

**KOMAGATAEIBACTER HANSENII GA2016 İLE BAKTERİYEL
SELÜLOZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU****Melih Güzel^{1*}, Özlem Akpınar²**¹Gümüşhane Üniversitesi, Şiran Mustafa Beyaz Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gümüşhane, Türkiye²Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat, Türkiye

Geliş / Received: 13.04.2017; Kabul / Accepted: 16.09.2017; Online baskı / Published online: 15.11.2017

Güzel, M., Akpınar, Ö. (2017). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. *GIDA* (2017) 42 (5): 620-633 doi: 10.15237/gida.GD17040**ÖZ**

Selüloz, glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan ve dünyada en yaygın olarak bulunan polimerdir. Çeşitli mikroorganizmalardan biyosentez yolu ile elde edilen selüloza bakteriyel selüloz (BS) adı verilmektedir. Bu çalışmada, evsel sirkeden selüloz üreticisi bakteri izole edilmiş ve *Komagataeibacter hansenii* GA2016 olarak tanımlanmıştır. BS üreticisi mikroorganizma ile BS üretilmiş ve üretilen BS'nin fiziksel, kimyasal, yapısal ve termal özellikleri belirlenmiştir. *Komagataeibacter hansenii* GA2016'nın yüksek derecede kristaliniteye sahip BS ürettiği bulunmuştur. BS'nin FTIR spektrumunun bitkisel selüloz spektrumuna benzer, ortalama lif çapının bitkisel selülozdan yaklaşık 120 kat daha ince ve termal kararlılığının bitkisel selüloza kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *Komagataeibacter hansenii* GA2016'nın yüksek oranda ve birçok polimere göre üstün fizikokimyasal özelliklere sahip BS ürettiği, dolayısıyla gıda sanayinde BS üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel selüloz, karakterizasyon, *Komagataeibacter hansenii***PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL
CELLULOSE WITH KOMAGATAEIBACTER HANSENII GA2016****ABSTRACT**

Cellulose is the most common polymer in the world, formed by β -1,4 linked glucopyranose units. Cellulose that is produced by various microorganisms via biosynthesis is called bacterial cellulose (BC). In this study, the cellulose-producing bacteria was isolated from the homemade apple vinegar and identified as *Komagataeibacter hansenii* GA2016. BC was produced with the BC producer microorganism and the physical, chemical, structural and thermal properties of the produced BC were determined. It was found that *Komagataeibacter hansenii* GA2016 produced highly crystalline BC. The FTIR spectrum of the BC was similar to the plant cellulose spectrum, its fiber diameter was about 120 times thinner than plant cellulose and the thermal stability was higher than that of plant cellulose. As a result of this study, it has been shown that *Komagataeibacter hansenii* GA2016 produces BC with high yield and superior physicochemical properties compared to many polymers, and thus it can be used for the production of BC in food industry.

Key words: Bacterial cellulose, characterization, *Komagataeibacter hansenii*

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ melihguzel010@hotmail.com

☎ (+90) 456 233 1000 / 3608

☎ (+90) 456 511 8679

GİRİŞ

Selüloz, glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan ve son yüzyılda yoğun bir şekilde incelenmiş, dünyada en yaygın bulunan polimerdir (Klemm vd., 2005). Hemen hemen tüm bitkilerin iskelet yapısında hemiselüloz ve lignin ile birlikte (%40-60 selüloz, %20-40 hemiselüloz ve %10-25 lignin) bulunmaktadır (Lynd vd., 2002). Bitkilerin yanında bazı bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bakteriyel selüloz (BS) olarak adlandırılan bu tip selülozlar, bakteri metabolizmasının ilk ürünü ve hücre dışı bir polimer olup hücreyi koruyucu olarak görev yapmaktadır (Klemm vd., 2005; Lisdiyanti vd., 2006; Perez ve Samain, 2010). BS'nin bakterileri oksijen basıncının yüksek olduğu yüzeye konumlandığı (Iguchi vd., 2000), viskozite ve hidrofilik özellikleri nedeniyle kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) (Bielecki vd., 2000) ve UV ışınına karşı koruduğu (Ross vd., 1991) belirtilmektedir. BS'nin; bitki orijinli selüloza göre yüksek su tutma kapasitesi (Saibuatong ve Phisalaphong, 2010), benzersiz nanoyapı (Chen vd., 2010), yüksek derecede polimerizasyon (Dahman vd., 2010), yüksek mekanik mukavemet (Castro vd., 2011), yüksek kristalinite (Yamanaka ve Sugiyama, 2000; Keshk, 2014) yüksek gerilme direnci, elastikiyet (Watanabe vd., 1998; Yamanaka ve Sugiyama, 2000) gibi birçok üstün özellikleri bulunmaktadır.

BS; *Komagataeibacter* (eski adıyla *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella* ve *Escherichia* gibi çeşitli bakteri türleri tarafından üretilmektedir (Brown, 2004; Shoda ve Sugano, 2005; Morgan vd., 2013; Huang vd., 2014; Lin vd., 2016). *Komagataeibacter* grubundaki *K. xylinus* (*Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus*), *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. oboediens* ve *K. intermedius* en iyi BS üreticisi olarak bilinir (Drysdale ve Fleet, 1988; Yamada, 2000; Akoğlu vd., 2010; Karahan vd. 2011; Ha ve Park, 2012; Lin vd., 2016).

Selüloz gibi insan vücudunda sindirilemeyen (Lin ve Lin, 2004) ve serum trigliserid ve toplam kolesterol seviyesini azaltabilen (Stephens vd., 1990) BS, geleneksel olarak Güney Doğu Asya'da

bazı yerel gıdalarda (Nata de Cocco: jelatin küpü olarak servis edilen üretilen yerel bir gıda) (Shi vd., 2014) ve Japonya'da fonksiyonel içeceklerin (Kombucha ya da Mançurya çayı) (Ng vd., 2004) üretiminde kullanılmaktadır. BS gıda endüstrisi dışında, ilaç, biyoteknoloji, biyomedikal, kozmetik, kağıt ve elektronik alanlarında da kullanımı giderek artmaktadır (Zhu vd., 2010; Shah vd., 2013; Çakar vd., 2014; Shi vd., 2014).

