ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gluconoacetobacter xylinum SUŞLARININ (A06O2 ve B759) PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yerbol İMANALİYEV

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2011

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Yerbol İMANALİYEV tarafından hazırlanan **"*Gluconoacetobacter xylinum* Suşlarının (A06O2 ve B759) Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması 20/04/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği ABD

Juri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği ABD

Üye: Prof. Dr. Kadir HALKMAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği ABD

Üye: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özer KOLSARICI
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Gluconoacetobacter xylinum SUŞLARININ (A06O2 ve B759) PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yerbol İMANALİYEV

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Selüloz dünyada çok yaygın olması nedeniyle endüstriyel üretimlerde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Geleneksel olarak selüloz bitki kaynaklarından elde edilmektedir. Alternatif selüloz kaynağının bakteriyel selüloz olabileceği araştırmacılar tarafından düşünülmüştür. Çünkü bakteriyel selüloz saf ve fiziksel özellikler bakımından bitkisel selülozdan üstün niteliklere sahip olduğu saptandığından yeni bir fonksiyonel materyal olarak dikkatleri üzerine toplamıştır. Bakteriyel selüloz; kâğıt, tekstil, gıda endüstrisi ve tıpta kullanılmaktadır. Bu polisakkaritin büyük miktarda üretimi onun maliyetine bağlı bulunmaktadır. Böylece daha önce yapılan araştırmalar suş ve süreç geliştirme üzerinde yoğunlaşmıştır. Plazmit içeriği belirlenecek olan *Gluconoacetobacter xylinus* A06O2 suşudur, kontrol suşu olarak ABD Tarım Bakanlığından (USDA ARS Culture Collection) temin edilen *Gluconoacetobacter xylinus* NRRL-B759 kullanılmıştır. Bu suşlara ait çeşitli özellikler daha önceki çalışmada saptanmıştır. Çalışmada ise yukarıda belirtilen *Gluconoacetobacter xylinus* suşlarının plazmid içeriklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda A06O2 suşu plazmit içermediği buna karşın NRRL-B759 kontrol suşunda 10.7 kb'lık bir plazmid bulunmuştur. Buna göre iki suşun plazmit içerikleri bakımından farklı olduğu saptanmıştır.

Nisan 2011, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Gluconoacetobacter xylinum*, bakteriyel selüloz, plazmit izolasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF PLASMID PROFILES OF *Gluconoacetobacter xylinum* STRAINS (A06O2 AND B759)

Yerbol İMANALİYEV

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Cellulose demand is so high in the world which is used for various purposes of industrial production. Traditionally, cellulose is obtained from plant sources. In addition that researchers examined the different source of cellulose according to theis decision bacterial cellulose might be possible candidate. Because bacterial cellulose is pure and its superior qualifications were unique based on their physical properties so it was accepted as a new functional material. Bacterial cellulose is used in paper, textile, food industry and also in medicine. The barrier of large production of this polysaccharide is cost of production. For this reason earlier studies were focused on the strain selection and process development. Our study concentrated on genetic studies mainly to elucide plasmid profiles of two different strains which are Gluconoacetobacter xylinus A06O2 and NRRL-B 759. According to the result of the study; Native strain A06O2 does not have any plasmid. In a contrast control strain NRRL-B 759 have 10.7 kb of plasmid. So two strains were different from each other.

April 2011, 55 pages

Key Words: *Gluconoacetobacter xylinum*, bacterial cellulose, plasmid isolation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen Aylin AKOĞLU'na, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yönlendiren Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN'a, bilimsel çalışmaların yanında her aşamada pratik çözümleriyle bir hoca bir arkadaş olarak destek olan Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen eşim ve çocuğuma en derin duygularla teşekkür ederim.

Yerbol İMANALİYEV
Ankara, Nisan 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET…….. i
ABSTRACT…….. ii
TEŞEKKÜR…… iii
SİMGELER DİZİNİ……..… v
SEKİLLER DİZİNİ……..…. vi
ÇİZELGELER DİZİNİ……..…. vii
1. GİRİŞ……..…. 1
2. KURUMSAL TEMELLER……..…. 5
2.1 Asetik asit bakterilerinin özellikleri ve sınıflandırılması……..…… 5
2.2 *Gluconoacetobacter xylinum*…….… 8
2.3 Bakteriyel selülozun özellikleri ve yapısı……..…… 9
2.3.1 Bakteriyel selüloz sentezleyen mikroorganizmalar…….…… 13
2.3.2 Bakteriyel selüloz biyosentezi…….....…. 15
2.3.3 Bakteriyel selüloz üretiminin yöntemleri ve etkileyen faktörler……..….. 19
2.3.4 Bakteriyel selülozun kullanım alanları……... 24
2.4 Plazmit DNA'nın özellikleri ve yapısı……..…….… 29
3. MATERYAL ve YÖNTEM…….…. 31
3.1 Materyal……..….. 31
3.1.1 Mikroorganizmalar……..…. 31
3.1.2 Besiyeri……..…. 31
3.2 Yöntem…….…... 32
3.2.1 Plazmit DNA izolasyonu……..…..... 32
3.2.1.1 Plazmit DNA izolasyonu kiti I ile yapılan çalışmalar…….…… 32
3.2.1.2 Klasik yöntemiyle plazmid DNA izolasyonu……..... 34
3.2.1.3 Plazmit DNA izolasyonu kiti II ile yapılan çalışmalar……..…. 36
3.2.1.4 Plazmit büyüklüklerinin hesaplanması....…… 37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA……..…….. 39
5. SONUÇ……..….. 49
KAYNAKLAR……..……. 50
ÖZGEÇMİŞ……..…….. 55

SİMGELER DİZİNİ

AAB	Asetik asit bakterileri
BOI	Biyolojik oksijen ihtiyacı
BS	Bakteriyel selüloz
CMC	Karboksimetil selüloz
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
OFR	Okuma çerçevesi (open frame reading)
PEG	Polietilen glikol
PHB	Polihidroksibütirat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Asetikasit EDTA
TBE	Tris Borikasit EDTA
UDP Glc	Uridin difosfoglukoz sentezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Gluconoacetobacter xylinum*'un elektron mikroskobu görüntüsü……..... 8
Şekil 2.2 Selülozun moleküler yapısı……..... 12
Şekil 2.3 Bakteriyel (a) ve bitkisel (b) selülozun yapısı……..... 12
Şekil 2.4 Bakteriyel selüloz oluşumunun şematik gösterimi……..... 16
Şekil 2.5 *Gluconoacetobacter xylinum*'da selüloz oluşum mekanizması…… 17
Şekil 2.6 *Gluconoacetobacter xylinum*'da selüloz sentezinin biyokimyasal mekanizması……..... 18
Şekil 2.7 *Gluconoacetobacter xylinum*'un karbon metabolizması…… 19
Şekil 2.8 Statik yöntemle bakteriyel selüloz üretimi…….. 20
Şekil 2.9 Dönen disk reaktörü……23
Şekil 2.10 Bakteriyel selüloz ile kaplanmış yara…….. 25
Şekil 2.11 Elektronik kâğıt……..... 27
Şekil 2.12 "Arts & Humanities Research Council" grubunun yetiştirdiği giyimler……..... 28
Şekil 4.1 Kültürün geliştirilmesinde besiyerine aktararak ve onu arttırarak yapılan yöntem …… 41
Şekil 4.2 Agaroz jel elektroforezi sonucu (22.10.2010)……..... 43
Şekil 4.3 Agaroz jel elektroforezi sonucu (12.11.2010)……..... 44
Şekil 4.4 12.11.2010 tarihinde yapılan çalışmada izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin hesaplanması…… 44
Şekil 4.5 Agaroz jel elektroforezi sonucu (26.11.2010)……..... 46
Şekil 4.6 26.11.2010 tarihinde yapılan çalışmada izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin hesaplanması…… 46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Acetobacteraceae familyasının üyeleri…… 6
Çizelge 2.2 Selüloz üreten mikroorganizmalar……...15
Çizelge 4.1 Değiştirilmiş protokolün koşulları……...42
Çizelge 4.2 12.11.2010 tarihinde yapılan çalışmaların sonucu……...45
Çizelge 4.3 26.11.2010 tarihinde yapılan çalışmaların sonucu……...47

1. GİRİŞ

Mikrobiyel selüloz bitki kaynaklarından elde edilen biyopolimerdir. Selüloza göre birçok avantajlara sahip olup gıda, kozmetik, tekstil ve klinik amaçlar için yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır.

Dünya nüfusunun hızlı artışı ve selüloza olan ihtiyacın artması bakteriyel selüloza olan ilgiyi teşvik etmiştir.

Bu konuda yapılan çeşitli araştırmalarda *Gluconoacetobacter xylinum* plazmitlerinin selüloz üretiminde rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Rezaee vd. (2005) çalışmalarında *Gluconoacetobacter xylinum*'un Fars tipi suşunun plazmit içerikleri belirlenmiş ve bu suşta bulunan 44 kb'lık plazmidin selüloz üretimi ile ilişkisi üzerinde durulmuştur. Bu plazmit düşürüldüğünde, plazmidi düşürülmüş suş doğal bir suşla selüloz üretimi ile kıyaslandığında selüloz üretiminin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Bakteriyel selülozun endüstrideki önemi ve kullanımı son 30 yılda ciddi oranda artmıştır. Endüstride ve özellikle biyoteknolojide hızla gelişen yöntemler bazı sanayi ürünlerinin teknolojik olarak üretimine olanak sağlamıştır. Endüstride kullanılan en önemli kaynaklardan birisi şüphesiz selülozdur. Selüloz bir biyopolimer olup, bitkilerde hücre duvarı yapısında bulunan temel yapı maddesidir. Doğal bir polimer olan selüloz dünyada çok yaygın olması nedeniyle kağıt ve pamuk endüstrisinde önemli bir yer edinmiş durumdadır. Günümüzde selüloz esas olarak bitki kaynaklarından elde edilmektedir. Ancak her yıl yangınlar ve diğer nedenlerle sahip olduğumuz orman alanları giderek azalmaktadır. Kâğıt üretiminin yanı sıra selülozun katıldığı diğer üretim dalları da dikkate alındığında yeni üretim kaynaklarının bulunması daha da önem kazanmaktadır. Dünya orman varlığının azalması ve son yıllarda biyoteknolojinin hızla ilerlemesi ile araştırmacılar bitkiler olmadan da selüloz üretebilmenin yollarını aramışlardır. Bakterilerin melas, peynir altı suyu gibi ucuz atık maddeler üzerinde kolaylıkla geliştirilebilmesi ve 1 hektar yüzey alanına sahip statik kültürden yılda yaklaşık 10 000 kg bakteriyel polimer elde edilmesine karşılık, aynı alan ve sürede

sadece 600 kg pamuk yetiştirilmesi ekonomik boyutun irdelenmesi açısından çarpıcıdır (Saxena ve Brown 1997).

Selüloz dünyada bitki üretimiyle sonuçlanan fotosentez olayına bağlıdır. Karbon döngüsünün en önemli sonlandırıcıları, toprakta ve hayvanların bağırsaklarında bulunan mikroorganizmalardır (Lynd vd. 2002). Selüloz dünyada en çok bulunan ve ekonomik değere sahip bir maddedir. Pamuğun % 94'ünden fazlası, ağacın %50'sinden fazlası selülozdan oluşmaktadır (Brown 2006).

Selüloz bir biyopolimer olup, bitkilerde hücre duvarı yapısında bulunan temel yapı maddesidir. Doğal bir polimer olan selüloz dünyada çok yaygın olması nedeniyle kâğıt ve pamuk endüstrisinde önemli bir yer edinmiş durumdadır. Selüloz biyopolimeri dört yolla elde edilmektedir. Bunlardan ilki ve en iyi bilineni selülozun bitkilerden elde edilmesidir. Endüstride yaygın olarak kullanılan bu yöntemde lignin ve hemiselülozun selülozdan ayrılması gerekmektedir. İkinci yöntem ise selülozun çeşitli mikroorganizmalardan biyosentez yolu ile elde edilmesidir. Bunlardan en çok bilinenleri algler (*Vallonia*) küfler, (*Saprolegnia*, *Dictystelinum discoideum*) ve bakterilerdir (*Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea*). Fakat bu bakterilerin hiçbiri selülozu ekstraselüler olarak sentezleyememektedir (Klemm vd. 2001).

Selüloz esas olarak bitkisel kaynaklardan elde edilmekte, fakat her yıl yangınlar ve diğer nedenlerle sahip olduğumuz orman alanları giderek azalmaktadır. Kâğıt üretiminin yanı sıra selülozun katıldığı diğer üretim dalları da dikkate alındığında yeni üretim kaynaklarının bulunması daha da önem kazanmaktadır. Bakteriyel selüloz üretimi, bitkisel selüloz üretimine göre 40 kez daha hızlıdır (Brown 2006).

Dünyada kağıt tüketimi sürekli olarak artmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde 1983 yılında 41 milyon ton kâğıt tüketilirken, 1996 yılında bu değer 64 milyon tona çıkmıştır. 2010 yılında bu değerin 105 milyon ton olacağı tahmin edilmektedir. ABD'de yıllık kağıt tüketimi 100 milyon tondur. Çin'de kağıt tüketimi 26 milyon ton, Kanada'da 18 milyon ton ve Almanya'da 16 milyon tondur. Her yıl dünyada ormanların % 1,3'ü yani

yaklaşık 40 milyon hektarlık alan kâğıt üretiminde kullanılmak üzere kesilmektedir. Bu Paraguay veya İsviçre büyüklüğünde bir topraktır. Ayrıca kâğıt fabrikalarının ciddi enerji tüketimi ve çevreyi kirletmeleri söz konusudur. Üretim esnasında önemli miktarda gaz emisyonu, atık su ve katı atık oluşmaktadır. Bu atık suların BOI (Biyolojik Oksijen ihtiyacı) değerleri oldukça yüksektir. Ayrıca fosfor ve azot atık sulara karışıp doğaya salınmaktadır (Öztürk 2005).

Hızlı nüfus artışı, ağaç ve bitkilerden selüloz üretiminin devam etmesi nedeni ile birçok alanda dünya çapında tehlikelere sebep olmaktadır. Bu olay doğrudan dünyanın karbon döngüsüne etki etmektedir. Bu koşullar altında dünya çapındaki karbon döngüsünde selülozun yerini iyi anlamalıyız. Dünyadaki karbon döngüsü; atmosferdeki CO_2'in, fotosentez yoluyla ayrıştırılması, organik ürünlere fiksasyonu arasında çok geniş bir etkileşim söz konusudur. Endüstriyel çağın ortaya çıkmasıyla küresel ısınma tetiklenmiştir (Brown 2006).

Mikrobiyel selüloz, diğer kaynaklardan elde edilen selülozlara göre daha yüksek kaliteye ve çok önemli özelliklere sahiptir. Çok ince ağ yapısına, yüksek kristalize değerine ve önemli oranda mekaniksel dirençliliğe sahiptir. Bundan başka uzun zincir yapısına sahip olması, yüksek oranda kimyasal saflığa sahip olması, su tutma kapasitesi yüksek olması, katlanınca şeklini koruyabiliyor olması, üretim esnasında şekil modifikasyonlarına uygun bir biyopolimer olması selülozun bu türünü en önemli polimer etmektedir. Bu özelliklerinden dolayı kullanım alanı çok geniştir. Dayanıklı kağıt üretiminde, gıda, kozmetik ve deri sanayisinde kullanma potansiyeli yüksektir. Yüksek su tutma kapasitesinden dolayı plastik cerrahide ve özellikle de yanıkların tedavisinde kullanılması üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Çok başarılı uygulamaları olmuştur (Bielecki vd. 2000).

Bu güne kadar mikrobiyel selülozun üretim maliyetinin yüksek olması kullanımını kısıtlamıştır. Ancak yakın zamanda bakteriyel selüloz üzerine yapılan araştırmaların çoğu yüksek selüloz üretme kapasitesine sahip suşların bulup ucuz hammaddeleri kullanarak selüloz üretimini gerçekleştirmeye yöneldiğini göstermektedir.

