



SERBEST VE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ
Saccharopolyspora erythraea
SUŞU İLE FARKLI BİLEŞENLERİ İÇEREN ORTAMLARDA
ERİTROMİSİN ÜRETİMİ

Hüseyin MUTLU

Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hakan KALENDER

HAZİRAN-2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERBEST VE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ *Saccharopolyspora erythraea* SUŞU İLE
FARKLI BİLEŞENLERİ İÇEREN ORTAMLARDA ERİTROMİSİN ÜRETİMİ

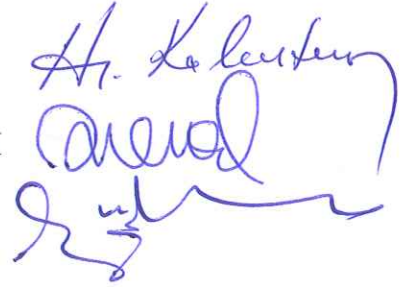
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüseyin MUTLU

171132102

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27 Mayıs 2019
Tezin Savunulduğu Tarih : 18 Haziran 2019

Danışman : Prof. Dr. Hakan KALENDER
Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM
Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖBEK



HAZİRAN - 2019

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan ve yönlendiren, yanında çalışmaktan gurur duyduğum, danışmanım Sayın Prof. Dr. Hakan KALENDER' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde yanımda olan, tüm kalbiyle bana inanan, her koşulda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme desteklerinden ve varlıklarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi MF.18.14 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederim.

Çalışmam süresince bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet KALENDER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hüseyin MUTLU
ELAZIĞ – 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikroorganizmaların Tarihçesi	2
1.2. <i>Saccharopolyspora erythraea</i> Bakteri Türü.....	5
1.3. Antibiyotikler.....	6
1.3.1. Antibiyotiklerin Önemi ve Keşfi.....	6
1.3.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	9
1.3.2.1. Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörleri	9
1.3.2.2. Hücre Membranı İnhibitörleri.....	9
1.3.2.3. Protein Sentezi İnhibitörleri.....	10
1.3.2.4. Nükleik Asit Fonksiyonu ve Sentezi İnhibitörleri.....	11
1.3.3. Eritromisin Antibiyotiği.....	13
1.3.4. Mikroorganizmalarda Antibiyotik Direnç Oluşumu.....	14
1.3.4.1. Genetiğe Bağlı Olmayan (Doğal) Direnç Oluşumu.....	14
1.3.4.2. Genetiğe Bağlı (Kazanılmış) Direnç Oluşumu.....	14
1.3.4.2.1. Kromozomal Direnç	15
1.3.4.2.2. Ekstrakromozomal Direnç.....	15
1.3.4.2.3. Çapraz Direnç.....	16
1.4. İmmobilizasyon	16
1.4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	17
1.4.1.1. Taşıyıcı Bağlama Yöntemi.....	18
1.4.1.2. Çapraz bağlama Yöntemi.....	19

1.4.1.3. Tutuklama Yöntemi.....	19
1.5. Çalışmanın Amacı.....	20
2. MATERYAL VE METOT.....	21
2.1. Materyal.....	21
2.1.1. Bakteri Suşları.....	21
2.1.2. Kimyasallar ve Sarflar.....	21
2.1.3. Cihazlar.....	21
2.1.4. Besiyerleri.....	22
2.1.4.1. Nutrient Agar (Lab M).....	22
2.1.4.2. Nutrient Broth (Lab M)	22
2.1.4.3. Oatmeal Agar (Condalab)	22
2.1.4.4. Müller Hinton Agar (Himedia).....	23
2.2. Metot.....	23
2.2.1. Eritromisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması.....	23
2.2.2. Sporulasyon Kültürünün Hazırlanması.....	24
2.2.3. Eritromisin Üretim İçin Serbest <i>S. erythraea</i> Suşunun Kullanılması.....	24
2.2.4. <i>S. erythraea</i> Suşunun İmmobilizasyon Yöntemleri.....	24
2.2.4.1. Kalsiyum aljinat ile İmmobilizasyon Yöntemi.....	24
2.2.4.2. Poliakrilamid Jel ile İmmobilizasyon Yöntemi.....	26
2.2.5. Fermantasyon Ortamlarındaki Üretilen Eritromisin Miktarının Spektrofotometrik Yöntem ile Tespiti.....	26
2.2.6. Fermantasyon Ortamlarındaki Üretilen Eritromisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti.....	27
2.2.7. İmmobilize Edilmiş <i>S. erythraea</i> Suşunun Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	27
2.2.8. SPSS Programı ile istatistiksel analiz.....	27
3. BULGULAR.....	28
3.1. Eritromisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması...	28
3.2. Eritromisin Üretim İçin Serbest <i>S. erythraea</i> Suşunun Kullanılması.....	30
3.3. Eritromisin Üretim İçin İmmobilize <i>S. erythraea</i> Suşunun Kullanılması.....	36
3.4. Fermantasyon Ortamlarında Üretilen Eritromisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti.....	40

3.5. İmmobilize Edilmiş <i>S. erythraea</i> Suşunun Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	40
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	43
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52



ÖZET

Bu çalışmada, serbest ve immobilize edilmiş *Saccharopolyspora erythraea* suşu kullanılarak farklı bileşenleri içeren ortamların eritromisin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumlu ve/veya olumsuz yönde etki gösterebilen, düşük moleküler ağırlığa sahip, mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlerdir. Eritromisin antibiyotiği klinikte en çok kullanılan makrolid grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Çalışmamızda, eritromisin üretimi için, karbon kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda ticari glikoz ve şeker pancarı melası içeren iki farklı ortam kullanıldı. Bakteri hücreleri hem serbest olarak, hem de kalsiyum aljinat ve poliakrilamid jel ile immobilize edilerek eritromisin üretimi üzerine etkileri incelendi.

Çalışmamız sonucunda, karbon kaynağı olarak kullanılan 60 g/l şeker pancarı melası fermantasyon ortamında 5. gün sonunda 0,271 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değerine ulaşıldı. Yapılan immobilizasyon deneyleri sonucunda, kalsiyum aljinat immobilizasyonu ile 6. gün sonunda 0,584 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değeri elde edildi.

Sonuç olarak şeker pancarı melası karbon kaynağının ticari glikoza göre hem ucuz hem de 4,37 kat daha yüksek verimlilik değerine ulaşılmıştır. Ayrıca kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonunda serbest hücreye göre 2.16 kat daha yüksek verimlilik değerine ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eritromisin, İmmobilizasyon, *Saccharopolyspora erythraea*, Antibiyotik

SUMMARY

Erythromycin Production in Media Containing Different Components Using Free and Immobilized *Saccharopolyspora erythraea* Strains

In this study, the effects of media containing different components on erythromycin production were investigated by using free and immobilized *Saccharopolyspora erythraea* strain. Antibiotics are microbial secondary metabolites of low molecular weight, which may have positive and / or negative effects on certain regions of prokaryotic and eukaryotic organisms. Erythromycin antibiotic is the most commonly used antibiotic in the clinic and is an antibiotic in the macrolide group. In our study, two different media containing different concentrations of commercial glucose and sugar beet molasses were used as carbon sources for erythromycin production. Bacterial cells were immobilized both freely and with calcium alginate, polyacrylamide gel and their effects on erythromycin production were examined.

As a result of our study, the highest yield value was reached with 0.271 $\mu\text{g} / \text{ml} \cdot \text{hour}$ at the end of the 5th day in the fermentation medium of 60 g / l sugar beet molasses used as carbon source. As a result of immobilization experiments, calcium alginate immobilization yielded the highest efficiency value at the end of 6th day with 0.584 $\mu\text{g} / \text{ml} \cdot \text{hour}$.

In conclusion, the sugar beet molasses carbon source was found to be cheaper and 4.37 times higher than the commercial glucose. In addition, the results of immobilization with calcium alginate reached 2.16 times higher efficiency than free cell.

Keywords: Erythromycin, Immobilization, *Saccharopolyspora erythraea*, Antibiotic

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Anton Van Leeuwenhoek ve tasarladığı mikroskop.....	2
Şekil 1.2. <i>S. erythraea</i> bakterisinin mikroskop görüntüsü.....	5
Şekil 1.3. Alexander Fleming'in penisilini keşfi.....	6
Şekil 1.4. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları	11
Şekil 1.5. Eritromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.6. Temel hücre immobilizasyon teknikleri	17
Şekil 2.1. Kalsiyum aljinat ile immobilizasyon yöntemi.....	25
Şekil 3.1. UV kalibrasyon için farklı konsantrasyonlardaki eritromisin numuneleri.....	28
Şekil 3.2. Eritromisin kalibrasyon eğrisi.....	29
Şekil 3.3. Farklı şeker pancarı melası fermantasyon ortamları ile eritromisin üretimi.....	30
Şekil 3.4. Serbest hücre ticari glikoz karbon kaynağı verim değerleri.....	32
Şekil 3.5. Serbest hücre glikoz karbon kaynağı verimlilik değerleri.....	33
Şekil 3.6. Serbest hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verim değerleri.....	35
Şekil 3.7. Serbest hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verimlilik değerleri.....	36
Şekil 3.8. <i>S. erythraea</i> suşunun kalsiyum aljinat ile immobilizasyonundan sonra oluşan boncuklar.....	36
Şekil 3.9. <i>S. erythraea</i> suşunun poliakrilamid jel ile immobilizasyonundan sonra oluşan jel parçaları.....	37
Şekil 3.10. İmmobilize hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verim değerleri.....	39
Şekil 3.11. İmmobilize hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verimlilik değerler grafiği.....	39
Şekil 3.12. Fermantasyon ortamında üretilen eritromisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite test görüntüsü.....	40
Şekil 3.13. Poliakrilamid jel ve kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucu oluşan jel ve boncukların ışık mikroskobu görüntüleri.....	41
Şekil 3.14. Taramalı elektron mikroskobu.....	41
Şekil 3.15. Kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucu oluşan boncuğun SEM görünsü....	42
Şekil 3.16. Poliakrilamid jel ile immobilizasyon sonucu oluşan jel parçasığının SEM görüntüsü.....	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Mikrobiyoloji alanındaki önemli buluşlar	4
Tablo 1.2. 1920-1960 yılları arasında keşfedilmiş önemli antibiyotikler.....	8
Tablo 1.3. Bazı önemli antibiyotiklerin kökeni ve etki mekanizmaları.....	12
Tablo.1.4. İmmobilize mikrobiyal hücreler tarafından üretilen bazı antibiyotikler.....	20
Tablo 3.1. Eritromisin kalibrasyon eğrisinin spektrofotometrik yöntem ile bulunması deneyinin absorbans sonuçları.....	29
Tablo 3.2. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun ticari glikoz (50g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	31
Tablo 3.3. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun ticari glikoz (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	31
Tablo 3.4. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun ticari glikoz (70g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	32
Tablo 3.5. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri	33
Tablo 3.6. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (50g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	34
Tablo 3.7. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	34
Tablo 3.8. Serbest <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (70g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	35
Tablo 3.9. Kalsiyum aljinat ile immobilize <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	37
Tablo 3.10. Poliakrilamid jel ile immobilize <i>S. erythraea</i> suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri.....	38

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOLLER

-	: Negatif
+	: Pozitif
=	: Eşit
%	:Yüzde

KISALTMALAR

Mm	: Milimetre
M.Ö.	: Milattan önce
Y.Y.	: Yüzyıl
G-C	: Guanin-Sitozin
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribo nükleik asit
tRNA	: Taşıyıcı ribo nükleik asit
S (50S vb.)	: Svedberg ünitesi
NAG	: N-asetil glukozamin
NAM	: N-asetil-muramik asit
PABA	: Para-amino benzoik asit
G	:Gram
°C	:Santigrat Derece
l	:Litre
Dk	:Dakika
Ml	:Mililitre
M	:Molar
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
Sn	:Saniye
Nm	:Nanometre
Rpm	:Dakikadaki Devir Sayısı

1. GİRİŞ

Dünyadaki ekosistemin en önemli elamanları olan mikroorganizmalar (virüsler, bakteriler, protozoalar, birçok alg ve funguslar) karbon, oksijen, azot, kükürt ve fosfor döngülerinin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar. Mikroorganizmalar, insanlık yaşamı için önemli olan ekmek, peynir, yoğurt, şarap, turşu, sirke vb. fermente ürünlerin yapımında; organik asit, antibiyotik, vitamin, enzim ve aşılarda üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Tunail, 2009).

Faydalarının aksine enfeksiyöz hastalıkların etkeni de mikroorganizmalardır. Enfeksiyöz hastalıklar, insanlığın varoluşundan beri tüm toplumları tehdit eden en önemli sorunlardan biri olmuştur ve enfeksiyon etkenlerinden biri olan bakterilere karşı eski çağlarda çeşitli yöntemler denense de ilk antibiyotiğin keşfedilmesi ile enfeksiyöz hastalıklara karşı mücadele etkili olmaya başlamıştır. Antibiyotik kavramı; Alexander Fleming'in 1929'da, stafilokokların üremesini engellediğini tespit ettiği *Penicillium chrysogenum* ile keşfedilmiş fakat 1944 yılında ticari olarak üretilen penisilin ile önemli hale gelmiştir. Antibiyotikler “mikroorganizmalar tarafından ikincil metabolit olarak üretilen ve diğer mikroorganizmaları öldüren (Bakterisit) ya da inhibe eden (Bakteriyostatik) düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler” olup, endüstriyel mikroorganizmalarca sentezlenen en önemli organik bileşiklerden biridir ve son 70 yıl içinde insan sağlığını iyileştirmedeki etkileri tartışılmazdır (Arda, 2000).

Eritromisin antibiyotiği 1952 yılında keşfedilmiş olup, daha önceleri *Streptomyces erythreus* olarak bilinen fakat günümüzde *Saccharopolyspora erythraea* olarak adlandırılan bakteriler tarafından üretilmektedir (Liu vd., 2013). Klinikte en çok kullanılan makrolid grubu geniş spektrumlu bir antibiyotik olan eritromisin, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde değişik formlarda (Kapsül, Toz, Jel, Ampul ve Tablet) kullanılmaktadır (Öner, 1989). Eritromisin sadece Gram pozitif bakteriler değil, aynı zamanda Gram negatif bakteriler ve mikoplazmalara da etkili bir antibiyotiktir.

1.1. Mikroorganizmaların Tarihçesi

Dünya ekosisteminde yaşam, besin maddelerine bağlıdır. Besin maddelerinin oluşumunda mikroorganizmalar önemli işlevler üstlendiklerinden yaşam döngüsünde aktif rol oynarlar (Tunail, 2009). 1 mm'nin altında olan gözle görülemeyen bu küçük organizmalar (virüsler, bakteriler, protozoalar, birçok alg ve funguslar) fosfor, oksijen, kükürt, azot, ve karbon döngülerinde çok önemli işlevler üstlenmektedirler (Arda, 2000; Tunail, 2009).

İnsan sağlığı için önemli olan etanol, organik asit, vitamin, enzim ve aşılarda üretiminde; ekmek, şarap, yoğurt, turşu, peynir, bira, sirke gibi fermente ürünlerin yapımında mikroorganizmalar sıklıkla kullanılmaktadır (Tunail, 2009). Son yüzyılda ortaya çıkan biyoteknoloji, birçok hastalık teşhisi ve tedavisi, gen transferi, klonlama vb. yöntemler bu küçük canlıların keşfiyle ilerlemektedir (Arda,2000).

Diğer yandan faydalarının aksine hastalık etkeni olarak geçmiş yüzyıllarda insan, hayvan ve bitki popülasyonunu tehlike altına almış olan mikroorganizmalar; Anton Van Leeuwenhoek'un 1675 tarihinde kendi tasarladığı bir mikroskobu yapmasıyla gözlemlenmiş (Şekil 1.1) ve Yunancada mikros "küçük" ve organismos "organizma" kelimelerinden meydana gelmiştir (Tunail, 2009).



Şekil 1.1. Anton Van Leeuwenhoek ve tasarladığı mikroskop (URL-1, 2019).

