



T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE TATLI
PATATES (*Ipomoea batatas*) EKSTRAKTI VE ÜRİDİN KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda AKIN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

OCAK 2023

T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE TATLI
PATATES (*Ipomoea batatas*) EKSTRAKTI VE ÜRİDİN KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda AKIN
(19297056008)
ORCID: 0000-0003-0929-5514

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT
ORCID: 0000-0002-5857-8820

OCAK 2023

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 19297056008 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Eda AKIN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE TATLI PATATES (*Ipomoea batatas*) EKSTRAKTI VE ÜRİDİN KULLANIMI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

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

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Elif DEMİRKAN**
Bursa Uludağ Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan KAZAN
Bursa Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi :
Savunma Tarihi : 25 Ocak 2023



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

İNTİHAL BEYANI

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

Öğrencinin Adı Soyadı: Eda AKIN

İmzası:





Anneme ve babama,

ÖNSÖZ

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

Yüksek lisans tezimde bana her zaman destek olan ve görüşlerinden yararlandığım Arş. Gör. Hilal GİRĞİN ÖZ hocama katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hocalarıma da yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında manevi desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşlarıma da içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme minnettarım.

Ocak 2023

Eda AKIN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	x
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	1
1.2 Hyaluronik Asit Teknolojisinin Gelişimi	1
1.3 Hyaluronik Asidin Önemi ve Uygulama Alanları.....	2
1.4 Hyaluronik Asit Yapısı.....	3
1.4.1 Hyaluronik asidin kimyasal yapısı.....	3
1.4.2 Hyaluronik asidin çözelti yapısı.....	4
1.5 Hyaluronik Asit Üretim Kaynakları.....	4
1.5.1 Hayvansal dokulardan hyaluronik asit ekstraksiyonu.....	5
1.5.2 Mikrobiyal kaynaklı hyaluronik asit üretimi.....	6
1.6 Biyosentetik Yolak.....	6
1.7 Bakteri Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretiminde Fermantasyon Stratejileri.....	7
1.7.1 Bakteri türü seçimi	7
1.7.2 Besiyeri tercihi	8
1.7.3 Üretim koşulları	8
1.7.3.1 Fermantasyon yöntemleri.....	8
1.7.3.2 pH.....	9
1.7.3.3 Karıştırma hızı.....	9
1.7.3.4 Sıcaklık.....	10
1.7.3.5 Çözünmüş oksijen.....	10
1.8 Karbon Kaynağı Olarak <i>I. batatas</i>	11
1.9 Üridin İlavesi.....	11
1.10 Hyaluronik Asit Miktar Analizi	12
1.11 Hipotez	12
2. MATERYAL VE METOD.....	13
2.1 Materyal.....	13
2.1.1 Bakteri kültürü	13
2.1.2 Kimyasallar	13
2.1.3 Cihazlar	14
2.1.4 Besiyerleri	14
2.2 Metod.....	15
2.2.1 <i>S. zooepidemicus</i> aktif hale getirilmesi	15

2.2.2 İnokulasyon ortamının hazırlanması	15
2.2.3 Biyoreaktörde üretim	15
2.2.4 <i>I. batatas</i> ekstraktının hazırlanması	16
2.2.5 <i>I. batatas</i> ekstrakt oranının belirlenmesi	16
2.2.6 Üridin oranının belirlenmesi	17
2.2.7 Fermantasyon süresinin belirlenmesi	17
2.2.8 Glikoz ile HA üretimi.....	17
2.2.9 Fermantasyon süresince bakteri sayısının belirlenmesi	17
2.2.10 Karbozal metoduyla HA miktar tayini	18
3. BULGULAR	20
3.1 HA Üretimi İçin <i>I. batatas</i> Ekstraktı Oranının Belirlenmesi	20
3.2 HA Üretiminde Kullanılacak Üridin Oranının Belirlenmesi	21
3.3 Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi.....	23
3.4 Glikoz İle Hyaluronik Asit Üretimi	24
4. TARTIŞMA	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	37

KISALTMALAR

BHI	: Beyin Kalp İnfüzyonu
CDM	: Kimyasal tanımlanmış besiyeri
GAG	: Glikozaminoglikan
HA	: Hyaluronik asit
<i>I.batatas</i>	: <i>Ipomoea batatas</i>
kob	: Koloni oluşturan birim
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
sp.	: species
subsp.	: subspecies
<i>S. zooepidemicus</i>	: <i>Streptococcus zooepidemicus</i>

SEMBOLLER

g	: gram
Da	: Dalton
H₂SO₄	: Sülfürik asit
HCl	: Hidroklorik asit
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
L	: Litre
MgSO₄.7H₂O	: Zaman
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
OD	: Optik dansite
pH	: Asitlik-bazlık derecesi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrad
%	: Yüzde

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Kimyasallar.....	13
Çizelge 2.2 Cihazlar.....	14
Çizelge 2.3 Fermantasyon besiyeri bileşimi (1 L için).....	16



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Hyaluronik asit kullanım alanları (Fallaraca ve diğ, 2018)	2
Şekil 1.2 A: HA disakkarit biriminin kimyasal yapısı. B: Tetrasakkarit HA yapısı, hidrofilik fonksiyonel gruplar maviyle, hidrofobik kısımlar sarıyla ve hidrojen bağları yeşil kesikli çizgiyle gösterilmiştir (Fallaraca ve diğ, 2018).....	3
Şekil 1.3 Hyaluronik asit üretim yöntemleri (Grupta ve diğ, 2019)	5
Şekil 1.4 Streptokoklarda HA için biyosentetik yolak (Girgin, 2019).....	7
Şekil 2.1 HA standart eğrisi (Girgin, 2019)	18
Şekil 3.1 Farklı <i>I. batatas</i> ekstraktı konsantrasyonlarında mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	20
Şekil3.2 Farklı <i>I. batatas</i> ekstraktı konsantrasyonlarında mikrobiyal HA üretiminin R programında kutu grafiğinde gösterimi	21
Şekil 3.3 Farklı üridin oranlarında mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	22
Şekil 3.4 Farklı üridin oranlarında mikrobiyal HA üretiminin R programında kutu grafiğinde gösterimi	22
Şekil 3.5 Dokuz saat boyunca mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	23
Şekil 3.6 <i>I. batatas</i> ekstraktı ve glikoz kullanımında üridin ilavesi ile mikrobiyal HA üretimi (A: Üridin ilaveli <i>I. batatas</i> ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. n = 4 tekrarlı çalışılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	24
Şekil 3.7 Farklı <i>I. batatas</i> ekstraktı konsantrasyonlarında oluşan bakteri sayısı ve mikrobiyal HA üretimi (Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	25
Şekil 3.8 Süreye yönelik yapılan çalışmada 5. saatte oluşan bakteri sayıları ve mikrobiyal HA üretimi (A: <i>I. batatas</i> ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli <i>I. batatas</i> ekstraktı kullanımında HA üretimi, C: Glikoz kullanımında HA üretimi, D: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	26
Şekil 3.9 Farklı değerlerde üridin ilavesinde oluşan bakteri sayıları ve mikrobiyal HA üretimi (Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	27
Şekil 3.10 Üridin ilaveli <i>I. batatas</i> ekstraktı ve glikoz kullanımında oluşan bakteri sayısı ve mikrobiyal HA üretimi (A: Üridin ilaveli <i>I. batatas</i> ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.).....	28

***Streptococcus zooepidemicus* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE TATLI PATATES (*Ipomoea batatas*) EKSTRAKTI VE ÜRIDİN KULLANIMI**

ÖZET

Çalışmanın amacı *Streptococcus zooepidemicus* bakterisi ile HA üretiminde *I. batatas* ekstraktı kullanımı ve üridin ilavesinin üretime etkisinin olup olmadığının belirlenmesidir. Tez çalışması kapsamında tam kontrollü (%20 doymuşluğun üzerinde optimal O₂ seviyesi, 37 °C sıcaklık, 6,5 pH değeri, 150 rpm karıştırma hızı) paralel fermentör sistemi ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HA miktarları karbazol yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada 0,1, 1, 8, 10, 13, 21 ve 30 g/L *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonları ile HA üretilmiştir. Belirlenen optimum *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonu kullanılarak optimum üridin oranı için 1 L besiyerine 0,75, 1,5, 2,50, 4,25, 6,75 mL üridin ilavesi ile HA üretim seviyeleri karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ise glikoz kullanılarak HA üretimi gerçekleştirilerek *I. batatas* ekstraktı kullanılarak elde edilen HA miktarları ile karşılaştırılmıştır. Fermantasyon süreleri sonunda sistemden alınan numunelerin 550 nm’de absorbans ölçümleri yapılarak HA standart eğrisi ile üretilen HA miktarları hesaplanmıştır. Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi üridin ilaveli glikoz kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Mann Whitney U Test, P=0,02857). HA üretiminde karbon kaynağı olarak *I. batatas* ekstraktı ve üridin kullanımıyla HA üretim verimini arttırmak mümkün olmuştur. Ancak *I. batatas* ekstraktı ve üridin kullanımında fermantasyon koşullarının etkisi spesifik olarak bilinmemektedir. Gelecekteki çalışmalar *I. batatas* ekstraktı ve üridin kullanımıyla HA üretiminde fermantasyon koşullarının etkilerine odaklanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Hyaluronik Asit, Fermantasyon, *Ipomoea batatas*, Üridin, *Streptococcus zooepidemicus*

USAGE OF SWEET POTATO (*Ipomoea batatas*) EXTRACT AND URIDIN IN HYALURONIC ACID PRODUCTION BY *Streptococcus zooepidemicus*

SUMMARY

The aim of the study is to determine whether the use of *I. batatas* extract in the production of HA with *Streptococcus zooepidemicus* bacteria and whether the addition of uridine has an effect on production. Within the scope of the thesis, studies were carried out with a fully controlled (optimal O₂ level above 20% saturation, 37 °C temperature, 6.5 pH value, 150 rpm mixing speed) parallel fermenter system. HA amounts were determined by carbazole method. In the study, HA was produced with 0.1, 1, 8, 10, 13, 21 and 30 g/L *I. batatas* extract concentrations. HA production levels were compared with the addition of 0.75, 1.5, 2.50, 4.25, 6.75 mL uridine to 1 L medium for optimum uridine ratio by using the optimum *I. batatas* extract concentration. In the control group, HA production was performed using glucose and the amount of HA obtained using *I. batatas* extract was compared. At the end of the fermentation period, the absorbance measurements of the samples taken from the system at 550 nm were made and the amount of HA produced with the HA standard curve was calculated. Microbial HA production using uridine-added *I. batatas* extract was compared with microbial HA production using uridine-added glucose, and a significant difference was found between the results (Mann Whitney U Test, P=0.02857). It was possible to increase HA production efficiency by using *I. batatas* extract and uridine as carbon source in HA production. However, the effect of fermentation conditions on the use of *I. batatas* extract and uridine is not known specifically. Future studies focus on the effects of fermentation conditions on HA production using *I. batatas* extract and uridine.

Keywords: Hyaluronic Acid, Fermentation, *Ipomoea batatas*, Uridine, *Streptococcus zooepidemicus*

1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Hyaluronan adıyla da bilinen hyaluronik asit (HA), tekrarlanan disakkarit birimlerden oluşan dallanmış bir glikozaminoglikandır (Kuo ve diğ, 1991). Eşsiz biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle HA çeşitli tıbbi, farmasötik, gıda ve kozmetik uygulamalar için ideal biyomalzemeler arasında yer alır (Fallaraca ve diğ, 2018). Önemli bir makromolekül olması ve yaygın kullanım alanı sebebiyle hyaluronik asit ihtiyacı her geçen gün artmaktadır (Chong ve diğ, 2005; Vázquez ve diğ, 2015). Hyaluronik asidin 2016 yılında 7,2 milyar dolar bir pazar hacmine sahip olduğu bilinmektedir. 2025 yılına kadar ise 15,4 milyar dolar hacmine ulaşması beklenmektedir (Fallaraca ve diğ, 2018). HA'nın kilogram değeri ise değişen uygulama alaları doğrultusunda 2.000 ile 60.000 ABD doları arasında değişmektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen üretim sürecinde görülen zorluklar nedeniyle yüksek tüketim fiyatlarına sahiptir (Girgin, 2019).

