

**BİYOREAKTÖR KOŞULLARINDA CLOSTRİDİUM PERFRİNGENS TİP
A'DAN ALFA TOKSİN ÜRETİM OPTİMİZASYONU**

EMRAH İBİŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

İLERİ TEKNOLOJİLER Anabilim Dalı

BİYOTEKNOLOJİ Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat 2022

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Yüksek Lisans ğrencisi EMRAH İBİşOğLU, BİYOREAKTÖR KOşULLARINDA CLOSTRİDİUM PERFRİNGENS TİP A’DAN ALFA TOKSİN ÜRETİM OPTİMİZASYONU başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Doç. Dr. Volkan KILIÇ

ÖZET

BİYOREAKTÖR KOŞULLARINDA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TİP A'DAN ALFA TOKSİN ÜRETİM OPTİMİZASYONU

EMRAH İBİŞOĞLU

İLERİ TEKNOLOJİLER Anabilim Dalı

BİYOTEKNOLOJİ Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2022

Danışman: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Clostridium perfringens tip A, alfa toksin üretimini en yüksek miktarda yapan *C. perfringens* türüdür. Salgıladığı bu madde (alfa toksin olarak bilinen), protein yapıdaki bir enzim olan fosfolipaz C'dir (PLC). *C. perfringens* tip A, salgıladığı bu alfa toksin ile insanları ve hayvanları enfekte etme kabiliyetine sahip bir türdür. İnsanlarda ve hayvanlarda bazı hastalıklara sebep olur. Hayvan sağlığı açısından önemli bir patojendir. Hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıklar toksikasyonla seyrettikleri için tedavi edilemezler ve yüksek oranda ölüme neden olurlar. *Clostridial* hastalıklardan korunmada en etkili ve tek yöntem aşılama değildir.

Bu çalışmada *C. perfringens* tip A'dan biyoreaktör koşullarında alfa toksin üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, referans ve ülkemizde izolasyonu yapılan bir suş olmak üzere 2 farklı suş kullanılmıştır. Araştırmada farklı pH ve sıcaklık şartları, farklı besi yeri komponentleri ve farklı besi yeri ortamları, besi yeri ortamı azot beslemesi, farklı inokülasyon oranlarının alfa toksin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. İnkübasyon süresi üretim kültürü için 37 °C'de 24 saat olarak belirlenmiştir. Biyoreaktör koşulları 100 rpm, 37 °C, ve pH değeri 6.5-7.0 olarak belirlenmiştir. İnkübasyonun 6-8. saatleri arasında alfa toksin miktarının maksimum olduğu yapılan toksin titrasyon testleri ile belirlenmiştir. Besi ortamı pH değerinin 6.5 – 7 arasında alfa toksin üretiminin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Besi ortamına belirli saatlerle azot beslemesinin yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Toksin titrasyon testlerine göre, bu belirlenen parametre şartları sağlandığında 100 mld üzeri titreye ulaşılmıştır.

Üretilen bu alfa toksin ile bu bakterinin sebep olduğu hastalıklardan korunmak amacıyla, (formaldehit ile inaktive edilerek) inaktif aş ı eldesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla daha fazla alfa toksin salgılanması sağlanacak ve bu alfa toksin aş ı etken maddesi (antijen) olarak kullanılacaktır.

Anahtar Sözcükler: *Clostridium Perfringens Tip A, Alfa Toksin, Biyoreaktör, Toksin Titrasyon Testi*



ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ALPHA TOXIN PRODUCTION FROM CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TYPE A UNDER BIOREACTOR CONDITIONS

EMRAH İBİŞOĞLU

Department of ADVANCED TECHNOLOGİES

Programme in BIOTECHNOLOGY

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, February 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Volkan KILIÇ

Clostridium Perfringens type A, is a *C. perfringens* species that produces the highest amount of alpha toxin. The substance it secretes (known as alpha toxin) is phospholipase C (PLC), an enzyme in protein structure. *C. perfringens* type A is a species that has the ability to infect humans and animals with this alpha toxin it secretes. It causes some diseases in humans and animals. It is an important pathogen for animal health. It causes significant economic losses in the livestock sector. Since these diseases progress with toxication, they cannot be treated and they progress very quickly and cause high rates of death. Vaccination is the most effective and only method to prevent clostridial diseases.

In this study, it is aimed to optimize alpha toxin production from *C. perfringens* type A, in bioreactor conditions. For this purpose, two different strains, a reference strain and a strain isolated in our country, were used. In the study, the effects of different pH and temperature conditions, different media components and different nutrient media, nitrogen feeding of the nutrient media, and different inoculation rates on alpha toxin production were investigated. The incubation period was determined as 24 hours at 37 °C for the production culture. Bioreactor conditions were determined as 100 rpm, 37 °C, and pH value 6,5-7. It was determined by toxin titration tests that the amount of alpha toxin was maximum between 6-8. th hours of incubation. It has been observed that alpha toxin production is higher between 6.5-7 pH value of the medium. It was concluded that nitrogen feeding should be done at certain hours to the nutrient medium. According to toxin titration tests, at the specified parameter conditions, a result of over 100 mld has been reached.

With this produced alpha toxin, it is aimed to obtain an inactivated vaccine (by inactivating with formaldehyde) in order to protect against the diseases caused by this bacterium. For this purpose, more alpha toxin will be secreted and this alpha toxin will be used as vaccine active substance (antigen).

Keywords: : *Clostridium Perfringens Type A, Alpha Toxin, Bioreactor, Toxin Titration Test.*



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde danışmanlığımı üstlenen tez çalışmamda tüm bilgi ve tecrübelerini, desteğini, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Volkan KILIÇ ‘a

Tezimde katkılarından dolayı başta çalışma arkadaşlarım Gözde SELEK, Duygu SUBAY ve hayvan deneylerinin yapılması konusunda yardımcı olan Şule Yılmaz olmak üzere yüksek lisans sürecim boyunca beni destekleyen Ahmet ALTIN ve Ruken OĞUZHAN’a

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, emeklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda bana güvenen, destek veren aileme

Tez çalışmalarında her türlü desteği sağlayan ATAFEN Anonim Şirketi’ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

EMRAH İBİŞOĞLU

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

EMRAH İBİŞOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

DANIŞMAN ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Clostridium Perfringens</i> ’ in Tarihçesi	4
2.2. <i>Clostridium Perfringens</i> ’ in Filogenetik ve Taksonomik Sınıflandırılması	4
2.3. <i>C. perfringens</i> ‘in Özellikleri	5
2.3.1. <i>C. perfringens</i> ‘in besin gereksinimleri	6
2.4. <i>C. perfringens</i> ‘in Türleri	8
2.4.1 <i>Clostridium perfringens</i> tip A	9
2.4.2. <i>Clostridium perfringens</i> tip B	10
2.4.3. <i>Clostridium perfringens</i> tip C	11
2.4.4. <i>Clostridium perfringens</i> tip D	11
2.5. <i>Clostridium Perfringens</i> Toksinleri	12
2.5.1 <i>C. perfringens</i> alfa (α) toksin (CPA)	12
2.5.2. Alfa toksin etki mekanizması	13
2.5.3. Hücre ölümü mekanizmaları	16
2.5.4. <i>C. perfringens</i> beta (β) toksin (CPB)	16
2.5.5. <i>C. perfringens</i> epsilon (ϵ) toksin (ETX)	17
2.5.6. <i>C. perfringens</i> iota (ι) toksin (ITX)	17
2.5.7. <i>C. perfringens</i> enterotoksin (CPE)	18
2.6. Toksin Tayin Yöntemleri	18
2.7. Bakteriye Büyüme Eğrisi	22
2.7.1. Gecikme veya uyum fazı (Lag faz)	22

2.7.3. Durağan faz (Stationary faz)	24
2.7.4. Ölüm fazı (Death faz)	25
2.8. Biyoproses İşletim Sistemleri	25
2.9. Biyoreaktörün Dizayn ve Çalışması	29
2.10. Biyoreaktör İşletim Sistemleri	30
2.10.1. Kesikli proses	30
2.10.2. Sürekli proses.....	31
2.10.3.Yarı kesikli proses	32
2.11. Biyoreaktör Türleri.....	34
2.11.1. Karıştırılmalı tank biyoreaktörü (Stirred tank bioreactor)	34
2.11.2. Hava kaldırmalı biyoreaktör (Airlift bioreactor).....	35
2.11.3. Kabarcık kolon biyoreaktörü (Bubble column reactor).....	36
2.11.4. Akışkan yataklı biyoreaktör (Fluidized bed reactor)	37
2.11.5. Dolgulu yatak biyoreaktörler (Packed bed reactor)	39
2.11.6. Membran biyoreaktör (Membrane bioreactor)	40
3. MATERYAL VE METOD.....	42
3.1. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar	42
3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve komponentler	42
3.2. Bakteriye Suş	42
3.3. Kullanılan Besi Yeri Komponentleri ve Hazırlanışı	42
3.3.1. Çalışma kültürü-1.....	43
3.3.2. Çalışma kültürü-2.....	43
3.3.3. Üretim kültür M1-1 besi yeri	44
3.3.4. Brain Heart Infusion Broth (BHI)	44
3.3.5. Reinforced Clostridial Medium Besiyeri (RCM)	45
3.3.6. Vitamin çözeltisi hazırlanması	45
3.3.7. B Kısmı (İkinci kısım)	45
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması.....	46
3.4.1. 2.5 M H ₂ SO ₄ hazırlanması	46
3.4.2. 5 M NaOH hazırlanması.....	46
3.4.3. %50 Gliserol çözeltisi hazırlanması.....	46
3.4.4. Gram boyama solüsyonları hazırlanması	46
3.4.5. SDS-PAGE için hazırlanan solüsyonlar	46

3.4.6. FTS Solüsyonu Hazırlığı	47
3.5. Biyoreaktörün Hazırlanması ve Besiyeri Sterilizasyonu	47
3.5.1. Çalışma ortamının oluşturulması ve inokülasyon işlemi	49
3.6. Tayin Yöntemleri	50
3.6.1. Gram boyama yöntemi	50
3.6.2. SDS -PAGE yöntemi	50
3.6.3. Gümüş boyama yöntemi	52
3.6.4. Toksin titrasyon yöntemi	52
3.6.5. Optik dansite tayin yöntemi	53
4. BULGULAR	54
4.1. Üretim 1	54
4.1.1. Çalışma kültürü 1	54
4.1.2. Çalışma kültürü 2	54
4.1.3. Üretim kültürü.....	55
4.1.4. Toksin titrasyon testi.....	55
4.1.5. SDS-PAGE elektroforez çalışması	55
4.1.6. Değerlendirme	56
4.2. Üretim 2	56
4.2.1. Çalışma kültürü 1	56
4.2.2. Çalışma kültürü 2	56
4.2.3. Üretim kültürü.....	57
4.2.4. Toksin titrasyon testi.....	58
4.2.5. SDS-PAGE elektroforez çalışması	58
4.2.6. Değerlendirme;	58
4.3. Üretim 3	59
4.3.1. Çalışma kültürü 1	59
4.3.2. Çalışma kültürü 2	59
4.3.3. Üretim kültürü.....	59
4.3.4. Toksin titrasyon testi.....	60
4.3.5. Değerlendirme;	60
4.4. Üretim 4	60
4.4.1. Çalışma kültürü 1	60
4.4.2. Çalışma kültürü 2	61

4.4.3. Üretim kültürü.....	61
4.4.4. Toksin Titrasyon Testi	61
4.4.5. Değerlendirme;	61
4.5. Üretim 5	61
4.5.1. Çalışma kültürü 1	61
4.5.2. Çalışma kültürü 2	61
4.5.3. Üretim Kültürü.....	62
4.5.4. Toksin Titrasyon Testi	62
4.5.5. Değerlendirme	63
4.6. Üretim 6	64
4.6.1. Çalışma kültürü 1	64
4.6.2. Değerlendirme	64
4.7. Üretim 7	64
4.7.1. Çalışma kültürü 1	64
4.7.2. Çalışma kültürü 2	64
4.7.3. Üretim Kültürü.....	64
4.7.4. Toksin titrasyon testi.....	65
4.7.5. Değerlendirme	65
4.8. Üretim 8	65
4.8.1. Çalışma kültürü 1	65
4.8.2. Çalışma kültürü 2	65
4.8.3. Üretim Kültürü.....	65
4.8.4. Toksin titrasyon testi.....	66
4.8.5. Değerlendirme	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
KAYNAKÇA	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. <i>C. perfringens</i> 'in neden olduğu hastalıklar.....	2
Tablo 2.1. <i>C. perfringens</i> taksonomik sınıflandırılması	4
Tablo 2.2. <i>C. perfringens</i> 'in besi yeri gereksinimleri	7
Tablo 2.3. <i>C. perfringens</i> toksinlerinin özellikleri (Petit, L. ve diğerleri,1999)	8
Tablo 2.4. Biyoreaktör parçaları ve işlevleri (Jagani, ve diğerleri, 2010); (Kaushik, ve diğerleri, 2014).....	27
Tablo 2.5. Proses işletim türleri ve özellikleri (Avili, M.G. ve diğerleri, 2012).....	33
Tablo 3.1. M1-1 Besi yeri komponent miktarları	44
Tablo 3.2. Vitamin hazırlığı için gerekli bileşen oranları	45
Tablo 3.3. SDS alt ve üst jel komponent oranları	51
Tablo 5.1. Yapılan üretimlerde elde edilen sonuçlar	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>C. perfringens</i> Filogenetik Sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.2. <i>C. perfringens</i> tip A mikroskop altında Gram boyama yapılmış görüntüsü	9
Şekil 2.3. <i>Clostridium perfringens</i> alfa toksininin yapısı (Nagahama, M. ve diğerleri, 1996).	13
Şekil 2.4. <i>Clostridium perfringens</i> alfa toksininin yapısı (Nagahama, M. ve diğerleri, 1996).	14
Şekil 2.5. Bir bakteri popülasyonu için tipik bir büyüme eğrisi grafiği (Yates & Smotzer, 2007).....	23
Şekil 2.6. Karıştırılmalı biyoreaktör	30
Şekil 2.7. Kesikli Proses işletim sistemi görüntüsü (Ngibuini & Mwai, 2014).	31
Şekil 2.8. Sürekli proses işletim sistemi görüntüsü (Ngibuini & Mwai, 2014).....	32
Şekil 2.9. Yarı kesikli proses işletim sistemi görüntüsü (Karki, Gaurab, 2017)	32
Şekil 2.10. Mekanik karıştırılmalı tank biyoreaktörü (Jagani, ve diğerleri, 2010).....	35
Şekil 2.11. Hava kaldırmalı biyoreaktör (Siegel and Robinson 1992).	36
Şekil 2.12. Kabarcık kolonlu biyoreaktör (Minhaj Uddin Monir ve diğerleri)	37
Şekil 2.13. Akışkan yataklı biyoreaktör (Kwong, ve diğerleri, 2000).....	38
Şekil 2.14. Dolgulu yataklı biyoreaktör (Siegel & Robinson, 1992).	40
Şekil 2.15. Membran biyoreaktörü (Ho Nam Chang & Shintaro Furusaki).....	41
Şekil 5.1. Bioastat B + CpA alfa toksin üretim sürecinde tüketilen baz grafiği.....	69

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Çalışma yapılan biostat B plus biyoreaktör	49
Görsel 4.1. ÇK-1 kanlı agar saflık kontrolü örneği.....	55
Görsel 4.2. SDS-PAGE jel görüntüsü	56
Görsel 4.3. Çalışma kültür 1 ve çalışma kültür 2	57
Görsel 4.4. Üretim 2 SDS-PAGE jel görüntüsü.....	58
Görsel 4.5. Pendik şusu biyoreaktör besiyeri ortamı görüntüsü	60
Görsel 4.6. ÇK 2 mikroskop altında Gram boyam yapılmış saflık kontrolü görüntüsü	62
Görsel 4.7. Aynı saate ekimi yapılan ATCC ve Pendik şusu görüntüsü.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>C. perfringens</i>	: <i>Clostridium perfringens</i>
α	: Alfa
β	: Beta
ϵ	: Epsilon
I	: Iota
CPE	: <i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoksin Geni
G-C	: Guanin - Sitozin
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik asit
Eh	: Yükseltgenme-indirgenme potansiyeli
a_w	: Su aktivitesi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
NCTC	: Ulusal Tıp Kültürleri Koleksiyonu
CPA	: <i>Clostridium perfringens</i> alfa toksin
CPB	: <i>Clostridium perfringens</i> beta toksin
ETX	: <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksin
IXT	: <i>Clostridium perfringens</i> iota toksin
CPE	: <i>Clostridium perfringens</i> enterotoksin
CPB2	: Beta 2 toksini
PFO	: Perfringolisin O
CM	: Clostridial miyonekroz
C	: Ülseratif kolit

FP	: Gıda Zehirlenmesi;
GI	: Gıda Kaynaklı Olmayan Gastrointestinal Hastalık
NE	: Nekrotizan Enterokolit
ET	: Enterotoksemi
KDa	: Kilodalton
Ma	: Molekül ağırlığı
LD50	: Uygulandığı hayvanların %50'sinde ölüme neden olan doz
L	: Litre
pH	: Hidrojen potansiyeli
rpm	: Dakika başına devir
°C	: Santigrat derece
Mg	: Mikrogram
PC	: Fosfatidilkolinin
SM	: Sfingomiyeline
DAG	: Diasilgliserol
CER	: Seramid
TrkA	: Tropomiyozin reseptör kinaz A
PLC	: Fosfolipaz C
AA	: Araşidonik asit
LDH	: Laktat dehidrojenaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SPH	: Sfingosin
S1P	: Sfingosin-1-fosfat
IP3	: İnositol trifosfat

BoNT	: Botulinum toksinleri
TeNT	: Tetanoz toksinleri
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TNT	: Toksin Nötralizasyon Testi
PCR	: Polimer Zincir Reaksiyonu
LC-MS	: Likit Kromatografi – Kütle Spektrofotometresi
MLD	: Minimal letal doz
TSB	: Tryptic Soy Broth
m ³	: Metre küp
STR	: Karıştırmalı tank biyoreaktörleri
CSTR	: Sürekli karıştırmalı tank biyoreaktörleri
CO ₂	: Karbondioksit
μ	: Mikron
Spp	: Species (tür, çoğul)
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
OD	: Optik dansite
Nm	: Nanometre
Å	: Angstrom
G	: Gram
Eh	: Oksidasyon/Redüksiyon Potansiyeli
İP	: İntraperitonel
İV	: İntravenöz
ml	: Mililitre
Mg	: Miligram

ÇK	: Çalışma kültürü
BHI	: Brain Heart Infusion Broth
RCM	: Reinforced Clostridial Medium
TFF.	: Tangential Flow Filtration
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
CFU/g	: Koloni Oluşturan Birim/gram



1. GİRİŞ

Clostridium perfringens doğada her alanda yaygın olarak bulunan patojen bir mikroorganizmadır. Toprakta, sulara, soluduğumuz havada, insanların veya hayvanların gastrointestinal sistem florasında bulunabilirler. Bu mikroorganizma α , β , ϵ , ι toksini olmak üzere 4 ana toksinin üretimine göre 5 tipe (A, B, C, D ve E) ayrılır. Tip A dışındaki türler toprakta uzun süre yaşamlarını devam ettiremezler. Yalnızca Tip A hem toprakta hem de insan ve hayvan bağırsak florasında yaşayabilme yetisine sahiptir (Smith, ve diğerleri, 1968).

C. perfringens'in 200'den fazla tanımlanmış türü bulunmaktadır (Markey ve diğerleri, 2013). *C. perfringens*, klinik mikrobiyolojide adı *Clostridium welchii* olarak da bilinmektedir. Kalınlığı yaklaşık olarak 0.8-1.5 μ dur ve uzunluğu ise yaklaşık olarak 4-6 μ dur. *C. perfringens* anaerobiktir ve anaerobik olmakla beraber, aerotoleranttır. Bu nedenle gelişmesi için mutlak anaerobik koşullar gerekmez, ayrıca g-Gram (+), spor oluşturan çubuk şeklinde bir bakteridir. Mikroskop altında genellikle tek ve ikili olarak görünürler, nadiren kısa zincir oluştururlar. Sporları subterminal veya terminal pozisyonda bulunur. Hareketsiz olup, kapsül oluşturur ve jelatini parçalar. Birçok karbohidratı fermente etme yeteneğine sahiptir. *C. perfringens* sülfiti ve nitratı indirgeyebilme yeteneğine sahip olan tek *Clostridium* türüdür (McClane BA, 2000).

Perfringens latince ve ‘‘içten parçalayan’’ anlamına gelen bir terimdir. 1943 yılında İngiltere’de, tavuk eti tüketen okul çağındaki çocuklardan *C. perfringens*'in izole edilmesiyle birlikte, ilk kez gıda kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır (Angelotti, ve diğerleri,1962). Ek olarak I. Dünya savaşı sırasında yüzbinlerce askerin ölümüne yol açan gazlı gangren oluşumunda etkili olduğu rapor edilmiştir (Williamson ED & Titball RW, 1993).

Clostridium perfringens muhtemelen çevrede en yaygın olarak bulunan bakteriyel patojenlerden biridir. İnsanların ve diğer hayvanların normal olarak bağırsak florasında bulunur (Hatheway, C.L. & Johnson, E.A, 1998). Bu bakteri insanlarda çok çeşitli hastalıklara neden olur, gerçekten de özellikle penetrat yaraların ardından *C. perfringens* ile enfekte olduğu pek çok bölgede rapor edilmiştir. En sık görülen *C. perfringens* enfeksiyonları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı..1. *C. perfringens*'in neden olduğu hastalıklar

<i>C. perfringens</i> Türü	Hastalıklar	
	İnsanlarda	Diğer Hayvanlarda
A	Gazlı kangren, gıda kaynaklı, Antibiyotiğe bağlı ve bulaşıcı ishal	Enterotoksemi (kuzular, sığırlar, keçiler, atlar, köpekler, alpakalar, kangurular, domuzlar ve tavşanlar, ren geyiği ve diğerleri) Nekrotik enterit (evcil ve yabani kuşlar) Akut gasrtik dilatasyon (insan dışı primatlar ve diğerleri)
B, D ve E	Tanımlanmamıştır	Enterit ve enterotoksemi (koyun, keçi, kobay, tavşan ve diğerleri)
C	Nekrotizan enterit	Enterotoksemi (kuzular) Nekrotik enterit (domuz yavruları, kuzular, buzağılar, taylor ve kuşlar)

Clostridium perfringens'in neden olduğu gıda zehirlenmesinde, kırmızı et veya kümes hayvanları eti gibi yiyeceklerin, pişirilmesi sırasında, *C. perfringens*'in vejetatif hücreleri ölür, ancak olumsuz koşullarda hayatta kalabilen sporlar oluştururlar. Bu yiyeceklerde soğutma işlemi yavaş olursa, sporlar yüksek sayıda çoğalabilen vejetatif hücreler geliştirmeye başlar. Yüksek derecede kontamine olmuş yiyecekler yenildiğinde ise hücreler bağırsakta büyüyemeseler de bağırsakta sporlar oluştururlar ve hücreler sporu serbest bırakmak için parçalandıkça, bağırsağa büyük miktarda toksin salınır. Bağırsağa salınan bu toksinler bazı semptomlar gösterirler. Bu semptomlar sulu ishal ve genellikle kendiliğinden geçen karın ağrısını şeklinde görülür (McClane BA, 2007).

Hastalık tipik olarak kontamine gıdanın yenmesinden 8-15 saat sonra ortaya çıkar. *C. perfringens* hücreleri, gıdalar dondurulduğunda veya özel önlemler alınmadığı takdirde uzun süre buzdolabında tutulduğunda canlılıklarını kaybeder.

C. perfringens, çoğu hayvan türünün bağırsak normal florasında, az sayıda bulunur ve normal bağırsak hareketiyle kolayca uzaklaştırılabilen az miktarda toksin üretir, ancak bağırsak ortamı diyetteki veya diğer faktörlerdeki ani değişiklikler tarafından değiştirildiğinde, *C. perfringens* çoğalır ve lokal olarak hareket eden veya konak üzerinde genellikle yıkıcı etkilerle genel dolaşıma emilen güçlü toksinler üretirler. Hastalıklar genellikle koyun, keçi ve diğer hayvanlarda enterotoksemi olarak adlandırılır (Uzal & Songer, 2008). Enterotoksemi dünya çapında koyun ve keçilerde en sık görülen hastalıklardan biridir. Dünyanın dört bir yanındaki ülkelerden gelen raporlar, enterotokseminin yaygınlık oranlarının %24,13 ile %100 arasında değiştiğini bildirmiştir (El Idrissi AH & Ward GE, 1992).

Gelişmiş ülkelerde rapor edilen çoğu *C. perfringens* gıda zehirlenmesi vakası A tipi suşlardan kaynaklanmaktadır. Tip C, nadir, şiddetli, nekrotik enterite neden olur (Bates & Bodnaruk, 2003). Tüm *C. perfringens*'in %5'inden azı Tip A, hastalığa neden olan enterotoksin üretiminden sorumlu geni (cpe geni) taşır. Sadece bu geni bir kromozomda (C-Cpe) taşıyan suşlar gıda kaynaklı hastalıklara neden olur (Sarker, 2000); (McClane, 2007).

Clostridial hastalıklar, sığır ve koyunların sağlığı ve üretkenliği için ciddi bir tehdit oluşturan *Clostridium* cinsi bakterilerin neden olduğu bir grup bulaşıcı hastalıktır. Enfeksiyon sırasında clostridia, farklı tetikleyici faktörlere yanıt olarak konakçıda hızla çoğalabilirler. Her *Clostridium* türü, farklı etkilere sahip bir veya daha fazla toksin türü üretebilir. *Clostridium*, konakçıya iki yoldan girebilir. Oral yol, sindirim sisteminde büyümelerine ve toksin salınımına izin vererek bağırsak hastalıklarının başlamasına neden olur. Diğer giriş yolu, oksijenden yoksun olan nekrotik dokularda anaerobik bakteri üremesine izin veren bir yaradır. Bu durumda toksinlerin lokal salgılanması kangren oluşturabilir veya toksin merkezi sinir sistemine taşındığında nörolojik bir hastalığa neden olabilir (Popoff & Bouvet, 2009).

Dünya 'nın birçok yerinde klostridial hastalıkların başarılı kontrolü aşılardan sistematik kullanımıyla sağlanmıştır (Lewis, 2011). Ticari olarak temin edilebilen aşılarda, tek bileşenli aşılardan 10 bileşenli aşılara kadar değişen, *Clostridium* türlerinin sayısı bakımından farklılık gösterir. Aşılarda genellikle farklı *Clostridial* türlerinden çözülebilir inaktive edilmiş toksoidler olarak formüle edilir, ancak bazıları, özellikle *C. chauvoei* için inaktive edilmiş hücresel materyalin (bakterin) dahil edilmesi gerekir. *Clostridium* antijenlerine karşı antikor titreleri, uzun zamandır aşı kaynaklı korumanın ana korelasyonu olarak kabul edilmiştir.

Araştırmacı bu çalışmada *C. perfringens* tip A 'nın üretim koşullarının optimizasyonunu yaparak, *C. Perfringens* 'den salgılanan α toksin miktarını artırmayı amaçlamaktadır. Besi yeri pH değeri, besi yeri komponentleri ve besi yeri sıcaklığı α , farklı tip suş ve farklı oranlarda inokülasyon oranının α toksin üretimine etkisi araştırılacaktır. Mikrobiyal büyüme eğrisinde α toksinin maksimum seviyeye ulaştığı inkübasyon süresinde ayrıca belirlenmeyi amaçlanan parametreler arasında yer almaktadır. α toksinin salgılanma miktarı artırılarak, aşı etmeni antijen olarak kullanılabilir. Bu tez kapsamında üretim optimizasyonu yapılacaktır. Optimize edilen üretim şartları ile salgılanan α toksin miktarındaki artış, küçük ölçekli üretimlerle yeterli miktarda toksin eldesi sağlamak amaçlanmaktadır. Elde edilen bu toksinin hazırlanacak olan inaktif aşılarda kullanılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridium Perfringens*' in Tarihçesi

C. perfringens çevremizde en geniş yayılıma sahip patojen sporlu bakterilerden biri olarak bilinir. Amerikalı Dr. Welch ve çalışma arkadaşları tarafından 1892 yılında insan otopsisinden identifiyesini sağlanmıştır. Dr. Welch, enfekte olan kan damarlarında oluşan gaz kabarcıklarını gözlemlemiştir ve bu hastalık etkenini buradan izole ve identifiye etmiştir (Lucey & Grover, 2004). Başlangıçta *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak bildirilen mikroorganizma için *Bacillus welchii*, *Bacillus enteritidis sporogenes*, *Bacillus perfringens*, *Bacterium welchii* veyahut *Clostridium welchii* isimleri kullanılmıştır ve günümüz literatüründe *C. perfringens* olarak tanımlanıp kullanılmaktadır (Welch WH, ve diğerleri, 1892); (Skerman V, ve diğerleri 1980).

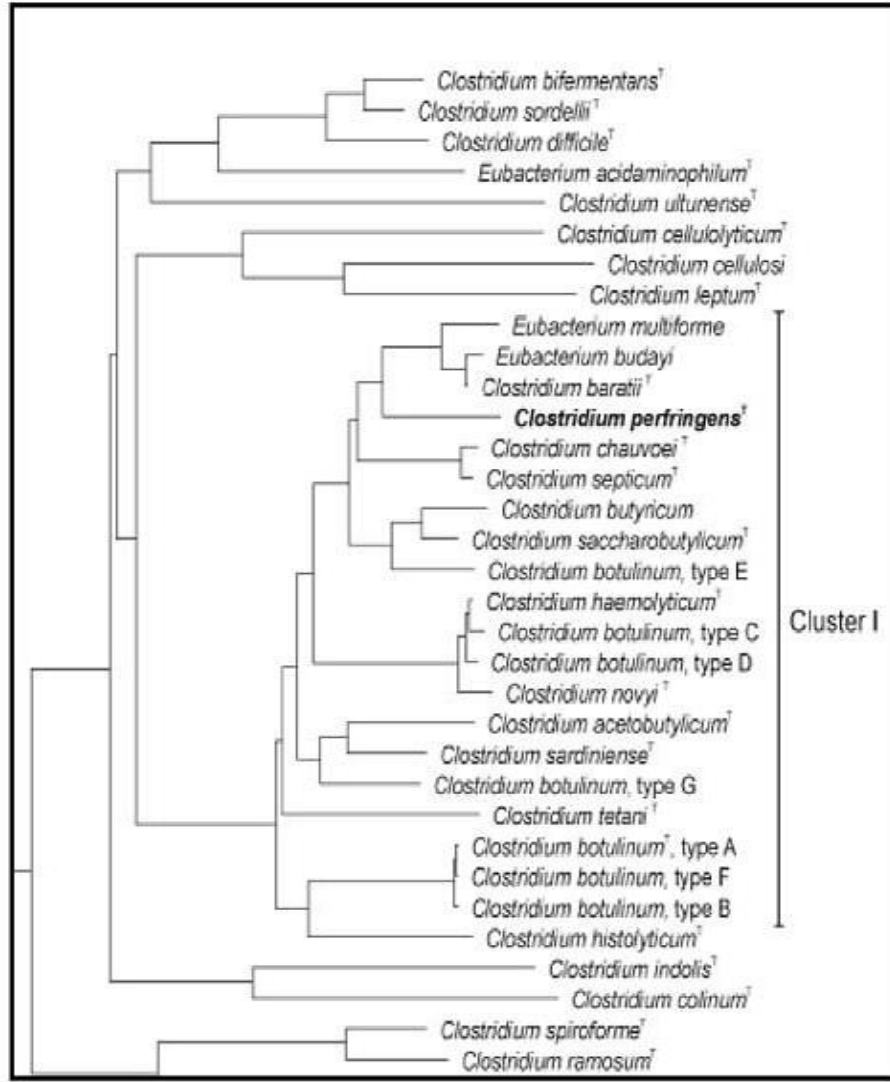
2.2. *Clostridium Perfringens*' in Filogenetik ve Taksonomik Sınıflandırılması

Organizmanın G+C oranı %24-27 mol arasındadır ve 16S rDNA sekans dizisi analizine göre, organizma bu cins içindeki diğer türlere göre düşük G+C oranına sahip olan tipik *Clostridium* I kümesi 'ne aittir (Collins M. D, & Lawson,1994). Aşağıda yer alan tablo 2' de taksonomik sınıflandırılması yer almaktadır.

