

Çeşitli Gıda Atıklarından Selüloz Üreten Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Yaşar ANDELİB AYDIN, Nuran DEVECİ AKSOY

İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, çürük meyvelerden ve organik sirke- lerinden mutasyona dirençli selüloz üretebilen asetik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanmaları ve kültür koleksiyonlarına kazandırılmaları amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kalsiyum karbonat (CaCO₃)-etanol besiyerinde asetik asit üreten ve Hestrin-Schramm (HS) besiyerinde selüloz oluşturabilen suşlar, biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır. Selüloz üretim miktarı, hücre sayısı ve glukoz derişim analizleri ile saptanmış; selüloz yapısı ise Dearing metodu, X-ışınları kırınımı (XRD) ve elektron mikroskopi ile gösterilmiştir. Selüloz üretim kapasitesi yüksek ve uzun dönemli saklama koşullarına dayanıklı suş, 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Bulgular: Çoğunluğu (%63,4) meyvelerden olmak üzere asetik asit bakterilerinin koloni morfolojilerine uyan toplam 112 koloni elde edilmiş, bunlar arasında asetik asidi okside eden 35 izolatın altı tanesinin selüloz ürettiği saptanmıştır. Biyokimyasal test sonuçları, izolatların, *Gluconacetobacter* türüne ait olduklarını ortaya koymuştur. Bu izolatların, 0.56-4.7 g/l aralığında selüloz üretebildikleri saptanmıştır. XRD analizi, yalnız bir suşun tipik "Selüloz I kristal" yapıda selüloz sentezleyebildiğini göstermiş, ancak asit hidrolizinin %95,14-%98,57 geri kazanım oranları sağlaması, tüm numunelerin selüloz yapısında olduğunu doğrulamıştır. Pasajlar ve stoklanma sırasında selüloz üretim kapasitesini koruyabilen tek suş, çürük erikten izole edilen P2A olmuştur. 16S rRNA dizisinin birincil veri tabanlarındaki sekanslar ile kıyaslanması sonucunda elde edilen %99,8 benzerlik nedeniyle bu izolat, *G. hansenii* P2A olarak adlandırılmıştır.

Sonuç: Çalışma sonucunda, yüksek miktarda (1.275±0.15 g/l) bakteriyel selüloz sentezleyebilen ve uzun dönem saklama koşullarına dirençli bir suş (*G. hansenii* P2A) elde edilmiştir. Bu suş, KUEN 1606 referans numarası ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, "Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi" koleksiyonuna alınmış olup, bakteriyel selülozün ticari boyuttaki üretimine olanak sağlayabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Asetik asit bakterileri, *Gluconacetobacter* türleri, bakteriyel selüloz

SUMMARY

Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria Producing Cellulose from Various Food Wastes

Objective: This study aimed for the isolation and identification of mutation-resistant cellulose producing acetic acid bacteria from fruits and organic vinegar samples through biochemical and molecular methods.

Materials and Methods: Strains that could produce acetic acid in calcium-carbonate (CaCO₃)-ethanol culture media, and produce cellulose in Hestrin-Schramm (HS) culture media were identified in genus level by application of relevant biochemical tests. The amount of the cellulose produced was determined by cell count and glucose concentration analysis. Cellulose structure was verified by the micromethod described by Dearing and by XRD analysis. Most efficient strain, selected according to the high level of cellulose productivity and stability over long-term preservation, was identified at species level by 16S rRNA gene sequence analysis.

Results: A total of 112 colonies compatible with the colony morphologies of acetic acid bacteria were isolated. The majority (63.4%) were originated from the rotten fruits. It was determined that six of the 35 isolates that oxidised acetic acid, produced cellulose. Elaborate biochemical tests supported the affiliation of selected isolates to *Gluconacetobacter* genus. Cellulose production capacities of these strains were determined within the range 0.56-4.7 g/l, after incubation in HS medium for a week at 30°. XRD analysis showed that only one strain was able to produce "Cellulose I crystal" type crystalline cellulose. However, acid hydrolysis of all samples confirmed cellulose structure due to recovery rates of 95.14%-98.57%. Only strain that could preserve its cellulose production capability over passages and long-term storage, was P2A isolated from a rotten plum. Comparison of the 16S rRNA sequence of this strain with similar sequences obtained from primary data-banks revealed 99.8% sequence similarities with *G. hansenii* species and thus, the strain was named as *G. hansenii* P2A.

Conclusion: As a result, a strain that exhibited high production of bacterial cellulose (1.275±0.15 g/l) and resistance to long term preservation, was isolated and identified as *G. hansenii* P2A. The strain was included under the reference number KUEN 1606 in the culture collection of the "Microorganism Culture Collections Research and Application Center" Department of Microbiology Istanbul University Faculty of Medicine, Turkey. This strain was suggested as a candidate organism for the industrial production of bacterial cellulose.

Key words: Acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter* species, bacterial cellulose

Alındığı tarih: 15.12.2012

Kabul tarihi: 02.02.2013

Yazışma adresi: Yaşar Andelib Aydın, Ayazağa Mah. 34469 Sarıyer / İstanbul

e-posta: erdoganyas@itu.edu.tr

GİRİŞ

Odon, kenevir, pamuk ve benzeri bitkilerin hücre duvarlarının ana bileşeni olan selüloz, β (1→4) bağlı glukoz moleküllerinden oluşan bir polisakkarittir. Bir asetik asit bakterisi olan *Gluconacetobacter* türleri başta olmak üzere bazı bakteriler, mantarlar, algler ve tulumular olarak adlandırılan deniz canlılarının da selüloz üretebildikleri bilinmektedir. Bu yolla sentezlenen selüloz, biyo-selüloz, mikrobik selüloz ya da bakteriyel selüloz olarak adlandırılmaktadır⁽¹⁾.

Bakteriyel selüloz, bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı kimyasal yapıya sahiptir. Ancak saflık, mekanik dayanıklılık, su tutma kapasitesi, fibril çapı ve biyoyumluluk özellikleri bakımından bitkisel selüloza kıyasla üstündür^(2,3). Bu nedenle, özellikle son yirmi yılda, bakteriyel selüloz ve kompozitlerinin ilaç, sağlık ve malzeme bilimi alanlarında geniş ilgi uyandırdığı bilinmektedir^(1,4,5). Bakteriyel selülozun ticari uygulamaları arasında yapay kan damarı, doku ve cilt takviyesi, akustik diyafram ve kâğıt ve katkı maddesi olarak kullanımı bulursa da, bu malzemenin üretimi halen düşük seviyededir. Bunun en temel nedenleri, üretim maliyetlerinin yüksek oluşu ve kullanılan suşların üretim koşulları içerisinde selüloz üretim becerilerini koruyamamalarıdır. Bu nedenle, bakteriyel selüloz kullanımının yaygınlaşabilmesi için, selüloz üretim kapasitesi yüksek, mutasyona dirençli bakteri türlerinin izolasyonu ya da mutasyon etkisini minimuma indirecek üretim yöntemlerinin geliştirilmesi gerekir⁽⁶⁾.