Bu keşiften önce mikroorganizmalar hakkında ilk fikirler M.Ö. 1. yüzyılda Romalı akademisyen Marcus Terentius Varro'nun Tarım Üzerine adlı kitabında şöyle yer almaktadır: ” ...ve çünkü gözle görülemeyen, havada yüzen; ağız ve burun yoluyla vücuda giren; ciddi hastalıklara yol açan çok hızlı hareket eden tehlikeli yaratıklar vardır”. El-Kanun fi't-Tıb (1020) kitabında İbn-i Sina, vücut salgılarının enfekte olmadan önce vücut dışından kirli organizmalar tarafından kirletildiğini ifade etmiş ve aynı zamanda tüberküloz ve diğer hastalıkların bulaşıcı olabileceğini savunmuş, bunların enfeksiyöz hastalık olduğunu söylemiş ve yayılmalarını engellemek için karantina uygulattırmıştır (Arda, 2000). Büyük Veba Salgını 14. Y.Y.'da Endülü's'e yayılınca İbn Khatima, bulaşıcı hastalıkların insan vücuduna giren küçük canlılar tarafından yayıldığını yazmıştır. 1546 yılında, Girolamo Fracastoro salgın hastalıkların, enfeksiyonu doğrudan veya dolaylı temas veya bazen çok uzun mesafelerde temas olmaksızın ileten taşınabilir tohum benzeri yapılar ile meydana getirildiğini ileri sürmüştür (Arda, 2000; Tunail, 2009). Maalesef bu ortaya atılan fikirler basit gözlemlere ve tahminlere dayandığı için mikroskobun ve mikroorganizmaların keşfine kadar fermente ürünlerin, hastalıkların ve bazı yaşamsal oluşumların nedeninin mikroorganizma olduğu tespit edilememiştir. Mikrobiyoloji, Robert Koch'un ve Louis Pasteur'ün 1857-1881 yılları arasında yaptıkları çalışmalar sayesinde mikroskobun bulunmasından sonra geçen 200 yıllık duraklama döneminden çıkıp yükselme dönemlerine doğru ilerlemiştir (Tunail, 2009). Louis Pasteur tavuk kolerası, kuduz ve antraks hastalıkları üzerinde korunma ve aşılama çalışmalarını yürütmüş; şarap ve biranın maya hücrelerinden kaynaklandığını saptayarak fermantasyon teknolojisini bulmuş ve bu çalışmalar sonucunda yayınladığı pastörizasyon esasları günümüzde halen geçerliliğini korumaktadır (Arda, 2000; Tunail, 2009). Louis Pasteur'ün bu çalışmalarını cerrahiye uygulayan ilk kişi bir İngiliz cerrahı olan Joseph Lister; 1852 yılında operasyonlarda dezenfektan madde ile temas ettirilmiş sargı bezlerini kullanarak mikroorganizmalardan kaynaklı hastalıkların önüne geçmiş böylece cerrahide antiseptiklerin önemini ortaya koymuştur (Tunail, 2009). Robert Koch'un geliştirdiği katı besiyerleri karışık mikroorganizma kültürlerinden saf kültür elde edilmesini sağlamıştır ve aynı zamanda “Koch postulatları” olarak bilinen hastalıklar üzerine bazı kriterler öne sürmüş ve geçerliliği uzun yıllar boyunca sürdürmüştür (Arda, 2000).

Robert Koch anilin boyaları ile mikroorganizmaları boyama yöntemlerini geliştirmiş ve bakteriyoloji alanında uygulanabilir hale getirmekle birlikte, 1876 yılında Antraks ve 1882 tüberküloz hastalıklarının teşhisi ve etkenini keşfetmiştir. 1905 yılında tüberküloz

hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*’i keşfinden dolayı da Nobel ödülüne layık görülmüştür (Arda, 2000; Tunail, 2009). 1884 yılında Christian Gram’ın Gram boyama yöntemini bulması ve 1887 yılında Julius Petri’nin de Petri kaplarını tasarlaması Mikrobiyoloji’nin gelişmesini hızlandırmıştır ve halen geçerliliklerini korumuşlardır (Tunail, 2009). Mikrobiyolojideki diğer önemli buluşlar Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

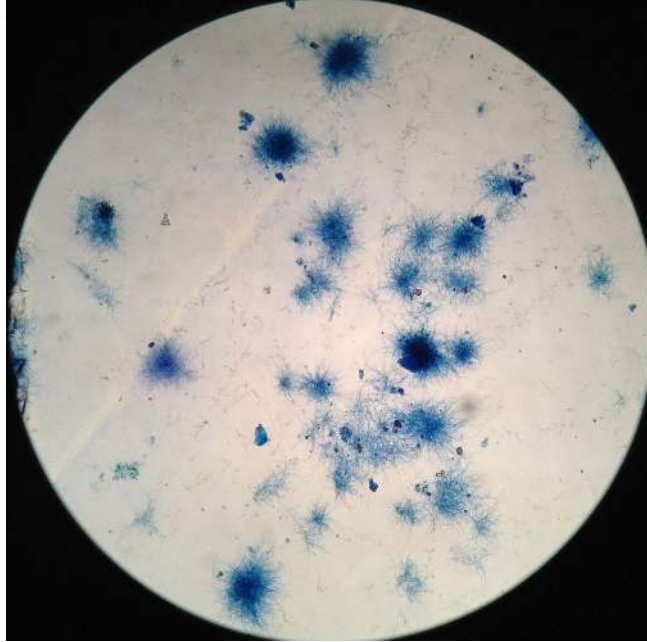
Tablo 1.1. Mikrobiyoloji alanındaki önemli buluşlar (URL-2, 2019).

1675	Antoni Van Leewenhock mikroskobu kullanarak mikroorganizmaları keşfi.
1729-1799	Spallanzani Redi’nin bulguları paralelinde önemli bir adım attı ve ağzı sıkıca kapatılmış bir balonda, kaynatıldıktan sonra tutulan et suyunun bozulmadığını gördü.
1793-1867	Pierre Rayer şarbondan ölenlerin kanlarında birtakım çomakcıklar gördü.
1796	Jenner inek çiçeğini insana bulaştırarak, çiçeğe karşı korunmanın mümkün olduğunu gösterdi.
1829	Ehrenberg ilk kez ‘bakteri’, ‘spiril’ ve ‘spiroket’ deyimlerini kullandı.
1837	Magendie ilk anafilaksi olayını bildirdi; Robert Remak favusun etkenleri olan mantarları tarif ettiler.
1854	Pacini kolera etkenini <i>Vibrio cholera</i> olarak tanımlamıştır; Schröder ve Von Dush pamuktan süzülen havanın steril olduğunu gösterdiler.
1880	Metchnikoff fagositoz olayını buldu; bel soğukluğu ve frengi için aşılar geliştirdi.
1888	Geartner <i>Salmonella enteridis</i> ’i buldu.
1902	Richet ve Portier’in anafilaksiyi dünyaya duyurması; Walter Reed sarıhumma etkeninin bir virüs olduğunu bildirdi.
1911	Rous ilk tümör virüsünü buldu.
1917	Felix d’Herelle bakteriyofajları buldu.
1936	Max ve Theiler sarıhumma aşısını buldular.
1945	Florey, Fleming ve Chain penisilini buldukları için Nobel ödülü aldılar.
1953	Watson ve Crick DNA’nın 3 boyutlu süper sarmal yapısını çözdüler.

1.2. *Saccharopolyspora erythraea* Bakteri Türü

İlk olarak *Streptomyces erythraeus* (Şekil 1.2) olarak adlandırılıp, sonrasında *Saccharopolyspora erythraea* olarak adı değiştirilen, Pseudonocaridaceae familyası aktinomiset grubunda yer alan ve toprakta yaşayan bir mikroorganizmadır (Liu vd., 2013). İkincil metabolit olarak makrolid grubunda yer alan tıpta hayati bir rol oynayan geniş spektrumlu eritromisin antibiyotiğinin endüstriyel ölçekte üreticisidir (Licona-Cassani vd., 2014; Oliynyk vd., 2007).

S. erythraea gram pozitif olup, DNA yapısında 7,264 gen ve 8,212,805 baz çifti içermekle birlikte kromozomunda G-C oranı çok yüksektir (Oliynyk vd., 2007). Yeniden sınıflandırılmasına rağmen *Streptomyces coelicolor* A3 (2) ve *Streptomyces avermitilis* türlerine genetik olarak yakın olduğu anlaşılmıştır (Oliynyk vd., 2007). *S. erythraea* suşunun üreme ısısı 30 °C ve fermantasyon ortamının pH'sı 7'dir (Hamedi vd., 2005; Bandyopadhyay vd., 1993)

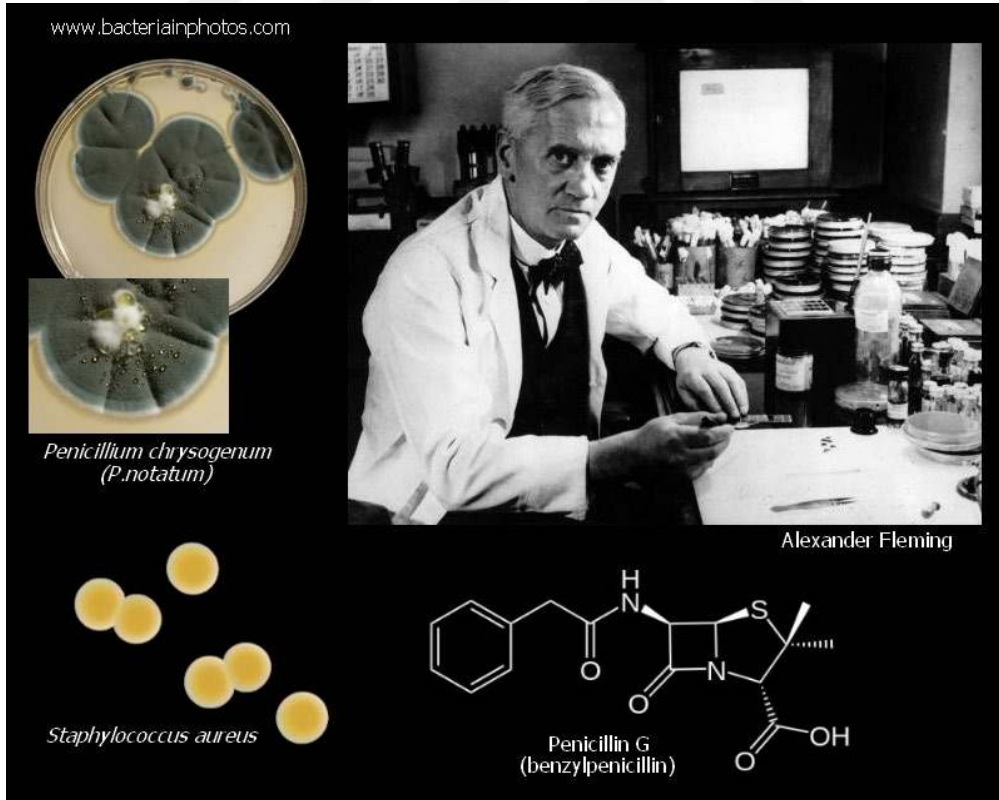


Şekil 1.2. *Saccharopolyspora erythraea* bakterisinin mikroskop görüntüsü (URL-3, 2019)

1.3. Antibiyotikler

1.3.1. Antibiyotiklerin Önemi ve Keşfi

Antibiyotikler “Mikroorganizmalar tarafından ikincil metabolit olarak üretilen ve diğer mikroorganizmaları öldüren (Bakterisit) ya da inhibe eden (Bakteriyostatik) düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler” olarak tanımlanabilir (Waites vd., 2015; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Antibiyotik üretimi, onu üreten mikroorganizma için selektif bir avantaj sağlar (Arda, 2000). Endüstriyel mikroorganizmalarca sentezlenen en önemli organik bileşiklerden biri olan antibiyotikler, son 70 yıl içinde insan sağlığını iyileştirmede önemli katkılar sağlamıştır (Waites vd., 2015). Antibiyotik kavramı; Alexander Fleming'in 1928'da, stafilokokların üremesini engellediğini tespit ettiği *Penicillium chrysogenum* (Şekil 1.3) ile keşfedilmiş fakat 1944 yılında ticari olarak üretilen penisilin ile önemli hale gelmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).



Şekil 1.3. Alexander Fleming'in penisilini keşfi (URL-4, 2019).

Penisilinin keşfinden çok daha öncesinde; Çin’de M.Ö.600 yıllarında küflü soya püresiyle iltihaplı yaralar tedavi edilmiştir. Sümer ve Mısırlılar, bayat ekmekle yapılan birayı antibiyotik olarak kullanılmıştır (Akbulut, 2019).

Mezopotamya ve Ukrayna’da yaralar toprakla tedavi edilmiştir. 19. y.y.’da ise Joseph Lister, küf mantarı bulaşan idrarda bakteri çoğalmadığını tespit etmiştir. William Roberts, 1874’te küf mantarının bakterileri büyütmediğini keşfetmiş ve Louis Pasteur, 1877’de küfün şarbon aktivitesini durdurduğunu saptamıştır. Son olarak Ernest Duchesne, 1897’de küf mantarının *coli basili* çoğalmasını engellediğini tezinde belirtmiştir (Akbulut, 2019). Bu gözlemleri yapanlar maalesef penisilinin kâşifi olamamışlardır.

1943’de Selman Waksman ve arkadaşları tarafından, *Streptomyces griseus* ’dan elde edilmiş streptomisin bulunmasıyla antibiyotik araştırmaları hız kazanmış ve streptomisin, tüberküloz tedavisinde kullanılan etkili ilk antibiyotik olmuştur (Arda, 2000; Oskay ve Tamer, 2009). Waksman ve arkadaşlarının bu buluşundan sonra 1950 ve 1960’lı yıllarda çok sayıda antibakteriyal ve antifungal antibiyotikler bulunmuş ve bu dönem antibiyotik keşiflerinin “**Altın Çağı**” olarak nitelendirilmiştir (Oskay ve Tamer, 2009). Farklı organizmalardan 4000’in üzerinde antibiyotik izole edilmesine karşın sadece 50 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır (Waites vd., 2015). Bunların içinde en fazla bilinen ve en fazla önemli olan antibiyotikler beta laktamlar (penisilin, sefalosporinler vb.), aminoglikozitler (streptomisin, neomisin, gentamisin vb.) ve geniş spektrumlu tetrasiklinler’dir (Arda, 2000; Waites vd., 2015; Reynolds ve Tansey, 2000).

Şimdiye değin bilinen 12.000 antimikrobiyalın %22’si filamentli funguslardan, %55’i filamentli bakteriler olan Actinomycetes’lerin *Streptomyces* cinsinden, %11’i diğer Actinomycetes’lerden ve %12’si filamentli olmayan bakterilerden elde edilmektedir (Oskay ve Tamer, 2009). Geniş spektrumlu antibiyotikler Gram + ve Gram - bakteriler türlerinin büyük bir kısmına, dar spektrumlu antibiyotikler Gram + veya Gram - bakteri çeşitlerinden birine, sınırlı spektrumlu antibiyotikler ise sadece tek bir mikroorganizmaya karşı etkilidirler (Arda, 2000; Waites vd., 2015).

1920-1960 yılları arasında keşfedilmiş önemli antibiyotikler Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. 1920-1960 Yılları arasında keşfedilmiş önemli antibiyotikler (Reynolds ve Tansey, 2000).

Antibiyotik	Keşfedildiği Yıl	Üretici Organizma	Kaynak
Penicillin	1928-1940	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Hava, Londra, İngiltere
Tyrothricin	1939	<i>Bacillus brevis</i>	Toprak, New York, ABD
Streptomycin	1943	<i>Streptomyces griseus</i>	Hava, New Jersey, ABD
Bacitracin	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>	Enfeksiyonlu yara
Chloramphenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Malçlanmış alan, Venezuela
Polymyxin	1947	<i>Bacillus polymyxa</i>	Hava, Birleşik Krallık ve ABD
Chlortetracycline	1948	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Hava
Cephalosporin-C, -N ve -P	1948	<i>Cephalosporium sp.</i>	Kanalizasyon çıkışı, Sardinya Adası, İtalya
Neomycin	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>	Hava, New Jersey, ABD
Oxytetracycline	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>	Hava
Nystatin	1950	<i>Streptomyces noursei</i>	Çiftlik havası, Fauquier Bölgesi, Virginia, ABD
Erythromycin	1952	<i>Streptomyces erythreus</i>	Hava, Filipin Adaları
Vancomycin	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>	Hava, Borneo ve Indiana, ABD
Ristocetin	1957	<i>Nocardia lurida</i>	Hava, Tanrılar Bahçesi, Colorado, ABD
Kanamycin	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Hava, Japonya
Paromomycin	1959	<i>Streptomyces rimosus</i>	Hava, Colombia

1.3.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

1.3.2.1. Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörleri

Genellikle bakteriyel hücre duvarı (membran) sentezi inhibitörleri, peptidoglikan oluşum aşamasını hedefler (Şekil 1.4) ve mikroorganizmanın aktif büyüme evresinde etkilidir (Bilgehan, 2002). Penisilin, ampisilin, kabenilin, metisilin, oksasilin, sefalosporin, vankomisin ve basitrasin antibiyotikleri hücre duvarı sentezinin engellenmesinde kullanılan antibiyotiklerdir (Arda, 2000).