Tablo 2.1. *C. perfringens* taksonomik sınıflandırılması

Bölüm	: <i>Firmicutes</i>
Sınıf	: <i>Clostridia</i>
Takım	: <i>Clostridiales</i>
Aile	: <i>Clostridiaceae</i>
Cins	: <i>Clostridium</i>
Tür	: <i>C. perfringens</i>

C. perfringens birçok patojenik clostridial türün de yer aldığı *Clostridium* genusunun merkezi olarak bilinen cluster I içinde Ia alt kümesinde *Clostridium botulinum* ile birlikte yer alır (Dworkin M, ve diğerleri, 2006). Şekil 1 de yer aldığı *Clostridium* genusu şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. *C. perfringens* Filogenetik Sınıflandırılması

2.3. *C. perfringens* 'in Özellikleri

Clostridium cinsinin üyesi olup anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde Gram pozitif bakterilerdir. Mikroskop altında tek veya ikili olarak görünürler, nadiren de olsa kısa zincir oluştururlar. Kapsül oluşturlar ve jelatini parçalayabilme yeteneğine sahiptir. *C. perfringens* sülfiti indirgeyen tek *Clostridium* türüdür. Nitrati da indirgerler. Hem insanları hem de hayvanları enfekte eden patojenlerin yanı sıra serbest yaşayan bakteriler olarak bilinirler. Çoğu patojenik *Clostridium* türünün, çok çeşitli hastalıklardan sorumlu olan toksinler ürettiği bilinmektedir (Hathaway, 1990). *Clostridium perfringens*, 15 °C ile 50 °C arasında büyüebilir ve birçok suş için optimum sıcaklık 37 °C 'dir. Çoğu suş için 33 °C ile 49 °C arasındaki sıcaklıklarda üreme süresi (generation time) 20 dakikanın altında, 8 dakika olarak rapor

edilmiştir (Labbe, 2000). Organizma 13'ün üzerinde farklı toksin üretebilir; ancak her bakteri bu toksinlerin yalnızca bir alt kümesini üretir (Petit, 1999).

Anaerobiktir ve son elektron alıcısı olarak nitrat gibi diğer bileşikleri kullanarak anaerobik solunum yapar. *C. perfringens* anaerobik olmakla beraber, aerotoleranttır. Bu nedenle gelişmesi için mutlak anaerobik koşullar gerekmez. En iyi 37 °C 'de gelişir ve patojenik veya patojenik olmayan formun kültürlenmesine bağlı olarak birkaç besiyerinde geliştirilebilir. *Clostridium perfringens*, inorganik elektron alıcısı olarak nitrat kullanarak anaerobik solunum yapabilen anaeroblardır. Bakterilerin enerji elde etmesinin ana yolu bu olsa 'da, fermantasyon gibi enerji ihtiyaçlarını sürdürmek için çok çeşitli metabolik reaksiyonlar da yapabilir ve anaerobik bir ortam oluşturmaya yardımcı olmak için karbondioksit üretir, glikoliz ve glikojen metabolizmasını gerçekleştirebilirler. *C. perfringens*'in genomu yaklaşık 3,6 milyar baz çiftidir. *C. perfringens*'teki DNA tek bir halkadır ve yaklaşık 45 enzimi kodlar. Bu bakterinin yeterli amino asit içermeyen bir ortamda büyümesine izin vermez. Bakterilerin tek kromozomu, %24 ila %55 arasında bir G-C konsantrasyonu içerebilir. Genom, birkaç taşıyıcı için kodlama ile 10 rRNA geni ve 96 tRNA geni içerir (Johansson A, & Aspan A, 2009).

2.3.1. *C. perfringens* 'in besin gereksinimleri

Mikroorganizmalar pH, sıcaklık, su aktivitesi (aw), oksidasyon/redüksiyon potansiyeli (Eh) gibi etkenlere bağlı olarak insanlarda, hayvanlarda ve gıdalarda gelişip çoğalabilmektedirler. Diğer birçok patojen bakteriler gibi *C. perfringens* de uygun ortam ve besi yeri koşulların optimal olduğu zaman hastalık oluşturabilecek sayıya ulaşabilir (Erol İ, 2007). *Clostridium* cinsine ait bakteriler genellikle sığır infüzyon et suyu, glikoz + pepton ve genellikle karaciğer veya maya özü eklenmiş triptik sindirilmiş kazein dahil olmak üzere karmaşık ortamlarda yetiştirilir. *Clostridium perfringens*'in toksin üretimi birkaç araştırmacı tarafından incelenmiştir ve bu amaçla birçok basitleştirilmiş ortam tanımlanmıştır (Taylor & Stewart ve diğerleri, 1941). Bununla birlikte, genel olarak bu ortamlar, enzimatik olarak sindirilmiş kazein, et infüzyonu, et veya karaciğer ekstraktları gibi ekleri olan peptonlara dayanmaktadır.

Yapılan çalışma ile *C. perfringens*'in amino asit gereksinimleri, arginin, glutamik asit, histidin, lösin, fenilalanin, treonin, tirozin ve triptofan olarak belirlenmiştir. Steven B. Goldner ve diğerleri *Clostridium perfringens*'in anaerobik sürekli bir işletim sistemi için minimal bir ortam geliştirmiştir. Bu çalışmada *C. perfringens* ATCC 3624 ve NCTC 10240 kültürleri, pH 7.2' de sınırlı glikozla, kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda sırasıyla 46 °C'de ve 43°C'de

kültüre alınmıştır. Çalışmanın sonucunda kemostat sistem için gerekli olan amino asit, mineral, vitamin ve nükleotid gereksinimleri Tablo 3'te listelenmiştir (Steven B. Goldner, ve diğerleri).

Tablo 2.2. *C. perfringens*'in besi yeri gereksinimleri

Amino Asit	ATCC 3624	NCTC 10240
mg/L 'de minimum gereksinim		
Arginine	31.0	233.0
Glutamic acid	338.0	75.0
Histidine	7.0	3.6
Isoleucine	98.5	74.0
Leucine	22.0	12.0
Lysine	310.0	NRa
Methionine	40.0	39.0
Phenylalanine	38.0	49.0
Threonine	162.0	164.0
Tyrosine	31.0	14.0
Tryptophan	1.6	0.8
Valine	49.0	60.0
Mineraller	ATCC 3624	NCTC 10240
mg/L 'de minimum gereksinim		
Fe	6.0	7.0
K	201.0	201.0
Mg	6.1	5.1
Mn	8.9	10.5
Na	923.0	923.0
Zn	3.1	5.8
Vitaminler	ATCC 3624	NCTC 10240
mg/L 'de minimum gereksinim		
Biotin	9×10^{-4}	1.89×10^{-3}
Nicotinic acid	0.175	0.165
Pantothenic acid	0.7	0.64
Pyridoxamine	0.08	0.025

2.4. *C. perfringens* 'in Türleri

Clostridium perfringens geniş bir toksin üretme kabiliyeti ile insanlar ve hayvanlar için ciddi bir patojendir, histotoksik, enterik ve/veya enterotoksemik hastalıklara sebep olur. Toksin üretimi, geleneksel olarak alfa (CPA), beta (CPB), epsilon (ETX) ve iota (ITX) toksinleri için kodlayıcı genlerin varlığına dayanan bir sınıflandırma sisteminin temeline dayanır (Uzal, F.A & Freedman, 2014). Bu temele göre *C. perfringens* suşları, majör dört toksinin *alpha* (α), *beta* (β), *epsilon* (ϵ), ve *iota* (ι) üretimine dayalı olarak (A, B, C, D ve E) olmak üzere beş farklı türe ayrılır. Bununla birlikte, *C. perfringens*, perfringolisin O (PFO), enterotoksin (CPE) ve beta 2 toksini (CPB2) gibi öldürücü toksinler dahil olmak üzere çeşitli kombinasyonlarda 15'e kadar farklı toksin üretebilir (Layana JA, ve diğerleri, 2006); (Garmory, ve diğerleri, 2000); (Guss SB, 1977). Pek çok *Clostridial* tür gibi, *C. perfringens*'in virülans etkisi toksinlerin üretimine bağlıdır (Hatheway, C.L, 1990). Tüm toksinler herhangi bir suş tarafından üretilmez, bunun yerine her bir izolat toksin taşıma ve üretimi açısından önemli ölçüde farklılık gösterir (Robertson S, 2014). Ancak bu tiplendirme sistemi yakın zamanda iki ek tip içerecek şekilde revize edilmiştir, yani enterotoksin (CPE) üreten ancak CPB, ETX veya ITX üretmeyen *C. perfringens* tip F suşları ve nekrotik enterit B benzeri toksin üreten *C. perfringens* tip G suşları sınıflandırmaya dahil olmuştur (Rood, J.I & Adams, 2018). Aşağıdaki tabloda toksinleri özellikleri detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 2.3. *C. perfringens* toksinlerinin özellikleri (Petit, L. ve diğerleri,1999)

Toxin	Gen	Bulunduğu Türler	Aktivite	İlişkili Hastalıklar	Gen Lokasyonu
Alpha-toxin	CPA	A-B	Fosfolipaz C ve Sfingomyelinaz	CM İnsanlarda ve hayvanlarda	Kromozomal
Beta-toxin	CPB	A-B-E	Por oluşturan toksin	NE İnsanlarda ve hayvanlarda	Plazmid
Epsilon-toxin	ETX	D-B	Por oluşturan toksin	ET Koyun ve keçilerde	Plazmid
Iota-toxin	ITX	E	Aktine özgü ADP ribosiltransferaz	E Koyun, kuzu ve ET tavşanlarda	Plazmid
Enterotoxin	CPE	A	Por oluşturan toksin	FP ve GI insanlarda ve C ve E evcil hayvanlarda	Kromozomal veya Plazmid

CM, Clostridial miyonekroz C, Ülseratif kolit ; E, Enterit FP, Gıda zehirlenmesi; GI, Gıda kaynaklı olmayan gastrointestinal hastalık NE, Nekrotizan enterokolit ET, enterotoksemi

Bu toksinler, genellikle ekspansiyel faz sırasında besi yeri ortamına salgılanır. Diğer toksinlerin aksine, CPE sadece sporlanma sırasında üretilir. Bununla birlikte, *C. perfringens*, türleri laboratuvar şartlarındaki olağan kültür ortamlarında zayıf şekilde sporlanır, bu da CPE saptamasına dayalı enterotoksijenik suşların tanımlanmasını engeller. Cpe genini içeren A tipi suşlar çoğunlukla gıda zehirlenmesi salgınlarından ve ishalleri hayvanlardan ve besi domuzları gibi çiftlik hayvanlarından izole edilir. CPE ayrıca B-E toksinotiplerinin suşları tarafından da üretilir (McClane, B.A., 1996). Birçok *C. perfringens* toksininin hücresel etkisi, hedef hücrelerin plazma membranında bulunan bir reseptöre bağlanmayı, ardından hücre içi yolların aktivasyonunu ve sonunda hücre ölümüne yol açan çeşitli sitopatik etkileri içerir (Uzal, F.A & Freedman, 2014); (Uzal, F.A, 2010).

2.4.1 *Clostridium perfringens* tip A

C. perfringens Tip A, yaygın olarak bulunan bir *C. perfringens* türlerinden biridir yaklaşık olarak küresel popülasyonun %5 'ini oluşturur. Hayvanlarda enfeksiyonun oluşmasına neden olan en önemli faktörler ani diyet değişikliği ve karbonhidrat (veya protein) içeriği fazla olan yem ile beslenmedir. Tip A, α toksinden başka, enterotoksin (CPE) ve β 2 toksin (CPB2) de üretebilir (Songer, 1996). Tip A ve Tip C toksinlerin insanlarda hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. *C. perfringens* Tip A, gıda zehirlenmelerinin ve gıda kaynaklı olmayan ishal ile ilişkili hastalıkların çoğundan sorumludur (Dewey-Mattia, ve diğerler, 2002). Şekil 2 'de bakterinin mikroskop altındaki görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 2.2. *C. perfringens* tip A mikroskop altında Gram boyama yapılmış görüntüsü

Clostridium perfringens tip A, CPA üretir ve ayrıca CPE ve CPB2 dahil olmak üzere birçok farklı toksin üretebilir. Ruminantlarda tip A enterik enfeksiyonların patogenezi hakkında bilgi sınırlıdır ve çoğu zaman çelişkilidir; ancak genellikle çoğu klinik belirti ve lezyonun

CPA'nın etkilerinden kaynaklandığı varsayılır. CPB2 üreten *C. perfringens* tip A da yakın zamanda koyun ve keçiler de dahil olmak üzere birçok hayvan türünde hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Dray T, 2004); (Bueschel DM, ve diğerleri, 2003); (Gkiourtzidis K, ve diğerleri, 2001).

C. perfringens tip A ile kontamine gıdaların 10-54 °C arasında bırakılması veya servis edilmesi bu mikroorganizmanın büyüüp gelişmesi için uygun ortam koşulları oluşturur ve zehirlenmelere sebep olur (McClane BA, ve diğerler, 2001). Yüksek miktarlarda alınan patojen hücre mide bariyerini geçtikten sonra bağırsaklarda spor oluşturur ve orada CPE toksinini üreterek toksini bağırsak lümenine bırakır. Semptomlar 8-12 saat içinde karın krampları ve diyare şeklinde görülür. Genellikle semptomlar 24 saat içinde ortadan kalkan zehirlenme şeklinde görülür. Risk grubunda bulunan yaşlı bireylerde bu durum ölümle sonuçlanabilmektedir.

Clostridial enfeksiyonlar, tüm dünyada görülen ve ani ölümle karakterize birçok hastalığa neden olur. *Clostridium perfringens* Tip A gibi yeni etkenlerin yaygınlığının artmasıyla, buna bağlı olarak bu hastalıklar, hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıklar toksikasyonla seyrettikleri için tedavi edilemezler ve çok hızlı seyrederek yüksek oranda ölüme neden olurlar. *Clostridial* hastalıklardan korunmada en etkili ve tek yöntem aşılama değildir.

2.4.2. *Clostridium perfringens* tip B

C. perfringens'in, en yaygın görülen tipi, *C. perfringens* tip B' dir. *C. perfringens* Tip B, hayvanların sindirim sisteminde düşük miktarda ($<10^3$ CFU/g) bulunur ve α , β , ϵ toksinlerini üretir (Niilo, 1980). Enfeksiyon, mikroorganizmanın belirtilen aralıklarda çoğalmasıyla genellikle (10^8 – 10^9 CFU/g) birlikte β ve ϵ toksin üretmesine bağlı olarak ortaya çıkar (Tarişe, ve diğerleri, 2017). B tipi suş bağırsağa girdikten sonra hızla bölünür ve toksinler üretir, bu da geniş nekroz ve ince bağırsakta kanama ve enterotoksemi ile sonuçlanan enterite sebep olur. Bazen fokal simetrik ensefalomalazi de mevcuttur. Akut vakalarda klinik belirtiler esas olarak hemorajik ishal, karın ağrısı, nörolojik belirtilerden oluşur ve hastalık ilerledikçe klinik belirtilerin başlamasından sonraki 24 saat içinde ölüm meydana gelebilir. Perakut vakalarda hiçbir belirti görülmez ve ani ölüm hastalığın tek göstergesidir. B tipi salgınlar sırasında enfeksiyon oranları %30'u aşabilir ve ölüm oranları %100'e yaklaşabilir. Bununla birlikte, B tipi hastalık salgınları nadirdir ve Birleşik Krallık, Güney Afrika ve Orta Doğu ile sınırlıdır (Songer JG, ve diğerleri, 1996); (Uzal FA, ve diğerleri, 2008). B tipi suşların neden olduğu

ölümcül enterotoksemiler için hem beta toksin (CPB) hem de epsilon toksininin de (ETX) önemli olduğu görünmektedir (Fernandez-Miyakawa ME, ve diğerleri, 2007).

2.4.3. *Clostridium perfringens* tip C

Hem insanlarda hem de çeşitli hayvan türlerinde (atlar, koyunlar, sığırlar ve domuzlar) ortaya çıkan *C. perfringens* tip C enfeksiyonları, enterotokseminin eşlik edebileceği nekrotik enterit olarak kendini gösterir. C tipi hastalığın çoğunluğu, akut veya perakut formda ortaya çıkan ve şiddetli karın ağrısı, kanlı ishal ile nitelendirilir ve yenidoğan hayvanlarda gözlenir.

Clostridium perfringens beta toksini, tip C enfeksiyonlarında ana virülans faktörü olarak kabul edilir (Fisher DJ, ve diğerleri, 2006); (Sayeed S, ve diğerleri, 2008). İnsanlarda C tipi hastalık, Darmbrand veya Pigbel olarak da adlandırılan enteritis nekrotikans (EN) olarak ortaya çıkar. EN vakalarının çoğu, diyetlerin ve tatlı patates gibi tripsin inhibitörleri açısından zengin temel gıdaların tüketildiği gelişmekte olan ülkelerde meydana gelir. EN' in, genellikle diyabet hastaları gibi pankreas fonksiyon bozukluğu olan kişilerle sınırlı olduğu, gelişmiş ülkelerde ara sıra ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Petrillo TM, ve diğerleri, 2000); (Gui L, ve diğerleri, 2002).

2.4.4. *Clostridium perfringens* tip D

Toxino tip D, koyun ve keçilerde klostridial enterotokseminin açık ara en yaygın şeklidir. *C. perfringens* tip D'nin neden olduğu hastalığın patogenezeine çoğunlukla ETX aracılık eder. Bu metabolit, 100 ng/kg'lık bir doz fare için öldürücü dozdur ve en güçlü bakteriyel toksinlerden biridir (Sakurai J, 1995). İnaktif bir prototoksin olarak üretilir ve *C. perfringens*'ten veya konakçıdan bir proteaz tarafından bölündüğünde '1000 kat daha fazla toksik forma dönüştürülür (Bhown AS & Habeeb AFSA, 1977); (Worthington RW & Mulders MS, 1977). Epsilon toksini, sıçan beyin sinaptozomlarına yüksek afinite ile bağlanır (Nagahama M & Sakurai J, 1991).

Koyunlarda D tipi enterotoksemi vakalarının çoğu, diyetteki ani değişikliklerle, genellikle yüksek oranda fermente olabilen karbonhidratlardan zengin yemlerle ilgilidir. Sonuç olarak, büyük miktarlarda sindirilmemiş karbonhidrat ince bağırsağa girer. Bu genellikle, hayvanların tahıllara aşamalı olarak adapte edilmeden ve ilkbahar ve sonbaharda yağmurlardan sonra yemyeşil çimenlere erişim olmadan besi alanlarına getirilmesi ile ilişkilidir (Bullen JJ, 1963). Bağırsak ortamını rahatsız eden diğer faktörler, tip D enterotoksemiye yatkınlık oluşturabilir; ancak bu konuda ikna edici kanıtlar yayınlanmamıştır. Keçileri D tipi enterotoksemiye yatkın hale getiren faktörler hakkında daha da az şey bilinmektedir ve birkaç ay boyunca düzenli saman diyeti ile beslenen keçilerde vakalar meydana geldiği görülmüştür.

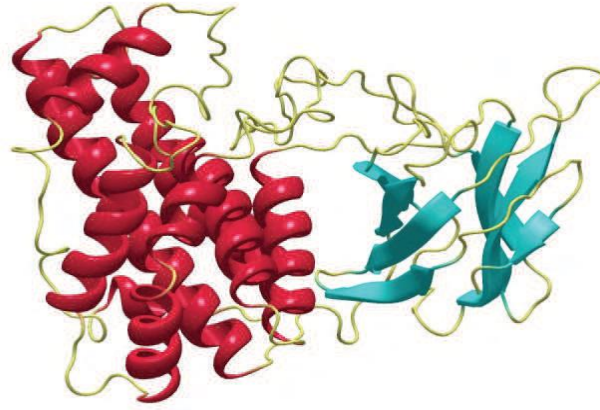
D tipine karşı aşilar, dünya çapında koyun ve keçilerde en sık kullanılan biyolojikler arasındadır. Bu nedenle, hayvan sahipleri ve veteriner hekimler, D tipi enfeksiyonları ekarte etmek için sıklıkla aşı kullanırlar. Bununla birlikte, aşı kalitesi ülkeler ve üreticiler arasında büyük farklılıklar gösterir ve aşılar her zaman doğru şekilde nakledilmez, depolanmaz veya uygulanmaz. Ek olarak, hayvanlar arasındaki antikor tepkilerinde koyun ve keçilerde sıklıkla bireysel farklılıklar görülür.

2.5. *Clostridium Perfringens* Toksinleri

2.5.1 *C. perfringens* alfa (α) toksin (CPA)

Alfa Toxin tüm *C. perfringens* suşları tarafından üretiler; ancak en yüksek miktar alfa toksin tip A suşunda üretilir. Ancak sadece tip A tarafından vejetatif üreme sırasında üretilen toksin lethal doza sahiptir. *Clostridium perfringens* tarafından üretilen en önemli öldürücü dermonekrotik toksinlerden biridir, yaygın olarak alfa toksin olarak bilinen bir fosfolipaz C'dir (PLC). Alfa toksin üretiminde ihtiyaç duyulan optimum besiyeri pH'sı, 6.7-7,5 arasında olduğu bildirilmiştir (Smith & Holdeman, 1968). Alfa toksin geni, 370 aminoasit kodlayan, molekül ağırlığı 43 kDa'dur ve LD₅₀'si 40 ng/kg olan bir metalloenzimdir ve lesitin ve fosfolipidlerin hidrolizini katalize eden bir proteindir (Saint-Joanis, ve diğerleri, 1989). Bu nedenle, bulgular alfa-toksinin PLC ailesine ait olduğunu göstermektedir. BC-PLC'de iki sıkı bağlı ve bir gevsk bağlı çinko iyonu bulunur (Hough, 1989). Yapılan araştırmada Asp-56'nın katalitik aktivite için esas olduğu, bu da toksinin katalitik bölgesinin N-terminal alanında yer aldığını gösterir (Nagahama, ve diğerleri, 1996). Ayrıca, kristalografik çalışma, yapının iki terminal alana bölündüğünü göstermiştir (Naylor, ve diğerleri, 1998): dokuz adet sıkıca paketlenmiş a-heliksinden oluşan N- terminal alanı (250 residual) ve C- terminal alanı (120 residual) sekiz iplikli bir anti-paralel β-sandviç motifi. N- terminal alanının, tüm BC-PLC'ye benzer bir yapısal topolojiye sahip olduğu doğrulanmıştır (Hough, ve diğerleri, 1989). N- terminal alanı, tüm BC-PLC'ye benzer bir yapısal topolojiye ve aktif bölgede çinko iyonları içeren üç iki değerlikli katyona sahip olduğu ve çinko koordinasyonunda yer alan amino asit kalıntılarının enzimatik aktiviteler için gerekli olduğu 'da doğrulandı. Alfa-toksinin C- terminal alanı, kalsiyum bağımlı bir şekilde membran fosfolipidleri ile etkileşimlere aracılık ettiğini bildirilmiştir. Bu nedenle, C-terminal alanı zarlara bağlanmada önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Bu gözlemlerden, alfa-toksinin iki ayrı modülden oluştuğu açıktır: N-alanı, membranlarda fosfolipid hidrolizini katalize eder ve C-alanı, zarlara bağlanır ve zarlara girer. Yapılan alışmada CPA, kalsiyum iyonlarının varlığında konaki hücre zarlarına bağlanan 370 amino asitten oluşan bir çinko metalloenzimdir (Jewell, S.A ve diğerleri, 2015). Alfa toksin 2 ana kısımdan oluşur, bunlar

sitolitik aktiviteye sahip olan C-terminal ucu ve fosfolipaz aktiviteye sahip N-terminaldir. Ayrıca alfa toksin lökositler ve trombosit yıkımlanmalarına sebep olan, hemolitik özellikte, zardaki kapiller geçirgenliği arttırdığıda bildirilmiştir. (Rood JI, 1997).



N- terminal alanı
(Katalitik Alan)

C- terminal alanı
(Bağlanma Alanı)

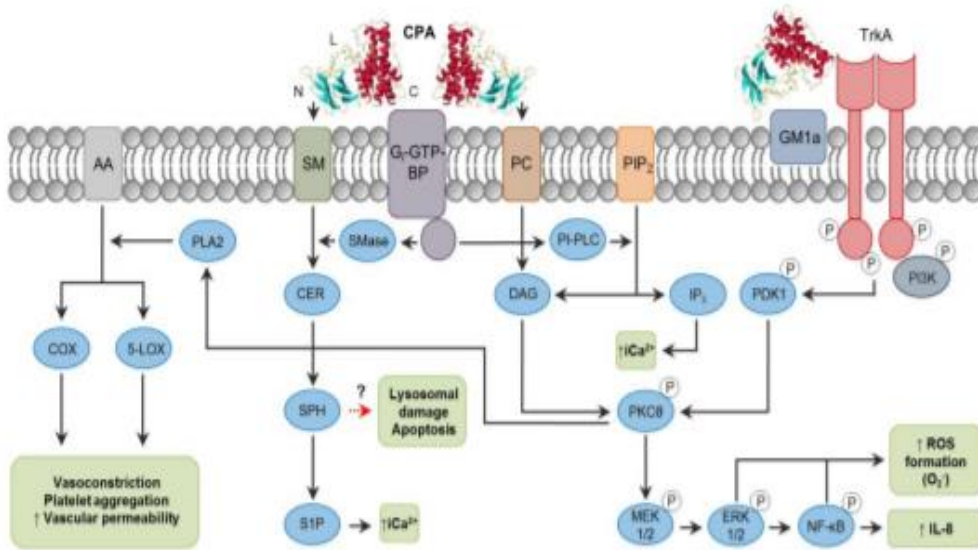
Şekil 2.3. *Clostridium perfringens* alfa toksininin yapısı (Nagahama, M. ve diğerleri, 1996).

CPA'yı kodlayan gen, bakteri kromozomu içinde stabil bir bölgede bulunur ve tüm *C. perfringens* izolatlarında bulunur (Titball, R.W, ve diğerleri, 1999). CPA ölümcül, hemolitik ve dermonekrotik, insan gazlı kangren (klostridial miyonekroz) ile ilgili en önemli virülans faktörüdür (Awad ve diğerleri, 1995). Ve iskelet kası nekrozu, deri altı ödem ve amfizem, şok, çoklu organ yetmezliği ve ölüm ile nitelendirilir (Bryant & A.E, 2003). Ek olarak, Perfringolisin O (PFO) adlı pore forming toksinleri kolesterol bağımlı sitolizin ailesinin bir üyesinin, gazlı kangrende gözlenen patolojik etkileri üretmek için CPA ile sinerjistik olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, hastalıkta PFO'nun rolü küçük görünmektedir (Awad & M.M, 2001). *C. perfringens* tip A, hayvanlarda gazlı kangren vakalarıyla ilişkilendirilmiş olsa 'da, bu türlerde CPA'nın rolü henüz netlik kazanmamıştır (Uzal & F.A, 2010).

2.5.2. Alfa toksin etki mekanizması

CPA'nın aktivitesi oldukça karmaşıktır ve hücre tipleri arasında değişiklik gösterir. Plazma zarındaki fosfatidilkolinin (PC) sfingomiyeline (SM) oranı ve aynı zamanda lokal toksin konsantrasyonlarından etkilenir. Bu nedenlerle CPA'nın aktivitesi birçok farklı yoldan etkilenir (Şekil 2.4). CPA, plazma membranında PC ve SM'yi hidrolize ederek sırasıyla

diasilgliserol (DAG) ve seramid (CER) üretir (Oda M, ve diğerleri, 2015). Bu aktivitelere ek olarak CPA, Gi tipi GTP bağlayıcı proteinler (Gi-GTP-BP'ler) ile etkileşim yoluyla benzer fosfolipaz ve sfingomiyelinaz özelliklerine sahip endojen konakçı enzimleri dolaylı olarak aktive edebilir (Şekil 2.4) (Oda, M, 2008). Bununla birlikte, CPA eylemi yalnızca membran bozulmasıyla sınırlı değildir. Merkezi döngü alanındaki toksinin gangliosid bağlama bölgesi, tropomiyozin reseptör kinaz A'nın (TrkA) hücre zarları üzerinde etkileşimini ve bağlanmasını teşvik eder (Oda M, ve diğerleri, 2012). Bu da MEK/ERK yolunun aktivasyonuna yol açar (Oda M, ve diğerleri, 2015). İlginç bir şekilde, gangliosid eksikliği olan DonQ veya GM95 hücresi, CPA etkisine oldukça duyarlıdır (Flores-Díaz, ve diğerleri, 2005); (Manni M, ve diğerleri, 2017). Gangliosidler, plazma zarının akışkanlığını azaltabilen, fosfolipidlerin daha sıkı bir şekilde paketlenmesine neden olabilen glikosfingolipidlerdir ve ayrıca substratların mevcudiyetini etkileyen elektrostatik değişikliklerle ilişkilidir (Flores-Díaz, ve diğerleri, 2000); (Maggio B, 1994). Bu etkiler, CPA'nın membran bozucu aktivitesine müdahale edebilir ve böylece hücreleri hücre hasarından koruyabilir. Sialik asitler, gangliosidlerin yapısında önemlidir (Yu R.K, ve diğerleri, 2011). Ve bunların *C. perfringens* sialidazlar tarafından uzaklaştırılması, hücrenin in vitro ve in vivo olarak CPA'ya duyarlılığını arttırmıştır (Flores-Díaz, ve diğerleri, 2005). Bu da CPA ile sialidazlar arasında potansiyel bir sinerjizm anlamına gelir. Sialidazların bu sinerjik etkisinin, CPB, CPE ve ETX dahil olmak üzere diğer *C. perfringens* toksinlerinin (özellikle NanI sialidaz) bağlanma/aktivitesini arttırdığı da kanıtlanmıştır (Li J, ve diğerleri, 2011); (Theoret J.R, ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.4. *Clostridium perfringens* alfa toksininin yapısı (Nagahama, M. ve diğerleri, 1996).
C. perfringens alfa-toksin (CPA) hücre içi eyleminde yer alan hücre içi yollar.

