



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 32 (2017)  
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)  
doi: 10.7161/omuanajas.287668



Farklı bitkisel yağların *Streptomyces clavuligerus*'ta klavulanik asit üretimi üzerine etkisi

Ashlan Kurt Kızıldoğan

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun Türkiye  
Sorumlu yazar/corresponding author: aslihan.kizildogan@omu.edu.tr

Geliş/Received 24/01/2017

Kabul/Accepted 21/03/2017

ÖZET

Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak farklı bitkisel yağların *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064 suşunda klavulanik asit üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fermentasyon besiyerinde zeytinyağı, mısırözü yağı, ayçiçeği yağı ve fındık yağı varlığında 168 saat süresince 28 °C ve 220 rpm'de inkübe edilen kültürlerin kontrole kıyasla daha iyi üreme profili gösterdiği bulunmuştur. Agar plak difüzyon deney sonuçlarına göre, ayçiçeği ve zeytinyağında *S. clavuligerus* ATCC27064 tarafından üretilen klavulanik asit miktarı kontroldekinden daha düşük tespit edilmiştir. En yüksek klavulanik asit üretimi (1526.4 mg L<sup>-1</sup>) inkübasyonun 120. saatinde (T<sub>120</sub>) ve ile fındık yağının kullanılması ile elde edilmiştir. Sonuçlar, fındık yağının test edilen diğer bitkisel yağlarla karşılaştırıldığında *S. clavuligerus* ATCC27064'taki klavulanik asit üretimi üzerinde belirgin bir üstünlük sağladığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler:  
*Streptomyces clavuligerus* ATCC27064  
Klavulanik asit  
Bitkisel yağ  
Fındık yağı  
Agar plak difüzyon yöntemi

The effect of different vegetable oils on clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the effect of different vegetable oils as carbon source, on the production of clavulanic acid in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064. Cultures that were incubated at 28 °C and 220 rpm for 168 hours in the presence of olive oil, corn oil, sunflower oil and hazelnut oil in the fermentation media were found to have better growth pattern than control. According to agar plate diffusion results, the use of sunflower and olive oil resulted in lower clavulanic acid production in *S. clavuligerus* ATCC27064 in comparison to the control. The highest clavulanic acid production (1526.4 mg L<sup>-1</sup>) was obtained at 120 hours (T<sub>120</sub>) of incubation due to use of hazelnut oil. The results showed that hazelnut oil exerted a remarkable superiority over the tested vegetable oils in clavulanic acid production in *S. clavuligerus* ATCC27064

Keywords:  
*Streptomyces clavuligerus* ATCC27064  
Clavulanic acid  
Vegetable oil  
Hazelnut oil  
Agar diffusion method

© OMU ANAJAS 2017

1. Giriş

*Streptomyces clavuligerus* tarafından doğal olarak üretilen klavulanik asit endüstriyel açıdan oldukça önemli bir sekonder metabolittir. Düşük antibiyotik aktivitesine (Minimal inhibitör konsantrasyonu: 25-125 µg/ml) karşı çok güçlü bir β-laktamaz inhibitörüdür (Baggaley ve ark., 1997). Klavulanik asit β-laktamazların katalitik bölgelerindeki serin hidroksil grubuna tersinmez olarak bağlanarak çok kararlı bir yapı oluşturur ve enzimi inaktif hale getirir. Klavulanik asit doğal formunda oldukça kararsız özellikte

olduğundan lityum, potasyum ya da sodyum tuzu ile formüle edilmektedir (Videiras ve Aires-Barros, 1994). Etki mekanizması sayesinde, penisilin ve sefalosporin gibi β-laktam antibiyotiklerine direnç kazanmış bakteriler üzerinde etki gösterebildiğinden β-laktamaz üreten bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotiklerle birlikte kullanılmaktadır. Sözelimi, potasyum klavulanat formu amoksisilin ile birlikte Augmentin™ ve tikarsilin ile birlikte Timentin™ formülasyonunda yer alır (Saudagar ve ark., 2008). 2003 yılında klavulanik asit pazarı 1 milyar doları aşarken Augmentin™ pazar payını 2 milyar

doların üzerine çıkarmıştır (Özcengiz ve Demain, 2013).

