

**MİKROBİYAL HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ VE TARIMSAL ATIKLARIN  
HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE DEĞERLENDİREBİLİRLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Yasemin KARASU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ**

**Eskişehir**

**Eskişehir Teknik Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Ocak 2021**

**ÖZET**  
**MİKROBİYAL HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ VE TARIMSAL ATIKLARIN**  
**HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE DEĞERLENDİREBİLİRLİĞİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

Yasemin KARASU

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2021

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Hyaluronik asit (HA)  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış olan, canlı vücudunda bazı yaşamsal aktiviteleri gerçekleştiren, ticari olarak değerli bir polimerdir. Bu çalışmada HA üretiminde kullanılabilir farklı mikroorganizmaların araştırılması, fermantasyon ortamında tarımsal atıkların kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi ile hyaluronik asit üretim koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. *S.thermophilus*, *S. epidermidis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *S. mutans* ve *S. warnei* HA üretimi açısından incelenmiştir. Tarama deneyleri ile HA üretimi yaptığı belirlenen bakteriler ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Plackett Burman deney tasarımı ile üretimde etkili faktörlerin belirlenmesinden sonra cevap yüzey yöntemi ile optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Üretimi etkileyen en önemli faktörler sıcaklık, pH, çalkalama hızı ve iz mineraller olarak bulunmuştur. En yüksek üretim miktarları *S. thermophilus* P4 88,0 mg/L ve *S. mutans* 1a21 85,0 mg/L olarak bulunmuştur. Optimum üretim koşulları belirlendikten sonra peynir altı suyu, melas, şilempe ve zeytin posasının üretimde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Üretilen hyaluronik asit hyaluronidaz enzimi ve FTIR ile tayin edilmiştir. Deneylere alınan bakterilerin HA üretiminde kullanılacakları ve değerlendirilen tarımsal atıkların HA besiyerinde karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir..

**Anahtar Sözcükler:** Hyaluronik asit, Atık, Plackett Burman, Cevap Yüzey Yöntemi, Optimizasyon

## ABSTRACT

### MICROBIAL HYALURONIC ACID PRODUCTION AND INVESTIGATION OF THE EVALUABILITY OF AGRICULTURAL WASTE IN HYALURONIC ACID PRODUCTION

Yasemin KARASU

Department of Biology

Programme in Fundamental and Industrial Microbiology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2021

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Hyaluronic acid (HA) is a commercially valuable polymer bonded by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds and performs some vital activities in the living body. In this study, it is aimed to investigate different microorganisms that can be used in HA production, to evaluate the usability of agricultural wastes in fermentation environment and to optimize hyaluronic acid production conditions. *S. thermophilus*, *S. epidermidis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *S. mutans* and *S. warnei* were examined in terms of HA production. Optimization studies continued with the bacteria that were determined to produce HA through screening experiments. After determination to the factors affecting production with the Plackett Burman experimental design, the optimum production conditions were determined by the response surface method. The most important factors affecting the production were found to be temperature, pH, agitation speed and trace minerals. The highest production amounts were found as *S. thermophilus* P4 88,0 mg/L and *S. mutans* 1a21 85,0 mg/L. After determination to the optimum production conditions, the usability of whey, molasses, chill and olive pulp in production was investigated. The hyaluronic acid produced has been determined by hyaluronidase enzyme and FTIR. It has been determined that the bacteria taken in the experiments can be used in the production of HA, and the evaluated agricultural wastes can be used as a carbon and nitrogen source in the HA medium.

**Keywords:** Hyaluronic acid, Waste, Plackett Burman, Response Surface Method, Optimization

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans tez alışmalarım boyunca deneyimleriyle bana yol gösteren, ufkumu genişleten ve her zaman ilgiyle yaklaşan değerli hocam Prof. Dr. Merih Kıvanç'a, optimizasyon çalışmaları sırasında analizlerimi gerçekleştiren ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Berrin Bozan'a,

Eğitim hayatım boyunca desteğini hiç esirgemeyen üniversite eğitimimin bana kattığı kıymetli dostum Gamze Gültekin'e, aynı çalışma ortamını paylaştığım laboratuvar arkadaşlarıma ve hocalarıma,

2210-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu ile çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a teőekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da desteklerini hep hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Yasemin KARASU

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

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

Yasemin KARASU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
GÖRSELLER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hyaluronik Asit Nedir? .....	2
1.2. Hyaluronik Asidin Tarihçesi.....	3
1.3. Hyaluronik Asidin Biyosentezi .....	4
1.4. Hyaluronik Asidin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	6
1.4.1. Hyaluronik asidin kozmetikte kullanımı.....	10
1.4.2. Hyaluronik asidin oftalmojide kullanımı .....	10
1.4.3. Hyaluronik asidin yara iyileşmesinde kullanımı .....	10
1.4.4. Hyaluronik asidin dermatolojide kullanımı.....	11
1.4.5. Hyaluronik asidin farmosötik kullanımı.....	11
1.5. Hyaluronik Asit Pazar Büyüklüğü .....	12
1.6. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri.....	13
1.6.1. Hayvansal dokulardan ekstraksiyon .....	14
1.6.2. Bakteriyel fermentasyon.....	15
1.6.2.1. Üretime etki eden faktörler.....	15
1.6.3. İn vitro üretim .....	17
1.7. Hyaluronik Asit Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar .....	17

1.7.1. Streptococcus'ların genel özellikleri.....	18
1.7.2. Staphylococcus'ların genel özellikleri .....	19
1.7.3. Enterococcus'ların genel özellikleri.....	20
1.8. Hyaluronik Asit Üretiminde Atıkların Kullanılması.....	21
1.9. Optimizasyon .....	21
<b>2. MATERYAL VE METHOD .....</b>	<b>24</b>
2.1. Materyal.....	24
2.1.1. Mikroorganizmalar .....	24
2.1.2. Besiyerleri.....	24
2.1.2.1. Fermentasyon besiyeri.....	24
2.1.2.2. M17 agar .....	24
2.1.2.3. M17 broth.....	24
2.1.2.4. BHI (brain heart infusion) agar .....	25
2.1.2.5. BHI (brain heart infusion) broth .....	25
2.1.3. Kullanılan çözelti ve kimyasallar .....	25
2.1.3.1. %20'lik gliserol .....	25
2.1.3.2. 0.025 M sodyum tetraborat çözeltisi.....	25
2.1.3.3. Karbazol çözeltisi .....	25
2.1.3.4. %0.1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi.....	25
2.1.3.5. Peptonlu su.....	26
2.1.3.6. 0.2 M asetat tamponu .....	26
2.1.3.7. PH ayarlama amacıyla kullanılan çözeltiler .....	26
2.1.3.8. Sodyum klorit çözeltisi.....	26
2.1.3.9. Fosfat tamponu.....	26
2.1.3.10. Enzim dilüenti.....	26
2.1.3.11. Asetik albumin çözeltisi .....	26
2.1.3.12. DNS (Dinitro salisilik asit) çözeltisi.....	27
2.1.3.13. İz mineral çözeltisi.....	27
2.1.3.14. %3'lük hidrojen peroksit .....	27
2.1.3.15. Kullanılan boyalar .....	27
2.2. Method .....	28
2.2.1. Yoğurt ve peynirden mikroorganizmaların izolasyonu.....	28

2.2.2. Mikroorganizmaların tanılanması.....	28
2.2.2.1. Gram boyama.....	28
2.2.2.2. Katalaz testi.....	28
2.2.2.3. Biyokimyasal ve moleküler tanılama.....	28
2.2.2.4. Sıcaklık tolerans testi.....	29
2.2.3. Hyaluronik asit standardının hazırlanması.....	29
2.2.4. Bakterilerin hyaluronik asit üretimi yönünden taranması.....	30
2.2.5. Mikroorganizmalar ile hyaluronik asit üretiminin yapılması.....	30
2.2.6. Üretilen hyaluronik asidin doğrulanması.....	31
2.2.6.1. FTIR ile hyaluronik asit tayini.....	31
2.2.6.2. Hyaluronidaz enzimi ile tayin.....	31
2.2.7. Hyaluronik asit üretiminin optimizasyonu.....	32
2.2.7.1. Plackett Burman deney tasarımı.....	32
2.2.7.2. Cevap yüzey yöntemi.....	34
2.2.8. Validasyon.....	40
2.2.9. Mikroorganizmaların atıklarla gelişiminin incelenmesi.....	40
2.2.10. Tarımsal atıkların bazı özelliklerinin belirlenmesi.....	40
2.2.10.1. Azot miktarının belirlenmesi.....	40
2.2.10.2. Kuru madde miktarının belirlenmesi.....	41
2.2.10.3. Yağ oranının belirlenmesi.....	41
2.2.10.4. İndirgen şeker analizi.....	41
2.2.11. Seçilen tarımsal atıkların HA üretiminde kullanılması.....	42
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması.....	44
3.2. Bakterilerin Hyaluronik Asit Üretimi Yönünden Taranması.....	49
3.3. Mikroorganizmalardan Hyaluronik Asit Üretimi.....	50
3.4. Hyaluronik Asit Üretiminde Etkili Parametrelerin Belirlenmesi.....	51
3.4.1. Plackett Burman deney tasarımı.....	51
3.4.2. Cevap yüzey yöntemi ile hyaluronik asit üretimi.....	72
3.5. Validasyon.....	87
3.6. Atıkların HA Üretiminde Kullanılabilirliği.....	87

3.6.1. Atıkların bulunduğu besiyerlerinde bakterilerin gelişimlerinin incelenmesi .....	88
3.6.2. Atıkların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	90
3.6.2.1. Azot miktarlarının belirlenmesi .....	90
3.6.2.2. Kuru madde miktarlarının belirlenmesi .....	90
3.6.2.3. Yağ oranlarının belirlenmesi .....	90
3.6.2.4. İndirgen şeker miktarlarının belirlenmesi.....	91
3.6.3. Atıkların besiyerinde kullanım miktarlarının belirlenmesi .....	91
3.6.4. Optimum koşullarda atıklarla üretim .....	92
3.7. Hyaluronik Asit Doğrulama Deneyleeri .....	93
3.7.1. Hyaluronidaz enzimi ile tayin .....	93
3.7.2. FTIR ile Tayin .....	94
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	106
KAYNAKÇA.....	122
EKLER .....	135
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> Optimizasyon için değerlendirilen parametreler.....	33
<b>Tablo 2.2.</b> Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı deney tasarımı.....	33
<b>Tablo 2.3.</b> Karbon kaynağı olarak sükrözün kullanıldığı deney tasarımı.....	34
<b>Tablo 2.4.</b> CYY tasarımında kullanılan parametrelerin düzeyleri.....	35
<b>Tablo 2.5.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 glukozlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı.....	36
<b>Tablo 2.6.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 glukozlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı.....	37
<b>Tablo 2.7.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 sükrözlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı.....	38
<b>Tablo 2.8.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 sükrözlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı.....	39
<b>Tablo 2.9.</b> Kullanılan şeker ve atık miktarları.....	42
<b>Tablo 3.1.</b> Peynir ve yoğurttan izole edilen bakterilerin gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri.....	45
<b>Tablo 3.2.</b> İzole edilen bakterilerin biyokimyasal özellikleri.....	45
<b>Tablo 3.3.</b> Vitek 2 ile tanımlanan bakteriler ve benzerlik oranları.....	48
<b>Tablo 3.4.</b> Dizi analizi ile tanımlanan bakteriler ve genbank erişim numaraları.....	49
<b>Tablo 3.5.</b> <i>S. thermophilus</i> P3'ün glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	52
<b>Tablo 3.6.</b> <i>S.thermophilus</i> P3 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	53
<b>Tablo 3.7.</b> <i>S. thermophilus</i> P3'ün PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları.....	53
<b>Tablo 3.8.</b> <i>S.thermophilus</i> P3 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	54
<b>Tablo 3.9.</b> <i>S. thermophilus</i> P4'ün PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	55
<b>Tablo 3.10.</b> <i>S.thermophilus</i> P4 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	55
<b>Tablo 3.11.</b> <i>S. thermophilus</i> P4'ün PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları.....	56
<b>Tablo 3.12.</b> <i>S.thermophilus</i> P4 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	57
<b>Tablo 3.13.</b> <i>E. gallinarum</i> M179'un PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	57

<b>Tablo 3.14.</b> <i>E. gallinarum</i> M179 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	58
<b>Tablo 3.15.</b> <i>E. gallinarum</i> M179'un PB tasarımında süzkroz ile elde edilen üretim miktarları.....	59
<b>Tablo 3.16.</b> <i>E. gallinarum</i> M179 ile süzkroz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	59
<b>Tablo 3.17.</b> <i>E. durans</i> M173'ün glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	60
<b>Tablo 3.18.</b> <i>E. durans</i> M173 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	61
<b>Tablo 3.19.</b> <i>E. durans</i> M173'ün süzkroz ile elde edilen üretim miktarları.....	61
<b>Tablo 3.20.</b> <i>E. durans</i> M173 ile süzkroz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	62
<b>Tablo 3.21.</b> <i>S. mutans</i> 1a21'in glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	63
<b>Tablo 3.22.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	63
<b>Tablo 3.23.</b> <i>S. mutans</i> 1a21'in süzkroz ile elde edilen üretim miktarları.....	64
<b>Tablo 3.24.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile süzkroz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	65
<b>Tablo 3.25.</b> <i>S. warnei</i> S22'nin glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	65
<b>Tablo 3.26.</b> <i>S. warnei</i> S22 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	66
<b>Tablo 3.27.</b> <i>S. warnei</i> S22'nin süzkroz ile elde edilen üretim miktarları.....	67
<b>Tablo 3.28.</b> <i>S. warnei</i> S22 ile süzkroz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	67
<b>Tablo 3.29.</b> <i>S. epidermidis</i> PS1'in PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları.....	68
<b>Tablo 3.30.</b> <i>S. epidermidis</i> PS1 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	69
<b>Tablo 3.31.</b> <i>S. epidermidis</i> PS1'in PB tasarımında süzkroz ile elde edilen üretim miktarları.....	69
<b>Tablo 3.32.</b> <i>S. epidermidis</i> PS1 ile süzkroz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	70
<b>Tablo 3.33.</b> PB tasarımında test bakterilerinin en yüksek HA üretim miktarları.....	71

<b>Tablo 3.34.</b> PB tasarımı ile belirlenen üretimde etkili faktörler.....	71
<b>Tablo 3.35.</b> <i>S. thermophilus</i> P4'ün glukoz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları.....	73
<b>Tablo 3.36.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 glukozlu besiyeri varyans analiz sonuçları.....	76
<b>Tablo 3.37.</b> <i>S. mutans</i> 1a21'in glukoz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları.....	76
<b>Tablo 3.38.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukozlu besiyeri varyans analiz sonuçları.....	77
<b>Tablo 3.39.</b> <i>S. thermophilus</i> P4'ün sükroz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları.....	80
<b>Tablo 3.40.</b> P4 numaralı <i>S. thermophilus</i> bakterisinin sükrozlu besiyeri varyans analiz sonuçları.....	81
<b>Tablo 3.41.</b> <i>S. mutans</i> 1a21'in sükroz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları.....	84
<b>Tablo 3.42.</b> 1a21 numaralı <i>S. mutans</i> bakterisinin sükrozlu besiyeri varyans analiz sonuçları.....	85
<b>Tablo 3.43.</b> Cevap yüzey modeli ile belirlenen optimum koşullar.....	87
<b>Tablo 3.44.</b> Validasyon deneyleri sonucunda elde edilen üretim miktarları.....	87
<b>Tablo 3.45.</b> Bakterilerin peynir altı suyunda gelişimleri.....	88
<b>Tablo 3.46.</b> Bakterilerin melasta gelişimleri.....	89
<b>Tablo 3.47.</b> Bakterilerin şilempede gelişimleri.....	89
<b>Tablo 3.48.</b> Bakterilerin zeytin posasında gelişimleri.....	89
<b>Tablo 3.49.</b> Atıkların azot miktarları.....	90
<b>Tablo 3.50.</b> Atıkların kuru madde miktarları.....	90
<b>Tablo 3.51.</b> Atıkların içerdikleri yağ miktarları.....	91
<b>Tablo 3.52.</b> Atıkların indirgen şeker miktarları.....	91
<b>Tablo 3.53.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ve <i>S. mutans</i> 1a21 ile HA üretiminde besiyerine ilave edilen oranları.....	91
<b>Tablo 3.54.</b> Optimum koşullarda atıklar ile üretim miktarları.....	92
<b>Tablo 3.55.</b> Üretilen ürünün hyaluronidaz enzimi ile muamele değerleri.....	93

## GÖRSELLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Görsel 1.1.</b> Hyaluronik asidin kimyasal yapısı. ....	3
<b>Görsel 1.2.</b> <i>S. zooepidemicus</i> 'ta hyaluronik asit biyosentetik yolu.....	5
<b>Görsel 1.3.</b> Bir hyaluronik asit tabakasının ucunda jel oluşumu.....	9
<b>Görsel 1.4.</b> Hyaluronik asit pazar büyüklüğü.....	13
<b>Görsel 1.5.</b> Hyaluronik asit üretim yöntemleri.....	14
<b>Görsel 2.1.</b> Hyaluronik asit ile hazırlanan standart eğri.....	30
<b>Görsel 2.2.</b> Glukoz-absorbans kalibrasyon doğrusu.....	42
<b>Görsel 3.1.</b> <i>S. thermophilus</i> , <i>S. epidermidis</i> mikroskop görüntüsü.....	44
<b>Görsel 3.2.</b> <i>S. thermophilus</i> , <i>S. epidermidis</i> ve <i>S. mutans</i> 'ta renk değişimi.....	50
<b>Görsel 3.3.</b> Glukoz ve sükroz içeren HA besiyerleri.....	51
<b>Görsel 3.4.</b> İnkübasyon sonrası HA besiyeri.....	51
<b>Görsel 3.5.</b> <i>S. thermophilus</i> 'un glukozlu besiyeri kontur grafiği.....	75
<b>Görsel 3.6.</b> <i>S. thermophilus</i> 'un glukozlu besiyeri cevap yüzey grafiği.....	76
<b>Görsel 3.7.</b> <i>S. mutans</i> 'ın glukozlu besiyeri kontur grafiği.....	79
<b>Görsel 3.8.</b> <i>S. mutans</i> 'ın glukozlu besiyeri cevap yüzey grafiği.....	80
<b>Görsel 3.9.</b> <i>S. thermophilus</i> 'un sükrozlu besiyeri kontur grafiği.....	83
<b>Görsel 3.10.</b> <i>S. thermophilus</i> 'un sükrozlu besiyeri cevap yüzey grafiği.....	84
<b>Görsel 3.11.</b> <i>S. mutans</i> 'ın sükrozlu besiyeri cevap yüzey grafiği.....	86
<b>Görsel 3.12.</b> <i>S. mutans</i> 'ın sükrozlu besiyeri kontur grafiği.....	86
<b>Görsel 3.13.</b> Bakterilerin peynir altı suyunda gelişimi.....	88
<b>Görsel 3.14.</b> Zeytin, şilempe, melas, pas içeren ve atık içermeyen besiyeri.....	92
<b>Görsel 3.15.</b> Literatüden elde edilen HA spektrumları.....	95
<b>Görsel 3.16.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile glukoz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	96
<b>Görsel 3.17.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile glukoz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	96

<b>Görsel 3.18.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile glukoz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	97
<b>Görsel 3.19.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile glukoz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	97
<b>Görsel 3.20.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile glukoz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	98
<b>Görsel 3.21.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile sükroz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu .....	98
<b>Görsel 3.22.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile sükroz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	99
<b>Görsel 3.23.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile sükroz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	99
<b>Görsel 3.24.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile sükroz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	100
<b>Görsel 3.25.</b> <i>S. thermophilus</i> P4 ile sükroz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	100
<b>Görsel 3.26.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	101
<b>Görsel 3.27.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	101
<b>Görsel 3.28.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	102
<b>Görsel 3.29.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	102
<b>Görsel 3.30.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile glukoz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	103
<b>Görsel 3.31.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile sükroz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	103
<b>Görsel 3.32.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile sükroz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden	

üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	104
<b>Görsel 3.33.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile sükroz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	104
<b>Görsel 3.34.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile sükroz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	105
<b>Görsel 3.35.</b> <i>S. mutans</i> 1a21 ile sükroz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu.....	105



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\beta$	: Beta
Da	: Dalton
kDa	: Kilo Dalton
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
spp.	: Türler
vd	: Ve diğerleri
M	: Molar
L	: Litre
$\text{CO}_2$	: Karbondioksit
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
$\mu$	: Mikrolitre
Cyy	: Cevap yüzey yöntemi
PB	: Plackett Burman
nm	: Nanometre

## 1. GİRİŞ

Hyaluronik asit (HA), tekrarlayan disakkaritlerden oluşan doğal ve doğrusal bir polimerdir. HA,  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin disakkarit birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmaktadır (Chong vd., 2005). HA canlıların vücut dokularında doğal olarak üretilen ve birçok göreve sahip olan bir polimerdir (Chong vd., 2005). İnsanların tüm dokularında, göbek kordonu, eklem sıvısı, gözde vitreus sıvısında ve ciltte bol miktarda bulunmaktadır (Kogan vd., 2007; Liu vd., 2011). HA birçok hücre tipi tarafından üretilmektedir (Lee vd. 2000; Toole, 2000). Ancak insanda üretimi genellikle mezenkimal hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir (Toole, 2004; Liang vd. 2016). Normal biyolojik koşullarda HA boşluk doldurma, hidrasyon, eklemlerin yağlanması ve hücrelerin içinden geçebileceği bir matrisin sağlanmasında işlev görmektedir. Doku hasarı sırasında aktif olarak üretilmektedir. Polimer, iltihaplı hücre aktivasyonu, epitel hücre davranışının düzenlenmesi ve fibroblastlar gibi doku onarımının ve hastalık sürecinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Liang vd., 2016).

HA viskoelastisitesi, yüksek nem tutma kapasitesi ve biyouyumluluğu, polimerin ilaç dağıtımı (Zanin vd., 2017), osteoartrit tedavileri (Yu vd., 2008; Altman vd., 2000), oftalmik cerrahi (Kretz vd., 2014), periodontitis (Rajan vd., 2014; Chen vd., 2019) ve kutanöz yara iyileşmesi gibi özellikleri farmasötik ve tıbbi alanlarda geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlamaktadır. Yara tedavisinde, HA'nın ekzojen uygulamaları, hücre göçünü ve proliferasyonunu kolaylaştırarak yara iyileşmesini desteklemektedir (Su ve ark., 2014; Shin vd., 2016). HA viskoelastisitesi, biyouyumluluk, biyobozunurluk, immünojenik olmamaları nedeniyle nedeniyle cilt üzerine yoğun olarak uygulanmaktadır (Papakonstantinou vd., 2012).

Hyaluronik asit (HA), ilaç ve kozmetik endüstrisinde uygulamaları olan bir biyopolimerdir. Günümüzde HA ticari olarak hayvan dokularından, yani horoz ibiği veya Lancefield grup A ve C streptokok bakterilerinin fermentasyonundan ekstraksiyon yoluyla üretilmektedir (Chong vd., 2005; Boeriu vd., 2013). Hayvan kaynaklı ürünlerin viral enfeksiyon nedeniyle bulaşıcı maddelerle kirlenmesine ilişkin artan endişeler, bakteriyel fermentasyonu gelecekteki talepleri karşılamak için daha arzu edilen bir üretim sistemi haline getirmektedir (Chong vd., 2005). Bunun yanında, tarımsal atık materyallerin fermentasyonda kullanılma olasılığının olması üretim maliyetini

düşürebilmektedir (Amado vd., 2017; Pan vd., 2017). Tüm bunların yanında canlı vücudunda bazı yaşamsal aktiviteleri olan HA'nın gün geçtikçe önemi daha çok anlaşılmaktadır (Yatmaz ve Turhan, 2015).

Küresel hyaluronik asit pazar büyüklüğünün 2019'da 8,9 milyar ABD doları olduğu ve 2020 yıl sonunda 9,6 milyar ABD dolarına ulaşması beklenmektedir. Küresel hyaluronik asit pazarının 2020'den 2027'ye yıllık %8,0 oranında büyüyerek 2027'ye kadar 16,5 milyar ABD dolarına ulaşması beklenmektedir (http-1). Bu raporlar göz önüne alındığında ne kadar değerli bir ürün olduğu ve kullanım alanlarının genişliği nedeniyle ihtiyaç duyulan miktarın her geçen yıl artacağı açıkça görülmektedir.

Bu çalışmada, hyaluronik asit üretiminde kullanılacak farklı mikroorganizmaların araştırılması, fermentasyon ortamında tarımsal atıkların kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi ile hyaluronik asit üretim koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

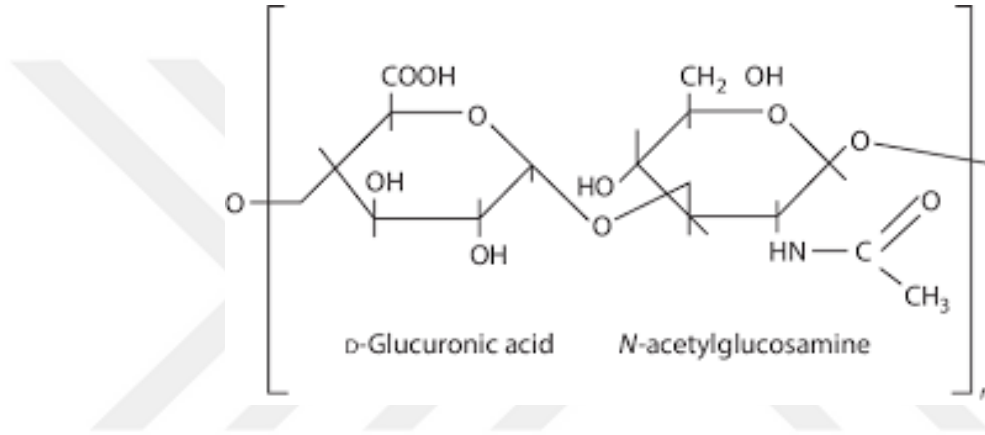
### **1.1. Hyaluronik Asit Nedir?**

Hyaluronik asit, N-asetil glukozamin ve glukuronik asidin dimerik birimlerinden oluşan, moleküler ağırlığı  $10^4$  - $10^9$  Da arasında değişiklik gösteren doğrusal bir polisakkarittir (Görsel 1.1.) (Amado vd. 2015). Her iki şeker de, beta konfigürasyonunda tüm hacimli gruplarının (hidroksiller, karboksilat kısım ve bitişik şeker üzerindeki anomerik karbon) sterik olarak uygun ekvator pozisyonlarında olmasına izin veren glukoz ile mekansal olarak ilişkilidir (Sirisha ve D'Souza, 2016).

Bozulmamış HA polisakkarit zincirleri, bir moleküler ağırlığa karşılık gelen 25.000 kadar disakkarit biriminden oluşabilmektedir. Moleküler ağırlığı  $10^7$  Da olan HA, genellikle fizyolojik koşullar altında bir sodyum tuzudur ve bu nedenle sodyum hiyalüronat olarak anılmaktadır (Li vd., 2020). HA'nın yapısı, 8 CH grubu ve karboksil ve hidroksil gruplarının hidrofilik alanlarından oluşan hidrofobik bir yapıya sahip amfifilik iki katlı bir sarmaldır (Souza ve Chaud, 2019).

HA'nın uzaysal yapısı, pH'a, konsantrasyona ve HA molar kütlesine güçlü bir şekilde bağlıdır (Souza ve Chaud, 2019; Gupta vd., 2019). Ticari olarak temin edilebilen HA ister horoz ibiğinden ister mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretilsin çok dağınık bir yapıdadır (Shah vd., 2013; Zhang vd., 2020; Necas vd., 2008).

Hyaluronik asit mikrobiyal fermentasyonla üretilen, ticari değeri olan bir polimer olmakla birlikte tüm vücut dokusunda yer alan ve bazı yaşamsal aktiviteleri gerçekleştiren bir asittir (Chong vd., 2004). HA, çoğu omurgalı bağ dokusunun hücre dışı matrisinde (ECM) yaygın olarak bulunmaktadır (Brown ve Jones, 2005). Göbek kordonu (4,1 mg/mL) ve sinovyal sıvıda yüksek HA konsantrasyonları bulunmaktadır (1.4-3.6 mg/mL). Gözlerde daha düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. (0.14-0.34 mg/mL). Ciltteki HA miktarı, vücuttaki toplam HA'nın en az %50 sini oluşturmaktadır (Laurent ve Fraser, 1992). Ortalama 70 kg'lık bir bireyin vücudunda yaklaşık 15 gr HA bulunmaktadır (Gall, 2010).



Görsel 1.1. Hyaluronik asidin kimyasal yapısı( Sirisha ve D'Souza, 2016).

## 1.2. Hyaluronik Asidin Tarihçesi

1934 yılında, Karl Meyer ve John Palmer sığır vitre salgınından izole edilen yeni bir polisakkarit tanımlayıp bu maddeyi "hyaluronik asit" olarak adlandırmışlardır (Liu vd., 2011). Mayer ve Palmer Yunanca'da camsı, cam gibi anlamlara gelen 'hyalos' ve üronik asit'in birleştirilmesiyle hyaluronik asit olarak isimlendirmişlerdir. Bu molekülün hem asit hem de tuz formunda bulunması nedeniyle 1986 yılında uluslararası isimlendirmede 'hyaluronan' olarak kullanılmaya başlamıştır (Necas vd., 2008).

1930'lu ve 1940'lı yıllarda HA, vitreus gövdesi, göbek bağı, horoz ibiği ve streptokok gibi birçok kaynaktan izole edilmiştir. HA'nın kimyasal yapısı esas olarak Karl Meyer ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. HA,  $\beta$ -1, 3 ve  $\beta$ -1,4'in glikozidik bağa alternatif olarak katıldığı D-glukuronik asit (GlcUA) ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) 'nin disakkarit tekrarlarından oluştuğunu bildirmişlerdir (Liu vd., 2011).

Endre Balazs HA'nın ticari olarak patent başvurusunu yapmasının ardından 1942 yılında yumurta beyazından üretimi yapılmaya başlanmıştır (Necas vd., 2008). HA'nın

fizikokimyasal karakterizasyonu 1950'li ve 1960'lı yıllarda yapıldıktan sonra 1980 itibari ile Streptococci C grubu mikroorganizmaların fermentasyonu ile ticari üretimi yapılmaya başlanmıştır (Liu vd., 2011).

HA' nın ilk tıbbi uzmanlık ürünü Pharmacia tarafından 1970'lerde ve 1980'lerde geliştirildiğinde ve oftalmik cerrahide kullanılması onayladığında dikkat çekmiştir. Daha sonra, alternatif şirketler de göz ameliyatı için HA ilaç markalarını piyasaya sürmüştür. O zamandan beri HA isminin kullanımı oldukça popüler hale gelmiştir. HA,  $\beta$ -1, 4 ve  $\beta$ -1, 3 glikozit bağları değiştirilerek D-glukuronik asit ve N-asetil glukozamin gruplarından oluşan, enerjisel olarak stabil bir oligosakkaritten oluşmaktadır. Bu disakkaritler, uzunluğu 10 nm'ye kadar değişen çeşitli uzunlukta ve 10 ila 1000 kDa arasında değişen bağıl moleküler kütleyle sahip bir sarmal zincir yapısı oluşturmak üzere bağlanmaktadır. Moleküler ağırlığında bu kadar geniş bir aralık ile HA, çeşitli tıbbi kullanımlar için kullanılabilir farklı elastik özellikler kazanmıştır (Schulz vd., 2007).

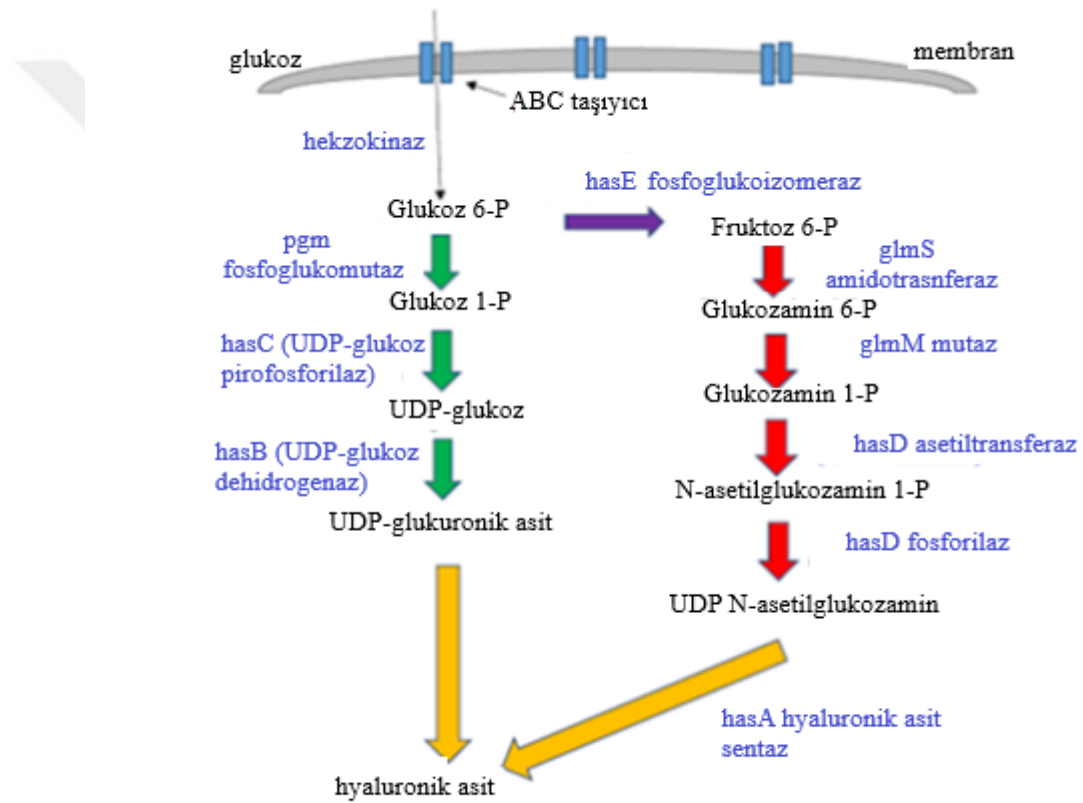
Hayvansal kaynaklı HA üretiminde ekstraksiyondaki sorunlar nedeniyle biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda bazı endişelerin ortaya çıkmasına neden olmuş ve bu nedenle mikrobiyal fermentasyonla HA üretimi alternatif olarak ortaya çıkmıştır.

Ticari olarak ilk HA üretimi *Streptococcus zooepidemicus* kullanılarak yapılmıştır (Liu vd., 2011). Ancak Streptokokkal HA içerisinde endotoksin bulunma olasılığının biyomedikal alanda kullanımını sınırlaması ile rekombinant HA üretimi gündeme gelmiştir (Chien ve Lee, 2007).

### **1.3. Hyaluronik Asidin Biosentezi**

HA biosenteziyle ilgili çalışmalar *S. zooepidemicus* üzerinde yoğunlaşmış durumdadır (Schiraldi vd., 2010; Liu vd., 2011; Sze vd., 2016). HA biosentezinde glukoz hekzokinaz ile fosforilize olmaktadır ve glukoz-6-fosfat meydana gelmektedir. Buradan itibaren HA sentezi iki yapıtaşının sentezlendiği 2 yolla meydana gelebilmektedir (Görsel 1.2.). Bunlardan biri glukuronik asit diğeri ise N-asetilglukozamindir. Birinci yolda  $\alpha$ -fosfoglukomutaz (pgm) glukoz-6-fosfatı, glukoz-1-fosfata dönüştürmektedir. Bu aşamadan sonra UDP-glukoz pirofosforilaz (hasC) ile UTP den bir fosfat grubunu glikoz-1-fosfata aktararak UDP-glukoza dönüştürmektedir. UDP-glukoz, UDP-glukoz dehidrojenaz (hasB) ile oksitlenerek HA'nın ilk öncül maddesi olan UDP-glukuronik asidi (UDPGlcUA) meydana getirmektedir.

İkinci yolda ise glukoz-6-fosfat, fosfogluoizomeraz (hasE) ile fruktoz-6-fosfata dönüştürülmektedir. Fruktoz-6-fosfata glutamin kalıntısından amidotransferaz (glmS) ile bir amid grubu eklenerek glukozamin-6-fosfat meydana gelmektedir. Mutaz (glmM) ile modifiye olarak glukozamin-1-fosfat oluşmaktadır. Oluşan bu ara ürün asetil transferaz (HasD) ile asetillenerek N-asetilglukozamin-1-fosfat 'a daha sonra pirofosforilaz (HasD) ile fosforilize olarak HA in ikinci öncüsü olan UDP-N-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc) oluşmaktadır. Bu iki öncü madde sentezlendikten sonra HA hyalüronan sentaz (hasA) ile sentezlenmektedir (Sze vd., 2016) (Görsel 1.2.).



**Görsel 1.2.** *S. zooepidemicus*'ta hyaluronik asit biyosentetik yolu. Glikoz ilk önce heksokinaz tarafından glikoz-6-Fosfat oluşturmak üzere dönüştürülür ve bu da daha sonra UDPglukuronik asit (pgm, hasC ve hasB) veya UDP-Nasetilglukozamin (hasE, glmS, glmM ve hasD) oluşturmak için iki farklı yoldan birine girer. Bu öncüler daha sonra hyaluronik asit oluşturmak için hyaluronik asit sentaz veya HAS (*S. zooepidemicus*'ta hasA tarafından kodlanmıştır) etkisiyle birbirine bağlanır (Sze vd., 2016).

HAS enzimleri hücre membranının iç yüzeyinde bulunmaktadırlar ve HA sentezlenme işlemi sırasında hücre membranında belirlemektedirler. HA'nın moleküler

boyutu büyük olduğundan, aynı anda hem sentezleme işlemi gerçekleştirilirken hem de HA'nın hücre dışına doğru çıkışını da gerçekleştirmektedir. Başlangıçta bu mekanizmaya dayanarak HA'nın dışarıya çıkmasını sağlayan eksport mekanizması veya transmembran kanalı ile sentezi gerçekleştiren enzimin ilişkili olabileceği, buna bağlı olarak da farklı iki prosesin farklı zamanlarda gerçekleşiyor olabileceği düşünülmekteydi. Ancak daha sonraları biyosentez ve eksport mekanizmasını hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda tek bir polipeptidin gerçekleştirdiği bulunmuştur. Bu duruma bağlı olarak tek bir polipeptidin iki temel glukoziltransferaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir (Schiraldi vd., 2010). Aynı zamanda da bunların HA'nın dışarıya salınımı için translokasyonu gerçekleştirebildiği de anlaşılmaktadır (Weigel vd.,1997; Spicer ve Tien 2004).

#### **1.4. Hyaluronik Asidin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları**

HA, hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olan büyük bir sülfatlanmamış glikozaminoglikandır (Vasvani vd., 2019). Kimyasal olarak, bağ dokusu proteinleri grubunun en basit ve sülfat içermeyen tek üyesidir. Diğer doğal ve sentetik polimerlere göre çok daha fazla su tutma kapasitesine sahiptir. Hyaluronik asit, dokuların hidrasyonu ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişinde, hücrelerin hareketinde ve farklılaşmasında yardımcı rol oynamaktadır (Tırnaksız ve Kaymak, 2008).

Hyaluronik asidin yarılanma ömrü kanda 2-5 dakika, deride ve eklemlerde 12 saat, kırıkta 1-3 hafta, gözdeki vitröz sıvıda ise 70 gündür. Molekülün parçalanmasında hyaluronidazlar, kondroitinazlar, heksozaminidazlar ve serbest oksijen radikalleri etkilidir (Weindl vd., 2004). Lokal metabolizma ile hyaluronik asidin yıkımının %20-30 arasında değişen miktarı deri ve eklemlerde, kalan kısmı ise lenfatik yolla sağlanmaktadır (Fraser vd.,1997).

İnsan vücudunda doğal olarak üretilen HA birisi glukuronik asit diğeri N-asetilglukozamin olarak adlandırılan iki basit şekerin tekrarlı sıralamasıyla oluşmaktadır. Bu bileşikler hem negatif yüklüdür hem de bir araya geldiklerinde çok uzun bir molekülün oluşmasına karşı koymaktadırlar. İnsanlarda üretimi ağırlıklı olarak mezenkimal hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Normal biyolojik koşullarda, HA, boşluk doldurma, hidrasyon, eklemlerin yağlanması ve hücrelerin içinden geçebileceği bir matrisin sağlanmasında işlev görmektedir. Doku hasarı sırasında polimer, iltihaplı hücre aktivasyonu, epitel hücre davranışının düzenlenmesi ve fibroblastlar gibi doku onarımının ve hastalık sürecinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Liang vd., 2016).

HA'nın boyutunun biyolojik etkisinde önemli olduğu bildirilmiştir. Moleküler ağırlığı 1000 kDa'dan büyük olan yüksek moleküler ağırlıklı HA'lar dolgu materyali olarak boşluk doldurucu molekül etkisi gösterebilir ve anti-apoptotik aktiviteye sahiptir. 200 kDa'dan küçük olan düşük moleküler ağırlıklı HA'lar güçlü bir proinflamatuvar etki, vücutta fizyolojik rol, hücre sinyalinin inflamasyona ve kayganlaştırmaya kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir (Huynh ve Priefer, 2020). Genel olarak bu kısa oligosakkaritlerin vücudun alarm sistemini harekete geçirip uyarıcı etkiye sebep olabildiği düşünülmektedir.

Farklı moleküler ağırlıklara sahip hyaluronik asidin, ciltteki etkisi birbirinden farklılık göstermektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı HA cildin yüzeyinde durmaktadır ve higroskopik olması sebebiyle oldukça fazla miktarda su ile etkileşime girebilmektedir. Oluşturduğu bu ince koruyucu tabaka cildin yumuşak, pürüzsüz ve nemli kalmasına yardımcı olmaktadır. Orta moleküler ağırlıklı HA su tutma özelliği ile iyi bir cilt bariyeri sağlamaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı HA ise deri altı katmanlara kadar ulaşabildiğinden daha iyi bir nemlendirme etkisi sağlamaktadır ve dokuların geçici olarak doldurulması ile küçük kırışıklıkların düzeltilmesini sağlamaktadır (Mazzucco, 2019).

İzole edilmiş hyaluronik asidin boyutu 104 - 107 kDa'a kadar ulaşabilmektedir (Lawrence ve Balazs 1970). Bu değişkenlik HA üretim kaynaklarına bağlı olmaktadır (Liu vd., 2011) ve tekrarlanan polimerlerin zincir uzunluğu 2000 - 50.000 dimer arasında olabilmektedir.

HA konsantrasyonunun ve moleküler ağırlığın artması viskoelastisite artışına neden olmaktadır. Viskoelastisite pH'a bağlıdır. D-glukuronik asit karboksil gruplarının pKa değeri yaklaşık 3.0'dır ve bir pH değişikliği, HA zincirlerinin iyonizasyonunu etkileyerek polimer moleküler etkileşimlerini ve reolojik özelliklerini değiştirmektedir (Brown ve Jones, 2005).