Penisilin antibiyotiği toksisitesi az olduğundan çok geniş kullanım alanı vardır. Penisilin, beta laktam halkası vasıtasıyla transpeptidaz enzimine bağlanır ve enzimin ileri aktivite göstermesini engelleyerek gevşek bir peptidoglikan hücre duvarı oluşmasını sağlayarak bakteri hücresinin parçalanmasına sebep olur. Penisilin antibiyotiği Gram + bakteriler üzerinde etki eder (Bilgehan, 2002).

Penisilin gibi bir beta laktam antibiyotiği olan ve aynı etkiyi gösteren Sefalosporinler, penisiline alerjisi olanlar için kullanışlıdır ve hem Gram + hem de Gram - bakteriler üzerinde etkilidir (Waites vd., 2015).

Vankomisin antibiyotiği N-asetil glukozamin (NAG) N-asetil-muramik asit (NAM) pentapeptit alt birimlerinin yan zincirleri üzerindeki D-alalil-D-alanin grubuna bağlanarak yeni peptidoglikan birleşmelerini engelleyerek, peptidoglikan sentezini sınırlar ve Gram + bakteriler üzerinde etkilidir (Bilgehan, 2002).

Basitrasin antibiyotiği ise sitoplazmik membran boyunca bir lipit taşıyıcı molekülden peptidoglikan alt ünitelerinin ayrılmasını inhibe ederek peptidoglikan sentezini önlemekle birlikte yüksek toksisiteye sahip bir antibiyotiktir ve Gram + bakteriler üzerinde etkilidir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

1.3.2.2. Hücre Membranı İnhibitörleri

Bakterilerde sitoplazmik membran bütünlüğü hem enerji üretiminde hem de besin taşımada hem de enerji üretiminde önemli görevlere aracılık eder. Gram - bakterilerin dış membranı aynı zamanda koruyucu bir hücre katmanıdır (Bilgehan, 2000; Tunail, 2009).

Prokaryotik ve ökaryotik membranların yapıları benzer olduğundan dolayı, hücre membranına etki eden (Şekil 1.4) antibiyotiklerin kullanımı sınırlı olmakla birlikte toksiktir. Polimiksin (A,B,C,D,E), gramisidin ve tyrosidin hücre membranına etki eden antibiyotiklerdir. Tek klinik önemi olan polimiksin, membran fosfolipitlerine bağlanıp membranın fonksiyonunu inhibe ederek bakterisidal etki oluşturur (Arda, 2000; Waites vd., 2015).

1.3.2.3. Protein Sentezi İnhibitörleri

Protein sentezi, DNA'nın mRNA'ya transkripsyonu, sonrasında mRNA'nında ribozomlar ve tRNA'ların etkileşimi ile polipeptitlere translasyonu şeklindeki biyokimyasal bir süreç olmakla birlikte bu gruptaki antibiyotikler bu süreci engelleyerek (Şekil 1.4) mikroorganizmaların ölmesine neden olurlar (Waites vd., 2015). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin ribozom yapılarının farklı olmasından dolayı bu antibiyotikler seçici toksisite açısından önemli bir avantaj sağlamakla birlikte, ökaryotik hücrelerin mitokondrileri bakteri hücrelerinin ribozomlarına benzerlik gösterdiğinden bu tür antibiyotikler konukçu hücre üzerinde olumsuz etki gösterebilirler (Bilgehan, 2002).

Aminoglikozidler (streptomisin, kanamisin, tobramisin, gentamisin vb.), makrolidler (eritromisin, oleandomisin vb.), tetrasiklinler (tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, doksisisiklin vb.) bu gruptaki antibiyotiklerdir (Arda, 2000).

Aminoglikozit antibiyotikler bakteriyel ribozomların 30S alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin başlamasını inhibe ederler. Makrolid antibiyotikler (Eritromisin; Klinikte ne çok kullanılan antibiyotik.) bakteriyel ribozomların 50S alt birimlerine bağlanarak proteinin uzamasına engel olurlar (Waites vd., 2015).

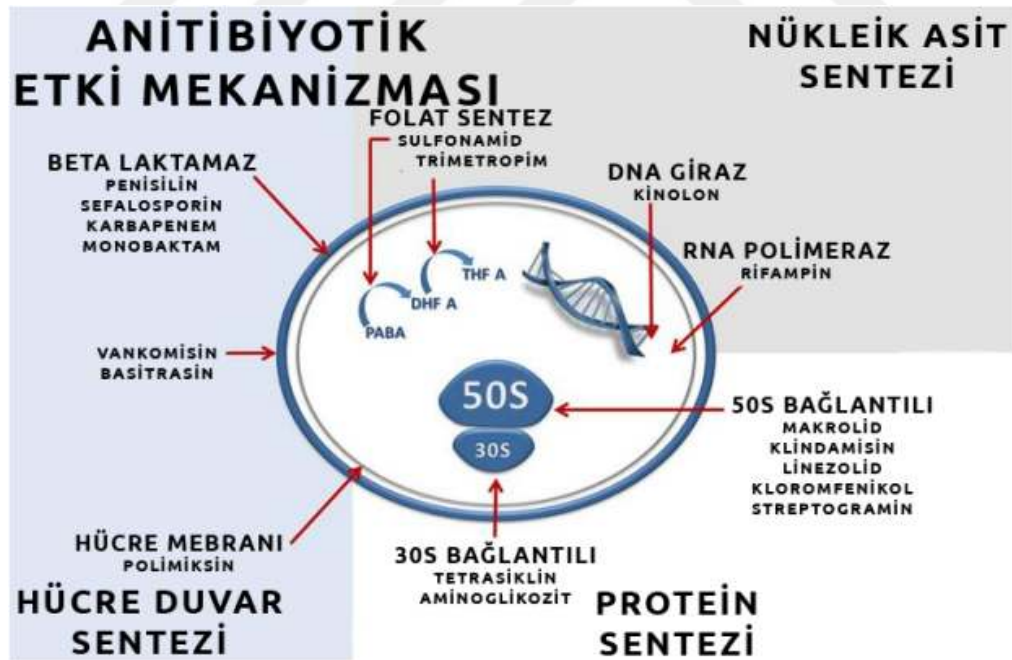
Tetrasiklin antibiyotikleri ise bakterilerde 30S alt birimlerine bağlanmakla birlikte, hayvan hücrelerinde hem 70s hem de 80S ribozomlarda gerçekleşen protein sentezini inhibe eden geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Çoğu bakteri, tetrasiklin için aktif taşıma sistemine sahip olduğundan, bu gruptaki antibiyotikler ökaryotik hücreler üzerinde düşük toksik etki gösterirler (Arda, 2000; Bilgehan, 2002).

1.3.2.4. Nükleik Asit Fonksiyonu ve Sentezi İnhibitörleri

Bu gruptaki antibiyotikler DNA veya RNA'nın sentezini veya fonksiyonunu engelleyerek (Şekil 1.4) hücre gelişimini etkiler, fakat hem mikrobiyal hücreleri hem de hayvan hücrelerini etkilediğinden klinik kullanımları oldukça sınırlıdır. Aktinomisin, mitomisin, rifamisin, streptoviridin, kinonlar ve sülfonamidler bu gruptaki antibiyotiklerdir (Arda, 2000; Waites vd., 2015)

Sülfonamidler, para-amino benzoik asit (PABA) ile benzer olduğundan DNA sentezinde kullanılan folik asit sentez yolağındaki PABA yerine geçerek dolaylı olarak DNA sentezinde inhibe edici işlev görür (Bilgehan, 2002).

Novabiosin antibiyotiği, DNA polimeraz üzerine etki ederek DNA replikasyonunu inhibe ederler. Rifamisin, RNA polimerazı inhibe ederek mRNA sentezine mani olur. Kinonlar geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçlardır ve bakterilerde DNA girazın fonksiyonunu bozarak bakterilerin ölmesine neden olurlar (Arda, 2000; Bilgehan, 2002; Waites vd., 2015).



Şekil 1.4. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları (URL-5, 2019).

Klinikte en çok kullanılan antibiyotiklerin kökenleri ve mikroorganizmalar üzerine etki mekanizmaları ve üretici mikroorganizmaları Tablo 1.3'te özetlenmiştir.

Tablo 1.3. Bazı önemli antibiyotiklerin kökeni ve etki mekanizmaları (Waites vd., 2015).

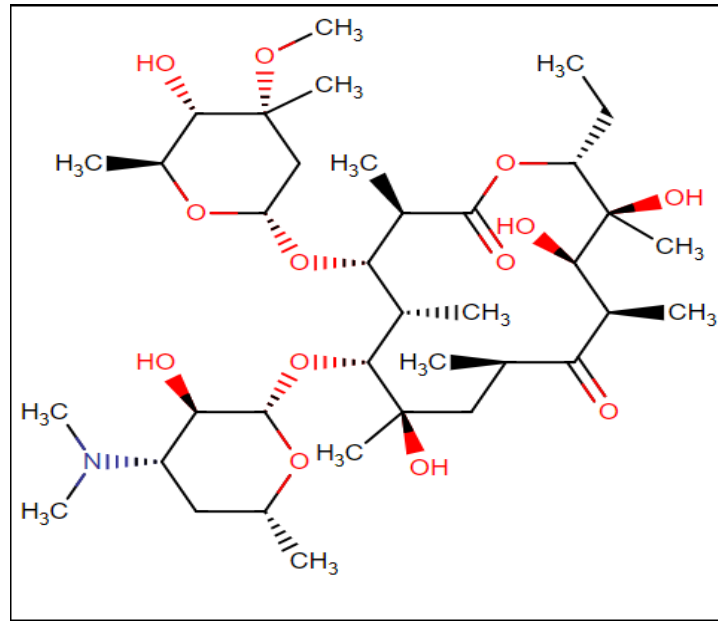
Antibiyotik	Üretici Organizma	Etkili Olduğu Grup	Etki Noktası
Beta laktamlar			
Doğal Penisilinler (Penisilin G ve V)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gram +	Hücre Duvarı Sentezi
Yarı Sentetik Penisilinler			
Aminopenisilinler (Ampisilin, Amoksisilin, Hetasilin)	“	Bazı Gram - Çubuklar	“
Pelisilinaza Dayanıklı Penisilinler (Metisilin, Kloksasilin, Dikloksasilin, Nafisilin, Oksasilin)	“	Stafilokoklar	“
Karboksipenisilinler (Karbenisilin, Tikarsilin)	“	Psödomonaslar	“
Üreidopenisilinler (Azlosilin, Mezlosilin, Piperasilin)	“	“	“
Sefalosporinler	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Gram + ve -	“
Monolaktamlar	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Gram -	“
Polipeptid Antibiyotikler (Basitrasin, Polimiksin B)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Peanibacillus polymyxa</i>	Gram +, Gram -	Hücre Duvarı Sentezi, Hücre Zarı
Makrolidler (Eritromisin, Tilosin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> , <i>Streptomyces fradiae</i>	Gram +	Protein Sentezi
Aminoglikozidler (Gentamisin, Neomisin, Streptomisin)	<i>Micromonospora purpurea</i> , <i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces griseus</i>	Gram + ve -, Gram + ve -, Gram -	“ “ “
Tetrasiklinler	<i>Streptomyces türleri</i>	Gram + ve -	“
Vankomisin	<i>Streptomyces orientalis</i>	Gram +	Peptidoglikan
Rifamisin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Tüberküloz	RNA Sentezi

1.3.3. Eritromisin Antibiyotiği

Eritromisin antibiyotiği 1952 yılında keşfedilmiş olup, daha önceleri *S. erythreus* olarak bilinen fakat günümüzde *S. erythraea* olarak adlandırılan bakteriler tarafından üretilmektedir (Liu vd., 2013). Makrolid grubu geniş spekturumlu bir antibiyotik olan eritromisin (şekil 1.5) , insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde değişik formlarda (Kapsül, Toz, Jel, Ampul ve Tablet) kullanılmaktadır (Öner vd., 1989).

şekil 1.4’de görüldüğü gibi makrolid grubu antibiyotikler, mikroorganizmaların 50S ribozomal alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir (Arda, 2000). Eritromisin sadece Gram pozitif bakteriler değil, aynı zamanda Gram negatif bakteriler ve mikoplazmalara da etkili bir antibiyotiktir (Brittain, 1987). İlk keşfedilen antibiyotik olan ve halen kullanılmakta olan ve Gram pozitif bakterilere etkili penisilin antibiyotiğine karşı alerjisi olan insanlarda buna alternatif olarak eritromisin antibiyotiğinin kullanıldığı bildirilmiştir (Moreno vd., 1995).

Eritromisin boğaz ve sinüs, akciğer, kulak, ağız ve diş, deri ve doku, mide ve başırsak, göz ve yanıklar, ameliyatlar, romatizmal ateş, bakteriyel kalp içi zarı iltihabı veya dental işlemler gibi enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmaktadır (Brittain, 1987; Moreno vd., 1995).



şekil 1.5. Eritromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı (URL-6, 2019).

1.3.4. Mikroorganizmalarda Antibiyotik Direnç Oluşumu

1.3.4.1. Genetiğe Bağlı Olmayan (Doğal) Direnç Oluşumu

Mikroorganizmalar latent ve stasyoner fazlarında ortam koşullarında daha az etkilendiklerinden antimikrobiyal maddeler mikroorganizma metabolizmasının en aktif olduğu dönemde etkilidirler. Metabolizmanın aktif olmadığı durumda kullanılan antimikrobiyal ilaçlar etkisiz kalmakta ve mikroorganizmayı öldürmek imkânsız olmaktadır (Çevikbaş, 1990). Her antimikrobiyal ajan belli bir mikroorganizma grubuna çeşitli mekanizmalar ile etki etmekte olup, bu etki mekanizmasının olmadığı veya antimikrobiyal ajanlarını hücre içine almayan mikroorganizmalar, bazı antimikrobiyal ajanlara karşı duyarsız (dirençli) kalmaktadır.

Örneğin; Beta laktam antibiyotikleri mikroorganizmaların hücre çeperine etki etmekte olup, hücre çeperi olmayan veya sonradan kaybeden mikroorganizmalar doğal olarak bu antibiyotiğe karşı duyarsız (dirençli) olurlar. Aminoglikozit grubu antibiyotiklerinin hücre membranından geçişinde oksijen gerekli olup oksidatif fosforilasyonun olmadığı zorunlu anaerobik bakterilerde yeterli miktarda bu gruptaki ilaçlar hücre içine ulaşamadığından mikroorganizma üzerinde etki göstermezler (Öztürk, 2002). Ayrıca makrolid grubu antibiyotikler, hücre duvarından geçerek hedef molekülüne ulaşmak için çok büyük olduğundan Gram - bakterilere makrolid grubu antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençlidirler (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1.3.4.2. Genetiğe Bağlı (Kazanılmış) Direnç Oluşumu

Kazanılmış direnç, doğal olarak duyarlı (dirençsiz) olan mikroorganizmaların çeşitli yollarla antibiyotiklerden etkilenmeyecek duruma gelmeleridir. Bütün canlı gruplarında olduğu gibi mikroorganizmalarında tüm özellikleri ve işlevleri genlerin yönetimi ve denetimi altında olmakla birlikte mikroorganizmalarda dirençlilik genleri kromozom veya ekstrakromozom'da (plazmid, epizom, transpozon) bulunur (Çevikbaş, 1990). Antimikrobiyal maddenin mikroorganizma ile ilk temasa geçtiğinde etkili olup temas süresi ve tekrarlanan tedaviler esnasında mikroorganizma antimikrobik maddeye karşı dirençli hale gelebilir.

Antimikrobik ajanlara karşı oluşan dirençlilik esas olarak bu yolla oluşmakla birlikte yaşanan mutasyonlar sonunda seleksiyonla dirençli türler ortaya çıkmaktadır (Öztürk, 2002). Bir bakteri grubu antibiyotiklere karşı direnç oluşturduğunda, bu dirençliliği transformasyon, transdüksiyon yada konjugasyon yolu ile diğer bakterilere aktarabilir ve dirençlilik türler arasına yayılım gösterebilir (Çevikbaş, 1990; Öztürk, 2002). Bu gruptaki direnç oluşumu ve mekanizmalarını aşağıdaki 4 ana başlık altında özetleyebiliriz.

1.3.4.2.1. Kromozomal Direnç

Mikroorganizmanın kromozomunda spontan bir mutasyon sonucu meydana gelen değişiklikler antibiyotiklere karşı duyarlılıklarında değişikliklere yol açarak, hedef bölge modifikasyonu olması veya antibiyotiği yıkan enzimlerin salgılanması durumunda antibiyotiğe karşı dirençlilik kazanır. Başta streptomisin ve diğer bazı aminoglikozidler, eritromisin, rifamisin, sefalosporinler ve linkomisine karşı direnç bu şekilde olur (Öztürk, 2002).