Klavulanik asidin büyük hacimlerde kimyasal olarak sentezi henüz mümkün olmadığından endüstriyel üretimi *S. clavuligerus* fermentasyonlarına dayanmaktadır (Ferguson ve ark., 2016). Klavulanik asit, genellikle nitrojen ve karbon kaynağı olarak soya unu, nişasta ve gliserol içeren zengin besiyerlerinin kullanıldığı fermentasyon ortamlarından elde edilmektedir (Teodoro ve ark., 2006; Ortiz ve ark., 2007; Kurt-Kızıldoğan ve ark., 2017). Temel olarak klavulanik asit biyosentezinin besin regülasyonu mekanizması nitrojen, karbon ve fosfat düzenlenmesi ve öncül moleküllerinin (arjinin, ornitin vb.) besiyerine eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Saudagar ve ark., 2008). Ayrıca, yüksek miktarlarda üretim için ileri fermentasyon teknolojilerinden de yararlanılmaktadır (Schmidt, 2005). *S. clavuligerus* ATCC 27064 glukozu karbon kaynağı olarak kullanmadığından diğer organizmalarda sekonder metabolitlerin üretimini artırılması için uygulanan aşırı glukoz kullanımı stratejisi bu bakteride işe yaramamaktadır. Bunun yerine, karbon kaynağı olarak lipitlerin kullanımı yoluna gidilmektedir (Butterworth, 1984; Saudagar ve ark., 2008). Klavulanik asit fermentasyonlarında bitkisel yağların kullanımına yönelik olarak yapılan daha önceki çalışmalarda, soya unu ve nişasta içeren besiyerine gliserol yerine zeytinyağı eklenmesinin klavulanik asit üretimini 1120 mg L<sup>-1</sup>'ye çıkardığı gösterilmiştir (Teodoro ve ark., 2010; Salem-Berkhit ve ark., 2010).

Sekonder metabolit üretimini artırmak amacı ile yapılan suş geliştirme çalışmalarında amaç ucuz maliyetli, kaliteli ve bol miktarda ürün elde edilmesidir. Bu çalışmalar içerisinde klasik mutagenез ve tarama, bilgiye dayalı rasyonel yaklaşımlar ve besiyeri optimizasyonu çalışmaları önemli yer tutmaktadır (Paradkar, 2013). Şu ana kadar, en yüksek klavulanik asit üretimi, *S. clavuligerus*'a ait iki farklı endüstriyel suşta, besiyeri optimizasyonu ile 3000 mg L<sup>-1</sup> (Jiang, 2004), gen manipülasyonu ile ise 6690 mg L<sup>-1</sup> (Kurt-Kızıldoğan ve ark., 2017) olarak rapor edilmiştir. Standart *S. clavuligerus* ATCC27064 suşu tarafından üretilen klavulanik asit titresi 25–120 mg L<sup>-1</sup> olup laboratuvar şartlarına, kullanılan besiyeri ve fermentasyon koşullarına (sıcaklık, pH, çalkalama hızı vb.) bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Paradkar, 2013). Literatürde farklı bitkisel yağların (zeytinyağı, mısırözü yağı, palmiye yağı, ayçiçeği yağı, pamuk yağı, keten yağı, hint yağı, bezir yağı vb.) kullanımının *S. clavuligerus* ATCC2704 suşunun klavulanik asit üretimine olan etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur (Efthimiou ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009; Salem-Berkhit ve ark., 2010). Bu çalışmada, literatürde ilk defa fındık yağı ve ceviz yağının *S. clavuligerus* ATCC2704'te klavulanik asit üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, elde edilen veriler zeytinyağı, mısırözü yağı ve ayçiçeği yağının kullanıldığı besiyerlerinden elde edilen diğer sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bakteri suşları ve fermentasyon koşulları