Dokular arası bariyer olan HA'nın hidrolizini katalizleyen hyaluronidaz, hyaluronik asit viskozitesini düşürerek dokulardan geçirgenliğini arttırmaktadır. Bu nedenle ilaçların dağılımını ve hızlı bir şekilde etki etmesini sağlamak için diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (Necas vd., 2008). HA'nın viskoelastisitesi, belirgin bir şekilde çözelti konsantrasyonuna ve moleküler kütleyle bağlıdır. HA'nın moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu arttıkça viskozitesi ve elastikiyeti artmaktadır (Laurent vd., 1996). HA

viskoelastisite yapısı hücre fonksiyonlarını etkileyebilmekte ve hyaluronan açısından zengin periküler bölge boyunca viral ve bakteriyel geçişin gecikmesine katkıda bulunabilmektedir. HA'nın viskoelastisitesi oftalmik cerrahide kullanılmasının esas nedenidir. HA solüsyonunun yüksek viskozitesi, oftalmolojik dokuların manipüle edilmesine ve cerrahi boşluğun korunmasına izin vermektedir (Schiraldi vd., 2003).

HA'nın antimikrobiyal aktivitesi tartışmalıdır ve varsa bu polimer etkisini değerlendirmek için çok az çalışma yapılmıştır. Pirnazar vd. (1999), yüksek moleküler kütleli HA'nın yara iyileşmesinde bakteriyel kontaminasyonu en aza indirmede faydalı olabileceğini öne sürmüştür. Bununla birlikte, bu yazarlar, 1 mg/mL yüksek moleküler kütleli HA'nın (1.300 KDa) bakterisidal etkiye sahip olmadığını, ancak bakteriyostatik etkinin inhibe edildiğini gözlemlemiştir. Ardizoni vd., (2011), farklı mikrobiyal türlerin ve bazen aynı türe ait farklı mikroorganizmaların HA'dan farklı şekilde etkilendiğini göstermiştir. HA'nın antiviral aktivitesi bu araştırmacı grubu tarafından da gözlemlenmiştir (Cermelli vd., 2011). Öte yandan, Cerbo vd. (2013), çeşitli laktik asit bakteri suşları ile test edildiğinde hiçbir antimikrobiyal aktivite gözlemlenmemiştir, ancak tam tersine, HA'nın yeni bir probiyotik oral formülde uygulanabileceğini düşündürerek, bakteriyel canlılığı arttırdığı görülmüştür. *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde de HA'nın bakteriyostatik etkisi gösterilmemiştir (Tang vd., 2002). Costagliola vd. (1996) yaptıkları bir çalışmada bakteriyel olarak hyaluronatın in vitro bir besin maddesi olarak kullanma yeteneğini incelemiştir ve %0.7 HA kullanarak 72 saatte *Staphylococcus* ve *Streptococcus* büyümesinde yaklaşık % 50 artış olduğunu gözlemlemişlerdir (Pan vd., 2020).

HA doku onarım kapasitesini arttıran ve UV radyasyonuna karşı cildin korunmasına katkıda bulunan serbest radikal temizleyici ajan olarak hareket eden antioksidan etki sergilemektedir (Guillaumie vd., 2010). HA'nın serbest radikal hasarlarını azaltma mekanizması, çapraz bağlı karboksilik gruplara sahip yapısına dayanmaktadır. Bu nedenle, bu karboksil grupları  $Cu_2 +$  ve  $Fe_2 +$  gibi metal iyonları ile etkileşime girerek bu moleküllerin metal şelatör görevi görmesine izin verebilmektedir (Campo vd., 2004; Pan vd., 2020).

Hyaluronik asit (HA), hücre dışı matrisin (ECM) daha küçük bir bölümünü oluşturmaktadır, ancak kaynağı ne olursa olsun yapısal koruma açısından önemli bir avantaja sahiptir ve bu nedenle alerjen değildir (Price vd., 2007).

HA'nın viskoelastik özelliği, ilaçları epidermiste daha uzun süre tutabilmektedir (Martin vd., 1999). Bununla birlikte, HA konsantrasyonu çok yüksekse veya HA'nın moleküler ağırlığı çok büyükse, hedef bileşikler formülasyonun geçirgenliğini sınırlamaktadır.

HA yüksek higroskopik özellikleri sayesinde viskoelastik jeller oluşturmaktadır ve bu nedenle cilt nemlenmesi amacıyla çok önemli bir moleküldür (Görsel 1.3.). Sulu ortamda HA kendi ağırlığının 1000 katına kadar ağırlığı su çekme kapasitesine sahip bir polimerdir. Hyaluronik asidin pKa'sı  $2,9 \pm 0,1$ 'dir ve oluşturduğu jelin pH değeri 2,5'e ulaşabilmektedir. Hyaluronik asit jelinin viskozitesi zincirin uzunluğuna, pH ve kimyasal değişimlere bağlı değişiklik göstermektedir (Price vd., 2007).



**Görsel 1.3.** Bir hyaluronik asit tabakasının ucunda jel oluşumu (Price vd., 2007).

Higroskopik ve biyouyumlu bir molekül olarak hyaluronik asit tıp, ilaç, beslenme ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı HA, transdermal uygulama sistemleri geliştirmek için uygundur, yüksek moleküler ağırlıklı HA ise formülasyonda yüksek viskoziteler sağlar ve ilaçların/nutrasötiklerin lokalizasyonunu ve sürekli salınımını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle topikal uygulama sistemleri geliştirmek için kullanılabilir (Zhu vd. 2020).

HA'nın kendine özgü özelliklerinden faydalanabilmek amacıyla HA içeren dört tip ticari ürün üretilmiştir:

- 1) Oftalmik operasyonlarda cerrahi yardım amacıyla kullanılan ajan ve doku koruyucu ajan,
- 2) Diz osteoartritinde ağrıyı azaltmak için kullanılan enjeksiyonluk preparatlar,

- 3) Ameliyat sonrası bariyer ve kozmetik preparatlarda doku büyümesi için enjeksiyonluk çözeltiler,
- 4) Jeller (Burdick ve Prestwich, 2011).

#### **1.4.1. Hyaluronik asidin kozmetikte kullanımı**

HA viskoelastisitesi ve biyoyumluğu nedeniyle kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Kozmetik formülasyonlarında ultraviyole ışınlar karşı deride korumaya yardımcı görev görmektedir. Hyaluronik asit derinin hem dermis hem epidermis tabakasında bulunmaktadır ancak epidermise nazaran dermis tabakasında fazla bulunmaktadır.

Kozmetikte kullanılan HA'nın molekül ağırlığı önemlidir. Farklı molekül ağırlıklı HA'ların etkisi de farklı olmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı HA deriyi nemlendirme özelliğine sahiptir ve deriden absorblanmamaktadır. 120-200 kDa gibi düşük molekül ağırlığındaki HA'nın ise hem deriden su kaybını engellediği hem de hasara uğramış derinin re-epitelizasyonunu da artırdığı gösterilmiştir (Trommer vd., 2003; Brown ve Jones, 2005).

#### **1.4.2. Hyaluronik asidin oftalmojide kullanımı**

Hyaluronik asit içeren ilk tıbbi ürün göz ameliyatlarında doku koruyucu olarak geliştirilmiştir ve 1983 yılında ilk oftalmolojik ilaç FDA tarafından onaylanmıştır (Kuo ve Prestwich, 2011). Hyaluronik asit gözdeki vitröz tabakada bulunan başlıca polisakkarittir (Nickerson vd., 2008). Gözyaşı, lakrimal doku ve kornea epitelini de kapsayacak şekilde gözün farklı yerlerinde bulunmaktadır. Göze kayganlık verirken aynı zamanda serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı koruyucu bir etki ve antiinflamatuvar özellik göstermektedir. Bu etkilerinden dolayı göz kuruluğunun önlenmesi amacıyla suni gözyaşı preparatlarında, kontakt lenslerde, oküler cerrahisinde, katarakt cerrahisinde ve kornea nakil cerrahisinde kullanılmaktadır (Karbownik ve Nowak, 2013).

#### **1.4.3. Hyaluronik asidin yara iyileşmesinde kullanımı**

Yara iyileşmesi birbirini takip eden süreçlerden oluşmaktadır. Bunlar; hemostazis, enflamasyon, proliferasyon ve maturasyon aşamalarıdır. Proteoglikanlar hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu, kollajen ve fibril organizasyonunu, kollajen sentezini ve degradasyon oranını kontrol etmeleri sebebiyle yara iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır (Price vd., 2007; Gence, 2008). Glikozaminoglikan ailesinin üyesi olan

hyaluronik asit hem erişkin hem de fetal yara matriksinde bulunmaktadır ve her ikisinde de 3. günde pik seviyesine ulaşmaktadır. Erişkinlerde 3. günden sonra miktarı azalmakta olup 7. günden sonra ölçülemeyecek seviyeye inmektedir. Erişkinlerde HA depolanmasını takiben depolanan hyaluronidaz enziminin 3. günden itibaren aktivitesini artırarak HA'nın sülfatlanmamış glikozaminlere parçalanması sağlamaktadır. Fetüste ise HA 3 hafta boyunca yüksek seviyede bulunmaktadır. Fetüste HA fetal serum, amniyotik sıvı ve fetal doku hücresinde bulunan bir glikoprotein olan HASA (hyaluronik asit stimüle eden aktivite) nedeniyle yüksek seviyede bulunmaktadır (Özgenel, 2004).

#### **1.4.4. Hyaluronik asidin dermatolojide kullanımı**

Dermatoloji, cilt hastalıklarını hafifletmeye ve kozmetik ürünlerini iyileştirmeye odaklanan bir tıp alanıdır (Greene vd., 2015). HA, dermatolojide geniş çapta araştırılmış ve uygulanmıştır. Dermal dolgu maddeleri, kırışıklık önleyici maddeler olarak ve doku yenilenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Hacimsel dolgu görevi gören HA, yüzeysel çöküntüleri tedavi edebilmekte ve böylece cilt kalitesini iyileştirebilmektedir (Gatta vd., 2019). Dermal dolgular, kırışıklıklar ve kıvrımlar için en yaygın ve faydalı tedavilerden biridir ve “yaşlanma belirtilerini” tersine çevirmek isteyen artan nüfusa hitap etmektedir (Kopera vd., 2015; Huynh ve Priefer,2020). Çapraz bağlı hyaluronandan oluşmuş hyaluronik asit dolgulu preparatlar, yüz kırışıklığı ve skarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Topikal jel olarak kullanılan hyaluronan preparasyonları kronik deri yaraları ve venöz bacak ülserlerinin iyileşme sürecinde etkilidir (Necas vd., 2008).

#### **1.4.5. Hyaluronik asidin farmosötik kullanımı**

Hyaluronik asit hücre proliferasyonu ve migrasyonunu etkileyerek hücre içi işlevlerde önemli rol oynamaktadır. Farmasötik açıdan biyolojik olarak parçalanabilen, non-toksik, biyobozunur, yüksek viskoelastik özellikte, biyoyumlu ve non-immunojen bir polimerdir. Bu özellikleri sayesinde kozmetik, tıbbi, ilaç ve eczacılık alanlarında yaygın olarak kullanılan ideal bir biyopolimerdir. Ayrıca hyaluronik asit çapraz bağlar ya da uygun fonksiyonel grupların (karboksilik asit ve hidroksil grupları) kullanılması ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sayesinde kimyasal modifikasyonlar göstermektedir (Brown ve Jones, 2005). Uygun fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri sayesinde osteoartrit tedavisinde, oküler ve plastik cerrahide ve doku mühendisliği gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda çeşitli ilaçların taşınmasında da hyaluronik asitten faydalanılmaktadır. Kanser tedavisinde reseptör

aracılı ilaç hedeflendirilmesinde, taşıyıcı olarak peptid, protein ya da nükleotidlerin taşınmasında ve görüntüleme ajanlarının taşınması sayesinde çeşitli hastalıklı hücrelerin tanınmasında kullanılmaktadır.

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta HA, yeni biyomalzemelerin oluşturulması için önemli bir yapı taşı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, HA'nın hücrelere bağlandığı ve yeni kemik oluşumunu etkili bir şekilde desteklediği gösterilmiştir. HA'nın geniş uygulama yelpazesi olduğu için, farklı biyotıp alanında başarılı bir biyomateryal olarak kullanılmaktadır (Sirisha ve D'Souza, 2016).

### **1.5. Hyaluronik Asit Pazar Büyüklüğü**

Küresel hyaluronik asit pazar büyüklüğü 2019'da 9,1 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiştir ve tahmini olarak 2027'ye kadar yıllık %8,1'lik bir büyüme olacağı tahmin edilmektedir (Görsel 1.4.). Yaşlanan nüfus ve teknolojik olarak gelişmiş ürünlerin piyasaya sürülmesi nedeniyle pazarın patlama yapması beklenmektedir. Tercihlerde minimal invaziv prosedürlere ve hızlı sonuçlara geçişin önümüzdeki yıllarda hyaluronik asit pazarını yönlendirmesi beklenmektedir (<http-1>).

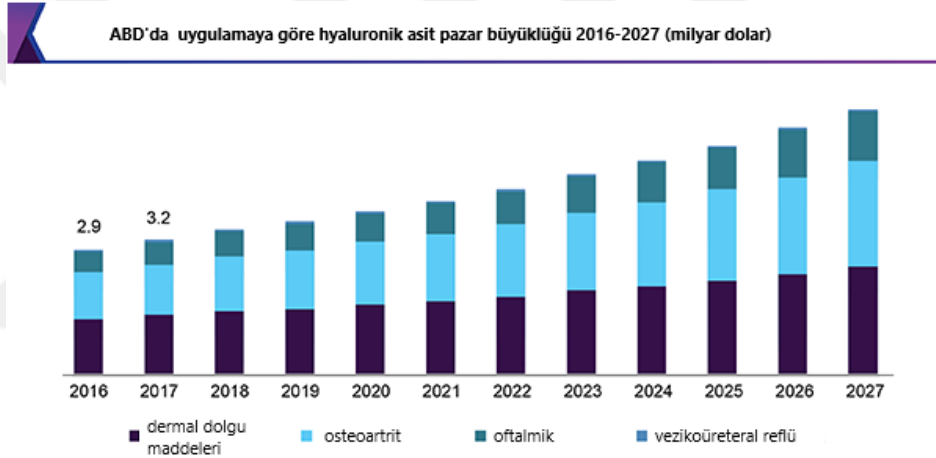
Artan estetik bilinç, yaşlanan nüfus, uygun maliyetli tedavilerin ve ürünlerin tanıtımı ve teknolojik gelişmeler, hyaluronik asit pazarının büyümesini sağlayan faktörlerden bazılarıdır. Plastik cerrah ve kozmetik kliniklerinin sayısındaki artış, yapılan estetik işlemlerin sayısının da artmasına katkı sağlamaktadır. Botoks ve hyaluronik asit enjekte edilebilirler dahil cerrahi olmayan kozmetik prosedürlerin giderek daha fazla benimsenmesi pazarı yönlendirmektedir. Yeni ürün geliştirmeleri ve birleşme ve devralmalar dahil olmak üzere kilit piyasa firmaları tarafından iş stratejilerinin artan şekilde benimsenmesinin, tahmin dönemi boyunca pazar büyümesini hızlandırması beklenmektedir.

Hyaluronik asit nem tutma, daha hızlı yara iyileşmesi, eklem ağrısından kurtulma, kuru gözleri ve rahatsızlığı önleme ve kemik gücünün korunması gibi yararlar sağlamaktadır. Doğal yaşlanma süreci, tütün içimi ve kirlilik, insan cildinde bulunan hyaluronik asit miktarını azaltabilir. Hyaluronik asit bazlı takviyelerin ve serumların doğru kullanımı bu düşüşü önleyebilmekte ve yetişkinlerde cildi iyileştirebilmektedir.

Osteoartrit segmenti, 2019'da yaklaşık %41'lik bir payla hyaluronik asit pazarına hakim olmuştur. Bu, geriatrik popülasyondaki artışa ve minimal invaziv prosedürler için artan tercihe bağlanabilmektedir.

Hyaluronik asit pazarında faaliyet gösteren bazı önemli firmalar arasında Allergan, Inc.; Galderma; Salix Pharmaceuticals; Lifecore Biomedical; Anika Therapeutics; Sanofi, Shiseido; Smith ve Nephew Plc; LG Yaşam Bilimleri; Maruha Nichiro, Inc.; Ferring İlaç; ve Contipro bulunmaktadır.

Hyaluronik asit pazarının büyümesini sağlayan temel faktörler arasında artan estetik bilinç, yaşlanan nüfus, uygun maliyetli tedavilerin ve ürünlerin piyasaya sürülmesi ve teknolojik gelişmeler bulunmaktadır (http-1).



Görsel 1.4. Hyaluronik asit pazar büyüklüğü (http-1).

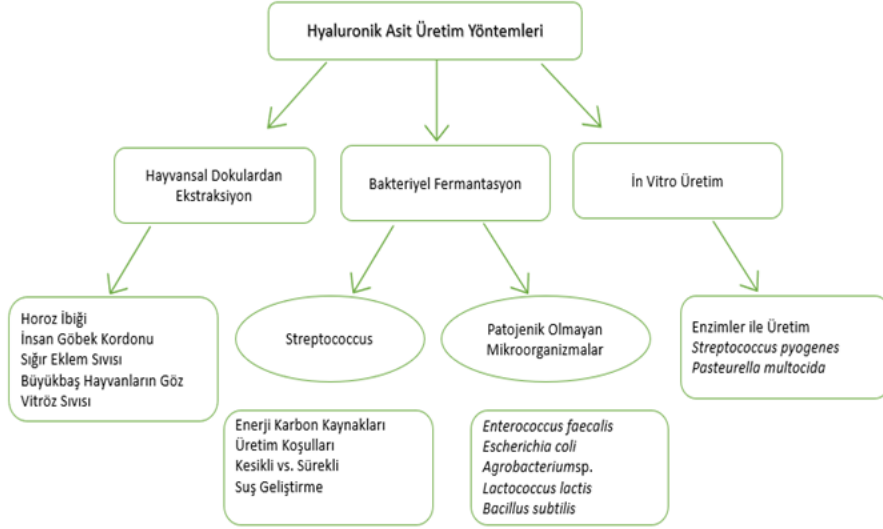
## 1.6. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri

Hayvan dokularından türetilen HA doğal olarak yüksek moleküler ağırlıklara sahiptir ve şimdiye kadar bildirilen en yüksek konsantrasyon, hayvan dokusunun horoz ibiğinde olmuştur (Fraser vd., 1997). Bakteriyel fermantasyon işlemlerinde kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma oranı, çözülmüş oksijen, biyoreaktör tipi) ve kültür ortamının içeriği diğer fermantasyon işlemlerinde olduğu gibi mikrobiyal HA üretimini de önemli ölçüde etkilemektedir (Kim vd., 1996).

HA üretiminde başlıca üç temel kaynak kullanılır (Görsel 1.5.). Bunlar;

- 1) Hayvan dokularından izole etmek,
- 2) Bakteriyel fermantasyon,

3) Kimyasal/enzimatik sentezdir (Burdick ve Prestwich, 2011).



**Görsel 1.5.** Hyaluronik asit üretim yöntemleri (Boeriu vd., 2013).

### 1.6.1. Hayvansal dokulardan ekstraksiyon

HA ilk defa, Karl Meyer ve John Palmer tarafından 1934 yılında sığır gözünden izole edilmiştir. Ancak kimyasal yapısının tamamen anlaşılabilmesi yıllar sürmüştür. İlk bulunduğu tarihten itibaren Karl Meyer tarafından 10 yıl boyunca eklem sıvısı, deri, göbek bağı ve horoz ibiği gibi birçok kaynaktan HA izolasyonu denenmiştir. Ardından HA' nın omurgalılarıdaki birçok dokuda esansiyel bileşen olmasından dolayı hemen hemen her dokudan izolasyonuna başlanmıştır. 1949 yılında Boas, horoz ibiğinden hyaluronik asit izolasyonunu tanımlamıştır (Boeriu vd., 2013).

Horoz ibiği, hayvan dokuları için rapor edilen en yüksek hyaluronan konsantrasyonlarını içermektedir. Hayvanlarda ve bakterilerde üretilen hyalüronan polimeri aynı olduğundan, konakçı bağışıklık savunması, farklı bir hücre dışı kapsülü olan diğer bakterilerin aksine patojenik bakterileri itmek için tetiklenmemektedir. Bakteriyel hyalüronanın immünojenik olmayan ve enflamatuar olmayan özellikleri ile şu anda memelilere de yarar sağlamaktadır, çünkü bakteriyel hyalüronan tıpta kullanılabilirlik için mükemmel bir kaynak oluşturmaktadır (Boeriu vd., 2013).

Hayvansal kaynaklardan elde edilen HA dokudaki diğer proteoglikanlarla kompleks halinde olduğundan ve saflaştırma işlemleri sırasında bozulmasına neden olan enzimlerden de korunması gerektiğinden, yapılan ekstraksiyon, saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri oldukça uzun süren ve iş gücü gerektiren uygulamalar haline

gelmektedir. Bu durum HA' nın elde edilmesini oldukça maliyetli hale getirmektedir. Bunlara bağılı olarak mikrobiyal üretime olan ilgi artmıştır ve hayvansal kaynaklardan elde edilen HA yerini daha az maliyetli olan mikrobiyal kaynaklı üretime bırakmıştır.

### **1.6.2. Bakteriyel fermentasyon**

Horoz ibiğinden pahalı yöntemlerle elde edilen hyaluronik asidin fermentasyonla üretilebileceği anlaşılınca, üretim yönteminin standardize edilmesi ve hedeflenen moleküler ağırlıkta, istenilen miktarda hyaluronik asidin sürekli üretilebilmesi amacıyla fermentasyon yöntemi ile hyaluronik asit üretimine başlanmıştır (Hasegawa vd.,1999). Endüstriyel olarak HA üretimine bakıldığında özellikle *S.equi* ve *S. zooepidemicus* gibi grup C streptokoklarından 1980'li yılların başından beri üretim gerçekleştirilmektedir (Deangelis, 1996). Fermentasyonla HA üretiminde ana üretici mikroorganizma olarak *Streptococcus sp.* kullanılmaktadır. Üretilen ürünün fermentasyon ortamından saflaştırılması sırasında proteinlerin kaynaklanan güçlükler dezavantaj olmaktadır (Liu vd., 2011). Mikrobiyal üretimde kültür koşullarının kontrol edilip optimum koşulların sağlanabilmesi, istenilen hacimlerde üretim gerçekleştirilebilmesi ve gerektiğinde genetik mühendisliğin de uygulanabilmesiyle istenilen verimde ürün üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Armstrong vd., 1997). Bu sayede birçok üretici fermentasyon koşullarında iyileştirmeye giderek veya mikroorganizmalarda genetik modifikasyonlar yaparak istenilen moleküler büyüklükteki HA üretimi gerçekleştirilmektedir.

Bakteriyel fermentasyon yoluyla HA üretimi son yirmi yılda istikrarlı bir şekilde gelişmiştir. Gelişimin erken safhasında, doğal olarak HA üreten A ve C grubu Streptokoklar fermentörlerde yetiştirilip HA saflaştırılmıştır. Bununla birlikte alternatif bakteriler aranmıştır. HA biyosentetik yolağını kodlayan genler belirlendikten sonra, bir dizi bakteri (*Bacillus*, *Agrobacterium*, *E. coli* ve *Lactococcus*) bu genleri eksprese etmek ve HA üretmek için genetik olarak modifiye edilmiştir. Sonraki çalışmalar kültür ortamının optimizasyonu ve yetiştirme koşullarına odaklanmıştır (DeAngelis vd., 1993; Sze vd., 2016).

#### **1.6.2.1. Üretime etki eden faktörler**

Bakteriyel fermentasyon işlemlerinde kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma oranı, çözünmüş oksijen, biyoreaktör tipi) ve kültür ortamının içeriği mikrobiyal HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir (Kim vd.,1996).

Kesikli, tekrarlı kesikli, beslemeli kesikli ve sürekli kültür gibi çeşitli fermantasyon tipleri HA üretiminde kullanılmaktadır (Blank 2005; Cooney vd., 1999). Bir kültür ortamında, fermantasyon sırasında başlangıçta kullanılan ortama yeni besin bileşenlerinin eklenmediği ve ortamdaki uzaklaştırma yapılmadığı kültürasyon işlemi olan kesikli fermantasyon işlemi en çok kullanılan HA üretim yöntemidir (Cooney vd., 1999; Armstrong vd., 1997).

Mikrobiyal fermantasyonda en önemli unsur mikroorganizmaların laboratuvarında üretilmesi için kullanılan ve içerisinde mikroorganizmaların en temel ihtiyaçlarını karşılayacak maddeleri barındıran kültür ortamıdır. Bu kültür ortamlarının en önemli bileşeni yeni hücre materyallerini üretebilmek adına kullanılmış oldukları karbon kaynağıdır. Karbon kaynağını takiben azot kaynakları ve çeşitli enzimlerin çalışabilmesi için metaller, tuzlar da oldukça büyük önem teşkil etmektedir. Ayrıca kullanılan mikroorganizmaların aerobik, anaerobik veya fakültatif anaerob olmalarına göre de çözünmüş oksijen konsantrasyonu üretilen ürünü etkilemektedir.

Mikrobiyal üretimde kültür koşullarının kontrol edilip optimum koşulların sağlanabilmesi, istenilen hacimlerde üretim gerçekleştirilebilmesi ve gerektiğinde genetik mühendisliğin de uygulanabilmesiyle verimli ürün üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Armstrong vd., 1997).

Kültür ortamlarında kullanılan karbon kaynaklarına bakıldığında genel olarak sükröz, maltoz gibi şeker kaynakları kullanılmaktadır. Bunlar için farklı konsantrasyonlarda denemeler yapılmıştır. Azot kaynağı için ise genel olarak maya ekstraktı, pepton veya kazein hidrolizatları tercih edilmektedir ve ortam magnezyum ve fosfat tuzlarını da içermektedir. Azot kaynağının streptokokların büyüme ortamı için oldukça önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir. Çünkü hücresel biyosentez işlemlerinde bu bileşikler azot kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra karbonun da büyük bir kısmını karşılayabilmektedir.

HA üretim prosesinde iyileştirmeye gidilirken besiyeri bileşenlerinin farklı konsantrasyonları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle endüstriyel mikrobiyoloji çalışmalarında, üretilmesi istenilen bir ürünün verimini artırmak için seçilen mikroorganizmaya göre çevresel ve besinsel faktörlerin optimizasyonu önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmacılar besinsel faktör olarak besiyerlerinde farklı

organik (pepton, malt ekstrat, maya ekstratı, üre vb.) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat, amonyum nitrat vb) kaynakları çalışmalarında test etmektedirler (Kunamneni vd., 2005; Erdal ve Taskin 2010; Taskin 2011).

### 1.6.3. İn vitro üretim

Bakteriyel ekspresyon sistemleri küçük ölçekli fermentörlerde HA üretebilirken, daha büyük sistemlerde HA üretimi, ortamın viskozitesini artırır, bu da zayıf karıştırma ve düşük oksijen kütle aktarım oranıyla sonuçlanır, bu nedenle genellikle 6-7 g/L'den daha fazla verim elde etmek zordur (Liu vd., 2011). Bakteriyel fermantasyonda üretilen HA'nın miktarı ve verimi kültür koşullarına oldukça bağımlı görünmektedir. Son olarak, HA'nın hayvan kaynaklarında olduğu gibi, bakteri hücresinin kendisi, bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilecek bir kontaminasyon kaynağı (nükleik asitler, HA bağlayıcı proteinler, toksinler, vb.) olarak işlev görebilir (Boeriu vd., 2013). Hayvansal veya bakteri kaynaklı mevcut seri üretim ile ilgili sınırlamalar nedeniyle, hücresiz üretim sistemi (in vitro) arzu edilen bir alternatif olarak görülmektedir.

Streptokokların metabolik mühendisliği, *S. pyogenes* ve *S. equi* dahil olmak üzere bir dizi ilgili streptokok için şu anda mevcut olan genomik sekans sayesinde son on yılda büyük ölçüde geliştirilmiştir (Yamada ve Kawasaki, 2005).

### 1.7. Hyaluronik Asit Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Ticari olarak üretilen HA, hayvanlardan (örneğin cilt, eklemler, gözün vitröz sıvısı, sinovyal sıvı, göbek kordonu, horoz ibiği vb.) izole edilmekte veya bakteri fermantasyonu yolu ile üretilmektedir (Brown ve Jones, 2005).

HA'nın endüstriyel üretiminde en sık kullanılan bakteriler, A ve C grubu streptokoklardır. Bu bakteriler, spesifik amino asitleri ve B vitaminlerini sentezleme yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle besleyici ortamlara ihtiyaç duymaktadırlar. Ek olarak, hücresel biyosentezleri için de büyük miktarda karbon sağlayan organik azot ile ilgili beslenme gereksinimi vardır (Armstrong vd., 1997).

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

Süt ürünlerinden, hyaluronan da dahil olmak üzere yararlı ekzopolisakkaritlerin yüksek üretkenliğine sahip *S. thermophilus* suşları, güvenli bir hyaluronan üreten organizma olarak belirlenmiştir (Boeriu vd., 2013; Izawa vd., 2008).

*Streptococcus spp.* gibi bazı patojenik suşlar çevrelerinde bir HA kapsülü oluştururlar. Bu HA kapsülü konakçının bağışıklık sisteminden kaçmalarına yardımcı olur (Rangaswamy 2008; Choi, 2014). *Streptococcus*, kapsüler bir ekzopolisakkarit olarak HA üretir. Prokaryotik polimer ökaryotlarla özdeş olduğu için, bu mikroorganizmalardaki sentez mekanizması muhtemelen konakçılarından yatay transferle asimile edilmiştir ve konakçıların bağışıklık sistemine karşı savunma ile ilgilidir (Boeriu vd., 2013).

Bilinen bakteriler dışında farklı bakteriler ile de hyaluronik asit üretimine dair çalışmalar devam etmektedir. Örneğin, Choi vd., (2014) *Lactobacillus plantarum*'un hyaluronik asit üretebildiğini bildirmişlerdir.

### **1.7.1. Streptococcus'ların genel özellikleri**

Streptokoklar gram pozitif, katalaz negatif, yuvarlak veya oval yapılı, 2 µm' den daha küçük, hareketsiz, sporsuz, sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde zincir oluşturmuş gibi peş peşe dizilen, fakültatif anaerop, glikozu fermente ederek laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. Özellikle A grubu streptokoklarda bulunan hyaluronik asitten oluşan kapsül, mikroorganizma organizmadan yeni ayrıldığında ve zengin besiyerlerinde bulunduğu anda açığa çıkmaktadır. Üretim sırasında kapsül görülmez ve besiyeri içerisinde hyaluronik asit maddesi dağılmış olarak bulunmaktadır (King 1992).

Streptokok cinsinden bakteriler doğada oldukça yaygın olup insanın normal florasında bulunabildikleri gibi suda, havada, tozlarda, sütte ve süt ürünlerinde, sebzelerde, insan ve hayvanların solunum ve sindirim yollarında bulunmaktadır. Ayrıca patojen olanları, özellikle A ve B grubundakiler üst solunum yollarının, D grubundakiler ise gastrointestinal sistemin normal florasında bulunmaktadır (Kunduracılar 1991).

İlk olarak 1874'de Bilroth yılanlık ve yara infeksiyonlarında zincir yapan koklar görmüş ve bu bakteriye Streptokok adını vermiştir. Daha sonra 1879'da Pasteur lohusalık humması olan bir hastanın kanından, 1881'de Oqston cera hattan streptokokları üretmiştir. 1881'de Robert Koch bunların her zaman yılanlık lezyonlarında

bulunabileceğini göstermiş ve 1882–1883 yılları arasında Fechleisen yüzdeki yılanık lezyonlarından yaptığı kültürle mikrop üretmek bunun etken olduğunu göstermiş ve saf kültür halinde üretmiştir. 1902’de P.H. Hiss bu bakterilerin bazı şekerleri fermente etme özelliklerini ayırımlarında kullanmıştır. 1906’da Andrews ve Harder streptokokların sınıflandırılmasında şekerlerin fermentasyonunu esas almışlardır. 1903’de Schotmüller bakterilerin kanlı besiyerlerinde oluşturdukları hemoliz rengine göre, bunları daha düzenli bir halde sınıflandırmıştır. 1919’da Brown hemoliz yapanları Alfa ve Beta, hemoliz yapmayanları ise Gamma adını verdiği gruplarda toplamıştır. 1928’de Lancefield immunolojik reaksiyonları bunların sınıflandırılmasında esas alınmıştır. 1934’de Griffith türlerin tanımı için aglütinasyon metodunu ileri sürmüştür. 1933’de Lancefield presipitasyon tekniğini kullanarak streptokokları gruplandırmıştır (Bilgehan, 1990).

### **1.7.2. Staphylococcus’ların genel özellikleri**

Staphylococcus’lar gram pozitif, 0.5-1.5 µm çapında, bireysel kokların üzüm salkımına benzer kümeler meydana getirmeleriyle karakterize olan, sporsuz, genellikle kapsülsüz, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Optimum üreme sıcaklıkları 30-37°C’dir (Duman, 2007).

Stafilokokların üzüm salkımına benzeyen görünüşlerine daha çok katı kültürlerden hazırlanan preparatlarda rastlanmaktadır. Katı besiyerinde stafilokoklar 24-48 saat içinde bol miktarda üremekte ve genellikle 1-2 mm çapında yuvarlak, konveks ve parlak koloniler oluşturmaktadır. Kolonilerde pigment ve hemoliz görülebilmektedir. Kolonilerin rengi beyaz ve limon sarısı arasında değişiklik göstermektedir (Arda, 2016). Stafilokoklar çeşitli enzimlere sahiptirler. Bunlardan katalaz enzimi tüm stafilokoklarda vardır. Koagulaz enzimi bir patojenite kriteri olarak bilinir ve Stafilokok türleri koagulaz pozitif ve negatif olarak ikiye ayrılabilir. Koagulaz enzimi fibrinojeni fibrine çevirerek plazmayı koagule etmektedir. Oluşan fibrin ağı bakteriyi fagositozdan korumaktadır. Hyaluronidaz enzimi patojen stafilokokların yaklaşık %90’ında vardır ve bağ dokudaki hyaluronik asidi parçalayarak bakterinin doku içinde yayılmasını sağlamaktadır. Fibrinolizin enzimi patojen Stafilokokların fibrin pıhtılarını eritmesini sağlamaktadır. Penisilinaz enzimleri penisilinin beta laktam halkasını parçalayarak penisiline dirençliliği sağlamaktadır (Arda, 2016). Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak buldukları gibi deri ve mukozalarda normal floranın bir parçasıdır.

Stafilokoklar besiyerlerinde kolayca üremektedirler. Katı besi yeri olarak genellikle koyun kanlı agar tercih edilmektedir. Stafilokoklar genellikle 2-4 mm çapında yuvarlak, konveks ve parlak koloniler oluştururlar. Patojen olan stafilokok suşlarında pigment ve hemoliz görülebilmektedir. Patojenik stafilokok suşlarının ayırımında spesifik besiyeri olarak DNase testi için DNase agardan yararlanılır. Stafilokoklar genel sıvı besi yerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda orta dereceden koyuya kadar değişen bir bulanıklık oluşturmaktadır. Sıvı besiyerinde üreyen stafilokoklar pigment oluşturmazlar (Arda, 2016).

### 1.7.3. Enterococcus'ların genel özellikleri

Enterokoklar hemen her zaman, her yerde bulunabilen mikroorganizmalardır. Süt ürünlerinde ve diğer gıdalarda da yüksek oranlarda bulunabilen bu bakterilerin, bakteriyosin üretimi, probiyotik karakteri, süt endüstrisinde kullanılabilirlikleri gibi önemli biyoteknolojik özellikleri olduğu halde, onların gıda kaynaklı patojenler olarak görülüp görülmeyeceği üzerine fikir birliği yoktur. Ancak son yayınlar *E. faecalis* 'in ve diğer laktik asit bakterilerinden bazı türlerinin klinik enfeksiyonlara, özellikle de endokartitis oluşumuna katıldıkları belirtilmektedir.

Enterokoklar gram pozitif, birkaç istisna dışında hareketsiz, aerobik veya fakültatif anaerob, katalaz negatif (oksijen varlığında gelişen ve pseudokatalaz üreten bazı türler hariç), oval kok formunda, genellikle diplokok veya kısa zincir görünümündedirler. Gram negatif bakterilere kıyasla, beslenme gereksinimleri daha seçicidirler. Geliştirildikleri besiyerinde daha fazla üreme faktörüne gereksinim duymaları açısından da diğer pek çok gram pozitif bakteriden ayrılırlar. Örneğin, gelişebilmeleri için B vitaminleri ve bazı temel aminoasitler açısından pek çok gram pozitif bakteriden çok daha fazla oranda besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Belirli türlerin üreme faktörü olarak bazı spesifik aminoasitlere gereksinim duymalarından dolayı bu spesifik aminoasitlerin nicel olarak belirlenmesinde test organizması olarak kullanılmaktadırlar.

Bunların yanı sıra, geniş bir pH aralığında ve pek çok patojen bakterinin gelişemediği alkali pH 'da (pH 9,6) gelişebilen enterokoklar düşük O/R potansiyelindeki (Eh) ortamlarda da çok iyi gelişmektedirler. Sodyum azid, safra tuzu ve sodyum klorüre dayanıklıdırlar. Enterococcus cinsine ait tüm türler %40 safra tuzu ve %3 NaCl içeren besiyerlerinde gelişebilirken, *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri tuza daha dirençli olup %6.5 tuz konsantrasyonunda gelişebilmektedirler. Termodurik bakterilerdir, süte

uygulanan pastörizasyon işlemi ile elimine edilemezler. Donma ve kurutmaya karşı *Escherichia coli* 'ye kıyasla daha dayanıklıdırlar. Bütün türleri eskülini hidroliz eder ve 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgerler. *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* türleri sarı pigment oluştururken *E. avium* ve *E. malodoratus* türleri de H<sub>2</sub>S oluştururlar. *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* türleri ise menakuinon üretirler. Diğer yandan enterokoklar birçok karbonhidratı fermentatif olarak kullanırlar. *E. faecalis* ve *E. faecium* karbonhidratlardan fermentasyon yoluyla başlıca ürün olarak laktik asit ürettiklerinden, çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılabilirler (Akçelik vd., 2000).

### **1.8. Hyaluronik Asit Üretiminde Atıkların Kullanılması**

Yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyacın artması, çevre sorunlarının çözümü, tarımsal üretimde istihdamın artması gibi birçok etken tarımsal atıkların değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Dünya nüfusunun hızla artması ve tarımı yapılan alanların ise aynı kalması sonucu atıklarının değerlendirilmesi sınırlı kaynakların kullanımını açısından da önem taşımaktadır. Tarımsal atıkların değerlendirilmesi çevre sorunlarını azaltıp, hammadde rezervlerini koruyacak ve ekonomik açıdan kalkınmaya yardım sağlayacaktır (Çolakoğlu, 2018). Bunların dışında, tarımsal kaynaklar ucuzdur ve fermantasyon süreçleri için alternatif ortamları sağlamaktadırlar, aynı zamanda karbon ve enerji kaynakları olarak kültür ortamlarına eklenebilmektedirler (Thomsen, 2005).

Araştırmacılar, hem bakterinin besinsel ihtiyacını karşılamak hem de HA'nın üretim maliyetini azaltmak için yapılan farklı çalışmalarda soya peptonu (Benedini, 2012), peynir altı suyu (Amado vd., 2015), palmiye şekeri (*Borassus flabellife*) (Ghodke vd., 2018), koyun yünü peptonu ve melas (Arslan 2018), hidrolizat soya proteini konsantresi (HSPC), peynir altı suyu proteini konsantresi (WPC) ve kaju elma suyu (CAJ) ve mısır likörü (CSL) (Aline vd., 2010) gibi birçok atık kullanmışlardır. Bu sayede HA üretim maliyetinin yaklaşık olarak %30 oranında azaltılabileceğini bildirmektedirler (Pires vd., 2010; Vázquez vd., 2010; Liu vd., 2011; Oliveira vd., 2013).

### **1.9. Optimizasyon**

Optimizasyon; bir gerçel fonksiyonu minimize ya da maksimize etmek amacı ile gerçek ya da tam sayı değerlerini tanımlı bir aralıkta seçip fonksiyona yerleştirerek sistematik olarak bir problemi incelemek ya da çözmek işlemlerini ifade etmektedir.

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe (yanıt) olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genellikle hedef fonksiyonu adı verilen önceden tanımlanmış kriterleri maksimize veya minimize etmek için (örneğin; ürün kalitesi veya kâr) karar (bağımsız) değişkenleri adı verilen belirlenen koşulların değiştirilmesini içermektedir (Banga vd., 2003, Berikten D., 2013).

Plackett Burman tasarımları, mümkün olduğunca az deneysel çalışma kullanarak aktif faktörleri tanımlamak için etkili bir tarama yöntemi oluşturmaktadır. Plackett-Burman deneysel tasarımı, sistem hakkında tam bilgi genellikle mevcut olmadığında, deney aşamasının başlarındaki en önemli faktörleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Plackett-Burman tasarımlarında, ana etkilerin iki faktörlü etkileşimlerle karmaşık bir karıştırıcı ilişkisi vardır. Bu nedenle, bu tasarımlar iki yönlü etkileşimlerin ihmal edilebilir olduğu varsayılabilir olduğunda ana etkileri incelemek için kullanılmalıdır (Kennedy, 1999).

Plackett-Burman tasarımları, yalnızca ana etkiler ile ilgilendiğinde çok verimli tarama tasarımlarıdır. Deneyleri taramak için Plackett-Burman (PB) tasarımları kullanılır, çünkü bir PB tasarımında ana etkiler genel olarak iki faktörlü etkileşimlerle karıştırılmaktadır (Sun vd., 2020). Deney tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir. Yapılan doğrulama deneyleri kabul edilebilir güven aralıkları ile sistemin kendi içindeki tutarlılığını ve güvenilirliğini de test etmektedir (Aytar vd., 2013). Plackett Burman deney tasarımı ile elde edilen sonucun optimizasyonu için kullanılan yöntemlerin başında cevap yüzey yöntemi gelmektedir.

Cevap yüzey yönteminin amacı, kimyasal reaksiyonların istenilen düzeyde optimize edilebilmesidir. Denemelerin tasarlanması, elde edilen veriler kullanılarak yanıtlar doğrultusunda faktörlerin etkisinin belirlenmesi ve bu etkilerin matematiksel modeller ile ifade edilmesi ve faktörlerin optimizasyonu aşamalarını içermektedir.

Cevap yüzey yöntemi istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin birleşimi ile birçok değişkenden etkilenen bir cevap yoluyla problemlerin analizi ve modellenmesi yöntemidir. Amaç bu cevabı optimize etmektir. Cevap yüzey yöntemi temelde

tasarlanmış deneylerle elde edilmiş verilere uydurulan polinomlar yardımıyla öngörü (tasarım) yapabilmeyi sağlamaktadır (Montgomery, 2001).