Bu çalışmanın amacı, evsel olarak üretilen sirkeden, BS üreten bakteriyi izole edip tanımlamak ve tanımlanan potansiyel BS üreticisi mikroorganizma ile BS üreterek, üretilen BS'nin fiziksel, kimyasal, yapısal ve termal özelliklerini belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Evsel olarak üretilen elma sirketi (Ereğli, Konya) BS üreten bakteriyi izole etmek için kullanılmıştır. Sirkeden 1 mL'lik numuneler, Hestrin-Schramm (HS) besiyerine (20 g/L glikoz, 5 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 2.7 g/L Na₂PO₄ ve 1.15 g/L sitrik asit) aktarılmış, 30°C'de 18-24 saat süre ile selüloz üreticisi bakterilerin ön çoğaltması yapılmıştır (Schramm ve Hestrin, 1954). Mikrobiyal gelişme durumunda kültürlerin HS-agar (20 g/L glikoz, 5 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 2.7 g/L Na₂PO₄, 1.15 g/L sitrik asit ve 15 g/L agar) plakaları üzerine ekimi gerçekleştirilmiş ve 30°C'de inkübe edilmiştir (Aydın ve Aksoy, 2013). Mikroorganizmaların morfolojisi ışık mikroskopu ile incelenmiş, Gram boyama ile Gram negatif suşlar seçilmiş, beyaz-krem tonundaki mukoz yapıdaki kolonilerin, HS agara birden fazla ekimleri gerçekleştirilerek, mikroorganizmanın saflaştırılması sağlanmıştır. İzole edilen selüloz üreticisi bakteri HS agarda 4°C'de muhafaza edilmiş ve 16S rRNA dizi analizine göre (Ref-Gen, ODTÜ Teknokent/Ankara) tanımlanması yapılmıştır. Genomik DNA ekstraksiyonu QIAGEN DNeasy Kan ve Doku Kiti (Almanya) kullanılarak izole edilmiş ve 27F ve 1492R, 16S rRNA üniversal primerleri kullanılmış olup 94°C'de 5 dakika + 30X (94 °C'de 30 saniye + 55 °C'de 30 saniye + 72 °C'de 45 saniye) + 72 °C'de 10 dakika PCR koşullarında çalışılmıştır. Elde edilen diziler BLAST araştırması (Blast, 2017)

kullanılarak GenBank veri tabanında mevcut olanlar ile karşılaştırılmış ve en yakın türlerin 16S rRNA gen dizileri veri tabanından alınmıştır.

BS üretimi

HS-agara izolasyonu yapılan BS üreticisi mikroorganizma, öncelikle 10 mL HS besiyerine ekilerek statik koşullarda 48 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Buradan alınan 1 mL'lik örnekler, 1000 mL'lik erlenlerde bulunan 500 mL HS besiyerlerine ekilmiştir. Selüloz üretimine, 28-32°C'de statik koşullarda 21 gün boyunca ve yüzeyde oluşan BS tabana çökene kadar devam edilmiştir. Çöken BS, besiyerinden alınarak 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve %4'lük NaOH çözeltisinde 30 dakika kaynayan su içerisinde bekletilmiştir (Son vd., 2002). BS'den NaOH'ın uzaklaşması için BS'ye 5 defa beşer dakika saf su ile durulama işlemi uygulanmış, daha sonra %2 asetik asit çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletilmiş ve bu işlemi takiben de saf su ile nötralize edilmiştir. Nötralize edilen BS 50 °C'de etüvde 48 saat kurutulmuş ve BS üretim oranı; bir litre HS besiyerinde üretilen kurutulmuş BS'nin ağırlığı olarak verilmiştir (Gomes vd., 2013). Sonuçlar 3 paralelin ortalaması alınarak, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

BS'nin nem, kül içeriği ve sıvı tutma kapasitesinin belirlenmesi

Kurutulmuş BS'nin nem ve kül içeriği gravimetrik olarak (AOAC, 1989) belirlenmiştir. Sıvı tutma kapasitesinin belirlenmesi için, 1 g BS, 40'ar g su, aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit ile karıştırılmış, oluşan süspansiyon 2 saat süre ile bekletilmiş, daha sonra 30 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak ıslak numune tartılmıştır. Sonuçlar, sıvı tutma kapasitesi (%) olarak ifade edilmiş olup örneklerin sıvı tutma kapasiteleri eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır (Tappi, 1991). Tüm sonuçlar 3 paralelin ortalaması alınarak, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

$$\text{Sıvı Tutma Kapasitesi (\%)} = (W_L / W_{BS}) \times 100 \quad (1)$$

Bu bağıntıda; W_L : sıvı ağırlığını (g), W_{BS} : BS miktarını (g) ifade etmektedir.

Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi

BS potasyum bromür (KBr) diskleri haline getirildikten sonra FTIR analizi (800-400 cm^{-1}) Jasco FT/IR-430 spektrofotometre (Japonya) ile gerçekleştirilmiştir.

Termal analiz (TG-DTA)

BS'nin termal özellikleri; 10°C/dak ile 25-650 °C arasında azot ortamında Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA Termal Analiz Cihazı (ABD) ile belirlenmiştir.

Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

BS'nin, altın (au) kaplama uygulandıktan sonra, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntüleri alınarak yapısal ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. SEM analizleri QUANTA 450 Field Emission Gun (FEG) SEM Yüksek Çözünürlüklü Taramalı Elektron Mikroskobu (ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

X-ışını kırınım (XRD) analizi

BS'nin kristalinite derecesinin belirlenmesi için X-ışını kırınım (XRD) analizi Panalytical Empyrean Yüksek Performans Difraktometre Cihazı (Hollanda) ile yapılmıştır. XRD analizlerinde Ni filtreli Cu X-ışın tüplü cihazlar ile 5°/dk ile 20=10°-50° aralığında tarama yapılmıştır. Kristalinite derecesi (%) Curve Fitting metodu ile eşitlik 2'ye göre hesaplanmıştır (Hermans vd., 1948; Fang ve Catchmar, 2014).

$$CrI (\%) = (A_{cryst} / A_{total}) \times 100 \quad (2)$$

Bu bağıntıda; CrI : Kristalinite derecesini (%), A_{cryst} : kristal bölgenin alanını, A_{total} : toplam alanı ifade etmektedir.