CPA'nın (PDB ID:1CA1) bağlayıcı C-domainine (C), katalitik N-domainine (N) ve gangliosid-bağlama döngü alanına (L) dikkat edin. CPA, hedef hücrelerin plazma membranında bulunan fosfatidilkolini (PC) ve sfingomiyelini (SM) doğrudan hidrolize eder. CPA ayrıca plazma zarında bulunan Gi-tipi GTP-bağlayıcı proteini (Gi-GTP-BP) aktive edebilir ve bu da endojen fosfolipazları (PI-PLC) ve sfingomyelinazları (SMase) aktive edecektir. Fosfolipaz aktivitesi, diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3) oluşumuyla sonuçlanır; ikincisi, intrasitoplazmik kalsiyum iyonlarını (iCa^{2+}) harekete geçirir ve artırır. Sfingomyelinaz etkisi, seramid (CER), sfingosin (SPH) ve sfingosin-1-fosfat (S1P) oluşumu ile sonuçlanır. Ek olarak, CPA'nın TrkA reseptörü ile etkileşimi, PDK1 ve PKC θ fosforilasyonuna yol açar, bu da MEK/ERK sinyalleme kaskadı ve reaktif oksijen türleri (ROS) ve IL-8 oluşumunda yer alan NF-KB'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. Kesikli kırmızı ok, mevcut yazarlar tarafından varılan ve/veya önerilenleri temsil eder (Oda, M. ve diğerleri, 2015).

Daha önce bahsedildiği gibi, CPA, Gi-GTP-BP'leri aktive etmenin yanı sıra, dahil olan hücre tipine bağlı olarak farklı yolları tetikleyerek PC ve SM membranına bağlanabilir ve bunlar üzerinde etki edebilir (Şekil 4). Örneğin, at eritrositleri PC'deki intrinsik CPA fosfolipaz aktivitesi ile ve muhtemelen ayrıca endojen fosfatidilinositole özgü fosfolipaz C'nin (PI-PLC) (Ochi S, ve diğerleri, 2003). Aktivasyonu yoluyla parçalanırken, sadece eser miktarda PC içeren koyun eritrositleri esas olarak CPA'dan etkilenir. GTP-BP'ler yoluyla SM metabolizmasının aktivasyonu ile (Oda M, ve diğerleri, 2008); (Ochi S, ve diğerleri, 2004). Tavşan nötrofillerinde ve DonQ hücrelerinde, CPA ile indüklenen süperoksit anyon üretimi, endojen fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ve TrkA reseptörü aracılığıyla PI3K fosforilasyonu ve PDK1, PKC θ , MEK1/2, ERK1/2 sistemi ve daha fazla fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. NF-KB (Oda M, ve diğerleri, 2006); (Monturiol-Gross L, ve diğerleri, 2014). Bu yol, IL-8 mRNA'yı stabilize ettiğine inanılan p38 MAPK'nın aktivasyonuna ek olarak, A549 hücreleri tarafından IL-8'in üretilmesinde de önemlidir (Oda M, ve diğerleri, 2012). Bu bağlamda, gazlı kangrenden etkilenen dokularda nötrofillerin azlığı ve bunların vasküler endotel üzerinde birikmesi, en azından kısmen, nötrofillerin hücre dışı matris proteinlerine sıkı bir şekilde yapışmasını teşvik eden yüksek IL-8'in etkisine bağlı olabilir (Oda M, ve diğerleri, 2012). Son çalışmalar ayrıca, CPA (Takehara M, ve diğerleri, 2016). Tarafından indüklenen periferik kanda nötrofillerin farklılaşması ve yenilenmesinin bozulduğunu bildirmiştir, bu etkiler bu hücrelerde GM1a içeren lipid sallarındaki değişikliklere atfedilmiştir (Takehara M, ve diğerleri, 2016). Ayrıca, gazlı kangren sırasında anaerobik bir mikro ortamın kalıcılığının, iltihaplanma, kas ile ilişkili prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler üreten fosfolipaz A2 (PLA2) yoluyla araşidonik asit (AA) metabolizmasının CPA ile indüklenen aktivasyonunun bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Kasılma, trombosit agregasyonu ve vazokonstriksiyon, azalmış perfüzyonla sonuçlanır (Titball R.W, ve diğerleri, 1999).

2.5.3. Hücre ölümü mekanizmaları

CPA'nın litik konsantrasyonları, nekrozun özelliği olan (Chan F.K, ve diğerleri, 2013). Plazma membranının geniş ölçüde bozulmasına ve laktat dehidrojenaz (LDH) salınımına (Flores-Díaz ve diğerleri, 2005); (Flores-Díaz, M ve diğerleri, 2004). Neden olabilir, CPA'nın alt-litik konsantrasyonları, MEK/ERK yolunun aktivasyonu ve belirli miktarlarda hücrelerde oksidatif strese yol açabilen ve apoptozun intrinsik mekanizmalarını aktive edebilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile ilişkilidir (Elmore S, 2007). Yakın tarihli bir çalışma, düşük bir CPA dozu tarafından indüklenen SM metabolizmasının, CER, N-asiletanolamin ve doymuş yağ asitleri gibi proapoptotik araçların üretimi ve mitokondriyal sitokrom C'nin salınımı, aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Kaspaz-3 ve GM95 hücrelerinde artan fosfatidilserin maruziyeti. Apoptozda yer alan ikinci bir haberci olarak CER'nin rolü daha önce tarif edilmişti (Kolesnick & Krönke, 1998); (Pettus B.J, ve diğerleri, 2002). CER, lizozomların içinde birikebilen ve lizozomların yırtılmasını indükleyebilen, apoptoza dahil olan lizozomal proteazları serbest bırakan sfingosine (SPH) işlenir (Kågedal K, 2001). ROS üretimi ayrıca CPA kolesterol içeren caveola yoluyla endositozlandığında ve endozomal kompartmanlar içinde insan ticareti yolları boyunca sinyal yollarını aktive ettiğinde lizozomal hasara (Johansson A, ve diğerleri, 2010). Yol açabilir, yüksek seviyelerde intrasitoplazmik Ca^{2+} (iCa^{2+}), hem apoptoz hem de nekroz gibi ölümcül olmayan olaylarda yaygın olarak rol oynar (Pinton P, ve diğerleri, 2008); (Zhivotovsky B, 2011). CPA, sfingosinden (SPH) sfingosin-1-fosfat (S1P) ve PIP2'den (Titball R ve diğerleri, 1999). Inositol trifosfat (IP3) oluşumuna yol açar (Şekil 1); hem S1P hem de IP3, mobilizasyon ve iCa^{2+} artışı ile ilişkilidir (Blom T, ve diğerleri, 2005). Ancak bildiğimiz kadarıyla, CPA ile ilişkili spesifik hücre ölümü yolları için bir tetikleyici olarak iCa^{2+} 'nın rolü araştırılmamıştır.

2.5.4. *C. perfringens* beta (β) toksin (CPB)

C. perfringens tip B ve C her iki tür tarafından üretilen β toksin 336 aminoasit içeren tek polipeptid zincirden oluşur. Toksin üretimi için ihtiyaç duyulan optimal pH değeri 7 olup bu pH değeri ince bağırsak pH'sına yakın bir değerdir (Smith ve Holdeman 1968). β toksinin karakteristik izoelektrik noktası yaklaşık 5.4- 5.5'dir (Uzal & McClane 2011). CPB, plazmit kodlu gen *cpb* tarafından kodlanır ve beta pore forming toksinler olarak bilinen heptamerik proteinler ailesinin bir üyesidir (BPFT) (Gurjar A & Li J, 2010). Bu genin ifadesi, 336 amino asitli bir protoksin ile sonuçlanır. Salgılandığında, 27 amino asitlik bir sinyal peptidi oluşturulur, bu da 34.861 kDa'lık aktif toksin ile sonuçlanır. Bu toksin, plazma zarında fosfatidilkolin ve kolesterolden oluşan lipid mikro alanları içinde yaklaşık 228 kDa ve 12 Å

Hedef hücrenin sitoplazmasına girerek ADB ribozilasyon reaksiyonu ile protein sentezini inhibe edici etki gösterir ve hücre ölümüne sebep olur (Songer, 1996 & Aras, 1998).

2.5.7. *C. perfringens* enterotoksin (CPE)

Clostridium perfringens enterotoksin, gıda zehirlenmesi ve gıda kaynaklı olmayan insan gastrointestinal hastalıklarının patogeneğinde rol oynayan başlıca virölans faktörüdür. *C. perfringens* enterotoksin (CPE), tıbbi açıdan en önemli *C. perfringens* toksinleri arasında yer almaktadır. Tüm *C. perfringens* izolatlarının sadece %5'inden azını temsil etmesine rağmen, CPE+ tip A suşları önemli enterik patojenlerdir. Enterotoksin geni, cpe, gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açan izolatlarının kromozomunda bulunur; ancak gıda kaynaklı olmayan gastrointestinal hastalık izolatlarında ve veteriner izolatlarında büyük bir plazmit üzerinde bulunur. Cpe geni kromozom ya da plazmitler tarafından kodlanır ve toksinin ifadesi sadece sporülasyon sırasında meydana gelir (McClane B.A, 2013). CPE, 319 amino asit içeren tek bir polipeptitten oluşur. CPE, daha önceleri CPE+ tip A suşları olarak bilinen *C. perfringens* tip A suşları tarafından sporülasyon sırasında üretilen por oluşturan bir toksindir (Rood J.I, 2018). Bununla birlikte, C ve D toksinotiplerine ait CPE üreten suşlar da yaygındır (Li J, 2010). E tipi suşlar, sessiz bir cpe geni taşıyabilir veya bir varyant CPE üretebilir (Miyamoto K, 2011). Ancak tip B tarafından üretilmez. Deneysel ve epidemiyolojik kanıtlar, insanlarda *C. perfringens* tip A ile ilişkili gıda zehirlenmesinde rol oynayan ana virölans faktörü olarak CPE'yi göstermektedir. *C. perfringens* tip A suşları ayrıca tüm antibiyotik ilişkili diyare (Antibiyotik kullanımı sonrası gelişen ishal) vakalarının yaklaşık %5-10'unda yer alır (Carman R.J, 1997). CPE ile ilişkili gıda zehirlenmesinin semptomları arasında ishal ve karın krampları bulunur ve bunlar genellikle bir veya iki gün sonra kendiliğinden düzelir (McClane, 2013). Bununla birlikte, kabızlık veya fekal impaksiyonda dahil olmak üzere belirli predispozan koşullar altında, CPE öldürücü olabilir (Bos J, 2005).

2.6. Toksin Tayin Yöntemleri

Yapılan çalışmalarda alfa toksin tayininde kullanılan birçok yöntem olduğu gözlemlenmiştir. Aşağıda en çok kullanılan yöntemler bildirilmiştir. Bu yöntemler ve bu yöntemle analiz edilen materyal verilmiştir.

ELISA - (Toksin)

SDS- PAGE – (Toksin)

Toksin Titrasyon Testi ve Toksin Nötralizasyon Testi (TNT) - (Toksin aktivitesi)

PCR - (Gen)

LC-MS - (Cpa Protein)

Toksinlerin kesin tanısı için, kültürden ürün sıvısı toplanarak süpernatant elde edilerek *C. perfringens* toksinleri tespit edilebilir. Toksinin tiplendirme genellikle oluşturduğu majör toksinlerin etkisinin nötralizasyonuna dayanır. Toksin nötralizasyonu, toksine özgü antiserum kullanılarak nötralizasyon gerçekleştirilir. *C. perfringens*'in toksin tiplendirmesi 1931'den günümüze kadar dermonekrotik test veya in vivo test olarak Toksin Nötralizasyon Testi (TNT) ile yapılmıştır (Pettit, ve diğerleri, 1999). Bu yöntemlerle toksinlerin tespiti için, toksin verilen faredeki letal gücü veya kobaylardaki dermonekrotik etkileri sonucu alınan veriler değerlendirilir. Fare TNT ile uyumludur ve bu sebeple alfa toksin tespiti için en uygun seçimdir (Duracova, ve diğerleri, 2018).

Günümüze kadar toksin tayininde deney hayvanı testlerinin yerine, alternatif metotların kullanılması yaygınlaşmıştır. Toksin tayininde kullanılan Toksin Nötralizasyon Testi (TNT) farelere dayalı bir tayin yöntemi olduğu için günümüzde daha az kullanılmaktadır. Bunun sebebi TNT yaygın olarak kullanılmışsa da günümüzde hayvan refahı göz önünde bulundurulduğunda, test sonucunun uzun zaman gerektirmesi ve test sonuçları değişkenlik gösterdiğinden dolayı günümüzde hayvan deneyleri daha az kullanılır.

C. perfringens'in toksinleri stabil değildir ve hızlı bir şekilde yapısı bozulabilir. Analiz için gerekli numuneler kısa sürede analiz edilmezse veya analize kadar uygun olmayan laboratuvar koşullarında muhafaza edilmez ise yanlış negatif sonuçlara neden olur (Stiles, ve diğerleri, 2013); (Duracova, ve diğerleri, 2018). Toksinleri saptanması ve tanımlanmasında son yıllarda pek çok yöntem ortaya çıkmıştır. Bu yöntemler moleküler biyolojik, immünolojik ve MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) testleri uygulanarak MS (Mass Spectrometry) analizi yapılmaktadır (Duracova, ve diğerleri, 2018). Ayrıca, serolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemlerde de kullanılır (Hadimli, ve diğerleri, 2012). Toksinlerinin tespitinde kullanılan metotların çoğu, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniklerine dayanır.

PCR, DNA'nın bir bölümünün in vitro koşullarda hedef toksin genin çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu metot da *cpa* geni varlığına göre tayin yapılabilmektedir. Ancak *cpa* geni tüm *C. Perfringens* (A-E) türlerinde bulunduğu için *C. perfringens* Tip A 'yı belirlemek tek başına yetersizdir. Bu durumda diğer toksin genleri (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve

cpb2) yönünden incelenmesi gereklidir. Ancak diğer toksin genlerin tespit edilmesi ile toksinin türü belirlenebilir. Her bir toksin genlerinin saptanması için spesifik birçok PCR protokolü mevcuttur.

ELISA, bu yöntemde *C. perfringens* alfa toksinine karşı monoklonal antikorlar kullanılır. Testin daha az zaman ve emek ile toksinleri ve organizma türlerini tespit etmede etkili olduğu bulunmuştur. Son yıllarda, *C. perfringens* toksinotiplerini tanımlamak için çeşitli enzim immünoanalizleri geliştirilmiş ve moleküler yöntemler uyarlanmıştır (Naylor, ve diğerleri, 1987). ELISA, reaktiflerin stabilitesi, manipülasyon kolaylığı, yüksek duyarlılık ve özgüllük nedeniyle *C. perfringens*'in toksinotiplendirmesinde etkili bulunmuştur (Jackson, ve diğerleri, 1985). Bu test basittir, nicel sonuçlar sağlamasının yanında belirli bir maliyeti vardır. ELISA, biraz uzmanlık ve özel ekipman gerektirmesine rağmen hassas ve spesifik olmakla birlikte bazı ELISA yöntemleri çapraz reaksiyon veren antikorlardan etkilenecek düşük düzeydeki antikorları saptamada yetersiz kalabilmektedir (Sesardic D, ve diğerleri, 1992). Örneğin, enterotoksemi olduğundan şüphelenilen koyunların bağırsak içeriklerinde alınan örneklerden *C. perfringens* toksinlerinin tespiti için ELISA'nın %95 güvenilir olduğu bulunmuştur (Martin P.K, ve diğerleri, 1994). Sonuç olarak ELISA yöntemi pratik, otomatize edilebilen, çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabileceği, ucuz bir yöntemdir (Pelczar M, ve diğerleri, 1986). Ayrıca ELISA, *C. perfringens* gıda kaynaklı hastalıkların araştırılmasında değerli bir yöntem olarak önerilmektedir. Ancak bu yöntemler toksini etkinliğini belirleyememektedir. Bunun için Toksin nötralizasyon deneylerine ihtiyaç vardır. ELISA teknolojisi hassas ve nicel olup toksin nötralizasyon testi mükemmel uyum sağlar ve bu nedenle farelerdeki zehirlenmeyi doğrulamanın en iyi yollarından biridir.

TNT, Toksin nötralizasyonu testi toksinler baz alınarak yapılan tiplendirme ve toksinin oluşturduğu etkinin nötralizasyonuna prensibine dayanır. Toksin nötralizasyonu, toksine spesifik antiserum kullanılarak gerçekleştirilir. TNT için, genellikle standart toksinler kullanılır, aranan üniteye göre test serum dilüsyonları hazırlanır ve toksin serum karışımları farelere iv/im yolla enjekte edilir. Fareler belirli gün ve süreyle gözlenir ve ölüm durumuna göre serumlarda bulunan antikor değeri IU olarak belirlenir. Artık bu ve benzeri testlerde deney hayvanları yerine, alternatif metotların kullanılması yaygınlaşmıştır. *C. perfringens*'e ait antiserumlarla toksin nötralizasyonunu hedefleyen klasik fare deneyi (TNT), kullanımı günümüzde nispeten daha azdır (Stiles, ve diğerleri, 2013). Fare TNT ile uyumludur ve bu sebeple alfa toksin tespiti için en uygun seçimdir (Duracova, ve diğerleri, 2018). Ancak günümüzde deney hayvanları etik ilkeler doğrultusunda kullanımını göz önünde alındığında,

kullanımı nispeten azalmıştır ve in vitro diğer testlerin kullanımının çoğaltılması amaçlanmaktadır. Fare nötralizasyon testi canlı hayvan kullanımı ve deneyimli ve sertifikalı personel gerektirmesi, uzun zaman alması, fazla miktarda serum gerektirmesi ve çok sayıda örneğin aynı andan çalışılamaması gibi nedenlerden dolayı ise uygun bir test olarak kabul edilmemektedir.

Toksin Titrasyonu Testi, bakterilerinin ürettiği oldukları ekzotoksinlerin MLD (Minimal Letal Doz) değerlerinin saptanması için kullanılan bir test yöntemidir. Bu testte amaç farelerde ölüme neden olup olmadığının saptanmaya çalışılmasıdır. Bu testte aktif bakteri kültürü örnekleri steril ortamda alınır. Alınan bu kültür örneklerinin süpernatantları alınarak farklı oranlarda dilüsyonlar (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/...)toksinin durumuna göre hazırlanarak farelere enjekte edilir. Eğer farelerin hiçbirinde ölüm gerçekleşmez ise toksin üretimi veya sentezi yapılamadığı anlamına gelmektedir. Ancak fare ölümü gözlenir ve bu ölümler 1/32 oranında dilüe örnekte bile gerçekleşir ise toksin varlığını ve toksinin letal gücünün yüksek olduğu anlamına gelir.

LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) tekniği kullanılarak Cpa proteininin tespiti ve miktarının belirlenmesi de mümkün kılınmaktadır. LC- MS, antikor bazlı herhangi bir antijene veya antikora özgü olan çapraz reaksiyona yol açmaz. Ancak ne immünolojik yöntemler ne de LC-MS yöntemi, tayin edilecek toksinlerin biyolojik aktivitesini belirlemez (Payne, ve diğerleri, 1994). Burada toksinin molekül ağırlığına göre tayin edilmektedir.

SDS PAGE, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektrofrezisi yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrışmaları temeline dayanır. En yaygın elektrofrezis tipidir. Proteinlerin tayini için çok uygun bir yöntemdir çünkü suda çözünmeyen proteinler dahil, bütün proteinlerin ayrışması için kullanılır. Proteinlerin büyüklüğü veya altbirimlerinin niteliği bu yöntem ile belirlenebilir. Bu yöntemde proteinlerin içerisinde hareket ettiği çapraz bağ oluşumunu sağlayan poliakrilamit jel kullanılır. Jel oluşumu monomerlerin polimerleşmesi ile sağlanır, oluşan gözeneklerin boyutu analiz edilmek istenen proteinlerin hareketini geciktirecek şekilde küçük olarak ayarlanır. Jel sentetik bir madde olan akrilamit ile akrilamit türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve proteinler bu jelde yürütülür. Polimerleşme derecesi sıcaklık, pH, amonyum persülfat ve Temed (N,N,N',N'- tetrametil - etilendiamin) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan amonyum persülfat, reaksiyon başlatıcı ve temed, katalizör olarak kullanılır. Yöntem polipeptitlerin büyüklüğüne göre ayırma sağlar böylelikle molekül ağırlığı hakkında

bilgi verir. Alfa toksinin yapılan araştırmalarda mA'sı 43 kDa olarak kayıtlara geçiştir. Burada jel derişimi önemlidir. Büyük moleküller için düşük derişimde jel hazırlanması gerekmektedir. Yapılan araştırmalarda %10'luk jel derişimi 18-78 kDa arasında proteinleri ayırmak için idealdir (Alberts B, ve diğerkleri, 2002); (Cooper G.M, 2004).

2.7. Bakteriyel Büyüme Eğrisi

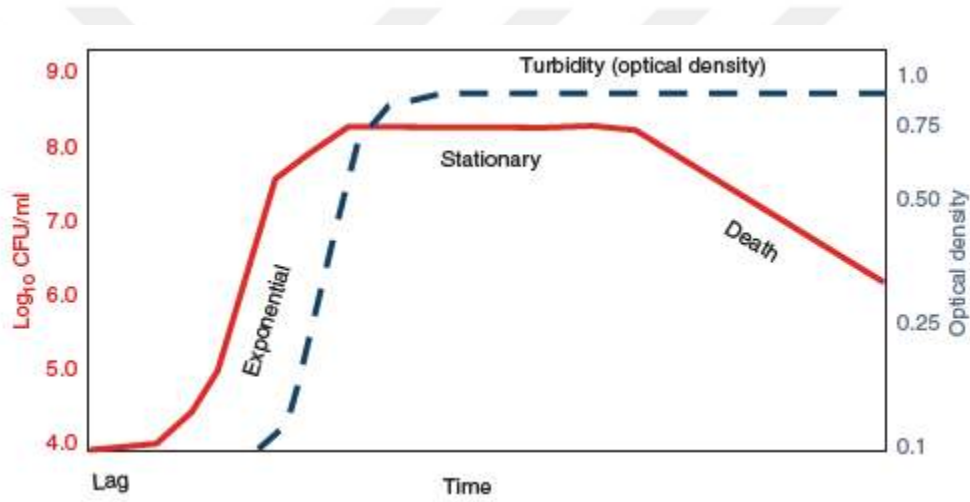
Bakteriyel büyüme, sayısız anabolik (hücre bileşenlerinin ve metabolitlerin sentezi) ve katabolik (hücre bileşenlerinin ve metabolitlerin parçalanması) reaksiyonları içeren karmaşık bir süreçtir. Homojen, zengin bir kültür ortamında, ideal koşullar altında bir hücre 10 dakika gibi kısa bir sürede bölünebilir ve bu bakteriyel mikroorganizmaya göre farklılık gösterebilir. Buna karşılık, hücre bölünmesinin bazı yeraltı karasal ortamlarında her 100 yılda bir'e kadar yavaş gerçekleşebileceği de öne sürülmüştür. Bu tür yavaş büyüme, çoğu yeraltı ortamının hem besin açısından fakir hem de heterojen olduğu gerçeğini ne sürülmektedir. Sonuç olarak, topraktan mikroorganizma izole edilmesi muhtemeldir. Mikroorganizmaların büyümesiyle ilgili mevcut bilgilerin çoğu, mikroorganizmaların saf kültürlerini kullanarak kontrollü biçimde laboratuvar çalışmaları ile elde edilen bilgilerdir. Eğer besiyerindeki besin maddeleri üretim sırasında yenilenmezse (kapalı sistem) zaman içerisinde üreyen mikrobiyal kitle maksimum değere ulaştıktan sonra bir süre sabit kalır. Böyle bir kesikli üretimde ise aşağıda belirtilen fazlar görülür:

Tipik olarak, belirli bir mikrobiyal izolatın büyümesini anlamak ve tanımlamak için hücreler, besinlerin ve çevresel koşulların kontrol edildiği sıvı bir ortama inokülasyon yapılır. Eğer besiyerindeki besin maddeleri üretim sırasında yenilenmezse (kapalı sistem) Ortam, büyüme için gerekli tüm besinleri sağlıyorsa ve çevresel parametreler optimal ise, sayılardaki veya bakteri kütlesindeki artış, bir büyüme eğrisi elde etmek için zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülebilir. Bir büyüme eğrisi içinde birkaç farklı büyüme fazı gözlemlenebilir (şekil 2.5). Bunlar, uyum veya gecikme fazı (Lag Phase), stel faz (Exponential, Log Phase), durağan faz (Stationary Phase) ve ölüm fazını (Death Phase) olmak üzere 4 aşama içerir. Bu aşamaların her biri, hücre kültüründeki tipik fizyolojik değişikliklerle ilişkili olan farklı bir büyüme dönemini temsil eder. İlerleyen bölümlerde görüleceği gibi, her aşamayla ilişkili büyüme oranları oldukça farklıdır.

2.7.1. Gecikme veya uyum fazı (Lag faz)

Bir mikrobiyal popülasyon taze bir besiyerine inoküle edildiğinde, büyüme genellikle hemen başlamaz. Mikroorganizma, taze besiyeri koşullarına uyum göstermek için bir adaptasyon sürecinden geçer. Büyüme hızının esasen sıfır olduğu aşamadır. İnokulum taze

besiyerine yerleştirildiğinde, gecikme fazı adı verilen bir süreden sonra büyüme başlar. Gecikme aşaması, başlangıç popülasyonu iki katına çıktıktan sonra üstel aşamaya geçiş olarak tanımlanır (Yates & Smotzer, 2007). Gecikme fazının, hücrenin kültür koşullarına fizyolojik adaptasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu, yeni kültür gereksinimlerini karşılamak için spesifik haberci RNA (mRNA) ve protein sentezinin uyarılması için bir zaman gereksinimini içerebilir. Gecikme fazı ayrıca ekzoenzimlerin (hücreden salınan enzimler) ve büyüyen hücrelerden sızan besinlerin seyrelmesine neden olan organizmaların düşük başlangıç yoğunluklarından da kaynaklanabilir. Normalde, bu tür malzemeler birbirine yakın hücreler tarafından paylaşılır. Ancak hücre yoğunluğu düşük olduğunda, bu malzemeler seyreltikdir ve kolayca alınamaz. Sonuç olarak, hücre büyümesi ve bölünmesinin başlaması ve üstel faza geçiş yavaşlayabilir.



Şekil 2.5. Bir bakteri popülasyonu için tipik bir büyüme eğrisi grafiği (Yates & Smotzer, 2007)

Gecikme aşaması genellikle dakikalardan birkaç saate kadar sürer. Gecikme fazının uzunluğu bir dereceye kadar kontrol edilebilir çünkü bu, başlangıç inokulum boyutuna olduğu kadar ortamın tipine de bağlıdır. Örneğin, triptikaz soya suyu (TSB) içindeki bir üstel faz kültüründen bir aşı alınırsa ve aynı büyüme koşulları (sıcaklık, çalkalama hızı) altında 106 hücre/ml'lik bir konsantrasyonda taze TSB ortamına yerleştirilirse, fark edilebilir bir gecikme aşaması olmamalıdır. Ancak inokulum durağan fazlı bir kültürden alınırsa, durağan faz hücreleri yeni koşullara uyum sağladığı ve fizyolojik olarak durağan faz hücrelerinden üstel faz hücrelerine geçtiği için bir gecikme fazı daha uzun olacaktır. Benzer şekilde, aşı TSB'den başka bir ortama, örneğin tek karbon kaynağı olarak glikoz içeren bir mineral tuz ortamına yerleştirilirse, hücreler glikoz katabolizması için uygun enzimleri sentezlemek üzere fizyolojik olarak yeniden organize olurken ve değişirken bir gecikme fazı gözlemlenecektir. Son olarak,

inokulum boyutu küçükse, örneğin 10^4 hücre/ml ve aktivite ölçümünden birinin substratın ortamdan yok olması gibi, popülasyon yaklaşık 10^6 hücre/ml'ye ulaşana kadar bir gecikme fazı gözlemlenecektir.

2.7.2. Üstel faz (Log-Exponential faz)

Kesikli bir sistemde gözlemlenen büyümenin ikinci aşaması, üstel aşamadır. Üstel faz, bir üstel büyüme periyodu ile karakterize edilir. Kesikli sistemde mevcut koşullar altında mümkün olan en hızlı büyümedir. Yani bu evrede büyüme hızı maksimum ve sabittir. Hücre popülasyonu geometrik olarak artış gösterir, yani mikroorganizma sayısının matematiksel olarak üst cinsinden arttığı fazdır. Üstel büyüme sırasında, kültürdeki hücrelerin artış hızı, herhangi bir zamanda mevcut olan hücre sayısı ile orantılıdır. Üstel büyüme sırasında hücre sayısının 2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 geometrik ilerlemesinde n bölünmeden sonra hücre sayısı 2^n olana kadar arttığını düşünülmektedir.

Örneğin, ilk hücre sayısı X_0 ise, n katlamadan sonraki hücre sayısı $2^n X_0$ 'dır. Bu örnekten görülebileceği gibi, düşük sayıda hücre ile başlanırsa, üstel büyüme başlangıçta çok sayıda yeni hücre üretmez. Bununla birlikte, hücreler birkaç nesil sonra, her bölünmede yeni hücrelerin sayısı geometrik bir şekilde artmaya başlar. Bir hücre bölünmesinin gerçekleşmesi için geçen süreye üretim süresi veya iki katına çıkma(generasyon) süresi denir.

2.7.3. Durağan faz (Stationary faz)

Büyümenin üçüncü evresi durağan evredir. Bir kültüründeki durağan faz, net büyümenin olmadığı bir durum olarak tanımlanabilir. Bir popülasyon sürekli olarak eksponansiyel oranda büyümemektedir. Sabit fazda net büyüme olmamasına rağmen, hücreler yine de büyür ve bölünür. Büyüme, eşit sayıda hücrenin ölmesiyle dengelenir. Bir kültürün durağan faza ulaşmasının birkaç nedeni vardır. Yaygın bir neden, karbon ve enerji kaynağının veya temel bir besinin tamamen tükenmesidir. Bir karbon kaynağı tükendiğinde, bu mutlaka tüm büyümenin durduğu anlamına gelmez. Bunun nedeni, ölmekte olan hücrelerin parçalanıp bir besin kaynağı sağlayabilmesidir.

Ölü hücrelerde büyümeye endojen metabolizma denir. Endojen metabolizma, büyüme döngüsü boyunca meydana gelir, ancak büyümenin oksijen alımı veya karbon dioksit gelişimi açısından ölçüldüğü durağan faz sırasında en iyi şekilde gözlemlenebilir. Bu nedenle, birçok büyüme eğrisinde, durağan faz aslında az miktarda büyüme gösterir. Yine, bu büyüme, substrat kullanıldıktan sonra meydana gelir ve ölü hücrelerin bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımını yansıtır.

Durağan fazın gözlemlenebilmesinin ikinci bir nedeni ise, atık ürünlerin, hücre büyümesini engellemeye başladıkları veya hücreler için toksik oldukları bir noktaya kadar birikmesidir. Bu genellikle yalnızca yüksek hücre yoğunluğuna sahip kültürlerde meydana gelir. Ortamda toksin maddenin çoğalması ve ortam pH 'nın değişmesi sebebiyle büyüme durabilir. Durağan faza geçişe neden olan ise ortamdaki değişiklikleri indükleyen faktörlerdir, organizmanın kendi aktivitesidir. Hücrelerin durağan faza girme sebebi ne olursa olsun, durağan fazdaki büyüme dengesizdir çünkü hücrelerin bazı bileşenleri diğerlerine göre sentezlemesi daha kolaydır. Bazı bileşenler giderek daha sınırlayıcı hale gelir, hücreler mümkün olduğunca uzun süre büyümeye ve bölünmeye devam edecektir. Bu besin stresinin bir sonucu olarak, durağan fazdaki hücreler genellikle üstel fazdaki hücrelerden daha küçük ve daha yuvarlaktır.