Bu çalışmada TÜBİTAK tarafından desteklenen TOVAG 1050156 "Selüloz Üretiminde Kullanılacak Mikroorganizmaların izolasyonu, moleküler tanısı ve Mikrobiyel selülozun gıda sanayisinde kullanım olanaklarının araştırılması" adlı projede kullanılan B 759 suşu ile A06O2 suşları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu nedenle çalışmada suşların plazmit içerikleri belirlenerek plazmit içerikleri bakımından farklı olup olmadığı araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Asetik asit bakterilerinin özellikleri ve sınıflandırılması

Etanolü asetik aside okside eden mikroorganizmalar asetik asit bakterileri olarak adlandırılmaktadır. Asetik asit bakterileri (AAB) Gram negatif, elipsoitten çubuk şekline kadar değişen, tek, çift veya zincir şeklinde görülen bakterilerdir. Flagella bulunma durumuna göre hareketsiz ve hareketli (peritrik veya polar) tipleri bulunmaktadır. Olumsuz koşullardan korunmak üzere endospor oluşturmazlar.

Zorunlu aerob, oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanan metabolizmaya sahiptir. AAB gelişimi için en uygun pH aralığı 5–6,5'dur. Bununla birlikte bu bakteriler pH 3–4 arasında da üreyebilirler. AAB 0,4–1 μm genişliğinde ve 0,8–4,5 μm uzunluğundadır. Bunlar katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir. Katı ortamlarda üredikleri takdirde pigment meydana getirebilir ve farklı özelliklerde polisakkarit üretirler (De Ley vd. 1984).

AAB şekerli ortamlarda, alkol fermantasyonu gelişmiş gıdalarda, hafif asitli ortamlarda (nişlerde) örneğin çiçekler, meyveler, bira, şarap, elma şarabı (cider), sirke, ekşimiş meyve sularında ve balda bulunurlar. Bu substratların üzerinde şekerleri ve alkolü okside ederler. Son ürün olarak ortamda organik asitlerin birikimine neden olurlar (Raspor ve Goranovič 2008).

AAB'nin önemli özelliklerinden biri de çok çeşitli substratları okside edebilme kabiliyetinde olmalarıdır. Bu şekilde ortamda, metabolik ürünlerinin birikmesi sağlanmaktadır. Bu özellik, temelde hücre membranında yer alan dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Doğal olarak bu dehidrogenazlar sitokrom zinciri ile yakından ilgilidir (Matsushita vd. 1985).

Taksonomik açıdan AAB, *Proteobacteria*'nın α-alt grubu olan Acetobacteraceae familyası içinde sınıflandırılmaktadır. Acetobacteraceae familyası 10 cinsten oluşmaktadır (Çizelge 2.1). Asetik asit üreten çeşitli bakteriler bulunmakla birlikte,

Acetobacter, *Gluconoacetobacter* ve *Gluconobacter* cinsinden bakteriler ticari olarak kullanılmaktadır (Raspor ve Goranovič 2008).

Çizelge 2.1 Acetobacteraceae familyasının üyeleri

<table>
<tr><td>Acetobacter</td><td>Gluconoacetobacter</td><td>Gluconobacter</td><td>Acidomonas</td></tr>
<tr><td rowspan="15">A. aceti
A. orleanensis
A. estunensis
A. indonesiensis
A. tropicalis
A. cibinongensis
A. orientalis
A. syzygii
A. cibinongenesis
A. orientalis
A. cerevisiae
A. malorum
A. oeni
A. nitrogenifigens
A. pasteurianus
A. peroxydans
A. pomorum
A. lovaniensis
A. syzygii</td><td rowspan="15">Ga. liquefaciens
Ga. diazotrophicus
Ga. sacchari
Ga. johannae
Ga. azotocaptans
Ga. xylinum
Ga. hansenii
Ga. europaeus
Ga. entanii
Ga. oboediens
Ga. intermedius
Ga. swingsii
Ga. rhaeticus
Ga. saccharivorans
Ga. nataicola</td><td>G. oxydans
G. albidus
G. cerinus
G. frateurii
G. thailandicus</td><td>Ac. methanolica</td></tr>
<tr><td>Asaia</td><td>Kozakia</td></tr>
<tr><td rowspan="13">As. siamensis
As. bogorensis
As. krungthepensis</td><td rowspan="13">K. baliensis</td></tr>
<tr><td colspan="2">Neoasaia
Neoasaia chiangmaiensis</td><td rowspan="2">Swaminathania
S. salitolerans</td><td rowspan="2">Saccharibacter
Sa. floricola</td></tr>
<tr><td colspan="2">Granulibacter
G. bethesdensis</td></tr>
</table>

Acetobacteraceae familyasında bulunan cinslerden *Acidomonas, Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia* ve *Granulibacter* sadece birer tür içermektedir. Bu suşlar asetik asit bakterilerinin izole edildiği sirke, şarap, meyve ve çiçekler gibi kaynaklardan nadiren izole edilebilmektedir. *Acidomonas* suşları ise çoğunlukla atık sudan izole edilmiştir (Yamashita vd. 2004). Diğer dört cins *Acetobacter, Gluconobacter, Gluconoacetobacter* ve *Asaia*'nın asetat ve laktat oksidasyon testinin yanı sıra etanolden asetik asit oluşturma gibi iki testle fenotipik olarak cins düzeyinde tanısını yapmak mümkündür. *Acetobacter* cinsinin suşları asetat-laktat oksidasyon testinde hızlı ve belirgin bir şekilde lacivert renk, asetik asit üretim testinde asetik asit oluşturur. *Gluconobacter* suşları ise asetat ve laktat oksidasyonu testi

sonucunda genellikle açık sarı renk oluşturur. *Acetobacter* suşlarının aksine *Gluconoacetobacter* (*Ga*) suşları hızlı bir mavi renk oluşumu gerçekleştiremez. *Asaia* suşları ise etanolden az miktarda asetik asit üretmesiyle diğer 3 cinsten farklılık gösterirken, asetat ve laktat oksidasyonunda renk değişiminin oluşumu da son derece yavaştır (Yamada ve Yukphan 2008).

Ga. xylinum iki ana amfibolik yoldan karbon metabolizmasını gerçekleştirir. Bunlar; karbonhidratların oksidasyonu için pentoz fosfat yolu ve organik asitler vb. bileşiklerin oksidasyonu için Krebs döngüsüdür. Fosfofrüktokinaz aktivitesi bulunmadığı ya da çok zayıf olduğu için glikolitik aktivite çok zayıftır veya gözlenmez. Bu nedenle glikoz, anaerobik olarak metabolize edilemez. Ancak *Ga. xylinus* subsp. *sucrofermentans* BPR2001'in fosforüktokinaz aktivitesine sahip olduğu da belirlenmiştir (Vandamme vd. 1998).

AAB'nin fizyolojik ve kemotaksonomik testlerle tanısının yapılması mümkün olmakla birlikte, bu yöntemler uzun zaman gerektirmesi ve elde edilen sonuçların güvenilir olmaması nedeniyle tanının moleküler tekniklerle yapılması tercih edilmektedir. Bu amaçla DNA ve rRNA hibridizasyon yöntemleri, dizi analizleri ya da farklı PZR yöntemlerinden yararlanılmaktadır (González vd. 2004).

BS üreten suşların izolasyonu ve tanısı üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştiren bakterilerin taranmasında De Wulf vd. (1996) tarafından önerilen yöntemin yanı sıra glikozu glukonik aside metabolize edemeyen bir *Ga. xylinus* suşu $CaCO_3$ içeren besiyerinden izole edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, BS üreten sekiz suş, çürümüş üzüm ve geleneksel yöntemle üretilmiş sirkeden izole edilmiştir. Çalkalamalı kültürde nispeten değişmeyen bir BS üretimi gerçekleştirilen izolat, biyokimyasal ve fizyolojik testlerle *Ga. xylinum* olarak tanımlanmıştır (Changjin vd. 2002).

BS üretim kapasitesi yüksek izolatların tanısında biyokimyasal testlere ilave eden protein jel elektroforezi ile cluster analizinden ve 16S-23S rDNA internal transcribed spacer bölgelerinin tanısı yöntemlerinden de yararlanılmıştır (Trček ve Teuber 2002).

2.2 *Gluconoacetobacter xylinum*

Hestrin ve Schram (1954) liyofilizle *Gluconoacetobacter* hücrelerinin bakteriyel selüloz sentezlediğini ispatlamalarının ardından *Gluconoacetobacter xylinum* selüloz üretimi çalışmalarında model mikroorganizma olarak kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 2.1'de *Gluconoacetobacter xylinum*'un elektron mikroskobundaki görüntüsü yer almaktadır (Brown 2006).



Şekil 2.1 *Gluconoacetobacter xylinum*'un elektron mikroskobu görüntüsü.

Bu bakteri doğada çiçeklerin ve meyvelerin yüzeylerinde yer almaktadır, şaraplardan ve diğer fermantasyon ürünlerinde sirke üretiminde çok önemli bir ticari öneme sahiptir. Bunlar çok kuvvetli aerobik (oksijene ihtiyaç duyan) organizmalardır ve genellikle maya gibi fermantatif organizmalarla aktivite gerçekleştikten sonra büyümekteler. En önemli karakteristik özelliklerinden bir tanesi; etanolü asetik aside okside etmeleridir, bu nedenle genellikle asetik asit bakterileri olarak bilinmektedirler (http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/biotech-envirron/cellulose/axylin.htm).

2.3 Bakteriyel selülozun özellikleri ve yapısı

Öncelikle *Ga. xylinum* bakterisinin ikincilik metaboliti olarak tanımlanmamış ve izole edilmemiş olsa da, sirke ürününde ortak olan selüloz tabakası yüzyıllardır Kabucha çayı ve Nata-de-Coco olarak kullanılmıştır. Brown, sirke fermantasyonunda asetik asit bakterisiyle çalışırken standart çalışmasının dışında mayalanma sıvısının yüzeyinde peltemsi, jelatinimsi bir yığın oluştuğunu gözlemlemiştir. Bu kütle yığını "sirke anası" olarak belirlenmiştir. Bu materyalin yırtılmaya dayanıklı olduğu görülmüştür. Bu tabakanın, ilerleyen analizlerde selüloz olduğu görülmüştür. Sorumlu olan bakteri o zamanlar *Bacterium xylinum* olarak tanımlanmıştır (Lapuz vd. 1967).

İlk kez Brown tarafından sirke fermantasyonu sırasında, sıvı yüzeyde oluşan jelatinimsi yapıdan izole edilen *Gluconoacetobacter xylinum'un*, uygun bir besi ortamında üretildiğinde, yüksek miktarda ekstraselüler jelatinimsi bir yapı sentezlediği belirtilmiştir. Son 30 yılda yapılan çalışmalar selüloz üretebilen bakteriler üzerinde yoğunlaşmış ve bakteriler tarafından üretilen bu selüloza da "Bakteriyel Selüloz" adı verilmiştir (Bielecki vd. 2000).

Asetik asit bakterileri α-Proteobakteriler içindeki Acetobacteracea familyasında olup, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconoacetobacter*, *Asaia* ve *Kozakia* olmak üzere altı cinsi içermektedir (Holt vd. 1994).

Gluconoacetobacter cinsi içinde; *Ga. xylinum, Ga. pasteurianus, Ga. aceti, Ga. hansenii, Ga. lovaniensis, Ga. liquefaciens* türleri selüloz üretimi en iyileri olarak bilinmektedir. Bu bakterilerinin, doğal kaynaklardan izolasyonu için Hestrin ve arkadaşları ile birlikte Frauter ve Simonart'ın önerdiği yöntemler ile Fratuer ve Carr'in çalışmalarında kullandıkları metotlardan da yararlanılmaktadır. Bakteriyel selüloz, metabolizmanın ilk ürünü olan ekstraselüler bir polimerdir ve hücreyi koruyucu olarak görev yapar. Bitkisel selüloz ise hücrenin yapı elemanı olarak işlev görür. *Ga. xylinum'un* sentezlediği selülozun depo materyali olarak kullanıldığı da ileri sürülmektedir (Bielecki vd. 2000).

Selüloz tabakanın, viskozitesi ve hidrofilik özellikleri nedeniyle bakterileri kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) karşı koruduğu da bilinmektedir. Ayrıca bakteriyel selülozun, bakterileri UV ışınına karşı koruduğu da belirtilmektedir. UV ışınına 1 saat maruz kalan, bakteriyel selüloz ile örtülü olan asetik asit bakterilerinin % 23'nün canlı kalmaya devam ettiği belirtilmiştir (Ross vd. 1991).

Selüloz, β-1,4 bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz birimlerinin, suda çözünmeyen, dallanmamış yapıdaki polimer bileşikleridir. Yoğun olarak araştırılan bakteriyel selüloz, kimyasal olarak bitkisel selüloz ile aynı olmasına rağmen, bakteriyel selülozun moleküler yapısı ve fiziksel özellikleri bitkisel selülozdan farklıdır. Bakteriyel selülozun, fibril ağ çapının 0,1 μm olduğu belirtilmektedir, bu çap bitkisel selülozun yaklaşık % 1'i kalınlığındadır. Bakteriyel selülozun makroskobik görüntüsü kültür koşullarına bağlıdır. Durgun koşullarda (çalkalamasız) sıvı besi ortamının üst yüzeyinde (oksijence zengin olan kısım) selüloz tabaka oluşur. Selülozun subfibrilleri devamlı olarak bakteri hücresinin yüzeyindeki porlardan dışarı çıkar ve kristalize olmuş mikrofibriller birbirlerine paralel bir şekilde bulunurlar (Jonas ve Farah 1998).

Çalkalamalı kültürlerde gelişen bakteriyel selüloz ise düzensiz, kenarları pürüzlü granüller şeklinde oluşur (Yoshinaga vd. 1997).

Selülozun, selüloz I ve selüloz II olmak üzere iki kristalize formu vardır. Selülozun bu iki formu X-ray, nükleer magnetik rezonans (NMR), Raman spektroskopi ve Infrared analizi ile tespit edilebilir (Johnson ve Neogi 1989).

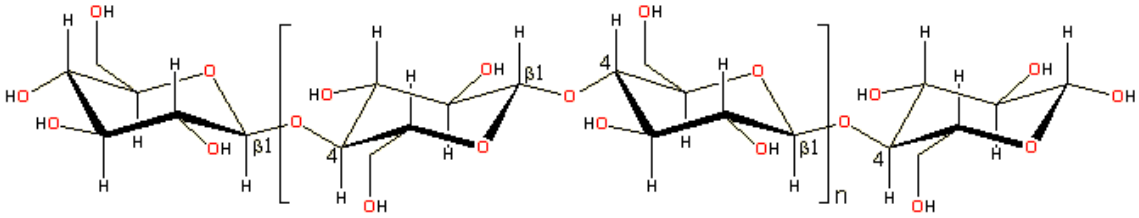
CP/MAS 13C-NMR kullanılarak, selülozun iki farklı formu olan selüloz Iα ve selüloz Iβ'nın ayrımı mümkündür. Bakteriyel selülozun subfibrilleri, mikrofibriller halinde kristalize olmuştur. Bunlar demetler ve iplikler halinde bulunurlar. Bakteriyel selüloz genel olarak suda çözünmeyen, esnek, gerilme direnci yüksek, elastik bir polimerdir (Watanabe vd. 1998).

Ağsı bir yapıya sahip olan polimerin kristalize özelliği yüksektir. Bu özellikler bitki orijinli selülozda bulunmaz. Ayrıca bakteriyel polimerin yüzeyi, bitkisel polimerin yüzey alanına göre 200 kat daha büyüktür. Bakteriyel selüloz içerdiği sıvı komponentlerden dolayı jelatinimsi bir görünüme sahiptir. Polimerin su tutma kapasitesi yüksektir fakat suyun fazlası polimere bağlanmaz ve polimer yavaşça bastırılarak fazla su dışarı verilebilir. Kurutulmuş polimer bir kâğıt tabakası gibi 0,01-0,5 mm kalınlığında olup, iyi bir adsorblama özelliğine sahiptir. Ayrıca ses dalgalarını hızlı bir şekilde iletebilmektedir. Polimerin bu mekanik özelliğinden dolayı akustik membranlar olarak kullanılabildiği de belirtilmiştir (Vandamme vd. 1998).

Genelde selüloz β 1-4 glukosidik bağlarla birbirine bağlı D - anhidroglukopiranoz birimleri içeren lineer bir polimerdir. Glikoz molekülleri bir birine 180°'lik açı ile C_1 ve C_4 glikosidik oksijen bağları ile bağlıdır. Selüloz, selubiyozun doğal polimeridir. Selubiyoz, selülozdaki glikoz moleküllerini içeren ve tekrarlayan yapısal birimdir (Maguire 1997).