Çoğu cevap yüzey yöntemi probleminde cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu sebepten dolayı, cevap yüzey yönteminde ilk basamak, y ve bağımsız değişkenler arasındaki gerçek fonksiyonel ilişki için uygun yaklaşımı bulmaktır. Eğer cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu ile iyi modelleniyorsa, yaklaşım fonksiyonu birinci derecedir;

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon$$

Optimum noktalar; durağan noktaların yerleşimi için genel bir matematiksel çözüm ile elde edilebilir. Matris gösteriminde ikinci dereceden model yazılarak,

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır, örneğin ikinci derece model;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{1i}x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{2i}x_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij}x_ix_j + \varepsilon$$

## 2. MATERYAL VE METHOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada yoğurt ve peynirden izole edilen *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinsi mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bunların yanında Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus mutans* ve *Staphylococcus warnei* kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Besiyerleri

##### 2.1.2.1. Fermentasyon besiyeri

Glikoz	80 gr
Maya özütü	5 gr
Kazein pepton	17 gr
Glutamik asit	0,6 gr
MgSO <sub>4</sub>	0,7 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 gr
NaCl	5 gr

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Song vd., 2009).

##### 2.1.2.2. M17 agar

M17 Agar (Merck, 115108)	55 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

##### 2.1.2.3. M17 broth

M17 broth (Merck VM118029 029)	42gr
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

#### **2.1.2.4. BHI (brain heart infusion) agar**

BHI Agar (Sigma-Aldrich, 70138)	52 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

#### **2.1.2.5. BHI (brain heart infusion) broth**

BHI Broth (Sigma-Aldrich, 70138)	52 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

### **2.1.3. Kullanılan çözelti ve kimyasallar**

#### **2.1.3.1. %20'lik gliserol**

Gliserol	20 ml
Distile su	80 ml

Gliserol distile su içinde çözüldükten sonra çözelti otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

#### **2.1.3.2. 0.025 M sodyum tetraborat çözeltisi**

Sodyum tetraborat	0,0046 gr
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 ml

Sodyum tetraborat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile balon jöje içerisinde karıştırıldıktan sonra -4 °C'de saklanmıştır (Bitter ve Muir, 1962).

#### **2.1.3.3. Karbazol çözeltisi**

Karbazol	0,125 gr
Metanol	100 ml

Karbazol saf metanol içinde çözüldükten sonra -4 °C'de saklanmıştır (Bitter ve Muir, 1962).

#### **2.1.3.4. %0.1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi**

SDS	1 gr
Distile su	1000 ml

SDS distile su içerisinde çözüldürülmüştür.

#### **2.1.3.5. Peptonlu su**

Pepton	10 gr
Distile su	100 ml

Pepton distile su içerisinde çözündürüldükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

#### **2.1.3.6. 0.2 M asetat tamponu**

Sodyum asetat (0.2M)	16.406 gr
Asetik asit (0.2M)	12.01 ml
Sodyum klorit (0.15M)	8.76 gr
Distile su	450 ml

Sodyum asetat, asetik asit ve sodyum klorit balon jöje içerisinde distile su ile çözündürüldükten sonra -4 °C'de saklanmıştır (Song vd., 2009).

#### **2.1.3.7. PH ayarlama amacıyla kullanılan çözeltiler**

1N NaOH çözeltisi, 1N HCl çözeltisi

#### **2.1.3.8. Sodyum klorit çözeltisi**

Sodyum klorit	1,357 gr
Distile su	100 ml

Sodyum klorit, distile su içerisinde çözündürüldükten sonra kullanılmıştır (Reddy ve Karunakaran, 2013).

#### **2.1.3.9. Fosfat tamponu**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	25,198 gr
---	-----------

500 ml saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 37°C'de pH 5.35'e ayarlanıp kullanılmıştır (Hoffmann vd., 2014).

#### **2.1.3.10. Enzim dilüenti**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,239 gr
NaCl	0,45 gr
Bovin albümin	0,1 gr

100 ml saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 37°C'de pH 7' ye ayarlanıp kullanılmıştır (Hoffmann vd., 2014).

#### **2.1.3.11. Asetik albumin çözeltisi**

Sodyum asetat	0,196 gr
Asetik asit	0,473 ml

Bovin albümin 0,1 gr

100 ml saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 25°C’de pH 3.75’ e ayarlanıp kullanılmıştır (Hoffmann vd., 2014).

#### **2.1.3.12. DNS (Dinitro salisilik asit) çözeltisi**

2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoik asit 10,6 gr

NaOH 19,8 gr

Rochella tuzu 306 gr

Fenol 7,6 ml (8,132 gr)

Sodyummetabisülfid 8,3 gr

Ultra saf su 1416 ml

2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoik asit, NaOH ve Rochella tuzu su ile çözündürülüp içerisine sıcak suda 2-3 sn bekletilerek çözündürülen fenol eklenmiştir. En son sodyummetabisülfid eklenip manyetik karıştırıcıda iyice çözündürülmüştür.

#### **2.1.3.13. İz mineral çözeltisi**

EDTA 0,5 gr

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 3 gr

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5 gr

NaCl 1 gr

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 gr

1000 ml ultra saf su içerisinde çözündürülüp kullanılmıştır.

#### **2.1.3.14. %3’lük hidrojen peroksit**

%35’lik hidrojen peroksit 8,57 ml

Distile su 91,43 ml

Hidrojen peroksit distile su içerisinde çözündürülüp kullanılmıştır.

#### **2.1.3.15. Kullanılan boyalar**

1) Kristal viyole

2) Lugol

3) Safranin

4) Metilen mavisi

## **2.2. Method**

### **2.2.1. Yoğurt ve peynirden mikroorganizmaların izolasyonu**

Bu çalışmada kullanılan *Streptococcus* ve *Staphylococcus* izolasyonunda kaynak olarak evde mayalanmış doğal yoğurt ve hazır olarak satın alınan yoğurt, yöntem olarak ise tüp dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Örnekler yoğurttan rastgele olarak alınmıştır. İzolatlar M17 agarda 37°C'lik %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 48 saat inkübasyona bırakılarak petrieler incelenmiş ve saflaştırma işlemine geçilmiştir.

Marketten satın alınan peynirden tartılan 10 gr örnek %10' luk peptonlu su içerisine konulup homojen hale getirilmiştir. M17 agara yayma plak yöntemi ile ekim yapıp 37°C'lik %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen mikroorganizmalar gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Saflaştırılan tüm izolatlar %20'lik gliserol içeren steril ependorf tüplerine aktararak -84°C'de saklanmıştır (Tamer vd., 1989).

### **2.2.2. Mikroorganizmaların tanınması**

#### **2.2.2.1. Gram boyama**

M17 besiyerine ekimi yapılan bakteriler %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra hazırlanan ve tespit edilen preparatlar üzerine kristal viyole ve lugol uygulandıktan sonra lamalar %96'lık alkolle yıkanmıştır. Daha sonra safranin uygulanmıştır. Boya yıkandıktan sonra preparat kurutulmuş ve immersiyon yağı ile mikroskopta incelenmiştir.

#### **2.2.2.2. Katalaz testi**

M17 besiyerinde inkübe edilen izolatlar steril kürdan yardımı ile lam üzerine yayılmış ve üzerine birkaç damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak gaz kabarcığı oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı oluşturan izolatlar katalaz pozitif, oluşturmayan izolatlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akçelik vd., 2000).

#### **2.2.2.3. Biyokimyasal ve moleküler tanılama**

İzole edilen 45 mikroorganizmadan gram boyama ve mikroskobik inceleme sonrasında gram pozitif kok olarak değerlendirilerek seçilen izolatların biyokimyasal tanınması için Vitek 2 (Biomerieux) kullanılmıştır. Saf izolatların 3 ml tuzlu su (%0,45 su, %0,5 NaCl, pH 4,5-7,0) içinde bulanıklık ayarı Densi Chek TM ile 0,50-0,63 McFarland aralığında olacak şekilde yapılmıştır. Gram pozitif karta (Biomerieux)

üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlanan kültürden aktarılmıştır. Yaklaşık sekiz saatlik inkübasyonun ardından her testin bulanıklığı ya da metabolizma ürünlerinin rengi ölçülerek sonuç “+”, “-”, “(-)” veya “(+)” olarak verilmektedir. Parantez içindeki sonuçlar zayıf reaksiyonları göstermektedir. Sonuçlar mevcut standart değerlerle karşılaştırılarak olası bakteri adı yüzde benzerlik oranıyla belirlenmektedir (Pincus, 2006).

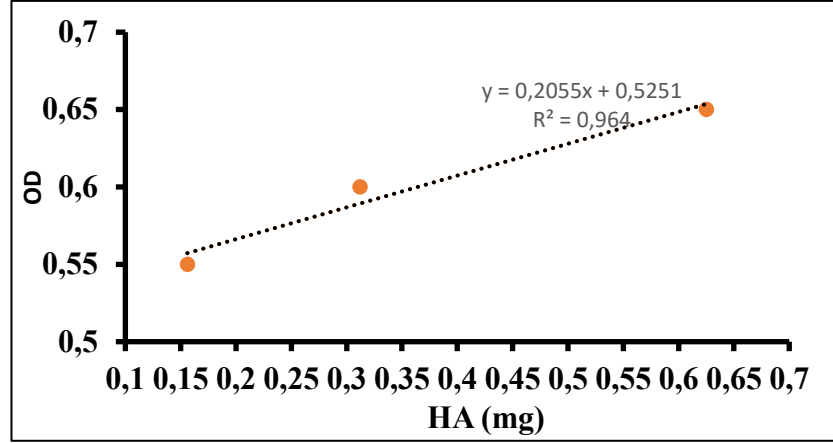
Çalışmada esas olarak kullanılan yedi bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E.gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) dizi analizleme yöntemi ile tanımlanmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen 16S rRNA gen dizileri BioEdit programı kullanılarak düzenlenmiştir. 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerleri ile okunan diziler birleştirilmiştir ve National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanınması yüzde benzerlik oranıyla belirlenmiştir.

#### **2.2.2.4. Sıcaklık tolerans testi**

*Streptococcus thermophilus* olarak tanımlanan bakterilere sıcaklık testi uygulanmıştır. Buna göre steril deney tüplerine 3'er ml M17 broth eklenip içerisine 1 öze dolusu bakteri inoküle edilmiştir. Deney tüpleri 55°C, 50°C ve 45°C 'de inkübe edilmiş ve tüplerdeki bulanıklık oluşumu gözlenmiştir.

#### **2.2.3. Hyaluronik asit standardının hazırlanması**

0,002 gr tartılan hyaluronik asit ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 ml distile su eklenmiştir. Vortekslendikten sonra ½ oranında bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan sırası ile 50 µl alınarak Elisa petrisine aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl sodyum tetraborat çözeltisi eklenip, 100°C de 10 dk ısıtılıp oda sıcaklığında 15 dk soğutulmuştur. Her kuyucuğa 50 µl karbazol çözeltisi eklenip 100°C'de 10 dk ısıtıldıktan sonra Elisa okuyucuda 550 nm'de okuma yapılmıştır (Cesaretti vd., 2003). Elde edilen okuma değerleri ile standart grafik hazırlanmıştır (Görsel 2.1.).



Görsel 2.1. Hyaluronik asit ile hazırlanan standart eğri

#### 2.2.4. Bakterilerin hyaluronik asit üretimi yönünden taranması

İçerisinde bakteri bulunan hyaluronik asit besiyerinin %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C’de 24 saatlik inkübasyonunun sonra besiyeri %0.1’lik sodyum dodesil sülfat (SDS) ile 1:1 oranında muamele edilmiştir. 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj ile hücrelerden ayrılan üstteki faz alınmıştır. Elde edilen üst faz 1:3 oranında saf etil alkol ile muamele edilerek 6000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir (Aytar vd., 2013). Çökelek 200 ml etanol ile muamele edilip santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelek %70’lik etanol ile 3 defa yıkanmış ve üzerine 2 ml asetat çözeltisi eklenmiştir. Tamamen çözününceye kadar 37°C’lik çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir (Song vd., 2009).

Çökelekten 1 ml alınarak ependorf tüpüne aktarılıp ve ½ oranında bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan sırası ile 50 µl alınarak Elisa petrisine aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl sodyum tetraborat çözeltisi eklenip, 100°C’de 10 dk ısıtılıp oda sıcaklığında 15 dk soğutulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa 50 µl karbazol çözeltisi eklenip 100°C’de 10 dk ısıtıldıktan sonra Elisa okuyucuda 550 nm’de okuma yapılmıştır (Cesaretti vd., 2003).

#### 2.2.5. Mikroorganizmalar ile hyaluronik asit üretiminin yapılması

Fermantasyon ortamına inoküle edilen mikroorganizmalar, hyaluronik asidi fermantasyon ortamında üretmeleri amacıyla 37°C’lik çalkamalı inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

%5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C’de 24 saatlik inkübasyonundan sonra inkübatörden alınan besiyeri %0.1’lik SDS ile 1:1 oranında muamele edilmiştir. 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj ile hücrelerden ayrılan üstteki faz alınmıştır. Elde edilen üst faz 1:1 oranında saf

etil alkol ile muamele edilerek 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir (Aytar vd., 2013). Santrifüj işleminden sonra elde edilen çökelek sodyum klorit çözeltisi ile tamamen çözündürüldükten sonra elde edilen miktarın %0.1'i olacak şekilde trikloroasetik asit ilave edilmiştir. Daha sonra charcoal ile muamele edilip 1 saat bekletilmiş ve 7000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Bu şekilde kısmi saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

Kısmi saflaştırılmış HA çözeltisinden ½ oranında olacak şekilde bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan sırası ile 50 µl alınarak Elisa petrisine aktarılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl sodyum tetraborat çözeltisi eklenip, 100 °C'de 10 dk ısıtılıp oda sıcaklığında 15 dk soğutulmuştur. Her kuyucuğa 50 µl karbazol çözeltisi eklenip 100°C'de 10 dk ısıtıldıktan sonra spektrofotometrede 550 nm'de okuma yapılmıştır (Cesaretti vd., 2003).

İnkübasyonun sonra kısmi saflaştırma işlemleri yapıp en son elde kalan çözelti spektrofotometrede 550 nm'de okutulmuş olan standart grafiğe göre HA üretim miktarı hesaplaması yapılmıştır.

## **2.2.6. Üretilen hyaluronik asidin doğrulanması**

### **2.2.6.1. FTIR ile hyaluronik asit tayini**

Üretim aşamasının ardından kısmi olarak saflaştırılan hyaluronik asit FTIR ile tayin edilmiştir. İlk ürünler Eskişehir Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nde tayin edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra ise Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı tarafından hizmet alımı ile tayin edilmiştir.

### **2.2.6.2. Hyaluronidaz enzimi ile tayin**

8-32 mg arasında 5 oranda tartım yapılan hyaluronik asit 100'er ml fosfat tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Her birinden alınan 500 µl tampon çözelti, içerisine hyaluronidaz enzimi eklenmiş olan enzim dilüenti ile aynı oranda karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 100 µl çözelti, 900 µl asetik asit çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu şekilde oluşturulan standart, oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından 600 nm'de spektrofotometrede okunmuştur.

Üretimi yapılarak elde edilen çözeltiden 250 µl alınarak ependorf tüpüne aktarılmıştır. 37°C'de 10 dk inkübasyonun ardından içerisinde hyaluronidaz enzimi bulunan enzim dilüentinden 250 µl alınarak karıştırılmıştır. Karışım 20 dk inkübe

edildikten sonra 100 µl alınıp, 900 µl asetik asit çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından 600 nm’de spektrofotometrede okunarak değerlendirilmiştir (Hoffman ve Altenbuchner, 2014).

### **2.2.7. Hyaluronik asit üretiminin optimizasyonu**

Hyaluronik asit üretiminde kullanılacak besiyeri bileşenlerinin optimize edilmesi amacıyla Plackett Burman ve cevap yüzey yöntemi olmak üzere iki deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Plackett Burman tasarımında elde edilen verilerin sonucunda etkili parametreler belirlenerek cevap yüzey yöntemi ile etkili parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon işlemleri 150 ml hacimli erlenler içerisinde 50 ml besiyerinde yapılmıştır. Maksimum HA verimini elde etmek için öngörülen optimum proses değişkenleri, Minitab 16 programı ile belirlenmiştir.

#### **2.2.7.1. Plackett Burman deney tasarımı**

Üretime etki eden tüm faktörler değerlendirilmek istendiğinden en etkili faktörlerin belirlenmesi amacıyla bu tasarım kullanılmıştır. Plackett Burman deney tasarımı ile glukoz, sükroz, sıcaklık, inokülüm miktarı, çalkalama hızı, pH, maya özütü, kazein pepton, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl ve iz mineral olmak üzere üretimi etkileyen tüm faktörler değerlendirilmiştir. Glukoz ve sükrozun üretim üzerindeki etkisini net olarak gözlemleyebilmek amacıyla ayrı ayrı deneylere alınmışlardır. Kullanılan şeker dışında Plackett Burman deney tasarımlarında bir farklılık bulunmamaktadır. %95 güven aralığında orta noktalarda 5 tekrar olmak üzere 25 deney yapılmıştır. Deneyin her değişkeni orta (0) ve üst (1) olmak üzere 2 düzeyde çalışılmıştır. Plackett Burman tasarımı ile etkileri incelenen parametreler ve düzeyleri Tablo 2.3’de verilmiştir.

Her bir tasarım yedi bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E.gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) ve iki şeker için ayrı ayrı uygulanmıştır (Tablo 2.2., 2.3). Elde edilen verilerin ANOVA testleri sonucunda etkili parametreler belirlenmiştir.

Plackett Burman tasarımına göre hazırlanan besiyeri ortamlarına yoğunluğu 1’e ayarlanmış olan bakteriler seçilen miktarlarda eklenmiştir. 48 saat inkübasyonun ardından kısmi saflaştırma işlemleri yapıp en son elde kalan çözelti spektrofotometrede 550 nm’de okutularak hazırlanmış olan standart grafiğe göre HA üretim miktarı hesaplaması yapılmıştır.

**Tablo 2.1. Optimizasyon için değerlendirilen parametreler**

Parametre no	Parametre	Düşük düzey (-1)	Yüksek düzey(+1)
A	Sükroz (g)	40	80
B	Sıcaklık(°C)	25	40
C	İnokulum miktarı(ml)	1	10
D	Çalkalama hızı (rpm)	100	200
E	Glukoz (g)	40	80
F	pH	5	9
G	Maya özütü (g)	10	30
H	Kazein pepton (g)	2	10
J	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	0,5	2
K	MgSO <sub>4</sub> (g)	1	3
L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	2	10
M	İz mineral (ml)	1	4
N	NaCl (g)	0,25	1,5

**Tablo 2.2. Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı deney tasarımı**

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500

**Tablo 2.2. (Devamı)**

25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500

**Tablo 2.3. Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı deney tasarımı**

Sükroz (g)	Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)
70	32,5	5,5	150	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
80	40,0	10,0	100	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250
60	25,0	1,0	100	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250
70	32,5	5,5	150	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
80	40,0	1,0	100	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500
60	40,0	10,0	100	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500
70	32,5	5,5	150	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
80	25,0	10,0	200	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500
60	40,0	1,0	200	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500
60	25,0	1,0	200	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250
60	25,0	10,0	100	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500
70	32,5	5,5	150	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
60	40,0	10,0	200	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250
60	40,0	10,0	100	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500
80	40,0	1,0	200	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250
80	40,0	1,0	100	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250
60	25,0	10,0	200	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250
80	40,0	10,0	200	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250
80	25,0	1,0	200	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500
60	40,0	1,0	200	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500
60	25,0	1,0	100	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250
80	25,0	1,0	100	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500
80	25,0	10,0	100	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250
70	32,5	5,5	150	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875
80	25,0	10,0	200	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500

### 2.2.7.2. Cevap yüzey yöntemi

Plackett Burman deney tasarımı ile her bir bakteri için üretimi etkileyen faktörler belirlendikten sonra bu faktörler kullanılarak cevap yüzey yöntemi ile maksimum HA üretimi için parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

Cevap yüzey yönteminde gerçekleştirilen tasarımda hem glukoz hem de sükrozda en iyi sonuçları veren 2 bakteri (*S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21) kullanılmıştır. Her bakteri için etkili faktörlere uygun glukoz ve sükroz için ayrı olmak üzere deney planı oluşturulmuştur (Tablo 2.4., 2.5., 2.6., 2.7.). Hyaluronik asit üretiminin optimizasyonunda

her parametre için alt düzey (-1), orta düzey (0) ve üst düzey (+1) olmak üzere 3 düzeyde tasarım kullanılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, deney planı Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak “Merkezi Bileşen” (Central Composite) yöntemi ile oluşturulmuştur. Tasarım, değişken sayısı (n) =5 olan deneylerde (Tablo 2.5.,2.6.,2.7.) 10’u merkez nokta olmak üzere toplam 52 deneyden oluşmaktadır ( $\alpha=2,378$ ). Değişken sayısı üç olan tasarımda ( $\alpha=1,6818$ ) ise 6’sı merkez noktada toplam 20 deney vardır (Tablo 2.8.). Beş faktörlü ve üç faktörlü cevap yüzey tasarımında kullanılan parametrelerin düşük, orta ve yüksek düzeyleri Tablo 2.4’de verilmiştir. Diğer parametreler; inokülüm miktarı 5,5 ml, sükröz 60 g, glukoz 60 g, maya özütü 20 g, kazein pepton 6 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, MgSO<sub>4</sub> 2 g olarak kullanılmıştır.

**Tablo 2.4.** *CYY tasarımında kullanılan parametrelerin düzeyleri*

Parametre no	Parametre	Düşük düzey (-1)	Orta düzey (0)	Yüksek düzey (+1)
X1	Sıcaklık(°C)	25	30	35
X2	pH	8	9	10
X3	Çalkalama hızı(rpm)	80	100	120
X4	NaCl (g)	0,4	0,6	0,8
X5	İz mineral (ml)	3	4	5
X6	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	0,5	0,75	1

Cevap yüzey deney tasarımında parametreler arasındaki ilişki, ikinci dereceden bir polinom modeli kullanılarak elde edilmiştir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Bu modelde “y” öngörülen yanıt,  $\beta_0$  sabit,  $\beta_i$ , “i” faktörünün ana etkisinin katsayısı,  $\beta_{ij}$ , “i” ve “j” arasındaki etkileşim etkisinin katsayısı,  $\beta_{ii}$  “i” faktörünün 2. derece polinom etkisi, “ $\varepsilon$ ” ise hatadır.

Minitab 16 programı ile oluşturulan bu deney planlarına uygun olarak bakteriler hazırlanan besiyeri ortamlarına ilave edildikten sonra çalkalamalı inkübatörde 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından saflaştırma işlemleri yapıp en son elde kalan numune spektrofotometrede 550 nm’de okutularak hazırlanmış olan standart grafiğe göre üretim miktarı hesaplaması yapılmıştır.

**Tablo 2.5.** *S. thermophilus* P4 glukozlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı(rpm)	pH	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)
35	80	8	0,5	4
35	80	8	0,5	5
30	147	9	0,75	3
30	100	9	0,75	3
42	100	9	0,75	4
25	120	10	1	4
25	120	10	0,5	3
25	120	8	1	3
30	52	9	0,75	5
30	100	9	0,75	3
25	80	10	1	4
30	100	9	0,75	3
25	80	8	0,5	4
30	100	9	0,75	3
25	120	8	0,5	3
35	120	10	0,5	3
35	80	10	1	3
25	120	8	1	4
25	80	10	0,5	5
25	80	8	0,5	3
30	100	11	0,75	4
35	120	10	1	3
30	100	9	0,16	5
30	100	9	0,75	5
35	80	10	0,5	5
35	80	8	1	5
35	120	8	0,5	5
25	120	8	0,5	5
25	80	8	1	4
35	80	10	1	3
35	80	10	0,5	4
18	100	9	0,75	4
30	100	9	0,75	5
25	120	10	1	5
25	80	10	0,5	4
35	120	10	0,5	4
25	120	10	0,5	5
30	100	9	0,75	4
30	100	9	0,75	4
35	80	8	1	5
35	120	8	1	4
30	100	9	0,75	4
35	120	8	1	3
35	120	10	1	4
30	100	9	1,35	5
30	100	9	0,75	5

**Tablo 2.5. (Devamı)**

30	100	9	0,75	5
30	100	9	0,75	1,62
25	80	8	1	6,34
35	120	8	0,5	4
25	80	10	1	3
30	100	6,62	0,75	3

**Tablo 2.6. *S. mutans* 1a21 glukozlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı**

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı(rpm)	pH	İz mineral (ml)	NaCl (g)
30	100	9	4	0,6
25	120	8	3	0,4
30	100	9	4	0,6
30	100	9	4	0,6
30	100	9	4	0,6
35	80	8	3	0,8
25	80	10	3	0,8
35	120	10	5	0,8
35	120	8	5	0,8
30	100	11,4	4	0,6
25	80	10	3	0,4
25	80	10	5	0,8
35	80	8	5	0,8
30	100	9	4	0,6
25	80	8	3	0,4
30	100	9	4	0,6
35	120	8	5	0,4
30	100	9	1,62	0,6
35	80	10	3	0,8
35	120	8	3	0,4
25	120	8	3	0,8
30	100	9	4	0,6
30	100	6,62	4	0,6
35	80	10	5	0,4
18,1	100	9	4	0,6
25	120	10	5	0,8
35	120	10	3	0,8
25	120	8	5	0,4
30	100	9	4	1,07
35	120	8	3	0,8
25	120	8	5	0,8
35	80	8	3	0,4
30	100	9	4	0,6
25	80	10	5	0,4
35	80	10	5	0,8
35	120	10	5	0,4
30	147,5	9	4	0,6

**Tablo 2.6. (Devamı)**

30	100	9	4	0,6
30	100	9	6,38	0,6
25	120	10	3	0,4
35	80	10	3	0,4
41,9	100	9	4	0,6
25	80	8	3	0,8
25	80	8	5	0,8
35	80	8	5	0,4
30	100	9	4	0,6
25	120	10	5	0,4
30	52,4	9	4	0,6
35	120	10	3	0,4
25	120	10	3	0,8
30	100	9	4	0,12

**Tablo 2.7. *S. thermophilus* P4 sükrözlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı**

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)	pH	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)
35	120	8	1	4
30	100	9	0,75	5
35	120	10	1	3
25	120	10	0,5	3
30	100	11,4	0,75	4
35	120	8	1	4
30	100	9	0,75	3
25	80	8	1	3
25	80	10	1	5
35	120	8	0,5	3
25	80	8	1	4
25	120	8	1	3
35	120	10	0,5	4
30	100	9	0,75	3
30	100	9	0,75	3
25	120	8	0,5	3
30	100	9	0,75	3
30	100	9	0,75	4
30	100	6,62	0,75	5
25	80	10	0,5	3
25	120	10	1	4
35	120	10	0,5	3
25	120	10	0,5	5
25	120	8	0,5	5
30	100	9	1,35	5
30	100	9	0,75	5
30	100	9	0,75	5
30	100	9	0,75	5
35	80	8	1	4

**Tablo 2.7. (Devamı)**

30	100	9	0,15	3
35	80	10	0,5	4
35	80	10	1	4
25	80	8	0,5	5
30	52,4	9	0,75	5
35	80	8	1	4
35	120	10	1	4
25	80	8	0,5	5
25	120	8	1	4
35	80	10	0,5	4
30	100	9	0,75	5
30	100	9	0,75	4
35	80	8	0,5	4
35	80	8	0,5	3
35	120	8	0,5	4
25	120	10	1	5
30	147,5	9	0,75	5
25	80	10	0,5	5
30	100	9	0,75	1,62
41,9	100	9	0,75	6,38
35	80	10	1	4
25	80	10	1	3
18,1	100	9	0,75	3

**Tablo 2.8. *S. mutans* Ia21 sükrözlu besiyeri için hazırlanan CYY tasarımı**

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)	İz mineral (ml)
30	100	4
30	100	4
35	80	3
30	133,6	4
25	120	3
35	80	5
25	80	5
30	100	4
35	120	5
35	120	3
30	100	4
30	100	4
30	100	2,3
38,4	100	4
30	100	5,7
30	100	4
21,6	100	4
30	66,4	4
25	120	5
25	80	3

### 2.2.8. Validasyon

Optimizasyon çalışmaları maksimum HA miktarını elde edilebilmek amacıyla yapılmıştır. Validasyon deneyleri ise doğrulama deneyleridir. Deney tasarımı kullanılarak bulunan optimum değerlerde elde edilen HA miktarına deneysel olarak ulaşıp ulaşılmadığı kontrol edilmiştir. Belirlenen şartlarda üretim yapılmış ve optimizasyondan sonra bulunan maksimum HA değeri ile karşılaştırılmıştır.

Minitab 16 programının cevap yüzey optimizasyonu ile *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 için hyaluronik asit üretiminde optimum koşullar belirlenmiştir (Tablo 3.8.) ve belirlenen parametreler ile doğrulama deneyleri yapılmıştır. Belirlenen parametrelere uygun olarak hazırlanan ortamlarda bakteriler 48 saat fermentasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda saflaştırma işlemleri yapıp miktar hesaplanması yapılmıştır.

### 2.2.9. Mikroorganizmaların tarımsal atıklarda gelişiminin incelenmesi

Çalışmanın başında seçilen 7 mikroorganizmanın atıkların bulunduğu ortamda gelişip gelişmedikleri incelenmiştir. 3 farklı şekilde besiyeri içeriği değiştirilmiştir. İlk olarak besiyerinde hyaluronik asit besiyerinde bulunan glukoz tamamen çıkarılarak atıklar eklenmiştir. Peynir altı suyu, melas ve şilempe 10 ml, zeytin posası ise 10 gr eklenmiştir. Bakterilerin tümü geliştiğinden ikinci besiyerinde ek olarak atık miktarları düşürülmüştür. Peynir altı suyu, melas ve şilempe 4 ml, zeytin posası ise 4 gr eklenmiştir. Üçüncü besiyerinde ise glukoz, kazein pepton, maya özütü yarıya indirilip atıklar farklı oranlarda eklenmiştir. Peynir altı suyu 10 ml, melas ve şilempe 8 ml, zeytin posası ise 10 gr eklenmiştir. Hazırlanan besiyerlerine agar eklenerek 121°C'de 15 dk otoklavlanarak petriye dökülmüştür. Ardından yoğunluğu 1'e ayarlanmış olan mikroorganizmalar damlatma plak yöntemi ile besiyerlerine 10 µ damlatılmıştır. %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.10. Tarımsal atıkların bazı özelliklerinin belirlenmesi

Seçilen atık materyallerin (melas, şilempe, zeytin posası ve peynir altı suyu) hyaluronik asit üretiminde kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için öncelikle bazı özellikleri belirlenmiştir.

#### 2.2.10.1. Azot miktarının belirlenmesi

Semi mikrokendal yöntemi ile azot miktarları belirlenmiştir. 1gr olarak tartılan her bir atık bir tüpe eklenmiştir. 2 adet katalizör tablet (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve 12 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

eklenmiştir. Yakma aparatına konulan tüpün 3 saat 420°C’de yakma işlemi yapılmıştır. Ardından cihaz açılmış ve öncesinden kör olarak ayarlanan içerisinde 2 adet katalizör tablet ve 12 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bulunan tüp okutulmuştur. Yakma işlemi tamamlanan tüp soğuduktan sonra cihaza yerleştirilip okuması yapılarak atıkların azot miktarları belirlenmiştir. (Kaplan vd., 2010).

#### **2.2.10.2. Kuru madde miktarının belirlenmesi**

Kuru madde miktarlarının belirlenmesi için 1 gr örnek 70°C’lik etüvde 24 saat inkübasyonun ardından tekrar tartımları yapıp kaydedilmiştir.

#### **2.2.10.3. Yağ oranının belirlenmesi**

Buchii yağ ekstraksiyon sistemi ile yağ miktarları belirlenmiştir. Ekstraksiyon cihazının cam hazneleri tartılarak değerleri not edilmiştir. Örnekler eşit miktarlarda tartılıp selüloz timble’lara konulup ve cihaz çalıştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra cam hazneler petrol eterinin uzaklaşması için çeker ocakta 1 saat bekletilmiştir. Yağ miktarı şu formül ile hesaplanmıştır:

$$\%Yağ=(B-A)\times 100/C$$

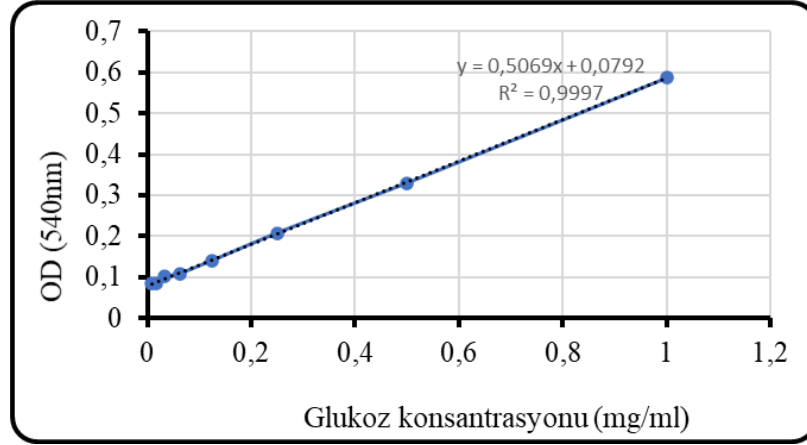
B: cam kap ve içindeki yağların toplam ağırlığı

A: cam kabın ağırlığı

C: örneğin ağırlığı

#### **2.2.10.4. İndirgen şeker analizi**

Enzimatik hidroliz sonucunda sıvıda çözünen indirgen şeker miktarı DNS metodu ile belirlenmiştir (Miller, 1959). 1,5 mL şeker çözeltisi ile 3 mL DNS çözeltisi karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Kaynar su banyosundan alınan çözeltiler hemen soğuk su banyosunda soğutulmuş ve 540 nm dalga boyunda kör tampon çözeltiliye karşı spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Çözeltideki indirgen şeker miktarları (mg/ml) DNS yöntemi saf glikoz çözeltileri kullanılarak hazırlanmış ve mg/ml glikoz-absorbans kalibrasyon doğrusu ( $r^2:0,9997$ ) (Görsel 2.2.) kullanılarak belirlenmiştir.



Görsel 2.2. Glukoz-absorbans kalibrasyon doğrusu

### 2.2.11. Tarımsal atıkların HA üretiminde kullanılması

Cevap yüzey yönteminden alınan sonuçlara göre bakterilerin en iyi üretimi gerçekleştirdiği ortam koşulları kullanılarak şeker miktarlarında değişimler yapılmıştır. Buna göre melas, şilempe, peynir altı suyu ve zeytin atıkları toplam şeker miktarının %10'u atık %90'ı şeker, %30'u atık %70'i şeker, %50 atık, %50 şeker ve %100 atık olacak şekilde her atık için 4 farklı besiyeri içeriği hazırlanmıştır. Glukoz ve sükröz için ayrı ayrı besiyerleri hazırlanmıştır. 48 saatlik inkübasyonun ardından saflaştırma işlemine geçilmiştir. Saflaştırma işlemlerinin ardından spektrofotometrede 550 nm'de okuma yapıp miktar hesaplanması yapılmıştır. Bu deney ile atıkların HA besiyerinde hangi miktarlarda kullanılacağı belirlenmiş (Tablo 2.9.) ve deneylere alınmıştır.

Tablo 2.9. Kullanılan şeker ve atık miktarları (PAS: peynir altı suyu)

Bakteri	Besiyeri	Atık	Atık miktarı(%)	Şeker miktarı(%)
<i>S. mutans</i> 1a21	A <sup>1</sup>	PAS	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Melas	50	50
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Şilempe	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Zeytin posası	100 <sup>3</sup>	-
<i>S. mutans</i> 1a21	B <sup>1</sup>	PAS	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Melas	30	70
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Şilempe	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Zeytin posası	100	-
<i>S. mutans</i> 1a21	A	PAS	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Melas	50	50
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Şilempe	10	90

**Tablo 2.9. (Devamı)**

<i>S. mutans</i> 1a21	A	Zeytin posası	100	-
<i>S. mutans</i> 1a21	B	PAS	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Melas	30	70
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Şilempe	10	90
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Zeytin posası	100	-

<sup>1</sup> Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra glukoz ilavesi ile tamamlanmıştır.

<sup>2</sup> Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra sükröz ilavesi ile tamamlanmıştır.

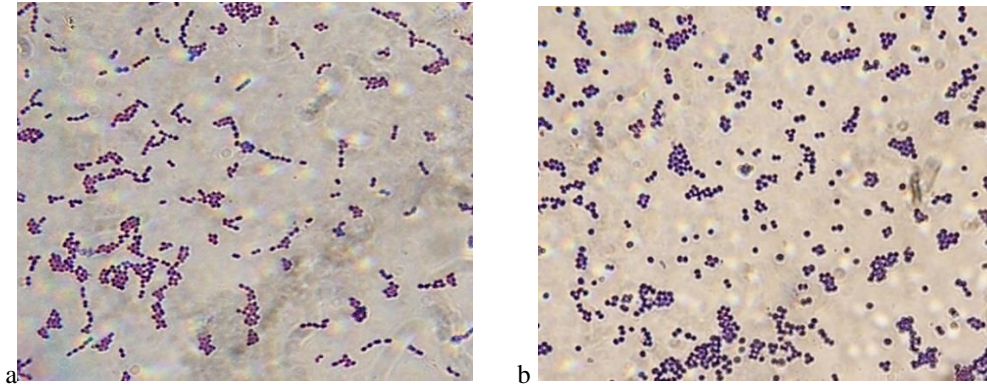
<sup>3</sup> Atık materyalin %100 kullanıldığı besiyerlerinde şeker kullanılmamıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması

Peynir ve yoğurt örneklerinden toplam 42 izolat elde edilmiştir. İzolasyon işleminde basiller göz ardı edilmiş olup yalnızca gram pozitif özellik gösteren koklar ile saflaştırmaya gidilmiştir (Tablo 3.1.). İzolatlar biyokimyasal özellikleri açısından Vitek 2 sistemi ile tanımlanmıştır. (Tablo 3.2.). Vitek 2 (Biomerieux) ile gram pozitif bakteri kartları kullanılarak yapılan tanılamada izotlardan 32'si *Streptococcus thermophilus*, 5'i *Staphylococcus epidermidis*, 2'si *Enterococcus gallinarum*, 2'si *Enterococcus columbae* ve 1'i ise *Kocuria kristinae* olarak tanımlanmıştır. Tanılamada benzerlik yüzdeleri %87-99 aralığındadır (Tablo 3.3).

İzolasyon sonucunda elde edilen bakterilerden hyaluronik asit taraması ve üretimi yapılmış olup, izotlardan çalışmaya esas olarak 2 adet *Streptococcus thermophilus* ve 1 adet *Staphylococcus epidermidis* alınmıştır (Görsel 3.1.). Bu bakterilerin yanında Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Streptococcus mutans* ve *Staphylococcus warnei* çalışmaya alınmıştır. Çalışmada esas olarak kullanılan 7 bakteri dizi analizleme yöntemi ile moleküler olarak tanımlanmıştır (Tablo 3.4.) Teste alınan *Streptococcus thermophilus* cinsi tüm mikroorganizmalar için en yüksek gelişme sıcaklığı 45°C olarak bulunmuştur.



Görsel 3.1. a. *S. thermophilus* mikroskop görüntüsü, b. *S. epidermidis* mikroskop görüntüsü

Tablo 3.1. Peynir ve yoğurttan izole edilen bakterilerin gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri

İzolat no	Gram reaksiyonu	Katalaz	İzolat no	Gram reaksiyonu	Katalaz
P1	(+)	(-)	P22	(+)	(-)
P2	(+)	(-)	P23	(+)	(-)

**Tablo 3.1. (Devamı)**

P3	(+)	(-)	P24	(+)	(-)
P4	(+)	(-)	P25	(+)	(-)
P5	(+)	(-)	P26	(+)	(-)
P6	(+)	(-)	P27	(+)	(-)
P7	(+)	(-)	P28	(+)	(-)
P8	(+)	(-)	P29	(+)	(-)
P9	(+)	(-)	P30	(+)	(-)
P10	(+)	(-)	P31	(+)	(-)
P11	(+)	(-)	P32	(+)	(-)
P12	(+)	(-)	E1	(+)	(-)
P13	(+)	(-)	E2	(+)	(-)
P14	(+)	(-)	E3	(+)	(-)
P15	(+)	(-)	E4	(+)	(-)
P16	(+)	(-)	E5	(+)	(-)
P17	(+)	(-)	PS1	(+)	(+)
P18	(+)	(-)	PS2	(+)	(+)
P19	(+)	(-)	PS3	(+)	(+)
P20	(+)	(-)	PS4	(+)	(+)
P21	(+)	(-)	PS5	(+)	(+)

**Tablo 3.2. İzole edilen bakterilerin biyokimyasal özellikleri**

Biyokimyasal Özellikler	<i>S.thermophilus</i> P1, P6	<i>S.thermophilus</i> P2, P16, P23	<i>S.thermophilus</i> P3	<i>S.thermophilus</i> P4	<i>S.thermophilus</i> P5,32	<i>S.thermophilus</i> P7,26	<i>S.thermophilus</i> P8, P27	<i>S.thermophilus</i> P9,31	<i>S.thermophilus</i> P10,	<i>S.thermophilus</i> P11	<i>S.thermophilus</i> P12	<i>S.thermophilus</i> P13	<i>S.thermophilus</i> P14	<i>S.thermophilus</i> P15, P24
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AlaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DRIB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOVO	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	(-)	-	-	(+)
DRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPTO	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ProA	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-
TyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tablo 3.2. (Devamı)**

ILATk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NC6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O129R	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
DXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGAR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	(-)	+	-
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMNE	-	+	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLYB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DGAL	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
BGUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BACI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH2s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBdG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DTRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AMY:Amilaz, APPA:Ala-Phe-Pro Arilamidaz, LeuA:Lösin Arilamidaz, AlaA:Alanin Arilamidaz dRIB: D-Riboz, DRAF:D-Raffinoz, NOVO:Novobiosin Direnci, OPTO:Optokin Direnci, PIPLC: Fosfatidilinositol Fosfolipaz C, CDEX: Siklodekstrin, ProA:L-Prolin Arilamidaz, TyrA:Tirosin Arilamidaz, ILATk:L-Laktat Alkalinizasyonu, NC6.5:%6.5 NaCl Ortamında Üreme, O129R:O/129 Direnci (Vibriostatik bileşenler), dXYL:D-Ksiloz, AspA: L-Aspartat Arilamidaz, BGURr: Beta Glukuronidaz, dSOR: D-Sorbitol, LAC: Laktoz, dMAN: D-Mannitol, SAL:Salisin, ADH1: Arginin Dihidrolaz 1, BGAR: Beta-Galaktopiranosidaz, AGAL: Alfa-Galaktosidaz, URE: Üreaz, NAG: N-Asetil-D-Glukozamin, dMNE: D-Mannoz, SAC: Sakkaroz/Sükroz, BGAL: Beta-Galaktosidaz, AMAN: Alfa-Mannosidaz, POLYB: Polimiksin B Direnci, dMAL: D-Maltoz, AGLU: Alfa-Glukozidaz, PyrA: L-Pirolidonil-Arilamidaz, PHOS: Fosfataz, BGUR: Beta-Glukuronidaz, dGAL: D-Galaktoz, BACI: Basitrasin Direnci, PUL: Pullulan, ADH2s: Arginin Dihidrolaz 2, MBdG: Metil-B-D-Glukopiranosid, dTRE: D-Trehaloz.