Çalışmada *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 suşları kullanılmıştır. *S. clavuligerus* ATCC27064 fermentasyonu için iki farklı besiyeri tercih edilmiştir. İlk olarak bakterilerin logaritmik faza kadar üremeleri ve fermentasyon besiyerine transferi için gerekli olan kültürün elde edilmesi amacıyla (g L<sup>-1</sup>): gliserol 10 g, Bacto pepton 10 g, malt özütü 10 g, maya özütü 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.75 g, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0.001 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.001 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.001 g, MOPS, 21 g, pH:7.00 (Maranesi ve ark., 2005) kullanılmıştır. Fermentasyon besiyeri içeriği ise şu şekildedir (g L<sup>-1</sup>): Nişasta 10 g, soya unu 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 g, MOPS 21 g, ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.001 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.001 g, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0.001 g (Salem-Berkhit ve ark., 2010). Ön kültürlerde OD<sub>600</sub> değeri 6 ya ulaşan *S. clavuligerus*'dan 1/100 hacminde bitkisel yağ içermeyen (kontrol) ve zeytinyağı, mısırözü yağı, ceviz yağı, fındık yağı ve ayçiçeği yağı eklenmiş (23 g L<sup>-1</sup>) fermentasyon besiyerlerine ekim yapılmıştır. Kültürler 500 mL'lik çentikli erlenlerde 50 mL'lik fermentasyon hacminde 28°C'de 220 rpm dönüş hızında 168 saat boyunca inkübe edilmiştir. Fermentasyon deneyi iki kez tekrarlanmış, her bir deney setinde kontrol ile birlikte 6 farklı besiyeri ve her besiyerinden 2 biyolojik replika kullanılmıştır.

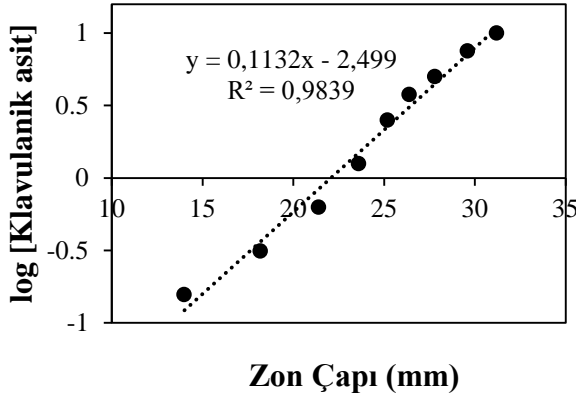
### 2.2. DNA miktarının ölçümü yolu ile üremenin belirlenmesi

Fermentasyon kültürlerinden alınan 1 ml örnek 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve elde edilen çökelek kısmı DNA miktarının ölçülmesinde kullanılmıştır (Burton, 1968). DNA miktarı Herring Sperm DNA (Sigma)'sından elde edilen veriler kullanılarak çizilen standart eğriye göre hesaplanmıştır. DNA miktarı mg DNA/L kültür olarak ifade edilmiştir.

### 2.3. Agar plak difüzyon yöntemi ile klavulanik asit üretiminin belirlenmesi

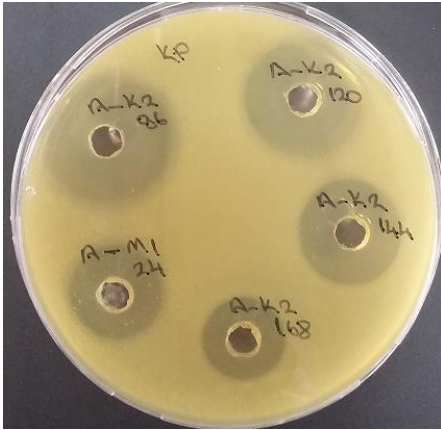
Fermentasyondaki kültürlerden 24 saat aralıklarla toplanan 1 mL hacmindeki örneklere ait supernatanlardaki klavulanik asit miktarları Agar plak difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Romero ve ark., 1984). Bu çalışmada potasyum klavulanat (DEPA) standart olarak, *K. pneumoniae* ATCC 29665 suşu ise klavulanik asit biyoassayinde indikatör organizma olarak kullanılmıştır. Bu bakteri suşu TSB (Trypton soya broth) (Oxoid) besiyerinde 30°C ve 200 rpm'de OD<sub>600</sub> değeri 0.9-1.0'e ulaşana dek üretilmiştir. Hazırlanan TSB agar (TSA) besiyeri 45°C'ye kadar soğutulmuştur. 10 µg/mL penisilin G (Sigma) içeren 100 mL TSA içerisinde 0,0033 yoğunluğunda bakteri olacak şekilde *K. pneumoniae* ATCC 29665 kültürü eklenerek TSA-