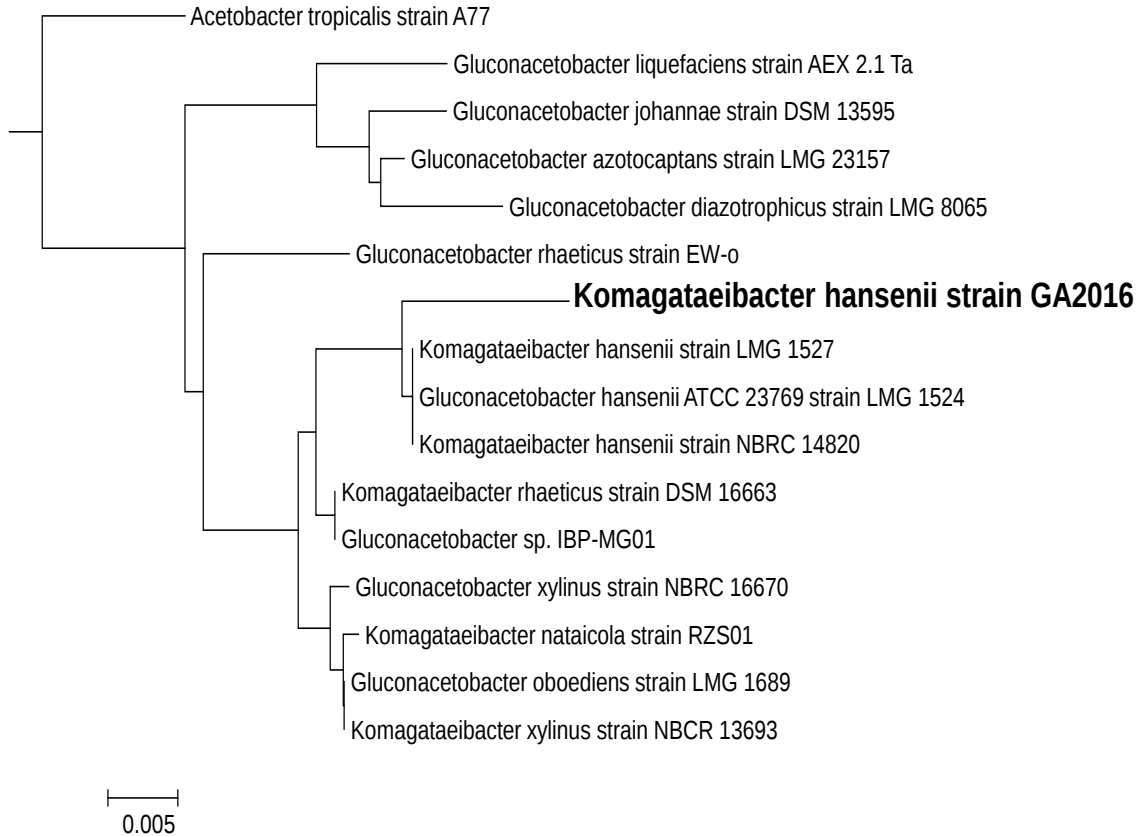
SONUÇ VE TARTIŞMA

Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Evsel sirkeden izole edilen ve BS üretebilme yeteneğine sahip bakterinin gram boyama sonucunda izolatin Gr (-) ve çubuk şeklinde olduğu gözlenmiştir. 16S rRNA dizi analizine göre tanımlanması gerçekleştirilmiş ve izole edilen suş *Komagataeibacter hansenii* LMG 1527 ve NBRC 14820 suşlarına yüksek oranda benzerlik gösterdiğinden, *Komagataeibacter hansenii* GA2016 olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Şekil 1'de 15 farklı suşun 16S rRNA gen dizilerini içeren

filogenetik ağacı gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Komagataeibacter hansenii*'nin iyi bir BS üreticisi bakteri olduğu ve BS üretimi amacıyla farklı çalışmalarda kullanıldığı belirlenmiştir (Park vd., 2003a; Park vd., 2003b; Jung vd., 2005; Rani

ve Appaiah, 2013; Aydın ve Aksoy, 2014; Lin vd., 2014; Ko vd., 2015; Lin vd., 2016; Uzyol ve Saçan, 2017).



Şekil 1. *Komagataeibacter hansenii* GA2016 izolatının 16S rRNA dizisi temel alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

Figure 1. Phylogenetic tree of *Komagataeibacter hansenii* GA2016 isolate based on 16S rRNA analysis

Bakteriyel selülozun özellikleri

HS besiyerinde üretilen BS'nin miktarı, nem ve kül içerikleri ile sıvı tutma kapasiteleri Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, bir litre besiyerinden 7.44 g BS üretildiği, üretilen BS'nin nem içeriğinin %10.98 (a/a) ve kül içeriğinin ise %9.43 (a/a) olduğu görülmektedir. BS üretimi; mikroorganizma çeşidi, kültür koşulu, karbon kaynakları ve ortam koşulları gibi pek çok durumdan etkilenmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı mikroorganizmalar, ortam koşulları, karbon kaynakları kullanılarak 0.81-8.79 g/L (Son vd., 2003; Cheng vd., 2009; Neto vd., 2009; Hungund

ve Gupta 2010; Castro vd., 2011; Wee vd., 2011; Gomes vd., 2013) arasında değişen miktarlarda BS üretildiği ancak besiyerine Vitamin C gibi takviyelerin bu miktarı 19.33 g/L'ye (Keshk, 2014) çıkardığı tespit edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen BS miktarının diğer çalışmalara kıyasla (Son vd., 2003; Neto vd., 2009; Hungund ve Gupta, 2010; Castro vd., 2011; Wee vd., 2011; Gomes vd., 2013; Keshk, 2014) yüksek olduğu ve izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016 suşunun BS üreticisi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Sıvı tutma kapasitesi bir polimerin, viskoz çözelti oluşturmak için sıvıyı absorblamak ve muhafaza etmek ile ilgili bir özelliğidir. Yüksek sıvı tutma kapasitesine sahip bir polimer; kullanıldığı gıdanın hacmini artırabilme, kalorisini ise azaltabilme fonksiyonuna sahiptir. Ayrıca gıdanın tekstür ve viskozitesini doğrudan etkilemekte olup, bu gibi nedenlerle sıvı tutma kapasitesi hem fizyolojik hem de teknolojik açıdan önemli bir özelliktir (Rodriguez vd., 2006). Selüloz, kristal yapısından dolayı organik çözücülerin çoğunda çözünmemektedir (Goh vd., 2012). Bununla birlikte belirli çözücülerde kristal içi ve kristaller arası şişme mümkündür (Mantains vd., 1995). Çalışmamızda elde edilen BS'nin çeşitli sıvıları tutma kapasiteleri belirlenmiş olup, su tutma kapasitesinin %609 olduğu tespit edilmiştir. Diğer sıvıları (aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit) tutma kapasitesinin ise %294-637 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Çizelge 1). Bu

çalışmada üretilen BS'nin sıvı tutma kapasitesi Kambucha çayından üretilen BS'nin ve ticari kristal selülozun farklı sıvıları (su, aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit) tutma kapasiteleri ile ilgili yapılan çalışmadan (Goh vd., 2012) daha yüksek bulunmuştur. Yüksek hidrojen bağlama kapasitesi ve yüksek kohesif enerji yoğunluğuna sahip selülozik liflerinin sudaki şişme gücünün dimetil sülfoksitten daha düşük olmasından (Robertson, 1964) dolayı, bu çalışmada da BS'nin dimetil sülfoksit sıvısını tutma kapasitesinin diğer sıvılara kıyasla daha fazla olduğu bulunmuş ve sonuçların diğer çalışmalarla da (Mantanis vd., 1995; Goh vd., 2012) uyumlu olduğu belirlenmiştir. Asetonun hidrojen bağlama kapasitesi, diğer üç organik çözücüye kıyasla daha zayıf olmasından (Goh vd., 2012) dolayı, BS'nin aseton sıvısını tutma kapasitesinin diğer sıvılara kıyasla daha az olduğu görülmektedir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bakteriyel selülozun fizikokimyasal özellikleri
Table 1. Physicochemical properties of bacterial cellulose

Bakteriyel Selüloz (g/L)	7.44±0.09
Nem İçeriği (% a/a)	10.98±0.05
Kül İçeriği (% a/a)	9.43±0.03
Su Tutma Kapasitesi (% a/a)	609.30±0.90
Aseton Tutma Kapasitesi (% a/a)	294.12±8.31
Dimetil Sülfoksit Tutma Kapasitesi (% a/a)	637.31±10.87
Asetik Asit Tutma Kapasitesi (% a/a)	543.73±19.41

