

**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE  
OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİLAL GİRGİN**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**HAZİRAN 2019**



**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE  
OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hilal GİRĞİN  
(172083101)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT**

**HAZİRAN 2019**

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 172083101 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi HİLAL GİRGİN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Ömer KOZ** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Doç. Dr. Gamze YILDIZ** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Savunma Tarihi :** 24 Haziran 2019

**FBE Müdürü :** **Doç. Dr. Murat ERTAŞ** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi ...../...../.....

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hilal GİRGIN

İmzası :

X X X X X



*Aileme,*

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimde görüşlerinden yararlandığım danışman hocam Prof.Dr.Hamdi ÖĞÜT'e katkı ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma Görevlisi olarak da içinde bulunduğum Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hocalarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardım eden ve manevi desteklerini aldığım arkadaşlarıma minnettarım.

Bugüne kadar hayatımın her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen ve hep daha iyiye yönelmemde beni teşvik eden aileme içtenlikle teşekkür ederim.

172L12 numaralı proje kapsamında tez çalışmasına verdikleri destekten ötürü Bursa Teknik Üniversitesi BAP Birimine teşekkür ederiz.

Haziran 2019

Hilal GİRGIN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	viii
SEMBOLLER .....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY .....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	1
1.2 Hyaluronik Asitin Önemi Ve Uygulamaları Alanları .....	1
1.3 Hyaluronik Asitin Kimyasal Yapısı .....	2
1.4 Hyaluronik Asit Üretim Kaynakları .....	3
1.4.1 Hayvansal dokulardan hyaluronik asit ekstraksiyonu.....	3
1.4.2 Mikrobiyal kaynaklı hyaluronik asit üretimi .....	3
1.4.3 Mikroorganizmaların metabolik mühendisliği.....	4
1.5 Biyosentetik Yolak.....	5
1.6 Bakteri Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretimi İçin Fermantasyon Stratejileri .....	6
1.6.1 Bakteri türü seçimi .....	6
1.6.2 Besiyeri tercihi .....	6
1.6.3 Üretim koşulları .....	6
1.6.3.1 Fermantasyon yöntemleri.....	7
1.6.3.2 pH.....	7
1.6.3.3 Sıcaklık.....	7
1.6.3.4 Çözünmüş oksijen .....	7
1.6.3.5 Karıştırma hızı.....	8
1.7 HA Miktar Analizi .....	8
1.8 Literatür Araştırması .....	8
1.9 Hipotez .....	10
<b>2. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>11</b>
2.1 Materyal .....	11
2.1.1 Bakteri kültürü .....	11
2.1.2 Kimyasallar .....	11
2.1.3 Cihazlar .....	12
2.1.4 Besiyerleri .....	12
2.2 Metod .....	12
2.2.1 Liyofilize bakterinin kültüre alınması.....	12
2.2.2 Bakteri gelişimi için uygun besiyerinin seçimi.....	13
2.2.3 İnokülasyon ortamının hazırlanması.....	13
2.2.4 Biyoreaktörde üretim .....	13



2.2.5 Sıcaklık tolerans limitlerinin belirlenmesi .....	14
2.2.6 <i>S. zooepidemicus</i> suşunda antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi .....	15
2.2.7 HA Üretimi üzerinde etken faktörlerin optimizasyonu.....	15
2.2.7.1 HA üretiminde inokülasyon yoğunluğunun belirlenmesi .....	15
2.2.7.2 HA üretiminde sıcaklık ve pH'ın etkisi .....	15
2.2.8 Karbazol metoduyla HA miktar tayini.....	16
2.2.9 Fermantasyon süresince bakteri sayısının belirlenmesi .....	17
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>18</b>
3.1 Bakteri Gelişimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi .....	18
3.2 Sıcaklık Tolerans Limitlerinin Belirlenmesi .....	19
3.3 <i>S. zooepidemicus</i> Suşunda Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi .....	20
3.4 Fermantasyon Şartlarının Optimizasyonu .....	20
3.4.1 HA üretiminde inokülasyon yoğunluğunun belirlenmesi .....	20
3.4.2 HA üretiminde sıcaklığın etkisi .....	20
3.4.3 HA üretiminde pH etkisi .....	22
3.5 Fermantasyon Süresince Bakteri Sayısının Belirlenmesi.....	23
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>26</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>28</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>29</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>33</b>

## KISALTMALAR

<b>BHI</b>	: Beyin kalp infüzyonu
<b>CDM</b>	: Kimyasal tanımlanmış besiyeri
<b>GAG</b>	: Glikozaminoglikan
<b>HA</b>	: Hyaluronik Asit
<b>kob</b>	: Koloni oluşturan birim
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>sp.</b>	: species
<b>subsp.</b>	: subspecies
<b><i>S. zooepidemicus</i></b>	: <i>Streptococcus zooepidemicus</i>
<b>TSA</b>	: Triptik Soy Agar
<b>TSB</b>	: Triptik Soy Brot

## SEMBOLLER

<b>Da</b>	: Dalton
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>g</b>	: Gram
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Sülfürik asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Potasyum dihidrojen fosfat
<b>L</b>	: Litre
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik dansite
<b>pH</b>	: Asitlik derecesi
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>v/v</b>	: Hacim/hacim
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>°C</b>	: Santigrad
<b>%</b>	: Yüzde

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Kimyasallar.....	11
Çizelge 2.2 : Cihazlar.....	12
Çizelge 2.3 : Fermantasyon besiyeri bileşimi (1 L için).....	14
Çizelge 2.4 : Deney grupları.....	16
Çizelge 3.1 : Antibiyotik duyarlılık testi sonrası zon çap ölçümleri.....	20



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : HA kimyasal yapısı.....	2
Şekil 1.2 : Streptokoklarda hücre büyümesi, HA sentezi ve laktik asit döngüsü arasındaki ilişki.....	5
Şekil 2.1 : HA standart eğrisi.....	17
Şekil 3.1 : BHI agar besiyerinde <i>S. zooepidemicus</i> gelişimi.....	18
Şekil 3.2 : TSA agar besiyerinde <i>S. zooepidemicus</i> gelişimi.....	18
Şekil 3.3 : TSA+Glikoz agar besiyerinde <i>S. zooepidemicus</i> gelişimi.....	19
Şekil 3.4 : TSA+BHI agar besiyerinde <i>S. zooepidemicus</i> gelişimi.....	19
Şekil 3.5 : Farklı sıcaklık değerlerinde HA üretimi.....	21
Şekil 3.6 : Farklı sıcaklık değerlerinde üretilen HA miktarlarının R programında kutu grafiğinde gösterimi.....	21
Şekil 3.7 : Farklı pH değerlerinde HA üretimi.....	22
Şekil 3.8 : Farklı pH değerlerinde üretilen HA miktarlarının R programında kutu grafiğinde gösterimi.....	23
Şekil 3.9 : 32°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.....	23
Şekil 3.10 : 35°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.....	24
Şekil 3.11 : 37°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.....	24
Şekil 3.12 : 40°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.....	24
Şekil 3.13 : Bakteri sayılarına bağlı karbazol yöntemiyle belirlenen HA miktar (mg/200 mL) değişimi.....	25

## ***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ**

### **ÖZET**

Hyaluronik asit (HA) geleneksel olarak kimyasal yollarla horoz ibiği, göbek kordonu gibi hayvansal kaynaklardan saflaştırılmaktayken, bu yöntemlerin kaynakların sınırlı olması, viral enfeksiyon riski taşınması ve HA'nın yıkıcı enzimlerle kontaminasyona maruz kalması gibi sorunlara yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenlerle son yıllarda mikrobiyal fermantasyon yoluyla HA üretimi tercih edilmekte ve protokol geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışma kapsamında HA üretiminde genel üretici olduğu bilinen *Streptococcus zooepidemicus* ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. *S. zooepidemicus* ile HA üretimi üzerinde etkisi olduğu düşünülen pH ve sıcaklık gibi kültür şartları eski protokoller yerine tam kontrollü (oksijen, sıcaklık, pH ve karıştırma) paralel fermentör sistemi kullanılarak farklı değerler uygulanarak denenmiştir. Beş saatlik fermantasyon süresi sonucunda oluşan HA miktarları karbazol yöntemiyle belirlenerek farklı değerlerde uygulanan kültür şartları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Fermantasyonla HA üretimine pH etkisi incelendiğinde HA üretiminin pH 6,5 ve pH 7 değerlerinde pH 7,5 ve pH 8'e göre yüksek olduğu görülmüştür. HA üretimine pH etkisi incelendiğinde pH 6,5, pH 7, pH 7,5 ve pH 8 değerleri arasında HA üretimleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir farkın olmadığı görülmüştür (Duncan Test,  $P>0,05$ ). HA üretimine sıcaklık etkisi incelendiğinde en yüksek HA üretimi 35°C ve 37°C'de elde edilmesine rağmen kullanılan farklı sıcaklık değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (Duncan Test,  $P>0,05$ ). Farklı sıcaklık değerlerinin denendiği gruplar parametrik olmayan test ile de karşılaştırılmıştır, ancak gruplar arasında önemli bir fark tespit edilememiştir (Kruskal Wallis Testi,  $P>0,05$ ). HA üretiminde en az varyasyon 32°C ve 35°C sıcaklıklarında gözlemlenmiştir. En yüksek HA üretimi 37°C sıcaklıkta ve pH 6,5'te olmuştur. Fermantasyon boyunca her saatte numune alınıp bakteri sayıları izlenerek farklı pH ve sıcaklık değerlerinde bakteri sayısı değişimi karşılaştırılmıştır. Her bir deney grubunda fermantasyon ortamındaki bakteri sayısı arttıkça oluşan HA miktarının da arttığı belirlenmiştir. Deney grupları incelendiğinde bakteri sayısı artışının en yüksek 37°C sıcaklıkta ve pH 7'de olduğu görülmüştür. Ön fermantasyon aşamasının incelendiği bu çalışmada farklı pH ve sıcaklık değerlerinde HA miktarındaki eğilim belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hyaluronik Asit, Fermantasyon, *Streptococcus zooepidemicus*

## OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS IN HYALURONIC ACID PRODUCTION USING *Streptococcus zooepidemicus*

### SUMMARY

While hyaluronic acid (HA) is traditionally purified from animal sources such as cockbones, umbilical cord by chemical means, these methods are known to cause problems such as limited resources, risk of viral infection, and contamination of HA with destructive enzymes. For these reasons, HA production is preferred by microbial fermentation and protocol development studies are still going on. Within the scope of this study, studies were carried out with *Streptococcus zooepidemicus*, which is known to be general producer in HA production. The culture conditions such as pH and temperature, which are thought to have an effect on the production of HA with *S. zooepidemicus*, have been tested by applying different values using a fully controlled (oxygen, temperature, pH and mixing) parallel fermenter system instead of the old protocols. The amount of HA formed as a result of the five hour fermentation period was determined by the carbazole method and the different culture conditions were compared. When the pH effect of HA production by fermentation was examined, HA production was found to be higher than pH 7,5 and pH 8 in pH 6,5 and pH 7. When pH effect was examined for HA production, it was seen that there was no statistically any difference between the pH 6,5, pH 7, pH 7,5 and pH 8 in terms of HA production (Duncan Test,  $P>0,05$ ). When the temperature effect of HA production was examined, although the highest HA production was obtained at 35°C and 37°C, no statistical difference was found amongst the different temperature values used (Duncan Test,  $P>0,05$ ). Groups with different temperature values were also compared with the nonparametric test, but there was no significant difference between the groups (Kruskal Wallis Test,  $P> 005$ ). The lowest variation in HA production was observed at 32°C and 35°C. The highest HA production was at 37°C and pH 6,5. Bacterial count changes in different pH and temperature values were compared by taking samples at every hour during fermentation. In each experimental group, it was determined that as the number of bacteria in fermentation environment increases, the amount of formed HA increased. When the experimental groups were examined, it was observed that the number of bacteria increased at the highest 37°C and pH 7. In this study where pre-fermentation stage was examined, the trend of HA in different pH and temperature values were determined.