Bu çalışmada, hyaluronik asit üretiminde genel üretici olduğu bilinen *S. zooepidemicus* bakterisi ile 0,1, 1, 8, 10, 13, 21, 30 g/L *I. batatas* ekstraktı ile 1 L besiyeri bileşimine 0,75, 1,5, 2,5, 4,25 ve 6,75 mL üridin ilavesi kullanılarak *I. batatas* ekstraktı ve üridin için optimum oranların belirlenmesi amaçlanmaktadır. Tam kontrollü paralel fermantasyon sistemiyle birim zamanda *I. batatas* ekstraktı ve üridin ilavesi ile mikrobiyal HA üretiminin artırılması hedeflenmiştir.

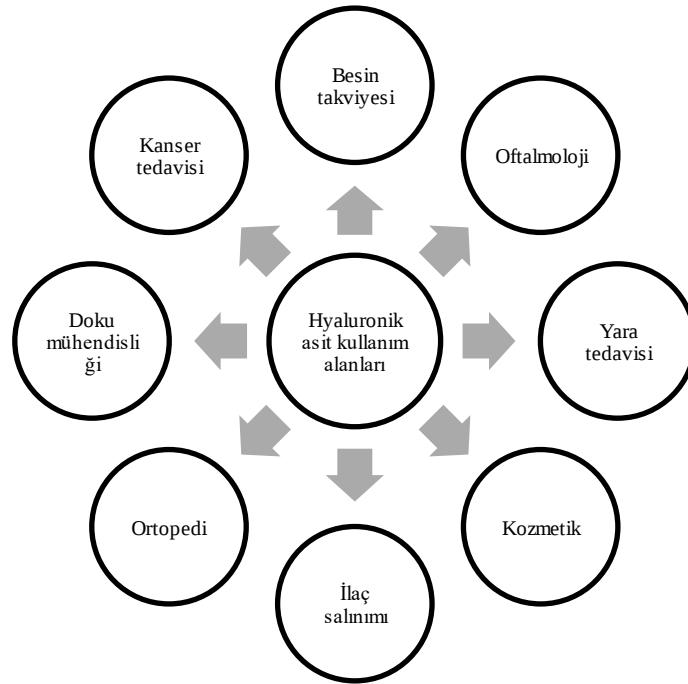
1.2 Hyaluronik Asit Teknolojisinin Gelişimi

Hyaluronik asit (HA) ilk kez 1934 yılında Karl Meyer ve John Palmer (1934) tarafından izole edilmiştir. Meyer ve Palmer, sığır gözünün vitröz kısmından bir amino şeker ve bir üronik asit içeren yeni bir polisakkaridi izole etmişler ve “hyaloid” (camsı, cam gibi, şeffaf) ve “üronik asit” terimlerinin birleşmesi sonucu oluşturdukları “hyaluronik asit” adını vermişlerdir (Fallaraca ve diğ, 2018; Necas ve diğ, 2008). HA'nın ticari olarak kullanımı ise ilk kez 1942 yılında Endre Balazs tarafından unlu

mamüllerde yumurta akı yerine HA kullanmak için yapılan patent başvurusu ile gerçekleşmiştir. Hyaluronanın insanlar için ilk tıbbi uygulaması ise 1950'lerin sonlarında göz ameliyatı sırasında vitreus ikamesi olmuştur. Kullanılan hyaluronan ilk olarak insan göbek kordonundan (Meyer ve Palmer, 1934) ve kısa bir süre sonra da horoz ibiklerinden yüksek oranda saflaştırılmış ve yüksek moleküler ağırlıklı bir formda izole edilmiştir (Meyer ve Palmer, 1934). HA daha sonra birçok kaynaktan izole edilmiş ve fizikokimyasal yapı özellikleri ve biyolojik rolü çok sayıda laboratuvarında incelenmiştir (Necas ve diğ, 2008).

1.3 Hyaluronik Asidin Önemi ve Uygulama Alanları

HA, omurgalıların epitel, bağ ve sinir dokularında dağılan glikozaminoglikanlar (GAG) adı verilen bir grup heteropolisakkarite ait doğal ve dallanmamış bir polimerdir. Hyaluronik asit (HA), insan ve hayvanların tüm dokularında bulunmaktadır. HA, tüm türlerde ve tüm doku türlerinde aynı kimyasal yapıyı paylaşır. Hyaluronik asit biyouyumluluk, hidrofilisite, viskoelastisite, nem tutma kabiliyeti gibi biyolojik ve fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle ilaç salınımı, yara tedavisi, kozmetik ve doku mühendisliği gibi pek çok kullanım alanına sahiptir (Şekil 1.1) (Fallaraca ve diğ, 2018).

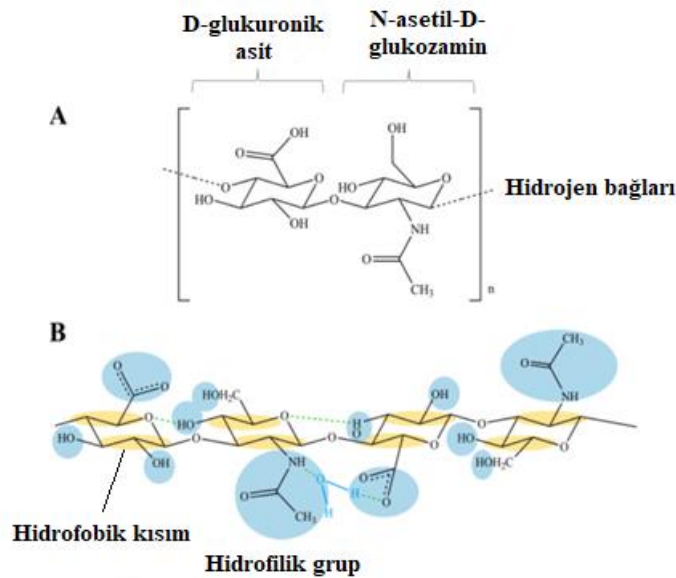


Şekil 1.1 Hyaluronik asit kullanım alanları (Fallaraca ve diğ, 2018)

1.4 Hyaluronik Asit Yapısı

1.4.1 Hyaluronik asidin kimyasal yapısı

Hyaluronik asit disakkarit bir yapıya sahiptir ve D-glukuronik asit ve D-N-asetil glukozamin şeker moleküllerinin sırasıyla β -1,4 ve β -1,3 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşur. Hyaluronik asit yapısına dair yapılan araştırmalar polar olmayan hidrofobik ve polar hidrofilik zincirlerden dolayı sarmal bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. HA'nın kimyasal yapısında hidrojen atomları polar olmayan özellikler gösterirken, yan zincirler polar özellikler gösterir (Şekil 1.2) (Buldağ, 2020; Fallaraca ve diğ, 2018). Ek olarak, HA çok yüksek bir moleküler ağırlığa (HMW, 10^8 Da) ulaşabilmektedir (Knopf-Marques ve diğ, 2016; Fraser ve diğ, 1997; Girish ve diğ, 2007). HA'nın yüksek moleküler ağırlığa sahip olması, fonksiyonları ve uygulama alanları açısından oldukça önemli bir parametredir. Bu özellik, HA'nın viskoelastik özelliğini ve nem tutma kabiliyetini arttırmaktadır. Bu sebeple HA oftalmoloji, ortopedi, kozmetik gibi alanlarda tercih edilen bir malzeme olarak öne çıkmaktadır (Armstrong, 1997).



Şekil 1.2 A: HA disakkarit biriminin kimyasal yapısı. B: Tetrasakkarit HA yapısı, hidrofilik fonksiyonel gruplar maviyle, hidrofobik kısımlar sarıyla ve hidrojen bağları yeşil kesikli çizgiyle gösterilmiştir (Fallaraca ve diğ, 2018).

1.4.2 Hyaluronik asidin çözelti yapısı

Fizyolojik bir çözeltide, bir hyaluronan molekülünün omurgası, disakkaritin kimyasal yapısı, iç hidrojen bağları ve çözücü ile etkileşimlerin bir kombinasyonu ile sertleştirilir. Hyaluronan çözeltileri çok sıra dışı reolojik özellikler gösterir ve aşırı derecede kaygan ve çok hidrofiliktir. Çözeltide hyaluronan polimer zinciri, genişletilmiş, rastgele bir bobin şeklini alır. Bu zincirler, olağandışı reolojik özelliklere katkıda bulunabilecek çok düşük konsantrasyonlarda birbirleriyle karışırlar. Daha yüksek konsantrasyonlarda, çözeltiler son derece yüksek ancak kaymaya bağlı viskoziteye sahiptir. %1'lik bir çözelti jöle gibidir, ancak basınç altına alındığında kolayca hareket eder ve küçük çaplı bir iğne ile uygulanabilir. Bu nedenle “yapay plastik” malzeme olarak adlandırılmıştır. Hyaluronan çözeltilerinin olağanüstü reolojik özellikleri, onları yağlayıcılar olarak ideal kılar. Hyaluronanın birbiri boyunca kayan doku yüzeylerinin çoğunu ayırdığına dair kanıtlar vardır. Bu arada hyaluronanın aşırı kayganlaştırıcı özelliklerinin, abdominal ve ortopedik cerrahiye takiben postoperatif adezyon oluşumunu azalttığı da gösterilmiştir (Cowman ve diğ, 2015).

1.5 Hyaluronik Asit Üretim Kaynakları

Günümüzde hyaluronik asit üretimi için kullanılan iki yöntem vardır. Bunlardan biri geleneksel hayvan dokularından ekstraksiyon yöntemidir. Hyaluronik asit, sığır gözlerinden ve horoz ibiklerinden elde edilir. Daha çok tercih edilen diğer bir yöntem ise bakteriyel fermantasyona dayanmaktadır. Gram-pozitif, grup A ve grup C Streptokoklar, HA içeren koruyucu kapsüller üretir. Alternatif olarak, rekombinant mikroorganizmalar, HA'nın moleküler ağırlığını ve verimini arttırmak için tasarlanmaktadır (Boeriu ve diğ, 2013). Biyomedikal ve kozmetik uygulamalarda HA içeren ürünlerin yarı ömrü önemli bir parametredir ve ürünün fizyolojik işlevini bozmadan uzun ömürlü olması istenir. Bu nedenle yarılanma ömrü daha uzun olan 1MDa (milyon Dalton) üzerinde yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asitler tercih edilmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı HA, hayvan dokusundan veya bakteriyel fermantasyondan üretilebilir (Şeki 1 1.3) (Grupta ve diğ, 2019).