FT-IR analizi

Şekil 2'de BS'nin FTIR spektrumu verilmiş olup, laboratuvarımızda bulunan buğday sapından elde edilen bitkisel selülozun (Erdoğan, 2007) FTIR spektrumu ile karşılaştırılmıştır. FTIR ile, moleküler bağların karakterizasyonu yapılarak; organik bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu ve bağlanma yerleri belirlenmektedir (Fabio vd., 2013). Şekil 2'de de görüleceği üzere 800 ve 1200 cm⁻¹ dalga aralığında bulunan absorpsiyonlar karbonhidratlar için parmak izi bölgesidir ve bu bantların konumu ve yoğunluğu her polisakkarit için spesifik olup polisakkaritlerde önemli kimyasal grupların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Nesic vd., 2011; Sivam vd., 2012). Yapılan çalışmalarda BS için karakteristik pik

değerlerinin 3400-3440 cm⁻¹'de hidroksil grupları (-OH), 2800-2900 cm⁻¹'de metilen gerilme titreşimini (-CH₂-), 1620-1640 cm⁻¹'de karboksilik grupların varlığını (COOH), 1420-1440 cm⁻¹'de karbonil grupların varlığını (C=O), 1160 cm⁻¹'de C-O-C ve 1040-1068 cm⁻¹'de şeker halkasının C-O-C ve C-O-H germe titreşimi ifade ettiği belirtilmektedir (Park vd., 2003b; Halib vd., 2012; Gao vd., 2014; Gayathry ve Gopalswamy, 2014). Bitkisel selülozlar için ise 3350 cm⁻¹ ve 3400-3500 cm⁻¹ civarında O-H, 2800-2900 cm⁻¹'de C-H, 1300 cm⁻¹ civarı C-H, 1160 cm⁻¹ civarı C-O-C ve 1035-1060 cm⁻¹ civarında C-O gerilmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Marchessault ve Sundararajan, 1983; Halib vd., 2012). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile üretilen BS'nin FTIR spektrumunda literatürde bulunan

değerlere benzer pikler görülmüş ve aynı zamanda bitkisel selülozun FTIR spekturumu ile de uyum içinde olduğu saptanmıştır.

Termogravimetrik analiz

Termogravimetrik analiz (TGA) incelenen maddelerin termokimyasal dönüşüm esnasında yarı kantitatif olarak ısı bozunma süreçleri hakkında bilgi vermektedir (Aydıncak, 2012). BS'nin sıcaklık değişimine karşı kütledeki azalma ölçülmüş ve termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz eğrisi bitkisel selüloz için elde edilen eğri ile beraber Şekil 3'te ve TGA değerlerine ilişkin sıcaklık ve kütle kaybı (%) değerleri Çizelge 3'te sunulmuştur. BS'nin sıcaklıkla bozunma eğrisinin bitkisel selüloz ile benzer olduğu ve eğrilerin literatürde bulunan diğer çalışmalarda da görülen (Cheng vd., 2009; Martins vd., 2009; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015; Schröpfer vd., 2015) 0-100 °C, 200-250 °C ve 360-390 °C olmak üzere üç bölgeye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3). İlk bölgede sıcaklık artışına bağlı olarak örneklerde absorbe suyun buharlaşması nedeniyle hafif bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir (Yang ve Chen, 2005; Cheng vd., 2009; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015). 200-250 °C arasındaki sıcaklıklarda ikinci bir ağırlık kaybı, hidroksil ve metil hidroksil gruplar gibi küçük molekül ağırlıklı parçaların uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır (Yang ve Chen, 2005; Cheng vd., 2009; Mohammadkazemi vd., 2015). 360-390°C arasında meydana gelen önemli ağırlık kaybı (%70-80) ise polimerik zincirler ve pıran yapılarının bozunumundan ileri gelmektedir (Cheng vd., 2009; Vazquez vd., 2013).

Termal bozunum davranışları liflerin moleküler ağırlığı, kristalinitesi ve yönelimi gibi bazı yapısal parametrelerden etkilenmektedir (Barud vd., 2007; Vazquez vd., 2013). Türevsel termogravimetri (DTG) eğrisi üzerindeki en büyük pik (DTG_{max}), bozunma esnasında en keskin ağırlık kaybı eğimini (%/°C) ifade etmektedir. Bu değer BS için 333 °C, bitkisel selüloz için ise 335 °C olarak bulunmuştur (Çizelge 2). Daha önceki çalışmalarda, saf selüloz ve Whatman kağıdı için bu değerlerin 330-350°C civarında, Nata de Coco'dan elde edilen BS'nin 330-370 °C arasında, kağıt yapımında kullanılan

Acetobacter xylinum kültüründe üretilen BS'nin 370°C (Halib vd., 2012), ambalaj kağıdı için 350 °C (Soares vd., 1995), arpa sapından elde edilen bitkisel selülozun ise 333 °C (Sun vd., 2005) olduğu belirtilmiştir. Termal bozunum esnasında BS kütlelerinin yarısının kaybolduğu sıcaklık değerini ifade eden T_{%50} değerleri de BS için 342 °C, bitkisel selüloz için 335 °C olarak belirlenmiştir. 650 °C'deki toplam kütle kaybı ise BS ve bitkisel selüloz için sırasıyla %75 ve %90 olarak belirlenmiş olup, BS'nin termal kararlılığının bitkisel selüloza göre daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 2. Bakteriyel ve bitkisel selüloz örneklerinin termal degradasyon ölçüm değerleri
Table 2. Thermal degradation measurement of bacterial and plant cellulose samples