**Tablo 3.2. (Devamı) İzole edilen bakterilerin biyokimyasal özellikleri**

Biyokimyasal Özellikler	<i>S.thermophilus</i> P17	<i>S.thermophilus</i> P18, P19,P30	<i>S.thermophilus</i> P20	<i>S.thermophilus</i> P21	<i>S.thermophilus</i> P22,P25	<i>K. kristinae</i> E1	<i>E. gallinarum</i> E2	<i>E. gallinarum</i> E3	<i>E. columbae</i> E4	<i>E. columbae</i> E5	<i>S. epidermidis</i> PS1	<i>S. epidermidis</i> PS2	<i>S. epidermidis</i> PS3	<i>S. epidermidis</i> PS4,PS5
AMY	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
APPA	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AlaA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
DRIB	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
NOVO	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
DRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
OPTO	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDEX	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
TyrA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
ILATk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NC6.5	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
O129R	-	+	-	(-)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
DXYL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
ADH1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
BGAR	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
NAG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	(-)	-
DMNE	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLYB	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
DMAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MBdG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
DTRE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

**Tablo 3.2. (Devamı)**

AGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHOS	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	(-)	-	+	+
BGUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DGAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BACI	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ADH2s	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

AMY:Amilaz, APPA:Ala-Phe-Pro Arilamidaz, LeuA:Lösin Arilamidaz, AlaA:Alanin Arilamidaz dRIB: D-Riboz, DRAF:D-Raffinoz, NOVO:Novobiosin Direnci, OPTO:Optokin Direnci, PIPLC: Fosfatidilinositol Fosfolipaz C, CDEX: Siklodekstrin, ProA:L-Prolin Arilamidaz, TyrA:Tirosin Arilamidaz, ILATk:L-Laktat Alkalinizasyonu, NC6.5:%6.5 NaCl Ortamında Üreme, O129R:O/129 Direnci (Vibriostatik bileşenler), dXYL:D-Ksiloz, AspA: L-Aspartat Arilamidaz, BGURr: Beta Glukuronidaz, dSOR: D-Sorbitol, LAC: Laktoz, dMAN: D-Mannitol, SAL:Salisin, ADH1: Arginin Dihidrolaz 1, BGAR: Beta-Galaktopiranosidaz, AGAL: Alfa-Galaktosidaz, URE: Üreaz, NAG: N-Asetil-D-Glukozamin, dMNE: D-Mannoz, SAC: Sakkaroz/Sükroz, BGAL: Beta-Galaktosidaz, AMAN: Alfa-Mannosidaz, POLYB: Polimiksin B Direnci, dMAL: D-Maltoz, AGLU: Alfa-Glukozidaz, PyrA: L-Pirolidonil-Arilamidaz, PHOS: Fosfataz, BGUR: Beta-Glukuronidaz, dGAL: D-Galaktoz, BACI: Basitrasin Direnci, PUL: Pullulan, ADH2s: Arginin Dihidrolaz 2, MBdG: Metil-B-D-Glukopiranosid, dTRE: D-Trehaloz.

**Tablo 3.3. Vitek 2 ile tanımlanan bakteriler ve benzerlik oranları**

İzolat no	Tür adı	Benzerlik oranı (%)
P1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
P3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	92
P4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	87
P5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
P6	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P7	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97
P8	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93
P9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P10	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P11	<i>Streptococcus thermophilus</i>	87
P12	<i>Streptococcus thermophilus</i>	94
P13	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97
P14	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P15	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97
P16	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
P17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P18	<i>Streptococcus thermophilus</i>	94
P19	<i>Streptococcus thermophilus</i>	94
P20	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93

**Tablo 3.3. (Devamı)**

P21	<i>Streptococcus thermophilus</i>	87
P22	<i>Streptococcus thermophilus</i>	90
P23	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
P24	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97
P25	<i>Streptococcus thermophilus</i>	90
P26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97
P27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93
P28	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93
P29	<i>Streptococcus thermophilus</i>	94
P30	<i>Streptococcus thermophilus</i>	94
P31	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96
P32	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
E1	<i>Kocurina kristinae</i>	87
E2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98
E3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	97
E4	<i>Enterococcus columbae</i>	87
E5	<i>Enterococcus columbae</i>	87
PS1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97
PS2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97
PS3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98
PS4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96
PS5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96

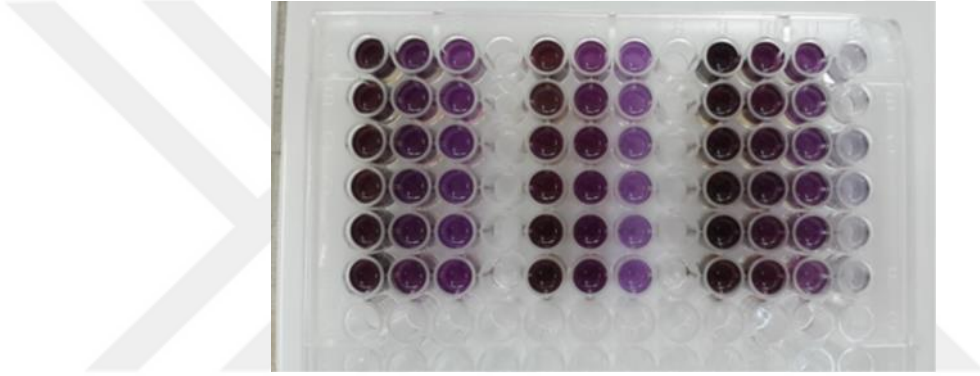
**Tablo 3.4. Dizi analizi ile tanımlanan bakteriler ve genbank erişim numaraları**

İzolot no	Tür adı	Erişim no	Benzerlik oranı(%)
P3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	MT613588.1	100
P4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	MT613588.1	100
M173	<i>Enterococcus durans</i>	MK026976.1	99,6
M179	<i>Enterococcus gallinarum</i>	MK026658.1	100
1a21	<i>Streptococcus mutans</i>	CP013237.1	100
S22	<i>Staphylococcus warnei</i>	MT642942.1	98,97
PS1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MG719590.1	99,72

### 3.2. Bakterilerin Hialuronik Asit Üretimi Yönünden Taranması

HA miktar analizinde en bilinen yöntem Bitter ve Muir (1962) tarafından belirlenen karbazol yöntemi olup karbonhidratların H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HCl ile muamele edilip karbazol ile tepkimeye girecek maddelerin renk vermesi esasına dayanmaktadır (Cesaretti vd., 2003).

Çalışmanın başında elde edilen 42 izolattan 10 adet *S. thermophilus* ve 2 adet *S. epidermidis* cinsi bakteriler karbozol reaksiyonuna göre taramaya alınmış ve pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Lactococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* cinsi 8 adet bakteri taramaya alınmış ve negatif sonuç verenler elenerek mor renk oluşumu gözlenen bakteriler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Görsel 3.2.). *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus warnei*'nin pozitif sonuç vermesi ile toplamda toplam 7 adet bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) ile deneylere devam edilmiştir.



Görsel 3.2. *S. thermophilus*, *S. epidermidis* ve *S. mutans*'ta renk değişimi

### 3.3. Mikroorganizmalardan Hyaluronik Asit Üretimi

Tarama sonucunda seçilen mikroorganizmalar 500 ml hacimli HA fermentasyon ortamında (Görsel 3.3.) 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saatlik inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda (Görsel 3.4.) saflaştırma işlemleri gerçekleştirilip ilk ürünler hyaluronidaz enzimi ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopi (FTIR) ile doğrulanmıştır. Bu aşamada yalnızca *S. thermophilus* P4 ile üretilen HA, FTIR analizi ile doğrulanmıştır.

HA üretimi açısından teste alınan izolatlardan elde edilen ürünlerin HA olduğu hyaluronidaz enzimi ve FTIR analizi ile doğrulandıktan sonra optimum üretim koşullarını belirlemek için 7 adet bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) ile deneylere devam edilmiştir.



**Görsel 3.3.** Glukoz(sol) ve sükröz(sağ) içeren HA besiyerleri    **Görsel 3.4.** İnkübasyon sonrası HA besiyeri

### 3.4. Hyaluronik Asit Üretiminde Etkili Parametrelerin Belirlenmesi

Hyaluronik asit üretiminde kullanılacak besiyerinin bileşenlerinin optimize edilmesi amacıyla Plackett Burman ve cevap yüzey yöntemi olmak üzere iki deneysel tasarım kullanılmıştır. Plackett Burman tasarımında elde edilen verilerin ANOVA testleri sonucunda etkili parametreler belirlenmiştir. Etkili parametreler kullanılarak cevap yüzey yöntemi ile deney tasarımı yapıp deneyler bu tasarıma göre yapılmıştır. 7 bakteri kullanılmış olup tüm tasarımlar glukoz ve sükröz için ayrı ayrı yapılmıştır.

#### 3.4.1. Plackett Burman deney tasarımı

Parametrelerin belirlenmesi işlemleri 150 ml hacimli erlenler içerisinde 50 ml besiyerinde yapılmıştır. 7 bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) deneylere alınmış olup, glukoz, sükröz, sıcaklık, inokülüm miktarı, çalkalama hızı, pH, maya özütü, kazein pepton,  $K_2SO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , NaCl ve iz mineral değerlendirilmiştir. Deneyin her değişkeni orta (0) ve üst (1) olmak üzere 2 düzeyde çalışılmıştır (Tablo 2.3.). Tasarım glukoz ve sükröz için ayrı ayrı hazırlanmıştır. %95 güven aralığında orta noktalarda 5 tekrar olmak üzere 25 deney yapılmıştır. 7 bakteri ve 2 şeker ile yapılan tüm deneylerin sonuçları tablolar halinde kaydedilmiştir.

Glukoz içeren besiyerinde 62,0 mg/L ile en yüksek üretim *S. thermophilus* P4'e ait iken en düşük üretime sahip mikroorganizma 32 mg/L ile *S. epidermidis* PS1 olmuştur. Sükröz içeren besiyerinde ise *S. thermophilus* P4 56,0 mg/L ve *S. epidermidis* PS1 32,4 mg/L ile sonuçlar aynı olmuştur. En yüksek üretim miktarına sahip ikinci bakteri ise glukozda 66,4 mg/L ve sükrözde 54,0 mg/L ile *S. mutans* 1a21 olmuştur. Bakterilerin PB

deney tasarımları arasında sahip oldukları en yüksek HA miktarı Tablo 3.33'te verilmiştir.

Test bakterileri ile HA üretimine etki eden faktörler bakterilere göre değişiklikler göstermiştir. Bütün bakterilerde için en etkili faktörler; sıcaklık, çalkalama hızı, pH ve iz mineraller ( $p < 0.05$ ) olmuştur. Bakterilere göre değişmekle birlikte  $K_2SO_4$ , NaCl ve  $MgSO_4$  etkili faktörler olarak belirlenmiştir (Tablo 3.34.).

**Tablo 3.5.** *S. thermophilus* P3 'ün PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	Inokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	$K_2SO_4$ (g)	$MgSO_4$ (g)	$Na_2HPO_4$ (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktar (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	12,5
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	13
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	13
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	12,6
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	12,1
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	14,0
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	34,4
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	13,1
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	31,0
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	54,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	14,0
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

F ve P değerleri modelin ve model parametrelerinin anlamlılıklarını göstermek için kullanılmaktadır. *S.thermophilus* P3 'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 7,61 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu görülmektedir. Regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin  $R^2$  değeri %89,99'dur (Tablo 3.6.).

**Tablo 3.6.** *S.thermophilus* P3 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	9,9197	0,76305	7,61	0,001
Doğrusal	12	9,6390	0,80325	8,01	0,001
Sıcaklık(°C)	1	2,1530	2,15299	21,47	0,001
İnokulum miktarı	1	0,2576	0,2576	2,57	0,137
Çalkalama hızı	1	0,5204	0,52035	5,19	0,044
Glukoz	1	0,3031	0,30307	3,02	0,110
pH	1	2,1530	2,15299	21,47	0,001
Maya özütü	1	0,2576	0,25764	2,57	0,137
Kazein pepton	1	0,1674	0,16744	1,67	0,223
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1,4397	1,43970	14,36	0,003
MgSO <sub>4</sub>	1	0,2576	0,25765	2,57	0,137
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,1674	0,16745	1,67	0,223
İz mineral	1	0,8282	0,82825	8,26	0,015
NaCl	1	1,1338	1,13383	11,31	0,006
Eğim	1	0,2807	0,28069	2,80	0,123
Hata	11	1,1032	0,10029		
Uyum eksikliği	7	1,0980	0,15686	121,72	0,000
Saf hata	4	0,0052	0,00129		
Toplam	24	11,0229			

Model özeti      R<sup>2</sup>= % 89,99      R<sup>2</sup>(pred)= % 18,61      R<sup>2</sup>(adj)= % 78,16      S = 0,316685

**Tablo 3.7.** *S. thermophilus* P3'ün PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Sükröz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,0
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,78
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,4
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	18
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,76
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,1
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,32
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	6,3
25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	18,2
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,1

**Tablo 3.7. (Devamı)**

25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	24,4
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,32
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	23,2
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	36,0
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	36,4
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	19,2
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S.thermophilus* P3 sükrözlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 12,56 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir. Modelin  $R^2$  değeri %93,69'dir (Tablo 3.8.).

**Tablo 3.8. *S.thermophilus* P3 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	9,25748	0,71211	12,56	0,000
Doğrusal	12	7,50900	0,62575	11,04	0,000
Sükröz	1	0,00271	0,00271	0,05	0,831
Sıcaklık(°C)	1	2,74022	2,74022	48,35	0,000
İnokulum miktarı	1	0,11026	0,11026	1,95	0,191
Çalkalama hızı	1	1,02378	1,02378	18,06	0,001
pH	1	0,39004	0,39004	6,88	0,024
Maya özütü	1	0,05757	0,05757	1,02	0,335
Kazein pepton	1	0,00362	0,00362	0,06	0,805
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,95966	0,95966	16,93	0,002
MgSO <sub>4</sub>	1	0,03724	0,03724	0,66	0,435
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,38559	0,38559	6,80	0,024
İz mineral	1	1,04287	1,04287	18,40	0,001
NaCl	1	0,75544	0,75544	13,33	0,004
Eğim	1	1,74848	1,74848	30,85	0,000
Hata	11	0,62344	0,05668		
Uyum eksikliği	7	0,51092	0,07299	2,59	0,187
Saf hata	4	0,11252	0,02813		
Toplam	24	9,88092			

Model özeti       $R^2 = \%93,69$      $R^2(\text{pred}) = \%56,01$      $R^2(\text{adj}) = \%86,23$      $S = 0,238068$

**Tablo 3.9.** *S. thermophilus* P4'ün PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,8
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,1
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,56
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	28,8
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	17,8
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	30,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	34,8
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	6,4
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,4
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,8
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	40,8
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	62,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,2
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S. thermophilus* P4 'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 12,44 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu görülmektedir. Regresyonun istatistiksel olarak anlamlıdır. Modelin R<sup>2</sup> değeri %93,63'dür (Tablo 3.10.).

**Tablo 3.10.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	17,3233	1,33256	12,44	0,000
Doğrusal	12	16,1478	1,34565	12,56	0,000
Sıcaklık(°C)	1	9,2834	9,28339	86,65	0,000
İnokulum miktarı	1	0,3170	0,3170	2,96	0,113
Çalkalama hızı	1	1,2074	1,20737	11,27	0,006
Glukoz	1	0,2151	0,21507	2,01	0,184
pH	1	1,4440	1,44399	13,48	0,004

**Tablo 3.10. (Devamı)**

Maya özüttü	1	0,3437	0,34374	3,21	0,101
Kazein pepton	1	0,3385	0,33852	3,16	0,103
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,6603	0,66030	6,16	0,030
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0098	0,00977	0,09	0,768
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,1005	0,10054	0,94	0,353
İz mineral	1	1,7654	1,76537	16,48	0,002
NaCl	1	0,4627	0,46269	4,32	0,062
Eğim	1	1,1755	1,17549	10,97	0,007
Hata	11	1,1785	0,10713		
Uyum eksikliği	7	1,1508	0,16440	23,76	0,004
Saf hata	4	0,0277	0,00692		
Toplam	24	18,5017			

Model özeti  $R^2 = \%93,63$   $R^2(\text{pred}) = \%48,99$   $R^2(\text{adj}) = \%86,10$   $S = 0,327311$

**Tablo 3.11. *S. thermophilus* P4'ün PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları**

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Sükröz (g)	pH	Maya özüttü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,2
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,84
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	22,2
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,2
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,86
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,4
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	28,4
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,32
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	1,58
25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	24,6
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	1,08
25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	36,8
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	6,6
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,38
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,2
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	34,0
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	56,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,4
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S.thermophilus* P4 'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 9,78 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir.  $R^2$  değeri ise %92,04'tür (Tablo 3.12.).

**Tablo 3.12.** *S.thermophilus* P4 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	13,4885	1,03758	9,78	0,000
Doğrusal	12	12,0555	1,00462	9,47	0,000
Sükröz	1	0,0462	0,04618	0,44	0,523
Sıcaklık(°C)	1	6,4673	6,46726	60,95	0,000
İnokulum miktarı	1	0,4076	0,40755	3,84	0,076
Çalkalama hızı	1	0,9318	0,93182	8,78	0,013
pH	1	0,8833	0,88326	8,32	0,015
Maya özütü	1	0,4814	0,48143	4,54	0,057
Kazein pepton	1	0,0184	0,01842	0,17	0,685
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,7400	0,73997	6,97	0,023
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0154	0,01540	0,15	0,710
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0031	0,00310	0,03	0,867
İz mineral	1	1,8162	1,81624	17,12	0,002
NaCl	1	0,2449	0,24487	2,31	0,157
Eğim	1	1,4330	1,43305	13,51	0,004
Hata	11	1,1672	0,10611		
Uyum eksikliği	7	1,1388	0,16268	22,91	0,004
Saf hata	4	0,0284	0,00710		
Toplam	24	14,6557			

Model özeti       $R^2 = \%92,04$      $R^2(\text{pred}) = \%36,27$      $R^2(\text{adj}) = \%82,62$      $S = 0,325743$

**Tablo 3.13.** *E.gallinarum* M179'un PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,4
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,8
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,0
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	27,0
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	22,0
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	30,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,2

**Tablo 3.13. (Devamı)**

40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	14,2
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	6,2
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,4
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	23,2
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	40,4
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	30,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,2
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*E. gallinarum* M179'a ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 12,35 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %93,59'dur (Tablo 3.14.).

**Tablo 3.14. *E. gallinarum* M179 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	12,0184	0,92450	12,35	0,000
Doğrusal	12	8,3213	0,69344	9,26	0,000
Sıcaklık(°C)	1	5,8883	5,88830	78,66	0,000
İnokulum miktarı	1	0,0295	0,02949	0,39	0,543
Çalkalama hızı	1	0,7873	0,78725	10,52	0,008
Glukoz	1	0,0412	0,04122	0,55	0,474
pH	1	0,3046	0,30455	4,07	0,069
Maya özütü	1	0,0077	0,00768	0,10	0,755
Kazein pepton	1	0,1937	0,19365	2,59	0,136
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0119	0,01191	0,16	0,698
MgSO <sub>4</sub>	1	0,6294	0,62942	8,41	0,014
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0363	0,03630	0,48	0,501
İz mineral	1	0,3776	0,37758	5,04	0,046
NaCl	1	0,0139	0,01394	0,19	0,674
Eğim	1	3,6972	3,69716	49,39	0,000
Hata	11	0,8234	0,07485		
Uyum eksikliği	7	0,8231	0,11758	1469,79	0,000
Saf hata	4	0,0003	0,00008		
Toplam	24	12,8418			

Model özeti      R<sup>2</sup>= %93,59    R<sup>2</sup>(pred)= % 47,67    R<sup>2</sup>(adj)= % 86,01    S = 0,273596

**Tablo 3.15.** *E.gallinarum* M179'un PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Sükröz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	29,8
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	25,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,2
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,4
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	22,4
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,26
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	0,9
25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	24,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	22,2
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	6,0
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,4
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	25,2
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	35,4
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	27,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,2
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*E. gallinarum* M179'un sükrözlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 6,62 ve P değeri 0,002'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir. R<sup>2</sup> değeri ise %88,72'dir (Tablo 3.16.).

**Tablo 3.16.** *E. gallinarum* M179 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	9,1689	0,70530	6,66	0,002
Doğrusal	12	6,3814	0,53178	5,02	0,006
Sükröz	1	0,0020	0,00200	0,02	0,893
Sıcaklık(°C)	1	4,2375	4,23752	39,99	0,000
İnokulum miktarı	1	0,0051	0,00512	0,05	0,830

**Tablo 3.16. (Devamı)**

Çalkalama hızı	1	0,8389	0,83886	7,92	0,017
pH	1	0,1186	0,11858	1,12	0,313
Maya özütü	1	0,0761	0,07614	0,72	0,415
Kazein pepton	1	0,0003	0,00030	0,00	0,958
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,2036	0,20362	1,92	0,193
MgSO <sub>4</sub>	1	0,1043	0,10426	0,98	0,343
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0093	0,00933	0,09	0,772
İz mineral	1	0,7730	0,77303	7,30	0,021
NaCl	1	0,0126	0,01260	0,12	0,737
Eğim	1	2,7876	2,78756	26,31	0,000
Hata	11	1,1656	0,10596		
Uyum eksikliği	7	1,0362	0,14802	4,58	0,080
Saf hata	4	0,1294	0,03235		
Toplam	24	10,3345			

Model özeti  $R^2 = \%88,72$   $R^2(\text{pred}) = \%16,20$   $R^2(\text{adj}) = \%75,39$   $S = 0,325517$

**Tablo 3.17. E. durans M173'ün PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları**

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,4
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	25,3
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,0
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	29,0
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	30,0
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	26,4
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,2
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	6,2
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	1,4
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	24,2
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	39,6
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	52,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*E. durans* M173'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 7,07 ve P değeri 0,001'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu gözlenmektedir. Regresyonun istatistiksel olarak anlamlıdır. Modelin R<sup>2</sup> değeri %89,31'dir (Tablo 3.18.).

**Tablo 3.18.** *E. durans* M173 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	13,2612	1,02009	7,07	0,001
Doğrusal	12	11,2510	0,93758	6,50	0,002
Sıcaklık(°C)	1	6,6148	6,61480	45,84	0,000
İnokulum miktarı	1	0,0124	0,01240	0,09	0,775
Çalkalama hızı	1	1,3510	1,35096	9,36	0,011
Glukoz	1	0,1183	0,11827	0,82	0,385
pH	1	0,7289	0,72886	5,05	0,046
Maya özütü	1	0,0081	0,00808	0,06	0,817
Kazein pepton	1	0,5841	0,58414	4,05	0,069
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0318	0,03184	0,22	0,648
MgSO <sub>4</sub>	1	0,4986	0,49865	3,46	0,090
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,4999	0,49991	3,46	0,090
İz mineral	1	0,5571	0,55711	3,86	0,075
NaCl	1	0,2460	0,24598	1,70	0,218
Eğim	1	2,0102	2,01016	13,93	0,003
Hata	11	1,5875	0,14432		
Uyum eksikliği	7	1,5280	0,21828	14,67	0,010
Saf hata	4	0,0595	0,01488		
Toplam	24	14,8486			

Model özeti      R<sup>2</sup>= %89,31    R<sup>2</sup>(pred)= %15,37    R<sup>2</sup>(adj)= %76,67    S = 0,379890

**Tablo 3.19.** *E. durans* M173'ün PB tasarımında süktroz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Süktroz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,8
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,24
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	26,2
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	32,2
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,2
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	25,6
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,9
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	24,0

**Tablo 3.19. (Devamı)**

25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	25,2
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,2
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	12,4
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	1,4
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,28
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,0
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	35,2
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	28,4
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,4
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*E. durans* M173'ün sükrözlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 10,34 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir. Modelin  $R^2$  değeri ise %92,43'tür (Tablo 3.20.).

**Tablo 3.20. *E. durans* M173 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	9,8219	0,75553	10,34	0,000
Doğrusal	12	7,2417	0,60347	8,26	0,001
Sükröz	1	0,0454	0,04541	0,62	0,447
Sıcaklık(°C)	1	4,8876	4,88764	66,87	0,000
İnokulum miktarı	1	0,0364	0,03638	0,50	0,495
Çalkalama hızı	1	0,6419	0,64189	8,78	0,013
pH	1	0,3519	0,35192	4,81	0,051
Maya özütü	1	0,0209	0,02093	0,29	0,603
Kazein pepton	1	0,0990	0,09898	1,35	0,269
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0000	0,00001	0,00	0,993
MgSO <sub>4</sub>	1	0,6440	0,64405	8,81	0,013
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0888	0,08884	1,22	0,294
İz mineral	1	0,3556	0,35564	4,87	0,050
NaCl	1	0,0700	0,06997	0,96	0,349
Eğim	1	2,5802	2,58020	35,30	0,000
Hata	11	0,8040	0,07309		
Uyum eksikliği	7	0,6705	0,09578	2,87	0,163
Saf hata	4	0,1335	0,03338		
Toplam	24	10,6259			

Model özeti  $R^2 = \%92,43$   $R^2(\text{pred}) = \%46,53$   $R^2(\text{adj}) = \%83,49$   $S = 0,270350$

**Tablo 3.21.** *S. mutans* 1a21'in PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,4
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	30,6
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	24,0
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	28,2
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	32,4
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	1,4
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,2
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	31,0
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	66,4
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S. mutans* 1a21'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 8,34 ve P değeri 0,001'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu gözlenmektedir. Regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %90,79'dur (Tablo 3.22.).

**Tablo 3.22.** *S. mutans* 1a21 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	15,5409	1,19546	8,34	0,001
Doğrusal	12	14,5337	1,21114	8,45	0,001
Sıcaklık(°C)	1	8,3515	8,35149	58,30	0,000
İnokulum miktarı	1	0,3976	0,39762	2,78	0,124
Çalkalama hızı	1	0,9057	0,90568	6,32	0,029

**Tablo 3.22. (Devamı)**

Glukoz	1	0,2040	0,20402	1,42	0,258
pH	1	1,4993	1,49933	10,47	0,008
Maya özütü	1	0,2420	0,24200	1,69	0,220
Kazein pepton	1	0,2000	0,20000	1,40	0,262
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,2509	0,25088	1,75	0,213
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0366	0,03664	0,26	0,623
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,1312	0,13122	0,92	0,359
İz mineral	1	1,5324	1,53236	10,70	0,007
NaCl	1	0,7825	0,78250	5,46	0,039
Eğim	1	1,0072	1,00721	7,03	0,023
Hata	11	1,5759	0,14326		
Uyum eksikliği	7	1,5559	0,22226	44,45	0,001
Saf hata	4	0,0200	0,00500		
Toplam	24	17,1168			

Model özeti  $R^2 = \%90,79$   $R^2(\text{pred}) = \%25,62$   $R^2(\text{adj}) = \%79,91$   $S = 0,378496$

**Tablo 3.23. *S.mutans* 1a21'in PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları**

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,4
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	30,6
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	24,0
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	28,2
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,2
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	32,4
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	1,4
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,2
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	31,0
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	66,4
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,0
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S. mutans* 1a21'e ait sükrözlu besiyeri varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 7,05 ve P değeri 0,001'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir.  $R^2$  değeri ise %89,29'dur (Tablo 3.24.).

**Tablo 3.24.** *S. mutans* 1a21 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	11,7450	0,90346	7,05	0,001
Doğrusal	12	9,9002	0,82502	6,44	0,002
Sükröz	1	0,0054	0,00538	0,04	0,841
Sıcaklık(°C)	1	5,2326	5,23264	40,84	0,000
İnokulum miktarı	1	0,2837	0,28370	2,21	0,165
Çalkalama hızı	1	1,4045	1,40450	10,96	0,007
pH	1	0,4830	0,48298	3,77	0,078
Maya özütü	1	0,3575	0,35751	2,79	0,123
Kazein pepton	1	0,0447	0,04475	0,35	0,566
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,3853	0,38531	3,01	0,111
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0018	0,00177	0,01	0,909
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0351	0,03511	0,27	0,611
İz mineral	1	1,3645	1,36451	10,65	0,008
NaCl	1	0,3021	0,30209	2,36	0,153
Eğim	1	1,8447	1,84471	14,40	0,003
Hata	11	1,4094	0,12813		
Uyum eksikliği	7	1,3943	0,19919	52,84	0,001
Saf hata	4	0,0151	0,00377		
Toplam	24	13,1544			

Model özeti  $R^2 = \%89,29$   $R^2(\text{pred}) = \%13,29$   $R^2(\text{adj}) = \%76,62$   $S = 0,357949$

**Tablo 3.25.** *S. warnei* S22'nin PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,6
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	24,8
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	26,0
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,8
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	24,6
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	24,0

**Tablo 3.25. (Devamı)**

25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	25,6
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	27,8
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	25,0
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	4,0
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,4
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	37,2
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	30,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,0
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,04

*S. warnei* S22'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 8,34 ve P değeri 0,001 olarak bulunmuştur. Oluşturulan modelin etkili olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %94,00'dır (Tablo 3.26.).

**Tablo 3.26. *S. warnei* S22 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	10,3077	0,79290	13,26	0,000
Doğrusal	12	8,1120	0,67600	11,30	0,000
Sıcaklık(°C)	1	5,8992	5,89915	98,63	0,000
İnokulum miktarı	1	0,0064	0,00641	0,11	0,750
Çalkalama hızı	1	0,4861	0,48610	8,13	0,016
Glukoz	1	0,0000	0,00002	0,00	0,987
pH	1	0,5114	0,51136	8,55	0,014
Maya özütü	1	0,0002	0,00017	0,00	0,959
Kazein pepton	1	0,0718	0,07176	1,20	0,297
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0478	0,04782	0,80	0,390
MgSO <sub>4</sub>	1	0,3748	0,37483	6,27	0,029
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0261	0,02606	0,44	0,523
İz mineral	1	0,5373	0,53726	8,98	0,012
NaCl	1	0,1510	0,15103	2,53	0,140
Eğim	1	2,1957	2,19573	2,1957	0,000
Hata	11	0,6579	0,05981		
Uyum eksikliği	7	0,6408	0,09154	21,39	0,005
Saf hata	4	0,0171	0,00428		
Toplam	24	10,9656			

Model özeti      R<sup>2</sup>= %94,00      R<sup>2</sup>(pred)= %52,05      R<sup>2</sup>(adj)= %86,91      S = 0,244560

**Tablo 3.27.** *S.warnei* S22'nin PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Sükröz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	30,0
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,46
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	13,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	27,4
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,22
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,36
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	27,0
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	26,2
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,4
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	3,0
25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	24,4
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	29,9
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,1
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,12
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,16
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,16
25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	27,2
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	6,4
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	1,04
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,2
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	34,4
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	28,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,4
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,92

*S. warnei* S22 'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 6,56 ve P değeri 0,002'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğu görülmektedir. Modele ait R<sup>2</sup> değeri %88,57'dir (Tablo 3.28.).

**Tablo 3.28.** *S.warnei* S22 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	9,3267	0,71744	6,56	0,002
Doğrusal	12	5,9804	0,49837	4,55	0,009
Sükröz	1	0,0047	0,00471	0,04	0,839
Sıcaklık(°C)	1	4,0545	4,05450	37,05	0,000

**Tablo 3.28. (Devamı)**

İnokulum miktarı	1	0,0785	0,07850	0,72	0,415
Çalkalama hızı	1	0,4569	0,45693	4,18	0,066
pH	1	0,3362	0,33618	3,07	0,107
Maya özütü	1	0,0171	0,01711	0,16	0,700
Kazein pepton	1	0,0088	0,00878	0,08	0,782
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,2878	0,28776	2,63	0,133
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0378	0,03776	0,35	0,569
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0803	0,08026	0,73	0,410
İz mineral	1	0,6178	0,61776	5,65	0,037
NaCl	1	0,0002	0,00015	0,00	0,971
Eğim	1	3,3463	3,34634	30,58	0,000
Hata	11	1,2036	0,10942		
Uyum eksikliği	7	1,1458	0,16369	1,33	0,017
Saf hata	4	0,0578	0,01445		
Toplam	24	10,5304			

Model özeti  $R^2 = \%88,57$   $R^2(\text{pred}) = \%10,32$   $R^2(\text{adj}) = \%75,06$   $S = 0,330785$

**Tablo 3.29. *S. epidermidis* PSI'in PB tasarımında glukoz ile elde edilen üretim miktarları**

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı (ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Glukoz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	22,2
40,0	10,0	100	40	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,2
40,0	1,0	100	40	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,04
40,0	10,0	100	80	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,04
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	25,8
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,04
25,0	1,0	200	40	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	6,2
25,0	10,0	100	80	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	32,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,0
40,0	10,0	200	80	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,04
40,0	10,0	100	40	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,14
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,04
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,04
25,0	10,0	200	40	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	28,0
40,0	10,0	200	40	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	40	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,04
25,0	1,0	100	40	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	22,4
25,0	1,0	100	40	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	24,2
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	32,0
32,5	5,5	150	60	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	28,0
25,0	10,0	200	40	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,94

*S. epidermidis* PS1'e ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 3,05 ve P değeri 0,036'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etki değerinin daha düşük görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %78,29'dir (Tablo 3.30.).

**Tablo 3.30.** *S. epidermidis* PS1 ile glukoz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	8,1139	0,62414	3,05	0,036
Doğrusal	12	5,0332	0,41943	2,05	0,122
Sıcaklık (°C)	1	2,6485	2,64846	12,94	0,004
İnokulum miktarı	1	0,2000	0,20000	0,98	0,344
Çalkalama hızı	1	0,7167	0,71669	3,50	0,088
Glukoz	1	0,0401	0,04014	0,20	0,666
pH	1	0,1542	0,15418	0,75	0,404
Maya özütü	1	0,1805	0,18050	0,88	0,368
Kazein pepton	1	0,2346	0,23458	1,15	0,307
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,5732	0,57325	2,80	0,122
MgSO <sub>4</sub>	1	0,0530	0,05305	0,26	0,621
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,0451	0,04513	0,22	0,648
İz mineral	1	0,0661	0,06612	0,32	0,581
NaCl	1	0,1211	0,12106	0,59	0,458
Eğim	1	3,0807	3,08073	15,06	0,003
Hata	11	2,2506	0,20460		
Uyum eksikliği	7	2,2031	0,31473	26,49	0,003
Saf hata	4	0,0475	0,01188		
Toplam	24	10,3645			

Model özeti      R<sup>2</sup>= %78,29      R<sup>2</sup>(pred)= %0,00      R<sup>2</sup>(adj)= %52,62      S = 0,452327

**Tablo 3.31.** *S. epidermidis* PS1'in PB tasarımında sükröz ile elde edilen üretim miktarları

Sıcaklık (°C)	İnokulum miktarı(ml)	Çalkalama hızı (rpm)	Sükröz (g)	pH	Maya özütü (g)	Kazein pepton (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA Miktarı (mg/L)
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	18,4
40,0	10,0	100	80	9	30	2	2,00	3	2	1,0	0,250	0,46
25,0	1,0	100	60	5	30	2	2,00	3	10	4,0	0,250	13,2
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	23,8
40,0	1,0	100	80	5	30	2	2,00	1	10	4,0	1,500	0,36
40,0	10,0	100	60	9	10	2	0,50	1	10	1,0	1,500	0,07
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	23,6
25,0	10,0	200	80	9	10	2	2,00	3	2	4,0	1,500	24,0
40,0	1,0	200	60	9	30	2	0,50	3	10	1,0	1,500	0,26
25,0	1,0	200	60	9	10	10	2,00	3	10	1,0	0,250	0,88
25,0	10,0	100	60	5	30	10	2,00	3	2	1,0	1,500	24,0

**Tablo 3.31. (Devamı)**

32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	19,9
40,0	10,0	200	60	5	10	10	2,00	1	10	4,0	0,250	0,16
40,0	10,0	100	60	5	10	10	0,50	3	2	4,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	80	5	10	2	0,50	3	2	4,0	0,250	0,16
40,0	1,0	100	80	9	10	10	2,00	1	2	1,0	0,250	0,16
25,0	10,0	200	60	9	30	2	0,50	1	2	4,0	0,250	26,6
40,0	10,0	200	80	5	30	10	0,50	3	10	1,0	0,250	0,04
25,0	1,0	200	80	5	30	10	0,50	1	2	1,0	1,500	0,04
40,0	1,0	200	60	9	30	10	2,00	1	2	4,0	1,500	0,32
25,0	1,0	100	60	5	10	2	0,50	1	2	1,0	0,250	24,0
25,0	1,0	100	80	9	10	10	0,50	3	10	4,0	1,500	32,4
25,0	10,0	100	80	9	30	10	0,50	1	10	4,0	0,250	30,0
32,5	5,5	150	70	7	20	6	1,25	2	6	2,5	0,875	24,0
25,0	10,0	200	80	5	10	2	2,00	1	10	1,0	1,500	0,98

*S. epidermidis* PS1'e ait sükrözlu besiyeri varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 4,46 ve P değerinin 0,09 olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %84,06'dir. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etki değerinin daha düşük görülmektedir (Tablo 3.32.).

**Tablo 3.32. *S. epidermidis* PS1 ile sükröz içeren besiyerinde HA üretiminde etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	13	7,70226	0,59248	4,46	0,009
Doğrusal	12	6,00809	0,50067	3,77	0,018
Sükröz	1	0,00003	0,00003	0,00	0,988
Sıcaklık(°C)	1	3,77233	3,77233	28,42	0,000
İnokulum miktarı	1	0,13878	0,13878	1,05	0,328
Çalkalama hızı	1	0,64082	0,64082	4,83	0,050
pH	1	0,32922	0,32922	2,48	0,144
Maya özütü	1	0,01579	0,01579	0,12	0,737
Kazein pepton	1	0,00008	0,00008	0,00	0,981
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,29622	0,29622	2,23	0,163
MgSO <sub>4</sub>	1	0,02035	0,02035	0,15	0,703
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,05325	0,05325	0,40	0,539
İz mineral	1	0,72200	0,72200	5,44	0,040
NaCl	1	0,01922	0,01922	0,14	0,711
Eğim	1	1,69416	1,69416	12,76	0,004
Hata	11	1,46006	0,13273		
Uyum eksikliği	7	1,38894	0,19842	11,16	0,017
Saf hata	4	0,07112	0,01778		
Toplam	24	9,16232			

Model özeti      R<sup>2</sup>= %84,06    R<sup>2</sup>(pred)= %0,00    R<sup>2</sup>(adj)= %65,23    S = 0,364325

**Tablo 3.33. PB tasarımı seçilen test bakterilerinin en yüksek HA üretim miktarları**

Bakteri	Karbon kaynağı	En yüksek üretim(mg/L)
<i>S. thermophilus</i> P3	Glukoz	54,0
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	62,0
<i>E. gallinarum</i> M179	Glukoz	40,4
<i>E. durans</i> M173	Glukoz	58,8
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	66,4
<i>S. warnei</i> S22	Glukoz	37,2
<i>S. epidermidis</i> PS1	Glukoz	32,0
<i>S. thermophilus</i> P3	Sükroz	36,4
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	56,0
<i>E. gallinarum</i> M179	Sükroz	34,8
<i>E. durans</i> M173	Sükroz	35,2
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	54,0
<i>S. warnei</i> S22	Sükroz	34,4
<i>S. epidermidis</i> PS1	Sükroz	32,4

**Tablo 3.34. PB tasarımı ile belirlenen üretimde etkili faktörler**

Bakteri	Karbon kaynağı	Etkili faktörler
<i>S. thermophilus</i> P3	Glukoz	Sıcaklık, pH, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaCl, iz mineral ve çalkalama hızı
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	Sıcaklık, iz mineral, pH, çalkalama hızı, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<i>E. gallinarum</i> M179	Glukoz	Sıcaklık, çalkalama hızı, MgSO <sub>4</sub> , ve iz mineral
<i>E. durans</i> M173	Glukoz	Sıcaklık, çalkalama hızı, pH
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	Sıcaklık, iz mineral, pH, çalkalama hızı, NaCl
<i>S. warnei</i> S22	Glukoz	Sıcaklık, iz mineral, pH, çalkalama hızı, MgSO <sub>4</sub>
<i>S. epidermidis</i> PS1	Glukoz	Sıcaklık
<i>S. thermophilus</i> P3	Sükroz	Sıcaklık, iz mineral, çalkalama hızı, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	Sıcaklık, iz mineral, çalkalama hızı, pH, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<i>E. gallinarum</i> M179	Sükroz	Sıcaklık, çalkalama hızı ve iz mineral
<i>E. durans</i> M173	Sükroz	Sıcaklık, MgSO <sub>4</sub> , çalkalama hızı
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	Sıcaklık, çalkalama hızı, iz mineral
<i>S. warnei</i> S22	Sükroz	Sıcaklık, iz mineral
<i>S. epidermidis</i> PS1	Sükroz	Sıcaklık, iz mineral

Plackett Burman deney sonuçlarına göre glukoz ve sükrözde en yüksek üretim miktarına sahip 2 bakteri olan *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 seçilerek cevap yüzey yöntemine geçilmiştir (Tablo 3.33.).

### 3.4.2. Cevap yüzey yöntemi ile hyaluronik asit üretimi

*S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 izolatları ile Plackett Burman deney tasarımında üretimde etkili olarak belirlenen faktörler kullanılarak cevap yüzey deney tasarımı ile HA üretimi için parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Hyaluronik asit üretiminin optimizasyonunda her parametre için alt düzey (-1), orta düzey (0) ve üst düzey (+1) olmak üzere 3 düzeyde tasarım kullanılarak üretim gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.4.). Yapılan deneyler sonucunda deneye alınan bakterilerde maksimum hyaluronik asit üretimi için Minitab 16 software Response Optimizer kullanılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Cevap yüzey deney tasarımında parametreler arasındaki ilişki, ikinci dereceden bir polinom modeli kullanılarak elde edilmiştir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Bu modelde “y” öngörülen yanıt,  $\beta_0$  sabit,  $\beta_i$ , “i” faktörünün ana etkisinin katsayısı,  $\beta_{ij}$ , “i” ve “j” arasındaki etkileşim etkisinin katsayısı,  $\beta_{ii}$  “i” faktörünün 2. derece polinom etkisi, “ $\varepsilon$ ” ise hatadır.

Cevap yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin hyaluronik asit üretimi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir ve üretim miktarları kaydedilmiştir. (Tablo 3.35-3.42.). 2 bakteri (*S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21) ve 2 şeker (glukoz, sükröz) için analizler ayrı ayrı yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda üretim miktarlarının bakterilere ve kullanılan karbon kaynağına göre değişiklik gösterdiği görülmüştür.

