

## HYALURONİK ASİT VE FERMANTASYONLA ÜRETİLMESİ

Ercan Yatmaz\*, İrfan Turhan

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 07058, Antalya, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 24.11.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 04.03.2015

Kabul tarihi / Accepted: 10.03.2015

### Özet

Hyaluronik asit (HA)  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan bir polimerdir. Yüksek viskoelastisite, nem tutma kapasitesi ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olmasından dolayı gıda, tıp, kozmetik ve nutrasötik alanlarında kullanılmaktadır. Geleneksel olarak horoz ibiğinden ekstraksiyonla üretilmektedir. Ancak 1980lerden sonra streptokok suşlar kullanılarak fermantasyonla üretimine başlanmış ve günümüzde de rekombinant sistemlerle yüksek moleküler ağırlığa sahip HA üretimi denenmektedir. HA'nın son zamanlarda gıda takviyesi olarak kullanımı oldukça dikkat çekmektedir. Bu çalışmada HA, HA üretim yöntemleri ve fermantasyon teknolojisi ile HA üretiminde karşılaşılan genel problemler ile ilgili bilgilere yer verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hyaluronik asit (HA), fermantasyon teknolojisi, streptokok suşları.

## HYALURONIC ACID and PRODUCTION BY FERMENTATION

### Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a polymer composed of units of N-acetyl glucosamine and D-glucuronic acid linked by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bond. Due to the fact that it has desirable viscoelasticity, moisture capacity, and biocompatibility, HA is used for several applications in food, medicine, cosmetics, and nutraceuticals. HA is traditionally extracted from rooster combs, but since 1980s it has been produced by fermentation with streptococcal strains, and recombinant systems have been also tried to produced HA with high molecular weight lately. It has been recently gained attention for food supplement. The main purpose of this study is to present a review about HA, application fields, HA production systems, and problems of HA fermentation.

**Keywords:** Hyaluronic acid (HA), fermentation technology, streptococcal strains.

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ercanytmz@gmail.com,

☎ (+90) 242 310 65 73,

☎ (+90) 242 227 45 64

## GİRİŞ

Fermantasyonla katma değeri yüksek ürünlerin saf kimyasallar ve karmaşık saflaştırma teknikleri ile üretimi uzun yıllardır gerçekleştirilmektedir. Bu ürünler arasında enzimler, organik asitler, biyoetanol, vitamin, antibiyotik ve antikor gibi birçok ürünü saymak mümkündür. Bu ürünlerden bazıları yüksek oranlarda üretilebilirken (biyoetanol) bazılarının üretim miktarı litrede mg (antikor) seviyelerinde kalmaktadır.

Hyaluronik asit (HA),  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin disakkarit birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan ve moleküler ağırlığı  $10^4$ - $10^9$  Da arasında değişiklik gösteren bir polimerdir (1, 2). HA karakteristik yapısal özellikleri sayesinde eklendiği solüsyonlara yüksek viskoelastikiyet ve su tutma kapasitesi sağlamaktadır (3, 4). Bu özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlerin üretiminde (5), yara için ilaçların üretiminde (6), doku rejenerasyonunda ve tedavisinde (7-9), ilaçların hedef dokuya ulaştırılmasında (10-13), hedef kimyasalın kontrollü olarak salınımında (14, 15), göz damlası ilaçlarında (16), kalça veya diz implantlarında (17), ortopedik protezlerde (18), deri dokusunun rekonstrüksiyonunda (19), yumuşak dokuların tedavisinde (20), hedef tümörün MR görüntülemesinde (21), periradiküler cerrahi sonrası periapikal dokunun iyileştirilmesinde (22) ve mikro cerrahi işlemlerinde (23) kullanım alanına sahiptir.

HA, yaraların veya yara izlerinin iyileşmesini hücre dışı matriks rejenerasyonu, epitel doku rejenerasyonu, keratinosit transferi, epidermal rejenerasyonu gibi etkilerle sağlamaktadır. Göz cerrahisinde ise kuru göz tedavisinde HA jeli, uygulanacak olan antibiyotik için hem iyi bir taşıyıcı olmakta hem de ortama iyi adapte olduğundan ve zor ayrıldığından ilacın etki süresini uzatmaktadır. İlaçların veriminin artırılmasında da taşıyıcı olarak HA içeren sistemler kullanılmakta ve hedefe ulaşım kolaylaştırılmaktadır. Ayrıca habis tümöründe, akciğer patolojisi çalışmalarında, eklem patolojisi çalışmalarında, estetik cerrahisinde (göğüs cerrahisi, deri dolgu maddeleri ve deri gençleştirmede) de yaygın olarak kullanılmaktadır (24).

