

Şeker Pancarı Melası Kullanılarak *Gluconacetobacter xylinum* NRRL B-759 ile Bakteriyel Selüloz Üretimi Üzerine Etanolün Etkisi

Y. Emre ÖZ¹ ve *Mehmet KALENDER²

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ
¹yunusemreoz55@hotmail.com, ^{2,*}mkalender@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 22.01.2017; Kabul/Accepted: 28. 04.2017)

Özet

Selüloz dünyada en yaygın bulunan makromoleküler yapılardan biridir ve genellikle bitkilerden elde edilir. Kâğıt kullanımının artması ve tıp alanındaki bazı gelişmelerden dolayı günümüzde araştırmacılar alternatif selüloz üretme yöntemlerine odaklanmışlardır. Bakteriyel selüloz formül olarak bitkisel selüloz ile aynı olmasına rağmen su tutma kapasitesi, polimerizasyon derecesi ve yüksek saflık gibi bazı özellikler bakımından bitkisel selülozdan farklıdır. Bu çalışmada, besi yeri ve karbon kaynağı olarak şeker pancarı melası kullanılarak *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 tarafından bakteriyel selüloz üretimi incelenmiştir. Bu amaçla, bakteriyel selüloz üretiminde melas konsantrasyonunun etkisi (40-240 g/L) ve besi yerine etanol ilavesinin etkisi (5-20 g/L) araştırılmıştır. Sonuç olarak melas konsantrasyonunun artmasıyla 200 g/L konsantrasyona kadar bakteriyel selüloz üretiminin arttığı ve daha sonra azaldığı görülmüştür. Etanol ilavesinin yapıldığı çalışmalarda etanollü besi yerinde üretilen bakteriyel selüloz miktarının etanolsüz ortama göre en çok 10 g/L etanol ilavesinde arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, Melas, Etanol, *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759.

Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 Using Sugar Beet Molasses

Abstract

Cellulose is a macromolecular structure which is one of the most common in the world. It is usually obtained from plants. Because of increasing use of paper and developments in the field of medicine, it has been focused by the researches on alternative production techniques for the cellulose production. Bacterial cellulose with some properties like high purity and high water holding capacity is a good alternative technique among those production techniques. In this study, it has been investigated the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 strains using sugar beet molasses as nutrient and carbon source. For this purpose, the effect of the concentration (40-240 g/L) on molasses and addition of ethanol (5-20 g/L) on the bacterial cellulose production has been studied. As a result, it has been observed that cellulose production increases with increasing of the concentration of molasses until 200 g/L, and then decreases. The results of ethanol addition experiments showed that the highest cellulose production has been obtained at ethanol concentration of 10 g/L added to fermentation media containing molasses.

Keywords: Bacterial Cellulose, Molasses, Ethanol, *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759.

1. Giriş

Genellikle bitkilerden elde edilen selüloz, dünyada en çok bulunan makromoleküldür [1]. Bitkilerin hücre duvarı yapısında bulunan selüloz sanayide geniş kullanım alanlarına sahip bir biyopolimerdir. Endüstride kullanılan selülozlar genellikle pamuk (% 94 selüloz) ve ağaçtan (% 50'den fazla) elde edilmektedir. Bitkilerde selüloz hemiselüloz, lignin ve pektin ile birlikte bulunur. Bu yüzden endüstride

selülozun kullanılmadan önce bu yapılardan ayrılması gerekir ve bu da ek maliyet ile birlikte birçok kimyasal madde kullanımı gerektirir. Günümüzde artan nüfus ile birlikte selüloza olan ihtiyacın artması da kaçınılmazdır ve bunun sonucu olarak ormanların daha fazla tahrip edilmesi söz konusudur. Bu yüzden, son yıllarda dünya üzerinde orman arazilerinin hızla azalması ve biyoteknolojideki gelişmeler bilim insanlarını bitkiler olmadan selüloz üretme konusu üzerinde yoğunlaşmalarına sebep

olmuştur. Yapılan çalışmalarda algler, küfler ve bakterilerin selüloz üretebildiğini fakat bunlar arasında bakterilerin endüstriyel seviyede selüloz üretebildiği görülmüştür. *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia* gibi birçok bakteri türünün ve birkaç siyanobakter türünün selüloz ürettiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [2, 3].