Selüloz üretebilen pek çok mikroorganizma türü bulunmasına rağmen, bilimsel çalışmalarda model teşkil eden tür, şekerleri ve alkollerini, asetik aside oksitleyebilme özelliği ile karakterize, *Acetobacteraceae* ailesine mensup, *G. xylinus* türüdür^(1-3,6,7). Mutlak aerob olan *Gluconacetobacter* türlerinin, oksijence zengin ortamda bulunmak, kuruma ve radyasyona karşı korunmak gibi nedenlerle, besiyerindeki karbon kaynağını tüketerek, kendilerini içine yerleştirecekleri selülozik bir biyofilm sentezledikleri bilinmektedir^(5,8-10). *Acetobacteraceae* ailesinde selüloz ürettiği tespit edilmiş olan diğer türler ise, çoğunlukla *Gluconacetobacter* cinsine ait türler olup, *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. intermedius*, *Acetobacter aceti* ve *A. pasteurianus* olarak sıralanmaktadır^(6,9,11-13). Çoğunlukla meyve, çiçek, fermente gıda, içecek ve

sirke içeren ortamlarda gerçekleştirilen selüloz üretimi çalışmalarında, günümüze değin ulaşılan en üst değer 15,3 g/l'dir^(6,14-19). Bu değere, Toyosaki ve ark.⁽²⁰⁾ tarafından vişneden izole edilen *G. xylinus* BPR2001 suşunun optimum koşullardaki kültürü ile ulaşılmıştır⁽²¹⁾.

Bu çalışmada, mutasyon direncine sahip, yüksek miktarda selüloz üreten asetik asit bakterilerinin izolasyonu amaçlanmıştır. İzole edilen suşların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler testler ile tür düzeyinde tanımlanmaları ve kültür koleksiyonlarına kazandırılmaları da hedefler arasındadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Selüloz üreten suşların izolasyonu: Selüloz üreten suşların izole edilmesi için kullanılan, sirke örnekleri (elma, üzüm, alıç) ve taze ya da çürük meyveler (elma, üzüm, kayısı, erik, ananas ve kestane) yerel marketlerden satın alınmış veya doğal kaynaklardan toplanmıştır.

Sirke örneklerinden alınan 1mL'lik numuneler direkt olarak, katı örneklerden alınan 5g'lık numuneler ise homojenize edildikten sonra Hestrin-Schramm (HS) besiyerine (%2 D-glukoz, %0,5 pepton, %0,5 maya özütü, %0,27 Na₂HPO₄, %0,115 sitrik asit, pH 5.0) ekilmiş ve 30°C'da üç gün inkübe edilerek zenginleştirilmiştir. Maya ve küf üremesini önlemek amacıyla, HS besiyerine 50 mg/l sikloheksimid eklenmiştir. İnkübasyon sonunda, 0,1 ml'lik örnekler HS agara yayılmış ve 30°C'da üç gün inkübe edildikten sonra oluşan koloniler incelenmiştir⁽²²⁾. Asetik asit bakterilerinin koloni morfolojisine uyan, 2,5-3mm çaplı, krem-bej renkli, düzgün kenarlı ve yapışkan kolonilerden Gram boyama yapılmıştır. Gram negatif basilere seçilerek, kalsiyum karbonat (CaCO₃)-etanol besiyerine (%0,05 D-glukoz, %0,3 pepton, %0,5 maya özütü, %1,5 CaCO₃, %1,2 agar, %1,5 etanol) ekilmiştir. Bu besiyerinde, 30°C'da 2-7 günlük inkübasyon sonucunda, asetik asit üretebilen türler, kolonileri etrafında CaCO₃'ün çözünmesi sonucu şeffaf bölgeler oluşması ile ayrılmışlardır⁽⁸⁾. Asetik asit bakterisi (*Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* cinsleri) olan kolonilere daha sonra ileri oksidasyon testleri uygulanarak, bu testlerde negatif sonuç veren *Gluconobacter*'in ayrılması sağlanmıştır⁽¹⁴⁾. İleri oksidasyon testi pozitif olanlar (*Acetobacter*

ve *Gluconacetobacter*) daha sonra HS besiyerine ekilmiş ve 30°C'de bir hafta süre ile statik koşullarda inkübe edilerek selüloz üretim becerileri araştırılmıştır. Besiyeri-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşturan izolatlar selüloz üreten izolatlar olarak kabul edilerek tanımlamak amacıyla biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Bu izolatların selüloz üretimini devam ettirme özellikleri, ürettikleri selüloz miktarı ve ürettikleri selülozun analizi de yapılmıştır.

G. xylinus LMG 18788 ve *G. hansenii* DSM 5602 suşları referans suşlar olarak tüm deneylerde kullanılmıştır. Tüm izolatlar ve referans suşlar, çalışılana kadar -20°C'de gliserol çözeltisinde dondurularak korunmuştur.

Selüloz üreten suşların biyokimyasal analizleri: Tanımlama amacıyla kullanılan biyokimyasal testler ve ilgili besiyerleri konu hakkındaki literatür çalışmaları esas alınarak belirlenmiş ve uygulanmıştır (19,23). Katalaz, oksidaz ve indol testleri BD (Becton, Dickinson and Company, ABD) test kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçların yinelenabilirliğinin sağlanması için tüm deneyler üçer kere yinelenmiştir.

Selüloz üretiminin miktarının belirlenmesi: Besiyeri-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatlar, 10 ml HS besiyerine ekilmiş ve statik koşullarda, üç gün boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Buradan alınan 1ml'lik örnekler, 250 ml'lik erlenlerde bulunan 50 ml HS besiyerine ekilmiştir. Selüloz üretimi, 30°C'da ve statik koşullarda bir hafta boyunca sürdürülerek, kültür ortamı üzerinde beyaz bir film tabakasının belirmesiyle gözlemlenmiştir.

