sundararajan P. R.,** 1993. Cellulose, p. 11-95 *In* G. O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides*, vol. 2. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N.,** 1993, Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18–22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mensah, A., Chen, Y., Christopher, N. and Wei, Q.,** 2022, Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery, *Bioengineering*, 9(1), 3.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A. and Gidley, M. J.,** 2009, Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC53524, *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 576–583.
- Mishra, S., Singh, P. K. and Pattnaik, R.,** 2022, Biochemistry, synthesis, and applications of bacterial cellulose: a review. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10:1–12.
- Mohammad, N.H., El-Sherbiny, G.M., Hammad, A.A., Abou el- Nour, S.A. and Askar, A.A.,** 2021, Optimization of bacterial cellulose production using Plackett-Burman and response surface methodology, *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 30(4), 93-101.
- Molina-Ramírez, C., Castro, C., Zuluaga, R., Gañán, P.,** 2018, Physical characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter medellinensis* using food supply chain waste and agricultural by-products as alternative low-cost feedstocks, *J. Polym. Environ.* 26,830–837.
- Moon R. J., Martini A., Nairn J., Simonsen J. and Youngblood J.,** 2011, Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites, *Chem. Soc. Rev.* 40, 941–3994.
- Nassiri Mahallati, M.,** 2020, Advances in modeling saffron growth and development at different scales. *Saffron*, 139–167.
- Nicolas, W. J., Ghosal, D., Tocheva, E. I., Meyerowitz, E. M., and Jensen, G. J.,** 2020, Structure of the bacterial cellulose ribbon and its assembly-guiding cytoskeleton by electron cryotomography. *Journal of Bacteriology*.
- Okamoto, T., Yamano, S., Ikeaga, H., and Nakamura, K.,** 1994, Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 563-568.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mélida, H., Mazur, O., Bulone, V. and Zimmer, J.,** 2013, BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17856–17861.
- O'Sullivan A. C.,** 1997, Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207.
- Pa'e, N., Salehudin, M. H., Hassan, N. D., Marsin, A. M. and Muhamad, I. I.,** 2018, Thermal Behavior of Bacterial Cellulose Based Hydrogels with Other Composites and Related Instrumental Analysis. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, 1–25.
- Pandit, A. and Kumar, R.,** 2021, A Review on Production, Characterization and Application of Bacterial Cellulose and Its Biocomposites, *Journal of Polymers and the Environment*, 29(9), 2738–2755.
- Panesar, P. S., Chavan, Y., Chopra, H. K., and Kennedy, J. F.,** 2012, Production of microbial cellulose: Response surface methodology approach, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 930–934.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A. and Johnson, D.K.,** 2010, Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnol. Biofuels* 3,1-10.
- Plackett, R.L. and Burman, J.P.,** 1946, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- Pourramezan, G. Z., Roayaei, A. M. and Qezelbash, Q. R.,** 2009, Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2, *Biotechnology* 8, 150-154.
- Rahman, S. S. A., Vaishnavi, T., Vidyasri, G. S., Sathya, K., Priyanka, P., Venkatachalam, P., and Karuppiyah, S.,** 2021, Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support, *Scientific Reports*, 11(1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramírez-Flores, J., Rubio, E., Rodríguez-Lugo, V and Castaño V. M.,** 2009, Purification of polluted waters by functionalized membranes. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 21: 211- 216.
- Rangaswamy, B. E., Vanitha, K. P., and Hungund, B. S.,** 2015, Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit, *International Journal of Polymer Science*, 1–8.
- Rani, M. U. and Appaiah, A.,** 2011, Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09, *Annals of Microbiology*, 61(4), 781–787.
- Rani, M.U. and Appaiah, K.A.A.,** 2013, Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk, *J. Food Sci. Technol.*, 50,755–762.
- Romling, U., and Galperin, M. Y.,** 2015, Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions, *Trends Microbiol.*, 23, 545–557.
- Rusdi, R.A.A., Halim, N.A., Norizan, M.N., Abidin, Z.H.Z., Abdullah, N., Ros, F.C., Ahmad, N. and Azmi, A.F.M,** 2022, Pre-treatment effect on the structure of bacterial cellulose from Nata de Coco (*Acetobacter xylinum*), *Polimery*, 67:110–118.
- Saleh, A. K., Soliman, N. A., Farrag, A. A., Ibrahim, M. M., El-Shinnawy, N. A., and Abdel-Fattah, Y. R.,** 2020, Statistical optimization and characterization of a biocellulose produced by local Egyptian isolate *Komagataeibacter hansenii* AS.5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 198–207.
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O. and Yang, G.,** 2014, Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545.
- Shoda M. and Sugano Y.,** 2005, Recent advances in microbial cellulose production, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 10, 1–8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sijabat, E. K., Nuruddin, A., Aditiawati, P., Sunendar Purwasasmita, B.,** 2020, Optimization on the synthesis of bacterial nano cellulose (BNC) from banana peel waste for water filter membrane applications, *Materials Research Express*, 7(5), 055010.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., and Tripathi, C. K. M.,** 2017, Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Slatnar, A., Klancar, U., Stampar, F. and Veberic, R.,** 2011, Effect of Drying of Figs (*Ficus carica L.*) on the Contents of Sugars, Organic Acids, and Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11696–11702.
- Soemphol, W., Hongsachart, P. and Tanamool, V.,** 2018, Production and characterization of bacterial cellulose produced from agricultural by-product by *Gluconacetobacter* strains, *Materials Today Proceeding*, 5(5), 11159–11168.