2.7.4. Ölüm fazı (Death faz)

Büyüme eğrisinin son aşaması, kültürlenebilir hücrelerin net kaybıyla karakterize edilen ölüm aşamasıdır. Ölüm fazında bile metabolize olan ve bölünen tek tek hücreler olabilir, ancak kazanılandan daha fazla canlı hücre kaybedilir, dolayısıyla canlı hücrelerin net kaybı olur. Ölüm fazı genellikle üsteldir, ancak hücre ölüm hızı genellikle üstel fazdaki büyüme oranından daha yavaştır.

Hücre büyümesinin ölçülme şeklinin büyüme eğrisinin şeklini etkileyebileceğine dikkat edilmelidir. Örneğin, büyüme optik yoğunlukla ölçülürse ölüm fazının başlangıcı hemen belli olmaz. Benzer şekilde, karbon dioksitte değişimi cinsinden ölçülen büyüme eğrisi incelenirse, yine ölüm fazını ayırt etmek mümkün değildir. Yine de bunlar büyüme ölçümünde yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardır. Normalde çevresel mikrobiyologların en çok ilgilendiği büyüme evreleri gecikme evresi, üstel evre ve durağan evreye başlama zamanıdır.

2.8. Biyoproses İşletim Sistemleri

Biyoproseslerin gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulamaları vardır. Biyoproses, arzu edilen bir fiziksel veya kimyasal değişimi gerçekleştirmek için canlı hücreleri, bileşenlerini veya mikroorganizmaları kullanan bir proses olarak tanımlanır. Biyoproses çalışmaları, biyoproses ve kimya mühendisliği, mikrobiyoloji, biyokimya, genetik ve hatta fizik ve matematik gibi farklı disiplinlerden temel çaba gerektirir (Jagani et al. 2010). Biyoreaktörler, bir dereceye kadar geleneksel kimyasal reaktörden farklıdır. Biyolojik varlıkları barındırır ve onları kontrol ederler. Biyoproses teknolojisi, upstream processes, downstream processing, biyoreaksiyonları kapsar. Biyoreaktör, fermentasyon prosesinin kalbi olarak tanımlanır ve bu biyoreaktör içerisinde birçok reaksiyon ve aktivite meydana gelir. Biyoreaktörler, biyokütle

üretiminin, metabolit biyosentezinin ve biyotransformasyonun meydana geldiği biyoprosesdeki temel unsurdur. Son 10 yılda mikroorganizmalar çok sayıda kimyasal hammadde, enerji kaynağı, enzim, farmasötik hormon, vitamin, polisakkarit, protein, yağ ve aşı vb. üretiminde kullanılmıştır. Biyoprosesler, çeşitli proses parametrelerinden ve her parametrenin optimal koşulundan etkilenir, hem de ekonomik bir proses geliştirmek için bunların birbirine etkileşim etkisinin değerlendirilmelidir.

Mevcut senaryoda, biyoreaktör teknolojisinin geliştirilmesi, mikrobiyal ürünlerin daha yüksek üretkenliği ve kalitesi ile herhangi bir işlem parametresini ekonomik olarak değiştirebilir, bu nedenle bir biyoreaktörün tasarımı ve mimarisi önemlidir ve biyoproses mühendisliğinde yeni bir devrim yaratabilir. Biyoreaktörde yeterli kütle transferi (oksijen), ısı transferi, substratın yetersiz veya aşırı dozda beslenmesinden kaçınarak uygun şekilde beslenmesi sağlanmalıdır. Ayrıca kültür ortamında oluşan gaz ürünü ve yan ürün oluşumunun giderilmesi gerekmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile, birçok faydalı mikroorganizma geliştirmiştir ve büyük ölçekli ekonomik üretimler için, esas olarak uygun bir biyoreaktör sistemlerinin ve proses parametrelerinin geliştirilmesinde fermantasyon teknolojisini ihtiyaç duyulmaktadır. Prensipte olarak biyoreaktör işlemin gerektirdiğinden komplike olmamalıdır ve kullanım sonrası temizliği zor olmamalıdır. Tüm biyoreaktörlerin sahip olmaları gereken bazı özellikler mevcuttur. Bu özellikler biyoreaktör steril şartlar altında işletilebilmeli ve uzun süreli reaksiyonlar için güvenilir olmalıdır. Mikroorganizma tarafından gereksinim duyulan steril havalandırma ve uygun karıştırma hızı sağlayabilmelidir. Güç sarfıyatı mümkün olduğunca az olmalıdır Sıcaklık ve pH, kontrolü sağlanabilmelidir ve amaca uygun olarak sıcaklık, pH, O₂ probu ve seviye, köpük sensörü bulundurulmalıdır. Numune alabilmek için gerekli düzeneğe sahip olmalıdır. Sıvılar ve katılar genellikle biyoreaktörün üst kapağındaki bağlantılarla doldurulabilir. Besi ortamına işletim sırasında asit, baz, antifoam veya komponentler portlar yardımı ile eklenir. Buharlar ve gazlar da üstteki bağlantılardan tahliye edilir. Bu tahliye işleminde uygun por çapına sahip filtreler kullanılır. Sıvılar ve katılar genellikle alttan tahliye edilir. Biyoreaktör genellikle hücrelere besin ve oksijen transferini ve hücrelerden metabolik ürünleri kontrol eden biyomekanik ve biyokimyasal bir ortam sağlar (Sharma, ve diğerleri, 2012); (Bueno, ve diğerleri, 2004).

Tablo 2.4. Biyoreaktör parçaları ve işlevleri (Jagani, ve diğerleri, 2010); (Kaushik, ve diğerleri, 2014)

Biyoreaktör Parçaları	İşlevi
Impellor (agitator)	Ortamin sürekli karıştırılması, oksijenin sistem genelinde homojen dağıtılması ve hücrelerin çökmesini önleme
Sparger (Aerator)	Aerobik fermentasyon prosesinde ortama steril hava veya oksijen verilmesi veya anaerobik prosesinde azot veya karbondioksit verilmesi
Baffles	Girdap oluşumunu engelleyerek daha iyi karıştırma sağlar
Temperature probe	Fermentasyon işlemi sırasında besi ortamdaki sıcaklık değişimini ölçer ve kontrol panelinde gözlemlenir
pH probe	Ortamin pH'ındaki değişikliği ölçer ve gözlemi sağlar
Dissolve oxygen probe	Biyoreaktördeki çözünmüş oksijeni ölçümünü sağlar
Level probe	Seviye probu besi ortamının seviyesini ölçer
Foam probe	Köpüğün varlığını tespit eder
Acid	Ortamı nötralize eder ve pH'ı korur
Base	Asidik ortamı nötralize eder ve gerekli pH'ı korur
Antifoam	Köpük önleyici bozulma ve ortamda köpük oluşumunu önler
Sampling point	Proses boyunca numune almak için kullanılır
Valves	Sıvıların ve gazların akışını düzenler ve sınırlandırır
Control panel	Sistemdeki tüm parametreleri izlenebilmesini sağlar
Exhaust air filter	Besi ortamındaki kirleticilerin dış ortama kaçmasını önler
Inlet air filter	Biyoreaktöre girmeden önce havanın filtrelenerek ortama steril verilmesi sağlar
Cooling Jacket	Prosesin sıcaklığını korumasını sağlar
Valves	Sıvıların ve gazların akışını düzenler ve sınırlandırır
Sampling point	Proses boyunca numune almak için kullanılır

Karıştırma sistemi, köpük kontrolü, oksijen dağıtım sistemi, üst boşluk hacmi, örnekleme portu, sıcaklık ve pH kontrol sistemi, sterilizasyon sistemi ve biyoreaktörü doldurma ve

boşaltma hatlarını içeren biyoreaktörün temel özelliğidir. (Alaghlavi, ve diğerleri, 2013). Tablo 2.4'te. Temel biyoreaktör bileşenleri açıklanmıştır.

Havalandırma, fermentörde uygun miktarda oksijen sağlayarak organizmanın büyümesini destekler.

Karıştırma, hücrelerin standartlaştırılmış besin ortamında homojen bir şekilde karışmasını sağlar. Kabarcıkların parçalanması için gerekli olan yeterli kesme koşullarını sağlar. Çoğu mikrobiyal fermentasyon, rushton türbin tipi bir karıştırıcı kullanır.

Üst boşluk hacmi: Bir biyoreaktörün çalışma hacmi, ortam, mikroorganizmalar ve gaz kabarcıkları tarafından alınan toplam hacminin kesridir ve kalan hacme üst boşluk denir. Genel olarak, çalışma hacmi, toplam biyoreaktör hacminin ~%70-80'i olacaktır. Ancak bu, biyoreaktörün işletimi sırasında köpük oluşum hızına bağlıdır (Van't R, 1991).

Köpük kontrol sistemi, aşırı köpük oluşumu filtreleri tıkadığı için hava çıkışının 'da tıkanmasına yol açtığı ve reaktörde basınç oluşturduğu için biyoreaktörün temel bir unsurudur.

Sıcaklık kontrol sistemi, sıcaklık problemleri, ısı transfer sistemi (ceket, bobin) içerir. Isıtma, elektrikli ısıtıcılar ve kazanlarda üretilen buhar ile sağlanır ve soğutma, soğutma kuleleri tarafından üretilen soğutma suyu veya amonyak gibi soğutkanlarla sağlanır.

pH kontrol sistemi, pH'ı kontrol etmek için nötralize edici maddeler kullanır; bunlar, ortamda seyreltildiğinde aşındırıcı olmamalı, hücreler için toksik olmamalıdır.

Numune alma portları, biyoreaktörlere besin, su, tuz, asit, baz vb. enjekte etmek ve ayrıca küçük ölçekli biyoreaktörlerde numune toplamak için kullanılır.

Temizlik ve sterilizasyon, sistem kontaminasyonunu önlemek için önemlidir. Ekipmanların ekonomik ve büyük ölçekli sterilizasyonları için buharla termal sterilizasyon tercih edilen bir seçenektir. Kimyasal maddelerle sterilizasyon genellikle ısıya duyarlı ekipmanlar tercih edilir. Sterilizasyon, yüzeyler için uv radyasyonu ve sıvılar için x-ışınları ile gerçekleştirilir (Van't R, 1991).

Kullanım amacına göre çok değişik hacimlerde ve şekillerde biyoreaktörler mevcuttur. Bu biyoreaktörlerin boyutları <1 L'den 500.000 L'ye kadar değişebilir. Biyoreaktörün boyutları, mikrobiyal hücreden çalkalama şişesine (100-1000 ml) laboratuvar ölçekli vessel için (1 – 50L) ve pilot seviyeye için (0,3 – 10 m³) ve endüstriyel ölçek için (2 – 500 m³) büyük hacimli endüstriyel uygulamalara kadar geniş ölçüde değişir. Biyoreaktörün imalatı için kullanılan

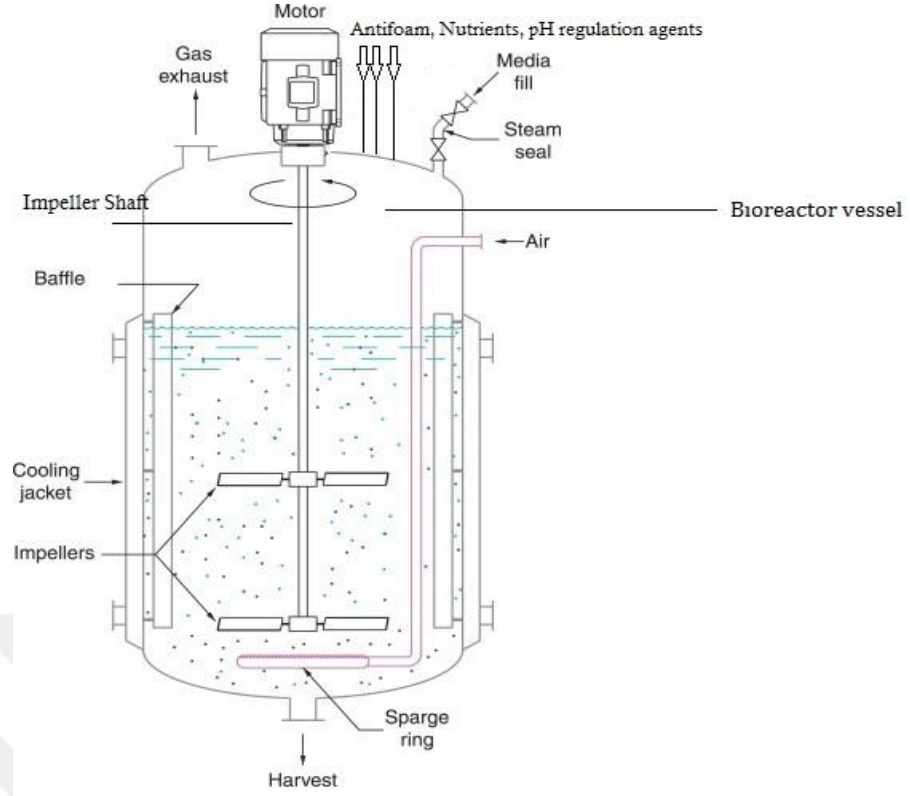
malzeme ise: Laboratuvar ölçekli ve pilot ölçek biyoreaktör tipik olarak cam ile yapılır ve endüstriyel ölçekli vessel normal olarak paslanmaz çelikten imal edilir veya paslanmaz çelikten kaplamaya sahip olmalıdır (Jagriti Singh & Nirmala Kaushik, 2014). İç yüzeyi olabildiğince pürüzsüz olmalıdır.

2.9. Biyoreaktörün Dizayn ve Çalışması

Biyoreaktör tasarımı, geliştirilmiş üretkenlik ve istenen parametrelerin doğrulanması ile düşük maliyetli yüksek kaliteli ürün sağlamalıdır. Biyoreaktörün tasarımı ve çalışma şekli, mikroorganizma üretimine, ürün değerine, istenen ürün oluşumu için gerekli koşula ve üretim ölçeğine bağlıdır. Etkili bir biyoreaktör biyolojik reaksiyon üzerinde olumlu etki sağlar ve minimum kör nokta ile kontaminasyon riskini önler. Biyoreaktörde sermaye yatırımı ve işletme maliyeti dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir (Eibl, ve diğerleri, 2008).

Kültürün havalandırılması aşağıdaki yöntemlerden biri ile sağlanır: atmosferik basıncın artırılması veya oksijenin sınırlı basıncının artırılması ve doğrudan sparger, veya dolaylı olarak membran havalandırma veya ortam perfüzyonu ile sağlanır (Naraendranathanet, ve diğerleri, 1998). Özetlemek gerekirse iyi tasarlanmış bir biyoreaktör basit, ekonomik ve sağlam olmalıdır mekanik tasarım iyi dizayn edilmelidir. Aseptik koşullar altında kolay kullanım olanağı sağlayabilmedir, proste esneklik, ölü bölgelerin kalmaması gerekir. Isı ve kütle transferini sağlayabilmelidir. Biyoreaktör tasarımı pH, sıcaklık, oksijen gerilimini kontrol etmeli, aseptik çalışmaya izin vermelidir. Sistem ayrıca otomatik proses adımlarına da izin vermelidir. Bunların hepsi sadece kontrol için değil, aynı zamanda gelecekteki rutin üretim için de gereklidir (Martin, ve diğerleri, 2004).

Biyoteknolojik proseslerde, biyoreaktör tasarımında özel dikkat gerektiren çeşitli görüşler vardır. Bunlar biyoreaktördeki pH, sıcaklık, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen seviyesi, köpük oluşumu, düşük gaz oranları vb. kontrol için gerekli ve yakından izlenmesi gereken koşullardır (Chen, ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.6. Karıştırılmalı biyoreaktör

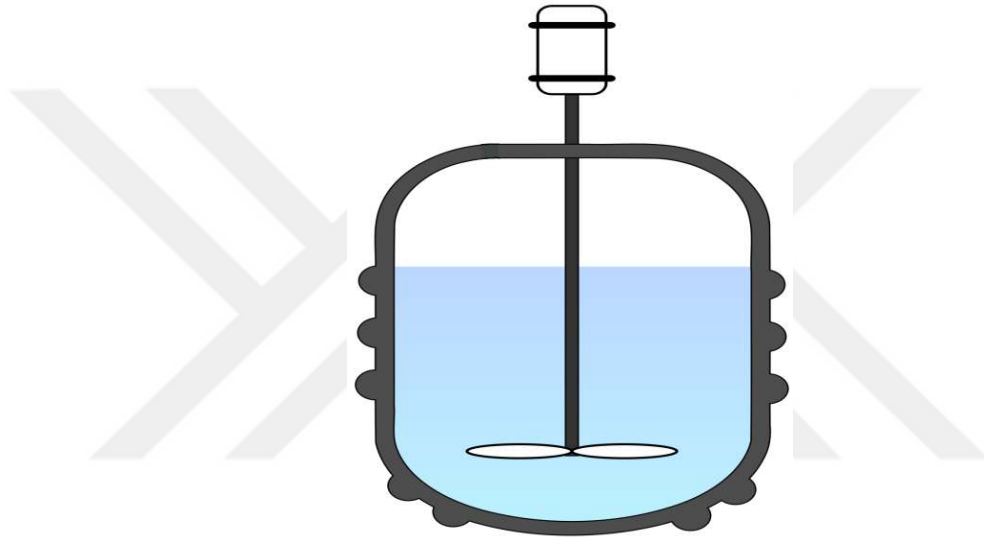
2.10. Biyoreaktör İşletim Sistemleri

Biyoreaktör ortamının ve kültürlerin biyoreaktöre beslenmesine bağlı olarak kesikli, sürekli ve kesikli beslemeli veya yarı sürekli olmak üzere üç farklı çalışma türü vardır (McNeil & Harvey, 2008). Substratın biyokütle ve verimle beslenmesi arasındaki ilişki, mükemmel fermentasyon modunu ortaya koymaktadır (Raj & Karanth, 2006). Yüzyıllardır geleneksel kesikli karıştırılmalı tank reaktörleri (STR'ler) ve sürekli karıştırılmalı tank reaktörleri (CSTR'ler) mevcuttur. Basit olmaları nedeniyle biyoproses endüstrilerinde yaygın olarak kullanılırlar (McNeil & Harvey, 2008). Endüstriyel fermentasyonlar kesikli, kesikli beslemeli veya sürekli kültürler olarak amaca göre işletilebilmektedir.

2.10.1. Kesikli proses

Kesikli proseste, vessel'a yüklenen besi yeri steril edilir ve sterilizasyondan sonra steril kültür ortamına mikroorganizmalar aşılanır. Bu reaksiyon periyodu sırasında hücreler, besin tuzlarını içeren substratlar, vitaminler ve ürünlerin konsantrasyonları zamanla değişir. Proses önceden belirlenmiş bir süre boyunca çalışmasına izin verilir ve belirlenen bu süre sonunda ürün hasat edilir (Carberry James J, 1976). Proses kısmen kapalı bir sistemde gerçekleştirilir. Aerobik kültür şartlarında büyüme ve gelişmeyi teşvik etmek için ortam, sürekli bir oksijen

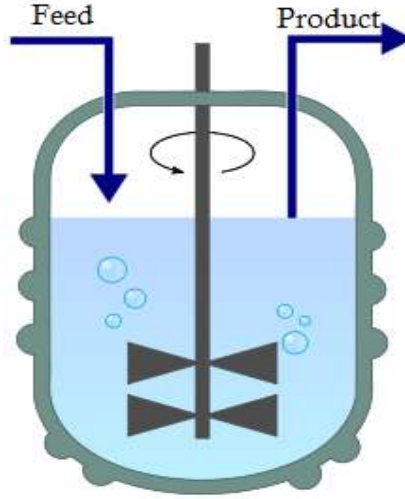
akışı sağlamak üzere havalandırılır. CO₂ gibi gaz halindeki yan ürünler uzaklaştırılır; havalandırma ve gaz giderme işlemleri yarı kesikli şekilde gerçekleşir. Ayrıca pH kontrol çözeltileri işletim sırasında sisteme eklenir. Üretilen ürünler, hücre içi veya hücre dışına salgılansa bile, ürünler işlemin sonunda hasat edilir (Williams J.A, 2002). Kesikli proses tek tank veya vesseldan oluşur ve reaksiyon dizisini kontrol etmek daha kolaydır. Tank, reaktanları entegre ısıtma ve soğutma sistemi ile karıştırmak için bir karıştırıcı sistemi ile donatılmıştır. Bu vessellların kapasiteleri 1 litreden az ile 15.000 litreden fazla olarak bu değerler arasında değişebilir.



Şekil 2.7. Kesikli Proses işletim sistemi görüntüsü (Ngibuini & Mwai, 2014).

2.10.2. Sürekli proses

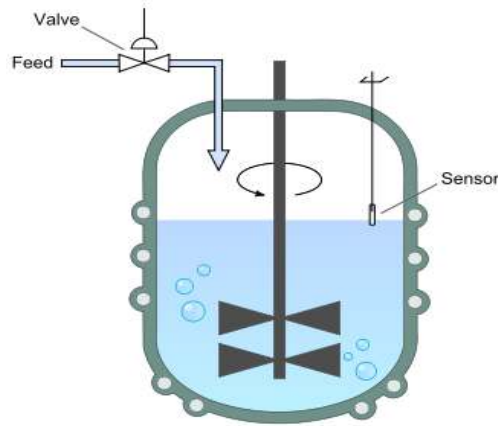
Sürekli mod işletimli bir biyoreaktör için, sürekli olarak taze besiyeri eklenir ve ürünler, kültürle birlikte aynı oranda toplanır, böylece işlem boyunca sabit besin ve hücre konsantrasyonları korunur (Acharya T, 2013); (Abbott M.S.R, ve diğerleri, 2013). Sürekli proses, yüksek hacimli üretim için sıklıkla kullanılır; gaz, sıvı veya çözünür katı substratlar kullanan reaksiyonlar için ve yüksek mutasyon stabilitesine sahip mikroorganizmaları içeren işlemler içinde sıklıkla kullanılır. Kemostat, sürekli proses biyoreaktörü için yaygın bir örneğidir.



Şekil 2.8. Sürekli proses işletim sistemi görüntüsü (Ngibuini & Mwai, 2014).

2.10.3.Yarı kesikli proses

Bu işlem, kesikli ve sürekli reaksiyonların bir kombinasyonu olarak kullanır. Bu proseste, reaksiyon sıcaklığının kontrol edilmesiyle birlikte daha iyi verim için ve daha yüksek seçicilik elde etmek için biyoreaksiyonlar devam ederken ilave besinler biyoreaktöre aşamalı olarak eklenir. Ürünler, kesikli biyoreaktörde olduğu gibi üretim döngüsünün sonunda hasat edilir (Abbott M.S.R, ve diğerleri, 2013). Yarı kesikli reaktörler, kesikli reaktöre göre daha kararludur ve daha güvenli işletim gerçekleştirirler.



Şekil 2.9. Yarı kesikli proses işletim sistemi görüntüsü (Karki, Gaurab, 2017)

Bu işletim sistemlerinin amaca veya üretilmek istenen ürüne göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Tablo 2.5 'te işletim sistemlerinin özellikleri incelenmiştir.

Tablo 2.5. Proses işletim türleri ve özellikleri (Avili, M.G. ve diğerleri, 2012)

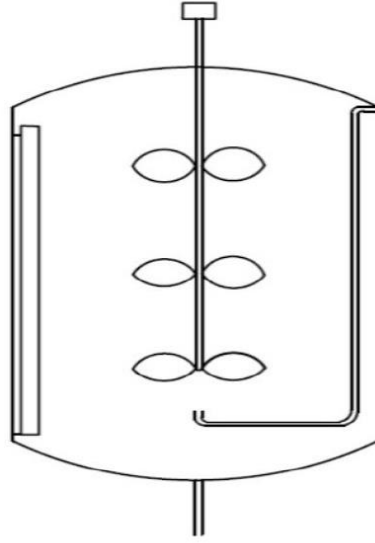
	Kesikli Proses	Kesikli Beslemeli Proses	Sürekli Proses
1	Kesikli fermentasyonda, tüm ortam bileşenleri, kültür başlangıcında biyoreaktöre yerleştirilir.	Kesikli-Beslemeli kültür, besinlerin sistematik olarak eklendiği kesikli fermentasyonda yapılan bir değişikliktir.	Sürekli kültür, besinlerin sürekli olarak biyoreaktöre eklendiği ve kültür (hücreler ve metabolitler içeren) aynı anda çıkarıldığı sürekli bir süreçtir.
2	Fermentasyon kapalı bir sistemde gerçekleştirilir.	Fermentasyon yarı kapalı bir sistemde gerçekleştirilir.	Fermentasyon açık bir sistemde gerçekleştirilir.
3	Bu kesikli bir süreçtir.	Bu yarı kesikli bir süreçtir.	Bu sürekli bir süreçtir.
4	Besinlerin tümü, daha sonra ilaveler yapılmadan, inkübasyonun başlangıcında sağlanır.	Besinler başlangıçta verilir ve daha sonra inkübasyon işlemi sırasında sistematik olarak besin eklenir.	İnkübasyon süreci boyunca besinler sürekli olarak eklenir ve oluşan ürün sürekli olarak dışarı çıkarılır.
5	Ürünler oluştuğunda, tüm süreç durdurulur	Ürünler oluştuğunda, tüm süreç durdurulur	İşlem devam eder ve ürünler sürekli olarak biyoreaktörden alınır.
6	Mikrobiyal büyüme dört aşamadan geçer. Lag faz, Log Faz, Durağan faz, Ölüm fazı	Mikrobiyal büyüme dört aşamadan geçer. Lag faz, Log Faz, Durağan faz Ölüm fazı	Mikrobiyal büyüme, süreç boyunca Lag ve Log fazlarında tutulur.
7	İç ortam sabit kalmaz.	İç ortam sabit kalır.	İç ortam sabit kalır.
8	Besinlerin hacmi aynı kalır.	Besinlerin hacmi artar.	Besinlerin hacmi aynı kalır.
9	Proses başladıktan sonra fermentasyon kurulumu değiştirilmez	Fermentasyon süreci başladığında, ortam dışarıdan değiştirilir.	Fermentasyon süreci başladığında, ortam dışarıdan değiştirilir.
10	İçeride besin maddeleri ve diğer koşullar sınırlı olduğu için devir hızı düşüktür.	Optimal besin seviyeleri korunduğundan, devir hızı orta düzeydedir.	Optimal besin seviyeleri ve diğer koşullar korunduğundan, devir hızı yüksektir.
11	Proses işletim sırasında kontaminasyon ve mutasyon ihtimali düşüktür.	Kontaminasyon ve mutasyon olasılığı vardır.	Kontaminasyon ve mutasyon olasılığı vardır.
12	Proses boyunca mikrobiyal büyüme ve istenen ürün üzerinde daha az kontrol vardır.	Proses boyunca mikrobiyal büyüme ve istenen ürün üzerinde daha fazla kontrol vardır.	Proses boyunca, mikrobiyal büyüme ve istenen ürün üzerinde daha fazla kontrol vardır.
13	Kesikli kültür genelde büyük biyoreaktörlerde gerçekleştirilir	Kesikli beslemeli kültürler küçük biyoreaktörlerde gerçekleştirilir	Sürekli kültürler küçük biyoreaktörlerde gerçekleştirilir.
14	Kesikli kültür ayarlarının kurulumu ve çalıştırılması basittir.	Kesikli beslemeli kültür kurulumu karmaşıktır ve uygulanması ve sürdürülmesi zordur	Kesikli beslemeli kültür kurulumu karmaşıktır ve uygulanması ve sürdürülmesi zordur
15	Ürün verimi düşük	Ürün verimi yüksek	Ürün verimi yüksek
16	İşgücü talebi daha az	İşgücü talebi daha fazla	İşgücü talebi daha fazla

2.11. Biyoreaktör Türleri

Endüstride spesifik amaçlar ve üretilmek istenen ürüne göre yaygın olarak kullanılan biyoreaktör tipleri, Karıştırılmalı tank biyoreaktör, Hava kaldırmalı biyoreaktör, Kabarcık kolon biyoreaktör, Akışkan Yataklı Reaktör, Dolgulu yataklı reaktör, Membran biyoreaktör olmak üzere farklı biyoreaktör türleri mevcuttur.

2.11.1. Karıştırılmalı tank biyoreaktörü (Stirred tank bioreactor)

Karıştırılmalı tank biyoreaktörü (STF) esneklikleri ile bilinir, bu nedenle en sık kullanılan biyoreaktörlerden biridir (Chisti, ve diğerleri, 2010). STF silindir şeklindedir ve STF’de motor şaftı çalıştırır ve tanktaki içeriğin karıştırılması sağlanır. Proses ölçeğine ve diğer durumlara bağlı olarak karıştırıcı alttan veya üstten çalıştırılabilir. Yaygın olarak kullanılan üstten girişli karıştırıcı (karıştırıcı) modelidir, sağlamlık, güvenilirlik gibi pek çok faydası vardır ve kolay çalıştırılır ve nadiren kullanılan ise alttan girişli karıştırıcı modelidir. Şaft, neredeyse bir impeller çapında ayrı olarak yerleştirilmiş ikiden fazla impeller ile desteklenir (Chisti, ve diğerleri, 2010). Farklı uygulamalarda farklı türde karıştırıcılar kullanılmaktadır. Mikrobiyal kültür kapları, genellikle, tankın çevresine eşit uzaklıkta yerleştirilmiş dört baffle ile sağlanır. Baffle genişliği, tank çapının 1/10'u veya 1/12'sidir. Tank iç çeper yakınında sıvının durmasını önlemek için çeper ile baffle arasında tank çapının yaklaşık %1,5'i kadar bir boşluk bırakılır. Karakteristik olarak karar verilecek değişkenleri şunlardır: boyut, tip, impeller ve sparger boyutu. Kullanılan impellerin sayısı, vessel'ın en boy oranına bağlıdır. En alttaki impeller, tankın tabanının üzerinde tank çapının yaklaşık üçte biri büyüklüğü kadar olabilir. Ek olarak impellerların, arasında 1.2 impeller çapında mesafe olacak şekilde aralıkla konumlandırılır. Mekanik Karıştırılmalı biyoreaktörlerde amaca göre farklı türde karıştırıcılar kullanılır: Rushton disc türbine, concave bladed türbine, prochem maxflo T hydrofoil, lightnin' A315 hydrofoil, chemineer hydrofoil ve marine propeller olarak sıralanabilir. Bu tip biyoreaktör şu işlemlere sahiptir. Sıvının havalandırılması, katıların süspansiyonu, homojenizasyon, gaz-sıvı karışımının dağılması ve ısı değişimi. Laboratuvar ölçekli karıştırıcı tank fermentörleri, borosilikat cam ve paslanmaz çelik kapak ile üretilmiştir. Bu fermentörlerin kapasitesi 1 ila 100 L'dir. Paslanmaz çelikli biyoreaktör laboratuvarlarda özel gereksinime sahiptir (Ali, ve diğerleri, 2002). Karıştırılmalı tank biyoreaktörü, muazzam kütle transferi ve avantajlı karıştırma sağlar. İmmobilize hücrelerle vesselda yıpranma sorunu meydana gelir, ancak karıştırma bölgesini bölerek sistem kolayca ve etkili bir şekilde çalıştırılabilir. Karıştırılmalı tank biyoreaktörlerinin bir diğer avantajı, büyüyen hücreler için verimli gaz transferi sağlamalarıdır.