Bir aşamalı mutasyon sonucu sefalosporinleri yıkan beta laktamaz enzimi salgılanması, çok aşamalı mutasyon sonucu penilisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direncin oluşumu, mutasyon ile porin üretimi bozulması sonucu antibiyotiğe karşı geçirgenliğin azalmasıyla oluşan dirençlilik, kromozomal dirence örnek verilebilir (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Bu yolla kazanılan dirençlilik başka türden bakterilere yayılmadığından dolayı daha seyrek olarak klinikte karşımıza çıkmaktadır.

1.3.4.2.2. Ekstrakromozomal Direnç

Bu gruptaki direnç kazanımı plazmid, epizom ve transpozonlarda meydana gelmektedir. Plazmidler bakteri kromozomundan ayrı, bakterinin yaşamı için ihtiyaç olmayan özellikleri taşıyan DNA molekülleri olup, kendilerini bağımsız bir şekilde replike edebilirler. Epizomlar bir ya da birden fazla birleşik plazmidlerden meydana gelen kromozomal DNA'ya bağlanan DNA yapılarıdır. Transpozonlar ise sıçrayıcı gen dediğimiz hem plazmidde hem de kromozomal DNA da bulunabilen kendilerini bir DNA molekülünden başka bir DNA molekülüne aktarabilen fakat bağımsız bir şekilde bölünme yeteneği gösteren DNA parçalarıdır (Çevikbaş, 1990).

Plazmidler, antimikrobiyal ve ağır maddelere karşı direnç genleri yanında çeşitli virülans faktörlerinin de barındırabilir. Klinikte görülen direncin temel sorumlusu plazmide bağlı dirençtir (Öztürk, 2002). Kazanılan bu direnç transdüksiyon (plazmidlerin bakteriyofajlarlar birleşip taşınarak diğer bakterilere aktarılması), transformasyon (Ölen bakterilerin ortamdaki DNA veya plazmidlerinin diğer bakterilere aktarılması) ve konjugasyon (temasla oluşan sitoplazma köprüsü aracılığı ile plazmid aktarımı) ile diğer bakterilere aktırılarak direncin yayılmasına neden olur ve plazmide bağlı direnç bulaşıcı olmakla birlikte genellikle antibiyotiği inaktive eden ve geçirgenliği değiştiren enzimler ile oluşmaktadır (Çevikbaş, 1990; Öztürk, 2002).

Aminoglikozit, sefalosporin, kloramfenikol, makrolit ve penisilin vb. grubu antibiyotiklerine karşı direnç kazanımı genellikle bu yolla olmaktadır. Genellikle Gram - bakterilerde bulunan tranpozonlar kendilerini replike edemedikleri için bakteriyofaj ya da bir plazmid DNA'sında bulunmak zorundadırlar ve DNA molekülleri arasında uygun bölgelere sıçrayarak gen aktarımı yapar. Böylelikle dirençlilik genlerini aktararak mikroorganizmaların direnç oluşturmalarına sebep olurlar (Çiftçi ve Aksoy, 2015; Öztürk, 2002). Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin ve trimetoprim karşı direnç gelişimi bu yolla olmaktadır.

1.3.4.2.3. Çapraz Direnç

Bir antimikrobiyal ilaca karşı direnç kazanmış mikroorganizmaların ayrı veya benzer mekanizma ile etki eden başka antimikrobiyal ilaca karşı direnç kazanmalarına çapraz direnç denir. Bu antimikrobiyal ilaçlar kimyasal bakımından yakın veya farklı olabilirler (Çevikbaş, 1990).

1.4. İmmobilizasyon

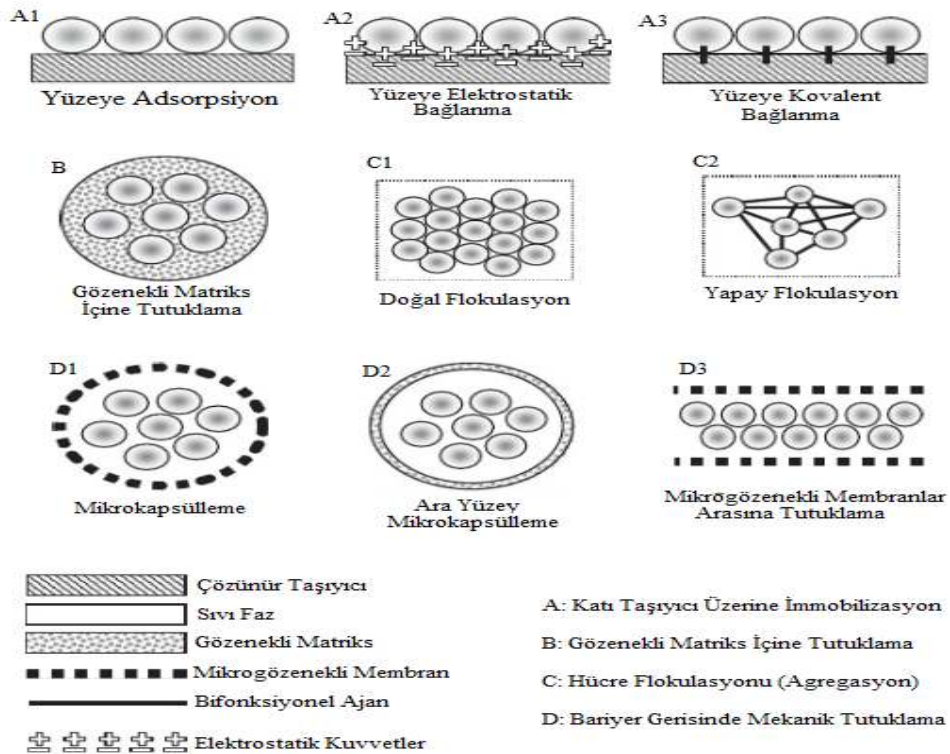
İmmobilizasyon, aktif olan biyokatalizörlerin (hücre veya enzim) hareketli sıvı ortamda (reaktör veya analitik sistem) çeşitli materyaller ile tutuklanmasıdır (Göksungur ve Güvenç, 2002; Uygun, 2005).

İmmobilizasyon özel bir materyal üzerinde çözünmeyen bir yapı oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Son 40 yıldır immobilizasyon yöntemleri enzim ve hücre tutuklamada pratik ve teorik olarak çok önem kazanmıştır (Uygun, 2005).

Hücre immobilizasyonunun çeşitli avantajları vardır. İmmobilize hücreler istenilen biyodönüşüm neticesinde ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilirler ve yeniden kullanılabilirler. Hücreler ortamdan ayrılabilirliklerinde fermantasyon ortamını kirletmezler ve alt akım işlemleri kolaylaşır, sürekli sistemde çalışmaya çok elverişlidirler, yüksek hacimsel verimlilik değerlerine ulaşılabilir, substrat yeniden biyokütle oluşumu için harcanmayacağından daha fazla ürün elde edilir ve kontaminasyona daha az duyarlıdır (Göksungur ve Güvenç, 2002).

1.4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Çok sayıda biyoteknolojik süreç immobilize hücre kullanımı ile avantajlı hale getirilmiş olup, çeşitli teknikler (Şekil 1.6) ve destek materyalleri geliştirilmiştir. İmmobilizasyon yöntemlerini taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama olarak üç temel gruba ayırabiliriz.



1.4.1.1. Taşıyıcı Bağlama Yöntemi

Biyokatalizörlerin taşıyıcılara bağlanmaları en eski immobilizasyon yöntemidir. Temel olarak, biyokatalizörlerin fiziksel adsorbsiyon, iyonik veya kovalent bağlar vasıtasıyla suda erimeyen taşıyıcılara doğrudan bağlanmasıdır. Uygulanmasının kolay olması, taşıyıcının yenilenebilir olması ve enzimin modifiye olmaması yöntemin kullanımını arttıran özelliklerdir. Immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir (Özçelik, 2019).

Doğal taşıyıcılar; cam boncuklar, karragenan, selüloz, nişasta, silikajel, agar, alginat vb. taşıyıcılardır. Yapay taşıyıcılar; polivinilalkol, poliakrilamit, naylon, iyon değiştirici reçineler gibi polimerlerdir (Özçelik, 2019, Kasavi, 2006).

i-Kovalent Bağlama: Bu yöntem biyokatalizörün suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına esasına dayanır. Kovalent bağlanmada biyokatalizör ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerinden daha kuvvetlidir (Kasavi, 2006).

ii-Adsorbsiyon: Bu yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın biyokatalizör ile karıştırılması ve biyokatalizör fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır. Van der Waals (yüzey gerilimi) kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler taşıyıcıya bağlamada etkili olmaktadır. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı zaman ucuz bir immobilizasyon metodudur (Uygun, 2005; Özçelik, 2019; Kasavi, 2006).

iii-İyonik Bağlama: İyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara biyokatalizörün iyonik bağlanması esaslıdır. İyonik bağlama yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olmaktadır. Biyokatalizör ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan daha zayıftır. Uygulanmasının kolay olması, taşıyıcının yenilenebilir olması ve biyokatalizörün modifiye olmaması yöntemi avantajlı hale getirmektedir (Uygun, 2005; Kasavi, 2006).

1.4.1.2. Çapraz bağlama Yöntemi

Bu yöntemde, küçük moleküllü çift veya çok fonksiyonlu reaktifler, biyokatalizörler ile bağlar yaparak, sonuçta suda çözünmeyen yapıların oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, reaktif derişimine, pH ve biyokatalizöre doğrudan bağımlıdır. Bu metotta divinilsülfonlar, karbinildiimidazol, glutraldehit, klorformat, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorhidrinler gibi reaktifler çapraz bağlama için kullanılır. Bu yöntem ile immobilize edilmiş biyokatalizörün aktivitesinde genellikle azalma olur. Çoğunlukla çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha iyidir (Uygun, 2005; Kasavi, 2006; Telefoncu, 1997).

1.4.1.3. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama, biyokatalizörü belirli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Bu işlem polimer matriksler içinde yapılabileceği gibi, yarı geçirgen membranda, mikrokapsülleme ile de yapılabilir. Biyokatalizör bulunduğu çevreden çıkamaz. Biyokatalizörler kimyasal veya fiziksel olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmaları, kovalent ve çapraz bağlanmadan ayıran en önemli özelliğidir. Kafes, mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel gibi tutuklama metotları vardır (Özçelik, 2019).

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda yüksek derecede çapraz bağlama sonucu biyokatalizör oluşan kafeslerde tutuklanmaktadır. Sık kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Bu metodun, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajları vardır (Uygun, 2005; Telefoncu, 1997).

Mikrokapsül tipi immobilizasyon, biyokatalizörün bir yarı geçirgen sentetik polimerin mikrokapsüllerinde hapsedilmesini içerir. Membranın gözenekleri substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin kapsül dışına çıkmasına engel olmayacak büyüklükte olmalıdır (Özçelik, 2019; Uygun, 2005).

Antibiyotik üretiminde immobilizasyon yöntemleri özellikle de sürekli sistemlerde çok sık kullanılmaktadır (Cruz vd., 2003; Awais vd., 2010; Egorov vd., 1978; Hasan vd., 2009). Immobilize hücreler tarafından üretilen antibiyotikler Tablo 1.4'de özetlenmiştir.

Tablo 1.4. İmmobilize mikrobiyal hücreler tarafından üretilen bazı antibiyotikler (Ramakkrishna ve Prakasham,1999).

Antibiyotik	Mikroorganizma	Destek Materyali
Aktinomisin D	<i>Streptomyces parvullus</i>	Ca-Aljinat
Basitrasin	<i>Bacillus sp.</i>	Poliakrilamid
Kandisidin	<i>Streptomyces griseus</i>	k-karragenan
Sefalosporin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Poliakrilamid hidrazit, pamuk kumaş
Klortetrasiklin	<i>Streptomyces aureofacino</i>	Ca-Aljinat
Siklosporin A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	k-karragenan, selit
Daunorubisin	<i>Streptomyces euceitus</i>	Ca-Aljinat
Eritromisin	<i>Streptomyces erythreus</i>	Aljinat
Hibrit Antibiyotik	<i>Streptomyces lividans</i>	Kendiliğinden oluşan Agregatlar
6APA	<i>Escherichia coli</i>	Ca-Aljinat
Mitramisin	<i>Streptomyces iverini</i>	Agar
Neomisin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Selüloz küreler
Nikkomisin	<i>Streptomyces tendae</i>	Ca-Aljinat
Patulin	<i>Penicillium urticae</i>	k-karragenan
Penisilin G	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Poliakrilamid selid, k-karragenan
Rifamisin B	<i>Streptomyces rimosus</i>	Cam yünü
Tinamisin	<i>Streptomyces cattleya</i>	Selit
Tilosin	<i>Streptomyces sp.</i>	Ca-Aljinat

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, serbest ve immobilize edilmiş *Saccharopolyspora erythraea* bakterisi kullanılarak farklı içerikteki besiyeri ortamlarında eritromisin antibiyotiğinin üretimi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri Suşları

Antibiyotik üretiminde kullanılan *S. erythraea* suşu (NRRL B-24072 Red (2338)) Tarımsal Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu'ndan (NRRL) ücretsiz temin edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılacak olan *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) suşu Fırat Üniversitesi Hastanesi Laboratuvarından ücretsiz temin edilmiştir.

2.1.2. Kimyasallar ve Sarflar

Akrilamid (Acrosorganic), Amonyumpersülfat (Chemsolute), Asetonitril (İsolab), BaCl₂.2H₂O (Merck), CaCO₃ (Chemsolute), CaCl₂ (İsolab), Eritromisin (Chem-Impex), Glikoz (Bioshop), Gluteraldehit %25 (Merck), H₂SO₄ (İsolab), HCl (Merck), K₂HPO₄ (Chemsolute), MgSO₄.7H₂O (İsolab), Maya Ekstraktı (Multicell), Metilenbisakrilamid (J&K), Müller Hinton Agar (Himedia), NaCl (Merck), NaNO₃ (Chemsolute), NaOH (Chemsolute), TEMED (Roth), Sodyum Aljinat (AppliChem), Etanol (İsolab) kimyasalları ve diğer sarf malzemeler Biyomühendislik bölümünden veya FÜBAP MF.18.14 projesi ile ticari firmalardan temin edilmiştir.

2.1.3. Cihazlar

Çalkalamalı İnkübatör (Mipro-MCI 120), Vortex (Velp ZX3), Manyetik Karıştırıcı (Weightlab WF-MIA), Hasas Terazı (Weightlab WL303), Buzdolabı (Arçelik A+), Otoklav (Jelo Tech ST-85G), Santrifüj (Nüve- NF800R,NF800), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), Su Banyosu (Mipro-MSB 15), Steril kabin (Heal Force- HFsafe1200), Saf Su Cihazı (Fine Tech), Taramalı Elektron Mikroskobu-SEM (ZEISS-EVO MA10), Işık Mikroskobu (Olympus-CX21LEDFS1) ve pH metre (Martini Instruments- Mi 151) cihazları Biyomühendislik bölümünden veya FÜBAP MF.18.14 projesi ile ticari firmalardan temin edilmiştir.

2.1.4. Besiyerleri

2.1.4.1. Nutrient Agar (Lab M)

Nutrient Agar katı besi yeri *S. erythraea* ve *S. aureus* bakterilerinin üretilmesinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Nutrient Agar besi yerinden 28 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk steril edildikten sonra steril petrilere aktarıldı.

Besi yeri içeriği (g/l) ;

Peptone	:5.0
Sığır Eti Ekstraktı	:3.0
NaClO ₂	:8.0
Agar No.2	:12.0

2.1.4.2. Nutrient Broth (Lab M)

Nutrient Broth sıvı besi yeri *S. erythraea* ve *S. aureus* bakterilerinin üretilmesinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Nutrient Broth besi yerinden 13 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek deney tüplerine aktarıldı. Sonrasında otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk steril edildi.

Besi yeri içeriği (g/l) ;

Peptone	:5.0
Sığır Eti Eksraktı	:1.0
Maya Eksraktı	:2.0
NaClO ₂	:5.0

2.1.4.3. Oatmeal Agar (Condalab)

Oatmeal Agar katı besi yeri *S. erythraea* bakterisinin üretilmesinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Oat Meal Agar besi yerinden 72.5 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk steril edildikten sonra steril petrilere aktarıldı.

Besi yeri içeriği (g/l) ;

Yulaf Ezmesi	:60.0
Bakteriyolojik Agar	:12.50

2.1.4.4. Müller Hinton Agar (Himedia)

Müller Hinton Agar katı besi yeri eritromisin antibiyotiğinin *S. aureus* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite testinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Müller Hinton Agar besi yerinden 38.0 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk steril edildikten sonra steril petrilere aktarıldı.