Şekil 1.3 Hyaluronik asit üretim yöntemleri (Grupta ve diğ, 2019)

1.5.1 Hayvansal dokulardan hyaluronik asit ekstraksiyonu

Omurgalılarda gözün camsı gövdesi, horoz ibikleri, göbek kordonu, eklem sıvısı, domuz derisi, tavşan perikard sıvısı ve köpekbalıklarının kıkırdakları ve sığırların vitreus hümrü gibi hemen hemen tüm dokuları hyaluronik asit içerir. Horoz ibikleri, hayvan dokularından HA üretmek için geleneksel ekstraksiyon yönteminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle hayvan dokularında bulunan HA, yüksek moleküler ağırlığa ve yüksek konsantrasyona sahiptir. Örneğin, horoz ibiği gram başına 7,5 mg HA içermektedir (Selyanin ve diğ, 2015). Ekstraksiyon yöntemi ile HA üretiminde doku, nihai ürününe ulaşmak için homojenizasyon, ekstraksiyon ve saflaştırma gibi birkaç aşamadan geçer. Homojenizasyon ve ekstraksiyon işlemlerinde papain, pepsin, pronaz ve tripsin gibi enzimler kullanılır. Daha sonra negatif yüklü hyaluronik asit, setilpiridinyum klorür gibi pozitif yüklü yüzey aktif madde eklenerek çökeltir. Alternatif olarak çökeltme, organik çözücüler veya deterjanlarla yapılabilir (Schiraldi ve diğ, 2010). Son aşamada, safsızlıkları ve diğer kalıntıları gidermek için ultrafiltrasyon, steril filtrasyon ve kromatografi kullanılır. Nihai ürün toz, çözelti, lif veya granül formda olabilir (Gaffney ve diğ, 2009). HA'nın hayvan dokularından ekstraksiyonu yaygın olarak kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları ve sınırlamaları vardır. İlk olarak ekstraksiyon prosesi, zaman alıcı olduğundan ve büyük üretim tesisleri gerektirdiğinden, öğütme, asitle muamele ve tekrarlanan organik solvent ekstraksiyonu gibi farklı aşamalardaki zorluklardan dolayı teknik sınırlamalara

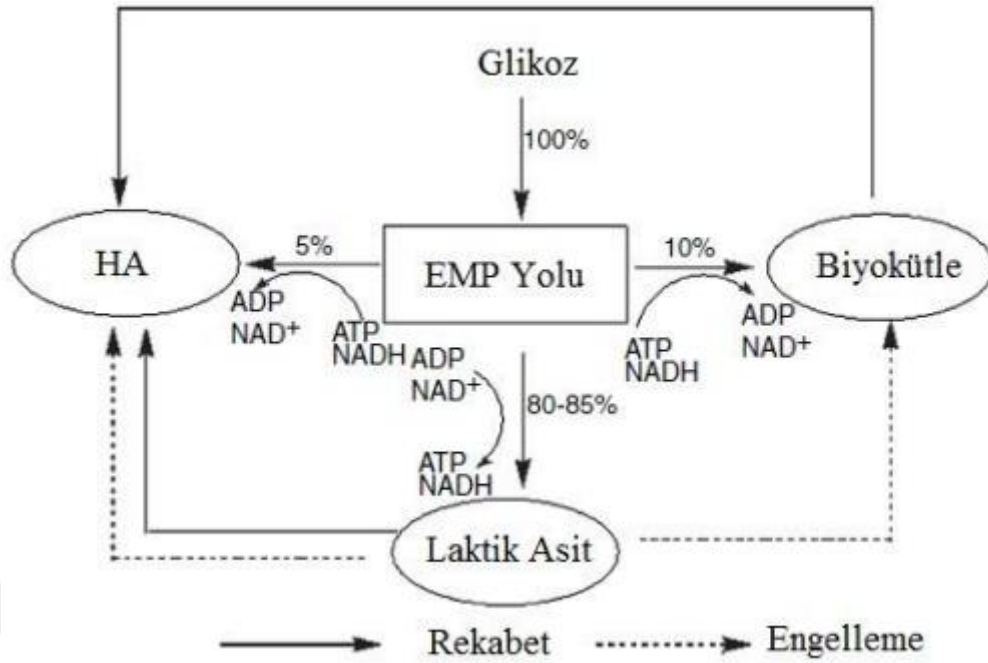
sahiptir. İkincisi, ekstraksiyon yöntemindeki kontrolsüz bozulma, verimi olumsuz etkiler ve hyaluronanın polidispersitesini artırır. Diğer bir problem ise üründe hücrel proteinlerin bulunmasıdır. Ayrıca hayvan dokusundan üretilen HA virüsler içerebileceğinden virüs istilası, safsızlıklar ve enflamatuar reaksiyonlar gibi potansiyel kontaminasyon riski vardır. Örneğin kuş gribi gibi hastalıklar türler arası viral enfeksiyon riski taşır (Selyanin ve diğ, 2015). Zaman alıcı ekstraksiyon prosesi, kontrolsüz bozulma ve kontaminasyon riski sebebiyle genellikle mikrobiyal HA üretimi tercih edilmektedir (Sze ve diğ, 2016).

1.5.2 Mikrobiyal kaynaklı hyaluronik asit üretimi

1960'lı yıllarda hayvan dokusundan üretilen hyaluronik asidin istenmeyen proteinler içerdiği ve insanlarda alerjik iltihaba neden olduğu tespit edildikten sonra mikrobiyal hyaluronik asit üretimi geliştirilmeye başlanmıştır. (Boeriu ve diğ, 2013). 1980'li yılların başından beri *S.equi* ve *S. zooepidemicus* gibi grup C streptokoklarından HA üretimi gerçekleştirilmektedir (Deangelis, 1996). HA üretiminde yaygın olarak kullanılan suş, uygun kültür koşulları altında 6-7 g/L HA üretebilen *S. zooepidemicus*'tur. (Liu ve diğ, 2011). Bunun yanı sıra *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Escherichia coli* ve *Lactococcus* gibi rekombinant mikroorganizmalar da mikrobiyal HA üretiminde kullanılmaktadır (Lych ve diğ, 2019). Günümüzde mikrobiyal HA üretimi için Streptokoklar veya güvenli rekombinant mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Boeriu ve diğerleri, 2013; Schiraldi ve diğerleri, 2010).

1.6 Biyosentetik Yolak

HA sentezinden *Streptococcus*'taki *has* operonunun ekspresyonu sorumludur. *has* operonu üzerinde *hasA*, *hasB* ve *hasC* genleri bulunur. Bu genler tarafından sırasıyla hyaluronat sentaz, UDP-glikoz dehidrojenaz ve UDP-glikoz pirofosforilaz enzimleri kodlanır (Yamada ve Kawasaki, 2005). Streptokokların laktik asit bakterileri olması sebebiyle, şeker kaynağının %90'ı bazı durumlarda homolaktik fermentasyonla laktata dönüştürülür. Karışık asit fermentasyonu ile format, asetat ve etanol üretilir. Hyaluronik asit sentezinde kullanılan öncüler peptidoglikan, teikoik asit ve antijenik duvar polisakkaritlerinin oluşumu için yapısal bileşenlerini sağlayarak hücre büyümesinde görev alır. Bu yüzden HA sentezi ve hücre büyümesi arasında bir rekabet söz konusudur (Chong, 2005; Pires, 2010).



Şekil 1.4 Streptokoklarda HA için biyosentetik yolak (Girgin, 2019)

1.7 Bakteri Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretiminde Fermantasyon Stratejileri

Bakteri kaynaklı hyaluronik asit üretiminde bakteri seçimi, besiyeri tercihi ve fermantasyon koşullarının optimizasyonu oldukça önemlidir. Hyaluronik asit üretiminde üretimi etkileyen parametreler ile ilgili farklı bakteri suşları ile pek çok çalışma yapılmış ve çalışma sonuçları incelenip rapor edilmiştir. A grubu hemolitik streptokoklardan ilk olarak yaklaşık 100 mg/L HA elde edilmiştir (Holmström, 1967). Bakteri fermantasyonu ile hyaluronan üretimi, 20. yüzyılın son yirmi yılında olgun bir teknolojiye dönüşmüştür. A ve C grubu streptokoklar ile HA verimini ve kalitesini artırmak için kültür ortamı ve yetiştirme koşullarının optimizasyonu kullanılarak fermantasyon yoluyla üretilen HA miktarı 6-7 g/L'ye çıkmıştır (Boeriu ve diğ, 2013).

1.7.1 Bakteri türü seçimi

Pasteurella multocida ve Gram pozitif *Streptococcus* Grup A ve C gibi bazı bakteriyel patojenler HA zincirleri üretebilir ve salgılayabilir (Oliveira ve diğ, 2016). Streptokoklar, büyük bir hücre dışı kapsülle çevrili büyüme özelliğine sahip, spor oluşturmeyen ve hareket etmeyen Gram pozitif bakterilerdir (Yamada ve Kawasaki, 2005). *Streptococci*'nin çeşitli vahşi tip suşları, *Streptococcus equisimilis*, *S. pyogenes* ve *S. uberis* gibi HA üretebilir. Ancak bunlar arasında *Streptococcus equi* subsp. *equi*

ve *S. equi* subsp *zooepidemicus* yaygın olarak kullanılanlardır (Oliveira ve diğ, 2016). Bu nedenlerle bu çalışmada da *S. zooepidemicus* kullanılmıştır.

1.7.2 Besiyeri tercihi

Bakteriyel kaynaklı HA üretiminde, besiyeri tercihi hem Streptokokların gelişimi hem de HA sentezi için oldukça önemlidir. Bu nedenle tercih edilen besiyeri gerekli temel bileşimlerden oluşmalıdır. Genel olarak, *Streptococcus* cinsine ait bir mikroorganizmayı inkübe etmek için besiyeri ortamı, eser elementlerden bir karbon kaynağı, bir nitrojen kaynağı, bir inorganik tuzdan oluşur. Karbon kaynağı olarak nişasta, glikoz, sükroz ve galaktoz kullanılabilir (Park ve diğ, 1996). Azot kaynağı olarak ise amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, kasamino asit, maya özü, pepton, tripton vb. kullanılabilir (Park ve diğ, 1996). Karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu meyvesini içeren fermentasyon ortamının kullanıldığı bir tez çalışmasında optimum besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 2.60 g/L hyaluronik asit üretilmiştir (Özcan, 2020). Literatürde yer alan başka bir çalışmada üretim ortamında, glikoz yerine sükroz, fruktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, nişasta ve galaktoz olmak üzere yedi farklı karbon kaynağı kullanılmış ve fruktozun (658 mg/L) umut verici olduğu bulunmuştur (Kotra ve diğ, 2013).

1.7.3 Üretim koşulları

Kültür koşulları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı) mikrobiyal HA üretimini önemli ölçüde etkiler (Liu ve diğ, 2011). Bunun yanı sıra doğru bakteri ve besiyeri seçimi de HA verimi üzerinde etkilidir. HA üretimi için uygun bir süreç geliştirmek ekonomik açıdan büyük önem taşır. Uygun besiyerini kullanmak ve kültür koşullarının optimizasyonu HA moleküler ağırlığını yükselterek verim artışı sağlayabilecektir (Chen ve diğ, 2009).

1.7.3.1 Fermentasyon yöntemleri

HA üretimi için kesikli, kesikli beslemeli ve sürekli fermentasyon yöntemleri kullanılmaktadır. HA üretimi için yaygın olarak kesikli fermentasyon yöntemi tercih edilir. Kesikli fermentasyon kültür ortamında, fermentasyon sırasında başlangıçta kullanılan ortama yeni besin bileşenlerinin eklenmediği ve ortamdan da uzaklaştırma yapılmadığı kültivasyon işlemi olarak tanımlanır (Karasu, 2021). Literatürde farklı proses türleri ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Proses türleri için literatürdeki

alışmalar incelendiğinde kesikli kültür çalışmasında yarı kesikli ve sürekli proseslere göre en yüksek düzeyde verimliliğin elde edildiği belirlenmiştir. (Liu ve diğ, 2008a). *S. zooepidemicus* ile HA retimi gerçekleştirilen bir çalışmada kesikli kültür ve yarı kesikli prosesin kombinasyonu kullanılmış ve HA üretiminin %32 oranında arttığı belirtilmiştir (Liu ve diğ, 2008c). Bu nedenlerle bu çalışmada kesikli fermantasyon yöntemi uygulanmıştır.