Besiyerinden, 4000g'de 10dk santrifüjlenme ile uzaklaştırılan film tabakası, distile su ile yıkanmış ve 80°C sıcaklıkta, 0.1N NaOH çözeltisi içerisinde 20dk süresince bekletilmiştir. Selülozun sıcak alkali işlemi olarak adlandırılabilen bu saflaştırma adımına dayanıklı olması nedeniyle, işlem sonunda elde edilen malzeme bakteri hücrelerinden ve ortam bileşenlerinden arındırılmış selüloz olarak kabul edilmiştir (18). Elde edilen bakteriyel selüloz, 10dk süresince 0.1N CH₃COOH içerisinde bekletildikten sonra, süzüntü nötral niteliğe ulaşana değin distile su ile yıkanmış ve vakum etüvünde 0.1 bar ve 40°C'de

kurutulmuş ve kalınlığı ölçülerek miktarı tartılmıştır. Canlı hücre sayısı yayma plak yöntemi ile belirlenmiş, glukoz analizinde ise DNS yöntemi kullanılmıştır (24).

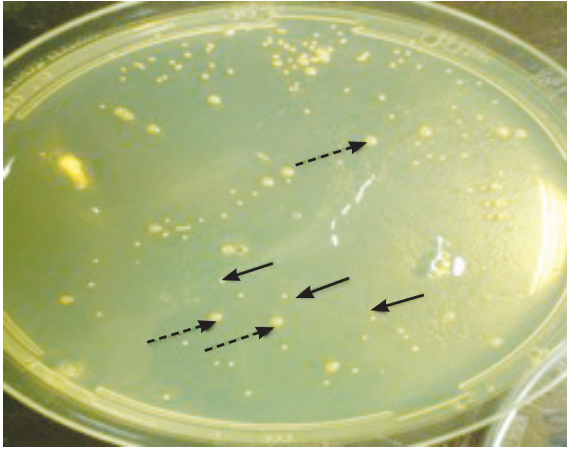
Selüloz yapısının analizi: Elde edilen selülozların yapısı, X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD analizi), selülozun derişik H₂SO₄ ile hidroliz edilerek glukoz birimlerine indirgenmesi prensibine dayanan Dearing yöntemi ve taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir (25).

XDR analizinde kırınım diyagramı, 2θ=5-40° aralığında 0.58°/dk hız ile yapılan tarama sonucunda oluşturulmuştur (PANalytical, XPERT PRO).

Selülozun derişik H₂SO₄ ile hidroliz edilerek glikoz birimlerine indirgenmesi prensibine dayanan Dearing yöntemi gereği, 0-150 µg/ml yoğunluğunda glukoz çözeltileri hazırlanmış ve absorbans değerlerine göre kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Her bir izolat tarafından sentezlenen selüloz numunelerinden tartım yapılmış; asit hidrolizi ardından elde edilen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisi yardımı ile glikoz miktarına çevrilmiş ve başlangıç selüloz miktarının hidroliz sonundaki glikoz miktarına oranı ile verimlilik hesaplanmıştır (25).

Uygun görülen bakteriyel selüloz numunelerinin fibril morfolojileri, taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Bu amaçla, bakteriyel selüloz numuneleri 10mA akım altında 2dk süresince platin ile kaplandıktan sonra, JEOL JSM 7000 F cihazı kullanılarak çeşitli büyütme oranlarının uygulanmasıyla mikroskop altında görüntülenmiştir.

Selüloz üretiminin devamının belirlenmesi: Asetik asit bakterilerinin selüloz üretme yetilerini kolaylıkla ve geri dönüşümsüz olarak yitirebilmeleri nedeniyle, üretim kapasitesini pasajlar ve stoklanma sırasında kaybetmeyen ve ürün verimliliği yüksek suşların seçimi gerekli görülmüştür (14,20). Bu nedenle elde edilen izolatlardan hazırlanan ve saklanan stokların selüloz üretim kapasiteleri belirli aralıklarla kontrol edilmiş ve stoklanma süresine bağlı olarak selüloz üretmeyen mutantların gelişimi takip edilmiştir. Mutant koloniler, HS agarda oluşturdukları daha büyük, şeffaf ve yapışkan koloniler ile ayrıştırılmış ve sayılmışlardır (Şekil 1).



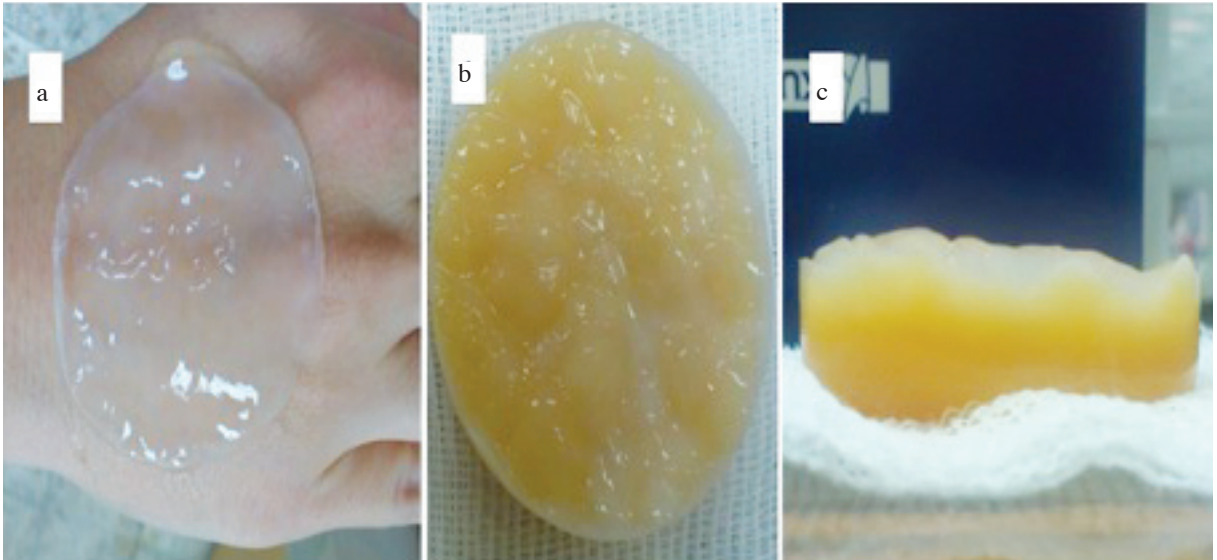
Şekil 1. Vahşi (→) ve mutant (--->) kolonilerin görünüşleri.