Besi yeri içeriği (g/l)	;
Kazein Asit Hidrolizatı	:17.50
Et İnfüzyon Katıları	:2.0
Çözünür Nişasta	:1.50
Agar	:17.0

2.2. Metot

2.2.1. Eritromisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması

0,05 g eritromisin antibiyotiği hasas terazi ile tartıldı ve 10 ml asetonitril içerinse çözündürülerek 10 ml saf su eklendi. Bu çözeltiden asetonitril-su (1:1) karışımı seyreltici olarak kullanılarak eritromisin konsantrasyonları 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Sonra bu çözeltilerden 5 paralel çalışılacak şekilde deney tüplerine 1 ml örnekler alınarak üzerlerine 1 ml konsantre H₂SO₄ eklendi ve 50 C’de 30 dk su banyosunda bekletildi. Su banyosundan sonra tüplere 8 ml asetonitril-saf su (1:1) karışımından eklenerek, tüplerin hacimleri 10 ml tamamlandı. Tüplerin son karışım hacimleri sırasıyla 5, 10, 15, 20, 25, 30 eritromisin µg / ml oldu. Kör tüpüne ise 9 ml asetonitril-saf su (1:1) ve 1 ml konsantre H₂SO₄ eklendi ve spektrofotometre cihazında kör numunesine karşı 480 nm’de diğer tüplerin absorbans değerleri okunarak kaydedildi. Bu değerler grafiğe dönüştürülerek eritromisin kalibrasyon grafiğinin denklemi bulundu (Wankhade vd., 2012). Bu denklem daha sonra miktarını bilmediğimiz fermantasyon ortamındaki eritromisin miktarını belirlemek için kullanıldı.

2.2.2. Sporulasyon Kültürünün Hazırlanması

Liyofilize *S. erythraea* suşu steril sıvı besiyeri (Nutrient Broth) ile sulandırıldıktan sonra sporulasyon için Oat Meal Agar, Nutrient Agar ve Nutrient Broth steril besiyerlerine ekimi yapıldı ve bu besiyeri 29 °C’de 7 gün etüvde inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerindeki saf olan bakteri kolonilerden alınarak 10 gün boyunca 30 °C’de Nutrient Broth besiyeri içerisinde yoğun sporulasyon için inkübasyona bırakıldı. Tüm çalışmalar streil koşullar altında yapıldı (Hamedı vd., 2005).

2.2.3. Eritromisin Üretim İçin Serbest *S. erythraea* Suşunun Kullanılması

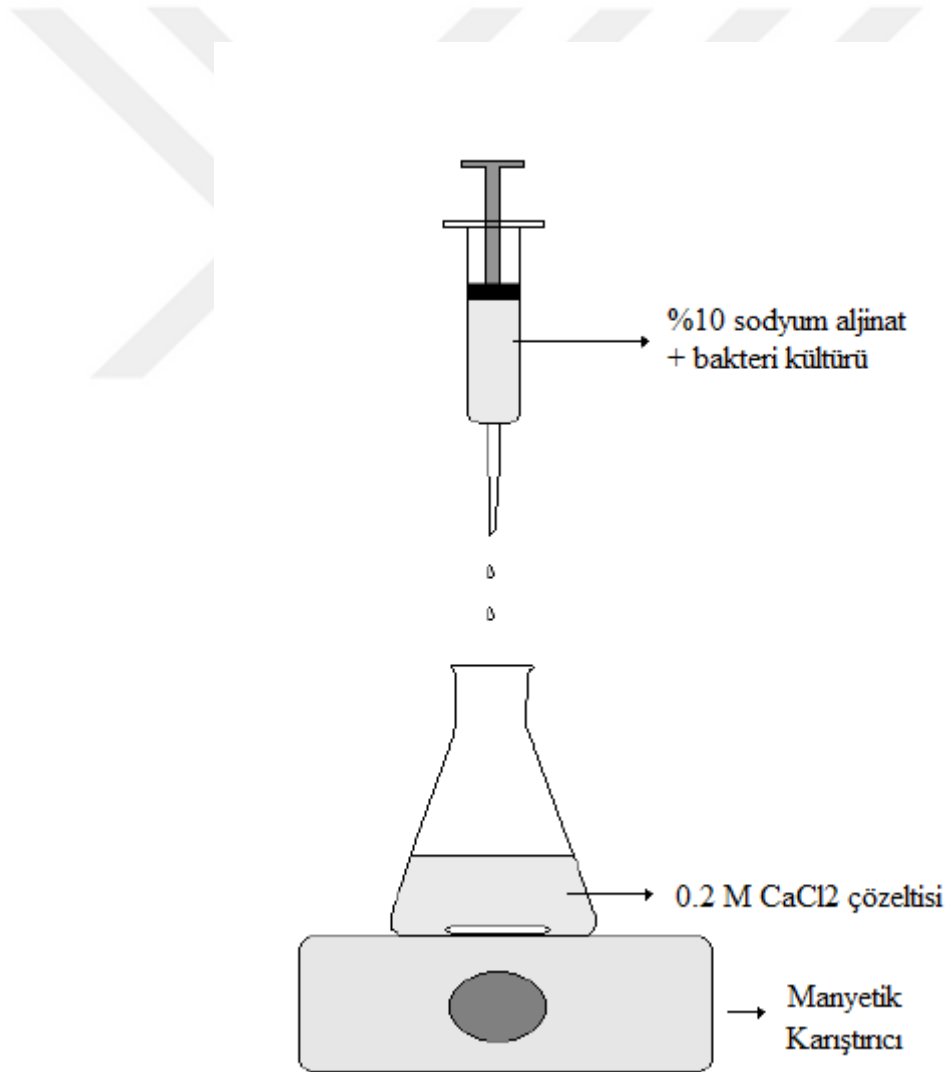
Eritromisin üretimi için 10 g/l maya eskraktı, 6 g/l NaNO₃, 8 g/l NaCl 1 g/l MgSO₄.7H₂O, 2g/l CaCO₃, 2g/l K₂HPO₄ ve karbon kaynağı olarak 50-60-70 g/l glikoz ve 40-50-60-70 g/l şeker pancarı melası içeren besiyeri ortamları 3 paralel olacak şekilde 50 ml fermantasyon hacminde, 250 ml erlenlerde hazırlandı. Hazırlanan besi yerleri pH’sı 7.1’e ayarlanarak otoklavda steril edildi. Sonrasında sporulasyon ortamından 2 ml bakteri süspansiyonu eklenerek 30 °C, 200 rpm’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamından eritromisin miktarını belirlemek için her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak +4 °C buzdolabında saklandı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Hamedı vd., 2005; Bandyopadhyay vd., 1993; El-Enshasy vd., 2007).

2.2.4. *S. erythraea* Suşunun İmmobilizasyon Yöntemleri

2.2.4.1. Kalsiyum Aljinat ile İmmobilizasyon Yöntemi

Sporulasyon ortamından 2 ml bakteri süspansiyonu alınarak steril 50 ml nutrient broth besiyerinde 2 gün boyunca 30 °C , 200 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında bu besiyeri 5.000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri sıvı ortamdan alındı. Bu bakteri hücreleri 10ml %2 (g/l) streil Sodyum Aljinat solüsyonu ile karıştırıldı ve steril 0.2 M CaCl₂ çözeltisine enjektör ile damlatılarak ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (Şekil 2.1) karıştırıldı.

Sonrasında oluşan boncuklar 2 kere steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkandı ve 2 gün boyunca aktivasyon için 10 g/l maya eskraftı, 6 g/l NaNO_3 , 8 g/l NaCl 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/l CaCO_3 ve 50 g/l glikoz içeren pH'sı 7 olan steril fermentasyon ortamında 30 °C, 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Aktivasyon işleminden sonra eritromisin üretimi için 6 g/l NaNO_3 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g/l K_2HPO_4 ve 60 g/l şeker pancarı melası içeren steril ve pH'sı 7'e ayarlanmış besiyeri ortamına alınarak 30 °C, 200 rpm'de 2 günde bir besiyeri yenilenerek boncuklar parçalanana kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamındaki eritromisin miktarını belirlemek için her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak +4 °C buzdolabında saklandı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Hamed vd., 2005; Bandyopadhyay vd., 1993; El-Enshasy vd., 2007).



Şekil.2.1. Kalsiyum aljinat ile immobilizasyon yöntemi

2.2.4.2. Poliakrilamid Jel ile İmmobilizasyon Yöntemi

Sporulasyon ortamından 2 ml bakteri süspansiyonu alınarak steril 50 ml nutrient broth besiyerinde 2 gün boyunca 30 °C , 200 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında bu besiyeri 5.000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri sıvı ortamdan alındı. Bu bakteri hücreleri 50 ml’lik beherde 3 ml steril FTS ve 6 ml %20 poliakrilamid stok solüsyon (18.2 g akrilamid ve 1.8 g bis akrilamid) ile karıştırılarak, 100 µl taze hazırlanmış %10 amonyumpersülfat çözeltisi eklendi. Daha sonra 10 µl TEMED eklenip karıştırılarak 20 dk buz banyosunda bekletildi. Oluşan jel steril bıçak ile küçük parçalara (10-40 mm³) kesilerek steril FTS ile yıkandı (Awais vd.,2010; Morikawa vd., 1979).

Sonrasında 2 gün boyunca aktivasyon için 10 g/l maya eskraktı, 6 g/l NaNO₃, 8 g/l NaCl 1 g/l MgSO₄.7H₂O, 2g/l CaCO₃ ve 50 g/l glikoz içeren pH’sı 7 olan steril fermantasyon ortamında 30 °C, 200 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Aktivasyon işleminden sonra eritromisin üretimi için 6 g/l NaNO₃, 1 g/l MgSO₄.7H₂O, 0,2g/l K₂HPO₄ ve 60 g/l şeker pancarı melası içeren steril ve pH’sı 7’e ayarlanmış besiyeri ortamına alınarak 30 °C, 200 rpm’de 2 günde bir besiyeri yenilenerek belirli bir süre boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamından eritromisin miktarını belirlemek için her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak +4 °C buzdolabında saklandı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Hamedi vd., 2005; Bandyopadhyay vd., 1993; El-Enshasy vd., 2007).

2.2.5. Fermantasyon Ortamlarındaki Üretilen Eritromisin Miktarının Spektrofotometrik Yöntem ile Tespiti

Serbest ve immobilize edilmiş *S. erythraea* suşu ile yapılan eritromisin üretim metotları sonucunda toplanan numunelerden ve kör için ekim yapılmamış fermantasyon ortamından ependorflara 1 ml alınarak üzerlerine 1 ml asetonitril-su (1:1) çözeltisi eklendi. Ependorflar 15 sn vortekslendikten sonra 10,000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüj edildi.

Ependorflardaki sıvı çözelti deney tüplerine aktararak üzerlerine 1 ml konsantre H₂SO₄ eklendi ve 30 dk boyunca 50 °C ‘de su banyosunda bekletildi. Sonrainsa tüplere 7 ml asetonitril-su (1:1) çözeltisi eklendi ve Spektrofotometre cihazında kör numunesine karşı 480 nm’de diğer tüplerin absorbans değerleri okunarak kaydedilir (Wankhade vd., 2012). Bu değerler kalibrasyon grafiğindeki absorbans yerlerine yazılarak numunelerdeki eritromisin değerleri bulundu.

2.2.6. Fermantasyon Ortamlarındaki Üretilen Eritromisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

McFarland 0.5 bulanıklık standardını hazırlanmak için 50 ml hazırlanmış % 1.175 g/l $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 0.5 mL alınarak, 99.5 ml 0.36 N H_2SO_4 (%1 v/v) çözeltisi ile karıştırıldı. Oluşan çözeltinin dansitesi 625 nm’de 0.08-0.13 değeri arasında olup olmadığı kontrol edildi. Eritromisin antibiyotiğine duyarlı olan olan *S. aureus* (ATCC-25923) suşu 10 ml steril nutrient broth sıvı besiyerine ekim yapılarak 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bakteri dansitesini, hazırlanan McFarland 0.5 çözeltisi ile aynı bulanıklıkta ayarlamak için ayrı bir tüp içerisinde seyreltici olarak steril tuzlu su (% 0.9 NaCl g/l) kullanılarak ayarlandı. Önceden hazırlanmış 3-4 mm kalınlıktaki Müller Hinton Agarlı petrilere McFarland 0.5’e göre hazırlanmış *S. aureus* bakteri kültüründen eküvyon ile örnek alınarak petrilere eşit dağıtılacak şekilde ekim yapıldı. Petri yüzeylerinin kuruması için 5 dk bekledikten sonra steril bir şekilde petri yüzeylerinde 6 mm çapta kuyucuklar açıldı. Sonrasında daha önceden fermantasyon ortamından toplanan numunelerden ependorflara 1 ml örnek alınarak, üzerlerine 1 ml etanol eklendi. 15 sn boyunca vorteks ile karıştırılan ependorflar 10.000 rpm de santrifüj edildi. Ependorflardan 100 µl örnek alınarak Müller Hinton Agarlı petrilere kuyucuklara eklendi. 5 dk bekledikten sonra petrilere 16-18 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında zon çapı olup olmadığı kontrol edildi. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Gür, 2016; Hamed vd., 2005).

2.2.7. İmmobilize Edilmiş *S. erythraea* Suşunun Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi

S. erythraea Suşunun kalsiyum aljinat ve poliakrilamid jel ile immobilizasyon sonucunda oluşan kapsül ve jeller SEM analizi için öncelikle %25’lik glutaraldehit çözeltisinde 1 gün boyunca bakteri hücrelerin dondurulması için bekletildi. Sonrasında kapsül ve jeller süzülerek oda sıcaklığında 3 gün boyunca kuruması için bekletildi. Işık mikroskobu ile görüntüledikten sonra, SEM analizi için birkaç kapsül ve jel taneleri Fırat Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında görüntüledi.

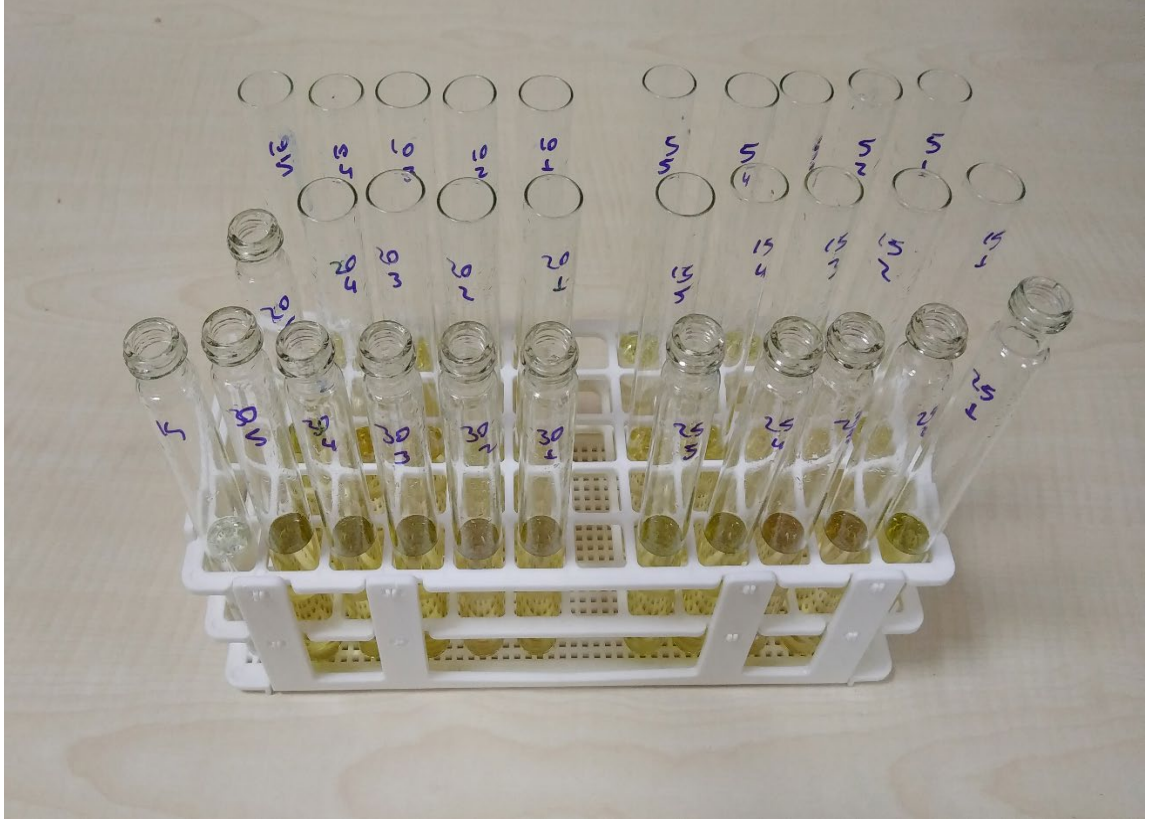
2.2.8. SPSS Programı ile istatistiksel analiz

