

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

Ramoplanin

PROJE ADI

Ramoplanin Antibiyotiği Üretiminin Ucuz Materyaller

Kullanılarak Arttırılması

BAŞVURU ID

#30613

KATEGORİ

.....

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....	3
2. Problem/Sorun	3
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem	4
4.1. Mikroorganizma	4
4.2. Katı ve Sıvı Büyüme Ortamı Kültür Koşulları	4
4.3. Ramoplanin Üretimi	5
4.4. pH Ölçümü.....	6
4.5. Kuru Hücre Kütlesinin Belirlenmesi	6
4.6. Ramoplanin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Miktar Tayini	6
4.7. Ölçek Büyütme Çalışmaları.....	6
4.8. Ölçek Büyütmede Kullanılacak Biyoreaktörün Özellikleri.....	7
4.9. Biyoreaktörde Ramoplanin Üretimi	7
4.10. Aşılama Oranı Etkisi.....	7
4.11. Biyoreaktörde pH Etkisi.....	7
4.12. Biyoreaktörde Karıştırma Hızı Etkisi	8
4.13. Biyoreaktörde Havalandırma Etkisinin İncelenmesi	8
4.14. Biyoreaktörde Köpük Oluşumu Etkisi.....	8
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	8
6. Uygulanabilirlik	9
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	9
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar).....	11
9. Riskler.....	11
10. Kaynaklar	12

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Ramoplanin lipoglikodepsipeptit yapısında bir antibiyotiktir. Gram-pozitif bakterilerde bakterisidal etki göstermektedir [1]. Benzersiz yapısı ve yaygın kullanılan antibiyotiklerden tamamen farklı bir etki mekanizmasına sahip olması nedeniyle bu antibiyotiğe karşı çapraz direnç gelişimi gözlemlenmemiştir. Yapılan klinik çalışmalar, ramoplanin antibiyotiğinin çoklu direnç gösteren VRE, MRSA, CDAD gibi hastalık ve ölüm oranının yüksek olduğu enfeksiyonlara karşı düşük dozlarda bile etkili olduğunu göstermektedir [2]. Bu nedenlerle ramoplanin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından hızlandırılmış ilaçlar kategorisine alınmıştır. Önümüzdeki yıllarda faz çalışmaları tamamlanıp piyasaya sürülmesi beklenmektedir [1]. Ramoplanin üretimi ekonomik olmayan, mevcut koşullarda düşük verimde üretilen, pahalı bir antibiyotiktir. Piyasaya uygun fiyattan sürülebilmesi için düşük maliyet ve yüksek verimle büyük ölçekli üretiminin yapılması gerekir. Ancak bu tür çalışmalar henüz yapılmamıştır. Sunduğumuz projede ramoplanin üretim verimini arttıracak besi ortamlarının tasarlanması ve büyük ölçekli üretime uyarlanması amaçlanmıştır. İlk olarak tam faktöriyel deney tasarım tekniğiyle ucuz endüstriyel azot kaynakları ve farklı derişimlerde iz elementler içeren besi ortamları tasarlanır ve laboratuvar ölçekli çalışmalar gerçekleştirilir. Ramoplanin miktarı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenir. Ardından en yüksek verimli besi ortamı kullanılarak 5 litre hacimli bir biyoreaktörde ölçek büyütme çalışmaları yapılır. Ölçek büyütmede aşılama oranı, pH, karıştırma hızı, havalandırma ve köpük oluşumu kontrol altında tutularak ramoplanin üretimi maksimum düzeye çıkarılır. Bu amaçla Plackett-Burman tasarımından yararlanarak deneyler gerçekleştirilir. Projemizin sonucunda belirlenecek optimum fermantasyon koşulları, Ar-Ge aşamasında daha büyük ölçekli üretimlere uyarlanarak antibiyotiğin piyasaya sürülmesi için geliştirilebilecektir.