kültür karışımı elde edilmiştir. Donan agarların üzerinde oluşturulan 5 mm çapındaki kuyucuklara 60 µL örnek süpernatanı ve farklı konsantrasyonlarda potasyum klavulanat standartları (10-7.5-5-3.5-2.5-1.25-0.625-0.312-0.156 µg/mL) yüklenmiştir. Petri kapları önce 4°C’de 2 saat, ardından 30°C’de 12-15 saat inkübe edilmiştir. Potasyum klavulanat’a ait standart eğriden (Şekil 1) elde edilen lineer regresyona göre örneklerdeki klavulanik asit konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 1. Kültürlerdeki klavulanik asit konsantrasyonlarının hesaplamada kullanılan potasyum klavulanat’a ait standart eğri

Burada, *K. pneumoniae* ATCC 29665 tarafından üretilen β-laktamaz klavulanik asit tarafından inhibe edilmekte ve bu ise penisilin G’nin *K. pneumoniae* ATCC 29665’nin üremesini engelleyerek inhibisyon zonu oluşturmasına neden olmaktadır (Şekil 2).



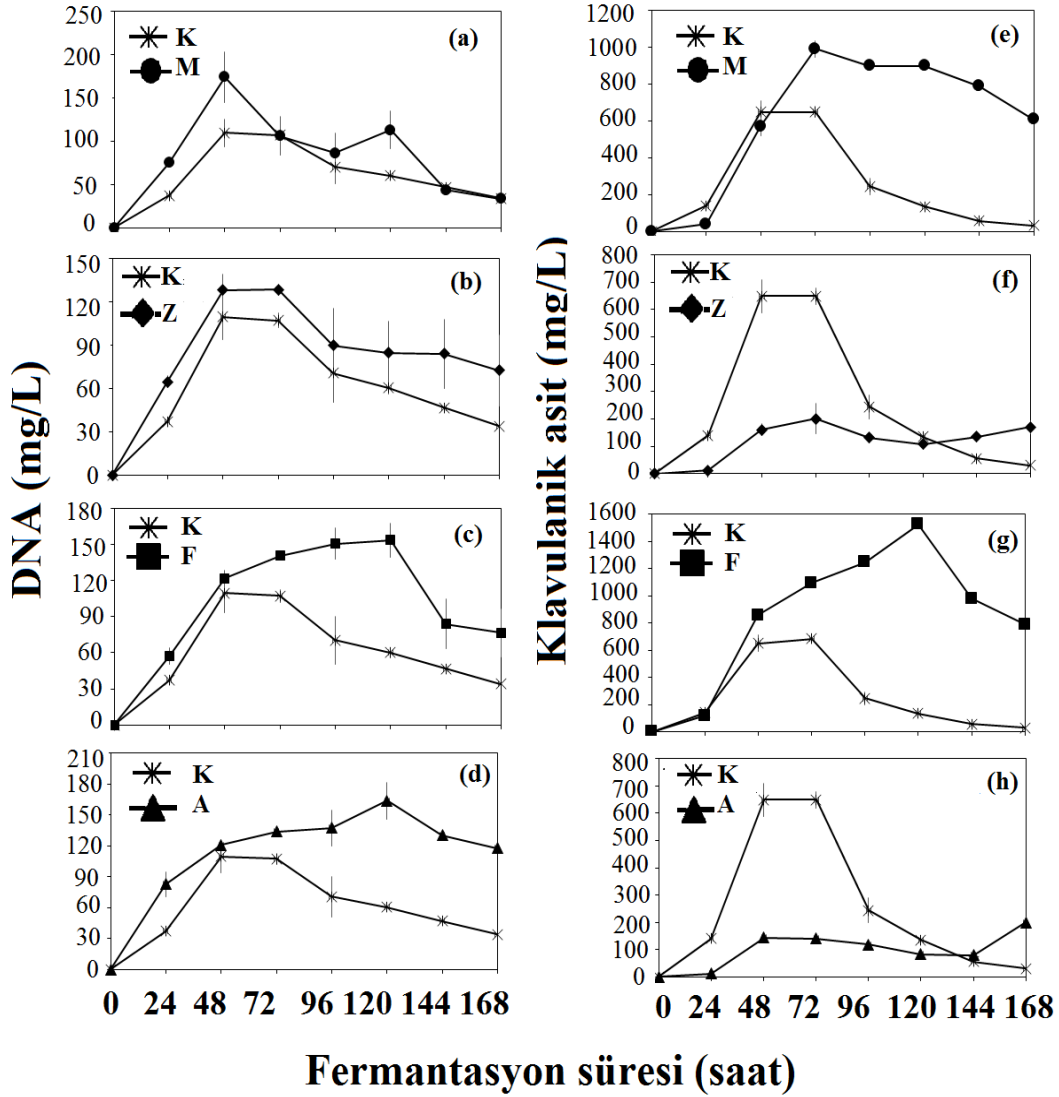
Şekil 2. Agar plak difüzyon deneyi sonrasında kültür süpernatantlarından elde edilen inhibisyon zonları