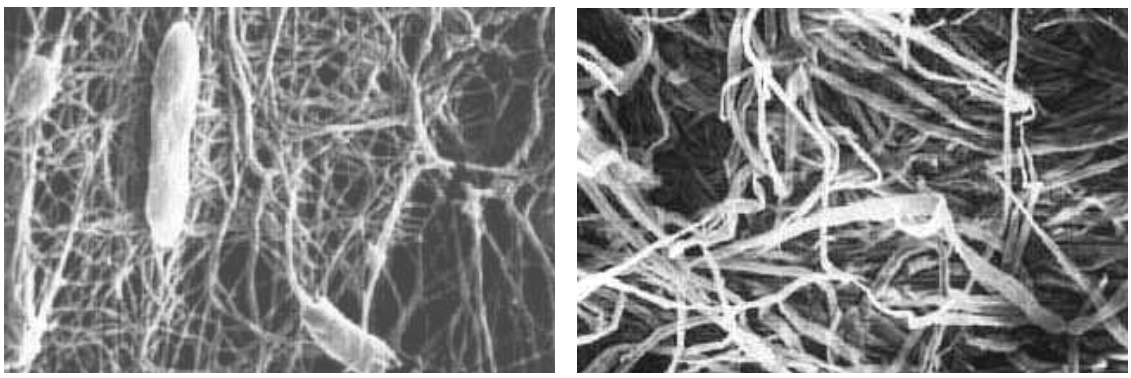
Bağlara göre selülozu nişastadan farklı yapan özellik: selülozdaki asetal bağının β olmasıdır. Asetal bağdaki bu farklılık insan sindiriminde çok büyük bir farka neden olmaktadır. İnsanlar selülozu sindiremez çünkü β asetal bağlarını parçalayacak enzime sahip değildirler. İnek, at, koyun gibi hayvanlar ve toprakta bulunan bakteriler β asetal bağlarını parçalayacak olan bu enzime sahiptirler (Chaplin 2006).

Genel olarak selüloz yapısı, yani molekülü genişletildiğinde dışarıda hidroksil grupları bulunan ve bu sayede molekül içi ve hücre içi hidrojen bağları yapabilen düz bir kurdele yapıda olduğu görülür. Böyle bir kurdelenin yüzeyi, karbon atomlarına direkt bağlı hidrojen atomları içermektedir ve bu nedenle hidrofobiktir. Şekil 2.2'de selülozun moleküler yapısı gösterilmektedir (Geyer vd. 1994).



Şekil 2.2 Selülozun moleküler yapısı

Doğada selülozun yapısını ve özelliklerini, moleküllerin kristalin yapıya birleşmesi ve yapısal liflere dönüşmesi belirler. Selüloz lifleri düşük çözünürlüğe sahiptir ve elastik değildirler. *Gluconoacetobacter xylinum* tarafından sentezlenen selüloz, uzun lifler şeklinde hücre dışına polimerize olur ve kimyasal olarak bitkilerden elde edilen selüloz ile aynı yapıya sahiptir. Her ikisi de β 1-4 glukandır. Bakteriyel selülozu bitkisel selülozdan farklı yapan bir takım fiziksel özellikler vardır. Örneğin kristalleşme indeksi bitkisel selüloza göre oldukça yüksektir (%60'ın üzerinde) ve polimerizasyon derecesi bitkisel selülozdan farklıdır. Bakteriyel selülozun polimerizasyon derecesi bazı durumlarda 16000 ve 20000 arasında değişirken, bitkisel selülozunki genellikle 13000 ile 14000 arasında değişmektedir. Şekil 2.3'de bakteriyel ve bitkisel selülozun yapısı gösterilmektedir (Bielecki vd. 2000).



(a) (b)

Şekil 2.3 a Bakteriyel ve b bitkisel selülozun yapısı

Selülozun, paralel glukan zincirleri taşıyan mikro lifli yapıdaki bu kristalografik formu, Selüloz I (doğal selüloz) olarak bilinmektedir. Selüloz I'in iki formu bulunmaktadır. Selüloz I_α daha çok alglerin ve bakteriyel selülozun yapısında bulunurken, selüloz I_β

bitkilerin yapısında yer almaktadır. Selüloz I, paralel glukan zincirlerine ve kuvvetli intramoleküler hidrojen bağlarına sahiptir. Selüloz II doğal selülozun alkali maddelerle çözülmesi, çökeltilmesi veya muamele edilmesiyle ve daha sonra suyla yıkanmasıyla elde edilir. Suyla yıkama prosesi selülozu çözmeden Selüloz I'in Selüloz II'ye dönüşmesini sağlar (Maguire 1997).

Lif terimi elektron mikroskobunda görülebilen en ince yapıyı belirtmek için kullanılmaktadır. Doğal selüloz lifleri 1 ile 25 nm arasında değişen genişliğe (10-250 zincir uzunluğunda) ve 2000-18000 glikoz içeren 1 ile 9 μm arasında değişen uzunluğa sahiptir. Genellikle farklı mikroorganizmalar arasında lif genişliği değişim gösteriyor olsa da, aynı türlerde birbirine oldukça yakındır. Liflerin görevi ve bulunduğu yerler canlıdan canlıya farklılık göstermektedir. Bitkilerde selüloz lifleri polisakkarit yapıdaki dayanıklı hücre duvarını oluştururken, *Gluconoacetobacter xylinum'*da lifler metabolik olarak inert ve oldukça saf olarak hücre dışına salınmaktadırlar (Geyer vd. 1994).

2.3.1 Bakteriyel selüloz sentezleyen mikroorganizmalar

Bakteriyel selüloz üretiminde *Gluconoacetobacter* suşları en iyi bilinen türler olmasına karşın, diğer bazı bakteri cinsleri de selüloz sentezler. Selüloz sentezleyen bakteriler arasında başlıca; *Acetobacter, Pseudomonas, Rhizobium, Agrobacterium, Sarcina* cinslerine ait türler bulunmaktadır (Jonas ve Farah 1998). Bakteriyel selülozun biyosentezi bu bakterilerde aynı olmasına rağmen, polimerin yapısı organizmaya göre değişir (Ross vd. 1991).

Selüloz üreticileri arasında en iyi olanı *Ga. xylinum* (sinonimleri: *A. aceti ssp. xylinum, Ga. xylinum*) olmakla birlikte *Gluconoacetobacter* grubundaki *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus*, *Ga. oboediens ve Ga. intermedius* da selüloz üreten strainler arasında önemli bir yer tutar (Yamada vd. 1998).

Ga. xylinum; selüloz biyosentezi, kristalizasyonu ve yapısal özelliklerin araştırılmasında model organizma olarak kullanılmıştır (Okamoto vd. 1994). Bakteriyel selülozun

sentezi, spesifik olarak katalitik ve regülatör protein kompleksleri ve enzimler ile regüle edilen çok basamaklı bir işlemdir (Johnson ve Neogi 1989). Sentez işlemi glikozun selüloz öncülü olan uridin difosfoglukoz (UDPGlc) sentezini takiben β-1,4 glukan zincirine polimerizasyonunu içerir (Vandamme vd. 1998). Bitkilerde selüloz, membranda bulunan selüloz sentaz enzimi ile plazma membranında sentezlenirken, *Ga. xylinum* bakterisinde selüloz sentaz enzimi sitoplazmik membranda bulunur ve selüloz ekstraseluler olarak sentezlenir (Saxena vd. 1995). *Ga. xylinum* tarafından sentezlenen selüloz, pentoz fosfat yolu veya Krebs döngüsünün, karbon metabolizmasının son urunudur (Tonouchi vd. 1996).

Glikoz, glukokinaz enzimi ile glikoz-6-P'a katalizlenir. Glukoz-6-P, fosfoglukomutaz enzimi ile glikoz-α-1-P'a dönüşür. Glukoz-α-1-P, UDPGlc pirofosforolaz enzimi ile UDPGlc'ye katalizlenir. Bu son enzim (UDPGlc pirofosforolaz), selüloz sentezinde en önemli olan enzimlerden biridir. Selüloz sentezlemeyen ve fenotipik olarak (Cel^-) olan mutant hücrelerde bu enzimin eksik olduğu belirtilmiş ve bu durum deneysel olarak da gözlenmiştir (Valla vd. 1989). Bakteriyel selüloz üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan karbon ve azot kaynaklarıdır (Matsuoka vd. 1996). Selüloz üretiminde pahalı besi ortamı bileşiklerinin yerine; beyaz kabak suyu, şeker pancarı atığı veya peynir altı suyu gibi ucuz endüstriyel atıklar da kullanılabileceği belirtilmiş ve bu atıkların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (Battad-Bernardo vd. 2004). Ayrıca besi ortamına piridoksin, nikotinik asit, paminobenzoik asit ve biotin gibi vitaminler eklenerek, bakteriyel selüloz sentezinde etkisi araştırılmıştır (Ishikawa vd. 1996). Kolin, betain ve yağ asitlerinin (tuzlar ve esterler) de *Ga. xylinum* strainlerinin selüloz üretimini güçlü bir şekilde stimule ettiği gösterilmiştir (Hikawu vd. 1996).

Ga. xylinum suşlarının selüloz üretiminde pH etkisinin analizinde suşlar için en iyi pH aralığının türe bağlı olarak 4,0-7,0 olduğu belirtilmiştir (Ishihara vd. 2002). Polimer üretiminde pH kadar sıcaklığın da önemi büyüktür. Yapılan araştırmalar sonucunda selülozun polimerizasyon derecesinin (DP) ve su tutma kapasitesinin en iyi olduğu sıcaklığın 28-30^oC olduğu gösterilmiştir (Skinner ve Cannon 2000).

2.3.2 Bakteriyel selüloz biyosentezi

Doğada selüloz üreten mikroorganizmalar alg, mantar, bakteri olarak sınıflandırılabilir. Ancak seçilen mikroorganizma türüne göre, elde edilen selülozun yapısı da farklılıklar göstermektedir. Çizelge 2.2'de selüloz üretebilen mikroorganizmaların listesi verilmiştir. Bu türlerden en çok tercih edileni *Gluconoacetobacter* türüdür.

Çizelge 2.2 Selüloz üreten mikroorganizmalar (Bielecki vd. 2000)

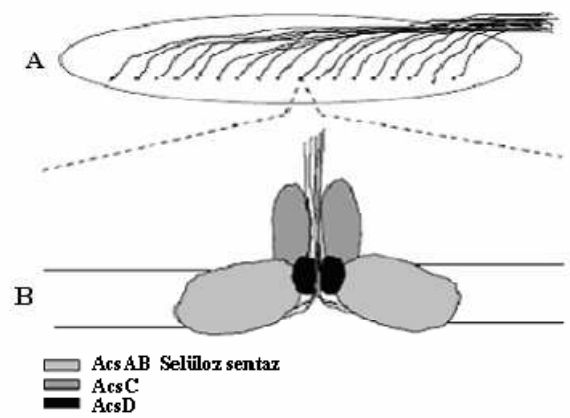
TÜR	**SELÜLOZ YAPISI**
Gluconoacetobacter	Hücre dışı, şeritlerden oluşan tabaka
Achromobacter	Lifli
Aerobacter	Lifli
Agrobacterium	Kısa lifler
Alcaligenes	Lifli
Pseudomonas	Belirgin olmayan lifler
Rhizobium	Kısa lifler
Sarcina	Şekilsiz
Zooglea	Belirgin olmayan lifler

Ga. xylinum, bilinen en etkili selüloz üreten mikroorganizmadır. Doğada meyvelerde, meyve suyunda ve sirkede bulunur. Aerobik, Gram-negatif, asetik asit bakterisidir. *Ga. xylinum* ile üretilen selüloz, bitkiler ve diğer mikroorganizmalar ile elde edilen selülozlardan daha yüksek saflıktadır. Diğer bir avantajı ise, selülozu ürettikten sonra hücre dışına saldığından herhangi bir saflaştırma işlemi gerektirmemesidir (Hestrin ve Schram 1954).

Bitkilerde bulunan selüloz, diğer polisakkaritlerle birlikte kompleks halinde hücre duvarının yapısını oluşturmaktadır. *Ga. xylinum*'da ise bunun tam tersine üretilen selüloz metabolik olarak inerttir ve saf olarak hücrenin dışına salınmaktadır (Ross vd. 1991).

Ga. xylinum'da bakteriyel selüloz, biyosentezi kusursuz düzenlenmiş, birkaç adımda gerçekleşen birçok enzim, katalitik ve düzenleyici protein kompleksleri içeren spesifik bir prosestir. Proses, bakteriyel selüloz prekörsırı olan üridin difosfoglikoz (UDPGlc) sentezini takiben glikozun β-1,4-glukan bağlarıyla polimerize olması ve oluşan yüzlerce ve hatta binlerce selüloz polimerlerinin şeride benzeyen karakteristik şeklini almasından oluşur. UDPGlc sentezi, prosesin glikoz polimerizasyonunun moleküler mekanizması ve hücre dışına ekstrüzyonu aşamalarına göre daha bilinen bir reaksiyondur (Bielecki, vd. 2000).

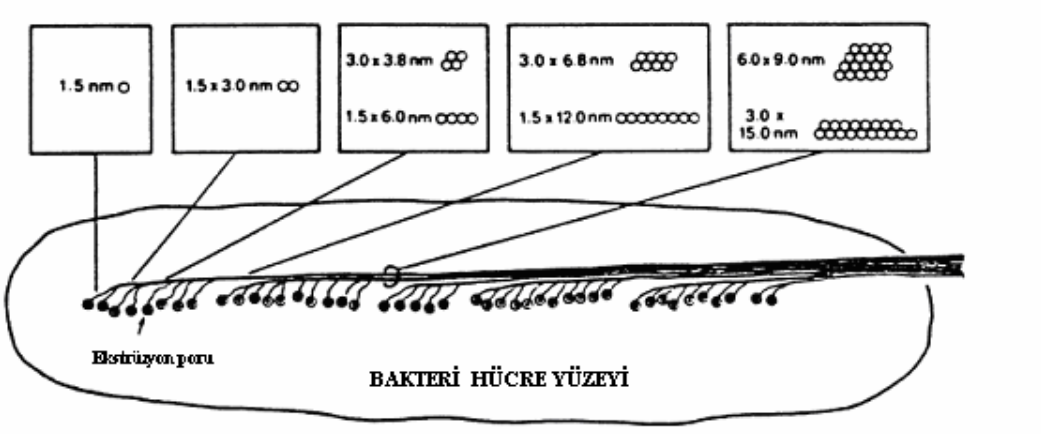
Şekil 2.4'de A ile gösterilen kısım, selüloz sentezleme bölümüdür. Tek bir bakteri hücresinde sayısız selüloz sentezleme bölümü bulunmaktadır. Her bir bölümde, 16 glukan zincirinden oluşan lifler oluşur. Daha sonra bu lifler birleşerek şerit haline gelirler. B ile gösterilen kısım ise, membran proteini olan selüloz sentaz (AcsAB protein) ve onunla ilişkili proteinlerin (AcsC ve AcsD) bulunduğu kısımdır. Bu proteinlere, selüloz sentezleme kompleksi adı verilir ve dış membran ile sitoplazmik membran arasında bulunurlar (Saxena vd. 2005).



Şekil 2.4 Bakteriyel selüloz oluşumunun şematik gösterimi (Saxena vd. 2005)

Elektron mikroskobuyla incelendiğinde *Ga. xylinum*'un yüzeyinde bulunan selüloz sentezleme bölümlerinin düz bir eksen üzerinde bulunduğu gözlenmiştir. Her bir pordan hücre dışına salınan 16 zincirli lif, parçalanamayan en küçük selülozik birim olduğundan, selüloz ürünün başlangıç bölümü olarak kabul edilir. Bu lifler, selülozun

mikrofibril yapısı kalkoflor beyazı (Tinopal) ile boyandığında görülebilmektedirler ve yaklaşık 1,5 nm uzunluğundadırlar. Şekil 2.5'de görülebileceği gibi selüloz yapısının oluşumu rastgele gerçekleşmemektedir. Glukan bağlarının oluşumundan itibaren, liflerin, mikrofibrillerin ve son olarak da şerit şeklindeki selüloz makromolekülünün oluşumu hiyerarşi bir düzen içinde gerçekleşmektedir. Bu proses her ne kadar hücre dışında gerçekleşse de, hücre tarafından yönetilmektedir.

