

Asetik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Alternatif Selüloz¹

Esin Poyrazoğlu Çoban², H.Halil Bıyık³

Bakteriyel Selüloz ve Özellikleri

Son yıllarda biyoteknolojinin hızla ilerlemesi ile biyoteknologlar, bitkiler olmadan da selüloz üretebilenin yollarını aramışlardır. İlk kez Brown tarafından sirke fermantasyonu sırasında, sıvı yüzeyde oluşan jelatinimsi yapıdan izole edilen *Acetobacter xylinum* 'un, uygun bir besi ortamında üretildiğinde, yüksek miktarda ekstraselüler jelatinimsi bir yapı sentezlediği belirtilmiştir (1, 2). Son 30 yılda yapılan çalışmalar, selüloz ürettiği bilinen bakteriler üzerinde yoğunlaşmış ve bakteriler tarafından üretilen bu selüloza da "Bakteriyel Selüloz" adı verilmiştir (2).

En iyi selüloz üreticisi olan *Acetobacter xylinum*, asetik asit bakterisi olarak bilinir (3). Asetik asit bakterileri α -Proteobakteriler içindeki *Acetobacteraceae* familyasında olup (4, 5), *Acetobacter* (6), *Gluconobacter* (7), *Acidomonas* (8), *Gluconacetobacter* (9), *Asaia* (10) ve *Kozakia* (11) olmak üzere altı cinsi içermektedir (12). Selüloz üretimi en iyi olan *Acetobacter* cinsi içinde *Acetobacter xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. hansenii*, *A. lovaniensis*, *A. liquefaciens* türleri yer almaktadır (5, 13).

Asetik asit bakterilerinin, doğal kaynaklardan izolasyonu için Hestrin ve arkadaşları (14, 15) ve Frauter & Simonart (16)'ın önerdiği yöntemler (13, 17) ile Fratuer (18) ve Carr (19)'in çalışmalarında kullandıkları metotlardan da yararlanılmaktadır (13, 20).

Bakteriyel selüloz, metabolizmanın ilk ürünü olan ekstraselüler bir polimerdir ve hücreyi koruyucu olarak görev yapar. Bitkisel selüloz ise hücrenin yapı elemanı olarak işlev görür (2).

A. xylinum 'un sentezlediği selülozun depo materyali olarak kullanıldığı da ileri sürülmektedir.

¹ Bu çalışma, 2007 yılında Araş. Gör. Esin Poyrazoğlu Çoban tarafından ve Yrd. Doç. Dr. H.Halil Bıyık danışmanlığında tamamlanan "Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellüler Polisakkarit Üretimi" adlı doktora tezinden düzenlenmiştir.

² Araş. Gör. Esin Poyrazoğlu Çoban, ³ Yrd. Doç. Dr. H. Halil Bıyık; Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Aydın. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: epoyrazoglu@adu.edu.tr

Selüloz tabakanın, vizkozitesi ve hidrofilik özellikleri nedeniyle bakterileri kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) karşı koruduğu da bilinmektedir (2, 20). Ayrıca bakteriyel selülozun, bakterileri UV ışınına karşı koruduğu da belirtilmektedir. UV ışınına 1 saat maruz kalan, bakteriyel selüloz ile örtülü olan asetik asit bakterilerinin % 23'ünün canlı kalmaya devam ettiği belirtilmiştir (20).

Selüloz, β -1,4 bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz birimlerinin, suda çözünmeyen dallanmamış yapıdaki polimer bileşikleridir (21). Yoğun olarak araştırılan bakteriyel selüloz, kimyasal olarak bitkisel selüloz ile aynı olmasına rağmen, bakteriyel selülozun moleküler yapısı ve fiziksel özellikleri bitkisel selülozdan farklıdır (2). Bakteriyel selülozun, fibril ağ çapının 0.1 μ m olduğu belirtilmektedir, bu çap bitkisel selülozun yaklaşık % 1'i kalınlığındadır (22, 23).

