

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Yaşar Andelib AYDIN¹, Nuran Devci AKSOY²

GLUCONACETOBACTER HANSENII P2A İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİNİN KİNETİK MODELLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada, çürük erikten izole edilen ve mutasyon direnci sergilediği ispatlanan *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) suşu ile, Hestrin Schramm besiyeri kullanılarak, statik ve karıştırılmalı koşullar altında bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirilmiş, süreç, kinetik modeller ile tanımlanmış ve ilgili parametreler tespit edilmiştir. Sonuçlar, hücre büyümesinin her iki kültürasyon koşulunda da Monod ifadesine uygunluk gösterdiğini ($R^2 \cong 1$) ortaya koymuştur. Monod sabitleri μ_{max} ve K_s , statik ve karıştırılmalı koşullar için sırasıyla, 0.081 h^{-1} , 45.88 g.l^{-1} ve 0.224 h^{-1} , 22.85 g.l^{-1} olarak belirlenmiştir. Ürün oluşumu kinetiği irdelendiğinde ise, Leudeking-Piret modelinin deneysel verilere en uygun model olduğu saptanmış, regresyon katsayıları, statik ve karıştırılmalı koşullar için sırasıyla, 0.96 ve 0.98 olarak hesaplanmıştır. Oluşturulan yüksek hassasiyetteki modeller, *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) ile gerçekleştirilecek pilot ve endüstriyel ölçekli bakteriyel selüloz üretiminin tasarımında temel oluşturacak niteliktedir.

Anahtar **kelimeler:** *Gluconacetobacter hansenii* P2A, Bakteriyel selüloz, Fermantasyon kinetiği

KINETIC MODELLING OF BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION BY GLUCONACETOBACTER HANSENII P2A

ABSTRACT

This study involved the expression of the kinetics of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606); a strain which was originally isolated from a rotten plum. Bacterial cellulose production was realized in Hestrin Schramm medium under static and agitated cultivation conditions. The experimental data were fitted to relevant kinetic models for cell growth and cellulose production and model parameters thereof were calculated accordingly. Results proved that the growth of *Gluconacetobacter hansenii* P2A was best described by Monod equation for both stationary and agitated culture conditions ($R^2 \cong 1$). Monod parameters μ_{max} and K_s were identified as 0.081 h^{-1} , 45.88 g.l^{-1} and 0.224 h^{-1} , 22.85 g.l^{-1} for static and agitated conditions, respectively. For the description of product formation kinetics, Leudeking Piret model was selected according to the relatively high regression coefficients of 0.96 and 0.98, for stationary and agitated culture conditions, respectively. These constructed models of high accuracy are convenient to form the basis for the design of pilot and industrial scale production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606).

Keywords: *Gluconacetobacter hansenii* P2A, Bacterial cellulose, Fermentation kinetics

¹ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

E-posta: erdoganyas@itu.edu.tr

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

E-posta: nuran@itu.edu.tr

Geliş: 30 Eylül 2014 **Düzeltilme:** 19 Aralık 2014 **Düzeltilme:** 09 Şubat 2015 **Kabul:** 10 Şubat 2015

1. GİRİŞ

$\beta(1\rightarrow4)$ bağlı glikoz monomerlerinden oluşan selüloz, bitkilerin yanı sıra bazı mantar ve alg türlerinin de hücre duvarlarının temel bileşenidir. Selülozun, bitkisel kaynaklardan elde edilmesi halinde, başlıcaları hemiselüloz, lignin ve pektin olan safsızlıklardan ayrıştırılması gerekmektedir. Kuvvetli baz ve asit çözeltileri ile gerçekleştirilen saflaştırma adımlarında enerji gereksinimi oldukça yüksektir ve yüklü miktarda sıvı atık ve toksinler açığa çıkar. Bu işlemler sırasında selülozun kristal yapısı, gerilme direnci, su tutma kapasitesi vb. malzeme özellikleri tersinmez şekilde kayba uğrar (Chawla ve ark 2009, Sani ve Dahman 2009).