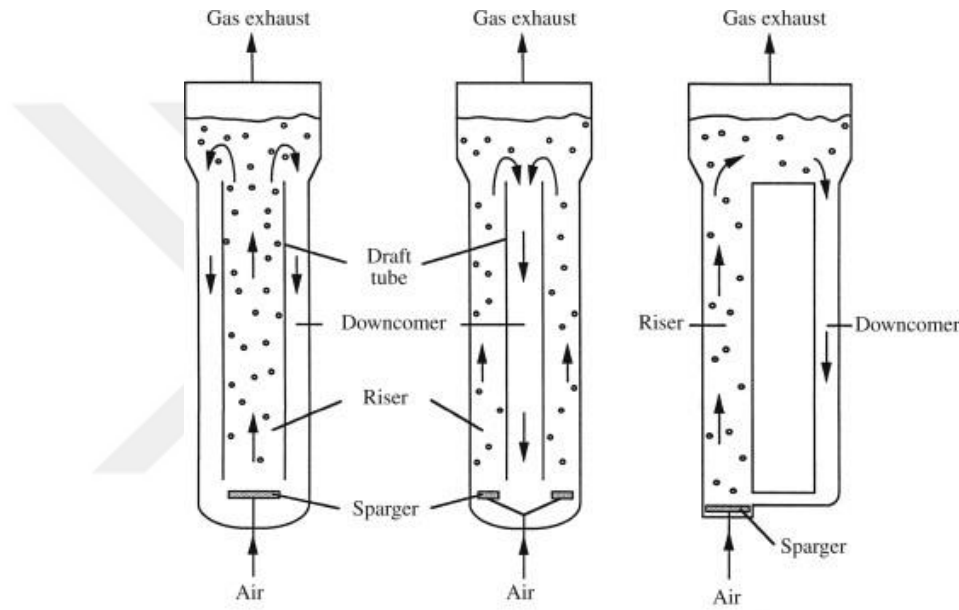


Şekil 2.10. Mekanik karıştırılmalı tank biyoreaktörü (Jagani, ve diğerleri, 2010)

2.11.2. Hava kaldırmalı biyoreaktör (Airlift bioreactor)

Hava kaldırmalı biyoreaktör ayrıca kule reaktörü olarak da tanımlanır. Bir airlift biyoreaktör vessel'ı, kolondan ortama çıkan haznenin dibinde havanın verildiği silindir şeklindedir. Bakteri, maya, mantar ve hayvan ve bitki hücreleri için uygun olan immobilize hücrelerle birlikte veya serbest biçimde kullanılabilme kapasitesine sahiptir. Bu tip fermenterlerde çalkalama sistemi yoktur, ancak kap içindeki içerikler alttan verilen hava ile çalkalanır. Hava kabarcıkları biyoreaktörün çeşitli bölmelerine önemli ölçüde kolandaki hücre karışımı gradient olarak her yere akar. Sirkülasyonu ve oksijen iletimini iyileştirmek ve ekipmandaki kesme kuvvetlerini düzenlemek için hava akımı tüpü veya baffle aracılığıyla akışkanın hacmi birbirine bağlı iki bölge içinde ayrılır (Veera & Joshi, 2001). Bu bölgelerden sadece bir tanesine hava veya başka bir gaz püskürtülür. Gaz püskürtülmüş yükselticideki gaz-sıvı dağılımının kütle yoğunluğu, indiricideki kütle yoğunluğundan daha az olma eğilimindedir; sonuç olarak, dağılım yükseltici bölgede yukarı doğru akar ve aşağı yönde akış meydana gelir. Püskürtme olmayan bölge, indirici olarak bilinir ve gaz veya hava püskürtülen bölge alıcıdır (Chisti & Moo-Young, 2001). Bunlar, harici döngü tasarımı ve dahili döngü tasarımı olmak üzere iki modelde görülür (Chistiet, ve diğerleri, 1999). Örneğin, sitrik asit üretiminde *Aspergillus niger* kullanılarak 900 m³ hacimli airlift fermentör kullanılmıştır. Airlifts Fermentör, sıradan çelik pH 1-2'de çözüldüğü için asitliğe direnmek için paslanmaz çelikten imal edilmiştir. Airlift fermentör, oksijen kütle iletim katsayısının karıştırılmalı tank reaktörlerinden daha yüksek olması nedeniyle genellikle aerobik organizma için uygundur.

Airlift biyoreaktörleri, karıştırmalı biyoreaktörlere kıyasla yüksek enerji verimliliğine sahiptir, ancak her iki türün üretkenlikleri karşılaştırılabilir. Airlift biyoreaktörlerinin ısı ve kütle transfer yetenekleri en az diğer sistemlerinki kadar iyidir ve airlift biyoreaktörleri katıları askıda tutmada kabarcık kolonlardan daha etkilidir. Optimum gaz-sıvı kütle transfer performansı için, bir airlift biyoreaktörleri yükseltici-indirici kesit alanı oranı 1,8 ile 4,3 arasında olmalıdır. Airlift biyoreaktörlerinin tüm performans özellikleri, nihai olarak gaz enjeksiyon hızına ve sonuçta ortaya çıkan sıvı sirkülasyon hızına bağlıdır. Sıvı hızı, biyoreaktörün geometrisinden ve sıvının viskozitesinden de etkilenir. Genel olarak, sıvı sirkülasyon hızı, airlift cihazının yüksekliğinin karekökü ile artar.



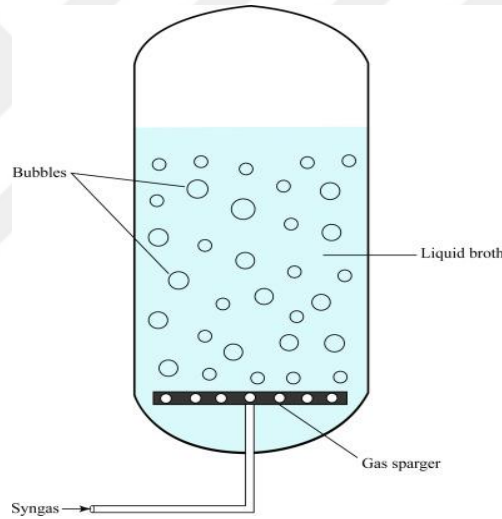
Şekil 2.11. Hava kaldırmalı biyoreaktör (Siegel and Robinson 1992).

2.11.3. Kabarcık kolon biyoreaktörü (Bubble column reactor)

Kabarcık kolon biyoreaktörü, en basit biyoreaktör tiplerinden biridir ve ölçek büyütülmesi kolaydır (Kantarci, ve diğerleri, 2005). Genellikle kolon silindirik ve en-boy oranı 4 ile 6 arasındadır. Bu temel tasarım, vessel'in içine çeşitli türde iç parçalar (örneğin, yatay delikli plakalar, dikey bölmeler) yerleştirilerek değiştirilebilir. Bir kabarcık kolon biyoreaktörü, genellikle alt tarafında gaz sağlayıcı içeren silindirik şekilli bir kaptır. Helmut Gerstenberg ve ark. ilk kez uygulamışlardır (Borakb & Kutlu, 2005). Kabarcık kolon biyoreaktöründe gazın kabarcıklar şeklinde sıvı-katı süspansiyona veya sıvılaştırılmış faza dağıtıldığını bildirmişlerdir. Biyoreaktörde karıştırma, gaz püskürtme ile sağlanır ve otomatik karıştırmaya göre çok az miktarda enerjiye ihtiyaç duyar. Oksijen transferi, karıştırma ve diğer performans faktörleri, esas olarak gaz akış hızından ve sıvının özelliklerinden etkilenir. Gaz

akış hızı arttıkça kütle ve ısı transfer performansı artar. Karıştırıcı kabarcıklarına sahip diğer biyoreaktörlerle karşılaştırıldığında, daha az kesme gerilimi sağlar (Kantarci, ve diğerleri, 2005). Kabarcık kolonlu biyoreaktör, diğer tip biyoreaktörlere kıyasla birçok avantaja sahiptir. Bu tip biyoreaktörler daha az bakım gerektirir ve iyi ısı ve kütle transfer özelliklerine sahiptir, kompakt olmaları ve katalizörün kararlılığı nedeniyle işletme maliyeti daha düşüktür.

Kabarcık kolon biyoreaktörleri, biyokimya, petrokimya, metalurji ve kimya endüstrileri gibi birçok endüstri tarafından kullanılmaktadır (Degaleesan, ve diğerleri, 2001). Bu biyoreaktörlerin özellikle gaz işleminin dönüştürülmesiyle suni yakıtların üretiminde, klorlama, polimerizasyon, alkilasyon ve hidrojenasyon gibi kimyasal işlemlerde ve biyolojik atık su yönetimi ve fermantasyon gibi biyokimyasal işlemlerde kullanımı (Prakash, ve diğerleri, 2001). Devirdaim ile kabarcık kolonları ve hava kaldırmalı biyoreaktörler, özellikle bitki hücrelerinin tüylü kök kültürü için uygundur.



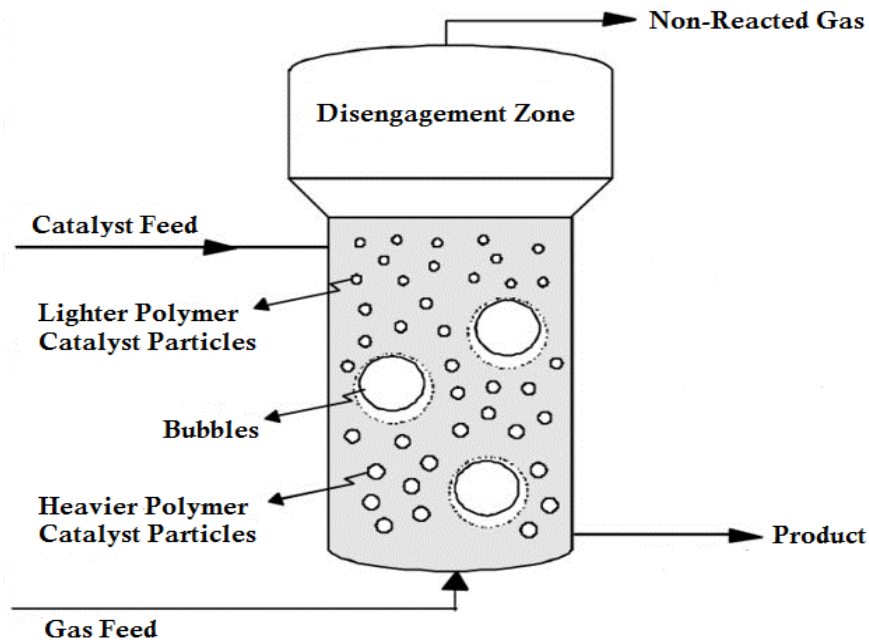
Şekil 2.12. Kabarcık kolonlu biyoreaktör (Minhaj Uddin Monir ve diğerleri)

2.11.4. Akışkan yataklı biyoreaktör (Fluidized bed reactor)

FBB'nin diğer tip biyoreaktörlere göre birçok avantajı vardır, bu nedenle son yıllarda bu tip biyoreaktörlerin kullanımı artmıştır. Akışkan yataklı biyoreaktörler biyolojik sistem için geliştirilmiş biyokatalizör olarak üç fazlı sistem (sıvı, katı ve gaz) olan hücrelere sahiptir. Bu tip biyoreaktör, sıvıyı hareket ettiren küçük boyutlu partiküllerle dolu yatak içerir. Küçük partikül boyutu, hücrelere daha yüksek oksijen transferini, kütle transferini, daha yüksek karıştırma oranlarını ve beslenmeyi hızlandırır. Çoğunlukla FBB'lerde kullanılan bileşenler üç tiptir: (a) Biyokütlenin hücre eki ile üretildiği hareketsiz dolgu. (b) Biyokatalizörün içinde tutulduğu gözenekli parçacıklar. (c) Hücre kümeleri/flokları (kendi kendine

hareketsizleştirme). Akışkan yataklı biyoreaktörde yüksek sıvı basınç düşüşü, kanallanma, tıkanma, yatağın sıkışması gibi meydana gelen bazı sorunlar tamamen önlenebilir problemlerdir. FBB, haznenin altından sürekli olarak pompalanan sıvıyı, yeterli bir hızda yeniden sirküle edilerek süspansiyon halinde tutabilmek için kabın tepesinde genişletilmiş kesit alanına sahiptir (Chisti, ve diğerleri, 2010). Bu biyoreaktörde ortamın çalkalanması pompanın hareketi ile desteklenir. FBB, sürekli proseste yüksek biyokütle konsantrasyonunu ve mükemmel kütle transferini sürdürmek için kullanılan yöntemlerden biridir.

Akışkan yataklı biyoreaktörler, immobilize enzim ve hücre partikülleri gibi sıvı süspansiyonlu bir partikül katalizörü içeren reaksiyonlara uygundur. Geometrik olarak, biyoreaktör, akışkanlaştırıcı sıvının yüzeysel hızını katıları süspansiyon halinde tutmak için gereken değerin altına düşürmek için enine kesitin tepeye yakın bir yerde genişletilmesi dışında kabarcık kolonuna benzer. Sonuç olarak, katılar genişleyen bölgede çöker ve aşağıdaki daha dar biyoreaktör kolonuna geri düşer; bu nedenle, sıvı dışarı akarken katılar biyoreaktörde tutulur. Bir sıvı akışkan yatak, gaz-sıvı-katı bir akışkan yatak üretmek için hava veya başka bir gazla püskürtülebilir. Katı parçacıklar çok hafifse, yapay olarak ağırlıklandırılması gerekebilir, örneğin, paslanmaz çelik bilyeleri normalde hafif olan katı bir matrise gömerek. Katıların yüksek yoğunluğu, fazlar arasındaki bağıl hızı artırarak katı-sıvı kütle transferini iyileştirir. Daha yoğun katıların tortulaşması da daha kolaydır, ancak yoğunluk sıvınıninkine göre çok büyük olmamalıdır, aksi takdirde akışkanlaştırma zor olacaktır. Sıvı akışkan yataklar oldukça durgun olma eğilimindedir, ancak bir gazın verilmesi türbülansı ve çalkalamayı önemli ölçüde artırır.

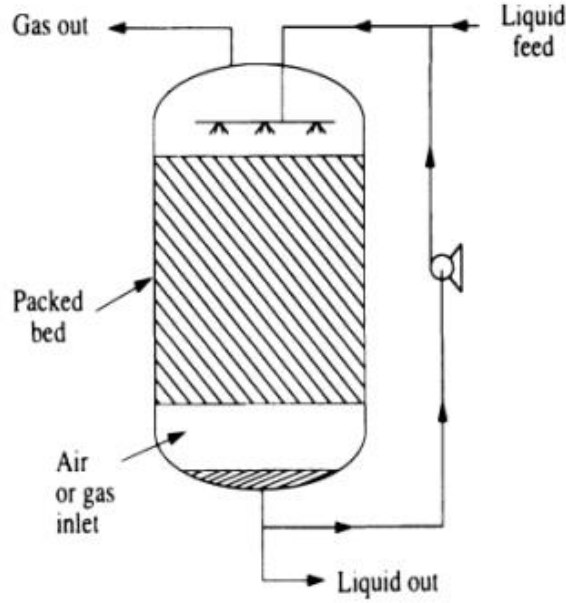


Şekil 2.13. Akışkan yataklı biyoreaktör (Kwong, ve diğerleri, 2000).

2.11.5. Dolgulu yatak biyoreaktörler (Packed bed reactor)

Dolgulu yataklı biyoreaktör, sabit yataklı biyoreaktör olarak bilinir. Dolgulu yataklı biyoreaktörler, substrat ve mikroorganizma ile doldurulmuş ve dolgu malzemelerini desteklemek için delikli bir tabana sahip olan silindir şeklindeki kaplardır. Besinler, dolgulu kolonda immobilize biyokatalizör ile üstten veya alttan beslenir. Çözünmüş besin ve substrattan oluşan sıvı, katı yataktan akar. Akışkanın akış hızı ve yatakta kalma süresi, yatakla alt tabaka temasını artırmak veya azaltmak için kontrol edilir. Üst taraftan havalandırılması, parçacıkların yüksek hava hızlarında akışkanlaşmasını önler, ancak hava akışının yerçekimi ile aynı doğrultuda olduğu için yatak sıkışmasına katkıda bulunacaktır. Dolgulu yataklı biyoreaktör yaygın olarak immobilize hücreler ile muamele edilir. Dolgulu yatağın kurumasını önlemek için, giriş havasının su ile doyurulması gerekmektedir. Biyoreaktör cam, seramik, polimer, doğal malzeme ile hazırlanmış bir dolgu yatağı oluşturur ve sıvının bir uçtan diğer uca akışını sağlayan çeşitli boyut ve şekillerde bulunur. Dolgulu biyoreaktör, daldırılmış modda (havalandırılmalı veya havalandırmasız) veya damlama akış modunda çalıştırılabilir. Yüksek basınç düşüşlerinin oranı, aynı zamanda, biyoreaktörde tıkanmasını önlenabilir (Wang, ve diğerleri, 1992). Kanallardaki akış hızları, bitişik sıvı filmdeki harici kütle transfer sınırlamasını ortadan kaldırmak için yüksek olabilir. Bitişik sıvı filmdeki harici kütle transfer sınırlamasını ortadan kaldırmak için kanallardaki akış hızı artırılabilir. Çalışma sırasında, yatak gözenekliliğindeki değişiklikler nedeniyle, akış özelliklerinde değişiklik meydana gelir. Bunlar normalde substrat inhibisyonu reaksiyon hızını yönettiği anda kullanılırlar. Biyoreaktörde basınç düşüşünü azaltmak için konik yatak kullanılır, yatay yatak, eğimli yatak, döner yatay gibi çeşitli biyoreaktörler kısmi başarı ile test edilmiştir.

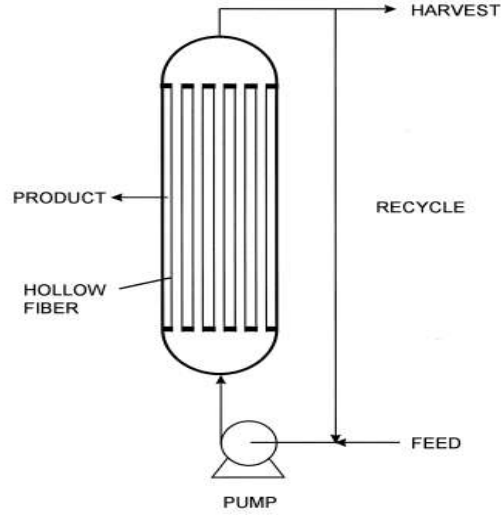
Dolgulu yatak biyoreaktörlerindeki sıcaklık gradyanı, üstesinden gelinmesi gereken ilk engeldir. Diğer bir engel olan oksijen gradyanına kıyasla, dolgulu yatak biyoreaktör içindeki sıcaklık gradyanı mikroorganizmalara daha fazla zarar verir. Sıcaklık belirli bir değeri aştığında, mikroorganizmaların büyümesi baskılanır ve mikrobiyal ölüm meydana gelebilir. Bu biyoreaktörlerin istenmeyen özellikleri arasında zayıf sıcaklık kontrolü, ısı gradyanları, istenmeyen yan reaksiyonlar ve katalizör değiştirme zorluğu yer alır. Ayrıca tıkanıklıklardan ve zayıf oksijen transferinden dezavantajları arasındadır. Çalışma sırasında yatak gözenekliliğinde meydana gelen değişiklikler, bu biyoreaktörlerin akış özelliklerini değiştirir. Bunlar genellikle atık su arıtımında kullanılır.



Şekil 2.14. Dolgulu yataklı biyoreaktör (Siegel & Robinson, 1992).

2.11.6. Membran biyoreaktör (Membrane bioreactor)

Membran biyoreaktör, maya, enzim ve bakterilerin immobilizasyonu için geliştirilmiş hallow fiber sistemi içerir. Hollow fiber, düzenli bir çeper matrisine sahip selüloz asetattan veya düzensiz çeper konfigürasyonuna sahip polisülfon elyaflardan veya akrilik kopolimerden hazırlanır (Raj & Karanth, 2006). Mikrobiyal sistem için hallow fiber biyoreaktörün avantajları, biyokatalizör rejenerasyonu ve biyokütle ile ürünün hemen ayrılmasıdır. Reaktörün başlıca dezavantajları, daha düşük oksijen transfer oranları nedeniyle kültürün büyümesini ve bozulmasını ve aşırı mikroorganizma gelişimini kontrol etmenin ve izlemenin zor olmasıdır. Hücrelerin metabolik aktivitesi, hallow fiberlerde toksik ürünlerin birikmesiyle engellenir. Çeşitli mikrobiyal hücre üretiminde membran biyoreaktörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Chang & Furusaki, 1991). Bu tür bir sistem, hacimsel üretkenliği ve yüksek hücre verimini sağlar. Atık su arıtım proseslerinde kullanımı geniştir.



Şekil 2.15. Membran biyoreaktörü (Ho Nam Chang & Shintaro Furusaki)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

Otoklavlanabilir Biyoreaktör Sistemi (Sartorius Stedim Biostat B Plus), Manyetik Karıştırıcı(Stuart), Otoklav (Systec VX-65), Hassas Terazı (Mettler Toledo), Frigomix Chiller 2000 (Sartorius Stedim), Mikrobiyolojik biyogüvenlik kabini (Nüve), Mikroskop CX31 (Olympus), -80 °C Derin Dondurucu (Nuve DF 490), İnkübatör (Nuve EN 120), Elisa (Rayto), Şarjlı Pipetör (Brand), pH metre (Ohaus ST 2100), Vortex (S, Santrifüj (Sigma), Elektroforez Sistemi (Bio-Rad), Spektrofotometre (Analyticjena), Buzdolabı

2x200 Deney tüpü, 100 mL Cam Şişe Vida Kapaklı, Manyetik balık, Lam, Midisart 2000 0.2 µm PTFE hava filtresi (Sartorius Stedim), PTFE 0.2 µm (Sartorius Stedim), Tek kullanımlık pipet, 50 mL enjektör, beyaz fareler (Swiss albino, İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü)

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve komponentler

pH 4 Solüsyonu (Merck), pH 7 Solüsyonu (Merck), Antifoam (Sigma Aldrich), Tryptone(Neogen), Yeast extract (Neogen), Starch (BD Bioscience), Bacto Peptone (Thermo Scientific), Casamino Acids (Sigma-Aldrich), Beef Extract (Neogen), L-Cystein (Neogen), Dextrose (BD Bioscience), Riboflavin (BD Bioscience), Ethanol (Merck), Biotin (BD Bioscience), NaCl (Merck), Kanlı agar (Liofilchem), İmmersiyon yağı, Formaldehit (Merck), Sulfuric acid (Merck), Calcium Pentothenate (Sigma-Aldrich), Thiamine (BD Bioscience), Pyridoxine HCl (Sigma-Aldrich), Riboflavin (BD Bioscience), 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad), 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad), Tris (Bio-Rad), 10x SDS Buffer (Bio-Rad), TEMED (Bio-Rad), 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 (Bio-Rad), Ammonium Persulfate (Bio-Rad).

3.2. Bakteriyel Suş

Bu çalışmada ACTT-13124 referans kodlu ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü tarafından izole edilen *Clostridium perfringens* tip A bakterisi kullanılmıştır. Suşlar -80 °C %50 gliserollü ortamda derin dondurucuda muhafaza edilmektedir Canlandırılan *Clostridium perfringens* suşu M1-1 Etli besiyerinde 37 °C de inkübe edilmiştir.

3.3. Kullanılan Besi Yeri Komponentleri ve Hazırlanışı

Komponentler tabloda belirtilen oranlarda analitik terazide hassas bir şekilde 2L'lik beherde tartılır. Behere tartılan komponentlerin üzerine bir miktar saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda, içerisine balık atılarak çözünmesi sağlanır. Gözle görülür partikül kalmadığına

emin olana kadar çözdürmeye devam edilir, çözünme sağlandığında saf su ile 1.5 L hacme tamamlanır. Bir süre daha manyetik karıştırıcıda karışması sağlanır.

3.3.1. Çalışma kültürü-1

Etli M1-1 besiyeri için parçalara ayrılmış 100 g yağsız sığır eti kullanılır. 100 g sığır eti 200 mL saf su içinde 20 dakika kaynatılır. Kaynayan etin suyu, filtre kağıdından süzülerek temiz bir şişe içinde toplanır. Tablo 3.1 de verilen besiyeri komponentleri, 200 mL 'ye oranlanarak tartılır. Tartılan komponentler et suyu içinde çözülünceye kadar karıştırılır. Sıvı miktarı kaynama esnasında azaldığından tekrar 200 ml' ye tamamlanır. Sürekli karışan besiyeri çözeltisinin içine pH probu daldırılır, pH 7,2'den düşük ise 5M sodyum hidroksit, 7,2'den büyük ise 2,5M sülfürik asit çözeltisi yavaşça eklenerek pH 7,2'e ayarlanır. Her bir tüpe 20 mL olacak miktarda, 10 adet deney tüplerine veya cam şişelere, et parçaları eşit miktarda dağıtılır. Üzerine, besiyeri ilave edilip, otoklavda 121°C'de 20 dk steril edilir. Sterilizasyon sonrası besiyeri oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. İnokulasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları (B kısım) olan dextrose ve L-cysteine saf suda çözdürülür. Çözdürülen dextrose ve L-cysteine 0,2 mikron filtreden süzülerek steril edilir ve aseptik koşullarda besiyerine ilave edilir. Çalışma kültürü-1, 20 mL olarak 10 adet deney tüpüne ayrılarak hazırlanmıştır. Kullanılacak olan 20 mL ÇK-1 besiyeri içeren deney tüpüne, filtre edilmiş dextrose ve L-cysteine taze olarak eklenir. Diğer deney tüpleri sterilizasyon sonrası daha sonraki denemeler için kullanılmak üzere +4° C'ye kaldırılır.

3.3.2. Çalışma kültürü-2

M1-1 besiyeri için Tablo 3.1 de' verilen besiyeri komponentleri, 500 mL 'ye göre oranlanarak tartılır. Tartılan komponentler çözülünceye kadar karıştırılır. Sürekli karışan besiyeri çözeltisinin içine pH probu daldırılır, pH 7,2'den düşük ise 5M sodyum hidroksit, 7,2'den büyük ise 2,5M sülfürik asit çözeltisi yavaşça eklenerek pH 7,2'e ayarlanır. 10 adet 50 mL lik şişelere hazırlanan besiyeri ilave edilir, otoklavda 121°C'de 20 dk steril edilir. Sterilizasyon sonrası besiyeri oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. İnokulasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları (B kısım) olan dextrose ve L-cysteine saf suda çözdürülür. Çözdürülen dextrose ve L-cysteine 0,2 mikron filtreden süzülerek aseptik koşullarda besiyerine ilave edilir. Çalışma kültürü-2 50 mL olarak 10 adet şişeye hazırlanır. Kullanılacak olan ÇK-2 besiyerini içeren şişeye filtre edilmiş dextrose ve L-cysteine eklenir. Diğer şişeler sterilizasyon sonrası daha sonraki denemelerde kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırılır.

3.3.3. Üretim kültür M1-1 besi yeri

Besiyeri Komponentleri ve 1.5 L'deki miktarları

Tablo 3.1. M1-1 Besi yeri komponent miktarları

1.Tryptone	15 g
2.Yeast extract	7.5 g
3.Sodyum Klorür	7.5 g
4.Starch	1.5 g
5.Bacto Peptone	6 g
6. Casamino Acids	8 g
7. Beef Extract	3 g
8. L-Cystein	0,8 g
9. Dextrose	15 g
10.Antifoam	1.5 mL

L-cystein ve Dextrose dışındaki komponentler saf su içinde karıştırılıp homojenize hale getirilir. 1.5 L'lik bir besiyeri hazırlığı için, L-cysteine ve Dextrose dışındaki komponentler 1450 mL saf su içinde çözündürülür. Geri kalan 50 mL kısım ise ikinci kısım (L-Cystein ve Dextrose) için kullanılır. Hazırlanan besiyeri, huni yardımı biyoreaktöre doldurulur. Biyoreaktörün tüm bağlantıları kontrol edilir. Açık kalan kısımlar kör ile kapatılır. Prob kalibrasyonları yapılır ve biyoreaktör ceketini saf su ile doldurularak otoklavda 121°C'de 20 dk steril edilir. Sterilizasyon sonrası oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. İnokülasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları (B kısmı) olan dextrose ve L-cysteine saf suda çözündürülür. Çözündürülen dextrose ve L-cysteine 0,2 mikron filtreden süzülerek steril edilir ve aseptik koşullarda, inokulasyondan hemen önce, biyoreaktördeki besiyerine ilave edilir. Sistem kurulduktan sonra inokülasyon yapılmadan önce pH değeri 7.2 ye setlenir. Asit ve baz hortumları peristaltik pompalara bağlanır ve manuel olarak pH değeri istenilen değere ayarlanır.

3.3.4. Brain Heart Infusion Broth (BHI)

Dehidre besiyeridir, toz şeklinde kullanılan besiyeridir, besiyeri kutusunda yazılı olan, 1L'deki miktara göre hazırlanır. 56 g BHI bir behere tartılır. Tartılan BHI manyetik karıştırıcıda içerisinde balık atılarak, üzerine bir miktar saf su eklenerek çözünmesi sağlanır. Gözle görülür boyutta partikül kalmadığında su ile 1 L'ye tamamlanır. Sürekli karışan besiyeri çözeltisinin içine pH probu daldırılır ve istenen pH ayarı çözeltiye yavaşça eklenerek yapılır. Besiyerleri, ambalajında belirtilen sıcaklık ve sürede otoklavda steril edilir.

3.3.5. Reinforced Clostridial Medium Besiyeri (RCM)

Dehidre besiyeridir, toz şeklinde kullanılan besiyeridir, besi yeri kutusunda yazılı olan, 1L'deki miktara göre hazırlanır. 57 g RCM bir behere tartılır. Tartılan RCM manyetik karıştırıcıda içerisine balık atılarak, üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlanır. Gözle görülür partikül kalmadığında su ile 1 L'ye tamamlanır. Sürekli karışan besiyeri çözeltisinin içine pH probu daldırılır ve istenen pH ayarı çözeltiye yavaşça eklenerek yapılır. Besiyerleri, ambalajında belirtilen sıcaklık ve sürede otoklavda steril edilir.

3.3.6. Vitamin çözeltisi hazırlanması

Vitamin çözeltisi komponentleri ve 2 L'deki miktarları aşağıdaki gibidir;

Tablo 3.2. Vitamin hazırlığı için gerekli bileşen oranları

Calcium Pentothenate	4,2 mg=0,0042 g
Vitamin B1 (Thiamine)	1,082 mg=0,001 g
Pyridoxine HCl	1,086 mg=0,001 g
Riboflavin	1,086 mg=0,001 g
Ethanol	%25'lik hazırlanan ethanol'den 2 L'lik vitamin çözeltisine 4,6 mL eklenir.
Biotin	0,001 gr tartılıp 5 mL'de çözündürülür ve 90 µl alınıp karışıma ilave edilir.

Vitamin çözeltisi komponentleri iz element halinde olduğu için tartımları zordur. Tartımlarının kolay olması için minimum 2 L hacminde hazırlanmaktadır. Tabloda yazılı, Biotin dışındaki diğer tüm komponentler tartılıp 13,6 mL saf su içinde çözündürülür. Biotin ayrıca hazırlanıp, 2 L'lik vitamin çözeltisine 4,6 mL ilave edilir. Çözelti üzerine 4,6 mL ethanol ilave edilir ve toplam hacim 18,2 mL olur. Sterilizasyon işlemi 0.2 'lik filtreden geçirilerek gerçekleştirilir.