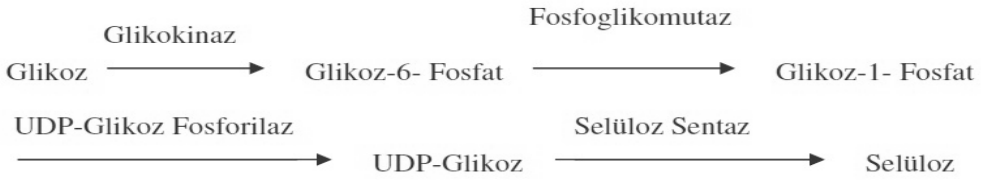


Şekil 2.5 *Gluconoacetobacter Xylinum*'da selüloz oluşum mekanizması (Ross vd. 1991)

Diğer bir husus ise, *Ga. xylinum*'da polimerizasyon ve kristalizasyon aşamalarının birbirini tamamlayan önemli iki proses olmalarıdır. Kristalin mikrofibrillerin oluşumu, ancak β-1,4-glukan zincirleri halen oluşuyor iken gerçekleşebilmektedir. Polimerizasyon verimi, kristalizasyon prosesine bağlı olarak artış göstermektedir. Bu aşamada, bakteriyel selüloz sentezinde sınırlayıcı adım, kristalizasyon prosesidir, denebilir (Benziman vd. 1980).

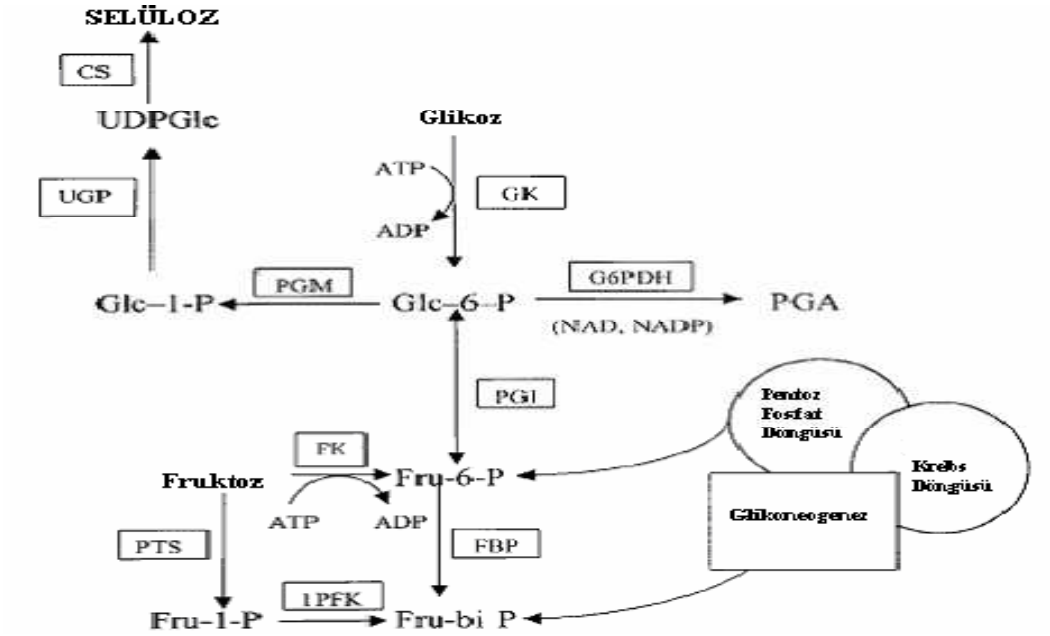
Selüloz, *Ga. xylinum'*un karbon metabolizmasının son ürünüdür. Pentoz fosfat döngüsü, Krebs döngüsü ve glikoneogenez ile ilişkilidir. Aerobik, asetik asit bakterisi olan *Ga. xylinum*'da fosfofruktokinaz enzimi bulunmadığından glikoliz gerçekleşmemektedir. Selüloz sentezi, katabolik bir süreç olan oksidasyon ile ilişkilidir ve katabolik reaksiyonlarda üretilen enerjinin yaklaşık %10'unu tüketirken protein sentezi gibi anabolik reaksiyonları engellememektedir. *Ga. xylinum,* hegzoz, gliserol, dihidroksi aseton, pirüvat ve dikarboksilik asit gibi çeşitli karbon kaynaklarını yaklaşık %50

verimle selüloza çevirebilir. Bu bileşikler, Krebs döngüsü, pentoz-fosfat döngüsü ve glikoneogenez sonucu biyosenteze dâhil olurlar. Pentozfosfat döngüsü ile karbonhidratların oksidasyonu, Krebs döngüsü ile organik asitlerin oksidasyonu gerçekleşir (Ross vd. 1991). Direkt selüloz sentezleyicisi olan UDPGlc, bitkiler de dâhil olmak üzere birçok organizmada oldukça yaygın kullanılan bir yol ile üretilmektedir. Bu yolda; glikoz, glikokinaz katalizörlüğünde, glikoz-6-fosfata, glikoz-6-fosfat fosfoglikomutaz katalizörlüğünde izomerizasyon ile glikoz-1-fosfata, glikoz-1-fosfat UDPGlc fosforilaz enzimi ile UDPGlc'a dönüşür. Son aşamada ise, selüloz sentaz enzimi ile UDPGlc'dan selüloz sentezlenir (Bielecki vd. 2000). Bu mekanizma, şekil 2.6'da verilmektedir.



Şekil 2.6 *Gluconoacetobacter xylinum*'da selüloz sentezinin biyokimyasal mekanizması(Jonas ve Farah 1998)

Bu dönüşüm esnasında en önemli rol, UDP-Glikoz fosforilaz enzimindedir. Selüloz negatif mutantlar (Cel^-), bu enzim bulunmadığından, her ne kadar yüksek selüloz sentaz aktivitesi gösterseler de, selüloz sentezleyemezler. UDP-Glikoz fosforilaz aktivitesi kullanılan *Ga. xylinum* türüne bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Bilinen en yüksek aktivite BPR2001 türünde görülmektedir. UDP-Glikoz fosforilaz aktivitesindeki artış, selüloz veriminde de artış sağlamaktadır (Bielecki vd. 2000). *Ga. xylinum*'un bazı türleri ise karbon kaynağı olarak glikoz yerine früktozu tercih ederler. Bu durumda izlenen yol; früktozun früktoz-1-fosfata, früktoz-1-fosfatın fosfoglikoizomeraz enzimi katalizörlüğünde glikoz-6-fosfata dönüşmesidir (Ross vd. 1991). Glikoz-6-fosfat ise, şekil 2.6'da verilen mekanizma ile selüloza dönüştürülür. *Ga. xylinum*'un karbon metabolizması şekil 2.7'de ayrıntılı olarak verilmektedir.



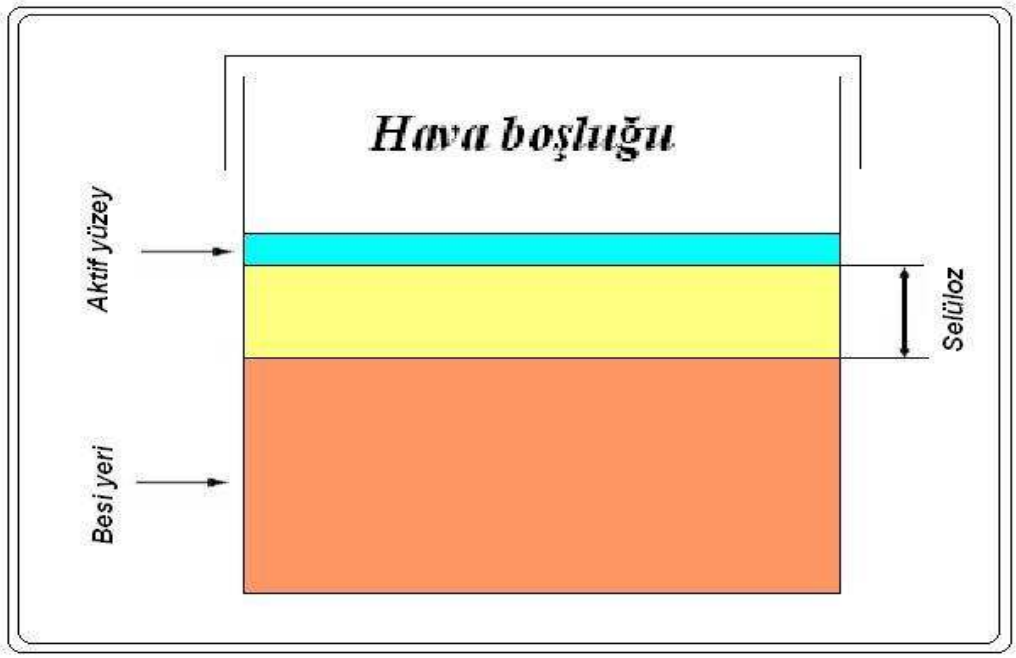
Şekil 2.7 *Gluconoacetobacter xylinum*'un karbon metabolizması (Bielecki vd. 2000)

2.3.3 Bakteriyel selüloz üretiminin yöntemleri ve etkileyen faktörler

Bakteriyel selülozun üretiminde birkaç farklı teknik mevcuttur. Bu tekniklerden en çok kullanılanları statik yöntem (durgun) ve karıştırmalı yöntemdir. Ayrıca bakteriyel selüloz üretiminde hava kaldırmalı reaktörler ve dönen disk reaktörleri de kullanılmaktadır (Krystnowicz vd. 2002).

Bakteriyel selülozun nerede kullanılacağına göre üretim yöntemi seçilmektedir. Bunun nedeni, bakteriyel selülozun fiziksel ve mekanik özelliklerinin kullanılan yönteme göre değişiklikler göstermesidir. Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan geleneksel yöntem statik yöntemdir. Bu yöntem oldukça basittir ve zar halinde selüloz üretmek için en çok tercih edilen yöntemdir. Statik yöntemde inoküle edilmiş besiyeri yayan kaplara dökülür ve üzeri kapatıldıktan sonra zar kabın yüzeyini sarana kadar yaklaşık 5 ile 20 gün arasında beklenir. Yapılan araştırmalar zarın sadece en üst kısmında üreme olduğunu, zarın alt kısmında kalan hücrelerin zamanla inaktif hale geçtiğini ve oksijen yetersizliği

nedeniyle öldüğünü göstermektedir. Şekil 2.8'de statik yöntem ile selüloz üretimi gösterilmiştir (Krystnowicz vd. 2002).



Şekil 2.8 Statik yöntemle bakteriyel selüloz üretimi

Statik yöntemde selüloz lifleri düzenli bir şekilde üst üste birikir. Bu nedenle karıştırmalı yöntemlere kıyasla statik yöntemle elde edilen selülozun yapısında paralel glükan zincirlerine ve kuvvetli molekül içi hidrojen bağlarına sahip Selüloz I daha fazla bulunmaktadır. Ayrıca statik yöntemle elde edilen selülozun kristalleşme indeksi ve kristal boyutu, karıştırmalı yöntemle elde edilen selüloza göre daha fazladır. Bakteriyel selüloz üretiminde statik yöntem oldukça basit olmasına ve üretim sonucunda zar şeklinde selüloz elde edilmesine rağmen birçok eksiklikleri de vardır. Bunların en başında difüzyon sorunu vardır. Besiyerinin yüzeyinde oluşan zar şeklindeki selüloz, besiyerine yeterli kadar oksijen geçişine imkân sağlamamakta ve bu da alt kısımdaki hücrelerin zamanla ölmesine neden olmaktadır. Ayrıca statik yöntemde besiyeri aşılama yapıldıktan sonra fermantasyon süresi boyunca hiç hareket ettirilmemelidir. (Bielecki vd. 2000).

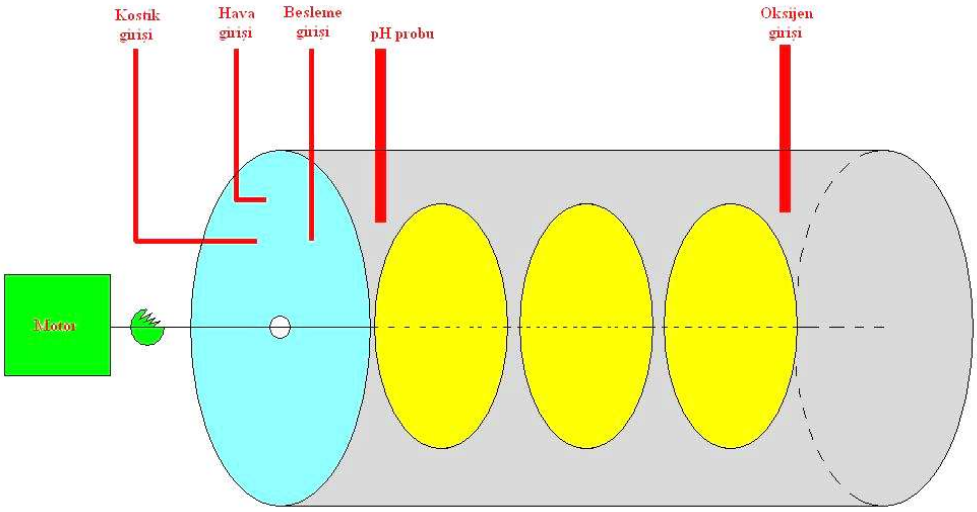
Difüzyon sorununu önlemek ve en uygun havalandırmayı sağlamak için yüzey/hacim oranı çok önemlidir ve bu oran ayarlanarak oksijen difüzyon limitasyonunun yaratacağı sorunlar önlenmektedir. Statik yöntemde fermantasyon süresinin oldukça uzun olması ve ölçek büyütmede problemlerin olması nedeniyle tercih edilen bir diğer yöntem ise karıştırmalı fermantörlerin kullanılmasıdır. Doğadan ilk izole edilen *Ga. xylinum* türleriyle yapılan çalışmalar, bu bakterinin karıştırmalı fermantörler için uygun olmadığını göstermiştir. Bunun sebebi karıştırmanın yarattığı kuvvetin sonucunda ortamda selüloz üretme kabiliyeti olmayan mutant hücrelerin oluşmasıdır. Ancak araştırmacılar doğadan karıştırmalı reaktörler için uygun olan *Ga. xylinum*'un farklı suşlarını izole etmeyi başarmışlardır. Örneğin, Tsuchida ve Yoshinaga (1997) kirazdan izole ettikleri *Ga. xylinum BPR2001* adlı bakterinin, karıştırmalı yöntemle bakteriyel selüloz üretimine elverişli olduğunu kanıtlamışlar. Ayrıca Son ve arkadaşları Kore'de sirkeden izole ettikleri *Ga. sp. V6* suşunun 200 rpm hızında karıştırma ile selüloz üretim özelliğini kaybetmediğini kanıtlamışlar (Tsuchida ve Yoshinaga 1997).

Statik yöntemdeki zar şeklindeki selülozun aksine, karıştırmalı yöntemde lifli yapıda selüloz oluşmaktadır. Karıştırmadan doğan kuvvetlerin yuvarlak, düzensiz yapıda selüloz oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Statik yöntemle karıştırmalıyı karşılaştırdığımızda selüloz mikrolifleri karıştırmalı yöntemde daha ince, kristal büyüklükleri daha küçük ve polimerizasyon derecesi daha azdır. Lif şeklindeki bu selüloz, besiyeri viskozitesi oranının artmasına, oksijen iletmemesine ve karıştırma problemlerine yol açmaktadır. Bu sebeplerden dolayı kullanılan karıştırıcının şekli ve fermantör içindeki yeri çok önemlidir. Viskozitesi yüksek olan bu besiyerinde homojen karıştırma sağlamak oldukça güçtür. Karıştırıcı yakınında oksijen transferi yüksek iken karıştırıcıdan uzaklaştıkça homojen olmayan karıştırmadan dolayı oksijen transferi zorlaşmaktadır. Ayrıca viskozitesi yüksek besiyerini karıştırmak için gücü yüksek karıştırıcılara ihtiyaç vardır bu da işlemin enerji ihtiyacını arttırmaktadır. Ayrıca deneylerinde besiyerinde çözünmüş oksijen miktarını arttırmak için oksijence zengin hava kullanmışlar ve verimin oldukça yüksek olduğunu göstermişlerdir. Özellikle hava kaldırmalı reaktörde üretilen bakteriyel selülozun karıştırmalı reaktörde üretilen lifli yapıdaki selüloza göre, eliptik misket eklinde olduğu görülmüştür.. Eliptik misket şeklindeki selülozun polimerizasyon derecesi 16000'dir ve bu değer statik yöntemle

elde edilen selüloza oldukça yakındır. Ayrıca statik yöntemdekinin aksine hava kaldırmalı yöntemde hücrelerin bölünme hızı çok daha yüksektir (Chao vd. 2000).