Selüloz üretiminde alternatif oluşturan ikinci bir biyosentez yolu, Brown'un 1886'da sirke fermantasyonu üzerine yaptığı araştırmalarda sirke anası olarak adlandırılan yapının, *Acetobacter xylinum*'un ürettiği selülozik bir biyofilm olduğunu ortaya koyması ile açığa çıkmıştır (Toyosaki ve ark 1995, Klemm ve ark 2005). Günümüze değin süre gelen çalışmalarla, *Acetobacter xylinum*'un da aralarında bulunduğu *Gluconacetobacter*lerin yanı sıra, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* ve *Zoogloea* gibi bakterilerin, *Valonia*, *Chaetamorphia spp.* gibi bazı alglerin ve *Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum* gibi bazı mantarların ve tulumlular olarak adlandırılan deniz canlılarının da farklı amaçlarla yüksek saflıkta (%95-99) selüloz sentezleyebildikleri ispatlanmıştır. Bu yolla sentezlenen selüloz, bakteriyel selüloz, biyoselüloz ya da mikrobiyel selüloz olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyel selüloz, saflık, kristalinite, mekanik dayanıklılık, biyobozunurluk vb. malzeme özellikleri bakımından bitkisel selülozdan üstündür. Bu nedenle, bakteriyel selüloz ve kompozitleri ilaç, sağlık ve malzeme bilimi alanlarında geniş ilgi uyandırmaktadır (Chawla ve ark 2009, Klemm ve ark 2005, Aydın ve Aksoy 2014). Ancak yüksek maliyet ve düşük verim gibi etkenler bakteriyel selüloz üretiminin endüstriyel boyuta taşınmasını engellemektedir (Choi ve ark 2009).

Bakteriyel selüloz üretimi, genellikle, üretim kapasitesi ve hızı düşük olan statik kültürasyon koşullarında gerçekleştirilir (Bae ve Shoda 2005). Bu koşullarda sentezlenen selüloz besiyeri-hava arayüzeyini kaplayan bir biyofilm şeklindedir (Schramm ve Hestrin 1954, Toyosaki ve ark 1995). Tipik olarak, fermantasyon süreci 7-22 gün sürmekte, üretilen selüloz miktarı ise kullanılan besiyerine bağlı olarak, 0.1-5 g.l⁻¹ aralığında değişmektedir. Selüloz üretim verimi, tüketilen karbon kaynağına bağlı olarak, çoğunlukla 0.1 g.g⁻¹ değerinin altındadır (Sani ve Dahman 2009, Mohite ve ark 2012). Kapasitenin ve üretim hızının artırılması için uygulanan karıştırmalı kültürasyon koşullarında ise, açığa çıkan kesme gerilmesi, bakteri suşlarının mutasyona uğramasına ve selüloz üretme kapasitelerini kalıcı olarak yitirmelerine yol açmaktadır (Park ve ark 2003, Czaja ve ark 2004, Aydın ve Aksoy 2014). Bu koşullarda sentezlenen selüloz, fibrik süspansiyon, küresel parçacıklar veya düzensiz hacimler formunu almakta, özellikle kristalinite ve su tutma özellikleri bakımından kayba uğramaktadır (Czaja ve ark 2004, Klemm ve ark 2005). Bu nedenle, bakteriyel selüloz kullanımının yaygınlaşabilmesi için, mutasyona dirençli bakteri türlerinin izolasyonu ya da kesme gerilmesi etkisini minimuma indireyecek üretim yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Park ve ark 2003).

Hava kaldırmalı (Choi ve ark 2009), döner disk (Krystynowicz ve ark 2002) ve yatay bant tip (Kralisch ve ark 2010) reaktörlerin tasarlanması ile malzeme özelliklerinin kaybı engellenebilmiştir. Bununla beraber, mutasyona dirençli türlerin izolasyonu konusundaki araştırmalar da sürmektedir. Günümüze değin gerçekleştirilen çalışmalarda, tespit edilen en verimli ve dirençli suş, Toyosaki ve ark. (1995) tarafından vişneden izole edilen *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* BPR2001'dir. Bu suşun, optimize edilmiş fermantasyon koşullarında ve besiyeri bileşiminde 14.1 g.l⁻¹ selüloz üretebildiği tespit edilmiş; selüloz üretim verimi ise, 0.33 g.g⁻¹ düzeyine çıkarılabilmektedir (Shoda ve Sugano 2005). Ürün veriminin artırılmasına yönelik bu tip çalışmalarda bir veya birkaç etkenin optimizasyonu gerçekleştirilmiş; ancak sürecin tam olarak anlaşılmasını sağlayacak kinetik çalışmalar göz ardı edilmiştir.

Bu çalışmada, çürük erikten izole edilen ve mutasyon direncine sahip olduğu ispatlanan *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) suşu ile bakteriyel selüloz üretilmesi sürecinin kinetik modellerle açıklanması hedeflenmiştir. Elde edilen veriler, bu suş ile gerçekleştirilecek ticari ölçekli selüloz üretiminin tasarımında temel oluşturacaktır.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroorganizma ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar biyolojik saflıktadır. Selüloz üreten suş, çürük erikten izole edilmiş; biyokimyasal testler ve moleküler yöntemler ile tanımlanarak *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606, GenBANK: KF155166) olarak adlandırılmıştır (Aydın ve Aksoy 2014). Aşı kültürü ve fermentasyonda, Hestrin-Schramm besiyeri (%2.0 glikoz, %0.5 pepton, %0.5 maya özütü, %0.27 Na₂HPO₄, %0.115 sitrik asit) (Schramm ve Hestrin 1954) kullanılmıştır. Statik koşullardaki üretim, 250 mL'lik erlenlerde 50 mL besiyeri hacmi ile gerçekleştirilmiş ve inkübasyon süresi 2 hafta olarak uygulanmıştır. Karıştırılmalı koşullar ise, 1.5 l hacimli, sıcaklık, pH ve oksijen kontrollü bir fermentörde (Electrolab 200), 0.5 vvm oksijen debisi, %70 doluluk oranı ve 120 rpm karıştırma hızı uygulanarak sağlanmıştır. Hacimsel oksijen transfer katsayısı (K_La), dinamik yöntem ile (Tobajas ve García-Calvo 2000), 44.98 h⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tüm deneylerde aşı oranı %10 (v/v), sıcaklık ise 28°C'dir. Deneyler, tekrarlanabilirliğin sağlanması için üç tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