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., and Lee, S.-J.** 2001 Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter sp.A9* in shaking cultures, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), 1.
- Sugiyama, J., Persson, J. and Chanzy, H.,** 1991, Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses, *Macromolecules*, [24\(9\)](#), 2461–2466.
- Surma-Ślusarska, B., Presler, S. and Danielewicz, D.,** 2008, Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter xylinum* culture for application in papermaking, *Fibers Textiles Eastern Europe*, 4:108–111.
- Swingler, S., Gupta, A., Gibson, H., Kowalczyk, M., Heaselgrave, W., and Radecka, I.,** 2021, Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine, *Polymers*, 13(3), 412.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ullah, H., Santos, H. A. and Khan, T.,** 2016, Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery, *Cellulose*, 23(4), 2291–2314.
- Urbina, L., Herná'ndez-Arriaga, A.M., Eceiza, A., Gabilondo, N., Corcuera, M.A., Prieto, M.A. and Retegi, A.,** 2017, By-products of the cider production: an alternative source of nutrients to produce bacterial cellulose, *Cellulose*, 24:2071–2082.
- Vaidya, R., Vyas, P. and Chhatpar, H.,** 2003, Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 92–96.
- Vanaja, K. and Shobha Rani, R. H.,** 2007 *Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design. Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 1–23.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P. and Galvagno, M.** 2013, Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*, *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545–554.
- Velasquez-Riano, M. and Bojaca, V.,** 2017, Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates, *Cellulose*, 24,2677–2698.
- Volova, T. G., Prudnikova, S. V., Sukovaty, A. G. and Shishatskaya, E. I.,** 2018, Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus B-12068*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7417–7428.
- Wang, J. and Wan, W.,** 2009, *Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1), 235–244.
- Wang, S., Jiang, F., Xu, X., Kuang, Y., Fu, K., Hitz, E. and Hu, L.,** 2017, Super-strong, super-stiff macrofibers with aligned, long bacterial cellulose nanofibers, *Advanced Materials*, 29(35), 1702498.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Watanabe A., Morita S. and Ozaki Y.,** 2007, Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I α studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I β , *Biomacromolecules* 8, 2969–2975.
- Wu, J.M. and Liu, R.H.,** 2013, Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydrate Polymers*, 90,116-121.
- Wu, S.-C. and Li, M.-H.,** 2015, Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4), 444–449.
- Yamamoto, H. and Horn, F.,** 1994, In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I α and I β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS)¹³C NMR spectroscopy, *Cellulose*, 1, 57–66.
- Yang, H.J, Taek, L., Kim, J.R., Choi, Y.E. and Park, C.,** 2019, Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 75, 158–163.
- Yang, X., Nisar, T., Liang, D., Hou, Y., Sun, L., and Guo, Y.,** 2018, Low methoxyl pectin gelation under alkaline conditions and its rheological properties: Using NaOH as a pH regulator, *Food Hydrocolloids*, 79, 560–571.
- Yanti, N. A., Ahmad, S. W. and Muhiddin, N. H.,** 2018, Evaluation of inoculum size and fermentation period for bacterial cellulose production from sago liquid waste, *Journal of Physics: Conference Series*, 1116, 052076.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ye, J., Zheng, S., Zhang, Z., Yang, F., Ma, K., Feng, Y. and Yang, X.,** 2019, Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium, *Bioresource Technology*, 274,518–524.
- Zahan, K. A., Nordin, K., Mustapha, M. and Mohd Zairi, M. N.,** 2015, Effect of Incubation Temperature on Growth of *Acetobacter xylinum* 0416 and Bacterial Cellulose Production, *Applied Mechanics and Materials*, 815, 3–8.
- Zeng, X., Small, D.P. and Wan, W.,** 2011, Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup, *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506–513.
- Zhao, H., Xia, J., Wang, J., Yan, X., Wang, C., Lei, T. and Zhang, H.,** 2018, Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources, *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 32,350–356.
- Zhong, C.,** 2020, Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca karşılaştığım her zorlukta değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp yardımını asla esirgemeyen, her zaman anlayış ve sabırla yol gösteren kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR'a tüm desteği ve bana öğrettiği her şey için minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jürisinde yer alarak görüşlerini ve desteklerini paylaşan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Sait SARGIN'a ve aynı zamanda tezde kullanılan mikroorganizmanın tedarikini de sağlayan sayın Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ'e teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans sürecimde değerli bilgi birikimi ve önerilerini esirgemeyen, bana farklı bir bakış açısı kazandıran sayın Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren içtenliğiyle hep yanımda olan, ilk defa geldiğim bu şehre alışmamı sağlayan, tüm stresli zamanlarımda bana destek olan iyi ki tanıdığım değerli arkadaşım Seda SARIYILDIZ'a çok teşekkür ederim. Aynı çalışma ortamını paylaştığım desteklerini hep hissettiğim beni motive eden, bu süreçte çok güzel anılar biriktirmemi sağlayan, hayatımda hep olacak kıymetli arkadaşlarım Bahar BAKAR, Meltem GELEN, Ezgi Ebrar KARATOPAN, Eylem Ece HENDERSON ve Büşra ÇETİNKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Yaşadığım her türlü zorlukta koşulsuz yanımda olan, bana ne kadar şanslı olduğumu hissettiren çok değerli annem Ayşe YILMAZ, babam Hüseyin YILMAZ ve abim Mert YILMAZ'a maddi ve manevi tüm destekleri için yürekten minnettarım.

