

***Streptococcus equi* İLE HYALURONİK ASİT ÜRETİMİNDE OPTİMUM KOŞULLARIN PLACKETT BURMAN YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Pınar Aytar¹, Yeliz Buruk², Ahmet Çabuk^{3*}

Özet

Hyaluronik asit genellikle *Streptococcus* sp. türlerinden elde edilen, kozmetik ve medikal uygulamalarda kullanılan lineer, yüksek molekül ağırlıklı bir glikozaminoglikandır. Bu çalışmada *S. equi* ile hyaluronik asit üretimi için besiyeri bileşenleri Plackett Burman deneysel tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Plackett Burman'a dayanan istatistiksel taramaya göre 11 faktörden 8'inin hyaluronik asit üretim sürecinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu en önemli faktörler; pH, inokulum miktarı, kazein pepton, MgSO₄, sükröz, NaCl, iz element, K₂SO₄ olmuştur.

Anahtar kelimeler: Hyaluronik asit, Plackett Burman deney tasarımı, *S. equi*

GİRİŞ

Glikozaminoglikan grubu polimerlerden hyaluronik asit (HA), ilk olarak gözdeki retinanın saydam sıvısından izole edilmiş uzun zincirli bir polisakkarittir (1). N-asetil-D-glikozamin ve D-glukoronik asit'in β-1,4 glikozidik bağıyla bağlanmasıyla meydana gelen disakkaritin tekrarlarından oluşmaktadır (2). HA ve tuzu omurgalı hayvanların bağ dokularından izole edilebilir. HA, doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilen ve biyo-uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretilmesine olanak tanımaktadır. HA, birçok *Streptococcus* suşundan üretilmektedir. Özellikle *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* bakterilerinden fermentasyon süreciyle HA üretimi gerçekleştirilmiştir. *S. equi*, atlarda enfeksiyon ajanı olan ve ürettiği HA nedeni ile nötrofillerin fagositozundan kendini koruyabilen bir organizmadır. Dolayısı ile *S. equi*'nin etkin bir HA üretimi için tercih edilmesi doğaldır. 1980'den beri Streptococci C grubu mikroorganizmaların fermentasyonu ile HA'nın ticari üretimi yapılmaktadır (3). HA, önemli yapısal, reolojik, fizyolojik ve biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Nemi uzun süre tutma yeteneği, vizkoelastikiyet özelliği, immunogenisite ve toksisitesinin olmaması gibi nedenlerden dolayı kozmetik, biyomedikal ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (3).

* ¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir;

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, Eskişehir; ³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: acabuk@ogu.edu.tr

Kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma oranı, çözünmüş oksijen, biyoreaktör tipi) ve kültür ortamının içeriği mikrobiyal HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir (4). Deneye etki edebilecek bu tip değişkenler tek faktör-tek zaman yöntemine göre optimize edilmesinin yanı sıra Taguchi, Plackett Burman veya Response Surface yönteminde uygulanan algoritmalar dikkate alınarak optimize edilebilmektedir.

Plackett Burman deney tasarımı birinci derecede modele dayanmaktadır. Bu yöntem, fiziksel ya da endüstriyel bir araştırma içinde meydana gelebilecek sorunlara karşı sürecin etkinliğini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Var olan nicel değişkenlerin yapılan denemelerle sonuca katkıları ölçülerek süreç etkinliklerinin artırılması hedeflenmektedir. Minimum 11 faktör ve her bir faktörün bir alt bir de üst limiti olmak üzere iki düzeyinin kullanıldığı tasarımda denenen düzeylerden elde edilen veriler ışığında her bir faktör için deney tasarımında denenen farklı düzeyler de önerilebilmekte ayrıca sonuca katkısı olan kritik faktör ve düzeyler de belirlenebilmektedir. 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 (5).

Bu çalışmanın amacı, atlarda enfeksiyon ajanı ve önemli bir hyaluronik asit üreticisi olan *S. equi* ile hyaluronik asit üretiminde kullanılan besiyeri bileşenlerinin Plackett Burman deney tasarımı kullanılarak optimize edilmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mikroorganizma

Daha önce atlardan izole edilmiş *Streptococcus equi* Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Deneyler esnasında kullanılacak aşı kültürü için tripton soy brot besiyeri (g/L; pepton 5 g, sodyum klorür 5 g, et özütü 1.5 g, maya özütü 1.5 g) hazırlanmış, 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiş ve inokulum olarak kullanılmıştır. Saf kültürler +4 °C'de tripton soy agar besiyerinde muhafaza edilmiştir.