3.3.7. B Kısmı (İkinci kısım)

Bu kısım sterilizasyon sırasında sıcaklık ile bozulabilecek komponentleri içerir ve besi yeri ortamına sterilizasyondan sonra eklenir. Bir kap içerisine Dextrose ve L-cysteine sırası ile 1000 g ve 60 g olacak şekilde hassas bir şekilde tartılır. Tartılan bileşenler kaba bir miktar saf su alınarak çözündürülür ve vitamin ile karıştırılır. Dextrose, L-cysteine ve vitamin çözeltisinden oluşan besiyerinin ikinci kısmı, 0,2 mikron filtreden süzülerek sterilize edilir ve aseptik koşullarda, biyoreaktör içinde bulunan besiyeri üzerine, inokülasyondan hemen önce ilave edilir.

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. 2.5 M H₂SO₄ hazırlanması

250 mL için, 34,75 mL H₂SO₄ (%95) + 215,25 mL H₂O

Hazırlanan sülfirik asit çözeltisi sterilize etmek için, çözeltinin alındığı şişenin ağzı pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılır. Otoklavda, 121°C’de 20-25 dk sterilize edilir.

3.4.2. 5 M NaOH hazırlanması

1000 mL için, 200 g NaOH+1L H₂O

Tartımlı yapılan NaOH, içinde manyetik balık bulunan çözündürme kabı içerisinde bir miktar saf su içinde çözündürülür. Tüm içerik çözündürüldükten sonra, çözelti içindeki manyetik balık alınır. Hazırlanan çözelti, otoklavda 121⁰C’de 15 dakika sterilize edilir.

3.4.3. %50 Gliserol çözeltisi hazırlanması

%50 Gliserol çözeltisi, ana referans stok suşları ile çalışma kültür stok suşlarının hazırlanmasında kullanılır. Çözelti hacminin %50 oranına denk gelen hacimde Gliserol, mezur veya pipet ile ölçülerek alınır. Gliserol üzerine saf su ilave edilerek istenen hacime tamamlanır. Çözelti, otoklavda, 121 °C’de 20 dakika sterilize edilir

3.4.4. Gram boyama solüsyonları hazırlanması

Gram boyama solüsyonları, bakterilerin mikroskopik muayenelerinin yapılabilmesi için uygulanan boyama işleminde kullanılmaktadır. Gram boyama solüsyonları aşağıdaki gibidir;

Kristal Viole: 1 g / 100 mL şeklinde hazırlanır. 1 g kristal viole 100 ml saf su içinde iyice çözündürülünceye kadar karıştırılır.

İodine: 2 g iodine ve 0,4 g sodyum hidroksit, 100 mL saf su içinde iyice çözündürülünceye kadar karıştırılır.

Ethanol: % 70’lik veya saf ethanol kullanılır.

Fucsin: 0,05 g / 100 mL şeklinde hazırlanır. 0,05 g fucsin 100 mL saf su içinde iyice çözündürülünceye kadar karıştırılır.

3.4.5. SDS-PAGE için hazırlanan solüsyonlar

Temed (Bio-Rad), %30 Acrilamide (Bio-Rad), Ammonium Persulfate (Bio-Rad), 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad), 10x SDS Buffer (Bio-Rad),

Stok Solusyonların Hazırlanması

0,5 M Tris-HCL, pH:6,8: 6 gr Tris 50 mL saf suda çözündürülür, HCL ile pH 6,8'e ayarlanır ve hacim 100 mL ye tamamlanır (2 ay + 4 C de saklanabilir).

1,5 M Tris-HCL, pH:8,8: 18,15 gr Tris 50 mL saf suda çözündürülür, HCL ile pH 8,8'e ayarlanır ve hacim 100 mL ye tamamlanır (2 ay + 4 C de saklanabilir).

%10 luk SDS: 1 gr SDS 10 mL saf suda çözündürülür (2 ay + 4 C de saklanabilir).

APS: 0,1 gr APS, 1 mL saf suda çözündürülür (taze hazırlanması gerekir).

Sample Buffer (örnek tamponu): 900 mL 4x sample buffer, 100 mL betamerkaptoetanol.

1X Tampon Çözeltisi: Biorad hazır 10X tamponundan 1/10 sulandırılarak 1X tampon çözeltisi oluşturulur.

3.4.6. FTS Solüsyonu Hazırlığı

500 mL FTS solüsyonu hazırlamak için 4,25 g NaCl hassas terazide tartılır, tartımı yapılan NaCl, içinde manyetik balık bulunan çözündürme kabı içerisinde bir miktar saf su içinde çözündürülür. Çözelti hacmi 500 mL 'ye tamamlanır. Tüm içerik çözündürüldükten sonra, çözelti içindeki manyetik balık alınır.

3.5. Biyoreaktörün Hazırlanması ve Besiyeri Sterilizasyonu

Biyoreaktör sistemi çalıştırılır, sıcaklık probu ve pH probu kalibre edilmek üzere pH 7 ve pH 4 referans solüsyonları hazırlanır. Biyoreaktör ekranında Calibration- Mode – Calibration sekmesinden cihazın komutuna göre sırası ile pH 7 ve pH 4 solüsyonlarına sıcaklık ve pH probu birlikte daldırılır. Cihaz ekranına göre, önce pH 7, sonra pH 4 solüsyonları kullanılarak kalibrasyon tamamlanır.

Kalibrasyon tamamlandığında probalar bağlantı noktalarından çıkarılır. Biyoreaktör bu aşamadan sonra güç düğmesinden kapatılmamalıdır. Yapılan kalibrasyon hafızasında mevcuttur. Yapılan tüm bağlantılar için silikon hortumlar kullanılır ve klips ile sıkıca bağlanır. Hazırlanan 1.5 L besiyeri huni yardımı ile reaktörün haznesine doldurulur. 4'lü port yerine takılır ve elle iyice sıkılarak doğru takıldığı kontrol edilir. 250 mL 'lik boş baz (NaOH), asit (H₂SO₄), antifoam şişeleri ve inokülasyon hattı 4 yollu porta takılır. Biri havalandırma amaçlı, diğeri egzoz filtresi ve ortama azot beslemesi yapmak için toplamda 3 adet Midisart 2000 0.2 µm PTFE filtre takılır. Spargerin bağlı olduğu porta azot beslemesi yapmak için hava filtresi takılır. Egzoz filtresi egzoz yoğunlaştırıcı hazne üzerine takılarak ortama kirli havanın salınması engellenmiş olur. Son olarak besi ortamının havalanması için hava filtresi kullanılır. Ürün toplama erleni headplate üzerindeki dip boruya bağlı olan porta bağlanır. Porta bağlı silikon hortumun diğer ucuna 2L'lik erlen bağlanarak pamuk ve alüminyum folyo ile girişi kapatılır.

Biyoreaktör haznesi ile otoklava girecek şekilde hazır tutulur. Tüm bağlantılar dikkatlice takılır ve hortumların bağlantı noktaları klips yardımı ile kontaminasyon riskini azaltmak için sıkıca bağlanır.

Otoklava taşınmadan önce biyoreaktör ceketı su ile doldurulur. Tüm bağlantılar kontrol edilerek otoklava dikkatlice yerleştirilir. Karıştırıcı şaftı, oksijen, pH, sıcaklık problemleri ve inokülasyon portunun üst kısımları alüminyum folyo ile kapatılır. Silikon hortumlar klipsler ile sıkıştırılır. Otoklavda 121 °C 1 bar basınçta 25 dk sterilizasyon işlemi yapılır. Oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklenir. Soğuma tamamlandığında vessel biyoreaktör kontrol paneline taşınarak pH probu, oksijen probu, sıcaklık probu, egsoz yoğuşturucusu soğutma suyu giriş ve çıkış bağlantıları, ceket suyu giriş ve çıkış bağlantıları, hava hattı ve karıştırıcı rotoru bağlantıları gerçekleştirilir. Ceket su giriş vessel'a alt kısımdan çıkış üst kısımdan yapılmasına dikkat edilir. Daha sonra cekete su alma işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemden sonra sıcaklık ve karıştırıcı aktif hale getirilebilir.



Görsel 3.1. Çalışma yapılan biostat B plus biyoreaktör

3.5.1. Çalışma ortamının oluşturulması ve inokülasyon işlemi

İnokülasyon işleminden önce B kısmı olarak adlandırdığımız, sıcaklık ile bozulabilecek komponentler, 0.2'lik filtre yardımı ile steril edilir ve peristaltik pompa ile inokülasyon hattından besi ortamına eklenir. Biyoreaktör içerisine azot vermek için azot vanası açılır, hava vanası kapatılır. İçeriye verilen azot ile sistemde çözünmüş oksijen besiyerinden uzaklaştırılır ve çözünmüş oksijen değerinin %0 olması sağlanır. Kontrol panelinden istenen üretim sıcaklığı 37 °C ve karıştırıcı hızı 100 rpm'e ayarlanır. pH ise ihtiyaç duyulan değere rekaliibre edilir. İhtiyaç duyulan veya önceden belirlenen değerlere setlenen tüm parametreler, bu setlenen parametrelere ulaştığında inokülasyon işlemi yapılabilir.

İnokülasyon işlemi 2 şekilde yapılabilir. Peristaltik pompa ile veya şırınga ile inokülasyon portundaki membrandan yapılabilir. İnoküle edilecek olan kültür, biyogüvenlik kabini içinde steril şırınga içerisine çekilir. Şırınganın ucu ve inokülasyon portu alev yanında dikkatli bir şekilde açılır. İnokülasyon membranı şırınga ucuyla delinir ve şırınga içerisindeki kültür Biyoreaktör içerisine aktarılır. İşlem bittiğinde alev yanında port kapatılır. İkinci bir seçenek ise inoküle edilecek kültür, biyogüvenlik kabini içinde peristaltik pompaya bağlı steril bir boş şişe içerisine alınır ve peristaltik pompa çalıştırılarak reaktör içine aktarılır. Aktarım sonunda şişe ile pompa arasındaki hortum klipslenerek kapatılır.

Örnek almak için örnek haznesi ile biyoreaktör arasında bulunan silikon hortumun üzerindeki klips açılır. Örnek alma haznesi üzerindeki hava filtresine şırınga bağlanır ve şırınga ile vakum oluşturularak biyoreaktörden istenilen miktarda kültürün örnek alma haznesine toplanması sağlanır.

Kültür üretimi tamamlandıktan sonra, peristaltik pompa yardımıyla tüm ürün harvest hattından peristaltik pompa veya besi yerine azot verilerek 2L'lik erlene toplanır.

3.6. Tayin Yöntemleri

3.6.1. Gram boyama yöntemi

Mikropipet veya öze yardımıyla kültür lam üzerine sürülür. Daha sonra lam ateş ile fikse edilir ve Gram boyama yöntemi uygulanır. Hazırlanmış olan preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika beklenir. Preparat saf su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılır. Daha sonra iodine çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilir sonrasında preparat önce %96 'lık etil alkol daha sonra saf su ile yıkanır. Son olarak fuksin çözeltisi damlatılarak yaklaşık 1 dakika bekletilir ve saf su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile hafifçe bastırılarak kurutulur. Preparata immersiye yağ damlatılarak 100 'lük objektifle incelenir. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilir. Bu işlem, kültürün 4., 6., 8. ve 24. saatlerinde saflık kontrolü için uygulanmaktadır.

3.6.2. SDS -PAGE yöntemi

Protein örnekleri, betamerkaptoetanol gibi kimyasal indirgen ajanlarla ön işleme tabi tutularak disülfid köprülerinin indirgenmesi ve polipeptitlerin arasındaki bağların koparılması sağlanır. SDS'in de varlığında, bu polipeptitler negatif yüklenerek, elektrik alanında pozitif elektroda doğru hareket eder.

1. Elektroforez sistemi hazırlanıp, jelin döküleceği camlar temizlenerek düzenek kurulur.

2. %10 luk alt jel (yürütme jeli) hazırlanır.

Tablo 3.3. SDS alt ve üst jel komponent oranları

%10 luk Alt Jel (Yürütme Jeli) hazırlanır	%5 lik Üst Jel (Yükleme Jeli) hazırlanır
2,01 mL saf su,	1,525 mL saf su,
1,665 mL bisacrylamid,	0,325 mL bisacrylamid,
1,25 mL 1,5 M Tris-HCL, pH:8,8	0,625 mL Tris-HCL, pH:6,8
50 uL SDS,	25 uL SDS,
25 uL APS,	12,5 uL APS,
2,5 uL Temed.	2,5 uL Temed.

Hazırlanan jel karıştırılır ve mikropipet yardımıyla camlar arasına dökülür. Jel dökümü bittikten sonra, distile su veya izopropil alkolden 1-2 mL üzerine dökülerek jelin düzgün polimerleşmesi ve hava almaması sağlanır. Yaklaşık 1 saat polimerleşme için beklenir.

3. Alt jel polimerleştikten sonra üzerine ilave edilen alkol, kurutma kâğıdı yardımıyla uzaklaştırılır.

4. %5 lük üst jel (yükleme jeli) hazırlanır.

Hazırlanan jel karıştırılır ve mikropipet yardımıyla alt jel üzerine dökülür ve tarak yerleştirilir. 2 saate yakın polimerleşmesi için beklenir.

5. Jeller polimerleştikten sonra üst jele yerleştirilen tarak çıkarılır ve camlar elektroforez tankına yerleştirilir. Hazır halde bulunan 10X tampon çözeltisinden 1X olacak şekilde hazırlanır ve elektroforez tankı içerisine yerleştirilen camlar arasında oluşan havuzu dolduracak şekilde ilave edilir.

6. Örneklerin hazırlanması ve yüklenmesi,

- 5 uL örnek tamponu (4x sample buffer + Betamerkaptoetanol), 15 ul örnek koyularak karışım sağlanır ve yaklaşık 10 dk 70-80 °C sıcak suda bekletilerek proteinlerin denatüre olmaları sağlanır.
- Her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde örnekler mikropipet yardımıyla yüklenir. Ayrıca 2 µL standart marker yüklenir.
- Yüklem tamamlandıktan sonra tank içerisine de 1X tampon çözeltisinden ilave edilir ve sistem elektroforez güç kaynağına bağlanarak uygun voltajda çalıştırılır.

- Yürüme tamamlandıktan sonra jel çıkarılarak saf suya alınır ve gümüş boyama tekniği uygulanır.

3.6.3. Gümüş boyama yöntemi

Gümüş boyama metodunda iyonik gümüş (Ag^+) protein üzerinde metalik forma indirgenir (Ag^0) ve koyu kahverengi bir renk oluşturur. Böylece örneklerdeki protein bantları görünür hale getirilmesi.

Fiksasyon; 20 dk (%50 metanol, %5 asetik asit) (50 mL metanol, 5 mL asetik asit, 45 mL saf su)

Yıkama; 10 dk (50 mL metanol + 50 mL saf su ile)

Yıkama; 2 saat veya gece boyu saf suda yıkama

Ön muamele; 1 dk ön muamele solüsyonu (0,02 gr sodyum thiosülfat 100 mL su içerisinde çözünerek hazırlanır)

Yıkama; 3x20 sn saf su ile hafif çalkalanarak muamele edilir * çok uzun bekletilmemeli

Boyama; 20 dk Boya solüsyonu ile muamele (0,1 gr Gümüş nitrat 100 mL su içerisinde çözdürülür son anda içerisine 75 uL formaldehit ilave edilir)

Yıkama; 2x30 sn saf su ile çalkala

Geliştirme; bantlar görünür hale gelene kadar yaklaşık 10 dk geliştirme solüsyonu ile muamele (geliştirme solüsyonu; 2 gr sodium karbonat 100 mL suda çözünür, 40 uL formaldehit eklenerek uygulamaya hazır hale gelir)

Yıkama; 2x2 dk saf su ile çalkala

Durdurma; 10 dk durdurma solüsyonu ile çalkala (durdurma solüsyonu; 5 mL asetik asit 100 mL ye saf su ile tamamlanır).

Saklama; jel %1 asetik asitte +4 C de saklanır.

3.6.4. Toksin titrasyon yöntemi

Testin uygulanması için canlı bakteri kültür örnekleri steril koşullarda alınır, etiketlenir. Süpernatant elde etmek amacıyla teslim alınan örnek bekletilmeden steril ependorfa alınarak mikrosantrifüj yardımıyla 3000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilir. Santrifüj sonunda numunenin üzerinde berrak sarı renkteki toksin içeren süpernatant ayrı steril bir ependorfa alınarak etiketlenir bu şekilde test numunesi hazırlanmış olur. Hazırlanan toksin içeren örnek oda sıcaklığında fazla bekletilmeden kullanılır, kalan kısım -80 °C 'de muhafaza edilir.

Analiz için hazırlanacak dilüsyonlar belirlenir. İlk tüpe 1,5 mL fizyolojik tuzlu su konur. Diğer tüplere dilüsyon oranına uygun fizyolojik tuzlu konulduktan sonra, ilk tüpteki fizyolojik

tuzlu suyun üzerine 0,5 mL test numunesinden konulur ve 1/4 oranında dilüsyon elde edilir ve 1/16, 1/20, 1/25, ... oranlarında olacak şekilde ileri dilüsyonlara gidilir. Hazırlanan her bir toksin dilüsyonu, 0,2 mL olacak şekilde damar içi yol ile 2' şer adet fareye uygulanır. Hayvanlar 3 gün boyunca izlenir, ölümler kaydedilir. Farelerde ölüm tespit edilen en son dilüsyon oranının 5 katı, mL 'deki toksin titresine eşittir.

Eğer enjekte edilen toksin dilüsyonu, her 2 fareyide öldürür ise verilen dilüsyon oranı x5 MLD değeri üzerinde olarak elde edilir. Farenin sadece bir tanesi ölür ise dilüsyon oranı x5 MLD değerine eşit olarak elde edilir. Hiç fare ölmez ise dilüsyon oranı x5 MLD altında değeri elde edilir.

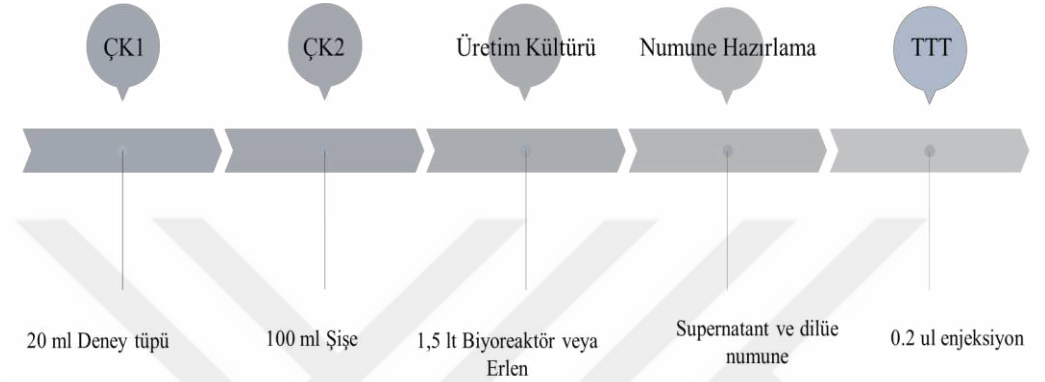
3.6.5. Optik dansite tayin yöntemi

Bulanıklık tayini spektrofotometre cihazı ile optik dansitenin (OD) tayiniyle ölçülür. Bu metot indirek bir metot olup mikroorganizmaların belli dalga boyundaki ışığı absorbe etme özelliklerinden yararlanılarak ölçülür. Besi yerinden alınan numune sıvı kültürde bulunan mikroorganizmalar aseptik koşullarda besi yerinin yoğunluğuna göre direk 1/5 veya 1/10 oranında FTS solüsyonu ile seyreltilerek spektrofotometre küvetine aktarılır. Spektrofotometrenin dalga boyu 630 nm 'ye ayarlanır. Öncelikle spekfotometrede autozero yapılarak FTS den gelen OD değeri sıfırlanır. Önce küvete kör olarak FTS ile sıfırlama yapılır. Daha sonra seyreltilmiş kültür numunesi küvete doldurularak OD₆₃₀ nm de okuma yapılır.

4. BULGULAR

C. perfringens tip A'nın alfa toksin üretim optimizasyonu için, farklı pH, farklı referans suş, farklı besi yeri bileşenleri ve dehidre toz besiyerleri (BHI broth ve RCM medium) gibi değişen parametreler kullanılarak alfa toksin üretim performans denemeleri yapılmıştır.

Aşağıda proses akış diyagramı verilmiştir.



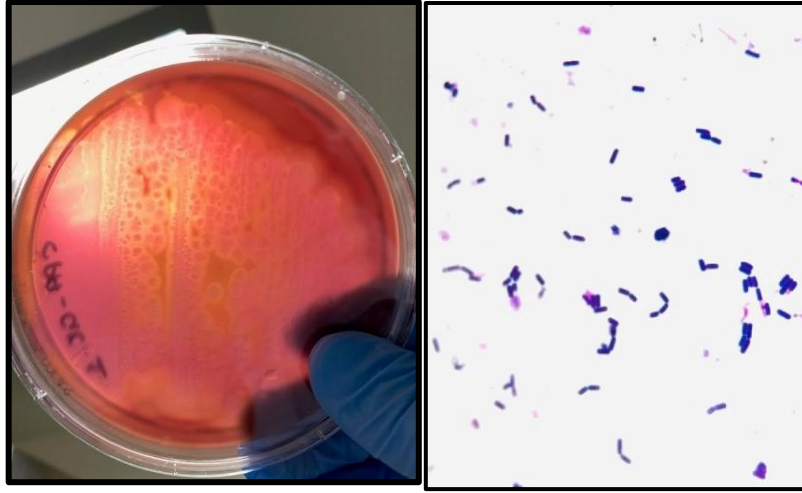
4.1. Üretim 1

4.1.1. Çalışma kültürü 1

-80 °C derin dondurucudan *C. perfringens* ATCC-13124 suşu çıkarılarak oda sıcaklığında, ani ısı şoklara maruz bırakılmadan çözünmesi beklenir. Biyogüvenlik kabini içerisinde steril koşullarda 20 mL M1-1 etli besi yerine ATCC-13124 suşu ekimi yapılır (ÇK 1). 6 saat 37 °C inkübasyona bırakılır. Kültür ortamı saflık kontrolü preparat hazırlanarak mikroskop altında Gram boyama yöntemi ile kontrol edilip, kültürün saf olduğundan emin olduktan sonra ölçek büyütme yapılarak 50 mL ÇK-2 ye geçiş yapılır.

4.1.2. Çalışma kültürü 2

50 mL'lık M1-1 (meat extract bileşeni eklenmeden) besiyerine ÇK-1 'den 5-6 mL kültür ÇK-2 ye aktarılır. ÇK-2 12-16 saat 37 °C inkübasyona bırakılır. Kültür ortamı saflık kontrolü, kanlı ağara çizgi ekim ve Gram boyama ile kontrol edilir. Saf olduğuna emin olduktan sonra üretim kültürü aşaması için biyoreaktöre aktarım gerçekleştirilir.



Görsel 4.1. ÇK-1 kanlı agar saflık kontrolü örneği

4.1.3. Üretim kültürü

2 L lik cam biyoreaktöre 1.5 mL M1-1 besi yeri hazırlanıp steril edilerek kontrol paneli bağlantıları yapılır. Kontrol parametreleri: karıştırma hızı 100 rpm, pH 7.2 olarak ayarlanır. Bu üretimde sıcaklık kontrolsüz olarak üretim denemesi yapılmıştır. Besi yeri ortamı azot gönderimi sağlanarak anaerob koşullar sağlanır. ÇK-2 kültürü biyoreaktöre steril şartlar bozulmadan inoküle edilir. 4. saatte örnek alınarak OD ölçülmüş ve saflık kontrolü için kanlı agara çizim yapılır. OD değeri 0,2 olarak bulunmuştur. 24. saat sonunda harvest gerçekleştirilir. OD ölçümü ve Gram boyama ile kontroller yapılır. 24 saatlik kültür OD değeri 1,3 olarak bulunmuştur. Kültüre %0,8 lik formaldehit ilave edilerek 37 °C ‘de 7 gün inaktivasyona alınır.

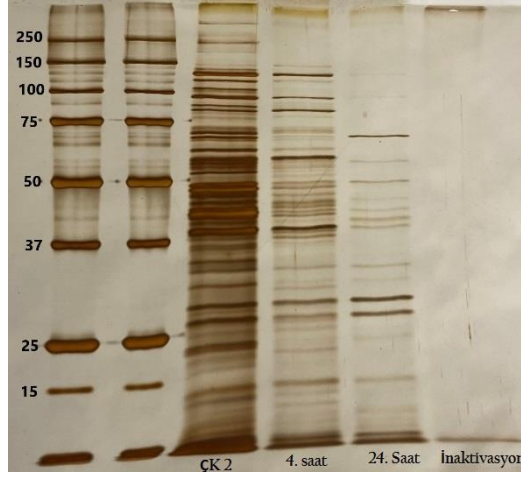
4.1.4. Toksin titrasyon testi

Toksin titrasyon testi için kültür vakit kaybetmeden, 3000 rpm ‘de 10 dk süre ile santrifüj yapılır. Oluşan süpernatant alınır. Belirli dilüsyonlarda numuneler hazırlanarak deneyimli ve sertifikalı kişi tarafından farelere enjeksiyonlar gerçekleştirilir.

24. saat ve 4. saat sonrası alınan örneklerden hazırlanan dilüsyonlar toksin etkinliği ölçümü için 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranında olacak şekilde hazırlanır ve farelere uygulama yapılır. Uygulama sonucu hiçbir farede ölüm gözlenmemiştir.

4.1.5. SDS-PAGE elektroforez çalışması

ÇK 2 ve biyoreaktör 4. saat, 24. saat ve inaktivasyon sonrası süpernatant örneklerine SDS-Page Elektroforez ve gümüş boyama yöntemi uygulanır ve moleküler boyutu 43 kDa olan alfa toksin varlığı kontrol edilir.



Görsel 4.2. SDS-PAGE jel görüntüsü

4.1.6. Değerlendirme

C. perfringens Tip A alfa toksin, 2 L 'lık biyoreaktörde üretim yapılmıştır, ancak toksin salınımı olmadığı düşünülmektedir. Bu üretimde pH ve sıcaklık kontrolsüz olarak üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmalarda, pH ve sıcaklık parametrelerinin kontrollü şartlar altında olmasının toksin üretimi açısından önemi dikkat çekmektedir. Bu deneme üretimi ile kontrollü şartlarda üretim yapılmasının toksin verimi açısından oldukça önemli olduğu gözlemlenmiştir.

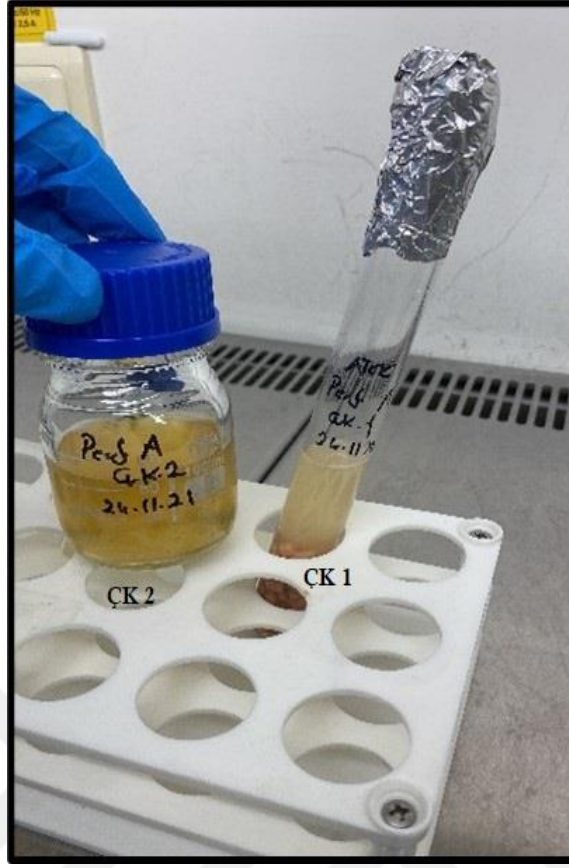
4.2. Üretim 2

4.2.1. Çalışma kültürü 1

Başlık 4.1.1. de açıklandığı şekilde tekrarlanır. Ayrıca kültür ortamı saflık kontrolü yapılır, OD değeri 3,1 olarak bulunmuştur. Kültürün saf olduğundan emin olunduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçilir.

4.2.2. Çalışma kültürü 2

ÇK-1 'den 5-6 ml kültür, 50 mL'lık steril M1-1 besiyerine aktarılır (ÇK-2). Et parçalarından alınmamasına dikkat edilir. Anaerob koşullar altında 37 °C 'de 12-16 saat inkübasyona bırakılır. Kültür ortamı saflık kontrolü, gram boyama yöntemi ile yapılır. OD değeri 2,5 olarak bulunmuştur. Saf olduğuna emin olunduktan sonra üretim kültürü aşaması için biyoreaktöre geçiş yapılır.



Görsel 4.3. Çalışma kültür 1 ve çalışma kültür 2

4.2.3. Üretim kültürü

Başlık 4.1.3. de açıkladığı şekilde işlemler yapılır. Besi yerine sterilizasyon sonrası B kısmı + vitamin eklemesi yapılmıştır. 50-60 mL ÇK-2 kültürü, steril şartlar bozulmadan biyoreaktöre inoküle edilir. Karıştırma hızı 100 rpm, pH 7 ve sıcaklık 37 °C olarak kontrollü koşullar altında üretime başlanır. 4. saatte örnek alınarak OD ölçülmüş ve saflık kontrolü yapılır. OD değeri 1,6 olarak bulunmuştur. 6. saatte kültür örneği alınmış, Gram boyama, OD ölçümü yapılır ve toksin titrasyon testi için örnek alınır. OD 2,2 olarak bulunmuştur. Gece biyoreaktör pH değeri 7,8'e çıkartılıp daha sonra tekrar pH 6,8-7 aralığına düşürülerek üretime devam edilmiştir. 24. saatte harvest yapılarak ürün toplanır. OD ölçümü ve toksin titrasyon testi için numune örneği alınır. OD değeri 0,2 olarak bulunmuştur. Kültüre %0,8 lik formaldehit ilave edilerek 37 °C 'de 7 gün inaktivasyona alınır.

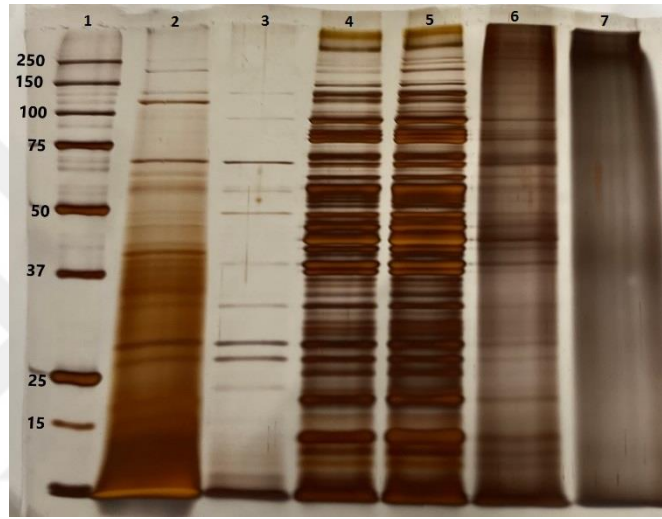
4.2.4. Toksin titrasyon testi

Başlık 4.1.4. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

4. saat, 6. saat ve 24. saat biyoreaktör örneklerinden toksin titrasyon testi yapılmış, sadece 6. saat örneğinde sonuç 10 MLD bulunmuştur. Diğer saatlerde ölüm gözlemlenmemiştir.