### 3. Bulgular ve Tartışma

Mikrobiyal metabolitlerin üretimi fermentasyon süreci ile yakından ilişkilidir. Besin tipi, konsantrasyonu ve kültür parametreleri metabolit üretkenliğini etkileyen

önemli değişkenler arasındadır. Bu nedenle, verimliliği arttırmak ve maliyeti düşürmek için en uygun besiyeri kompozisyonunun seçimi birincil önem taşımaktadır. (Ortiz ve ark., 2007). Endüstriyel ölçekli klavulanik asit üretimi açısından alternatif karbon kaynaklarının değerlendirilmesi olumlu sonuçlar vermiştir (Maranesi ve ark., 2005; Eftimiou ve ark., 2008). Dolayısı ile, *S. clavuligerus* ATCC 27064 suşunda klavulanik asit üretimini arttırmak amacıyla literatürde erlen içerisinde ve farklı bitkisel yağların kullanıldığı kesikli fermentasyonla en iyi klavulanik asit üretiminin gerçekleştirildiği raporlar (Salem-Berkhit ve ark., 2010; Ser ve ark., 2016) dikkate alınarak mevcut çalışma şekillendirilmiştir. Mısırozü yağı, ayçiçeği yağı ve zeytinyağı yanında literatürden farklı olarak ilk defa fındık yağı ve ceviz yağının bu güçlü β-laktamaz inhibitörünün üretimini nasıl etkilediği tespit edilmeye çalışılmıştır. Ancak, ceviz yağının muhtemel antibakteriyel etkisinden dolayı (Orhan ve ark., 2011) bulunduğu besiyerinde bakteri üremesi gerçekleşmemiştir. Fermentasyon çalışması ceviz yağı içerikli besiyerinde sonuç vermediğinden mısırozü yağı, fındık yağı, ayçiçeği yağı ve zeytinyağı ile kontrol (yağ eklenmemiş) kültürlerine ait veriler değerlendirilmiştir. Nişasta, soya unu, fosfat ve iz elementler içeren besiyerine 23 g/L oranında farklı bitkisel yağlar ilave edilerek 168 saat süresince 28°C ve 220 rpm’de inkübe edilen *S. clavuligerus* ATCC 27064 kültürlerinde üremenin genel olarak yağ içermeyen kontrol kültüründekine kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *S. clavuligerus* ATCC 27064 suşu kontrol kültüründe T<sub>48</sub>’de durgunluk fazına girerken bu noktadaki en yüksek üreme değerine mısırozü yağının kullanıldığı kültürlerde ulaşılmıştır (Şekil 3a).

*S. clavuligerus* ATCC 27064 suşunun kontrol besiyerinde sahip olduğu üremeye en yakın profil zeytinyağı varlığında elde edilmiştir (Şekil 3b). Fındık yağı ve ayçiçeği yağının bulunduğu kültürlerde *S. clavuligerus* ATCC 27064 suşunun üremesi 120. saate kadar yükselirken bu saat sonrasında azalmaya başlamıştır (Şekil 3c,d). Ancak, üreme profilinin fermentasyonun geç saatlerine kadar yüksek olduğu ayçiçeği yağı aynı doğrultuda klavulanik asit üretimini destekleyememiştir. Ayçiçeği yağı ve zeytinyağı varlığında klavulanik asit üretimi kontrolden daha düşük seviyede gerçekleşmiştir (Şekil 3f,h). Diğer taraftan, mısırozü yağı ve fındık yağı kullanımı klavulanik asit üretiminde artış sağlarken kontrole kıyasla bitki yağlarının kullanıldığı besiyerlerinde en yüksek volumetrik klavulanik asit üretimi fındık yağı varlığında inkübasyonun 120. saatinde (1526.4 mg klavulanik asit L<sup>-1</sup>) elde edilmiştir (Şekil 3g) (Çizelge 1). Mısırozü yağında tespit edilen en yüksek klavulanik asit üretimi 991.4 mg L<sup>-1</sup> ile T<sub>72</sub>’de gerçekleşmiştir (Şekil 3e). Fındık yağı ve mısırozü yağı kullanımında da üremenin en yüksek olduğu zamanda en iyi volumetrik klavulanik asit üretimi sağlanmıştır.