**Keywords:** Hyaluronic Acid, Fermentation, *Streptococcus zooepidemicus*

## 1. GİRİŞ

### 1.1 Tezin Amacı

Yaygın kullanımı nedeniyle, hyaluronik asit ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Ticari değeri yüksek olan HA'nın yaklaşık bir milyar dolarlık bir pazar hacmine sahip olduğu bilinmektedir (Chong ve diğ, 2005). Bir kilogram HA'nın değeri, uygulama alanına bağlı olarak 2.000 ila 60.000 ABD Doları arasında değişmektedir (Pires ve Santana, 2010). Yüksek kullanım potansiyeline sahip olmasına rağmen, üretimden kaynaklanan zorluklar nedeniyle tüketici fiyatı yüksektir.

Bu çalışmada HA üretiminde genel üretici olduğu bilinen *S. zooepidemicus* ile HA üretimi üzerinde etkisi olduğu düşünülen pH ve sıcaklık gibi kültür şartlarının eski protokoller yerine tam kontrollü (oksijen, sıcaklık, pH ve karıştırma) paralel fermentör sistemi kullanılarak optimizasyonun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

### 1.2 Hyaluronik Asitin Önemi Ve Uygulamaları Alanları

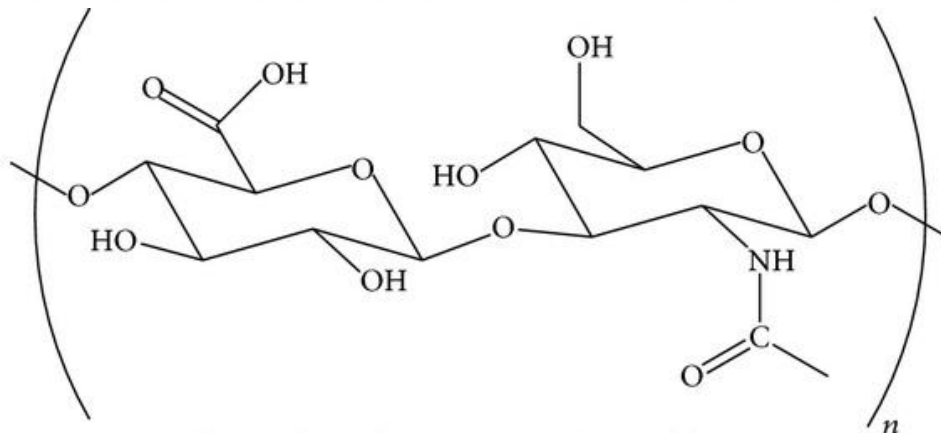
Hyaluronik asit bazlı biyomalzemelerin sentezlenme ve işlenme değişkenliği nedeniyle HA çok çeşitli uygulamalarda kullanılır. HA ilk ticari olarak 1942'de Endre Balazs tarafından unlu mamullerde yumurta akı yerine kullanılması için patent başvurusu yaptığında kullanıldı (Necas ve diğ, 2008). HA'nın her dokuda farklı işlevleri vardır. Eklemlerdeki sinovyal sıvıdaki HA, viskoelastisitesi ve yüksek oranda hidratlanmış matris oluşturma kabiliyeti nedeniyle liyofilizasyon ve tamponlama işlevlerine sahiptir (Greenberg ve diğ, 2006). Osteoartrozdaki HA, eklem kıkırdağının mekanik özelliklerini belirlemede rol oynayarak sinovyal sıvı ile kıkırdak arasındaki metabolik değişimi düzenler. HA eklem çevresindeki ağırları azaltır ve eklem hareketliliğini korumaya yardımcı olur (Frizziero ve diğ, 1998). HA'nın ilk tıbbi uygulaması, 1950'lerin sonunda göz cerrahında kullanılmasıydı. Hyaluronik asit, gözün vitröz sıvısında yer alan en önemli maddelerden biridir ve viskoelastik özellikleri nedeniyle özellikle oftalmolojideki bozuklukların tedavisinde kullanılır.



HA, katarakt cerrahisinde destekleyici materyal veya vitröz sıvı kaybolduğunda göz içi lens implantasyonunda kullanılır (Balazs ve diğ, 1972). Deri ve yumuşak bağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunan HA, antioksidan özelliğe sahiptir ve hücre dışı matrisin promotin yapısal bütünlüğü ile yaraların iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır (Moseley ve diğ, 2003).

### 1.3 Hyaluronik Asitin Kimyasal Yapısı

Hyaluronik asit ilk kez 1934 yılında Karl Meyer ve John Palmer tarafından sıgır göz içi sıvısında izole edilmiştir ve kimyasal yapısı laboratuvarında yapılan çalışmalar sonucunda 1950 li yıllarda açıklanmıştır (Meyer ve Palmer, 1934). HA, beta-1,4 ve beta-1,3 glikozidik bağları ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetil glukozamin disakkarit birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan glikozaminoglikanlara (GAG) aittir (Şekil 1.1) (Chong, 2005; Boeriu, 2013). HA'nın moleküler ağırlıkları kaynaklara göre değişkendir ve  $10^7$  Da'ya ulaşabilir (Kogan ve diğ, 2007). HA, hücrelerden bir polipeptide bağlanmamış lineer polimer olarak sentezlenir ve salgılanır. Bu özellik sayesinde mikrobiyal fermantasyon teknikleriyle üretilen HA genetik mühendislik yaklaşımlarında kullanılmaktadır (Rodell ve diğ, 2015).



Şekil 1.1 : HA kimyasal yapısı.

Çoğu glikozaminoglikanlar golgi içinde sentezlenip proteinlere bağlanırken, HA proteinlere kovalent olarak bağlanmadığından ve sülfatlanmadığından GAG'lar arasında eşsiz bir yere sahiptir (Boeriu ve diğ, 2013).

HA makromeri üzerindeki reaktif grup sayısının kimyasal olarak değiştirilmesi, HA'nın viskoelastik çözeltiler, esnek tabakalar, elektrospun lifleri ve hidrojeller gibi farklı formlarda varlığına yol açar (Burdick ve Prestwich, 2011).

HA'nın biyobozunur, biyouyumlu, immünojeniklik ve toksisite eksikliği, spesifik sinyal iletimi ile yara onarımı, viskoelastisite, su tutma, biyouyumluluk, hücre çoğalması, morfogenez gibi çok değerli fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Toole, 1981).

HA'nın moleküler ağırlığı; reolojik özellikleri, fizyolojik fonksiyonların belirlenmesi ve uygulama alanları açısından, önemli bir parametredir. HA'nın yüksek moleküler ağırlıkta olması; viskoelastik özelliğini, nem tutma kabiliyetini artırmaktadır. Bu özellik HA'nın oftalmoloji, ortopedi, kozmetik gibi alanlarda tercih edilen bir malzeme olmasını sağlamaktadır (Armstrong ve Johns, 1997).

#### **1.4 Hyaluronik Asit Üretim Kaynakları**

Hyaluronik asitin endüstriyel üretimi esas olarak üç prosese dayanmaktadır. Bu prosesler; hayvansal dokulardan ekstraksiyon, bakteri suşları kullanarak mikrobiyal fermantasyon ve mikroorganizmaların metabolik mühendisliği olarak gruplandırılır (Boeriu ve diğ., 2013).

##### **1.4.1 Hayvansal dokulardan hyaluronik asit ekstraksiyonu**

HA, hemen hemen tüm omurgalı dokularında, özellikle yumuşak bağ dokularında hücre dışı matrikslerde bulunabilir (Fraser ve Laurent, 2007). İnsan vücudunda HA doğal olarak üretilir, hyaluronat tuzu formunda bulunur. İnsan vücudundaki HA'nın %50'si ciltte hem epidermiste hem de dermiste bulunur (Erickson ve Stern, 2012).

HA insan vücudunda ayrıca göbek kordonunda (Hadidian ve Pirie, 1948), hyalin kıkırdakta (Hascall ve Heinegård, 1974), sinoviyal sıvıda (Engström-Laurent, 1997) ve gözü çevreleyen vitröz sıvıda (Brewton ve Mayne, 1992) yüksek konsantrasyonlarda bulunur. HA ayrıca sığır sulu mizahından ve domuz gözlerinin vitröz mizahından, horoz taraklarından, tümör sıvısından izole edilir (Hadidian ve Pirie, 1948).

##### **1.4.2 Mikrobiyal kaynaklı hyaluronik asit üretimi**

Hyaluronik asit geleneksel olarak hayvansal kaynaklardan elde edilebilirken bu üretim yönteminin, yüksek saflıkta ve yüksek molekül ağırlığında HA eldesinin maliyetli ve zor olduğu bilinmektedir. Kaynakların sınırlı olması, HA'nın yıkıcı

enzimlerle kirlenmesine maruz kalması ve viral enfeksiyon riski karşılaşılan zorluklara örnek olarak gösterilebilir (MacLennan, 2009; Liu, 2011).

1980'lerin başından itibaren HA mikroorganizmalardan fermantasyon yoluyla üretilmektedir. (Yamada ve Kawasaki, 2005). Fermantasyon yoluyla endüstriyel ölçekte mikrobiyal HA üretimi ilk olarak 1980'lerde Shiseido tarafından gerçekleştirildi (Akasaka ve diğ,1989). Bu yöntemde ana üretici mikroorganizma grubu olarak *Streptococcus* suşları kullanılmaktadır. Streptokoklar gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob mikroorganizmalardır (Reddy ve Karunakaran, 2013). Lancefield A ve C grubu streptokoklar, HA'nın endüstriyel üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalardır ve bu mikroorganizmalarda hyaluronik asit hücre dışı kapsül olarak sentezlenir. Bakteriler kendilerini çevreleyen kalın HA tabakası sayesinde konakçılarının savunma sisteminden gizlenirler, aynı zamanda epitelyal tabakalardan dokulara geçiş için HA'yı kullanabilirler ki bu da bakterilerin patojenite seviyesinin neden yüksek olduğunu açıklar (Yamada ve Kawasaki, 2005).

*Streptococcus equisimilis* (hayvan patojeni), *Streptococcus uberis* (sığırlarda görülen patojen), *Streptococcus pyogenes* (insan patojeni) gibi çeşitli yabancıl tip Streptokoklar HA üretebilir. *Streptococcus zooepidemicus* gram pozitif Lancefield C grubu streptokoklardandır. İnsan, kümes hayvanları, domuz, keçi ve sığırlarda görülmesinin yanında genellikle atların üst solunum yollarında görülen bir patojen olarak bilinmektedir (Timoney ve diğ, 1988).

Bakteriyel patojen olarak bilinen *Pasteurella multocida* gram negatif kokobasildir. *Pasteurella multocida* HA zincirleri üretilip salgılayabilmektedir (Oliveira, 2016). pmHAS geni tarafından HA zincirini polimerize eden HAS enzimini kodlanır (DeAngelis, 1999). HA, *Pasteurella multocida* suşlarının kapsülünde bulunur (Chung, ve diğ, 1998).

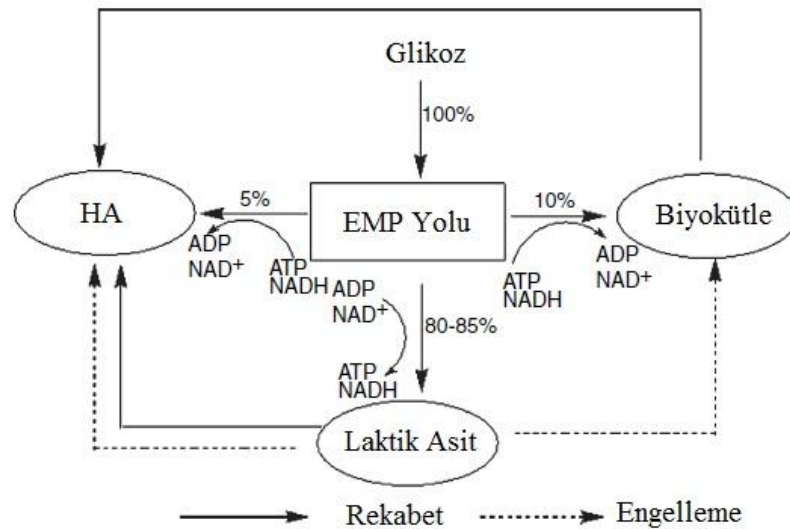
### **1.4.3 Mikroorganizmaların metabolik mühendisliği**

Metabolik akı analizi ve metabolik kontrol analizi gibi metabolik mühendislik araçları ile HA verimini ve moleküler ağırlığını artırmak için stratejiler geliştirilebilir (Liu ve diğ, 2011). Yüksek moleküler ağırlıkta HA üreten suşların geliştirilmesi amacıyla rastgele mutageneze başvurulmuş çalışmalar yapılmıştır (Stangohl, 2000, 2003).