1.7.3.2 pH

Fermantasyonla HA retimi sırasında laktik asitten kaynaklanan karboksilik asitlerin ortamda birikmesi sebebiyle üretim süreci boyunca pH değerinde düşüş gözlenmektedir. pH değerinde görülen düşüş, mikrobiyal biyokütleyi ve HA üretimini olumsuz etkilemektedir. pH değerini optimum değerlere ayarlayarak HA üretimini arttırmak mümkündür (Lu ve diğ, 2016; Liu ve diğ, 2011). Anaerobik koşullarda *S. zooepidemicus* ile yapılan bir çalışmada HA retimi için optimum pH değeri $6,7\pm0,2$ olarak belirtilmiştir (Johns ve diğ, 1994). *S. zooepidemicus* ile HA üretiminin incelendiği başka bir çalışmada optimum pH değeri 7 olarak belirlenmiştir (Johns ve diğ, 1994; Kim ve diğ, 1996). Literatürde yer alan bir tez çalışmasında *S. zooepidemicus* ile HA retiminde pH 6,5 ve 7 değerlerinde pH 8 değerine göre daha fazla HA elde edilmiştir (Girgin, 2019). Bu nedenlerle bu çalışmada 6,5 pH değerinde fermantasyon gerçekleştirilmiştir.

1.7.3.3 Karıştırma hızı

Bakteri kaynaklı HA retimi viskoz bir işlemdir. Bu nedenle fermantasyon ortamının karıştırılması HA retim sürecine önemli ölçüde etki etmektedir. Karıştırma hızının yükseldiği durumlarda yüksek karıştırma hızı sonucunda ortamdaki hücrelerin parçalanması ile HA retiminde bir miktar düşüş yaşanmaktadır (Hasegawa ve diğ, 1999). *S. zooepidemicus* ile HA retimi için yapılan bir çalışmada karıştırma hızı 200 rpm olarak kullanılmıştır (Liu ve diğ, 2009). *S. zooepidemicus* ile yapılan başka bir çalışmada üç farklı karıştırma hızında (100 rpm, 150 rpm, 200 rpm) alışılmış ve optimum değer 100 rpm olarak belirlenmiştir (Pan ve diğ, 2015). Bu çalışmada 150 rpm karıştırma hızında fermantasyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

1.7.3.4 Sıcaklık

Hücre içi enzimlerin mikroorganizmalardaki katalitik aktivitesi esas olarak sıcaklık tarafından belirlenir ve sıcaklık değişiminin mikrobiyal büyüme ve ürün sentezi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Optimum sıcaklık ile enzimler yüksek oranda çalışır ve mikroorganizmaların maksimum büyümesini sağlar (Liu ve diğ, 2018). Sıcaklık değişiminin mikrobiyal büyüme ve ürün sentezine etkisi sebebiyle literatürde optimum sıcaklık değerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Sıcaklığın HA üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *S. zooepidemicus* ATCC 39920 kullanılmış ve sıcaklık 34°C, 37°C ve 40°C değerlerinde tutulmuştur. Çalışmanın sonunda optimum sıcaklık değeri 37 °C olarak belirtilmiş ve 0.787 g/L HA elde edilmiştir. 40 °C değerine çıktığında ise HA üretim miktarı azalmıştır (Pan ve diğ, 2015). *S. zooepidemicus* kullanılarak 2.5 L fermantasyon hacminde yapılan bir çalışmada sıcaklık değeri 37°C'den 30°C'ye düşürülmüş ve bakteri büyüme hızının düştüğü belirtilmiştir (Jagannath ve Ramachandran, 2010). *S. zooepidemicus* ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada sıcaklık değerlerinin 35°C ve 37°C olduğu şartlarda HA üretiminin 32°C ve 40°C'ye kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En yüksek HA üretiminin ise 37°C'de olduğu belirlenmiştir (Girgin, 2019).

1.7.3.5 Çözünmüş oksijen

Fermantasyon ortamı viskoz bir karışım olduğu için ihtiyaç duyulan oksijenin alımı zorlaşmaktadır. Bu nedenle süreç boyunca çözünmüş oksijen konsantrasyonu önemli bir parametredir (Duan ve diğ, 2008). Oksijen transferinin HA üretiminde önemli rol aldığı yapılan çalışmalarla da belirtilmiştir (Oliveira ve diğ, 2016; Huang ve diğ, 2006). *S. zooepidemicus* (ATCC 39920) ile HA üretimine çözünmüş oksijen miktarının etkisinin incelendiği bir çalışmada çözünmüş oksijen konsantrasyonunun kritik değerinin %5 olduğu belirlenmiş ve HA üretiminin bu değerin altında olumsuz etkilendiği belirtilmiştir (Oliveira ve diğ, 2016). 2 L çalışma hacminde gerçekleştirilen başka bir çalışmada çözünmüş oksijen konsantrasyonu %50 olduğunda maksimum HA üretimi elde edilmiştir (Huang ve diğ, 2006).

1.8 Karbon Kaynağı Olarak *I. batatas*

Mikroorganizmalar (mayalar, küfler veya bakteriler), asitler, gazlar, alkol veya başka bir şey gibi yeni organik bileşikler üretmek için şekeri kullanır. Bu metabolik sürece “fermantasyon” denir. Kullanılan fermentasyon sisteminden bağımsız olarak, mikroorganizmalar enerji elde etmek ve organik bileşikler üretmek için büyük ve küçük beslenmeye ihtiyaç duyarlar. Karbon ve nitrojen kaynakları temel beslenme gereksinimleri olarak sınıflandırılabilir. Mikroorganizmalar enerji elde etmek için karbon kaynaklarına ve hücre materyalleri ve bileşenleri üretmek için nitrojen kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Ancak endüstriyel fermentasyon prosesleri için ekonomik olarak etkili değildir. Bu nedenle yüksek miktarda HA elde etmeyi mümkün kılan farklı karbon kaynakları kullanılır (Yatmaz ve Turhan, 2018).

Ucuz ve kolay bulunabilen bir tarım ürünü olan *I. batatas*, endüstriyel fermentasyon için uygun bir hammadde olan büyük miktarda nişasta içerir (Wu ve diğ, 2009). Tatlı patates posasının kuru ağırlığı %43,5 nişastadan oluşur (Takamine ve diğ, 2019). Tatlı patates kökünde ise kuru maddenin yaklaşık %80'ini nişasta oluşturmaktadır (Wang ve diğ, 2016). *S. zooepidemicus* ile yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak nişasta ile ortam geliştirilmiş ve HA konsantrasyonunun 6,7 g/L'ye ulaştığı görülmüştür (Zhang ve diğ, 2006). Bu nedenle *I. batatas* ekstratı kullanımının yüksek miktarda HA elde etmek için umut verici olabileceği düşünülmüştür. Bu sayede daha düşük maliyet ile daha yüksek miktarda HA üretilebilir.

1.9 Üridin İlavesi

Hyaluronik asit ve glikozaminoglikanlar, amino şekerlerin biyosentetik yolundaki mukopolisakkaritlerin biyosentezi yoluyla sentezlenir. Hyaluronik asit ve glikozaminoglikan, ham madde olarak glikoz veya glikojen kullanılarak bir dizi metabolik işlemle sentezlenir. UTP'nin bir molekülü sentez yolunda kullanılır ve UTP şeker türevlerinin biyosentezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada mukopolisakkarit sentezini artırmak için UTP sentezi kaynağı olarak urasil, üridin, UMP, UDP ve üridin türevlerinin kullanılabileceği rapor edilmiştir (Park ve Hangyul, 2011).

1.10 Hyaluronik Asit Miktar Analizi

Üronik asitlerin karbazol ile reaksiyonu (Bitter & Muir, 1962), çeşitli organ ve dokulardan ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sırasında polisakkaritlerin ve proteoglikanların tahmin edilmesi için en tatmin edici yöntemlerden biridir (Cesaretti ve diğ, 2003). Yaygın olarak kullanılan karbazol metodunda temel prensip karbonhidratların H_2SO_4 veya HCl ile muamele edilip karbazol ile reaksiyona girerek renk vermesidir (Song ve diğ, 2009).

1.11 Hipotez

Yokluk hipotezi: H_0 : Üridin ilaveli glikoz yada üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktının kullanımının mikrobiyal HA üretim veriminde bir fark yoktur.

Alternatif Hipotez: Üridin ilaveli glikoz yada üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktının kullanımının mikrobiyal HA üretim veriminde bir fark vardır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Bakteri kültürü

Bu çalışmada HA üretimini incelemek amacıyla Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilen ve üniversite stoğunda bulunan *Streptococcus zooepidemicus* bakterisi kullanılmıştır.

2.1.2 Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Kimyasallar

Malzeme	Marka	Katalog Numarası
Glikoz	Applichem	A1422
Maya özütü	Merck	1.03753.0500
Potasyum dihidrojen fosfat(KH_2PO_4)	Merck	1.04873.1000
Magneyum sülfat hepta hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck	1.05886.0500
Sodyum Hidroksit(NaOH)	Merck	1.37041
Hidroklorik sit(HCl)	Merck	1.09058
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	1.06404.1000
Beyin kalp infüzyon agar	Merck	1.13825.0500
Beyin kalp infüzyon brot	Merck	1.104.930.500
Sülfirik asit (H_2SO_4)	Merck	M112080
Etil alkol	ISOLAB	920.027
Sodyum dodesil sülfat	Sigma	71725
Sodyum tetraborat	Sigma	221732
Carbazol	Sigma	C5132

2.1.3 Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar Çizgelde 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Cihazlar

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

2.1.4 Besiyerleri

Tez çalışmasında streptokok suşunun aktivasyonu ve muhafazası için Beyin Kalp İnfüzyon brot besiyeri (BHI) (Merck) ve BHI agar (Merck) kullanılmıştır.

2.2 Metod

2.2.1 *S. zooepidemicus* aktif hale getirilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan bakteri, -80°C’de derin dondurucuda stoklanan *Streptococcus zooepidemicus* kültürlerinden alınarak çoğaltılmıştır. Aktifleşen *S. zooepidemicus* deney süresince kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir. +4°C’de muhafaza edilen *S. zooepidemicus* suşu çalışmada kullanılmak üzere otokavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilen BHI agara transfer edilip 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

2.2.2 İnokulasyon ortamının hazırlanması

İnokulasyon ortamı olarak 25 mL BHI Agar, 120°C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. BHI agar üzerinde gelişen *S. zooepidemicus* tek koloni alınıp steril platin öze ile sıvı besiyerine transfer edilmiştir. Erlen çalkalayıcı inkübatörde 150 rpm’de 24°C’de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

2.2.3 Biyoreaktörde üretim

Organizmalar tipik olarak maya veya hayvan özü, pepton ve serum içeren karmaşık büyüme ortamlarının bir karışımı üzerinde büyütülür. *S. zooepidemicus* metabolizmasını incelemek amacıyla, konsantrasyonları bilinen chemically defined medium (CDM) glikoz, vitaminleri, eser elementleri ve aminoasitleri içermelidir. Bu çalışma *S. zooepidemicus* suşu ile HA üretimi için yapılan bir tez çalışmasına ait bulgular doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Girgin, 2019). Tez çalışma kapsamında karbon kaynağı olarak büyük miktarda nişasta içermesi sebebiyle endüstriyel fermantasyon için uygun bir hammadde olan *I. batatas* ekstraktı kullanılmıştır (Wu ve diğ., 2009). Buna ek olarak ortamda üridin eklenmesinin de HA verimine etkisi incelenmiştir (Park ve Hangyul, 2011). *I. batatas* ekstraktı, maya ekstratı, MgSO₄.7H₂O ve üridin çözeltisi ayrı ayrı otoklavlanarak stok çözeltiler hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3 Fermantasyon besiyeri bileşimi (1 L için)