Plackett-Burman Deneysel Tasarımı

S. equi'nin hyaluronik asit üretiminde kullanılacak besiyerinin bileşenleri Plackett-Burman Tasarımı (PBT) kullanılarak optimize edilmeye çalışılmıştır. PBT, istatistiksel bir yöntem olup birinci derece modele dayanır (5). Bu yöntem, bir deney sisteminde seçilen herhangi bir bağımlı parametre üzerinde, sistemdeki diğer bağımsız parametrelerin etkisini lineer olarak veren bir bağımsız değişken elimine yöntemidir ve aşağıdaki eşitlik (1) ile gösterilebilir. Burada; Y , yanıt (sonuç); β_0 , model kayması; β_i , lineer katsayı; X_i , bağımsız değişkenlerin düzeyi şeklindedir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (1)$$

Hyaluronik asit üretim ortamını etkileyen en önemli parametrelerin ortaya konması için 11 (n) faktörden oluşan PBT kullanılmıştır. Deney tasarımında kullanılan

parametreler; süktroz, maya özütü, kazein pepton, K_2SO_4 , $MgSO_4$, Na_2HPO_4 , $FeSO_4$, iz element, NaCl, inokulum miktarı, pH olmuştur. Toplamda 12 (n+1) deneyin her değışkeni yüksek (+1) ve düşük (-1) olmak üzere 2 düzeyde çalışılmıştır.

PBT ile etkileri incelenen parametreler ve düzeyleri Çizelge 1’de verilmiştir. Çizelge 2’de ise hyaluronik asidin üretim koşullarının optimizasyonu için PBT’nin önerdiği deney tasarımı verilmiştir.

Yapılan tasarıma göre önerilen 12 farklı besiyeri bileşimi için 37 °C’de, 150 r.p.m. çalkalama hızında, 10^8 cfu/mL başlangıç konsantrasyonuna sahip *S. equi* aşı kültürü inokulasyonu yapılarak 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonrasında kültür sıvılarındaki hyaluronik asit ölçümleri karbazol yöntemine göre yapılmıştır.

Çizelge 1. Hyaluronik asidin besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu için PBT ile incelenen değışkenler

Parametre no	Parametre adı	Düşük düzey (-1)	Yüksek düzey (+1)
A	Süktroz	60	80
B	Maya özütü	10	30
C	Kazein pepton	2	10
D	K_2SO_4	0,5	2,1
E	$MgSO_4$	1	3
F	Na_2HPO_4	2	10,4
G	$FeSO_4$	0,002	0,008
H	İz element	1	4
J	NaCl	0,25	1,5
K	İnokulum miktarı	1	4
L	pH	6,8	7,6

Analitik Ölçümler

20 saatlik inkübasyon süresi sonunda 5 mL kültür %0,1’lik SDS ile 1:1 oranında muamele edilerek 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmış, elde edilen süpernatant 1:3 oranında etil alkolle karıştırılmıştır, sonrasında tekrardan 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip pellet suda çözülmüş ve hyaluronik asit karbazol yöntemiyle ölçülmüştür (6). Buna göre, tüplere 4 mL sodyum tetraborat çözeltisi ve 1 mL örnek konmuştur. 100 °C’de 10 dakika ısıtılıp soğutulduktan sonra 1 mL karbazol çözeltisi eklenmiştir. Tekrardan 100 °C’de 10 dakika ısıtılıp soğutulmuş ve 550 nm’de glukuronik asit standardı kullanılarak çizilen standart eğri dikkate alınarak okunmuş ve g/L cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 2. Hyaluronik asidin üretim koşullarının optimizasyonu için PBT tarafından önerilen deneyler

	Sükroz (g/L)	Maya özütü (g/L)	Kazein pepton (g/L)	K ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	FeSO ₄ (g/L)	İz element (v/v)	NaCl (g/L)	İnokulum miktarı (g/L)	pH
1	80	30	2	2,1	3	10,4	0,002	1	0,25	4	6,8
2	60	30	10	0,5	3	10,4	0,008	1	0,25	1	7,6
3	80	10	10	2,1	1	10,4	0,008	4	0,25	1	6,8
4	60	30	2	2,1	3	2	0,008	4	1,5	1	6,8
5	60	10	10	0,5	3	10,4	0,002	4	1,5	4	6,8
6	60	10	2	2,1	1	10,4	0,008	1	1,5	4	7,6
7	80	10	2	0,5	3	2	0,008	4	0,25	4	7,6
8	80	30	2	0,5	1	10,4	0,002	4	1,5	1	7,6
9	80	30	10	0,5	1	2	0,008	1	1,5	4	6,8
10	60	30	10	2,1	1	2	0,002	4	0,25	4	7,6
11	80	10	10	2,1	3	2	0,002	1	1,5	1	7,6
12	60	10	2	0,5	1	2	0,002	1	0,25	1	6,8