Bakteriyel selülozun makroskopik görüntüsü kültür koşullarına bağlıdır (24, 25). Durgun koşullarda (çalkalamasız) sıvı besi ortamının üst yüzeyinde (oksijence zengin olan kısım) selüloz tabaka oluşur. Selülozun subfibrilleri devamlı olarak bakteri hücrelerinin yüzeyindeki porlardan dışarı çıkar ve kristalize olmuş mikrofibriller birbirlerine paralel bir şekilde bulunurlar (26). Çalkalamalı kültürlerde gelişen bakteriyel selüloz ise düzensiz, kenarları pürüzlü granüller şeklinde oluşur (22).

Selülozun, selüloz I ve selüloz II olmak üzere iki kristalize formu vardır. Selülozun bu iki formu X-ray, nükleer magnetik rezonans (NMR), Raman spektroskopi ve Infrared analizi ile tespit edilebilir (27). CP/MAS 13 C-NMR kullanılarak, selülozun iki farklı formu olan selüloz I α ve selüloz I β 'nin ayrımı mümkündür (24, 28). Bakteriyel selülozun subfibrilleri, mikrofibriller halinde kristalize olmuştur. Bunlar demetler ve iplikler halinde bulunurlar (25, 26).

Bakteriyel selüloz genel olarak suda çözünmeyen, esnek, gerilme direnci yüksek, elastik bir polimerdir (24). Ağsı bir yapıya sahip olan polimerin kristalize özelliği yüksektir (25). Bu özellikler bitki orijinli selülozda bulunmaz (24,25). Ayrıca bakteriyel polimerin yüzeyi bitkisel polimerin yüzey alanına göre 200 kat daha büyüktür (2, 27). Bakteriyel selüloz içerdiği sıvı komponentlerden dolayı jelatinimsi bir görünüme sahiptir. Polimerin su tutma kapasitesi yüksektir fakat suyun fazlası polimere bağlanmaz ve polimer yavaşça bastırılarak fazla su dışarı verilebilir (24, 25, 27). Kurutulmuş polimer bir kağıt tabakası gibi 0,01-0,5 mm kalınlığında olup, iyi bir adsorblama özelliğine sahiptir (29, 30). Ayrıca ses dalgalarını hızlı bir şekilde iletebilmektedir (20, 21, 26, 27). Polimerin bu mekanik özelliğinden dolayı akustik membranlar olarak kullanılabilirdiği de belirtilmiştir (20, 21, 26).

Bakteriyel Selüloz Sentezleyen Mikroorganizmalar

Bakteriyel selüloz üretiminde *Acetobacter* suşları en iyi bilinen türler olmasına karşın, diğer bazı bakteri cinsleri de selüloz sentezler. Selüloz sentezleyen bakteriler arasında başlıca; *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* cinslerine ait türler bulunmaktadır (2, 26). Bakteriyel selülozun biyosentezi bu bakterilerde aynı olmasına rağmen, polimerin yapısı organizmaya göre değişir (20, 26).

Selüloz üreticileri arasında en iyi olanı *Acetobacter xylinum* (sinonimleri: *A. aceti* ssp. *xylinum*, *A. xylinus*) olmakla birlikte *Gluconacetobacter* grubundaki *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* ve *G. intermedius* da selüloz üreten strainler arasında önemli bir yer tutar (10, 31).

Bakteriyel Selülozun Biosentezi

A. xylinum; selüloz biosentezi, kristalizasyon ve yapısal özelliklerin araştırılmasında model organizma olarak kullanılmıştır (32, 33, 34). Bakteriyel selülozun sentezi, spesifik olarak katalitik ve regülatör protein kompleksleri ve enzimler ile regüle edilen çok basamaklı bir işlemdir (2, 27, 33, 34). Sentez işlemi glukozun selüloz öncülü olan üridin difosfoglukoz (UDPGlc) sentezini takiben β -1,4 glukan zincirine polimerizasyonunu içerir (21, 26, 27). Bitkilerde selüloz, membranda bulunan selüloz sentaz enzimi ile plazma membranında sentezlenirken, *A. xylinum* bakterisinde selüloz sentaz enzimi sitoplazmik membranda bulunur ve selüloz ekstraselüler olarak sentezlenir (2, 34, 35). *Acetobacter xylinum* tarafından sentezlenen selüloz, pentoz fosfat yolu veya Krebs döngüsünün, karbon metabolizmasının son ürünüdür (20, 30, 36). Glukoz, glukokinaz enzimi ile glukoz-6-P'a katalizlenir. Glukoz-6-P, fosfoglukomutaz enzimi ile glukoz- α -1-P'a dönüşür. Glukoz- α -1-P, UDPGlc pirofosforolaz enzimi ile UDPGlc'ye katalizlenir. Bu son enzim (UDPGlc pirofosforolaz), selüloz sentezinde en önemli olan enzimlerden biridir (2, 26, 30, 37). Selüloz sentezlemeyen ve fenotipik olarak (Cel⁻) olan mutant hücrelerde bu enzimin eksik olduğu belirtilmiş ve bu durum deneysel olarak da gözlenmiştir. (37).