Fonksiyonel gıdalar alışılagelmiş gıda formlarını ifade eden, vücudumuzun genel ihtiyaçlarını karşılamanın yanı sıra fizyolojik ve metabolik

fonksiyonlar üzerinde de ilave faydalar sağlayan sağlığını olumlu yönde etkileyen gıdalar veya gıda bileşenleridir (25). Nutrasötikler ise ağızdan alınmak üzere katı, sıvı, kapsül, yumuşak jel vb. haldeki vitamin, mineral, aminoasit, enzimler ve metabolitleri gibi ürünleri içermekte olup ürünlerin kronik bir hastalığa karşı koruyucu veya fizyolojik yarar gösterdiği kanıtlanmış ancak ilaç olarak kabul edilmeyen ürünlerdir (26). Nutrasötik olarak kullanılan ürünler yağ asitleri, karotenoidler, antioksidan vitaminler, fenolik bileşikler, terpenoitler, steroidler, indoller, organik asitler, lifler vb. olup bunların insan sağlığına yararlı etkilerini gösteren bilimsel çalışmalar mevcuttur (26). Örneğin antioksidanlar; lipitlerin peroksidasyonunda veya proteinlerin çapraz bağlanmasında rol alarak doku hasarının oluşmasını önleyebilirler (25). Antioksidan özellikleri ve zengin antioksidan içeriği bakımından yeşil çay oldukça değerli bir ürün olup yüzyıllardır yararlı etkilerinden ötürü kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra domateste bulunan likopenin ise kanser önleyici etki gösterdiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (25). Tüm bu bileşenlerin yanı sıra doğal olarak insan vücudunda yer alan ve yaşlandıkça vücuttaki miktarı azalan HA'nın farklı dönemlerde uygun dozlarda alınımının vücutta onarıcı etki göstererek fiziksel hareket kabiliyetini geliştireceği bildirilmektedir (27) (Çizelge 1).

Kullanım alanının genişliği ve önemi ile paralel olarak ihtiyaç duyulan miktarı da her geçen gün artmakta olan HA, dünyada yaklaşık olarak 1 milyar dolarlık bir pazar hacmine sahiptir (28). Ülkemizde de HA, tablet, kapsül vb. ürünler şeklinde takviye ürün tedarikçileri tarafından pazarlanmaktadır.

### Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri

Oldukça geniş kullanım alanına ve ekonomik öneme sahip olan HA ilk zamanlarda horozibiginden pahalı yöntemlerle saflaştırılmaktayken HA'nın fermantasyonla üretilebileceği ortaya konulunca endüstriyel ölçekte üretim bu tekniğe kaymıştır (29). Üretim tekniğinin fermantasyona kaymasındaki temel faktörler üretim yönteminin standardize edilebilir oluşu ve hedeflenen moleküler ağırlığa sahip istenilen miktarda HA'nın yıl boyunca üretilebiliyor oluşudur. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda yumurta kabuğundan da HA ekstraksiyonunun mümkün olduğu ortaya konmuştur (30).

Çizelge 1. HA'nın gıda takviyesi olarak kullanımı ve sağlık üzerine etki şekli (27)

ID	Gıda veya Gıda Bileşeni	Sağlık İlişkisi	Etki şekli
1572	Hyaluronik asit	Eklem sağlığı	Hyaluronik asit (Schiff® Move Free®) yağlamaya yardımcı olur ve eklemleri destekler.
Kullanım şekli: Her bir alım en az 3 mg yüksek moleküler ağırlığa sahip (>700 kDa) HA içermeli.			
1731	Hyaluronik asit/Sodyum hyaluronat	Eklem sağlığı	Eklem hareketliliği ve yağlamaya katkıda bulunur.
Kullanım şekli: 3-5 hafta süresince haftada bir defa 20 mg.			
1932	Sodyum hyaluronat	Eklem sağlığı ile ilgili	Eklem hareketliliğine katkı sağlar.
Kullanım şekli:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Günlük 25-50 mg arasında kullanılmalı.</li> <li>&gt; 2-3 ay süresince günde 2 defa 50 mg sodyum hyaluronat kullanılmalı ve yılda iki kez tekrarlanmalı.</li> </ul>			
3132	Hyaluronik asit	Eklem hareketliliğinin devamına yardım etme	Eklem hareketliliğinin devamının sağlanmasına yardım eder. Eklemlerin sağlıklı kalmasına yardım eder.
Kullanım şekli: Günde 100 mg.			