2.2. Kinetik modelleme

Süreç boyunca belirli aralıklarla besiyerinden alınan numunelerde üretilen selüloz miktarı, hücre sayısı ve glikoz derişimi analizleri yapılmıştır. Glikoz analizi için DNS yöntemi kullanılırken (Miller 1959), canlı hücre sayısı yayma plak yöntemi ile belirlenmiştir. Selüloz üretim verimi, sentezlenen selüloz miktarının, tüketilen şeker miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

Glikoz derişimi, hücre sayısı ve ürün derişimi verilerinden faydalanarak mikroorganizma büyümesi, substrat tüketimi ve ürün oluşumu modellenmiştir. Hücre büyümesinin modellenmesinde, enzimatik reaksiyonların kinetiği için geliştirilen Monod modeli (Eş. 1) kullanılmıştır.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (1)$$

Burada S, substrat derişimini (g.l⁻¹), K_s, substrat tüketim sabitini (g.l⁻¹) ve μ_{\max} , maksimum spesifik büyüme hızını (h⁻¹) ifade etmektedir. Ürün oluşumu kinetiği, büyümeye bağımlı ve büyümeden bağımsız ürün oluşumu koşullarını yansıtmak üzere, Marx-Figini ve Pion (Eş. 2) ile Leudeking-Piret (Eş. 3) modelleri kullanılarak irdelenmiştir.

$$\frac{dP}{dt} = k_c P \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha X + \beta \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Burada P, ürün derişimini (g.l⁻¹), k_c, ürün oluşumu hız sabitini (h⁻¹), X, hücre derişimini (g.l⁻¹), α ve β ise sırasıyla durgunluk ve büyüme evrelerine ait hız sabitlerini ifade etmektedir. Leudeking-Piret modeli çözümlendiğinde, ürün oluşumu için Eşitlik 4 ile verilen ifadeye ulaşılmıştır.

$$P = P_0 + \alpha \left(\frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{\mu_{\max}} \right) (1 - \exp(\mu_{\max} t)) \right] + \beta (X - X_0) \quad (4)$$

2.3. Selüloz yapısının analizi

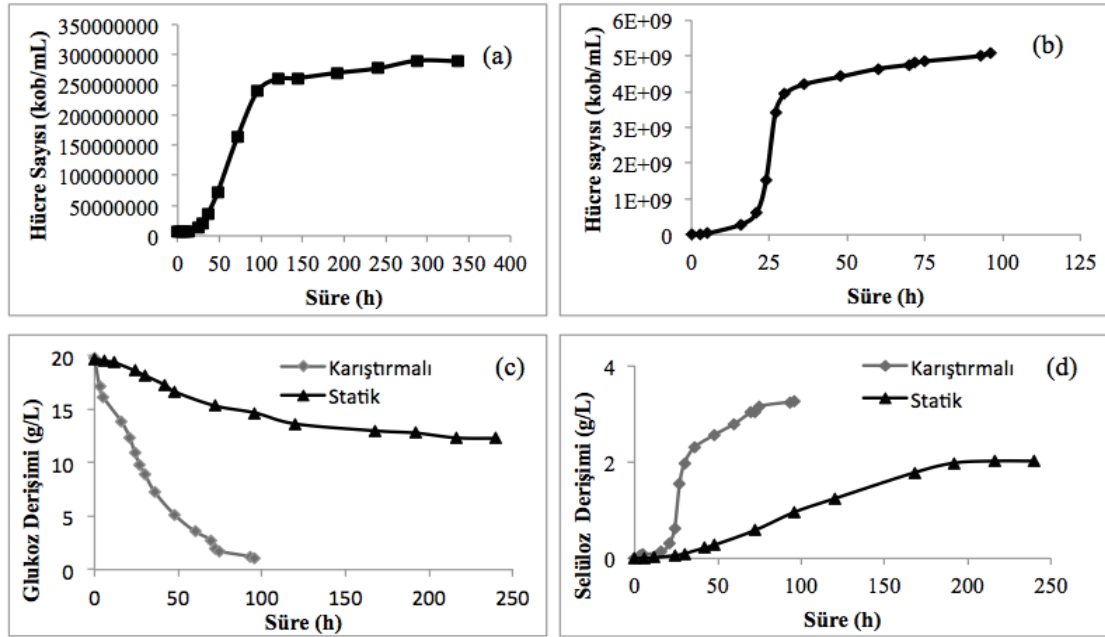
Selüloz numuneleri 4,000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra, 0.1N NaOH çözeltisi içerisinde 20 dk süresince bekletilerek bakteri hücrelerinden ve ortam bileşenlerinden arındırılmıştır. Saflaştırılan selüloz numuneleri, 10 dk süresince 0.1N CH₃COOH içerisinde bekletildikten sonra, distile su ile yıkanmış ve vakum etüvünde 0.1 bar ve 40°C'de kurutularak tartılmıştır. Selülozun kristal yapısının belirlenmesinde X-ışınları kırınımı (PANalytical, XPERT PRO), fibril yapısının gözlemlenmesinde ise, taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 7000 F) kullanılmıştır (Aydın ve Aksoy 2014).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Hücre Büyümesi ve Ürün Oluşumunun Modellenmesi