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

S. equi tarafından HA üretimi için ihtiyaç duyduğu besinsel bileşenlerin ve bu bileşenlerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla yapılan optimizasyonda Plackett Burman deney tasarım yöntemi kullanılmıştır. Klasik optimizasyon çalışmalarında süreç üzerine etki edebilecek değişkenler sırası ile denenebilmektedir fakat elde edilen bulgular yüzeysel sonuçlar verebilmektedir. Elde edilen deneysel veriler analiz edildiğinde spesifik olarak hangi faktörün sonuca ne kadar katkısı olduğu ve hangi faktörlerin daha kritik, hangilerinin etkisinin daha zayıf olduğu ortaya koyulmaktadır. Tek faktör-tek zaman yöntemi olarak bilinen klasik optimizasyon çok fazla deney gerektiren ve zaman alan bir süreç olurken deneysel tasarım kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmaları daha az deney sayesinde daha kısa sürede sonuç elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

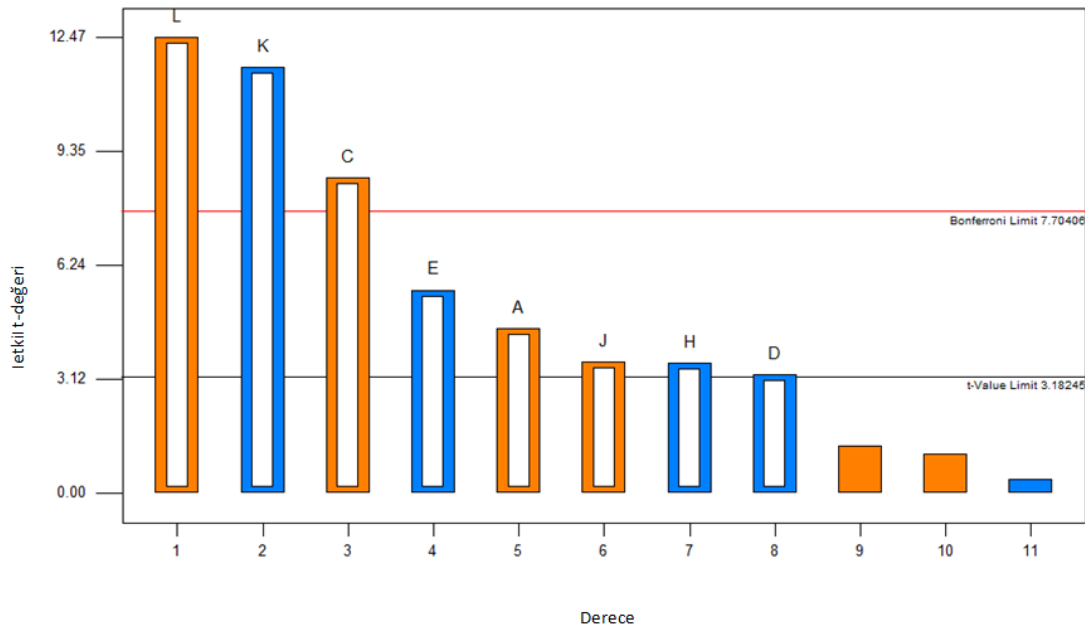
Çizelge 3'te verilen Plackett Burman deney tasarım yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin hyaluronik asit üretimi üzerine etkisini görmek amacıyla ölçüm yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre 2, 7 ve 11 numaralı besiyeri bileşimlerinde hyaluronik asit üretiminin 0,5 g/L'den fazla olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen deney bulgularına göre HA üretimi üzerine her besiyeri bileşeni etkili olmuştur. % etki değerleri Şekil 1'de Pareto grafiğinde görülmektedir. Ancak sırasıyla pH, inokulum miktarı, kazein pepton, MgSO₄, sükroz, NaCl, iz element, K₂SO₄ daha

etkili olduğu görülürken maya özütü, Na_2HPO_4 , FeSO_4 seçilen düzeyler açısından daha az etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3. Plackett Burman Deney Tasarım Yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin HA ölçüm değerleri. (Çalışma koşulları: 37 °C; 150 rpm; inkübasyon süresi 20 saat)