Malzeme	Çalışılan Miktar
<i>I. batatas</i> ekstraktı (tatlı patates)	21 g/L
Maya ekstratı	10 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
NaCl	2,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/L
Üridin çözeltisi	2,5 mL

Ayrı ayrı otovklanan malzemeler biyogüvenlik kabini içerisinde birleştirilmiş ve 200 mL besiyeri oluşturulmuştur. Steril fermantasyon besiyeri (200 mL) steril biyoreaktöre biyogüvenlik kabini içerisinde aktarılmıştır. Biyoreaktörde kullanılacak olan çözünmüş oksijen ve pH problemleri de önce etil alkole maruz bırakılmış ve ardından otovklanmış saf su ile durulanarak steril hale getirilmiştir. Fermantasyon biyomühendislik laboratuvarında bulunan dörtlü fermantasyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kesikli fermantasyon kullanılmış ve pH 6,5 değerinde sıcaklık ise 37 °C’de sabit tutulmuştur. Fermentasyon süresince optimal O₂ seviyesi ise %20 doymuşluğun üstünde tutulmuştur

2.2.4 *I. batatas* ekstraktının hazırlanması

I. batatas ekstraktının hazırlanması için Pham ve arkadaşları tarafından uygulanan protokol minör değişikliklerle yapılmıştır (Pham ve diğ., 2019). Önce tatlı patatesler yerel marketten temin edilmiş ve yıkanmıştır. Yıkanan patatesler ince çubuklar halinde kesilmiş ve mikrodalgada 400 W ile 30 dakika kurutulmuştur. Kurutma aşamasının ardından *I. batatas* blender yardımıyla toz haline getirilmiş ve elekten geçirilmiştir. Çalışmada kullanılacak ekstrakt belirlenen konsantrasyon değerlerine göre hazırlanarak otovklanmıştır. Çözelti biyogüvenlik kabini içerisinde steril filtre kağıdı ile filtre edilerek fermentasyon besiyeri bileşiminde kullanılmıştır.

2.2.5 *I. batatas* ekstrakt oranının belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında 0,1, 1, 8, 10, 13, 21 ve 30 g/L *I. batatas* ekstrakt konsantrasyonları kullanılmıştır. *S. zooepidemicus* ile HA üretimi için yapılan bir tez çalışması doğrultusunda fermantasyon süresi 5 saat olarak gerçekleştirilmiştir (Girgin, 2019). Beşinci saat sonunda sistemden numune alınmış ve en fazla HA elde edilen *I.*

batatas ekstraksiyonu oranı ekleme miktarı belirlenerek takip eden çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2.6 Üridin oranının belirlenmesi

Optimum üridin değerini belirlemek için yapılan çalışmalarda 1 L besiyeri bileşimi için 0,75, 1,5, 2,5, 4,25 ve 6,75 mL üridin ilaveleri kullanılarak HA üretimi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan üridin ilavesi için stok çözelti hazırlanmıştır. 4 gr üridin, 50 mL saf su ile tamamlanarak çözelti haline getirilmiş ve 0,2 µm filtre ile sterilize edilmiştir.

2.2.7 Fermantasyon süresinin belirlenmesi

Optimal *I. batatas* ekstrakt oranının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda fermantasyon süresi 5 saat olarak gerçekleştirilerek, üretilen HA miktarları karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak HA üretimi için zamana yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Dokuz saatlik fermantasyon çalışması gerçekleştirilmiş olup her saat başı numune alınarak 550 nm’de absorban ölçümleri yapılarak HA standart eğrisi ile elde edilen HA miktarları belirlenmiştir. Çalışmada *I. batatas* ekstraktı, üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı, glikoz ve üridin ilaveli glikoz kullanılmıştır. *I. batatas* ekstraktı ve glikoz konsantrasyonları 21 g/L olarak kullanılmıştır. Üridin ilavesi 1 L besiyeri ortamı için 2,5 mL olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, saat başı toplam HA üretimi istatistiksel olarak karşılaştırılarak optimum fermentasyon süresi belirlenmiştir.

2.2.8 Glikoz ile HA üretimi

I. batatas ekstraktı ve üridinin optimum değer belirlenmesinin ardından HA üretimine etkisini değerlendirmek için kontrol grubunda glikoz ile HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Üridin ilaveli glikoz kullanımıyla elde edilen HA miktarı ile üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımıyla elde edilen HA miktarı karşılaştırılmıştır.

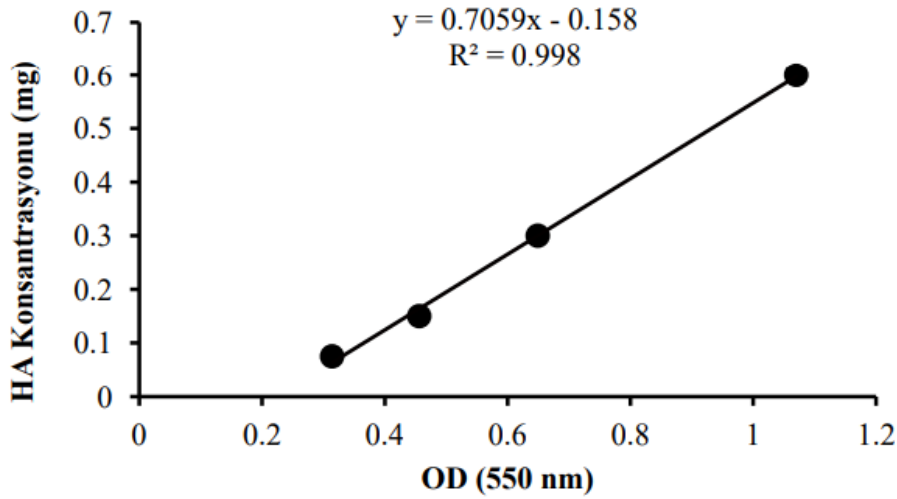
2.2.9 Fermantasyon süresince bakteri sayısının belirlenmesi

Yapılan fermantasyon uygulamalarında bakteri sayılarını belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Fermantasyon süresi sonlarında alınan bakteri sayısının belirlemek için seri dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Her fermentör örneğinden 100 µl alınarak 900 µl BHI brot içerisine aktarılmıştır. (1:9) oranında seyreltilerek 10^{-5} ’e kadar dilüsyon devam ettirilmiştir. Deney gruplarında oluşan bakteri sayısına göre 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5}

dilüsyonlardan alınıp BHI agar içeren petrilere 3 tekrarlı olarak ekimler yapılmıştır. Petri kapları 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.10 Karbazol metoduyla HA miktar tayini

Bu çalışmada HA miktarını belirlemek için Bitter ve Muir tarafından çalışması yapılan karbazol yöntemi modifiye olarak kullanılmıştır (Bitter ve Muir, 1962, Girgin 2019). Fermantasyon süreci sonunda alınan numunelerden HA miktar tayini gerçekleştirilmiştir. HA miktarını hesaplamak için literatürde yer alan *S. zooepidemicus* ile HA üretimine yönelik yapılan bir tez çalışmasında elde edilen HA standart eğrisi kullanılmıştır. Deney sırasında Şekil 2.1’de gösterilen bu standart eğri kullanılarak HA miktarları belirlenmiştir (Girgin, 2019).



Şekil 2.1 HA standart eğrisi (Girgin, 2019)

Karbazol yöntemi için fermantasyon sürecinin sonunda örnek alma aparatı ile alınan numunelerden 1 mL alınmış ve hacimce (1:1) oranında %0,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenmiştir. SDS eklenen numuneler 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatantlar alınıp üzerlerine hacimce (1:3) oranında etil alkol eklenerek 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar uzaklaştırılmış ve geriye kalan pelletler otovklanmış saf suda çözdürülmüştür. Ekstrasyon sonucu elde edilen örneklerden 25 µl alınarak üzerine 150 µl 25 mM sodyum tetraborat çözeltisi eklenmiştir. Ardından numuneler 100°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelen örneklerin üzerlerine %0,125' lik karbazol çözeltisi ilave edilip 100°C'de 15

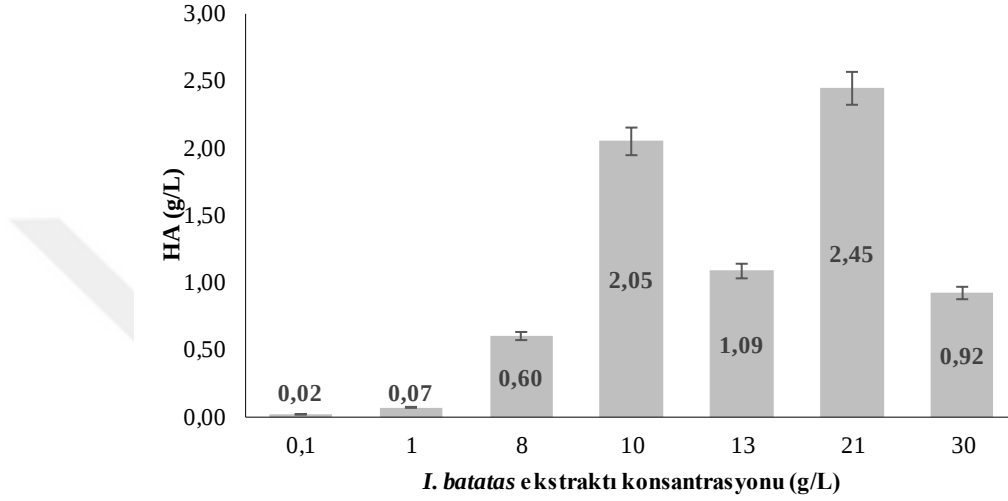
dakika bekletilmiştir. İşlem sonunda örneklerin oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiş ve soğuduktan sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Ölçüm işlemi için örneklerin 550 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen HA miktarı için HA standart eğrisi kullanılmıştır. Her bir fermantasyon numunesi üç tekrarlı olarak ölçülmüştür.



3. BULGULAR

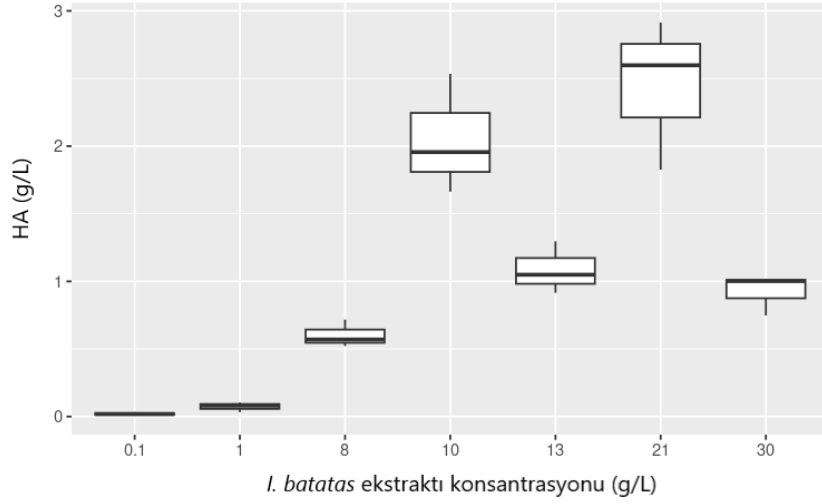
3.1 HA Üretimi İçin *I. batatas* Ekstraktı Oranının Belirlenmesi

Fermantasyonla HA üretiminde *I. batatas* ekstraktı etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı oranlarda *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonu kullanılmış ve fermantasyon uygulaması ile üretilen HA miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonlarında mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

En fazla HA üretimi (2,45 g/L) 21 g/L *I. batatas* ekstraktı kullanımında elde edilmiş ve 30 g/L konsantrasyon değerinde tekrar düşme şeklinde bir eğilim göstermiştir (Şekil 3.1).