Karbon kaynağı ve immobilizasyon tekniklerine göre eritromisin antibiyotiği üretim değerleri arasındaki ilişki SPSS (IBM Statistics 22) programında Ki-Kare testi ile hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Eritromisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması

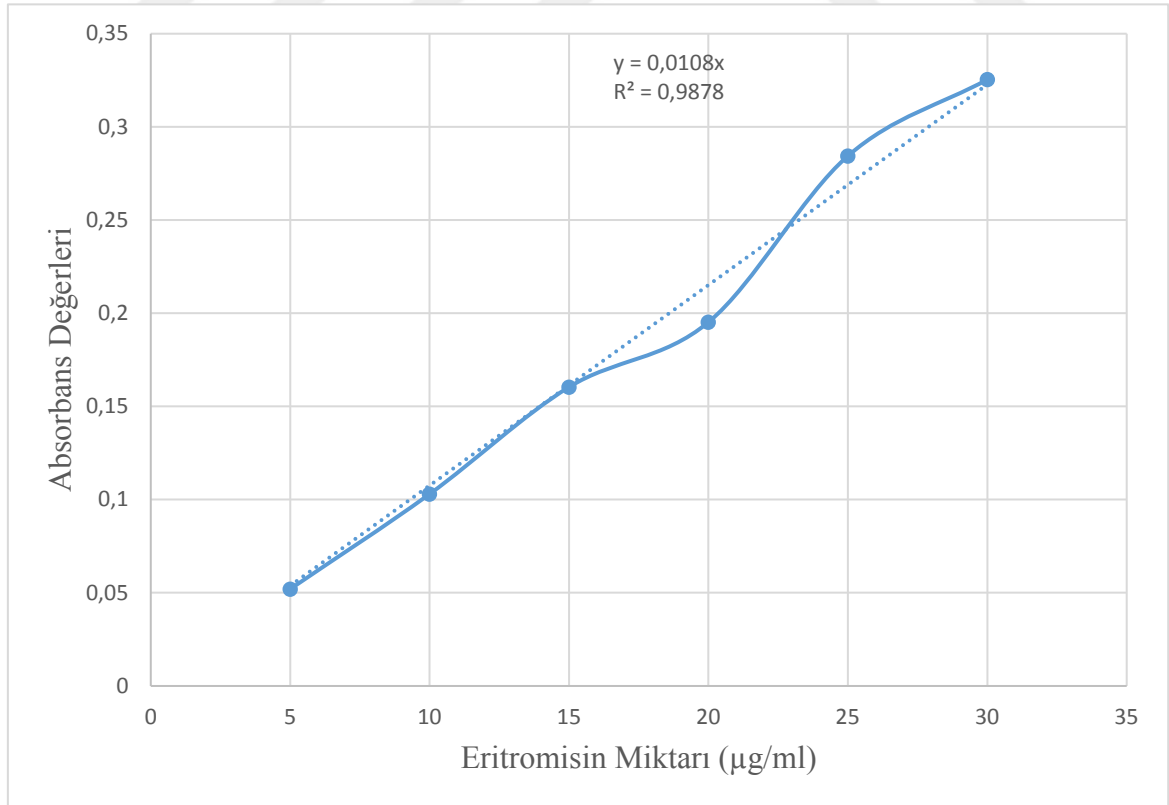
Eritromisin Kalibrasyon Eğrisinin bulunması deneyinden (Şekil.3.1) sonra Tablo 3.1 deki absorbens değerleri kaydedilmiş, sonrasında Şekil 3.2 ile kalibrasyon denklemi $y=0,0108x$ bulunmuştur.



Şekil 3.1. UV kalibrasyon için farklı konsantrasyonlardaki eritromisin numuneleri

Tablo 3.1.Eritromisin kalibrasyon eğrisinin spektrofotometrik yöntem ile bulunması deneyinin absorbens sonuçları

$\mu\text{g/ml}$	1.Numune	2.Numune	3.Numune	4.Numune	5.Numune	Ortalama
5	0,048	0,047	0,051	0,054	0,060	0,052
10	0,120	0,098	0,099	0,09	0,108	0,103
15	0,170	0,138	0,159	0,175	0,160	0,1604
20	0,190	0,185	0,182	0,202	0,217	0,1952
25	0,290	0,271	0,263	0,300	0,298	0,2844
30	0,400	0,363	0,279	0,278	0,307	0,3254



Şekil 3.2. Eritromisin kalibrasyon grafiği

3.2. Eritromisin Üretim İçin Serbest *S. erythraea* Suşunun Kullanılması

Eritromisin üretimi için serbest *S. erythraea* suşunun farklı konsantrasyonlarda karbon kaynağı içeren besiyerlerinin (Şekil 3.3) kullanılması deneyleri sonucu elde edilen üretim değerleri Tablo 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8’de, verim ve verimlilik değerleri ise Şekil 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7 gösterilmiştir. Bu şekillere göre glikoz karbon kaynağında en çok verim 3. günde 4,44 µg/ml ve verimlilik ise 3.günde 0,062 µg/ml*saat değeri ile 50 g/l glikoz içeren besiyeri ortamında bulunmuştur. Şeker pancarı melası karbon kaynağı içeren besiyerlerinin kullanılması sonucunda ise, en çok verim 6.günde 34,56 µg/ml ve verimlilik 5.günde 0,271 µg/ml*saat değeri ile 60 g/l şeker pancarı melası içeren besiyerleri ortamında bulunmuştur.



Şekil.3.3. Farklı şeker pancarı melası fermantasyon ortamları ile eritromisin üretimi

Tablo 3.2. Serbest *S. erythraea* suşunun ticari glikoz (50g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

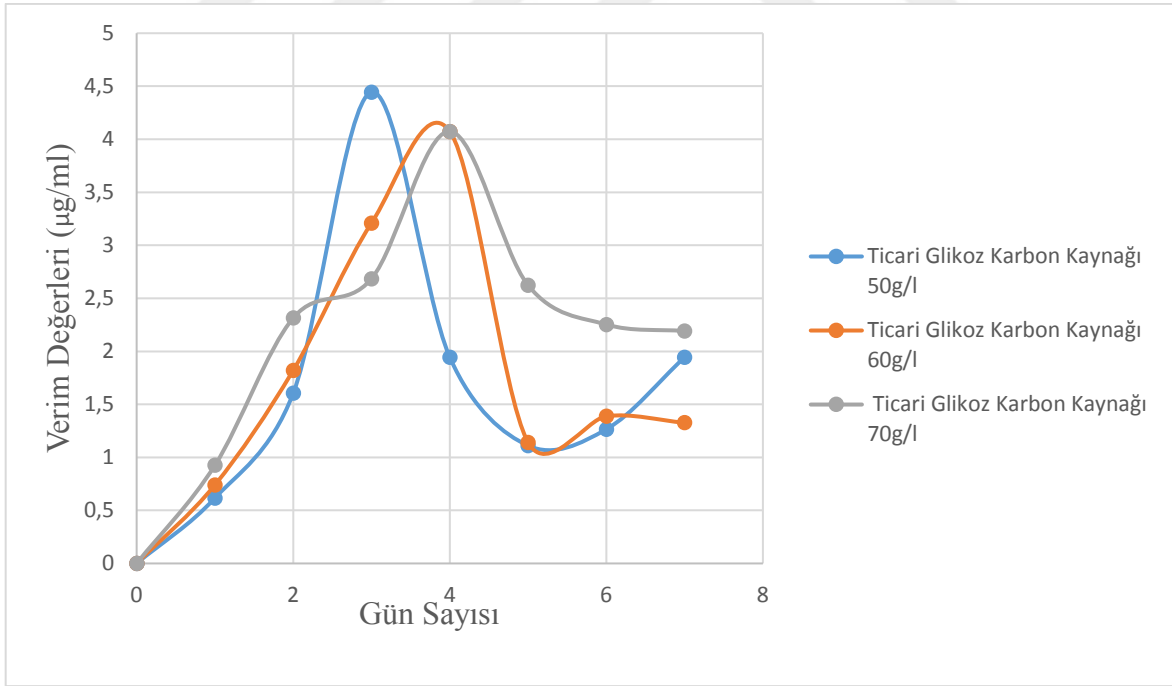
Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	1,204	0,463	0,185	0,617	0,026
2	1,759	1,667	1,389	1,605	0,033
3	3,519	5	4,815	4,445	0,062
4	2,5	1,574	1,759	1,944	0,02
5	1,019	1,204	1,111	1,111	0,009
6	1,389	1,111	1,296	1,265	0,009
7	1,667	1,852	2,315	1,945	0,012

Tablo 3.3. Serbest *S. erythraea* suşunun ticari glikoz (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

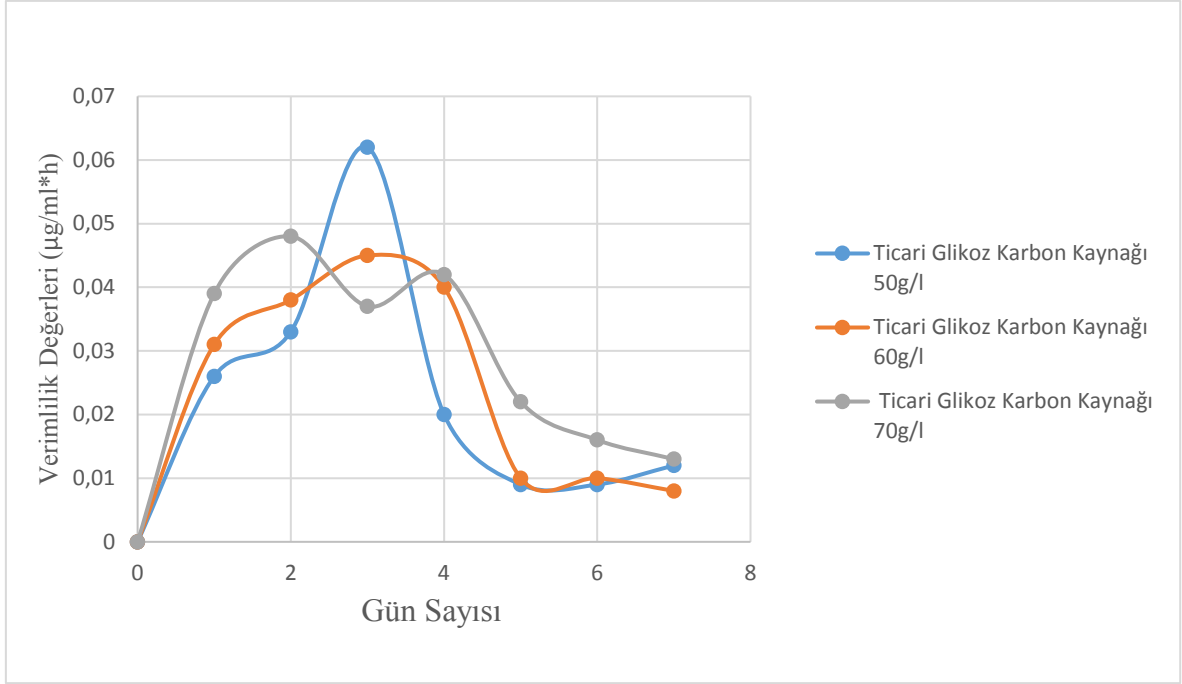
Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,833	0,463	0,926	0,741	0,031
2	1,574	1,759	2,13	1,821	0,038
3	3,241	3,056	3,333	3,21	0,045
4	3,704	4,167	3,611	3,827	0,04
5	0,926	0,926	1,574	1,142	0,01
6	1,944	0,833	1,389	1,389	0,01
7	1,389	1,204	1,389	1,327	0,008

Tablo 3.4. Serbest *S. erythraea* suşunun ticari glikoz (70g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,556	1,019	1,204	0,926	0,039
2	2,315	2,222	2,407	2,315	0,048
3	2,685	2,315	3,056	2,685	0,037
4	3,889	3,704	4,63	4,074	0,042
5	2,87	2,222	2,778	2,623	0,022
6	2,407	2,222	2,13	2,253	0,016
7	2,5	2,222	1,852	2,191	0,013



Şekil.3.4. Serbest hücre ticari glikoz karbon kaynağı verim değerleri



Şekil 3.5. Serbest hücre glikoz karbon kaynağı verimlilik değerleri

Tablo 3.5. Serbest *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0	0,648	0,185	0,278	0,012
2	0,648	0,741	0,833	0,741	0,015
3	0,556	0,926	1,019	0,834	0,012
4	1,019	1,574	1,389	1,327	0,014
5	0	0,185	0,278	0,154	0,001
6	0	0	0,185	0,062	0
7	0	0	0	0	0

Tablo 3.6. Serbest *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (50g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

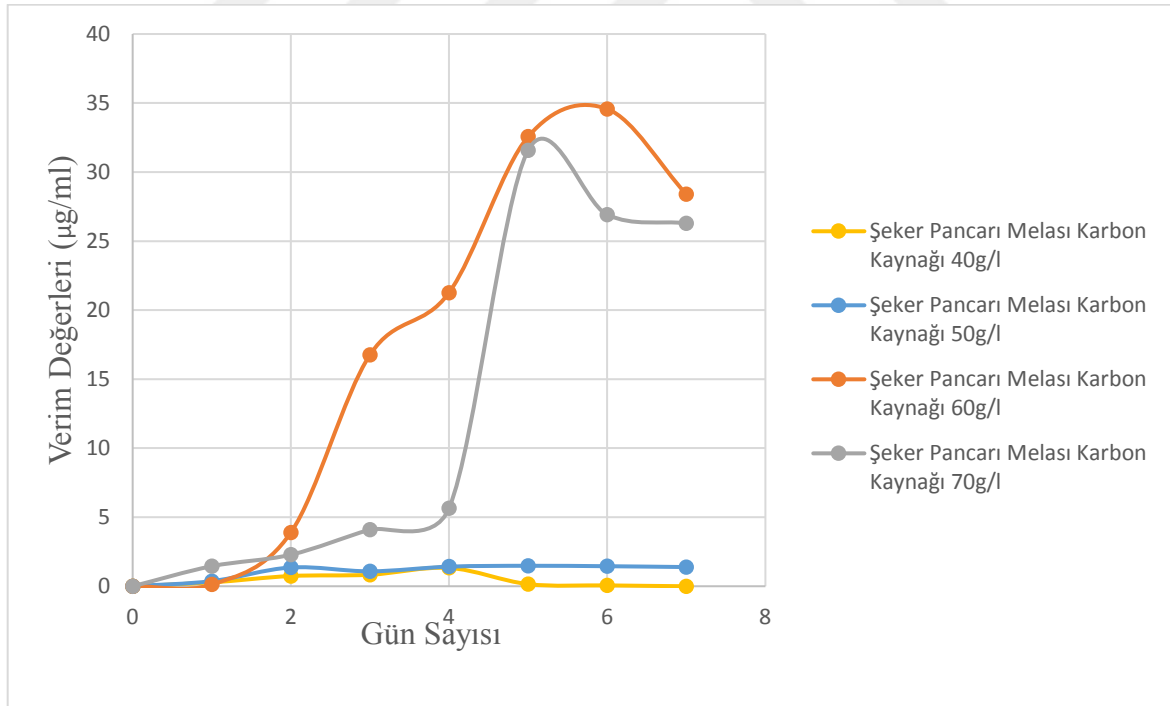
Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,185	0,463	0,463	0,37	0,015
2	1,204	1,204	1,667	1,358	0,028
3	1,019	1,111	1,111	1,08	0,015
4	1,389	1,481	1,389	1,42	0,015
5	1,389	1,759	1,296	1,481	0,012
6	1,204	1,481	1,667	1,451	0,01
7	1,296	1,389	1,481	1,389	0,008