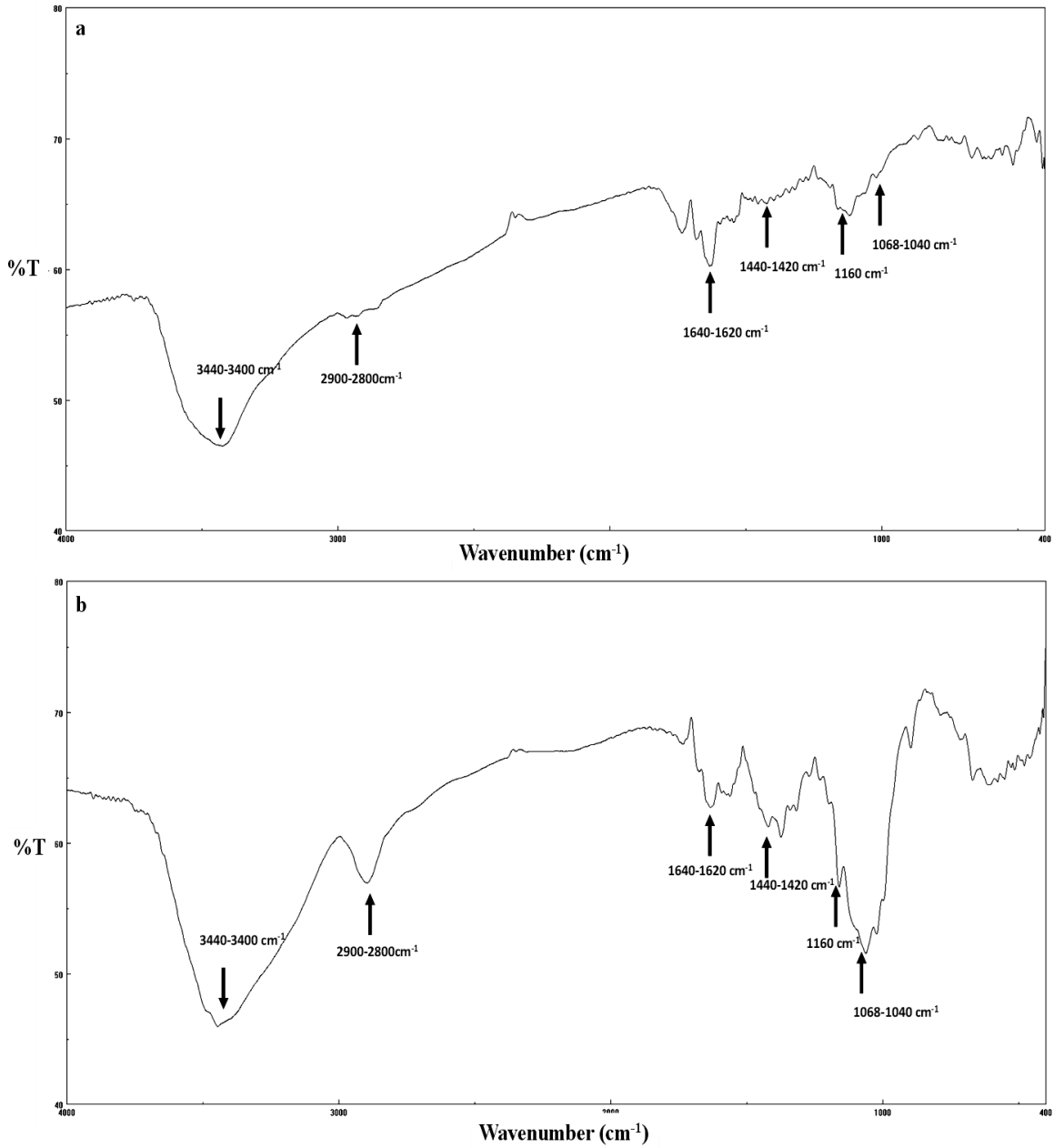
	T _{%50} (°C)	DTG _{max} (°C)	Kütle Kaybı (650 °C) (%)
Bakteriyel Selüloz	342	333	75
Bitkisel Selüloz	335	335	90

SEM analizi

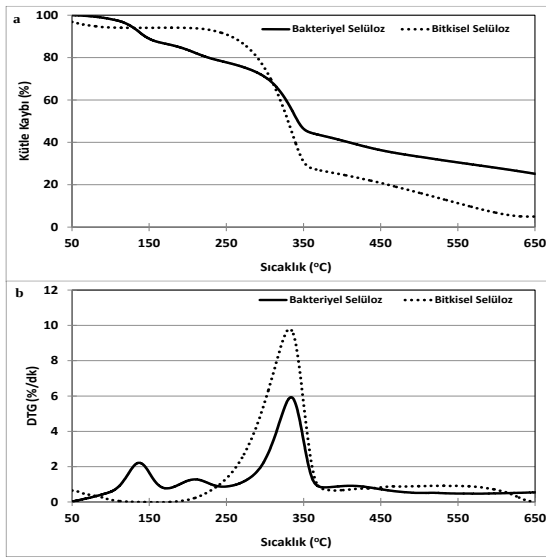
BS'nin görsel yüzey morfoloji özellikleri bitkisel selüloz ile karşılaştırılarak, farklı büyütme değerlerine sahip taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde BS'nin farklı literatür kaynaklarında belirtilen BS örnekleri ile morfolojik yapıları benzer bulunmuştur (Cheng vd., 2009; Martins vd., 2009; Goh vd., 2012; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015). BS'nin ortalama lif çapı 73.63 nm olarak belirlenmiş olup, bitkisel selüloz lif çapına göre 120 kat daha ince olduğu görülmektedir (Şekil 4). İnce liflere sahip polimerlerin gerilme direnci ve uzama özellikleri gibi mekanik özellikleri artmakta, su buharı geçirgenliği azalmakta ve daha pürüzsüz bir yapı oluşmaktadır (Luddee vd., 2014). Ayrıca daha önceki BS ile yapılan çalışmalarda mikrofibrillerin bitkisel selülozlara kıyasla daha küçük olması ile BS'nin yüzey alanının büyüdüğü ve bu sayede daha büyük ve gözenekli bir hidrojel tabakanın

oluştugu belirtilmiştir (Johnson ve Neogi, 1989; Ross vd., 1991; Jonas ve Farah, 1998; Vandamme vd., 1998; Bielecki vd., 2000). Bu özellikler BS'nin su tutma kapasitesi, termal stabilitesi ve mekanik

mukavemet gibi özelliklerini etkilemektedir (Cheng vd. 2009).



Şekil 2. Bakteriyel (a) ve bitkisel selülozun (b) FTIR spektrumu
Figure 2. FTIR spectrum of bacterial cellulose (a) and plant cellulose (b)



Şekil 3. Bakteriyel ve bitkisel selülozun TGA (a) ve DTA (b) eğrileri

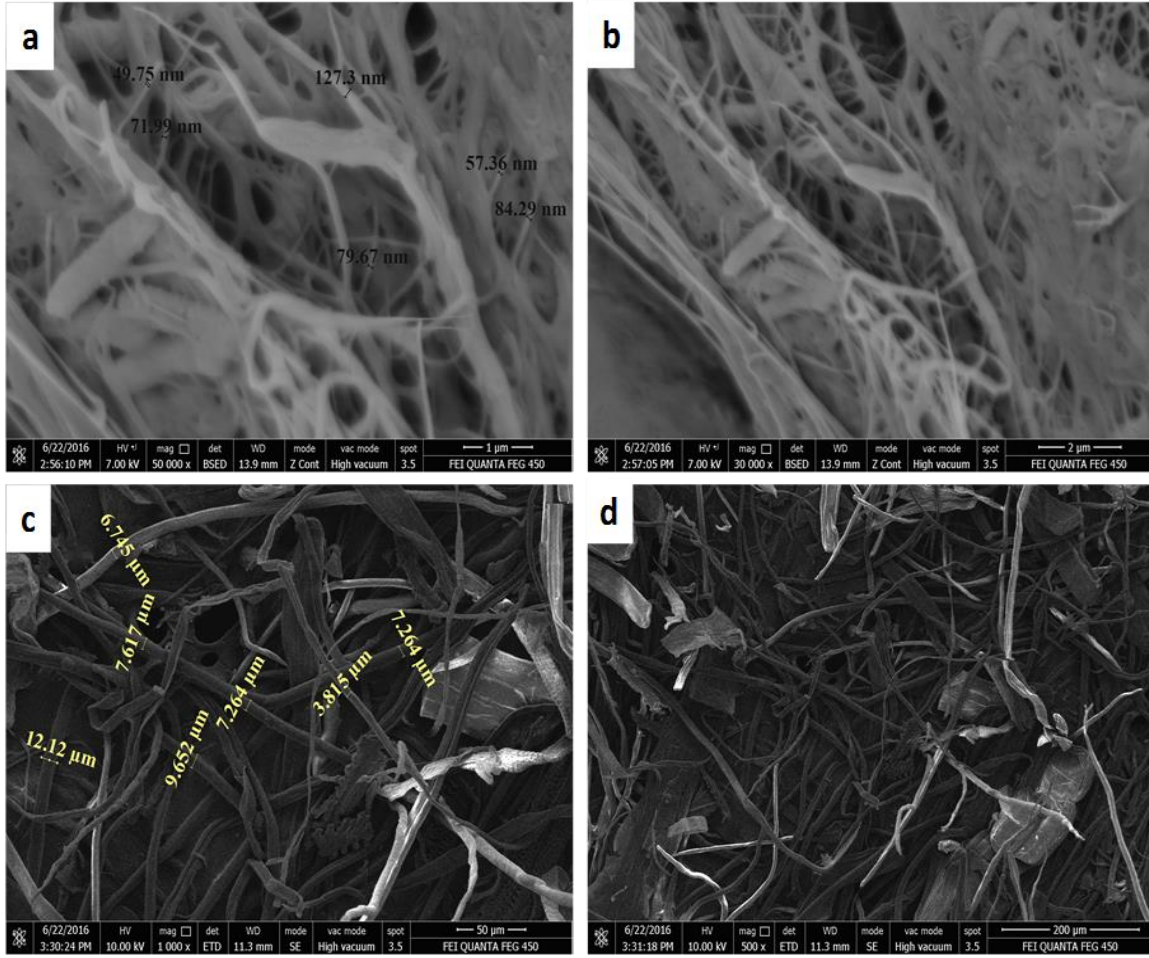
Figure 3. TGA (a) and DTA (b) curves of bacterial cellulose and plant cellulose