4.2.5. SDS-PAGE elektroforez çalışması

ÇK 2 ve biyoreaktör 4. saat, 24. saat ve inaktivasyon sonrası süpernatant örneklerine SDS-Page Elektroforez ve gümüş boyama yöntemi uygulanır ve moleküler boyutu 43 kDa olan alfa toksin varlığı kontrol edilir.



Görsel 4.4. Üretim 2 SDS-PAGE jel görüntüsü

Yükleme sırası

1. Marker
2. ÇK 1 son saat süpernatant
3. ÇK 2 son saat süpernatant
4. Biyoreaktör 4. saat süpernatant
5. Biyoreaktör 6. saat süpernatant
6. Biyoreaktör 24. saat süpernatant
7. İnaktivasyon sonrası süpernatant

4.2.6. Değerlendirme;

Biyoreaktörde kontrollü koşullar altında 100 rpm, 6,8-7 pH, 37 °C 'de üretim yapılır. Kültürden alınan 4. ve 24. saat örnekleri ile yapılan toksin titrasyon test sonuçlarında ölüm gözlemlenmemiş, sadece 6. saat örneğinde toksin titrasyon test sonucu 10 MLD çıkmıştır. Elektroforez çalışma sonucunda; 43 kDa olan alfa toksin varlığını aramak için, 37-50 kDa

arasındaki bantlanmalar incelendiğinde 6. saat örneğinde toksin titrasyon testi ile uyumlu olarak en yoğun bantlanma gözlemlenmiştir.

4.3. Üretim 3

4.3.1. Çalışma kültürü 1

Başlık 4.1.1. de açıklandığı şekilde tekrarlanır. Ayrıca kültür ortamı saflık kontrolü yapılmış ve 6 saat sonunda OD değeri 1,5 olarak ölçülmüştür. Yapılan kontrollerde kültürün saf olduğundan emin olduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçiş yapılır.

4.3.2. Çalışma kültürü 2

50 ml'lık M1-1 besiyerine ÇK-1den 5-6 mL kültür aktarılır (ÇK-2). Başlık 4.2.2. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır. OD değeri 2 olarak ölçülmüştür. Saf olduğuna emin olduktan sonra üretim kültürü aşaması için biyoreaktöre geçiş yapılır.

4.3.3. Üretim kültürü

Başlık 4.2.3. de açıkladığı şekilde işlemler yapılır. Besi yeri ortamına azot gönderimi sağlanarak anaerob koşullar sağlanır. Steril şartlar bozulmadan inokülasyon işlemi gerçekleştirilir. Pendik suşuyla gerçekleştirilen bu üretimde reaktörde çok fazla köpük olduğu için yaklaşık 30 mL %10 luk antifoam ilavesi yapılmıştır. Buna bağlı olarak asit ve baz dengesi ara ara bozulmuş pH değerinde iniş ve çıkışlar meydana gelmiştir. 4. saatte örnek alınarak OD ölçülmüş ve saflık kontrolü yapılmıştır. OD değeri 1,4 olarak bulunmuştur. Reaktör 6. saat kültür örneği alınmış; gram boyama, OD ölçümü yapılır ve toksin titrasyon testi için örnek alınır. OD 3 olarak ölçülmüştür. 24. Saatin sonunda harvest yapılarak ürün toplanır. OD ölçümü ve toksin titrasyon testi için numune ayrılır, kültüre %0,8 lik formaldehit ilave edilerek 37 °C de 7 gün inaktivasyona alınır. OD değeri 2.4 olarak ölçülmüştür.



Görsel 4.5. Pendik şusu biyoreaktör besi yeri ortamı görüntüsü

4.3.4. Toksin titrasyon testi

Başlık 4.1.4. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

4. saat, 6. saat ve 24. saatlerinde biyoreaktör kültür ortamından örnek alınarak toksin titrasyon testi yapılır. 4. saat örneğinde sonuç; 20 MLD olarak bulunmuştur, 6. saat örneğinde sonuç; 20-40 MLD bulunmuştur, 24. saat örneğinde hiçbir farede ölüm gözlenmemiştir.

4.3.5. Değerlendirme;

Pendik suşu ile gerçekleşen bu üretim, toksin eldesi açısından daha başarılı olmuştur. Fakat köpük oluşumu nedeniyle fazla miktarda antifoam eklemesi yapılmış ve bununla ilişkili olarak pH değerinde ani iniş çıkışlar yaşanmıştır. Besiyeri hazırlanırken antifoam eklemesinin daha iyi olacağına karar verilmiştir. Toksin titrasyon testinde 1/2 ve 1/4 dilüsyonlarda ölümler gerçekleşmiştir. Alfa toksin sentezinin kısmen de olsa gerçekleştiği düşünülmektedir.

4.4. Üretim 4

4.4.1. Çalışma kültürü 1

Bu üretimde yine pendik şusu kullanılmıştır. Başlık 4.1.1. de açıklandığı şekilde tekrarlanır. Ayrıca kültür 6 saat sonunda Gram boyama ile saflık kontrolü yapılır, OD değeri 1.4 olarak ölçülmüştür. Kültürün saf olduğundan emin olunduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçiş yapılır.

4.4.2. Çalışma kültürü 2

ÇK-1'den 10-12 mL kültür, biyogüvenlik kabini içerisinde steril şartlarda 90 mL M1-1 besiyerine aktarılır. Başlık 4.2.2. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır. Yapılan kontrollerde OD değeri 0,2 olarak bulunmuştur. Saf olduğuna emin olunduktan sonra üretim kültürü aşaması için biyoreaktöre geçiş yapılır.

4.4.3. Üretim kültürü

Başlık 4.2.3. de açıkladığı şekilde işlemler yapılır. Besi yeri ortamına antifoam ve vitamin ilaveli ancak beef extract ilavesiz olarak üretim başlatılmıştır. Üreme çok yavaş devam etmiştir. Bu yüzden 6. Saatte örnek alınmamıştır. 18. saatte örnek alınmış ve OD değeri 1,2 olarak bulunmuştur. 26 saatin sonunda kültür harvest edilir. OD ölçümü ve toksin titrasyon testi için örnek ayrılır. Kültüre %0,8 'lik formaldehit ilave edilerek 37 °C 'de 7 gün inaktivasyona alınır.

4.4.4. Toksin Titrasyon Testi

Başlık 4.1.4. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

18. saat biyoreaktör kültür örneğine toksin titrasyon testi yapılmıştır. Sonuç 10-20 MLD arasında bulunmuştur. 26. saat sonundaki kültürden alınan örnekte ise fare ölümü gözlenmemiştir.

4.4.5. Değerlendirme;

Pendik suşu ile gerçekleşen *C. perfringens* Tip A üretimi 2 L lik biyoreaktörde kontrollü koşullarda pH 7,0, sıcaklık 37 °C tamamlanmıştır. Besi yeri ortamına beef extract eklenmemiş ve inokülasyon miktarı artırılmıştır. Son saat OD'si 1.4 olarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre besiyerine beef extract eklenmemesinin, üremeyi yavaşlattığı ve buna bağlı olarak toksin üretimini azalttığı düşünülmüştür.

4.5. Üretim 5

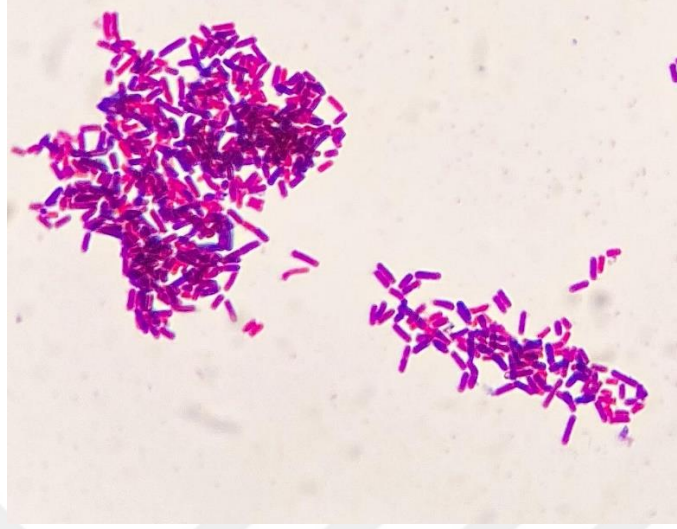
4.5.1. Çalışma kültürü 1

Bu üretimde yine Pendik ve ATCC-13124 *C. perfringens* suşları kullanılmıştır. Başlık 4.1.1. de açıklandığı şekilde tekrarlanır. Ayrıca her iki kültür 6 saat 37 °C 'de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda saflık kontrolü Gram boyama ile yapılır, kültürlerin saf olduğundan emin olunduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçilir.

4.5.2. Çalışma kültürü 2

Her iki suş anaerob koşullar altında ÇK-1 'den ÇK-2 ye 10-15 mL kültür alınarak geçiş yapılır. Başlık 4.2.2. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır. Saf olduklarına emin olunduktan

sonra ATCC-13124 suşunu içeren ÇK-2, üretim kültürü aşaması için biyoreaktöre, Pendik suşunu içeren ÇK-2 ise 2 lt lik erlene inoküle edilir.



Görsel 4.6. ÇK 2 mikroskop altında Gram boyam yapılmış saflık kontrolü görüntüsü

4.5.3. Üretim Kültürü

Başlık 4.2.3. de açıkladığı şekilde işlemler yapılır. Besi yeri ortamı vitamin ilaveli olarak ve ayrıca bacto pepton yerine protease pepton kullanılmıştır. ATCC-13124 suşunu içeren ÇK 2 kültürünün tümü (100 mL) biyoreaktöre inoküle edilir. Biyoreaktör üretimi, pH 7.0, 37 °C ve 100 rpm karıştırmada kontrollü olarak başlatılır. Üretim boyunca kültür ortamına, 2 saatte bir 1-2 dk'lık azot beslemeleri yapılır. 6. ve 24. saatlerde OD, saflık kontrolleri ve toksin titrasyon testi için numune alınır. 24. saat sonunda kültür %0,8 'lik formaldehit ilave edilerek 37 °C 'de 7 gün inaktivasyona alınır.

Erlende ise Pendik suşunu içeren kültür üretimi yapılır, 1.5 L vitamin ilaveli besiyerine inoküle edilir. Manyetik karıştırıcı ile karıştırma sağlanır. Belirli aralıklarla pH ölçülerek kontrolleri manuel olarak yapılır. 6. ve 24. saatlerde OD, saflık kontrolü ve toksin titrasyon testi için numune alınır. 24. Saat sonunda kültüre %0,8 'lik formaldehit ilave edilerek 37 °C 'de 7 gün inaktivasyona alınır.

4.5.4. Toksin Titrasyon Testi

Başlık 4.1.4. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

C. perfringens ATCC-13124 suşu ile üretimi yapılan kültürden alınan numunelerden 6. saat OD değeri 5.7 ve 24.saat OD değeri ise 4.3 olarak bulunmuştur. Bu kültürden alınan

numunelerden elde edilen supernatanttan belirli oranlarda dilüsyon hazırlanmıştır. Farelere enjekte edilen bu numunelerden 6. saat 80 MLD ve 24. Saat 40-60 MLD değer elde edilir.

Pendik şusu ile üretilen erlenden alınan numunelerden. 6. saat OD değeri 0,6 ve 24. saat OD değeri 0,35 olarak bulunmuştur. Bu kültürden alınan numunelerden elde edilen süpernatanttan yine aynı oranlarda dilüsyonlar hazırlanır. Farelere enjekte edilen bu numunelerden 6. saatte ölüm gözlenmemiştir ve 24. saat 20 MLD altı değer elde edilmiştir.

4.5.5. Değerlendirme

Yapılan deneme üretimleri arasında alfa toksin üretimi değerinde ciddi bir artış elde edilmiştir. 6. saatte 80 MLD değeri elde edilmiştir. Besi yerindeki pepton türünün değişimi ve 2 saatte bir düzenli olarak yapılan azot beslemesinin, toksin üretimini artırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu aşamadan itibaren ATCC-13124 şusu ile deneme üretimleri devam edecektir. Pendik suşu ile gerçekleşen üretimlerde hem alfa toksin miktarının düşük olması, hem de üretim sırasında meydana gelen köpük oluşumu, işlemleri oldukça zorlaştırmaktadır.

Ayrıca, şekil 4.7’ de M1-1 besi yerine aynı saatte aynı şekilde ekimi yapılan ATCC-13124 ve Pendik üretim kültürleri mevcuttur. ATCC-13124 şusunda gözle görülür oranda üreme olurken Pendik şusunda henüz üreme gözle görülür oranda gerçekleşmemiştir.



Görsel 4.7. Aynı saate ekimi yapılan ATCC ve Pendik suşu görüntüsü

4.6. Üretim 6

4.6.1. Çalışma kültürü 1

Bu üretimde yine ve ATCC-13124 *C. perfringens* kullanılmıştır. – 80 °C derin dondurucudan ATCC-13124 suşu çıkarılarak oda sıcaklığında, ani ısı şoklarına maruz bırakılmadan çözünmesi beklenir. Biyogüvenlik kabini içinde deney tüpünde bulunan steril 20 mL BHI (Brain Heart Infusion) besi yerine ATCC-13124 suşu ekilmiştir (ÇK 1). 6 saat 37 °C 'de inkübasyona bırakılır. 6. saatte üreme görülmediği için 8. ve 10. saatlerindeki üreme durumu gözlemlenmemiştir. Bu saatlerde 'de üreme gözlenmediği için ÇK 2 geçiş yapılmamıştır. Kültür ortamı saflık kontrolü Gram boyama ile yapılır. 16. saat kültür numunesinde az miktarda üreme gözlenmiştir. OD değeri bakılmamıştır.

4.6.2. Değerlendirme

C. perfringens ATCC-13124 suşunun BHI hazır besi yeri ortamında üreme hızı çok düşük olduğu için ÇK 2 ve üretim kültürleri denenmemiştir.

4.7. Üretim 7

4.7.1. Çalışma kültürü 1

Bu üretimde 2 adet üretim planlanmıştır yine ATCC-13124 *C. perfringens* kullanılır. Başlık 4.1.1. 'de açıklandığı şekilde tekrarlanmıştır. Ayrıca kültür ortamları saflık kontrolü Gram boyama yöntemi ile yapılır. Yapılan kontrollerde kültürlerin saf olduğundan emin olunduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçiş yapılır.

4.7.2. Çalışma kültürü 2

ÇK-1 'den 10-12 mL kültür biyogüvenlik kabini içerisinde steril şartlarda, 2 şer adet 90 mL M1-1 besiyerlerine aktarılır. Başlık 4.2.2. 'de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

4.7.3. Üretim Kültürü

Hem biyoreaktörde hem de erlende 2 farklı üretim ve bileşenden oluşan besi yeri denemesi yapılmıştır. Biyoreaktörde 1.5 L hacminde besi yeri ortamına vitamin ilaveli ve ayrıca bacto pepton yerine protease pepton kullanılmıştır ve tryptone ortamdan çıkarılır. Biyoreaktörde bulunan modifiye M1-1 besi yerine ATCC-13124 suşunu içeren ÇK-2 kültürünün tümü (100 mL) inoküle edilir. Biyoreaktör üretim şartları, Ph 7.0, sıcaklık 37 °C ve 100 rpm karıştırma koşullarında kontrollü olarak başlatılır. Kültür ortamına, 2 'şer saat aralıklarla 2 dk boyunca azot beslemesi yapılır. 6. ve 24. saatlerde OD ölçümü ve toksin titrasyon testi için örnek alınır. OD değeri 6. Saatte 2,4 ve 24 saatte 3.1 olarak bulunmuştur.

Erlende bulunan besi yerine ise biyoreaktör ortamından farklı olarak bacto peptone kullanılmış, strese sokmak amacıyla da starch eklenmemiştir. ÇK-2 kültüründen diğeri biyogüvenlik kabini içerisinde erlene inoküle edilir ve 37 °C 'de inkübasyona bırakılarak üretime başlanır. Belirli aralıklarla kültür ortamının pH kontrolü pH stripleri ile yapılır. 6. ve 24. saatlerde OD kontrolü ve toksin titrasyon testi için örnek alınmıştır. OD değeri 6. saatte 2,1 ve 24 saatte 2,7 olarak bulunmuştur.

4.7.4. Toksin titrasyon testi

Biyoreaktör kültüründen ve erlen kültüründen 6. ve 24. saatlerinde alınan örnekler aynı oranda dilüsyonları yapılarak, örnek alındıktan sonra vakit kaybı olmadan bu dilüe toksinler hemen farelere enjekte edilir. Biyoreaktör kültüründen alınan örneklerde 6. saat 20-40 MLD ve 24. saat ise 20 MLD altı olarak bulunmuştur. Erlen kültüründen alınan örneklerden ise her iki örnek 6. saat ve 24. saat içinde 20 MLD altı olarak bulunmuştur.

4.7.5. Değerlendirme

Besi yerlerinde yapılan değişikliklerin toksin üretimini düşürdüğü tespit edilmiştir. Erlende üretilen kültürün, ortam şartları kontrol edilemediği için toksin üretiminin düşük olduğu düşünülmektedir. Biyoreaktör besi yeri ortamında yapılan değişikliklerde de toksin üretiminin düştüğü gözlenmiştir.

4.8. Üretim 8

4.8.1. Çalışma kültürü 1

Bu üretimde yine ATCC-13124 *C. perfringens* kullanılmıştır. Başlık 4.1.1. de açıklandığı şekilde tekrarlanır. Ayrıca kültür ortamları saflık kontrolleri Gram boyama yöntemi ile yapılır. Yapılan kontrollerde kültürlerin saf olduğuna emin olunduktan sonra ölçek büyütme yapılarak ÇK-2 ye geçiş yapılır.

4.8.2. Çalışma kültürü 2

ÇK-1'den 10-12 mL kültür biyogüvenlik kabini içerisinde steril şartlarda, 2 adet 90 mL M1-1 besiyerlerine aktarılır. Başlık 4.2.2. de belirtildiği şekilde işlemler yapılır.

4.8.3. Üretim Kültürü

Hem biyoreaktörde hem de erlende 2 farklı üretim ve bileşenden oluşan besi yeri denemesi yapılmıştır. Biyoreaktörde 1.5 L hacminde besi yeri ortamında vitamin eklenir ve protease pepton kullanılmıştır. Biyoreaktörde bulunan modifiye besi yerine ATCC-13124 suşunu içeren ÇK 2 kültürünün tümü (50 mL) inoküle edilir. Biyoreaktör şartları, pH 7.0, sıcaklık 37 °C ve 100 rpm karıştırma hızı koşullarında kontrollü olarak üretim başlatılır. Kültür

ortamına 2 saat aralıklarla 2 dk boyunca azot beslemesi yapılmıştır. 6, 8, 10 ve 24. saatlerinde de toksin titrasyon testi için örnek alınır. OD değeri sadece 6. Saatte 5,4 ve 24. saatte 3.8 olarak bulunmuştur. Diğer saatlerde OD değeri bakılmamıştır.

Erlende bulunan besi yerine ise biyoreaktör ortamından farklı olarak RCM besi yeri kullanılmıştır. ÇK 2 kültüründen biyogüvenlik kabini içerisinde inoküle işlemi yapılır. 37 °C 'de üretime başlanır. Belirli aralıklarla kültür ortamının pH kontrolü pH stripleri ile yapılır. 6, 8 ve 24. saatlerde toksin titrasyon testi için örnek alınmıştır. OD değeri 6. saatte 0,5 ve 24. saatte 1,84 olarak bulunmuştur. 8. saatte OD değeri bakılmamıştır.

4.8.4. Toksin titrasyon testi

Biyoreaktör kültüründen 6, 8, 10 ve 24. saatlerde ve erlen kültüründen 6, 8 ve 24. saatlerde alınan örnekler aynı oranda dilüsyonları yapılarak, örnek alındıktan sonra vakit kaybı olmadan dilüe toksinler hemen farelere enjekte edilir. Biyoreaktör kültüründen alınan örneklerde 6. saat 100 MLD üzeri, 8. Saat 80-100 MLD arası, 10. saat 80 MLD altı 24. saat 40 MLD altı olarak bulunmuştur.

Erlen kültüründen alınan örneklerde ise 6. saat 20 MLD altı olarak bulunmuştur ve bu yüzden 24. saate bakılmamıştır.

4.8.5. Değerlendirme

ATCC-13124 şusu ile biyoreaktör koşullarında vitamin eklemeli ve protease peptonlu modifiye M1-1 besi yerlerinde üretilen kültürlerde en yüksek toksin seviyesine ulaşılmıştır. Besi yerinde pepton kaynağı olarak protease pepton kullanılmasının, B kısmına vitamin eklemesi yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Biyoreaktör koşulları olarak en iyi sonuçların alındığı pH 6.8-7.0 aralığı, sıcaklık 37 °C ve 100 rpm karıştırma şartlarının alfa toksin üretimi için uygun olduğu belirlenmiştir. Erlende üretilen kültür ortamı şartlarının, kontrol edilemediği için, toksin üretimi açısından verimli olmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada tüm Çk 1 besi yerlerinde M1-1 etli besi yeri ve Çk 2 de ise M1-1 modifiye clostridial besi yeri kullanılmıştır. Üretim kültürleri besi yerlerinde Modifiye M1-1, RCM ve BHI besi yeri denemeleri yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda Mariano E. ve diğ, yaptığı çalışmada *C. perfringens* tip A üretimde yaygın kullanılan 3 besi yerinde en iyi sonuç BHI da alınmıştır; ancak bu çalışmada yapılan deneme üretimlerinde BHI ile yapılan üretimde ÇK1 de 16. saatin sonunda üreme miktarının gözle görülür düzeyde az olduğu tespit edilmiştir bu yüzden ölçek büyütme işlemlerine geçilmemiştir. Bu deneme ile besi yeri olarak BHI nın kullanımının üretim açısından mantıklı olmadığı karar verilmiştir ve bir sonraki üretimlerde kullanılmamıştır. RCM besi yeri ile yapılan üretimde üremenin normal olduğunu ancak toksin üretim miktarının az olduğu görülmüştür. Biyoreaktör kültüründe RCM’li besi yeri ortamı denenmemiştir bu deneme erlenle sınırlı kalmıştır ancak erlenle üretilen M1-1 besi yerindeki elde edilen MLD değerleri karşılaştırıldığında yine RCM besi yeri ortamları kullanımına sıcak bakılmamıştır. Modifiye M1-1 clostridial besi yerinde bazı deneme üretimlerinde starch, dextrose ve tryptone gibi bileşenler bakteriyi strese sokma amacı ile besi ortamından çıkarılmıştır ancak üremenin ve toksin üretiminin düştüğü tespit edilmiştir. Yine modifiye M1-1 clostridial besi yerine sterilizasyon sonrası vitamin eklenmesi ve ayrıca bacto pepton yerine protease pepton kullanılması toksin üretimini önemli ölçüde artırdığı alınan sonuçlarda görülmektedir. En yüksek oranda MLD değerine M1-1 clostridial besi yerinde ulaşılmıştır. Yapılan araştırmalarda clostridial türler için en uygun besi yeri M1-1 clostridial besidir ve bu çalışmadada ulaşılan sonuçlardan bu açık olarak gözükmetedir. Bu besi yeri modifiye edilerek alfa toksin salınımı miktarı arttırılmıştır. Yapılan bu çalışma ile ATCC-13124 referans kodlu şus için en uygun besi yeri ortamı M1-1 modifiye clostridial besi olarak belirlenmiştir.

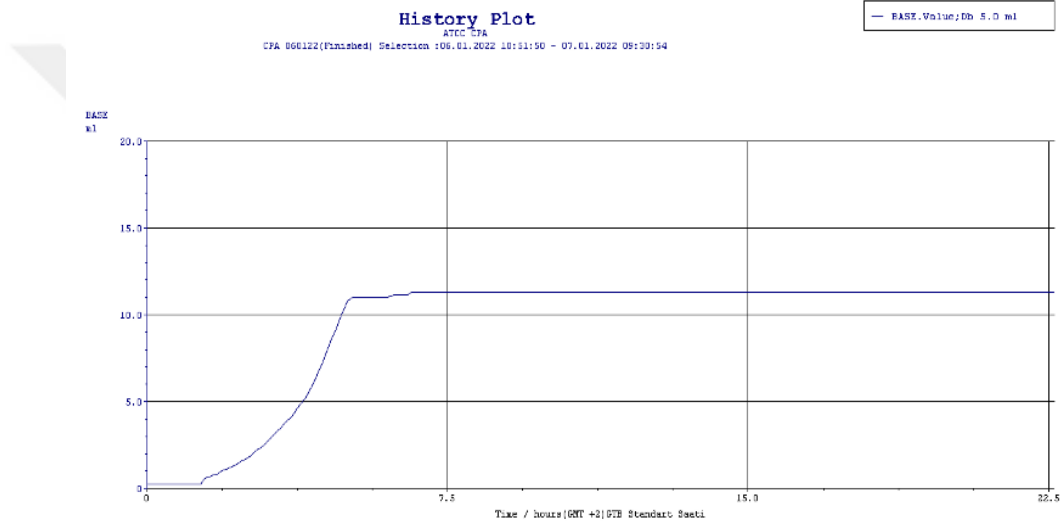
Tablo 5.1. Yapılan üretimlerde elde edilen sonuçlar

Tüm Üretim Tablosu										
	Suş	Reaktör/Erlen (1,5 L)	Besiyeri	4. saat Tok. Titr.	6. saat Tok. Titr.	8. saat Tok. Titr.	10. saat Tok. Titr.	18. saat Tok. Titr.	24. saat Tok. Titr.	26. Saat Tok. Titr.
Deneme 1	ATCC	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	x	-	-	-	-	x	
Deneme 2	ATCC	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	x	10 MLD	-	-	-	x	
Deneme 3	Pendik	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	20 MLD	20-40 MLD	-	-	-	x	
Deneme 4	Pendik	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	-	-	-	-	10-20 MLD	-	x
Deneme 5	ATCC	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	-	80 MLD	-	-	-	40-60 MLD	
	Pendik	Erlen	Modifiye M1-1	-	x	-	-	-	20 MLD ↓	
Deneme 6	ATCC	ÇK1	BHI							
Deneme 7	ATCC	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	-	20-40 MLD	-	-	-	20 MLD ↓	
	ATCC	Erlen	Modifiye M1-1	-	20 MLD ↓	-	-	-	20 MLD ↓	
Deneme 8	ATCC	Biyoreaktör	Modifiye M1-1	-	100-125 MLD	80-100 MLD	80 MLD altı	-	40 MLD	
	ATCC	Erlen	RCM	-	20 MLD ↓	-	-	-	-	

Bu araştırmada 2 farklı şuşun alfa toksin üretim düzeyleride araştırılmıştır. Kullanılan bu şuşlar ATCC-13124 referans kodlu ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü tarafından izole edilen şuştur. Pendik şuşu hem biyoreaktör koşullarında hem de erlen kültürü üretiminde köpük oluşumu gözlenmiştir. Bu köpük oluşumu hem erlen hem de biyoreaktör ölçeğinde problemler oluşturmaktadır. Biyoreaktörde pH kontrolünün zorlaşmasına ve dolayısıyla besi ortamının asitlik derecesinin artmasına, hava filtresinin tıkanmasına dolayısıyla besi ortamının çözünmüş azot değerini etkilemektedir. Köpük kırıcı kullanılmıştır ancak köpük oluşum miktarı fazla olduğu için yetersiz kalmıştır. Köpük kırıcı miktarı artırılmıştır bu da ortamdaki proteinlerin yıkımlanmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu gibi sebeplerden dolayı biyoreaktör sisteminin işletimini ciddi derecede zorlaştırmaktadır. Ölçek büyütme yapıldığında üretim hacmi büyüdüğünde köpük oluşumu daha ciddi sonuçlara sebep olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak alfa toksin üretimi seviyesi düşük kalmaktadır ve fazla miktarda köpük oluşumundan dolayı Pendik şuşu kullanımı tercih edilmemiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı ATCC-13124 şuşu ile üretim yapılmasına karar verilmiştir. ATCC-13124 şuşunda köpük oluşumu minimum düzeydedir. Besi ortamına köpük kırıcı eklendiği takdirde böyle bir sorunla karşılaşılmamıştır. Besi yeri ortamına antifoam eklenmesi ile köpük oluşumunun engellenmesi ortamdaki proteinlerin yıkımlanmasını engellemektedir. Besi ortamı zenginleştirildiğinde ATCC-13124 şuşu alfa toksin üretimi 100-125 MLD değerine ulaşılacaktır. Yapılan araştırmalarda 100 MLD üzeri iyi bir değer olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı alfa toksin üretimi için ATCC-13124 referans şuşu

kullanımında verim artmıştır ve biyoreaktör parametlerinin işletimi açısından ise Pendik şusuna göre daha kolaydır.

Yapılan araştırmalarda toksin üretiminin bakteriyel üreme eğrisine baktığımızda log fazda toksin üretiminin maksimum olduğu belirtilmiştir. Üretimde elde ettiğimiz baz tüketim grafiğine Şekil 5.1’de bakacak olursak 6 – 7. saatleri arasında log fazı tamamlamaktadır. 7.5 saatlerde durağan faza geçmektedir. Bu saatten sonra besi ortamına salınan toksinler ortamda yıkılmaktadır. Süre ilerledikçe 10.’ den 24.’ e kadar ortamdaki alfa toksin seviyesi azalmaktadır. Bu grafikte ölüm fazı tayin edilememektedir. 7.5 saatte sabitlenen baz tüketim miktarı bize diğer fazlar hakkında bilgi vermektedir. Ölüm fazı hakkında bilgi verememektedir.



Şekil 5.1. Bioastat B + CpA alfa toksin üretim sürecinde tüketilen baz grafiği

Tablo 5.3’e baktığımızda log fazda yani 6. saatte 100-125 MLD arası alfa toksin üretimi sağlanmıştır. Tablo 5.3 ’e baktığımızda 6-8. saatleri arasında toksin miktarının maksimum olduğu görülmüştür. Durağan faza geçtikten sonra toksin miktarı 10. saatte düşüşe geçtiği toksinlerin yapısının bozulduğu düşünülmektedir. Ayrıca 24. Saatin sonunda alfa toksin miktarı 40 MLD ye kadar düştüğü tespit edilmiştir. Reaktörde tüm işlemler 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ancak elde edilen verilere göre 6-8. saatleri arasında harvest işleminin tamamlanması gerekmektedir. Bu saatler arasında ortamdaki toksin miktarı maksimumdur. İşletim süresinin kısaltması hem verimin artması hemde işletim maliyetlerinin azalması açısından önemlidir.

Erlende yapılan üretimlerde kontrolsüz şartlar olduğu için, kısmi karıştırma sağlanabilmiş ve pH kontrolü sağlanamadığı sadece 37 °C ortam koşulları sağlanabilmiştir.