Fermantasyonla HA üretiminde ana üretici mikroorganizma olarak *Streptococcus* sp. kullanılmakta ve üretilen ürünün fermantasyon ortamından saflaştırılması sırasında proteinlerin oluşturmuş olduğu güçlükler en büyük dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Safsızlık unsuru proteinlerin ortamdan uzaklaştırması, maliyeti artırdığından yeni üretim stratejileri ile bu sorunu önlemek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntem rekombinant hücre teknolojisi olup farklı suşlar; *E. coli* (31), *Pichia pastoris* (32), *B. subtilis* (33), *S. thermophilus* YIT 2084 (34, 35), *Lactococcus lactis* (36) geliştirilmiştir. Yeni suşlarla gerçekleştirilen denemelerde HA üretimi gerçekleştirilebilmesine karşın HA üretim miktarları veya moleküler ağırlığı istenilen düzeylerde olmamıştır. Bu nedenle yeni rekombinant suşların geliştirilmesi veya farklı fermantasyon stratejileri ile safsızlıkların en aza indirgenmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmaların yanı sıra Novozymes firması rekombinant *Bacillus subtilis* ile endüstriyel boyutta yüksek saflıkta HA üretimi yapmaktadır (37). 1 g saf HA'nın 2-5 dolar arasında satışa sunulduğu (kozmetik amaçlı kullanım için) ve 1 kg HA'nın en az 2000 dolar ettiği göz önüne alındığında ne kadar değerli bir ürün olduğu ve kullanım alanlarının genişliği nedeniyle ihtiyaç duyulan miktarın her geçen yıl artacağı açıkça görülmektedir.

#### Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Ana Üretici Olan *Streptococcus* sp. Kullanımı

Daha önce de bahsedildiği üzere HA üretiminde ana üretici mikroorganizma grubu *Streptococcus* sp. olup çalışmaların büyük çoğunluğu bu grup ile gerçekleştirilmiştir. Bu kısımda ilgili

mikroorganizma ile gerçekleştirilen denemeler ve yöntemler hakkında bilgiler verilecektir.

Farklı karıştırıcılar kullanılarak oluşturulan iki tip fermentörde karıştırma hızının HA üretim miktarı ve moleküler ağırlığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Streptococcus zooepidemicus* kullanılmış ve her iki tip fermentörde de HA'nın moleküler ağırlığı  $4.3 \times 10^6$  Da olarak bulunmuştur (29). Bir başka çalışmada ise *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) ile HA üretiminde karıştırma ve çözülmüş oksijen konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır (38). Denemeler sonucunda çözülmüş oksijen konsantrasyonu için kritik değer %5 olduğu ve karıştırmanın oksijenin absorpsiyonunu artırdığı ancak HA üretimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Çözülmüş oksijen konsantrasyonunun *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) ile HA üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada da farklı stratejilerle çözülmüş oksijen miktarının kontrolünün HA üretim miktarını etkilediği tespit edilmiştir (39). HA fermantasyonunda n-dodekan ve n-hekzadekanın oksijen vektörü (oksijen taşıyıcısı olarak görev yapan ve oksijene yüksek afinite gösteren organik faz) olarak kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, oksijen vektörü ilavesinin HA üretim miktarını ve moleküler ağırlığını artırdığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda maksimum HA konsantrasyonu 4.25 g HA/L ve moleküler ağırlığı  $1.54 \times 10^7$  Da olarak %0.5 (v/v) heksadekan ilavesi ile gerçekleştirilmiştir (40).

*Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada tekrarlı-kesikli fermantasyonla HA üretimi amaçlanmıştır. Kesikli kültürde 0.24 g HA/L/sa olan hacimsel üretim oranı değeri tekrarlı-kesikli fermantasyonla 0.59 g

HA/L/sa değerine yükseltmiştir (41). *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) ile HA üretiminde ise hyaluronidaz enzimi ilavesinin kesikli kültürde üretime etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda hyaluronidaz ilavesi yapılmış ve 0.15 g/L enzim ilavesinin HA üretimini 5.0 g/L'den 6.0 g/L'ye yükselttiği, daha yüksek oranlarda enzim ilavesinin HA üretimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür (42). Aynı mikroorganizma ile gerçekleştirilen iki aşamalı fermantasyon stratejisinde de öncelikle yarı-sürekli fermantasyon ile hücre gelişimi sağlanmış ardından sakaroz içeriği 15 g/L'ye ayarlanarak kesikli fermantasyon başlatılmıştır. Deneme sonucunda yalnızca kesikli fermantasyonla 5.0 g/L HA üretilmişken iki aşamalı fermantasyon yöntemiyle üretim miktarı 6.6 g/L'ye yükseltmiştir (43).

Patil vd. (44), farklı besiyeri bileşimlerinde *Streptococcus zooepidemicus* (MTCC 3523) gelişimi ve HA üretimini incelemişler ve en yüksek HA üretimine (0.798 g HA/L); %4.05 glukoz, %5.12 soya peptonu, %0.075 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ve %0.25 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> içeren besiyerinde ulaşımlardır. Zhang vd. (45), yapmış oldukları çalışmada *S. zooepidemicus* (NJUST01) için optimum besiyeri içeriğini %5 nişasta, %0.3 glukoz, %0.5 pepton, %0.15 MgSO<sub>4</sub> ve %2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olarak belirlemişler ve çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen çalışmada 6.7 g/L HA üretmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) mikroorganizmasının alkali pH'da stres altında HA üretim potansiyeli incelenmiş ve alkali streste HA miktarı 1.5 g/L artış göstererek 6.5 g/L olarak gerçekleşmiştir (46). Besiyeri içeriği optimizasyonu üzerine bir diğer çalışmada ise *Streptococcus* sp. ID9102 için optimum besin bileşimi %4 glukoz, %0.75 maya ekstraktı, %1 kazein-pepton, %0.25 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.05 MgCl<sub>2</sub>, %0.5 NaCl, %0.04 glutamin, %0.06 glutamat ve %0.02 okzalik asit olarak bulunmuştur (47).

Besiyeri karbon/azot (K/A) oranının HA üretimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise kesikli fermantasyonda en uygun K/A oranının 2:1 olduğu ve fermantasyon veriminin artırılması için mikroorganizmanın durağan faza geçmeden kültür yenilemenin avantaj sağladığı belirtilmiştir (48). Ayrıca başlangıç glukoz konsantrasyonunun erlen çalışmalarında HA üretimi üzerine etkisinin olmadığı ancak reaktör çalışmaları göz önüne alındığında ise başlangıç glukoz konsantrasyonunun

önemli olduğu belirtilmiştir (49). Tüm bu besiyeri optimizasyonu çalışmalarının yanı sıra metal iyonlarının da HA üretimini ve moleküler ağırlığını etkilediği ve özellikle Na<sup>+</sup> iyonunun fermantasyonun başından itibaren ortamda bulunmasının moleküler ağırlığın artmasına katkı sağladığı belirlenmiştir (50).

Farklı zirai kaynaklardan; soya proteini konsantresi hidrolizati, peyniraltı suyu proteini konsantresi ve kaju elma suyu kullanılarak *Streptococcus zooepidemicus* ile HA fermantasyonları gerçekleştirilmiş ve kaju elma suyunda 0.89 g/L HA üretimi sağlanmıştır. Bu değer sentetik ortamda gerçekleştirilen kontrol çalışmasında elde edilen değer (0.86 g/L) ile aynıdır. Ancak zirai kaynaklarla üretilen HA moleküler ağırlığı 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> Da arasında değişirken sentetik ortamda üretilen HA'nın moleküler ağırlığı 10<sup>7</sup> Da olarak bulunmuştur (51).