Deney no	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Ortalama yanıt (g/L)	0,155	0,552	0,418	0,228	0,233	0,352
Deney no	#7	#8	#9	#10	#11	#12
Ortalama yanıt (g/L)	0,275	0,576	0,475	0,379	0,589	0,328



Şekil 1. Deneyde belirlenen % etki değerlerinin Pareto grafiği.

pH değerinin diğer değişkenlere nazaran HA üretiminde daha önemli bir etkisi olduğu görülmektedir. Çalışılan mikroorganizmanın HA üretimi üzerine yapılan tüm çalışmalar bu süreci nötral pH değerlerinde yaptığını kanıtlamaktadır (7, 8). HA üretiminde önemli bir bileşen olan karbon kaynağı bu çalışmada da anlamlı bir değişken olarak öne çıkmıştır. Sükroz, HA fermentasyonunda kullanılan karbon kaynaklarından birisidir (9-11). *Streptococcus* sp. türlerinin HA üretiminde daha çok basit şekerleri kullandığı bilinen bir gerçektir (12). İm ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada organik azot kaynağı olarak maya özütü ile kazein peptonun birlikte kombine edilerek kullanılması sonucu yüksek HA üretimi elde edilmiştir (13). Bu çalışmada da aynı kombinasyon kullanılmış ancak deney tasarımının önerdiği bulgulara göre kazein peptonun deneyde daha anlamlı bir değişken olduğu

görülmektedir. Maya özütü ile ilgili sınırlama, çalışmada değerlendirilen düzeylerle ilgili olabilir. $MgSO_4$ ve potasyum kaynağı olarak K_2SO_4 'ün de çalışmada etkili değişkenler olduğu görülmüştür. Mg^{+2} iyonunun UDP-GlcUA ve UDP-GlcNAc'nin polimerize edilmesinde önemli bir kofaktör olduğu bilinmektedir (14).

İstatistiksel deney tasarım yöntemi önerilen besiyerlerinden alınan sonuçlardan yola çıkarak deneylerin doğruluğunu ortaya koymak amacı ile doğrulama deneyleri önermektedir. Doğrulama deneylerinden elde edilen bulguların tahmin edilen değerlere yakın olması sistem başarısını göstermektedir. Bu bağlamda tasarımın önerdiği besiyeri içerikleri ile yapılan deneme sonuçlarına göre önerilen doğrulama deneyinin besiyeri bileşimi (g/L) sükroz 79,86; maya özütü 28; kazein pepton 9,9; K_2SO_4 0,51; $MgSO_4$ 1,25; Na_2HPO_4 10,38; $FeSO_4$ 0,01; iz element 1,28; NaCl 1,23; inokulum miktarı %2,6; pH 7,51 şeklinde olmuştur. Bu kombinasyonda deney tasarımı yönteminin güven aralığı 0,539 ile 0,639 arasındadır. Tahmin edilen doğrulama deneyi, deneysel olarak da gerçekleştirildiğinde sonuç olarak 0,624 bulunmuş olup bu değer güven aralığı içinde kalmaktadır.

Erlen ölçeğinde (100 mL) yapılan bu çalışmada optimizasyon sonucu elde edilen HA değeri 0,624 g/L olmuştur. Bu üretim değeri literatürde erlen ölçeğinde yapılan çalışmalar kapsamında kıyaslanabilir bir değer olarak ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda tekrarlı kesikli kültür yöntemi ile HA üretimi çalışılmış ve HA veriminde artış kaydedilmiştir (15, 16). Bir çalışmada kesikli kültür yöntemi ile 0.24 g/L HA üretim verimi alınırken tekrarlı kesik kültür yöntemi ile HA üretiminde 0.59 g/L'ye çıkılabilmektedir. Literatürde bu değerden daha yüksek değerler bulunsa da sözü edilen bu çalışmalar fermentör ölçeğinde yapılmış çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Liu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yapay sinir ağları ve QPSO algoritması kapsamında değişkenler değerlendirilerek 7 L'lik bir fermentör kullanılmış ve 5.58 g/L HA verimi elde edilmiştir (8). Im ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise tek zamanda tek faktör yöntemi ve Taguchi tasarımı kullanılarak 75 L'lik bir fermentörde 6,94 g/L HA üretimine kadar çıkılabilmektedir (13). Bu çalışmalar havalandırma oranının HA üretiminde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. *S. zooepidemicus* ile HA üretimi genellikle viskoz bir süreç olduğu için karıştırma performansı ve oksijen kütle transferi HA üretimini arttıran en önemli faktörler arasında yer almaktadır (7).