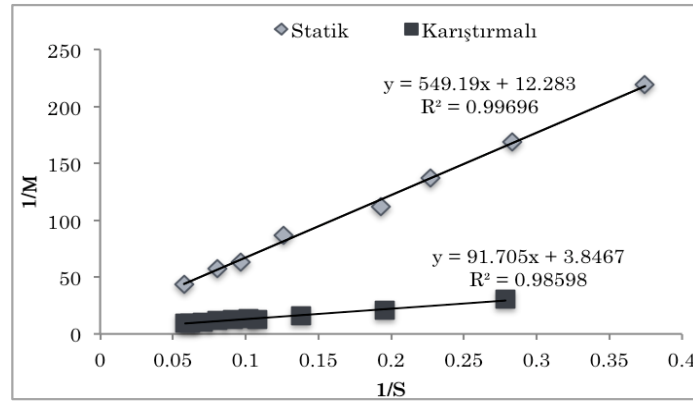
Gluconacetobacter hansenii P2A suşunun HS besiyerinde statik ve karıştırmalı koşullarda geliştirilmesi sonucu elde edilen hücre gelişimi, substrat tüketimi ve ürün oluşumu verileri Şekil 1.a-d’de sunulmuştur. Büyüme eğrileri incelendiğinde, statik koşullarda (Şekil 1.a) ekimi takip eden ilk 10 saatlik sürenin alışıma, 10 ile 30 saat aralığının hızlanma, 30 ile 96 saat aralığının logaritmik ve 96 ile 200 saat aralığının ise, yavaşlama evresi olarak adlandırılabilen görülmüştür. Karıştırmalı koşullarda ise (Şekil 1.b), alışıma evresinin 5 saate kadar gerilediği; hızlanma evresinin 5-20 saat, logaritmik evrenin ise 20-36 saat aralığında sürdüğü saptanmıştır. 36-96 saat aralığında yavaşlama evresi koşulları geçerli olmuştur. 96 saat sonunda ulaşılan canlı hücre sayısı statik koşullara göre oldukça yüksektir. Gerek statik gerekse karıştırmalı koşullar için, glukoz tüketimi (Şekil 1.c), hücre büyümesi ile benzer seyir göstererek alışıma ve logaritmik evrelerde yüksek hızda gerçekleşmiş, durgunluk evresinde ise yavaşlamıştır. Bununla beraber, selüloz oluşumunun (Şekil 1.d) ancak logaritmik evreden itibaren gerçekleştiği ve durgunluk fazında da devam ettiği belirlenmiştir.

*Gluconacetobacter*lerin statik koşullardaki inkübasyonuna ait literatür değerleri incelendiğinde, alışıma fazının genellikle 10-12 saat sürdüğü, karıştırmalı koşullarda ise alışıma evresinin kısaldığı görülmüştür (Park ve ark 2003, Bae ve Shoda 2005). Logaritmik evreye geçiş süresi ise, suşa ve uygulanan besiyerine bağlıdır. Krystynowicz ve ark (2002), *Acetobacter xylinum* E25 suşu ile yürüttükleri çalışmalarında, logaritmik evreye 40. saatten sonra geçilebildiğini bildirmişlerdir. Kongruang (2008) ise, farklı meyve sularını besiyeri olarak değerlendirdiği çalışmasında, incelediği *Acetobacter xylinum* suşlarının logaritmik evrelerinin 4-6 gün, durgunluk evrelerinin ise 6-14 günler arasında sürdüğünü belirlemiştir.