#### **Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Rekombinant Mikroorganizma Kullanımı**

HA üretiminde ana üretici mikroorganizmanın kullanıldığı fermantasyonlarda karşılaşılan temel problemlerden birincisi ortamda istenmeyen safsızlıkların (proteinlerin) bulunması ve bu durumun saflaştırma maliyetlerini artırmasıdır. Ayrıca yüksek miktarda ve hedeflenen moleküler ağırlığa sahip HA üretimi de büyük önem arz etmektedir. Tüm bu sorunların üstesinden gelmek için araştırmacılar yeni rekombinant suşlar geliştirerek HA üretim denemeleri gerçekleştirmişlerdir.

Rekombinant hücre teknolojisi ile geliştirilen *E. coli* ile gerçekleştirilen denemelerde moleküler ağırlığı 3.5x10<sup>5</sup> ile 1.9x10<sup>6</sup> Da arasında değişen HA üretimi sağlanmış ancak üretim miktarları 1 g/L'nin çok çok altında gerçekleşmiştir (31). *Bacillus subtilis*'in HA üretiminde kullanılabilirliğinin tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada da HA üretimi geliştirilen suşlarla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş, TPG223 suşunun 6.8 g HA/L (4.5x10<sup>6</sup> Da) ve PG6181 suşunun 2.4 g HA/L (13x10<sup>3</sup> Da) ürettiği belirlenmiştir (33). *Lactococcus lactis* ile yapılan gen transferi çalışmalarında ise geliştirilen rekombinant suş ile 0.65 g/L HA üretimi sağlanabilmiştir (36). *S. thermophilus* (YIT 2084) ile gerçekleştirilen çalışmada ise en yüksek HA üretim değeri 208 mg/L olarak optimum şartlarda gerçekleştirilen deneme sonucunda elde edilmiştir (34). Benzer bir çalışmada ise doğal üretici olan *S. thermophilus* (YIT 2084) rekombine edilerek oluşturulan suş ile yapılan denemeler sonucunda

üretim miktarı yabani suşa göre 6 kat artmış ve 1.2 g/L HA olarak gerçekleşmiştir (35).

Bir diğer rekombinant hücre *Pichia pastoris* ile yüksek moleküler ağırlığa sahip HA üretimi hedeflenmiş, düşük sıcaklıkta (26 °C) gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda  $2.5 \times 10^6$  Da büyüklüğünde HA üretilmiş ancak üretim miktarı 0.8-1.7 g/L seviyelerinde kalmıştır (32). *S. zooepidemicus* ve rekombinant *L. lactis* ile gerçekleştirilen denemelerde UDP-GlcUA/UDP-GlcNAc hücre içi akış oranının HA moleküler ağırlığı üzerine direkt etkili olduğu bulunmuştur (52).

Tüm bu rekombinant hücrelerle gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde şu ana kadar geliştirilen suşların üretim miktarları ve üretkenlik değeri açısından yeterli seviyelere ulaşmadığı görülmektedir. Bu nedenle de ana üretici mikroorganizma olan *Streptococcus zooepidemicus* ile yeni fermantasyon stratejileri denenerek yapılan çalışmalara ara vermeden devam edilmektedir.

### **Hyaluronik Asit Üretiminde Farklı Fermantasyon Stratejileri ve Hyaluronik Asidin Saflaştırılması**

HA üretiminde karşılaşılan sorunların üstesinden gelmek, yüksek miktarda ve moleküler ağırlıkta HA üretimi sağlamak amacıyla farklı yöntem ve stratejiler denenmiştir.

Daha önceki bölümlerde açıklandığı üzere HA üretiminin artırılması için kesikli, yarı-kesikli ve diğer fermantasyon stratejileri denenmiş, elde edilen sonuçlar doğrultusunda yeni stratejiler oluşturularak üretimin artırılması ve HA'nın moleküler ağırlığının standardize edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bunların yanı sıra yalnızca HA moleküler ağırlığını artırmak üzere glikolitik prosesin zayıflatılmasının (53), UDP-N-asetilglukozamin konsantrasyonunun (54) ve fermantasyon şartlarının optimize edilmesinin (havalandırma, pH, sıcaklık vs.) (55) olumlu sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir. Bunların yanı sıra halen yeni üretim stratejileri oluşturularak denemeler yapılmakta, HA üretim miktarının artırılmasına ve moleküler ağırlığının standardize edilmesine çalışılmaktadır.