## 1.5 Biyosentetik Yolak

*Streptococcus*'taki *has* operonunun ekspresyonu HA sentezinden sorumludur. *hasA*, *hasB* ve *hasC* genleri *has* operonu üzerinde bulunur. Hyaluronat sentaz, UDP-glikoz dehidrojenaz ve UDP-glikoz pirofosforilaz enzimleri sırasıyla bu genler tarafından kodlanır (Yamada ve Kawasaki, 2005). Streptokoklar laktik asit bakterileridir, şeker kaynağının %90'ı bazı durumlarda homolaktik fermantasyonla laktata dönüştürülürken (anaerobik koşullar), karışık asit fermantasyonuyla format, asetat ve etanol üretir. Hyaluronik asit sentezinde kullanılan öncüler aynı zamanda hücre kuru ağırlığının %20'sini oluşturan peptidoglikan, teikoik asit ve antijenik duvar polisakkaritlerinin oluşumu için yapısal bileşenlerini sağlayarak hücre büyümesinde de görev alır. Bu yüzden HA sentezi ve hücre büyümesi arasında bir rekabet söz konusudur (Chong, 2005; Pires, 2010). Buna ek olarak glikoliz evresi ve HA sentezi için de aynı karbon akışı için rekabete girmektedir, Şekil 1.2'de şematik olarak gösterilmiştir (Liu ve diğ, 2008b). Karbon akışı yönünün, hücre büyümesi ve laktik asit sentezi yönünde bastırılarak HA sentezi yönüne çevrilmesiyle üretilen HA miktarı artacaktır (Liu ve diğ, 2011).

Mikroorganizmaların metabolizmalarında reaksiyon akış yönü kültür koşullarına göre değişebilir. Mikroorganizmadaki metabolik değişimlerin incelenip anlaşılması ve buna göre kültür koşullarının geliştirilmesi HA üretiminin artırılmasını sağlayacaktır (Pires ve Santana, 2010).



**Şekil 1.2** : Streptokoklarda hücre büyümesi, HA sentezi ve laktik asit döngüsü arasındaki ilişki.

## 1.6 Bakteri Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretimi İçin Fermantasyon Stratejileri

Mikrobiyal HA üretimi için uygun bakteri seçimi, hücre gelişimi için gerekli olan besiyerinin mevcut bakteri için optimizasyonu ve üretim koşullarının optimizasyonu oldukça önemlidir. Fermantasyon ile hyaluronik asit üretimi mekanizmasal olarak ortaya konmuş ve üretimi etkileyen faktörlerle ilgili çeşitli suşlarla yapılan çalışmalarda incelenip rapor edilmiştir. Fermantasyonla HA üretiminde Grup A streptokoklarla yapılan ilk çalışmalarda elde edilen HA miktarı 60–140 mg/L elde edilmekteydi (Kendall ve diğ, 1937). Otuz yıl içerisinde ise fermantasyon yoluyla üretilen HA miktarı 300-400 mg/L'den 6-7 g/L'ye çıkmıştır (Holmström, 1967; Kim, 1996).

### 1.6.1 Bakteri türü seçimi

Mikrobiyal fermantasyonla HA üretiminde ana üretici mikroorganizma grubu olarak *Streptococcus sp.* kullanılmaktadır. Streptokoklar arasında HA üretiminde en çok kullanılan türler *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ve *Streptococcus pyogenes*'tir (Oliveira ve diğ, 2016).

### 1.6.2 Besiyeri tercihi

HA üretimi için fermantasyon ortamının bileşimi genel olarak hem Streptokok'ların doğru oranlarda büyüyüp gelişebilmesi için uygun olmalıdır hem de HA sentezi için gerekli temel bileşimlerden oluşmalıdır. Streptokokların büyümesi için gerekli olan beslenme ortamı kompleks besin içeriğinden oluşmaktadır (Chong, 2005; Armstrong, 1997). HA elde etmek için kültür ortamı karbon kaynağı, azot kaynağı, inorganik tuzlar gibi eser elementler içermelidir (Hosoya ve diğ, 1991). Karbon kaynağı olarak şeker içeren kaynak tercih edilir. En çok tercih edilen şeker kaynağı glikoz iken bunun yanısıra sükroz, galaktoz, fruktoz da kullanılabilir. Kullanılan azot kaynaklarına örnek olarak maya ekstraktı, pepton, tripton örnek verilebilir (Park ve diğ, 1996).

### 1.6.3 Üretim koşulları

HA üretimi için uygun bir fermantasyon stratejisi geliştirme ekonomik bir fermantasyon süreci için önem taşımaktadır. Bu geliştirme, kültür koşullarının optimizasyonu ve proses sürecinin işletilmesi ile gerçekleşecektir. Üretim

koşullarının optimizasyonu, HA moleküler ağırlığını yükselterek verimi artıracak ve maliyetin düşmesini sağlayacaktır (Chen ve diğ, 2009).

### **1.6.3.1 Fermantasyon yöntemleri**

Biyoteknolojik çalışmalarda fermantasyon çalışmaları kesikli, kesikli beslemeli, sürekli yöntemlerle yürütülmektedir (Li ve diğ, 2011). Kesikli proses, fermantasyon için gerekli malzemelerin reaktöre aseptik koşullarda yüklendiği ve fermantasyon boyunca sistemde besleme yada ürün uzaklaştırmanın yapılmadığı kısmen kapalı bir sistemi ifade eder (Cinar ve diğ, 2003). Kesikli proseste biyoreaktöre fermantasyon besiyeri doldurulup hücre aşılandıktan sonra hücre yoğunluğu ve ürün miktarı belli değerlere ulaştığında fermantasyon boyunca sistemde besleme yada ürün uzaklaştırma yapılmaz (Cinar ve diğ, 2003).

### **1.6.3.2 pH**

Mikroorganizmalar, çoğalacakları ortamdaki hidrojen iyonlarına karşı çok hassastır. Fermantasyonla HA üretimi sırasında pH değerinde düşüş meydana gelmektedir. Bu durum; üretim esnasında çoğunlukla laktik asitten oluşan karboksilik asitlerin ortamda birikmesinden kaynaklanmaktadır. Ortamdaki pH değerinin azalması, mikrobiyal biyokütlenin ve HA üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. pH değerinin ayarlanması için yapılacak müdahalelerle HA üretimi artırılabilir (Lu, 2016; Liu, 2011).

### **1.6.3.3 Sıcaklık**

Mikroorganizmalar, biyoproses sırasında belirli bir sıcaklık aralığında büyür. Optimum sıcaklık belirlendiğinde enzimlerin en yüksek oranda çalışmasından dolayı mikroorganizmaların maksimum büyümesi sağlanır. Maksimum büyüme çoğu zaman maksimum üretim anlamına gelse de deneysel olarak çalışılıp tam kontrollü deneylerle ortaya konması gerekmektedir (Liu ve diğ, 2018).

### **1.6.3.4 Çözünmüş oksijen**

Fermantasyon ortamı heterojen, viskoz bir karışım olduğu için kültürün gelişimi ve HA üretimi için ihtiyaç duyduğu oksijeni alması zorlaşmaktadır. Bu yüzden fermantasyon ortamında hücre içine oksijen alınması ve hücreler arası oksijen transferi arasındaki ilişkilere odaklanarak süreç yürütülmelidir (Duan ve diğ, 2008).

### 1.6.3.5 Karıştırma hızı

Mikrobiyal fermantasyonla HA üretimi viskoz bir işlem olduğu için fermantasyon ortamının karıştırılması HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Karıştırma hızının yüksek olduğu durumlar, ortamdaki hücrelerin parçalanmasıyla sonuçlanabilir, bunun sonucunda da HA üretimi düşmektedir (Hasegawa ve diğ, 1999).

### 1.7 HA Miktar Analizi

HA miktar analizinde en bilinen yöntem Biter ve Muir (1962) tarafından belirlenen karbazol yöntemidir. Bu metot, karbonhidratların H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HCl ile muamele edilip karbazol ile tepkimeye girecek maddelerin renk vermesi esasına dayanır (Cesaretti ve diğ, 2003).

### 1.8 Literatür Araştırması

Üretim maliyetlerinin düşürülmesi amacıyla bu kaynakların yerine organik atıkların kullanıldığı çalışmalar da vardır (Vázquez ve diğ, 2010). Karbon kaynağı olarak nişasta içeren özel serum ortamının kullandığı bir çalışmada HA konsantrasyonu 6,7 g/L'ye ulaşmıştır (Zhang ve diğ, 2006).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde kesikli kültür çalışmasında, yarı kesikli yada sürekli proseslere göre en yüksek düzeydeki verimliliğin elde edildiği belirtilmiştir (Liu ve diğ, 2008a).

*S. zooepidemicus* ile gerçekleştirilen bir çalışmada kesikli kültür ve yarı kesikli prosesin kombinasyonu ile HA üretiminin %32 oranında arttığı belirlenmiştir. Hücre büyümesinin inhibe edilmesi azalmış ve sükrozun HA'ya dönüşümü artmıştır (Liu ve diğ, 2008c).

pH etkisinin *S. zooepidemicus* mikroorganizmasının gelişmesine ve hyaluronik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda optimum pH değerinin 7,0 olduğu belirlenmiştir (Johns, 1994; Kim, 1996).

*S. zooepidemicus* ile yapılan diğer bir çalışmada anaerobik koşullarda ayarlandığında HA üretim hızı ve verimi açısından optimum pH değerinin 6,7±0,2 olduğu belirlenmiştir (Johns ve diğ, 1994).

*S. zooepidemicus* ile yapılan diğer bir çalışmada pH 6,0 ve pH 7,9 aralığında pH değeri arttıķa HA üretiminin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır (Akasaka ve diğ, 1988).

*S. zooepidemicus* (WSH-24) ile alkali koşullarda HA üretiminin incelendiği bir çalışmada kesikli fermantasyon yöntemi uygulanmış ve 7 L hacimli biyoreaktör kullanılarak 4 L fermantasyon ortamında gerçekleştirilen çalışmada pH 7'de 6 saat tutulmuş daha sonra 1 saat süreyle pH 8,5'e çıkarılıp pH 7'ye getirilip fermantasyon tamamlanmıştır. Bunun sonucunda alkali şartlar altında HA üretiminin 5 g/L'den 6,5 g/L'ye çıktığı rapor edilmiştir (Liu ve diğ, 2008b).

*S. zooepidemicus* (ATTC 39920) ile 4,5 L biyoreaktörde gerçekleştirilen bir çalışmada, pH kontrolü yapılmayan fermantasyon ortamında pH değerinin 4.9 değerlerine düştüğü ve bu düşüşün mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. pH kontrolü yapılan fermantasyon ortamında pH 8'e ayarlanarak 2,825 g/L HA elde edilmiştir (Pan ve diğ, 2017).

Sıcaklığın HA retimi üzerindeki etkisini araştırmak için *S. zooepidemicus* ATCC 39920 kullanılarak 25 mL erlen ölçeğinde gerçekleştirdikleri çalışmada, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı olarak olarak 3 parametre, 3 düzeyde ve 3 tekrarlı olarak çalıştırılmıştır. Sıcaklık 34°C, 37°C ve 40°C değerlerinde tutulup fermantasyon sonucunda sıcaklık 34°C'den 40°C'ye yükseltildiğinde üretim miktarının azaldığı saptanmış ve optimum sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonucunda 0,787 g/L HA elde edilmiştir (Pan vd., 2015).