Seçilen faktöryel modele göre ANOVA sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Buna göre formülizasyona giren diğerlerine göre daha önemli olan faktörlere ait F ve p değerleri de aynı çizelgede yer almaktadır. p değerinin 0.05'ten düşük olması söz konusu değişkenlerin deneyde anlamlı olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada tek basamaklı bir optimizasyon süreci uygulanarak erlen ölçeğinde HA üretiminde kullanılan besiyeri bileşenlerinin taraması Placket Burman deneysel tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen en iyi besiyeri kombinasyonu önerilerek gerçekleştirilen HA üretimi 0,624 g/L olmuştur. Sürece etki edebilecek diğer değişkenlerin de hesaba katılması ve bir seri optimizasyon süreci uygulanması durumunda bu değer artması beklenmektedir. Ayrıca çalışmanın ölçek büyütülmesi ile fermentör boyutuna aktarılması, böylelikle HA üretiminde bir diğer önemli değişken olan havalandırma oranının da optimize edilmesine olanak tanınması ile HA üretiminin çok daha yüksek değerlere taşınması olasıdır. Diğer

çevresel faktörlerin deneysel tasarım yöntemleri ile optimize edilmesi ve çalışmanın fermentör ölçeğine aktarılması gelecekte yapılması planlanan çalışmalardır.

Çizelge 4. Seçilen faktörlerin ANOVA analizi

Varyans tablosunun analizi					
Kaynak	Kareler toplamı	df	Mean Square	F değeri	p-değeri Prob > F
Model	0,221725	8	0,027716	56,61385	0.0035
A-Sükroz	0,009976	1	0,009976	20,37835	0.0203
C-Kazein pepton	0,03652	1	0,03652	74,59896	0.0033
D-K ₂ SO ₄	0,005125	1	0,005125	10,46936	0.0480
E-MgSO ₄	0,015123	1	0,015123	30,89128	0.0115
H-iz element	0,006165	1	0,006165	12,59374	0.0381
J-NaCl	0,006348	1	0,006348	12,96686	0.0367
K-İnokulum miktarı	0,066305	1	0,066305	135,4399	0.0014
L-pH	0,076161	1	0,076161	155,5724	0.0011
Rezidual	0,001469	3	0,00049		
Toplam	0,223194	11			

Kaynaklar

1. Meyer, L., Palmer, J., 1934. The polysaccharide of the vitreous humour. Biol. Chem., 107:629–634.
2. Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, R., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol. Lett., 29:17-25, 2007.
3. Chong, F.B., Blank, L.M., McLaughlin, R., Nielsen, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 341-351.
4. Kim, J.H., Yoo, S.J., Oh, D.K., Kweon, Y.G., Park, D.W., Lee, C.H., Gil, G.H., 2007. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid, Enzyme Microbial Technol., 19: 440-445.
5. Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 33, 305–325.
6. Bitter, H., Muir, H.M., 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 14: 330–334.
7. Johns, M.R., Goh, L.T., Oeggerli, A., 1994. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnol, Lett. 16: 507-512.

8. Liu L., Sun J., Zhang D., Du G., Chen J., Xu W., 2009. Culture conditions optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* based on radial basis function neural network and quantum-behaved particle swarm optimization algorithm, *Enzyme Microbial Technol.*, 44: 24-32.
9. Liu, L., Wang, M., Du, G., Chen, J., 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by and intermittent alkaline-stress strategy, *Lett. Appl. Microbiol.*, 46: 383–388.
10. Stangohl, S., 2000. Methods and means for the production of hyaluronic acid, US Patent 6090596.
11. Rangaswamy, V., Jain, D., 2008. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Biotechnol. Lett.* 30: 493–496.
12. Huang, W.C., Chen, S.J., Chen, T.L., 2006. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation, *Biochem. Eng. J.*, 32: 239–243.
13. Im, J., Song, J., Kang, J., Kang, D., 2009, Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 1337-1344.
14. DeAngelis, P.L., 1999. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses, *Cell Mol. Life Sci.*, 56: 670–682.
15. Chen, S.J., Chen, J.L., Huang, W.C., Chen, H.L., 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Korean J Chem. Eng.*, 26: 428-432.
16. Huang, W.C., Chen, S.J., T.L. Chen, 2008. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation, *Biochem. Eng. J.*, 40: 460-464.