En yüksek hyaluronik asit üretimi için değişkenlerin birbirleri üzerindeki etkileri kontur grafikleri çizilerek kaydedilmiştir (Görsel 3.5., 3.7., 3.9., 3.11.). Değişkenler arasındaki etkileşimleri anlamak ve maksimum cevap için her bir değişkenin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla cevap yüzey grafikleri çizilmiştir (Görsel 3.6., 3.8., 3.10., 3.12.).

**Tablo 3.35.** *S. thermophilus* P4'ün glukoz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı(rpm)	pH	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	HA miktarı (mg/L)
35	80	8	0,5	4	58,0
35	80	8	0,5	5	46,2
30	147	9	0,75	3	60,0
30	100	9	0,75	3	54,2
42	100	9	0,75	4	26,0
25	120	10	1	4	28,0
25	120	10	0,5	3	30,0
25	120	8	1	3	40,4
30	52	9	0,75	5	48,2
30	100	9	0,75	3	50,6
25	80	10	1	4	20,0
30	100	9	0,75	3	54,4
25	80	8	0,5	4	60,0
30	100	9	0,75	3	56,0
25	120	8	0,5	3	42,2
35	120	10	0,5	3	18,0
35	80	10	1	3	13,0
25	120	8	1	4	50,4
25	80	10	0,5	5	18,0
25	80	8	0,5	3	48,0
30	100	11	0,75	4	1,8
35	120	10	1	3	14,0
30	100	9	0,16	5	50,0
30	100	9	0,75	5	56,0
35	80	10	0,5	5	20,4
35	80	8	1	5	57,6
35	120	8	0,5	5	48,0
25	120	8	0,5	5	40,0
25	80	8	1	4	62,0
35	80	10	1	3	16,0
35	80	10	0,5	4	14,0
18	100	9	0,75	4	18,0
30	100	9	0,75	5	54,0
25	120	10	1	5	30,2
25	80	10	0,5	4	28,4
35	120	10	0,5	4	20,0
25	120	10	0,5	5	24,0
30	100	9	0,75	4	53,2
30	100	9	0,75	4	56,4
35	80	8	1	5	45,6
35	120	8	1	4	52,6
30	100	9	0,75	4	54,0
35	120	8	1	3	56,0
35	120	10	1	4	13,0
30	100	9	1,35	5	54,0

**Tablo 3.35. (Devamı)**

30	100	9	0,75	5	56,4
30	100	9	0,75	5	60,0
30	100	9	0,75	1,62	54,0
25	80	8	1	6,34	58,0
35	120	8	0,5	4	52,4
25	80	10	1	3	26,0
30	100	6,62	0,75	3	66,0

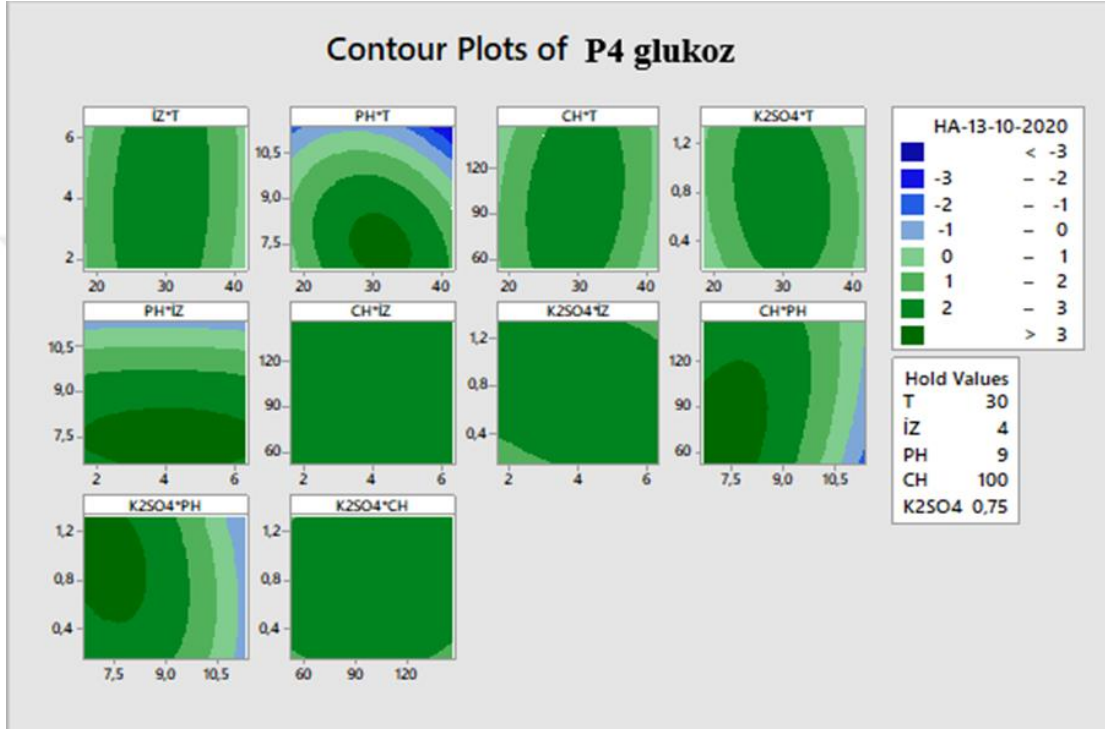
*S.thermophilus* P4 glukozlu besiyerine ait varyans analizinde çalışılan modelin F değeri 13,84 ve P değeri 0,000'dır. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %89,93'dür (Tablo 3.36.).

**Tablo 3.36. *S.thermophilus* P4 bakterisinin glukozlu besiyeri varyans analiz sonuçları (t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch:çalkalama hızı)**

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	20	34,7922	1,7396	13,84	0,000
Doğrusal	5	23,6166	4,7233	37,58	0,000
T	1	0,1096	0,1096	0,87	0,358
İZ	1	0,0000	0,0000	0,00	0,995
PH	1	23,4714	23,4714	186,73	0,000
CH	1	0,0009	0,0009	0,01	0,935
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0347	0,0347	0,28	0,603
Kare	5	9,5041	1,9008	15,12	0,000
T*T	1	6,8686	6,8686	54,64	0,000
İZ*İZ	1	0,0646	0,0646	0,51	0,479
PH*PH	1	3,2983	3,2983	26,24	0,000
CH*CH	1	0,2088	0,2088	1,66	0,207
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,3507	0,3507	2,79	0,105
Etkileşim	10	1,6715	0,1671	1,33	0,259
T*İZ	1	0,2353	0,2353	0,20	0,657
T*PH	1	0,6527	0,6527	5,19	0,030
T*CH	1	0,1128	0,1128	0,90	0,351
T*K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0935	0,0935	0,74	0,395
İZ*PH	1	0,0028	0,0028	0,02	0,882
İZ*CH	1	0,0007	0,0007	0,01	0,941
İZ*K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,1953	0,1953	1,55	0,222
PH*CH	1	0,4560	0,4560	3,63	0,066
PH*K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,1313	0,1313	1,04	0,315
CH*K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,0010	0,0010	0,01	0,929
Kalıntı	31	3,8967	0,1257		
Uyum eksikliği	22	3,8103	0,1732	18,04	0,000
Saf hata	9	0,0864	0,0096		
Toplam	51	38,6889			

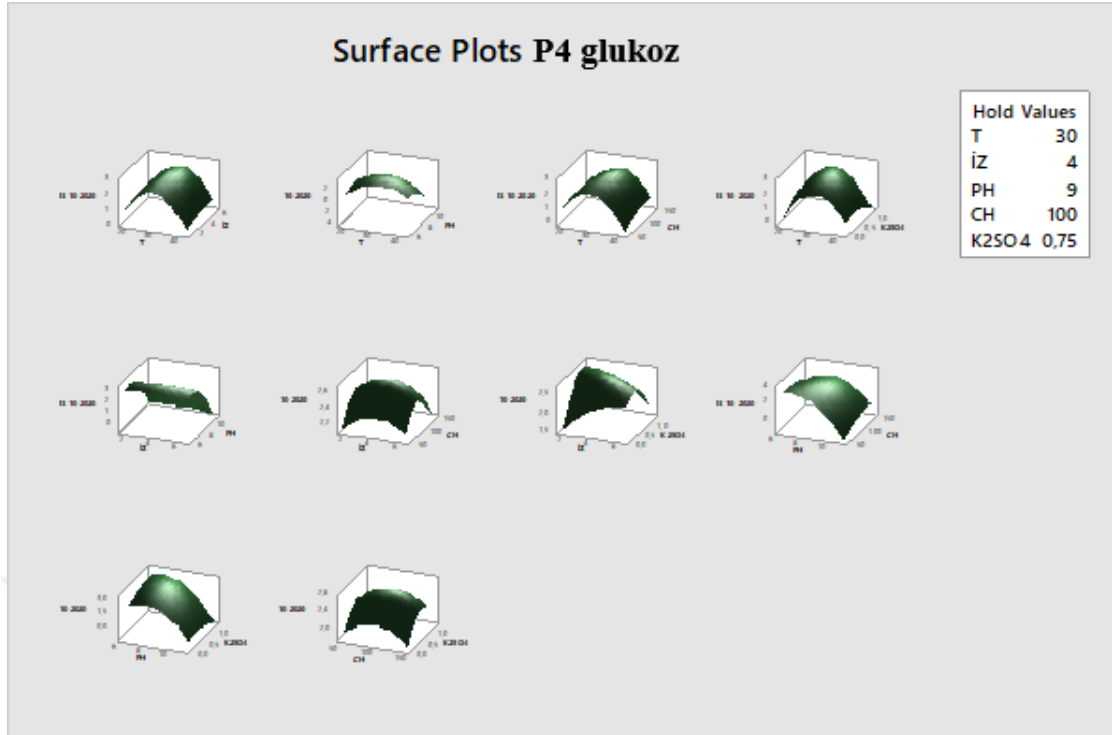
Model özeti      R<sup>2</sup>= %89,93      R<sup>2</sup>(pred)= %58,49      R<sup>2</sup>(adj)= %83,43      S = 0,354541

*S. thermophilus* P4 numaralı bakterinin glukozlu besiyeri kontur grafiğinde görüldüğü üzere incelenen sınır noktalarında sıcaklık orta noktalardayken üretimin arttığı, iz mineral miktarının artmasının üretime pozitif etkisinin olduğu, pH değerinin azalması ve K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarının artması ile üretimin arttığı görülmektedir. Tüm besiyeri bileşenlerinin birbirleri üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir (Görsel 3.5.).



**Görsel 3.5.** P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin glukozlu besiyeri kontur grafiği

P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin glukozlu besiyeri cevap yüzey grafiğinde iz mineral ve sıcaklık parametrelerinin HA üretimi üzerine olan kuadratik etkileri görülmektedir. İz mineral ve sıcaklığın HA üretimi üzerine olan negatif kuadratik etkilere bağlı olarak orta değerlere kadar üretimin arttığı ve daha yüksek değerlere çıktığında üretimini azaldığı görülmüştür. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve sıcaklık, çalkalama hızı ve sıcaklık, çalkalama hızı ve K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etkilerinde de durum benzerdir. Çalkalama hızı ve pH'nın yükselmesi ile üretimin azaldığını görülmektedir. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün artması ve pH'nın azalması ile üretim arttığı görülmektedir (Görsel 3.6.).



**Görsel 3.6.** P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin glukozlu besiyeri cevap yüzey grafiği

**Tablo 3.37.** *S. mutans* 1a21'in glukoz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı(rpm)	pH	İz mineral (ml)	NaCl (g)	HA miktarı (mg/L)
30	100	9	4	0,6	48,0
25	120	8	3	0,4	64,00
30	100	9	4	0,6	46,0
30	100	9	4	0,6	44,2
30	100	9	4	0,6	26,0
35	80	8	3	0,8	51,2
25	80	10	3	0,8	12,0
35	120	10	5	0,8	10,0
35	120	8	5	0,8	50,0
30	100	11,4	4	0,6	20,0
25	80	10	3	0,4	14,2
25	80	10	5	0,8	9,8
35	80	8	5	0,8	48,2
30	100	9	4	0,6	48,0
25	80	8	3	0,4	44,2
30	100	9	4	0,6	26,4
35	120	8	5	0,4	54,0
30	100	9	1,62	0,6	56,0
35	80	10	3	0,8	16,0
25	80	8	5	0,4	52,6
35	120	8	3	0,4	58,2
25	120	8	3	0,8	62,0
30	100	9	4	0,6	44,0

**Tablo 3.37. (Devamı)**

30	100	6,62	4	0,6	60,8
35	80	10	5	0,4	18,0
18,1	100	9	4	0,6	16,0
25	120	10	5	0,8	32,0
35	120	10	3	0,8	10,4
25	120	8	5	0,4	68,0
30	100	9	4	1,07	42,0
35	120	8	3	0,8	60,0
25	120	8	5	0,8	60,0
35	80	8	3	0,4	62,0
30	100	9	4	0,6	49,2
25	80	10	5	0,4	10,0
35	80	10	5	0,8	9,8
35	120	10	5	0,4	12,6
30	147,5	9	4	0,6	53,6
30	100	9	4	0,6	44,8
30	100	9	6,38	0,6	70,0
25	120	10	3	0,4	50,4
35	80	10	3	0,4	12,4
41,9	100	9	4	0,6	28,0
25	80	8	3	0,8	54,0
25	80	8	5	0,8	56,6
35	80	8	5	0,4	58,0
30	100	9	4	0,6	46,4
25	120	10	5	0,4	28,0
30	52,4	9	4	0,6	50,0
35	120	10	3	0,4	14,0
25	120	10	3	0,8	24,2
30	100	9	4	0,12	42,0

*S. mutans* 1a21 glukozlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 13,76 ve P değeri 0,000 bulunmuştur. P değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkili olduğu ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri ise %89,87'dir (Tablo 3.38.).

**Tablo 3.38. *S. mutans* 1a21 ile glukozlu besiyeri varyans analiz sonuçları (t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch:çalkalama hızı)**

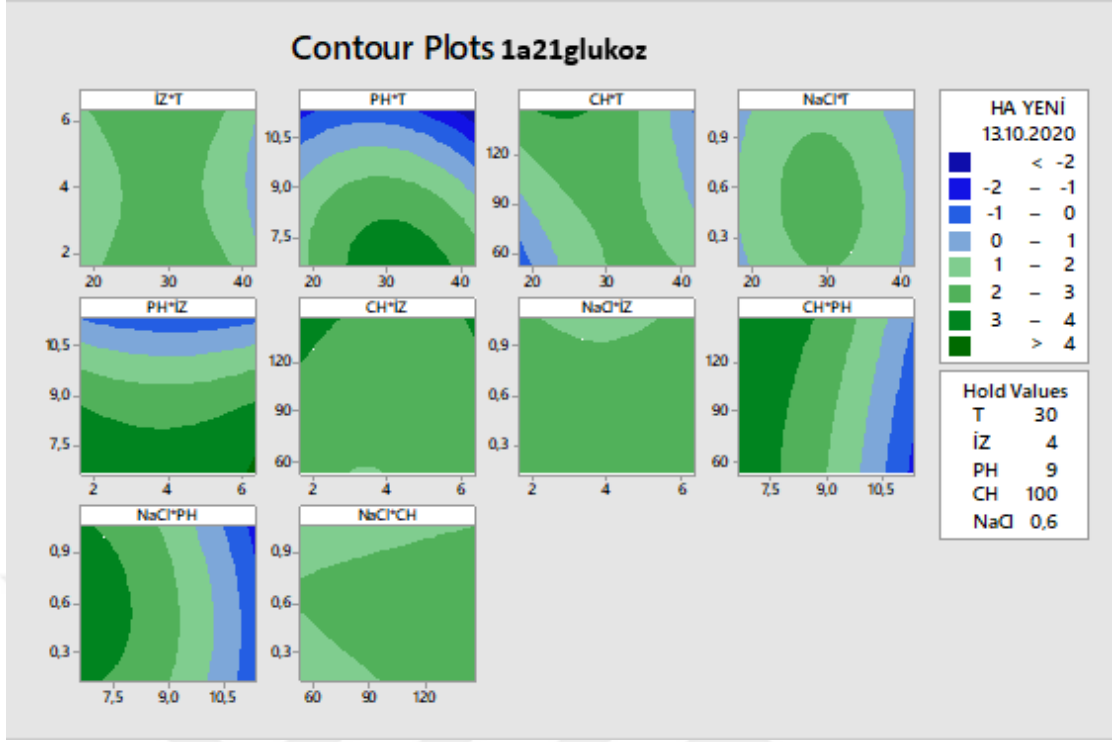
Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	20	42,7134	2,1357	13,76	0,000
Doğrusal	5	34,7551	6,9510	44,78	0,000
T	1	0,2681	0,2681	1,73	0,198
İZ	1	0,0131	0,0131	0,08	0,773
PH	1	33,2112	33,2112	213,96	0,000
CH	1	1,0938	1,0938	7,05	0,012

**Tablo 3.38. (Devamı)**

NaCl	1	0,1689	0,1689	1,09	0,305
Kare	5	5,8319	1,1664	7,51	0,000
T*T	1	3,5223	3,5223	22,69	0,000
İZ*İZ	1	0,4799	0,4799	3,09	0,089
PH*PH	1	1,5404	1,5404	9,92	0,004
CH*CH	1	0,0191	0,0191	0,12	0,728
NaCl*NaCl	1	0,2750	0,2750	1,77	0,193
Etkileşim	10	2,1263	0,2126	1,37	0,240
T*İZ	1	0,0183	0,0183	0,12	0,734
T*PH	1	0,2729	0,2729	1,76	0,195
T*CH	1	1,6223	1,6223	10,45	0,003
T*NaCl	1	0,0130	0,0130	0,08	0,774
İZ*PH	1	0,0155	0,0155	0,10	0,754
İZ*CH	1	0,0461	0,0461	0,30	0,590
İZ*NaCl	1	0,0022	0,0022	0,01	0,906
PH*CH	1	0,0591	0,0591	0,38	0,542
PH*NaCl	1	0,0213	0,0213	0,14	0,714
CH*NaCl	1	0,0557	0,0557	0,36	0,554
Kalıntı	31	4,8119	0,1552	28,52	0,000
Uyum eksikliği	22	4,7439	0,2156		
Saf hata	9	0,0680	0,0076		
Toplam	51	47,5253			

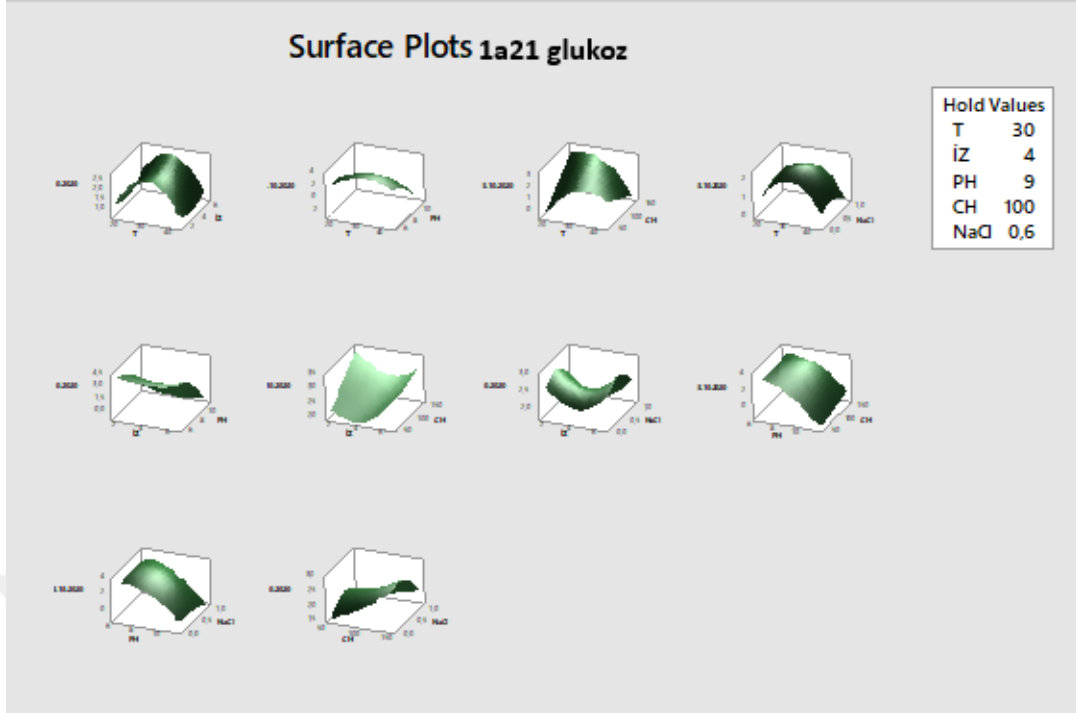
Model özeti       $R^2 = \%89,87$        $R^2(\text{pred}) = \%58,00$        $R^2(\text{adj}) = \%83,34$        $S = 0,393984$

*S. mutans* 1a21 numaralı bakterinin glukozlu besiyeri kontur grafiğine bakıldığında incelenen sınır noktalarında NaCl ve sıcaklık orta noktalardayken üretimin arttığı, pH ve sıcaklık arttıkça üretimin azaldığı, iz mineral miktarının artması pH'nın azalması ile üretimin arttığı görülmektedir. Tüm besiyeri bileşenlerinin birbirleri üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir (Görsel 3.7.).



**Görsel 3.7.** 1a21 numaralı *S. mutans* bakterisinin glukozlu besiyeri kontur grafiği

*S. mutans* 1a21 numaralı bakterinin glukozlu besiyerinin cevap yüzey grafiğinde iz mineral ve sıcaklığın hyaluronik asit üretimi üzerine olan negatif kuadratik etkilerine bağlı olarak orta değerlere kadar üretimin arttığı ve daha yüksek değerlere çıktığında üretimini azaldığı görülmüştür.  $K_2SO_4$  ve sıcaklık, çalkalama hızı ve sıcaklık etkileşimlerinde de durum oldukça benzerdir. Çalkalama hızı ve pH'nın yükselmesi ile üretimin azaldığını görülmektedir.  $K_2SO_4$ 'ün artması ve pH'nın azalması ile üretim artmaktadır. İz mineral ve NaCl orta noktalardayken üretimin azaldığı görülmektedir. Besiyeri bileşenleri arasında doğrusal olmayan etkileşimler bulunmaktadır (Görsel 3.8.).



**Görsel 3.8.** 1a21 numaralı *S. mutans* bakterisinin glukozlu besiyeri cevap yüzey grafiği

**Tablo 3.39.** *S. thermophilus* P4'ün sükröz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)	pH	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	İz mineral (ml)	HA miktarı (mg/L)
35	120	8	1	4	44,2
30	100	9	0,75	5	38,0
35	120	10	1	3	18,0
25	120	10	0,5	3	24,2
30	100	11,4	0,75	4	14,0
35	120	8	1	4	54,0
30	100	9	0,75	3	36,4
25	80	8	1	3	32,0
25	80	10	1	5	20,6
35	120	8	0,5	3	50,0
25	80	8	1	4	38,0
25	120	8	1	3	48,0
35	120	10	0,5	4	20,4
30	100	9	0,75	3	39,8
30	100	9	0,75	3	38,0
25	120	8	0,5	3	56,0
30	100	9	0,75	3	34,2
30	100	9	0,75	4	37,2
30	100	6,62	0,75	5	66,0
25	80	10	0,5	3	12,0
25	120	10	1	4	26,2
35	120	10	0,5	3	20,8

**Tablo 3.39. (Devamı)**

25	120	10	0,5	5	27,8
25	120	8	0,5	5	59,2
30	100	9	1,35	5	36,4
30	100	9	0,75	5	38,0
30	100	9	0,75	5	37,2
30	100	9	0,75	5	36,0
35	80	8	1	4	62,0
30	100	9	0,15	3	35,2
35	80	10	0,5	4	14,6
35	80	10	1	4	16,0
25	80	8	0,5	5	61,0
30	52,4	9	0,75	5	36,0
35	80	8	1	4	56,0
35	120	10	1	4	46,0
25	80	8	0,5	5	62,2
25	120	8	1	4	58,0
35	80	10	0,5	4	13,2
30	100	9	0,75	5	40,8
30	100	9	0,75	4	44,0
35	80	8	0,5	4	55,8
35	80	8	0,5	3	50,8
35	120	8	0,5	4	42,2
25	120	10	1	5	22,0
30	147,5	9	0,75	5	48,0
25	80	10	0,5	5	16,0
30	100	9	0,75	1,62	38,0
41,9	100	9	0,75	6,38	26,0
35	80	10	1	4	18,0
25	80	10	1	3	12,0
18,1	100	9	0,75	3	12,6

*S. thermophilus* P4 sükrözlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 12,81 ve P değeri 0,000'dır. Oluşturulan modelin etkili olduğu gözlenmektedir ve regresyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin R<sup>2</sup> değeri %89,21'dir (Tablo 3.40.).

**Tablo 3.40. P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin sükrözlu besiyeri varyans analiz sonuçları (t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch:çalkalama hızı)**

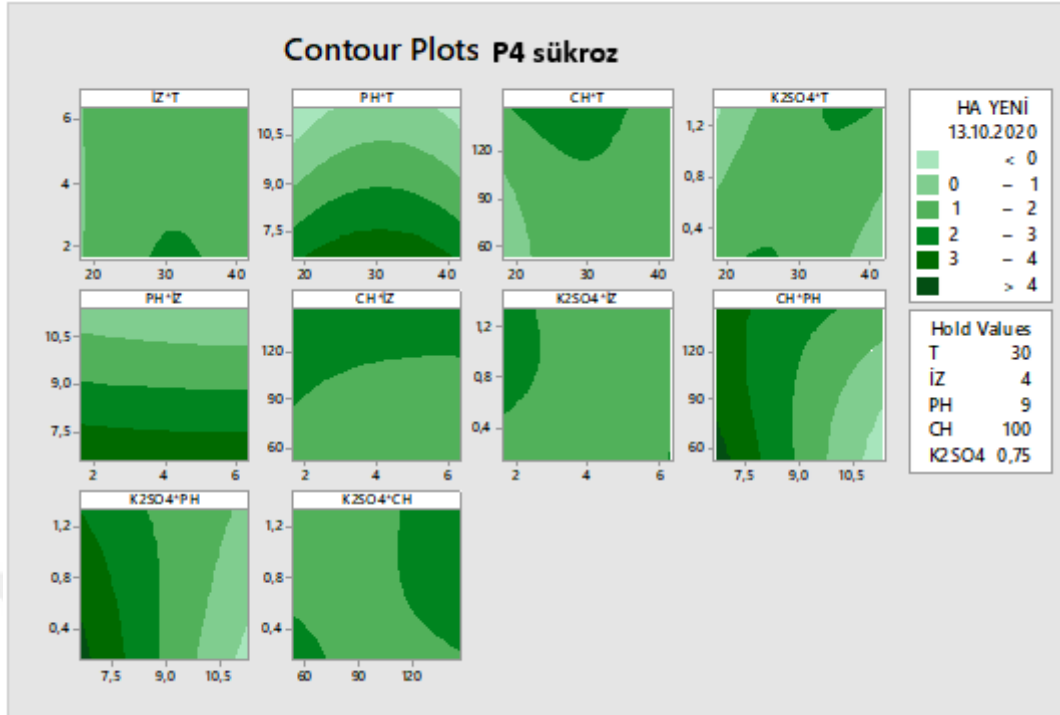
Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	20	27,5563	1,3778	12,81	0,000
Doğrusal	5	23,3243	4,6649	43,37	0,000
T	1	0,0915	0,0915	0,85	0,364
İZ	1	0,0839	0,0839	0,78	0,384
PH	1	22,5014	22,5014	209,20	0,000
CH	1	0,6393	0,6393	5,94	0,021

**Tablo 3.40. (Devamı)**

K2SO4	1	0,0084	0,0084	0,08	0,782
Kare	5	1,7805	0,3561	3,31	0,016
T*T	1	1,5203	1,5203	14,13	0,001
İZ*İZ	1	0,0105	0,0105	0,10	0,757
PH*PH	1	0,0289	0,0289	0,27	0,608
CH*CH	1	0,0932	0,0932	0,87	0,359
K2SO4*K2SO4	1	0,0130	0,0130	0,12	0,731
Etkileşim	10	2,4514	2,4514	2,28	0,039
T*İZ	1	0,0151	0,0151	0,14	0,710
T*PH	1	0,0042	0,0042	0,04	0,845
T*CH	1	0,2674	0,2674	2,49	0,125
T*K2SO4	1	0,9163	0,9163	8,52	0,006
İZ*PH	1	0,0024	0,0024	0,02	0,883
İZ*CH	1	0,0001	0,0001	0,00	0,981
İZ*K2SO4	1	0,0382	0,0382	0,35	0,556
PH*CH	1	0,6202	0,6202	5,77	0,023
PH*K2SO4	1	0,4129	0,4129	3,84	0,059
CH*K2SO4	1	0,1748	0,1748	1,63	0,212
Kalıntı	31	3,3344	0,1076		
Uyum eksikliği	22	3,2919	0,1496	31,73	0,000
Saf hata	9	0,0424	0,0047		
Toplam	51	30,8907			

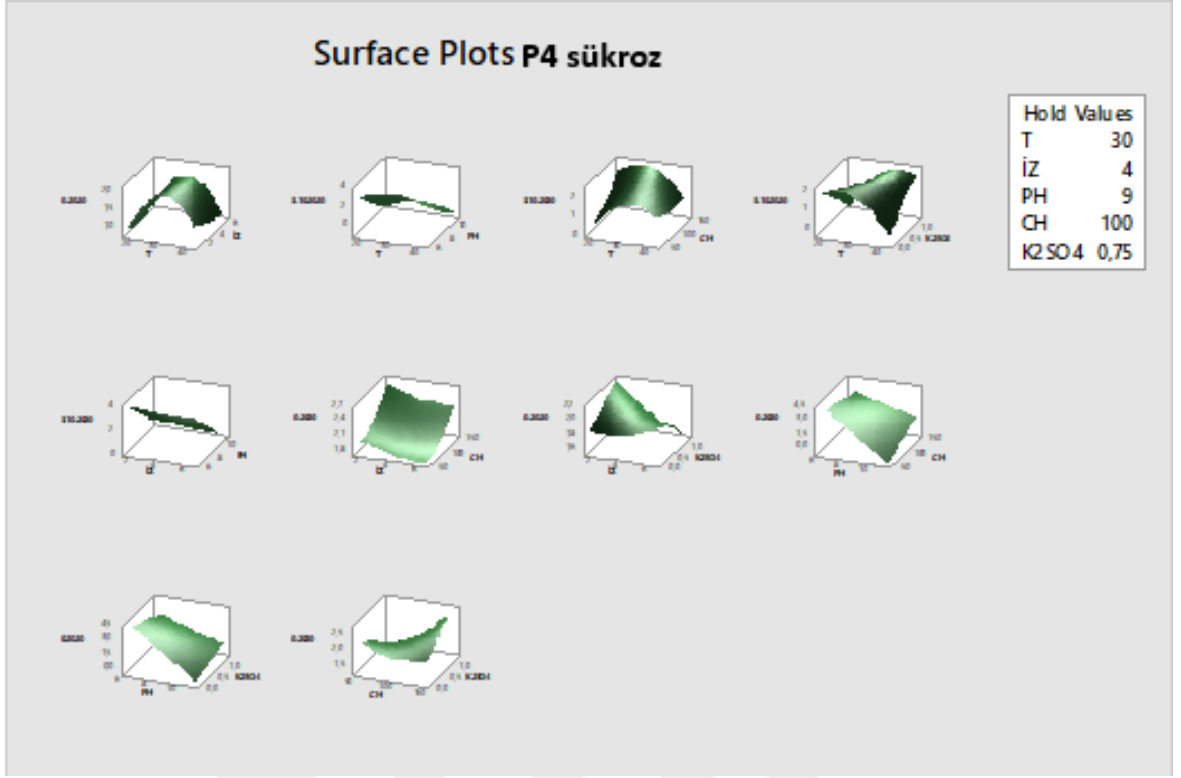
Model özeti  $R^2 = \%89,21$   $R^2(\text{pred}) = \%60,28$   $R^2(\text{adj}) = \%82,24$   $S = 0,327964$

*S. thermophilus* P4 numaralı bakterinin sükrözlu besiyeri kontur grafiğinde görüldüğü üzere incelenen sınır noktalarında sıcaklık 30°C'ye yakın olduğunda üretimin maksimum olduğu, iz mineral miktarının artmasının üretime pozitif etkisinin olduğu, pH değerinin azalması ve K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarının artması ile üretimin arttığı görülmektedir. Tüm besiyeri bileşenlerinin birbirleri üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir (Görsel 3.9.).



**Görsel 3.9.** P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin sükrözlu besiyeri kontur grafiği

*S. thermophilus* P4 numaralı bakterinin sükrözlu besiyeri cevap yüzey grafiğine bakıldığında sıcaklık ve iz mineralin orta noktalarda bulunması durumunda üretimin arttığı görülmektedir. Sıcaklık ve çalkalama hızının etkileri de benzerdir. İz mineral ve çalkalama hızının azalması ile üretim hyaluronik asit üretim miktarı azalmaktadır. Besiyeri bileşenleri arasında doğrusal olmayan etkileşimler bulunmaktadır (Görsel 3.10.).



**Görsel 3.10.** P4 numaralı *S. thermophilus* bakterisinin sükrözlü besiyeri cevap yüzey grafiği

**Tablo 3.41.** *S. mutans* 1a21'in sükröz için hazırlanan deney tasarımında HA (mg/L) miktarları

Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)	İz mineral (ml)	HA miktarı (mg/L)
30	100	4	56,0
30	100	4	58,4
35	80	3	62,0
30	133,6	4	36,0
25	120	3	56,4
35	80	5	66,0
25	80	5	56,0
30	100	4	58,0
35	120	5	64,0
35	120	3	61,2
30	100	4	60,0
30	100	4	59,2
30	100	2,3	56,0
38,4	100	4	60,0
30	100	5,7	62,0
30	100	4	58,4
21,6	100	4	18,8
30	66,4	4	54,0
25	120	5	58,0
25	80	3	54,0

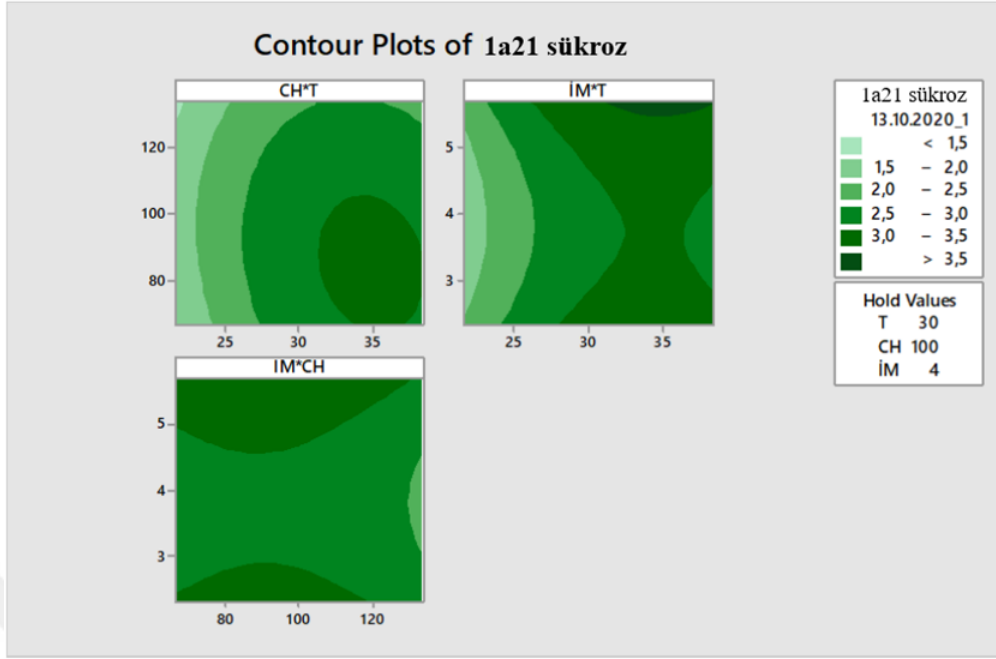
*S. mutans* 1a21 sükrözlu besiyerine ait varyans analizinde çalıştığımız modelin F değeri 1,61 ve P değeri ise 0,233'dür. Modelin R<sup>2</sup> değeri %59,24'dür (Tablo 3.42.). P değerine ve R<sup>2</sup> değerine bakıldığında oluşturulan modelin etkisinin düşük olduğu görülmektedir.

**Tablo 3.42.** 1a21 numaralı *S. mutans* bakterisinin sükrözlu besiyeri varyans analiz sonuçları (t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch:çalkalama hızı)

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Model	9	3,11595	0,34622	1,61	0,233
Doğrusal	3	1,98867	0,66289	3,09	0,076
T	1	1,76132	1,76132	8,22	0,017
CH	1	0,15049	0,15049	0,70	0,422
İM	1	0,07686	0,07686	0,36	0,563
Kare	3	1,10708	0,36903	1,72	0,226
T*T	1	0,56414	0,56414	2,63	0,136
CH*CH	1	0,14084	0,14084	0,66	0,437
İM*İM	1	0,31836	0,31836	1,48	0,251
Etkileşim	3	0,02020	0,00673	0,03	0,992
T*CH	1	0,01620	0,01620	0,08	0,789
T*İM	1	0,00320	0,00320	0,01	0,905
CH*İM	1	0,00080	0,00080	0,00	0,952
Kalıntı	10	2,14397	0,21440		
Uyum eksikliği	5	2,12923	0,42585	144,52	0,000
Saf hata	5	0,01473	0,00295		
Toplam	19	5,25992			

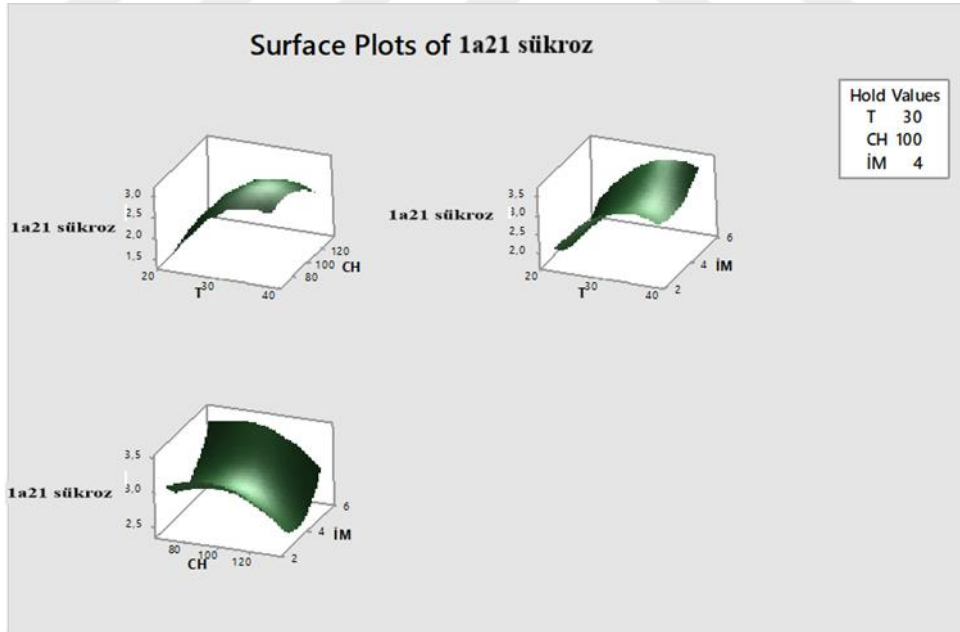
Model özeti      R<sup>2</sup>= %59,24    R<sup>2</sup>(pred)= %,00    R<sup>2</sup>(adj)= %22,56    S = 0,463030

*S. mutans* 1a21 sükrözlu besiyerine ait kontur grafiğine bakıldığında çalkalama hızının azaldığı sıcaklığın arttığı noktada üretimin arttığı, iz mineral ve sıcaklığın seçilen aralıklarda artması ile üretimin arttığı ve iz mineral miktarının artmasının üretimi pozitif etkilediği görülmektedir (Görsel 3.11.).



**Görsel 3.11.** 1a21 numaralı *S. mutans* bakterisinin süzkrozlu besiyeri kontur grafiği

*S. mutans* 1a21 süzkrozlu besiyerine ait cevap yüzey grafiği incelendiğinde sıcaklık ve çalkalama hızının üretimde birbirini olumlu etkilediği, çalkalama hızı ve iz mineral orta noktalardayken üretimin azaldığı görülmektedir (Görsel 3.12.).



**Görsel 3.12.** 1a21 numaralı *S. mutans* bakterisinin süzkrozlu besiyeri cevap yüzey grafiği

Maksimum HA verimini elde etmek için öngörülen optimum proses değişkenleri, Minitab 16 programının cevap yüzey optimizasyonu ile belirlenmiştir. Belirlenen bu parametreler kullanılarak Minitab tarafından verilen teorik sonuçları elde edebilmek için validasyon deneylerine geçilmiştir. Belirlenen optimum koşullara bakıldığında bakteriyeye

ve kullanılan karbon kaynağına göre sonuçlarda farklılık olduğu görülmektedir (Tablo.3.43).

**Tablo 3.43.** Cevap yüzey modeli ile belirlenen optimum koşullar (t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch:çalkalama hızı)

Bakteri	Şeker	Parametreler
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	T:29,87, İz:1,90, pH:6,62, CH:55,31, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1,29
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	T:26,51, İz: 6,37, pH: 6,62, CH:52,43, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 0,15
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	T:36,12, İz:6,37, pH: 6,62, CH: 52,43, NaCl: 0739
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	T:35,52, CH:82,67, İz:5,68

### 3.5. Validasyon

Validasyon deneyleri sonucunda hyaluronik asit üretim miktarları cevap yüzey yöntemi kullanılarak hazırlanan tasarım sonucunda beklenen aralıklarda olmuştur (Tablo 3.43). Böylece tasarım doğrulanmıştır. Model tarafından belirlenen optimum koşullar (Tablo 3.42.) ile yapılan çalışmalarda en yüksek üretim 50 ml’de 88,0 mg/L ile sükroz içeren besiyerinde *S. thermophilus* P4 numaralı bakteride olmuştur. Cevap yüzey yöntemi ile yapılan deney sonucunda en yüksek üretim miktarı 66,0 mg/L iken 88,0 mg/L’ye yükselmiştir. Diğer bakterilerde de aynı şekilde üretim miktarlarının arttığı görülmektedir. En az artış *S. thermophilus* P4 numaralı bakteride glukozlu besiyerinde olmuştur.