2. Problem/Sorun

Antibiyotikler bakteri orijinli moleküller olup piyasadaki mevcut antibiyotiklerin bir kısmı bakterilerden biyolojik sentez yoluyla, bir kısmı da kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. Ramoplanin, doğal olarak *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 olarak tanımlanan bakteri tarafından üretilmektedir [3]. Ancak ramoplanin antibiyotiğinin üretim maliyeti yüksek ve üretim verimliliği düşüktür. 250 mg ramoplanin antibiyotiğinin fiyatı 375 Euro'dur [4]. **Ramoplanin antibiyotiğinin faz çalışmaları bittiğinde piyasaya sürülebilmesi için düşük maliyet ve yüksek verimle büyük ölçekli üretimi yapılabilirdir.** Yazın taraması sonuçlarına göre, ramoplanin antibiyotiğinin biyolojik veya kimyasal sentez yoluyla üretimi üzerine çok az çalışma yapıldığı görülmektedir. Biyolojik üretim çalışmaları laboratuvar ölçekli olup ölçek büyütme çalışması yapılmamıştır. Ramoplanin fermantasyonu çalışmalardan birinde besi ortamına lösin ve valin amino asitlerinin eklenmesi ile üretimin arttığı gösterilmiştir [5]. Ancak fermantasyon ortamında saf amino asit kullanımı ekonomik değildir. Ucuz endüstriyel karbonhidrat ve azot kaynakları ile iz elementlerin kullanımının antibiyotiklerin üretimini arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ramoplanin üretiminin; endüstriyel azot kaynakları kullanılarak en fazla 3-4 kat, iz elementler tek derişimde kullanılarak 7 kata kadar arttığı belirlenmiştir [6]. Çeşitli çalışmalarda ramoplanin ve türevlerinin kimyasal sentezi bütünüyle gerçekleştirilmiştir. Bu antibiyotiğin etkin formu olan ramoplanin A2 ile ramoplanoz aglikonu [7] ve ramoplanin A1 ile A3 aglikonları [8] kimyasal olarak sentezlenmiştir. Ancak bu çalışmaların ortak özelliği toplam verimin çok düşük olması ve biyolojik üretim ile rekabet

edememesidir [9]. Sonuç olarak **ramoplanin üretimi için uygun yol biyolojik sentezdir.** Ramoplanin antibiyotiğini piyasaya makul fiyattan sürebilmek için üretim maliyetini düşürmek ve üretim verimini arttırmak şarttır. Bunun için de yeni fermantasyon koşullarının belirlenmesi, optimizasyonu ve büyük ölçekli üretime uyarlanması gereklidir. Çözüm önerimiz ile ramoplanin üretim verimini çok daha fazla artıracak koşullar belirlenecek ve ölçek büyütme çalışması yapılabilecektir.

3. Çözüm

Ramoplanin antibiyotiğini üretebilmek için tek uygun yol biyolojik sentez olduğuna göre, çözüm biyolojik sentez verimini arttırmaktır. Bu amaçla besi ortamı ile fermantasyon türü ve koşullarının optimizasyonu yapılabilir [10]. Hipotezimize göre, **iz elementler ve azot kaynakları ayrı ayrı kullanıldığında üretimde belirlenen birkaç kat artış; bu maddelerden** deneysel tasarım yöntemiyle kombinasyon besi ortamları oluşturularak ölçek büyütme çalışmaları yapılırsa ramoplanin üretimi **çok daha yüksek düzeylere çıkacaktır.** Projemizin gerçekleşmesi, önümüzdeki yıllarda ramoplanin antibiyotiğinin makul fiyattan piyasaya sürülmesini sağlayacaktır.

Projemiz üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama; bakteri hücrelerinin çoğaltılarak fermantasyon aşamasına hazırlanması ve antibiyotik üretimine hazır hale getirilmesidir.