Kouda vd. (1997) yaptıkları çalışma sonucunda bakteriyel selüloz üretiminde karıştırmalı yöntem için en uygun karıştırıcı türünün türbin karıştırıcılar olduğunu belirtmişlerdir. Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan bir diğer yöntem ise, hava kaldırmalı reaktörlerin kullanıldığı yöntemdir. Hava kaldırmalı reaktörler daha az kesme gerilimi oluşturduğundan, basit mekanik yapısından, düşük enerji tüketiminden ve yüksek hücre kütle veriminden dolayı birçok mikrobiyel fermantasyonda tercih edilmektedir. Ancak hava kaldırmalı reaktörler bakteriyel selüloz besiyeri gibi viskoz sıvılar için çok uygun değildir.

Bakteriyel selüloz üretiminde dönen disk reaktörlerin kullanımı da gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Bu sistemde, yarısına kadar inoküle edilmiş besiyeri ile dolu silindirik yatak bulunmaktadır. Yatağın içerisindeki diskler motor yardımıyla döndürülmektedir. Hücreler diskin yüzeyine adsorbe olmakta ve burada zar yapısında selüloz oluşturmaktadırlar. 8-12 saat sonra bütün hücreler diskin üzerine geçmekte, besiyerinde yaklaşık olarak hiç hücre kalmamaktadır. Ağ yapılı ya da delikli diskler, katı disklere göre daha çok tercih edilmektedir çünkü, delikler daha fazla besiyerinin disk üzerinde tutulmasını ve daha hızlı, kuvvetli film oluşumunu sağlamaktadır. Statik yönteme kıyasla bu yöntemle, birim alanı daha fazla ıslak selüloz elde edilmektedir ve elde edilen selülozun su tutma kapasitesi statik yöntemle elde edilenin yaklaşık iki katıdır. Şekil 2.9'da dönen disk reaktörü şematik olarak verilmiştir (Son vd. 2003).



Şekil 2.9 Dönen disk reaktörü (Son vd. 2001)

Dönen disk reaktörlerinin kullanımının statik yönteme kıyasla bir takım üstünlükleri vardır. Her iki yöntemde de birim alan başına yaklaşık olarak eşit selüloz üretimi gerçekleşmektedir ancak hacimsel hızlar, dönen disk reaktörlerde daha fazladır. Disklerin düzgün ayarlanmasıyla, yüzey alanı/hacim oranı yaklaşık 5 kat arttırılabilir ve aynı miktardaki besiyerinden çok daha fazla selüloz üretilebilir. Disk döndükçe diskin yarısı besiyeriyle temas ederken, diğer yarısı da havayla temas etmektedir. Bu durum statik yöntemde karşılaşılan difüzyon problemlerinin önlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca üretim esnasında selüloz besiyerinde değil de diskin üzerinde bulunduğundan, selüloz zarına herhangi bir zarar vermeden besiyerinden örnek alınabilir ve besiyeri kontrol edilebilir. Ayrıca substrat konsantrasyonu ve pH ayarlanarak uygun koşulların uzun süre devam etmesi sağlanabilmektedir (http://rpi.edu/~weberd/Final%20Thesis.doc).

Kritik faktörler iki grup altında toplanır. Bunlar fermantasyonun kompanentleri ve koşulların kontrolüdür. Bu bağlamda ilk grup; en iyi organizma ile besiyeri için en uygun ve en iyi karbon ve nitrojen kaynaklarının seçimidir. İkinci grup ise; pH, O_2 varlığı ve miktarı, sıcaklık, substrat konsantrasyonları ile en uygun kültür yönteminin kullanımıdır.

Selüloz verimini arttırıcı optimum şartların sağlanmasında karbon ve azot kaynakları, bazı bileşikler (etanol, pirüvik asit vb.), fermantasyon ortamı, fermentör tipi, O_2 düzeyi, pH, sıcaklık, C/N oranı, inokülüm miktarı, süresi vb. başlıca faktörler yer almaktadır (Cheng vd. 2002). Karbon kaynağı olarak arabitol ve mannitol kullanımı ile üretim 6,2 ve 3,8 kat artmıştır (Jonas ve Farah 1998). Glikoza kıyasla früktoz, üretim kapasitesini artırıcı etki yapmıştır (Tonouchi vd. 1996).

2.3.4 Bakteriyel selülozun kullanım alanları

Bakteriyel selüloz, çok iyi mekanik özelliklere sahip olduğundan birinci kalite kâğıt üretiminde kullanılır. Bakteriyel selüloz içerikli kâğıtlar, dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmeleri yanında aynı zamanda elastik, geçirgen, yırtılmalara-yanmalara dirençli ve suyu emme özelliğine de sahiptirler (Iguchi vd. 1988). Bakteriyel selüloz, yüksek saflıkta olması ve mekanik-kimyasal dayanım özelliklerinin oldukça iyi olması nedeniyle çok çeşitli kullanım alanına sahiptir. Şüphesiz ki, bakteriyel selülozun en önemli kullanım alanı kağıt üretimidir. Ancak üretim maliyetlerinin düşürülememiş olması nedeniyle, yüksek mekanik dayanım, yüksek yırtılma direnci gibi özelliklere sahip özel kağıt üretimlerinde kullanılabilmektedir. Diğer bir önemli konu ise, toksik gazların absorbsiyonunda kullanılan aktif karbonun yapısında %30 normal kağıt hamuru yerine %5 bakteriyel selüloz kullanıldığında aynı miktarda absorbsiyon yapılabilmesidir.

Tarihi dokümanların tamirinde kullanılan el yapımı kağıtların fibrillerine az miktarda bakteriyel selüloz ilave edilmesiyle yıpranmaya dirençli bir etki yaratılmış olur (Krystynowicz vd. 1999). Bakteriyel selülozu % 1 oranında içeren kâğıtlar ISO 9706:1994 standardında yer almaktadır. Ayrıca bakteriyel selülozdan yüzey kaplamada kullanılan kâğıtlar da üretilmiştir. Bu kâğıtlar cilalı, parlak, düzgün ve gözenekli bir görünüme sahiptir. Yüzde 3 oranında bakteriyel selüloz içeren kaplama kâğıtları, % 20 oranında kaplamaya sahip olan rotogravuer kâğıtlarına benzer yüzey direncine ve cila özelliklerine sahiptir (Johnson ve Neogi 1989).

Bakteriyel selülozun ümit vaat ettiği diğer bir alan ise tıp sektörüdür. Durgun kültürde üretilen bakteriyel selüloz, yanık bölge üzerinde iyileştirici bir özelliğe de sahiptir. Bakteriyel selüloz steril edilebilir, dokuya uyumludur, gözenekli, elastik ve elle tutulması kolaydır, suyu adsorbladığı için belli oranda nem içerir bu da yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar ayrıca yaralı bölgede ikincil enfeksiyonların oluşmasını engeller, yanan bölgedeki ısıyı adsorblayarak acıyı ve ağrıyı azaltır ve dokuda yaranın yayılmasını engeller (Krystynowicz vd. 2000).

Şekil 2.10' da bakteriyel selüloz ile kaplanmış bir yara görülmektedir. Ayrıca bakteriyel selüloz, yapay kan ve lenf damarlarının ve idrar yollarının yapısında da kullanılmaktadır (Czaja vd. 2006). Sıvı haldeyken yüksek mekanik dayanıma sahip olması, biyolojik olarak uyumlu olması ve insan ve hayvan vücudunda sindirilememesi gibi avantajlarından dolayı medikal alanında oldukça ümit vermektedir.



Şekil 2.10 Bakteriyel selüloz ile kaplanmış yara (Czaja vd. 2006)

Hayvansal orijinli ürünlerdeki problemlerden dolayı kollagen kaplayıcılar yerine bakteriyel selüloz içerikli kaplayıcılar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan bakteriyel selüloz ürünleri Xylos Corp. firması tarafından Prima CelTM olarak üretilmektedir. Bu polimer, Rensselaer Polytechnic Institute (USA)'de ülser tedavisinde yara kapatıcı olarak uygulanmıştır. Krystynowicz ve arkadaşları tarafından *Ga. xylinum*'dan elde edilen selülozun, farelerdeki yaralar üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu da belirtilmiştir. Yamanaka ve arkadaşları ortası çukur özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz fibrillerinin suni kan damarları ve üreterler olarak kullanılabileceğini de

önermişlerdir (Yamanaka vd. 1990). Kopeklerde aort ve boyun damarlarının yerine antitrombik özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz içeren suni damarlar kullanılmıştır.

Bakteriyel selüloz ayrıca tekstil sanayisinde suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsortif materyal olarak, kozmetik sanayinde ise kremlerin, toniklerin, tırnak cilalarının emilimini kolaylaştırmada da kullanılır (Jonas ve Farah 1998).

Sony Corp. firması tarafından üretilen hoparlör ve kulaklıklarda da bakteriyel selüloz kullanılmaktadır. Böylelikle daha yüksek ve temiz tonlarda ses elde edilebilmektedir (Geyer vd. 1994).

Bakteriyel selüloz için gelecek vadeden diğer bir konu ise, elektronik kağıt üretimidir. Shah ve Brown (2005) bakteriyel selüloz katmanının içine elektronik boyayı gömmüşlerdir. Daha sonra bu katmanı şeffaf elektrotların arasına yerleştirmişlerdir. Başlangıçta sistem düz beyaz bir kağıt gibi görülmektedir, ancak elektrotlara elektrik akımı verildiğinde boyanın rengi koyulmaya başlamış ve elektrik akımı kesildikten sonra da rengini korumuştur. Düşük enerji tüketimi bu sistemin önemli avantajlarından biridir. Sisteme daha sonra ters akım uygulandığında, boyanın renginin açıldığını ve baştaki düz beyaz kağıt görünümünü tekrar aldığı belirtilmiştir.

Bakteriyel selülozla üretilen elektronik kağıdın diğer bir avantajı da, görüntünün normal kağıtla elde edilen görüntüyle aynı olmasıdır (Shah ve Brown 2005). Şekil 2.11’ de elektronik kağıdın bir görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.11 Elektronik kağıt (Shah ve Brown 2005)

Sahip olduğu eşsiz özellikler ve yapısı nedeniyle BS, çeşitli gıdaların üretiminde önem taşımaktadır. Az miktarda kullanıldığında, lezzet etkileşimlerinin önlenmesi, köpük stabilizasyonu, geniş pH aralıklarında, sıcaklık ve dondurma çözme işlemlerinde stabilitenin sağlanması açısından etkili olmaktadır. Akıcı ve kaşıkla alınabilir özellikteki yemek ve salata sosları ve et suları, kek süslemede kullanılan şekerli karışımlar, kremalar, ekşi krema ve kültürle üretilmiş ve dondurulmuş süt ürünlerinde kullanılma imkânı bulunmaktadır. Sakkaroz ve karboksimetil selülozla birlikte kullanıldığında, ürünün dispersiyon özelliğini geliştirmektedir. Bunların yanı sıra, düşük kalorili katkı maddesi, kıvam arttırıcı, stabilizer, yapı düzenleyici, börek katkısı ve dondurmada kullanımı gibi yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Akoğlu vd. 2010).

Gelişen teknolojilerin sayesinde, insan için yapılamaz dediği şeylerin listesi her geçen gün azalmaktadır. İnsan hayatında kendi ihtiyacı olan birçok şeyleri yetiştirebilir. Ancak bakteriyel selüloz kavramı bilim dünyasına ayak basmadan önce giyimi yetiştirebilmek insan için imkânsız olanlardan biriydi. Üstelik giyimi yetiştirmek için ufak ve hoş canlıları görevlendirmek ve o hoş canlılar bakteriler olduğunu hayal etmeyi rüyamızda bile görmezdik. Bu hayalleri gerçeğe dönüştüren bilim ve tabii ki *Ga. xylinum*. *Gluconoacetobacter xylinum* karbon, vitaminler ve azot içeren suda yaşayarak harika materyaller oluşturuyor. Bu materyal bakteriyel selüloz olarak adlandırılıyor. Bu işleri

yapan “Arts & Humanities Research Council” grubu paralel olarak “en iyi doğal boya” araştırmasını da yürütmektedir (http://www.novate.ru).



Şekil 2.12 “Arts & Humanities Research Council” grubunun yetiştirdiği giyimler

BS 1992’de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food ve Drug Administration) tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle de gıdalarda kullanıma son derece elverişlidir. BS’un geleneksel bazı ürünlerde yer aldığı bilinmektedir. Nata ya da Nata-de-Coco olarak adlandırılan BS jeli, Filipinlerde tatlı olarak sevilerek tüketilmektedir. Bitkisel selüloz ve BS kimyasal olarak aynı yapıda olmalarına rağmen, BS’un serum lipitleri ve kolesterol düşürme etkisinin bitkisel selülozdan daha yüksek olduğu da bulunmuştur. Ayrıca bağırsak kanseri, kalp damar hastalıkları kroner trombozise karşı koruyucu olduğuna ve idrarda glikoz düzeyinin ani yükselişini engellediğine inanılmaktadır. Bu nedenle Nata-de-Coco sadece Asya’da değil Dünya’da da popüler hale gelmiştir (Akoğlu vd. 2010).

Akoğlu vd. (2010) tarafından yapılan araştırmada A06O2 suşunun çeşitli gıdalarda kullanım olanakları irdelenmiştir.

Sucuk üretiminde yağ miktarı azaltılarak, selüloz kullanılması rutubet kaybını azaltmış, buna karşın tekstür özelliklerinin tüketici beğenisine uygun hale gelmesini sağlamıştır (Akoğlu vd. 2010).

Selüloz içeren Beyaz peynirler yağsız, yarım yağlı ve yağlı sütten üretilen peynirlere kıyasla olgunlaşma özellikleri ve çeşitli kimyasal özellikler açısından farklılık göstermemiş, ancak duyusal değerlendirme sonucunda daha az tercih edildiği ($p<0,05$) belirlenmiştir. Buna rağmen %1,7 selüloz+yağsız süt ve %1,7 selüloz+%1,7 süt yağı uygulamalarının tüketilebilir özellikte olduğu da ortaya konmuştur (Akoğlu vd. 2010).

Mayonez günümüzde yaygın olarak kullanılan bir gıdadır. Ancak raf ömrü ve stabilitesi büyük önem taşımaktadır. Yağ içeriği azaltılıp, selüloz içeriği arttırılarak üretilen mayonez örnekleri içinde özellikle %1 selüloz içeren grup, piyasadan sağlanan mayonez örneğine benzer vizkozite göstermiştir. Bakteriyel selülozun mayonez üretiminde kullanılmasıyla kaliteden ödün vermeden yağ oranının düşürülmesinin mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır (Akoğlu vd. 2010).

2.4 Plazmit DNA'nın özellikleri ve yapısı

Plazmitler, birçok bakteri türünde bulunan, ancak her suşta bulunmayan halkasal veya süper sarmallı DNA molekülleridir. Plazmitler, küçük moleküllerdir; bu açıdan bir karşılaştırma yapılırsa, bakteriyel kromozomun %20'si ile %4'ü arasında büyüklüklerde olduğu görülür. Plazmitler, bazı üreme koşullarında konakçı hücre için mutlaka taşınması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte, pek çok plazmit, özel koşullara uyum sağlamak için önemli olan genler içerir. Bu genler, çoğu kez bakterinin plazmidi taşıdığına dair temel işaret olurlar. Örneğin R plazmidi taşıyıp, çeşitli antibiyotiklere dirençli olan bakteriler, aynı plazmidi taşımayan bakterilerin yaşayamadığı antibiyotikli ortamlarda yaşayarak diğerlerinden ayrılırlar. Birçok bakteride plazmit, hücreler arası gen transferinin özel bir tipinden sorumludur. Plazmitlerin bu özellikleri, 1950'lerde ilginç bir çalışma konusu olmalarına sebep olmuştur. Plazmitler, normalde konakçının replikasyon sistemini büyük ölçüde kullanmaları sebebiyle bakteriyel DNA replikasyonunun anlaşılması için iyi modeller olmuşlardır. Ayrıca, Mikrobiyel genetikte kısmi diploidlerin yapılmasına yönelik çalışmalarda kullanıldıkları için önemlidirler. Başka bir önemleri de, genetik mühendisliğinde klonlama vektörü olarak kullanılmalarıdır (Zubay 1998)

Çoğu bakterilerde, bazı maya ve mantarlara özgü kromozomlardan ayrı olarak bulunan bir başka kalıtsal yapıya plazmit adı verilmektedir. Plazmitler temelde hücre kromozomlarından ayrılarak oluşan sirküler kalıtsal yapılardır. Hücre bölüneceği zaman genomik DNA gibi plazmitlerde replike olur. Sirküler ve süper sarmal yapıya sahip bir plazmit bakteri kromozomunun % 0,2- 4,0'ü kadar büyük bir yapıya sahiptir (Brown 2000).