*S. zooepidemicus* kullanılarak 3.7 L fermentörde 2.5 L fermantasyon hacminde bir çalışma yapılmış ve sıcaklık değeri 37°C'den 30°C'ye düşürüldüğünde bakteri büyüme hızının düştüğü belirtilmiştir (Jagannath ve Ramachandran, 2010).

Oksijen transferinin HA retiminde önemli rol aldığı bilinmektedir. *S. zooepidemicus* (ATCC 39920) ile yapılan bir çalışmada çözünmüş oksijen miktarının ve karıştırmanın HA retimindeki etkisini incelemişlerdir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun kritik değerinin %5 olduğu belirlenmiş ve HA üretiminin bu değerin altında olumsuz etkilendiği rapor edilmiştir (Oliveira ve diğ, 2016). Daha sonra 3 L fermentörde 2 L alışma hacminde gerçekleştirilen bir çalışmada çözünmüş oksijen konsantrasyonu %50 olduğunda HA üretiminin maksimum seviyeye ulaştığı grlmştir. Aynı çalışmada karıştırmanın oksijen absorpsiyonunu artırdığını fakat HA retim miktarını etkilemediği grlmştir (Huang ve diğ, 2006).



*S. zooepidemicus* (ATCC 39920) suşu kullanılarak 3.7 L'lik fermentörde 2.5 L çalışma hacminde gerçekleştirilen ve çözülmüş oksijen seviyesinin %30 doygunlukta tutulduğu bir çalışmada biyokütle veriminin %25 ve HA veriminin %13 arttığı belirlenmiştir (Jagannath ve Ramachandran, 2010).

Aerobik ve anaerobik koşullar altında yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında aerobik koşullardaki kültürden elde edilen HA'nın daha büyük moleküler ağırlığa sahip olduğu belirtilmiştir (Johns, 1994; Armstrong, 1997). Aerobik şartlarda çalışıldığında glikoz kullanımı, hücrelerin büyüme hızının ve HA verim ve moleküler ağırlığının arttığı rapor edilmiştir (Oliveira ve diğ., 2013).

*S. zooepidemicus* kullanılarak biyoreaktörde 2.5 L fermantasyon hacminde yapılan bir çalışmada sıcaklık değeri 37°C'den 30°C'ye düşürüldüğünde bakteri büyüme hızının düştüğü belirtilmiştir (Jagannath ve Ramachandran, 2010).

## **1.9 Hipotez**

Biyoreaktörde gerçekleştirilecek olan *S. zooepidemicus* ile HA fermantasyonunda farklı sıcaklıklar ve farklı pH değerleri arasında HA üretimi açısından fark vardır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bakteri kültürü

Bu çalışmada HA üretiminin incelenmesi amacıyla *Streptococcus zooepidemicus* türü kullanıldı. Tez çalışmasında kullanılacak olan *S. zooepidemicus* suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Liyofilize halde temin edilen suş aktive edilene kadar +4°C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

#### 2.1.2 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Kimyasallar.

Malzeme	Marka	Katalog Numarası
Glikoz	Applichem	A1422
Maya özütü	Merck	1.03753.0500
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck	1.04873.1000
Magnezyum sülfat hepta hidrat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck	1.05886.0500
Gliserol	Sigma	G2025
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck	1.37041
Hidroklorik asit (HCl)	Merck	1.09058
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	1.06404.1000
Beyin kalp infüzyon agar	Merck	1.13825.0500
Beyin kalp infüzyon brot	Merck	1.104.930.500
Sülfirik asit (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck	M112080
Triptik soy agar	Merck	1.054.580.500
Triptik soy brot	Merck	1.054.590.500
Etil Alkol	ISOLAB	920.027
Antibiyogram disk	Liofilchem	95290
Sodyum dodesil sülfat	Sigma	71725
Sodyumtetraborat	Sigma	221732
Karbazol	Sigma	C5132

### 2.1.3 Cihazlar

Araştırmada kullanılan cihazlar Çizelge 2.2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2 : Cihazlar.**

Cihaz Adı	Marka	Model
Manyetik Karıştırıcı(Isıtcılı)	Stuart	US152
Vorteks Karıştırıcı	Stuart	SA8
Terazi (Analitik)	Ohaus	AX224
Santrifüj (Soğutmalı)	Beckman Coulter	Allegra X30R
Mikroplaka Okuyucu	Biotek	Epoch
Otomatik Pipet Seti	Thermo Scientific	Finnpipette FLP Kit 4
Pipet Tabancası	Thermo Scientific	S1 Pipet
Etüv	MMM Medcenter	INCUCCELL55
Su Banyosu (Çalkamalı)	VWR	462-0494
Otoklav	Hirayama	HV-85L
Biyogüvenlik Kabini	Thermo scientific	SAFE 2020/CLASSII
UV Lambalı Saf Su Cihazı	Millipore	Direct-Q 3 UV
Densitometre	BIOSAN	DEN-1B
Biyoreaktör Sistemi	TRL Instruments	TRL-BIO
Azot tüpü	Ozoto	EGN1046
Hava Kompresörü	Puma	PDN-30-1M
İnkübatör (Çalkalamalı)	Mipro	MCİ 120
İnkübatör (Soğutmalı)	Mipro	MSİ 250

### 2.1.4 Besiyerleri

Streptokok suşunun aktivasyonu, saklanıp muhafazası ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi süreçlerinde çeşitli besiyerleri kullanılmıştır. Bakterinin aktivasyonu için Beyin Kalp İnfüzyon brot besiyeri (BHI) (Merck), Triptik Soy brot besiyeri (TSB) (Merck), serum fizyolojik su kullanılmıştır.

Bakterinin en iyi gelişim göstereceği besiyerinin seçimi için Beyin Kalp İnfüzyon agar (BHI) (Merck), Triptik Soy agar (TSA) (Merck), TSA+BHI agar, TSA+Glikoz agar besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için BHI agar (BHI) (Merck) kullanılmıştır.

## 2.2 Metod

### 2.2.1 Liyofilize bakterinin kültüre alınması

Çalışma kapsamında kullanılan bakteri suş açma protokolüne uygun olarak açıldıktan sonra liyofilize haldeki bakteri aseptik koşullarda hazırlanan BHI brot sıvı besiyerine aktarılmıştır. Kültür inkübatörde 30°C'de 24 saat bekletilip canlandırılması

sağlanmıştır. Canlandırılan bakteri kültüründen steril platin öze yardımıyla alınıp petri kaplarındaki BHI agar katı besiyeri ortamına transfer edildi. 30°C'de 24 saat bekletilip bakterinin canlılığını devam ettirip çoğalması sağlandı. Daha sonra santrifüj tüplerine 1 mL BHI brot aktarılıp içerisine sıvı bakteri kültüründen ve katı besiyeri üzerinde üreyen bakteri kolonisinden alınıp transfer edildi. Gliserol çözeltisi de eklendikten sonra bakteri kültürleri -80°C'de buzdolabında stoklandı.

HA üretimi çalışmalarında kullanılacak olan bakteri ayda bir pasajlanarak -80°C'de buzdolabında saklandı.

### **2.2.2 Bakteri gelişimi için uygun besiyerinin seçimi**

Canlandırma işlemlerinden sonra muhafaza edilen bakteri kültürünün en iyi gelişim göstereceği besiyeri ortamını bulmak için farklı besiyerleri ve bileşimler kullanılmıştır. BHI agar ve TSA agar hazırlanmıştır. TSA+Glikoz agar için TSB agar hazırlanırken içerisine glikoz ilavesi yapılmıştır. 1 L olarak hazırlanan TSA+Glikoz agar için %4 TSA agar ve %0,15 Glikoz birleştirilmiştir. TSA+BHI agar besiyeri için TSA agar ve BHI agar sırasıyla %4 ve %5,2 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **2.2.3 İnokülasyon ortamının hazırlanması**

İnokülasyon ortamı 100 mL'lik erlende 25 mL BHI sıvı besiyeri olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan inokülasyon ortamı otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. BHI agar üzerinde gelişen bakteri kültüründen steril platin öze yardımıyla tek koloni alınıp erlen içerisine transfer edilmiştir. Çalkalayıcılı inkübatörde 27°C, 150 rpm'de 24 saatte inkübasyona tabii tutulmuştur. Bu süreç sonunda MacFarland yöntemine göre (BIOSAN, DEN-1B) ortalama bakterilerin  $10^8$  kob/mL seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir.

### **2.2.4 Biyoreaktörde üretim**

Konsantrasyonları belirli, kimyasal tanımlanmış besiyeri (CDM) ortamı içerisinde glikoz, vitaminler, eser elementler, aminoasitler bulunmalıdır. (Chong, 2005; Armstrong, 1997). Bu nedenle, *S. zooepidemicus* suşu ile HA üretimi için fermantasyonda kullanılan besiyerinin seçimi (Armstrong, 1997) ve (Pan, 2015) bulguları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.3). Glikoz ve  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ayrı ayrı otoklavlanmıştır. Steril edilen bu iki malzeme daha sonra besiyeri

bileşimine katılmıştır. Bunun sebebi besiyeri ortamında yüksek sıcaklıkta karamelize olma tehlikesine karşı besiyeri ortamını korumaktır.

**Çizelge 2.3 : Fermantasyon besiyeri bileşimi (1 L için).**

Malzeme	Çalışılan Miktar
Glikoz	20 g/L
Maya ekstratı	10 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g/L
NaCl	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g/L

Steril fermantasyon besiyeri (200 mL) biyogüvenlik kabini içerisinde steril biyoreaktöre aktarılmıştır. Çözünmüş oksijen ve pH problemleri etil alkole maruz bırakılmış ve steril saf suyla durulandıktan sonra biyoreaktöre yerleştirilmiştir. Fermantasyon yöntemi olarak kesikli yöntem uygulandı. Biyoproseste hava beslemesi, pH kontrolü için asit/baz eklemesi veya reaksiyonlar sonucu oluşabilecek köpüklenmeler biyoreaktör sisteminde kontrol altında tutuldu. Kesikli fermantasyon ortamı 32°C, 35°C, 37°C ve 40°C sıcaklık değerlerinde ve pH 6,5, pH 7, pH 7,5 ve pH 8 değerlerinde çaprazlama olarak çalıştırılmıştır. Fermantasyon biyomühendislik laboratuvarlarındaki dörtlü fermentör sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.5 Sıcaklık tolerans limitlerinin belirlenmesi**

Fermantasyon bitiminde izleyen çalışmalar için fermentörlerin içerisindeki kültür sıvısının sterilizasyonu gerekmektedir. Önceki çalışmadan kalan kültür ortamındaki aktif/canlı *S. zooepidemicus*'lerin inaktif olması için gerekli olan üst sıcaklık limiti tespit edilmiştir. Bu amaçla, TSB+BHI agarda 27°C, 48 saatte kültür edilen *S. zooepidemicus* 65°C'ye ayarlanan etüvde inkübasyona tabi tutularak 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda etüvden çıkarılarak TSB+BHI agar besiyeri üzerine ekimler yapıp inkübasyon süreleri sonunda canlılıkları belirlendi.

Tüpler 1, 2 ve Kontrol şeklinde etiketlenip 4'er mL BHI sıvı besiyeri aktarıldı. TSB+BHI agarda 27°C, 48 saatte gelişen *S. zooepidemicus* bakterisinin üzerine 5 mL BHI brot eklenip pipetaj yaparak karıştırılıp 1'er mL tüplere aktarıldı. Kontrol tüpleri oda sıcaklığında bekletilirken, 1 ve 2 numaralı tüp 55°C'ye ve 65°C'ye ayarlanan su banyolarına yerleştirildi. 30., 60., 90., 120., 150., 180. dakikalarda çıkarılan tüplerden TSB+BHI agara ekim yapıldı.