Şekil 1. *Gluconacetobacter hansenii* P2A'nın (a) statik, (b) karıştırmalı koşullardaki büyüme eğrisi, (c) substrat tüketimi, (d) ürün oluşumu (HS besiyeri, 28°C, pH=5.0).

Logaritmik evre verileri kullanılarak maksimum spesifik büyüme hızı (μ_{max}), statik ve karıştırmalı koşullar için sırasıyla, 0.081 h^{-1} ve 0.224 h^{-1} olarak hesaplanmıştır. İklenme süreleri (t_d) ve jenerasyon sayıları (n) ise, statik koşullar için sırasıyla, 8.6 h ve 6.8 olarak belirlenirken, karıştırmalı koşullar için 3.1 h ve 10.3 olarak hesaplanmıştır. Tüm değerlerin karıştırmalı koşullarda gelişme göstermesi, *Gluconacetobacter* mutlak aerob oluşu ile ilişkilendirilmiş ve oksijen derişiminin hücre gelişimi üzerindeki belirleyici rolünü vurgulamıştır. Kongruang (2008), incelediği *Acetobacter xylinum* suşlarının statik koşullardaki spesifik büyüme hızlarının $0.02-0.5 \text{ h}^{-1}$ aralığında olduğunu belirlemiştir. Bae ve Shoda (2005) ise, *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* BPR2001 suşu ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, karıştırmalı koşullarda, başlangıç şeker derişimine bağlı olarak $0.08-0.12 \text{ h}^{-1}$ aralığında değişen değerler elde etmişlerdir. Bu değerlerden hareketle çalışmada tespit edilen logaritmik evre süreleri ve maksimum spesifik büyüme hızlarının literatür ile uyumlu olduğuna karar verilmiştir. Monod parametrelerinin hesaplanması için hücre büyümesi (Şekil 1.a-b) ve substrat tüketimi (Şekil 1.c) verilerinden faydalanılarak Lineweaver-Burke çizimi (Şekil 2) oluşturulmuş; ulaşılan sonuçlar, hesaplanan diğer fermantasyon parametreleri ile birlikte Tablo 1’de özetlenmiştir.



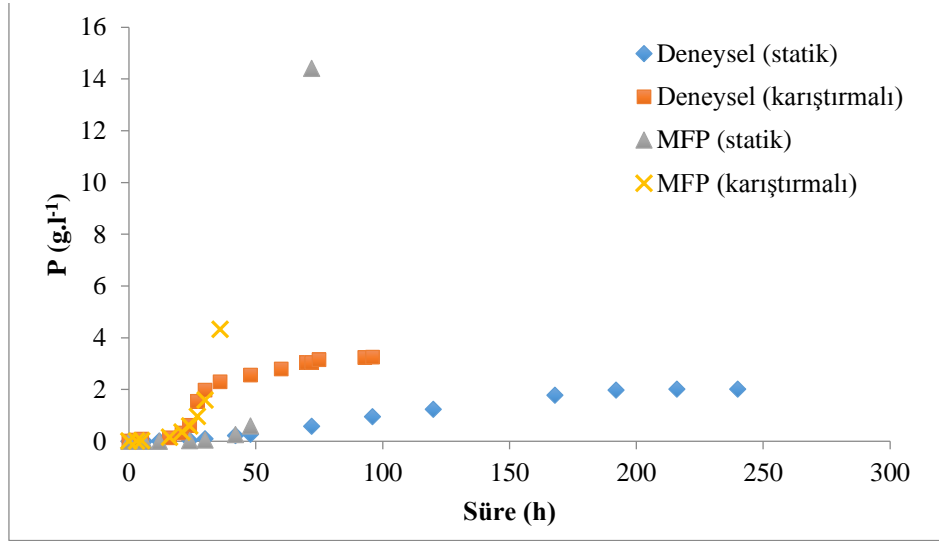
Şekil 2. Lineweaver-Burke çizimi ile Monod sabitlerinin belirlenmesi.

Tablo 1. Hesaplanan fermantasyon parametreleri.

	Selüloz Miktarı (g.l^{-1})	Maksimum Büyüme Hızı ($\text{kob.l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Maksimum Üretim Hızı ($\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Maksimum Tüketim Hızı ($\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})	K_s (g.l^{-1})	Verim (g.g^{-1})
Statik	2.02	$3.85 \cdot 10^6$	0.014	0.044	0.081	45.88	0.107
Karıştırmalı	3.25	$6.3 \cdot 10^8$	0.309	0.722	0.224	22.85	0.172

Ortalama üretim hızı, statik koşullar için $0.006 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$, karıştırmalı koşullar için ise $0.067 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Söz konusu değerler, eşdeğer besiyeri ve kültür koşulları dikkate alındığında literatür verilerinin üzerindedir (Shoda ve Sugano 2005). Bakteriyel selüloz üretiminde verim, şuş ve besiyerine bağlı olarak $0.01-0.4 \text{ g.g}^{-1}$ aralığında değişmektedir (Shoda ve Sugano 2005, Bae ve Shoda 2005, Chawla ve ark 2009). Bu çalışmada elde edilen ürün verimleri, her iki kültivasyon koşulu için de aralık dahilindedir. Ancak, besiyeri bileşiminin ve fermantasyon koşullarının optimizasyonu ile ürün veriminin artırılması mümkündür. Selüloz üretim veriminin karıştırmalı koşullarda artış göstermesi oksijen derişiminin ve etkin pH kontrolünün önemini vurgularken; *Gluconacetobacter hansenii* P2A'nın kesme gerilmesine dirençli bir şuş olduğunu da açıkça ortaya koymuştur.