16S rRNA sekans analizi: Pasajlar sırasında ve saklama koşulları altında, selüloz üretim kapasitesini koruyabilen izolatın tür düzeyinde tanımlanması için 16S rRNA dizi analizi yöntemine başvurulmuştur. Analiz, “TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü”nde gerçekleştirilmiştir. Bakteriden saflaştırılan genomik DNA’nın 16S rRNA bölgesi 27F-1492R primerleri kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. PZR ürünü %1’lik agaroz jelde görüntülenmiş ve saflaştırma kiti ile temizlenmiştir. Saflaştırılan 1500 baz çiftlik ürün, Beckman Coulter dizi analiz kiti ile 27F, 357F, 530F, 343R, 907R, 1100R, 1392R ve 1492R evrensel 16S rRNA primerleri kullanılarak kit protokolüne göre (CEQ™ DTCS

Quick Start Kit, Beckman Coulter) analiz edilmiştir. Farklı primerler ile elde edilen diziler Bioedit programı ile birleştirilerek 1405 baz çiftlik 16S rRNA dizisi elde edilmiştir. Belirlenen sekansın BLASTN programı kullanılarak birincil dizi veritabanları (Gen Bank, EMBL, DDBJ) içerisinde yer alan diziler ile kıyaslanması sonucunda, yüksek benzerlik gösteren sekanslar, CLUSTAL Omega programı kullanılarak sıralanmış ve Geneious 5.6.6 yazılımı kullanılarak ilgili filogenetik ağaç oluşturulmuştur ^(26,27).

BULGULAR

Selüloz üreten suşlar: Selüloz üreten suşların izole edilmesi için kullanılan sirke örnekleri ve taze ya da çürük meyvelerden alınan numunelerden, zenginleştirme sonrası HS agarda, asetik asit bakterilerinin koloni morfolojilerine uyan toplam 112 koloni elde edilmiştir. Elde edilen 112 koloninin, %63,4’ü meyvelerden, %36,6’sı ise sirke örneklerinden izole edilmiştir. Kolonilerden yapılan Gram boyamada 47 tanesinin gram negatif kısa basil ya da eliptik basil yapısında olduğu görülmüş ve asetik asit üretimi için seçilmiştir. Bu kolonilerden 39 adedi, etanolden asetik asit üretmiş ve böylelikle asetik asit bakterisi (*Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* cinsleri) olduğu kabul edilerek asetik asidin ileri oksidasyonuna alınmıştır. İleri oksidasyon testleri sonunda dört izolat negatif (*Gluconobacter* türleri) kalmış, pozitif reaksiyon veren 35 izolatın,



Şekil 2. İzolatlar tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz numunelerinin görünümü (a) 3 mm kalınlığında (b) ve (c) 15 mm kalınlığındaki biyofilm.

Tablo 1. İzolatlarla ve referans suşlara ait biyokimyasal test sonuçları*.

Özellik	AA4	AU9	TES2	DS1	P2A	ESU8	LMG 18788	DSM 5602
• Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
• Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-
• İndol	-	-	-	-	-	-	-	-
• Kahverengi pigment oluşumu	-	-	+	-	-	-	-	-
• H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-
• %0,35 asetik asit varlığında üreme	+	+	+	+	+	+	+	+
• %30 D-glukoz varlığında üreme	-	-	-	-	-	-	-	-
• Karbon kaynağı olarak metanolü kullanabilme	-	-	-	-	-	-	-	-
• Üre tüketimi	-	-	-	-	-	-	-	-
• Sodyum sitrat tüketimi	-	+	-	-	-	-	-	w
• Etanolün oksidasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+
• Laktat oksidasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+
• Jelatin hidrolizi	-	-	-	-	-	+	-	-
• Gliserolün ketojenizi	-	-	+	-	-	+	+	+
• Arjinin dehidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+
• Lizin dekarboksilaz	+	+	+	-	-	+	-	-
• Tirozin saydamlaştırma	-	-	-	-	-	-	-	-
• Nitrat redüksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-
• Mannitol agarda üreme	+	+	+	+	+	+	+	+
• Glutamat agarda büyüme	-	-	-	-	+	+	+	-
• Karbonhidratlardan asit üretimi:								
D-glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	+	+	-	-	-
Galaktoz	-	w	+	+	+	-	+	+
Maltoz	-	-	-	-	+	-	-	+
Mannoz	+	-	-	-	+	+	+	+
Ksiloz	-	-	-	+	+	-	+	-

*(+): olumlu sonuç; (-) olumsuz sonuç; (w) zayıf olumlu sonuç.

Acetobacter ya da *Gluconacetobacter* türleri oldukları açığa çıkmıştır. Bu 35 izolattan altısının selüloz ürettiği HS besiyerinde 30°C'de bir haftalık inkübasyon sonunda besiyeri-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşturmaları ile anlaşılmıştır.