XRD analizi

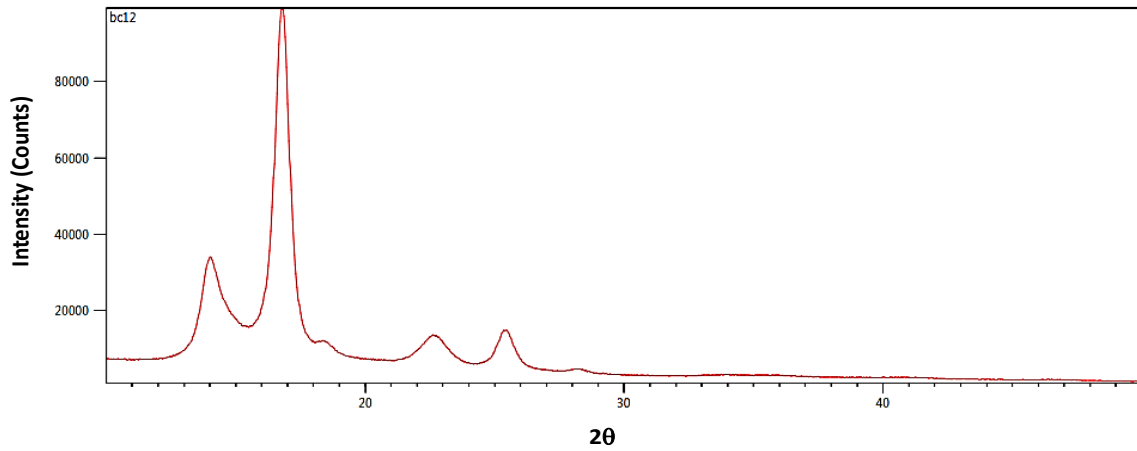
X-ışını kırınımı (XRD), selülozun kristal yapı analizinde en sık kullanılan tekniktir (Mazumdar, 1999; Goh vd. 2012). Selüloz yapısını oluşturan selüloz zincirleri, değişen uzunluk ve genişlikte suda çözünmeyen bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı düzenli (kristal) ve daha az düzenli (amorf) bölgelere sahiptir. Malzemenin kristal kısmı XRD’de keskin kırınım piki verirken, maddenin amorf kısmı ise dağınık pikler vermektedir (Park vd., 2010). BS örneğinin X-ışını difraktogramı Şekil 5’te verilmiştir. Difraktograma göre BS’nin karakteristik 2 θ açıları olan 14.00°-16.78° ve 22.60° (Kong vd. 2010; Sun vd., 2010) kristal düzlemlerine karşılık gelen selüloz I kırılma profili gösterdiği belirlenmiştir. BS’nin kristalinite derecesinin hesaplamasında 2 θ açısının en büyük olduğu 14.05°-16.77° ve 22.68° kullanılmış olup diğer lineer bölgeler hesaplama dışı bırakılmıştır. Bu şekilde BS’nin kristalinite derecesi %87.47 olarak hesaplanmış olup, sonucun literatürle uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında farklı mikroorganizmalar ve farklı karbon kaynakları kullanılarak elde edilen BS’lerin kristalinite derecelerinin %69-89 (Czaja vd., 2004; Cheng vd., 2009; Yang vd., 2012;

Mohammadkazemi vd., 2015), ticari mikrokristalin selülozun kristalinite derecesinin ise %65-83 (Schurz ve Klapp, 1976; Teeäär vd., 1987; Röder vd., 2006; Leppänen vd., 2009; Nada vd., 2009; Goh vd., 2012) olarak belirtilmiştir,

Bu çalışmanın sonucunda, evsel sirkeden izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016’nın yüksek oranda BS ürettiği ve elde edilen BS’nin yüksek su tutma kapasitesine, yüksek termal kararlılığa, kristaliniteye ve ince liflere sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen BS’nin, bitkisel selüloza kıyasla liflerinin yaklaşık 120 kat daha ince olmasından dolayı polimerin gerilme direnci ve uzama gibi mekanik özelliklerinin daha iyi olduğu, daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu, yüzey alanının daha büyük olduğu ve bu sayede daha büyük ve gözenekli bir hidrojel tabaka oluşturduğu söylenebilir (Luddee vd., 2014). Sağlık üzerine olumlu etkileri (sindirimi düzenleyici, serum kolesterol ve kan yağ seviyesini azaltıcı gibi), bitkisel selüloza göre daha saf olması ve üretim sırasında çevreye zararlı kimyasal maddeler kullanılmaması BS’nin diğer avantajlarıdır. BS’nin geniş ölçekli uygulamalarda kullanımı, üretim maliyetinin yüksek ve verimin düşük olması gibi nedenlerden dolayı bulunmamaktadır. Bu nedenle üretim maliyetini azaltmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır (Watanabe vd., 1998; Ramana vd., 2000; Yamanaka ve Sugiyama 2010). Son zamanlarda tarım, ormancılık ya da endüstriyel atıkların BS üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılması ile üretim maliyetlerinin azaltılabilmesi konusunda çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Uraki vd., 2002; Bae ve Shoda, 2005; Hong ve Qiu, 2008; Goelzer vd., 2009; Carreira vd., 2011; Usha ve Appaiah, 2011; Zeng vd., 2011; Chen vd., 2012; Gomes vd., 2013; Lin vd., 2014). Bu çalışmada izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016’nın iyi bir BS üreticisi olduğu bulunmuştur. Bu suş ile BS üretiminde karbon kaynağı olarak atık maddelerin kullanımı, hem selüloz üretiminin sürdürülebilirliğinin gelişmesine, hem de endüstriyel atıkların çevreyle dost bir şekilde bertaraf edilmesine katkı sağlayacaktır.