Ürün oluşumu verileri (Şekil 1.d) Marx Figini ve Pion (MFP) modeline (Eş. 2) uyarlanmış; k_c , statik ve karıştırmalı koşullar için sırasıyla, 0.133h^{-1} ve 0.166h^{-1} olarak hesaplanmıştır. Ancak, modelin deneysel verilere uyumu araştırıldığında, logaritmik evre sonrasında sapmanın hızla arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3). Durgunluk evrelerindeki yüksek sapma nedeniyle, her iki kültivasyon koşulu için de, regresyon katsayısı 0 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, MFP modelinin temel varsayımı olan hücre büyümesi temelli selüloz oluşumu teorisi reddedilmiştir.



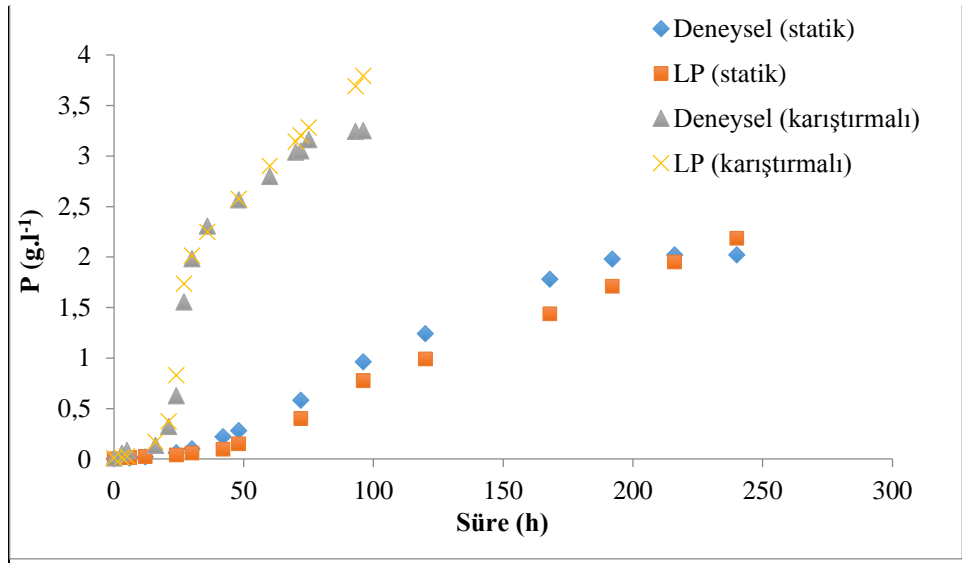
Şekil 3. *Gluconacetobacter hansenii* P2A tarafından gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üretiminin Marx Figini ve Pion modeline uyumu.

Durgunluk evresindeki ürün oluşumunu da kapsayan Leudeking-Piret (LP) modelinin uygulanması sonucunda, statik ve karıştırmalı koşullar için sırasıyla, Eşitlik 6 ve 7 ile verilen model denklikler oluşturulmuştur.

$$P = P_0 + 0.003 \left(\frac{X_{\max}}{0.055} \right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{0.055} \right) (1 - \exp(0.055t)) \right] + 0.261(X - X_0) \quad (6)$$

$$P = P_0 + 0.0036 \left(\frac{X_{\max}}{0.263} \right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{0.263} \right) (1 - \exp(0.263t)) \right] + 0.432(X - X_0) \quad (7)$$

Model denkliklerin deneysel verilerle uyumu incelendiğinde, durgunluk fazında pozitif sapma gösterdikleri (Şekil 4); ancak, sapmanın MFP modeline kıyasla oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Regresyon katsayıları, Eş. 6 ve 7 için sırasıyla, 0.96 ve 0.98 olarak hesaplanmıştır.