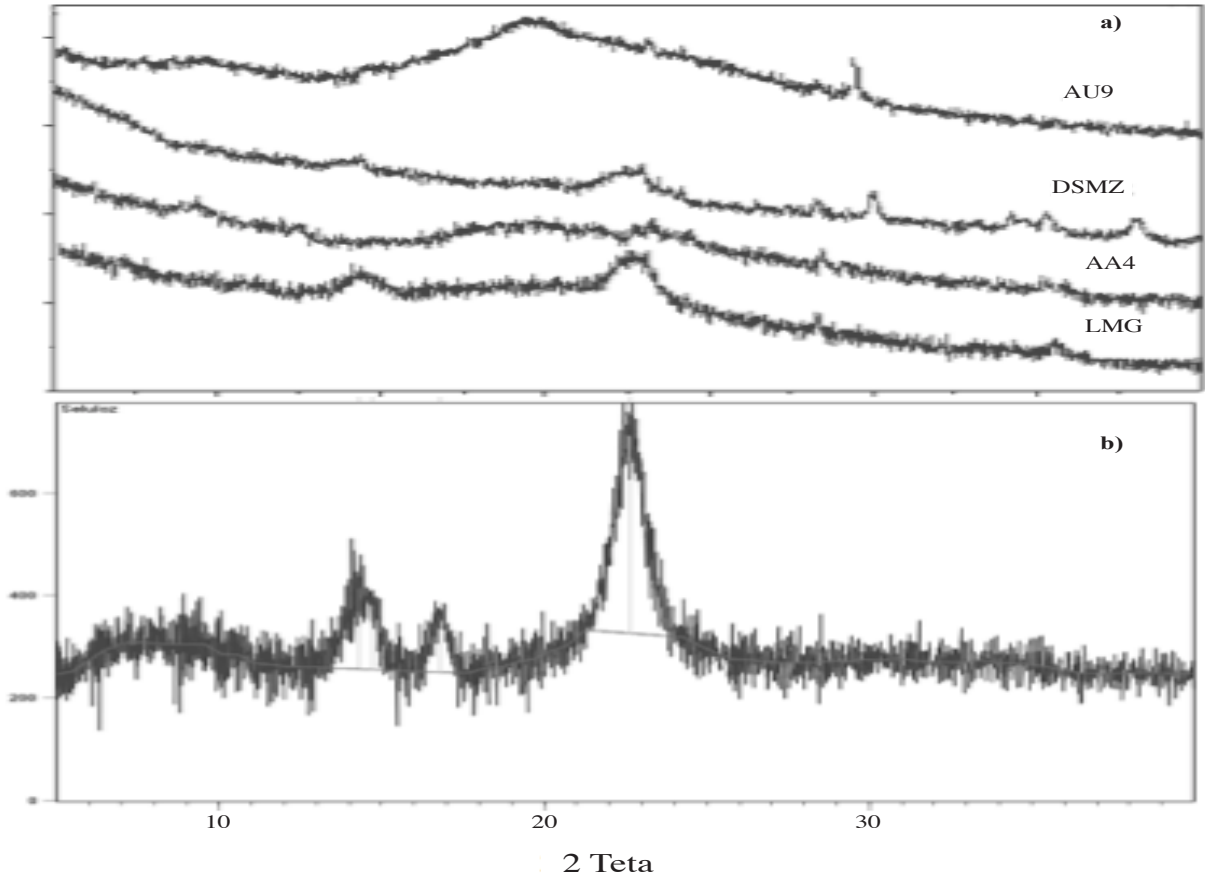
Selüloz üreten suşların biyokimyasal analizleri: Selüloz ürettiği saptanan altı izolat ve iki referans suşunun biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Altı izolatin ve referans suşların, 20°C altında ve 40°C üzerindeki sıcaklık değerlerinde ve 3,5'in altında ve 8'in üzerindeki pH değerlerinde üreme göstermediklerini ve optimum üreme sıcaklığının 25-35°C, optimum pH aralığını ise 4-7 olduğu ortaya konmuştur. Diğer biyokimyasal test sonuçları ise Tablo 1'de özetlenmiştir. Biyokimyasal test sonuçları, referans suşlara ait sonuçlar ile uyumludur. Uygulanan tüm biyokimyasal testler sonucunda, izolatların *Acetobacteraceae* ailesinin *Gluconacetobacter* cinsine benzediği tespit edilmiştir.

Suşların selüloz üretim miktarları: Besiyeri yüzeyindeki krem-beyaz renkli ve şeffaf bakteriyel selü-

loz tabakasının, 3-5 mm'den 15 mm kalınlığa kadar geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 2). Tablo 2'de ise izolatların, 50 mL HS besiyeri içerisinde, statik koşullarda bir hafta süre ile inkübe edilmesi sonucu sentezlenen bakteriyel selüloz miktarları ve hücre sayıları özetlenmiştir. Kaydedilen selüloz üretimi değerlerine göre, en verimli kültür üzüm sirkesinden izole edilen TES2 kodlu izolattır. DS1, ESU8 ve P2A kodlu izolatların da referans suşlara yakın miktarda selüloz ürettikleri tespit edilmiştir. AA4 ve AU9 kodlu izolatların üretim kapasiteleri daha kısıtlı görülmüştür.

Tablo 2. Doğal izolatlar ve referans suşlar tarafından üretilen selüloz miktarları.

İzolat kodu	Selüloz miktarı (g/L)	Hücre sayısı (log ₁₀ kob/ml)
AU9	0.560±0.04	7.23
AA4	0.610±0.04	7.32
P2A	1.275±0.15	7.61
TES2	4.700±0.16	8.74
DS1	2.746±0.19	8.17
ESU8	1.375±0.01	7.65
LMG 18788	3.730±0.11	8.46
DSM 5602	2.013±0.07	8.07



Şekil 3. (a) AA4, AU9 kodlu izolatlar ve referans suşlar tarafından, (b) P2A kodlu izolat tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz numunelerine ait X-ışınları kırınım desenleri.

Selüloz yapısının analizi: Selüloz yapısının ispatlanması amacıyla başvuru XRD analizinde elde edilen kırınım diyagramları Şekil 3'te sunulmuştur. Şekil 3a'da görülmekte olan, AA4 ve AU9 izolatlarınca sentezlenen selüloz numunelerine ait kırınım desenlerindeki $2\theta=20^\circ$ civarında gözlemlenen geniş pik, bu numunelerin amorf yapıda olduklarını; her iki numunede de $2\theta=22^\circ$ civarında gözlemlenen ve şiddeti son derece düşük olan kristal piki ise, numunenin içerisinde eser miktarda da olsa kristal fraksiyonu bulunduğunu göstermektedir. Kırınım desenlerindeki önemli bir diğer bulgu da, $2\theta=29^\circ$ civarında gözlemlenen kristal piki. Referans suşlar tarafından sentezlenen selüloz numunelerinin kırınım desenleri incelendiğinde, kristal piklerinin benzer şekilde düşük şiddetli olduğu, ancak, pik konumlarının "Selüloz I kristal" yapısına uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Şekil 3b'de ise, P2A kodlu izolat tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz numunesinin XRD deseni görülmektedir. Yapının diğer izolatlarca sentezlenen selülozun aksine, "Selüloz I kristal" formun-

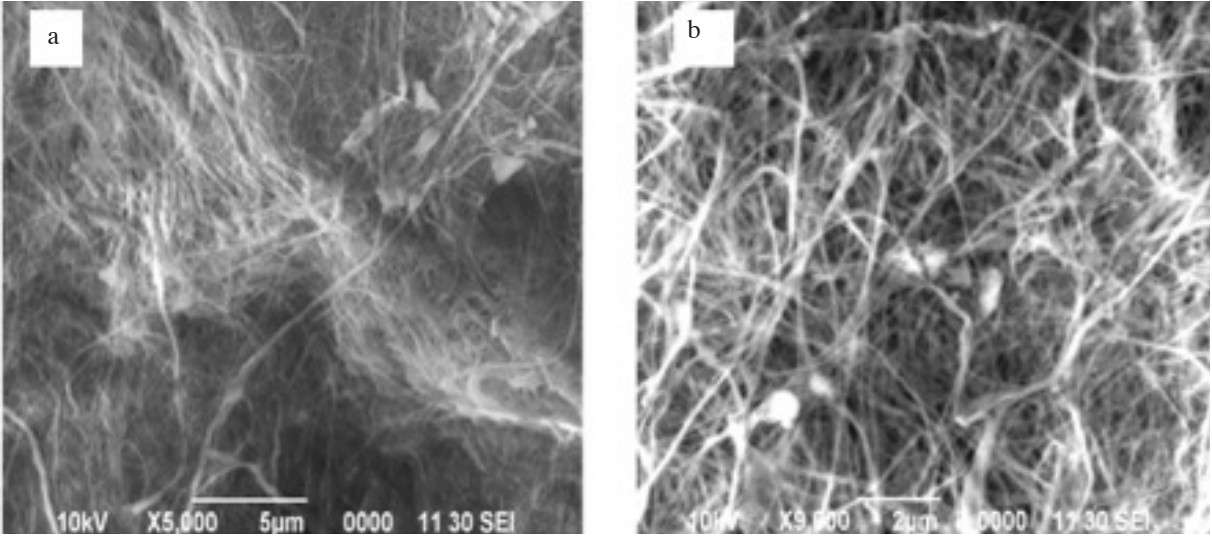
da olduğu ve $2\theta=29^\circ$ 'de pik oluşturmadığı açıktır.