**Tablo 3.44.** Validasyon deneyleri sonucunda elde edilen üretim miktarları(t:sıcaklık, iz:iz mineral, ch: çalkalama hızı)

Bakteri	Karbon kaynağı	Parametreler	Beklenen üretim miktarı(mg/L)	Üretim miktarı(mg/L)
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	T:29,87, İz:1,90, pH:6,62, CH:55,31, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1,29	71,2 ± 18	68,0
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	T:26,51, İz: 6,37, pH: 6,62, CH:52,43, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 0,15	115,2 ± 19,5	88,0
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	T:36,12, İz:6,37, pH: 6,62, CH: 52,43, NaCl: 0739	94,6 ± 19,2	85,0
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	T:35,52, CH:82,67, İz:5,68	73,8 ± 11,6	70,0

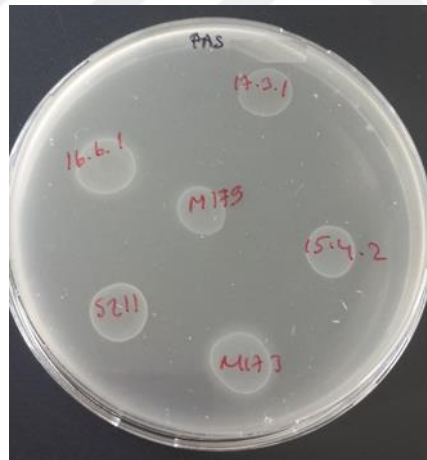
### 3.6. Atıkların HA Üretiminde Kullanılabilirliği

Atıkların HA üretiminde kullanılabilirliğini belirlemek için öncelikle test bakterilerinin bu atıkları içeren ortamlarda gelişip gelişmediği belirlenmiştir. Daha sonra

atıkların içerikleri belirlenmiştir. Optimum HA için belirlenen optimum koşullarda hangi oranlarda kullanılacaklarının belirlenmesinin ardından bu koşullarda HA üretimi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6.1. Atıkların bulunduğu besiyerlerinde bakterilerin gelişimlerinin incelenmesi

Optimizasyonda kullanılacak olan mikroorganizmaların seçilmesiyle atıkların bulunduğu ortamda gelişip gelişmeyeceğini gözlemlemek amacıyla besiyeri içerikleri değiştirilerek deneyler yapılmıştır. 3 farklı şekilde besiyeri içeriği değiştirilmiştir. 1 numaralı besiyerinde hyaluronik asit besiyerinde bulunan glukoz tamamen çıkarılarak atıklar eklenmiştir. Bakterilerin tümü geliştiğinden 2 numaralı besiyerinde 1 numaralı besiyerine ek olarak atık miktarları yarıya indirilmiştir. 3 numaralı besiyerinde ise glukoz, kazein pepton, maya özütü yarıya indirilip atıklar farklı oranlarda eklenmiştir. Deney sonuçlarına göre P3 numaralı *S. thermophilus* melas, şilempe ve zeytin posasında 3 numaralı besiyerinde gelişim göstermemiştir. Onun dışındaki tüm bakteriler tüm besiyerlerinde gelişim göstermişlerdir. Deney sonuçları tablolar halinde kaydedilmiştir (Tablo 3.45., 3.46., 3.47., 3.48.).



Görsel 3.13. Bakterilerin peynir altı suyunda gelişimi

Tablo 3.45. Bakterilerin peynir altı suyunda gelişimleri

İzolat no	Besiyeri 1	Besiyeri 2	Besiyeri 3
<i>S. thermophilus</i> P3	+	+	+
<i>S. thermophilus</i> P4	+	+	+
<i>E. durans</i> M173	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> M179	+	+	+
<i>S. mutans</i> 1a21	+	+	+
<i>S. warnei</i> S22	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> PS1	+	+	+

Besiyeri 1:glukoz yerine 10 ml peynir altı suyu eklenen besiyeri, Besiyeri 2: glukoz yerine 4 ml peynir altı suyu eklenen besiyeri , Besiyeri 3:glukoz, maya ekstraktı ve kazein peptonun tamamen çıkarılıp 10 ml peynir altı suyu eklenen besiyeri (+üreme var, -üreme yok)

**Tablo 3.46. Bakterilerin melasta gelişimleri**

İzolat no	Besiyeri 1	Besiyeri 2	Besiyeri 3
<i>S. thermophilus</i> P3	+	+	-
<i>S. thermophilus</i> P4	+	+	+
<i>E. durans</i> M173	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> M179	+	+	+
<i>S. mutans</i> 1a21	+	+	+
<i>S. warnei</i> S22	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> PS1	+	+	+

Besiyeri 1:glukoz yerine 10 ml melas eklenen besiyeri, Besiyeri 2: glukoz yerine 4 ml melas eklenen besiyeri , Besiyeri 3: glukoz, maya ekstraktı ve kazein peptonun tamamen çıkarılıp 8 ml melas eklenen besiyeri (+üreme var, -üreme yok)

**Tablo 3.47. Bakterilerin şilempede gelişimleri**

İzolat no	Besiyeri 1	Besiyeri 2	Besiyeri 3
<i>S. thermophilus</i> P3	+	+	-
<i>S. thermophilus</i> P4	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> M179	+	+	+
<i>E. durans</i> M173	+	+	+
<i>S. mutans</i> 1a21	+	+	+
<i>S. warnei</i> S22	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> PS1	+	+	+

Besiyeri 1:glukoz yerine 10 ml şilempe eklenen besiyeri, Besiyeri 2: glukoz yerine 4 ml şilempe eklenen besiyeri , Besiyeri 3:glukoz, maya ekstraktı ve kazein peptonun tamamen çıkarılıp 8 ml şilempe eklenen besiyeri (+üreme var, -üreme yok)

**Tablo 3.48. Bakterilerin zeytin posasında gelişimleri**

İzolat no	Besiyeri 1	Besiyeri 2	Besiyeri 3
<i>S. thermophilus</i> P3	+	+	-
<i>S. thermophilus</i> P4	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> M179	+	+	+
<i>E. durans</i> M173	+	+	+
<i>S. mutans</i> 1a21	+	+	+
<i>S. warnei</i> S22	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> PS1	+	+	+

Besiyeri 1:glukoz yerine 10 gr zeytin posası eklenen besiyeri, Besiyeri 2: glukoz yerine 4 gr zeytin posası eklenen besiyeri ,Besiyeri 3:glukoz, maya ekstraktı ve kazein peptonun tamamen çıkarılıp 10 gr zeytin posası eklenen besiyeri (+üreme var, -üreme yok)

### 3.6.2. Atıkların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

#### 3.6.2.1. Azot miktarlarının belirlenmesi

Semi mikrokendal yöntemi ile azot miktarları belirlenen atıkların deney sonuçları tablo 3.48.'te verilmiştir. Buna göre en yüksek azot içeriğine sahip atık %4,182 ile melas olarak belirlenmiştir. En düşük azot içeriğine sahip atık ise %1,593 ile zeytin posası olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3.49.** *Atıkların azot miktarları*

Atık	Ağırlığı (g)	Azot miktarı (%)
Melas	0,5	4,182
Şilempe	0,5	3,9484
Zeytin posası	0,5	1,593
Peynir altı suyu	-	Belirlenemedi

#### 3.6.2.2. Kuru madde miktarlarının belirlenmesi

1 gr olarak tartılan atıkların 70 derecelik etüvde 24 saatlik inkübasyonunun ardından ikinci tartımları yapılarak hesaplanan kuru madde miktarları tablo 3.49.'te verilmiştir. Kuru madde miktarı en fazla olan atık zeytin posası iken en az olan atık ise peynir altı suyudur.

**Tablo 3.50.** *Atıkların kuru madde miktarları*

Atık	Ağırlığı (g)	Kuru madde miktarı (g)
Peynir altı suyu	1	0,323
Melas	1	0,722
Şilempe	1	0,595
Zeytin posası	1	0,820

#### 3.6.2.3. Yağ oranlarının belirlenmesi

Buchii yağ ekstraksiyon sistemi ile belirlenen yağ miktarları tablo 3.51'de verilmiştir. Peynir altı suyu 70 °C'lik etüvde 48 saat inkübasyonunun ardından suyu uçurularak kalan katı kısımdan yağ analizi yapılmıştır. Buna göre en yüksek yağ içeriğine sahip atık %0,185 ile peynir altı suyu iken, en az yağ içeriğine sahip olan atık %0,036 ile zeytin posası olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3.51.** Atıkların içerdikleri yağ miktarları

Atık	Miktar	Yağ oranı(%)
Peynir altı suyu	3 ml	0,185
Melas	3 gr	0,079
Şilempe	3 gr	0,041
Zeytin posası	3 gr	0,036

#### 3.6.2.4. İndirgen şeker miktarlarının belirlenmesi

Enzimatik hidroliz sonucunda sıvıda çözünen indirgen şeker miktarı DNS metodu ile belirlenmiştir. Glukoz ile hazırlanan kalibrasyon doğrusu ile hesaplamalar yapılmıştır. Buna göre en yüksek indirgen şeker miktarı 11,7 ile şilempe iken en düşük şeker miktarına sahip atık ise peynir altı suyu olarak belirlenmiştir (Tablo 3.52.).

**Tablo 3.52.** Atıkların indirgen şeker miktarları

Atık	Ağırlığı	İndirgen şeker miktarı(mg/ml)
Peynir altı suyu	1 ml	2,1
Melas	1 ml	3,2
Şilempe	1 ml	11,7
Zeytin posası	-	Belirlenemedi

#### 3.6.3. Atıkların besiyerinde kullanım miktarlarının belirlenmesi

Atıkların bakterilerin gelişimlerini engellemedikleri belirlendikten sonra besiyerlerine hangi oranlarda ekleneceklerini belirlemek amacıyla deneyler yapılmıştır. Bu amaçla besiyerinde atıkların oranları değiştirilerek şeker yerine eklenmiştir. Şeker miktarları 60 g/L üzerinden hesaplanmıştır. Deneyler sonucunda zeytinin tüm denenen besiyerlerinde şeker yerine kullanılabileceği tespit edilmiştir (Tablo 3.53.)

**Tablo 3.53.** *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile HA üretiminde besiyerine ilave edilen atık oranları

Bakteri	Besiyeri	PAS	Melas	Şilempe	Zeytin posası
<i>S. thermophilus</i> P4	A <sup>1</sup>	%10	%30	%30	%100 <sup>3</sup>
<i>S. thermophilus</i> P4	B <sup>2</sup>	%10	%100	%100	%100
<i>S. mutans</i> 1a21	A	%10	%50	%10	%100
<i>S. mutans</i> 1a21	B	%10	%30	%10	%100

<sup>1</sup>Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra gerekiyorsa glukoz ilavesi ile tamamlanmıştır.

<sup>2</sup>Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra gerekiyorsa sükröz ilavesi ile tamamlanmıştır.

<sup>3</sup>Atık materyalin %100 kullanıldığı besiyerlerinde şeker kullanılmamıştır.

### 3.6.4. Optimum koşullarda atıklarla üretim

Deneyler 150 ml hacimli erlenlerde 50 ml besiyerinde çift paralelli olarak yapılmıştır (Görsel 3.14.). Atıklarla yapılan üretimlerin sonuçlarının kullanılan atık ve bakterilere göre değişiklik gösterdiği görülmektedir (Tablo 3.54.). Tüm bakterilerde en yüksek HA üretimi zeytin posası içeren besiyerlerinde olmuştur. *S. mutans* 1a21 numaralı bakteri glukoz içeren besiyerinde üretim miktarı 85,0 mg/L iken glukoz yerine zeytin posası kullanıldığında üretim miktarı 104,0 mg/L'a yükselmiştir (Tablo 3.35). Peynir altı suyunun *S. thermophilus* P4 ile kullanıldığı besiyerlerinde üretim miktarının aynı olduğu, *S. mutans* 1a21 ile kullanıldığı besiyerlerinde ise üretimin azaldığı görülmektedir. Melasın kullanıldığı besiyerlerinde ise *S. thermophilus* P4'te üretimin yakın olduğu, *S. mutans* 1a21 glukozda ise 85,0 mg/L'dan 90,0 mg/L'a yükseldiği görülmektedir. Şilempe kullanılan besiyerlerinde *S. mutans* 1a21' de üretim miktarları oldukça yakın olduğu *S. thermophilus* P4 numaralı bakteride ise glukozda üretim miktarı azalırken sükrozda üretim miktarının arttığı görülmektedir (Tablo 3.40.). Bu çalışmalarda şeker miktarı 60 gr/L üzerinden hesaplanmıştır.



**Görsel 3.14.** Sırasıyla zeytin, şilempe, melas, pas içeren ve atık içermeyen besiyeri

**Tablo 3.54.** Optimum koşullarda atıklar ile üretim miktarları

Bakteri	Besiyeri	Atık	Üretim miktarı (mg/L)	Atıksız Üretim (mg/L)
<i>S. thermophilus</i> P4	A <sup>1</sup>	PAS (%10)	67,0	68,0
<i>S. thermophilus</i> P4	A	Melas (%30)	65,0	68,0
<i>S. thermophilus</i> P4	A	Şilempe (%30)	56,0	68,0
<i>S. thermophilus</i> P4	A	Zeytin (%100) <sup>3</sup>	100,0	68,0
<i>S. thermophilus</i> P4	B <sup>2</sup>	PAS (%10)	86,0	88,0
<i>S. thermophilus</i> P4	B	Melas (%100)	79,0	88,0

**Tablo 3.54. (Devamı)**

<i>S. thermophilus</i> P4	B	Şilempe (%100)	93,0	88,0
<i>S. thermophilus</i> P4	B	Zeytin(%100)	97,0	88,0
<i>S. mutans</i> 1a21	A	PAS(%10)	75,0	85,0
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Melas (%50)	89,0	85,0
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Şilempe (%10)	80,0	85,0
<i>S. mutans</i> 1a21	A	Zeytin (%100)	102,0	85,0
<i>S. mutans</i> 1a21	B	PAS (%10)	65,0	70,0
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Melas (%30)	67,0	70,0
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Şilempe (%10)	67,0	70,0
<i>S. mutans</i> 1a21	B	Zeytin (%100)	101,0	70,0

<sup>1</sup>Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra glukoz ilavesi ile tamamlanmıştır.

<sup>2</sup>Besiyeri içeriği atık ilavesinden sonra sükröz ilavesi ile tamamlanmıştır.

<sup>3</sup>Atık materyalin %100 kullanıldığı besiyerlerinde şeker kullanılmamıştır.

### 3.7. Hyaluronik Asit Doğrulama Deneyleri

#### 3.7.1. Hyaluronidaz enzimi ile tayin

Hyaluronik asit hyaluronidaz enzimi ile muamele edildikten sonra spektrofotometrede 600 nm'de okuma yapıp bir standart hazırlanmıştır ve değerler kaydedilmiştir.

Hyaluronik asidin hyaluronidaz enzimini parçaladığı ve elde edilen değerlerin düştüğü gözlenmiştir. Ardından elde edilen çözeltiler hyaluronidaz enzimi ile aynı şekilde muamele edilmiştir. Spektrofotometrede 600 nm'de okuma yapıldığında tüm izolatların hyaluronidaz enzimini parçalayıp değerleri düşürdüğü gözlenmiştir (Tablo 3.55.). Kontrol olarak hyaluronidaz enzimi kullanılmadan aynı işlemler tekrarlanmıştır ve değerlerde düşme olmadığı gözlenmiştir.

**Tablo 3.55. Üretilen ürünün hyaluronidaz enzimi ile muamele değerleri (PAS:peynir altı suyu)**

Bakteri	Karbon kaynağı	Atık	İlk okuma	Son okuma
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	-	0,1152	0,0482
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	PAS	0,1165	0,0499
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	Melas	0,1518	0,0503
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	Şilempe	0,1362	0,0429
<i>S. thermophilus</i> P4	Glukoz	Zeytin	0,1268	0,0488
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükröz	-	0,1453	0,0452
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükröz	PAS	0,1518	0,0461

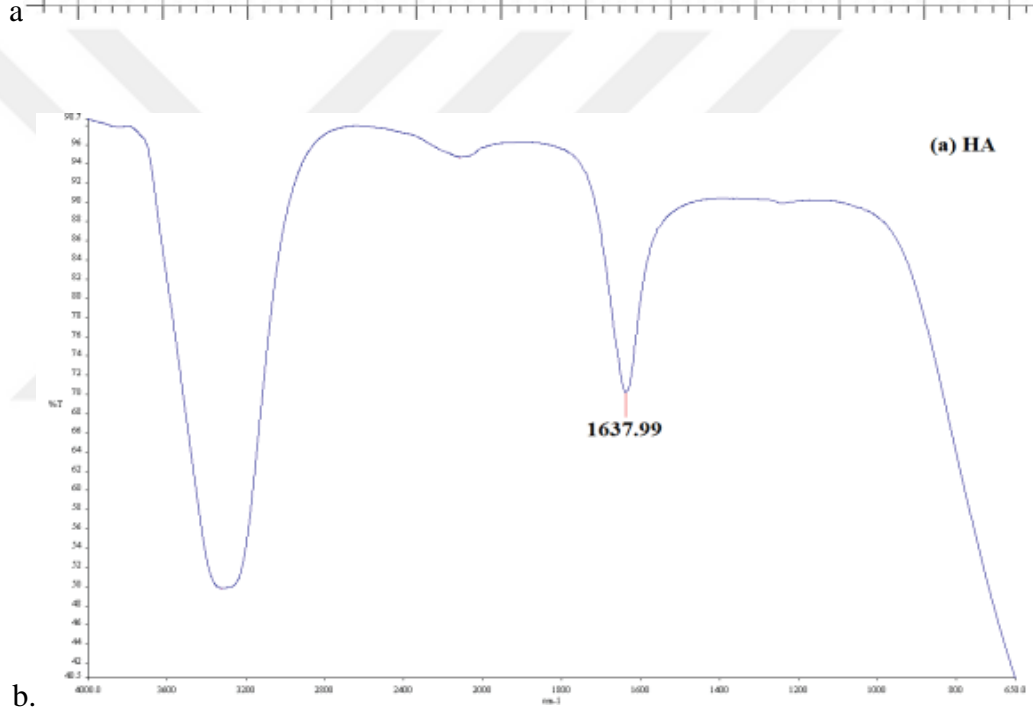
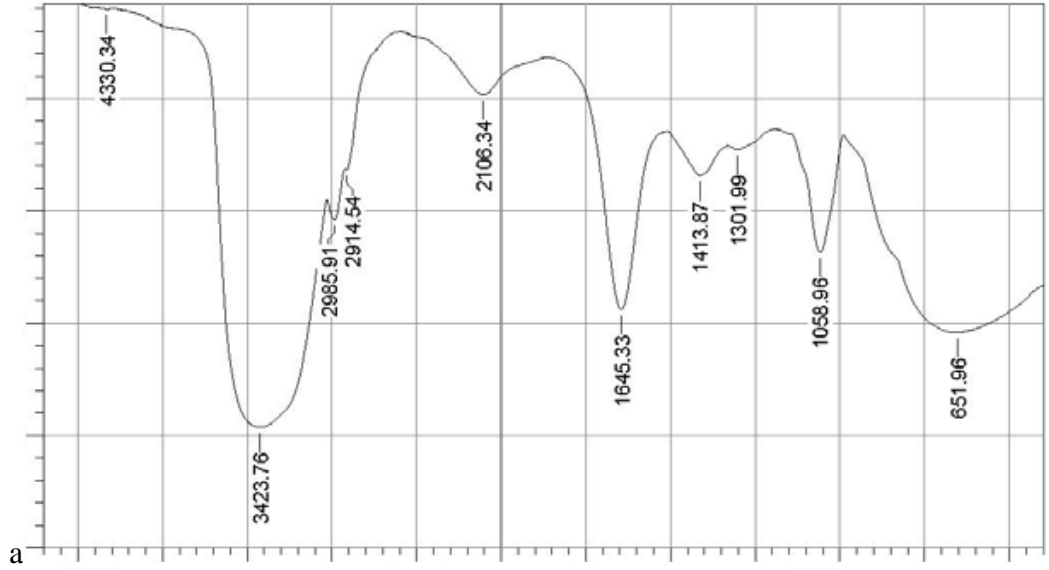
**Tablo 3.55. (Devamı)**

<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	Melas	0,1622	0,0415
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	Şilempe	0,1547	0,0503
<i>S. thermophilus</i> P4	Sükroz	Zeytin	0,1424	0,0505
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	-	0,1245	0,0447
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	PAS	0,1268	0,0433
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	Melas	0,1424	0,0528
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	Şilempe	0,1165	0,0451
<i>S. mutans</i> 1a21	Glukoz	Zeytin	0,1360	0,0484
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	-	0,1252	0,0477
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	PAS	0,1162	0,0431
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	Melas	0,1502	0,0457
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	Şilempe	0,1324	0,0503
<i>S. mutans</i> 1a21	Sükroz	Zeytin	0,1168	0,0528

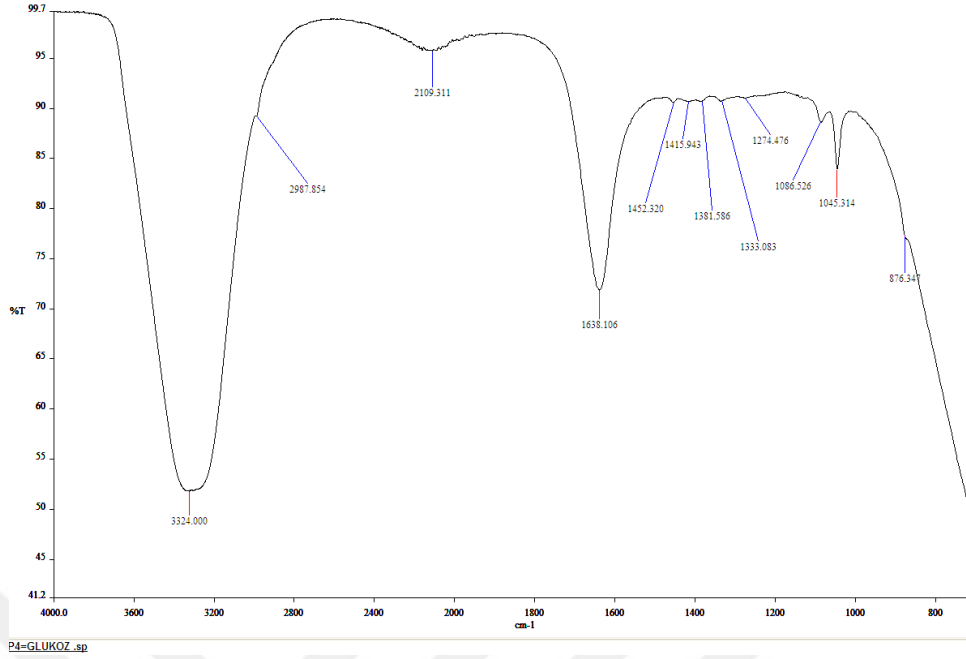
### 3.7.2. FTIR ile Tayin

Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı tarafından Perkin Elmer marka FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) cihazı ile yapılan analizde iki bakteriden (*S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21) dört ayrı atık ve iki ayrı şeker ile edilen 20 adet ürün test edilmiştir. Bu yöntem, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Elde edilen spektrumlar literatürde bulunan hyaluronik asit FTIR spektrumu (Görsel 3.14.) ile karşılaştırılmıştır ve ürünlerin tümünün hyaluronik asit olduğu tespit edilmiştir (Görsel 3.16-3.35.).

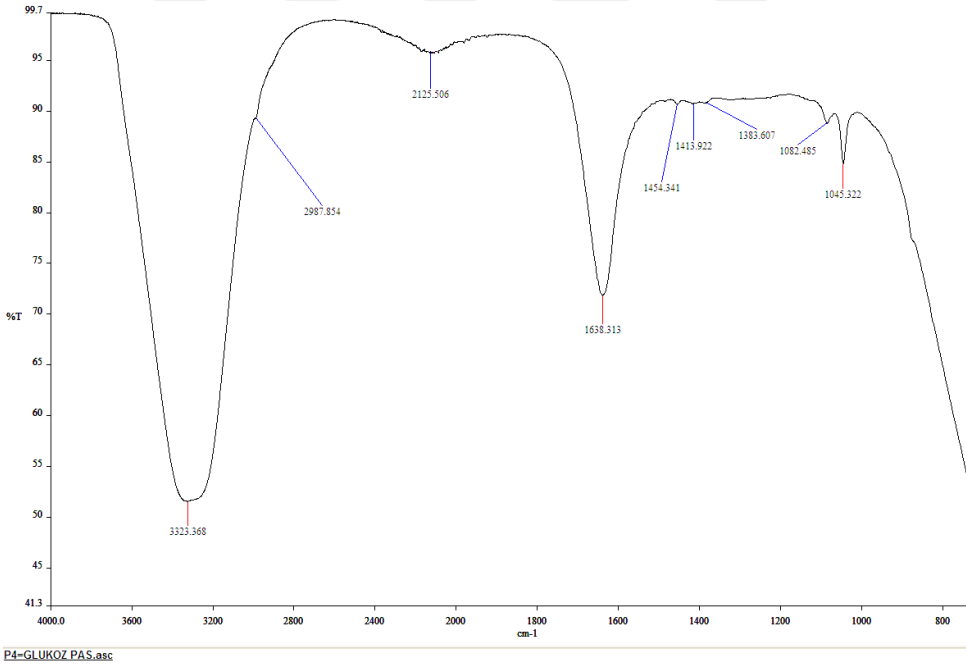
Glukoz, sükroz, peynir altı suyu, zeytin posası, melas ve şilempe içeren ortamlarda *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile üretimi yapılan hyaluronik asitlerin FTIR spektrumları benzer özellikler göstermiştir (Görsel 3.16-3.35.). 3319.83-3327.75  $\text{cm}^{-1}$  arasında ve 1638,186-1638,248  $\text{cm}^{-1}$  arasında değişen keskin iki pik ile karakterize edilmiştir. Bu spektrum saf HA spektrumuyla da benzerlik göstermektedir. (Görsel 3.15.). 1638.18 $\text{cm}^{-1}$  ile elde edilen tepe noktası N-asetil D-glukozamin omurgasında bulunan CO-NH<sub>2</sub>'ye (amid-II grubu) karşılık gelmektedir.



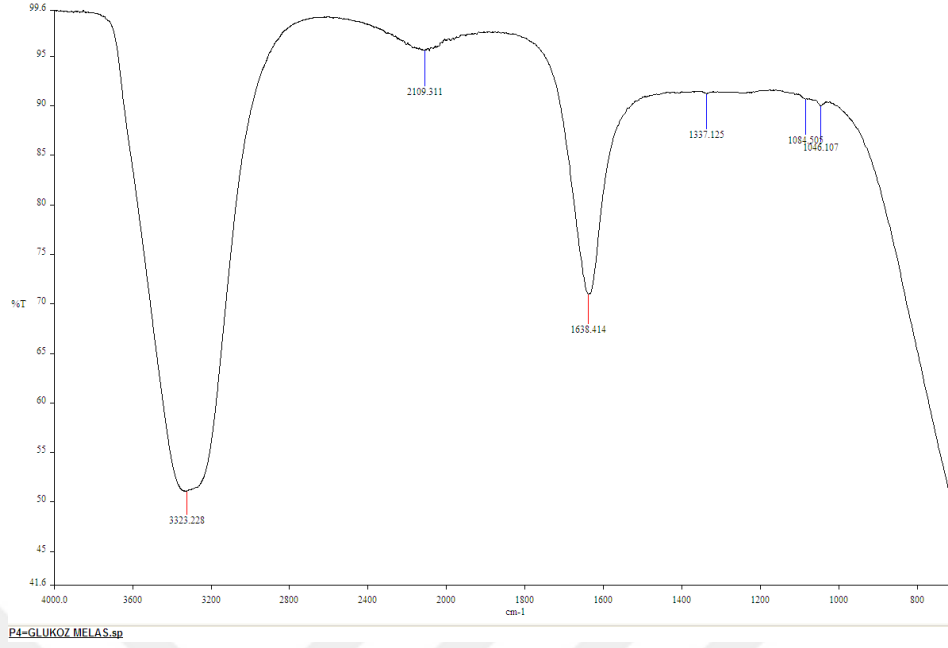
Görsel 3.15. Literatüden elde edilen HA spektrumları a. Hamad vd. 2017 b. Ahmad vd.2015.



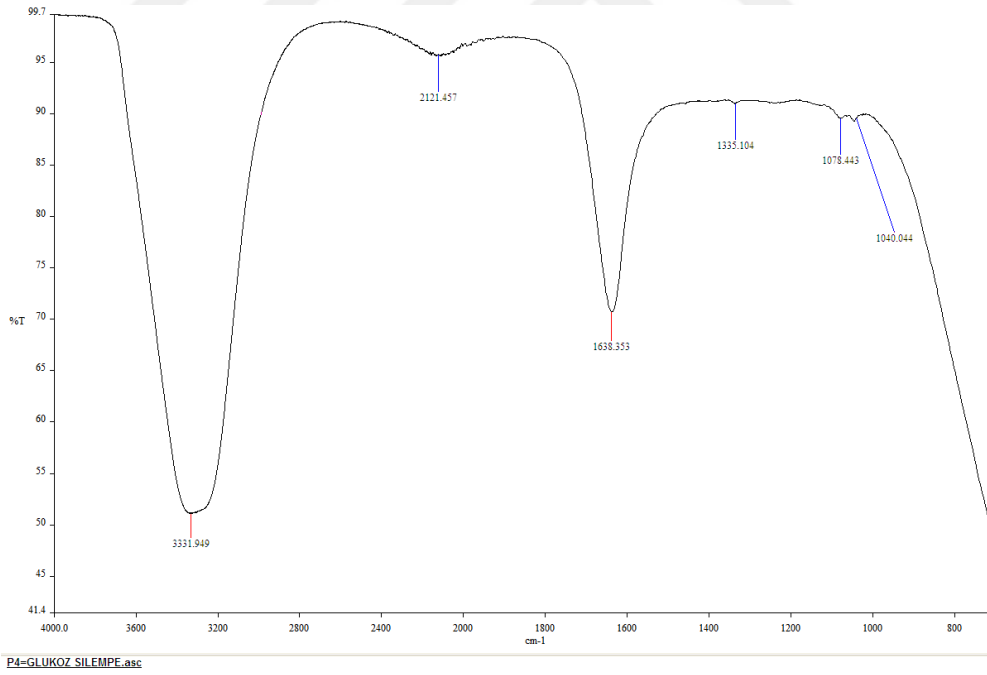
**Görsel 3.16.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



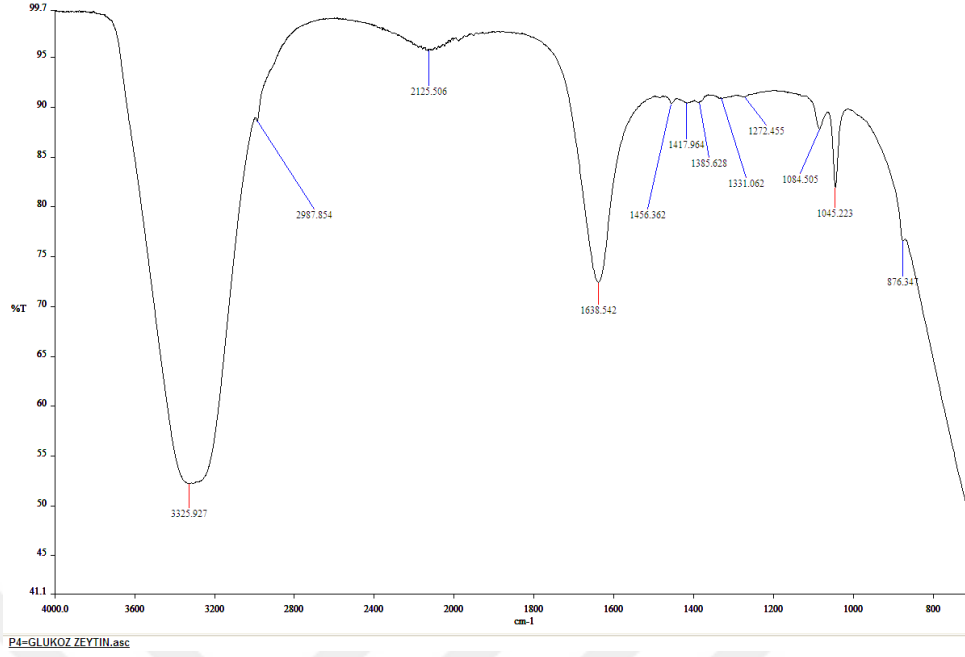
**Görsel 3.17.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



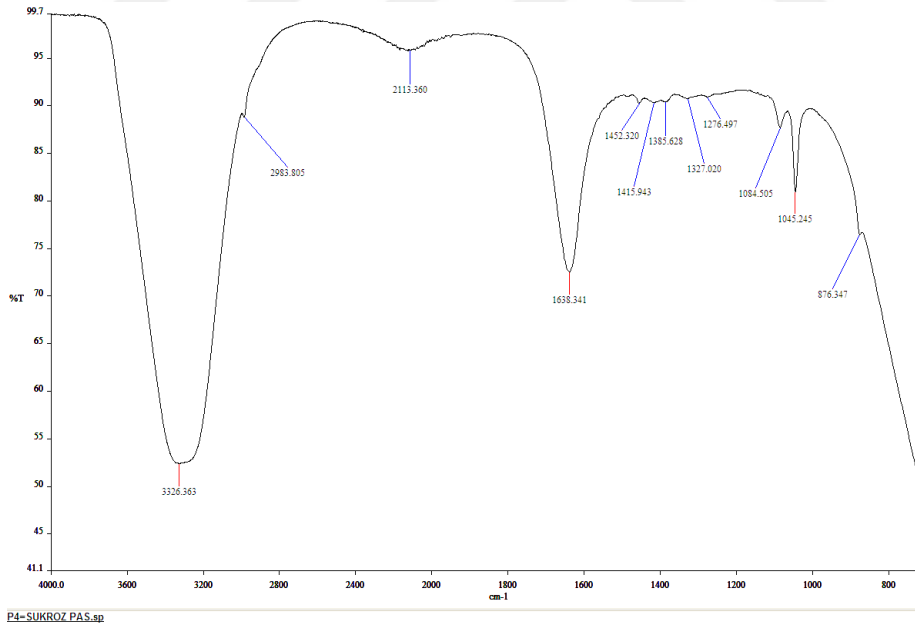
**Görsel 3.18.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



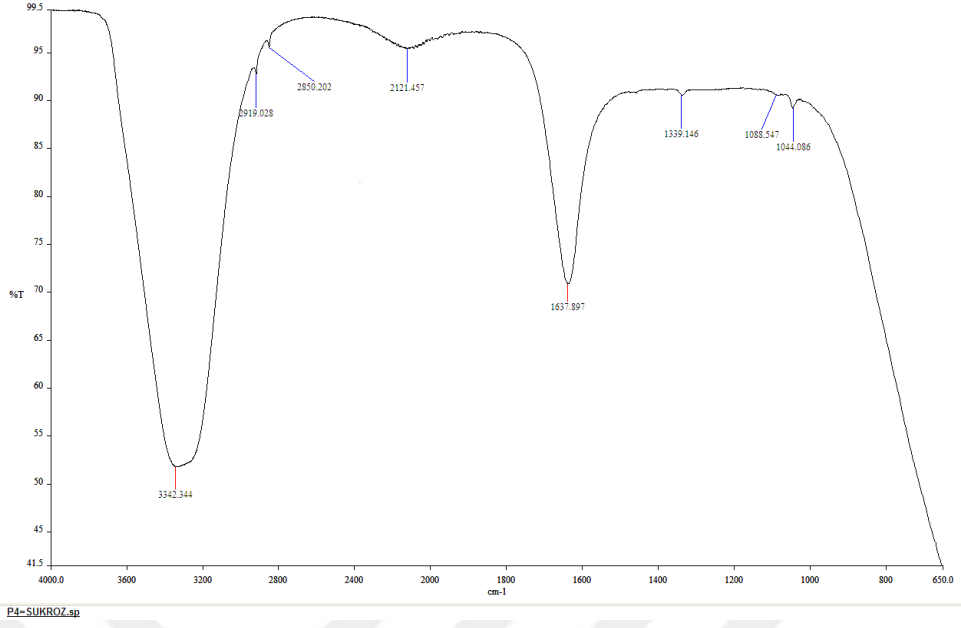
**Görsel 3.19.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



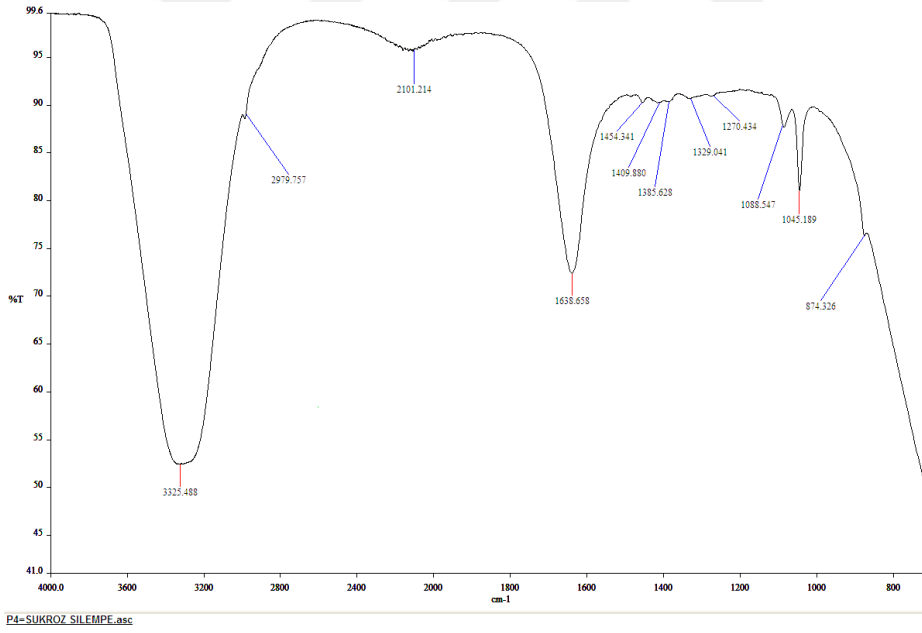
**Görsel 3.20.** *S. thermophilus* P4 ile glukoz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



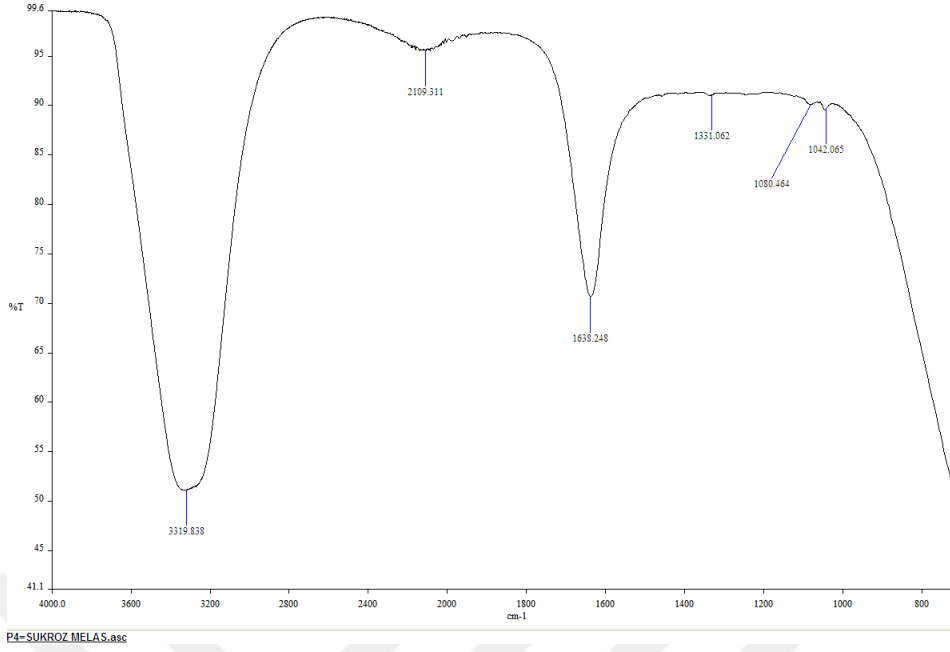
**Görsel 3.21.** *S. thermophilus* P4 ile sükröz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



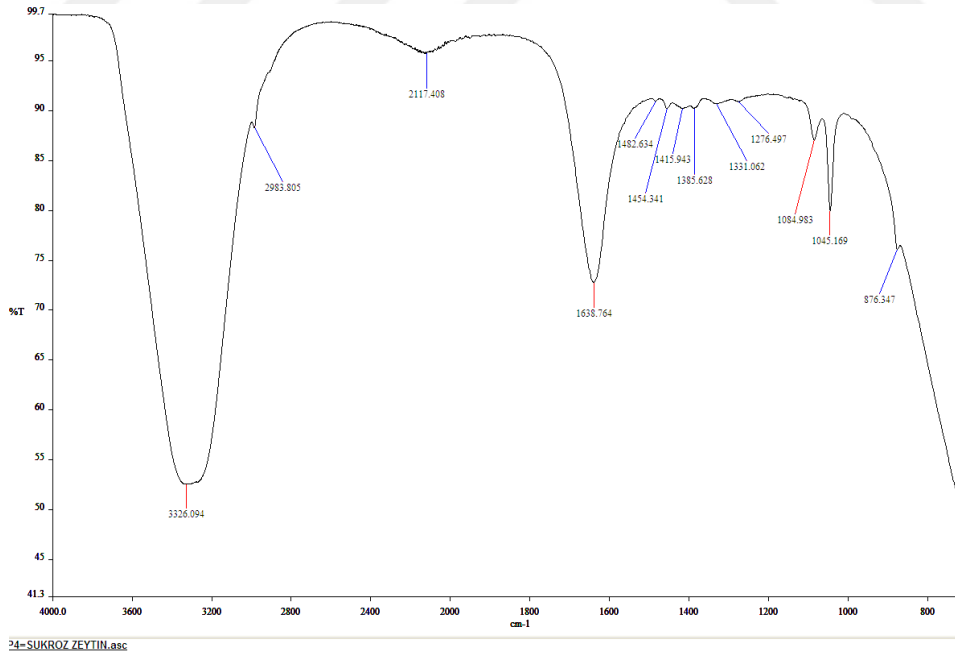
**Görsel 3.22.** *S. thermophilus* P4 ile sükröz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



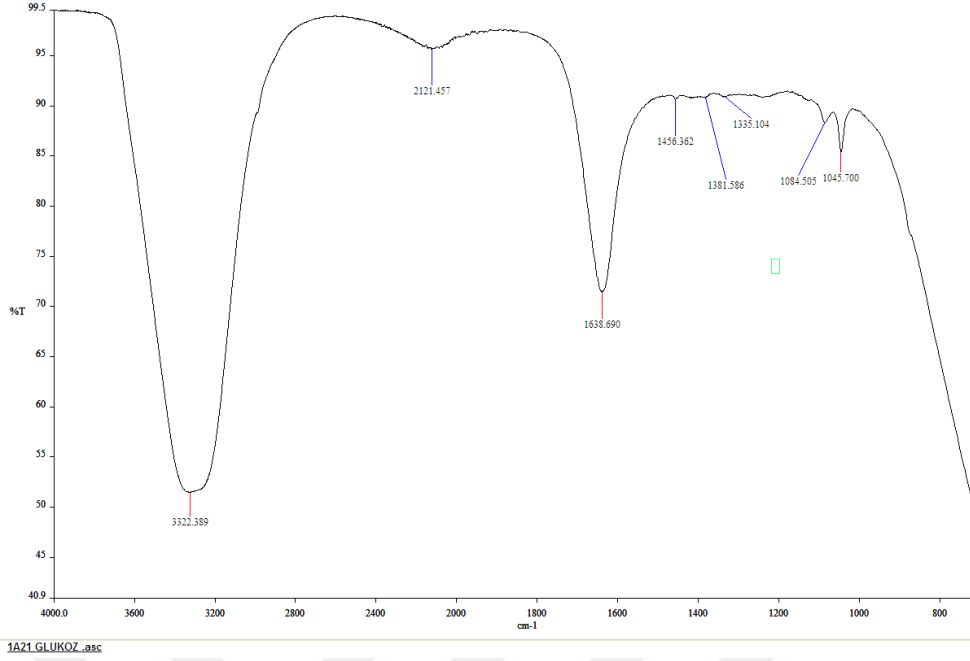
**Görsel 3.23.** *S. thermophilus* P4 ile sükröz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