Şekil 3. *S. clavuligerus* ATCC27064 suşunda kontrole kıyasla farklı bitkisel yağların zamana bağlı olarak üreme profili [(a) Mısırözü yağı, (b) Zeytinyağı, (c) Fındık yağı, (d) Ayçiçeği yağı] ve klavulanik asit üretimi üzerine etkileri [(e) Mısırözü yağı, (f) Zeytinyağı, (g) Fındık yağı, (h) Ayçiçeği yağı]. K: Bitkisel yağ eklenmemiş kontrol, M: Mısırözü yağı, Z: Zeytinyağı, F: Fındık yağı, A: Ayçiçeği yağı

Farklı besiyeri kompozisyonları farklı seviyelerde klavulanik asit üretimiyle sonuçlanmaktadır (Maranesi ve ark., 2005; Ser ve ark., 2016). Kim ve ark. (2009)'na ait çalışmada maksimum klavulanik asit üretimi karbon kaynağı olarak zeytinyağı, palmiye yağı ve mısırözü yağı, nitrojen kaynağı olarak ise soya unu içerikli besiyerinin kullanıldığı 4,5 litrelik fermentasyon kültüründe zeytinyağı varlığında elde edilmiştir (820 mg L<sup>-1</sup>). Ardından, Salem-Berkit ve ark. (2010) nişasta, soya unu içeren besiyerine gliserol, zeytinyağı, keten tohumu yağı, mısırözü yağı, hindistancevizi yağı, palmiye yağı, ayçiçeği yağı, bezir yağı ve hint yağı ekleyerek (pH:7.0), 50 mL'lik fermentasyon hacminde 28°C'de 250 rpm hızda *S. clavuligerus* hücrelerini

inkübe etmişlerdir. Sonuçta, en yüksek klavulanik asit üretimini yine zeytinyağı içeren besiyerinde elde etmişlerdir (1120 mg L<sup>-1</sup>). Kim ve ark. (2009) tarafından uygulanan sıcaklık ve hız parametreleri belirtilmemiştir. Ancak, Salem-Berkit ve ark. (2010)'e ait çalışmada, kullanılan fermentasyon koşulları (erlen hacmi, fermentasyon hacmi, sıcaklık) rapor edilmiş ve mevcut çalışmamızda uygulanmıştır. Daha sonra yapılan bir çalışmada, gliserol ve soya unu içerikli bir besiyeri ve 20°C inkübasyon sıcaklığında 1266.2 mg L<sup>-1</sup> klavulanik asit üretimi sağlanmıştır (Costa ve Badino, 2012).Görüldüğü gibi, besiyeri kompozisyonunun yanı sıra uygulanan sıcaklık, pH ve rpm hızı da bu maddenin üretimini önemli derecede etkilemektedir.

Çizelge 1. *S. clavuligerus*'ta fermentasyon besiyerine farklı bitkisel yağlar eklendiğinde zamana bağlı olarak klavulanik asit üretimi

Besiyeri	Fermentasyon Süresi (Saati)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
	<b>mg Klavulanik asit L<sup>-1</sup></b>							
Kontrol	0.32±0	140.4±6.5	650.2±59.8	683.5±30.4	246.2±45.1	136.1±12.5	56.4±2.6	31.5±4.3
Mısırozü yağı	0.32±0	39.7±7.3	570.7±52.5	991.5±45.6	906.3±16.6	898.7±0	795.6±14.6	613.0±11.2
Zeytinyağı	0.32±0	12.2±0	160.6±22.1	204.6±55.8	132.1±18.2	108.2±4.9	136.1±12.5	171.4±23.6
Fındık yağı	0.32±0	118.4±37.5	858.1±23.3	1095.0±10	1247.5±11.5	1526.4±27.9	977.6±26.7	788.9±0
Ayçiçeği yağı	0.32±0	12.8±2.9	144.9±0	141.0±19.4	119.5±11	83.3±3.8	80.8±7.4	201.2±18.5