Dearing yöntemine ⁽²⁵⁾ göre hesaplanan kazanım oranlarına bakıldığında, numuneye bağlı olarak, %95,14 ile %98,57 arasında verimlilik elde edilmiştir. Ortalama kazanım oranı ise $97,2\pm 3,3$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 3).

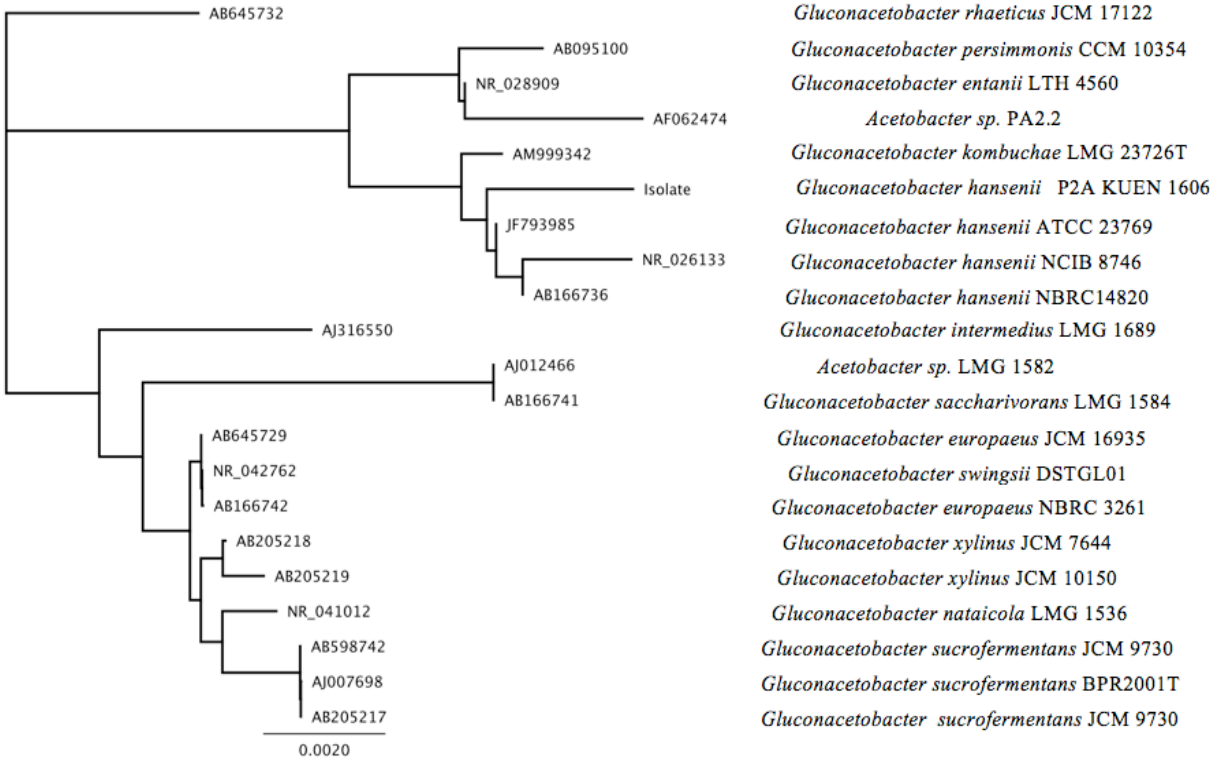
Bakteriyel selülozun mikrofibrillerden oluşan ağ yapısının gözlemlenebilmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu görüntülerinden yararlanılmıştır. Şekil 4'te TES2 kodlu izolat tarafından sentezlenen

Tablo 3. Bakteriyel selülozun Dearing yöntemine göre hesaplanan kazanım oranları ⁽²⁵⁾.

İzolat kodu	Tartılan selüloz miktarı (μg)	Kazanım oranı (%)
AA4	150	95.14 \pm 3.78
AU9	153	95.23 \pm 2.76
DS1	144	98.10 \pm 1.56
TES2	157	97.84 \pm 0.68
P2A	150	98.57 \pm 3.78
ESU8	152	98.33 \pm 7.41



Şekil 4. TES2 kodlu izolat ile sentezlenen bakteriyel selülozun taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. (a) X5000 (b) X10000 büyütme.



Şekil 5. P2A izolatının kısmi 16S rRNA dizisi temel alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

bakteriyel selülozun ağ yapısı örnek olarak sunulmuştur. Şekil 4a ve 4b'de bakteriyel selülozun rast gele yerleşmiş, yaklaşık kalınlığının nanometre ölçeğinde bulunan mikro-iplikçiklerden oluşan bir kafes yapısında olduğu açıkça görülmektedir.

Mutasyona dayanıklılık: AA4, AU9, TES2, DS1 ve

ESU8 kodlu izolatlar, %60'ın üzerine varan mutasyon oranı nedeniyle pasajlar sırasında kademeli olarak kapasite kaybına uğramıştır. P2A kodlu izolat ise, pasajlar ve stoklanma süresi boyunca mutasyona direnç göstermiş ve selüloz üretim kapasitesini korumuştur. Bu nedenle, moleküler tanı aşamasında, yalnızca P2A kodlu izolat ile çalışılmasına karar verilmiştir.