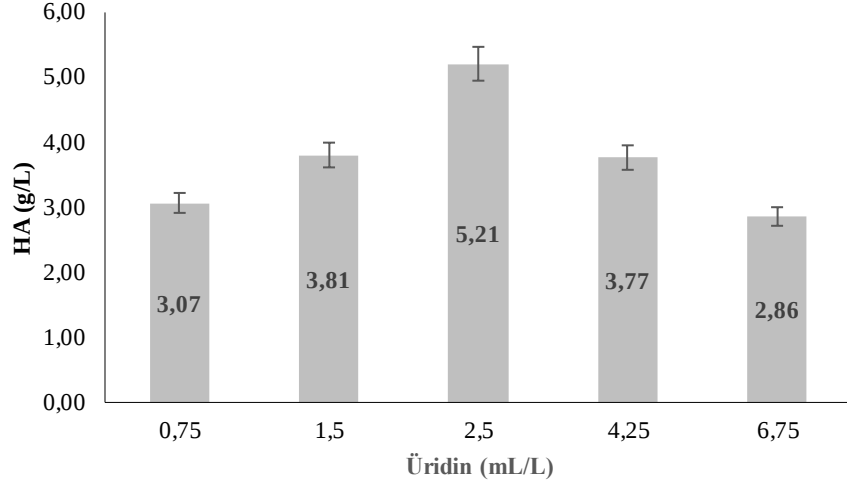


Şekil 3.2 Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonlarında mikrobiyal HA üretiminin R programında kutu grafiğinde gösterimi

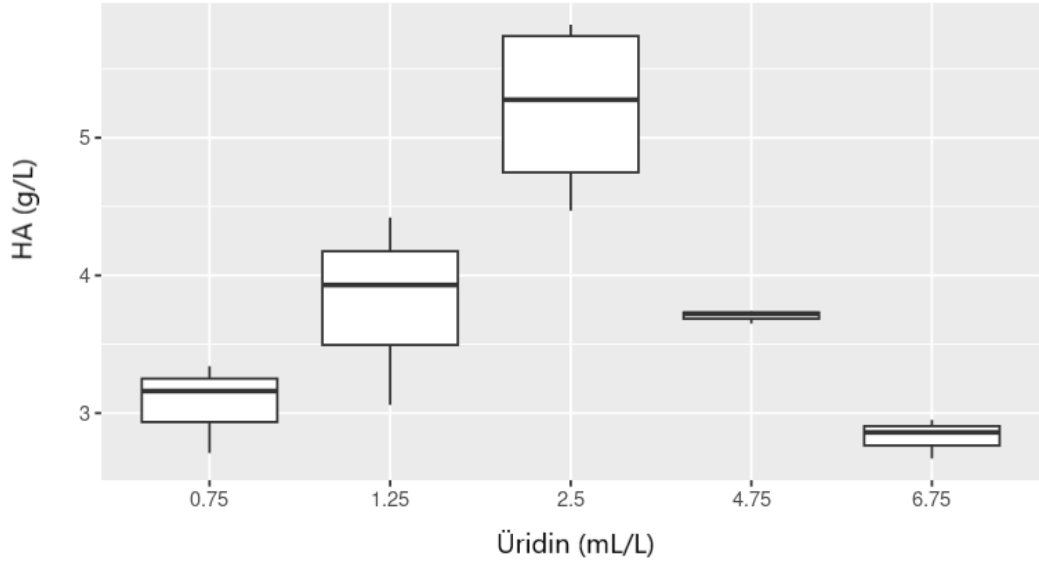
Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonlarında mikrobiyal HA üretimi R programında kutu grafiğinde de gösterilmiştir (Şekil 3.2). *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonlarına göre mikrobiyal HA üretiminin gösterildiği kutu grafiğinde gruplar arasında fark olduğu görülmektedir.

3.2 HA Üretiminde Kullanılacak Üridin Oranının Belirlenmesi

Fermantasyonla HA üretiminde üridin etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı oranların kullanılması sonucu elde edilen en fazla HA miktarı (5,21 g/L) 2,5 mL/L üridin ilavesinde elde edilmiştir. Ancak 2,5 mL üzerinde kullanılan oranlarda tekrar düşme eğilimi görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Farklı üridin oranlarında mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

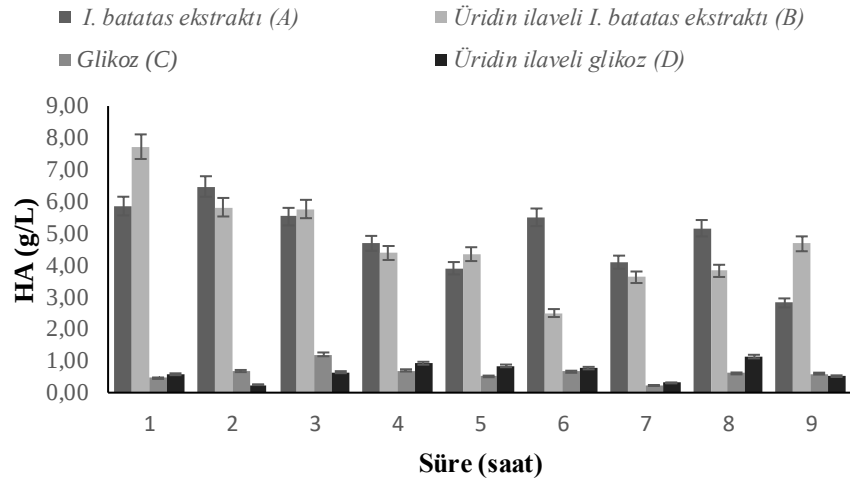


Şekil 3.4 Farklı üridin oranlarında mikrobiyal HA üretiminin R programında kutu grafiğinde gösterimi

Farklı üridin oranlarında mikrobiyal HA üretimi R programında kutu grafiğinde de gösterilmiştir (Şekil 3.4). Üridin oranlarına göre mikrobiyal HA üretiminin gösterildiği kutu grafiğinde gruplar arasında fark olduğu gözlenmiştir.

3.3 Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi

Fermantasyonla HA üretiminde süreye yönelik yapılan çalışmada *I. batatas* ekstraktı, üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı, glikoz ve üridin ilaveli glikoz kullanımıyla 9 saat boyunca elde edilen HA miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.5).

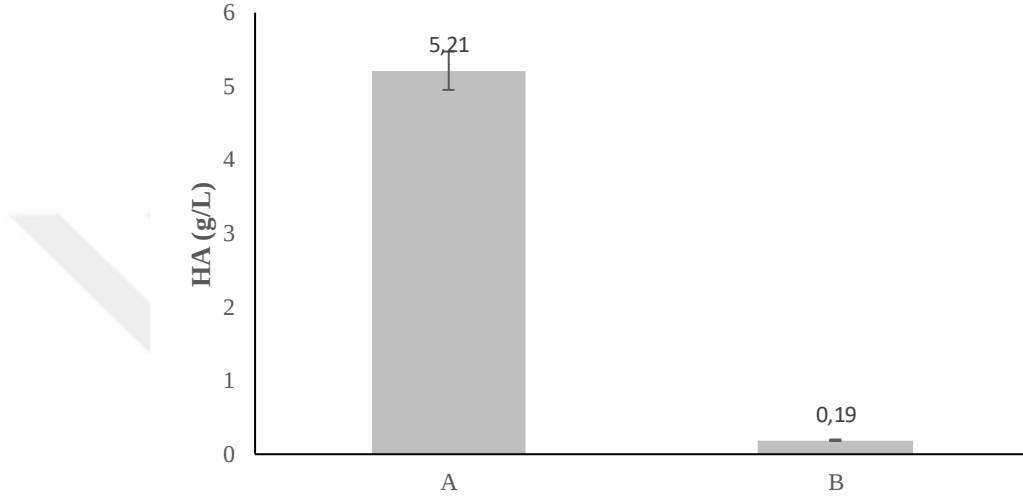


Şekil 3.5 Dokuz saat boyunca mikrobiyal HA üretimi (Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

I. batatas ve üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımı ile gerçekleştirilen fermantasyon uygulamasında saat başı üretilen HA miktarlarında 2. saatten itibaren azalma görülmüştür. Glikoz ile yapılan fermantasyon uygulamasında ise 3. saatte en yüksek HA üretimi (1,2 g/L) görülmüş daha sonra üretilen HA miktarlarında azalma gözlenmiştir. Üridin ilaveli glikoz kullanımında gerçekleştirilen fermantasyon uygulamasında en yüksek HA üretimi (1,13 g/L) 8. saatte görülmüştür. Saat başı üretilen HA miktarları parametrik olmayan test ile karşılaştırılmıştır. A grubunda saat başı üretilen HA miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$). B grubunda saat başı üretilen HA miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$). C grubunda saat başı üretilen HA miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$). D grubunda saat başı üretilen HA miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$).

3.4 Glikoz İle Hyaluronik Asit Üretimi

I. batatas ekstraktı kullanımıyla HA üretimini karşılaştırmak için kontrol grubu olarak glikoz ile HA üretimi yapılmıştır. Fermantasyon sürecinin sonunda alınan örnek numunelerin karbazol yöntemiyle absorbans ölçümleri yapılarak HA standart eğrisi ile üretilen HA miktarı hesaplanmıştır. Üretimde 21 g/L glikoz ve 2,5 mL/L üridin ilavesi kullanılmıştır.

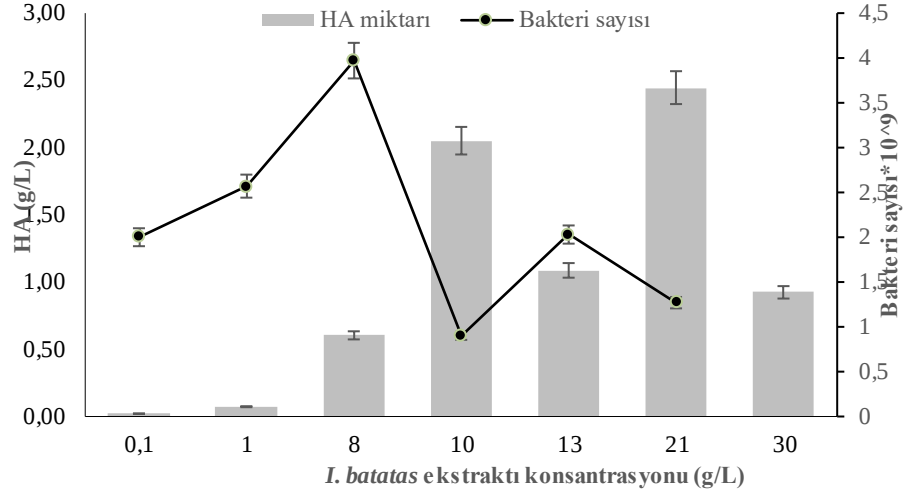


Şekil 3.6 *I. batatas* ekstraktı ve glikoz kullanımında üridin ilavesi ile mikrobiyal HA üretimi(A: Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. n = 4 tekrarlı çalışılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

Dört tekrarlı yapılan çalışmada üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında daha yüksek HA miktarı elde edilmiştir (Şekil 3.6). Dört tekrarlı çalışma ile elde edilen verilerin ortalaması alındığında üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında 5,21 g/L HA elde edilirken üridin ilaveli glikoz kullanımında 0,19 g/L HA elde edilmiştir. Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ve glikoz kullanımı ile elde edilen HA miktarları parametrik olmayan test ile karşılaştırılmış ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir (Mann Whitney U Test, P=0,02857).