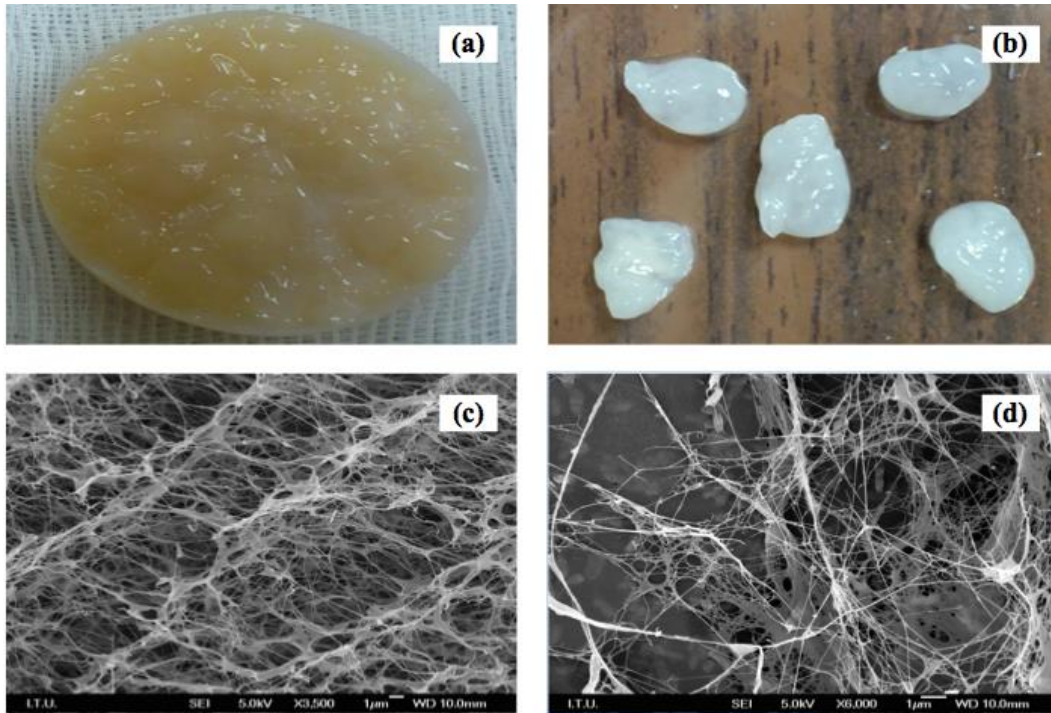
Şekil 4. *Gluconacetobacter hansenii* P2A tarafından gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üretiminin Leudeking-Piret modeline uyumu.

Oluşturulan model denklıklar, deneysel verilere yüksek düzeyde uyum göstermiştir. Ancak, bu modellerin endüstriyel ölçekteki bir üretim sürecini tanımlamakta kullanılabilmesi için büyük ölçekli fermentörlerde (5, 30 ve/veya 50 l) doğrulanması önerilmektedir. Veri noktalarının artırılmasıyla, özgün bir ampirik denklik de oluşturulabilir.

3.2. Sentezlenen Selülozun Yapısal Özellikleri

Sentez koşulları selülozun morfolojik ve yapısal özelliklerini etkilemiştir. Statik koşullarda kalın bir film halinde oluşan selüloz (Şekil 5.a), karıştırmalı koşullarda boncuk formunu almıştır (Şekil 5.b). Elektron mikroskobu görüntüleri, statik koşullarda sentezlenen biyofilmin, 8-10 nm kalınlığında iplikçiklerden oluşan düzenli bir ağ yapısı sergilediğini (Şekil 5.c), karıştırmalı koşullarda sentezlenen selülozun ise düzensiz yapıda olduğunu (Şekil 5.d) göstermiştir.

Sentez koşullarının kristal yapı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için kırınım diyagramlarına başvurulmuştur. Gerek statik, gerekse karıştırmalı koşullar altında sentezlenen selüloz numuneleri, $2\theta=14.70^\circ$, 16.6° ve 22.50° lerde kristal pikleri göstermişlerdir. Söz konusu pikler, doğal selüloz olarak da adlandırılan Selüloz I alomorfunun karakteristik pikleridir (Ford ve ark 2010). Bağlı kristalinite endeksi, statik ve karıştırmalı koşullar için sırasıyla, %78.7 ve %77.3 olarak belirlenmiştir (Aydın ve Aksoy 2014). Bağlı kristalinite endeksindeki %1.4'lük düşüş, %7-10 olarak kabul edilen literatür sınırlarının altındadır (Czaja ve ark 2004).



Şekil 5. *Gluconacetobacter hansenii* P2A tarafından sentezlenen selüloz numunelerine ait görüntüler (a ve c) statik fermantasyon (b ve d) karıştırmalı fermantasyon.

Bakteriyel selülozun kristalinitesi, genellikle %70-90 aralığında ölçülmektedir (Czaja ve ark 2004, Klemm ve ark 2005). Bu çalışmada saptanan değerlerin alt sınıra yakın olması suştan kaynaklanmış olabileceği gibi, sentezlenen selülozun analiz öncesinde, basınç uygulanarak yaprak formuna getirilmemiş olmasından da kaynaklanabilir.