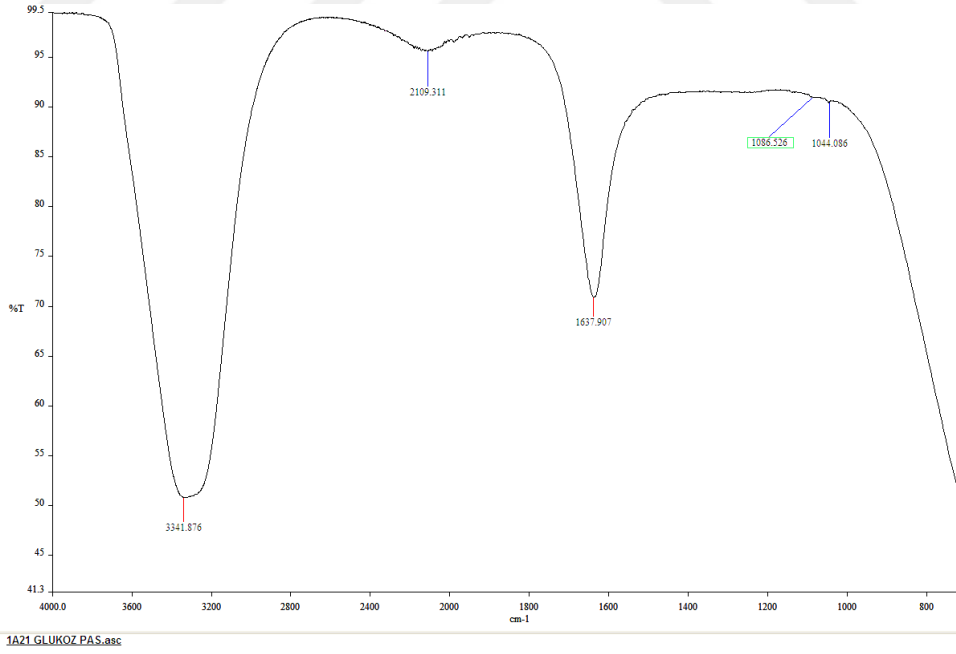
**Görsel 3.24.** *S. thermophilus* P4 ile sükröz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



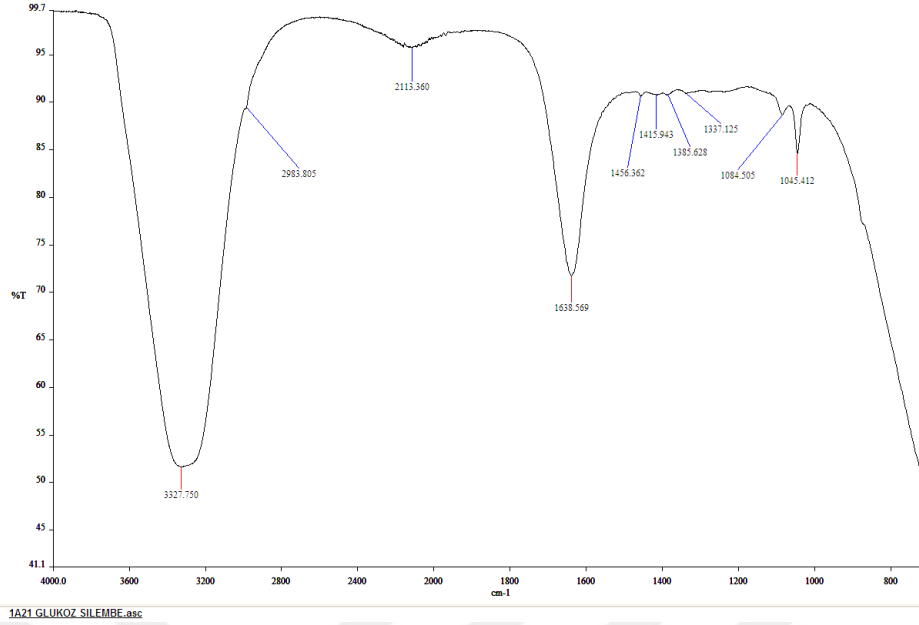
**Görsel 3.25.** *S. thermophilus* P4 ile sükröz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



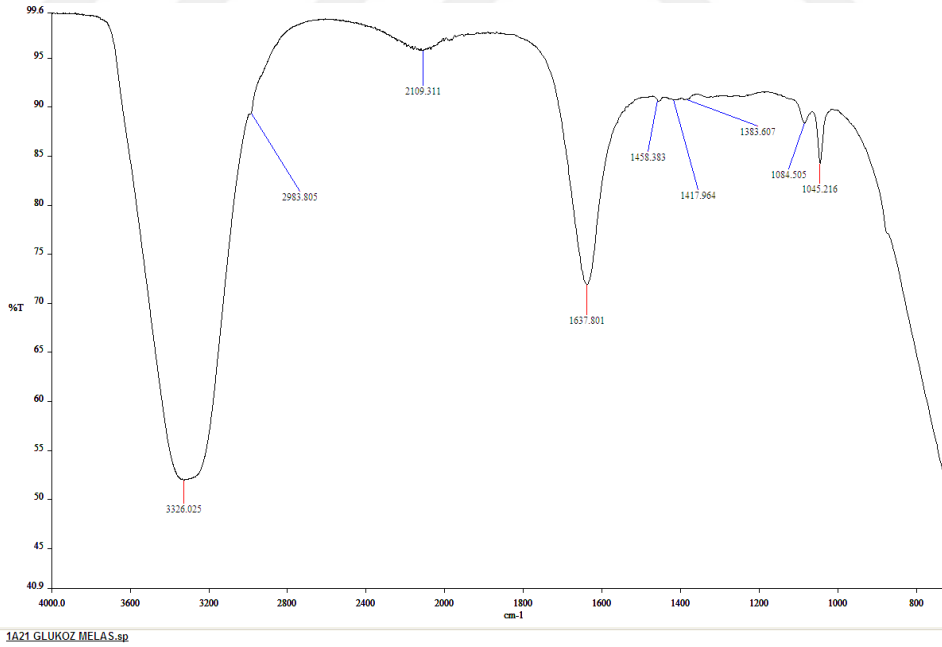
**Görsel 3.26.** *S. mutans 1a21* ile glukoz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



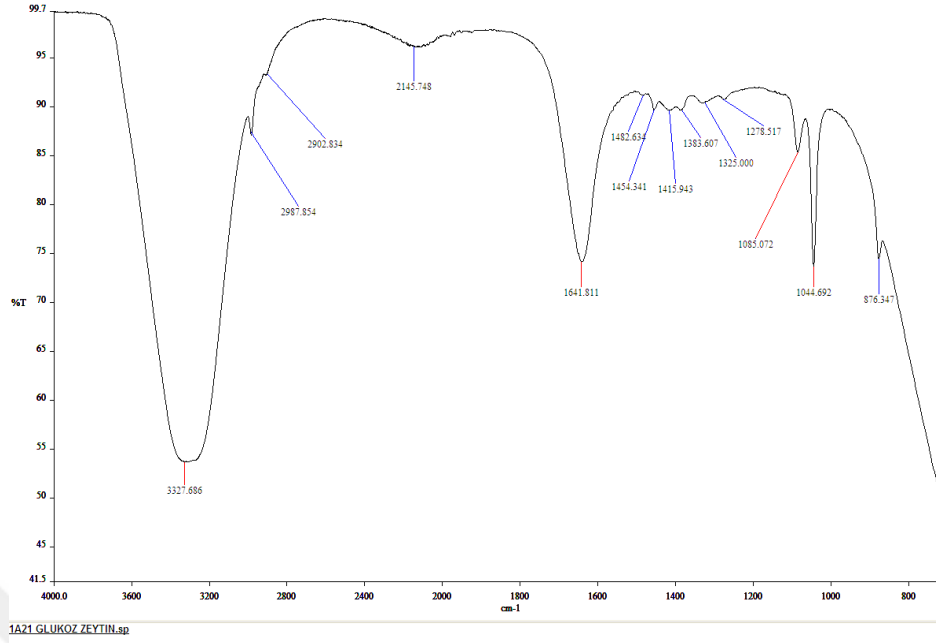
**Görsel 3.27.** *S. mutans 1a21* ile glukoz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



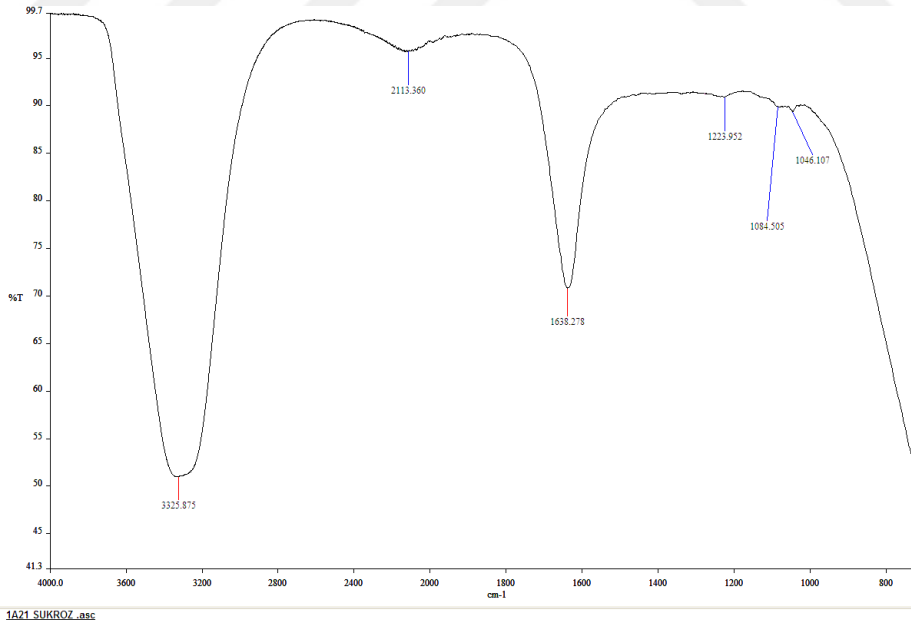
**Görsel 3.28.** *S. mutans 1a21* ile glukoz ve şilempe içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



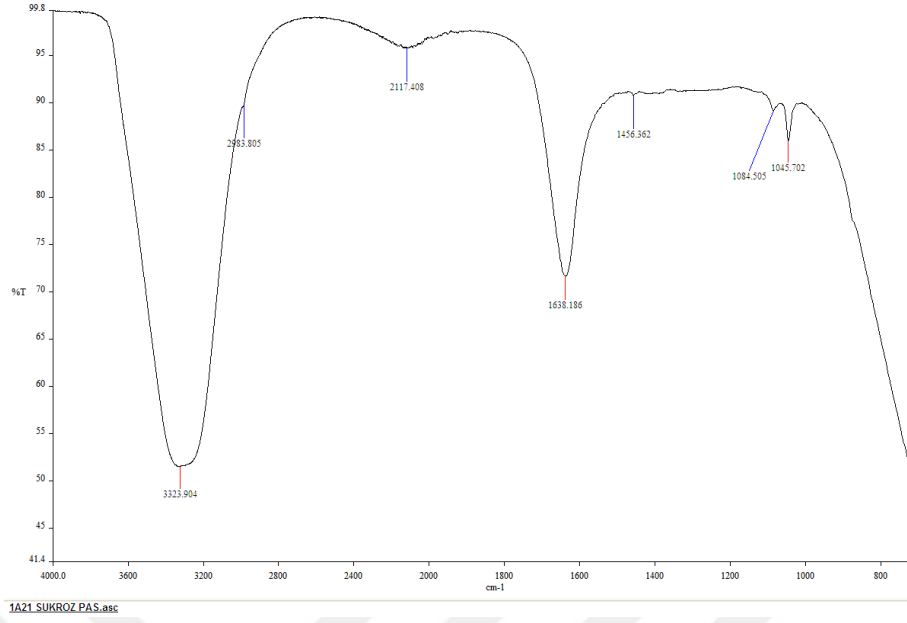
**Görsel 3.29.** *S. mutans 1a21* ile glukoz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



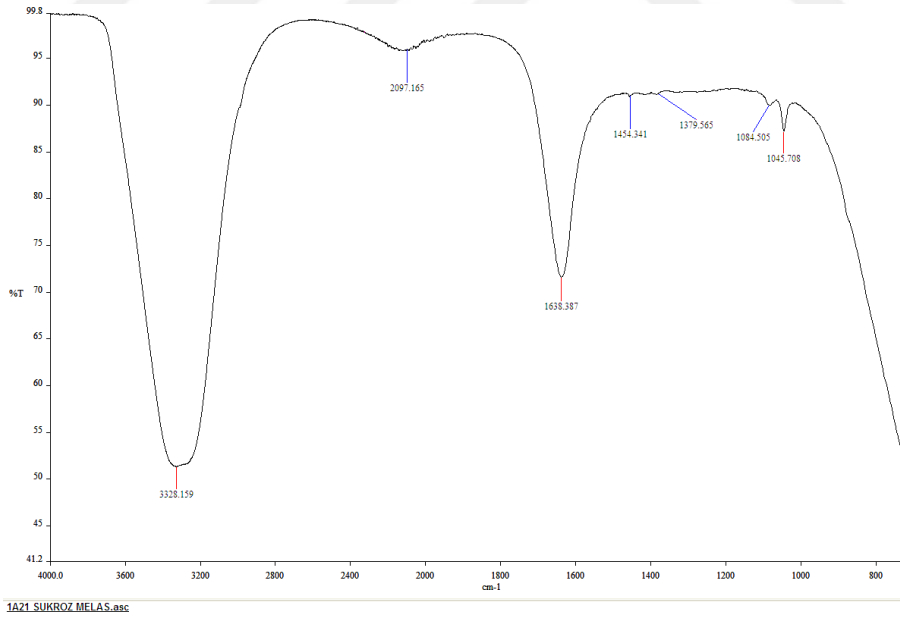
**Görsel 3.30.** *S. mutans 1a21* ile glukoz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



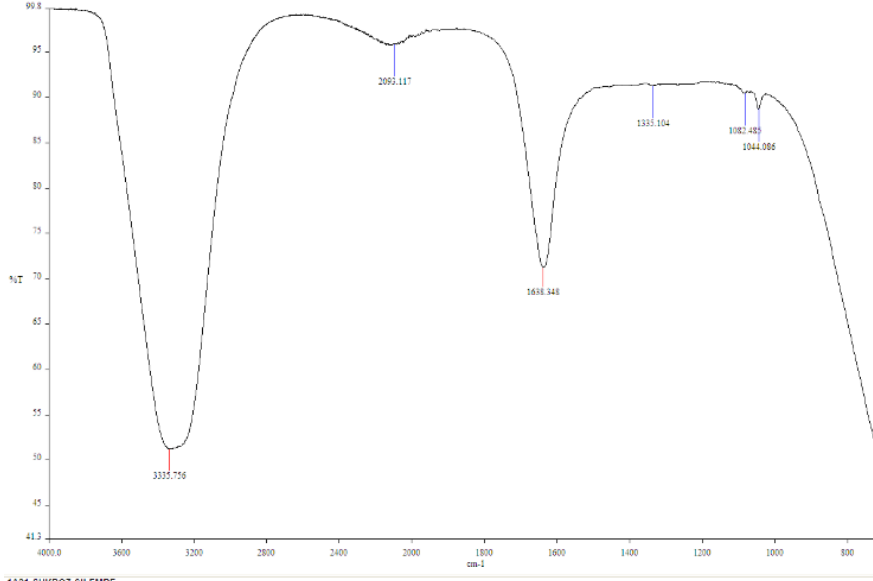
**Görsel 3.31.** *S. mutans 1a21* ile sükröz içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



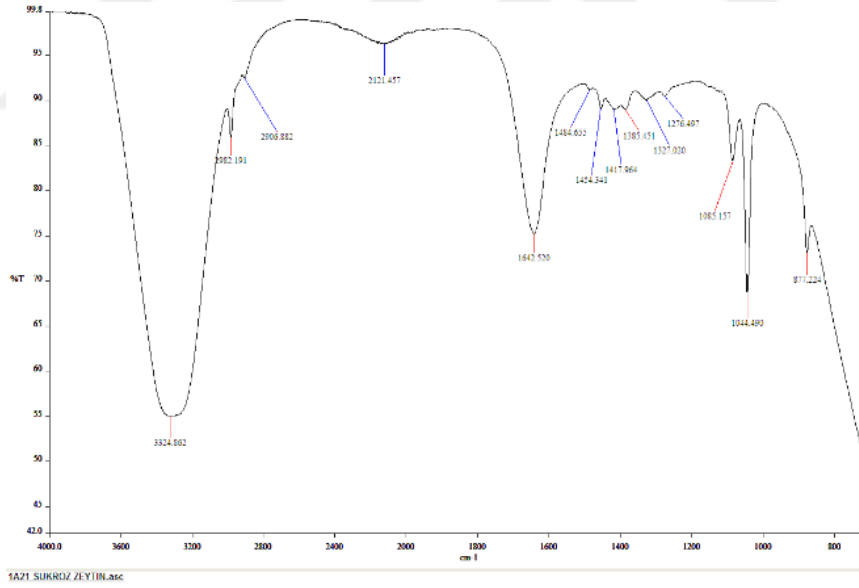
**Görsel 3.32.** *S. mutans 1a21* ile sükröz ve peynir altı suyu içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



**Görsel 3.33.** *S. mutans 1a21* ile sükröz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



**Görsel 3.34.** *S. mutans 1a21* ile sükkroz ve melas içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu



**Görsel 3.35.** *S. mutans 1a21* ile sükkroz ve zeytin posası içeren besiyerinden üretilen HA'nın FTIR spektrumu

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

1980 yılından itibaren streptokok suşları kullanılarak fermentasyon ile ticari üretimi yapılmakta olan hyaluronik asit, canlı vücudunda epitel ve sinir dokunun önemli bileşenlerinden biri olmasının yanında sinovyal sıvı, bağ doku, göz vitröz sıvısı, hyalin kırıkardak, eklem sıvısı, göbek kordonu gibi farklı bölgelerde bulunmaktadır ve canlı vücudunda birçok görev almaktadır. Bunun yanında sahip olduğu özellikler nedeniyle kozmetik, tıp, gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Gün geçtikçe yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte hyaluronik asidin önemi daha çok anlaşılmıştır. Kullanım alanının çok geniş olmasına bağlı olarak hyaluronik aside duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Bu sebeplerden dolayı ekonomik öneme sahip olan hyaluronik asidin dünyada sahip olduğu pazar hacmi oldukça yüksektir (Yılmaz ve Turhan 2008).

Geniş kullanım alanına sahip bir ürünün hayvanlardan ekstraksiyon metotları yerine fermentasyonla üretilebilir oluşu maliyetlerin azaltılması ve üretim miktarlarının artırılması yönünden oldukça avantajlıdır. Son zamanlarda gerçekleşen çalışmaların büyük çoğunluğu da fermentasyonla HA üretiminin iyileştirilmesi yönündedir.

Hyaluronik asit üretiminde test edilecek bakteriler peynir ve yoğurttan bakteriler izole edilerek tanımlanmıştır. Peynir ve yoğurttan izolasyon sonunda toplam 42 izolat elde edilmiştir. İzolasyon işleminde *S.thermophilus* elde edilmek istenildiğinden basiller göz ardı edilmiş olup yalnızca gram pozitif özellik gösteren kokların saflaştırılması yapılmıştır (Tablo 3.1.). Bu izolatlar gram pozitif test kitleri kullanılarak biyokimyasal özellikleri açısından Vitek 2 sistemi ile tanımlanmıştır ve aynı ortamdan izole edilen aynı cins mikroorganizmalarda dahi biyokimyasal açıdan farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2.). İzolasyon sonrası *S. thermophilus* cinsi bakterilerin maksimum gelişme sıcaklığı 45°C olarak belirlenmiştir. Harnett vd. (2011) *S. thermophilus* için optimum büyüme sıcaklığını 40–45°C, minimum 20–25°C ve maksimum 47–50°C civarında olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada ilk olarak karbazol reaksiyonuna göre hyaluronik asit üretimi açısından bir tarama yapılarak HA üreten izolatlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu reaksiyon karbazolün karbonhidratlar ile reaksiyona girmesi ile mor renk oluşumu esasına dayanmaktadır (Cesaretti vd., 2003). İzole edilen 42 bakteri içerisinde 10 adet *S. thermophilus* ve 2 adet *S. epidermidis* taramaya alınmıştır. Geri kalan bakteriler deneylere alınmamıştır. Bu bakteriler dışında Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Lactococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*,

*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* cinsi 8 adet bakterinin eklenmesiyle toplam 20 adet bakteri hyaluronik asit üretimi açısından taramaya alınmıştır. Bu reaksiyona göre mor renk oluşumu gösteren 10 adet *S. thermophilus*, 2 adet *S. epidermidis* ve Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen bakteriler arasından *S. mutans* 1a21, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22 cinsi bakteriler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya saflaştırılan mikroorganizmalar arasından seçilen 2 adet *S. thermophilus* ve 1 adet *S. epidermidis* alınmıştır. Bu bakterilerin yanında Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *E. durans*, *E. gallinarum*, *S. mutans* ve *S. warnei*'nin de dahil edilmesiyle optimizasyon çalışmalarına yedi bakteri ile devam edilmiştir ve bu bakteriler dizi analizleme yöntemi ile moleküler olarak tanımlanmıştır (Tablo 3.4.).

Fermentasyon ile geleneksel olarak hyaluronik asit üretimi amacıyla *Streptococcus* cinsi bakteriler yoğun olarak kullanılmaktadır (Deangelis P., 1996). *Pasteurella multocida* ve Gram-pozitif Streptococcus Grup A ve C gibi bazı bakteriyel patojenler HA zincirleri üretebilmekte ve salgılayabilmektedir ( DeAngelis vd., 1997). Streptokoklar arasında HA üretiminde en çok kullanılan türler *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ve *Streptococcus pyogenes*'tir (Oliveira vd., 2016). Özellikle A gurubu streptokoklarda bulunan hyaluronik asitten oluşan kapsül, mikroorganizmadan yeni ayrıldığında ve zengin besiyerlerinde bulunduğu anda açığa çıkmaktadır ve üretim sırasında kapsül görülmemektedir. Besiyeri içerisinde hyaluronik asit maddesi dağılmış olarak bulunmaktadır (King, 1992). *Streptococcus* türleri, *S. zooepidemicus*, *S. pyogenes*, *S. uberis* ve *S. equi*, yapışma özelliklerine aracılık etmek ve fagositoza karşı direnmek için HA kapsüller materyalini sentezlemektedir. Ancak son yıllarda Streptococcus türleri ile üretilen HA ekzotoksinlerin varlığı nedeniyle standartlara uymadığı için rekombinant suşların geliştirilmesi yoluna gidilmeye başlanmıştır. Alternatif bir strateji olarak rekombinant *Lactococcus lactis* (Prasad vd., 2010), *Escherichia coli* (Yu vd., 2008), *Bacillus subtilis* (Widner vd., 2005), *Agrobacterium* sp. (Mao ve Chen 2007), *Pichia pastoris* (Jeong vd., 2014) ile HA üretim çalışmaları yapılmıştır.

Süt ürünlerinden izole edilen, hyaluronan da dahil olmak üzere yararlı ekzopolisakkaritlerin yüksek üretkenliğine sahip *S. thermophilus* suşları, güvenli bir

hyaluronan üreten organizma olarak belirlenmiştir (Boeriu vd., 2013; Izawa vd., 2008). Izawa vd. (2009) bir süt ürününden izole edilen *S. thermophilus* YIT 2084'ün süttten HA üretebildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerden *S. thermophilus*'un hyaluronik asit ürettiği gözlenmiş ancak diğer bakterilerle hyaluronik asit üretimi yapılan çalışmalara ulaşılammıştır.

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin gelişim süreleri, 24-48 saat aralığında olduğundan fermentasyon süresi de 48 saat olarak seçilmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da 24-48 saatte HA üretimi gerçekleştiği ortaya konmuştur. Rangaswamy ve Jain (2008) *S. zooepidemicus*'un için 24-28 saat, Chahuki vd. (2018) *L. acidophilus* ve *S. thermophilus* için 48 saat fermentasyon süresi bildirmişlerdir.

Mikroorganizmaların metabolizmalarında biyosentez reaksiyonlarının akış yönü kültür koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Mikroorganizmadaki metabolik değişimlerin incelenip anlaşılması ve kültür koşullarının geliştirilmesi HA üretiminin artırılmasını sağlayabilmektedir (Pires ve Santana, 2010).

Hyaluronik asit üretiminde etkili faktörlerin belirlenmesi amacıyla Plackett Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Plackett Burman tasarımları birçok faktörden cevap değişkeninin değerlerine etkisi olanların ortaya çıkarılması ya da en az sayıda deneme ile en çok sayıda faktör etkisinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Kul, 2012). Çalışmamızda üretime etki eden tüm faktörler değerlendirilmek istendiğinden en etkili faktörlerin belirlenmesi amacıyla bu tasarım kullanılmıştır. Yedi bakteri (*S. thermophilus* P3, *S. thermophilus* P4, *S. mutans* 1a21, *S. epidermidis* PS1, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22) kullanılmış olup tüm tasarımlar glukoz ve sükröz için ayrı ayrı yapılmıştır. Bu tasarımdan elde edilen veriler Minitab 16 programı ile belirlenen ANOVA testleri sonucunda etkili parametreler belirlenmiştir.

Proseslerin optimizasyonunda genellikle sistemin performansını veya ürünün kalite kriterlerini belirleyen çok sayıda yanıtla eş zamanlı çalışılmaktadır. Bu yanıtların bazılarının maksimum seviyede tutulması, bazılarının minimum seviyede tutulması, bazılarının da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenmektedir. Bir yanıtın geliştirilmesi diğer bir yanıt üzerinde olumsuz bir etki oluşturabilmektedir. Bu yüzden, optimizasyon çalışmalarında sistemi karakterize eden tüm yanıtların hep birlikte ele alınması gerekmektedir. Ancak bu durumda, optimizasyon oldukça karmaşık bir hal

almaktadır (Koç ve Ertekin 2009). Plackett Burman deney tasarımı ile glukoz, sükröz, sıcaklık, inokülüm miktarı, çalkalama hızı, pH, maya özütü, kazein pepton, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl ve iz mineraller olmak üzere üretimi etkileyen tüm faktörler değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Test bakterileri ile HA üretimine etki eden faktörler bakterilere göre ufak tefek değişiklikler göstermiştir. Bütün bakterilerde için en etkili faktörler; sıcaklık, çalkalama hızı, pH ve iz mineraller (p< 0.05) olmuştur. Bakterilere göre değişmekle birlikte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl ve MgSO<sub>4</sub> etkili faktörler olarak belirlenmiştir. pH, sıcaklık, besin maddeleri, vitamin ve iyonlar gibi çevresel koşulların fermantasyon yolu ile ürünlerin oluşumunda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Hücre içi reaksiyonlarda ve biyolojik fonksiyonlarda yer alan magnezyum, sodyum, demir, çinko, manganez, potasyum, molibden kobalt, bakır ve kalsiyum gibi çeşitli mineraller hücre büyümesi için gerekli ortamı sağladığından fermantasyon ürünlerinde önem taşımaktadır (Pires vd., 2010). *S. equi* ile HA üretimi için Plackett Burman deney tasarımı ile pH, inokulum miktarı, kazein pepton, sükröz, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve iz elementlerin en etkili faktörler olduğu belirlenmiştir (Aytar vd., 2013). Mg ++ ve Mn ++, polimer zincirlerinde disakkaritlerin sentezinde yer alan glikosiltransferazlar için kofaktörler olarak tanımlanmıştır (Deangelis, 2002). Çoğu glikosiltransferazın aktivitesi, pirofosfat fraksiyonundan konformasyonun stabilizasyonu yoluyla şeker nükleotidlerin bağlanmasına katkıda bulunan iki değerlikli katyona bağlı olduğu saptanmıştır (Petrova vd., 2001). Potasyum ve sodyum gibi iyonlar *Streptococcus equisimilis* ile HA sentezinde şeker nükleotid öncülerinin bağlanmasından sorumlu enzim hyaluronan sentazı inhibe ettiği için önem taşıdığını vurgulamıştır (Tlapak-Simmons vd., 2004). Sodyumun *Streptococcus* cinsi bakteriler tarafından laktat atılımındaki rolü nedeniyle HA üretimine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca HA üretimi üzerine sodyum iyonlarının hücre içindeki proton potansiyelini sürdürmek için metabolik enerji sapması ile ilişkili olabileceği de bildirilmiştir (White, 2000). Pires vd. (2010) sodyum iyonlarının *Streptococcus zooepidemicus* ile HA üretimini inhibe ettiğini raporlamıştır. Düşük konsantrasyondaki mangan, çinko ve bakır iyonlarının sinerjik etki gösterebileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar glikoz ve yeast ekstrakt kullanıldığında diğer iyonların ilavesine gerek olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Mikroorganizmalar, çoğalacakları ortamdaki hidrojen iyonlarına karşı oldukça hassastır. Fermantasyonla HA üretimi sırasında pH değerinde düşüş meydana gelmektedir. Bu durum; üretim esnasında çoğunlukla laktik asitten oluşan karboksilik asitlerin ortamda birikmesinden kaynaklanmaktadır. Ortamdaki pH değerinin azalması, mikrobiyal biyokütlenin ve HA üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. pH değerinin ayarlanması için yapılacak müdahalelerle HA üretimi artırılabilir (Lu, 2016; Liu, 2011). Fermantasyonun başlangıç pH'sı ekzopolisakkarit üretimini etkilemekte ve laktat oluşumu üzerinden karbon akışını HA üretimine yönlendirmektedir. Alkali stresi indukleyerek laktat dehidrogenazı azaltmaktadır (Liu vd., 2007).

Mikrobiyal fermantasyonla HA üretimi viskoz bir işlem olduğu için fermantasyon ortamının karıştırılması HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Karıştırma hızının yüksek olduğu durumlar, ortamdaki hücrelerin parçalanmasıyla sonuçlanabilir, bunun sonucunda da HA üretimi düşmektedir (Hasegawa vd., 1999). Literatür taramaları sonucunda tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmamız sonucunda etkili bulunan faktörlerin önceki çalışmalarla örtüştüğü ve anlamlı olduğu görülmektedir.

Tabatabaei ve Sepahy (2017) *S. thermophilus* ile HA üretimi üzerine karbon, nitrojen, sıcaklık, pH ve ortam türlerinin etkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, karbon kaynakları olarak fruktoz ve glikozun suşların büyümesi üzerinde etkili etkilere sahip olduğunu ve besiyerinde glikoz veya fruktoz kullanımının, bulanıklık, suşların büyümesi ve suşların hyaluronik asit üretimine katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ise glukoz veya sükroz karbon kaynaklarının HA üretimine katkısının önemli olduğu düşünülerek ayrı ayrı deneyler yapılmıştır. Plackett Burman deney tasarımı ile orta noktalarda 5 tekrar ile yapılan 25 besiyeri bileşimi için 48 saat inkübasyon sonunda üretilen ürün saflaştırılarak miktar hesaplaması yapılmıştır. Buna göre glukoz için hazırlanan tasarımlarda en yüksek üretim miktarına 66,4 mg/L ile *S. mutans* 1a21 ve 62,0 mg/L ile *S. thermophilus* P4 ile ulaşılmıştır. En düşük üretim miktarına sahip mikroorganizma 32,0 mg/L ile *S. epidermidis* PS1 olmuştur. Sükroz içeren besiyerlerinde de durum benzerdir. *S. thermophilus* P4 56,0 mg/L, *S. mutans* 1a21 ise 54,0 mg/L hyaluronik asit üretmiştir. *S. epidermidis* PS1 32,4 mg/L ile sükrozlu besiyerinde de en düşük sonucu vermiştir. Plackett Burman deney tasarımı sonucu elde edilen verilere bakıldığında glukoz içeren besiyerlerinde üretim miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Çalışmamıza benzer olarak, Im vd., (2009) *Streptococcus* sp.

ID9102 ile HA üretimi için karbon kaynağı olarak glukozun önemli bir etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Plackett Burman deney tasarımı ile üretimde etkili parametrelerin belirlendikten sonra süzkroz ve glukozda en iyi üretim miktarlarını veren *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Her bakteri için etkili faktörlere uygun olarak glukoz ve süzkroz için ayrı olmak üzere cevap yüzey yöntemi ile deney planı oluşturulmuştur. Her bakteri için hazırlanan deney planlarına uygun olarak üretim yapıp maksimum üretim için gerekli koşullar bulunmuştur. Buna göre *S. thermophilus* P4 glukoz içeren besiyeri için tasarımın önerdiği koşullar (g/L) sıcaklık:29,87°C, iz mineral:1,90 ml , pH:6,62, çalkalama hızı:55,31 rpm, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1,29 g şeklinde olmuştur. Süzkroz içeren besiyeri için ise sıcaklık: 26,51 °C, iz mineral: 6,37 ml, pH: 6,62, çalkalama hızı:52,43 rpm, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,15 g şeklinde olmuştur. *S. mutans* 1a21 glukoz içeren besiyeri için tasarımın önerdiği koşullar (g/L) sıcaklık:36,12°C, iz mineral: 6,37 ml , pH:6,62, çalkalama hızı:52,43 rpm, NaCl:0,739 g olmuştur. Süzkroz içeren besiyeri için ise sıcaklık: 35,52 °C, iz mineral: 5,68 ml, çalkalama hızı:82,67 rpm olmuştur.

*S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile HA üretiminde optimum pH 6,62 olarak belirlenmiştir. Benzer çalışmalara bakıldığında farklı bakteriler ile HA üretiminde optimum pH değeri 7 civarlarında olduğu görülmektedir. Kim, Yoo vd. (1996) tarafından gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında optimum pH 7 olarak bulunmuştur. *S. zooepidemicus* ile yapılan bir çalışmada anaerobik koşullar altında HA üretim hızı ve verimi açısından optimum pH değerinin 6,7±0,2 olduğu belirlenmiştir (Johns vd., 1994). *S. zooepidemicus* (ATTC 39920) ile 4,5 L biyoreaktörde gerçekleştirilen bir çalışmada, pH kontrolü yapılmayan fermantasyon ortamında pH değerinin 4.9 değerlerine düştüğü ve bu düşüşün mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. pH kontrolü yapılan fermantasyon ortamında pH 8'e ayarlanarak HA üretim miktarı artırıldığı bildirilmiştir (Pan vd., 2017).

Plackett Burman deney tasarımı sonucunda da görüldüğü gibi tüm bakterilerde üretimde en etkili faktör sıcaklık olarak bulunmuştur. *S. thermophilus* P4 numaralı bakteride glukozlu besiyerinde 29,87°C süzkrozlu besiyerinde ise 26,51°C olarak bulunmuştur. *S. mutans* 1a21 numaralı bakteride ise optimum sıcaklık glukozlu besiyerinde 36,12°C süzkrozlu besiyerinde 35,52°C olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değeri bakterilere göre farklılık göstermektedir ve bulunan sıcaklık farklarının buna bağlı

olduğu düşünölmektedir. Yaygın olarak kullanılan üretim sıcaklığının 30 ile 37°C arasında olduğu görölmektedir. Pan vd., (2015) sıcaklığın HA üretimi üzerindeki etkisini araştırmak için *S. zooepidemicus* ATCC 39920 kullanarak 25 mL erlen ölçeğinde gerçekteştirdikleri çalışmada, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı olarak 3 parametre, 3 düzeyde ve 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Sıcaklık 34°C, 37°C ve 40°C değerlerinde tutulup fermantasyon sonucunda sıcaklık 34°C'den 40°C'ye yükseltildiğinde üretim miktarının azaldığı bildirilmiştir.

Mikrobiyal fermantasyonla HA üretimi viskoz bir işlem olduğu için fermantasyon ortamının karıştırılması HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerde cevap yüzey yöntemi ile optimum karıştırma hızı 52,43 rpm ile 82,67 rpm aralığında bulunmuştur. Karıştırma hızının yüksek olduğu durumlarda, ortamdaki hücrelerin parçalanmasıyla sonuçlanabildiği, bunun sonucunda da HA üretiminin düştüğü bildirilmiştir. (Hasegawa vd., 1999). Artan karıştırma hızı ile polisakkarit üretim oranlarında bir düşüş olduğu kaydedilmiştir (Kim vd., 2007). Ancak bazı araştırmacılar ise bunun aksini bildirmişlerdir (Johns vd.,1994; Hasegawa vd., 1999). Besinlerin kolay bir şekilde taşınabilmesi ve ortamdaki laktadın uzaklaştırılabilmesi için çalkalamaya ihtiyaç olduğu, ancak yüksek çalkalama oranının HA üretimine ve polimerin yapısına zarar verdiği ortaya konmuştur (Johns vd., 1994, Hasegawa vd., 1999 Kim vd., 2007). Izawa vd., (2010) *S. thermophilus* ile HA üretiminde çalkamanın düşük bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. HA üretiminde viskozite arttığı için çalkalama hızı ve oksijen kütle transfer oranları HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir (Liu vd., 2011). Amado vd. (2017) çalkalama hızının 200rpm den 800 rpm'e çıkarılması ile biyokütlenin arttığı ama HA miktarının düştüğünü bildirmişlerdir.

Cevap yüzey yönteminin uygulandığı deneysel tasarımda parametrelerin hyaluronik asit üretimi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tüm bakterilerde modelin (p:0,000) %100'lük etki seviyesinde etkili olduğu görölmüştür. Düşük P (>0,005) değer, parametrenin gerçekte ve önemli olduğunu göstermektedir. P değerleri parametre katsayılarının önemini incelemek için önemli bir veri olarak kullanılmaktadır (Aldemir vd., 2015).

Minitab 16 programının cevap yüzey yöntemi kullanılarak iki bakteri ve iki ayrı ayrı hazırlanan tasarımlarla yapılan deneyler sonucunda elde edilen en yüksek üretim miktarı besiyerinde *S. mutans* 1a21 glukozda 68,0 mg/L elde edilmiştir. Geri kalanlar ise

66,0 mg/L olarak kaydedilmiştir. Ancak belirlenen optimum koşullarla üretim yapılması ile bu miktarların artırılması hedeflenmiştir.

Doğrulama deneyleri çift paralelli olarak 50 ml besiyerinde yapılmıştır ve deneyler sonucunda elde edilen üretim miktarları *S. thermophilus* P4 için sükrozlu besiyeri dışında sistem tarafından belirlenen aralıklarda olmuştur. *S. thermophilus* P4 glukozlu besiyerinde beklenen üretim miktarı  $71,2 \pm 18$  mg/L olarak belirlenmiştir ve üretim sonucu 68,0 mg/mL olarak kaydedilmiştir. *S. thermophilus* P4 numaralı bakteride sükrozlu besiyerinde ise beklenen üretim miktarı  $115,2 \pm 19,5$  mg/L olarak belirlenmiştir ve üretim sonucu 88,0 mg/L olarak kaydedilmiştir. Üretim miktarı beklenen aralıkta değildir fakat oldukça yakın olduğu görülmektedir. *S. mutans* 1a21 numaralı bakteride glukozlu besiyerinde beklenen üretim miktarı  $94,6 \pm 19,2$  mg/L olarak belirlenmiştir ve üretim sonucu 85,0 mg/L olarak kaydedilmiştir. *S. mutans* 1a21 numaralı bakteride sükrozlu besiyerinde beklenen üretim miktarı  $73,8 \pm 11,6$  mg/L olarak belirlenmiştir ve üretim sonucu 70,0 mg/L olarak kaydedilmiştir. Doğrulama deneylerinden elde edilen bulguların tahmin edilen aralıklarda olması sistemin başarılı olduğunu göstermektedir.

Rangasway ve Jain (2008) tarafından yapılan çalışmada *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC 39920) ile HA üretimi için farklı karbon kaynakları denenmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz, sükroz ve laktoz denenmiş olup, en iyi sonuç sükroz ile elde edilmiştir. Çalışmamızda cevap yüzey yöntemi sonuçlarına göre *S. thermophilus* P4 88,0 mg/L ile sükroz (60 gr/L) içeren besiyerinde daha fazla üretim sağlamışken *S. mutans* 1a21 86,0 mg/L ile glukoz (60 gr/L) içeren besiyerinde daha fazla üretim gerçekleştirmiştir.

Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada *S. thermophilus* ile HA üretimi Plackett Burman tasarımı ile optimize edilmiş ve pepton (%0,2), et ekstresi (%0,2), mangan sülfat (%0,0001), sıcaklık (40°C), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (%0,04), maya özütü (%0,1), glukoz (%0,4) içeren ortamda 86 mg/L hyaluronan elde edilmiştir (Thien vd., 2016). Araştırmacılar bizim bulgularımızın aksine en etkili faktörün pepton olduğunu bildirmişlerdir. Tabatabaei ve Sepahy (2017) de benzer olarak HA üretiminde en etkili faktörü pepton olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca sıcaklıkta bizim bulgularımızdan farklı olarak 40°C olarak bildirilmiştir. Çalışmada pH 6.62'de *S. thermophilus* P4 ile 88.0 mg/L , *S. mutans* 1a21 ile 85 mg/L HA elde edilmiştir. Izawa vd. (2010) *S. thermophilus* YIT 2084 ile pH 6.8'de 90,5 mg/L HA üretmişlerdir. Optimum HA üretimi için gerekli pH değerinin gelişme sıcaklığından farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bu değerler bizim bulgularımıza yakındır.