Şekil 4. Bakteriyel ve bitkisel selülozün SEM mikrografı. (a) Bakteriyel selüloz 50000x, (b) Bakteriyel selüloz 30000x, (c) Bitkisel selüloz 1000x, (d) Bitkisel selüloz 500x büyütme
Figure 4. SEM of bacterial and plant cellulose. (a) Bacterial cellulose 50000x, (b) Bacterial cellulose 30000x, (c) Plant cellulose 1000x, (d) Plant cellulose 500x magnification



Şekil 5. Bakteriyel selülozün X-ışını difraktogramı
Figure 6. X-ray diffractogram of bacterial cellulose

Teşekkür

Yazarlar, Fatmagül Halıcı Demir'e evsel sirkeyi sağladığı için teşekkür ederler. Bu proje Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No:2015/128) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Akoğlu, A., Karahan, A.G., Çakır, İ., Çakmakçı, M.L. (2010). Bakteriyel selülozun özellikleri ve gıda sanayinde kullanımı. *GIDA* 35(2): 127-134.

AOAC (1989). Officials methods of analysis. 15th Edition, Washington DC, USA.

Aydın, Y.A., Aksoy, N.D. (2013). Çeşitli gıda atıklarından selüloz üreten asetik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması. *Türk Mikrobiyol. Cem. Dergisi* 43(1):26-35.

Aydın, Y.A., Aksoy, N.D. (2014). Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:1065-1075.

Aydıncak, K. (2012). Hidrotermal karbonizasyon yöntemiyle gerçek ve model biyokütlelerden karbon nanoküre sentezi ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.

Bae, S., Shoda, M. (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 45–51.

Barud, H. S., Ribeiro, C. A., Crespi, M. S., Martines, M. A. U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R. F. C., (2007). Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphatecomposite membranes. *J. Therm. Anal. Cal.* 87(3),815–818.

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

Blast (2017). Basic Local Alignment Search Tool. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (Accessed 10 January 2017).

Brown, R.M. (2004). Cellulose Structure and biosynthesis: What is in store for the 21th century. *J Poly Sci: Part A: Polymer. Chem.* 42:487-495.

Carreira, P., Mendes, J.A., Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S., Silvestre, A.J., Neto, C.P.,

(2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour. Technol.* 102: 7354–7360.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.L., Caroa, G., Mondragon, I., Ganán, P., (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, *Carbohydr. Polym.* 84(1): 96-102.

Chen, P., Cho, S.Y., Jin, H.J., (2010). Modification and Applications of Bacterial Celluloses in Polymer Science. *Macromol. Res.* 18: 309-320.

Chen, L., Hong, F., Yang, X.X., Han, S.F. (2012). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresour. Technol.* 135: 464–468.

Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A. (2009). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose* 16:1033-1045.

Czaja, W., Romanovicz, D., Brown Jr., R. M. (2004). Structural investigation of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* 11: 403–411.

Dahman, Y. (2009). Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9: 5105-5122.

De Souza, C.F., Lucyszyn, N., Woehl, M.A., Riegel-Vidotti, I.C., Borsali, R., Sierakowski, M.R. (2013). Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. *Carbohydr. Polym.* 93: 144-153.

Drysdale, G. S. and Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(2):143-154.

- Fabio, P.G., Nuno, H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M.F., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Carmen S.R.F. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass Bioenergy* 55: 205-211.
- Erdoğan, K. (2007). Tütün saplarından ksilooligosakkarit üretimi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tokat.
- Fang, L., Catchmark, J.M. (2014). Characterization of water-soluble exopolysaccharide from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly. *Cellulose* 21:3965-3978.
- Gao, C., Yan, T., Du, J., He, F., Luo, H., Wan, Y. (2014). Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocoll.* 36: 204-211.
- Gayathry, G., Gopalaswamy, G. (2014). Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Fibre Text. Res.* 39: 93-96.
- Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A.A., Bhat, R. (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. *Int. Food Res. J.* 19(1): 153-158.
- Goelzer, F., Faria-Tischer, P., Vitorino, J., Sierakowski, M.R., Tischer, C. (2009). Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Mater. Sci. Eng.* 29: 546-551.
- Gomes, F.P., Silva, N.H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M.F., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Freire, C.S.R. (2013). Production of bacterial cellulose by *gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass Bioenergy* 55: 205-211.
- Ha, J. H., Park, J. K. (2012). Improvement of bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum* using byproduct produced by *Gluconacetobacter hansenii*. *Korean J. Chem. Eng.* 29(5): 563-566.
- Halib, N., Iqbal, M. C., Amin. M., Ahmad, I. (2012). Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysiana* 41(2): 205-211.
- Hermans, P. H., Weidinger, A. (1948). Quantitative x-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis. *J. App. Phy.* 19(5): 491.
- Hong, F., Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter acetisubsp. xylinus* ATCC 23770. *Carbohydr. Poly.* 72: 545-549.
- Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* 21(1):1-30.
- Hungund, B.S., Gupta, S.G. (2010). Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1823-1828.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* 35(2):261-270.
- Johnson, D.C. ve Neogi, A.N. (1989). Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US Patent, 4863565.
- Jonas, R., Farah, L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad. Stab.* 59:101-106.
- Jung, J.Y., Park, J.K., Chang, H.N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme Microb. Technol.* 37:347-354.
- Karahan A.G., Akoğlu A., Çakır, I., Kart, A., Çakmakçı M.L., Uygun, A., Göktepe, F. (2011). Some properties of bacterial cellulose produced by new native strain *Gluconacetobacter* sp. A06O2 obtained from Turkish vinegar. *J. App. Poly. Sci.* 121(3):1823-1831.
- Kato, N., Sato, T., Kato, C., Yajima, M., Sugiyama, J., Kanda, T., Mizuno, M., Nozaki, K., Yamanaka, S., Amano, Y. (2007). Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter*