Tablo 3.7. Serbest *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

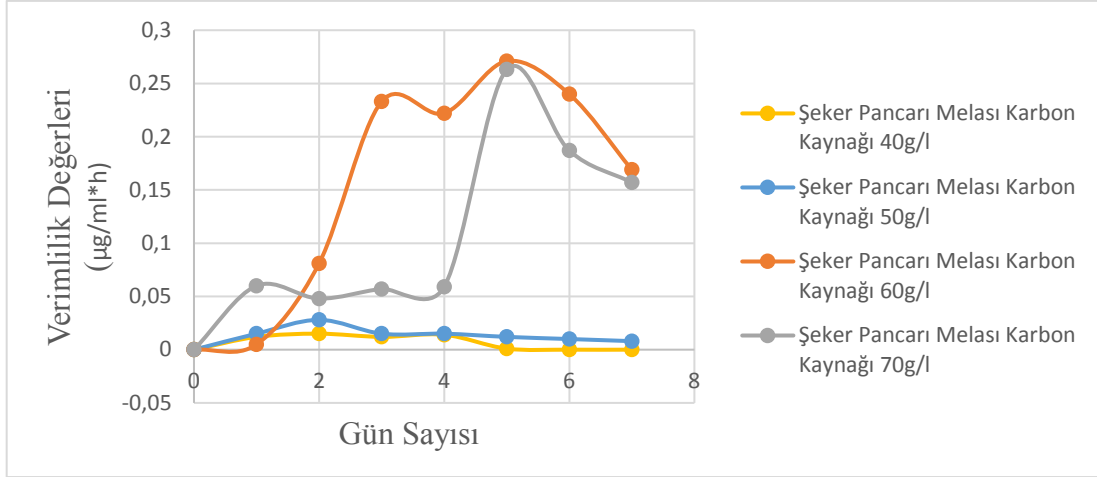
Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,093	0,185	0,093	0,124	0,005
2	0,37	0,37	10,926	3,889	0,081
3	1,111	26,019	23,148	16,759	0,233
4	2,037	30,926	30,833	21,265	0,222
5	28,796	33,704	35,185	32,562	0,271
6	34,259	36,111	33,333	34,568	0,24
7	29,722	27,87	27,593	28,395	0,169

Tablo 3.8. Serbest *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (70g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,037	0,741	1,574	1,451	0,06
2	2,315	1,019	3,519	2,284	0,048
3	3,426	3,889	5	4,105	0,057
4	5,093	5,463	6,389	5,648	0,059
5	32,407	31,574	30,741	31,574	0,263
6	32,407	26,852	21,481	26,913	0,187
7	22,222	28,796	27,87	26,296	0,157



Şekil 3.6. Serbest hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verim değerleri



Şekil 3.7. Serbest hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verimlilik değerleri

3.3. Eritromisin Üretim İçin İmmobilize *S. erythraea* Suşunun Kullanılması

Şekil 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7 yorumlanarak, immobilizasyon deneylerinin yapılmasında karbon kaynağı olarak sadece 60 g/l şekerpancarı melası eritromisin üretimi için kullanıldı. Kalsiyum aljinat (Şekil 3.8) ve poliakrilamide jel (Şekil 3.9) ile immobilize edilmiş *S. erythraea* suşunun kullanılması sonucu Tablo 3.9 ve 3.10 değerleri bulunmuştur. Verim ve verimlilik değerleri Şekil 3.10 ve 3.11’de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre en çok verim kalsiyum aljinat immobilizasyon yöntemi ile 6. günde 28,02 µg/ml eritromisin değeri ile bulunmuştur.



Şekil 3.8. *S. erythraea* suşunun kalsiyum aljinat ile immobilizasyonundan sonra oluşan boncuklar



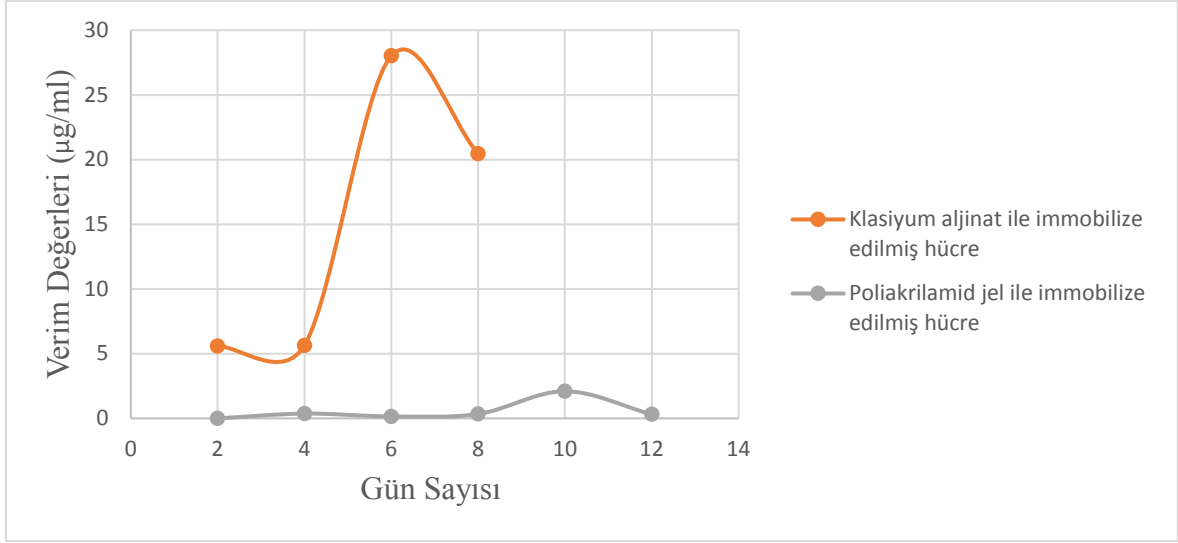
Şekil 3.9. *S. erythraea* suşunun poliakrilamid jel ile immobilizasyonundan sonra oluşan jel parçaları

Tablo 3.9. Kalsiyum aljinat ile immobilize *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

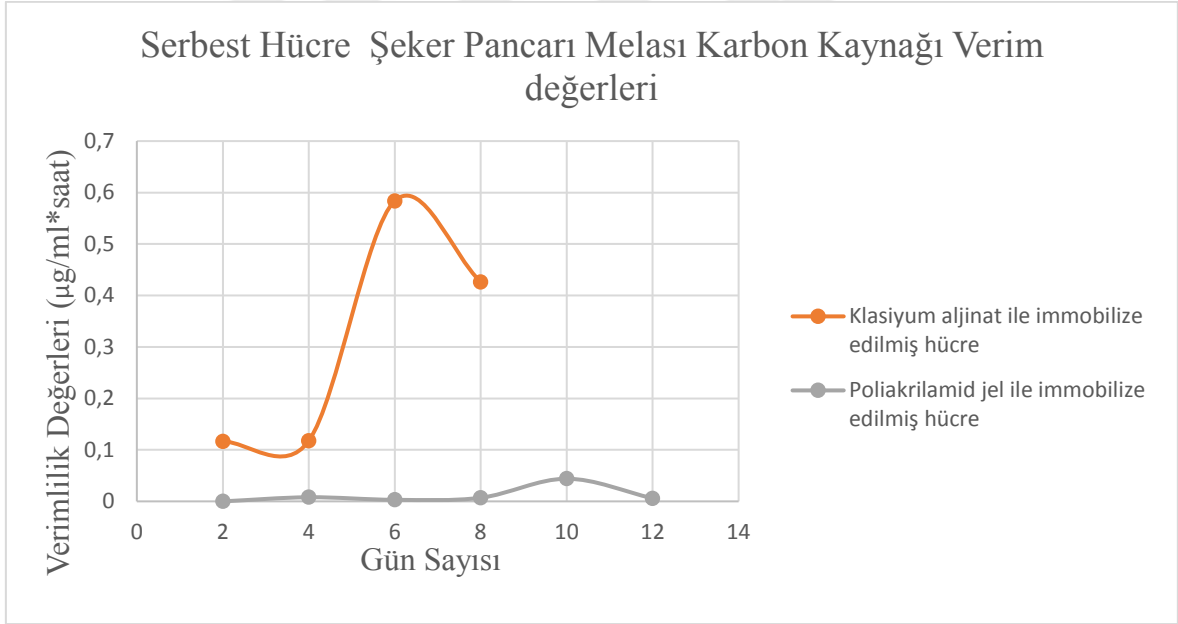
Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	3,704	4,074	5,185	4,321	0,18
2	4,815	6,852	5,093	5,587	0,116
3	4,352	4,444	5	4,599	0,192
4	5,37	5,556	6,019	5,648	0,118
5	9,352	6,759	7,5	7,87	0,328
6	32,037	18,241	33,796	28,025	0,584
7	5,093	7,685	8,333	7,037	0,293
8	28,056	15,648	17,685	20,463	0,426

Tablo 3.10. Poliakrilamid jel ile immobilize *S. erythraea* suşunun şeker pancarı melası (60g/l) karbon kaynağı ile eritromisin üretim değerleri

Gün Sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0,648	0	0,216	0,009
4	0,741	0,37	0	0,37	0,008
5	0	0,093	0	0,031	0,001
6	0,093	0,37	0	0,154	0,003
7	0,833	0,37	1,759	0,987	0,041
8	0,556	0	0,463	0,34	0,007
9	1,204	0,741	0	0,648	0,027
10	2,5	3,796	0	2,099	0,044
11	0,278	0,185	0	0,154	0,006
12	0,833	0,093	0	0,309	0,006



Şekil.3.10. İmmobilize hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verim değerleri grafiği



Şekil 3.11. İmmobilize hücre şeker pancarı melası karbon kaynağı verimlilik değerleri grafiği

Sonuçların SPSS ile analizine göre karbon kaynakları ve immobilizasyon tekniklerinin, verimlilik değerleri arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

3.4. Fermantasyon Ortamlarındaki Üretilen Eritromisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

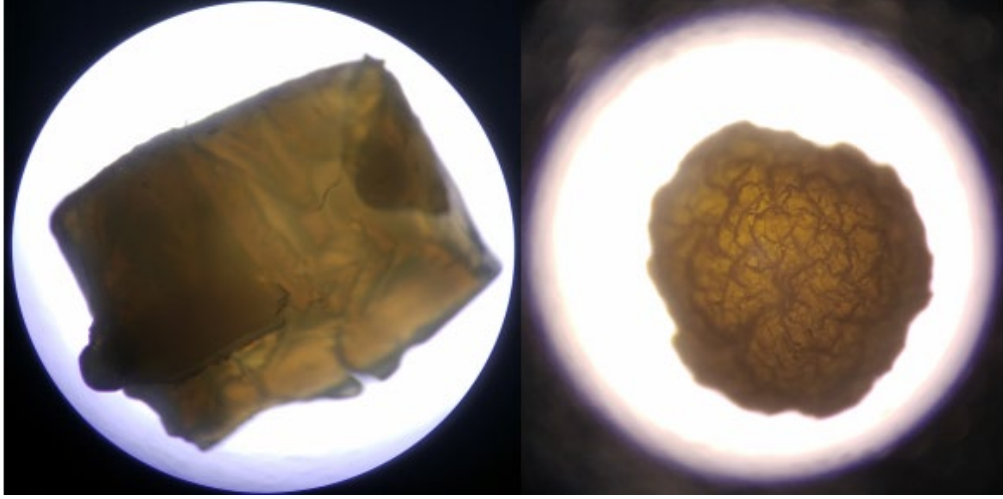
Fermantasyon ortamında üretilen eritromisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite testinde *S. aureus* bakterisine karşı etkili olduğu ve zon çaplarının oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12) .



Şekil 3.12. Fermantasyon ortamında üretilen eritromisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite test görüntüsü

3.5. İmmobilize Edilmiş *S. erythraea* Suşunun Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi

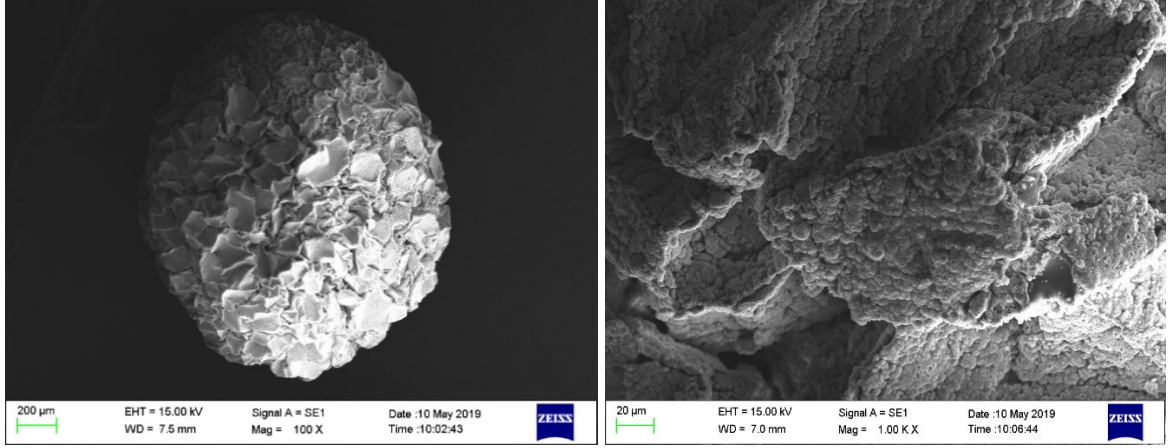
S. erythraea Suşunun immobilizasyonundan sonra oluşan boncuk ve jel parçaları ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri çekilmiştir (Şekil 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16).



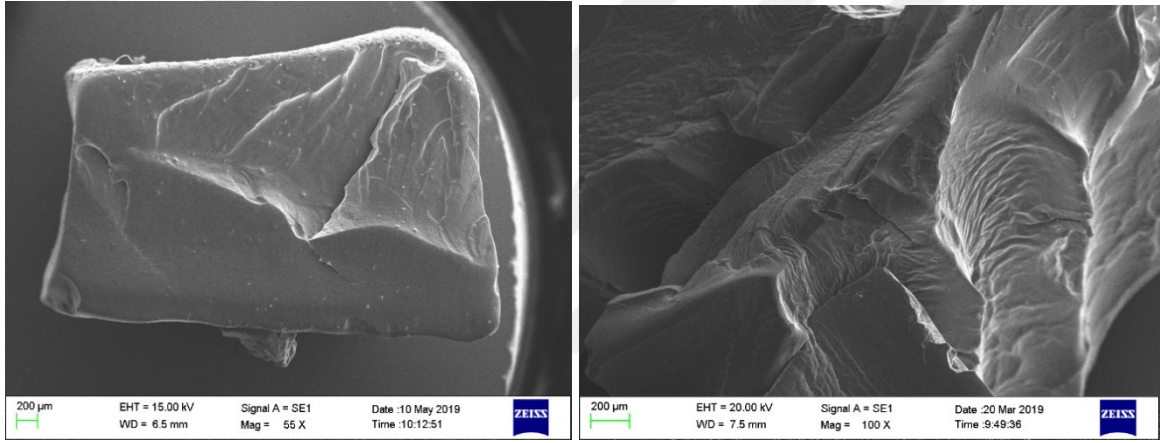
Şekil 3.13. Poliakrilamid jel (sağda) ve kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucu oluşan jel ve boncukların ışık mikroskobu görüntüleri.



Şekil 3.14. Taramalı elektron mikroskobu



Şekil 3.15. Kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucu oluşan boncukların SEM görüntüleri



Şekil 3.16. Poliakrilamid jel ile immobilizasyon sonucu oluşan jel parçasının SEM görüntüleri

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Antibiyotikler bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli sekonder metabolitlerdir. Son 60-70 yıldır hayatımızda olan antibiyotikler, enfeksiyon kaynaklı ölümleri azaltarak insan ömrünü 30-40 yıl uzatmıştır. *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*) bakterisi tarafından üretilen eritromisin antibiyotiği 1952 yılında keşfedilmiş ve klinikte kullanım alanı oldukça geniş makrolid grubu bir antibiyotiktir (Liu vd., 2013; Öner vd., 1989).

Hung vd. (1965) yaptıkları çalışmada, eritromisin antibiyotiğinin biyosentezi için bir şema önermişlerdir. Weber vd. (1985) yaptıkları çalışmada, *S. erythreus* bakterisinin eritromisin üretiminin genetik analizini yapmışlardır. Minas (2008), *S. erythraea* bakterisinin eritromisin antibiyotiğinin biyoteknolojik üretim prosesini açıklamıştır. Chen vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, eritromisin antibiyotiğinin daha yüksek bir saflıkta üretmek için *S. erythraea* bakterisinin üzerinde genetik modifikasyonlar yapılmış ve antibiyotik saflığını önemli ölçüde iyileştirildiği belirtilmiştir. Liao vd. (2015) yaptıkları çalışmada, *S. erythraea* bakterisinin kitin ve n-asetilglukozaminin içeren seçici bir besiyeri olarak aktinomised grubu bakterilerin izolasyonu için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Liu vd. (2018) yaptıkları çalışmada, *S. erythraea* bakterisinin genlerini CRISPR-Cas9 gen düzenleme yöntemi ile düzenleyerek yaptıkları deneme sonucunda eritromisin üretiminin yabani tipe göre %80,3 arttığı belirtmişlerdir. Zhuang vd. (2018) *S. erythraea* bakterisinin genom ölçekli metabolik modelini literatür ve veri tabanlarına göre yeniden düzenlemiş ve %75-90 arasında doğrulanabilirlik deneyleri ile teyit edildiğini belirtmişlerdir. Wu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, TetR gibi regülatör olan SACE_5754 ile *S. erythraea* üzerinde genom mühendisliği yapılarak eritromisin üretiminin küçük şişelerde %65, fermentörde ise %41 arttığı belirtilmiştir.