Bakteriyel selüloz (BS) ile bitkisel selüloz aynı moleküler formülü (C₆H₁₀O₅)n paylaşmasına rağmen, fizikokimyasal özellikleri farklıdır. Bitkisel selüloz ile karşılaştırıldığında BS yüksek su tutma kapasitesi, kristalinite, porozite, polimerizasyon derecesi, yüksek fiber ağ yapısı ve yüksek saflık gibi özelliklere sahiptir [4]. Bakteriyel selülozun gelişmiş mekanik özellikleri, selülozik fiberlerin eşit ve sürekli dağılımına bağlıdır. Bu özellikler kültür koşulları, mikroorganizma ve fermantasyon besi yeri bileşenleri gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu son derece işlevsel biyopolimerin çok yönlü özelliklerinden dolayı BS, doku mühendisliği doku iskelesi uygulamaları, yara iyileştirme uygulamaları, geniş yanıklarda yapay deri, deri dokusu onarımı, mikrocerrahi için yapay kan damarları, kağıt endüstrisi [5], dolgunlaştırıcı ve stabilize edici madde olarak gıda endüstrisini de içeren birçok alanda kullanılmaktadır [6].

Bakteriyel selüloz üretimini karbon kaynağı, azot kaynağı, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen gibi çeşitli parametrelerden etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda karbon kaynağı olarak arabinoz ve ksiloz gibi pentozlar, glikoz, früktoz ve mannoz gibi monosakkaritler, laktoz, sükroz ve maltoz gibi disakkaritler, dekstran, levan ve nişasta gibi polisakkaritler; kullanılmıştır. Azot kaynağı olarak ise maya ekstratı, pepton, kazamino asit ve mısır ıslatma suyu kullanılmıştır. Çeşitli uygulamalarda BS'nin yüksek potansiyeline rağmen yüksek BS üretim maliyeti endüstriyel uygulamaların engellenmesinde en büyük sorundur. Fermantasyon ortamı olarak endüstriyel atıklardan ve yan ürünlerden faydalanılması BS üretimi için maliyet açısından rekabeti geliştirebilir. Son yıllarda meyve suyu [7], akçağaç pekmezi [8], buğday sapı [9], ladin hidrolizati [10], biyodizel üretim prosesinden ham gliserol, üzüm posası, aseton-bütanol-

etanol fermantasyonu atık suyu [11] ve melas [12] gibi hammaddeler BS üretim maliyetini azaltmak için fermantasyon ortamı olarak yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır.

Bakteriyel selüloz üretiminde kullanılan karbon kaynağı, mikroorganizma türü ve azot kaynağı gibi parametrelere bağlı olarak elde edilen selülozun özelliklerinde de farklılıklar meydana gelmektedir [13]. Bu da kültür ortamında çeşitli faktörleri değiştirerek istenilen özellikte bakteriyel selüloz üretimine olanak sağlar.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mikroorganizma ve kültür ortamı

Çalışmada liyofilize haldeki *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu ve melas çözeltisi hazırlamak için Elazığ Şeker Fabrikasından alınan % 50 şeker içeriğine sahip melas kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan Hestrin & Schramm besi yeri (HS besi yeri) içeriği ağırlık/hacimce % 2 glikoz, % 0.5 pepton, % 0.5 maya ekstratı, % 0.27 Na₂HPO₄, % 0.15 sitrik asit olup distile su ile besi yeri hazırlandıktan sonra *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşu için pH 5'e 1 N asetik asit çözeltisi ile ayarlanmıştır. Hazırlanan besi yeri 121 °C'de 15 dk boyunca otoklav ile steril edilmiştir. Steril besi yerinden 50 ml alınarak 250 ml erlene konulmuştur ve steril şartlar altında liyofilize haldeki *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-759 suşunun ekimi yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra statik kültürde 30 °C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda selüloz oluşumu gözlemlenmiştir. Selüloz oluşumu gözlemlendikten sonra bu kültürün % 60' lık steril gliserol çözeltisiyle stok kültürü yapılmıştır. Eppendorf tüplere 100 µl kültür koyulduktan sonra üzerine hazırlanan gliserolden 1000 µl yavaşa ilave edilip -80 °C'de saklanmaya bırakılmıştır. Elde edilen bu stoklar daha sonraki selüloz üretim çalışmalarında kullanılmıştır. 200 g/L şeker konsantrasyonunda melas stok çözeltisi hazırlamak için 1 L'lik balon jöjeye 400 g melas tartılarak koyulmuştur. Daha sonra 1 N asetik asit çözeltisi ile pH = 5'e ayarlanıp, 121 °C'de 15 dk sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Steril

edilen melas çözeltisi 40, 80, 120, 160, 2000 ve 240 g/L konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