Yüksek miktarda ve standart özelliklerde ürün üretimi önemli olmakla birlikte elde edilen ürünün en yüksek saflıkta fermantasyon ortamından alınması da kritik öneme sahiptir. HA'nın fermantasyon ortamından saflaştırmak amacıyla ise ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon yöntemlerinin kombinasyonunun hızlı ve kararlı olduğu belirlenmiş ve uygun kombinasyonla %89 verim sağlanmıştır (56). HA

saflaştırmak amacıyla kriyojel içerisine hapsedilmiş glukuronik asit polimerlerinin kullanıldığı bir araştırmada oluşturulan yapının balık gözünden ve fermantasyon sıvısından HA'nın saflaştırılmasına olanak sağladığı ortaya konmuştur (57).

### **Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Karşılaşılan Genel Sorunlar**

Rekombinant hücre teknolojisinin HA üretimi amacıyla kullanılabilirdiği ancak HA üretim miktarının ve moleküler ağırlığının oldukça düşük düzeylerde kaldığı daha önceki çalışmalar incelendiğinde görülmektedir. Bu nedenle araştırmacılar ana mikroorganizma olan ve yüksek moleküler ağırlığına sahip HA üretimine imkân sağlayan *Streptococcus zooepidemicus* ile HA üretim miktarını arttırmayı ve farklı tekniklerle %100'e en yakın saflıkta HA elde etmeyi amaçlamışlardır. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek %89 saflıkta HA elde edilebilmiş ve HA üretim değeri ancak 6-7 g/L (MA:  $3.2 \times 10^6$  Da) düzeylerine ulaşabilmiştir (29). Hyaluronik asidin fermantasyonla üretiminde karşılaşılan sorunları özetlemek gerekirse (1):

-Fermantasyon sıvısında 4-5 g/L HA seviyesine ulaşıldığında viskozite değerlerinin 400-500 mPas değerlerine ulaşması karıştırmanın etkinliğini ve oksijen transfer oranını azaltmaktadır.

-HA sentezi ile hücre gelişimi paralellik göstermekle birlikte UDP-N-asetil-glukozamin ve UDP-glukuronik asit öncül bileşenlerini kullanma açısından bir yarış söz konusudur.

-HA üretimi sırasında en önemli yan ürün olan laktik asidin, fermantasyon ortamında birikmesi hücre gelişimini kısıtladığından HA üretimi olumsuz etkilenmektedir.

-*Streptococcus zooepidemicus* haricinde seçilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde düşük moleküler ağırlığa sahip HA elde edilmesi.

-*Streptococcus zooepidemicus* haricinde seçilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde düşük miktarlarda HA üretiminin sağlanması.

-Rekombinant hücre teknolojisi ile geliştirilen hücrelerle yapılan denemelerde HA üretim miktarlarının 2 g/L'nin oldukça altında gerçekleşmesi ve HA moleküler ağırlığının istenilen düzeyde olmaması.

-HA asit üretimini engelleyen anahtar mekanizmaların halen açıklanamamış olması.

-Tek düze (uniform) moleküler ağırlığa sahip HA üretiminin tam olarak sağlanamamış olması.

## Sonuç

HA, pazar hacmi 1 milyar doların üzerinde olan bir ürün olup bu derece kullanım potansiyeline sahip bir ürünün ekstraksiyon metotları yerine fermantasyonla üretilebilir oluşu maliyetlerin azaltılması ve üretim miktarlarının artırılması yönünden oldukça avantajlıdır. Son zamanlarda gerçekleşen çalışmaların büyük çoğunluğu da fermantasyonla HA üretiminde karşılaşılan temel sorunların üstesinden gelmek için gerçekleştirilmekte olup burada en temel sorunlar istenilen moleküler ağırlığına sahip HA'nın istenilen oranda ve tekdüze olarak üretiminin sürekli/stabil olarak sağlanamamasıdır. Bundan sonraki çalışmalarda üzerinde durulacak en temel sorunlar bunlar olup ana üretici mikroorganizmaya yeni fermantasyon tekniklerinin kombinasyonu uygulanarak veya yeni denenecek rekombinant sistemlerle stabil ve sürekli olarak HA üretiminin sağlanmasının yolu araştırılacaktır. Gıda takviyesi olarak kullanılan HA, tıp ve biyomedikal alanlarında da yaygın kullanım alanına sahiptir. Elde edilecek sonuçlar dâhilinde üretim miktarı artan ve maliyetleri düşen ürünün kullanım alanının da her geçen gün artacağına şüphe yoktur.