*S. clavuligerus* ATCC27064 suşunda bitkisel yağ kullanarak kesikli fermentasyon ile klavulanik asit üretiminin arttırılmaya çalışıldığı literatür çalışmalarında (Maranesi ve ark., 2005; Efthimiou ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009; Salem-Berkhit ve ark., 2010) zeytinyağı kullanımı en iyi sonucu verirken, bu çalışmada zeytinyağı varlığında klavulanik asit üretimi kontrolden daha düşük olmuştur. Vingerling ve ark. (2010) tarafından yapılan ve bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonlarının kromatografik yöntemlerle analiz edildiği bir çalışmada, zeytinyağının oleik asit bakımından oldukça zengin (>%70) ve fakat linoleik asit içeriği bakımından fındık yağı, ayçiçeği yağı, susam yağı gibi diğer yağlardan belirgin bir biçimde fakir olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, fındık yağının oleik asit içeriğinin zeytinyağından daha yüksek (72.7 g/100 g yağ) olduğu rapor edilmiştir. Ayçiçeği yağında ise belirgin oranda tekli-doymamış ve çok miktarda çoklu-doymamış yağ asitleri ve linoleik asit belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, mısırozü yağının oleik ve linoleik asitler bakımından zengin olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark., 1998).

Çalışmamızda, *S. clavuligerus* ATCC27064'de en yüksek klavulanik asit üretiminin oleik asit bakımından oldukça zengin olan fındık yağından elde edildiği görülmektedir. Bu bakımdan, fındık yağının besiyerine ilavesinin *S. clavuligerus* ATCC27064 tarafından yüksek miktarda klavulanik asit üretimine neden olması literatür çalışmalarından elde edilen verilerle uyumluluk göstermektedir. Ancak, zeytinyağı kullanımının bu çalışmada klavulanik asit üretimini olumsuz yönde etkilemesinin kullanılan zeytinyağının kalitesinden kaynaklanabileceği düşünülerek farklı marka zeytinyağı ve fındık yağının kullanıldığı bir başka fermentasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Ancak, *S. clavuligerus* ATCC27064 tarafından üretilen klavulanik asit titrelerinin yine fındık yağı eklenen kültürlerde zeytinyağına kıyasla çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (sonuç verilmemiştir). Sonuç olarak, ilk defa bu çalışmada bitkisel yağlardan fındık yağı kullanılarak *S. clavuligerus*'ta kesikli fermentasyon sonucunda şuna kadar rapor edilmiş en yüksek klavulanik asit üretimi sağlanmıştır.

#### 4. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada farklı bitkisel yağların (mısırozü yağı, zeytinyağı, ayçiçeği yağı, fındık yağı) kesikli fermentasyon yöntemi ile önemli bir sekonder metabolit üreticisi suş olan *S. clavuligerus* ATCC27064'da klavulanik asit üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Test edilen bitkisel yağlar içerisinde fındık yağı 1526.4 mg klavulanik asit/L ile en iyi üretimi sağlamıştır. Kesikli fermentasyon ile elde edilen klavulanik asit üretimi sonucu literatürdeki daha önceki çalışmalarda rapor edilenden daha yüksek olduğundan, mevcut verilerle endüstriyel anlamda yüksek verimde bir *S. clavuligerus* suşu geliştirilmesi yönünde önemli bir adım atıldığı düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen yüksek klavulanik asit üretiminin sıcaklık, dönüş hızı, pH gibi parametrelerde yapılacak ileri optimizasyon çalışmaları ile daha da arttırılması hedeflenmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından PYO.ZRT.1902-B.15.002 kodlu proje ile desteklenmiştir.