16S rRNA dizi analizi: P2A izolatına ait 1405 baz çiftlik 16S rRNA dizisinin, veri tabanlarındaki (Gen Bank, EMBL, DDBJ) diziler ile karşılaştırılması sonucunda, *G. hansenii* NBRC 14820 ve ATCC 23769 suşları ile %99,8 ve %99,7 düzeyinde benzerlik gösterdiği görülmüştür. İlgili yüzdeler sırasıyla 3 ve 4 baz değişikliğini ifade etmektedir. Öte yandan, izolat ile *Gluconacetobacter* türleri içindeki en düşük benzerlik, %98.3 ve 24 baz değişikliği ile *G. intermedium* LMG 1689 suşu arasında saptanmıştır. En yüksek düzeyde benzeşen 20 *Gluconacetobacter* suşunun sekans verileri kullanılarak P2A izolatının, *Gluconacetobacter* cinsi içerisindeki konumunu gösteren filogenetik ağaç oluşturulmuş ve *G. hansenii* grubunun içerisinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 5).

TARTIŞMA

Bu çalışmada sirke ve çeşitli meyvelerden selüloz üreten asetik asit bakterilerinin izolasyonu ve izole edilen bakterilerin tanımlanması ve ürettikleri selülozun yapısı incelenmiştir. Asetik asit bakterileri daha çok meyvelerden izole edilmiştir. Bu bulgu literatürle uyumlu olup, birden fazla tipte kaynağının tarandığı çalışmalarda da meyvelerin asetik asit bakterilerinin izolasyonu için daha zengin bir kaynak oluşturduğu görülmüştür (16,19).

Asetik asit bakterilerinin toplandığı, *Acetobacteraceae* ailesinde etanolden asetik asit üretemeyen tek cins *Asaia*'dır (9,28). Bu çalışmada CaCO₃-etanol besiyerinde 39 izolat asetik asit üretmiş olup, *Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* cinslerine ait türler oldukları, ileri oksidasyon testlerinde negatif kalan dört izolatın ise, *Gluconobacter* türü olduğuna karar verilmiştir. Zira, bazı asetik asit bakterileri asetat ve/veya laktatı CO₂ ve suya indirgeyebilirken, selüloz üretimi olmayan *Gluconobacter* türleri bu reaksiyonu sağlayamaz ve selüloz üretilen *Gluconacetobacter* ve *Acetobacter* türlerinden ayrımı bu şekilde mümkün olur (8,9,14).

Çalışma kapsamında selüloz ürettiği tespit edilen altı izolatın en iyi ürettiği sıcaklık ve pH aralığı (25-30°C ve pH 5-7), asetik asit bakterileri için optimum üreme sağlayan sıcaklık ve pH aralığı (25-35°C ve pH 4-7) ile uyumludur (9,19,29,30).

Selüloz ürettiği saptanan tüm izolatlar ve referans

suşlar; katalaz enzimi, etanol ve laktat oksidasyonu ile %0,35 asetik asit varlığında üreyebilmişlerdir. Yine tüm izolat ve referans suşlar için, oksidaz, indol, H₂S oluşumu, %30 D-glukoz varlığında üreme, üre tüketimi, metanolün metabolizasyonu, nitrat redüksiyonu ve tirozin saydamlaştırma testlerinde negatif yanıt alınmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, *Gluconacetobacter* türleri hakkındaki literatür bilgileri ile örtüşmektedir (8,9,28-30). Biyokimyasal test sonuçları, genel olarak, referans suşlara ait sonuçlar ile uyumludur. Ancak, karbonhidratlardan asit üretimi gibi testlerde tür içerisinde suş bazında değişken yanıt alınabildiğinden kesin tanı için moleküler yöntemlere başvurulması gereklidir.

Bu çalışmada TES2, DS1, ESU8 ve P2A kodlu izolatların selüloz üretimleri iyi, AA4 ve AU9 kodlu izolatların üretim kapasiteleri kısıtlı bulunmuştur. Bununla beraber, benzer fermantasyon koşullarının uygulandığı literatür çalışmaları ile kıyaslandığında, pek çok doğal izolata kıyasla yüksek kapasiteye sahip oldukları söylenebilir. Nguyen ve ark. (17) Kombucha kültüründen izole ettikleri *Gluconacetobacter xylinus* K3 suşu ile HS besiyerinde altı gün sürdürülen inkübasyon sonunda 0.217 ± 0.027 g/L selüloz üretimi gerçekleştirmiştir. Jahan ve ark. (31) tarafından yürütülmüş ve kültür kaynağı olarak doğal kaynakların tarandığı bir çalışmada, HS besiyerinde bir haftalık inkübasyon sonunda 0.07-0.51 g/L selüloz üretilen on ayrı izolat elde edilmiştir. Doğal kaynaklarda selüloz üreten türlerin tarandığı bir diğer çalışmada ise çürük elmadan izole edilmiş *G. hansenii* PJK suşu ile inkübasyonun dördüncü gününde 0.35 g/L selüloz üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir (6). Bu değerlerle kıyaslandığında, izole edilen kültürlerin, *G. xylinus* ve *G. hansenii* doğal izolatları için bildirilen literatür değerlerine yakın seviyede bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirdikleri sonucuna varılmıştır.

Selülozun dört kristalize formu bulunmakla beraber, pamuk, hind kenevir ve bakteriler gibi doğal kaynaklardan elde edilen selüloz numuneleri "Selüloz I kristal" yapısındadır (32). Bu yapı, karakteristik kırınım diyagramında, 2θ=14.7°, 16.6° ve 22° açılarında kuvvetli pikler, 2θ=20.6° ve 34.7° açılarında da ise zayıf pikler oluşturur (33). Öte yandan, selüloz numunesinin küçük fibril boyutlu ve amorf nitelikli olması halinde kırınım diyagramında 2θ=20° etrafında geniş bir pik elde edilir (32,33). XRD analizi ile AA4 ve AU9