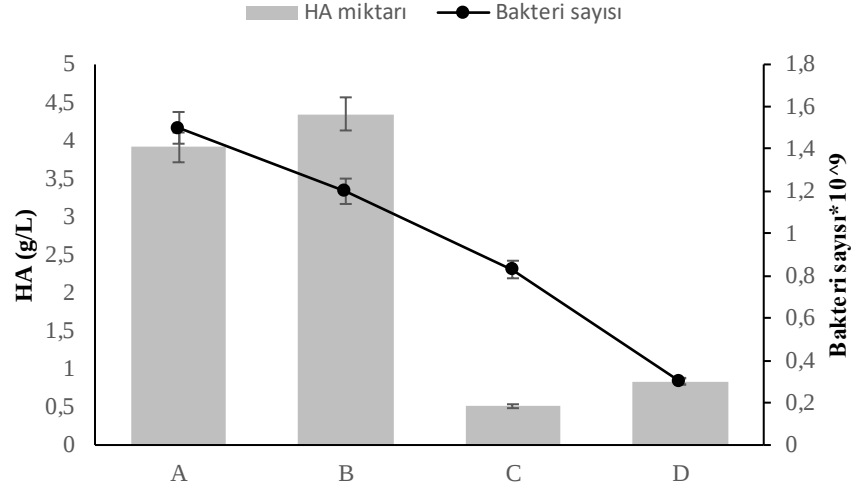
3.5 Fermantasyon Süresince Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Tez çalışması boyunca fermantasyon süreci sonunda alınan örnek numuneler ile seri dilüsyon yöntemi yapılarak bakteri sayısına bakılmıştır. HA üretiminde optimum *I. batatas* ekstraksiyonu oranı için yapılan çalışmalarda 5. saatte alınan numuneler ile 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlardan yapılan ekimler 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra agar üzerinde oluşan koloniler sayılmıştır.



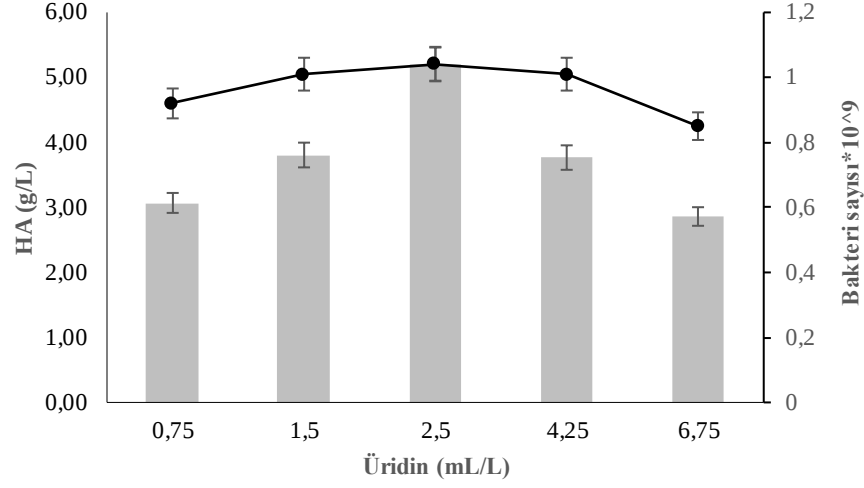
Şekil 3.7 Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonlarında oluşan bakteri sayısı ve mikrobiyal HA üretimi (Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonu ile yapılan fermantasyon uygulamasında 8 g/L *I. batatas* ekstraktı kullanımına kadar bakteri sayısında artış gözlenmiş ancak 10 g/L ve 21 g/L *I. batatas* ekstraktı kullanımında bakteri sayısında azalma görülmüştür. En düşük bakteri sayısı 21 g/L *I. batatas* ekstraktı kullanımında elde edilmiştir. Ancak en yüksek HA üretimi ise 21 g/L *I. batatas* ekstraktı kullanımında gerçekleşmiştir (Şekil 3.7). Farklı *I. batatas* ekstraktı konsantrasyonunda üretilen HA miktarı ve oluşan bakteri sayısı arasındaki ilişki istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür (Regrasyon analizi, $P=0,1657$). Tez çalışması kapsamında 30 g/L *I. batatas* ekstraktı ile yapılan fermantasyon süreci sonunda alınan örneklerden yapılan ekimlerden sonra iç içe girmiş kolonilerin varlığı gözlenmiştir. Bu nedenle bakteriler sayılamamıştır.



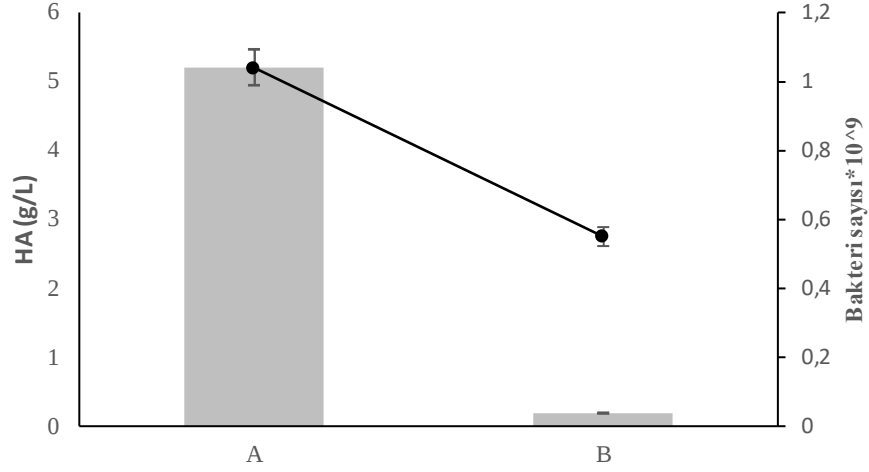
Şekil 3.8 Süreye yönelik yapılan çalışmada 5. saatte oluşan bakteri sayıları ve mikrobiyal HA üretimi (A: *I. batatas* ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında HA üretimi, C: Glikoz kullanımında HA üretimi, D: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

Süreye yönelik yapılan çalışmada 5. saatte alınan numuneler ile ekimler yapılarak oluşan koloniler sayılmıştır. *I. batatas* ekstraktı kullanımı ile yapılan fermantasyon uygulamasında en yüksek bakteri sayısı gözlenirken üridin ilaveli glikoz ile yapılan fermantasyon uygulamasında en düşük bakteri sayısı gözlenmiştir (Şekil 3.8). *I. batatas* ekstraktı ve glikoz ile yapılan fermantasyon uygulamalarında da üridin ilavesiyle oluşan bakteri sayısında azalma, elde edilen HA miktarında ise artma eğilimi gözlenmiştir.



Şekil 3.9 Farklı değerlerde üridin ilavesinde oluşan bakteri sayıları ve mikrobiyal HA üretimi (Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

Farklı üridin değerleri ile yapılan fermantasyon uygulaması sonucunda oluşan bakteri sayısında görülen artış ile elde edilen HA miktarında artış gözlenmiştir (Şekil 3.9). En yüksek HA miktarı ve bakteri sayısı 2,5 mL/L üridin ilavesinde elde edilmiştir. Farklı üridin oranlarında üretilen HA miktarı ve oluşan bakteri sayısı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür (Regrasyon analizi, $P=0,06279$).



Şekil 3.10 Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ve glikoz kullanımında oluşan bakteri sayısı ve mikrobiyal HA üretimi (A: Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında HA üretimi, B: Üridin ilaveli glikoz kullanımında HA üretimi. Bakteri ekimleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hata çubukları %5 hatayı temsil etmektedir.)

Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımıyla yapılan fermantasyon uygulaması ile üridin ilaveli glikoz kullanımına göre daha fazla bakteri sayısı elde edilmiştir. En yüksek bakteri sayısında en yüksek HA oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.10).

4. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında *S. zooepidemicus* ile tam kontrollü fermantasyon sistemi kullanılarak HA üretiminde *I. batatas* ekstraktı ve üridin ilavesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı oranlarda *I. batatas* ekstraktı ve üridin ilavesi mikrobiyal HA üretimleri karşılaştırılmış ve *S. zooepidemicus*'un gelişimi de incelenmiştir. Bu çalışmada 21 g/L *I. batatas* ekstraktına 2,5 mL/L üridin ilavesinde en fazla HA üretimi (5,21 g/L) elde edilmiştir. Çalışması sonucu üridin ilaveli glikoz kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi (0,19 g/L) ile karşılaştırılmıştır. Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ile elde edilen mikrobiyal HA üretiminin glikoz kullanımı ile gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimine göre fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışma kapsamında üridin etkisini incelemek için 21 g/L *I. batatas* ekstraktı ile gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi (2,45 g/L) üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ile gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi (5,21 g/L) ile karşılaştırılmış ve üridin ilavesiyle üretilen HA miktarında %113 artış gözlenmiştir.

Literatürde farklı *S. zooepidemicus* ile HA üretimi için farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 ile HA üretimi için yapılan bir çalışmada fermantasyon ortamında 25 g/L glikoz ve 60 g/L maya ekstraktı kullanılarak 2,5 g/L HA elde edilmiştir (Yao ve diğ, 2021). Tez çalışması kapsamında elde edilen 5,21 g/L HA miktarı literatürde yer alan 2,5 g/L HA miktarından %108 daha fazladır. *S. zooepidemicus* ile HA üretimi için yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak nişasta ile ortam geliştirilmiş ve HA konsantrasyonunun 6,7 g/L'ye ulaştığı görülmüştür (Zhang ve diğ, 2006). Tez çalışması kapsamında elde edilen 5,21 g/L HA miktarı literatürde yer alan 6,7 g/L HA miktarından %22 daha azdır. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre karbon kaynağı olarak *I. batatas* ekstraktı kullanımının nişasta kadar umut verici olduğu gözlenmiştir. Ancak tam bir karşılaştırma için sabit koşullarda ve aynı oranlarda nişasta ile fermantasyon uygulaması gerçekleştirilerek mikrobiyal HA üretimleri karşılaştırılmalıdır. Literatürde üridin ilavesi ile gerçekleştirilen mikrobiyal HA üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. *S. zooepidemicus* ile HA üretiminde ortam geliştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmış ve ortama 0,5, 0,75, 1 ve 2 g/L üridin ilavesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda 2 g/L üridin ilavesinde en yüksek HA miktarı (5 g/L) elde edilmiştir (Park

ve diğ, 1996). Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuç literatürde yer alan çalışmalarla da desteklenmektedir.

Çalışma kapsamında üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ve üridin ilaveli glikoz ile 9 saat fermantasyon uygulaması gerçekleştirilmiş ve saat başı mikrobiyal HA üretimleri karşılaştırılmıştır. Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktında en fazla HA üretimi 2. saatte elde edilmiş olmasına rağmen devam eden zamanlarda gerçekleşen mikrobiyal HA üretimleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$). Üridin ilaveli glikoz ile gerçekleştirilen fermantasyon uygulamasında 2. saatte en düşük HA miktarı gözlenmiş ancak saat başı mikrobiyal HA üretimleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kruskal Wallis Testi, $P=0,4335$). Üridin ilaveli glikoz ile gerçekleştirilen fermantasyon uygulamasında 2. saatte görülen düşük HA miktarının hyaluronik asit çözelti yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir ancak doğru bir karşılaştırma için 12-24 saat fermantasyon uygulaması gerçekleştirilmelidir. Böylece saat başı elde edilen mikrobiyal HA üretimleri arasındaki fark net bir şekilde belirginleşecektir. Fizyolojik bir çözeltide, bir hyaluronan molekülünün omurgası, disakkaritin kimyasal yapısı, iç hidrojen bağları ve çözücü ile etkileşimlerin bir kombinasyonu ile sertleştirilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda, çözeltiler son derece yüksek ancak kaymaya bağlı viskoziteye sahiptir (Cowman ve diğ, 2015). Fermantasyon süresinin 2 saat uygulanması ile hyaluronik asidin kimyasal ve çözelti yapısı sebebiyle örnek alımında oluşabilecek bazı dezavantajların ve kontaminasyon riskinin önlenmesi de mümkün olmuştur.