2.2. Fermantasyon süresinin belirlenmesi

Fermantasyon çalışmalarından önce fermantasyon süresinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan stoklardan biri, içerisinde 10 ml HS besi yeri bulunan 50 ml'lik erlene ekilmiştir ve statik kültürde 30 °C' de 3 gün bekletilmiştir. Daha sonra içinde 18 ml taze besi yeri bulunan başka bir erlene önceki kültürden 2 ml ekim yapılmış ve yine aynı koşullarda 3 gün daha bekletilmiştir. Bu işlemlerin sonunda melaslı besi yerinde kontrollü 10 set ile fermantasyon süresi belirleme çalışması yapılmıştır. İçerisinde 45 ml melaslı besi yeri bulunan 250'lik erlene 5 ml son kültürden ekim yapılarak statik kültürde 30 °C'de bir süre boyunca kültürdeki şeker tüketimi ve selüloz oluşumu incelenmiştir. Bunun için belirli zaman aralıklarında kültürlerden örnekler alınarak şeker analizi ve oluşan selüloz miktarı belirlenerek bu işlemler sonucunda optimum fermantasyon süresi belirlenmiştir.

Fermantasyon süreleri belirlendikten sonra yapılan fermantasyon işlemlerinde farklı melas konsantrasyonlarında (40-240 g/L) ve farklı miktarda etanol ilaveli (5-20 g/L) besi yerlerinde selüloz üretimi incelenmiştir. Fermantasyon sonrası elde edilen bakteriyel selüloz saflaştırılmıştır.

2.3. Selülozun saflaştırılması ve kurutulması

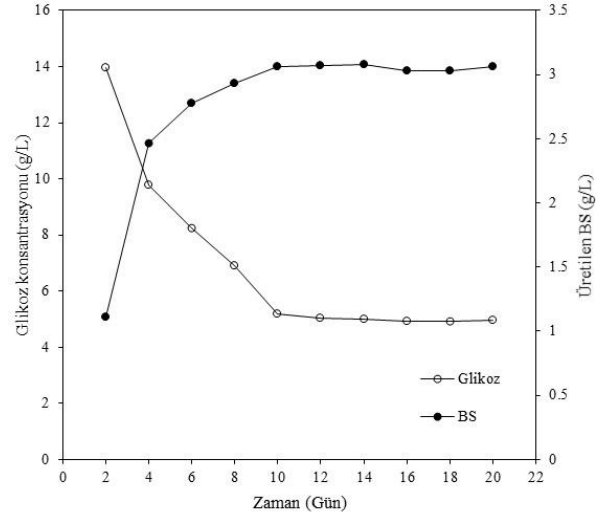
Fermantasyon süresi sonunda üretilen bakteriyel selülozlar kurutulmadan önce selülozlar besi yerinden ayrılmış ve daha sonra selülozdan hücreleri tamamen uzaklaştırmak için 4200 rpm' de 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüjlenen selülozlar 0.1 N NaOH ile 90 °C'deki su banyosunda yaklaşık olarak bir saat bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında selüloz 1 N asetik asit ile nötrleştirilip üç kez distile su ile yıkanmıştır. Son olarak bakteriyel selüloz 70 °C' deki etüvde ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmuştur.

2.4. Üretilen selülozların fonksiyonel gruplarının belirlenmesi

BS filmlerinin FTIR analizleri, ATI Unicam Mattson 1000 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Absorpsiyon modunda, 4000-400 cm⁻¹ frekans aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlük ile numune başına toplam 50 kümülatif tarama yapılmıştır.