Plazmitlerin çoğu taşıdıkları genetik bilgi ile bakterilerin uygun olmayan şartlara karşı direnç gibi aktivitelerini göstermelerini sağlar. Örneğin; civa, toluen naftalin gibi toksik maddeler bakteri plazmidinde bulunan gen ürünleriyle zararsız hale getirilir (Dilsiz 1998).

Plazmitlerin bakteride saptanmasında fiziksel, morfolojik ve fonksiyonel testlerden yararlanılmaktadır. Bakterilerin, bazı özel karakterleri çabuk kazanması ve bunları nesillere transfer etmesi veya bunları çabuk kaybetmesi, bu özelliklerin plazmitlerce kodlandığının bir işareti olarak kabul edilmektedir. Önceden bazı özelliklere sahip olmadığı bilinen bakterilerin müteakip pasajlarında yeni karakterler kazanması ve bunları yeni nesillere transfer etmesi aynı şekilde bunların plazmitle ilişkili olabileceğini düşündürebilir (Maloy vd. 2008).

DNA ekstraktları eğer dikkatlice hazırlanır ve DNA'nın parçalanması önlenirse, elektroforezisde iki DNA molekülü ayrı yerlerde lokalize olurlar. Plazmit DNA'sı karşı uçta yer alırken, büyük olan kromozomal DNA başlangıç yerinde (veya oraya yakın) kalır. Elektron mikroskopla da plazmit DNA'sı kolayca görüntülenebilir. Plazmit DNA'sı kromozomal DNA'dan, büyüklük farkı nedeniyle kolayca ayırt edilebilir. Sitoplazmada serbest bulunan plazmitlerin saptanması, kromozomla entegre olmuşlardan, daha kolaydır. Ancak, nukleusla birleşenleri saptamak için spesifik işaretli problardan yararlanılabilir. Etidium bromid içeren caesium chloride densite gradient santrifüjde de sirküler plazmit DNA'sı dibe yakın yerde, kromozomal DNA ise bunun üstünde bant oluşturur. Son olarak plazmitler bakterilerden fiziksel ve kimyasal yöntemlerle çıkabilecekleri gibi, spontan olarak da bakterilerden ayrılabilirler (Maloy vd. 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada B759 ve A06O2 kodlu selüloz üretebilen *Gluconoacetobacter* suşu kullanılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu kiti I ve II önemli materyaller olarak kullanılmıştır. Kültürlerin geliştirilmesi için HS Broth besiyeri kullanılmıştır.

3.1.1 Mikroorganizmalar

Çalışmada *Gluconoacetobacter xylinum* 759 NRRL B-759 (Synonyms: *Acetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus*) ve A06O2 suşları ile birlikte plazmitleri kontrol etmek için *E. coli* suşları da kullanılmıştır.

3.1.2 Besiyeri

Hestrin ve Schram (1954) tarafından önerilen besiyeri (HS Broth) kullanılmıştır. Besiyeri bileşimi şu şekildedir:

100 mL için HS Broth:

►Glikoz 2.0 g

►Pepton: 0.5 g

►Maya ekstraktı: 0.5 g

►$Na_2HPO_4{*}12H_2O$: 0.27 g

►Sitrik asit: 0.15g.

►Saf su: 100 mL.

3.2 Yöntem

Plazmit DNA izolasyonu yöntemleri olarak farklı firmalara ait izolasyon kitlerinin protokolüne göre ve onlara bazı değişlikler yapılarak geliştirilen yöntemler uygulanmıştır.

3.2.1 Plazmit DNA izolasyonu

Bu çalışmada plazmit izolasyonu kitleri ve plazmit izolasyonunun klasik yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1.1 Plazmit DNA izolasyon kiti I ile yapılan çalışmalar

A06O2 suşundan 4 tüpe aşılama yapılmış ve 28 ^{o}C'de gelişmesine göre 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde gelişme gözlendikten sonra 10 tane 10 mL'lik tüplere % 5 oranında aşılama yapılmış ve inkübasyona tekrar bırakılmıştır. Bu 10 tüpü 10 gün boyunca her gün 1 tüpten plazmit izolasyonu kiti I-i ("Fermentas" firmasının "GeneJet^{TM} Plasmid Miniprep Kit #K0502, #K0502" kiti) kullanarak plazmit izolasyonu işlemi yapılmıştır. İlk günün tüpünden plazmit izolasyonu için 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüpünde 5 dakika ve 14000 rpm'de santrifüj (Hettich, Germany) edilmiştir. Tüpün altında bir pelet oluşmadığından plazmit izolasyonu işlemi ilk günü yapılmamıştır. İkinci günün A06O2 suşlu tüpünden yapılan santrifüj sonucunda tüplerin altında pelet oluşturulmuştur. Pelet oluştuğundan daha da yoğun olması için tüplerin üst kısmındaki sıvı dökülerek altında çökmüş peletin üzerine aktif kültürden tekrar eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. İşlemden sonra pelet toplu iğne başı büyüklüğüne getirildikten sonra işleme devam edilmiştir. Plazmit izolasyonu işlemi I-i kiti kullanarak yapılmıştır. Kitle çalışma protokolü aşağıda verilmiştir.

Plazmit DNA izolasyonu kiti I ile çalışma protokolü:

1. Elde edilen peletin üzerindeki sıvı, çöküntüye dokunmadan atılmıştır. Peletin üzerine çözündürme solüsyonundan 250 µL eklendikten sonra tüp vorteks ile 10

saniye çalkalanmıştır, zaman zaman iyi karışım elde etmek için pipetle bir kaç kez çekilerek geri bırakılmıştır.

2. İşlemden sonra üzerine 250 µL lizis solüsyonu eklenmiş ve tüpler aşağı yukarı 4-6 kez çalkalanmıştır. Bu işlemde vorteks kullanılmamalıdır ve toplam işlemin süresi 5 dakikayı geçmemelidir.
3. Üzerine 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklenmiş ve 4-6 kez aşağı yukarı çalkalanmıştır.
4. Tüpler 5 dakika ve 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir
5. Santrifüjden sonra tüpün üzerinde oluşan sıvı çöküntüye dokunmadan pipetle iki tüpten aynı miktarda çekilerek özel GeneJET tüplerine aktarılmıştır.
6. Sonra tüpler 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiş ve özel GeneJET tüpünün altına süzülen sıvı atılmıştır.
7. Özel GeneJET tüpünün süzgeci olan kısmına 500 µL yıkama solüsyonu eklenmiş ve 30-60 saniye ve 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonra alttaki sıvı atılmıştır.
8. 7'nci aşama bir kez daha tekrarlanmıştır.
9. Alttaki sıvı dökülmüş ve 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonra özel GeneJET tüpünün alt parçası atılarak yerine temiz bir eppendorf tüpü yerleştirilmiştir.
10. Süzgeci olan tüpe 50 µL Elüsyon tamponundan eklenmiş ve 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Temiz tüpe geçen sıvı doğal olarak plazmit içerdiği kabul edildiğinden -20 ºC'de saklanmıştır.

1 lt 5x TBE tamponunun hazırlanışı:

60,5 gr Tris
30,9 gr Borik asit
2,92 gr EDTA pH=8

% 1'lik agaroz hazırlanmıştır. 1 gr agaroza 100 mL 1x TBE tamponu eklenmiş ve agarozun erimesi için mikrodalgada birkaç kez kaynatılmıştır. Kaynama noktasında olan agaroz biraz soğuduktan sonra üzerine 5 µL etidium bromid damlatılarak karıştırılmıştır. Agaroz soğumadan önce kutusuna dökülüp tarağı konulmuştur.

Katılaştıktan sonra elektroforez tankına (SCIE-PLAS, HU15 Standard, United Kingdom) yerleştirilerek üzerine 1x TBE tamponu ilave edilmiştir. Brom fenol blue boyasından 2 µL ve plazmit DNA'dan 5 µL alınarak, mikro pipetle çek-bırak yöntemi ile karıştırarak agarozun üzerinde tarağın oluşturduğu kuyucuklara ayrı ayrı konulmuştur. Bir kuyucuğa da standart 1 kb'lık DNA standardı yüklenmiştir. Jel elektroforez 90 v 50 mA'de 3-4 saat yürütülmüş ve UV ışınında incelenmiştir.

3.2.1.2 Klasik yöntemiyle plazmit DNA izolasyonu

10 mL'lik HS Broth besiyerinde 28 ºC'de 48 saat geliştirilen A06O2 ve B759 kültürünü 200 mL'lik besiyerine aktararak 28 ºC'de 6-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 14000 devir/dk hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra peletin üzerinde oluşan sıvı dökülüp santrifüj tüpünün dibinde oluşan pelet 379 µL sakaroz tamponunda çözülmüştür. 37 ºC'ye kadar ısıtılan bu ortama 120 µL (20mg/mL) lizozim çözeltisi ilave edilmiş ve 37 ºC'de su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Bu sürenin sonunda tüpler 30 dakika buzda bekletilmiştir. 48,2 µL Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, tüplere % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27,6 µL ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu aşamada ortamda viskozitenin artışı lizizin başladığını göstermektedir. Lizizin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37 ºC'de su banyosunda 10 dakika süre ile tutulmuştur. Bu süre bitiminde tüpler yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. Ortama yeni hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 27,6 µL ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile yavaş bir şekilde çevrilerek, kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları oluşturulmuştur. Ortam pH'sının uygulama sırasında 12,1-12,3 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 49,6 µL 2M Tris-Cl çözeltisi aktarılarak, 3 dakika süre ile yine düz bir zeminde karıştırılmıştır. Ortam pH'sının 8,5-9,0 arasına düşüşü ile nötralizasiyonun sağlandığı belirlenmiştir. Tüplere +4 ºC'de tutulan 5M NaCl çözeltisinden 71,7 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave ederek +4 ºC'de 15000 devir/dk hızında santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, plastik pastör pipetleri ile yeni tüplere aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 700 µL ilave edilmiştir.

Ortamlar +4 ºC'de 15000 devir/dk hızında 20 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmış ve eşdeğer hacimde izopropanol ile muamele edilmiştir. Ekstraktlar +20 ºC'de 1 gece bekletilmiş ve plazmit DNA, 15000 devir/dk hızında santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Son aşamada sıvı faz aktarılarak DNA çökeltisi kurutulmuştur. Çökeltiler, 20 µL Tris EDTA-2 içerisinde çözülmüş, agaroz jel elektroforezi uygulamasından önce RNaz A stok çözeltisinden 4 µL ilave edilerek 37 ºC'de 45 dakika inkübe edilmiştir (Menteş 2004). Klasik yöntemle yapılan çalışmanın sonucunda herhangi bir bant elde edilememiştir.

Aşağıda plazmit izolasyonunun klasik yönteminde kullandığımız çözeltilerin hazırlanışı verilmiştir.

Sakkaroz Çözeltisi:

Tris	0,655	g
EDTA	0,0372	g
Sakkaroz	6,7	g
Saf su	100	mL
pH	8,0	

Lizozim Çözeltisi:

Tris	0,3	g
Lizozim	0,2	g
Saf su	10	mL
pH	8,0	

Tris-EDTA-1

Tris	0,60	g
EDTA	9,31	g
Saf su	100	mL
pH	8,0	

Tris-Cl

Tris-Cl	31,52	g
Saf su	100	mL
pH	7,0	

SDS çözeltisi:

Tris	0,60	g
EDTA	0,74	g
SDS	20	g
Saf su	100	mL
pH	8,0	

Tris EDTA-2

Tris	0,121	g
EDTA	0,0037	g
Saf su	100	mL
pH	7,5	

RNaz A çözeltisinin hazırlanışı:

5 mL steril saf suyu içinde hazırlanan 0,05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5'e ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra, -18ºC'de saklanmıştır.

% 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanışı:

100 g fenol üzerine 20 mL saf su ve 3 g NaCl aktarılarak 45ºC'deki su banyosunda çözülmüştür. Ortama 0,1 g hidroksiguinolin ilave edilmiş ve karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

3.2.1.3 Plazmit DNA izolasyon kiti II ile yapılan çalışmalar

Her bir suş, B759, A06O2 ve E.coli (E.coli sadece 18 saatte geliştirilmiştir) 5 günde toplam 85 mL'lik besiyerinde geliştikten sonra 15 mL'lik tüplerle çalışan santrifüjde (IEC, USA) peletin yoğunlaşmasını sağlamak için üst kısmındaki sıvı dökülerek santrifüj birkaç kez yapılmıştır. Santrifüj ettikten sonra 15 mL'lik tüplerdeki peletleriyle birlikte 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılarak, 12 000 g hızına ayarlı santrifüjde 5-10 dakika santrifüj edilir. Sonra Plazmit DNA izolasyonu kiti II ile ("Sigma" firmasının GenElute HP Plasmid Miniprep Kiti) analiz yapılmıştır. Çalışma protokolü aşağıda verilmiştir:

1. 1,5 mL'lik tüpün dibine çöken pelete dokunmadan üzerindeki sıvı atılmıştır. Peletin üzerine 200 µl çözündürme solüsyonundan eklenmiş ve pipetle ya da tüpü aşağı yukarı şeklinde karıştırılmış, sonra üzerine 200 µl lizis solüsyonu eklenerek 6-8 kere devrilerek çalkalanmış (vorteks kullanılmamalı) ve 3-5 dakika bekletilmiştir.

2. 3-5 dakika bekletildikten sonra üzerine 350 µl nötralizasyon tamponu eklenmiş ve 4-6 kere aşağı yukarı karıştırılmış, sonra santrifüjde 12000 g hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Bu aşamada Özel Miniprep Binding Column tüpleri hazırlanır. 500 µl Özel tüpler için hazır Column Preparation solüsyonundan eklenmiş ve 1 dakika 12000 g hızında santrifüj edilmiştir.

4. İkinci aşamadan sonraki oluşan pelete dokunmadan üst kısmındaki sıvı lizat pipetle alınmış (peletin olduğu tüp atılır) ve özel tüpe aktarıldıktan sonra 1 dakika 12000 g hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra alta geçen sıvı atılmıştır.

5. Santrifüjden sonra özel tüpe 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklenmiş ve 1 dakika 12 000 g hızında santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı dökülmüş ve 750 µl yıkama solüsyonu 2 eklenmişir, sonra aynı hızda ve aynı süre santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı dökülerek tekrar aynı ayarda santrifüj edilmiş ve alt kısmı atılarak temiz santrifüj tüpüne özel tüpün üst kısmı konulmuştur.

6. Bu aşamada temiz plazmit DNA'sı elüsyon tamponu ile elde edilmiştir. Özel tüpe 100-50 µl (yüksek konsantrede plazmit DNA'sını elde etmek için 50 µl kullanılır) elüsyon tamponu eklenmiş ve aynı ayarda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı temiz ve saf plazmit DNA'dır (hemen elektroforezde bakılmayacak ise derin dondurucuda bir süre saklanabilir).

3.2.1.4 Plazmit büyüklüklerinin hesaplanması

Standardın verilerini kullanarak elde edilen plazmit görüntülerinden Gel Logic Imaging System (USA) cihazına dahil görüntüleri işleyen Kodak yazılımını kullanarak sonuçlar hesaplanmıştır.

Supercoiled DNA Ladderi (U.S. Patent No. 4,403,036) 2 ile 16 kb aralığındaki DNA plazmitlerini ölçmek için 11 tane Plazmit bandını içermektedir.

Tamponun içeriği:

10 mM Tris-HCl (ph 8.0)
10 mM EDTA

Kullanım önerileri: Yaklaşık olarak her 1 mm için 0,1 µg standart kullanılmıştır.

Maksimum doğruluk için standart ve plazmit bantlarını karşılaştırarak net ölçümün alınması ve yükleme sırasındaki kullanım miktarı büyük öneme sahiptir. Örnek olarak, 1 µg Supercoiled Ladder kullanıldığında (10 ng her bant için) plazmitten de 30 ng kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamız sırasında metot bölümünde detayları verilen 3 yöntem kullanılmıştır. Bu metotlardan Kit I ve Klasik yöntemle yapılan çalışmalarda herhangi bir bant elde edilememiştir.