Karbon kaynaklarının (Glikoz, gliserol, mannoz, sükroz, nişasta, melas vb.) birçok antibiyotik (eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, neomsin, klaromfenikol vb.) üretiminde etkilerinin araştırılması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Sanchez vd., 2010; Hamed vd., 2002; Hamed vd. 2005, Bandyopadhyay vd., 1993; Adinarayana vd., 2003; Cruz vd.,

2003; Veelken ve Pape, 1982; Rostamza vd., 2008). Hamedî vd. (2002) *S. erythraea* bakterisinin çeşitli bitki yağlarının olduğu fermantasyon ortamlarında eritromisin üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, siyah kiraz çekirdeği yağı ortamında eritromisin üretiminin kontrol grubuna göre 3.5 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

El-Enshasy vd. (2007) yaptıkları çalışmada, farklı karbon (glikoz, şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, nişasta vb.) ve organik-inorganik azot (mısır meserasyon sıvısı, kazein, pepton, üre, maya ekstraktı, amonyumklorid, amonyum nitrat, amonyum sülfat b.) bileşenlerini içeren besi yerlerinde *S. erythraea* bakterisi ile eritromisin üretmişler ve karbon kaynağı olarak şeker kamışı melası ile azot kaynağı olarak mısır meserasyon sıvısı içeren ortamlarda maksimum verimlilikte eritromisin üretimi gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Bandyopadhyay vd. (1993) yaptıkları çalışmada, eritromisin antibiyotiği üreticisi olan *S. erythraeus* bakterisini kalsiyum alginat ile immobilize etmişler ve farklı karbon ve azot kaynakları içeren ortamlarda eritromisin üretimini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda %1 sükroz ve %0.2 L-Lösin içeren besi yerinde ve kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucu daha yüksek eritromisin üretiminin olduğunu belirtmişlerdir.

Hamedî vd. (2005) yaptıkları bir başka çalışmada, *S. erythraea* bakterisinin kalsiyum aljinat ile immobilizasyonu sonucu serbest hücreye göre 2.3 kat daha fazla eritromisin ürettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca immobilize hücrelerin tekrar tekrar kullanımlarında zamanla daha az eritromisin üretilmiş ve immobilize hücrelerin 4. kez kullanımında eritromisin antibiyotiğinin üretilmediğini belirtmişlerdir. Neomisin, tylosin, nikkomisin gibi farklı antibiyotiklerin üretimi için de kalsiyum aljinat ile immobilizasyon yöntemleri denenmiş ve başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Adinarayana vd., 2003; Cruz vd., 2003; Veelken ve Pape, 1982).

Awais vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada; *Bacillus subtilis* bakterisinden antimikrobiyal metabolitler elde etmek için farklı glikoz konsantrasyonlarında ve poliakrilamid jel içerisinde bakteriyi immobilize etmişler ve serbest hücreye göre immobilize hücrede daha fazla antimikrobiyal bileşiklerinin olduğunu antimikrobiyal testler sonucunda saptamışlardır. Hasan vd. (2009) yaptıkları bir çalışmada ise, *Bacillus pumilus* SAF1 bakterisinin poliakrilamid jel, sodyum aljinat ve agar-agar ile yapılan immobilizasyon sonucunda serbest hücreye göre antibiyotik üretiminin biraz daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Fakat Egerov vd. (1978) yaptıkları çalışmada *Streptococcus lactis*

bakterisinin poliakrilamid jel ile immobilizasyonu sonucunda serbest hücreye göre 2-3 kat daha az nisin antibiyotiği ürettiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda *S. erythraea* bakterisi ile eritromisin antibiyotiğinin üretimi için farklı karbon kaynakları ve immobilizasyon teknikleri kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan 60 g/l şeker pancarı melası fermantasyon ortamında 5. gün sonunda 0,271 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değerine ulaşılmıştır. Yapılan immobilizasyon deneyleri sonucunda, kalsiyum aljinat immobilizasyonu ile 6. gün sonunda 0,584 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değeri elde edilmiştir. Fakat poliakrilamid jel ile immobilizasyonda serbest hücreye göre 6,6 kat daha az antibiyotik üretimi tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonucunda serbest hücreye göre daha fazla verimlilik elde edilmesi diğer araştırmacıların bulgularıyla (Hamedi vd., 2005; Adinarayana vd., 2003; Cruz vd., 2003; Veelken ve Pape, 1982) paralellik arz etmektedir. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde poliakrilamid jel ile immobilize edilmiş *S. lactis* bakterisinin serbest hücreye göre daha az nisin antibiyotiği ürettiği rapor edilmiştir (Egerov vd., 1978). Bununla birlikte bizim bulgularımızdan farklı olarak Awais vd. (2010) poliakrilamid jel ile immobilize edilmiş *B. subtilis* bakterisinin serbest hücreye göre daha fazla antibiyotik ürettiğini bildirmişlerdir. Karbon kaynakları ve immobilizasyon teknikleri antibiyotik üretimini etkileyen önemli parametrelerdir. Bizim çalışmamızda karbon kaynağı olarak ticari glikoz ve şeker pancarı melası, immobilizasyon tekniği olarak kalsiyum aljinat ve poliakrilamid jel ile immobilizasyon teknikleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak şeker pancarı melası karbon kaynağının ticari glikoza göre hem ucuz hem de 4,37 kat daha yüksek verimlilik değerine ulaşılmıştır ve istatistiksel olarak da karbon kaynaklarının aralarında anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca kalsiyum aljinat ile immobilizasyon sonunda serbest hücreye göre 2.16 kat daha yüksek verimlilik değerine ulaşılmıştır ve istatistiksel olarak da aralarında anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

4. KAYNAKLAR

- Adinarayana, K., Srinivasulu, B., Bapi-Raju, K.V.V.S.N. and Ellaiah, P.,** 2004. Countinuous neomycin production by immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in an airlift bioreactor, *Process Biochemistry*, **39** , 1407-1414.
- Akbulut, U.,** <http://www.uralakbulut.com.tr/wp-content/uploads/2009/11/PEN%C4%B0S%C4%B0L%C4%B0N.docD%C3%9CNYANIN-%C4%B0LK-ANT%C4%B0B%C4%B0YOT%C4%B0%C4%9E%C4%B0N%C4%B0NKE%C5%9EF%C4%B0-%C5%9EUBAT2010.pdf>, Penisilin: Dünyanın İlk Antibiyotiği ve Tesadüfen Keşfi. 06.04.2019
- Arda, M.,** 2000. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Evi, Ankara.
- Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A. and Shah, M.M.,** 2010. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel, *Pakistan Journal of Zoology*, **42**, 267-275.
- Bandyopadhyay, A., Das, A.K. and Mandal, S.K.,** 1993. Erythromycin production by *Streptomyces erythreus* entrapped in calcium alginate beads. *Biotechnology Letters*, **15**, 1003-1006.
- Bilgehan, H.,** 2002. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, İzmir.
- Brittain, D.C.,** 1987. Erythromycin, *Medical Clinics of North America*, **71**, 1147-1154.
- Chen, Y., Deng, W., Wu, J., Qian, J., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. and Liu, W.,** 2008. Genetic modulation of the overexpression of tailoring genes eryk and eryg leading to improvement of erythromycin a purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 1820-1828.

- Cruz, A.J.G.C., Pan, T., Giordano, R.C., Araujo, M.L.G.C. and Hokka, C., 2003.** Cephalosporin c production by immobilized *Cephalosporium acremonium* cells in a repeated batch tower bioreactor, *Wiley InterScience*, **85**, 96-102
- Çevikbaş, A., 1990.** Antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, Antibiyotikler, *MİSEP-1*, S. 164-174.
- Çiftçi, A. ve Aksoy, A., 2015.** Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, **1**, 1-10.
- Egorov, N.S., Baranova, I.P. and Kozlova, I.I., 1978.** Nisin formation by immobilized cells of lactic acid bacterium *Streptococcus lactis*, *Antibiotiki*, **23**, 872-874.
- El-Enshasy, H.A., Mohamed, N.A., Farid, M.A. and El-Diwany, A.I., 2007.** Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization, *Bioresource Technology*, **99**, 4263–4268.
- Göksungur, Y. ve Güvenç, U., 2002.** Kalsiyum aljinatta hücre immobilizasyonu ve biyoteknolojideki uygulamaları, *Gıda*, **6**, 511-518.
- Gür, D., 2016.** Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: Uygulama, yorum ve uzman kurallar, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **46**, 1-206.
- Hamed, J., Malekzadeh, F. and Niknam, V., 2002.** Improved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by various plant oils, *Biotechnology Letters*, **24**, 697-700.
- Hamed, J., Khodagholi, F. and Hassani-Nasab, A., 2005.** Increased erythromycin production by alginate as a medium ingredient or immobilization support in cultures of *Saccharopolyspora erythraea*, *Biotechnology Letters*, **27**, 661–664.
- Hasan, F., Khan, S., Shah, A.A. and Hameed, A., 2009.** Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1, *Pakistan Journal Botany*, **41**, 1499-1510.

- Hung, P.P., Marks, C.L. and Tardrew, P.L., 1965.** The biosynthesis and metabolism of erythromycins by *Streptomyces erythreus*, *The Journal of Biological Chemistry*, **240**, 1322-1326.
- Kasavi, C., 2006.** Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R. and Koutinas, A.A., 2004.** Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology*, **21**, 377-397.
- Liao, C., Rigali, S., Cassani, C.L., Marcellin, E., Nielsen, L.K. and Ye, B.C., 2014.** Control of Chitin and N-acetylglucosamine utilization in *Saccharopolyspora erythraea*, *Microbiology*, **160**, 1914-1928.
- Licona-Cassani, C., Lim, S., Marcellin, E. and Nielsen, L.K., 2014.** Temporal Dynamics of the *Saccharopolyspora erythraea* Phosphoproteome*, *Molecular & Cellular Proteomics*, **13**, 1219-1230.
- Liu, W.B., Yu, W.B., Gao, S.H. and Ye, B.C., 2013.** Genome sequence of *Saccharopolyspora erythraea* d, a hyperproducer of erythromycin, *Genome Announcements*, **1**, 1-2.
- Liu, Y., Wei, W.P. and Ye, B.C., 2018.** High GC content Cas9-mediated genome-editing and biosynthetic gene cluster activation in *Saccharopolyspora erythraea*, *ACS Synthetic Biology*, **7**, 1338-1348.
- Minas, W., 2008.** Production of erythromycin with *Saccharopolyspora erythraea*, *Methods in Biotechnology*, **18**, 65-90.
- Moreno, S., Garcia-Leoni, M.E., Cercenado, M.D.D., Quiros, B. and Bouza, E., 1995.** Infections caused by erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: Incidence, risk factors, and response to therapy in a prospective study, *Clinical Infectious Diseases*, **20**, 1195-1200.

- Morikawa, Y., Ochiai, K., Karube, I. and Suzuki, S.,** 1979. Bacitracin production by whole cells immobilized in polyacrylamide gel, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **15**, 126-130.
- Oliynyk, M., Samborsky, M., Lester, J.B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S.F. and Leadlay, P.F.,** 2007. Complete genome sequence of the erythromycin producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338, *Nature Biotechnology*, **24**, 447-453.
- Oskay, M. ve Tamer, A. U.,** 2009. Streptomises kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını, *e-Journal of New World Sciences Academy*, **4**, 48-60.
- Öner, M.,** 1989. Actinomycetes (Selman A. Waksman 1967' den çeviri). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, E.Ü. Basımevi, İzmir.
- Özcelik, F.** https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/101566/mod_resource/content/0/D314.%20F%C3%96%2010%20Biyokatalistlerin%20%C4%B0mmobilizasyonu.pdf, Biyokatalistlerin İmmobilizasyonu. 01.04.2019
- Öztürk, R.,** 2002. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu, *İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, **31**, 83-100.
- Ramakkrishna, S.V. and Prakasham, R.S.,** 1999. Microbial fermentation with immobilized cells, *Current Science*, **77**, 87-100.
- Reynolds, L.A. and Tansey, E.M.,** 2000. <http://discovery.ucl.ac.uk/2074/1/wit6.pdf>, Post Penicillin Antibiotics: From Acceptance To Resistance ?. *Wellcome Institute Witness Seminars*, London.
- Rostamza, M., Noohi, A. and Hamedi, J.,** 2008. Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding-media, *Daru*, **16**, 13-17.
- Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E. and Ruiz, B.,** 2010. Carbon source regulation of antibiotic production, *The Journal of Antibiotics*, **63**, 442-459.

- Telefoncu, A.**, 1997. Enzimoloji Lisans Üstü Yaz Okulu Notları, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Tunail, N.**, 2009. Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara.
- URL-1**, <https://www.uv.es/mabegagaleeuwenhoekleeuwenhoek.html>, Anton Van Leeuwenhoek. 02.04.2019
- URL-2**, <http://www.biyolojidersnotlari.com/mikrobiyolojinin-tarihcesi.html>, Mikrobiyolojinin Tarihçesi. 02.04.2019
- URL-3**, https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharopolyspora_erythraea, *Saccharopolyspora erythraea*. 05.04.2019
- URL-4**, http://www.bacteriainphotos.com/Alexander_Fleming_and_penicillin.html, Alexander Fleming. 02.04.2019
- URL-5**, <https://hipokratinyeri.wordpress.com/2014/05/01/antibiyotiklerin-etki-mekanizmalari/>, Antibiyotiklerin Etki Mekanizması. 05.04.2019
- URL-6**, <https://www.drugbank.ca/structures/DB00199/image.svg>, Erythromycin. 05.04.2019
- Uygun, M.**, 2015. *Aspergillus niger* ATCC 9642'nin alginat küreleri üzerine immobilizasyonu ve bazı tekstil boya ile zeytin karasuyunun renk gideriminde kullanımının araştırılması, *Yüksek Lisans tezi*, A.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Veelken, M. and Pape, H.**, 1982. Production of tylosin and nikkomycin by immobilized *Streptomyces* cells, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **15**, 206-210.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, S.J. and Higton, G.**, 2015. Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş, Çeviri Ed. Turhan, İ, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Wankhade, R., Bhalerao, S., Panchory, H., Pundir, A. and Pradhan, R.**, 2012. analysis of erythromycin and benzoyl peroxide in combined dosage form by UV-visible spectrophotometry, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, **4**, 527-531.

- Weber, J.M., Wierman, C.K. and Hutchinson, C.R.,** 1985. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*, *Journal of Bacteriology*, **164**, 425-433.
- Wu, H., Chu, Z., Zhang, W., Zhang, C., Ni, J., Fang, H., Chen, Y., Wang, Y., Zhang, L. and Zhang, B.,** 2019. Transcriptome-guided target identification of the TetR-like regülätör SACE_5754 and engineered overproduction of erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*, *Journal of Biological Engineering*, **13**, 1-12.
- Yılmaz, M. ve Beyath, Y.,** 2003. Bacillus cinsi bakterilerde antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi, *OrLab on-line Mikrobiyoloji Dergisi*, **7**, 35-49.
- Zhuang, Z., Huang, M. and Chu, J.,** 2018. In silico reconstruction and experimental validation of *Saccharopolyspora erythraea* genome-scale metabolic model İZZ1342 that accounts for 1685 ORFs, *Bioresources and Bioprocessing*, **5**, 1-14.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad- Soyad: Hüseyin MUTLU

Doğum Tarihi: 10.10.1991 (MUŞ)

Adres Bilgileri: Kültür mah. Fidan sk. No:8 1-8 Elazığ/Merkez

Cep: 507 941 70 49

Ehliyet: B Tipi

E-posta: huseyinmutlu01@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

(2018-.....) Fırat Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği Lisans Programı (Elazığ)

(2017-.....) Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı (Elazığ)

2014-2017 Anadolu Üniversitesi Uluslararası İlişkiler Lisans Programı (Eskişehir)

2011-2014 Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Lisans Programı (Elazığ)

2006-2010 2000 Evler Anadolu Lisesi (Nevşehir)

STAJLAR

2012 (1 Ay Laboratuvar Stajı); Ondokuz Mayıs Üniversite Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

2013 (1 Ay İşletme Stajı) ; Muğla Fethiye Atık Su Arıtma Tesisi

DENEYİMLER

2017-2019 (24 Ay); Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları

2015-2016 (12 ay Kamu Personeli); Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nükleer Tıp Laboratuvarı

NİTELİKLER

Yabancı Dil; Orta Seviyede İngilizce, Başlangıç Seviyede Almanca, Orta seviyede Kürtçe

Bilgisayar Bilgileri; MATHCAD, AUTOCAD, C-C++, SPSS, MS Ofis Programları, Windows İşletim Sistemleri