Bakteriyel selüloz üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan karbon ve azot kaynaklarıdır (2, 36, 38, 39, 40). Selüloz üretiminde pahalı besi ortamı bileşiklerinin yerine; beyaz kabak suyu, şeker pancarı atığı veya peynir altı suyu gibi ucuz endüstriyel atıklar da kullanılabilirliği belirtilmiş ve bu atıkların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (2, 41, 42, 43). Ayrıca besi ortamına piridoksin, nikotinik asit, p-aminobenzoik asit ve biotin gibi vitaminler eklenerek, bakteriyel selüloz sentezinde etkisi araştırılmıştır (39, 44, 45). Kolin, betain ve yağ asitlerinin (tuzlar ve esterler) de *A. xylinum* strainlerinin selüloz üretimini güçlü bir şekilde stimüle ettiği gösterilmiştir (46).

A. xylinum strainlerinin selüloz üretiminde pH etkisinin analizinde strainler için en iyi pH aralığının türe bağlı olarak 4.0-7.0 olduğu belirtilmiştir (27, 47, 48, 49, 50). Polimer üretiminde pH kadar sıcaklığın da önemi büyüktür. Yapılan araştırmalar sonucunda selülozun polimerizasyon derecesinin (DP) ve su tutma kapasitesinin en iyi olduğu sıcaklığın 28 - 30 °C olduğu gösterilmiştir (50, 51).

Bakteriyel Selülozun Uygulama Alanları

Bakteriyel selüloz, çok iyi mekanik özelliklere sahip olduğundan birinci kalite kâğıt üretiminde kullanılır. Bakteriyel selüloz içerikli kâğıtlar, dolgu ve renk maddesi gibi katkı maddelerini iyi tutabilmeleri yanında aynı zamanda elastik, geçirgen, yırtılmalara-yanmalara dirençli ve suyu emme özelliğine de sahiptirler (2, 52). Tarihi dokümanların tamirinde kullanılan el yapımı kâğıtların fibrillerine az miktarda bakteriyel selüloz ilave edilmesiyle yıpranmaya dirençli bir etki yaratılmış olur (2, 53).

Bakteriyel selülozu % 1 oranında içeren kâğıtlar ISO 9706:1994 standardında yer almaktadır. Ayrıca bakteriyel selülozdan yüzey kaplamada kullanılan kâğıtlar da üretilmiştir. Bu kâğıtlar cilalı, parlak, düzgün ve gözenekli bir görünüme sahiptir. Yüzde 3 oranında bakteriyel selüloz içeren kaplama kâğıtları, % 20 oranında kaplamaya sahip olan rotogravuer kâğıtlarına benzer yüzey direncine ve cila özelliklerine sahiptir (2, 27).

Durgun kültürde üretilen bakteriyel selüloz, yanık bölge üzerinde iyileştirici bir özelliğe de sahiptir (2, 30, 54). Bakteriyel selüloz steril edilebilir, dokuya uyumludur, gözenekli, elastik ve elle tutulması kolaydır, suyu adsorbladığı için belli oranda nem içerir bu da yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar ayrıca yaralı bölgede ikincil enfeksiyonların oluşmasını engeller, yanan bölgedeki ısıyı adsorblayarak acıyı ve ağrıyı azaltır ve dokuda yaranın yayılmasını engeller (54). Hayvansal orijinli ürünlerdeki problemlerden dolayı kollagen kaplayıcılar yerine bakteriyel selüloz içerikli kaplayıcılar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan bakteriyel selüloz ürünleri Xylos Corp. firması tarafından Prima CelTM olarak üretilmektedir. Bu polimer, Rensselaer Polytechnic Institute (USA)'de ülser tedavisinde yara kapatıcı olarak uygulanmıştır. Krystynowicz ve arkadaşları tarafından *A. xylinum*'dan elde edilen selülozun, farelerdeki yaralar üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu da belirtilmiştir (2, 54). Yamanaka ve arkadaşları ortası çukur özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz fibrillerinin suni kan damarları ve üreterler olarak kullanılabilceğini de önermişlerdir (29). Köpeklerde aort ve boyun damarlarının yerine antitrombik özelliğe sahip olan bakteriyel selüloz içeren suni damarlar kullanılmıştır (2, 29, 32).