Ancak *S. thermophilus* P4 ile HA üretiminde optimum sıcaklık (29.87-26,51°C) araştırmacıların sıcaklık değerinin (33-40°C) altındadır. 40°C'de 122,8 mg/L HA elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise 40°C de elde edilen en yüksek üretim miktarı 13 mg/L olmuştur. Bu durum diğer koşulların farklılığından kaynaklanmış olabilir. *S. thermophilus* ST111 ile HA üretimi için optimum sıcaklığın 32-42°C, pH'nın 5.5-6.6 arasında olduğunu rapor etmişlerdir (Vaningelgem vd., 2004). Soya fasulyesi peptitlerinin ilavesi ile pH 6.8, sıcaklık 40°C'de 100 rpm çalkalama hızında HA miktarının 208 mg/L olduğu belirlenmiştir (Izawa vd., 2010). Amodo vd. (2017) pH kontrolünün *S. zooepidemicus* ile HA üretiminde önemli olduğuna değinmişler ve kontrolsüz pH koşullarında ihmal edilebilecek oranda HA üretiminin gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

HA fermantasyonunda pH değerlerinin 5'in altına düşmesinden sonra şeker alımı durmakta buna bağlı olarak biyokütle ve HA üretimi durağan faza ulaşmaktadır (Amado vd. 2017). *S. zooepidemicus* ile HA üretimi yapılan araştırmada da bu durum rapor edilmiştir (John vd., 1994). HA üretiminde kontrollü pH hücre büyümesinin inhibisyonuna ve polisakkarit sentezine neden olan laktik ve asetik asit oluşumunu engelleyerek HA üretiminin artmasına neden olmaktadır (Armstrong vd., 1997; John vd., 1994; Liu vd., 2008). Çalışmamızda HA değerlerinin düşük olarak bulunmasının bir nedeni de pH kontrolünün yapılamayışı olabilir.

Araştırmacılar besinsel faktör olarak besiyerlerinde farklı organik (pepton, malt ekstrat, maya ekstratı, üre vb.) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat, amonyum nitrat vb) kaynakları çalışmalarında test etme yoluna gitmektedirler (Kunamneni vd., 2005; Erdal ve Taskin 2010; Taskin 2011).

HA'nın pazardaki payının artırılması ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi amacıyla ticari olarak HA üretimi gerçekleştirmek için birçok azot ve karbon kaynakları kullanılmıştır. HA üretimindeki yüksek maliyetleri düşürmeye yönelik olarak yüksek miktarda HA üreten mikroorganizmaların tespit edilmesinin yanı sıra daha ucuz karbon ve azot kaynaklarının kullanımı da yapılan çalışmalar arasındadır (Amado vd., 2015; Aline vd., 2010; Pires vd., 2010).

HA üretimi için araştırmacılar peynir altı suyu, mısır maserasyon sıvısı ve meyve suları gibi ucuz materyallerinde besiyerlerinde substrat (azot ve/veya karbon kaynağı)

olarak kullanılabilceğini belirtmektedirler (Pires vd., 2010; Oliveira vd., 2013; Amado vd., 2017).

Çalışma kapsamında karbon kaynağı olarak glukoz ve sükroz kullanılmış olup aynı zamanda 80 g/L gibi büyük miktarlarda kullanılan bu kaynağa alternatif olabileceği düşünülen tarımsal atıklar denemiştir. Çalışmada peynir altı suyu, melas, şilempe ve zeytin posası gibi tarımsal atıkların HA üretiminde kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için deneylerde kullanılan yedi mikroorganizmanın tarımsal atıkların bulunduğu ortamda gelişip gelişmeyeceğini gözlemlemek amacıyla besiyeri içerikleri değiştirilerek deneyler yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre *S. thermophilus* P3 numaralı bakteri dışında tüm bakteriler tüm besiyerinde gelişim göstermişlerdir. Bu durum tarımsal atıkların bakterilerin gelişimini engellemediklerini ve fermentasyon ortamında kullanılabilirliklerini göstermiştir. Belirlenen optimum koşullarda seçilen miktarlarda şeker yerine belli oranlarda ilave edilen peynir altı suyu, melas, şilempe ve zeytin posası kullanılarak HA üretimi yapılmıştır.

HA üretiminde glukoz ve sükroz yerine zeytin posası kullanıldığında *S. thermophilus* P4 ile 98 mg/L HA elde edilirken *S. mutans* 1a21 kullanıldığında HA üretimi 102,0 mg/L olmuştur. Bu miktarlar her iki bakterinin de ticari glukoz ve sükroz kullanıldığında elde edilen HA miktarından yüksektir. Zeytin posası zeytinden yağ çıkarıldıktan sonra yağ, çekirdek, kabuk ve benzeri ürünlerden oluşan yan üründür. Besleme değeri yüksek olduğundan hayvan beslemesinde yem olarak, enerji eldesinde ve gübre olarak değerlendirilen tarımsal bir atıktır (Duru ve Kaya, 2015). Zeytin posası ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır.

*S. thermophilus* P4 ile %10 peynir altı suyu ilave edilmiş ortamlardan glukoz içeren besiyerinde 67 mg/L, sükroz içeren besiyerinde ise 85 mg/L HA elde edilmiştir. Peynir altı suyu ilave edilmeden elde edilen HA miktarları glukozlu besiyerinde 67 mg/L iken sükrozlu besiyerinde 85 mg/L'dır. %10 oranında ilave edilen peynir altı suyunun HA üretim miktarı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. *S. mutans* 1a21 ile elde edilen HA üretim miktarları %10 peynir altı suyu ilavesi ile düşmüştür. Glukoz içeren besiyerinde üretim miktarı 85,0 mg/L iken peynir altı suyu içeren besiyerinde HA miktarı 75 mg/L olmuştur. Sükroz içeren besiyerinde HA miktarı 69,0 mg/L iken %10 peynir altı suyu içeren ortamda HA miktarı 65,0 mg/L olarak belirlenmiştir. HA üretiminde ilave edilecek peynir altı suyunun miktarının önemli olduğu vurgulanmıştır (Mohan vd., 2016).

Bu nedenle peynir altı suyunun miktarlarının optimize edilerek en uygun oranının belirlenmesi gerekmektedir. Peynir altı suyunun düşük maliyetli bir azot kaynağı olarak hyaluronik asit üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Amado vd., 2015).

Mohan vd. (2016) peynir altı suyu kullanılarak HA üretiminde başlangıç pH ve inokulum miktarının da önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar HA miktarını 109.1 mg/L ile 340.2 mg/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Peynir altı suyu miktarının 40 g/L'den 50 mg/L'ye doğru çıkıldıkça HA üretiminin arttığını 50 mg/L'den daha yüksek peynir altı suyu miktarlarında ise HA miktarının düştüğünü bildirmişlerdir. Yüksek peynir altı suyunun substrat inhibisyonu yapabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ürün oluşumuna ilave olarak glikosiz ve peptidoglikan sentezi için karbon akışının kanalize edilebileceğini bildirmişlerdir. Fermantasyonda pH değişiminin laktat oluşumunun göstergesi olduğunu bunun da karbon akışının glikolize aktarılan kısmın bir göstergesidir (Shah vd., 2013).

Çalışmada, HA miktarının düşük olmasının nedeni bakteri suşlarının farklılığı olduğu gibi peynir altı suyunun kullanılan miktarı ve uygulanan koşullarının farklılığından da kaynaklanabilir. Bu nedenle bir optimizasyon yapmanın daha uygun olacağı görünmektedir.

HA üretiminde etkili faktörlerden biri pH'dır. Çalışmada başlangıç pH'sı 6,62 olarak ayarlanmıştır. Mohan vd. (2016) peynir altı suyunun kullanıldığı HA fermantasyonunda en yüksek verimi pH 8.0'de elde ettiklerini bildirmişlerdir. pH farklılığı nedeniyle çalışmamızda elde edilen HA miktarı düşük olarak elde edilmiş olabilir. Çünkü pH 7'den pH 8.5 çıkarken HA miktarının arttığı saptanmıştır (Mohan vd. 2016).

Melas, zengin besinsel içeriğinden, özellikle yüksek şeker içeriğinden dolayı, günümüzde mikrobiyal fermentasyon çalışmalarında etil alkol, pigment, polisakkarit, lipid, tek hücre proteini ve organik asit gibi değerli ürünlerin üretiminde mikroorganizmalar için substrat olarak kullanılmaktadır (Ergun ve Mutlu 2000; Taskin vd. 2012). Melasın besiyerlerinde kullanımı esas olarak karbon kaynağı özelliğinde olmaktadır. Bununla birlikte, içeriğindeki diğer besleyici maddeler sayesinde kompleks bir fermentasyon substratı olarak değerlendirilmektedir. Pan vd. (2017); Amado vd. (2017) tarafında yapılan çalışmalarda melasın, *S. zooepidemicus* ile HA üretiminde de

kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu sebeple, melasın ve melasın atığı olan şilempenin bu çalışmada seçilen bakterilerle HA üretiminde substrat olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Melasın üretimdeki etkisi değerlendirildiğinde; başlangıç pH 6,62'de *S. thermophilus* P4 ile glukoz içeren besi ortamında HA üretim miktarı 66,4 mg/L iken %30 melas içeren besiyerinde 65,0 mg/L olmuştur. %100 melas kullanıldığında ise HA miktarı 79,0 mg/L ye çıkmıştır. Sükroz içeren ortamda ise HA miktarı 86 mg/L olarak saptanmıştır. *S. mutans* 1a21 ile glukoz içeren ortamda 85 mg/L HA elde edilirken, sükroz içeren ortamda HA miktarı 69 mg/L olmuştur. %50 melas ilavesi ile glukoz içeren ortamda HA miktarı 89 mg/L olurken %30 melas içeren sükrozlu besiyerinde 67 mg/L HA elde edilmiştir. *S. thermophilus* P4 için glukoz içeren besi ortamına %30 melas ilavesinin yapılabileceği görülmektedir. Böylece daha düşük glukoz kullanılarak maliyet düşürülebilir. *S. mutans* 1a21 ile ise %50 melas ilavesi glukoz içeren ortamda kullanılabilir. Amado vd. (2017) melas içeren besiyerinde *S. zooepidemicus* ile HA üretim miktarının düşük olduğunu bildirmişlerdir. Şeker kamışı melasında yüksek oranda sükroz bulunması nedeniyle hem biyokütle hem de HA miktarının düştüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar *S. zooepidemicus*'un 60 g/L şeker kamışı melasına kadar kullanabildiğini ancak daha yüksek konsantrasyonlarda hücre inhibisyonuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Liu vd., 2008; Pan vd., 2015; Amado vd., 2017; Jagganath ve Ramachandran, 2010).

Jagganath ve Ramachandran (2010), glukozun sükroz ile değiştirilmesinin, spesifik HA sentez hızı ile birlikte HA üretkenliğini ve moleküler ağırlığı artırdığını rapor etmişlerdir. Bu durum çalışmamızda *S. thermophilus* P4 ile HA üretiminde de gözlenmiştir. Glukoz yerine sükroz kullanıldığında HA verimi artmıştır. Ancak melas ilavesi ile aynı durum gözlenmemiştir. Melas kullanıldığında glukozlu ortamda HA miktarında önemli bir değişim gözlenmemiştir. *S. mutans* 1a21 ile HA üretiminde glukozlu ortama %50 oranda melas ilave edildiğinde HA miktarı (89 mg/L) artmıştır. Benzer olarak *S. zooepidemicus* kullanılarak yapılan çalışmada şeker kamışı melasının (0,376 g/L) kullanılmasının sükroz (0,488 g/L) ya da glukoz (0,429g/L) kullanıldığında elde edilen HA miktarlarından daha düşük olduğu bildirilmiştir (Pan vd., 2015). Benzer bulgular Amado vd. (2017) tarafından da vurgulanmıştır. *S. thermophilus* P4 ile sükroz içeren besi ortamında %100 melas kullanıldığında, *S. mutans* 1a21 ile %30 melas kullanılarak HA üretiminde ürün miktarının düşmesi melasın içerdiği antimikrobiyal

aktivite gösteren fenolik bileşikler nedeniyle olabileceği gibi laktik asitte olabilir (Liu vd., 2008; Takara vd., 2007).

Sonuçlarda etkileşimlerin bakterilere ve kullanılan şeker miktarlarına göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Melas içeren besiyerindeki düşük HA üretiminin düşük P içeriğinden de kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Literatürde melasın K, Na, Ca, Fe, Mg ve S bakımından zengin P bakımından ise fakir olduğu belirtilmektedir (Reed, 2012; Arslan, 2018). Bu nedenlerden detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Şilempe, şeker ve alkol sanayinin yan ürünüdür. Melastan fermantasyon yolu ile alkol üretildikten sonra geriye kalan sulu kısım şilempedir . Suda çözünür koyu renkli, kükürtçe zengin düşük pH'lı organik bir atıktır (Rodrigues ve Hu, 2017). Çok fazla oranda ortaya çıktığı için çevre sorunlarına neden olmaması için geri dönüşümü ve biyokütle üretimi ile ilgili çalışmalarda yararlanılmaktadır (Christofolletti vd., 2013). Şilempe gübreleme, enerji üretimi vb. birçok alanda kullanılmasına karşılık HA üretiminde test edildiği bir çalışmaya rastlamadık.

*S. thermophilus* P4 ile HA üretiminde glikoz içeren ortama %30 oranında şilempe ilave edildiğinde HA miktarı 55,0 mg/L iken sadece glikoz içeren ortamda 68,0 mg/L olarak saptanmıştır. HA miktarı önemli ölçüde düşmüştür. Ancak %100 şilempe ilave edilen besi ortamında ise ürün miktarı 93 mg/L'ye çıkmıştır. *S. mutans* 1a21 de ise %10 oranında şilempenin ortama ilavesi ile her iki besi ortamında da HA miktarı düşmüştür.

Mikrobiyal HA üretimi için uygun bakteri seçimi, hücre gelişimi için gerekli olan besiyerinin mevcut bakteri için optimizasyonu ve üretim koşullarının optimizasyonu önemlidir. Fermantasyon ile hyaluronik asit üretimi mekanizması olarak ortaya konmuş ve üretimi etkileyen faktörlerle ilgili çeşitli suşlarla çalışmalar yapılmıştır. Fermantasyonla HA üretiminde Grup A streptokoklarla yapılan ilk çalışmalarda elde edilen HA miktarı 60–140 mg/L elde edilmekteydi. Ancak zamanla yapılan çalışmalar ile bu miktar arttırılmıştır (Kendall vd., 1937). Plackett burman ve cevap yüzey yöntemi ile yaptığımız çalışmamız sonucunda elde edilen üretim miktarları geleneksel üretimde kullanılan suşlara kıyasla düşük olduğu görülmektedir. Ancak çalışmaların arttırılması ile bu miktarın artacağı düşünülmektedir.

Çalışmanın sonunda son ürünün HA olduğunun doğrulanması için FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ve hyaluronidaz enzimi ile deneyler yapılmıştır.

Hyaluronidaz enzimi hyaluronik asidi parçalayan bir enzim olduğundan hyaluronik asit ile aynı ortamda bulunması durumunda spektrofotometrede okuma değerlerinin düşmesi beklenmektedir. Atıkların da deneylere alınması ile iki bakteriden (*S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21) dört ayrı atık ve iki ayrı şeker ile edilen 20 adet ürün test edilmiştir. Deney sonuçlarına göre ürünümüz hyaluronidaz enzimi ile muamele edildiğinde spektrofotometrede okuma değerleri düşmektedir. Hyaluronidaz enzimi eklenmeden önceki okuma değerleri ortalama olarak 0,158 iken enzimin eklenmesiyle okuma değerleri ortalama olarak 0,045'e düşmektedir. Kontrol olarak hyaluronidaz enzimi kullanılmadan aynı işlemler tekrarlanmıştır ve değerlerde düşme olmadığı gözlenmiştir. Buna dayanarak ürünün hyaluronik asit olduğu düşünülmüştür. Aynı ürünlerin FTIR ile tayini Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir. 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında gerçekleştirilen çalışmada elde edilen spektrumlar literatürden elde edilen hyaluronik asit spektrumu ile karşılaştırılmıştır ve analiz edilen 20 numunenin hepsinin hyaluronik asit olduğu saptanmıştır.

Glukoz, sükroz, peynir altı suyu, zeytin posası, melas ve şilempe içeren ortamlarda *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile üretimi yapılan hyaluronik asitlerin FTIR spektrumları benzer özellikler göstermiştir. 3319.83-3327.75 $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen pik karbonhidrat için karakteristiktir ( Kumar vd., 2011) .

1638,186-1638,248  $\text{cm}^{-1}$  arasında değişen keskin pik görülmüştür. Mohan vd. (2016) *S. thermophilus* için benzer FTIR spektrumları belirtmişlerdir. Araştırmacılar CO-NH<sub>2</sub>'ye karşılık gelen 1625,5  $\text{cm}^{-1}$  tepe noktasını bildirmişlerdir. Saf hyaluronik aside göre numunelerdeki küçük kaymaların C-O-C esnemesine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Test bakterilerinden elde edilen 3411,2  $\text{cm}^{-1}$  tepe noktası O-H ve N-H fonksiyonel grupların göstergesi olduğunu, 2912,6  $\text{cm}^{-1}$ 'deki keskin bandın C-H bağının göstergesi olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak ticari önemi oldukça yüksek olan hyaluronik asidin yapılan çalışmalarla *S. thermophilus* P4 ve *S. mutans* 1a21 ile üretilebildiği görülmüştür. *S.thermophilus* ile hyaluronik asit üretime dair çalışmalar vardır ancak literatürde *S. mutans* ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile üretimde kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışmadaki amaçlardan biri de hyaluronik asit üretiminde yeni bakterilerin taranması ve literatüre kazandırılmasıdır. *S. epidermidis* PS1, *E. gallinarum* M179, *E. durans* M173, *S. warnei* S22 cinsi bakteriler tarama deneyleri

sonucunda pozitif sonuç vermişlerdir. Ancak ek çalışmalara ihtiyaç vardır. HA üretimi üzerinde en etkili faktörler sıcaklık, pH, çalkalama hızı ve iz mineraller olarak belirlenmiştir. Bakterilere göre değişmekle birlikte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, iz mineraller ve MgSO<sub>4</sub> etkili faktörler olarak belirlenmiştir.

Sürdürülebilir bir toplumun ihtiyaçları ve öncelikleri, biyoenerji veya değerli biyo ürünlere dönüştürülebilen tarımsal atıklar gibi yenilenebilir kaynakların kullanımına ihtiyaç duymaktadır (Angenent vd., 2004). Bu nedenle, fermentasyon süreçleri için alternatif maddeler kullanılan çalışmalara ihtiyaç vardır. Tarımsal kaynaklar ucuz olduklarından ve mikrobiyal yetenekleri nedeniyle karbon ve enerji kaynakları olarak metabolize edilen kültür ortamının değerli ana bileşenlerinin ve takviyelerinin üretimine izin vermektedirler (Thomsen, 2005; Aline vd., 2010). Bu çalışmada hyaluronik asit fermentasyon ortamında peynir altı suyu, melas, şilempe ve zeytin posasının kullanımı ile üretim maliyetlerinin düşürebileceği görülmüştür. Ancak söz konusu tarımsal atıklar kullanılarak besiyerinin optimizasyonu önem taşımaktadır.

*S. thermophilus* P4 ile HA üretilmesi, *S. thermophilus* GRASS bakterisi olduğundan sağlık açısından risk taşımamaktadır. Bu nedenle süt ürünlerinde özellikle yoğurt üretiminde kullanılabilir. Bu bakterilerin kullanıldığı yoğurtlarda HA tayini yapıldıktan sonra bu yoğurtların sağlığa katkı yapabilecek bir gıda olarak önerilmesi mümkün olabilir. İlave olarak ağızdan alınabilecek preparatlar hazırlanarak diz osteoartrit dejenerasyonunda yararlı olabilir (Lyu vd.2020). Ayrıca *S. thermophilus* P4 kullanılarak HA üretimi için tarımsal atıklar kullanılabilir. Özellikle zeytin posası ve şilempe bu çalışmada ilk kez çalışılmıştır. Zeytin posası HA asit üretiminde değerlendirilme potansiyeli yüksek olan tarımsal atıktır. Ancak tarımsal atıklar ile optimizasyon çalışmasına gerek bulunmaktadır. Bu çalışmada zeytin posasının, melas, şilempe ve peynir altı suyunun HA üretiminde kullanılabileceği ve böylece maliyetin düşürülebileceği görülmüştür.

Çalışmalar 50 ml besiyerinde yapılmıştır, büyük ölçeklerde ve fermentörde de denenmesi daha iyi sonuçlara ulaşmaya yardımcı olacaktır. Kullandığımız pH başlangıç

pH'sı olup, fermantasyon süresince pH kontrol edilememiştir. pH kontrolü fermantasyon süresince kontrol edilebilirse HA üretimine önemli bir etkisi olabilir.

Elde edilen HA in moleküler ağırlığının belirlenmesi ile ürünün kullanım alanları net bir şekilde ortaya konabilir.

Seçilen 2 bakteri dışında kalan 5 bakteri içinde tekrar üretim yapıp ürünün tayini için çalışmalar yapılmalıdır.



## KAYNAKÇA

- Abe, Y., Nakamura, K., Yamada, M., Yamamoto, Y. (2006). Encephalomalacia with *Enterococcus durans* infection in the brain stem and cerebral hemisphere in chicks in Japan. *Avian diseases*, 50(1), 139-141.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tükel, Ç. (2000). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Aldemir, A., Hapoğlu, H., Alpbaz, M. (2015). Optimization of generalized predictive control (GPC) tuning parameters by response surface methodology (RSM). *International Journal of Control and Automation* 8 (2), 393–408.
- Aline, M.B., Pires, Y., Eguchi S. (2010). The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 162, 2125–2135.
- Altman, R.D. (2000). Intra-articular sodium hyaluronate in the osteoarthritis of the knee. *Semin arthritis rheum* 30, 11-18.
- Amado, S., Vázquez, J., Pastrana, L., Teixeira, J. (2015). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry* 198, 54-61.
- Arda, M., (1997). Temel Mikrobiyoloji 1, *Medisan Yayınları*, Ankara.
- Ardizzoni, A., Neglia, R.G., Baschieri, M.C., Cermelli, C., Caratozzolo, M., Righi, E., Palmieri, B., Blasi, E. (2011). Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22, 2329-2338.
- Armstrong, D., Cooney, M., Johns, M. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology* 47, 309–312.
- Arslan, N.P. (2018). *Streptococcus zooepidemicus* ile Hyaluronik Asit Üretiminde Koyun Yünü Peptonu ve Melasın Kullanımı. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Aytar, P., Buruk, Y., Çabuk, A. (2013). *Streptococcus equi* ile Hyaluronik Asit Üretiminde Optimum Koşulların Plackett Burman Yöntemi ile Belirlenmesi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, Yıl: 2013 Cilt:11 Sayı:1 Sayfa: 28-35.
- Banga, J.R., Balsa-Canto E., Moles, C.G., Alonso A.A. (2003). Improving food processing using modern optimization methods, *Trends in Food Science and Technology* 14, 131-144.
- Benedini, L.J., Santana, M.H.A. (2013). Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresource Technology* 130, 798-800.
- Berikten, D. (2013). *Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Filamentli Fungusların İzolasyonu, Tanılanması ve Fitaz Enzimi Üretimlerinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü.
- Bilgehan, H. (1990). Klinik Mikrobiyoloji özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. *Barış Yayınları* İzmir. Sayfa: 208-232.
- Bitter, T., Muir, H.M. (1962). A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry* 4, 330-334.
- Blank, L. (2005). Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnology J.* doi:10.1002/bit.20466.
- Boeriu, C.G. (2013). Production Methods for Hyaluronan, *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Carbohydrate Chemistry*. Sayfa: 14.
- Brown, M.B., Jones, S.A. (2005). Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 19, 308-318.
- Campo, G.M., Avenoso, A., Nastasi, G., Micali A., Prestipino, V., Vaccaro, M., D'Ascola A., Calatroni, A., Campo, S. (2011). Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812, 1170-1181.
- Cerbo, A., Aponte, M., Esposito, R., Bondi M., Palmieri, B. (2013). Comparison of the Effect of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. *BMC*

*Microbiology* 13, 243.

- Cermelli, C., Cuoghi, A., Scuri, M., Bettua, C., Neglia, R.G., Ardizzoni, A., Blasi, E., Iannitti, T., Palmieri, B. (2011). In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. *Virology Journal* 8, 141.
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., Maccari, F., Volpi, N., (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers* 54. 59-61.
- Chen, S.J., Chen, J.L., Huang, W.C., Chen, H.S.(2009). Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering* 26 (2), 428-432.
- Chien, L.J., Lee, CK. (2007). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 339-346.
- Choi, S., Choi, W., Kim, S., Lee, S.Y., Noh, I., Kim. C.W. (2014). Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials, *Biomaterials Research* 18(6), 1–10.
- Chong, B. F., Blank L. M., Mclaughlin R., Nielsen L. K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 341–35.
- Christofolletti, C.A., Escher, J.P., Jorge Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management* 33, 2752-2761.
- Cooney, M.J., Goh, T., Lee, P.L., Johns, M.R. (1999). Structured model-based analysis and control of hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological implications of glucose and complex nitrogen- limited growth. *Biotechnology Progress* 15(5), 898–910.
- Costagliola, C., Prete, A, Winkler, N.R., Carpineto, P., Ciancaglini, M., Piccolomini, R., Mastropasqua, L. (1996). The ability of bacteria to use Na-hyaluronate as a nutrient. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 74, 566-568.
- Çolakoğlu, B. (2018). *Tarımsal atıkların alternatif kullanım alanları konusunda üretici eğilimleri*. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- DeAngelis, P. (1996). Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry*, 9768–9771.
- DeAngelis, P. (1999). Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from

- vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Sayfa: 670-682.
- DeAngelis, P. (2002). Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology* 12, 9–16.
- D’Souza, J., Sirisha, V.L. (2016). Polysaccharide-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems: Principles and Applications. *Marine OMICS*. Sayfa: 641-682.
- Duman, T. (2007). *Tavuk Karkaslarından İzole Edilen Staphylococcusların Virülans Faktörleri ve Antibiyotik Dirençliliği*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duru, A.A., Kaya, Ş., (2015). Zeytin Posası Silajının Hayvan Beslemede Kullanım Olanakları *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 64-71.
- Ergun, M., Mutlu, S. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 73, 251-255.
- Fong, C.B., Nielsen, L.K. (2003). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase, *Biochemical Engineering Journal* 16, 153–162.
- Fraser, J.R.E., T.C., Laurent, U.B.G. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover; *Journal of Internal Medicine*, 242, 27–33.
- Gall, Y. (2010). Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 137, 30-39.
- Gatta, L.A., Salzillo, R., Catalano, C., D’Agostino, A., Pirozzi, A.V.A., Rosa, M.D. (2019). Hyaluronan-based hydrogels as dermal fillers: the biophysical properties that translate into a “volumetric” effect, *PloS One* 14 (6), 287.
- Ghodke, R.S., Kakati, J.P., Tadi, S.R., Sivaprakasam, N.M.S. (2018). Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 Rohit. *Biochemical Engineering Journal*. Sayfa: 284–293.
- Guillaumie, F., Furrer, P., Felt-Baeyens, O., Fuhlendorff, B.L., Nymand S., Westh P., Gurny R., Schwach-Abdellaoui K. (2010). Comparative studies of various hyaluronic acids produced by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 92, 1421-1430.

- Gupta, R.C., Lall, R., Srivastava, A., Sinha, A. (2019). Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory, *Frontiers in Veterinary Science*, 6. Baskı, Sayfa:192.
- Greene, J., Sidle, D. (2015).The hyaluronic acid fillers: current understanding of the tissue device interface. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 23(4) 423–432.
- Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C.,Pearce, L. (2011). Streptococcus thermophilus. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 4. Baskı, Sayfa: 2577–2582.
- Hasegawa, S., Nagatsuru, M., Shibutani, M., Yamamoto, S., Hasebe, S. (1999). Productivity of Concentrated Hyaluronic Acid Using a Maxblend Fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 8 (1), 68-71.
- Hoffman, J., Altenbuchner J. (2014). Hyaluronic acid production with *Corynebacterium glutamicum*: effect of media composition on yield and molecular weight. *Journal of Applied Microbiology*. Sayfa: 1364-5072.
- Hung, W., Chen, S.J., Chen, T.L. (2006). The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 32, 239-243.
- Huynh, A., Priefer, R. (2020). Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. *Carbohydrate Research* 489.
- Http-1: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hyaluronic-acid-market>. (Erişim tarihi: 02.2020).
- Im, J.H., Song J.M., Kang J.H., Kang D.J.(2009). Optimization of medium components high molecular weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(11), 1337-1344.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 85-92.
- Imnazar, P., Wolinsky, L., Nachnani, S., Haake, S., Pilloni, A., Bernard, G.W. (1999). Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *Journal of Periodontology*, 70, 370-374.
- Izawa, N., Hanamizu, T., Iizuka, R., Sone, T., Mizukoshi, H., Kimura, K., Chiba, K.

- (2009). *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119–123.
- Izawa, N., Hanamizu, T., Sone, T., Chiba, K. (2010). Effects of Fermentation Conditions and Soybean Peptide Supplementation on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus thermophilus* Strain YIT 2084 in Milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 356–360.
- Jagadeeswara, R.K., Karunakaran, K.T. (2013). Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of BioScience and Biotechnology* 2, 3. Baskı, Sayfa: 173-179.
- Jagannath, S., Ramachandran, K.B. (2010). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biochemical Engineering Journal*, 48, 148–158.
- Jeong, E., Shim, W., Kim, J. (2014). Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for Production of Hyaluronic Acid with High Molecular Weight. *Journal of Biotechnology*, 185, 28–36.
- Johns, M.R., Goh, L.T., Oeggerli, A. (1997). Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnol. Lett.*, 16, 507–512.
- Kendall, F.E., Heidelberger, M., Dawson, M. H. (1937). A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*, *Journal of Biological Chemistry*, 118 (1), 61-69.
- Kennedy, M., Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 456–475.
- Kim, J., Yoo S, Oh D, Kweon Y.(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*, 0229(96), 440–445.
- King, D. (1992). *Microbiology*, Sayfa: 70-90.
- Koç, B., Ertekin, F. (2009). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *GIDA*. Cilt 35 , Sayı 1, Sayfa: 1-8.
- Kogan, G., Soltes, 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.

- Kopera, D., Palatin, M., Bartsch, R., Bartsch, K., O'Rourke, M., Holler, S. (2015). An openlabel uncontrolled, multicenter study for the evaluation of the efficacy and safety of the dermal filler Princess VOLUME in the treatment of nasolabial folds, *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2015/195328.
- Kul, S. (2004). *Cevap Yüzey Yöntemleri*. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kumar, M.A., Anandapandian, K.T.K., Parthiban, K. (2011). Production and characterization of Exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 54(2): 259–265.
- Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. (2005). Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus. *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 168-171.
- Kunduracılar H. (1991). Muayene Materyallerinden Ayrılan Streptokokların Gruplandırılması ve Kemoteröpatiklere Duyarlılıkları. Yüksek Lisans Tezi. Edirne.
- Kreil, G. (1995). Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. *Protein Science*, 4(9), 1666–1669.
- Laurent, T.C., Fraser, J. (1992). Hyaluronan. *FASEB Journal*, 6 (7), 2397–2404.
- Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J. (1996). The structure and function of hyaluronan: an overview. *Immunology & Cell Biology*, 74, 1-7.
- Lee, J.Y., Spicer, A.P. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 581–586.
- Li, J., Qiaob, M., Ji Y., Lin L., Zhang X, Linhardt R.J. (2020). Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 199–206.
- Liang, J., Jiang, D., Noble, P.W., (2016). Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 186-203.
- Liu, L., Liu Y., Li J., Du G., Chen J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10, 99.

- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., Sun, J. (2008). Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modelling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*, *Bioresource Technology*, 99, 8532–8536.
- Liu, L., Wang M., Du, G., Chen, J. (2007). Enhanced Hyaluronic Acid Production of *Streptococcus zooepidemicus* by an Intermittent Alkaline Stress Strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 383–388.
- Luo, H., Li, N.B., Lio, S.P. (2005). Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hyaluronic acid with ethyl violet dye and its analytical application. *Biosensors and Bioelectronics*, 45, 81-85.
- Lokeshwar, V.B., Mirza, S., Jordan, A. (2014). Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy. *Advances in Cancer Research*, 123, 35–65.
- Lokeshwar, V.B., Mirza, S., Jordan, A. (2012). Metastasis: multitasking hyaluronic acid. *Nature Reviews Cancer*, 12, 228.
- Lyu, J.L., Wang T.M., Chen, Y.H., Chang T., Wu M.S., Lin Y.H. (2020). Oral intake of *Streptococcus thermophilus* improves knee osteoarthritis degeneration: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study, (6), e03757.
- Marcellin, E., Chen W., Nielsen L.K. (2009). Microbial hyaluronic acid biosynthesis, *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Caister Academic Press. 163-180.
- Mao, Z., Chen, R.R. (2007). Recombinant Synthesis of Hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Progress*, 23,(5), 1038–1042.
- Mazzucco, A. (2019). Hyaluronic Acid: Evaluation of Efficacy with Different Molecular Weights *Department for Life Quality Studies*, University of Bologna, Italy.
- Meyer, K., Palmer, J.W. (1934). *Journal of Biological Chemistry*, 34, 607.
- 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.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*, 50, s: 684.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, 53,(8), 397–411.
- Oliveira, A.H., Ogrodowski, C. C., Macedo A.C., Santana M.H.A., Gonçalves L. R. B.

- (2013). Cashew Apple Juice as Microbial Cultivation Medium for Non-Immunogenic Hyaluronic Acid Production, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1097–1104.
- Pan, N.C., Vignoli, J.A., Baldo, C., Pereira, H.C.B.Ferreira, R.S.D.S, Celligoi, M.A.P.C. (2015). Agroindustrial by-products for the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 114-118.
- Papakonstantinou, E., Roth M., Karakiulakis, G.(2012). Hyaluronic acid: a key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology* 4 (3), 253–258.
- Plackett, R.L., Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305–325.
- Prasad, S.B., Jayaraman, G., Ramachandran, K.B. (2010). Hyaluronic Acid Production is Enhanced by the Additional Co-expression of UDPGlucose Pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86, 273–283.
- Pires, A.M.B., Santana, M.H.A. (2010). Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1751-1761.
- Price, R.D., Berry, M.G., Harshad, A.N. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60, 1110-1119.
- Rangaswamy, V., Jain D. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Biotechnology Letter*, 30, 493–496.
- Richard, D., Price, MG. Berry, Harshad A. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Navsaria Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60, 1110-1119.
- Rodrigues, C.E., Hu, B. (2017). Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? *Frontiers in Energy Research*, 5,7.
- Schiraldi, C., Gatta A., Rosa M.(2010). Biotechnological Production and Application of Hyaluronan *Biopolymer*, 20, 387–412.
- Schulz, T., Schumacher, U., Prehm, P.(2007). Hyaluronan export by the ABC Transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP, *Journal of*

- Biological Chemistry*, 282, (29) 20999–21004.
- Shah, M.V., Badle, S.S., Ramachandran, K.B. (2013). Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway, *Biochemical Engineering Journal*, 80,33–60.
- Souza, A.B., Chaud, M.V., Santana, M.H.A. (2019). Hyaluronic acid behavior in oral administration and perspectives for nanotechnology-based formulations: a review, *Carbohydrate Polymers*. 222, 115001.
- Song, J.M., Im, J.H., Kang, J.H., Kang, D.J. (2009). A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. *Carbohydrate Polymers*, 78, 633-634.
- Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *European Journal of Cell Biology*. 83, (7), 317–325.
- Stern, R., Asari, A., Sugahara, KN. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8), 699–715.
- Stevens, D.L., Kaplan E.L. (2000). Group A Beta-Hemolytic Streptococci: Virulence Factors, Pathogenesis, and Spectrum of Clinical Infections. In: Streptococcal Infections: Clinical Aspects. *Microbiology and Molecular Pathogenesis*.
- Stridh, S., Palm, F., Hansell, P.(2012). Renal interstitial hyaluronan : functional aspects during normal and pathological conditions. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, doi:10.1152/ajpregu.
- Sun, W., Wu, S., Cheng, Z., Xiong, L., Wang, R. (2020). Interaction effects and an optimization study of the microparameters of the flat-joint model using the Plackett-Burman design and response surface methodology. *Arabian Journal of Geosciences*, 13,53.
- Spicer, A.P, Tien J.Y.L. (2004). Hyaluronan and Morphogenesis. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*72(1,;89–108.
- Sze, J.H., Brownlie, J.C., Lov, C.A. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *Biotechnology*. 6,67. DOI 10.1007/s13205-016-0379-9.
- Tabatabaei, D., Sepahy A.(2017). Comparative evaluation of hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* isolated from yoghurt *Journal of Research in Biology* 7(6), 2340-2350.
- Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M. (2007). Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria, *Journal of Oleo Science*, 56, 611–614.

- Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989). 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, *Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları*, No.74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tang, Z., Hou, C., Chen, Q. (2002). Experimental study on bacteriostasis of chitosan and sodium hyaluronate. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*. 16, 259-261.
- Taskin, M., Erdal, S., Canli, O. (2010). Utilization of waste loquat (*Eriobotrya Japonica* Lindley) kernels as substrate for scleroglucan production by locally isolated *Sclerotium rolfsii*. *Food Science and Biotechnology*. 19, 1069-1075.
- Taskin, M., Kurbanoglu, E.B. (2011). Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 826-834.
- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S. (2012). Efficient production of lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 773-779.
- Tlapak-Simmons, V. L., Baron, C. A., Weigel, P. H. (2004). Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry*. 43 (28), 9234-42.
- Toole, B.P. (2000). Hyaluronan is not just a goo! *Journal of Clinical Investigation*. 106, 335-336.
- Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 4, 528-539.
- Özgenel GY. (2004). İntrauterin yara iyileşmesinin biyolojisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(2), 103-106.
- Petrova, P., Koca, J., Imberty, A. (2001). Molecular dynamics simulation of solvated UDPglucose in interaction with Mg<sup>2+</sup> cation. *European Journal of Biochemistry*. 268, 5365-5374.
- Pincus, D.H. (2006). Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of rapid microbiological methods*, 1, 1-32.
- Tırnaksız, F., Kaymak, Y. (2008). Hyalüronik Asit. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Derneği*, 18.1.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T., Vuyst L.(2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus*

- thermophilus ST 111 in milk-based medium. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1257- 1273.
- Vasvani, S., Kulkarni, P., Rawtani D. (2020). 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*, 151, 1012–1029.
- Vazquez, J.A., Montemayor, M.I., Raguas, J.F., Murado, M.A. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial Cell Factories*, 9, 46.
- Yamada, T., Kawasaki, T. (2005). Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (6), 521–28.
- Yatmaz, E. ve Turhan, I. (2015). Hyaluronik Asit ve Fermentasyonla Üretilmesi. *GIDA*, 40 (4), 233-240.
- Yu, H., Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Biosynthesis of Hyaluronic Acid. *Metabolic Engineering*, 10, 24–32.
- Zhang, M., McDonald, F.M., Sturrock, S.S., Charnock, S.J., Humphrey-Smith, I., Black, G.W., (2007). Group A streptococcus cell-associated pathogenic proteins as revealed by growth in hyaluronic acid-enriched media. *Proteomics* 7, 1379-1390.
- Zhang, X., Lin, L., Huang, H., Linhardt, R.J. (2020). Chemoenzymatic synthesis of glycosaminoglycans, *Accounts of Chemical Research*, 53(2), 335–346
- Zhu, J., Tanga, X., Jiab, Y., Hoa, C.H., Huang, Q. (2020). Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 578.
- Weigel, P.H., Hascall, V.C., Tammi, M. (1997). Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (22), 13997–14000.
- Weindl, G., Schaller, M., Schafer-Korting, M., Korting, H.C. (2004). Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases; molecular biological, pharmaceutical clinical aspects. *Skin Pharmacology Physiology*, 17, 207-213.
- Winter, W.T., Arnott, S. (1977). Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. *Journal of Molecular Biology*. 117, 761–784.
- Widner, B., Dollen, S.V., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P.L.,

Weigel, P.H., Brown, S. (2005). Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*.  
*Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3747–3752.

White, D. (2000). *The physiology and biochemistry of prokaryotes (2nd ed.)*. New York,  
Oxford University Press, 280-320.



## ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000-0002-2271-2872

**Adı Soyadı :** Yasemin Karasu  
**Doğum Yeri ve Yılı :** İstanbul/1994

### Eğitim

- Lisans-2017, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

### Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- Y. KARASU, G. GÜLTEKİN & M. KIVANÇ, Kozmetik Alanında Kullanılabilecek Hyaluronik Asit Üretilebilirliğinin *Enterococcus Spp.* İle Araştırılması, Poster Sunumu, 9. Kozmetik Kongresi, Antalya, 22 Şubat 2019, 24 Şubat 2019.
- G. GÜLTEKİN, Y. KARASU & M. KIVANÇ, Laktik Asit Bakterileri Bazı Kozmetiklerde Kullanılabilir Mi?, Poster Sunumu, 9. Kozmetik Kongresi, Antalya, 22 Şubat 2019, 24 Şubat 2019.
- S. A. KIVANÇ, Y. KARASU, B. AKOVA BUDAK, A. T. ÖZMEN & M. O. ULUSOY, Effects Of Disinfectants On Bacteria That Were Obtained From Aplanation Tonometers, Poster Sunumu, The 36th Congress Of The European Society Of Cataract And Refractive Surgeons (escrs), Viyana, 22 Eylül 2018, 26 Eylül 2018.
- G. GÜLTEKİN, Y. KARASU & M. KIVANÇ, Kluyveromyces Marxianus'un Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi, Sözlü Sunum, Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme Ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, Ankara, 12 Temmuz 2018, 15 Temmuz 2018.
- Y. KARASU, G. GÜLTEKİN & M. KIVANÇ, *Streptococcus thermophilus*'un Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, Sözlü Sunum, Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme Ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, Ankara, 12 Temmuz 2018, 15 Temmuz 2018.
- Y. KARASU, G. GÜLTEKİN & M. KIVANÇ, Determination Of Some Characteristics Lactic Acid Bacteria Isolated From Yoghurt For Selection Starter Cultures, Poster Sunumu, Iv. International Congress On Applied Biological Sciences, Eskişehir, 03 Mayıs 2018, 05 Mayıs 2018.

- G. GÜLTEKİN, Y. KARASU & M. KIVANÇ, Investigation Of Phytase Production From Yeast, Poster Sunumu, Iv. International Congress On Applied Biological Sciences, Eskişehir, 03 Mayıs 2018, 05 Mayıs 2018.
- Y. KARASU & M. KIVANÇ, Staphylococcus Cinsi Mikroorganizmalar İle Hyaluronik Asit Üretiminin Araştırılması, Poster Sunumu, 19. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, 01 Aralık 2017, 03 Aralık 2017.
- Y. KARASU & M. KIVANÇ, Peynir ve Yoğurttan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* İle Hyaluronik Asit Üretimi, Poster Sunumu, Uluslararası Tarım Ve Gıda Kongresi, Sivas, 26 Ekim 2017, 28 Ekim 2017.
- Y. KARASU & M. KIVANÇ, Is It Possible To Use Yeasts In Production Of Hyaluronic Acid?, Poster Sunumu, 1th International Eurasia Mycology Congress, 03 Temmuz 2017, 05 Temmuz 2017.

### **Ödüller&Burslar**

- 2210-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu
- Kozmetik Kongresi Poster İkincilik Ödülü, Kozmetik Alanında Kullanılabilecek Hyaluronik Asit Üretilirliğinin *Enterococcus Spp.* İle Araştırılması, Ödül Alınan Kurum: KİMYAGERLER DERNEĞİ, 24 Şubat 2019.
- Kozmetik Kongresi Mansiyon Ödülü, Laktik Asit Bakterileri Bazı Kozmetiklerde Kullanılabilir Mi?, Ödül Alınan Kurum: KİMYAGERLER DERNEĞİ , 24 Şubat 2019.