#### Kaynaklar

- Baggaley, K.H., Brown, A.G., Schofield, C.J. 1997. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams, Nat. Prod. Rep, 4: 309-333.
- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzymol, 12: 163-166.
- Butterworth, D. 1984. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme E.J., editor. Biotechnology of Industrial Antibiotics. New York, USA: Marcel Dekker; 1984. pp. 225-235.
- Costa, C.L., Badino, A.C. 2012. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions, Biochem. Engin. J, 69: 1-7. doi: 10.1016/j.bej.2012.08.005
- Efthimiou, G., Thumser, A.E., Avignone-Rossa, C.A. 2008. A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source. J. Appl. Microbiol, 105: 2058-2064.

- doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03975.x
- Ferguson, N.L., Peña-Castillo, L., Moore, M.A., Bignell, D.R.D., Tahlan, K. 2016. Proteomics analysis of global regulatory cascades involved in clavulanic acid production and morphological development in *Streptomyces clavuligerus*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 46:2 43: 537–555. DOI 10.1007/s10295-016-1733-y
- Jiang, S.J., Yang, Y.Y., Wang, H.Q. 2004. Optimization of clavulanic acid fermentation, *Chi. J. Antibiot*, 6: 335-733.
- Kim, S.J., Kim, J.O., Shin, C.H., Park, H.W., Kim, C.W. 2009. An approach to strain improvement and enhanced production of clavulanic acid in *Streptomyces clavuligerus*, *Biosci. Biotech. Biochem*, 73: 160–164. doi: 10.1271/bbb.80569
- Kurt-Kızıldoğan, A., Vanlı-Jaccard, G., Mutlu, A., Sertdemir, İ., Özcengiz, G. 2017. Genetic engineering of an industrial strain of *Streptomyces clavuligerus* for further enhancement of clavulanic acid production, *Turk J. Biol*, 41(2): 242-253.
- Lee, D.S., Noh, B.S., Bae, S.Y., Kim K. 1998. Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics, *Anal. Chim. Acta*, 358(2): 163-175.
- Maranesi, G.L., Baptista-Neto, A., Hokka, C.O., Badino, A.C. 2005. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *World J. Microbiol. Biotech*, 21: 509–514. doi: 10.1007/s11274-004-2393-z
- Orhan, İ., Özçelik, B., Şener, B. 2011. Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles, *Turk J Biol* 35: 251-258.
- Ortiz, S.C.A., Hokka, C.O., Badino, A.C. 2007. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *Enzyme Microbial Tech*, 4: 1071–1077. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.009
- Özcengiz, G., Demain, A.L. 2013. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation, *Biotechnol. Adv*, 31: 287-311.
- Paradkar, A. 2013. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *J. Antibiotics*, 1-10
- Romero, J., Liras, P., Martín, J.F. 1984. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 20:318–325.
- Salem-Berkhit, M.M., Alanazi, F.K., Alsarra, I.A. 2010. Improvement and enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* using vegetable oils, *Afr. J. Biotech*, 9: 6806–6812. doi: 10.5897/AJB10.965
- Saudagar, P.S., Survase, S.A., Singhal, R.S. 2008. Clavulanic acid: a review, *Biotech. Adv*, 26: 335–351. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.03.002
- Schmidt, F.R. 2005. Optimization and scale up of industrial fermentation processes, *Appl. Microbiol. Biotech*, 68: 425–435. doi: 10.1007/s00253-0050003-0
- Ser, H-L., Law, J.W-F., Chaiyakunapruk, N., Jacob, S.A., Palanisamy, U.D., Chan, K-G., Goh, B-H., Lee, L-H. 2016. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review, *Front. Microbiol*, 7:522. doi: 10.3389/fmicb.2016.00522
- Teodoro, J.C., Baptista-Neto, A., Araujo, M.L.G.D.C., Hokka, C.O., Badino, A.C. 2010. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *Braz. J. Chem. Engin*, 27:499–506. doi: 10.1590/S0104-66322010000400001
- Teodoro, J.C., Baptista-Neto, A., Cruz-Hernández, I.L., Hokka, C.O., Badino, A.C. 2006. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol, *Appl. Microbiol. Biotech*, 72: 450–455. doi: 10.1007/s00253-005-0273-6
- Videiras, M., Aires-Barros, M.R. 1994. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate, *J. Chromatogr. A*, 68: 237-240
- Vingering, N., Oseredczuk, M., Du Chaffaut, L., Ireland, J., Ledoux M. 2010. Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column, *Fondemantal*, doi: 10.1684/ocl.2010.0309.