### **2.2.6 *S. zooepidemicus* suşunda antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi**

Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için yapılan bu çalışmada 8 antibiyotik ajandan oluşan çoklu antibiyotik disk (95290, Liofilchem) kullanılmıştır. Bu kit spesifik olarak streptokoklar için sekiz antibiyotik ajandan oluşmaktadır: Penisilin G, Levofloksasin, Teikoplanin, Vankomisin, Eritromisin, Tetrasiklin, Linezolit ve Rifampisin'den oluşmaktadır. Antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için BHI brot besiyerinde inkübe edilen kültürden BHI agar besiyerine sürme şeklinde ekim yapıldı ve hemen akabinde üzerlerine çoklu antibiyotik disk yerleştirildi. 27°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda disk çevrelerinde zon çaplarına göre antibiyotik duyarlılıkları belirlendi.

### **2.2.7 HA üretimi üzerinde etken faktörlerin optimizasyonu**

Hyaluronik asit üretimindeki ortamı etkileyen önemli parametrelerin ortaya konması için Latin Square deneysel tasarım (4x4) yöntemi kullanılarak optimum koşullar belirlenmiştir.

#### **2.2.7.1 HA üretiminde inokülasyon yoğunluğunun belirlenmesi**

HA üretimi için standarda dayalı sayım yöntemlerinden McFarland yöntemine göre (BIOSAN/DEN-1B) kültür ortamının yoğunluğu belirlenmiştir. Kültür ortamının bulanıklığına karşılık gelen bakteri sayısı yardımıyla inokulum miktarları hesaplanmıştır. Hesaplamalara göre biyoreaktörde gerçekleşecek HA üretimi için gerekli olan başlangıç inokülasyon oranı belirlenmiştir. Bu oranın belirlenmesinde bakteri sayısının artışına bağlı olarak HA üretimini fermantasyon başlangıç aşamasında belirlemek amaç edinilmiştir, yani tam olarak bir fermantasyon hedeflenmemiştir. İnokulum yoğunluğunun etkisini inceleyebilmek için kültürden  $10^6$ ,  $10^7$  ve  $10^8$  kob/mL başlangıç konsantrasyonunda fermantasyon test edilmiştir.

#### **2.2.7.2 HA üretiminde sıcaklık ve pH'ın etkisi**

Deney dizaynı olarak "Latin Square" 4x4 dizaynı kullanılmıştır. HA üretiminde optimum sıcaklığın belirlenmesi için fermantasyon ortamı 32°C, 35°C, 37°C ve 40°C değerlerinde çalıştırılmıştır. Dört farklı sıcaklık değerinde, pH 6,5, pH 7, pH 7,5 ve pH 8 değerleri tek tek sabit tutulmuştur. Deney grupları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Fermantasyon besiyeri bileşimi Çizelge 2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

*S. zooepidemicus* aşı kültürü  $10^6$  kob/mL başlangıç konsantrasyonunda inokule edilmiştir. Deneylerin gerçekleştirme sürecinde optimal  $O_2$ , %30 doymuşluğun üzerinde tutulmuştur. Fermantasyon süresince fermantasyon ortamının pH değerinin sabit değerde tutulması, 0,25 N NaOH ve 0,1 N HCl ile fermentör mahareti ile ayarlanmıştır. Çalışma ortamının pH değeri optimizasyon çalışmasında kullanılan değerlere ayarlanmıştır. Fermantasyon uygulamaları 5 saat olarak gerçekleştirilmiştir, 2. saatten itibaren her saat başında sistemden numune alınmıştır.

**Çizelge 2.4 : Deney grupları.**

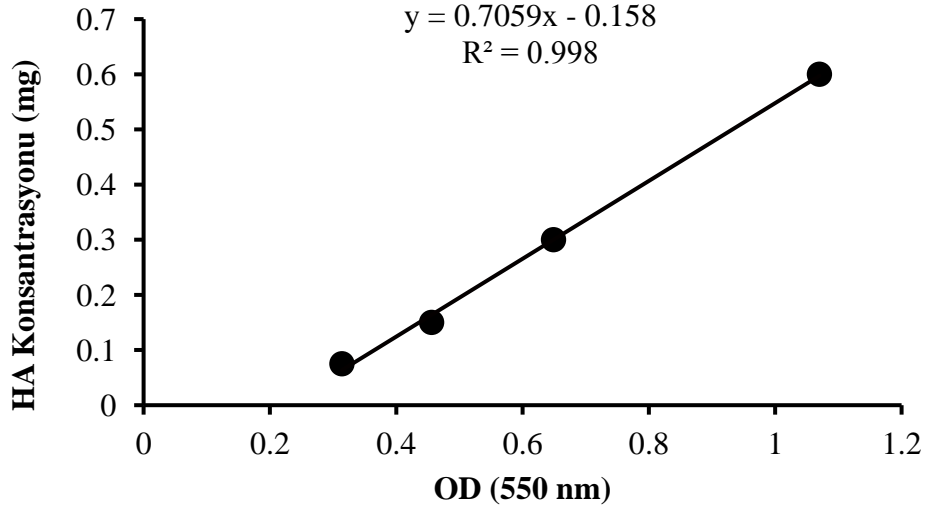
Örnek No	Sıcaklık(°C)	pH
1	32	6,5
2	32	7
3	32	7,5
4	32	8
5	35	6,5
6	35	7
7	35	7,5
8	35	8
9	37	6,5
10	37	7
11	37	7,5
12	37	8
13	40	6,5
14	40	7
15	40	7,5
16	40	8

### 2.2.8 Karbazol metoduyla HA miktar tayini

Hyaluronik asit miktarının belirlenmesi için Bitter ve Muir'in çalışmasını yapmış olduğu karbazol yöntemi kullanılmıştır (Bitter ve Muir, 1962). Bilinen miktardaki HA referans olarak kullanılarak farklı OD'lerde karşılık gelen farklı miktarlardaki HA'lardan standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 2.1). Daha sonra deney sırasında da bu standart eğri kullanılarak HA miktarları belirlenmiştir.

Fermantasyon süreci sonunda 5. saatte alınan numunelerden HA miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Her bir fermantasyon sonucunda, fermantasyon ürününde üç tekrarlı olmak üzere aynı seviyeden numune alma aparatı ile alınan numunelerden 1'er mL alınarak üzerlerine hacimce (1:1) oranında %0,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenip 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar

alınıp üzerlerine hacimce (1:3) oranında etil alkol eklenip sonrasında 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Aynı işlem tekrarlanarak süpernatantlar alınıp üzerlerine hacimce (1:3) oranında etil alkol eklenmiştir. Sonrasında 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar uzaklaştırılıp geriye kalan pelletler saf suda çözdürülmüştür.



Şekil 2.1 : HA standart eğrisi.

Fermantasyon numunelerinden HA ekstrasyonu sonucunda miktarları Bitter ve Muir (1962)'in çalışmasında kullandıkları karbazol metoduyla belirlenmiştir. Bunun için ekstrasyon sonucu elde edilen örneklerden 25 µl alınıp üzerlerine 150 µl 25 mM sodyum tetraborat çözeltisi eklendi ve 100°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerlerine %0,125' lik karbazol çözeltisi ilave edilip 100°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Örneklerin mikropilaya okuyucuda 550 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen HA miktarları daha önce hazırlanan HA standart eğrisine göre belirlenmiştir.

### 2.2.9 Fermantasyon süresince bakteri sayısının belirlenmesi

2., 3., 4. ve 5. saatlerde alınan fermantasyon kültürlerindeki bakteri sayılarının belirlenmesi amacıyla seri dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Buna göre fermentör örneklerinden 100 µl alınarak 900 µl BHI brot içerisine aktarılmıştır. (1:9) oranında seyreltme yapılarak dilüsyon 10<sup>-5</sup>'e kadar devam ettirilmiştir. Her bir deney grubunda yapılan çalışmada 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-5</sup> dilüsyonlardan alınıp BHI agar içeren petrilere iki paralelli ekimler yapılmıştır. Petri kapları 27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.



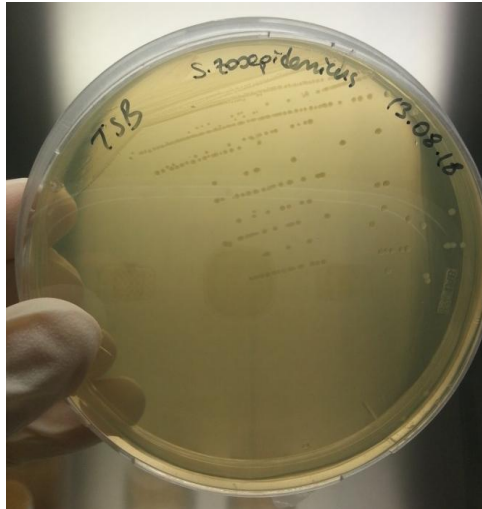
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Bakteri Gelişimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi

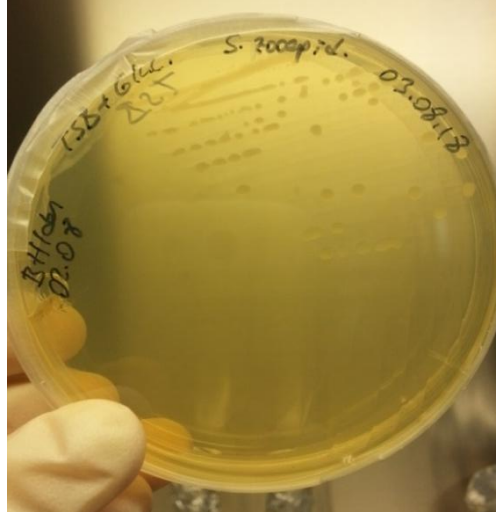
Bakterinin en iyi gelişim göstereceği besiyerinin seçimi için BHI agar, TSB agar, TSB+BHI agar, TSB+Glikoz agar besiyerlerinde 27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılan *S. zooepidemicus* suşunun gelişimi Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4'te verilmiştir. Buna göre en iyi gelişimin BHI agar üzerinde olduğu belirlenmiştir.



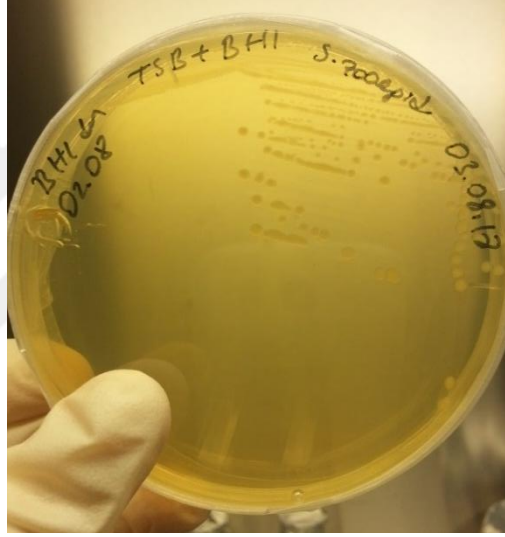
Şekil 3.1 : BHI agar besiyerinde *S. zooepidemicus* gelişimi.



Şekil 3.2 : TSA agar besiyerinde *S. zooepidemicus* gelişimi.



Şekil 3.3 : TSA+Glikoz agar besiyerinde *S. zooepidemicus* gelişimi.



Şekil 3.4 : TSA+BHI agar besiyerinde *S. zooepidemicus* gelişimi.

### 3.2 Sıcaklık Tolerans Limitlerinin Belirlenmesi

*S. zooepidemicus*'un inaktif olması için 65°C'de etüvde inkübasyona bırakılan örneklerin sonucuna bakıldığında, bakteri gelişimi gözlemlendi; bunun sebebi, 65°C'ye konulan petrilerin etüv içerisinde yavaş ısınıp istenilen sıcaklığa ulaşmaması olabilir.

65°C'de su banyosunda inkübasyona bırakılan örneklerin sonucunda, kontrol tüpünden yapılan ekimde bakteri gelişimi gözlenirken 1 ve 2 numaralı tüplerden yapılan ekimlere bakıldığında bakteri gelişimi olmadığı gözlemlendi.