İkinci aşamada; ramoplanin antibiyotiği fermantasyon yoluyla üretilir. Deneysel tasarım yöntemiyle, endüstriyel azot kaynakları ve iz element kombinasyonlarından oluşan deney grubu besi ortamları tasarlanır. Bu besi ortamları kullanılarak erlenmayerlerde ramoplanin fermantasyonu gerçekleştirilir. Deney grubu besi ortamları; balık unu, tavuk unu, et-kemik unu gibi ucuz endüstriyel azot kaynakları ile değişen derişimlerde iz elementlerden oluşur. Bu iz elementler; ramoplanin antibiyotiğini üreten aktinomiset bakterileri için önemli iz elementler arasından seçilir. Kontrol grubu olarak soya unu içeren besi ortamı kullanılır ve deney gruplarının hangisinin en iyi ramoplanin üretimini sağladığı belirlenir. Fermantasyon süresince örnekler alınır. Ramoplanin antibiyotiği fermantasyon ortamından ekstraksiyon yöntemiyle saflaştırılır ve miktar tayini yapılır [5].

Üçüncü aşama; ölçek büyütme ve çeşitli değişkenlerin antibiyotiğin üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi aşamasıdır. İkinci aşamada en fazla ramoplanin üretiminin belirlendiği besi ortamı 5 litre hacimli bir biyoreaktörde kullanılır. Biyoreaktörde aşılama oranı, pH, karıştırma hızı, havalandırma ve köpük oluşumunun ramoplanin üretimine etkisi Plackett-Burman tasarımıyla yapılan deneyler sonucunda belirlenir. Böylece optimum koşullar belirlenir ve ramoplanin üretimi maksimum düzeye çıkarılır.

4. Yöntem

4.1.Mikroorganizma

Ramoplanin üreten *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 bakteri suşu Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilir.

4.2. Katı ve Sıvı Büyüme Ortamı Kültür Koşulları

Actinoplanes sp. ATCC 33076 yulaf unu agar ortamında çoğaltılır. Ortam pH değeri 7,00'ye ayarlanır. Ortam, 20 dk süreyle 121°C'de otoklavda sterilize edilir. 1ml/l iz element çözeltisi

eklenir. Bakteri 30°C’de 8 gün inkübe edilir. Yulaf unu agar ortamının içeriği; 60 g yulaf unu, 12.5 g agar, 1 ml iz element çözeltisi, 1 l distile sudur. İz element çözeltisinin içeriği; 0.1 g FeSO₄.7H₂O, 0.1 g MnCl₂.4H₂O, 0.1 g ZnSO₄.7H₂O, 100 ml distile sudur [11].

Agar ortamında çoğaltılan bakteri sıvı büyüme ortamına alınır. Sıvı büyüme ortamının pH değeri 7,00-7,20 arasına ayarlanır. Ortam, 20 dk süreyle 121°C’de otoklavda sterilize edilir. 100 ml sıvı büyüme ortamı içeren 500 ml’lik erlenler 5 ml miselyum süspansiyonu (OD620: 0.800) ile inoküle edilir. Erlenler 30°C’de 96 saat döner çalkalayıcıda 200 rpm’de inkübe edilir. Sıvı büyüme ortamının içeriği; 3 g et özü, 5 g maya özütü, 5 g tripton, 1 g glikoz, 24 g çözümlü nişasta, 4 g CaCO₃, 1 l distile sudur [5].

4.3. Ramoplanin Üretimi

Ramoplanin antibiyotiğinin fermantasyon yoluyla üretim aşamasında kontrol grubu olarak soya unu içeren besi ortamı; deney grubu olarak endüstriyel azot kaynakları ve iz element kombinasyonları kullanılır. Kontrol grubu besi ortamının içeriği; 4 g glikoz, 4 g çözümlü nişasta, 20 g maltoz, 20 g sükkroz, 20 g gliserol, 30 g soya küspesi, 6 g CaCO₃, 1 l distile sudur [11].