3. Sonuçlar ve Tartışma

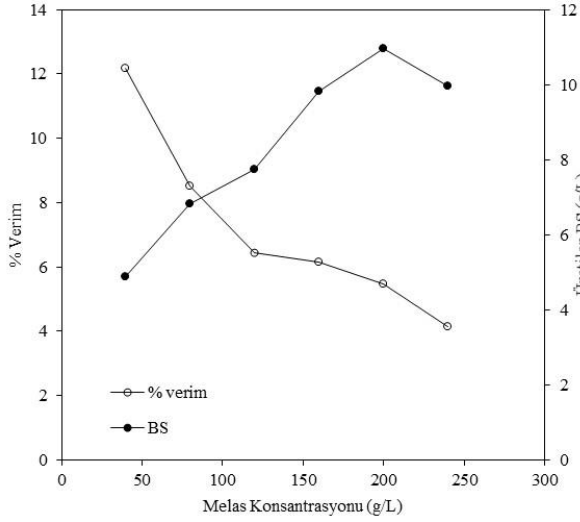
HS besi yerinde fermantasyon süresini belirlemek için statik kültürde 30 °C' de çalışılmış ve optimum fermantasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla 20 gün boyunca 2 günde bir üretilen bakteriyel selüloz ve tüketilen glikoz miktarı belirlenmiştir. Bu süreler sonunda zamanla oluşan bakteriyel selüloz ve tükenen glikoz konsantrasyon değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. HS besi yerinde zamanla oluşan bakteriyel selüloz ve tükenen glikoz konsantrasyonları

Şekil 1'de görüldüğü gibi 10. günden sonra fazla miktarda selüloz üretimi gözlenmediği için fermantasyon süresi 10 gün olarak kabul edilmiştir. Optimum fermantasyon süresi belirlendikten sonra bu süre melas ortamı için de kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı miktarlarda melas konsantrasyonunun ve etanol ilavesinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi incelenmiştir. Etanolün kullanılmadığı deney için farklı melas konsantrasyonlarında üretilen selüloz miktarları ile % verim değerlerini gösteren bir grafik Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil 2'deki verim değerleri

melastaki şeker konsantrasyonuna göre hesaplanmıştır.

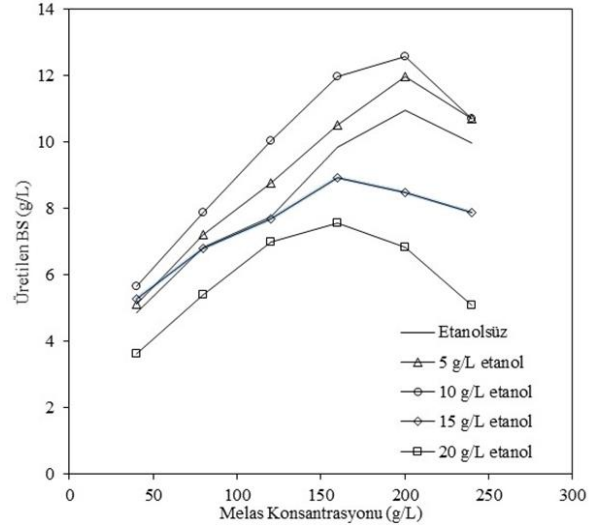


Şekil 2. Melas konsantrasyonu ile üretilen selüloz konsantrasyonunun ve yüzde verim değişimi

Farklı melas konsantrasyonlarında yapılan çalışmalarda 200 g/L melas konsantrasyonuna (100 g/L şeker içeriğine karşılık gelir) kadar üretilen bakteriyel selüloz miktarlarının arttığı daha sonraki konsantrasyonlarda ise azaldığı görülmüştür. Bunun sebebi çok yüksek konsantrasyonlardaki melasın suş üzerinde substrat inhibisyonu olabilir. Şekil 2’de yüzde verim değerleri incelendiğinde melas konsantrasyonu artışı ile verim değerlerinin sürekli olarak azaldığı görülmektedir. Bazı çalışmalarda statik kültür ile BS üretiminde meydana gelen selülozun kültür ortamına transfer olan havayı engellediği sonucuna ulaşılmıştır [5, 14–17]. Şekil 2’de özellikle 200 g/L melas konsantrasyonunun altındaki verim değerlerindeki düşüşün kültür ortamında meydana gelen bu hava azlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 3’de farklı miktarda etanol ilavesinin bakteriyel selüloz üretimine etkisi gösterilmiştir. Şekil 3’den görüldüğü gibi, çalışılan tüm melas konsantrasyonlarında en yüksek bakteriyel selüloz üretim değerlerine 10 g/L etanol eklenen besi yerlerinde ulaşılmıştır. Naritomi ve ark.’nın etanol ilavesinin selüloz üretimine etkisini araştırdıkları bir çalışmada selüloz üretiminde fruktozlu besi yerine 10 g/L etanol ilavesinin selüloz üretimini arttırmak için optimum değer olduğunu bulmuşlardır [18]. Bu durum,

gerçekleştirilen bu çalışmada etanol ilavesi için elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.