Bazı kaynaklarda asetik asit bakterilerine ait suşların tam gelişmesi için 6-7 gün inkübasyona terk edildiği görülmüştür. Kit I için hazırlanan 10 tüpüp tümüyle izolasyon işlemi yapılmamıştır. Çalışmada ancak dördüncü gün çok az miktarda pelet oluşturuldu ve Kit I ve Klasik yöntemle olumlu sonuç alınamamıştır. B 759 ve A06O2 suşuyla sırasıyla 6, 7, 8, 9 ve 10. günün tüplerinde kitle işlemler yapıldı fakat agaroz jel elektroforezinden sonra plazmit izolasyonu gerçekleştirilememiştir.

Rezaee vd. (2005) yaptıkları araştırmalarında kullandıkları plazmidi hızlı tarama yöntemi uygulanmıştır. Bu yönteme göre bakteri önce HS agarda geliştirilmiştir. B759 ve A06O2 suşları HS agar besiyerine yayma yöntemi ile ekimi yapılarak 2-3 gün 28 ^{o}C'ye ayarlı inkübatörde bekletilmiştir. 2-3 gün sonra oluşan kolonileri steril kürdanla toplayarak 300 µL HS Broth besiyerine aktararak kültür geliştirilmiştir. İnkübasyon sonrası izolasyon işlemi Kit I ile uygulanmıştır. Sonucunda B759 ve A06O2 suşlarından plazmit DNA bandı görülmemiştir.

Çalışmada büyük zorluğun selüloz içine gömülü bakterilerin kimyasallarla temasının kesilmesi sonucu bakteri DNA'sı veya plazmidinin açığa çıkarılması zorlaştığından genelde sonuç alınamamaktadır. Bu nedenle selülaz enziminin kullanılmasına karar verilmiştir. Selülaz enzimi kullanarak yapılan çalışmalarda 5 tüpe A06O2 suşlarından 5 µL aşılama yapılmıştır. Oluşan peletlerin üzerindeki bakterilerin hücre duvarını parçalamak ve plazmit izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla her 2 günde bir (yani aşılamadan sonra sırasıyla 2, 4, 6, 8 ve 10. günlerde) selülaz enzimi ile parçalama yöntemleri (farklı metotlar ve ayarları denemek için) uygulanmıştır.

Kültür toplamda beş gün her gün besiyeri miktarını arttırarak, yani birinci gün 5 mL'lik tüpe kültürlerimizden aşılayıp 28 °C'ye ayarlanmış inkübatöre bırakılmış, İkinci gün 5

mL'lik kültür 10 mL'lik besiyerinin üzerine aktarılmış, üçüncü gün 20 mL'lik besiyerine, dördüncü gün 50 mL'lik besiyerine aktarılmış ve 5. gün analiz yapılmıştır. Kit II kullanıldığında olumlu sonuç alınmıştır.

Saxena vd. (2001) yaptıkları çalışmalarının birinde selülazı kullanarak hücre duvarını parçalama işlemini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmaya göre kültüre % 0,2 oranında selülaz katılarak 24-48 saate bırakılmıştır. Çalışmada kullandığımız kültürün peletinde 24 saatte parçalanma gerçekleşmediği için 48 saati tamamlamak için bir güne daha bırakıldı. Ertesi günü peletin tamamen parçalanmadığı görülmüştür. Saxena ve arkadaşlarının belirttiği gibi 48 saat sonra plazmit izolasyonu kiti I ile izolasyon işlemi yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi sonucunda plazmit DNA'sı görülmemiştir.

Diğer bir denememizde, Cheng vd. (2009) yaptıkları çalışmada selüloz peletini parçalamak için selülaz enziminden % 2 oranında katılarak 50 ^{o}C'ye 100 dev/dk ayarında çalışan çalkalamalı banyoda 3 saat bekletilmiştir. Bu denemelerle paralel olarak kullanmakta olduğumuz yöntemi modifiye etmeye çalışılmıştır. % 5 oranında enzim katılarak 24 saat çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Kit 1'i kullandığımız izolasyon sonrası plazmit DNA'sı görülmemiştir.

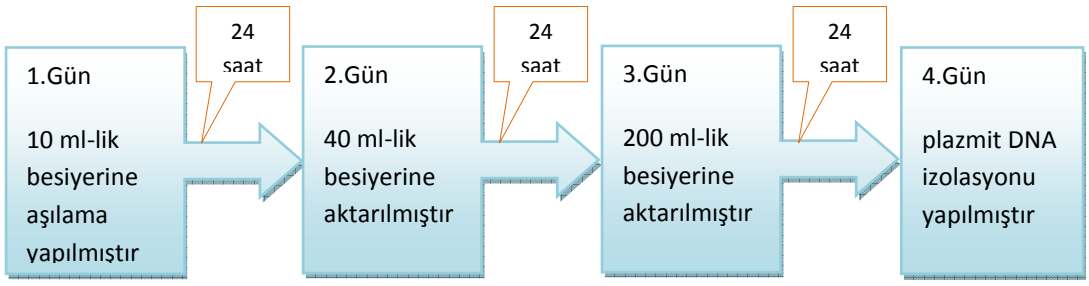
Aşılamadan 6 gün sonra: Hwang vd. (1999) yürütmüş oldukları çalışmada önce % 0,1 selülaz ekleyerek 24 saat beklettikten sonra santrifüjde 8000 g 10 dakika santrifüj etmişlerdir. Çalışmamızda aynı metodu uyguladık ve sonrasında plazmidi izole etmek için I-i kitle analize devam ettik. Agaroz jel elektroforezi sonucunda plazmit görülememiştir.

Yukarıda da ifade edildiği gibi Saxena vd. (2001) % 0,2 selülaz katarak 24-48 saat bekletmişlerdi, Hwang vd. (1999) % 0,1selülaz ekleyerek 24 saat beklettikten sonra 8000 g'de 10 dakika santrifüj etmişlerdi, Cheng vd. (2009) %2 selülaz katarak 50 ^{o}C'ye 3 saat boyunca 100 devir/dk hızında çalkalamışlardı. Dördüncü tüple yapılan çalışmalar için değiştirilen kısımlar: % 5 oranında enzim katarak 24 saat beklettikten sonra önce 3 saat boyunca 70 ^{o}C'ye 150 devir/dk hızında çalkalanmış sonra 12000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş, sonra plazmit DNA'sı izolasyonu kiti I ile analize devam edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezini ise aynı ayarlarda gerçekleştirdik ve bu yöntemde de plazmit görülememiştir.

Beşinci tüple yapılan çalışmalar için homojenizatör kullanılmıştır. 120 mL gelişmiş kültür önce homojenize edilmiş, sonrasında % 8 oranında enzim ekleyerek pH 5'e ayarlanarak 1 saat bekletilmiştir. Sonra 12000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Plazmit DNA'sı izolasyonu kitiyle analize devam edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinin sonucunda plazmit DNA görülmemiştir. Dolayısı ile selülaz ile yapılan çalışmaların tümünde istenilen sonuçlar alınamamıştır.

Beklediğimiz sonuçlara ulaşılamadığımız için yöntem geliştirilmeye devam edilmiştir. Bu kez kültürü geliştirme yöntemi değiştirilmiştir.



Şekil 4.1 Kültürün geliştirilmesinde besiyerine aktararak ve onu arttırarak yapılan yöntem

Bu yöntemle kültür için daha iyi bir besi ortamı yaratabileceği görüldü. Bu denemelerde A06O2 ve B759 suşlarını paralel olarak kullanıldı. 3 gün sonra kalın ve geniş bir peletler elde edildi. Kit I'i kullanarak yapılan izolasyon işleminde sonuç alınamamıştır.

Bu kez Kit II ile verilen protokolü değiştirerek analiz yapılmıştır. A06O2 ve B759 suşu 20 mL'lik besiyerinde paralel olarak aktifleştirilir ve 7 gün 28 ^{o}C'lik inkübatörde bekletilir. Her bir solüsyonları ve tamponları ekledikten sonraki yapılan işlemler değiştirilmiştir. Her bir suş için bu 4 tane ayrı yöntemler uygulanmıştır.

Çizelge 4.1 Değiştirilmiş protokolün koşulları

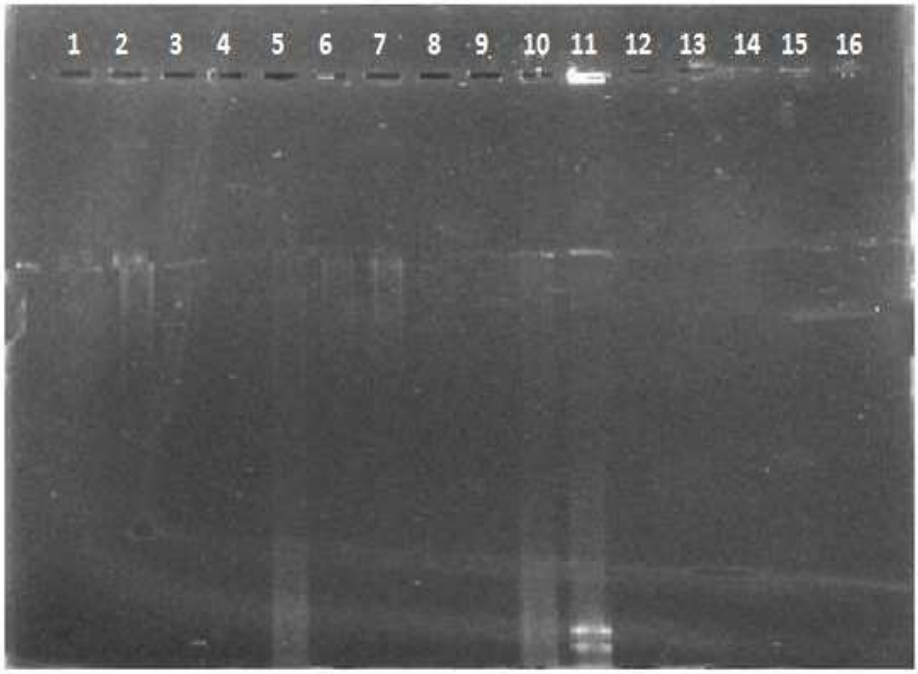
Solüsyon, tampon/N	Protokole göre	1	2	3
Çözündürme solüsyonu	Vorteks veya pipetle çek-bırak	Aşağı yukarı 4-6 kez çalkalama	Aşağı yukarı 10-12 kez çalkalama	Pipetle çek-bırak (iyice)
Lizis tamponu	Aşağı yukarı 4-6 kez çalkalama (vorteks yasak)	Pipetle çek-bırak	Vorteks	Aşağı yukarı 10-12 kez çalkalama
Nötralizasiyon solüsyonu	Aşağı yukarı 4-6 kez çalkalama	Vorteks	Pipetle çek-bırak	Vorteks (30-60 saniye)

Bu değiştirilmiş yöntemleri kullanarak yapılan izolasyondan sonra sonuçlar tekrar negatifti.

Bir diğer denememizde kit II ile yapılan Plazmit DNA'sı izolasyonu işleminden sonra plazmidi görüntülemek için agaroz jel elektroforezinin yönteminde de bazı değişiklikler yapılmıştır. Etidium bromid önceki çalışmalardaki gibi agaroz jelini hazırlarken eklenmemiştir, elektroforez uygulamasının sonunda agaroz jeli 10 µL Etidium Bromid eklenmiş TBE tamponunda yıkatılmıştır. Elektroforez ayarı 2-3 saat 90 V ve 50 mA olarak ayarlanmıştır.

Şekil 4.2'de jel yırtıldığından ve bazı bantlar jelin dışına çıktığından sonuçlar yeterince iyi görünmemektedir. Fakat bazı yerlerde plazmitlerin olduğu görünmektedir. Soldan sağa doğru yüklenmiş Plazmit DNA'larının isimleri:

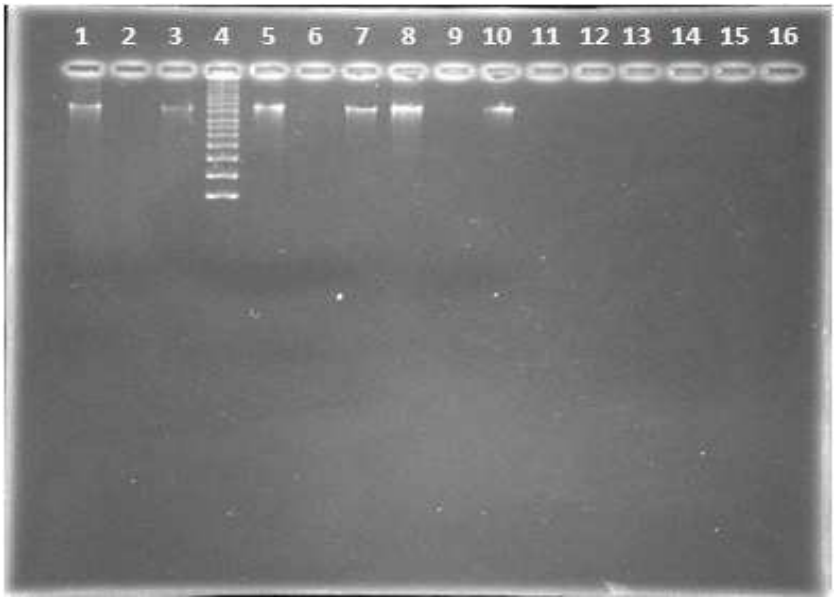
1) *E. coli* (22.10.10)
2) B 759 (22.10.10)
3) *E. coli* (22.10.10)
4) A06O2 (22.10.10)
5) A06O2 (22.10.10)
6) *E. coli* (22.10.10)
7) B759 (22.10.10)
8) *E. coli* (22.10.10)
9) A06O2 (22.10.10)
10) B759 (22.10.10)
11) Ladder



Şekil 4.2 Agaroz Jel Elektroforezi sonucu (22.10.10)

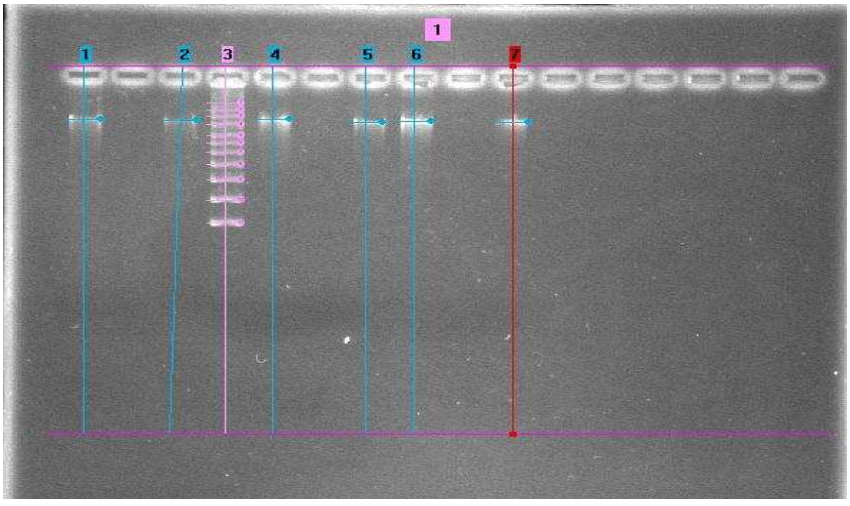
Kit II-i kullanarak bir daha analiz yapılmıştır. Bu kez agaroz jel elektroforezinin süresini 1 saate indirilmiştir, çünkü yüklemeden 1 saat sonra bantlar çok çabuk yürüdüğü görülmüştür. Sonucunda şekil 4.3'de plazmitleri net görünmüştür. Soldan sağa doğru yüklenmiş plazmitlerin sırası:

1. B759 (5 µL)
2. A06O2 (5 µL)
3. *E.coli* (5 µL)
4. Ladder
5. B759 (7,5 µL)
6. A06O2 (7,5 µL)
7. *E.coli* (7,5 µL)
8. B759 (12,5 µL)
9. A06O2 (12,5 µL)
10. *E.coli* (12,5 µL)



Şekil 4.3 Agaroz jel elektroforezi sonucu (12.11.2010)

Plazmit büyüklüklerinin hesaplanması şekil 4.4 ve çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.4 12.11.2010 tarihinde yapılan çalışmada izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin hesaplanması

Çizelge 4.2 12.11.2010 tarihinde yapılan çalışmaların sonucu

Bant	1:1	2:3	3:Ladder	4:5	5:7	6:8	7:10
	B759	*E. coli*	Standart: 1µg	B759	*E. coli*	B759	*E. coli*
	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)
1	11397,6	11027,5	16210	11212,5	10657,3	10842,4	10657,3
2			14174				
3			12138				
4			10102				
5			8066				
6			7045				
7			6030				
8			5012				
9			3990				
10			2972				
11			2067				