Deney grubu besi ortamları tam faktöriyel deney tasarım tekniği ile tasarlanır (Tablo 1). Deney gruplarında soya küspesi eşit kütlede et-kemik unu, tavuk unu ya da balık unu ile değiştirilir ve değişen derişimlerde iz element çözeltisi eklenir. Daha önce gerçekleştirilen laboratuvar ölçekli çalışmada ramoplanin üretiminin 7. Günde en üst düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Ucuz bir azot kaynağı olan tavuk unu ortamında total ramoplanin üretiminin en fazla olduğu belirlenmiş, balık unu ortamında 7. Gündeki en yüksek ramoplanin üretimi (406.805 mg/l; kontrol grubunun 4,89 katı) gerçekleşmiştir. Aynı çalışmada tek tür ve derişimde iz elementler kullanılmış ve bu iz elementler aktinomiset bakterileri için önemli iyonlar arasında seçilmiştir. En yüksek ramoplanin üretimi 75 ppm Zn⁺² iyonu içeren besi ortamında 647.415 mg/l (kontrol grubunun 6,78 katı) olarak 7. Günde belirlenmiştir. Ayrıca 45 ppm Mn⁺² ve 75 ppm K⁺ iyonu içeren besi ortamlarında da anlamlı artışlar olmuştur. Ancak Fe⁺² ve Mg⁺² iyonlarının ramoplanin üretim verimine etkisi diğer iyonlara kıyasla çok düşük düzeyde kalmıştır [6]. Bu projedeki deney grupları bu sonuçlar dikkate alınarak tasarlanmıştır. Azot kaynaklarına ramoplanin üretimini en çok arttıran Zn, Mn ve K iz elementleri eklenir. Daha üst ve alt derişimlerin de etkili olabileceği düşünülerek 75 ppm’de etkili olan Zn⁺² ve K⁺ için derişim aralığı 60-75-90 ppm, 75 ppm’de etkili olan Mn⁺² için derişim aralığı 30-45-60 ppm

Tablo 1: Deneysel tasarım ile hazırlanan besi ortamları

Deney no	İz elementler		
	Zn ⁺²	Mn ⁺²	K ⁺
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	1	1	2
5	1	2	1
6	2	1	1
7	1	1	3
8	1	3	1
9	3	1	1
10	2	2	1
11	2	1	2
12	1	2	2
13	2	2	3
14	2	3	2
15	3	2	2
16	3	3	1
17	3	1	3
18	1	3	3
19	3	3	2
20	3	2	3
21	2	3	3
22	1	2	3
23	1	3	2
24	2	1	3
25	2	3	1
26	3	1	2
27	3	2	1

olarak belirlenir. 3 çeşit iz elementin 3 derişimi için her azot kaynağı ile $3^3=27$ deney, toplamda 81 deney tasarlanır.

Ramoplanin üretim ortamlarının pH değerleri 7,00'ye ayarlanır. Ortamlar, 20 dk süreyle 121°C'de otoklavda sterilize edilir. İz element çözeltileri ayrıca eklenir. 250 ml'lik erlenlerde 20 ml ramoplanin üretim ortamı, 10 ml sıvı büyüme ortamı ile inoküle edilir. Erlenler 30°C'de döner çalkalayıcıda 200 rpm'de inkübe edilir [6].

Fermantasyonun 3. Gününden itibaren örnekler alınır ve analizler yapılır. Daha önce yapılan çalışmalarda ramoplanin üretiminin 7. Günde en üst düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Deneysel tasarım yönteminde hergün örnek olarak besi ortamına bağlı olarak değişiklikler olup olmadığı belirlenir. Ramoplanin fermantasyon ortamından ekstraksiyon yöntemiyle saflaştırılır ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile miktar tayini yapılır [5].

4.4. pH Ölçümü

Farklı besi ortamlarındaki pH değişimi-ramoplanin üretimi ilişkisi incelenir. Erlenlerden 10 ml örnek alınarak kültür, 5000 rpm'de 10 dk boyunca +4 °C'de santrifüjlenir. Kültür sıvısının pH değeri bir pH-metre ile ölçülür.

4.5. Kuru Hücre Kütlesinin Belirlenmesi

Farklı besi ortamlarındaki kuru hücre kütlesi-ramoplanin üretimi ilişkisi incelenir. Santrifüj ile elde edilen çökelti iki kez distile su ile yıkanır ve sabit bir kütleye kadar dondurularak kurutulur [12].