55°C'de su banyosunda inkübasyona bırakılan örneklerin sonucunda; kontrol tüpünden yapılan ekimde bakteri gelişimi gözlemlenirken 1 ve 2 numaralı tüplerden yapılan ekimlere bakıldığında 30. ve 60. dakikalarda yapılan ekimlerde bakteri

gelişimi gözlemlenirken 90., 120., 150., 180. dakikalarda yapılan ekimlere bakıldığında ise bakteri gelişimi gözlemlenmedi. 55°C'de bakteri gelişiminin olmaması için örnekleri 90 dakikadan daha fazla sürede inkübasyona bırakılması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

### 3.3 *S. zooepidemicus* Suşunda Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için yapılan bu çalışmada 27°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda çoklu disk içerisinde yer alan ve suşun duyarlı olduğu olduğu bilinen tüm antimikrobiyal ajanların etrafında zon oluşumu gözlenmiştir. Ölçülen zon değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.1** : Antibiyotik duyarlılık testi sonrası zon çap ölçümleri.

Antimikrobiyal ajan	Zon Çapı (mm)
Penisilin G	34
Levofloksasin	22
Teikoplanin	24
Vankomisin	20
Eritromisin	30
Tetrasiklin	28
Linezolit	32
Rifampisin	36

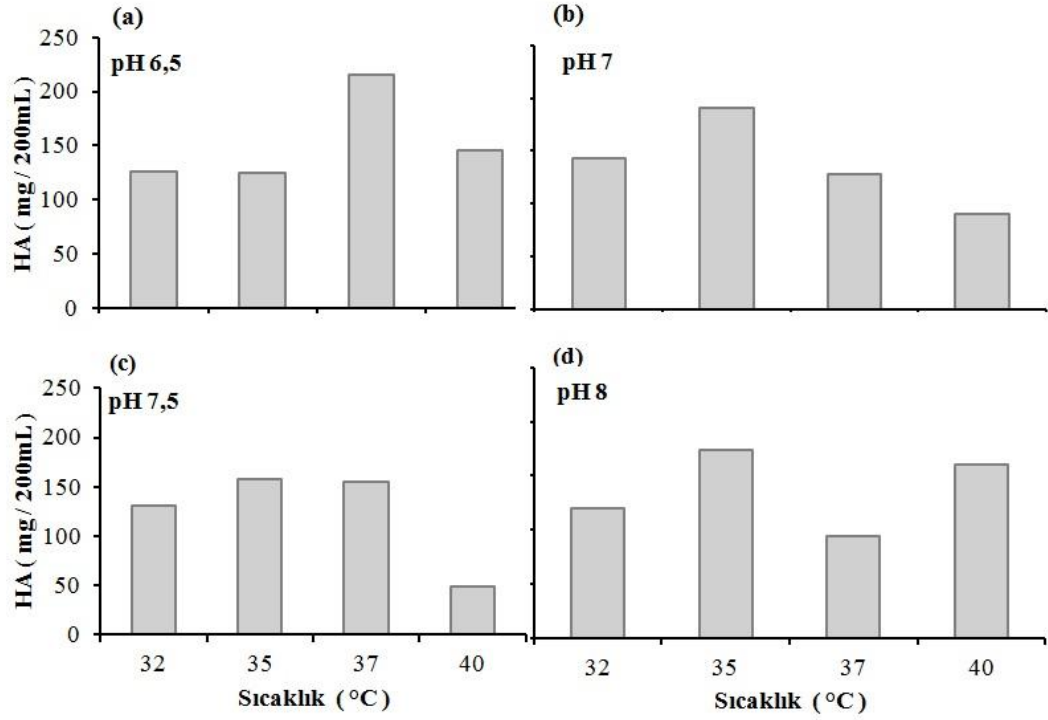
### 3.4 Fermantasyon Şartlarının Optimizasyonu

#### 3.4.1 HA üretiminde inokülasyon yoğunluğunun belirlenmesi

HA üretimi için en uygun inokülasyon yoğunluğunun belirlenmesi çalışmasında,  $10^7$  ve  $10^8$  kob/mL başlangıç konsantrasyonunda inokülasyon yapıldığında fermantasyon besiyerinin ortamdaki *S. zooepidemicus* tarafından çok hızlı tüketildiği belirlenmiştir. Buna göre çalışmalar fermantasyonun başlangıç sırasında HA üretimini daha net gözlemleyebilmek için  $10^6$  kob/mL başlangıç konsantrasyonunda devam ettirilmiştir.

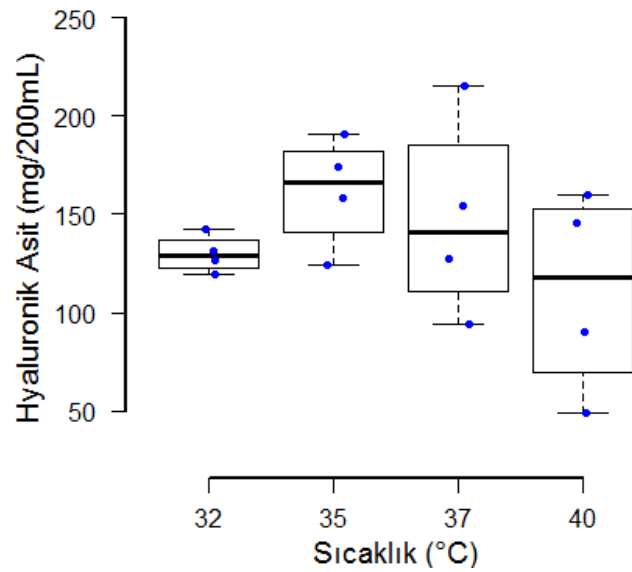
#### 3.4.2 HA üretiminde sıcaklığın etkisi

Fermantasyonla HA üretiminde sıcaklık etkisinin incelendiği çalışmada, her bir pH değerinde çalışılan farklı sıcaklık değerlerinin uygulanması sonucunda elde edilen HA miktarları Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.5 :** Farklı sıcaklık değerlerinde HA üretimi. (a) pH 6,5'te farklı sıcaklıklardaki HA miktarları, (b) pH 7'de farklı sıcaklıklardaki HA miktarları, (c) pH 7,5'te farklı sıcaklıklardaki HA miktarları, (d) pH 8'de farklı sıcaklıklardaki HA miktarları. n=3 tekrarlı çalışılmıştır.

Farklı sıcaklık değerlerindeki HA üretim miktarlarını gösteren Şekil 3.6 incelendiğinde HA üretimi 32°C'de düşük, 35°C ve 37°C'de yükselmiş ve daha sonra en yüksek sıcaklıkta (40°C) tekrar düşme şeklinde bir eğilim sergilemiştir.

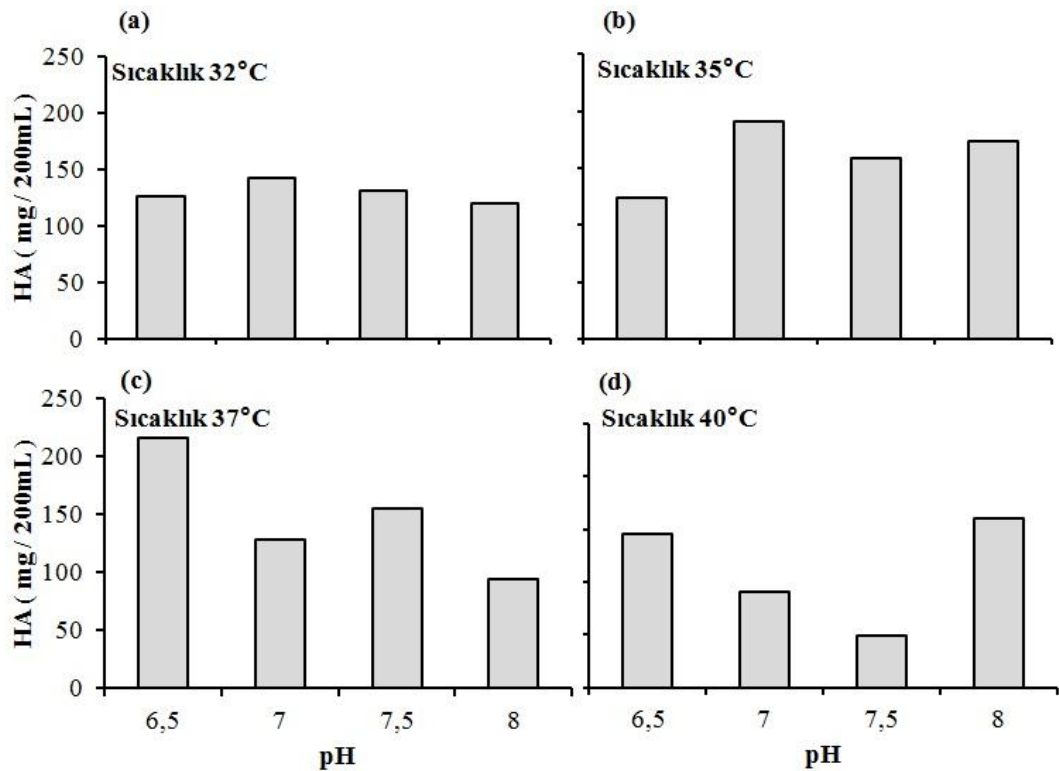


**Şekil 3.6 :** Farklı sıcaklık değerlerinde üretilen HA miktarlarının R programında kutu grafiğinde gösterimi.

En yüksek değere 37°C'de pH 6,5'te görülmesine karşın grafiklerin geneline bakıldığında 35°C'de diğer sıcaklık değerlerine göre daha yüksek HA elde edildiği görülmektedir. Ancak test edilen 4 sıcaklık değerinde de elde edilen HA miktarları parametrik testle karşılaştırıldığında istatistiki olarak aynı oldukları belirlenmiştir (Duncan Test,  $P>0,05$ ). Gruplar parametrik olmayan test ile de karşılaştırılmıştır, ancak gruplar arasında önemli bir fark tespit edilememiştir (Kruskal Wallis Testi,  $P>0,05$ ).

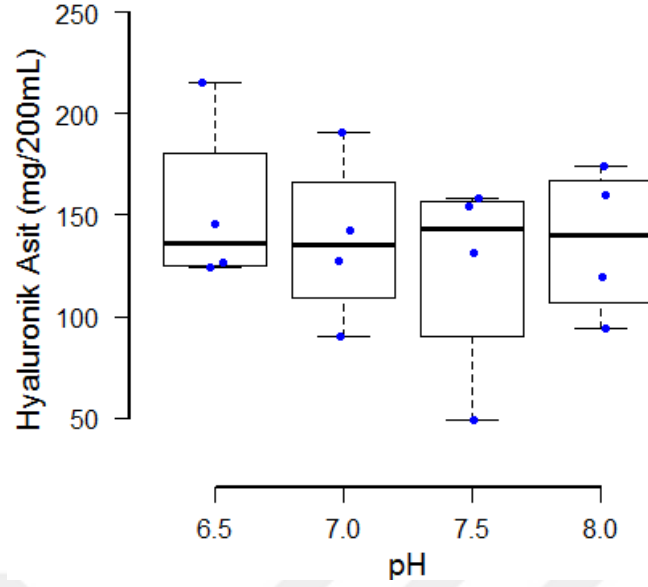
### 3.4.3 HA üretiminde pH etkisi

Fermantasyonla HA üretiminde pH etkisinin incelendiği çalışmada, her bir sıcaklık değerinde çalışılan farklı pH değerlerinin uygulanması sonucunda elde edilen HA miktarları Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7 :** Farklı pH değerlerinde HA üretimi. (a) 32°C sıcaklıkta farklı pH değerlerindeki HA miktarları, (b) 35°C sıcaklıkta farklı pH değerlerindeki HA miktarları, (c) 37°C sıcaklıkta farklı pH değerlerindeki HA miktarları, (d) 40°C sıcaklıkta farklı pH değerlerindeki HA miktarları. n=3 tekrarlı çalışılmıştır.

Şekil 3.8'e bakıldığında, HA üretimleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir farkın olmadığı belirlenmiştir (Duncan Test,  $P>0,05$ ). Ancak üretimde aşağı yönlü en az varyans pH 6,5'te gözlemlenmiştir.