izolatların amorf yapıda, P2A izolatının ise standart suşlara benzer şekilde “Selüloz I kristal” yapısında olduğu saptanmıştır. İlk iki izolatta, $2\theta=29^\circ$ civarında gözlemlenen kristal pikinin CaCO_3 artıklarından kaynaklandığı düşünülmüştür⁽³³⁾. İzolatların çoğunca sentezlenen bakteriyel selülozun amorf yapıda olması nedeniyle, yapının doğrulanması için ikinci bir yönteme gereksinim duyulmuştur. Yapılan literatür araştırması sonucu, Dearing tarafından⁽²⁵⁾ selülozun yaş analizi için geliştirilmiş hidroliz yönteminin pratik ve hassas olduğuna karar verilmiştir. Asit hidrolizine uğratılan selüloz numunelerinin, glukoz derişimi üzerinden kazanım oranları hesaplanmıştır. Kazanım oranının yüksek olması, tekrarlanan glukoz birimlerinden oluşan selüloz yapısını doğrulamış ve amorf numunelerin X-ışınları kırınım desenlerinde yer alan safsızlıklara ait piklerin, eser miktardaki CaCO_3 varlığından ileri geldiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca elektron mikroskopik inceleme ile biyofilm içerisinde hücre bulunmaması, alkali işlemin hücrelerin uzaklaştırılmasında etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir bir suşun üretkenliğini koruması ve dejenerasyona dirençli olması gerekmektedir⁽³⁴⁾. Bu çalışmada stoklama sırasında en az mutasyona uğrayan suş olarak belirlenen P2A izolatı, 16S rRNA dizi analizi ve filogenetik inceleme ile *G. hansenii* grubunun içerisinde yer almış ve izolat *G. hansenii* P2A olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen veriler Gen Bank veri tabanına kaydedilmiş ve 16S rRNA dizisi KF155166 kayıt numarası ile uluslararası erişime açılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile, çürük erikten, yaklaşık %9 glukoz verimi ile, 1.275 g/l düzeyinde bakteriyel selüloz üretebilen ve ürün verimliliğini uzun dönemli saklama koşullarında stabil olarak koruyabilen dirençli bir tür izole edilmiş ve 16S rRNA dizileme yöntemi ile *G. hansenii* P2A olarak tanımlanmıştır. KUEN 1606 referans numarası ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi koleksiyonuna dâhil edilen bu kültürün, bakteriyel selülozun ticari ölçekteki üretimi için aday bir suş olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla sürdürülecek çalışmalarda, besiyeri bileşiminin ve fermantasyon koşullarının optimize edilmesi ile, daha yüksek kapasite ve verim değerlerine ulaşması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Vandamme EJ, De Baets S, Vanbaelen A, Joris K, De Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stabil* 1998; 59:93-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00185-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00185-7)
2. Shoda M, Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2005; 10:1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02931175>
3. Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS. Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technol Biotech* 2009; 47:107-24.
4. Petersen N, Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 91:1277-86. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y> PMID:21744133
5. Klemm D, Kramer F, Moritz S, et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed* 2011; 50:5438-66. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201001273> PMID:21598362
6. Park JK, Park YH, Jung JY. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from a rotten apple. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2003; 8:83-8. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02940261>
7. Saxena IM, Brown Jr RM. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot-London* 2005; 96: 9-21. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mci155> PMID:15894551
8. Sievers M, Swings J. Family II: *Acetobacteraceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. Vol. 2. USA: Springer. 2005: 41-96.
9. Kersters K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J. The Family *Acetobacteraceae*: the Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer. 2006:163-200. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30745-1_9
10. Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci* 2000; 261-70. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1004775229149>
11. Mohite BV, Kamalja KK, Patil SV. Statistical optimization of culture conditions for enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529. *Cellulose* 2012; 19:1655-1666. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-012-9760-y>
12. Panesar PS, Chavan Y, Chopra HK, Kennedy JF. Production of microbial cellulose: Response surface methodology approach. *Carbohydr Polym* 2012; 87:930-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.002>
13. Bertocchi C, Delneri D, Signore S, Weng Z, Bruschi CV. Characterization of microbial cellulose from a high-producing mutagenized *Acetobacter pasteurianus* strain. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336:211-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(97\)00030-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00030-5)
14. Dellaglio F, Cleenwerck I, Felis GE, Engelbeen K, Janssens D, Marzotto M. Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55:2365-70. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63301-0> PMID:16280498
15. Kojima Y, Tonouchi N, Tsuchida T, Yoshinaga F, Yamada Y. The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. nonacetoxidans subsp. nov. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62:185-7. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.62.185>
16. Lisdiyanti P, Kawasaki H, Seki T, Yamada Y, Uchimura T, Komagata K. Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov. and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *J Gen Appl Microbiol* 2000; 46:147-65.

- <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.46.147>
PMid:12483588
17. **Nguyen VT, Flanagan B, Mikkelsen D, et al.** Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydr Polym* 2010; 80:337-43.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.019>
 18. **Son C, Chung S, Lee J, Kim S.** Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. *J Microbiol Biotechnol* 2002; 12:722-8.
 19. **Lisdiyanti P, Kawasaki H, Seki T, Yamada Y, Uchimura T, Komagata K.** Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* 2001; 47:119-31.
<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.47.119>
PMid:12483554
 20. **Toyosaki H, Kojima Y, Tsuchida T, Hoshino K, Yamada Y, Yoshinaga F.** The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. nov. *J Gen Appl Microbiol* 1995; 41:307-14.
<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.41.307>
 21. **Sani A, Dahman Y.** Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *J Chem Technol Biotechnol* 2010; 85: 151-64.
 22. **Schramm M, Hestrin S.** Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J Gen Appl Microbiol* 1954; 11:123-9.
 23. **Asai T, Izuka H, Komagata K.** The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. *J Gen Appl Microbiol* 1964; 10:95-126.
<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.10.95>
 24. **Miller GL.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959; 31:426-8.
<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
 25. **Dearing GG.** A new micromethod for the estimation of cellulose. *Nature* 1957; 179:579.
<http://dx.doi.org/10.1038/179579a0>
PMid:13418735
 26. **Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2010; 7:203-14.
<http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>
PMid:10890397
 27. **Goujon M, McWilliam H, Li W, et al.** A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:W695-9.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq313>
PMid:20439314 PMCID:PMC2896090
 28. **Yamada Y, Yukphan P.** Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2008; 125:15-24.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077>
PMid:18199517
 29. **Yamada Y.** Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50:2225-7.
<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-6-2225>
PMid:11155999
 30. **Jojima Y, Mihara Y, Suzuki S, Yokozeki K, Yamanaka S, Fudou R.** Saccharibacter floricola gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:2263-67.
<http://dx.doi.org/10.1099/ijss.0.02911-0>
PMid:15545468
 31. **Jahan F, Kumar V, Rawat G, Saxena RK.** Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit. *Appl Biochem Biotech* 2012; 167:1157-71.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9595-x>
PMid:22391690
 32. **Gümüşkaya G.** Selülozun kristal yapısı. *Kafkas Üniversitesi Artvin Orman Fakültesi Dergisi* 2005; 6:69-78.
 33. **Mittal A, Katahira R, Himmel ME, Johnson DK.** Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels* 2011; 4:41-56.
<http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-4-41>
PMid:22011342 PMCID:PMC3219654
 34. **Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ.** Principles of fermentation technology, 2nd Ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 2005.