4.6. Ramoplanin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Miktar Tayini

Erlenlerden 10 ml örnek alınarak 30 ml aseton:su (2:1) ile karıştırılır. Derişik HCl ile pH 2.20'ye ayarlanır. Karışım, oda sıcaklığında 30 dk çalkalanır ve filtre kağıdı ile süzülür. Süzülen çözelti, eşit hacimde etil asetat ile ekstrakte edilir. Karışım 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlenir. Altındaki su fazı dondurulur ve liyofilize edilir. Liyofilize edilmiş örnekler asetonitril:ultra distile suda (2:8) çözülür, 12000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüjlenir ve HPLC'ye enjekte edilmeden önce 0.45 µm'lik bir PTFE membran filtreden geçirilir [5].

HPLC ile ramoplanin miktar tayini, vakumlu gaz giderici, ikili pompa ve fotodiyot detektörlü (DAD) bir HPLC sistemi ve ters faz ODS-2 (C18) kolonu (250x4.6 mm, 5 µm) ile yapılır. Kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 1,2 ml/dk'dır. Mobil faz A olarak 25 mM NaH₂PO₄ (pH 3.50):CH₃CN (80:20, v/v) ve mobil faz B olarak 25 mM NaH₂PO₄ (pH 3.50):CH₃CN (20:80, v/v) çözeltileri kullanılır. Gradyan; başlangıçta %73 mobil faz A; 5. Dk'da %73 mobil faz A ve 30. Dk'da %5 mobil faz A şeklindedir. Dalga boyu 254 nm, enjeksiyon hacmi 20 µl'dir [5]. Standart olarak Sigma Aldrich'ten temin edilen ramoplanin kullanılır.

4.7. Ölçek Büyütme Çalışmaları

Bu aşamada, en fazla ramoplanin üretiminin belirlendiği besi ortamı kullanılarak 5 litrelik biyoreaktörde kesikli fermantasyon metoduyla ölçek büyütme çalışmaları yapılır. Biyoreaktör ortamındaki çeşitli faktörler kontrol altında tutularak ramoplanin üretimi maksimum düzeye çıkarılır. Bu amaçla yine deneysel tasarımdan yararlanır. Laboratuvar ölçeğinde en verimli

besi ortamı tam faktöriyel deney tasarımı ile belirlenirken, bu aşamada daha fazla değişken olduğu için deney sayısını azaltmak ve ekonomik olmak amacıyla bu tür çalışmalarda yararlanılan Plackett-Burman tasarımı kullanılır. Deney tasarım Minitab programı ile hazırlanır.

4.8. Ölçek Büyütmede Kullanılacak Biyoreaktörün Özellikleri

Ölçek büyütme aşamasında; termometre, pH sensörü, çözünmüş oksijen sensörü, takometre, hava akış ölçer, dahili basınç sensörü ve köpük algılama probu ile donatılmış 5 litre hacimli bir karıştırıcı tank biyoreaktör kullanılır. Karıştırma sistemi, dört düz bıçaklı ve manyetik tabanlı iki çarktan oluşur. Karıştırma hızı elektromanyetik olarak kontrol edilir. Havalandırma sistemi, hava akış ölçer, hava filtresi ve püskürtme cihazından oluşur. Sıcaklık, tabandan ısıtma sistemi ve soğutma suyu ile sabit tutulur. Köpük algılama probunun sinyali, köpük önleyici eklemek için bir röle yoluyla bir elektromanyetik valfe bağlanır [12]. Camdır ve otoklavlanabilir. (Sartorius Univessel® Glass)