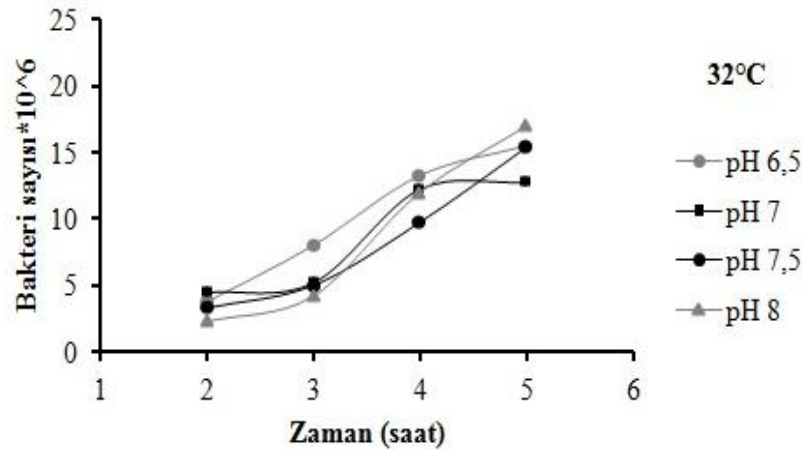


**Şekil 3.8 :** Farklı pH değerlerinde üretilen HA miktarlarının R programında kutu grafiğinde gösterimi.

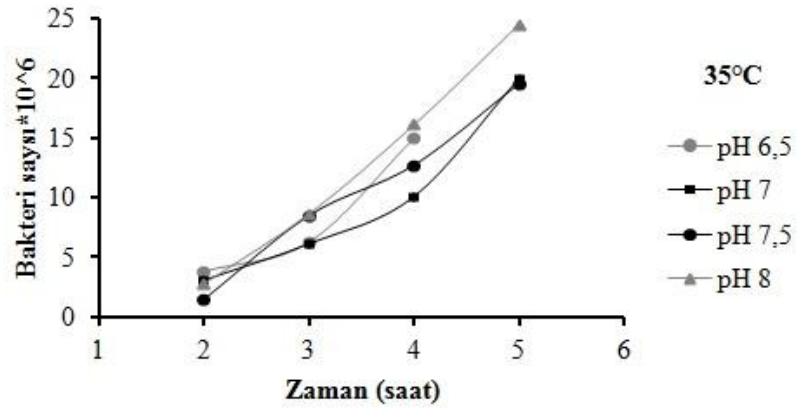
### 3.5 Fermantasyon Süresince Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Bakteri sayısı belirlemek amacıyla seri dilüsyon metodu uygulanarak  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  dilüsyonlardan yapılan ekimler  $27^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edildikten sonra agar üzerinde oluşan koloniler sayılmıştır. Buna göre her bir deney grubunun, çalışılan fermantasyon hacmine karşılık gelen bakteri sayıları hesaplanmıştır.

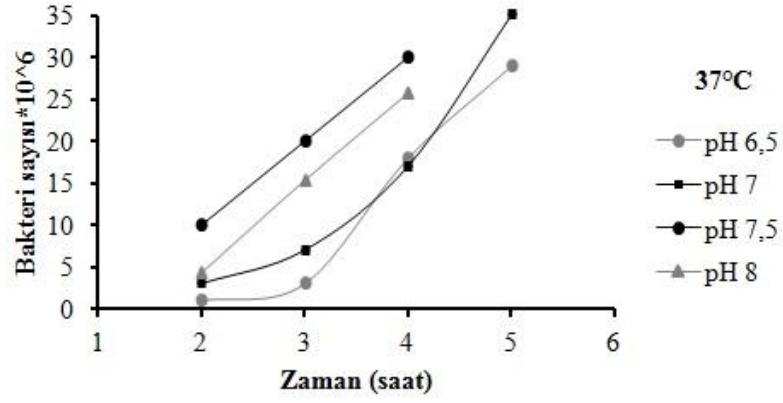
Her bir sıcaklık değerinde farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayılarını gösteren Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12 incelendiğinde bakteri sayısı artışının en yüksek  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve pH 7 değerinde olduğu görülmektedir.



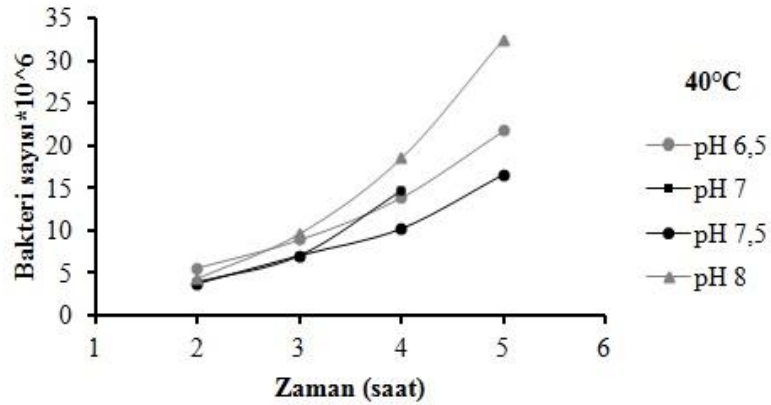
**Şekil 3.9 :**  $32^{\circ}\text{C}$ 'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.



Şekil 3.10 : 35°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.

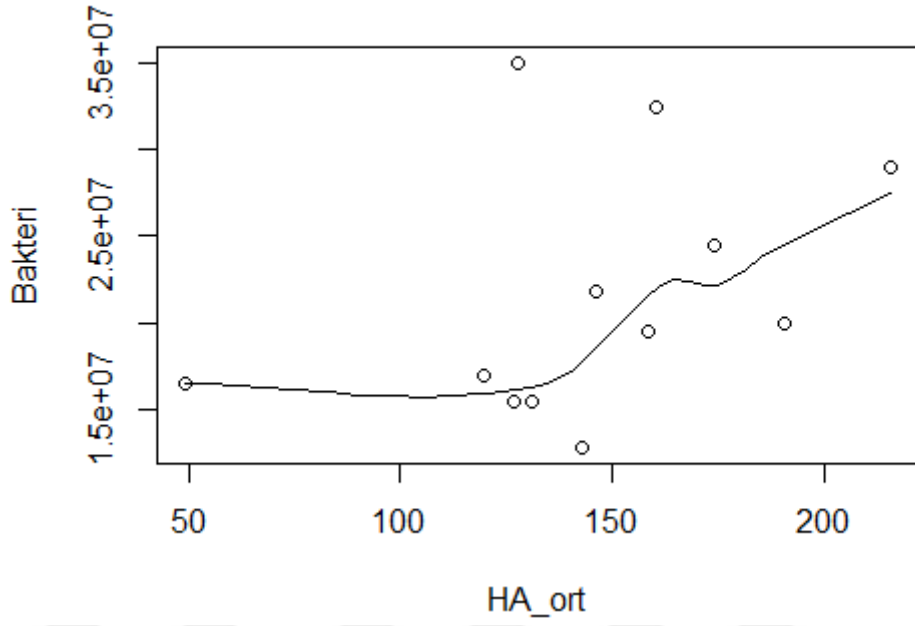


Şekil 3.11 : 37°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.



Şekil 3.12 : 40°C'de farklı pH değerlerinde zamana bağlı oluşan bakteri sayısı.

Her bir deney grubunda hesaplanan bakteri sayıları ve ölçülen HA miktarları Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.13** : Bakteri sayılarına bağlı karbazol yöntemiyle belirlenen HA miktar (mg/200 mL) değişimi. Bakteri sayılarına bağlı karbazol yöntemiyle belirlenen HA miktar (mg/200 mL) değişimi. HA miktarı ve bakteri sayısı hesaplama 5. saatte fermantasyon ortamı içerisindeki her bir örnekten 1 mL alınarak 3 tekrarlı çalışılıp ortalamaları alınmıştır.



#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *S. zooepidemicus* ile HA üretiminde etkili olduğu bilinen kültür şartlarından farklı pH ve sıcaklık koşulları uygulanarak elde edilen HA miktarları karşılaştırılmıştır. Ayrıca farklı pH ve sıcaklık koşullarında *S. zooepidemicus*'un çoğalması araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında fermantasyonla HA üretimine pH etkisinin incelendiğinde HA üretiminin pH 6,5 ve pH 7 değerlerinde pH 7,5 ve pH 8'e göre yüksek olduğu anlaşılmıştır. Şekil 3.8'deki sonuçlara bakıldığında dört farklı pH değerindeki HA üretimleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak herhangi bir farkın olmadığı görülmüştür (Duncan Test,  $P>0,05$ ). Bunun yanında üretimde en az varyans pH 6,5'de gözlemlenmiştir. *S. zooepidemicus* ile kesikli fermantasyon sonrası 3 L fermentör içerisinde 2 L çalışma hacminde yapılan çalışma sonrasında optimum HA miktarını pH  $6,7\pm 0,2$  değerlerinde elde edildiği belirlenmiştir (Johns ve diğ, 1994). *S. zooepidemicus* ile yapılan diğer bir çalışmada pH 6 ve pH 7,9 aralığında pH değeri arttıkça HA üretiminin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır (Akasaka ve diğ, 1988). Tez çalışmasında *S. zooepidemicus* ile yaptığımız çalışmadan ulaştığımız sonuç literatürde yapılan çalışmalarla da desteklendiği görülmektedir.

*S. zooepidemicus* suşu ile fermantasyonla HA üretiminde sıcaklık etkisinin incelendiği tez çalışmasının sonuçlarına bakıldığında sıcaklık değerlerinin  $35^{\circ}\text{C}$  ve  $37^{\circ}\text{C}$  olduğu şartlarda HA üretiminin  $32^{\circ}\text{C}$  ve  $40^{\circ}\text{C}$ 'ye kıyasla daha yüksek olduğu görülmesine rağmen kullanılan farklı sıcaklık değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $P>0,05$ ). HA üretiminde en az varyasyon  $32^{\circ}\text{C}$  ve  $35^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklarında gözlemlenmiştir. En yüksek HA üretiminin ise  $37^{\circ}\text{C}$ 'de olduğu sonucuna varılmıştır. *S. zooepidemicus* suşu ile yapılan bir çalışmaya bakıldığında 1,5 L fermantasyon hacminde uygulanan fermantasyon sonucunda elde edilen HA miktarının düşük kültür sıcaklıklarda ( $32^{\circ}\text{C}$  ve  $35^{\circ}\text{C}$ ) arttığı ve daha yüksek sıcaklık değerinde ( $40^{\circ}\text{C}$ )'de azaldığı rapor edilmiştir (Armstrong ve Johns, 1997). Başka bir çalışmada 125 mL hacimli erlenlerde 25 mL çalışma hacminde gerçekleştirilen

fermantasyon ile sıcaklık 34°C 'den 40°C'ye çıkarıldığında üretilen HA miktarının azaldığı belirtilmiştir (Pan ve diğ, 2015).

*S. zooepidemicus* ile HA fermentasyonu çalışmasında farklı pH ve sıcaklık değerleri uygulandığında fermentasyon boyunca kültürün çoğalması belirlenip karşılaştırılmıştır. 5 saatlik fermentasyon süresince alınan örneklerdeki bakteri sayıları hesaplandığında, tüm deney gruplarında 2. saatten 5. saate kadar bakteri sayılarında artış olduğu belirlenmiştir.