- xylinus* cells under high-hydrostatic pressure. *Extremophiles* 11(5): 693-698.
- Keshk, S.M.A.S. (2014). Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydr. Polym.* 99: 98-100.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material A. Bohn, *Polym. Sci.* 44: 3358-3393.
- Ko, Y. H., Oh, H.J., Lee, H.J. (2015). Use of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter hansenii* NOK21 as a proton permeable membrane in microbial fuel cells. *J. Microb. Biochem. Techno.* 7(3): 145-151.
- Kong, F.L., Zhang, M.W., Kuang, R.B., Yu, S.J., Chi, J.W., Wei, Z.C. (2010). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from pulp tissue of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Carbohydr. Polym.* 81:612-616.
- Leppänen, K., Anderson, S., Torkkeli, M., Knaapila, M., Kotelnikova, N., Serimaa, R., 2009. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various species, cotton and flax studied by x-ray scattering. *Cellulose*, 16: 999-1015.
- Lin, D., Sanchez, P.L., Li, R., Li, Z. (2014). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresour Technol.* 151:113-119.
- Lin, S. P., Liu, C. T., Hsu, K. D., Hung, Y. T., Shih, T. Y., Cheng, K. C. (2016). Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating diskbioreactor and its material property analysis. *Cellulose* 23(1): 367-377.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K. (2001). 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* 47: 119-131.
- Luddee, M., Pivsa-Art, S., Sirisansaneeyakul, S., Pechyen, C. (2014). Particle size of ground bacterial cellulose affecting mechanical, thermal, and moisture barrier properties of PLA/BC biocomposites. *Energy Procedia* 56: 211-218.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J. ve Van Zyl, W.H. (2002). Pretorius IS: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-77.
- Mantanis, G. I., Young, R. A., Rowell, R. M. (1995). Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. *Cellulose* 2:1-22.
- Marchessault, R.H., Sundararajan, P.R. (1983). Cellulose. In Aspinall G.O. (editor) *The Polysaccharides*, Volume 2, page 12-95. New York: Academic Press, Inc.
- Martins, I.M.G., Magina, S.P., Oliveira, L., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. (2009). New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. *Composites Sci Tech.* 69: 2163-2168.
- Mazumdar, S. (1999). A standardless method of quantitative ceramic analysis using X-ray powder diffraction. *J. Appl. Cryst.* 32:381-386.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydr. Polym.* 117: 518–523.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., ve Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493(7431): 181-186.
- Nada, A.M.A., El-Kady, M.Y., El-Sayed, E.S., Amine, F.M., 2009. Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC). *BioResources*, 4:1359-1371.
- Neto, C.P., Mikkelsen, A.G., Flanagan, B.M., Dykes, G.A., Gidley, M.J. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 107: 576-583.
- Nesic, A.R., Trifunovic, S.S., Grujic, A.S., Velickovic, S.J., Antonovic, D.G. (2011). Complexation of amidated pectin with poly(itaconic acid) as a polycarboxylic polymer model compound. *Carbohydr. Res.* 346(15): 2463-2468.
- Ng, C., Sheu, F., Wang, C., Shyu, Y. (2004). Fermentation of *Monascus purpureus* on agri-by-

- products to make colorful and functional bacterial cellulose (NATA). *Microbiol. Indones.* 4(1): 6-10.
- Park, J.K., Jung, J.Y., Park, Y.H. (2003a). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnol. Lett.* 25:2055–2059.
- Park, J.K., Park, Y.H., Jung, J.Y. (2003b). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8(2):83-88.
- Perez, S., Samain, D. (2010). Structure and engineering of celluloses. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 64: 25-116.
- Ramana, K., Tomar, A., Singh, L., 2000. World Journal of Microbiology and Biotechnology (2000) 16: 245. doi:10.1023/A:1008958014270 y, B.G. (1949). Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. *Acta Chemica Scandinavica*, 3: 649-450.
- Rani, M.U., Appaiah, K.A. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *J. Food. Sci. Technol.* 50(4):755-762.
- Robertson, A.A. (1964). Cellulose-liquid interactions. *Pulp Paper Mag Canada* 65:171-178.
- Rodriguez, R., Jiménez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A. (2006). Dietary fibre from plant products as source of functional ingredients, *Trends Food Sci. Tech.* 17(1): 3-15.
- Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microb. Rev.* 55 (1): 35-58.
- Röder, T., Moosbauer, J., Fasching, M., Bohn, A., Fink, H.P., Baldinger, T., Sixta, H., 2006. Crystallinity determination of native cellulose comparison of analytical methods. *Lenzinger Berichte* 86:85-89.
- Saibuatong, O.A., Phisalaphong, M. (2010). Novo Aloe Vera-Bacterial Cellulose Composite Film From Biosynthesis. *Carbohydr. Polym.* 79(2): 455-460.
- Saxena, I.M., Lin, F.C., Brown, R.M. (1990). Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol. Biol.* 15: 673-683.
- Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K., Brown, R.M. (1994). Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* 176:5735-5752.
- Schramm, M., Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11: 123-129.
- Schröpfer, S. B., Bottene, M. K., Bianchin, L., Robinson, L. C., Lima, V., Jahno, V. D., Barud, H. S., Ribeiro, S. J. L. (2015). Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, plant cellulose and poly (3-hydroxybutyrate) in soil. *Polímeros* 25(2), 154-160.
- Schurz, J., Klapp, H. (1976). Untersuchungen a mikrokristallinen und mikrofeinen cellulosen. *Das Papier* 30:510-513.
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. J., Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text Res. J.* 29:786-794.
- Seifert, M., Hesse, S., Kabrelian, V., Klemm, D. (2003). Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. *J Poly Sci: Part A: Polym. Chem.* 42:463-470.
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids* 35: 539-545.
- Shoda, M., Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 1-8.
- Sivam, A.S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chem.* 131(3):802-810.
- Soares, S., Camino, G., Levchik, S. (1995). Comparative study of the thermal decomposition of pure cellulose and pulp paper. *Polymer. Degrad. Stab.* 49: 275-283.

- Son, C., Chung, S., Lee, J., Kim, S. (2002). Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. *J. Microb. Biotech.* 12(5):722-728.
- Son, H.J., Kim, H.G., Kim, K.K., Kim, H.S., Kim, Y.G., Lee, S.J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresour. Technol.* 86: 215-219.
- Stephens, S.R., Westland, J.A., Neogi, A.N. (1990). Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component. *US patent 4960763*.
- Sun, J.X., Xu, F., Sun, X.F., Xiao, B., Sun, R.C. (2005). Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. *Polym. Degr. Stab.* 88: 521-531.
- Sun, J., Jiang, Y., Shi, J., Wei, X., Xue, S.J., Shi, J., Yi, C. (2010). Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit. *Food Chem.* 119:753-757.
- Tappi (1991). Tappi useful method UM256. Water retention value (WRV), Tappi Useful Methods, Tappi Press, Atlanta, USA.
- Teeäär, R., Serimaa, R., Paakkari, T., 1987. Crystallinity of cellulose, as determined by cp/mas nmr and xrd methods. *Polym. Bull.*, 17: 231-237.
- Uraki, Y., Morito, M., Kishimoto, T., Sano, Y. (2002). Bacterial cellulose production using monosaccharides derived from hemicelluloses in water-soluble fraction of waste liquor from atmospheric acetic acid pulping. *Holzforschung* 56: 341-347.
- Usha, R.M., Appaiah, K.A. (2011). Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract an agro-industry waste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 739-745.
- Uzyol, H. K., Saçan, M.T. (2017). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24:11154–11162
- Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym. Deg. Stab.* 59(1-3) 93-99.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Polym. Environ.* 21(2), 545-554.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* 5(3):187-200.
- Wee, Y.J., Kim, S.Y., Yoon, S.D., Ryu, H.W. (2011). Isolation and characterization of a bacterial cellulose producing bacterium derived from the persimmon vinegar. *Afr. J. Biotechnol.* 10(72): 16267-16276.
- Yamada, Y. (2000). 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.* 50:2225–2227.
- Yamanaka, S. ve Sugiyama, J. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* 7(3):213-225.
- Yang, C.M., Chen C.Y. (2005). Synthesis, characterization and properties of polyanilines containing transition metal ions. *Synth. Met.* 153:133-136.
- Yang, G., Xie, J., Hong, F., Cao, Z., Yang, X. (2012). Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym* 87: 839– 845.
- 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. *Carbohydr. Polym.* 85: 506– 513.