Tez çalışması kapsamında yapılan fermantasyon uygulamalarında *S. zooepidemicus*'un gelişimi de incelenmiştir. Üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı ile gerçekleştirilen fermantasyon uygulamasında üridin ilaveli glikoza göre yapılan fermantasyon uygulamasına göre daha yüksek HA miktarı ve bakteri sayısı elde edilmiştir (Şekil 3.10). Tez çalışması kapsamında elde edilen bu sonuca göre artan bakteri sayısı ile HA üretimine artış olacağı düşünülebilir ancak optimum *I. batatas* ekstraktına yönelik yapılan çalışmalarda en düşük bakteri sayılarında en yüksek HA üretimleri gerçekleşmiştir (Şekil 3.7). Tez çalışması kapsamında görülen artan bakteri sayısı ile azalan HA üretiminin, hücre büyümesi ve HA oluşumu arasında biyosentetik yolda görülen rekabetten kaynaklandığı düşünülmektedir. Hyaluronik asit sentezinde kullanılan öncüler peptidoglikan, teikoik asit ve antijenik duvar polisakkaritlerinin oluşumu için yapısal bileşenlerini sağlayarak hücre büyümesinde

görev alır. Bu yüzden HA sentezi ve hücre büyümesi arasında bir rekabet söz konusudur (Chong, 2005; Pires, 2010). Ayrıca glikoliz ve HA sentezi arasında rekabet vardır. Bu nedenle, yüksek HA sentezi isteniyorsa, yüksek spesifik büyüme hızı uygun olmayacaktır. HA konsantrasyonunu ve molekül ağırlığını artırmak için glikolitik işlemin ve biyokütle oluşumunun azaltılması gereklidir (Boeriu ve diğerleri, 2013).

Sonuç olarak tez çalışması kapsamında üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktının optimizasyonu ile yüksek oranda hyaluronik asit üretimi saptanmıştır. Bu çalışma mikrobiyal HA üretiminde yeni karbon kaynaklarının kullanılması için çalışmalara katkı sağlayabilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

S. zooepidemicus ile HA üretimi optimum HA üretiminin 21 g/L *I. batatas* ekstraktına 2,5 mL/L üridin ilavesinde olduğu belirlendi. Fermantasyon ortamındaki bakteri sayısında görülen artışın ise HA üretimine etki etmediği gözlemlendi. Yapılan çalışmada üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımıyla elde edilen HA miktarı ile üridin ilaveli glikoz kullanımıyla elde edilen HA miktarı arasında istatistiksel olarak bir fark olduğu belirlendi. Çalışma kapsamında *I. batatas* ekstraktı ve üridin oranı için optimizasyon çalışması yapılmasına rağmen üridin ilaveli *I. batatas* ekstraktı kullanımında fermantasyon koşullarının (sıcaklık, pH, karıştırma hızı, çözümüş oksijen) optimizasyonu yapılmamıştır. Buna ek olarak *I. batatas* ekstraktı ve üridin kullanımıyla fermantasyon koşullarının optimizasyonu da hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- Armstrong, D. C., & Johns, M. R.** (1997). Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2759-2764.
- Bitter T., Muir H. M.** (1962). A modified uronic acid carbazole reaction, *Analytical Biochemistry*, 4 (4), 330–334.
- Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A., & Eggink, G.** (2013). Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013.
- Buldağ, Ö.** (2020). Development and optimization of purification processes for hyaluronic acid (Master's thesis, Marmara Üniversitesi).
- Chen, S. J., Chen, J. L., Huang, W. C., Chen, H. L.** (2009). Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26 (2), 428-432.
- Chong, B. F., Blank, L. M., Mclaughlin, R., Nielsen, L. K.** (2005). Microbial Hyaluronic Acid Production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (4), 341–51.
- Cowman M.K., Matsuoka S.** (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, 340, 791–809.
- DeAngelis, P.** (1996). Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry*, 9768–9771.
- Duan, X. J., Yang, L., Zhang, X., Tan, W. S.** (2008). Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (4), 718-724.
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S.** (2018). Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 10(7), 701.
- Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. G.** (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*, 242(1), 27-33.
- Gaffney, J., Matou, N.S., Grau, O.M., Slevin M.** (2009). Therapeutic Applications of Hyaluronan. *Molecular Bio Systems*, 6(3), 437–443.
- Girgin, H.** (2019). *Streptococcus zooepidemicus* ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların belirlenmesi (Master's thesis, Bursa Teknik Üniversitesi).
- Gupta, R.C, Lall, R., Srivastava, A. and Sinha, A.** (2019). Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 192.
- Hasegawa, S., Nagatsuru, M., Shibutani, M., Yamamoto, S., Hasebe, S.** (1999). Productivity of Concentrated Hyaluronic Acid Using a Maxblend® Fermentor, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88 (1), 68–71.
- Holmström, B. & Řičica, J.** (1967). Production of hyaluronic acid by a *Streptococcal* strain in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 15(6), 1409-1413.

Huang, W. C., Chen, S. J., Chen, T. L. (2006). The Role of Dissolved Oxygen and Function of Agitation in Hyaluronic Acid Fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 32 (3), 239–43.

Jagannath, S. & Ramachandran, K. B. (2010). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (2), 148-158.

Johns, M. R., Goh, L. T., Oeggerli, A. (1994). Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnology Letters*, 16 (5), 507-512.

Karasu, Y. (2021). Mikrobiyal hyaluronik asit üretimi ve tarımsal atıkların hyaluronik asit üretiminde değerlendirilebilirliğinin araştırılması (Master's thesis, Eskişehir Teknik Üniversitesi).

Kim, J. H., Yoo, S. J., Oh, D. K., Kweon, Y. G., Park, D. W., Lee, C. H., & Gil, G. H. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (6), 440-445.

Knopf-Marques, H., Pravda, M., Wolfova, L., Velebny, V., Schaaf, P., Vrana, N. E., & Lavalley, P. (2016). Hyaluronic acid and its derivatives in coating and delivery systems: applications in tissue engineering, regenerative medicine and immunomodulation. *Advanced healthcare materials*, 5(22), 2841-2855.

Kotra, S. R., Venkateswarulu, T. C., & John, B. (2013). Cost effective media optimization for the enhanced production of hyaluronic acid using a mutant strain *Streptococcus zooepidemicus* 3523–7: a statistical approach. *Int J Adv Sci Technol*, 60, 83-96.

Kuo, J. W., Swann, D. A., & Prestwich, G. D. (1991). Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry*, 2(4), 232-241.

Liu, J., Wang, Y., Ren, Y., Zhao, Y., Zhao, G. (2018). Efficient Production of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid with a Two-Stage Fermentation, *RSC Advances*, 8 (63), 36167-36171.

Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., Sun, J. (2008a). Influence of Culture Modes on the Microbial Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13 (3), 269–73.

Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J. (2011). Microbial Production of Hyaluronic Acid: Current State, Challenges, and Perspectives, *Microbial Cell Factories*, 10 (1), 99.

Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J. (2008c). Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fedbatch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*, *Bioresource Technology*, 99 (17), 8532-8536

Liu, L., Sun, J., Xu, W., Du, G., & Chen, J. (2009). Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. *Biotechnology progress*, 25(6), 1819-1825.

Lu, J. F., Zhu, Y., Sun, H. L., Liang, S., Leng, F. F., Li, H.Y. (2016). Highly Efficient Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 Derived

from Heterologous Expression of Bacterial Haemoglobin and Mutant Selection, Letters in Applied Microbiology, 62 (4), 316–22.

Lych, I.V., Uhryn, A. O., Voloshina, I.M. (2019). Hyaluronic Acid: Biosynthesis and Application. Ukrainian Biopharmaceutical Journal, 2(59),6-13.

Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629-634.

Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 53(8), 397-411.

Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Antônio, M. V. R., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., Parachin, N. S. (2016). Genetic Basis for Hyper Production of Hyaluronic Acid in Natural and Engineered Microorganisms, Microbial Cell Factories, 15 (1), 119.

Özcan, A. (2020). Keçiboynuzu ekstraktının hyaluronik asit üretiminde karbon kaynağı olarak değerlendirilmesi ve üretim şartlarının optimizasyonu.

Padmanaban, S., Balaji, N., Muthukumaran, C., & Tamilarasan, K. (2015). Statistical optimization of process parameters for exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* using sweet potato based medium. *3 Biotech*, 5(6), 1067-1073.

Pan, N. C., Vignoli, J. A., Baldo, C., Pereira, H. C. B., Silva, R. S. D. S. F., Celligoi, M. A. P. C. (2015). Effect of Fermentation Conditions on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, Acta Scientiarum. Biological Sciences, 37 (04), 411–417.

Pham, T. N., Toan, T. Q., Lam, T. D., Vu-Quang, H., Vo, D. V. N., & Vy, T. A. (2019, June). Anthocyanins extraction from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): The effect of pH values on natural color. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 542, No. 1, p. 012031). IOP Publishing.

Park, M. G. Jang, J. D., Kang, W. K (1994). J.P. Patent No. H06319580A. Novel streptococcus strain and production of hyaluronic acid using same.

Park, M. G. Jang, J. D., Kang, W. K (1996). U.S. Patent No. 5496726. *Streptococcus zooepidemicus* medium and process for preparing HA .

Park, M., Hangyul, K. (2011). K.R. Patent No. 101073854. Uridine and uridine derivatives of enhancing biosynthesis of hyaluronic acid, glycosaminoglycan and/or collagen.

Pires, A. M. B., Santana, M. H. A. (2010). Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid, Applied biochemistry and biotechnology, 162 (6), 1751-1761.

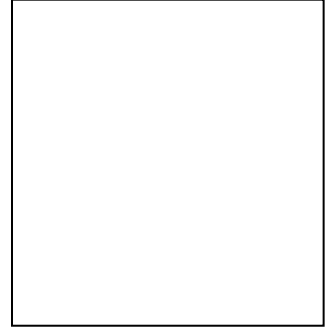
Schiraldi, C., Gatta, A., Rosa, M. (2010). Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. Biopolymers, 387-412.

Selyanin, M.A., Boykov, P., and Khabarov, V. (2015). Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine, 1st edition, John Wiley & Sons, Moscow.

Song, J. M., Im, J. H., Kang, J. H., & Kang, D. J. (2009). A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. *Carbohydrate polymers*, 78(3), 633-634.

- Sze, J.H., Brownlie, J.C., Love, C.A.** (2016). Biotechnological Production of Hyaluronic Acid: a Mini Review. 3 Biotechnology, 6(67), 1-10.
- Takamine, K., Ma, M. M., & Ogutu, F. O.** (2019). Sweet potato dietary fiber. In *Sweet Potato* (pp. 117-148). Academic Press.
- Vázquez, J. A., Pastrana, L., Piñeiro, C., Teixeira, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Amado, I. R.** (2015). Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scyllorhinus canicula* discards. *Marine Drugs*, 13(10), 6537-6549.
- Wang, S., Nie, S., & Zhu, F.** (2016). Chemical constituents and health effects of sweet potato. *Food Research International*, 89, 90-116.
- Wu, S., Jin, Z., Tong, Q., & Chen, H.** (2009). Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 645-649.
- Yamada, T., & Kawasaki, T.** (2005). Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(6), 521–528.
- Yatmaz, E., & Turhan, I.** (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 200-208.
- Zhang, J., Ding, X., Yang, L., & Kong, Z.** (2006). A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 168-172.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Eda AKIN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği