

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÜRETİM
ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Ali ÖZCAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÜRETİM
ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Ali ÖZCAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÜRETİM
ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

**Ali ÖZCAN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FYL-2019-4723 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Temmuz 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÜRETİM
ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

Ali ÖZCAN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 29/07/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TORUN
Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖZET

KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE KARBON KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

Ali ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Temmuz 2020; 97 Sayfa

Hyaluronik asidin insan sağlığı açısından oldukça önemli bir biyopolimer olduğu ve hayvansal kaynaklardan izole edildiği ilk günden itibaren gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konmuştur. Düz zincirli doğal glukozaminoglikan polimeri olan bu polisakkarit doğal üretici olan Grup A ve Grup C *Streptococcus* türleri tarafından biyoteknolojik yöntemlerle de üretilebilmektedir. Sahip olduğu yüksek su tutma kapasitesi, viskoelastiklik, yüksek molekül ağırlıklarına ulaşabilme gibi özellikleri nedeniyle biyoyarayışlılığı yüksek olan bu biyopolimer ortopedik rahatsızlıkların tedavisinde, göz hastalıkları ve göz cerrahisinde, estetik cerrahisinde kullanılan dolgu materyallerinde, cilt yenilenmesi ve kırışıklık giderilmesinde, kanser hücrelerinin tespiti ve tedavisinde, ilaç taşıma sistemlerinde ve kozmetik sektöründe doğrudan veya yardımcı materyal şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Oldukça yüksek kullanımı olan bu biyopolimerin fermentasyon şartlarının iyileştirilmesi ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi biyoteknolojik yollarla gerçekleştirilen hyaluronik asit üretimi için büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, ülkemizde yüksek miktarda yetiştirilen keçiboynuzu meyvesinin karbon kaynağı olarak fermentasyon ortamında kullanılmasıyla yüksek katma değere sahip bir ürün olan hyaluronik asidin üretim potansiyeli araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, öncelikle keçiboynuzu meyvesi ekstraktı kullanılarak *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 bakterisi ile hyaluronik asit üretim fermentasyonunun besiyeri içeriğinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kazein, maya ekstraktı, et ekstraktı ve pepton olmak üzere 4 farklı azot kaynağı ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , NaCl, K_2HPO_4 ve $FeSO_4$ gibi 5 farklı mineral kaynağı ile keçiboynuzu meyvesi ekstraktı besiyeri bileşenleri olarak belirlenmiştir. Besiyeri optimizasyonunu gerçekleştirmek üzere bu bileşenlere ek olarak inokülasyon oranını da içeren Plackett-Burman tasarımı oluşturulmuştur. Tasarımın sunduğu 15 farklı deneme için çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta, 150 rpm çalkalama hızında başlangıç pH 7.0 değerinde fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonrasında tespit edilen hyaluronik asit miktarları yanıt yüzeyi olarak kullanılmış ve Plackett-Burman tasarımı ile besiyeri optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum besiyeri ile çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyon sonunda hyaluronik asit miktarı 2.60 g/L olarak tespit edilmiştir. Varyans (ANOVA) analizi sonucunda; oluşturulan model, KH_2PO_4 , NaCl ve $FeSO_4$ istatistiksel olarak ($P < 0.05$) olarak önemli bulunmuştur. Bu doğrultuda elde edilen optimum besiyeri bileşimi kullanılarak biyoreaktörde hyaluronik asit üretimleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon parametrelerinin üretilen hyaluronik

asidin moleköl ağırlığı üzerine etkisi Box-Behnken cevap yüzey tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Havalandırma miktarı, karıştırma hızı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu olarak seçilen bağımsız değişkenler ile deneme deseni oluşturulmuş ve fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca preparatif HPLC kullanılarak moleküler ayırma (size exclusion, SEC) kromatografisi ile hyaluronik asitin moleküler ağırlık aralıkları belirlenmiştir. Biyoreaktör denemeleri sonucunda oluşturulan model ve havalandırma miktarı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Tez çalışması sonucunda alternatif bir karbon kaynağı olan keçiboynuzu meyvesinden optimum besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 2.60 g/L hyaluronik asit üretilmiştir. Bununla birlikte biyoreaktörde üretilen hyaluronik asidin ortalama moleköl ağırlığının 500 kDa ile 1750 kDa arasında değiştiğı tespit edilmiştir. Böylece keçiboynuzu meyvesinin katma değeri yüksek bir ürün olan hyaluronik asit üretiminde kullanılabileceğı kanıtlanmış, bu hammaddeyi içeren besiyerinin optimum bileşimi ve fermentasyon şartları tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Biyoreaktör, fermentasyon, hyaluronik asit, keçiboynuzu, optimizasyon

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TORUN

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

EVALUATION OF CAROB EXTRACT AS A CARBON SOURCE IN HYALURONIC ACID PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF PRODUCTION CONDITIONS

Ali ÖZCAN

MSc Thesis in, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN

July 2019, 97 pages

Studies, starting from isolation of hyaluronic acid from animal sources reveal that it is a very important biopolymer for human health. This polysaccharide, which is a straight chain natural glycosaminoglycan polymer, can be produced by biotechnological methods by using the natural producer species Group A and Group C *Streptococcus*. This biopolymer, which has high bioavailability due to its high water holding capacity, viscoelasticity and its ability to reach high molecular weights, can be widely used in the treatment of orthopedic ailments, eye diseases and eye surgery, filling materials used in aesthetic surgery, skin renewal and wrinkle removal, cancer cells detection and treatment, drug transport systems and cosmetics industry either directly or as an auxiliary material. Improving the fermentation conditions and lowering the production costs are very important for the biotechnological production of hyaluronic acid, having high utilization rate. In this respect, this thesis was designed to demonstrate the producibility of this polymer, which has a high added value, by using the carob grown in our country as a carbon source.

In this study, media of hyaluronic acid production by *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 3992, which include carob extract as a carbon source, was optimized. Firstly, with the literature review, carob extract medium components were determined with 4 different nitrogen sources as casein, yeast extract, beef extract and peptone and 5 different mineral sources such as $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , NaCl, K_2HPO_4 and $FeSO_4$. In order to perform media optimization, the Plackett-Burman design, which includes the inoculation rate in addition to these components, was created. The 15 different trial fermentations offered by the design were performed in incubator at 37°C, 150 rpm shaking speed, 7.0 initial pH. HA quantities detected after fermentation were used as response surfaces and medium optimization was performed with the Plackett-Burman design. The amount of hyaluronic acid was determined as 2.60 g/L at the end of the fermentation which was carried out in the incubator with using optimum medium. In addition, as a result of analysis of variance (ANOVA); The model, KH_2PO_4 , NaCl and $FeSO_4$ were found statistically significant ($P < 0.05$). Accordingly, hyaluronic acid production was carried out in bioreactor using by the optimum medium composition. The effect of fermentation parameters on the molecular weight of the produced hyaluronic acid was investigated using the Box-Behnken response surface design. The experimental design was created with the independent variables, which were selected as the amount of aeration, agitation speed and initial biomass density, and fermentations were carried out.

In addition, molecular weight of hyaluronic acid were determined by molecular separation (size exclusion, SEC) chromatography using preparative HPLC. The model and the amount of aeration were found to be statistically significant as a result of bioreactor experiments ($P < 0.05$). As a result of the thesis, 2.60 g/L hyaluronic acid was produced in optimum carob fruit extract medium with shaking incubator. In addition, the average molecular weight of the hyaluronic acid produced in the bioreactor was found to be between 500 kDa and 1750 kDa. Thus, it has been proved that carob fruit can be used in the production of hyaluronic acid, a product with high added value, and the optimum medium composition and fermentation conditions of this raw material have been determined.

KEYWORDS: Bioreactor, carob, fermentation, hyaluronic acid, optimization

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Asst. Prof. Dr. Mehmet TORUN

Asst. Prof. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

Biyoteknolojik çalışmalar ekosistem için yararlılığı yüksek olan ve zamanla elde edilmesi ekonomik ve çevresel nedenlerle kısıtlanan birçok önemli kaynağı geleneksel metotların haricinde üretebilmeyi mümkün kılmaktadır. Günümüzde enzim, vitamin, aminoasit vb. katma değeri yüksek ve canlılar için hayati önem taşıyan birçok bileşeni biyoteknolojik yöntemler sayesinde düşük maliyetle, yüksek verimle ve daha az doğal kaynak harcayarak elde edebilmekteyiz. Biyoteknolojik gelişmeler her ne kadar kıymetli ürün eldesinde doğal kaynak harcamasını azaltsa da bundan daha fazlasına ihtiyaç olduğu açıkça ortadadır. Bu nedenle söz edilen ürünlerin proses atıkları ve yan ürünler gibi geri dönüştürülebilir materyaller kullanılarak üretilmesi ekosistemi korumak adına da oldukça önemlidir. Tez kapsamında gerçekleştirilmesi hedeflenen amaçlardan biri ülkemizin üretim kapasitesi olarak dünya dördüncüsü olduğu ve uygun kimyasal bileşime sahip doğal bir bitki olan keçiboynuzu meyvesinin, fermentasyonla hyaluronik asit üretiminde karbon kaynağı olarak değerlendirilmesidir.

Hyaluronik asit insan vücudunda doğumdan itibaren doğal olarak bulunmakta ve miktarı azaldıkça insan sağlığını birçok açıdan olumsuz yönde etkilemektedir. HA hücrelerin dış yüzeyini kaplayan koruyucu bir bileşen olarak tüm vücutta var olmakla birlikte deride, eklem sıvılarında, gözün vitröz tabakasında ve göbek bağı kordonunda yüksek miktarda bulunmaktadır. İyileşme süreçlerine aktif katılımı, elastikiyet gerektiren organlara bu özelliği kazandırması, cildin pürüzsüzlüğü ve dokuların çevrelerinde koruyucu bir tabaka olarak var olması zamanla azalan hyaluronik asit miktarının mutlaka takviye edilmesi gerekliliğini güçlendirmektedir. Hayvansal kaynaklardan izole edilerek keşfedilen hyaluronik asidin elde edilmesinde uzun yıllar boyunca hammadde olarak yine hayvansal kaynaklar kullanılmıştır. Bu süre boyunca ortaya çıkan hayvansal kaynaklı riskler ve etik endişeler bu biyopolimerin biyoteknolojik yollarla üretilmesine olan ilgiyi giderek arttırmaktadır.

Doğal ve rekombinant mikroorganizmalar tarafından üretilen hyaluronik asit hem kendi doğası nedeniyle hem de üretici mikroorganizmaların metabolik yolları doğrultusunda fermentasyon prosesinde kısıtlayıcı etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu etkilerin azaltılması, verimin yükseltilmesi ve hammadde giderlerinin düşürülmesi için dünya genelinde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak gerçekleştirilen biyoteknolojik çalışmalarda genellikle verim hayvansal kaynaklara göre düşük kalmaktadır. Üretilen hyaluronik asidin molekül ağırlığı ve verimi arasında optimum ilişki sınırlı sayıda çalışmada kurulabilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit üretildiğinde üretim miktarı düşük kalmakta veya üretim miktarı arttıkça molekül ağırlıkları arzu edildiği kadar yüksek olmamaktadır. Bunların dışında mikrobiyal hyaluronik asit üretim mekanizması ile hücre içerisinde gerçekleşen diğer faaliyetlerin yarışma mekaniği henüz tam olarak çözülememiştir. Aynı zamanda fermentasyon ile üretimde maliyetin düşürülmesi öncelikli hedeflerden olup çalışmaları alternatif kaynaklardan ve optimum koşullarda üretim sistemleri geliştirilmesi üzerine yoğunlaştırmıştır.

Hyaluronik asidin sahip olduğu eşsiz özellikleri ve üretiminin daha ucuz hammaddeyle optimum şekilde üretilmesi gerekliliği nedeniyle bu tez çalışması tasarlanmıştır. Böylece, literatürde hyaluronik asit üretimi için daha önce

değerlendirilmeyen keçi boynuzu meyvesi hammadde olarak kullanılmış ve fermentasyon koşulları optimize edilmiştir.

Öncelikle lisans öğrenimimden itibaren her türlü desteğiyle bana yol gösteren, akademik olarak olgunlaşmam ve daima ileriye doğru hamle yapmamı öğütleyen, değerli tecrübelerini ve zamanını hiçbir koşulda benden esirgemeyen, psikolojik yıpranma anlarımda beni sabırla motive eden ve bu tez çalışmasını gerçekleştirmeme fırsat veren saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü öğrenimime adım atmama vesile olan, akademik desteklerini, dostluğunu ve sevgisini her daim fazlasıyla hissettiren, maddi ve manevi olarak her koşulda yanımda duran sevgili hocam Mustafa Germeç'e teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamında karşılaştığım her sorunda tereddütsüz yardımına koşan, pratik düşünme yeteneğime pozitif katkı sunan, tez aşamasında karşılaştığım tüm sorunlara çözüm bulmamda bana destek olan, güler yüzlü ve yapıcı hocam Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Göynük Meslek Yüksek Okulu) teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığım, birlikte uzun süreler boyunca farklı çalışmalarda ter döktüğümüz ve bir bakıma akademik ailem olan laboratuvar arkadaşlarım Selime Benemir ERKAN, Cansu YILMAZER, Hilal Nur GÜRLER ve Müge CANATAR ile maddi ve manevi olarak her zaman bana güç veren sevgili dostlarım Atike Nur DURAK, Sinem SALMAN ve Negin AZARABADI'ye teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve TÜBİTAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlar Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez hazırlama sürecinde her an yanımda olan gülen yüzüm ve huzur kaynağım, uzun bir zaman boyunca birbirimize destek olacağımız sevgili yol arkadaşım Esra TAPSIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak varlığıma anlam katan, hayat boyu arkamda var olacak olan, başaramayacağımı düşündüğüm her anda kenetlenen, sonunu göremediğim yollarda bana ışık olan, tüm yanlış ve doğrularımda bana kucak açan annem Aliye ÖZCAN ve kardeşlerim Alperen ÖZCAN ile Aslıhan ÖZCAN'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	15
2. KAYNAK TARAMASI.....	17
2.1. Hyaluronik Asidin Yapısı ve Özellikleri.....	17
2.1.1. Hyaluronik asidin yapısı.....	17
2.1.2. Hyaluronik asidin fizikokimyasal ve yapısal özellikleri	17
2.2. Hyaluronik Asidin İnsan Vücudundaki Önemi	18
2.3. Hyaluronik Asidin Uygulama Alanları	19
2.3.1. İlaç taşıyıcı sistem olarak hyaluronik asit	19
2.3.2. Hyaluronik asidin ortopedik uygulamaları.....	20
2.3.3. Göz biliminde hyaluronik asit uygulamaları	20
2.3.4. Hyaluronik asidin estetik ve dermatolojik uygulamaları	21
2.3.5. Hyaluronik asidin gıda uygulamalarında kullanılması.....	22
2.3.6. Hyaluronik asidin diğer uygulama alanları	23
2.4. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri	23
2.4.1. Hayvansal kaynaklı hyaluronik asit üretimi	24
2.4.2. Biyoteknolojik yöntemlerle hyaluronik asit üretimi	24
2.5. Karbon Kaynağı Olarak Keçiboynuzu Meyvesi	35
2.6. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Yöntemleri.....	39
2.6.1. Cevap yüzey metodu	39
2.6.2. Plackett-Burman deneysel tasarım	40
2.6.3. Box-Behnken deneysel tasarım	41
3. MATERYAL VE METOT.....	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Besiyerinde karbon kaynağı olarak keçiboynuzu ekstraktı üretimi ..	44

3.1.2. Hyaluronik asit üretimi optimizasyonu için kullanılan mikroorganizma	44
3.2. Yöntem	44
3.2.1. Plackett-Burman yöntemiyle besiyeri optimizasyonu.....	44
3.2.2. Fermentasyon şartlarının HA'nın moleküler ağırlığı üzerine etkisi..	47
3.3. Fermentasyon Ortamından Alınan Örneklerle Uygulanan Analizler	48
3.3.1. Hyaluronik asit içeren örneklerin ekstraksiyonu.....	48
3.3.2. Karbazol yöntemiyle toplam HA analizi.....	49
3.3.3. HA miktarının kromatografik olarak belirlenmesi.....	49
3.3.4. Toplam indirgen şeker analizi	50
3.3.5. Toplam biyokütle analizi.....	50
3.4. Kinetik Parametreler	51
3.5. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Plackett-Burman Tasarımıyla Oluşturulan Optimum Besiyeri Bileşimi..	53
4.1.1. PB tasarımıda etkili parametrelerin belirlenmesi ve istatistiksel analiz	69
4.1.2. Pb tasarımıla elde edilen optimum besiyeri bileşimi.....	71
4.2. Farklı Fermentasyon Parametrelerinin Üretilen HA'nın Miktarı ve Moleküler Dağılımı Üzerine Etkisi	73
4.2.1. Havalandırma miktarının HA üretimi üzerine etkisi.....	78
4.2.2. Karıştırma hızının HA üretimi üzerine etkisi	79
4.2.3. Başlangıç biyokütle yoğunluğunun HA üretimi üzerine etkisi	80
4.3. Box-Behnken Cevap Yüzey Yönteminin Sunduğu Optimum Koşullar İçin Doğrulama Fermentasyonu	81
5. SONUÇLAR	85
6. KAYNAKLAR.....	87
7. EKLER	94
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Keçiboynuzu Ekstraktının Hyaluronik Asit Üretiminde Karbon Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi ve Üretim Şartlarının Optimizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih 29/07/2020

Ali ÖZCAN



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°Bx	: Briks
°C	: Santigrat derece
µg	: mikrogram
a/h	: Ağırlık/hacim
Da	: Dalton
dk	: Dakika
g	: gram
h/h	: Hacim/hacim
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
MDa	: Megadalton
mg	: miligram
mL	: Mililitre
mPa.s	: Milipaskal saniye
N	: Normal
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen iyonlarının eksi logaritması
P	: Ürün
<i>P</i>	: Olasılık
<i>P_{max}</i>	: En yüksek üretim miktarı
<i>Q_p</i>	: Maksimum üretim hızı
<i>Q_s</i>	: Maksimum tüketim hızı

Q_x	: Maksimum gelişim hızı
R^2	: Belirleme katsayısı
rpm	: Devir/dakika
S_0	: Başlangıç şeker miktarı
S_{min}	: En düşük şeker miktarı
vvm	: Dakikada birim hacimden geçen hava miktarı
X	: Biyokütle
X_{max}	: En yüksek biyokütle miktarı
X_{min}	: En düşük biyokütle miktarı
$Y_{P/S}$	: Ürün verimi
ΔS	: Şeker tüketim miktarı

Tez kapsamında ondalık sayıların ayırımında ‘.’ kullanılmıştır.

Kısaltmalar

ANOVA	: Varyans analizi
ASPS	: Amerikan Plastik Cerrahlar Derneği
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BB	: Box-Behnken
BHI	: Brain Heart Infision sıvı besiyeri
CYM	: Cevap yüzey metodu
DNSA	: 3,5-dinitrosalisilik asit
ESM	: Ekstraselüler matriks
GAG	: Glukozaminoglikan
GRAS	: Genel olarak güvenilir kabul edilen maddeler
HA	: Hyaluronik asit
HAS	: Hyaluronan sentaz enzimi

HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
İM	: İşlem uygulanmış melas
KO	: Kareler ortalaması
KT	: Kareler toplamı
MS	: Midye üretim prosesi atık suyu
MŞ	: Mısır şurubu
OD	: Optik yoğunluk
PB	: Plackett-Burman
PP	: Peyniraltı suyu permeatı
PS	: Peyniraltı suyu
PSH	: Peyniraltı suyu hidrolizatı
PŞ	: Palmiye bitkisi şekeri
RBF-QPSO	: Kuantum davranışlı parçacık yığını optimizasyon algoritması bağlaşımlı radyal temelli fonksiyon sinir ağı
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
ŞM	: Şeker kamışı melası
TP	: Ton balığının iç organlarından elde edilen pepton
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UDP	: Üridin difosfat
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hyaluronik asitin yapısı	17
Şekil 2.2. Hyaluronik asidin kullanım alanları.....	19
Şekil 2.3. Bakteriyel hyaluronik asit sentezi.....	28
Şekil 4.1. PB tasarım deneme desenine göre çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonlara ait görüntüler	53
Şekil 4.2. PB tasarımı 1 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	54
Şekil 4.3. PB tasarımı 2 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	55
Şekil 4.4. PB tasarımı 3 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	56
Şekil 4.5. PB tasarımı 4 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	57
Şekil 4.6. PB tasarımı 5 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	58
Şekil 4.7. PB tasarımı 6 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	59
Şekil 4.8. PB tasarımı 7 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	60
Şekil 4.9. PB tasarımı 8 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	61
Şekil 4.10. PB tasarımı 9 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	62
Şekil 4.11. PB tasarımı 10 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	63
Şekil 4.12. PB tasarımı 11 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	64
Şekil 4.13. PB tasarımı 12 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	65
Şekil 4.14. PB tasarımı 13 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	66
Şekil 4.15. PB tasarımı 14 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	67
Şekil 4.16. PB tasarımı 15 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler	68
Şekil 4.17. İndirgenmiş etkilerin Pareto grafiği	71
Şekil 4.20. Biyoreaktörde gerçekleştirilen HA üretim fermentasyonlarına ait görüntü ..	74
Şekil 4.21. Box-Behnken tasarımının sunduğu fermentasyonlar sonucu elde edilen verilerle tahmin edilen sonuçların karşılaştırılması	78
Şekil 4.22. Havalandırma miktarı ve karıştırma hızının HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği.....	79
Şekil 4.23. Karıştırma hızı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunun HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği	80
Şekil 4.24. Havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunu HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesi bileşen kompozisyonu	37
Çizelge 3.1. PB tasarımı faktörlerin minimum ve maksimum değerleri.....	45
Çizelge 3.2. PB tasarımı deneme deseni	46
Çizelge 3.3. BB tasarım faktörlerin minimum ve maksimum değerleri	47
Çizelge 3.4. BB tasarım deneme deseni	48
Çizelge 4.1. PB tasarımı 1 numaralı besiyeri bileşimi	54
Çizelge 4.2. PB tasarımı 2 numaralı besiyeri bileşimi	55
Çizelge 4.3. PB tasarımı 3 numaralı besiyeri bileşimi	56
Çizelge 4.4. PB tasarımı 4 numaralı besiyeri bileşimi	57
Çizelge 4.5. PB tasarımı 5 numaralı besiyeri bileşimi	58
Çizelge 4.6. PB tasarımı 6 numaralı besiyeri bileşimi	59
Çizelge 4.7. PB tasarımı 7 numaralı besiyeri bileşimi	60
Çizelge 4.8. PB tasarımı 8 numaralı besiyeri bileşimi	61
Çizelge 4.9. PB tasarımı 9 numaralı besiyeri bileşimi	62
Çizelge 4.10. PB tasarımı 10 numaralı besiyeri bileşimi	63
Çizelge 4.11. PB tasarımı 11 numaralı besiyeri bileşimi	64
Çizelge 4.12. PB tasarımı 12 numaralı besiyeri bileşimi	65
Çizelge 4.13. PB tasarımı 13 numaralı besiyeri bileşimi	66
Çizelge 4.14. PB tasarımı 14 numaralı besiyeri bileşimi	67
Çizelge 4.15. PB tasarımı 15 numaralı besiyeri bileşimi	68
Çizelge 4.16. PB desenine göre gerçekleştirilen denemelere ait en yüksek HA değerleri.....	69
Çizelge 4.17. İndirgenmiş değerlerin varyans (ANOVA) analizi.....	69
Çizelge 4.18. PB optimum besiyeri bileşimi.....	72
Çizelge 4.19. Optimum (4 numaralı) besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler	72
Çizelge 4.20. Box-Behnken deneme deseninde yer alan koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler.....	76
Çizelge 4.21. Box-Behnken tasarım tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen sonuçların varyans (ANOVA) analizi.....	77
Çizelge 4.22. Box-Behnken cevap yüzey tasarımı ile oluşturulan optimum koşullar ve bu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyona ait HA üretim miktarı tahmini ve deneysel sonuçları	81
Çizelge 4.23. Doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler.....	82

1. GİRİŞ

Hyaluronik asit (HA) farklı molekül ağırlıklarına sahip ve genellikle omurgalı canlıların epitel, sinir ve bağ doku hücrelerinin ekstraselüler matriksinde bulunan bir biyopolimerdir (Fallacara vd., 2018; Sze vd., 2016). Glukozaminglukan ailesine ait bir mukopolisakkarit olan HA temelinde tekrarlanan disakkarit birimlerinden oluşmaktadır (Salwowska vd., 2016).

İnsan vücudunda genellikle deride, gözlerde, eklem sıvılarında ve göbek bağı kordonunda yüksek miktarlarda olmak üzere 70.0 kg'lık bir bireyde 15.0 g kadar HA bulunmaktadır (Volpi vd., 2009). İnsan vücudunda ciddi miktarda yer kaplayan HA birçok önemli görevi yerine getirmektedir. HA'nın insan vücuduna sağladığı katkılar: yüksek miktarda su tutma kapasitesiyle insan derisindeki dermal hacmi artırması ve cildin sıkılaşmasını sağlaması, hücre çoğalmasını ve doku onarımını desteklemesi, yaşlanma, yaralanma gibi nedenlerle gerçekleşen deri deformasyonlarının önüne geçilmesi gibi etkin görev aldığı şeklinde özetlenebilmektedir (Kogan vd., 2007).

İlk olarak Meyer ve Palmer tarafından 1934 yılında sığır gözünün camsı cismindeki vitröz sıvıdan izole edilen HA, insan sağlığı için öneminin daha çok anlaşılmasıyla birçok sağlık uygulamalarında doğrudan veya dolaylı olarak kullanılmaktadır (Meyer & Palmer, 1934). Sahip olduğu viskoelastik özellikler HA'yı ortopedi, kozmetik, estetik cerrahi, mikrocerrahi alanlarında ve çeşitli ilaçların içerisinde kullanılan önemli bir biyopolimer haline getirmiştir (DeRosa, 2013; Vasi vd., 2014; Qasemyar & Gianfermi, 2014; M.Yatmaz & Turhan, 2015). Çok geniş kullanım alanı olan HA 2016 yılında küresel pazarda 7.2 milyar Amerikan Doları hacminde paya sahip olmuştur ve ekonomik öngörüler 2027 yılında 16.6 milyar Amerikan Doları miktarında bir pazar payına sahip olacağı yönündedir (Anonim, 2020; Fallacara vd., 2018).

HA üretiminde hayvansal kaynaklı ve mikrobiyal kaynaklı olmak üzere iki temel yol izlenmektedir. Hayvansal kaynaklı üretim genellikle HA'nın horoz ibiğinden ve sığırların sinoviyal sıvısından ekstrakte edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Hayvansal kaynaklardan gerçekleştirilen üretimde en çok tercih edilen kaynak ise horoz ibiğidir. Ancak prosesin zorluğu ve etik nedenlerden dolayı biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için hayvan kaynaklı HA kullanımında sınırlamalar bulunmaktadır (Boeriu vd., 2013; Fakhari & Berkland, 2013).

Hayvansal kaynaklı üretimde karşılaşılan zorluklar nedeniyle HA'nın geniş ölçekte üretilmesi için mikrobiyal kaynaklı yöntemler tercih edilmektedir. Mikrobiyal yolların tercih edilme nedenlerinin başında mikroorganizmalardan elde edilen HA'nın insan vücuduyla biyolojik uyumunun yüksek olması yer almaktadır. (Boeriu vd., 2013; de Oliveira vd., 2016) Biyoteknolojik olarak HA üretiminde doğal üretici mikroorganizmalar olan *Lactococcus lactis* A ve C *Streptococcus* en çok tercih edilen suşlar olmaktadır. Bu mikroorganizmalarla gerçekleştirilen maksimum üretim miktarı 6.0-7.0 g/L seviyesindedir. Yüksek molekül ağırlıklı HA sentezleyebilen bu doğal mikroorganizmalar insanlar ve hayvanlar üzerinde patojen olmaları ve HA'nın saflaştırma maliyetinin yüksekliği gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle günümüzde HA üretimi için GRAS listesinde yer alan mikroorganizmalar (*Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Corynebacterium glutamicum*) ve/veya rekombinant suşlar ile üretimler denetlenmekte ancak esas üretici mikroorganizmalarla gerçekleştirilen

üretimlerdeki verimler elde edilememektedir (Cheng vd., 2016; Chien & Lee, 2007; Kaur & Jayaraman, 2016; Yu & Stephanopoulos, 2008). Bu nedenle Streptokoklar ile gerçekleştirilen HA üretiminde maliyeti azaltmak ve verimi daha yukarı çekme üzerine kurgulanmış çalışmalar önemini korumaktadır.

Fermentasyon yoluyla HA üretiminde Streptokok suşları için karbon kaynağı olarak glukoz ön plana çıksa da sakaroz, nişasta, laktoz ve dekstrin gibi kaynakların üretim maliyetlerini düşürdüğü için tercih edilebileceği bilinmektedir (Boeriu vd., 2013). Bu tez çalışmasında hammadde maliyetinin azaltılması ve literatürdeki boşluğun doldurulması adına karbon kaynağı olarak keçiboynuzu meyvesi ekstraktı kullanılmıştır. Keçiboynuzu bitkisi, üretim hacmi göz önüne alındığında ilk dörtte yer alan ülkemizde gıda endüstrisinde dondurma, çorbalar, peynir, meyve turtaları, konserve etler, şekerleme, fırıncılık ürünleri ve hayvan yemleri olmak üzere oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (Battle & Tous, 1997). Keçiboynuzu bitkisinden üretilen ürünlerin katma değer açısından bakıldığında hak ettiği değeri bulamaması, bu bitkiyi biyoteknoloji alanında değerlendirilebilecek kıymetli bir hammadde olarak öne çıkarmaktadır. İhtiva ettiği yüksek şeker miktarı (yabani tiplerde %28.2-56.48; aşıtlı tiplerde %39.6-82.3) çok sayıda aminoasit (aspartik asit, alanin, glutamik asit, lösin ve valin) ve mineral madde (potasyum, kalsiyum, fosfor ve magnezyum) sebebiyle keçiboynuzu bitkisini fermentasyon ortamındaki mikroorganizmalar için iyi bir besin kaynağı olarak tercih edilmesinin başlıca sebepleri olarak gösterilebilir (Ayaz vd., 2007) (Biner vd., 2007). Bu özellikleri nedeniyle keçiboynuzu bitkisi etanol, sitrik asit, laktik asit, mannanaz, mikrobiyal proteinler vb. gibi katma değeri yüksek ürünlerin fermentasyon yoluyla üretilmesinde karbon kaynağı olarak kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Turhan vd., 2010; Lima-Costa vd., 2012; Haider, 2014; Yatmaz & Turhan, 2018).

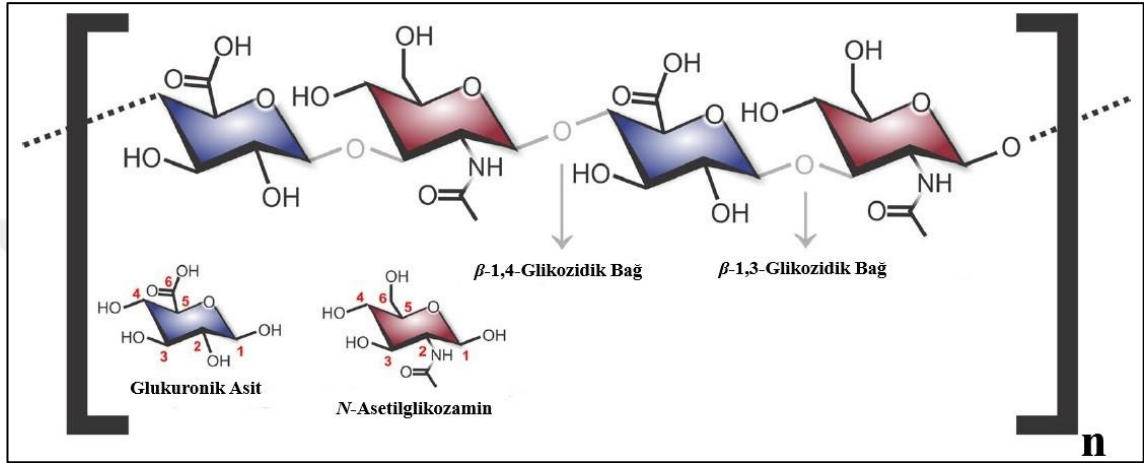
Bu çalışmada keçiboynuzu meyvesi içerdiği zengin şeker miktarı ve mineral maddeler nedeniyle karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Birçok fermentasyonda karbon kaynağı olarak kullanılmasına rağmen literatürde keçiboynuzu meyvesinin HA üretiminde değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu meyvenin ilk kez bu çalışmada değerlendirilecek olması nedeniyle optimum besiyeri bileşimi ile biyoreaktörde gerçekleştirilecek fermentasyonun optimum şartlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) bakterisi ile keçiboynuzu içeren besiyerinde HA üretiminde başlangıç şeker içeriği miktarı ve diğer besiyeri bileşenlerinin (Azot kaynakları, mineraller, iz elementler vb.) optimum bileşimi belirlenmiştir. Besiyeri optimizasyonu sabit sıcaklık ve çalkalama hızında (37°C ve 150 rpm) Placket-Burman yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyeri optimizasyonu sonrasında belirlenen besiyeri içeriği kullanılarak biyoreaktörde HA üretim koşulları optimize edilmiştir. Karıştırma hızı, havalandırma miktarı ve başlangıç hücre yoğunluğu parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiş ve Box-Behnken tasarımı kullanılarak biyoreaktörde HA üretim şartları optimize edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Hyaluronik Asidin Yapısı ve Özellikleri

2.1.1. Hyaluronik asidin yapısı

Hyaluronik asit β -1,3 ve β -1,4 glukozidik bağlarla birbirine bağlanan β -D-glukuronik ve *N*-asetil- β -D-glukozamin disakkarit birimlerinden oluşan düz zincirli bir doğal polisakkarittir (Şekil 2.1) (Fallacara vd., 2018).



Şekil 2.1. Hyaluronik asitin yapısı (de Oliveira vd., 2016)

Yüksek su tutma kapasitesine sahip anyonik bir glukozaminoglikan (GAG) olan HA 10^7 Da molekül ağırlığına ulaşabilmektedir. Yapısından kaynaklanan yüksek su tutma kapasitesi, viskoelastik yapısı, yüksek biyouyumluluğu ve yıkımı sırasında toksik bileşen oluşturmama özelliklerinden ötürü HA oldukça önemli bir bileşen olarak öne çıkmaktadır (de Oliveira vd., 2016).

2.1.2. Hyaluronik asidin fizikokimyasal ve yapısal özellikleri

Yüksek molekül ağırlıklarına ulaşması ve sülfatlanmamış bir biyopolimer olmasıyla diğer GAG'lardan farklılaşan HA hücrelerin plazma membranının iç yüzeyinde sentezlenmektedir. Yapısında bulunan β konfigürasyonundaki monosakkaritlerin içerdiği fonksiyonel grupların moleküler olarak uygun pozisyonlarda bulunması ve bu fonksiyonel grupların barındırdığı hidrojen atomlarının daha az enerji gerektiren eksenel pozisyonlarda olması nedeniyle HA kararlı bir yapıya sahip olmaktadır (Fallacara vd., 2018).

Yapısındaki negatif yüklü karboksil gruplarının Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi pozitif yüklü iyonlarla dengelenmesiyle HA'nın doğal pH derecesinde tuz formları oluşmaktadır. Oluşan bu tuz formuna hyaluronan veya hyaluronat denmektedir. Yüksek hidrofilik özellik gösteren negatif yüklü hyaluronan molekülleri sulu çözeltilerde su molekülleri tarafından sarılmaktadır. Su molekülleri karboksil ve asetamido gruplarına bağlanarak HA'nın heliks yapı oluşturmalarını sağlamaktadır. Daha sonra heliks yapı yeniden katlanarak tersiyer yapıdaki ağ formuna geçmektedir. Bu ağ formunun oluşması molekül

ağırlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Örneğin 10^6 Da molekül ağırlığındaki HA polimeri 1.0 µg/ml gibi düşük konsantrasyonlarda dahi bu ağı oluşturabilmektedir. Molekül ağırlığı ve konsantrasyonun artmasıyla ağ yapısı kuvvetlenmekte dolayısıyla HA'nın sulu çözeltileri giderek artan viskozite ve viskoelastik özellikler göstermektedir. Hyaluronan bir polielektrolit olduğundan sulu çözeltilerdeki HA viskozitesi iyonik güç, pH ve sıcaklık arttıkça belirgin şekilde azalır, bu da polimer zincirleri arasındaki etkileşimlerin zayıfladığını göstermektedir (Fallacara vd., 2018).

HA çözeltileri newtonian (newtonsal) olmayan, psödoplastik ve viskoelastik akış karakteri sergilemektedir. Psödoplastik profil incelendiğinde kayma oranı arttıkça moleküller arası hidrojen bağının koptuğu ve polimer zincirlerin deforme olduğu görülmektedir. Bu artış sonucunda HA'nın viskozitezi düşmektedir. Bununla birlikte kayma oranı düştükçe tiksotropik özellik göstermeyen HA çözeltileri orijinal yapıya geri dönmekte ve başlangıçtaki viskoz yapısını korumaktadır. Bu nedenle, polimerik ağın tahrip edilmesi geçici ve geri dönüşümlüdür. Bu karakteristik ve önemli reolojik özellikleri nedeniyle HA medikal, farmakolojik, gıda ve kozmetik alanlarındaki uygulamalarda önemli bir yere sahip olmaktadır (Fallacara vd., 2018).

2.2. Hyaluronik Asidin İnsan Vücudundaki Önemi

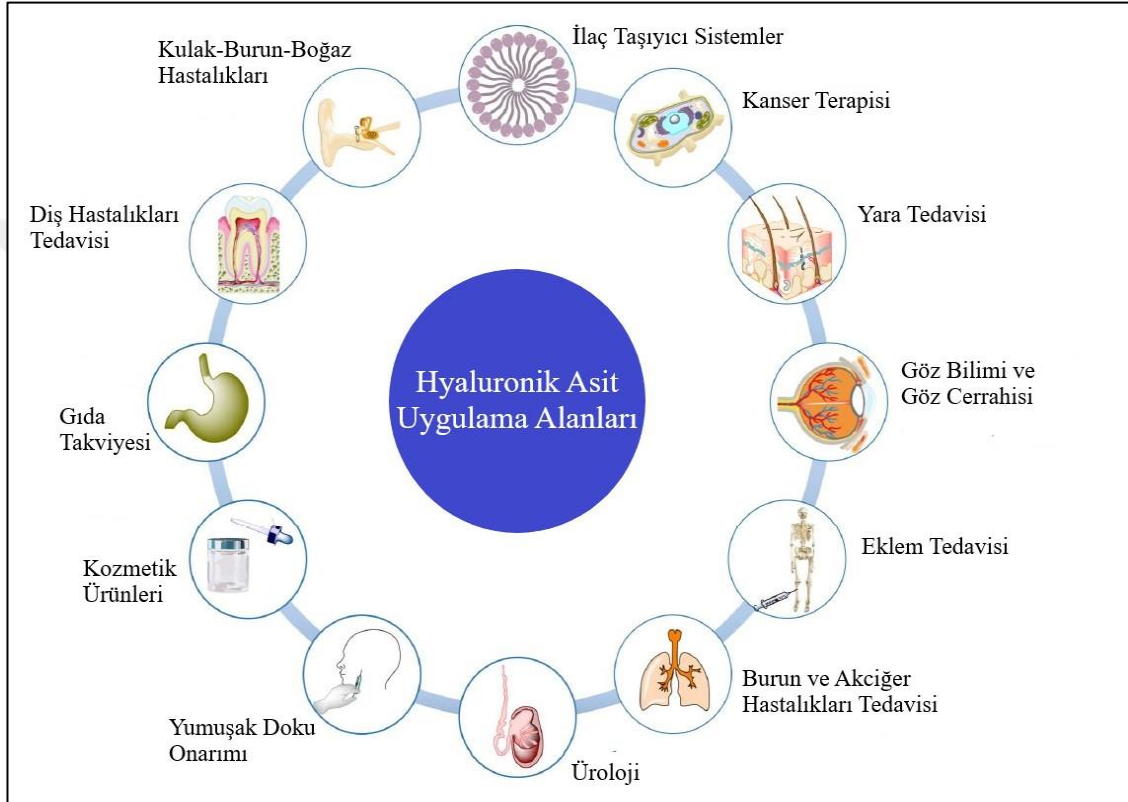
HA çoğunlukla Streptokoklar olmak üzere birçok mikroorganizmada, bunun yanında başlıca tavşan, horoz ve sığır olmak üzere hayvanlarda da bulunmaktadır. Birçok canlıda doğal olarak var olan ve bununla birlikte 70.0 kg ağırlığındaki yetişkin bir insanın vücudunda yaklaşık olarak 15.0 g HA bulunduğu göz önüne alındığında, HA insan vücudu için oldukça önemli bir biyopolimer olarak öne çıkmaktadır (Fallacara vd., 2018).

Su içeren ortamlarda 1000 katına kadar genişlemesi ile molekül ağırlığı ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen reolojik özellikleri nedeniyle HA vücut içerisindeki biyolojik fonksiyonu ve hücresel dağılımı çeşitlilik göstermektedir (Marcellin vd., 2014). HA genellikle insan vücudundaki tüm organlarda bulunmakla birlikte hücrelerin dış yüzeyini kaplayacak şekilde ve bağ dokuların hücre dışı matrislerinde bulunmaktadır. HA genellikle kıkırdak dokularda, eklem sıvılarında, göbek bağı kordonunda bulunur ve doku homeostazının korunmasından sorumludur. İnsan vücudunda bulunan tüm HA'nın %50.0'si insan derisinde (Epidermis ve Dermis) yer almaktadır. Buna ilave olarak sinoviyal eklem sıvısı (3.0-4.0 mg/mL) ve gözün vitrioz tabakası (0.1 mg/mL) önemli miktarda HA içermektedir (de Oliveira vd., 2016; Fallacara vd., 2018).

Bu biyopolimer direkt olarak iyileşme süreci, embriyogenez, inflamasyon, metastaz veya tümör ilerleme fenomeni ve anjiyogenez gibi süreçlerde rol oynamaktadır. HA'nın bir başka yaygın özelliği ise ökaryotik organizmalarda cildin pürüzsüzlüğünü sağlamasıdır. Yaşlanma ile birlikte HA üretiminin azaldığı, bunun sonucunda cilt dehidrasyonuna ve elastikiyet kaybına yol açarak kırışıklıkların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Gold, 2009; de Oliveira vd., 2016).

2.3. Hyaluronik Asidin Uygulama Alanları

Sahip olduğu biyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri ile HA ve türevlerinin birçoğu çeşitli tıbbi, farmasötik, gıda ve kozmetik uygulamaları için uygun ve güvenilir biyomateryaller olarak öne çıkmaktadır. (Şekil 2.2). Bazı HA bazlı ürünler piyasada bulunup halihazırda çeşitli uygulamalarda kullanılırken, bir kısmının etkinliklerinin doğrulanması için ise daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Fallacara vd., 2018).



Şekil 2.2. Hyaluronik asidin kullanım alanları (Fallacara vd., 2018)

2.3.1. İlaç taşıyıcı sistem olarak hyaluronik asit

HA kimyasal olarak ilaçlara veya ilaç taşıyıcı ajanlara bağlanabilmektedir. HA ilaç bileşimlerinin oluşturulmasında, ilaçların miseller gibi kolloidal taşıyıcılarla veya nanoteknoloji ile türetilmiş parçacıklarla birleştirilmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır. En önemli avantajı ise ilaçların polisakkaritler ile doğrudan veya bir ilaç taşıyıcısı kullanılarak birleştirilmesini kolaylaştırmasıdır. Bu sayede ilaç tüketimi sırasında herhangi bir çözünme probleminin üstesinden gelmektedir. HA'nın bir diğer avantajı ise biyofarmasötik özellikleri sayesinde polietilenglikole benzer şekilde bir etki göstererek birçok ilacın kandaki yarılanma süresini iyileştirmesi ve vücuttan atılma süresini yavaşlatması olarak öne çıkmaktadır (Han vd., 2015).

HA'nın ilaç taşıma sistemlerinde etkili olmasının dışında tümör işaretleyicisi olarak kullanılabilme potansiyeli önemli kanser tedavisi uygulamalarında bir avantaj

sağlamaktadır. Artırılmış farmakokinetik özellikleri sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde kullanıldığında tümörlü dokulara ilaç dağılımının kolaylaşmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bir tümör reseptörü olan CD44'e bağlanabilme yeteneği ile HA, bu reseptörün fazlaca üretildiği tümör hücrelerinde ilaç seçiciliğini artırabilmektedir (Dosio vd., 2016).

2.3.2. Hyaluronik asidin ortopedik uygulamaları

Sinovyal sıvı, eklem kapsülü ve eklem kıkırdağında doğal olarak bulunan HA, ortopedi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu biyopolimer esas olarak osteoartrit veya romatoid artrit gibi eklem hastalıklarının tedavisinde doğrudan tercih edilmektedir. Yüksek moleküler kütleli HA eklemlerde bariyer görevi gören enflamatuar hücrelerin kemotaksi ve madde geçirgenliğini azaltarak serbest radikallere karşı koruma sağlamaktadır (Gupta vd., 2005).

Deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmada eklem içerisine HA uygulamasının eklem kıkırdağının onarım sürecinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. HA'nın eklem yüzeylerinin tamamen yenilenmesinde tek başına etkisi olmasa da ağrıyı azaltarak ve antienflamatuar ajanların gereğinden fazla kullanılmasının önüne geçmektedir (Salwowska vd., 2016).

Sinovyal sıvı azaldığında veya iltihaplandığında ve HA seviyesi azaldığında, romatoid artrit ve osteoartrit gibi bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Bu bozuklukları tedavi etmek veya yavaşlatmak için lokal olarak dokulara HA enjekte edilmektedir. HA'nın, sinovyal sıvı viskoelastisitesinin restorasyonu için, birden fazla mekanizma ile hareket ettiği ve uzun süreli klinik faydalar sağladığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Bowman vd., 2018).

HA'nın eklem sıvısına enjeksiyonun terapötik etkisi, sinovyal hücrelerde yeni HA sentezinin uyarılması ve kıkırdak degradasyonunun azalması gibi biyolojik aktiviteler nedeniyle yaygın olarak gözlemlenmektedir. Ayrıca enjeksiyondan sonra yarılanma ömrünü ve sonuç olarak terapötik etkinliği arttırmak için, çapraz bağlı HA türevleri geliştirilmiş ve eklem içi kayganlaştırıcı sıvı enjeksiyonları olarak piyasaya sürülmüştür (Bowman vd., 2018; Fallacara vd., 2018).

2.3.3. Göz biliminde hyaluronik asit uygulamaları

HA insan gözünün vitröz gövdesi, gözyaşı bezi, korneal dokuları ve gözyaşı sıvısında bulunan doğal bir bileşendir. Bu nedenle, HA bazlı göz sağlığı ürünleri tamamen biyoyumludur ve vücudun vereceği karşıt reaksiyonları tetiklemez (Schanté vd., 2011; Fallacara vd., 2017; Fallacara vd., 2018).

HA'nın göz hastalıkları tedavisinde hem önleyici hem de operasyonel açıdan birçok uygulaması bulunmaktadır. Viskoelastik özelliklerinden dolayı sıklıkla kayganlaştırıcı ajan ve yapay gözyaşı formülasyonlarında ana bileşen olarak yer almakta ve kuru gözün rahatlatılmasında kullanılmaktadır. HA göz tedavilerinde uygulandığında tahrişi azaltmakta, gözü nemlendirmekte ve gözyaşı filmindeki sodyum hyaluronat eksikliklerini gidermektedir (Salwowska vd., 2016).

Günümüzde kontakt lens kullanan bireylerin %50'sinden fazlası göz kuruluğu şikayetiyle kontakt lens kullanımından vazgeçmekte ya da göz damlası kullanmaktadır. Çoğu göz damlası çözeltilerinin yapay bileşenler ve koruyucu maddeler içermesinden dolayı genellikle bir koruyucu madde gerektirmeyen HA solüsyonları göz kuruluğunu gidermek için tercih edilmektedir. Ayrıca yine yapay göz yaşı damlalarında sıvı genellikle gözün yüzeyinde eşit olarak dağılmamakta ve bulanık görmeye neden olabilmektedir. Buna karşılık HA, viskoelastik ve hidrofilik özellikleri sayesinde sürtünmeyi azaltmakta ve gözyaşlarının buharlaşmasını yavaşlatmaktadır. Ek olarak su yerine HA'nın kullanıldığı ürünlerin konjonktival kan damarlarını genişletmemesi sayesinde kış mevsimlerinde güvenle kullanılabilirler (Maltese vd., 2006; Kogan vd., 2007).

HA ayrıca göz cerrahisinde önemli bir rol oynamaktadır. Genellikle ameliyat sonrası iyileşmesinin hızlandırılması ve hastanın rahatlaması için uygulanmaktadır. Trabekülektomi işleminde, katarakt operasyonlarında, glokom uygulamalarında, refraktif cerrahide ve korneal plastik cerrahi işlemlerinde gibi gözün ön bölgesinde gerçekleştirilen operasyonlar sırasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Salwowska vd., 2016).

2.3.4. Hyaluronik asidin estetik ve dermatolojik uygulamaları

Birçok araştırmacı tarafından cilt gençleştirme için HA bazlı formülasyonların kozmetik ve nutrikozmetik etkilerini araştırılmıştır. Bu araştırmalar HA'nın kırışıklıklar, nazolabial kıvrımlar ve cilt yaşlanması gibi çeşitli cilt kusurlarını düzeltmede dikkate değer kozmetik ve nutrikozmetik etkiler sergilediğini ortaya koymuştur. Cilt kusurlarını gidermek için HA çeşitli formlarda (jeller, kremler, deri altı dolgu enjeksiyonları, dermal dolgu maddeleri, yüz dolguları, losyon, serum ve implantlar vb.) kullanılmıştır. HA'nın kozmetik ve nutrikozmetik etkileri, yumuşak doku büyütme, cilt hidrasyonu, kollajen uyarımı ve yüz gençleştirme özellikleri ile ilişkilendirilmiştir (Bukhari vd., 2018).

HA'nın tuz formu olan sodyum hyaluronat genellikle etkili olarak ağız ve burun çevresindeki kırım ve kırışıklıkların düzeltilmesi, yatay alın kırışıklıklarının hafifletilmesi, kaşların kaldırılması, burnun konumlandırılması, dudakların şeklinin ve hacminin değiştirilmesi, yanakların, çenenin, vücut hatlarının şekillendirilmesi (göğüslerin genişletilmesi ve modellenmesi, uyluk, kalça) gibi işlemlerde kullanılmaktadır (Salwowska vd., 2016).

Amerikan Plastik Cerrahlar Derneği'nin (ASPS) verileri incelendiğinde, 2018 yılında gerçekleştirilen yumuşak doku dolgu tedavisinin yaklaşık %80'inin HA içeren dermal dolgularla yapıldığı görülmektedir (Anonim, 2018). Bu kadar çok sayıda kullanılmasının başlıca nedenlerinden biri HA içeren dermal dolguların etkisinin tersine çevrilebilir nitelikte olmasıdır. Çünkü olası bir tıbbi hata veya komplikasyon HA enjeksiyonu ile giderilebileceğinden, kusurlar geri dönüşümlü bir şekilde düzeltilebilmektedir (Fallacara vd., 2018).

HA, kozmetik formülasyonlarda (jeller, emülsiyonlar veya serumlar) yaygın olarak kullanılan nemlendirici bir aktif bileşen olarak öne çıkmaktadır. HA nemlendirme etkisinin büyük ölçüde molekül ağırlığına, uzun ömürlülüğünün ise hyaluronidaz enzimlerine karşı stabilitesini koruyabilme gücüne bağlı olduğu düşünülmektedir. Cilde uygulanan yüksek molekül ağırlıklı HA içeren ürünler esas olarak film oluşturunca bir

polimer olarak çalışmaktadır ve böylece nemi bağlayarak cilt yüzeyinin nemli kalmasını sağlamaktadır (Nobile vd., 2014; Janiš vd., 2017; Fallacara vd., 2018).

2.3.5. Hyaluronik asidin gıda uygulamalarında kullanılması

Tüm bu uygulamalarının yanında son yıllarda HA'nın bir gıda ürünü olarak var olan gıdalara ilave veya toz, kapsül vb formlarda doğrudan tüketildiğinde etkili olup olmadığı araştırılmaktadır. HA, kullanım olarak bazı farklılıklarla ABD, Kanada, Avrupa ve Asya'da (özellikle Kore ve Japonya'da) gıda takviyesi olarak pazarlanmaktadır. Örneğin ABD ve Avrupa'da eklem ağrısı tedavisi, Japonya da ise kırışıklık tedavisi ve cildi nemlendirmek için kullanılan gıda takviyeleri bulunmaktadır. Ancak özellikle gastrointestinal sindirimde parçalanmadan vücuda alınıp alınmadığı ve vücut üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar halen az sayıda olsa da bu konuya olan ilgi artmaktadır (Fallacara vd., 2018).

Aşağıda bu konu üzerine gerçekleştirilen bazı çalışmalardan örneklere yer verilmiştir.

Deney hayvanları (sıçanlar) üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 300 Da ila 2 kDa molekül ağırlıklarında değişen HA'nın oral alımı sonrasında bozulma ve emilim süreçleri incelenmiştir. HA'nın vücuda alındıktan sonra bağırsakta olisakkaritlere parçalandığı ve kalın bağırsaktan emilerek kana geçtiği ardından cilde yayıldığı gözlemlenmiştir (Kimura vd., 2016). Başka bir çalışmada, işaretlenmiş yüksek molekül ağırlıklı (1.0 MDa) HA'nın sıçanlarda ve köpeklerde oral uygulamadan sonra emilimi, dağılımı ve salgılanması incelenmiştir. Çalışma sonucunda gıda olarak tüketilen HA'nın bağ dokulara ulaşabileceği gösterilmiştir. Özellikle bu sonuçlar, oral yoldan alınan HA'nın az miktarda da olsa eklemlere, kemiklere ve cilde ulaşabileceğini, böylece eklem ve cilt sağlığı için HA bazlı gıda takviyelerinin kullanılabileceğini göstermiştir (Sato & Iwaso, 2009).

Bir diğer çalışmada 12 hafta boyunca hafif diz ağrısı bulunan hastalara horoz ibiği ekstraktından elde edilen HA içeren düşük yağlı yoğurtlar verilmiş ve erkek hastalarda kas gücünde önemli bir iyileşme gözlemlenmiştir (Solà vd., 2015). Biyotin, C vitamini, bakır ve çinko içeren konsantre bir gıda takviyesine seyreltilmiş HA ilave edilmiş ve bu gıda takviyesi yirmi kadın deneğe 40 gün boyunca sunulmuştur. Deney sonucunda bireylerin ciltlerinde önemli ölçüde yaşlanma karşıtı (anti-aging) gelişimler gözlenmiştir (Göllner vd., 2017). Bunların dışında sadece HA içeren gıda takvilerinin vücut üzerindeki etkisinin sindirimle doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Kawada, vd. (2014) gıda takviyesi olarak tüketilen HA'nın ultraviyole ışınlar, sigara kullanımı ve kirletici maddelerden kaynaklanan cilt kuruluklarına karşı nemlendirici katkısını gösteren çalışmalar bulunduğunu raporlamışlardır. Aynı çalışmada günde 37.52-240 mg arasında değişen miktarlarda HA'nın 4-6 hafta süresince tüketilmesi durumunda cilt nemini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Kuru cilde sahip 61 denek üzerinde yapılan bir çalışmada, altı hafta boyunca iki farklı molekül ağırlığındaki (800 kDa ve 300 kDa) HA'nın 120 mg/gün miktarında tüketilmesinin etkilerini araştırılmıştır. Her iki molekül ağırlığındaki HA da pozitif etki göstermekle birlikte, 300 kDa molekül ağırlıklı HA'nın deneklerde bulunan cilt kuruluğu üzerinde en iyi gelişmeleri gösterdiği belirtilmiştir (Kawada, Yoshida, Yoshida, Sakamoto, vd., 2014). HA'nın oral uygulamaları ile topikal ve injektif uygulamalarının birleştirilmesi, cilt yaşlanmasının

kontrolünde oldukça başarılı olabilmektedir. Deney fareleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, oral yoldan uygulanan HA'nın yaklaşık % 90'ının sindirim sisteminden emildiğini ve farelerin derisine ulaşarak ve böylece cilt kuruluğunu azaltabileceği kanıtlanmıştır (Oe vd., 2014).

Sonuç olarak oral yolla tüketilen HA'nın sadece cilt için değil, aynı zamanda eklemler için de faydalı olabileceği ve diz ağrısının tedavisi, eklem iltihaplarının hafifletilmesi ve kas diz kaslarının güçlendirilebileceği bir dizi çalışma ile kanıtlanmıştır (Oe vd., 2015).

2.3.6. Hyaluronik asidin diğer uygulama alanları

Önceki bölümlerde bahsedilen kullanım alanları ağırlıklı olarak HA uygulamaları için tercih edilmekle birlikte bunların dışında HA ile gerçekleştirilen sağlık üzerine etkili başka uygulamalar da bulunmaktadır.

Vücuttan salgılanan HA solunum yolu salgılarının önemli bir bileşeni durumundadır. Üst ve alt solunum yollarının homeostazisinde önemli bir rol oynayan HA, antienflamatuar ve anti anjiyojenik eylemleri gerçekleştirmek; hücre dışı matrisini düzenlemek, bağ dokuları stabilize etmek, iyileşme süreçlerini sürdürmek ve dokuların hidrasyonunu düzenlemek önemli görevleri üstlenmektedir. Bu nedenle, dışarıdan alınan HA, alerjik ve alerjik olmayan rinit, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve kistik fibroz gibi iltihaplanma, oksidatif stres ve epitel dokunun yeniden şekillenmesini içeren burun ve akciğer hastalıklarının tedavisi için umut verici bir terapötik ajanı temsil etmektedir (Fallacara vd., 2018).

HA kırışıklık karşıtı, yaşlanma karşıtı ve ağız ve burun kıvrımlarındaki kırışıklıkları önlemek gibi etkilerinin yanı sıra yumuşak dokuların çoğalmasında, cildin yüzeyinin büyümesinde, yüz gençleştirme uygulamalarında, cilt parlaklığını düzenlemede ve kolajen uyarıcı olarak dikkate değer bir potansiyel göstermiştir (Bukhari vd., 2018; Duranti vd., 1998).

HA, solunum organı skleroproteinini enflamasyondan korumak amacıyla akciğerlerde bol miktarda bulunur. Bir çalışmaya göre HA, bir ilacın solunum organlarına dağılımında kullanılabilmekte ve ilacın sürekli salınımı sağlayarak tutulma süresini uzatabilir (Vasvani vd., 2019).

2.4. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri

HA sahip olduğu biyouyumluluk, biyobozunurluk, su tutma kapasitesi, viskoelastisite gibi biyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde ilk izole edilmesinden günümüze kadar birçok farmasötik, tıbbi, gıda (içecek, gıda takviyesi, gronala bar vb.) ve kozmetik uygulamasında önemli ölçüde kullanılmaktadır. Bu nedenle, yüksek kalite standartlarını karşılayan, verimli ve erişilebilir maliyetlerle HA elde etmek için üretim süreçlerinin optimize edilmesi üzerinde literatürde yapılmış ve yapılmakta olan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu süreçte hem HA'nın elde edilme yöntemi hem de saflaştırma prosesi molekül ağırlığı, saflığı, verimi ve maliyeti açısından eşit derecede önemli olmaktadır. Dolayısıyla, yüksek verim ve daha az maliyetli yöntemlerle yüksek

kaliteli HA üretmek, bu biyopolimerle ilgili araştırma alanlarında karşılaşılan en büyük zorluk olarak öne çıkmaktadır (Fallacara vd., 2018).

Bu doğrultuda endüstriyel olarak HA üretimi iki temel yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler, HA'yı doğal olarak vücutlarında barındıran hayvanlardan ekstrakte edilmesi ve HA'yı doğrudan sentezleyebilen mikroorganizmalar veya rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak üretilmesi şeklinde sıralanabilir.

2.4.1. Hayvansal kaynaklı hyaluronik asit üretimi

İlk kez sığır vitröz mizahından izole edildiği 1930 yılından bu yana, HA'nın üretimi insan göbek kordonu, horoz ibiği ve sığır sinovyal sıvısı dahil olmak üzere hayvan dokuları ekstrakte edilerek yaygın şekilde gerçekleştirilmiştir (Sze vd., 2016). Bunlar arasında, horoz ibiği bilinen en yüksek HA konsantrasyonuna (7.5 mg/g) sahip olması nedeniyle HA üretimi için en çok tercih edilen hayvan dokusu olmaktadır. Her ne kadar barındırdığı HA miktarı yüksek olsa da biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için hayvan kaynaklı HA kullanımını güçlü bir şekilde sınırlayan çeşitli teknik ve etik endişeler bulunmaktadır (Gallo vd., 2019).

Hayvansal dokulardan HA izolasyonu öğütme, asidik işlemler ve organik çözücülere maruz kalma gibi zorlu işleme koşullarını ve biyolojik kontaminasyonu önlemek için çeşitli saflaştırma aşamalarını içermesi nedeniyle karmaşık ve zaman alıcıdır. Bu dokularda genellikle HA'ya bağlı olarak bulunan proteoglikan ve hiyalüronidaz enziminin ekstraksiyon işlemi sırasında uzaklaştırılması gerekmektedir. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen HA'da bu bileşenlerin kalıntısı olması durumunda, HA'nın uygulanacağı bireylerde bağışıklık tepkisi gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle saflaştırma prosesi titizlikle uygulanmalıdır. Ekstraksiyon ve saflaştırma prosesinin ağır protokollerle gerçekleşmesi nedeniyle HA kısmi olarak degradasyona uğrayabilmekte ve bu durum daha düşük kalitede ürün elde edilmesiyle sonuçlanabilmektedir (Boeriu vd., 2013; Gallo vd., 2019).

Üretim prosesinde karşılaşılan zorluklara ilave olarak hayvansal kaynaklarda bulunması muhtemel bulaşıcı bileşenler (nükleik asitler, prionlar veya virüsler) ekstrakte edilen HA'yı kontamine edebilmekte ve bu bileşenler bulaşıcı hastalıkların bireylere sıçraması ihtimalini doğurmaktadır. Son olarak, hayvansal kökenli ürünlerin kullanımı ile ilgili artan etik endişe, endüstriyel olarak hayvansal kaynaklı HA üretimi için caydırıcı bir unsur oluşturmaktadır.

Hayvansal kaynaklı üretimde karşılaşılan yüksek maliyet, uzun süreli ve ağır ekstraksiyon prosesi, biyolojik tehlikeler ve etik sorunlar nedeniyle HA üretimi için düşük maliyetli, görece daha kolay saflaştırma prosesi gerektiren ve modifiye edilebilir olan biyoteknolojik üretim yöntemleri gün geçtikçe daha çok ön plana çıkmaktadır. (Sze vd., 2016).

2.4.2. Biyoteknolojik yöntemlerle hyaluronik asit üretimi

Günümüzde ticari HA genel olarak biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilmektedir. Mikroorganizmalar kullanılarak üretilen HA insan vücudu ile biyolojik olarak uyumludur, çünkü HA'nın yapısı farklı türler arasında büyük ölçüde korunmuştur.

Lancfield A ve C grup Streptokok suşları HA üretimi için kullanılan ilk bakteri olmuştur ve günümüzde birçok ticari ürün *Streptococcus sp.* kullanılarak üretilmektedir (Fallacara vd., 2018).

Streptokoklar, hücre dışı kapsülle çevrili, spor oluşturmayan, hareketsiz Gram pozitif bakteriler olarak tanımlanabilmektedir. Streptokokların doğal suşları olan, *Streptococcus equisimilis* (bir hayvan patojeni), *S. pyogenes* (bir insan patojeni) ve *S. uberis* (sığırlarda bir patojen) bakterileri HA için doğal üretici konumundadırlar. Bununla birlikte, bunlar arasında, *Streptococcus equi subsp. equi* ve *S. equi subsp. zooepidemicus* yaygın olarak kullanılan üretici mikroorganizmalar olarak öne çıkmaktadır (Sze vd., 2016).

Streptokokların HA üretim metabolizması incelendiğinde (Şekil 2.3) HA sentezi sadece hücre zarı üzerinde bulunan hyaluronan sentaz enzimlerinin (HAS) etkisiyle değil, aynı zamanda üridin difosfat-glukoz (UDP) öncüllerini üreten sitoplazmik enzimlerin katılımıyla da mümkün olmaktadır (Viola vd., 2008).

Hyaluronik asit sentezi;

- Glukoz molekülünün hücre içine girmesiyle başlamaktadır. (ABC trans-membran proteini aracılığıyla)
- Hücre içine alınan glukoz heksokinaz enzimleri aracılığıyla glukoz-6-fosfat'a dönüşmektedir.
- Oluşan glukoz-6-fosfat birimleri iki farklı metabolik yolda kullanılmak üzere UDP-GlcUA veya UDP-GlcNAc birimlerine dönüşmektedir.
- Disakkarit birimlerinden oluşan lineer hyaluronik asit yapısını oluşturmak için UDP-glukoz öncülleri HAS enzimleri tarafından substrat olarak kullanılmaktadır.
- Tekrarlanan disakkarit birimlerin indirgen uçlarına GlcUA veya UDP-GlcNAc birimleri β -1,3 ve β -1,4 glukozidik bağlanarak düz zincirli hyaluronik asit polimerini oluşturmaktadır.

Biyosentez sırasında çok miktarda aracı molekül oluşmasında ötürü HA üretimi hücrenin fazla enerji tüketmesine neden olmaktadır. Ayrıca bazı aracı molekülün (örn. UDP-GlcNAc), hücre duvarı biyosentezi gibi hücresel işlemlerde yer alması, HA sentezi ile rekabet eden diğer hücresel aktivitelerin olduğunu göstermektedir. Bu durum HA üretimini sınırlandıran unsurlardan biri olarak kabul edilebilmektedir (Gallo vd., 2019; Shah vd., 2013).

Fermentasyon için gerekli olan işlemler (up-stream) ve fermentasyon sonrası işlemler (down-stream) HA üretimi için ayrı ayrı önemli basamaklar konumundadır. Mikroorganizmanın seçimi, besiyeri içeriğinin belirlenmesi ve üretimin optimize edilmesi üretilen HA'nın özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Üretim fermentasyonunun sonrasında elde edilen HA'nın karakterize edilmesi, saflaştırılması ve molekül ağırlığının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle tez kapsamında kromatografik miktar tayini yanısıra moleküler eleme (size-exclusion) kromatografisiyle üretilen HA'nın sahip olduğu moleküler aralıklar da belirlenmeye çalışılmıştır.

HA'nın karmaşık biyolojik fonksiyonları, sahip olduğu boyuta, hidrodinamik hacmine, moleküler dizilimine ve esas olarak ortalama moleküler ağırlıklarına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin HA'nın kozmetik veya farmasötik kullanımı ortalama moleküler ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir. Bununla birlikte, fermantasyon yoluyla elde edilen HA'nın monodispers moleküler ağırlık dağılımı olmamaktadır. Bu nedenle moleküler ağırlık dağılımını ve çeşitli saflaştırma prosedürlerinden nasıl etkilendiğini bilmek çok önemlidir.

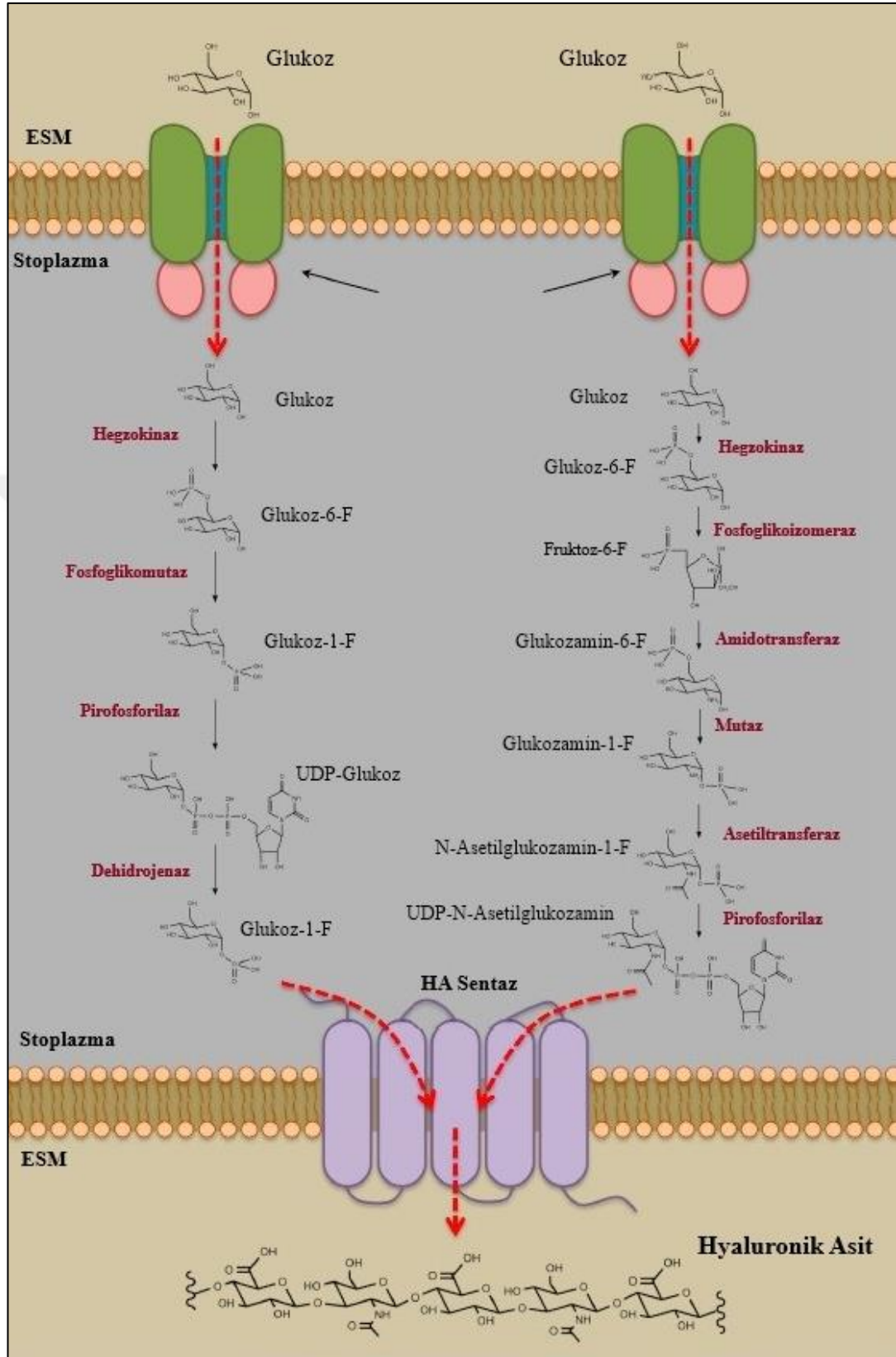
Viskozimetri, jel elektroforezi, kılcal elektroforez ve kromatografik yöntemler gibi HA molar kütesinin dağılımını değerlendirmek için çeşitli yöntemler literatürde yer almaktadır. Kromatografik yöntemler, özellikle moleküler eleme, makromoleküllerin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak ayrılmasında iyi performans göstermektedir. Moleküler eleme, maddelerin boyutlarının veya hidrodinamik hacimlerinin farklılıklarına dayanan bir kromatografik ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, durağan faz, belirli bir gözenek boyutu dağılımına sahip olan inert materyallerden oluşmaktadır. Sonuç olarak, farklı boyutlardaki polimerlerden oluşan bir karışımda, gözeneklerden daha büyük boyutlara sahip olan moleküller durağan fazla etkileşime girmeyerek kolondan önce çıkmaktadır. Öte yandan, daha küçük moleküller durağan fazın gözeneklerinde bulunan uzantılara nüfuz ederek kolondan daha geç çıkacaktır (Sousa vd., 2009). Böylelikle farklı moleküler dağılım gösteren (HA vb.) materyaller için başarılı bir moleküler ayırma gerçekleştirilmektedir. Bu doğrultuda tez kapsamında SEC kolon kullanılarak üretilen HA'nın moleküler ağırlık aralıkları belirlenmiştir.

Öte yandan kromatografik tekniklerle molekül ağırlığı belirlenen HA gibi polimerlerin preparatif kromatografi yöntemleriyle saflaştırılması, fraksiyonlarına ayrılması ve farklı fraksiyonlar halinde toplanması sağlanabilmektedir. Bu yöntemlerle yüksek seçiciliği olan kolonlar kullanılarak istenilen moleküller, büyük veya küçük ölçekli olarak ayrılabilir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilen preparatif analizler (preparatif HPLC), analitik analizlere göre farklı donanımlara ihtiyaç duymaktadır. Preparatif olarak ayrılacak materyale göre seçilen kolonlar, analitik kromatografiye kıyasla daha büyük iç çapa sahip olmaktadır. Genellikle plaka sayısı kolon çapı büyüdükçe artmaktadır. Ayrıca bu kolonların ayırma işlemi sırasında yüksek akış hızlarına maruz kaldığı için yüksek basınçlara (Örn. 3000 psi) dayanıklı olması gerekmektedir. Analitik kromatografiden farklı olarak ayırma işlemi gerçekleşmesinden ötürü preparatif HPLC sistemlerinde pompa donanımı farklılaşmaktadır. Özellikle gerekli olan akış hızlarına çıkabilmek için (genellikle 10-50 mL/dk) büyük hacimlerde mobil faz rezervuarlarına ihtiyaç olmaktadır. Bu analizin yalnızca ayrılması istenen bileşene odaklı gerçekleşen bir analiz olması nedeniyle hassas saptama yapan dedektörler yerine büyük konsantrasyonlardaki bileşenleri saptayabilecek dedektörler tercih edilmektedir. Ayrıca preparatif kromatografi ile gerçekleştirilen ayırmalarda fraksiyon kolektörünün cihaza entegre olması gerekmektedir. Tüm bunlara bakılarak, saflaştırma işlemi oldukça masraflı ve uzun çalışma süreleri gerektiren HA için preparatif kromatografi iyi bir alternatif olarak yer almaktadır (DeStefano & Kirkland, 1975).

Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında Sousa vd. (2009) HPLC sisteminde Shodex OHPak SB806M HQ (300×7.8mm I.D.) ve yarı-preparatif Superose 6 10/300GL (300×10mm I.D.) kolonlarıyla oluşturdukları moleküler eleme (SEC) kromatografisi ile molekül ağırlığı 10^5 Da'nın üzerinde olan HA fraksiyonlarını neredeyse hiç protein kontaminasyonu olmadan saflaştırmışlardır. Bu doğrultuda tez kapsamında HA'nın

kromatografik olarak analizi için kullanılan kolonun birkaç eklentiyle preparative kromatografiye uygun hale getirilebilmektedir. Bu sayede, tez kapsamında gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar ileride gerçekleştirilebilecek HA'nın kromatografik olarak saflaştırılması ve fraksiyonlarına ayrılması gibi çalışmalar için temel olacaktır.





Şekil 2.3. Bakteriyel hyaluronik asit sentezi (Gallo vd., 2019)

HA'nın ilk izole edildiği zamandan günümüze kadar üretim miktarını artırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda fermentasyon ortamının geliştirilmesi, daha yüksek üretkenliğe sahip olan suşların araştırılması ve ekstraksiyon sürecinin optimizasyonu gibi birçok deneme gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte kesikli fermentasyonlarda HA verimi 300-400 mg/L'den 6-7 g/L'ye yükseltilebilmiştir. Bu çalışmalar spesifik olarak HA üretim optimizasyonu, verimin iyileştirilmesi, moleküler ağırlığın artırılması ve polimer polidispersitesinin azaltılması üzerine yoğunlaşmıştır (Kim vd., 1996).

Doğal üreticiler olan Streptokoklar ile HA biyosentezi büyük miktarda enerji gerektirmektedir. Bu durumda ortamda bulunan karbon kaynağı için (glukoz) hücre büyümesinde enerji sağlayıcı veya UDP-şeker öncüsü olarak kullanımı için bir rekabet söz konusu olmaktadır. Örneğin ortamda sınırsız glukoz varlığında optimum koşullarda (pH:7.0 ve 37°C) bakteriyel gelişim maksimum olmaktadır. Ancak en yüksek HA miktarı ve molekül ağırlığına hücre gelişiminin en düşük olduğu koşullarda ulaşılmaktadır. Bunun nedeni hücreler yavaş geliştiğinde karbon ve enerji kaynaklarının üretim süreçleri için kullanılabilmesidir (D. Armstrong vd., 1997). Ortamdaki şekerin sınırlı miktarda olması önce HA üretimini sonra da molekül ağırlığını düşürmektedir (Chong vd., 2005).

Fermentasyon ortamındaki oksijen varlığı da yine aynı şekilde üretim miktarı ve molekül ağırlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır. Aerobik koşullarda HA verimi ve moleküler ağırlığı %50 artarken, hücre gelişimi etkilenmemektedir (D. Armstrong vd., 1997; Cooney vd., 1999; Huang vd., 2006). Aerobik fermentasyon koşulları altında Streptokoklar laktat metabolizması yerine asetat, format ve etanol metabolizmalarını tercih etmektedirler. Bu durumda, laktat metabolizmasında oluşan iki ATP molekülü yerine asetat metabolizmasında heksoz başına dört ATP molekülü üretilmektedir. Artan ATP miktarlarının veya hücre içinde fazla olan NADH miktarının oksijen varlığıyla azalması sonucu HA üretiminin arttığı düşünülmektedir (Chong & Nielsen, 2003). Yapılan çalışmalarda hücre gelişimi sırasında HA verimini artırmak için %5'lik kritik bir çözünmüş oksijen seviyesine ihtiyaç olduğu ve bu değer üzerinde verimin sabit kaldığı görülmüştür (Huang vd., 2006). Bu durum da HA miktarının, *S. zooepidemicus* bakterisinde HA sentaz enziminin aerobik koşullar altında anaerobik koşullara göre dokuz kat daha yüksek olmasıyla açıklanabilmektedir (Duan vd., 2009).

HA üretiminde çoğu fermentasyonda olduğu gibi besiyeri bileşimi, pH, sıcaklık, havalandırma ve karıştırma hızı oldukça önemlidir. Hem karıştırma hızı hem de fermentasyon stratejisi HA üretimi üzerinde oldukça karmaşık bir etkiye sahiptir. Artan karıştırma hızı aerobik ya da anaerobik fermentasyonla üretilen HA'nın verimini artırmaktadır. Bunun nedeni besiyerinde artan viskozitenin karıştırma işlemi ile azalması ve kütle transferinin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Boeriu vd., 2013). Bununla birlikte, HA'nın molekül ağırlığı kütle transferine bağlı olarak yükselmektedir. Ancak aerobik koşullardaki fermentasyonlarda yüksek karıştırma hızlarında molekül ağırlığı düşmektedir. Bu düşüşe yüksek karıştırma hızında oluşan oksijen reaktifleri nedeniyle HA'nın degrade olmasının neden olduğu düşünülmektedir (X. Zhang vd., 2010).

Kesikli fermentasyon ile HA üretimi besiyeri viskozitesinin artması ve kütle transferi kısıtlamaları nedeniyle 6.0-7.0 g/L ile sınırlanmaktadır. Bu nedenle HA veriminin yüksek hücre yoğunluklu fermentasyon veya yüksek verimli bir suş kullanarak

daha fazla iyileştirilmesi mümkün olmamaktadır. Hücrelerin sürekli beslemeli olarak ortama verilmesi HA verimliliği açısından olumlu etki yaratmaktadır (Boeriu vd., 2013).

Bahsedilen etkenler göz önüne alındığında HA üretiminde verimin artırılması için birçok parametrenin kontrol edilmesi gerekmektedir. Özellikle uygun karbon kaynağı seçilmesi, b kaynağın besiyerinde yeteri kadar bulunması ve fermentasyon şartlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle tez kapsamında hem besiyeri bileşiminin hem de fermentasyon şartlarının optimize edilmesi verimliliği artırmak açısından temel stratejiler olarak belirlenmiştir.

Streptococcus sp. suşları için tercih edilen karbon kaynağı glukoz olarak ön plana çıksa da nişasta, laktoz, sükroz ve dekstrin gibi diğer daha ucuz kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonlarda verimlilik açısından benzer sonuçlar alındığı görülmektedir. Bu alternatif karbon kaynakları HA üretiminin toplam maliyetinin düşmesine katkıda bulunmakta ve HA üretim endüstrisinde kullanım için cazip hale gelmektedir. Bu tez çalışmasının dayandığı temellerden biri de keçiboynuzu meyvesinden pekmez eldesi sırasında açığa çıkan atıkların ve/veya ekstraktın karbon kaynağı olarak değerlendirilmesine ve düşük maliyetle hammadde ihtiyacını karşılayıp katma değeri yüksek bir ürün üretmektir (Boeriu vd., 2013; Gallo vd., 2019).

Genellikle HA üretiminde insan patojeni olmayan Lancfield C grup *S. equi* subsp. *equi* ve *S. equi* subsp. *zooepidemicus* bakterileri (Boeriu vd., 2013) kullanılmaktadır. Tez kapsamında kullanılan *S. zooepidemicus* (ATCC 39920) bakterisi “ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC)” tarafından yayınlanan Mikrobiyolojik ve biyomedikal laboratuvarlarda biyogüvenlik yönergelerine göre 2. seviyede laboratuvar biyogüvenliğine gerek duymaktadır (Wilson & Chosewood, 2007). “M doğal üretici suşlar arasında yer alan bazı *Streptococcus sp.* bakterileri patojenite riski barındırmaktadır. Her ne kadar saflaştırma aşamalarından sonra endotoksin seviyesi kabul edilebilir aralıkta yer alsın da doğal HA üreticilerinden bazıların (örn. *S. Pyogenes*) insan patojeni olarak tanımlanması nedeniyle üretim için rekombinant suşların kullanıldığı çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. GRAS listesinde bulunan mikroorganizmalar bu çalışmaların temelinde tercih edilen suşlar olmaktadır. Endotoksin içermeyen HA, halihazırda *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Corynebacterium glutamicum* gibi rekombinant konakçılar tarafından sentezlenmiştir (Fallacara vd., 2018). Ancak yapılan rekombinant üretim denemelerinde üretim miktarı ve molekül ağırlığı açısından birkaç çalışma dışında yüksek değerlere ulaşamamakta ve halen çalışmalar devam etmektedir. Doğal üretici ve rekombinant mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde artan viskozite ve düşük molekül ağırlığı gibi karşılaşılan sorunlar nedeniyle besiyeri ve fermentasyon şartlarının optimizasyonu üzerine olan çalışmalar HA biyosentezi için halen ciddi önem taşımaktadır (Yatmaz & Turhan, 2015).

Besiyeri bileşiminin HA üretim miktarı ve molekül ağırlığına göre optimize edildiği bir diğer çalışmada üretici mikroorganizma olarak mutant *Streptococcus sp.* ID9102 kullanılmış ve sırasıyla çalkalamalı inkübatör ve biyoreaktörde fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ilk olarak karbon, azot, fosfat ve mineral kaynakları Her Defada Tek Etken Yöntemi ile belirlenmiş ardından seçilen bileşenlerin miktarı Taguchi Dizayn ile optimize edilmiştir. Besiyeri bileşimi için glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, laktoz, maltoz, sakaroz, ksiloz, dekstrin ve nişasta karbon kaynağı olarak (%4.0); maya ekstraktı, pepton, kazein, yağı alınmış süt, kazein, kazein peptonu, soya peptonu, kuru

maya ve soya küspesi azot kaynağı olarak (%0.5); K_2HPO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_3PO_4 ve KH_2PO_4 fosfat kaynağı olarak (%0.25); $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl , $FeCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$, $CoSO_4$, $ZnCl_2$, $ZnSO_4$ ve NaF mineral kaynağı olarak (%0.01-%0.05) belirlenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta ve 120 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda glukoz, maya ekstraktı, kazein peptonu, K_2HPO_4 ve $MgCl_2$ besiyeri bileşeni olarak seçilmiştir ve Taguchi tasarım ile gerçekleştirilen optimizasyonda glukoz sabit tutulmuş ve ortama %0.5 NaCl ilave edilmiştir. Ancak diğer bileşenler optimizasyon için değişken olarak tasarıma dahil edilmiştir. Bu bileşenlerle oluşturulan Taguchi L_{16} -Ortogonal Tasarımla besiyeri bileşen miktarları glukoz (%4.0), maya ekstraktı (%0.75), kazein peptonu (%1.0), K_2HPO_4 (%0.25), $MgCl_2$ (%0.05) ve NaCl (%0.5) olarak optimize edilmiştir. Optimum besiyerinde çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonda 2.51 g/L HA üretilmiştir. Son olarak optimum besiyerinde amino asit ile organik asit ilavesi ve ölçek büyütme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Pilot ölçekteki (45.0 L) HA üretimi 6 bıçaklı disk türbin karıştırıcılı biyoreaktörde 36°C sıcaklıkta ve 0.5 vvm havalandırma oranında pH kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak pilot ölçekte glukoz (%4.0), maya ekstraktı (%0.75), kazein peptonu (%1.0), K_2HPO_4 (%0.25), $MgCl_2$ (%0.05), NaCl (%0.5), glutamin (%0.04), glutamat (%0.06) ve oksalik asit (%0.02) içeren besiyerinde 6.94 g/L HA 5.9×10^6 Da molekül ağırlığında üretilmiştir (Im vd., 2009).

Liu vd. (2009) Box-Behnken Tasarım (CYM) ve Kuantum Davranışlı Parçacık Yığını Optimizasyon Algoritması Bağlısımlı Radyal Temelli Fonksiyon Sinir Ağı olmak üzere (RBF-QPSO) iki farklı optimizasyon yöntemi kullanılarak *S. zooepidemicus* WSH-24 suşu ile HA üretiminde karıştırma hızı (200-400 rpm), karıştırıcı (impeller) sayısı (2-6 adet) ve havalandırma oranı (0.5-2.5 vvm) parametrelerinin optimize edildiği bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu iki optimizasyon yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada, sakaroz 70.0 g/L, maya ekstraktı 25.0 g/L, K_2SO_4 1.3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.2 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 ve 2.5 mL iz element solüsyonu içeren besiyeri kullanılmıştır. Biyoreaktörde pH kontrollü (7.0) olarak gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda optimum koşullarda (300 rpm karıştırma hızı, 1.5 vvm havalandırma oranı ve 4 adet karıştırıcı) HA üretimi BB ve RBF-QPSO yöntemleri için sırasıyla 5.27 g/L ve 5.62 g/L olarak bulunmuştur.

Don ve Shoparwe (2010) HA üretimi üzerinde glukozun etkisini inceledikleri ve fermentasyon kinetiklerini modelledikleri bir çalışmada, 10.0-60.0 g/L arasında 6 farklı başlangıç şeker içeriğinde HA üretim denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Biyoreaktörde *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 suşu kullanarak 37°C'de ve 300 rpm karıştırma hızında ve 2.0 vvm havalandırma oranında yapılan fermentasyonlar için glukoz (10.0–60.0 g/L), maya ekstraktı 10.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.5 g/L ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L içeren besiyeri kullanmışlardır. Sonuç olarak en yüksek üretim veriminin ($Y_{P/S}$) 0.96 gHA/g glukoz olarak başlangıç glukoz miktarı 40.0 g/L olan fermentasyondan elde edildiğini ve en uyumlu modellerin Han & Levenspiel model ile Teissier-type Model olduğunu tespit etmişlerdir.

Vázquez vd. (2010), deniz ürünleri üretim proseslerinde yan ürün olan midye üretim prosesi atık suyu (MS) ve ton balığının iç organlarından elde edilen peptonu (TP) HA üretiminde karbon ve azot kaynağı olarak değerlendirmişlerdir. Biyoreaktörde *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 35246 suşu kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonlar için başlangıç şeker içeriği 50.0 g/L olarak sabitlenen ve tüm

besiyerlerine 5.0 g/L maya ekstraktı ile gerekli mineraller ilave edilerek dört farklı besiyeri bileşimi oluşturulmuştur. Bu besiyerleri 50.0 g/L glukoz içeren kontrol besiyeri, 50.0 g/L glukoz ile 8.0 g/L TP içeren besiyeri, 50.0 g/L MS içeren besiyeri ve 50.0 g/L MS ile 8.0 g/L TP içeren besiyeri olacak şekilde hazırlanmış ve pH 6.7 olarak ayarlanmıştır. Fermentasyonlar 37°C sıcaklıkta ve 500 rpm karıştırma hızında havalandırma olmaksızın pH kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonucunda en yüksek HA miktarı deniz ürünü atıkları ile 50.0 g/L MS ile 8.0 g/L TP içeren besiyerinde 2.46 g/L olarak belirlenmiştir.

Soya proteini hidrolizatı, kaju elması suyu, mısır şurubu ve konsantre peynir altı suyu proteini gibi tarımsal yan ürünlerin karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, ürünler ön işlemlerden geçirilerek besiyeri bileşimine eklenmiştir. *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 suşunun kullanıldığı denemelerde besiyerinde mineral ve tuzlar aynı miktarda eklenerek karbon kaynağı:azot kaynağı oranı 7.8:1 olarak sabit tutulmuştur. Bu orana göre üç karbon kaynağı toplamda 45.0 g/L glukoz ve 5.8 g/L azot kaynağı içerecek şekilde çeşitli kombinasyonlarla bir araya getirilmiş ve başlangıç pH'sı 7.5 olan fermentasyonlar çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta, 150 rpm çalkalama hızında ve %10 (h/h) inokülasyon oranında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonunda en yüksek HA miktarı 0.89 g/L olarak kaju elması suyu ve maya ekstraktı kullanılarak hazırlanan besiyerinden elde edilmiştir (Pires vd., 2010).

Sentetik besiyeri bileşenleri ile gerçekleştirilen besiyeri ve fermentasyon şartlarının optimize edildiği bir çalışmada (Kotra vd., 2013) mutant *Streptococcus zooepidemicus* 3523-7 suşu kullanarak HA üretiminde besiyeri içeriğinin optimize edilmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Öncelikle en iyi karbon ve azot kaynağını, başlangıç pH'sını ve fermentasyon süresini Her Defada Tek Etken Yöntemiyle belirlemişlerdir. Bunun için; sakaroz, fruktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, nişasta ve galaktoz olmak üzere 7 farklı karbon kaynağı (%5, a/h) ve 4 inorganik (potasyum nitrat, diamonyum hidrojen ortofosfat, sodyum nitrat ve amonyum nitrat), 7 organik (pepton, jelatin, soya peptonu, et peptonu, mantar peptonu, et ekstraktı ve mısır şurubu) olmak üzere 11 farklı azot kaynağı kullanılmıştır. Çalışmada başlangıç pH'sı (5.0-9.0) ve fermentasyon süresi (12-48 saat) olarak seçilmiştir. Fermentasyonlar sırasında karbon kaynağı (50.0 g/L), azot kaynağı (5.0 g/L), K₂HPO₄ (2.0 g/L), KH₂PO₄ (5.0 g/L), NH₄Cl (0.5 g/L), NaCl (5.0 g/L), MgSO₄ (0.5 g/L), 1M CaCl₂ (0.1 mL) ve mineral madde solüsyonu (1 mL) besiyeri bileşimi kullanılmıştır. Denemeler sonucunda HA üretimi için en verimli karbon kaynağı, azot kaynağı, pH ve süreyi sırasıyla glukoz, maya ekstraktı, pH 7.0 ve 24 saat olarak tespit etmişlerdir. Ardından belirlenen bu parametrelerle tüm besiyeri bileşimini Taguchi L27-Ortogonal düzende yeniden optimize etmişlerdir. Bu optimizasyon sonrasında en etkili değişkenlerin (glukoz, maya ekstraktı, K₂HPO₄ ve NH₄Cl) kombine etkilerini görmek için Cevap Yüzey Yöntemi kullanarak Merkezi Kompozit Tasarım ile bir optimizasyon işlemi daha gerçekleştirmişlerdir. Tüm bu optimizasyon işlemleri sonucunda tespit edilen en iyi besiyeri, başlangıç pH'sı ve fermentasyon süresinde maksimum 1.39 g/L HA üretilmiştir.

Peynir altı suyunun HA üretiminde azot kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada Amado vd. (2016) öncelikle peynir altı suyu (PS) ve konsantre edilmiş peynir altı sularını hidroliz ederek besiyeri ortamında kullanmışlardır. Ardından peyniraltı suyu ve hidrolizatı (PSH), konsantre peynir altı suyu ve hidrolizatı kullanılan dört farklı besiyeri ile kontrol grubu olmak üzere 5 farklı besiyeri hazırlanmıştır.

Streptococcus equi subsp. zooepidemicus ATCC 35246 bakterisinin üretici mikroorganizma olduğu HA üretim fermentasyonları, hazırlanan 5 farklı besiyeri kullanılarak biyoreaktörde 37°C sıcaklıkta (0.5 L çalışma hacmi) 500 rpm karıştırma hızı, 1 vvm havalandırma oranı ve pH 6.7’de üretim gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlarda PS ve PSH’de sırasıyla 2.14 g/L ve 2.38 g/L HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ölçek büyütme işlemi gerçekleştirilerek aynı koşullar altında 4.5 L çalışma hacminde PS ve PSH içeren besiyerinde fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 4.0 g/L ve 3.2 g/L HA üretilmiştir.

Peynir altı suyu permeatı (PP) ve PSH’nın karbon kaynağı olarak değerlendirildiği bir çalışmada Mohan vd. (2016) besiyeri bileşimi, başlangıç pH’sı ve inokülasyon oranının HA üretimi üzerine etkisi Plackett-Burman (PB) ve Box-Behnken (BB) tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. İlk olarak PP (30.0-50.0 g/L), PSH (3.0-8.0 g/L), inokülasyon oranı (%2.5-5.0) ve başlangıç pH’sı (7.0-8.0) ile diğer besiyeri bileşenlerinin bulunduğu 8 faktörlü PB tasarımı oluşturulmuştur. Bu tasarımla oluşturulan denemeler *Streptococcus thermophilus* NCIM 2904 suşu ile çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonunda maksimum HA üretimi 340.20 mg/L, PP, PSH, inokülasyon oranı ve başlangıç pH parametreleri de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. PB denemeleri sonrasında önemli çıkan parametreler BB tasarımı ile optimize edilmiştir. Diğer besiyeri bileşimi sabit tutulup PP (40.0-60.0 g/L), PSH (7.0-9.0 g/L), inokülasyon oranı (%3.0-6.0) ve başlangıç pH’sı (7.0-9.0) olarak optimizasyon için kurgulanmış ve BB tasarımı ile deneme deseni oluşturulmuştur. PB tasarım denemeleri ile aynı koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlar PP, PSH, inokülasyon oranı ve başlangıç pH parametreleri istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiş ve maksimum HA üretimi 342.93 mg/L olarak bulunmuştur.

Şeker kamışı melasının alternatif karbon kaynağı olarak değerlendirildiği bir çalışmada, öncelikle herhangi bir işlem uygulanmamış melas ile %15 toplam şeker içeriğine seyreltilmiş ve aktif kömürle muamele edilmiş melasa (İM) azot kaynağı ve mineraller eklenerek *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 bakterisi ile HA üretimi için ön deneme fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler sonucunda İM ile daha yüksek HA üretim miktarlarına ulaşılmıştır. Alt ve üst sınırları 14.65-85.35 g/L olarak seçilen İM ve maya ekstraktları içeren besiyeri ile Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak HA üretimi optimize edilmiştir. Optimizasyon işlemi, besiyeri pH’sı 8.0 olarak ayarlandıktan sonra 37°C sıcaklıkta, 100 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon işlemi sonrasında 85.35 g/L İM ve 50.0 g/L maya ekstraktı içeren besiyeri optimum olarak tespit edilmiştir. Sonrasında pH’nın HA üretimi üzerine etkisini görmek amacıyla optimum besiyerinde 37°C sıcaklık, 100 rpm karıştırma hızı ve 0.5 vvm havalandırma oranında pH (8.0) kontrollü ve kontrolsüz olmak üzere reaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda pH kontrollü biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 2.83 g/L HA üretilmiştir (Pan vd., 2017).

Amado vd. (2017) *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 35246 bakterisi ile HA üretimi için karbon ve azot kaynağı olarak mısır şurubu (MŞ) ve şeker kamışı melasını (ŞM) kullanmışlardır. Bu çalışmada; pH, karıştırma hızı ve havalandırma oranının HA üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Öncelikli olarak fermentasyon şartlarını belirlemek için 50.0 g/L glukoz içeren kompleks besiyerinde 37°C sıcaklıkta pH (6.7)

kontrollü ve kontrolsüz denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlarda farklı karıştırma hızları (200, 500 ve 800 rpm) ve sabit havalandırma oranı (0.1 vvm) parametreleri kullanılmıştır. Bu fermentasyonlar sonrasında tarımsal yan ürünlerden (MŞ ve ŞM) üretilcek HA için şartlar 500 rpm karıştırma hızı, 1.0 vvm havalandırma oranı ve pH kontrollü olarak belirlenmiştir. Daha sonra karbon kaynağı olarak seyreltilmiş ŞM (%10, h/h), seyreltilmiş MŞ (%10, h/h) ve 50.0 g/L glukoz, seyreltilmiş ŞM (%10, h/h) ve seyreltilmiş MŞ (%10, h/h) ile 50.0 g/L glukoz içeren dört farklı besiyeri gerekli azot kaynağı ve diğer bileşenler eklenerek hazırlanmıştır. Gerçekleştirilen fermentasyonlar sonrasında seyreltilmiş MŞ (%10, h/h) ve 50.0 g/L glukoz içeren besiyerinde 3.48 g/L, kompleks besiyerinde ise 3.60 g/L HA üretilmiştir.

Rohit vd. (2018) siyah palmye (*Borassus flabellifer*) bitkisi şekerinin (PŞ) HA üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Öncelikle *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523, *Streptococcus thermophilus* NCIM 2904 ve *Streptococcus thermophilus* STI-12 suşlarından en verimli olanı belirlemek amacıyla çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta, 180 rpm çalkalama hızında ve %1.0 inokülasyon oranında fermentasyonlar gerçekleştirmişlerdir. Bu fermentasyonlarda karbon kaynağı olarak glukoz, sakaroz ve PŞ'yi kullanarak en iyi karbon kaynağını, en iyi azot kaynağını ve en iyi üretici mikroorganizmayı belirlemişlerdir. Çalışmalar sonucunda en uygun suşun *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 karbon kaynağının PŞ ve azot kaynağının ise soya peptonu olarak belirlendiği erlenmayer denemelerinin ardından; 5 farklı (10.0-50.0 g/L) başlangıç şeker içeriğine sahip besiyerleri kullanarak 37°C sıcaklıkta, 180 rpm karıştırma hızında ve 1.0 vvm havalandırma oranında biyoreaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 30.0 g/L PŞ başlangıç şeker içeriğine sahip besiyerinde gerçekleştirilen biyoreaktör denemesinde 1.22 g/L HA üretilmiştir.

Hyaluronidaz enziminin HA fermentasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada Liu vd. (2008b), 8-16 saat arasında HA üretimini sınırlayan bir parametre haline gelen çözünmüş oksijen miktarını arttırmak için ortama 8. saatte farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 g/L) hyaluronidaz enzimi eklemişlerdir. *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24 bakterisi ile 37°C sıcaklıkta, 200 rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm havalandırma oranında ve pH 7.0 de sabitlenerek HA üretimleri gerçekleştirmişlerdir. Hyaluronidaz enzimi ilavesiz gerçekleştirilen fermentasyonda 1300 kDa molekül ağırlığında 5.0 g/L HA üretilmiş ancak çözünmüş oksijen seviyesi 8. saatte 0'a düşmüş ve ortamın viskozitesi 372.0 mPa.S olarak ölçülmüştür. Daha sonra 8. saatte hyaluronidaz ekleyerek gerçekleştirdikleri fermentasyonlarda enzim miktarı arttıkça HA miktarının arttığı ve 0.15 g/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda hyaluronidaz ilave edilen denemelerde HA miktarının 6.0 g/L'ye ulaştığı ve fakat daha fazla yükselmediğini gözlemlemişlerdir. Ancak hyaluronidaz miktarı arttıkça molekül ağırlığının 21.0 kDa'ya kadar düştüğü tespit edilmiştir.

Rekombinant HA üretiminin optimize edildiği bir çalışmada Chahuki vd. (2019) hyaluronan sentez genlerinin (*HasA* ve *HasC*) *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 bakterisine ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant bakteri ile HA üretimini optimize etmek için öncelikle sıcaklık, çalkalama hızı, azot kaynağı, *N*-asetilglukozamin, sakaroz, laktoz, trisodyum sitrat, lizozim, pirüvat ve iz elementleri içeren 10 faktörlü Plackett-Burman tasarımı kurgulamışlardır. PB tasarımının verdiği deneme fermentasyonlarında en fazla 1.03 g/L HA üretilmiş ve istatistiksel olarak önemli çıkan

faktörler seçilerek 3 seviyeli Box-Behnken tasarımı oluşturulmuştur. Aynı koşullar altında sıcaklık, azot kaynağı, N-asetilglukozamin, laktoz, lizozim, pirüvat ve iz elementleri ile gerçekleştirilen CYM ile optimizasyon sonrası elde edilen optimum besiyerinde 1.7 g/L HA üretilmiş, molekül ağırlığı ise 27.0 kDa olarak tespit edilmiştir.

Cheng vd (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada rekombinant *C. glutamicum* ATCC13032 suşu ile çalkalamalı inkübatörde 28°C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında HA üretimi optimize edilmiştir. Öncelikle karbon kaynağı olarak glukoz (40.0 g/L), maya ekstraktı (11.0 g/L), mısır şurubu (33.0 g/L), pepton (11.0 g/L), et ekstraktı (11.0 g/L) ve mısır şurubu tozu (20.0 g/L) gibi 5 farklı azot kaynağı optimize edilmiştir. Bu işlem sonrasında mısır şurubu tozu kullanılan besiyerinde en yüksek (5.9 g/L) HA miktarı elde edilerek en iyi azot kaynağı belirlenmiştir. Ardından mısır şurubu tozu içeren besiyerinde aynı miktarda (40.0 g/L) farklı karbon kaynakları (glukoz, sakaroz, maltoz ve fruktoz) denenerek optimum karbon kaynağı glukoz olarak tespit edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen optimizasyon işlemini sonucu belirlenen besiyeri kullanılarak biyoreaktörde 28°C sıcaklıkta, 600 rpm karıştırma hızında ve 1.0 vvm havalandırma oranı şartlarında pH 7.2’de kontrol edilerek HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sonuç olarak Rekombinant *C. glutamicum* ATCC13032 suşu ile 1.30 MDa molekül ağırlığında 8.3 g/L HA üretilmiştir (Cheng vd., 2016).

2.5. Karbon Kaynağı Olarak Keçiboynuzu Meyvesi

Biyoteknolojik yollarla katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesinde maliyet unsurunu etkileyen temel basamaklar arasında besiyeri bileşimi ve bu bileşimin özelinde ise karbon kaynağı yer almaktadır. Genellikle fermentasyon ile üretilecek ürün için seçilen mikroorganizma o fermentasyonda kullanılacak karbon kaynağını belirleyen temel unsur olmaktadır. Glukoz, fruktoz, laktoz, sakaroz gibi şekerler temel karbon kaynakları olarak çoğu mikroorganizma tarafından hem metabolik gelişimleri hem de istenilen bileşikler üretebilmek için kullanılmaktadır. Bu kaynakların yüksek saflıkta kullanılmaları laboratuvar ölçekli araştırmalarda kabul edilebilir olmakla birlikte endüstriyel ölçekli üretimlerde oldukça yüksek maliyetler ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Oluşan yüksek maliyet nedeniyle endüstriyel ölçekteki üreticiler alternatif ve düşük maliyetli kaynaklara yönelmektedir. Bu durumda genellikle üretim proseslerinde açığa çıkan ikincil ürünler ve proses atıkları gibi materyaller hammadde olarak tercih edilebilmektedir. Örneğin melas, mısır atıkları, şeker kamışı küspesi, çay proses atıkları gibi lignoselülozik materyaller sıklıkla karbon kaynağı olarak tercih edilmektedir (Yatmaz & Turhan, 2018). Bu tez kapsamında içerdiği yüksek şeker miktarı ve diğer bileşenler (azot ve mineraller) açısından zenginliği nedeniyle keçiboynuzu meyvesi karbon kaynağı olarak tercih edilmiştir. Literatürde keçiboynuzu meyvesi ekstraktı kullanılarak HA üretimi gerçekleştiren bir çalışma olmaması nedeniyle bu meyveyi içeren besiyerinin ve üretim şartlarının optimize edilmesi tezin birincil amacı olmaktadır.

Keçiboynuzu ağacı yaprak dökmeyen bir bitki olarak genellikle Akdeniz’e kıyıları olan ülkelerde yetişmektedir (Yousif & Alghzawi, 2000). *Ceratonia siliqua* L. olarak adlandırılan bitki en fazla Portekiz, İtalya, Fas, Türkiye’de yetişmektedir. Üretim verileri incelendiğinde (2000-2018 yılları arası) keçiboynuzu meyvesi Avrupa’da toplam 1,579,011 ton üretilmiş ve bu üretimin 261,241 tonu Türkiye’de gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla Türkiye dünya genelinde en büyük 4. üretici konumunda yer almaktadır (Anonim, 2019)

Keçiboynuzu meyvesi tohumları (%10-20) ve meyve kabuğu (%80-90) olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır (Oziyci vd., 2014). Tohumlar genellikle gıda ve diğer endüstriler için özel bir gam olan keçiboynuzu gamı üretimi için kullanılmaktadır. Meyve kabuğu kısmı içerdiği yüksek şeker miktarından ötürü batı ülkelerinde keçiboynuzu tozu ve Türkiye'de pekmez gibi geleneksel ürünler için kullanılmaktadır. Aynı zamanda meyvenin bu kısmı fermentasyon için karbon kaynağı olarak tercih edilen ekstrakt üretiminde kullanılmaktadır. Yetiştirilen keçiboynuzu türleri, yabani türlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek toplam fermente edilebilir şeker konsantrasyonlarına sahiptir (Biner vd., 2007). Keçiboynuzu, Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi esas olarak %34-42 sakkaroz, %7-10 glukoz, %10-12 fruktozdan oluşan ve ayrıca düşük miktarlarda amino asit, mineral ve fenolik bileşik içeren yüksek toplam kuru ağırlık içeriğine (yaklaşık %91-92) sahiptir (Ayaz vd., 2007; Karkacier vd., 1996).



Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesi bileşen kompozisyonu (Yatmaz & Turhan, 2018)

Bileşen	Şeker Kompizosyonu (% Toplam kuru ağırlık)
Sakaroz	34-42
Glukoz	7-10
Fruktoz	10-12
Amino Asit Kompozisyonu (g/100g Protein)	
Aspartik asit ve Aspargin	18.25
Alanin	10.55
Glutamik asit ve Glutamin	9.65
Lösin	9.30
Valin	9.05
Serin	6.80
Prolin	5.80
Trionin	5.10
Lisin	4.20
İzolösin	3.80
Glisin	3.55
Fenilalanin	3.10
Arginin	3.20
Histidin	2.80
Triosin	1.70
Metiyonin	1.40
Triptofan	0.95
Sistein	0.80
Fenolik Asit Kompozisyonu (µg/g Kuru Ağırlık)	
Toplam benzoik asit	3276.80
Toplam sinamik asit	4.50
Mineral Kompozisyonu (mg/100g Kuru Ağırlık)	
Potasyum	970.00
Kalsiyum	300.00
Fosfor	71.00
Magnezyum	60.00
Demir	1.88
Mangan	1.29
Bakır	0.85
Çinko	0.75

Keçiboynuzu meyvesi sıvı besiyeri ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmak amacıyla ekstrakte edilmektedir. Bu ekstraksiyon işlemi doğrultusunda 1.0 kg parçalanmış keçiboynuzu kabuğundan 4 litre su kullanılarak 10°Bx şeker içeriğine sahip

yaklaşık 3.0 L keçiyoynuzu ekstraktı elde edilebilmektedir (Turhan vd., 2010). Bu elde edilen ekstrakt su ile istenilen şeker içeriğine seyreltilebilmekte ve herhangi bir mikroorganizma için zenginleştirilmiş veya zenginleştirilmemiş karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Keçiyoynuzu meyvesi ile yapılan araştırmalar organik asitlerin, etanolün, enzimlerin, antikorların vb. ekonomik olarak daha yüksek verimle üretilebileceğini göstermiştir (Yatmaz & Turhan, 2018).

Keçiyoynuzu meyvesi zengin içeriği nedeniyle katma değeri yüksek ürünlerde karbon kaynağı olarak birçok çalışmada değerlendirilmiştir. Literatürde bulunan çalışmalara ait örneklere yer vermek gerekirse;

Roukas (1999) katı kültür fermentasyonu ile sitrik asit üretimini keçiyoynuzu meyvesi kullanarak gerçekleştirmiş ve çalışma sonucunda 176 g/kg (sitrik asit/kuru keçiyoynuzu) sitrik asit üretmiştir. Bir diğer çalışmada keçiyoynuzu ekstraktı süksinik asit üretim fermentasyonunda değerlendirilmiştir. Kesikli ve kesikli beslemeli fermentasyonlar sonucunda sırasıyla 9.41 g/L ve 18.97 g/L süksinik asit üretilmiştir (Carvalho vd., 2016). Biyohidrojen üretiminde keçiyoynuzu meyvesi atıkları değerlendirilmiş ve çalışma sonunda 54 mL biyohidrojen 1.32 mol H₂/mol şeker tüketimi verimle elde edilmiştir (Bahry, Abdallah, vd., 2019). Yine Bahry, Abdalla, vd. (2019) gerçekleştirdiği bir çalışmada keçiyoynuzu meyvesi ile laktik asit üretimi optimize edilmiştir. İmmobilize *Lactobacillus Rhamnosus* suşlarının kullanıldığı fermentasyonlarda optimum şartlarda 22 g/L laktik asit üretilmiştir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden olan β -mannanaz ve inülinaz üretiminde keçiyoynuzu ekstraktı besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak yer almıştır. Fermentasyon koşullarının optimize edildiği çalışmada optimum koşullarda 687.89 U/mL β -mannanaz üretilmiştir (Karahalil vd., 2019). İnülinaz enzimi üretiminde besiyeri optimizasyonun gerçekleştirildiği çalışmada keçiyoynuzu içeren optimum besiyerinde 1507.03 U/mL aktiviteye sahip inülinaz elde edilmiştir (İlgın vd., 2020). Bu ürünlerin dışında keçiyoynuzu meyvesinin çeşitli formlarda etanol üretiminde kullanıldığı birçok çalışma da literatürde yer almaktadır. Turhan vd. (2010) keçiyoynuzu ekstraksiyonunu ve fermentasyon şartlarını optimize ettikleri bir çalışmada 42.6 g/L etanol üretmişlerdir. İmmobilize *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlar için optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve keçiyoynuzu ekstraktı içeren optimum besiyerinde Yatmaz vd. (2013) 40.10 g/L etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. *Zymomonas mobilis* kullanılarak etanol üretimi gerçekleştirilen bir diğer çalışmada keçiyoynuzu ekstraktı içeren besiyeri optimize edilmiştir. Optimum besiyerinde 0.34 g/g verimle etanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Vaheed vd., 2011).

Görüldüğü üzere sahip olduğu zengin içeriği nedeniyle keçiyoynuzu meyvesi çok sayıda ürünün elde edildiği fermentasyonlarda karbon kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda besiyeri ve fermentasyon şartlarının optimize edilmesi gerekli görülmüş ve gerçekleştirilmiştir. Katma değeri yüksek birçok bileşenin üretilmesinde kullanılsa da keçiyoynuzu meyvesinin HA üretiminde karbon kaynağı olarak tercih edildiği herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle tez kapsamında ilk kez keçiyoynuzu ekstraktının HA üretiminde değerlendirilmesi teze özgünlük kazandırmaktadır. Aynı şekilde ilk çalışma olması nedeniyle besiyeri ve fermentasyon şartlarının optimize edilmesi gelecek çalışmalara örnek olması açısından oldukça önemlidir.

Ayrıca *S. equi subsp. zooepidemicus* bakterileri kullanılarak HA üretiminde karbon kaynağı olarak genellikle glukoz ve sakaroz tercih edilmektedir. Karbon kaynağı dışında besiyeri ortamında bulunan mineral maddeler, aminoasitler ve vitaminlerin mikroorganizmalar tarafından ihtiyaç duyulduğu da literatürdeki çalışmalardan görülmektedir. Keçiboynuzu meyvesi sahip olduğu yüksek şeker, aminoasit ve vitamin içeriği ile HA üretimi için ideal bir karbon kaynağı olarak görülmektedir.

2.6. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Yöntemleri

Fermantasyon proseslerinin geliştirilmesinde ürün veriminin artırılması, proses değişkenlerinin azaltılması, istenilen hedeflere daha yakın sonuçlar elde edilmesi, geliştirme sürecinin kısaltılması ve maliyetin düşürülmesi için istatistiksel deneysel tasarım teknikleri tercih edilmektedir. Bir optimizasyon işleminde yalnızca tek faktörü değişken olarak kabul edip diğer faktörleri belirsiz bir seviyede sabit tutan tek faktörlü optimizasyon uygulamasında tüm faktörlerin kombine etkisi gözlemlenememektedir. Bu şekilde gerçekleştirilen optimizasyonlar zaman alıcı olmakta ve optimum seviyeleri tespit etmek için çok sayıda deney gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Tek faktörlü bir optimizasyon sürecinin bu sınırlamaları değişken tüm parametrelerin toplu olarak optimize edilebildiği Cevap Yüzey Metodolojisi (CYM) kullanılarak hazırlanan istatistiksel deney tasarımı ile ortadan kaldırılabilir. CYM, karmaşık etkileşimlerin olduğu deneysel tasarımlarda bile birkaç faktörün görece önemini değerlendirmek için kullanılabilir (Elibol, 2004).

2.6.1. Cevap yüzey metodu

Maliyetleri artırmadan sistemlerin performansını artırmak ve süreçlerin verimini artırmak her türlü üretim için önemlidir ve bu işlem optimizasyon olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak bir optimizasyon işleminde bir parametre değişken olarak kullanılırken diğer parametreler sabit bir seviyede tutulmaktadır. Buna Tek Seferde Tek Değişkenli yöntem adı verilmektedir. Bu tekniğin en büyük dezavantajı, değişkenler arasında interaksiyonların etkilerini içermemesi bu nedenle parametrelerin süreç üzerindeki etkilerini tam olarak gösterememesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, Cevap Yüzeyi Metodolojisi (CYM) geliştirilmiştir (Baş & Boyacı, 2007).

CYM, belirlenmek istenilen bir yanıtın (örn. maksimum HA konsantrasyonu) çeşitli değişkenlerden (sıcaklık, karıştırma oranı, pH, süre vb.) etkilendiği süreçlerin geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimize edilmesi için istatistiksel ve matematiksel tekniklerden yararlanılan bir metodolojidir. CYM, yeni ürünlerin tasarımı, geliştirilmesi ve formülasyonunun belirlenmesinin yanı sıra mevcut ürün tasarımının iyileştirilmesinde önemli bir uygulama alanına sahiptir. Bağımsız değişkenlerin tek başına veya kombinasyon halinde yanıtlar üzerindeki etkisini tanımlar. Bağımsız değişkenlerin etkilerini analiz etmenin yanı sıra, CYM kimyasal veya biyokimyasal süreçleri tanımlayan matematiksel bir model oluşturur (Singh vd., 2017).

CYM optimizasyon işleminin birkaç aşamasında kullanılabilir ve üç temel adımda gerçekleştirilmektedir. Bu adımlar deneysel tasarımlar için seçilen faktörlerin en dik iniş ve çıkışlarını taramak, ikinci dereceden regresyon modellerini kurmak ve uygun regresyon modeline göre optimizasyonu gerçekleştirmek olarak sıralanabilir. CYM'nin önemli girdilerinden biri, verimin bir yüzey grafiği olarak gösterilmesidir. Tasarım ve

süreç optimizasyonu için en gerekli olan değişkenler arasındaki etkileşimleri göz önünde bulundurarak aynı anda birden fazla yanıt sağlayabilir. Bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki teorik ilişkiler açık olmadığından, bağımlı değişkenleri ikinci bir sıraya göre tahmin etmek için çoklu regresyon analizi uygulanabilir (Gupta vd., 2005; J. Zhang & Gao, 2007).

CYM'nin basit, verimli, daha az zaman alıcı ve çeşitli metabolitlerin üretim süreçlerinin optimizasyonunu tahmin edebildiği gösterilmiştir. CYM, istenen özellikleri eş zamanlı olarak karşılayabilen faktör seviyelerini belirlemek için kullanılır. Bu metod belirli bir yanıtın faktör seviyelerinin değişiminden nasıl etkilendiğini göstermekte ve test edilen değişkenler üzerindeki sistem davranışının nicel olarak anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. CYM ile gerçekte denenmeyen faktör kombinasyonları test edilerek ürün özellikleri tahmin edilebilmektedir. Ayrıca PBD ve CYM kombinasyonları fermentasyon yoluyla üretilmek istenilen ürünlerin optimum miktarını belirlemek için birçok çalışmada kullanılmıştır (Singh vd., 2017).

CYM, bir seferde bir değişkenin kullanıldığı klasik deneysel veya optimizasyon yöntemlerine kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. İlk olarak, CYM kullanılarak az sayıda deney ile sisteme ait çok miktarda bilgi edinilebilmektedir. İkinci olarak, CYM'de bağımsız parametrelerin birbiriyle olan etkileşimlerinin yanıtlar üzerindeki etkisini gözlemlemek mümkündür. Özellikle biyokimyasal süreçlerdeki parametrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin etkisi daha kolay izlenebilir hale gelmektedir (Baş & Boyacı, 2007).

2.6.2. Plackett-Burman deneysel tasarım

Plackett-Burman (PB) deneysel tasarımı 1946 yılında R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından kalite kontrol sürecini iyileştirmek amacıyla tasarım parametrelerinin sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi için tasarlanmıştır. PB, tüm ana etkenlerin yansız tahminlerini mümkün olan en küçük tasarım ile dikey düzende planlamayabilmektedir. Bu tasarımda “n” sayıda faktör ile “n+1” adet deneme oluşturulmaktadır (Vanaja & Shobha Rani, 2007).

PB tasarımı “n-1” değişkenin bulunduğu, özellikle 4'ün katı olacak şekilde (örn.8, 12, 16, 20 vb.) “n” sayıda deneme ile en az 7 faktör (7, 11, 15, 19 vb.) içeren tasarımlarda tercih edilmektedir. Doymuş tasarım olarak adlandırılan bu deneysel tasarımların en büyük avantajı belirli bir faktörün etkisini hesaplamak için en az sayıda gözlem gerektirmesidir. PB tasarımının izdüşümsel özelliği sayesinde oluşturulan tasarımdaki ana etkilerle, bu etkilerin etkileşimleri etkili şekilde birbirinden ayırt edilebilmektedir (Vanaja & Shobha Rani, 2007).

PB tasarımı en az sayıda deneme ile gerçekleştirilecek şekilde kurgulanabilse de faktörler arasındaki tüm etkileşimleri göstermemekte, önemli ana faktörler ve bu faktörlerin olası önemli etkileşimlerini tanımlamaktadır. PB tasarımı yalnızca faktörlerin etkileşimi olmadığında veya çıktı üzerinde sadece lineer etkileri olduğunda kullanılmalıdır. Aksi takdirde analiz edilen faktörün sonuçları, bir faktörün etkisinin başka bir faktöre bağlı olup olmadığını yorumlayamadığı için diğer faktörler tarafından artırılacak veya maskelenecektir (Singh vd., 2017).

Bir PB deneysel tasarımının kritik adımları faktörlerin seçilmesi, seçilen faktörlerin seviyeleri ve ölçülmesi gereken tasarım cevaplarını tanımlamaktır. Faktörlerin belirlenmesi, bir veya birkaç yanıtı seçen ve deneysel olarak her faktöre göre yanıtın türevlerinin nereden elde edilebileceğini araştıran araştırmacının deneyimine dayanmaktadır. Faktör düzeyleri, farklı kombinasyonlarda türetilbilir ve farklı deney tasarımları arasında tekrarlanabilir halde olmalıdır. Faktörler belirlenirken dikkat edilmesi gereken bir diğer etken ise faktör aralığının seçimidir. Eğer faktör aralığı çok küçükse, yanıtın değişimi çok küçüktür ve deneysel hatanın yanıt üzerindeki etkisi daha fazladır; öte yandan aralık çok büyükse, deney tasarımının sonuçlarını yorumlamak için kullanılan birinci derece model geçerli olmaz. Bu nedenle, bir PB deneysel tasarımında, her bir faktörün düşük ve yüksek seviyeleri arasındaki aralık, optimizasyon aşamasında kullanılan aralıklarla karşılaştırıldığında genellikle küçüktür (Nijhuis vd., 1999; Van Leeuwen vd., 1990).

Tasarımın ardından gerçekleştirilen deneylerden elde edilen verilerle regresyon katsayıları hesaplanır. PB tasarımında sonuçlar birinci dereceden polinom modeli kullanılarak yorumlanmaktadır. Faktörlerin ana etkenleri standart hata göstermez ve bunları hesaplamak için tüm serbestlik dereceleri kullanılır. Faktörlerin regresyon katsayılarının hesaplanmasından sonra, ilgili bağımlı değişkenleri (cevaplar) etkileyen önemli faktörlerin belirlenmesi için varyans analizi kullanılır. Faktörlerden hangisinin ilgili bağımlı değişkeni önemli ölçüde etkilediğini belirlemek için ANOVA varyans analizi gerçekleştirilir. ANOVA, faktör ana etkilerini tahmin etmek için kareler toplamını (KT), ortalama-karesel etki ve ortalama karesel hataları ayrı ayrı hesaplamak için ise F-oranlarını (F) gösterir. 'P' olasılık değerleri yanıtı etkileyen faktörlerin önem seviyelerini göstermektedir (Vanaja & Shobha Rani, 2007).

Sonuç olarak PB tasarımı enzim, biyoetanol, HA vb. gibi fermentasyonla üretilen ürünler için çeşitli değişkenlerin veya besiyeri bileşenlerinin göreceli önemini değerlendirebilen özgün bir yöntemdir. PB tasarımı değişken etkilerinin interaksiyonlarını dikkate almayarak üretilmek istenen ürünü doğrudan etkileyen değişkenleri inceler ve bu sayede toplam deney sayısını büyük ölçüde azaltır (Singh vd., 2017).

2.6.3. Box-Behnken deneysel tasarım

Box-Behnken tasarımı (BB) deneysel uygulamalarda seçilen yanıt yüzeylerinin değişimlerini belirlemek amacıyla Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş üç seviyeli faktöriyel tasarımıdır. BB tamamlanmamış bir blok tasarımı içerir ve her blokta maksimum ve minimum değerler, faktöriyel tasarım değerleri ve faktörlerin merkezi değerleri bulunmaktadır. Her blokta tüm kombinasyonlardan belirli sayıda faktör bulunurken, diğer faktörler merkezi seviyelerde (orta noktalarda) tutulur. Bu tasarım, -1 (düşük), 0 (orta) ve +1 (yüksek) olarak kodlanabilen üç seviyeye sahip olması ve bu seviyelerin bağımsız bir kuadratik tasarım oluşturulabilmesi gibi çeşitli avantajları sayesinde, tasarımdan elde edilen sonuçları düzenlemek ve yorumlamak daha kolay olmaktadır (Keskin Gündoğdu vd., 2016) (Majumder vd., 2009).

BBD ile bir tasarım oluşturmak için gerekli olan deney sayısı (N)

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \text{ olarak tanımlanır.}$$

(burada k faktör sayısı ve C_0 merkezi nokta sayısıdır).

Karşılaştırma için, merkezi kompozit tasarım için deney sayısı ise

$$N = 2k + 2k + C_0 \text{ 'dır.}$$

Bir deney tasarımının verimliliği, tahmin edilen modelde bulunan katsayı sayısının deney sayısına bölünmesiyle tanımlanmaktadır. BB ve diğer Cevap Yüzey Tasarımları (Merkezi Kompozit Tasarım, Doehlert matrisi ve Üç Seviyeli Tam Faktöryel Tasarım) karşılaştırıldığında, BB ve Doehlert Matrisinin Merkezi Kompozit Tasarımdan ve Üç Seviyeli Tam Faktöryel Tasarımdan daha verimli olduğu görülmektedir (Ferreira vd., 2007).

BB tasarımın bir başka avantajı, tüm faktörlerin aynı anda en yüksek veya en düşük seviyelerde olduğu kombinasyonları içermemesidir. Bu nedenle, bu tasarım uç seviyelerde (en düşük ve en yüksek seviyeler) gerçekleştirilmesi riskli olan deneyler için yararlıdır. Aynı zamanda üst sınırların etkisinin gözlemlenmek istendiği çalışmalar için verimsizdir. Uç seviyelerde deneme deseni oluşturmaması ve tasarım için daha az faktör seviyelerine ihtiyaç duyması BB'yi daha az zaman alan ekonomik bir tasarım haline getirmektedir. Bu sayede BB, biyomühendislik işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ferreira vd., 2007; Keskin Gündoğdu vd., 2016; Yin vd., 2011).

Sahip olduğu eşsiz özellikleri nedeniyle her geçen gün daha geniş bir kullanım alanına sahip olan HA'nın üretim veriminin artırılması birçok çalışmanın ana teması olmaktadır. Literatür taramasında görüldüğü üzere bakteriyel HA üretim prosesinde karşılaşılan birçok problem yer almaktadır. Katma değeri yüksek bu polimerin üretim maliyetinin düşürülmesi araştırmacıların öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır. Bu doğrultuda tez kapsamında maliyeti yüksek sentetik karbon kaynakları yerine ülkemizde yüksek miktarda bulunan keçiboynuzu meyvesinin değerlendirilmesi düşünülmüştür. Fermentasyon sırasında mikroorganizmanın metabolik faaliyetleri ile HA üretimi arasındaki yarışma kullanılacak olan karbon kaynağı, azot kaynağı ve inorganik bileşenlerinin miktarının optimize edilmesini gerektirmektedir. Bu sayede kaynak kısıtlaması yaşamadan bakterinin HA fermentasyonu yolağını seçmesi sağlanabilmektedir. Ayrıca HA üretiminde karbon kaynağı olarak ilk kez kullanılan bu meyvenin bulunduğu besiyerinin optimize edilmesi gelecek çalışmalar için fayda sağlayacaktır. HA üretiminde optimum besiyeri ortamı oluşturulmasının yanı sıra fermentasyon şartlarının da optimize edilmesi oldukça önemlidir. Üretim sırasında karşılaşılan yüksek viskozite, düşük kütle transferi ve biyokütle-HA negatif ilişkisi nedeniyle, karıştırma hızı, havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu gibi parametrelerin kontrolü öne çıkmaktadır. HA üretimi üzerindeki etkisinin oldukça kritik olduğu literatür araştırmaları ve ön denemeler neticesinde görülen bu parametreler, tez kapsamında optimize edilmiştir.

Gerçekleştirilen optimizasyon işlemlerin istatistiksel olarak önemini ve etki düzeylerini daha net görebilmek adına öncelikle besiyeri optimizasyonu için Plackett-Burman tasarım ve fermentasyon şartlarının optimizasyonu için Box-Behnken tasarım kullanılmıştır. İlk olarak PB tasarımın sunduğu deneme desenleri uyarınca fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlar sonucunda oluşturulan optimum besiyeri kullanılarak HA üretimi biyoreaktöre taşınmış ve üretim miktarının

artırılması amacıyla fermentasyon şartları optimize edilmiştir. Fermentasyonlar; şeker tüketim miktarı, biyokütle gelişimi ve HA üretim miktarı üzerinden izlenmiş, optimizasyon işlemi ise üretim miktarı göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, HA üretiminde kullanılan mikroorganizmanın geliştirilmesi; optimizasyon işlemleri için belirlenen değişkenler ve seviyeleri; fermentasyonların takibi için gerçekleştirilen analizler; elde edilen veriler ile fermentasyona ait kinetik parametrelerin hesaplanması ve veri setlerine uygulanan istatistiksel analizler bir sonraki bölümde paylaşılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı HA üretiminde sentetik karbon kaynağı yerine keçiboynuzu meyvesinin değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. HA üretiminde ilk defa keçiboynuzu ekstraktı içeren besiyerinin kullanılmasından ötürü optimum besiyeri bileşiminin belirlenmesi ve elde edilen optimum besiyeri kullanılarak biyoreaktörde HA üretimi gerçekleştirilerek üretilen HA'ya ait molekül ağırlığı dağılımının tespit edilmesidir. Böylelikle literatürde ilk defa keçiboynuzu meyvesi ile HA üretimi gerçekleştirilecek ve üretilen HA için moleküler ayırma (size-exclusion) kromatografisiyle molekül ağırlık dağılımı belirlenmiş olacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerinde karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu ekstraktı üretimi

Fermentasyonlarda karbon kaynağı olarak kullanılan keçiyoynuzu meyvesi Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasından temin edilmiştir. Parçalanmış halde temin edilen keçiyoynuzu meyvesi +4°C’ de muhafaza edilmiştir. Her bir fermentasyon için karbon kaynağı eldesinde Turhan vd. (2010) tarafından belirtilen metoda göre keçiyoynuzu meyvesi su ile 1:4 keçiyoynuzu meyvesi:su oranında karıştırılarak 80°C sıcaklıktaki su banyosunda ekstrakte edilmiştir.

3.1.2. Hyaluronik asit üretimi optimizasyonu için kullanılan mikroorganizma

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm fermentasyonlarda üretici mikroorganizma olarak *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) kullanılmıştır. Bakterilerin canlandırılması ve çoğaltılması için BHI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.10493.500) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bakteriler fermentasyonlar için kullanılmak üzere +4°C sıcaklıktaki dolaplarda stoklanmış ve aylık olarak tazelenmiştir. Bakteriler uzun süreli muhafaza için %20’lik gliserol çözeltisi içerisine alınmış ve -80°C sıcaklıkta depolanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Plackett-Burman yöntemiyle besiyeri optimizasyonu

Keçiyoynuzu meyvesi ekstraktından fermentasyon yoluyla HA üretimi için kullanılacak besiyeri bileşimi PB tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Besiyeri bileşenleri ve bu bileşenlere ait maksimum ve minimum değerler literatürdeki çalışmalar incelenerek belirlenmiştir (Çizelge 3.1). PB tasarımı ile oluşturulan deneme deseni Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Deneme deseninde cevap olarak her bir denemeye ait elde edilen maksimum HA miktarı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PB tasarımı faktörlerin minimum ve maksimum değerleri

Faktör	Bileşen	Birim	Minimum Değer	Maksimum Değer	Referans
A	Keçiyoynuzu Ekstraktı	°Bx	6.0	10.0	Pan vd 2017
B	MgSO ₄ .7H ₂ O	g/L	0.5	2.0	Pan vd 2017
C	Kazein	g/L	0.0	10.0	Ghodke 2018
D	KH ₂ PO ₄	g/L	1.5	2.5	Amado 2016
E	NaCl	g/L	1.0	2.0	Pan vd 2017
F	K ₂ HPO ₄	g/L	1.5	2.5	Pan vd 2017
G	Maya ekstraktı	g/L	0.0	10.0	Amado 2015
H	FeSO ₄	g/L	0.002	0.008	Pires 2010
J	Et ekstraktı	g/L	0.0	10.0	Ghodke 2018
K	Pepton	g/L	0.0	10.0	Im 2009
L	İnokülasyon oranı	%	5.0	7.0	Huang 2008

Fermentasyon denemelerini gerçekleştirmek üzere besiyerleri Çizelge 3.2’de verilen içeriklere göre hazırlanmış ve 121°C sıcaklıkta 15 dk. boyunca sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Tüm fermentasyonlar 200 mL besiyeri içeren 250 mL hacmindeki engelli erlenmayerler kullanılarak çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Edison, Excella E24R, New Jersey, USA) 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonların başlangıçtaki pH değeri 7.0 olacak şekilde NaOH ve HCl ile ayarlanmıştır. 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilen fermentasyonlar 48 saat boyunca sürdürülmüş ve belirli aralıklarla ortamdan 5.0 mL hacminde örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde toplam fermente edilebilir şeker analizi, toplam biyokütle analizi ve toplam HA miktarı analizi gerçekleştirilmiştir.

Besiyeri optimizasyonu boyunca gerçekleştirilen fermentasyonlarda ortama inoküle edilecek mikroorganizmalar BHI sıvı besiyerinde 37°C sıcaklıkta 24 saat boyunca etüvde geliştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar deneme deseninde yer alan inokülasyon oranında fermentasyon ortamına inoküle edilmiştir.

Çizelge 3.2. PB tasarımı deneme deseni

Deneme numarası	Bileşen Kodları										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	8.0	1.3	5.0	2.0	1.5	2.0	5.0	0.005	5.0	5.0	6.0
2	6.0	2.0	0.0	2.5	2.0	1.5	10.0	0.008	10.0	0.0	5.0
3	6.0	0.5	0.0	2.5	1.0	2.5	10.0	0.002	10.0	10.0	7.0
4	10.0	0.5	10.0	2.5	2.0	1.5	0.0	0.002	10.0	0.0	7.0
5	8.0	1.3	5.0	2.0	1.5	2.0	5.0	0.005	5.0	5.0	6.0
6	6.0	0.5	10.0	1.5	2.0	2.5	0.0	0.008	10.0	10.0	5.0
7	6.0	2.0	10.0	1.5	2.0	2.5	10.0	0.002	0.0	0.0	7.0
8	10.0	2.0	0.0	2.5	2.0	2.5	0.0	0.002	0.0	10.0	5.0
9	10.0	2.0	0.0	1.5	1.0	2.5	0.0	0.008	10.0	0.0	7.0
10	10.0	2.0	10.0	1.5	1.0	1.5	10.0	0.002	10.0	10.0	5.0
11	6.0	2.0	10.0	2.5	1.0	1.5	0.0	0.008	0.0	10.0	7.0
12	8.0	1.3	5.0	2.0	1.5	2.0	5.0	0.005	5.0	5.0	6.0
13	10.0	0.5	0.0	1.5	2.0	1.5	10.0	0.008	0.0	10.0	7.0
14	6.0	0.5	0.0	1.5	1.0	1.5	0.0	0.002	0.0	0.0	5.0
15	10.0	0.5	10.0	2.5	1.0	2.5	10.0	0.008	0.0	0.0	5.0

A: Keçiboynuzu ekstraktı (°Bx), B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), C: Kazein (g/L), D: KH_2PO_4 (g/L), E: NaCl (g/L), F: K_2HPO_4 (g/L), G: Maya ekstraktı (g/L), H: FeSO_4 (g/L), J: Et ekstraktı (g/L), K: Pepton, L: İnokülasyon oranı (%)

3.2.2. Fermentasyon şartlarının HA'nın moleküler ağırlığı üzerine etkisi

Plackett-Burman tasarımı ile elde edilen optimum bileşime sahip besiyeri kullanılarak biyoreaktörde üretim fermentasyonu şartlarının HA'nın molekül ağırlığı dağılımı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu nedenle Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılarak 3 faktörlü ve 3 seviyeli deneme desenleri oluşturulmuştur. Bu deneme desenindeki değişken faktörler karıştırma hızı, havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu olarak belirlenmiştir. Seçilen faktörlere ait alt ve üst sınırlar Çizelge 3.3'te verilmiştir. Box-Behnken metoduyla oluşturulan deneme deseni (Çizelge 3.4) üç orta nokta içerecek şekilde 15 deneme şeklinde tasarlanmıştır.

Çizelge 3.3. BB tasarım faktörlerin minimum ve maksimum değerleri

Değişken	Birim	Minimum Değer	Maksimum Değer	Kaynak
Karıştırma hızı	rpm	400	600	(Amado vd., 2017)
Havalandırma miktarı	vvm	0.5	1.0	(Amado vd., 2017; Liu vd., 2008a)
Başlangıç biyokütle	OD	0.6	1.0	(Don & Shoparwe, 2010)

Fermentasyonlar sırasında sıcaklık ve pH sırasıyla 37°C ve 7.0 olarak kontrol edilmiştir. Başlangıç inokülasyonu için bakteriler steril edilmiş BHI sıvı besiyerinde 37°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında istenilen optik yoğunluğa (OD) gelene kadar gelişime bırakılmıştır (Don & Shoparwe; 2010).

Çizelge 3.4. BB tasarım deneme deseni

Deneme numarası	Karıştırma hızı (rpm)	Havalandırma miktarı (vvm)	Başlangıç biyokütle (OD)
1	500	0.50	0.6
2	400	0.50	0.8
3	500	0.75	0.8
4	600	0.50	0.8
5	500	0.75	0.8
6	400	0.75	0.6
7	600	0.75	0.6
8	500	1.00	0.6
9	500	0.75	0.8
10	600	1.00	0.8
11	400	1.00	0.8
12	500	0.50	1.0
13	500	1.00	1.0
14	600	0.75	1.0
15	400	0.75	1.0

Deneme deseninin sunduğu şartlarda önceki basamakta belirlenen optimum besiyeri bileşimi (10 °Bx keçiyoynuzu ekstraktı, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 10.0 g/L kazein, 2.5 g/L KH₂PO₄, 2.0 g/L NaCl, 1.5 g/L K₂HPO₄, 0.002 FeSO₄, 10.0 g/L et ekstraktı) kullanılarak 2 tekerrürlü olacak şekilde 2 L hacminde biyoreaktörlerde (Sartorius Bioastad B Plus Goettingen, Almanya) Çizelge 3.4'te verilen tasarıma göre fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışma hacmi 0.75 L olan fermentasyonlar öncesi biyoreaktör ve pH kontrolü için kullanılan NaOH ile HCl ayrı ayrı 121°C sıcaklıkta 15 dk. boyunca sterilize edilmiştir. Sıcaklık ve pH kontrollü fermentasyonlarda pH 5N NaOH ve 2 N HCl ile sabitlenmiştir. Fermentasyon süresince ortamdan düzenli aralıklarla 5 mL hacminde örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde toplam fermente edilebilir şeker analizi, toplam biyokütle analizi ve HA miktarının kromatografik analizi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yanıt yüzeyinin HA miktarı olarak belirlendiği optimizasyonda her denemede üretilen HA için molekül ağırlığı dağılımı size-exclusion kromatografi yöntemiyle tespit edilerek molekül ağırlığı açısından sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.3. Fermentasyon Ortamından Alınan Örneklerle Uygulanan Analizler

3.3.1. Hyaluronik asit içeren örneklerin ekstraksiyonu

Besiyerinden alınan örneklerde analizler gerçekleştirilmeden önce fermentasyon ortamından gelebilecek safsızlıkları en aza indirmek için ekstraksiyon işlemi yapılmaktadır. Özellikle HA analizinde kullanılan karbazol reaktifi şeker türevleriyle reaksiyon vermekte ve analizin doğruluğunu düşürmektedir (Bitter, 1962). Bu nedenle örneklerle aşağıdaki işlemler uygulanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon ortamından alınan örnekler ilk önce örnek hacminin %10'u kadar %5'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında biyokütlenin uzaklaştırılması için 15,000 x g dönme hızında 15 dk. boyunca santrifüj (VWR Mega Star 3.0R, Osterode am Harz, Germany) işlemi gerçekleştirilmiş ve berrak kısım (süpernatant) toplam şeker ve toplam HA analizi için ayrılmıştır. HA analizi için ayrılan örnekler üzerine 1:3 örnek:etanol olacak şekilde %95'lik etanol çözeltisi ilave edilmiş ve 1 saat +4°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnek-etanol karışımı 10,000 g dönme hızında 10 dk. boyunca santrifüj edilerek HA'nın çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pellet %5'lik NaCl çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Etanolla yıkama işlemi 3 kez tekrar edildikten sonra kalan pelletler saf suda çözündürülerek HA miktarları karbazol yöntemiyle ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmiştir (Amado vd., 2016).

3.3.2. Karbazol yöntemiyle toplam HA analizi

HA üretim miktarları modifiye edilmiş Bitter (1962) karbazol metoduyla ölçülmüştür. Bu metot kapsamında kullanılan reaktifler ve hazırlanışı şu şekildedir:

Sülfürik asit reaktifi; 0.025 M sodyum tetraborat sülfürik asitte çözündürülerek hazırlanmıştır. Karbazol reaktifi ise %0.125 karbazol içerek şekilde etanol veya metanolde çözündürülerek hazırlanmıştır.

HA miktarı tayini için öncelikle +4°C sıcaklığa soğutulmuş sülfürik asit reaktifi 5 mL olacak şekilde deney tüplerine alınmıştır. Deney tüplerinde soğutulmuş sülfürik asit reaktifi üzerine ekstrakte edilmiş örnek solüsyonlarından 1 mL yavaşça ilave edilerek tüplerin kapağı kapatılmıştır. Sülfürik asit reaktifiyle örneğin karışması sırasında ciddi sıcaklık yükselişi meydana geldiği için tüpler buz içerisinde öncelikle yavaşça çalkalanmıştır. Soğuyan reaktif-örnek karışımı homojen hale gelinceye kadar (8-10 sn.) çalkalanmıştır. Bu işlemin ardından deney tüpleri kaynar su içeren su banyosunda 10 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızlı bir şekilde buz içerisinde soğutulmuştur. Soğutma işlemi sonrasında oda sıcaklığına getirilen tüplere 0.2 mL karbazol reaktifi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmış ve yeniden kaynar su içeren su banyosunda 15 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örnekler hızlıca soğutulduktan sonra 530 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) ölçülmüştür.

Okunan absorbans değerleri 4-40 µg/mL glukuronik asit çözeltileriyle hazırlanan standart eğride (Ek-1) yerine konularak HA miktarları hesaplanmıştır. HA absorbanslarının glukuronik asit absorbanslarından 2.05 kat fazla olduğu tahmin edilmektedir (Doubouya, 2014).

3.3.3. HA miktarının kromatografik olarak belirlenmesi

Biyoreaktörde gerçekleştirilen optimizasyon denemelerinde üretilen HA miktarı ve molekül ağırlığı dağılımı moleküler ayırma (size-exclusion, SEC) kromatografisi ile belirlenmiştir. HA içeren örnekler RefractoMax 520 kırılma indeksi dedektörü, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve bilgisayar denetleyicisi bulunan HPLC (ThermoScientific,

Ultimate 3000, Waltham, MA, ABD) cihazında Shodex OH-Pak SB806M kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 0.1 M NaNO₃ hazırlanmış ve mobil faz aynı zamanda örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır. Fermentasyon ortamından alınan örnekler önce üç kat seyreltilerek 0.45 µm'lik filtreden geçirilmiş ve 2 mL hacmindeki viallere doldurulmuştur. Analiz 0.5 mL/dk akış hızında, 50 µL enjeksiyon hacminde 40 dk. sürede gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı ise 25°C'de sabit tutulmuştur (Pan vd., 2017).

HA miktarını belirlemek için 30-50 kDa, 50-70 kDa, 70-120 kDa, 500-700 kDa, 1000-1250 kDa ve 1250-1750 kDa olmak üzere farklı molekül ağırlıklarındaki HA standartları ile 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak standart eğriler oluşturulmuştur. Fermentasyonlar sonucunda üretilen HA miktarları uygun molekül ağırlığındaki standart eğriler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.4. Toplam indirgen şeker analizi

Gerçekleştirilen tüm fermentasyonlar için ortamdaki alınan örneklerde 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metoduyla toplam indirgen şeker miktarları tayin edilmiştir (Miller, 1959). Analiz sırasında DNSA çözeltisi, 5N KOH çözeltisi ve %40'lık potasyum sodyum tartarat (PST) çözeltisi kullanılmıştır. DNSA çözeltisi; 10.0 g/L 3,5-dinitrosalisilik asit, 10.0 g/L NaOH ve 0.5 g/L sodyum sülfat tuzunun 1 L saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Analizde kullanılan diğer çözeltiler ise uygun konsantrasyonlarda hazırlanarak buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam indirgen şeker analizi metodu şu şekilde uygulanmıştır;

Öncelikle örnekler güvenilir ölçüm aralığında (0.200-0.600 abs) kalması için seyreltilmiştir. Ardından seyreltilmiş örnekler deney tüpleri içerisine konulan 1.95 mL saf suyun üzerine 0.05 mL örnek olacak şekilde eklenmiş ve 0.04 mL %37'lik HCl asit çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Asit çözeltisi eklenen karışım hidroliz için 90°C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk. boyunca bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler oda sıcaklığına soğutulularak nötrleştirme işlemi için 0.1 mL 5N KOH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Baz ilavesi sonrasında tüplerden 0.64 mL sıvı çekilerek üzerlerine 1.5 mL DNSA çözeltisi eklenmiştir. Bu sırada kör olarak 1.5 mL su ile 1.5 mL DNSA çözeltisi karıştırılmıştır. Tüplerdeki karışım çalkalandıktan sonra DNSA çözeltisinin indirgen şekerlerle reaksiyona girmesi için 15 dk. boyunca 90°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler yeniden oda sıcaklığına soğutulmuş ve renk stabilizasyonu için %40'lık PST çözeltisi eklenmiştir. Tüplerde bulunan karışımların spektrofotometrik ölçümü 575 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri daha önceden standart sakaroz çözeltileri ile hazırlanan standart eğride yerine konularak örneklerin içerdiği toplam indirgen şeker miktarları hesaplanmıştır. Standart eğri Ek-2'de verilmiştir. Analizler 2 paralelli örneklerle gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Toplam biyokütle analizi

Fermentasyon ortamından alınan tüm örneklerde bakterilerin gelişimlerini takip etmek için optik yoğunluk (OD) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler öncelikli olarak

1:10 örnek:su olacak şekilde saf suyla seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi sonrasında 700 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonunda elde edilen absorpsanlar seyreltme faktörüyle çarpılıp OD cinsinden hesaplanmıştır (Amado vd., 2016).

3.4. Kinetik Parametreler

Fermentasyonlar sırasında ortamdan alınan örneklerde toplam indirgen şeker, biyokütle ve HA miktarı analizleri gerçekleştirilerek elde edilen veriler kullanılarak en yüksek HA üretim miktarına sahip denemeye ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. Bu doğrultuda kinetik parametrelerin hesaplanmasında aşağıdaki denklemlerden yararlanılmıştır (Germec vd., 2019).

$$\text{Şeker tüketimi: } \Delta S \text{ (g/L)} = S_0 - S_{min}$$

$$\text{HA üretimi: } P \text{ (g/L)} = P_{maks}$$

$$\text{Biyokütle gelişimi: } X \text{ (OD)} = X_{maks} - X_{min}$$

$$\text{HA verimi: } (Y_{P/S}, \%) = (P_{maks} / (X_{maks} - X_{min})) \times 100$$

$$\text{Şeker tüketim oranı (\%)} = ((S_0 - S_{min}) / S_0) \times 100$$

$$\text{Maksimum tüketim hızı } (Q_S, \text{ g/L/sa}) = (-ds/dt)_{maks}$$

$$\text{Maksimum üretim hızı } (Q_P, \text{ g/L/sa}) = (dp/dt)_{maks}$$

$$\text{Maksimum gelişim Hızı } (Q_X, \text{ OD/sa}) = (dx/dt)_{maks}$$

S_0 : Başlangıç şeker konsantrasyonu (g/L)

S_{min} : En düşük şeker konsantrasyonu (g/L)

P_{maks} : Maksimum HA üretimi (g/L)

X_{maks} : Maksimum biyokütle miktarı (OD)

X_{min} : En düşük biyokütle miktarı (OD)

$(-ds/dt)_{maks}$: Zamana göre maksimum şeker tüketim hızı

$(dp/dt)_{maks}$: Zamana göre maksimum HA üretim hızı

$(dx/dt)_{maks}$: Zamana göre maksimum biyokütle gelişim hızı

3.5. İstatistiksel Analiz

Besiyeri bileşimi optimizasyonu için yanıt olarak HA üretim miktarı seçilmiş ve optimizasyon işlemine ait verilerin istatistiksel analizinde Design Expert (Version 10.0.0; Minneapolis, MN) yazılımı kullanılmıştır. Optimizasyon işlemi için oluşturulan modelin ve faktörlerin varyans analizi (ANOVA) %95 güven seviyesinde belirlenmiştir (Erkan vd.; 2020).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında öncelikle keçiboynuzu ekstraktı içeren besiyeri optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından belirlenen besiyeri bileşimi kullanılarak biyoreaktörde HA üretim şartları optimize edilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlar ait tespit edilen veriler, istatistiksel analizler ve sonuçlara ait tartışmalar bu bölümde paylaşılmıştır.

4.1. Plackett-Burman Tasarımıyla Oluşturulan Optimum Besiyeri Bileşimi

Keçiboynuzu meyvesi ekstraktının karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyeri optimizasyonu için PB tasarım ile 15 farklı deneme fermentasyonu oluşturulmuştur. İki tekerrürlü olarak planlanan fermentasyonlar 200 mL besiyeri hacminde başlangıç pH değeri 7.0 olarak ayarlandıktan sonra 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca sürdürülmüştür. Fermentasyonlar süresince düzenli olarak ortamdan örnekler alınmış ve HA, toplam indirgen şeker ve toplam biyokütle analizleri yapılmıştır. PB tasarım kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon için yanıt olarak HA miktarı kullanılmıştır.



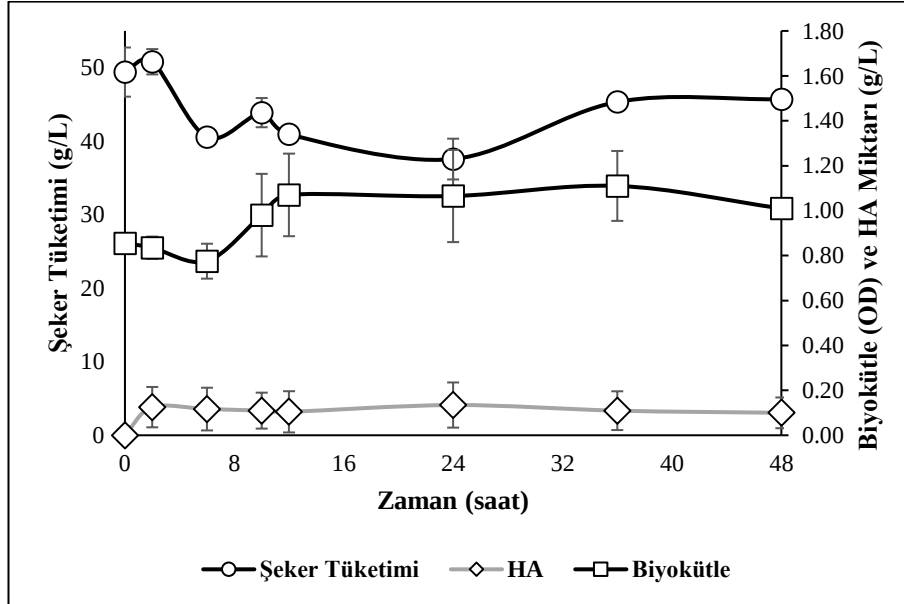
Şekil 4.1. PB tasarım deneme desenine göre çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonlara ait görüntüler

Besiyeri optimizasyonu için Çizelge 3.2.'ye göre gerçekleştirilen fermentasyonlara ait parametrelerin izlendiği grafikler ve elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla belirtilmiştir. Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan bir numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. PB tasarımı 1 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	8.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	1.3
Kazein (g/L)	5.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.0
NaCl (g/L)	1.5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.0
Maya ekstraktı (g/L)	5.0
FeSO ₄ (g/L)	0.005
Et ekstraktı (g/L)	5.0
Pepton (g/L)	5.0
İnokülasyon (%)	6.0

1 numaralı fermentasyon denemesinde en yüksek HA miktarı 0.135 g/L olarak 24. saatte tespit edilmiştir. Başlangıç şeker içeri 49.4 g/L olan denemede 0,855 OD optik yoğunluğa sahip hücrelerle fermentasyon başlatılmış ve en yüksek biyokütle yoğunluğu 1.110 olarak 36. saatte ölçülmüştür. Yaklaşık olarak 11.8 g/L şeker tüketimi gerçekleşmiş ve hücre gelişimi şeker tüketimiyle orantılı şekilde artarak 12. saatten itibaren hücrelerin durağan faza geçtiği görülmüştür.

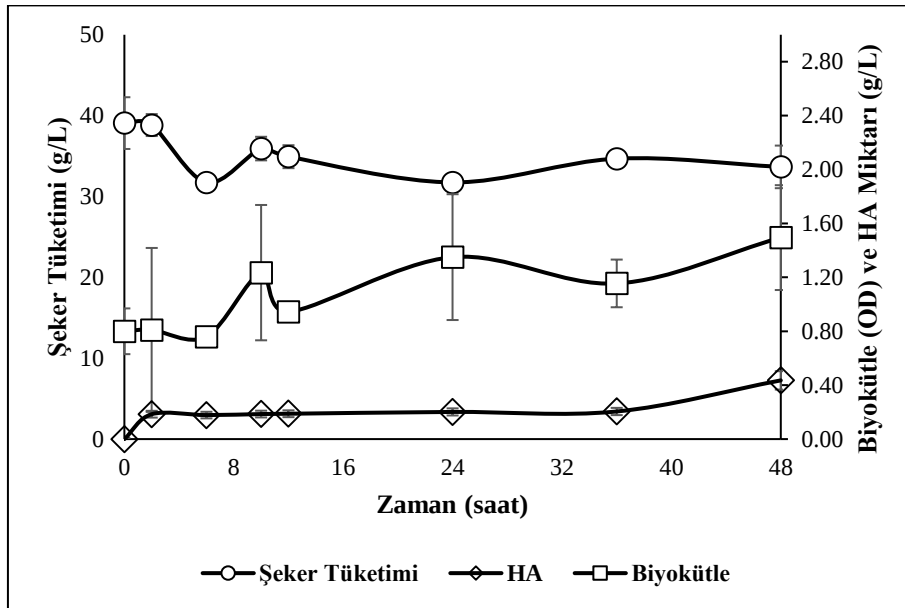
**Şekil 4.2.** PB tasarımı 1 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan iki numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. PB tasarımı 2 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	5.0

2 numaralı fermentasyon denemesinde en yüksek HA miktarı 0.435 g/L olarak 48. saatte tespit edilmiştir. Başlangıç şeker içeri 39.1 g/L olan denemede 0,800 OD optik yoğunluğa sahip hücrelerle fermentasyon başlatılmış ve en yüksek biyokütle yoğunluğu 1.495 olarak fermentasyon sonunda ölçülmüştür. Düşük şeker tüketimi (7.3 g/L) olmasına rağmen biyokütle artışı fermentasyon sonuna kadar devam etmiştir. Biyokütle gelişimine rağmen HA maksimum üretim miktarı 0.435 g/L olarak tespit edilmiştir.



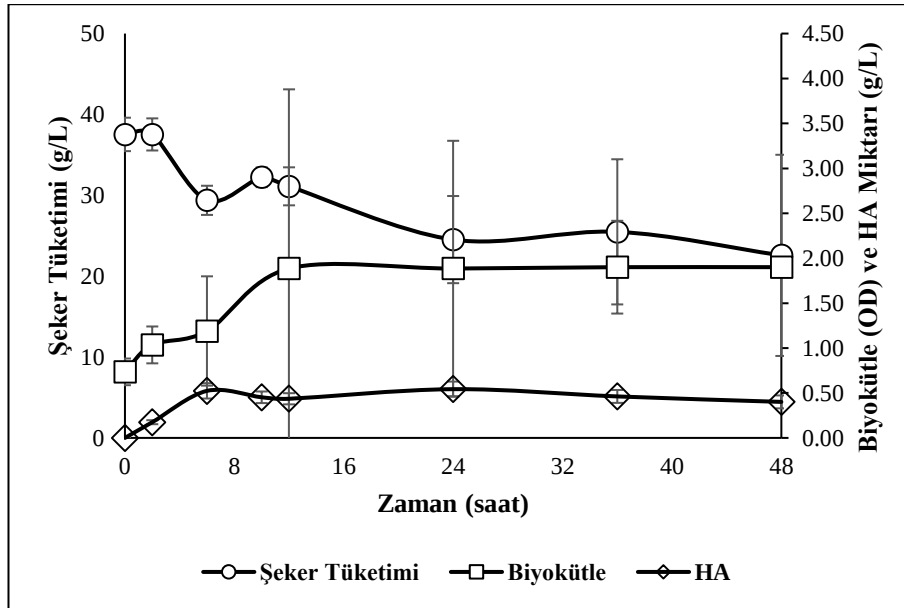
Şekil 4.3. PB tasarımı 2 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan üç numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. PB tasarımı 3 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	7.0

Çizelge 4.3'te bileşimi verilen fermentasyon 0.735 OD değerine sahip hücreler inoküle edilerek başlatılmıştır. Son saate kadar şeker tüketiminin (14.95 g/L) devam ettiği fermentasyonda, biyokütle 12. Saate kadar gelişerek maksimum 1.900 OD'ye ulaşmıştır. Öte yandan maksimum HA miktarı (0.542 g/L) 24. Saatte ölçülse de fermentasyonun 6. Saatinde 0.524 g/L HA üretilmiş olup yaklaşık 8.2 g/L şeker tüketimi gerçekleşmiştir. Fermentasyonun geri kalan sürecinde şeker tüketimi devam etse de biyokütle gelişimi (12. Saat) ve HA üretimi (6. Saaat) neredeyse sabit kalmıştır.



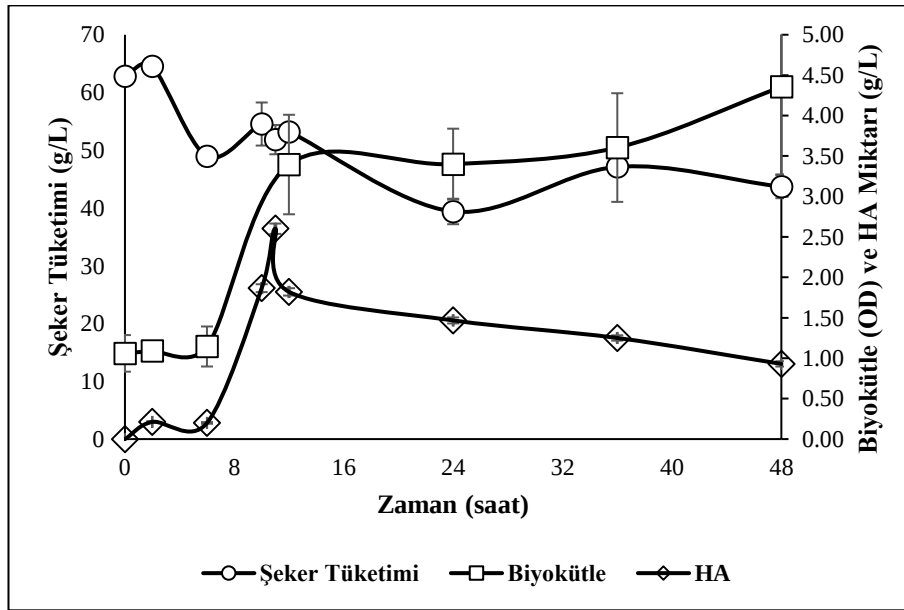
Şekil 4.4. PB tasarımı 3 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan dört numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. PB tasarımı 4 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	7.0

PB tasarımın sunduğu 4 numaralı denemede HA üretim miktarı 2.60 g/L olarak tespit edilmiştir. Başlangıç biyokütle yoğunluğu 1.060 OD'den fermentasyon sonunda 4.355 OD'ye yükselmiştir. Fermentasyonda 6. Saate kadar hızlı bir şeker tüketimi (13.8g/L) gerçekleşirken biyokütle yoğunluğu ve HA miktarı sabit kalmakta sonrasında ise 12. Saate kadar biyokütle miktarı 3 katına kadar artmaktadır. Fermentasyonda maksimum şeker tüketimi 23.4 g/L olarak ölçülmüştür.



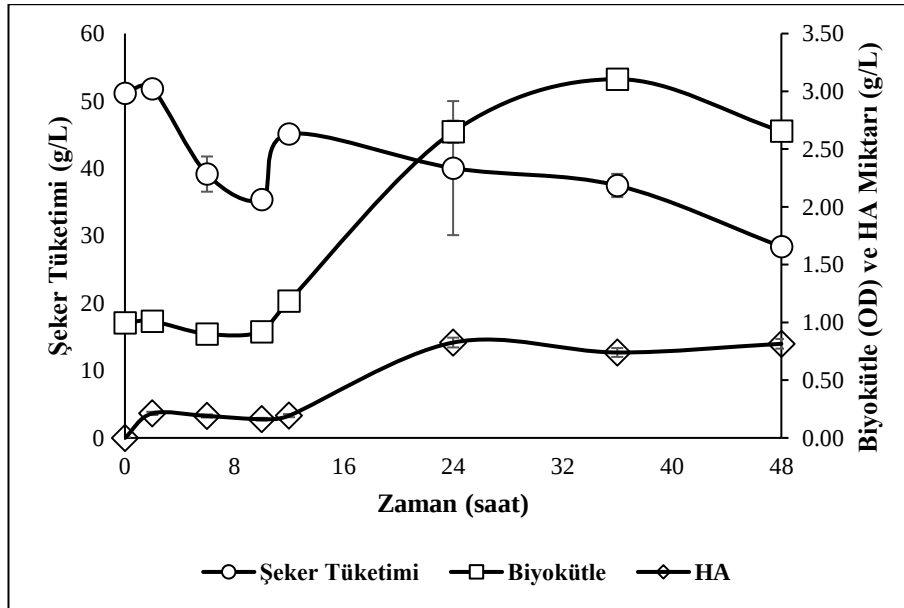
Şekil 4.5. PB tasarımı 4 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan beş numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. PB tasarımı 5 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	8.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	1.3
Kazein (g/L)	5.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.0
NaCl (g/L)	1.5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.0
Maya ekstraktı (g/L)	5.0
FeSO ₄ (g/L)	0.005
Et ekstraktı (g/L)	5.0
Pepton (g/L)	5.0
İnokülasyon (%)	6.0

Deneme deseninde orta nokta değerlerine sahip bir diğer fermentasyonda başlangıç şeker içeriği 51.1 g/L ve başlangıç biyokütle yoğunluğu ise 0.995 g/L olarak tespit edilmiştir. En yüksek HA konsantrasyonun 24. saat sonunda 0.825 g/L olarak tespit edildiği denemede maksimum şeker tüketim miktarı 22.7 g/L ve maksimum biyokütle gelişimi 3.105 OD olarak ölçülmüştür. 5 numaralı fermentasyon incelendiğinde 10. Saate kadar hızlı bir şeker tüketiminin gerçekleştiği (15.7 g/L) ve bu saate kadar neredeyse sabit kalan HA ve biyokütle miktarlarının ise yükselişe geçtiği görülmektedir.



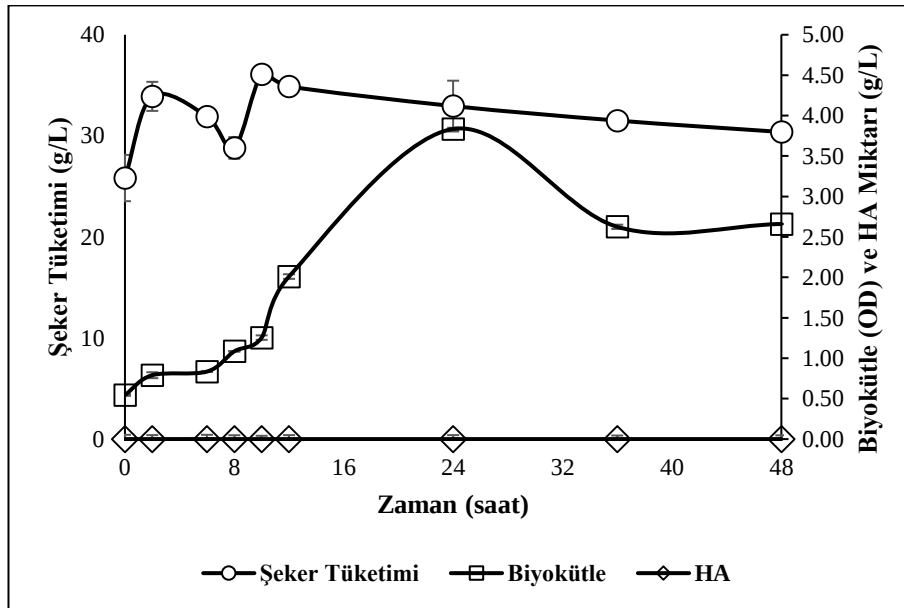
Şekil 4.6. PB tasarımı 5 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan altı numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. PB tasarımı 6 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	5.0

Çizelge 4.6’da içeriği verilen fermentasyonda en düşük inokülasyon oranı ve en düşük keçiyoynuzu ekstraktı konsantrasyonu ile oluşturulan besiyerinde HA üretim fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyona ait başlangıç şeker içeriği ve başlangıç biyokütle yoğunluğu miktarları sırasıyla 25.8 g/L ve 0.545 OD olarak tespit edilmiştir. Neredeyse hiç HA üretimi gözlenmeyen fermentasyonda (0.0002 g/L) ortamdaki toplam şeker miktarının ise yapılan ölçümlerde yükseldiği görülmektedir.



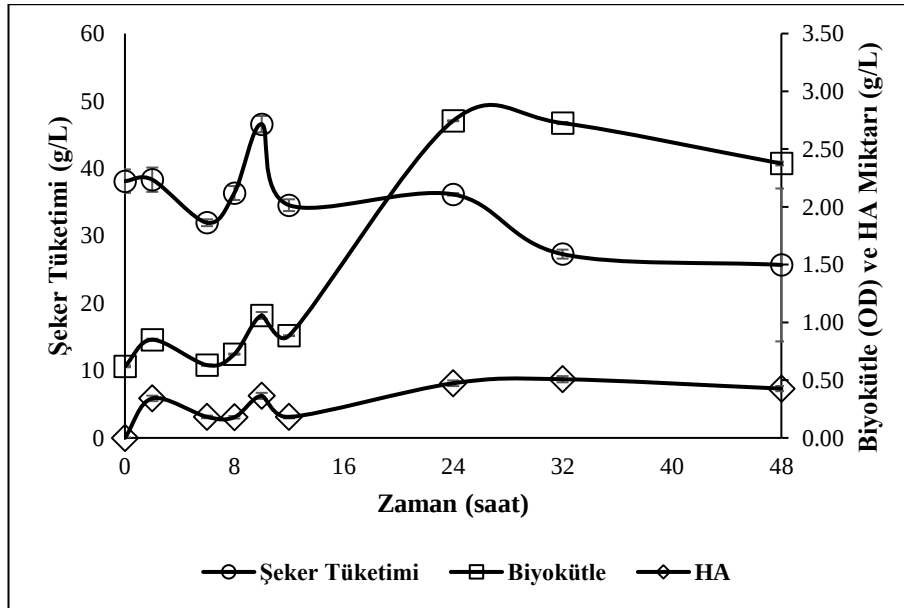
Şekil 4.7. PB tasarımı 6 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan yedi numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. PB tasarımı 7 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	7.0

PB tasarımın sunduğu 7 numaralı fermentasyon denemesinde başlangıç şeker miktarı 38.1 g/L ve başlangıç biyokütle yoğunluğu 0.620 OD olarak tespit edilmiştir. Maksimum şeker tüketiminin 12.4 g/L olduğu denemede en yüksek HA miktarı 0.51 g/L olarak ölçülmüştür. Tasarımdaki maksimum oranda (%7.0) inokülasyon gerçekleştirilen besiyerinde biyokütlenin neredeyse 5'e katlanarak 2.745 OD'ye ulaştığı gözlemlenmiştir. Fermentasyonun 10. saatinde biyokütle, HA ve toplam şeker miktarlarının hızlıca yükselip yeniden azaldığı ve daha sonra olağan değişimin devam ettiği görülmektedir.



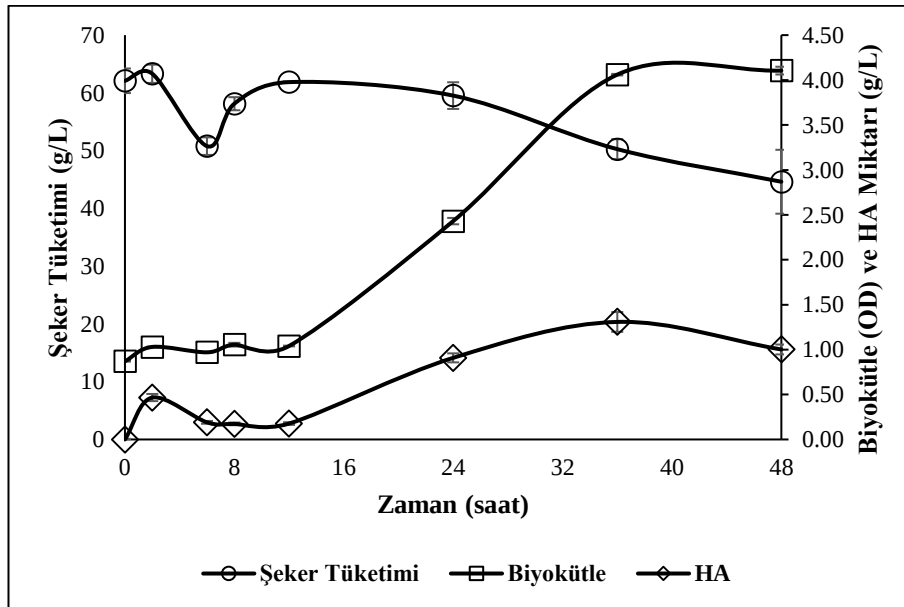
Şekil 4.8. PB tasarımı 7 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan sekiz numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. PB tasarımı 8 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	5.0

Başlangıç toplam şeker miktarı ve biyokütle oranı sırasıyla 62.1 g/L ve 0.870 OD olan 8 numaralı fermentasyonda en yüksek HA miktarına 36. saatte 1.31 g/L olarak ulaşılmıştır. Toplamda 17.5 g/L şeker tüketiminin gerçekleştiği fermentasyonda biyokütle yoğunluğu fermentasyon sonunda 4.105 OD'ye ulaşmıştır.



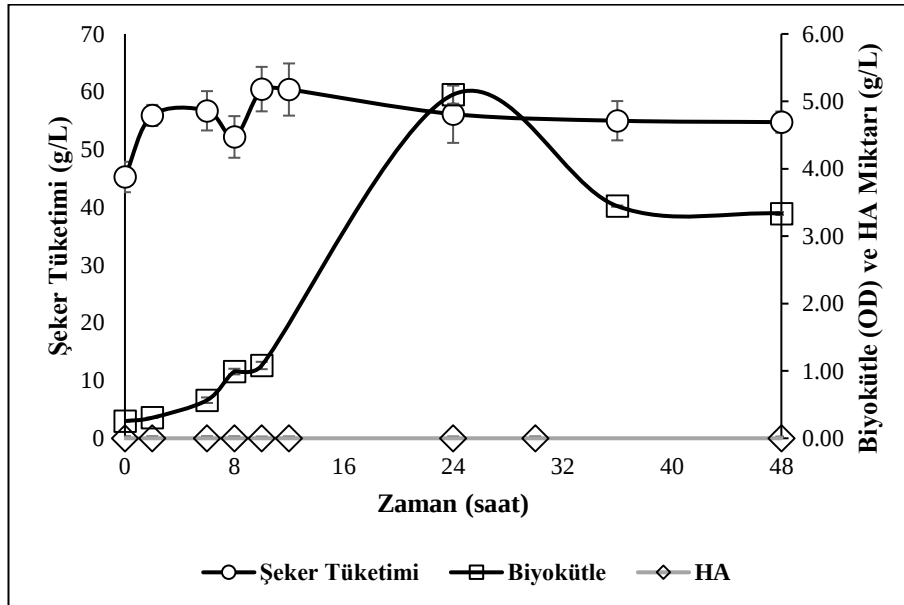
Şekil 4.9. PB tasarımı 8 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan dokuz numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. PB tasarımı 9 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	7.0

Başlangıç şeker içeriğinin 44.5 g/L olduğu 9 numaralı besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon %7.0 inokülasyon oranında başlatılmıştır. Fermentasyonun 24. saatinde 5.100 OD'ye çıkan üretici mikroorganizma yoğunluğu daha sonra ölüm fazına girerek 3.335 OD yoğunluğa kadar düşmüştür. Fermentasyon boyunca yapılan HA analizlerinde herhangi bir değer saptanamamıştır.



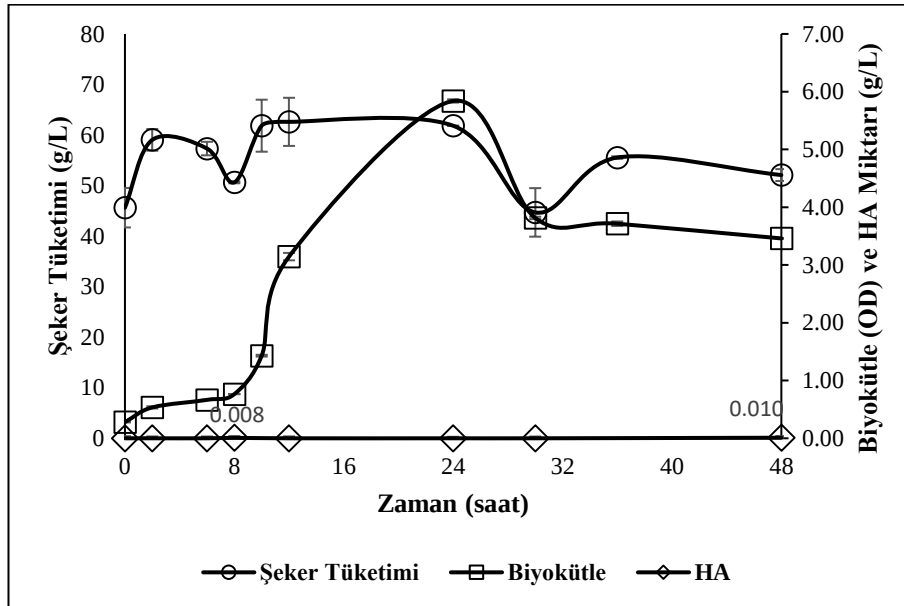
Şekil 4.10. PB tasarımı 9 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.10. PB tasarımı 10 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	5.0

PB tasarımın 10 numaralı denemesinde 46.8 g/L başlangıç şeker içeriğine sahip besiyerinde 0.01 g/L HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonda %5 oranında inokülasyonu ile başlatılan fermentasyonda maksimum biyokütle yoğunluğuna (5.840 OD) 24. saatte ulaşmış ve sonrasında düşüşe geçmiştir.



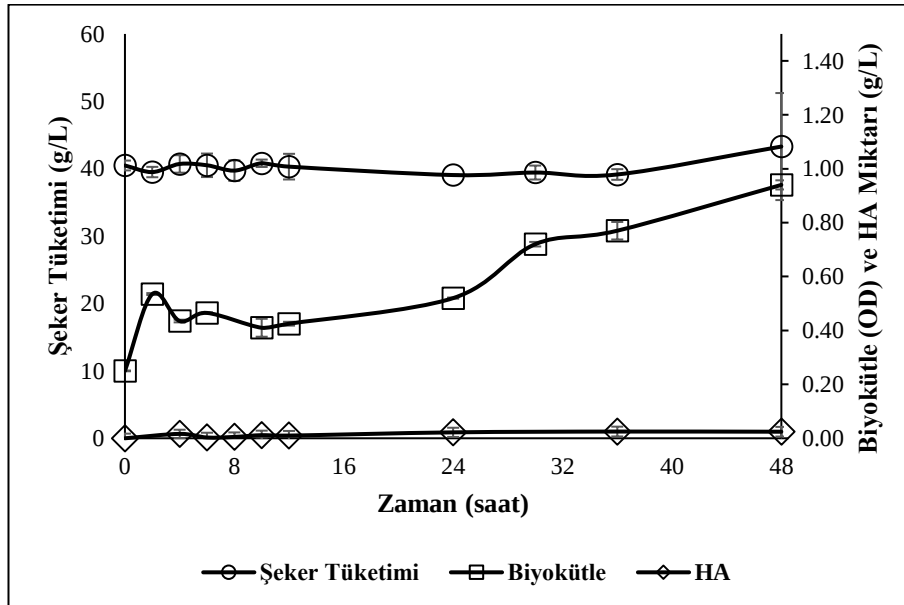
Şekil 4.11. PB tasarımı 10 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on bir numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.11. PB tasarımı 11 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiboynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	2.0
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	7.0

Fermentasyon boyunca maksimum HA üretiminin 0.03 g/L olarak 36. saatte belirlendiği denemede başlangıç şeker içeriği 40.5 g/L olan besiyeri kullanılmıştır. Başlangıçta %7 oranında ortama hücre inokülasyonu gerçekleştirilmiş ve diğer fermentasyonlara kıyasla daha düşük miktarda (maksimum 0.940) hücre gelişimi gözlemlenmiştir.



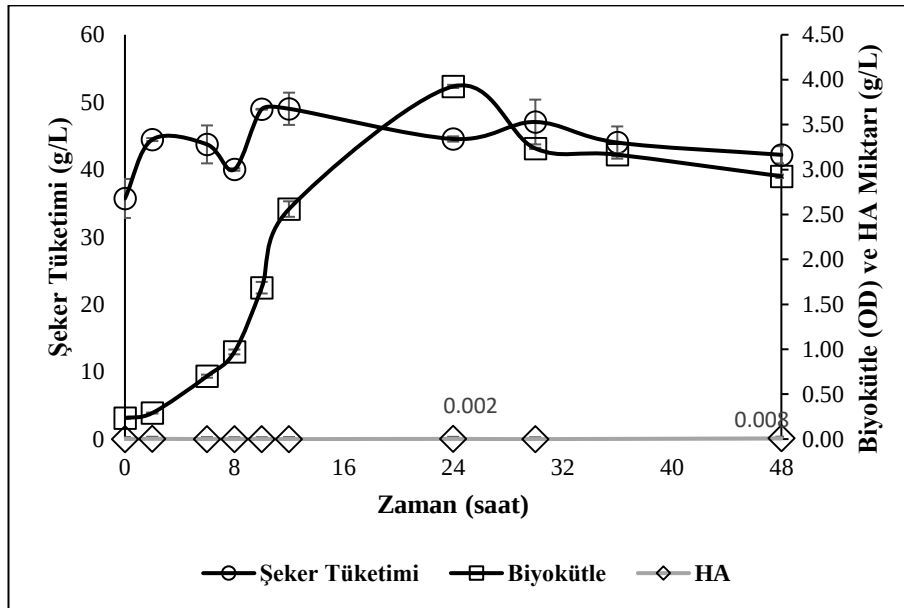
Şekil 4.12. PB tasarımı 11 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on iki numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.12. PB tasarımı 12 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	8.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	1.3
Kazein (g/L)	5.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.0
NaCl (g/L)	1.5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.0
Maya ekstraktı (g/L)	5.0
FeSO ₄ (g/L)	0.005
Et ekstraktı (g/L)	5.0
Pepton (g/L)	5.0
İnokülasyon (%)	6.0

PB tasarımda orta nokta değerlerine sahip bir diğer fermentasyonda 36.6 g/L başlangıç şeker içeriğine sahip olan besiyerinde HA üretimi gerçekleştirilmiştir. İnoküle edilen bakterilerin optik yoğunluğunun 24. saatte 3.925 OD'ye kadar yükseldiği gözlemlenmiştir. Başlangıç biyokütle yoğunluğunun düşük olduğu fermentasyonda 24. ve 48. saatlerde sırasıyla 0.002 ve 0.008 g/L HA tespit edilmiştir. Toplam fermente edilebilir şeker miktarının ölçümlerinde yükselişler izlenmiştir.



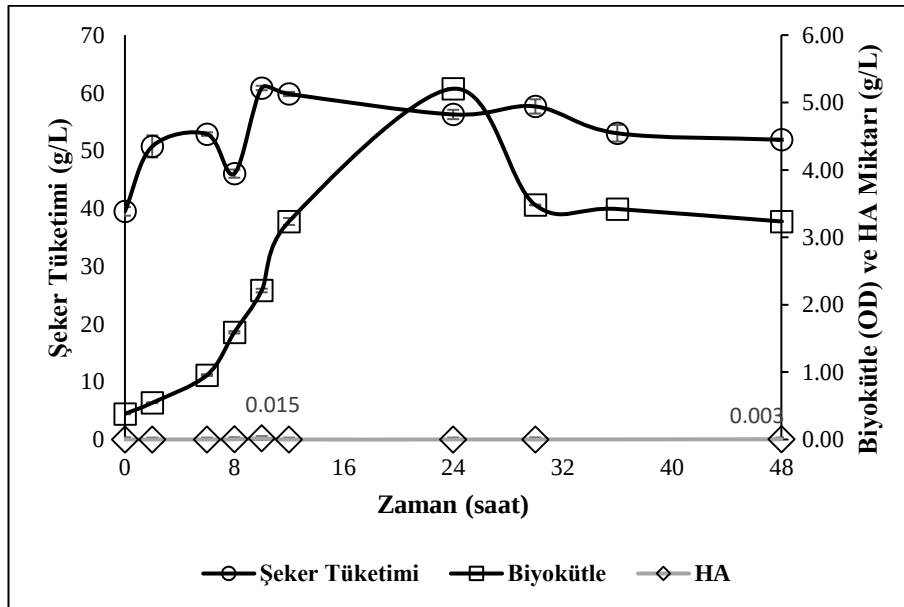
Şekil 4.13. PB tasarımı 12 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on üç numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. PB tasarımı 13 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiboynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	10.0
İnokülasyon (%)	7.0

Fermentasyon süresince maksimum HA miktarı 0.015 g/L olarak 10. ve maksimum biyokütle yoğunluğu (5.205 OD) 24. saatte tespit edilirken, başlangıç toplam şeker içeriği ve biyokütle yoğunluğu sırasıyla 39.3 g/L ve 0.380 OD değerinde ölçülmüştür.



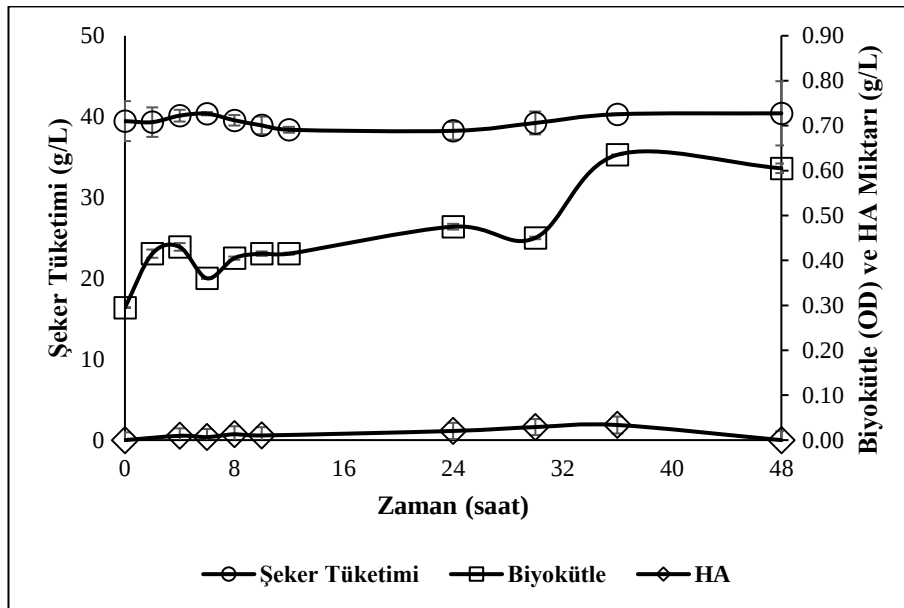
Şekil 4.14. PB tasarımı 13 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on dört numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.14. PB tasarımı 14 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	6.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	0.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	5.0

PB tasarımının minimum değerlerle oluşturduğu 14 numaralı denemede herhangi bir azot kaynağı bulunmamaktadır. Başlangıç fermente edilebilir şeker miktarı 39.4 g/L olan fermentasyonda biyokütle gelişimi ve HA üretimi oldukça düşük kalmıştır. Hücrelerin sadece ikiye katlandığı (maksimum 0.635 OD) fermentasyonda maksimum HA miktarı 0.034 g/L olarak 36. saatte tespit edilmiştir.



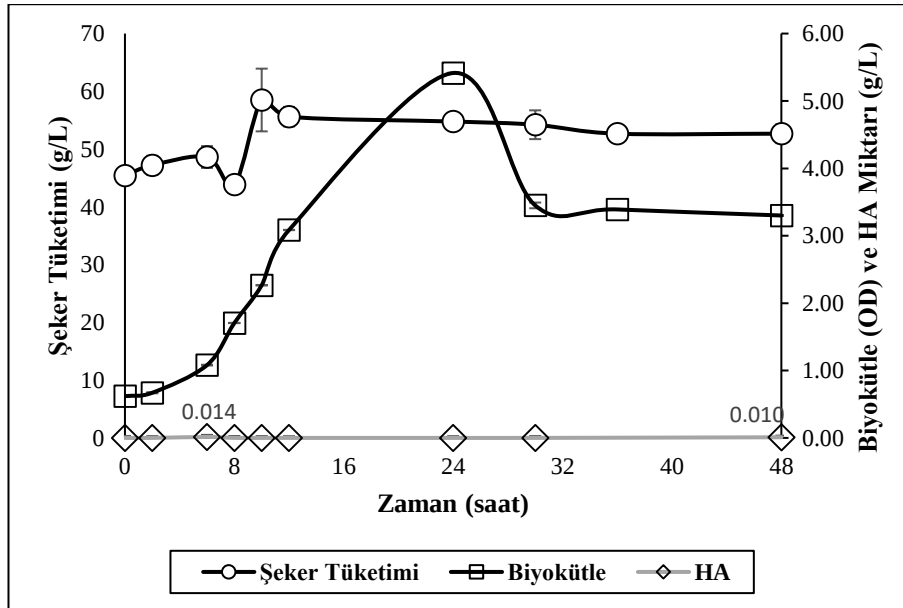
Şekil 4.15. PB tasarımı 14 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

Deneme desenindeki şartlara göre hazırlanan on beş numaralı besiyerine ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 4.15. PB tasarımı 15 numaralı besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiboynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	1.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2.5
Maya ekstraktı (g/L)	10.0
FeSO ₄ (g/L)	0.008
Et ekstraktı (g/L)	0.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	5.0

Başlangıç şeker içeriği 45.4 g/L olan 15 numaralı besiyerine 0.620 OD değere sahip bakteriler %5 oranla inoküle edilmiştir. Şeker miktarının önceki fermentasyonlardaki gibi arttığının görüldüğü denemede maksimum HA miktarı 0.014 g/L olarak tespit edilmiştir. Biyokütle gelişiminin 24. saate kadar arttığı ancak daha sonra azalıp 32. saatten itibaren sabit kaldığı görülmektedir. Fermentasyon süresince en yüksek biyokütle yoğunluğu 5.415 OD olarak gözlemlenmiş olmakla birlikte HA üretimi oldukça düşük miktarda gerçekleşmiştir.



Şekil 4.16. PB tasarımı 15 numaralı deneme fermentasyonuna ait parametreler

4.1.1. PB tasarımı etkili parametrelerin belirlenmesi ve istatistiksel analiz

Fermentasyonlar sonrasında ölçülen HA miktarları PB tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen besiyeri optimizasyonunda yanıt olarak kullanılmıştır. Optimizasyon sonrasında faktörlerin yanıt üzerindeki etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.16. PB desenine göre gerçekleştirilen denemelere ait en yüksek HA değerleri

Deneme Numarası	Maksimum HA miktarı (g/L)
1	0.01
2	0.00
3	0.02
4	0.51
5	2.60
6	0.03
7	0.00
8	0.01
9	0.13
10	1.31
11	0.55
12	0.00
13	0.83
14	0.00
15	0.44

Çizelge 4.17. İndirgenmiş değerlerin varyans (ANOVA) analizi

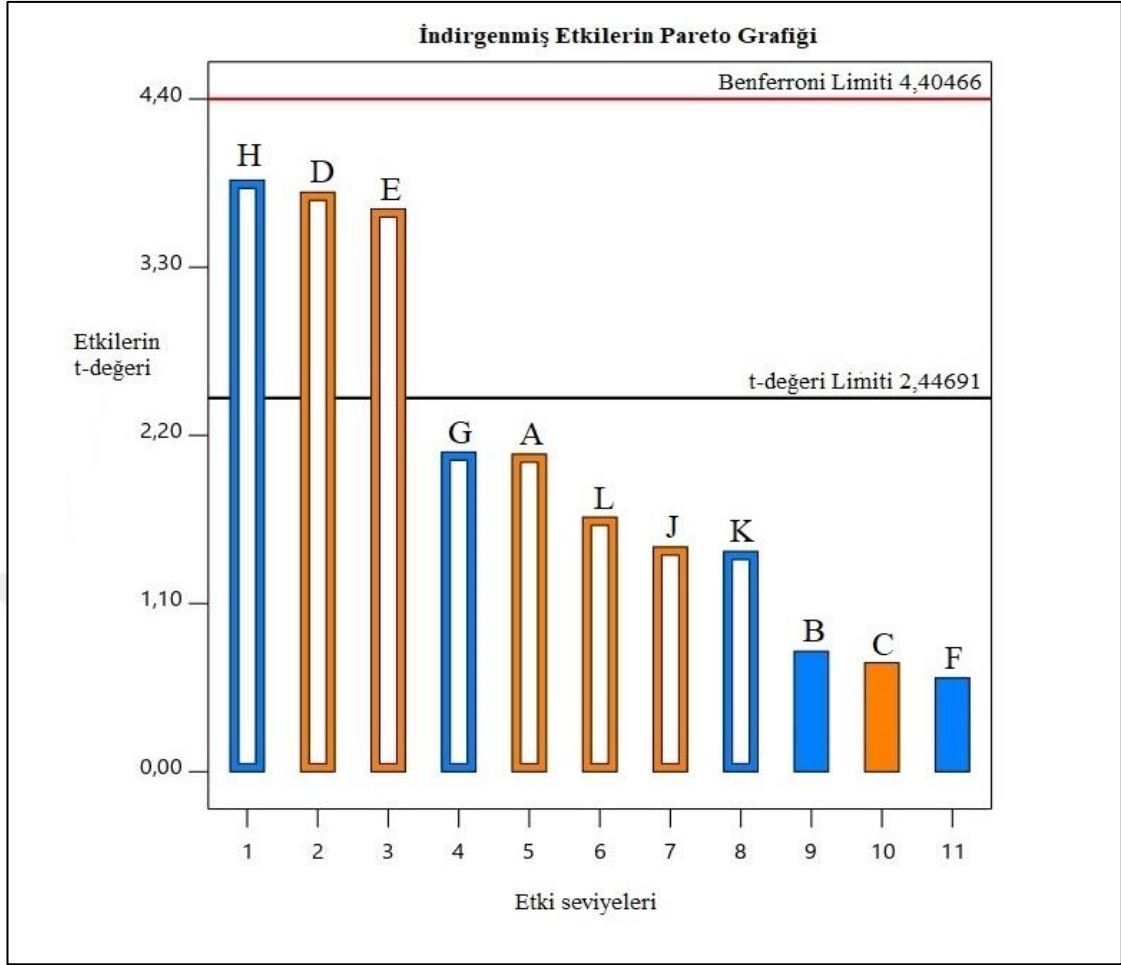
Terim	KT	KO	F-değeri	P-değeri
Model	6.5700	0.8211	7.34	0.021*
Keçiboynuzu ekstraktı	0.4838	0.4838	4.32	0.092
KH ₂ PO ₄	1.6100	1.6100	14.39	0.013*
NaCl	1.5200	1.5200	13.57	0.014*
Maya ekstraktı	0.4901	0.4901	4.38	0.091
FeSO ₄	1.6800	1.6800	15.00	0.012*
Et ekstraktı	0.2422	0.2422	2.16	0.201
Pepton	0.2329	0.2329	2.08	0.209
İnokülasyon	0.3107	0.3107	2.78	0.157
Uyum eksikliği	0.1685	0.0562	0.29	0.835

KT, kareler toplamı; KO, kareler ortalaması; R^2 :0.921; düzeltilmiş R^2 : 0.796; P, olasılık; *($P<0.05$)

Varyans (ANOVA) analiz verileri incelendiğinde modelin ($P<0.05$) önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı çıktığı ve modelin fermentasyon denemelerinde elde edilen sonuçları %92.1 oranında (R^2 , 0.921) temsil ettiği görülmektedir. Ayrıca uyum eksikliği (Lack of fit) değeri incelendiğinde modelin istatistiksel olarak uyumlu olduğu (0.835 , $P>0.05$) tespit edilmiştir. Besiyeri bileşimine eklenen bağımsız değişkenlerden KH_2PO_4 , NaCl ve FeSO_4 bileşenlerinin HA üretimi üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Besiyeri bileşiminde bulunan değerlerin HA miktarı üzerindeki etkilerini gösteren modele ait indirgenmiş Pareto Grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir. Pareto Grafiği üzerinde t-limit değerini geçen etkenler istatistiksel olarak önemli olmaktadır. Ayrıca grafikte mavi renkle gösterilen sütunların negatif, turuncu renkle gösterilen sütunların ise pozitif etki gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , FeSO_4 , maya ekstraktı ve pepton negatif etki gösteren bileşenler iken keçiyoynuzu ekstraktının miktarı, kazein, KH_2PO_4 , NaCl ve et ekstraktı pozitif etki gösteren bileşenler olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.17'de indirgenmiş faktörlere ait etki ortalamaları grafikleri gösterilmiştir. Grafikler incelendiğinde pozitif ve negatif etki gösteren bileşenlerin ortamdaki konsantrasyonlarının değişiminin HA miktarı üzerine etkileri her bir bileşen için görülmektedir.



Şekil 4.17. İndirgenmiş etkilerin Pareto grafiği A: Keçiboynuzu ekstraktı ($^{\circ}\text{Bx}$), B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), C: Kazein (g/L), D: KH_2PO_4 (g/L), E: NaCl (g/L), F: K_2HPO_4 (g/L), G: Maya ekstraktı (g/L), H: FeSO_4 (g/L), J: Et ekstraktı (g/L), K: Pepton, L: İnokülasyon oranı

4.1.2. Pb tasarımıyla elde edilen optimum besiyeri bileşimi

PB tasarımının sunduğu fermentasyon denemeleri sonrasında yanıt olarak fermentasyonlarda elde edilen maksimum HA miktarları girilmiş ve optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Pareto ve yarı normal dağılım grafikleri incelenerek indirgenmiş değerler ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiş ve optimum besiyeri içeriği belirlenmiştir. PB optimum besiyeri bileşimi, tasarımın önceki denemelerde verdiği ve fermentasyon sonucunda en yüksek HA üretiminin gerçekleştirildiği 4 numaralı besiyeri ile aynı çıkmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. PB optimum besiyeri bileşimi

Besiyeri Bileşeni	Miktar
Keçiyoynuzu ekstraktı (°Bx)	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.5
Kazein (g/L)	10.0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.5
NaCl (g/L)	2.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1.5
Maya ekstraktı (g/L)	0.0
FeSO ₄ (g/L)	0.002
Et ekstraktı (g/L)	10.0
Pepton (g/L)	0.0
İnokülasyon (%)	7.0

En yüksek HA üretimi gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.19’da görülmektedir.

Çizelge 4.19. Optimum (4 numaralı) besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer
Şeker tüketimi (g/L)	23.39
HA üretimi (g/L)	2.60
Biyokütle gelişimi (OD)	3.30
Şeker tüketim oranı (%)	37.25
HA verimi (Y _{P/S} , %)	11.12
Maksimum tüketim hızı (-ds/dt, g/L/h)	3.89
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt, g/L/h)	0.38
Maksimum Üretim Hızı (dx/dt, g/L/h)	0.48

Deneme deseninin sunduğu tasarıma göre gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda;

Maya ekstraktı, pepton, MgSO₄.7H₂O, K₂HPO₄ ve FeSO₄ istatistiksel analizler sonucunda HA üretimi üzerinde negatif etki gösteren bileşenler olarak bulunurken, keçiyoynuzu ekstraktı, kazein, KH₂PO₄, NaCl ve et ekstraktı pozitif etki gösteren bileşenler olarak belirlenmiştir. Ayrıca inokülasyon oranı da HA üretimi üzerinde pozitif etki göstermiştir. Öte yandan keçiyoynuzu ekstraktı konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Fermentasyonlar boyunca ölçülen maksimum şeker tüketiminin 23.4 g/L olduğu göz önünde bulundurularak yüksek konsantrasyonlardaki başlangıç şeker içeriğinin 40-70 g/L (6-10 °Bx) oluşturulan deneme deseni için istatistiksel bir fark oluşturmayacağı görülebilmektedir.

Tüm denemelerde gerçekleştirilen inokülasyonlar için eşit sürelerde (24 saat) geliştirilen stok kültürler kullanılsa da hücre gelişimleri bu süre sonucunda aynı olmamıştır. Bu nedenle, inokülasyon oranı artışının istatistiksel olarak pozitif etki göstermesinin yanı sıra başlangıç biyokütle miktarının 0.6 OD değerinden düşük olduğu fermentasyonlarda (6, 9, 10, 11, 12, 13, 14) HA üretimi oldukça düşük kalmıştır. Fermentasyonlar süresince biyokütle gelişimi görülmesi nedeniyle bakterilerin HA üretimi yerine besiyerindeki kaynakları hücre gelişim metabolizması için harcadıkları düşünülmektedir. Başlangıç biyokütle yoğunlukları sırasıyla 0.855 ve 0.995 OD olan 1 ve 5 numaralı fermentasyonlar incelendiğinde, başlangıç biyokütle yoğunluğunun yüksek olduğu durumda ortamda negatif etki gösteren bileşenlerin varlığında bile bu durumu destekler şekilde HA üretiminin 5 numaralı denemede daha yüksek olduğu görülmektedir.

Karbon:azot oranının HA üretimi üzerinde etkili olduğu literatürde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir (D. C. Armstrong & Johns, 1997; Pires vd., 2010). Örneğin 1, 2, 6, 10 numaralı fermentasyon denemelerinde HA üretiminin düşük miktarda kalması besiyerinin sırasıyla; 2.5, 2.0, 0.86 ve 1.2 gibi yüksek olmayan karbon:azot oranında içeriğe sahip olmasıyla açıklanabilmektedir.

HA üretimi sırasında hücre tarafından hyaluronidaz enzimi salgılanabilmektedir. Bu durumda HA alt birimlerine parçalanmakta ve fermentasyon boyunca takip edilen HA miktarında düşüşler gözlemlenebilmektedir. Örneğin 3, 4, 5, 7, ve 8 numaralı denemeler incelendiğinde HA miktarının önce arttığı ardından azaldığı görülebilmektedir.

Bunun dışında gerçekleştirilen tüm fermentasyonlarda DNSA metodu kullanılarak takip edilen toplam indirgen şeker miktarlarının fermentasyon başında azaldığı ancak belli saattlerden sonra yeniden yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durum üretici mikroorganizmanın hyaluronidaz enziminin üretildiği ve ortamda bulunan HA'nın enzim tarafından parçalandığını düşündürmektedir. Çünkü bu parçalanma sonrası HA'yı oluşturan birimlerinden indirgen bir şeker olan *N*-asetil- β -*D*-glukozamin'in açığa çıktığı ve toplam şeker analizi sırasında DNSA bileşeni ile reaksiyona girerek spektrofotometrik ölçümlerde absorbans verdiği düşünülmektedir (Malaekheh-Nikouei vd., 2013). Aynı şekilde HA'nın toplam şeker analizi sırasında ortama ilave edilen HCl nedeniyle parçalanabileceği ve glukozaminlerin DNSA ile reaksiyona girerek analiz sonuçlarını etkileyebileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle besiyeri optimizasyonu sonrasında cevap yüzey yöntemi kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilecek fermentasyonlara ait farklı parametrelerin üretilen HA'ların molekül ağırlıkları üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca biyoreaktörde üretilen HA'ların molekül ağırlığı profilleri preperatif HPLC kullanılarak moleküler ayırma (size-exclusion, SEC) kromatografisi yöntemiyle tespit edilmiştir.

4.2. Farklı Fermentasyon Parametrelerinin Üretilen HA'nın Miktarı ve Moleküler Dağılımı Üzerine Etkisi

Keçiboynuzu meyvesinin HA üretiminde karbon kaynağı olarak değerlendirildiği bu çalışmada PB tasarım ile çalkalamalı inkübatörde optimize edilen besiyeri bileşimi kullanılarak biyoreaktörde fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlarda karıştırma hızı, havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunun HA'nın

miktarı ve molekül ağırlığı dağılımı üzerine etkisi Box-Behnken tasarım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar 2 L hacmindeki biyoreaktörlerde 0.75 L çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.18. Biyoreaktörde gerçekleştirilen HA üretim fermentasyonlarına ait görüntü

Çizelge 3.4'te belirtilen deneme desenine göre HA fermentasyonları gerçekleştirilmiş olmakla birlikte her bir deneme için kinetik parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.19).

Kinetik parametreler incelendiğinde en yüksek HA üretiminin 13 numaralı denemede (1.00 vvm, 500 rpm ve 1.00 OD) gerçekleştiği görülmektedir. Fermentasyon sonunda ortalama molekül ağırlığı 750-1750 kD arasında değişen 230.11 mg/L HA elde edilmiştir. Şeker tüketim miktarının 9.11 g/L olduğu fermentasyonda biyokütle gelişimi 0.500 OD olarak tespit edilmiştir. Besiyerinde bulunan şeker içeriğinin yaklaşık %11.22 kadarının tüketildiği görülmekle birlikte HA verimi %5.52 olarak hesaplanmıştır. En düşük HA üretiminin ise (187.38 mg/L) 4 numaralı fermentasyonda gerçekleştiği ve elde edilen HA'nın ortalama molekül ağırlığının 750 ila 1750 kDa arasında değiştiği görülmüştür. Toplam şeker tüketiminin 6.90 g/L olarak gerçekleştiği fermentasyonda biyokütle gelişimi 0.050 OD olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca fermentasyonlar sırasında ortamdan alınan örneklerle gerçekleştirilen kromatografik analizler sırasında miktarı tayin edilen HA'ların molekül aralıkları da belirlenmiştir. Farklı molekül aralıklarına sahip (30-50 kDa, 50-70 kDa, 70-120 kDa,

500-700 kDa, 1000-1250 kDa ve 1250-1750 kDa) 6 adet HA standardı ile kromatografik analizler için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Fermentasyonlardan alınan örnekler ile standartların kolondan çıkış süreleri karşılaştırılarak üretilen HA'ların molekül aralıkları yorumlanmıştır. Bu doğrultuda keçiboynuzu ekstraktı içeren besiyerinde üretilen HA'ların molekül ağırlıklarının genel olarak 1250-1750 kDa aralığında yer aldığı tespit edilmiştir. Seçilen HA standardı ve bir örneğe ait kromatogram görüntüsü Ek-3 ve Ek-4'te paylaşılmıştır.

Karıştırma hızı, havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu parametrelerinin Box-Behnken cevap yüzey yöntemiyle optimizasyonu için yanıt yüzeyi olarak HA miktarı kullanılmıştır. Fermentasyonlar sırasında düzenli aralıklarla örnekler alınarak HA miktarları takip edilmiştir. Her bir fermentasyonda elde edilen en yüksek HA miktarı o denemeye ait yanıt yüzeyi olarak seçilmiştir. Bu doğrultuda Design Expert 11.0.0 programı aracılığıyla optimizasyon işlemi ve elde edilen verilerin varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.20. Box-Behnken deneme deseninde yer alan koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler

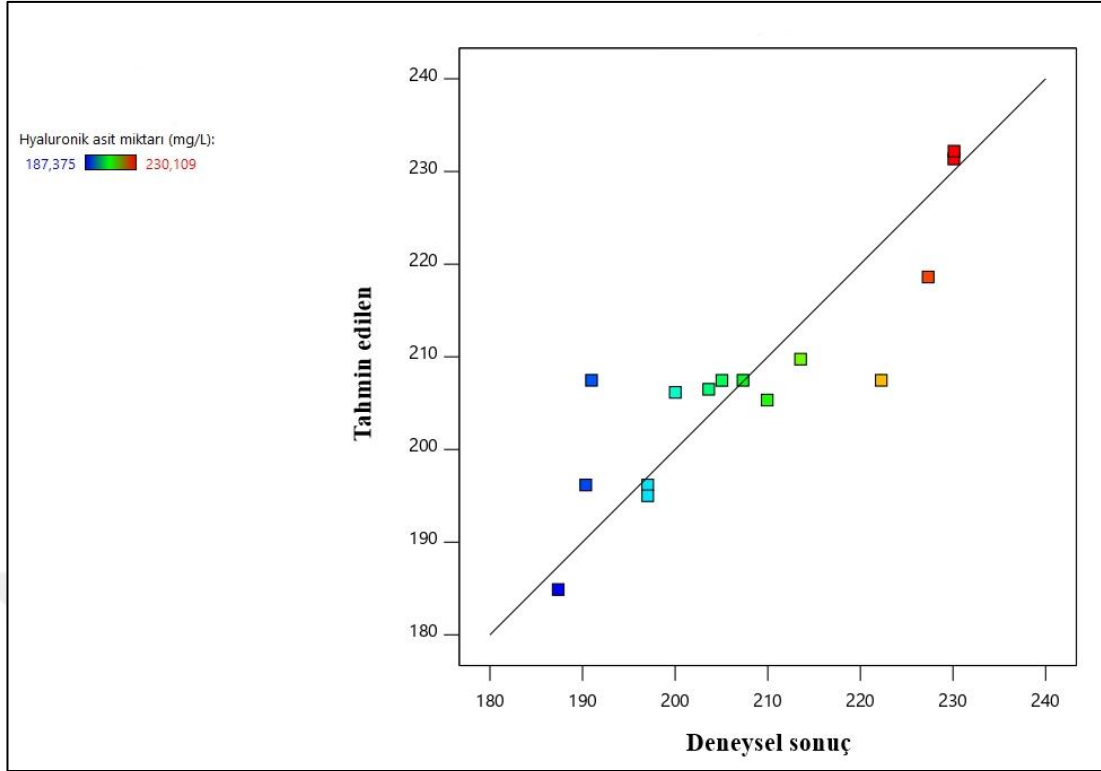
Denemeler	Ortalama molekül ağırlığı (kDa)	HA üretimi (mg/L)	Biyokütle gelişimi (OD)	Şeker tüketim oranı (%)	HA verimi ($Y_{P/S}$, %)	Maksimum tüketim hızı ($-ds/dt$, g/L/h)	Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt , g/L/h)	Maksimum Üretim Hızı (dx/dt , g/L/h)
1	1250-1750	197.03	0.03	18.00	1.74	0.54	0.00	0.05
2	750-1750	205.05	0.37	14.30	2.04	0.33	0.02	0.01
3	1250-1750	207.33	0.30	13.00	2.30	0.75	0.08	0.05
4	750-1750	187.38	0.05	9.30	2.70	0.73	0.00	0.02
5	750-1750	191.00	0.07	5.07	5.42	0.13	0.01	0.02
6	500-1750	197.03	0.19	14.05	1.83	0.57	0.02	0.05
7	750-1750	203.63	0.30	16.81	1.42	0.14	0.03	0.05
8	750-1750	209.94	0.29	11.93	2.32	0.44	0.38	0.05
9	500-1750	222.25	0.36	19.14	1.82	0.59	0.02	0.02
10	1250-1750	230.09	0.41	5.71	5.82	0.46	0.02	0.02
11	750-1750	200.02	0.20	5.34	5.54	0.21	0.02	0.02
12	1250-1750	190.34	0.56	9.75	2.38	0.87	0.13	0.05
13	750-1750	230.11	0.50	11.22	5.52	0.87	0.10	0.12
14	1250-1750	213.55	0.52	10.02	2.75	1.18	0.10	0.05
15	1250-1750	227.31	0.53	9.02	3.50	0.21	0.11	0.05

Çizelge 4.21. Box-Behnken tasarım tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen sonuçların varyans (ANOVA) analizi

Kaynak	KT	SD	KO	F-değeri	P-değeri
Model	2238.32	6	373.053	4.23	0.032*
A-Havalandırma miktarı	1020.60	1	1020.602	11.58	0.009**
B-Karıştırma hızı	3.42	1	3.425	0.04	0.849
C-Başlangıç biyokütle miktarı	360.29	1	360.293	4.09	0.078
A×B	570.02	1	570.016	6.47	0.034*
A×C	180.36	1	180.357	2.05	0.190
B×C	103.63	1	103.626	1.18	0.310
Artık hata	704.83	8	88.104		
Uyum eksikliği	215.23	6	35.872	0.15	0.972
Saf hata	489.60	2	244.801		
Toplam	2943.15	14			

KT, kareler toplamı; KO, kareler ortalaması; R^2 :0.761; düzeltilmiş R^2 : 0.581; yeterli hassasiyet, 7.377; P, olasılık; *($P<0.05$)

Programın önerdiği 2 faktörlü modele göre gerçekleştirilen Çizelge 4.20’de gösterilen varyans analizi incelendiğinde modelin istatistiksel olarak anlamlı (0.032, $P<0.05$) çıktığı ve modelin fermentasyon denemelerinde elde edilen sonuçları %76.1 oranında (R^2 , 0.761) temsil ettiği görülmektedir. Ayrıca modelin istatistiksel olarak uyumlu olduğu (0.972, $P>0.05$) tespit edilmiştir. Deneysel verilerle tasarımın tahminlerinin karşılaştırıldığı grafik incelendiğinde de modelin uyumu görülmektedir (Şekil 4.20).



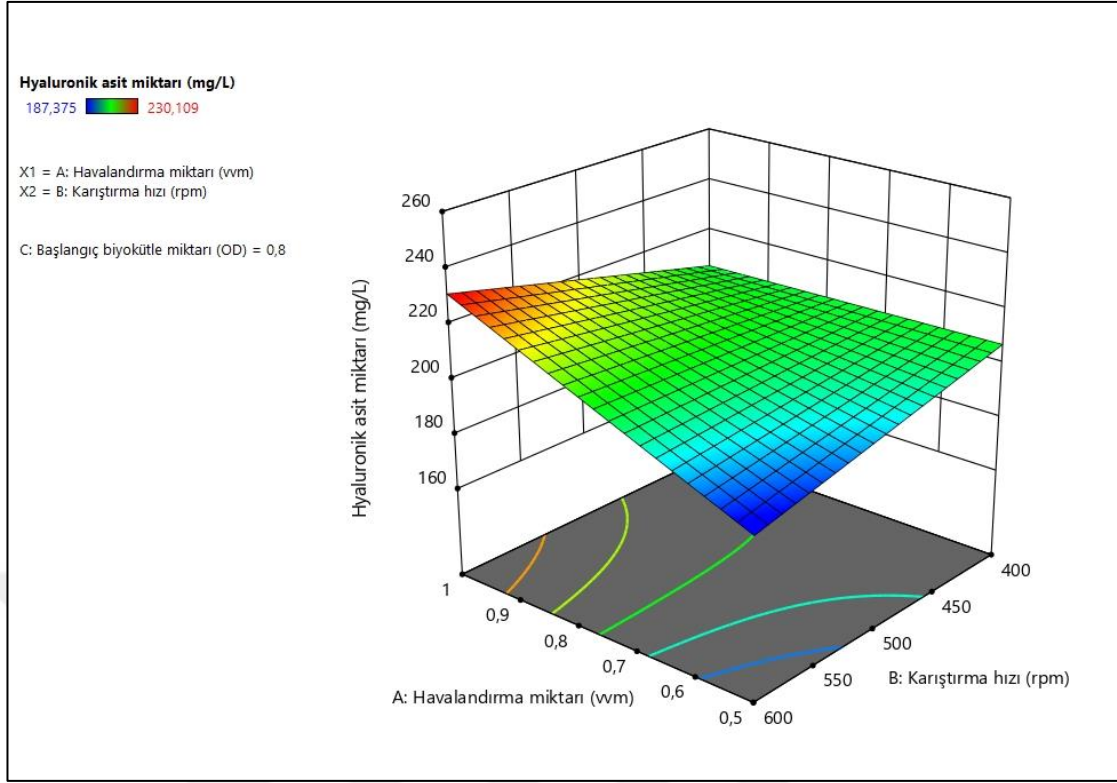
Şekil 4.19. Box-Behnken tasarımının sunduğu fermentasyonlar sonucu elde edilen verilerle tahmin edilen sonuçların karşılaştırılması

Biyoreaktörde gerçekleştirilen HA üretiminde havalandırma miktarının (0.009, $P < 0.01$) ve karıştırma hızıyla interaksyonun (0.034, $P < 0.05$) istatistiksel olarak önemli çıktığı görülmektedir. Optimizasyon için seçilen bağımsız değişkenlerin yanıt yüzeyi üzerindeki etkileri aşağıda ayrı başlıklar altında incelenmiştir.

4.2.1. Havalandırma miktarının HA üretimi üzerine etkisi

Box-Behnken cevap yüzey tasarımı kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda havalandırma miktarı bağımsız değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar sırasıyla 0.50 ve 1.00 vvm olarak belirlenmiştir. Varyans analizi sonucunda HA üretiminde önemli olduğu görülen havalandırma miktarının, diğer değişkenlerle interaksyonunu ve HA üretimi üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafikleri şekil 4.21 ve şekil 4.22’de sunulmuştur.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda en düşük HA miktarı şekil 4.21’de görülebileceği gibi havalandırma miktarının minimum olduğu 4 numaralı denemede tespit edilmiştir. Ayrıca maksimum HA üretimi ise havalandırma miktarının en yüksek olduğu denemede (deneme 13) gerçekleşmiştir. Havalandırma miktarındaki artışın HA üretimi olumlu yönde etkilediği açıkça görülmektedir.

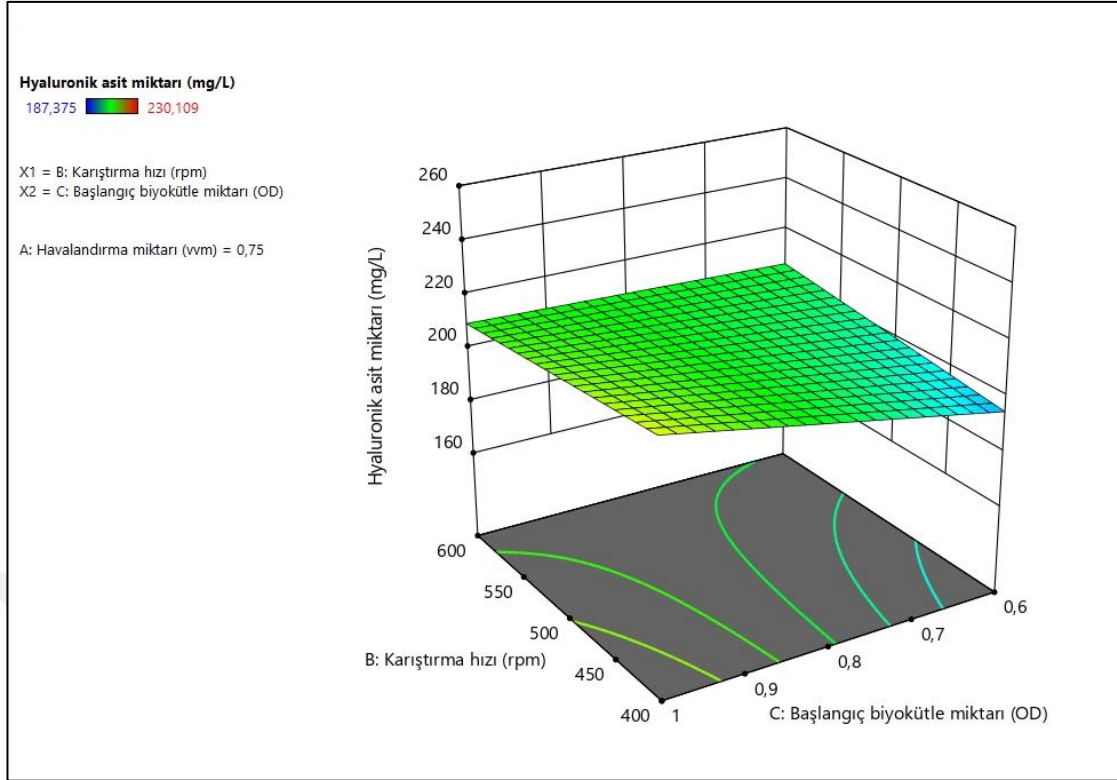


Şekil 4.20. Havalandırma miktarı ve karıştırma hızının HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği

4.2.2. Karıştırma hızının HA üretimi üzerine etkisi

Biyoreaktörde HA üretimi üzerindeki etkisi incelenen bir diğer bağımsız değişken olan karıştırma hızı 400 rpm alt limit 600 rpm ise üst limit olarak belirlenmiştir. Keçiyoynuzu ekstraktı içeren besiyerinde HA üretimi için karıştırma hızının tek başına istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (0.849, $P < 0.05$). Ancak karıştırma hızıyla olan %95 önem seviyesinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

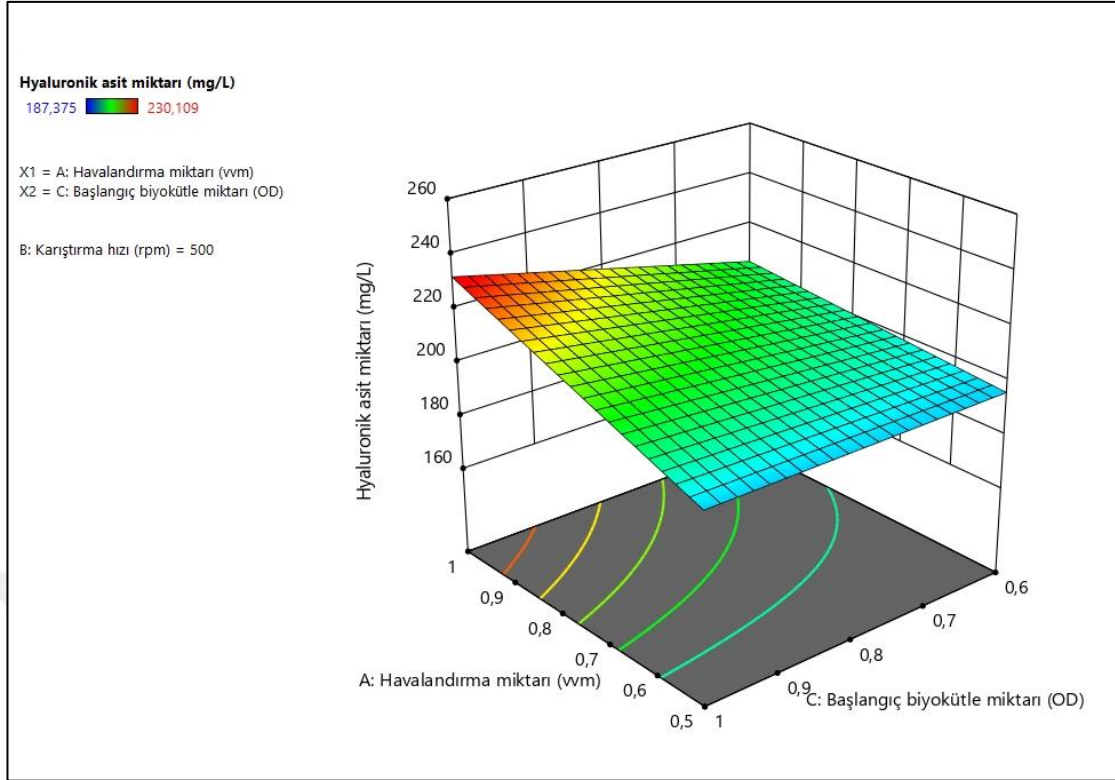
Şekil 4.21 ve şekil 4.22’de verilen 3 boyutlu kontur grafikleri incelendiğinde karıştırma hızının üretilen HA miktarı üzerinde büyük bir etkisinin olmadığı ancak karıştırma hızının artmasıyla HA miktarında düşük ölçüde azalmanın olduğu görülmektedir. Örneğin çizelge 4.19’da yer alan veriler incelendiğinde havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunun aynı olduğu (0.50 vvm ve 0.750 OD) ve yalnızca karıştırma hızının değiştiği (sırasıyla 400 ve 600 rpm) 2 ve 4 numaralı denemelerde karıştırma hızının arttıkça HA miktarının (Deneme 2, 205.05 mg/L ve deneme 4, 187.38 mg/L) azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.21. Karıştırma hızı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunun HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği

4.2.3. Başlangıç biyokütle yoğunluğunun HA üretimi üzerine etkisi

Başlangıç biyokütle yoğunluğu için literatür taranarak belirlenen alt ve üst limitler sırasıyla 0.600 ve 1.000 OD olarak Box-Behnken cevap yüzey deneme deseninin oluşturulmasında kullanılmıştır. İstatistiksel olarak HA üretiminde önemsiz bir parametre olarak görünmesine rağmen ($0.078, P < 0.05$) karıştırma hızına kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir. Başlangıç biyokütle yoğunluğunun yer aldığı 3 boyutlu kontur grafikleri (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23), HA miktarının başlangıç biyokütle yoğunluğunun artmasıyla arttığını göstermektedir. Box-Behnken tasarımıındaki deneme fermentasyonlar incelendiğinde (Çizelge 4.20) yalnızca başlangıç biyokütle yoğunluğunun değiştiği diğer değişkenlerin ise sabit olduğu (0.75 vvm ve 400 rpm) 6 ve 15 numaralı denemelerde HA miktarları sırasıyla 197.03 mg/L ve 227.31 mg/L olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla başlangıç biyokütle yoğunluğunun keçiyoynuzu ekstraktı ile gerçekleştirilen HA üretim fermentasyonlarını olumlu yönde etkilediği görülmektedir.



Şekil 4.22. Havalandırma miktarı ve başlangıç biyokütle yoğunluğunu HA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu kontur grafiği

4.3. Box-Behnken Cevap Yüzey Yönteminin Sunduğu Optimum Koşullar İçin Doğrulama Fermentasyonu

Box-Behnken cevap yüzey yöntemiyle oluşturulan deneme deseninin önerdiği koşullarda 15 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda tespit edilen HA miktarları her bir deneme için yanıt yüzeyi olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda Design-Expert programı kullanılarak HA üretiminin en yüksek miktarda gerçekleştirilebileceği optimum şartlar oluşturulmuştur.

Çizelge 4.22. Box-Behnken cevap yüzey tasarımı ile oluşturulan optimum koşullar ve bu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyona ait HA üretim miktarı tahmini ve deneysel sonuçları

Bağımsız Değişken	Alt sınır	Üst sınır	Optimum Değer	Tahmin edilen HA miktarı (mg/L)	Elde edilen HA miktarı (mg/L)
Havalandırma miktarı (vvm)	0.50	1.00	0.99		
Karıştırma hızı (rpm)	400	600	541	233.27	228.16
Başlangıç biyokütle yoğunluğu (OD)	0.600	1.000	0.980		

Bu doğrultuda 0.99 vvm havalandırma miktarı, 541 rpm karıştırma hızı ve 0.980 OD başlangıç biyokütle yoğunluğu koşullarında doğrulama fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon için program tarafından tahmin edilen HA miktarı 233.27 mg/L iken deneysel olarak belirlenen sonuç 228.16 mg/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.23. Doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer
Ortalama molekül ağırlığı (kDa)	1250-1750
HA üretimi (g/L)	228.16
Biyokütle gelişimi (OD)	0.46
Şeker tüketim oranı (%)	12.88
HA verimi ($Y_{P/S}$, %)	2.13
Maksimum tüketim hızı ($-ds/dt$, g/L/h)	0.25
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt , g/L/h)	0.03
Maksimum Üretim Hızı (dx/dt , g/L/h)	0.02

Doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler incelendiğinde, fermentasyon süresince ortamda bulunan şekerin %12.88'inin tüketildiği ve buna karşılık 228.16 mg/L HA üretildiği görülmektedir. Yaklaşık %2.13 verimle gerçekleşen HA üretim fermentasyonunda en yüksek biyokütle yoğunluğu 0.460 OD olarak ölçülmüştür. Doğrulama fermentasyonunda üretilen HA miktarı (228.16 mg/L) program tarafından tahmin edilen sonuca (233.27) %97.81 oranında yaklaşmıştır. Program tarafından sunulan %95 doğrulama güven aralığı içerisinde yer alan sonuca göre, optimizasyon modelinin sunduğu tahminin yaklaşık %98 oranında deneysel verileri yansıttığı görülmektedir.

HA üretiminde maliyeti düşürmek ve verimi artırmak için birçok çalışma literatürde bulunmaktadır. Farklı materyallerin karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve/veya besiyeri optimizasyonu gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen sonuçlarla tez kapsamında elde edilen sonuçların karşılaştırması yapılmıştır.

Siyah palmiye (*Borassus flabellifer*) bitkisi şekeri kullanılarak HA üretilmesi üzerine bir çalışmada 5.0 g/L palmiye şekeri, 5.0 g/L soya peptonu, 0.5 g/L askorbik asit, 19 g/L, disodyum- β -gliserofosfat ve 0.25 g/L magnezyum sülfat içeren optimum besiyerinde 0.93-0.96 MDa molekül ağırlığına sahip 0.54 g/L HA üretimi gerçekleştirilmiştir (Rohit vd., 2018).

Bu çalışmada kullanılan palmiye şekeri %65-85 sakaroz ve %5-15 indirgen şeker içeriği ile keçiyoynuzu meyvesine benzemektedir. Hakim şekerin sakaroz olması açısından benzer özellik göstermekte ancak azot kaynağı seçiminde tez çalışmasından farklılaşmaktadır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlarla örtüşen şekilde peptonun üretici mikroorganizma üzerinde HA verimi açısından pozitif etki göstermediği başka bir çalışma tarafından raporlanmış olmakla birlikte (Patil vd., 2011) keçiyoynuzu içeriğinin mikroorganizma açısından pozitif etki yarattığı bilinen aminoasit içeriğinin (D. Armstrong vd., 1997) yüksek olması HA üretiminin bu çalışmaya kıyasla yüksek

olmasının nedeninin açıklamaktadır. Dolayısıyla alternatif karbon kaynağının denendiği bu çalışmada elde edilen HA üretim miktarından (0.54 g/L) daha yüksek değerlere (2.60 g/L) ulaşılmasının nedenleri; optimum besiyeri içeriğinde pepton bulunmaması, keçiyoynuzunun palmiye şekerine kıyasla daha zengin içeriğe sahip olması ve inokülasyon miktarının yüksek seçilmesi olarak sıralanabilir. Tez kapsamında üretilen HA'nın molekül ağırlığının (1.25-1.75 MDa) çalışmada ölçülen değerlerden (0.93-0.96 MDa) yüksek olduğu görülmektedir.

Soya proteini hidrolizatı, kaju elması suyu, mısır şurubu ve konsantre peynir altı suyu proteini gibi tarımsal yan ürünlerin karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, kaynağı:azot kaynağı oranı 7.8:1 olarak sabit tutularak besiyeri optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda karbon kaynağı kaju elma suyu ve azot kaynağı olarak maya ekstraktı içeren besiyeri bileşimi en yüksek HA (0.89 g/L) üretilen besiyeri olarak belirlenmiştir. HA verimi ($Y_{P/S}$) %5.0 olan fermentasyonda 10.47 g/L şeker tüketimi gerçekleştiği raporlanmıştır (Pires vd., 2010).

Kaju elma suyunun 47.4 g/L glukoz içeriğiyle zengin bir karbon kaynağı olduğu görülse de şeker tüketim miktarları kıyaslandığında tez çalışması sonuçlarına göre daha düşük şeker tüketimi görülmektedir. Bununla birlikte yine tez kapsamında negatif etki gösterdiği istatistiksel olarak belirlenen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.005 g/L) ve maya ekstraktının (54.0 g/L) olarak besiyerine eklenmesi yüksek inokülasyon oranına rağmen daha düşük HA elde edilmesine neden olmuştur. Ayrıca kullanılan karbon kaynağının B-vitamini, tiamin, riboflavin, niasin ve folik asit içeriğine rağmen keçiyoynuzu meyvesinin daha zengin bileşime sahip olduğu bilinmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında maya ekstraktı ve FeSO_4 içeriğinin düşük olduğu keçiyoynuzu meyvesi ekstraktı içeren besiyerinde 2.60 g/L HA üretimi ($Y_{P/S}$, %11.12) gerçekleşmesi incelenen literatür çalışmasındaki bulgularla örtüşmektedir.

Şeker kamışı melasının alternatif karbon kaynağı olarak *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 bakterisi ile HA üretimi için değerlendirildiği bir çalışmada, ön denemeler sonucunda aktif karbonla detoksifiye edilen melas HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada optimum besiyerinde biyoreaktör kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 1.35×10^3 kDa molekül ağırlığına sahip 2.82 g/L HA üretilmiştir (Pan vd., 2017).

Çalışma için seçilen melasın içerik olarak (%53 sakaroz, %4 glukoz, %5 fruktoz, %1.2 amino asit ve %0.17 metal iyonu) keçiyoynuzu ekstraktına benzerlik gösterse de içeriği görece zayıf kalmaktadır. Ayrıca çalışmada besiyerine ilave edilen maya ekstraktı (50 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g/L) ve K_2HPO_4 (2.5 g/L) gibi tez çalışmasında belirlenen negatif etkili bileşenlerin yüksek miktarda olması üretim miktarındaki düşüklüğü açıklar niteliktedir. Çalışma içerisinde değinilen Fe^{+} iyonlarının inhibisyon etkisi tez kapsamında FeSO_4 bileşenin negatif etki gösterdiği bulgusuyla örtüşmektedir. Ayrıca 2.60 g/L üretim gerçekleştirilen tez kapsamında elde edilen sonuçlar yapılan çalışmaya oldukça yakın miktardadır. Üretilen HA'ların molekül ağırlık dağılımı incelendiğinde tez kapsamında ağırlıklı olarak $1.25-1.75 \times 10^3$ kDa molekül ağırlığı aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda söz konusu çalışmadan daha yüksek molekül ağırlığına sahip HA üretimi gerçekleştiği görülmektedir.

Amado vd. (2017) *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 35246 bakterisi ile HA üretimi için karbon ve azot kaynağı olarak mısır şurubu (MŞ) ve şeker kamışı melasının (ŞM) kullanmışlardır. Bu çalışmada Gerçekleştirilen fermentasyonlar sonrasında seyreltilmiş MŞ (%10, h/h) ve 50 g/L glukoz içeren besiyerinde 3.48 g/L, kompleks besiyerinde ise 3.60 g/L HA üretilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan karbon kaynağı olan şeker kamışı melasının bulunduğu besiyerinde HA üretiminin oldukça düşük olmasının nedenini (0.37 g/L) melasın ön işlemlere (asit hidroliz gibi) maruz kalması ve/veya reçine içeriği ile ilişkilendirmişlerdir. Yalnızca su ile ekstrakte edilen ve düşük miktarlarda fenolik bileşen içeren keçiboynuzu ekstraktının melasa kıyasla HA üretimi için daha elverişli olduğu görülmektedir. Yüksek hyaluronik asit miktarlarına ulaşılan bu çalışmada kullanılan mısır şurubunun, keçiboynuzu ekstraktına benzer şekilde zengin vitamin, mineral, amino asit ve protein içeriğine sahip olması üretimin verimliliğini açıklamaktadır. Her ne kadar biyoreaktör şartlarının (havalandırma ve pH kontrolü) üretim üzerinde olumlu etki gösterdiği açık olsa da tez kapsamında raporlanana benzer şekilde maya ekstraktı (5.0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/L), K_2HPO_4 (0.5 g/L) bileşenlerinin düşük, KH_2PO_4 (2.0 g/L) bileşeninin yüksek miktarda kullanılması üretimin tez çalışmasında elde edilen HA miktarına (2.6 g/L) benzer şekilde yüksek olmasını açıklamaktadır. Ayrıca çalışmada karıştırma hızının değişiminin HA üretimi üzerine olumlu bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Bununla birlikte tez havalandırma miktarının artmasıyla HA miktarının yükseldiğini belirtmişlerdir.

Liu vd. (2009) Box-Behnken Tasarım (CYM) ve Kuantum Davranışlı Parçacık Yığını Optimizasyon Algoritması Bağlısımlı Radyal Temelli Fonksiyon Sinir Ağı olmak üzere (RBF-QPSO) iki farklı optimizasyon yöntemi kullanılarak *S. zooepidemicus* WSH-24 suşu ile HA üretimi şartlarını optimize etmişlerdir. Çalışma sonucunda havalandırma miktarıyla HA üretiminin arttığını ve bunun nedenini hücrenin metabolik aktivitesindeki değişimlere etki ettiğini yorumlamışlardır. Dolayısıyla bu çalışma tez kapsamında havalandırma miktarının pozitif etki gösterdiği bulgusuyla örtüşmektedir.

Özetle alternatif karbon kaynaklarından HA üretimi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde; siyah palmiye bitkisi şekeri içeren besiyerinde 0.54 g/L kaju elma suyun içeren besiyerinde 0.89 g/L, şeker kamışı melası içeren besiyerinde 2.82 g/L, mısır şurubu ve glikoz içeren besiyerinde 3.48 g/L HA üretimi gerçekleştiği görülmektedir. Keçiboynuzu ekstraktı ile üretimin gerçekleştirildiği tez çalışma kapsamında 2.60 g/L HA üretimi gerçekleştirilerek keçiboynuzu meyvesinin alternatif karbon kaynağı olarak HA üretiminde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte üretilen HA'nın moleküler ağırlığının 1.25-1.75 MDa arasında dağılım gösterdiği ve böylece keçiboynuzu meyvesi ile yüksek molekül ağırlığına sahip HA üretiminin gerçekleştirilebilirliği ortaya konmuştur.

5. SONUÇLAR

Streptococcus zooepidemicus (ATCC 39920) bakterisi ile HA üretiminde alternatif karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu meyvesinin kullanılabilirliği test edilerek, optimum üretim miktarlarına ulaşılabilen besiyeri bileşimi elde edilmiştir. Keçiyoynuzu meyvesi ekstraktı içeren en verimli besiyeri bileşiminin oluşturulması amacıyla PB tasarımı kullanılarak deneme deseni oluşturulmuştur. PB tasarımda optimizasyon faktörleri olarak keçiyoynuzu meyvesi ekstraktı, kazein, maya ekstraktı, et ekstraktı, pepton, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , $FeSO_4$, KH_2PO_4 , NaCl ve inokülasyon oranı seçilmiştir. Bu faktörlerden besiyerine eklenmek üzere belirlenen minimum ve maksimum değerleri literatürdeki çalışmalar incelenerek tespit edilmiştir. Besiyeri optimizasyonu için seçilen 11 faktör, 3 seviyeli olarak kullanılmış ve 15 farklı içerikte besiyeri bileşimleri oluşturulmuştur. Formülasyonları PB tasarım ile elde edilen besiyerleri hazırlanarak fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyonlar sonrasında optimum besiyeri formülasyonu 10.0°Bx kuru madde içeriğindeki keçiyoynuzu ekstraktı, 10.0 g/L kazein, 0.0 g/L maya ekstraktı (g/L), 10.0 g/L et ekstraktı, 0.0 g/L pepton, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g/L KH_2PO_4 , 2.0 g/L NaCl, 1.5 g/L K_2HPO_4 , 0.002 g/L $FeSO_4$ ve %7.0 inokülasyon oranı olarak belirlenmiştir. Faktörlerin ve modelin HA üretimi üzerindeki etkileri istatistiksel olarak (ANOVA) incelenmiştir. Bu doğrultuda modelin %92.1 oranında (R^2 , 0.921) HA üretim fermentasyonlarını temsil ettiği ve istatistiksel olarak $P < 0.05$ seviyesinde ($P = 0.021$) önemli olduğu belirlenmiştir. Besiyerine eklenen bileşenler arasında KH_2PO_4 , NaCl ve $FeSO_4$ istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur. Ayrıca keçiyoynuzu ekstraktı, kazein, KH_2PO_4 , NaCl ve et ekstraktı HA üretimi üzerine pozitif etki gösterirken $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , $FeSO_4$, maya ekstraktı ve pepton negatif etki gösteren değişkenler olarak tespit edilmiştir.

Bu bileşimdeki besiyeri ile çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen HA üretim fermentasyonu sonucunda 2.60 g/L HA üretilmiştir. Toplam şeker tüketimi 23.4 g/L olarak ölçülürken biyokütlenin yaklaşık dörde katlanarak 4.355 OD yoğunluğa ulaştığı görülmüştür. Bu fermentasyona ait kinetik parametreleri olan, şeker tüketim oranı (%), HA verimi (%), maksimum tüketim hızı (g/L/sa), maksimum gelişim hızı (OD/sa) ve maksimum üretim hızı (g/L/sa) değerleri sırasıyla, %37.25, %11.12, 3.89 g/L/sa, 0.38 OD/sa ve 0.48 g/L/sa olarak hesaplanmıştır.

PB tasarım ile optimize edilen besiyeri kullanılarak biyoreaktörde HA üretim fermentasyonu şartlarının molekül ağırlığı dağılımı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu işlem için Box-Behnken cevap yüzey tasarımı kullanılmıştır. Tasarımda kullanılan parametreler literatür incelemesiyle havalandırma miktarı, karıştırma hızı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu olmak üzere 3 farklı faktör 3 seviyeli olacak şekilde seçilmiştir. Bu faktörler kullanılarak 3 orta noktalı 15 deneme içeren tasarım oluşturulmuştur.

Tasarımın sunduğu şartlarda gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda keçiyoynuzu meyvesi ekstraktı kullanılarak biyoreaktörde HA üretimi için gereken optimum fermentasyon koşulları 0.99 vvm havalandırma miktarı, 541 rpm karıştırma hızı ve 0.980 OD başlangıç biyokütle yoğunluğu şeklinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar yardımıyla model ve faktörler için varyans (ANOVA) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, modelin istatistiksel olarak önemli (0.032, $P < 0.05$) olduğu ve modelin elde

edilen sonuçları %76.1 oranında (R^2 , 0.761) temsil ettiği görülmektedir. Ayrıca modelin uyumluluğu (0.972, $P>0.05$) doğrulanmıştır. Bağımsız değişkenler arasından havalandırma miktarının (0.009, $P<0.01$) ve karıştırma hızıyla interaksiyonun (0.034, $P<0.05$) istatistiksel olarak önemli çıktığı görülmektedir.

Faktörler ayrı ayrı incelendiğinde havalandırma oranı ve başlangıç biyokütle yoğunluğundaki artışın HA üretimini artırdığı gözlemlenirken, karıştırma hızındaki artışın çok düşük şiddette olmakla birlikte HA üretimini düşürdüğü belirlenmiştir. Tasarımın sunduğu optimum şartlarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonunda 228.16 mg/L HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu fermentasyonda besiyerinde bulunan şekerin %12.88 kadarı (10.70 g/L) tüketilirken, %2.13 verimle HA üretilmiştir. Maksimum biyokütle gelişimi 0.460 OD olarak ölçülmüştür. Bunların dışında üretilen HA'nın molekül ağırlığının 500 kDa ile 1,750 kDa arasında değiştiği ve başta klinik uygulamalar olmak üzere, gıda ve kozmetik uygulamalarda kullanılabilirliği bilinen yüksek molekül ağırlıklı (>1.0 MDa) HA sınıfında olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda, insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan, sağlık sektöründe oldukça geniş kullanım alanına sahip, yüksek katma değer yaratma potansiyelindeki hyaluronik asit ülkemizde uzun yıllardır çok büyük miktarda yetiştirilen keçiboynuzu meyvesi kullanılarak ilk kez üretilmiştir. Bu meyve kullanılarak hyaluronik asit üretimi yapılan literatürdeki ilk çalışma olması ve üretimde yaygın olarak kullanılan dört farklı azot ve 5 farklı mineral kaynağın keçiboynuzu meyvesi ekstraktı ile nasıl bir formülasyonda birleştirilmesi gerektiğini göstermesiyle özgünlük kazanmaktadır. Belirlenen besiyeri kullanılarak biyoreaktörde kontrollü şartlar altında gerçekleştirilecek HA üretiminde havalandırma miktarı, karıştırma hızı ve başlangıç biyokütle yoğunluğu gibi temel etkenlerin üretim üzerinde gösterdikleri etkiler ortaya konularak literatüre katkıda bulunulmuştur. Ayrıca sentetik besiyeri bileşiminde kullanılan karbon kaynakları yerine verimli bir alternatif sunularak üretim maliyeti daha düşük bir proses tasarlanmasına katkıda bulunulmuştur.

Keçiboynuzu meyvesi kullanılarak gerçekleştirilen hyaluronik asit üretimini daha ileri taşımak adına tez çalışmasından gelecekte yapılacak araştırmalar için bazı çıkarımlarda bulunulmuştur. Öncelikli olarak tüm besiyeri bileşenlerinin etkileri tek tek incelenerek besiyeri içeriğinin maliyeti düşürülebilir. Havalandırma miktarının pozitif etkisi göz önünde bulundurularak daha yüksek havalandırma miktarı ve/veya doğrudan oksijen beslemesiyle üretim miktarı ve moleküler ağırlık artırılabilir. Ayrıca hyaluronik asit yıkımı için oldukça önemli olan hyaluronidaz enziminin miktarı fermentasyon süresince takip edilerek üretilecek hyaluronik asidin molekül ağırlığındaki tek düzelik artırılabilir. Bunların dışında çevrimiçi geri kazanım (online-recovery) prosesi kurularak üretilen hyaluronik asit besiyerinden düzenli olarak uzaklaştırılarak aynı zamanda fermentasyon ortamına taze besiyeri ve biyokütle beslemesi yapılarak verim yükseltilebilir. Preperatif HPLC teknikleri kullanılarak saflaştırma işlemi hızlıca gerçekleştirilebilirken son ürünlerdeki endotoksin varlığının azaltılması üzerine optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2016). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food chemistry*, 198, 54-61.
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2017). Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. *Biochemical engineering journal*, 117, 181-187.
- Anonim. (2018). American Society of Plastic Surgeons, 2017 Plastic surgery statistics report. <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2018/plastic-surgery-statistics-full-report-2018.pdf> [Son erişim tarihi: 23.07.2020].
- Anonim. (2019). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [Son erişim tarihi: 23.07.2020].
- Anonim. (2020). Hyaluronic Acid Market Size Worth \$16.6 Billion By 2027 | CAGR: 8.1%. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-hyaluronic-acid-market> [Son erişim tarihi: 23.07.2020].
- Armstrong, D., Cooney, M., & Johns, M. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(3), 309-312.
- Armstrong, D. C., & Johns, M. R. (1997). Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(7), 2759-2764.
- Ayaz, F. A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P. J., Alaiz, M., Sanz, C., . . . Strnad, M. (2007). Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30(6), 1040-1055.
- Bahry, H., Abdalla, R., Pons, A., Taha, S., & Vial, C. (2019). Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus Rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry. *Journal of biotechnology*, 306, 81-88.
- Bahry, H., Abdallah, R., Chezeau, B., Pons, A., Taha, S., & Vial, C. (2019). Biohydrogen production from carob waste of the Lebanese industry by dark fermentation. *Biofuels*, 1-11.
- Baş, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(3), 836-845.
- Battle, I., & Tous, J. (1997). *Carob tree: Ceratonia siliqua L.-Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 17. Bioversity International.
- Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., & Pekmezci, M. (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food chemistry*, 100(4), 1453-1455.
- Bitter, T. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 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.
- Bowman, S., Awad, M. E., Hamrick, M. W., Hunter, M., & Fulzele, S. (2018). Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 6.

- Bukhari, S. N. A., Roswandi, N. L., Waqas, M., Habib, H., Hussain, F., Khan, S., . . . Hussain, Z. (2018). Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1682-1695.
- Carvalho, M., Roca, C., & Reis, M. A. (2016). Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresource technology*, 218, 491-497.
- Chahuki, F. F., Aminzadeh, S., Jafarian, V., Tabandeh, F., & Khodabandeh, M. (2019). Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in *Lactobacillus acidophilus*. *International journal of biological macromolecules*, 121, 870-881.
- Cheng, F., Gong, Q., Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2016). High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology journal*, 11(4), 574-584.
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007). Enhanced Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis* by Coexpressing Bacterial Hemoglobin. *Biotechnology progress*, 23(5), 1017-1022.
- Chong, B. F., Blank, L. M., McLaughlin, R., & Nielsen, L. K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(4), 341-351.
- Chong, B. F., & Nielsen, L. K. (2003). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical engineering journal*, 16(2), 153-162.
- Cooney, M., Goh, L. T., Lee, P., & Johns, M. (1999). Structured Model-Based Analysis and Control of the Hyaluronic Acid Fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological Implications of Glucose and Complex-Nitrogen-Limited Growth. *Biotechnology progress*, 15(5), 898-910.
- de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., 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.
- DeRosa T. F. 2013. Next Generation of International Chemical Additives. Elsevier, UK, 565 p.
- DeStefano, J., & Kirkland, J. (1975). Preparative high-performance liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 47(13), 1193A-1204a.
- Don, M. M., & Shoparwe, N. F. (2010). Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochemical engineering journal*, 49(1), 95-103.
- Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., & Fattal, E. (2016). Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 204-236.
- Doumbouya, N. (2014). *Bacillus subtilis*'ten HYALURONİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU. 43.
- Duan, X.-J., Niu, H.-X., Tan, W.-S., & Zhang, X. (2009). Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechnol*, 19(3), 299-306.
- Duranti, F., Salti, G., Bovani, B., Calandra, M., & Rosati, M. L. (1998). Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation: A clinical and histological study. *Dermatologic surgery*, 24(12), 1317-1325.

- Elibol, M. (2004). Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*, 39(9), 1057-1062.
- Erkan, S. B., Ozcan, A., Yilmazer, C., Gurler, H. N., Karahalil, E., Germec, M., ... & Turhan, I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums. *Journal of Food Processing and Preservation*, e14820.
- Fakhari, A., & Berkland, C. (2013). Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7081-7092.
- Fallacara, A., Vertuani, S., Panozzo, G., Pecorelli, A., Valacchi, G., & Manfredini, S. (2017). Novel artificial tears containing cross-linked hyaluronic acid: an in vitro re-epithelialization study. *Molecules*, 22(12), 2104.
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic Acid in the 3rd Millennium. *Polymers*, 10, 701.
- Ferreira, S. C., Bruns, R., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J., Brandao, G., ... Souza, A. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.
- Gallo, N., Nasser, H., Salvatore, L., Natali, M. L., Campa, L., Mahmoud, M., . . . Madaghiele, M. (2019). Hyaluronic acid for advanced therapies: promises and challenges. *European Polymer Journal*.
- Germec, M., Ozcan, A., & Turhan, I. (2019). Bioconversion of wheat bran into high value-added products and modelling of fermentations. *Industrial Crops and Products*, 139, 111565.
- Gold, M. (2009). The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. *Journal of cosmetic dermatology*, 8(4), 301-307.
- Göllner, I., Voss, W., von Hehn, U., & Kammerer, S. (2017). Ingestion of an oral hyaluronan solution improves skin hydration, wrinkle reduction, elasticity, and skin roughness: Results of a clinical study. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 816-823.
- Gupta, S., Hawker, G., Laporte, A., Croxford, R., & Coyte, P. (2005). The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology*, 44(12), 1531-1537.
- Han, X., Li, Z., Sun, J., Luo, C., Li, L., Liu, Y., ... Wu, C. (2015). Stealth CD44-targeted hyaluronic acid supramolecular nanoassemblies for doxorubicin delivery: probing the effect of uncovalent pegylation degree on cellular uptake and blood long circulation. *Journal of controlled release*, 197, 29-40.
- Haider, M. M. (2014). Citric acid production from carob pod extract by *Aspergillus niger*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9, 112-116.
- 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), 239-243.
- Ilgin, M., Germec, M., & Turhan, I. (2020). Inulinase production and mathematical modeling from carob extract by using *Aspergillus niger*. *Biotechnology progress*, 36(1), e2919.
- Im, J.-H., Song, J.-M., Kang, J.-H., & Kang, D.-J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(11), 1337.

- Janiš, R., Pata, V., Egner, P., Pavlačková, J., Zapletalová, A., & Kejllová, K. (2017). Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. *Biointerphases*, 12(2), 021006.
- Karahalil, E., Germeç, M., & Turhan, I. (2019). β -Mannanase production and kinetic modeling from carob extract by using recombinant *Aspergillus sojae*. *Biotechnology progress*, e2885.
- Karkacier, M., Certel, M., & Artik, N. (1996). The conditions for carob (*Ceratonia siliqua* L.) extraction and the clarification of the extract. *Fruit Processing (Germany)*.
- Kaur, M., & Jayaraman, G. (2016). Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis*. *Metabolic engineering communications*, 3, 15-23.
- Kawada, C., Yoshida, T., Yoshida, H., Matsuoka, R., Sakamoto, W., Odanaka, W., . . . Masuda, Y. (2014). Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. *Nutrition journal*, 13(1), 70.
- Kawada, C., Yoshida, T., Yoshida, H., Sakamoto, W., Odanaka, W., Sato, T., . . . Urushibata, O. (2014). Ingestion of hyaluronans (molecular weights 800 k and 300 k) improves dry skin conditions: a randomized, double blind, controlled study. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 14-81.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, I., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N. (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 368-388.
- 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.
- Kimura, M., Maeshima, T., Kubota, T., Kurihara, H., Masuda, Y., & Nomura, Y. (2016). Absorption of orally administered hyaluronan. *Journal of medicinal food*, 19(12), 1172-1179.
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters*, 29(1), 17-25.
- Kotra, S. R., Venkateswarulu, T., & 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.
- Lima-Costa, M. E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B., & Peinado, J. M. (2012). Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(5), 789-797.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J. (2008a). Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource technology*, 99(17), 8532-8536.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J. (2008b). Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food chemistry*, 110(4), 923-926.

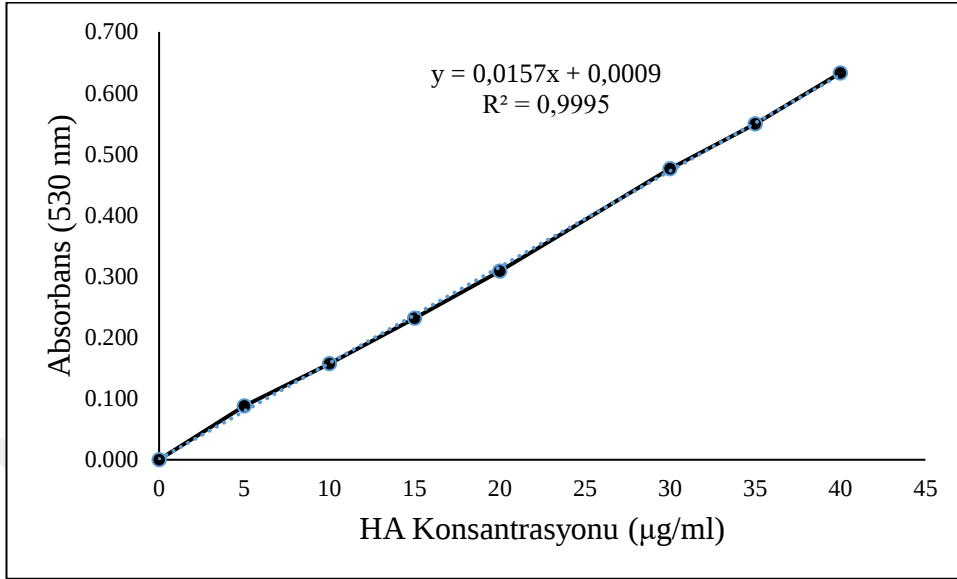
- Liu, L., Sun, J., Zhang, D., Du, G., Chen, J., & Xu, W. (2009). Culture conditions optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* based on radial basis function neural network and quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(1), 24-32.
- Majumder, A., Singh, A., & Goyal, A. (2009). Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranum* and its structural characterization. *Carbohydrate polymers*, 75(1), 150-156.
- Malaekheh-Nikouei, B., Golmohammadzadeh, S., Salmani-Chamanabad, S., Mosallaei, N., & Jamialahmadi, K. (2013). Preparation, characterization, and moisturizing effect of liposomes containing glucosamine and N-acetyl glucosamine. *Journal of cosmetic dermatology*, 12(2), 96-102.
- Maltese, A., Borzacchiello, A., Mayol, L., Bucolo, C., Maugeri, F., Nicolais, L., & Ambrosio, L. (2006). Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials*, 27(29), 5134-5142.
- Marcellin, E., Steen, J. A., & Nielsen, L. K. (2014). Insight into hyaluronic acid molecular weight control. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(16), 6947-6956.
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629-634.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohan, N., Balakrishnan, R., & Sivaprakasam, S. (2016). Optimization and effect of dairy industrial waste as media components in the production of hyaluronic acid by *Streptococcus thermophilus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(6), 628-638.
- Nijhuis, A., Van der Knaap, H., De Jong, S., & Vandeginste, B. (1999). Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. *Analytica chimica acta*, 391(2), 187-202.
- Nobile, V., Buonocore, D., Michelotti, A., & Marzatico, F. (2014). Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Journal of cosmetic dermatology*, 13(4), 277-287.
- Oe, M., Mitsugi, K., Odanaka, W., Yoshida, H., Matsuoka, R., Seino, S., . . . Masuda, Y. (2014). Dietary hyaluronic acid migrates into the skin of rats. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Oe, M., Tashiro, T., Yoshida, H., Nishiyama, H., Masuda, Y., Maruyama, K., . . . Fukui, N. (2015). Oral hyaluronan relieves knee pain: a review. *Nutrition journal*, 15(1), 11.
- Oziyici, H. R., Tetik, N., Turhan, I., Yatmaz, E., Ucgun, K., Akgul, H., . . . Karhan, M. (2014). Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits. *Scientia Horticulturae*, 167, 149-152.
- Pan, N. C., Pereira, H. C. B., da Silva, M. d. L. C., Vasconcelos, A. F. D., & Celligoi, M. A. P. C. (2017). Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(1), 276-293.
- Patil, K. P., Patil, D. K., Chaudhari, B. L., & Chincholkar, S. B. (2011). Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(3), 286-288.

- Pires, A. M., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., & Santana, M. H. (2010). Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource technology*, 101(16), 6506-6509.
- Qassemayr, Q., & Gianfermi, M. (2015). Supermicrosurgery and hyaluronic acid: Experimental feasibility study of a new method. *In Annales de chirurgie plastique esthétique* 60(1), 59-65).
- Rohit, S. G., Jyoti, P. K., Subbi, R. R. T., Naresh, M., & Senthilkumar, S. (2018). Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. *Biochemical engineering journal*, 137, 284-293.
- Roukas, T. (1999). Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1-2), 54-59.
- Salwowska, N. M., Bebenek, K. A., Żądło, D. A., & Wcisło-Dziadecka, D. L. (2016). Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *Journal of cosmetic dermatology*, 15(4), 520-526.
- Sato, T., & Iwaso, H. (2009). An effectiveness study of hyaluronic acid [Hyabest®(J)] in the treatment of osteoarthritis of the knee on the patients in the United States. *J New Rem & Clin*, 58(3), 249-256.
- Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 85(3), 469-489.
- Shah, M. V., Badle, S. S., & Ramachandran, K. (2013). Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochemical engineering journal*, 80, 53-60.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in microbiology*, 7, 2087.
- Solà, R., Valls, R.-M., Martorell, I., Giralt, M., Pedret, A., Taltavull, N., . . . de Frutos, V. L. (2015). A low-fat yoghurt supplemented with a rooster comb extract on muscle joint function in adults with mild knee pain: a randomized, double blind, parallel, placebo-controlled, clinical trial of efficacy. *Food & function*, 6(11), 3531-3539.
- Sousa, A. S., Guimarães, A. P., Gonçalves, C. V., Silva Jr, I. J., Cavalcante Jr, C. L., & Azevedo, D. C. (2009). Purification and characterization of microbial hyaluronic acid by solvent precipitation and size-exclusion chromatography. *Separation Science and Technology*, 44(4), 906-923.
- Sze, J. H., Brownlie, J. C., & Love, C. A. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*, 6(1), 67.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 101(14), 5290-5296.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010). Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food biotechnology*, 24(4), 364-374.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., & Galip, H. (2011). Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(1), 101-111.

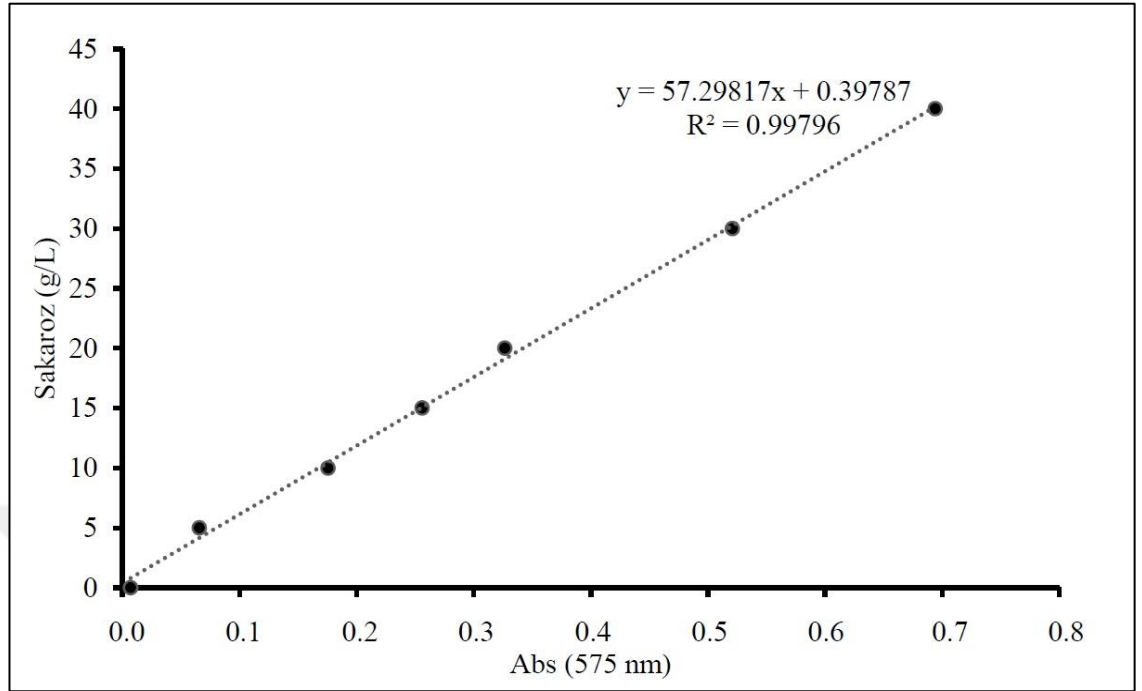
- Van Leeuwen, J., Vandeginste, B., Kateman, G., Mulholland, M., & Cleland, A. (1990). An expert system for the choice of factors for a ruggedness test in liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, 228, 145-153.
- Vanaja, K., & Shobha Rani, R. (2007). Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. *Clinical research and regulatory affairs*, 24(1), 1-23.
- Vasi A. M., Popa M. I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L. 2014. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Material Science and Engineering C*, 38, 177-185.
- Vasvani, S., Kulkarni, P., & Rawtani, D. (2019). Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International journal of biological macromolecules*.
- Vázquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., & Murado, M. A. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial cell factories*, 9(1), 46.
- Viola, M., Vigetti, D., Genasetti, A., Rizzi, M., Karousou, E., Moretto, P., . . . De Luca, G. (2008). Molecular control of the hyaluronan biosynthesis. *Connective tissue research*, 49(3-4), 111-114.
- Volpi, N., Schiller, J., Stern, R., & Soltes, L. (2009). Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current medicinal chemistry*, 16(14), 1718-1745.
- Wilson, D., & Chosewood, L. (2007). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. *US Department of Health and Human Services, CDC/NIH, 5th Edition. US Government Printing Office, Washington, DC*.
- Yatmaz, E., & Turhan, I. (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 200-208.
- Yatmaz, E., & Turhan, İ. (2015). HYALURONİK ASİT VE FERMANTASYONLA ÜRETİLMESİ. *Gıda*, 40(4), 233-240.
- Yatmaz, E., Turhan, I., & Karhan, M. (2013). Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource technology*, 135, 365-371.
- Yin, X., You, Q., & Jiang, Z. (2011). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 86(3), 1358-1364.
- Yousif, A. K., & Alghzawi, H. (2000). Processing and characterization of carob powder. *Food chemistry*, 69(3), 283-287.
- Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic engineering*, 10(1), 24-32.
- Zhang, J., & Gao, N.-f. (2007). Application of response surface methodology in medium optimization for pyruvic acid production of *Torulopsis glabrata* TP19 in batch fermentation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(2), 98-104.
- Zhang, X., Duan, X.-J., & Tan, W.-S. (2010). Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food chemistry*, 119(4), 1643-1646.

7. EKLER

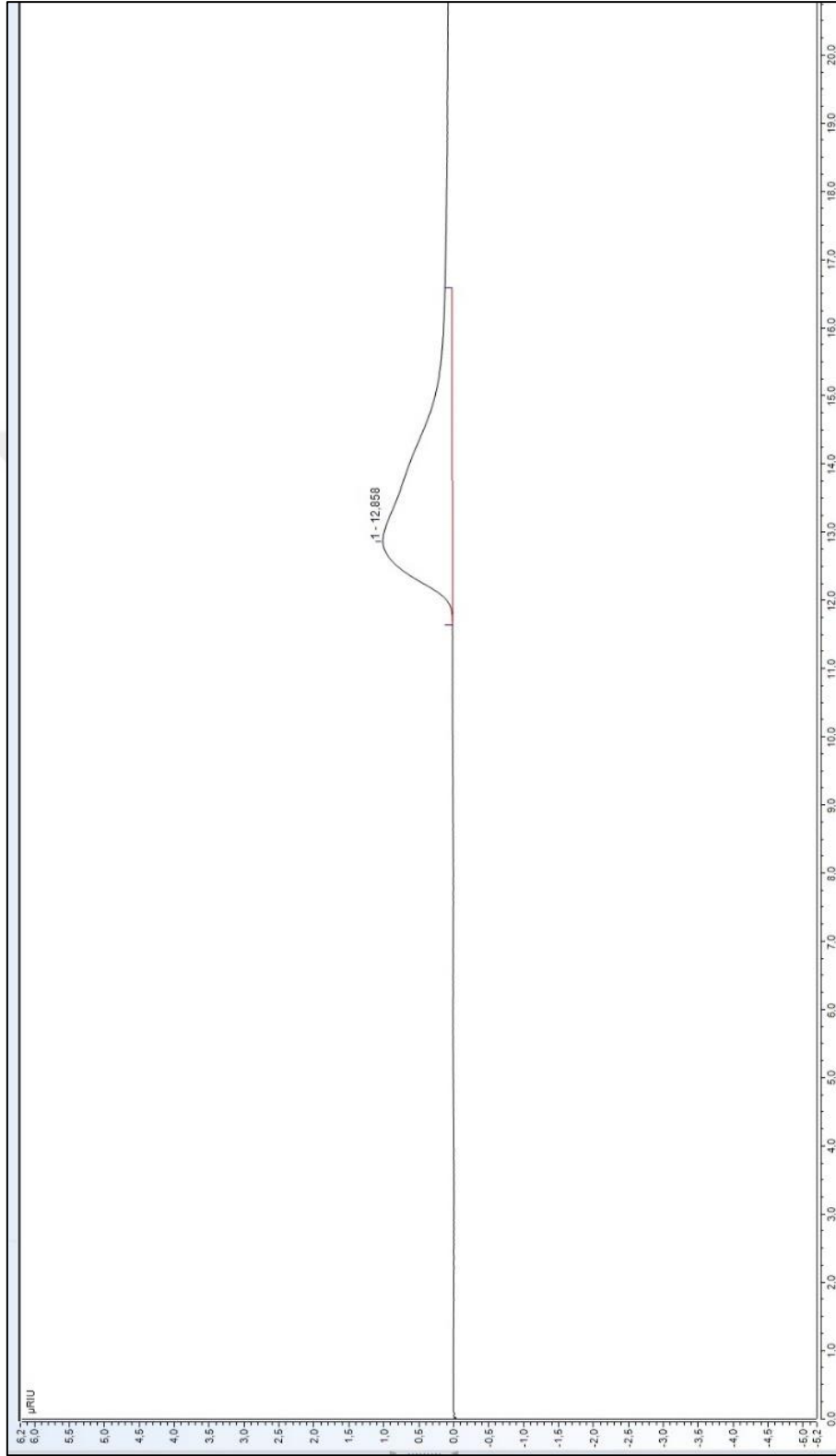
Ek-1. Hyaluronik asit standart grafiği



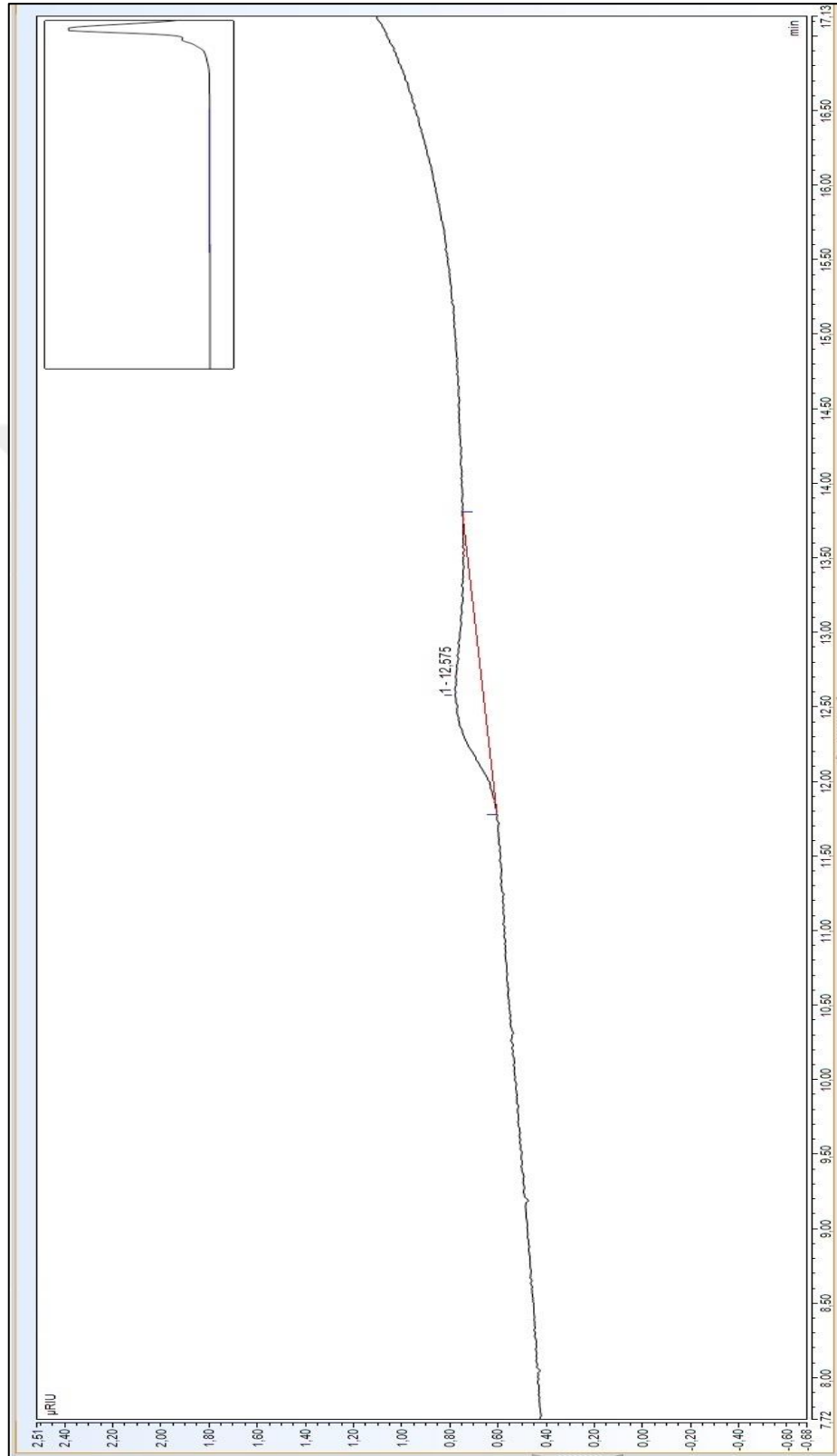
Ek-2. Toplam indirgen şeker analizi standart sakaroz grafiği



EK-3. 1.250-1.750 kDa molekül ağırlığı aralığındaki standarta ait kromatogram görüntüsü



EK-4. Biyoreaktör denemelerinde üretilen bir denemeye ait kromatogram ait kromatogram görüntüsü



ÖZGEÇMİŞ

ALİ ÖZCAN

ozzcanali@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2012-2017	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Erkan, S. B., **Ozcan, A.**, Yilmazer, C., Gürler, H. N., Karahalil, E., Germec, M., ... & Turhan, I. (2020). The effects of mannanase activity on viscosity in different gums. Journal of Food Processing and Preservation, e14820.
- 2- Erkan, S. B., Basmak, S., **Ozcan, A.**, Yilmazer, C., Gürler, H. N., Yavuz, G., ... & Turhan, I. (2020). Mannooligosaccharide production by β -mannanase enzyme application from coffee extract. Journal of Food Processing and Preservation, e14668.
- 3- Gurler, H. N., Yilmazer, C., Erkan, S. B., **Ozcan, A.**, Yatmaz, E., Öziyci, H. R., ... & Turhan, I. (2020). Applicability of recombinant Aspergillus sojae crude mannanase enzyme in carrot juice production. Journal of Food Processing and Preservation, e14603.
- 4- Germec, M., **Ozcan, A.**, & Turhan, I. (2020). Chemical characterization of acid-pretreated renewable resources: effect of pretreatment time. Biofuels, 1-11.
- 5- Germec, M., Gürler, H. N., **Ozcan, A.**, Erkan, S. B., Karahalil, E., & Turhan, I. (2020). Medium optimization and kinetic modeling for the production of Aspergillus niger inulinase. Bioprocess and Biosystems Engineering, 43(2), 217-232.

6- Germec, M., **Ozcan, A.**, & Turhan, I. (2019). Bioconversion of wheat bran into high value-added products and modelling of fermentations. *Industrial Crops and Products*, 139, 111565.

7- Germec, M., Demirel, F., Tas, N., **Ozcan, A.**, Yilmazer, C., Onuk, Z., & Turhan, I. (2017). Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. *Cellulose*, 24(10), 4337-4353.

8- Germec, M., **Ozcan, A.**, Yilmazer, C., Tas, N., Onuk, Z., Demirel, F., & Turhan, I. (2017). Ethanol fermentation from microwave-assisted acid pretreated raw materials by *Scheffersomyces stipitis*. *AgroLife Sci J*, 6(1), 112-118.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Gürler HN., Erkan SB., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Karahalil E., Germec M., Yatmaz E., Turhan I. A scale up processing with different microparticle agent for mannanase fermentation in bioreactor, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

2- Gürler HN., Yilmazer C., Erkan SB., **Ozcan A.**, Yatmaz E., Turhan I. Effect of mannanase enzyme treatment on yield, beta carotene content and turbidity in the carrot juice production, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

3- Erkan SB., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Gürler HN., Karahalil E., Germec M., Yatmaz E., Turhan I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

4- Yilmazer C., Erkan SB., **Ozcan A.**, Gürler HN., Yavuz G., Yatmaz E., Turhan I. Mannooligosaccharides production from different gums using mannanase, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

5- Erkan SB., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Gürler HN., Yavuz G., Yatmaz E., Turhan I. Mannooligosaccharide production by mannanase enzyme application from coffee extract, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

6- **Ozcan A.**, Germec M., Turhan İ., "EFFECT OF IMMOBILIZATION ON ETHANOL PRODUCTION FROM WHEAT BRAN USING *S.stipitis*", 3rd International Congress on Food Technology; October 10-12, 2018 Nevşehir/Turkey

7- Germeç M., Tas N., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Onuk Z., Demirel F., et al., "Microwaveassisted acid pretreatment of renewable resources: a process optimization", The International Conference of the University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, "Agriculture for Life, Life for Agriculture", BÜKREŞ, ROMANYA

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Turhan İ., Germeç M., Tas N., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Onuk Z., "Arpa Kavuzunun Mikrodalga Destekli Asidik Hidrolizi", Türkiye 12. Gıda Kongresi EDİRNE, TÜRKİYE, 05-07 Ekim 2016, vol.48, ss. 309-309

2- Turhan İ., Demirel F., Yilmazer C., Tas N., **Ozcan A.**, Onuk Z., Germeç M., "Çavdar Kepeğinin Mikrodalga Destekli Asidik Hidrolizi Üzerine Mikrodalga Gücü, Katı/Sıvı Oranı ve Hidroliz Süresinin Etkisi", Türkiye 12. Gıda Kongresi EDİRNE, TÜRKİYE, 05-07 Ekim 2016, vol.48, ss. 322-322.

3- Turhan İ., Germeç M., Onuk Z., Yilmazer C., Tas N., **Ozcan A.**, "Fermente Edilebilir Şeker Üretimi İçin Yulaf Kavuzunun Mikrodalga Destekli Asidik Hidrolizi", Türkiye 12. Gıda Kongresi EDİRNE, TÜRKİYE, 05-07 Ekim 2016, vol.48, ss. 323-323.

4- Turhan İ., Germeç M., Tas N., **Ozcan A.**, Yilmazer C., Onuk Z., "Buğday Kepeğinden Fermente Edilebilir Şekerlerin Üretimi Üzerine Mikrodalga Destekli Asidik Hidrolizin Etkisi", Türkiye 12. Gıda Kongresi EDİRNE, TÜRKİYE, 05-07 Ekim 2016, vol.48, ss. 324-324

PROJELER

1- "Rekombinant *Pichia pastoris* suşunun immobilizasyonu, immobilize kültür ile alfaamilaz üretim ve enzimin saflaştırılarak karakterize edilmesi", TÜBİTAK 2209/A Projesi, Haziran 2017

2- "Buğday kepeğinden fermente edilebilir şekerlerin üretimi ve elde edilen hidrolizatın inülaaz, laktik asit ve etanol fermentasyonunda potansiyel karbon kaynağı olarak kullanımı", BAP, Normal Araştırma Projesi FBA-2018-3689, Araştırmacı, kapandı.

3- "Keçiboynuzu ekstraktının hyaluronik asit üretiminde karbon kaynağı olarak değerlendirilmesi ve üretim şartlarının optimizasyonu", BAP, Yüksek Lisans Tez Projesi FYL2019-4723, Araştırmacı, devam ediyor.

4- "Katı kültür fermentasyonunda *Aspergillus niger* ile inülinaz ve fruktooligosakkarit üretimi", BAP, Kapamlı Araştırma Projesi FKA-2019-4686, Araştırmacı, devam ediyor.