## KAYNAKLAR

1. 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.
2. Kuo C. K., Li W. J., Tuan R. S. 2013. Chapter II.6.8 - Cartilage and Ligament Tissue Engineering: Biomaterials, Cellular Interactions, and Regenerative Strategies. *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Material in Medicine*, Edited by: Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons, Academic Press, UK, pp. 1214-1236.
3. Prestwich G. D., Atzet S. 2013. Chapter I.2.7 - Engineered Natural Materials. *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Material in Medicine*, Edited by: Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons, Academic Press, UK, pp. 195-209.
4. Gomes M., Azevedo H., Malafaya P., Silva S., Oliveira J., Silva G., Mano R. S. J., Reis R. 2013. 16 – Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics (A volume in Plastics Design Library)*, Edited by Sine Ebnesajjad, William Andrew, UK, pp. 385-425.
5. DeRosa T. F. 2013. Next Generation of International Chemical Additives. Elsevier, UK, 565 p.
6. Su Z., Ma H., Wu Z., Zeng H., Li Z., Wang Y., Liu G., Xu B., Lin Y., Zhang P., Wei X. 2014. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. *Materials Science and Engineering C* 44:440-448.
7. Naraghi S. B., Christman K. L. 2013. Chapter 3 – Tissue Engineering and the Role of Biomaterial Scaffolds: The Evolution of Cardiac Tissue Engineering. Edited by Goldenberg R. C. D. S., Carvalho A. C. C. D., *Academic Press*, UK, pp. 43-67.
8. Lopes T. D., Riegel-Vidotti I. C., Grein A., Tischer C. A., Faria-Tischer P. C. D. S. 2014. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 67: 401-408.
9. Lam J., Truong N. F., Segura T. 2014. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomaterialia* 10: 1571-1580.
10. Vasi A. M., Popa M. I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L. 2014. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Material Science and Engineering C* 38: 177-185.
11. Ilgin P., Avci G., Silan C., Ekici S., Aktas N., Ayyala R. S., John V. T., Sahiner N. 2010. Colloidal drug carriers from (sub)micron hyaluronic acid hydrogel particles with tunable properties for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 82: 997-1003.
12. Liu S., Jin M., Quan Y., Kamiyama F., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. 2014. Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics and safety after application to the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 86: 267-276.
13. Graz V., Moros M. 2012. Chapter 14 – Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances. *Frontiers of Nanoscience (Volume 4)*, Edited by Palmer R. E., Elsevier, UK, pp. 337-440.
14. Pal K., Paulson A. T., Rousseau D. 2013. 14 – Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics (A volume in Plastics Design Library)*, Edited by Sine Ebnesajjad, William Andrew, UK, pp. 329-363.

15. Nath S. D., Abueva C., Kim B., Lee B. T. 2015. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carbohydrate Polymers* 115: 160-169.
16. Uccello-Barretta G., Nazzi S., Zambito Y., Di Colo G., Balzano F., Sans M. 2010. Synergistic interaction between TS-polysaccharide and hyaluronic acid: Implications in the formulation of eye drops. *International Journal of Pharmaceutics* 395: 122-131.
17. Fernández-Ronco M. P., Kluge J., Krieg J., Rodríguez-Rojo S., Andreatta B., Luginbuehl R. Mazzotti M. 2014. Improving the wear resistance of UHMWPE implants by in situ precipitation of hyaluronic acid using supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 95: 204-213.
18. Pitarresi G., Palumbo F. S., Calascibetta F., Fiorica C., Stefano M. D., Giammona 2013. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International Journal of Pharmaceutics* 449: 84-94.
19. Yan S., Zhang Q., Wang J., Liu Y., Lu S., Li M., Kaplan D. L. 2013. Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia* 9: 6771-6782.
20. Zhang J., Ma X., Fan D., Zhu C., Deng J., Hui J., Ma P. 2014. Synthesis and characterization of hyaluronic acid/human-like collagen hydrogels. *Materials Science and Engineering C* 43: 547-554.
21. Li J., He Y., Sun W., Luo Y., Cai H., Pan Y., Shen M., Xia J., Shi X. 2014. Hyaluronic acid-modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *Biomaterials* 35: 3666-3677.
22. Segari W. A. O., Radwan D. A. E. K., Hamid M. A. A. E. 2014. The effect of adding hyaluronic acid to calcium phosphate on periapical tissue healing following periradicular surgery in dogs. *Tanta Dental Journal* 11: 122-129.
23. Qassemyar Q., Gianfermi M. 2014. Supermicrosurgery and hyaluronic acid: Experimental feasibility study of a new method. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* Article in Press. Doi: 10.1016/j.anplas.2014.08.015.
24. Price R. D., Berry M. G., Navsaria H. A. 2007. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 60: 1110-1119.
25. Özer, E. A., Güven, A. 2008. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum, Türkiye, 1119-1120.
26. Başaran, A. A. 2008. Nutrasötikler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 28: 146-149
27. EFSA 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to hyaluronic acid and maintenance of joints (ID 1572, 1731, 1932, 3132) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006<sup>1</sup>. *EFSA Journal*, 7(9):1266
28. Chong B. F., Blank L. M., Mclaughlin R., Nielsen L. K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 341-351.
29. Hasegawa S., Nagatsuru M., Shibutani M., Yamamoto S., Hasebe S. 1999. Productivity of Concentrated Hyaluronic Acid Using a Maxblend Fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (1): 68-71.
30. Khanmohammadi M., Khoshfetrat A. B., Eskandarneshad S., Sani N. F., Ebrahimi S. 2014. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20: 4371-4376.
31. Yu H., Stephanopoulos G. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering* 10: 24-32.
32. Jeong E., Shim W. Y., Kim J. H. 2014. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *Journal of Biotechnology* 185: 28-36.
33. Jia Y., Zhu J., Chen X., Tang D., Su D., Yao W., Gao X. 2013. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresource Technology* 132: 427-431.
34. 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(4): 356-360.
35. Izawa N., Serata M., Sone T., Omasa T., Ohtake H. 2011. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(6): 665-670.
36. Chien L. J., Lee C. K. 2007. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 339-346.
37. Anon 2014. [http://www.biopharma.novozymes.com/en/information-centre/brochures-and-datasheets/Documents/Hyasis\\_A3\\_foldout\\_FINAL\\_Web.pdf](http://www.biopharma.novozymes.com/en/information-centre/brochures-and-datasheets/Documents/Hyasis_A3_foldout_FINAL_Web.pdf) (Accessed 27.10.2014)
38. Huang W. C., Chen S. J., Chen T. L. 2006. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 32: 239-243.

39. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2009. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 755-763.
40. Lai Z. W., Rahim R. A., Ariff A. B., Mohamad R. 2012. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(3): 286-291.
41. Huang W. C., Chen, S. J., Chen T. L. 2008. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 40: 460-464.
42. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2008. Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry* 110: 923-926.
43. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 99: 8532-8536.
44. Patil K. P., Kamalja K. K., Chaudhari B. L. 2011. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. *Carbohydrate Polymers* 86: 1573-1577.
45. Zhang J., Ding X., Yang L., Kong Z. 2006. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 168-172.
46. Liu L., Wang M., Du G., Chen J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology* 46: 383-388.
47. Im J. H., Song J. M., Kang J. H., Kang D. J. 2009. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1337-1344.
48. Chen S. J., Chen J. L., Huang W. C., Chen H. L. 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(2): 428-432.
49. 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.
50. Pires A. M. B., Eguchi S. Y., Santana M. H. A. 2010. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 2125-2135.
51. Pires A. M. B., Macedo A. C., Eguchi S. Y., Santana M. H. A. 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology* 101: 6506-6509.
52. Badle S. S., Jayaraman G., Ramachandran K. B. 2014. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. *Bioresource Technology* 163: 222-227.
53. 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.
54. Chen W. Y., Marcellin E., Hung J., Nielsen L. K. 2009. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *The Journal Of Biological Chemistry* 284(27): 18007-18014.
55. Armstrong D. C., Johns M. R. 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7): 2759-2764.
56. Zhou H., Ni J., Huang W., Zhang J. 2006. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 52: 29-38.
57. Ünlüer Ö. B., Ersöz A., Denizli A., Demirel R., Say R. 2013. Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel. *Journal of Chromatography B* 934: 46-52.