Kit II-i kullanarak yapılan diğer bir çalışmamızda selüloz üretebilen diğer suşlarla da deneme yapılmıştır (A06O2, B759, *E. coli* dâhil 079, 063, 0612, 0712, 142). Bazı suşlar selüloz peleti oluşumunda farklılıklar göstermiştir. 079 suşunda pelet koloniler şeklinde oluşmuştu. 063 suşunda pelet büyüklüğü çok küçüktü. 0612 suşunun peletleri A06O2 suşundan ürettiğimiz peletlere benzerlik göstermişti. 0712 suşunda pelet hiç görünmüyordu. 142 suşundaki peletler yok denilecek kadar küçük ve azdı. Şekil 4.5-de gördüğünüz agaroz jeline sırayla soldan sağa doğru aşağıdaki suşlar yüklenmiş:

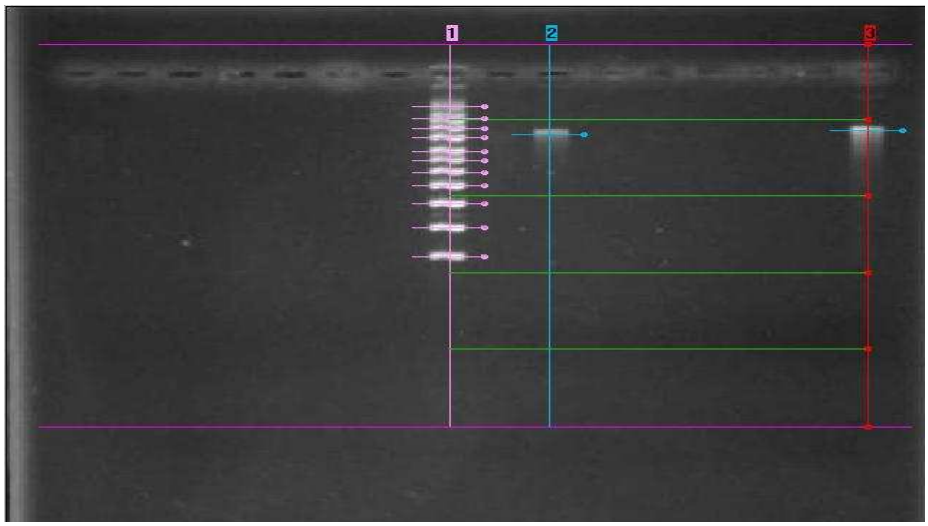
1. A06O2	(5µL)	7. 142	(5µL)	13. 0612	(7,5µL)
2. B759	(5µL)	8. Ladder	(2µL)	14. 0712	(7,5µL)
3. 079	(5µL)	9. A06O2	(7,5µL)	15. 142	(7,5µL)
4. 063	(5µL)	10. B759	(7,5µL)	16. *E.coli*	(7,5µL)
5. 0612	(5µL)	11. 079	(7,5µL)		
6. 0712	(5µL)	12. 063	(7,5µL)		

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi B759 (10) ve *E.coli* (16) suşlarında bant görülmüştür.



Şekil 4.5 Agaroz jel elektroforezinin sonucu (26.11.2010)

Plazmit büyüklüklerinin hesaplanması şekil 4.6 ve çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.6 26.11.2010 tarihinde yapılan çalışmada izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin hesaplanması

Çizelge 4.3 26.11.2010 tarihinde yapılan çalışmaların sonucu

Bant	1:Ladder	2:10	3:16
	Standart: 1µg	B759	*E. coli*
	MW (bp)	MW (bp)	MW (bp)
1	16210	10780,7	11798,7
2	14174		
3	12138		
4	10102		
5	8066		
6	7045		
7	6030		
8	5012		
9	3990		
10	2972		
11	2067		

B759 referans suşla projede kullanılan A06O2 suşun ürettiği bakteriyel selülozun yapısal özelliklerinin farklı olduğu daha önce saptanmıştı (Akoğlu vd. 2010). Bu farklılıkların kökenini belirlemek amacıyla mikroorganizmanın genetik özelliklerinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasına ihtiyaç bulunmakta idi. Bu nedenle suşlar arasında plazmit farklılıklarını varlığının saptanmasına çalışılmıştır.

Selüloz üretimiyle ilgili genlerin kromozomun yanı sıra plazmit DNA'da da yer almaktadır. *Gluconoacetobacter xylinum*'un bir suşunda bulunan 44 kb'lık plazmidin selüloz üretiminde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu plazmidin giderildiği suşlarda doğal suşa kıyasla selüloz üretimi önemli ölçüde azalmıştır (Rezaee vd. 2005).

B759 da elde edilen plazmidin 10.7 kb olmasına karşın Rezaee vd. (2005) 44 kb'lik plazmit izole etmişlerdir. Dolayısı ile bu iki suşunda farklı olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan yerli izolatımız A06O2'de ise plazmit bulunmaması selüloz üretimini etkileyen ekolojik farklılıkların bulunduğunu göstermektedir.

Selüloz üreten bakterilerin selüloz verimleri düşük olduğundan verimliliği artırmak amacı ile çeşitli mutasyon ve optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu yöntemlere ek olarak modern rekombinant gen teknolojisi tekniği de verimliliği arttırmak amacı ile kullanılmaktadır. Selüloz üretim yeteneğine sahip bakterilerde gen rekombinasyonunu gerçekleştirmek için her şeyden önce hedeflenen bakteri için konakçı vektör sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Çeşitli *Ga.* suşlarından birçok plazmit izole edilmiş ve karakterizayonu yapılmıştır. *Ga.*'ler için genetik transformasyon sistemleri ve plazmit vektörler hazırlanmıştır. Örneğin *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 3288 suşu tarafından taşınan 7 plazmit belirlenmiştir. Araştırmacılar izole ettikleri yerel bir suş olan *Acetobacter* sp. BPR 2001 suşunun da plazmit taşıdığını tespit etmişler ve bu plazmidi pAH4 olarak adlandırmışlardır. Bu plazmidin büyüklüğü yaklaşık 4 kb olarak belirlenmiş ve restriksiyon endonükleaz haritalaması sonucunda vektör olarak kullanımının uygun olduğu saptanmıştır. pSA19, pSA7 ve pK5 gibi shuttle vektörler selüloz üreten bakterilerin gen rekombinasyonu için vektör olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. (Beppu vd. 1994). Çalışmamızda bu konu ele alınmadığı için 10,7 kb'lik plazmidin vektör olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

5. SONUÇ

Çalışmada suşlar arasında plazmit farklılıklarının bulunduğu ve bakteriyel selüloz üretiminin suşlara göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Selülozun yapısal farklılığının buradan kaynaklandığını bu aşamada ifade etmek zor olmakla birlikte çalışmada, elde edilen B759 adlı suşa ait plazmidin vektör olarak kullanılıp kullanılamayacağının tespiti gerekmektedir. Buna paralel olarak selüloz üretimi ile ilişkili dizilerin prob olarak kullanılması, plazmit ve kromozom üzerindeki bölgelerin aydınlatılmasını sağlayacağı gibi çalışmaya ayrı bir boyut kazandıracaktır. Çalışma kapsamında sadece plazmit varlığının saptanması esas alındığından bu yönler üzerinde çalışılmamıştır. İlginç olan ise A06O2 suşunun plazmit taşımamasına rağmen BS üretmesidir.

KAYNAKLAR

Akoğlu A., Karahan A. G., Çakmakçı M. L. ve Çakır İ. 2010. Bakteriyal selülozun özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı. Gıda 35 (2): 127-134.

Anonymous 2010. http://www.novate.ru Erişim Tarihi: 12.10.2010

Anonymous 2010
http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Envirron/CELLULOSE/axylin.html

Battad-Bernardo, E., McCrindle, S. L., Couperwhite, I. and Neilan, B.A. 2004. Insertion of an E. coli lacZ gene in Acetobacter xylinus for the production of cellulose in whey. FEMS Microbiology Letters 231 (2), 253–260.

Benziman, M., Haigler, C.H. and Brown, Jr., R.M. 1980. Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 77, 6678-6682

Beppu, T., Tonouchi, N., Horinouchi, S. and Tsuchida, T. 1994. Acetobacter, Plasmid Originating Therein, And Shuttle Vector Constructed From Said Plasmid. Publication no: Wo/1994/020626.

Bielecki, S., Krystynowicz, A.,Turkiewicz, M. and Kalinowska, H. 2000. Bacterial Cellulose. In: Steinbuchel A (Ed), Biopolymers: Polysaccharides I., Vol.7, pp. 37-90. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany.

Brown, T.A. 2000. Esential Moleculer Biology, 2nd Edn.,Vol. 1., A Practical Approach.Oxfort Univ.Press., Oxford.UK.

Brown, M.R. 2006.
http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html
Erişim Tarihi: 13.09.2010

Changjin S., Chung S., Lee J., Kim S., 2002. Isolation and cultivation characteristics of Acetobacter xylinum KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(5), 722-728.

Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y. and Shoda, M., 2000. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor, *Biotechnoloy and Bioengineering*, 68, 345-351.

Chaplin, M. 2011. http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html). Erişim Tarihi: 23.12.2010

Cheng, H.P., Wang PM, Chen JW, Wu WT. 2002. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. Biotechnol. Appl. Biochem., 35: 125-132.

Cheng K.C., J.M. Catchmark and Demirci A. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *J Biol Eng.*; 3: 1-10

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown, M.R., 2006. Microbial Cellulose-The Natural Power to Heal Wounds, *Biomaterials*, 27, 145-151.

De Ley J., Gillis M. and Swings J., 1984. *Family Acetobacteraceae*, pp. 267–268.

De Wulf P., Joris K. And Vandamme EJ., 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 67, 376-380.

Dilsiz, N. 1998. Nuclear Transfer and Biotechnology. Sendrom, 10, 99-105.

Geyer, U., Heinze, T., Stei, A., Klenn, D., Marsch, S., Schumann, D. and Schmauder, H., 1994. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose, *Int. J. Biol. Macromol*, 16, 343-347.

González Á., Hierro N., Poblet M., Rozès N., Mas A. and Guillamón JM., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 853–860.

Hestrin, S. and Schram, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*, *Biochem J.*, 58, 345-352.

Hikawu, S., Hiroshi, T., Takayasu, T. and Yoshinaga, F. 1996. Manufacture of bacterial cellulose by addition of cellulose formation stimulators. Japanese patent, 96316922.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Edition. pp. 71, 84, 103, 107, 117, 126, 142. Williams & Wilkins, Baltimore.

Hwang J.W., Kook Y.Y., Hwang J.K., Pyun Y.R., and Kim Y.S. 1999. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *J Biosci Bioeng*, 88(2), 183–188.

Iguchi, M., Mitsuhashi, S. and Ichimura, K. 1988. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength. US Patent 4,742,164.

Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. And Tisler, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. Enzyme and Microbial Technology, 31:986-991.

Ishikawa, A., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1996. Production of bacterial cellulose with pyrimidine analogue- resistant strain. Japanese patent, 08000260.

Johnson, D.C. and Neogi, A.N. 1989. Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US Patent, 4863565.

Jonas, R. and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability, 59:101-106.

Klemm D., Schumann D., Udhard U. and Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. Prog. Polym. Sci., 26: 1561-1603.

Kouda T., Naritomi T., Yano H. and Yoshinaga F., 1997. Effect of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2), 124-127.

Krystynowicz, A., Czaja, W. and Bielecki, S. 1999. Biosynthesis and application of bacterial cellulose. Zywnosc., 3:22-33.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Pomorski, L., Kolodziejczyk, M. and Bielecki, S. 2000. The evalution of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material. 14th Forum for Applied Biotechnology, pp. 213-220.Gent, Belgium, Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent, Proceedings Part I.

Krystnowicz, A., Czaja, W., Jezierka, A.W., Miskiewicz, M.G., Turkiewicz, M. and Bielecki, S., 2002. Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 29, 189-185.

Lapuz, M., Gallardo, E., and Palo, M. 1967. "The Nata Organism – Cultural Requirements, Characteristics, and Identity", *The Philippine Journal of Science*, 96. 91-109.

Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. and Pretorius IS. 2002. Microbial Cellulose Utilisation: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66: 506-577.

Maguire, A., 1997. Bacterial Cellulose Based Medical Devices, *Master of Engineering Science,* The University of Western Ontario, London.

Maloy S.R., Cronan J. and Freifelder D. 2008. Microbial Genetics. Paperback Second Edition, Narosa.

Matsushita K., Nonobe M., Shinagawa E., Adachi O. and Ameyama M., 1985. Isolation and characterization of outer and cytoplasmic membranes from spheroplasts of acetobacter-aceti, *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(12) 3519-3526.

Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. and Yoshinaga, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(4):575-579.

Menteş Ö. 2004. Ekmek üretiminde kullanılan ekşi hamurdan laktobasillerin izolasyonu, identifikasyonu ve bu bakterilerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi, 105, 30-32.

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(4): 563-568.

Öztürk, M. 2005. Kullanılmış Kağıtların Geri Kazanılması Kullanılmış Kağıttan Kağıt Üretimi. http://www.cevreorman.gov.tr/belgeler1/kagit.doc 1-24

Raspor P. and Goranovič D. 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology,* 28(2), 101-124.

Rezaee A., Solimani S. and Forozandemogadam M. 2005. Role of plasmid in production of *Acetobacter xylinum* biofilms, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology,* 1(3), 121-124.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria, *Microbiological Reviews*, 55, 35-38.

Saxena, I.M., Brown, R.M., JR., Fevre, M., Geremia, R.A. and Henrissat, B. 1995. Multidomain architecture of betaglycosyl transferases: implications for mechanism of action. J. Bacteriol., 177:1419-1424.

Saxena I.M. and Brown R.M.Jr. 1997. Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive â-glycosyltransferases with the common motif ‘D, D, D35Q(R,Q)XRW, Cellulose, 4, 33-49.

Saxena, I.M, Brown, Jr.R.M. and Dandekar. T. 2001. Structure-function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. Phytochemistry 57: 1135-1148.

Saxena, I.M., Dandekar, T. and Brown, Jr.R.M. 2005. Mechanisms in Cellulose Biosynthesis, *Oxford Journals*, 96, 9-21

Shah, J. and Brown, M.R. 2005. Towards Electronic Paper displays made from Microbial Cellulose, *Applied Microbial Biotechnology*, 66, 352-355.

Skinner, P.O.N. and Cannon, R.E. 2000. Acetobacter xylinum: An inquiry into cellulose biosynthesis. The American Biology Teacher, 62:442-444.

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 Conditions, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33, 1-5.

Son, H.J., Kim, H.G., Kim, K.K., Kim, H.S., Kim, Y.G. and Lee, S.J. 2003. Increased Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter sp.* V6 in synthetic media under Shaking Culture Conditions, *Bioresource Technology*, 86, 215- 219.

Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F. and Beppu T. 1996. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in Acetobacter xylinum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 60(8), 1377–1379.

Trček J. and Teuber, M. 2002. Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters,* 208, 69–75.

Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1997. Production of Bacterial Cellulose by Agitation Culture Systems, *Pure.&Applied Chemistry,* 69, 2453-2458.

Valla, S., Coucheron, D.H., Fjaervik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., Amikam, D. and Benziman, M. 1989. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinus: complementation of cellulose negative mutant by UDPG pyrophosphorylase structure gene. Mol. Gen. Genet., 217:26-30.

Vandamme EJ., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K. and De Wulf P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability*, 59(7), 93-99.

Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. and Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. Cellulose, 5:187-200.

Yamada Y. and Yukphan P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 15–24.

Yamada, Y., Hoshıno, K. and Ishikawa, T. 1998. *Gluconoacetobacter* corrig.(*Gluconoacetobacter* [sic]). In Validation of Publication of New Names and New Combinations PreviouslyEffectively Published Outside the IJSB, List No. 64. Int. J. Syst Bacteriol., 48:327-328.

Yamanaka, S., Watanabe, K. and Suzuki, Y. 1990. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. European patent 0396344A2.

Yamashita S., Uchimura T. and Komagata K., 2004. Emendation of the genus Acidomonas Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 865–870.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 61(2):219-224.

Zubay Geoffrey L. 1998. Biochemistry, 4th Ed., Mc Graw Hill, USA.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yerbol İmanaliyev

Doğum Yeri: Kazakistan

Doğum Tarihi: 09.11.1985

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İnglizce, Rusça, Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Kazakistan, Shymkent, No. 50 lise (1992-2003)

Lisans :M. Auezov Güney Kazakistan Devlet Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2003-2007)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2008 – Nisan 2011)