4. SONUÇLAR

Bakteriyel selüloz sahip olduğu yüksek saflık, kristalinite, su tutma kapasitesi, mekanik dayanıklılık, biyouyumluluk, şekil verilebilirlik ve modifikasyon kolaylığı gibi pek çok özellik sayesinde, özellikle tekstil, kozmetik, gıda, kağıt, elektronik ve medikal alanlarda uygulanması araştırılan bir nanomalzemedir. Ancak, bu malzemenin üretimi, yüksek maliyetler ve suşların süreç koşullarından etkilenerek mutasyona uğramaları gibi nedenlerle sınırlı düzeyde kalmıştır (Klemm ve ark 2005).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606)'nın Hestrin Schramm besiyerinde 1 haftalık statik fermantasyon koşulları gözönüne alındığında verim, üretim kapasitesi ve malzeme özellikleri bakımından literatür sınırları dahilinde bakteriyel selüloz üretebildiğini göstermiştir (Park ve ark 2003, Czaja ve ark 2004). Karıştırmalı fermantasyon koşullarında ise, gerek verim, gerekse üretim kapasitesinin artmış olmasının yanı sıra, malzeme özellikleri ve fibril boyutlarının beklenenin altında düşüş sergilemesi, bu şusun bakteriyel selülozun ticari ölçekli üretimi için önemli bir tür olabileceğini vurgulamıştır.

Gluconacetobacter sp. tarafından gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üretimi üzerine yapılan çalışmalar, genellikle bakteri izolasyonu, ürün verimliliği ve malzeme özelliklerinin belirlenmesine yoğunlaşmış, süreç tasarımı için önemli olan fermantasyon kinetiği konusu ise yalnızca birkaç araştırma ile sınırlı kalmıştır. Bu eksiğin giderilmesi için yürütülen modelleme çalışmaları, hücre büyümesinin Monod ifadesiyle, ürün oluşumunun ise LP modeli ile yüksek hassasiyette ($R^2 > 0.95$) öngörülebileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen modeller, ülkemiz kültür kaynakları arasına dahil edilen *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) ile gerçekleştirilebilecek bakteriyel selüloz üretiminin tasarlanmasında ölçek büyütme aşamasında temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- Aydın Y.A. and Aksoy, N. D. (2014) Isolation and Characterization of an Efficient Bacterial Cellulose Producer Strain in Agitated Culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A, *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(3), 1065-1075.
- Bae, S. O. and Shoda, M. (2005). Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter Xylinum* BPR2001 using Molasses Medium in a Jar Fermenter, *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(1), 45-51.
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, *Food Technology and Biotechnology* 47(2), 107-124.
- Choi, C. N., Song, H. J., Kim, M. J., Chang, M. H. ve Kim, S. J. (2009). Properties of Bacterial Cellulose Produced in A Pilot-Scale Spherical Type Bubble Column Bioreactor, *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(1), 136-140.
- Czaja, W., Romanovicz, D. ve Brown Jr., R. M. (2004). Structural Investigations of Microbial Cellulose Produced in Stationery and Agitated Culture, *Cellulose* 11 (3-4), 403-411.
- Ford, E. N. J., Mendon, S. K., Thames, S. F. ve Rawlins, J. W. (2010). X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 5(1), 10-20.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angewandte Chemie International Edition* 44(22), 3358-3393.

- Kongruang, S. (2008). Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* Strains from Agricultural Waste Products, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 148(1-3), 245-256.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Miskiewicz, 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.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry* 31(3) 426-428.
- Mohite, B. V., Kamalja, K. K. and Patil, S. V. (2012). Statistical Optimization of Culture Conditions for Enhanced Bacterial Cellulose Production by *Gluconoacetobacter Hansenii* NCIM 2529, *Cellulose* 19(5), 1655-1666.
- Park, J. K., Park, Y. H. and Jung, J.Y. (2003). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* PJK Isolated from A Rotten Apple, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8(2), 83-88.
- Sani, A. & Dahman, Y. (2010). Improvements in The Production of Bacterial Synthesized Biocellulose Nanofibres using Different Culture Methods, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(2), 151-164.
- Schramm, M. and Hestrin, S. (1954) Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 1: Micromethod for the Determination of Celluloses, *Biochemical Journal* 56(1), 163-166.
- Shoda, M. and Sugano, Y. (2005). Recent Advances in Bacterial Cellulose Production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10(1), 1-8.
- Tobajas, M. and García-Calvo, E. (2000). Comparison of Experimental Methods for Determination of the Volumetric Mass Transfer Coefficient in Fermentation Processes, *Heat and Mass Transfer* 36(3), 201-207.
- Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K., Yamada, F. and Yoshinaga, F. (1995). The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. *nov.*, *Journal of General and Applied Microbiology* 41(4), 307-314.