4.9. Biyoreaktörde Ramoplanin Üretimi

Biyoreaktörde en fazla ramoplanin üretiminin gerçekleştiği besi ortamı kullanılır. 3,5 litre hacimde çalışılır. Biyoreaktör parçaları ve 3.5 l besi ortamı ile 30 dk süreyle 121 °C'de yüksek basınçlı buhar sterilizasyon kabı ile sterilize edilir [12]. Biyoreaktörde aşılama oranı, pH, karıştırma hızı, havalandırma ve köpük oluşumu faktörlerinin ramoplanin üretimine etkisi araştırılır. Bu 5 faktörün 3 farklı değeri için Plackett-Burman tasarımı ile 15 deney yapılır (Ek 1). Kontrol grubu olarak hiçbir faktörün kontrol altında tutulmadığı en verimli besi ortamı kullanılır. Fermantasyonun 3. Gününden itibaren 30 ml örnek alınır alınarak pH ölçümü, kuru hücre kütlelerinin belirlenmesi, ramoplanin saflaştırma ve miktar tayini yapılır. Bu aşamanın sonunda ramoplanin üretimi için en uygun koşullar belirlenmiş olur.

4.10. Aşılama Oranı Etkisi

Laboratuvar ölçekli denemelerde olduğu gibi bakteri hücreleri önce katı, sonra sıvı büyüme ortamında büyütülür ve biyoreaktörde yapılacak denemelerde aşılama amacıyla kullanılır. İlgili yazın incelendiğinde genellikle %10 aşılama yapıldığı belirlendi [13, 14, 15, 16]. Kontrol gruplarında müdahalesiz ortamda %10 aşılama yapılırken, deney gruplarında %5, %10, %15 aşılama oranının etkisi incelenir.

4.11. Biyoreaktörde pH Etkisi

Ramoplanin üreten *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 bakteri suşu için optimum pH değerleri 7,00-7,20 aralığındadır. Biyoreaktörde pH etkisi 6,75-7,00-7,25 değerlerinde incelenir. Kontrol grubunda ve deney gruplarında ramoplanin üretim ortamlarının pH değerleri fermantasyon öncesinde 7,00'ye ayarlanır. Kontrol grubunda pH değişimine müdahale edilmezken, deney gruplarında pH ayarı otomatik olarak yapılır. pH ayarı için 2 M HCl ve 3 M NaOH çözeltileri kullanılır [16].

4.12. Biyoreaktörde Karıştırma Hızı Etkisi

Laboratuvar ölçekli ramoplanin üretiminde 200 rpm optimum olarak belirlenmiştir [11]. Karıştırma hızının etkisini belirlemek için kontrol grubunda 200 rpm’de; deney gruplarında 200-250-300 rpm’de çalışılır.

4.13. Biyoreaktörde Havalandırma Etkisinin İncelenmesi

vvm, standart koşullar altında sıvı hacmi başına dakikada düşen hava akış hacmi olarak açıklanabilir. Biyoreaktörler genellikle 0,50-1,50 vvm aralığında havalandırma yapar [17]. **Ramoplanin üretiminde optimum havalandırma değerinin belirlenmesi için kontrol grubunda havalandırma yapılmazken deney gruplarında 0,50-1,00-1,50 vvm havalandırmanın etkisi incelenir.**

4.14. Biyoreaktörde Köpük Oluşumu Etkisi

Aktinomisetler biyoreaktörlerde ağır köpüklenmeye neden olan bakterilerdendir [18]. Köpük oluşumu biyoreaktörlerde etkin hacmini artırır, sıvının gerçek hacminin azaltır, işlemin steril koşullarda gerçekleşmesi güçleştirir, ürün kaybı ve dolayısıyla maliyet artışına neden olur. Ayrıca ürün kaybı, ısı ve kütle transferinin azalması, çözülmüş oksijenin kısıtlanması ve protein denatürasyonuna da neden olur. Tüm bu nedenler ile köpürme biyoproseslerde istenmeyen bir olaydır ve mutlaka yok edilmesi veya kontrol altında tutulması zorunludur [19].

Biyoreaktörde köpük oluşumunun etkisini incelenmek için kontrol grubunda köpük oluşumuna müdahale edilmezken deney gruplarında kimyasal köpük kırıcı kullanılır. Köpük kırıcı olarak ilaç üretimi ve mikrobiyal fermantasyona uygun, toksik olmayan bir madde seçilir. %0,1~0,3 aralığında kullanılması önerileri dikkate alınarak deney gruplarına toplam hacmin %0,1, %0,2 ve %0,3’ü kadar kimyasal köpük kırıcı eklenir.