Bakteriyel selüloz, işlenmiş gıdalarda hiçbir yan etkisi olmayan kalorisiz bir katkı maddesi olarak da kullanılır. Bakteriyel selülozun gıda endüstrisinde ticari olarak ilk kez kullanımı "nata de coco" olarak Filipinlerde kullanılmıştır (56, 57). Nata de coco'nun tüketiminin, bağırsak kanserine, damar sertliğine, koroner damarlardaki kanın pıhtılaşmasına karşı koruyucu etkisinin olduğuna ve idrardaki ani glukoz artışını önlediğine inanılır (56,57).

Bakteriyel selüloz ayrıca tekstil sanayinde suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsortif materyal olarak, kozmetik sanayinde ise kremlerin, toniklerin, tırnak cilalarının emilimini kolaylaştırmada da kullanılır (26, 30).

Türkiye'de Yapılan Bakteriyel Selüloz Çalışmaları

Alma ve Çetin tarafından "Odun Selülozuna Alternatif Bakteriyel Selüloz" başlıklı bir çalışma yapılmış ve bu çalışma II. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur (58). MEF Türkiye lise öğrencileri arası 12. araştırma projeleri yarışmasında sunulmak üzere, Dığrak ve OĖuz tarafından yürütölen "Acetobacter xylinum DA Tarafından Bakteriyel Selüloz Üretimi" başlıklı bir proje çalışması yapılmıştır (59). Esin Poyrazoğlu Çoban tarafından yapılan ve Yrd. Doç. Dr. H.Halil Bıyık danışmanlığında yürütölen "Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi" başlıklı doktora tez çalışması, Türkiye'de bu konuda yapılmış en kapsamlı çalışmalardan biridir (60). Poyrazoğlu ve Bıyık tarafından yapılan ve "Acetobacter pasteurianus HBB6 ve Acetobacter lovaniensis HBB5 Tarafından Yüzey Kültür Fermentasyonu ile Bakteriyel Selüloz Üretimi" ve "Yüzey Kültür Fermentasyonu ve Çalkalamalı Kültür Fermentasyonu ile

Bazı *Acetobacter* Türlerinden Bakteriyel Selüloz Üretimi” başlıklı iki çalışma 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi’nde sunulmuştur (61, 62). Ayrıca Poyrazoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan “*Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 Funguslarından Elde Edilen Selülaz Enzimi ile Bakteriyel Selülozun Hidrolizi” başlıklı bir diğer çalışma da aynı kongrede bildiri olarak sunulmuştur (63). Çakır ve arkadaşları tarafından “Mikrobiyel Selüloz Üretiminde Kullanılan *Gluconacetobacter* spp. suşunun Moleküler Tanısı” başlıklı başka bir çalışma 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi’nde bildiri olarak sunulmuştur (64). Ayrıca Babaç ve arkadaşları tarafından yapılan “Biyobozunur Forma Getirilmiş Bakteri Selülozu Üretimi” başlıklı çalışma da 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi’nde bildiri olarak sunulmuştur (65).