5, 11, 12, 14 no'lu deney gruplarında 5. saatte alınan örneklerden yapılan ekimlerden sonra iç içe girmiş kolonilerin varlığından dolayı bakteri sayıları hesaplanamamıştır. Şekil 3.10, 3.11 ve 3.12'de yalnızca 5, 11, 12, 14 no'lu deney gruplarının 5. saatteki bakteri sayılarına yer verilmediğinden bakteri sayısı artışı 4. saatteki bakteri sayılarına göre yorumlanmıştır. 32°C, 35°C, 37°C, 40°C sıcaklık değerlerinde oluşan bakteri sayıları karşılaştırıldığında en yüksek bakteri sayısına 37°C'de ulaşıldığı belirlenmiştir. Sıcaklık arttıkça oluşan bakteri sayısının da arttığı görülmektedir. Literatüre bakıldığında bu sonucun *S. zooepidemicus* gelişimi için en uygun sıcaklık değeri olduğu görülmektedir (Johns, 1994). *S. zooepidemicus* kullanılarak biyoreaktörde 2,5 L fermentasyon hacminde bir çalışma yapılmış ve sıcaklık değeri 37°C'den 30°C'ye düşürüldüğünde bakteri büyüme hızının düştüğü belirtilmiştir (Jagannath ve Ramachandran, 2010). Tez çalışmasında *S. zooepidemicus* ile yaptığımız çalışmadan ulaştığımız sonuç literatürde yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir.

pH 6,5, pH 7, pH 7,5 ve pH 8 değerlerinde oluşan bakteri sayıları karşılaştırıldığında en yüksek bakteri sayısına pH 8'de ulaşıldığı belirlenmiştir. Fermentasyon ortamında pH değerinin yükselmesiyle mikrobiyal büyümenin pozitif yönde etkilendiği görülmüştür. Pan ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada pH kontrolü yapılmayan fermentasyon ortamında pH değerinin 4,9 değerlerine düştüğü ve bu düşüşün mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. pH değeri 8'e ayarlandığında bakteri büyüme hızının arttığı rapor edilmiştir (Pan ve diğ, 2017).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*S. zooepidemicus* ile HA üretimi optimum HA üretiminin pH 6,5 ve pH 7'de ve 35°C ve 37°C sıcaklıklarda olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortamındaki bakteri sayısı arttıkça oluşan HA miktarının da arttığı belirlenmiştir. Her ne kadar bu çalışmada gruplar arasında bir fark bulunamamış ise de bu 1) çalışma dizaynının çaprazlama olmasından kaynaklı, 2) fermantasyonun kesikli olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Eğer tam bir fermantasyon süreci tamamlanırsa gruplar arasındaki farkın daha da belirginleşmesi kuvvetle muhtemeldir. Bundan sonraki çalışmalarda fermantasyon uygulamalarında yukarıdaki değerler ışığında tam fermantasyon uygulamaları gerçekleştirilecektir.

## KAYNAKLAR

- Akasaka, H., Komasaki, H., Arai, T.** (1989). *U.S. Patent No. 4801539*. U.S. Patent and Trademark Office.
- Armstrong, D. C., Johns, M. R.** (1997). Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7), 2759-2764.
- Armstrong, D. C., M. J. Cooney, M. R. Johns.** (1997). Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic-Acid-Producing *Streptococcus zooepidemicus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47 (3), 309–12.
- Balazs, E. A., Freeman, M. I., Klöti, R., Meyer-Schwickerath, G., Regnault, F., Sweeney, D. B.** (1972). Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor, *Modern Problems in Ophthalmology*, 10, 3-21.
- Bitter T., Muir H. M.** (1962). A modified uronic acid carbazole reaction, *Analytical Biochemistry*, 4 (4), 330–334.
- Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A., Eggink, G.** (2013). Production methods for hyaluronan, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (2013), 1-14.
- Brewton, R. G., Mayne, R.** (1992). Mammalian vitreous humor contains networks of hyaluronan molecules: electron microscopic analysis using the hyaluronan-binding region (G1) of aggrecan and link protein, *Experimental Cell Research*, 198 (2), 237-249.
- Burdick, J. A. & Prestwich, G. D.** (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Advanced Materials*, 23 (12), H41-H56.
- Chong, B. F., Blank, L. M., Mclaughlin, R., Nielsen, L. K.** (2005). Microbial Hyaluronic Acid Production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (4), 341–51.
- Chung, J. Y., Zhang, Y., Adler, B.** (1998). The Capsule Biosynthetic Locus of *Pasteurella multocida* A:1, *FEMS Microbiol Letters*, 166 (2), 289–96.
- Cinar, A., Parulekar, S. J., Undey, C., and Birol, G.** (2003). *Batch Fermentation: Modeling, Monitoring, and Control*. CRC Press.
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N.** (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction, *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 59-61.
- Chen, S. J., Chen, J. L., Huang, W. C., Chen, H. L.** (2009). Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26 (2), 428-432.

- DeAngelis, P. L.** (1999). Molecular Directionality of Polysaccharide Polymerization by the *Pasteurella multocida* Hyaluronan Synthase, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (37), 26557-26562.
- Duan, X. J., Yang, L., Zhang, X., Tan, W. S.** (2008). Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (4), 718-724.
- Engström-Laurent, A.** (1997). Hyaluronan in Joint Disease, *Journal of Internal Medicine*, 242 (1), 57–60.
- Erickson, M. & Stern, R.** (2012). Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism, *Biochemistry Research International*, 2012, 9.
- Fraser, J. R. E., Laurent, T. C.** (2007). Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium*, (ss.41-59). Chichester, UK.
- Frizziero, L., Govoni, E., Bacchini, P.** (1998). Intra-Articular Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Clinical and Morphological Study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 16 (4), 441–49.
- Greenberg, D. D., Stoker, A., Kane, S., Cockrell, M., Cook, J. L.** (2006). Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14 (8), 814-822.
- Hadidian, Z. & Pirie, N. W.** (1948). The preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord, *Biochemical Journal*, 42 (2), 260.
- Hascall, V. C. & Heinegård, D.** (1974). Aggregation of cartilage proteoglycans I. The role of hyaluronic acid, *Journal of Biological Chemistry*, 249 (13), 4232-4241.
- Hasegawa, S., Nagatsuru, M., Shibutani, M., Yamamoto, S., Hasebe, S.** (1999). Productivity of Concentrated Hyaluronic Acid Using a Maxblend® Fermentor, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88 (1), 68–71.
- Holmström, B. & Řičica, J.** (1967). Production of hyaluronic acid by a Streptococcal strain in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 15(6), 1409-1413.
- Hosoya, H., Kimura, M., Endo, H., Hiraki, Y., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Yoshikawa, S., Omine, H., Miyazaki, K.** (1991). *U.S. Patent No. 5023175*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Huang, W. C., Chen, S. J., Chen, T. L.** (2006). The Role of Dissolved Oxygen and Function of Agitation in Hyaluronic Acid Fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 32 (3), 239–43.
- Jagannath, S. & Ramachandran, K. B.** (2010). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (2), 148-158.
- Johns, M. R., Goh, L. T., Oeggerli, A.** (1994). Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnology Letters*, 16 (5), 507-512.
- Kendall, F. E., Heidelberger, M., Dawson, M. H.** (1937). A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*, *Journal of Biological Chemistry*, 118 (1), 61-69.

- Kim, J. H., Yoo, S. J., Oh, D. K., Kweon, Y. G., Park, D. W., Lee, C. H., & Gil, G. H.** (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (6), 440-445.
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P.** (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnology letters*, 29 (1), 17-25.
- Li, S. Y., Srivastava, R., Suib, S. L., Li, Y., & Parnas, R. S.** (2011). Performance of batch, fed-batch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control, *Bioresource technology*, 102(5), 4241-4250.
- Liu, J., Wang, Y., Ren, Y., Zhao, Y., Zhao, G.** (2018). Efficient Production of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid with a Two-Stage Fermentation, *RSC Advances*, 8 (63), 36167-36171.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., Sun, J.** (2008a). Influence of Culture Modes on the Microbial Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13 (3), 269–73.
- Liu, L., M. Wang, G. Du, J. Chen.** (2008b). Enhanced Hyaluronic Acid Production of *Streptococcus zooepidemicus* by an Intermittent Alkaline-Stress Strategy, *Letters in Applied Microbiology*, 46 (3), 383–88.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J.** (2011). Microbial Production of Hyaluronic Acid: Current State, Challenges, and Perspectives, *Microbial Cell Factories*, 10 (1), 99.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J.** (2008c). Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*, *Bioresource Technology*, 99 (17), 8532-8536.
- Lu, J. F., Zhu, Y., Sun, H. L., Liang, S., Leng, F. F., Li, H.Y.** (2016). Highly Efficient Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 Derived from Heterologous Expression of Bacterial Haemoglobin and Mutant Selection, *Letters in Applied Microbiology*, 62 (4), 316–22.
- MacLENNAN, A. P.** (1956). The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by 25 Strains of Group C Streptococci, *Journal of General Microbiology*, 15 (3), 485–91.
- Meyer, K. & Palmer, J. W.** (1934). The polysaccharide of the vitreous humor, *Journal of Biological Chemistry*, 107 (3), 629-634.
- Moseley, R., Walker, M., Waddington, R. J., Chen, W. Y. J.** (2003). Comparison of the Antioxidant Properties of Wound Dressing Materials-Carboxymethylcellulose, Hyaluronan Benzyl Ester and Hyaluronan, towards Polymorphonuclear Leukocyte-Derived Reactive Oxygen Species, *Biomaterials*, 24 (9), 1549–1557.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J.** (2008). Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review, *Veterinarni Medicina*, 53 (8), 397–411.
- Oliveira, A. H., Ogradowski, C. C., de Macedo, A. C., Santana, M. H. A., Gonçalves, L. R. B.** (2013). Cashew Apple Juice as Microbial Cultivation Medium for Non-Immunogenic Hyaluronic Acid Production, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1097–1104.

- Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Antônio, M. V. R., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., Parachin, N. S.** (2016). Genetic Basis for Hyper Production of Hyaluronic Acid in Natural and Engineered Microorganisms, *Microbial Cell Factories*, 15 (1), 119.
- Pan, N. C., Vignoli, J. A., Baldo, C., Pereira, H. C. B., Silva, R. S. D. S. F., Celligoi, M. A. P. C.** (2015). Effect of Fermentation Conditions on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37 (04), 411–417.
- Pan, N. C., Pereira, H. C. B., da Silva, M. D. L. C., Vasconcelos, A. F. D., Celligoi, M. A. P. C.** (2017). Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182 (1), 276-293.
- Park, M. G. Jang, J. D., Kang, W. K.** (1996). U.S. Patent No. 5496726. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Pires, A. M. B., Santana, M. H. A.** (2010). Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid, *Applied biochemistry and biotechnology*, 162 (6), 1751-1761.
- Rodell, C. B., Wade, R. J., Purcell, B. P., Dusaj, N. N., Burdick, J. A.** (2015). Selective proteolytic degradation of guest–host assembled, injectable hyaluronic acid hydrogels, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1 (4), 277-286.
- Reddy, K. J., Karunakaran, K. T.** (2013). Purification and Characterization of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Journal of BioScience and Biotechnology*, 2 (3), 173–79.
- Stangohl, S.** (2000). U.S. Patent No. 6090596. U.S Methods and means for the production of hyaluronic acid. U.S. Patent and Trademark Office.
- Stangohl, S.** (2003). U.S. Patent No. 6537795 . U.S Methods and means for the production of hyaluronic acid. U.S. Patent and Trademark Office.
- Timoney, J. F., Gillespie, J. A., Scott, F. W., Barlough, J. E.** (1988). *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8th ed. Timoney JF. Ithaca, Comstock.
- Toole, B. P.** (1981). Glycosaminoglycans in morphogenesis. In *Cell biology of Extracellular Matrix* (9), 259-294.
- Vázquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., Murado, M. A.** (2010). Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* in Marine By-Products Media from Mussel Processing Wastewaters and Tuna Peptone Viscera, *Microbial Cell factories*, 9, 46.
- Yamada, T., Kawasaki, T.** (2005). Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (6), 521–28.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : HİLAL GİRGİN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : BALIKESİR-26.02.1993  
**E-posta** : hilal.girgin@btu.edu.tr

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Araştırma Görevlisi - Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

### TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- *Streptococcus sp.* ile Hyaluronik Asit Üretim Protokolü Geliştirilmesi-Bursa Teknik Üniversitesi-BAP Projesi (172L12)

### DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Çatlakların Mikrobiyal Onarımı-Bursa Teknik Üniversitesi-BAP Projesi (182N31)
- The Dynamics of Insulin Delivery Using Hydroxyapatite- 3. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi-Poster sunumu