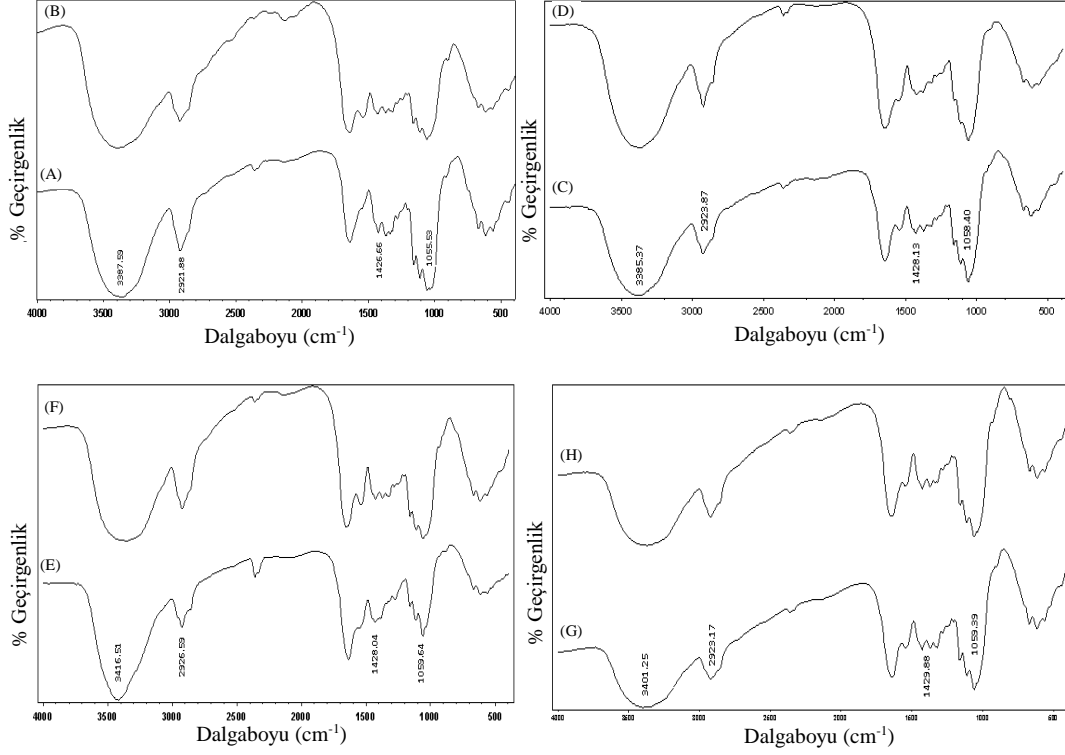
Şekil 3. Melas konsantrasyonu ve etanol ilavesinin selüloz üretimine etkisi

Etanolsüz, 5 ve 10 g/L etanol içeren ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalarda en yüksek BS üretim miktarının 200 g/L melas konsantrasyonunda olduğu Şekil 3’den görülmektedir. Diğer taraftan yüksek etanol (15 ve 20 g/L) ilavesiyle gerçekleştirilen çalışmalarda ise en yüksek BS üretimi 160 g/L melas konsantrasyonunda elde edilmiştir. 15 ve 20 g/L etanol ilavelerinde bakteriyel selüloz üretiminin düştüğü görülmektedir. Bu duruma yüksek konsantrasyonlarda etanol ilavesi ile kültür ortamında etanolün dezenfektan etkisinin sebep olduğu düşünülmektedir.

Bakteriyel selülozun fonksiyonel grupları 4000-40 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR analizleri ile belirlenmiştir. Şekil 4’de 11 g/L etanollü ve etanolsüz besi yerlerinden üretilen bakteriyel selülozlar için FTIR spektrumları gösterilmiştir. 0-160 g/L aralığında melas konsantrasyonu ve farklı oranlarda etanol içeriğine sahip besi yerlerinde sentezlenen bakteriyel selülozların hepsinde 3400 cm^{-1} bandında selülozun hidroksil grubu (-OH) gerilme titreşim frekansına karşılık gelmektedir. Bakteriyel selüloz yüksek oranda polar hidroksil grup içerir. Bu yüzden moleküler zincirler molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile etkileşime girmektedir [19]. Tüm numuneler, tipik selüloz tip I’in C-H bağının absorpsiyon