Kaynaklar

1. Brown, A.J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. J.Chem. Soc., 49:432-439.
2. Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. and Kalinowska, H. 2000. Bacterial Cellulose. In: Steinbuchel A (Ed), Biopolymers: Polysaccharides I., Vol.7, pp. 37-90. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany.
3. Drysdale, G. S. and Fleet, G. H. 1988. Acetic Acid Bacteria in Winemaking: A Review. Am. J. Enol. Vitic. 39:2:143-154
4. Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. and Truper, H.G. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". Int. J. Syst. Bacteriol., 38:321-325.
5. De Ley, J., Gillis, M. and Swings, J. 1984. Family *Acetobacteraceae*. pp. 267-268.
6. Beijerinck, M.V. 1898. Ueber die arten der essigbakterien. Zentralblatt für bakteriologie, parasitenkunde, infektionskrankheiten and hygiene 2Abt., 4, pp. 209-216.
7. Asai, T. 1935. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 11:674-708.
8. Urakami, T., Yamaoka, J., Suzuki, K. and Komagata, K. 1989. *Acidomonas* gen. Nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 39:50-55.
9. Yamada, Y., Hoshino, K.I. and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 61:1244-1251.
10. Yamada, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:2225–2227.
11. Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Susono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. Nov., a novel acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. Int. J.Syst. Evol. Microbiol., 52:813-818.
12. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey’s manual of determinative bacteriology. 9th Edition. pp. 71, 84, 103, 107, 117, 126, 142. Williams & Wilkins, Baltimore.
13. Swings, J. 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In Balows, Trüper, Dworkin, Harder and Schleifer (eds), The Procaryotes, 2nd ed., Vol. III, Springer-Verlag, New York, pp. 2268-2286.

14. Hestrin, S., Aschner, M., Mager, J. 1947. Synthesis of cellulose by resting Cells of *Acetobacter xylinum*. *Nature*, 159:64-65.
15. Hestrin, S. and Schramm, M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.*, 58:345.
16. Frauter, J. and Simonart, P. 1952. Etude de la flore bactérienne d'un acétificateur de vinaigre d'alcool. IX Congresso Internazionale Industrie Agrarie, Roma.
17. Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International journal of Food Microbiology*, 74:57-64.
18. Frateur, J. 1950. Essai su la systématique des *Acetobacters*. *La Cellule*, 53: 287-392.
19. Carr, J.G. 1968. Methods for identifying acetic acid bacteria, p. 1-8. In: Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. (ed), *Identification methods for microbiologists*, part B. Academic Pres, London.
20. Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and fuction in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 55:35-58.
21. Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(7),1:93-99.
22. Yoshinaga, F., Tonouchi, N., Watanabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2):219-224.
23. <http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/english/cellulose/index.html>
24. Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, 5:187-200.
25. Yamanaka, S. and Sugiyama, J. 2000. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 7(13),3:213-225.
26. Jonas, R. and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59:101-106.
27. Johnson, D.C. and Neogi, A.N. 1989. Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US Patent, 4863565.
28. Tokoh C.; Takabe K.; Sugiyama J.; Fujita M. 2002. CP/MAS ¹³C NMR and Electron Diffraction Study of Bacterial Cellulose Structure Affected by Cell Wall Polysaccharides. *Cellulose*, 9:351-360.
29. Yamanaka, S., Watanabe, K. and Suzuki, Y. 1990. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. European patent 0396344A2.
30. Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Drynska, E. and Galas, E., 1995. Bacterial cellulose-biosynthesis and application. *Biotechnologia.*, 30:120-132.
31. Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. 1998. *Gluconacetobacter* corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). In *Validation of Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*, List No. 64. *Int. J. Syst Bacteriol.*, 48:327-328.
32. Klemm, D., Schumann, U., Udhardt, U. and Marsch, S. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9):1561-1599.

33. Krystynowicz, A., Galas, E. and Pawlak, E. 1997. Method of bacterial cellulose production. Polish Patent, P-299907.
34. Okamoto, T., Yamano, S., Ikeaga, H. and Nakamura, K. 1994. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42(4): 563-568.
35. Saxena, I.M., Brown, R.M., JR., Fevre, M., Geremia, R.A. and Henrissat, B. 1995. Multidomain architecture of betaglycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J. Bacteriol.*, 177:1419-1424.
36. Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. and Beppu, T. 1996. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(8):1377-1379.
37. Valla, S., Coucheron, D.H., Fjaervik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., Amikam, D. and Benziman, M. 1989. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinus*: complementation of cellulose negative mutant by UDPG pyrophosphorylase structure gene. *Mol. Gen. Genet.*, 217:26-30.
38. Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.*, 75:18-22.
39. Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. and Yoshinaga, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(4):575-579.
40. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1998a. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment Bioeng.*, 85:598-603.
41. Keshki, S. M. A. S., Razeki, T. M. A. and Sameshima, K. 2006. Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses. *African Journal of Biotechnology* 5 (17):1519-1523,
42. Bae, S.O and Shoda, M. 2005. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 67(1): 45-51.
43. Battad-Bernardo, E., McCrindle, S. L., Couperwhite, I., Neilan, B.A. 2004. Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. *FEMS Microbiology Letters* 231 (2), 253–260.
44. Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1995. Increasing of bacterial cellulose production by sulfoguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:2259-2263.
45. Ishikawa, A., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1996b. Production of bacterial cellulose with pyrimidine analogue-resistant strain. Japanese patent, 08000260.
46. Hikawu, S., Hiroshi, T., Takayasu, T., Yoshinaga, F. 1996. Manufacture of bacterial cellulose by addition of cellulose formation stimulators. Japanese patent, 96316922.
47. Galas, E., Krystynowicz, A., Tarabasz-Szymanska, L., Pankiewicz, T. and Rzycka, M. 1999. Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis. *Acta Biotechnol.*, 19:251-260.
48. Hutchens, S.A, León, R.V., O'Neill, H.M., Evans, B.R., 2007. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Letters in Appl. Microb.*, 44:175-180.
49. Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., Tisler, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:986-991.

50. Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G. and Lee, S.J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33: 1-5.
51. Skinner, P.O.N. and Cannon, R.E. 2000. *Acetobacter xylinum*: An inquiry into cellulose biosynthesis. *The American Biology Teacher*, 62:442-444.
52. Iguchi, M., Mitsuhashi, S. and Ichimura, K. 1988. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength. US Patent 4,742,164.
53. Krystynowicz, A., Czaja, W. and Bielecki, S. 1999. Biosynthesis and application of bacterial cellulose. *Zywnosc.*, 3:22-33.
54. Krystynowicz, A., Czaja, W., Pomorski, L., Kolodziejczyk, M. and Bielecki, S. 2000. The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material. 14th Forum for Applied Biotechnology, pp. 213-220. Gent, Belgium, Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent, Proceedings Part I.
55. Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown Jr., R.M. 2006. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27: 145-151.
56. Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech.*, 38:41-47.
57. Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H. and Iguchi, M. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers* 40:137-143.
58. Alma M. H.; Çetin, N. S. 2002. Odun Selülozuna Alternatif Bakteriyel Selüloz, II. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi 15-18 Mayıs, Artvin, pp. 1115-1121.
59. Dığrak, M. ve OĖuz, K. 2003. *Acetobacter xylinum* DA tarafından bakteriyel selüloz üretimi. MEF Türkiye Lise Öğrencileri Arası 12. Araştırma Projeleri Yarışması, 123-132s., İstanbul.
60. Poyrazoğlu Çoban, E., 2007. Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi İle Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellüler Polisakkarit Üretimi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
61. Poyrazoğlu Çoban, E. ve Bıyık, H.H., 2007. *Acetobacter pasteurianus* HBB6 ve *Acetobacter lovaniensis* HBB5 Tarafından Yüzey Kültür Fermentasyonu ile Bakteriyel Selüloz Üretimi. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 28-31 Ekim, Antalya, pp. 37.
62. Poyrazoğlu Çoban, E. ve Bıyık, H.H., 2007. Yüzey Kültür Fermentasyonu ve Çalkalamalı Kültür Fermentasyonu ile Bazı *Acetobacter* Türlerinden Bakteriyel Selüloz Üretimi. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 28-31 Ekim, Antalya, pp. 37.
63. Poyrazoğlu Çoban, E., Koç, Ö., Bıyık, H.H., Metin, K., 2007. *Aspergillus niger* HBF 40 ve *Trichoderma sp.* HBF 110 Funguslarından Elde Edilen Selülaz Enzimi ile Bakteriyel Selülozun Hidrolizi. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 28-31 Ekim, Antalya, pp. 38.
64. Çakır, İ., AkoĖlu, A., Yakar, N., Çakmakçı, M. L., Karahan, A. G. 2007. Mikrobiyel Selüloz Üretiminde Kullanılan *Gluconacetobacter* spp. Suşunun Moleküler Tanısı. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim, Antalya, pp. 389.
65. Babaç C., Kutsal T., Bişkin E., 2007. Biyobozunur Forma Getirilmiş Bakteri Selülozu Üretimi. 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 28-31 Ekim, Antalya, pp. 45.