ÇK2 de anaerobik jar kullanılmıştır. Ancak üretim kültüründe erlenlerde ihtiyaç duyulmamıştır. Bu yüzden erlenlerde yapılan üretimlerde hem OD değerleri hem de farelerdeki MLD değerleri düşük bulunmuştur. Biyoreaktör koşullarında üretim kültür 1 'de sıcaklık kontrolsüz üretim yapılmıştır; ancak farelerde ölüm gözlenmemiştir. Bu yüzden diğer tüm üretimlerde sıcaklık 37 °C' de kontrollü olarak proses işletilmiştir. Karıştırma, pH ve sıcaklık parametrelerin kontrollü koşullar altında alfa toksin üretimi için önemli olduğu ve biyoreaktörlerin bu gibi üretimler için önem arz edildiği açıkça görülmektedir. Biyoreaktör bu gibi çalışmalarda steril şartların korunumuna olanak sağlaması, arzu edilen parametrelerin kontrollü şartlar altında sağlanabilmesi, ph, sıcaklık, O₂ vb. parametrelerin sürekli olarak anlık ölçümü yapılabilmektedir ve bu ölçümlere göre otomatik müdahale edebilmesi üretimlerde önem arz etmektedir. Erlen kültürüne göre steril şartlarda kültür ortamına müdahale daha kolaydır. Biyoreaktörde ısı transferi ve kütle transferi daha iyi sağlanır. Kütle transferinin iyi bir şekilde sağlanamaz ise bakteriler yeterli derecede beslenememesi söz konusudur. Biyoreaktörde ısı ve kütle aktarımı homojen olarak sağlanabilmektedir. Kullanımı ve bakım kolaylığı sayesinde biyotransformasyon süreçlerin de pek çok kolaylık sağlamaktadır.

Ayrıca besi ortamına inokülasyon yapılmadan önce azot verilerek besi ortamında anaerob ortam oluşturulması ve sonrasında inokülasyon yapılarak üretimin başlatılması gerekmektedir. ÇK1' lerin tümü anaerobik jarda inkübasyona bırakılmıştır. ÇK2 başlangıç denemeleri jarda inkübasyona bırakılmış ancak daha sonra oda sıcaklığı şartlarında inkübasyona alınmıştır. Bakteriyel üremede herhangi bir olumsuzluk gözlemlenmediği için ÇK2 de anaerobik jar kullanımına gerek olmadığına karar verilmiştir. Üretim sırasında azot beslemesi yapılmayan üretim ile 2 'şer saat veya 4 er saat aralıklarla besi ortamına azot beslenmesi yapılan alfa toksin üretimi seviyesinde farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Belirli aralıkla besi ortamına azot beslemesi yapılması, alfa toksin üretim verimini artırmak için gereklidir.

SDS- PAGE jelinde Şekil 4.4 'de görüldüğü gibi bantlanmalar bizlere alfa toksin veya ortamda bulunan diğer proteinler hakkında bilgi vermektedir. Kültür ortamından alınan örnekler santrifüjlendikten sonra elektroforez işlemi yapılmıştır. Jelde birçok bantlanma görülmektedir. Kültür ortamı harvest işlemi yapıldıktan sonra saflaştırma işlemine tabi tutulursa bantlanmaların daha az olacağı ve 43 kDa boyutundaki bantlanmanın daha belirgin bir şekilde görülebileceği ve ayırt edilebileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda amonyum sülfat ile çöktürme veya TFF saflaştırma sistemleri ile kısmi saflaştırma yapıldıktan sonra 43 kDa 'lık bantlanmanın daha belirgin ve ayırt edilebilir olacağı düşünülmektedir. Kültür ortamının 24. saatte ortamdaki alfa toksin ve ortamdaki diğer proteinlerin yapısı bozulmuştur.

Formaldehit ile inaktivasyon işlemi ile alfa toksin ve diğer proteinlerin tümünün yapısı bozulmuştur. İnaktivasyon sonrası jelde hiçbir bantlanma görülmemiştir.

Besi yeri ortamının pH değeri alfa toksin üretimi için en önemli parametreler arasında olduğu görülmüştür. pH değiştirilerek bakteride stres oluşturulmaya çalışılmıştır. İnokülasyon 7.2 pH da yapıp pH değeri 4. saatten sonra 6.5 'e kadar düşmesi sağlanıp, tekrar 6.7 ye setlendiğinde maksimum alfa toksin üretimi değerine ulaşılmıştır. Bu çalışmadan pH değerinin 6.5–7 arasında olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada biyoreaktörde modifiye M1-1 clostridial besi yeri ortamına bacto pepton ve vitamin eklemesi yapılmalıdır. Modifiye besi yeri ortamı bakteriyel büyüme ve toksin salınımı açısından daha avantajlıdır. Bu bileşenlerin verimi arttırdığı elde edilen sonuçlardan görülmektedir. Besi ortamı kontrollü şartlarda işletilmelidir. Biyoreaktör başlangıç parametreleri 37 °C, 100 rpm, pH 7.2 olarak ayarlanmalıdır. pH 4. saatten sonra 6.5-7 arasına düşürülmelidir. Besi yeri ortamına düzenli olarak 2 saat aralıkla azot beslemesi yapılmalıdır. Harvest işlemi 6. ve 8. saatleri arasında yapılmalıdır. Toksin miktarının maksimum olduğu süre olarak 6 – 8. saat olarak belirlenmiştir. Besi ortamına antifoam eklemesi ihtiyaç halinde minimum düzeyde yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Abbott M. S R, Harvey A. P, Perez G. V, Theodorou M. K, 2013. Biological processing in oscillatory baffled reactors: operation, advantages and potential, Bioprocessing Biopharmaceutical Technology Centre , Newcastle University , Newcastle upon Tyne, UK;The Centre for Process Innovation , Redcar, UK.
- Acharya T., 2013. Typical growth curve of bacterial population in enclosed vessel. Alaghlavi. Design of Fermenter and Kinetics. Bioprocess Engineering.2013.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff , M., Roberts, K., Walter, P., Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition, Garland Science, 2002.
- Ali, S.; Haq, I.U.; Qadeer, M.A.; Iqbal, J. Production of citric acid by *Aspergillusniger* using cane molasses in a stirred fermenter. Electronic Journal of Biotechnology.2002,5, 19-20.
- Alves, G.G.; Ávila, R.A.M.; Chávez-Olórtegui, C.D.; Lobato, F.C.F. Clostridium perfringens epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. Anaerobe **2014**, 30, 102–107. and Technology New York Marcel dekkar.2006, 148, 33.
- ANGELOTTI, R.,HALL, H. E., FOTER, M. J., LEWIS, K. H. (1962). Quantitation of Clostridium perfringens in foods. Appl. Environ. Microbiol. 10(3): 193-199.
- Avili, M. G., Fazaelpoor, M. H., Jafari, A., & Ataei, S. A. (2012). Comparison between batch and fed-batch production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*.
- Awad, M.M.; Bryant, A.E.; Stevens, D.L.; Rood, J.I. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. Mol. Microbiol. **1995**, 15, 191–202.
- Awad, M.M.; Ellemor, D.M.; Boyd, R.L.; Emmins, J.J.; Rood, J.I. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. Infect. Immun. **2001**, 69, 7904–7910.

- Bates JR, Bodnaruk PW. (2003) *Clostridium perfringens*. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. 6th edition. Ed: AD Hocking. Australian Institute Food Science and Technology Inc., Food Microbiology Group, Waterloo NSW. pp505-542.
- Bhown AS, Habeeb AFSA: 1977, Structural studies on eptotoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to e-toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 78:889–896.
- Blaby, I. K. (2011). Modes of Culture / Microbial. In *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition, Vol. 1 Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00034-9>
- Blom, T.; Slotte, J.P.; Pitson, S.M.; Törnquist, K. Enhancement of intracellular sphingosine-1-phosphate production by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium mobilisation in HEK 293 cells: Endogenous sphingosine-1-phosphate as a modulator of the calcium response. *Cell Signal*. **2005**, 17, 827–836.
- Borakb, Kutlu O. Ulgena, Department of Chemical Engineering, Yeditepe University, 34755, Kadikoy-Istanbul, Turkey.
- Bos, J.; Smithee, L.; McClane, B.; Distefano, R.F.; Uzal, F.; Songer, J.G.; Mallonee, S.; Crutcher, J.M. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin. Infect. Dis*. **2005**, 40, e78–e83.
- Boyd et al. (2), Fuchs and Bonde (6), Murata et al. (13), and K. Berkowitz (M.S. thesis, Rutgers University, New Brunswick, N.J., 1978)
- Bryant, A.E. Biology and pathogenesis of thrombosis and procoagulant activity in invasive infections caused by group A streptococci and *Clostridium perfringens*. *Clin. Microbiol. Rev*. **2003**, 16, 451–462.
- Bueno, E.M.; Bilgen, B.; Carrier, R.L.; Barabino, G.A. Increased rate of chondrocyte aggregation in a wavy-walled bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 2004, 88, 767-77.

- Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, et al.: 2003, Prevalence of cpb 2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* 94: 121–129.
- Bullen JJ: 1963, The influence of the diet on the pathogenesis of enterotoxemia of sheep. *Bull Off Int Epizoot* 59: 1453–1461. Calif, 1997.
- Carberry, James J., 2006. Chemical and Catalytic Reaction Engineering, McGraw-Hill, New York, pp 527-536, 1976.
- Carman, R.J. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.* **1997**, 8, S43–S45.
- Chan, F.K.-M.; Moriwaki, K.; De Rosa, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 979, 65–70.
- Chang, H.N.; Furusaki, S. Membrane bioreactors: present and prospects. In *Bioreactor systems and effects* Springer, Berlin, Heidelberg. 1991, 27-64.
- Chen, H.C.; Hu Y.C. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology letters*. 2006, 28, 1415-1423.
- Chisti, Y. Fermentation technology. *Industrial Biotechnology, Sustainable Growth and Economic Success*. 2010, 149-171.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. Bioreactor design. *Basic biotechnology*. 2001, 151-72.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. Fermentation technology, Bioprocessing, Scaleup and. *Biotechnology-The Science and the Business*. 1999, 177.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., et al. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 812–826.

- Cooper, G.M., Hausman, R.E., The cell: A Molecular Approach, Third Edition, ASM Press, 2004.
- Crueger, W., Crueger, A., & Aneja, K. R. (2017). *Crueger's biotechnology: A textbook of Industrial microbiology*. MedTech.
- Czezulin JR, Hanna PC, McClanr BA. (1993) Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infection and Immunity; 61: 3429-3439.
- Degaleesan, S.; Dudukovic, M.; Pan, Y. Experimental study of gas induced liquidflow structures in bubble columns,AIChE J.2001, 47, 913-1931.
- Dewey-Mattia D,Manikonda K,Hall AJ, Wise ME,Crowe SJ, Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002). 2018 Jul 27;
- Dray T: 2004, Clostridium perfringens type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. Can Vet J 45:251–253.
- Duracova M, Klimentova J, Fucikova A, Dresler J, 2018. Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. Toxin, 10, 99.
- Dworkin M. Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer ScienceBusiness Media, LLC 2006.ed. ASM Press, Washington DC, USA, 2001.
- Eibl, R.; Dieter, E. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. Phytochemistry Reviews, 2008, 7, 593-598.
- El Idrissi AH, Ward GE. (1992). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias. Vet. Microbiol. 31(4):389-396.
- Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. **2007**, 35, 495–516.

Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara Türkiye,2007.

Fernandez-Miyakawa ME, Fisher DJ, Poon R, Sayeed S, Adams V, Rood JI, et al. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. Infect Immun. 2007; 75:1443–52.

Fisher DJ, Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, et al.: 2006, Dissecting the lethality contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins in the mouse intravenous injection model. Infect Immun 74:5200–5210.

Flores-Díaz, M.; Alape-Girón, A.; Clark, G.; Catimel, B.; Hirabayashi, Y.; Nice, E.; Gutiérrez, J.-M.; Titball, R.; Thelestam, M. A cellular deficiency of gangliosides causes hypersensitivity to *Clostridium perfringens* phospholipase C. J. Biol. Chem. **2005**, 280, 26680–26689

Flores-Díaz, M.; Thelestam, M.; Clark, G.C.; Titball, R.W.; Alape-Girón, A. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. Anaerobe **2004**, 10, 115–123.

Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology,

Garmory HS, Chanter N, French NP, et al.: 2000, Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol Infect 124:61–67.

Ghosh, B., Bhattacharya, D., & Mukhopadhyay, M. (2018). Use of Fermentation Technology for Value-Added Industrial Research. *Principles and Applications of Fermentation Technology, August*,141161.<https://doi.org/10.1002/9781119460381.ch8>.

Gibert, M.; Petit, L.; Raffestin, S.; Okabe, A.; Popoff, M.R. *Clostridium perfringens* iota toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. Infect. Immun. **2000**, 68, 3848–3853.

Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, et al.: 2001, PCR detection and prevalence of alpha, beta, beta 2, epsilon, iota and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from labs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol* 82:39– 43

Gui L, Subramony C, Fratkin J, Hughson M. Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. *Mod Pathol*. 2002; 15:66 70.

Gurjar, A.; Li, J.; McClane, B.A. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infect. Immun*. **2010**, 78, 4860–4869.

Guss SB: 1977, Management and diseases of dairy goats. Dairy Goat Journal Publishing, Scottsdale, AZ.

Hasan Hüseyin HADİMLİ*, Osman ERGANİŞ, Zafer SAYIN, Zeki ARAS Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, 42075, 2012, Konya - TURKEY

Hamad, M.A.; Habra, N.; Allouz, A.K. Biotyping of *Clostridium perfringens* strains isolated from enterotoxemia cases in sheep using ELISA technique. *Iraqi J. Vet. Sci*. 2010, 24, 17–22.

Hathaway, C.L. 1990. Toxigenic *Clostridia*. *J. Microbiol. Rev.*, 3: 66–98.

Hatheway, C. L. and Johnson, E. A. (1998) *Clostridium*: the spore bearing anaerobes. In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (Balows, A. and Duerden, B. I. eds.), Vol. 2, 9th edn, Arnold, London, pp. 731–782.

Hernández, M.; López-Enríquez, L.; Rodríguez-Lázaro, D. Quantitative Detection of *Clostridium perfringens* by Real-Time PCR in Raw Milk. *Food Anal. Methods* 2017, 10, 1139–1147.

Hitesh Jagani*, Karteek Hebbar, Sagar S. Gang, P. Vasanth Raj, RaghuChandrashekhar H. and J.Venkata Rao. Department of Pharmaceutical Biotechnology, Manipal College of

Pharmaceutical Sciences Manipal University, Manipal, Karnataka, India 261-301 (2010).

Hough, E., L. K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson & Z. Derewenda (1989) High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature*, 338, pp. 357-360. ISSN 0028-0836 ISSN 1072-8368

Jackson SG, Yip-Chuck DA, Brodsky MH. 1985. A double antibody sandwich enzyme immunoassay for *Clostridium perfringens* type-A enterotoxin detection in stool specimens. *J Immunol Methods* 83: 141-150

Jagriti Singh, Nirmala Kaushik & Soumitra Biswas 2014. Bioreactors - Technology & Design Analysis. *The Scitech Journal*: Vol 01 (6):28-36

Jewell, S.A.; Titball, R.W.; Huyet, J.; Naylor, C.E.; Basak, A.K.; Gologan, P.; Winlove, C.P.; Petrov, P.G. *Clostridium perfringens* α -toxin interaction with red cells and model membranes. *Soft Matter* **2015**, 11, 7748–7761.

Johansson, A., & Aspan, A. (December 2009). Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis

Johansson, A.-C.; Appelqvist, H.; Nilsson, C.; Kågedal, K.; Roberg, K.; Ollinger, K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **2010**, 15, 527–540.

Kågedal, K.; Zhao, M.; Svensson, I.; Brunk, U.T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* **2001**, 359, 335–343.

Kantarci, N.; Borak, F.; Ulgen, K.O. Bubble column reactors. *Process biochemistry*. 2005, 40, 2263-2283.

- Karki, Gaurab. "Cultivation Technique of Bacteria: Batch, Fed-Batch and Continuous Culture Technique." *ONLINE BIOLOGY NOTES*, 20 Dec. 2017, drawing by By GYassineMrabet Talk
- Kolesnick, R.N.; Krönke, M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, 60, 643–665.
- Kuila. A, Sharma. V (2018). In *Principles and Applications of Fermentation Technology*. <https://doi.org/10.1002/9781119460381>.
- Labbe, R.G., Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. 2000. *Clostridium perfringens*. In: The microbiological safety and quality of food Vol. II Aspen Pub. Gaithersburg, Maryland. Pp. 1110– 1135
- Layana JA, Fernandez-Miyakawa ME, Uzal FA: 2006, Suitability of different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia. *Anaerobe* 12:204–206.
- Li, J.; Adams, V.; Bannam, T.L.; Miyamoto, K.; Garcia, J.P.; Uzal, F.A.; Rood, J.I.; McClane, B.A. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, 77, 208–233.
- Li, J.; Miyamoto, K.; McClane, B.A. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect. Immun.* **2007**, 75, 1811–1819.
- Li, J.; Miyamoto, K.; Sayeed, S.; McClane, B.A. Organization of the *cpe* locus in CPE positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PLoS ONE* **2010**, 5, e10932.
- Li, J.; Sayeed, S.; Robertson, S.; Chen, J.; McClane, B.A. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. *PLoS Pathog.* **2011**, 7, e1002429.
- Lucey BP, Grover MH, 2004. William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Arch Pathol Lab Med*, 128, 1193-5.

- Maggio, B. The surface behavior of glycosphingolipids in biomembranes: A new frontier of molecular ecology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1994**, 62, 55–117.
- Manni, M.M.; Valero, J.G.; Pérez-Cormenzana, M.; Cano, A.; Alonso, C.; Goñi, F.M. Lipidomic profile of GM95 cell death induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Chem. Phys. Lipids* 2017, 203, 54–70.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology* (2nd Edition), Mosby Elsevier, St.Louis, 2013, 215-237.7
- Martin P.K., Naylor R.D.: A Latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Res. Vet. Sci.*, 1994; 56: 259-261.
- Martin, I.; Wendt, D.; Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology*. 2004, 22, 80-86.
- McClane BA. (2007) *Clostridium perfringens*. In *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, 3rd edition. Eds: MP Doyle, LR Beuchat. ASM Press, Washington, D.C. pp305-326.
- McClane BA. 1997. *Clostridium perfringens*. *Food Microbiology; Fundamentals and*
- McClane BA. *C. perfringens*. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd
- McClane, B.A. (1996) *Toxicon* 34, 1335–1343
- McClane, B.A.; Robertson, S.L.; Li, J. *Clostridium perfringens*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*; Doyle, M.P., Buchanan, R.L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2013; pp. 465–489.
- McClane, B.A.; Strouse, R.J. Rapid detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, 112–115.].
- McLane BA. 2000. The Action, Genetics and Synthesis of *Clostridium perfringens* Enterotoxins. In, *Microbial Foodborne Diseases; Mechanism of Pathogenesis and Toxin*

- Synthesis. Eds. JW Cary, J Linz, D Bhatnagar. Technomic Publishing Co Inc, Pennsylvania, USA, 550 pp.
- McNeil, B.; Harvey, L. eds. Practical fermentation technology. John Wiley & Sons. Microbiol. 7, 104–110. doi:10.1016/S0966-842X (98)01430-9
- Minami, J.; Katayama, S.; Matsushita, O.; Matsushita, C.; Okabe, A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. Microbiol. Immunol. **1997**, 41, 527–535.
- Minhaj Uddin Monir, Abu Yousuf and Azrina Abd Aziz, Faculty of Engineering Technology, Universiti Malaysia Pahang, Gambang, Malaysia Department of Petroleum and Mining Engineering, Jessore University of Science and Technology, Jessore, Bangladesh Department of Chemical Engineering and Polymer Science, Shahjalal University of Science and Technology, Sylhet, Bangladesh
- Miyamoto, K.; Yumine, N.; Mimura, K.; Nagahama, M.; Li, J.; McClane, B.A.; Akimoto, S. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. PLoS ONE **2011**, 6, e20376.
- Monturiol-Gross, L.; Flores-Díaz, M.; Campos-Rodríguez, D.; Mora, R.; Rodríguez-Vega, M.; Marks, D.L.; Alape-Girón, A. Internalization of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect. Cell. Microbiol. **2014**, 16, 535–547.
- Nagahama M, Sakurai J: 1991, Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. Toxicon 29:211–217.
- Nagahama, M., K. Michiue & J. Sakurai (1996) Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1280, pp. 120-126.
- Nagahama, M.; Ochi, S.; Oda, M.; Miyamoto, K.; Takehara, M.; Kobayashi, K. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. Toxins **2015**, 7, 396–406.

Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50005-7>.

Narendranathan, T.J. Designing fermentation equipment. *Chemical engineer*. 1986,425, 23-31. Naylor et al, 1987, 1997; Martin et al, 1988; El-Idrissi and Ward, 1992; Younan et al, 1994 Naylor, C. E., J. T. Eaton, A. Howells, N. Justin, D. S. Moss, R. W. Titball & A. K. Basak.

Naylor RD, Martin PK, Barker LT. 1997. Detection of *C. perfringens* alpha toxin by enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 63: 101-102.

Naylor RD, Martin PK, Sharpe RT. 1987. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Res Vet Sci* 42: 255-256.

Ngibuini, Mwai (25 November 2014). "[How Single-Use, Mini Bioreactors Could Revolutionize Bioprocess Scale-Up](#)". *Pharmaceutical Processing*. United States: Advantage Business Media.

Niilo L, 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J* 21, 141-148.

Ochi, S.; Oda, M.; Matsuda, H.; Ikari, S.; Sakurai, J. *Clostridium perfringens* alpha-toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 12181–12189.

Ochi, S.; Oda, M.; Nagahama, M.; Sakurai, J. *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1613, 79–86.

Oda, M.; Ikari, S.; Matsuno, T.; Morimune, Y.; Nagahama, M.; Sakurai, J. Signal transduction mechanism involved in *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced superoxide anion generation in rabbit neutrophils. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 2876–2886.

- Oda, M.; Kabura, M.; Takagishi, T.; Suzue, A.; Tominaga, K.; Urano, S.; Nagahama, M.; Kobayashi, K.; Furukawa, K.; Furukawa, K.; et al. Clostridium perfringens alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33070–33079.
- Oda, M.; Matsuno, T.; Shiihara, R.; Ochi, S.; Yamauchi, R.; Saito, Y.; Imagawa, H.; Nagahama, M.; Nishizawa, M.; Sakurai, J. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by Clostridium perfringens alpha-toxin. *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 1039–1047.
- Oda, M.; Terao, Y.; Sakurai, J.; Nagahama, M. Membrane-Binding Mechanism of Clostridium perfringens Alpha-Toxin. *Toxins* 2015, 7, 5268–5275.
- Payne DW, Williamson ED, Havard H, Modi N, Brown J, 1994. Evaluation of a new cytotoxicity assay for Clostridium perfringens type D ϵ toxin. *FEMS Microbiol, Lett*, 116, 161-168.
- Pelczar M, Chan E, Krieg N. Microbiology Concepts and Applications. 1st ed. London: Education press, 1986:527-55.
- Petit, L. et al. (1999) Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. *Trends* Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R. 1999. Clostridium perfringens: Toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, 7: 104– 110.
- Petrillo TM, Beck-Sague CM, Songer JG, Abramowsky C, Fortenberry JD, Meacham L, et al. Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *N Engl J Med.* 2000; 342:1250–3.
- Pettus, B.J.; Chalfant, C.E.; Hannun, Y.A. Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1585, 114–125.
- Petit L, Gibert M, Gillet D, Laurent Winter C, Boquet P, Popoff MR. Clostridium perfringens epsilon toxin acts on MDCK cells by forming a large membran complex. *Journal of Bacteriology*, 1997, 6480-6487.

- Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E.; Rizzuto, R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **2008**, 27, 6407–6418.
- Popoff, M.R., Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 4, 1021–1064. doi:10.2217/fmb.09.72
- Prakash, A.; Margaritis, A.; Li, H.; Bergougnou, M.A. Hydrodynamics and local heat transfer measurements in a bubble column with suspension of yeast. *Biochemical Engineering Journal*. 2001,9, 155-163.
- Raj, A.E.; Karanth, N.G. Fermentation technology and bioreactor design. *Food Science and Technology New York Marcel dekker*.2006, 148, 33. Rev 1991; 55: 621–648.
- Robertson, S. et al. (2014) Bacteria: *Clostridium perfringens*. In *Encyclopedia of Food Safety* (Motarjemi, Y., ed), pp. 395–402. Academic Press.
- Rood, J.I.; Adams, V.; Lacey, J.; Lyras, D.; McClane, B.A.; Melville, S.B.; Moore, R.J.; Popoff, M.R.; Sarker, M.R.; Songer, J.G.; et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* **2018**.
- SAINT-JOANIS, B.; GARNIER, T.; COLE, S. T. Gene cloning shows the alpha-toxin of *C. perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinases activities. *Mol. Gen. Genetic*, v. 219, p. 453-460, 1989.
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K, 2009. *Clostridium perfringens* ι-toxin: structure and function, *Toxins*, 1, 208-28.
- Sakurai J: 1995, Toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Med Microbiol* 6:175–185.
- Sakurai, J.; Nagahama, M. *Clostridium perfringens* beta-toxin: Characterization and action. *Toxin Rev.* **2006**, 25, 89–108.
- Sakurai, J.; Nagahama, M.; Oda, M.; Tsuge, H.; Kobayashi, K. *Clostridium perfringens* iota toxin: Structure and function. *Toxins* **2009**, 1, 208–228.

- Sarker MR, Shivers RP, Sparks SG, Juneja VK, McClane BA. (2000) Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*; 66: 3234-3240.
- Sayeed S, Uzal FA, Fisher DJ, et al.: 2008, Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol Microbiol* 67:15–30.
- Sesardic D, Corbel M. Testing for neutralising potential of serum antibodies to tetanus and diphtheria toxin. *The Lancet* 1992; 340:737-8.
- Sharma, K.R. Design and operational key factors of bioreactor. *Biotech Articles*.2012.
- Siegel, M.H.; Robinson, C.W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. *Chemical Engineering Science*. 1992, 47, 3215-3229.
- Skerman V, McGowan V, and Sneath P. Approved Lists of Approved Bacterial Names. American Society for Microbiology, Washington DC, USA 1980.
- SMITH, L. Ds. And HOLDEMAN, L.V. : *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Ed. by A. Balows , Springfield , Illinois , USA, Thomas, (1968)
- Smith LD, Holdeman L, 1968. *The pathogenic anaerobic bacteria*, Springfield, III, Thomas.
- Songer JG, 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*, 9, 216-34.
- Songer JG, 2006. Bovine enteritis and enterotoxaemia, In: *Genus Clostridium, Clostridia in medical, veterinary and food microbiology diagnosis and typing*, In: Mainil J, Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG, Peck M, Pelkonen S, Popoff M, Stackebrandt E, Titball R, 1st ed. Luxembourg:

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev. 1996; 9:216–34. [PubMed: 8964036]

Srivastava, A. K. (2011). 2.38 – Fed-Batch Fermentation – Design Strategies. *Comprehensive Biotechnology*, 1, 515–526. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00112-4>

STEVEN B. Goldner, Myron Solberg,* And Laurie S. Post Department of Food Science, Cook College, New Jersey Agricultural Experiment Station, Rutgers, The State University, New Brunswick, New Jersey 08903.

Stiles, B.G.; Barth, G.; Barth, H.; Popoff, M.R. Clostridium perfringens Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? Toxins 2013, 5, 2138–2160.

Takehara, M.; Takagishi, T.; Seike, S.; Ohtani, K.; Kobayashi, K.; Miyamoto, K.; Shimizu, T.; Nagahama, M. Clostridium perfringens ϵ -Toxin Impairs Innate Immunity via Inhibition of Neutrophil Differentiation. Sci. Rep. **2016**, 6, 28192.

Takehara, M.; Takagishi, T.; Seike, S.; Oishi, K.; Fujihara, Y.; Miyamoto, K.; Kobayashi, K.; Nagahama, M. Clostridium perfringens ϵ -Toxin Impairs Lipid Raft Integrity in Neutrophils. Biol. Pharm. Bull. **2016**, 39, 1694–1700.

Tarisse CF, Mazuet C, Pauillac S, Krüger M, Lacroux C, Popoff MR, Dorner BG, Andreoletti O, Plaisance M, Volland H, Simon S. Highly, 2017. Sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of Clostridial E toxin in complex matrices. PLoS ONE 12(7):e0181013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181013>.

Taylor & Stewart, **1941**; Reed & Orr, **1941**; Robertson & Keppie, **1941**; Stewart, **1942**; A4dams & Hendee, **1945**; Logan, Tytell, Danielson & Griner, **1945**; Tamura, Tytell, Boyd & Logan, **1941**). 2008.

Theoret, J.R.; Li, J.; Navarro, M.A.; Garcia, J.P.; Uzal, F.A.; McClane, B.A. Native or Proteolytically Activated NanI Sialidase Enhances the Binding and Cytotoxic Activity of Clostridium perfringens Enterotoxin and Beta Toxin. Infect. Immun. **2018**, 86, e00730-17.

- Titball, R.W.; Naylor, C.E.; Basak, A.K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* **1999**, *5*, 51–64.
- Uzal FA, McClane BA, 2011. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections *Vet Microbiol*, *21*, 153, 37-43.
- Uzal FA, Songer G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goat. *J Vet Diag Invest*. 2008; *20*:253–65.
- Uzal FA, Songer JG (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest*. *20*(3):253-265.
- Uzal, F.A.; Freedman, J.C.; Shrestha, A.; Theoret, J.R.; Garcia, J.; Awad, M.M.; Adams, V.; Moore, R.J.; Rood, J.I.; McClane, B.A. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* **2014**, *9*, 361–377.
- Uzal, F.A.; Vidal, J.E.; McClane, B.A.; Gurjar, A.A. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinol. J.* **2010**, *2*, 24–42.
- Van't Reit, Klaas, and Johannes Tramper, 1991 *Basic Bioreactor Design*, Marcel Dekker, New York.
- Veera, U.P.; Kataria, K.L.; Joshi, J.B. Gas hold-up profiles in foaming liquids in bubble columns. *Chemical Engineering Journal*. 2001, *84*, 247-256.
- Wang, G.; Zhang, W.; Jacklin, C.; Freedman, D.; Eppstein, L.; Kadouri, A. Modified CelliGen-packed bed bioreactors for hybridoma cell cultures. *Cytotechnology*. 1992, *9*, 41, 49. Washington, USA, 768 pp.
- Welch WH, and Nuttall, GHF. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1892; *3*: 81-91

Williams J. A., 2002 Keys to bioreactor selections, Environmental & Production Solutions, LLC, cep magazine.

Williamson ED and Titball RW. A genetically engineered vaccine against α -toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. Vaccine 1993; 11: 1253-1258.

Worthington RW, Mulders MS: 1977, Physical changes in the epsilon prototoxin molecule of *Clostridium perfringens* during enzymatic activation. Infect Immun 18:549–551.

Yang, Y., & Sha, M. (2017). A Beginner's Guide to Bioprocess Modes-Batch, Fed-Batch, and Continuous Fermentation.

Yates, G. T., and Smotzer, T. (2007) On the lag phase and initial decline of microbial growth curves . *J. Theoret. Biol.* **244**, 511 – 517.

Yu, R.K.; Tsai, Y.-T.; Ariga, T.; Yanagisawa, M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. J. Oleo Sci. **2011**, 60, 537–544.

Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. Cell Calcium **2011**, 50, 211–221