Bu tez çalışması, 2220183 nolu TÜBİTAK 1002-A Hızlı Destek Modülü kapsamında ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Çalışmanın daha iyi şartlarda ve kapsamlı olarak gerçekleşmesini

sağlayan aldığımız tüm malzemeler ve burs desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan hurda inciri temin eden Işık Tarım A.Ş.'ye çok teşekkür ederim.

29 / 01 / 2024

Merve YILMAZ



ÖZGEÇMİŞ

Merve YILMAZ

Öğrenim Bilgisi:

Yüksek Lisans- (2021-2024) Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü/
Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Y1) (Tezli)

Lisans- (2015-2019) İstanbul Okan Üniversitesi, Mühendislik
Fakültesi/ Genetik ve Biyomühendislik

Çalışmalar:

Yılmaz Merve, Şahyar Buket, Baysal Taner, Göksungur Mehmet Yekta
(2023). Hurda İncirden *Gluconacetobacter xylinus* ile Mikrobiyal Selüloz Üretimi.
22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, Ankara Türkiye, 20-22 Ekim
2023 (Sözlü Sunum)

Üniversite Dışı Denevim:

Staj- (2018) Anadolu Sağlık Merkez (Gebze),
Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Bursiyer-(2023) ARDEB-TÜBİTAK
Proje numarası: 222O183

Bursiyer- (2022-2023) TÜBİTAK-2210/D

EKLER

EK 1. Kullanılan Kimyasallar

EK 2. Kullanılan Malzemeler



EK 1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge E. 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

| Kimyasal Adı Firma | Marka | Katalog Numarası |
|---|--------------------|-------------------------|
| Hurda İncir | Işık Tarım A.Ş | - |
| Fenol | Merck, Almanya | 100206 |
| Sülfirik asit (H₂SO₄) | Merck, Almanya | 100731 |
| Hidroklorik asit (HCl) | Sigma-Aldrich, ABD | 258148 |
| Sodyum hidroksit (NaOH) | Merck, Almanya | 106469 |
| Maya ekstraktı | Oxoid, Almanya | LP0021 |
| Pepton | - | - |
| Sitrik asit | Sigma-Aldrich, ABD | 251275 |
| Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) | - | - |
| Etanol | Tekkim, Türkiye | 200650 |

EK 2. Kullanılan Cihazlar

Çizelge E. 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

| Cihaz Adı | Marka |
|------------------------------|--|
| Analitik terazi | Shimadzu, BL-320H |
| Dijital Hassas Terazi | (Hassasiyet: 0.001), Japonya |
| Biyogüvenlik kabini | Esco, Labculture, Class II BSC, ABD |
| Buzdolabı | Bosch, KGN56VW30N, Almanya |
| Etüv | Memmert, UN 55, Almanya |
| Hassas terazi | Precisa, XB 220A, İsviçre |
| Manyetik karıştırıcı | WiseStir, MSH-20D, Witeg, Almanya |
| Mikroskop | Leica, DM 750, Mannheim, Almanya |
| Otoklav | Hirayama HG-50, Saitama, Japonya |
| pH metre | WTW Inolab 7110, Almanya |
| Santrifüj | Hettich Universal 320 R, Tuttlingen, Almanya |
| Spektrofotometre | Thermo Scientific, Genesys 10S UV-VIS, ABD |
| Statik inkübatör | Nüve, EN 400, Türkiye |
| Çalkalamalı inkübatör | Certomat® BS-1, Sartorius Stedim, Almanya |