spektrumuna karşılık gelen 2900 cm^{-1} dalga boyunda pik verdiği görülmüştür. 1430 cm^{-1} bandı metil ve metilenin asimetrik deformasyon titreşimi için 1367 cm^{-1} 'deki bant CH₂ eğilme titreşimi için 1055 cm^{-1} 'deki bant şeker

halkasının C-O-C ve C-O-H gerilme titreşimi için etanol içeren ve içermeyen besi yerlerinde farklı konsantrasyonlarda üretilen bakteriyel selülozların karakteristik bantlarını göstermektedir [20, 21]



Şekil 4. Farklı şartlarda üretilen bakteriyel selülozların FTIR analiz sonuçları (A: 40 g/L Melas, B: 40 g/L Melas + 10 g/L Etanol, C: 80 g/L Melas, D: 80 g/L Melas + 10 g/L Etanol, E: 120 g/L Melas, F= 120 g/L Melas + 10 g/L Etanol, G: 160 g/L Melas, H= 160 g/L Melas + 10 g/L Etanol).

Genel olarak bakıldığında etanol ilavesi yapılmadan elde edilen bakteriyel selüloz yapısı ile etanol ilavesi yapılan besi yerinde üretilen bakteriyel selüloz yapısı arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bu da etanol ilavesi ile üretilen bakteriyel selülozun işlevsel grupları arasında pek bir farkın olmadığını göstermektedir.

4. Kaynaklar

1. Czaja, W., Romanovicz, D. and Brown, R. M. (2004). Structural Investigations of Microbial Cellulose produced in Stationary and Agitated Culture, Cellulose, 11.
2. Dazzo, F. B., Napoli, C., Dazzo, F., & Hubbell, D.

(1975). Production of cellulose microfibrils in Rhizobium Production of Cellulose Microfibrils by Rhizobium1, (September 2016).

3. Gupta, B. S. H. S. G. (2010). Production of bacterial cellulose from Enterobacter amnigenus GH-1 isolated from rotten apple, 1823–1828. doi:10.1007/s11274-010-0363-1
4. Phisalaphong, M., & Jatupaiboon, N. (2008). Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose – chitosan film, 74, 482–488. doi:10.1016/j.carbpol.2008.04.004
5. Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, 47(2), 107–124.
6. Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Mandala, I. (2016). Food

- Hydrocolloids Bacterial cellulose as stabilizer of o / w emulsions. *Food hydrocolloids*, 53, 225–232. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.12.003
7. Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333–335. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.009
8. Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506–513. doi:10.1016/j.carbpol.2011.02.034
9. Chen, L. (2012). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism, (October). doi:10.1016/j.biortech.2012.10.029
10. Guo, X., Cavka, A., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2013). Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production, 1–14.
11. Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., & Liu, H. (2015). Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers*, 120, 115–119. doi:10.1016/j.carbpol.2014.11.061
12. Shoda, S. O. B. M. (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor, 45–51. doi:10.1007/s00253-004-1723-2
13. Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, 117, 518–523. doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.008
14. Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Italian Oral Surgery*, 2, 113–119. doi:10.1016/j.aaspro.2014.11.017
15. Krystynowicz, A., Czaja, W., Jezierska, A. W., Gonc, M., Mis'kiewicz, A., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(July), 189–195. doi:10.1038/sj.jim.7000303
16. Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 40(2), 137–143. doi:10.1016/S0144-8617(99)00050-8
17. Watanabe, K., & Yamanaka, S. (1995). Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(1), 65–68. doi:10.1271/bbb.59.65
18. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(6), 598–603. doi:10.1016/S0922-338X(98)80012-3
19. Maréchal, Y., & Chanzy, H. (2000). The hydrogen bond network in I(β) cellulose as observed by infrared spectrometry. *Journal of Molecular Structure*, 523(1-3), 183–196. doi:10.1016/S0022-2860(99)00389-0
20. Nelson, M.L., O'Connor, R. T. (1964). Bands, Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Lattice Type. Part 1. Spectra of Lattice Types I, II; III and Of Amorphous Cellulose. 8, (Journal of Applied Polymer Science), 1311–1324.
21. Park, J.K., Park, Y.H., Jung, J. Y. (2003). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK Isolated From Rotten Apple, (Biotechnol. Bioproc), 83–88.