Bütün deneyler 3 kez tekrarlanır ve istatistiksel analizler yapılır.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Ramoplanin, diğer antibiyotiklere kıyasla düşük dozlarda bile etkili olan, çapraz direnç gelişimi gözlenmeyen ve çoklu antibiyotik direnci gösteren birçok ölümcül enfeksiyonun tedavisinde son çare antibiyotiktir. İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen faz çalışmaları bitip piyasaya sürüleceğinde üretim verimi ve maliyeti önemli bir konu olacaktır. Ramoplanin üretimi üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen verim, antibiyotiğin piyasaya sürülebilmesi için yeterli ya da ekonomik değildir. Projemizin gerçekleştirilmesi durumunda daha önce yapılmamış olan kombinasyon besi ortamları ile ramoplanin üretim verimi arttırılacaktır. İz elementler ve azot kaynakları ayrı ayrı kullanıldığında üretimde belirlenen birkaç kat artış; bu maddeler kombinasyon olarak kullanıldığında çok daha yüksek düzeylere çıkacaktır. Böylece ramoplanin üretim verimini arttırmak için saf amino asit kullanımından çok daha ekonomik bir besi ortamı tasarlanmış olacaktır. Ayrıca balık unu, tavuk unu, et-kemik unu gibi endüstriyel azot kaynakları mikrobiyal enzim üretiminde yaygın olarak kullanılmasına rağmen antibiyotik üretiminde kullanımı oldukça azdır. Ramoplanin üretiminde şimdiki dek ölçek büyütme çalışması da yapılmamıştır. Biyoreaktörde ölçek büyütme ile erlende yapılan üretimde kontrol edilemeyen pH değişimi, oksijen tüketimi, köpüklenme gibi faktörler kontrol altına

alınabileceği için üretim maksimum düzeye çıkacaktır. Deneysel olarak 5 litre hacimli biyoreaktörde belirlenecek en uygun fermantasyon koşulları, Ar-Ge aşamasında daha büyük ölçekli üretimlere uyarlanarak antibiyotigin piyasaya sürülmesi için geliştirilebilir.

6. Uygulanabilirlik

Projemizde sunduğumuz çözüm yolu ve yöntemler ilaç firmaları ya da biyoteknoloji merkezleri tarafından gerekli ekipmana sahip bir laboratuvarında kolayca gerçekleştirilebilir. En yüksek verimde üretimi sağlayan koşullar belirlendikten sonra bir giderek artan ölçeklerde üretim denenebilir ve endüstriyel üretime uyarlanabilir. Böylece ramoplanin, piyasaya sürüleceği zaman makul fiyatlarda satın alınabilecek ticari bir ürüne dönüşmüş olacaktır. Diğer yandan çözüm önerimiz ramoplanin üretim maliyetini oldukça düşürecektir. Endüstriyel azot kaynaklarının kg fiyatları soya unundan çok daha düşük maliyetlidir. Üretim maliyetinin düşürülmesi için tavuk unu içeren besi ortamı optimize edilebilir. Endüstriyel üretimde 10-500 bin litre hacimli biyoreaktörlerde üretim yapıldığı dikkate alınırsa ucuz azot kaynaklarının kullanımı maliyeti oldukça düşürecektir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Bu projenin gerekli teçhizat altyapısına sahip olan bir araştırma merkezinde gerçekleştirileceği düşünülerek sarf malzemeler dikkate alınmıştır. Projede kullanılacak sarf malzemelerin fiyatları aşağıdaki tabloda listelenmiştir:

Sarf Malzeme	Adet	Birim Fiyat	Toplam Fiyat
Actinoplanes sp. ATCC 33076	1 vial	7320,00 TL	7320,00 TL
Ramoplanin	250 mg	4575,00 TL	4575,00 TL
Etanol	5 Litre	306,20 TL	1531,00 TL
Yulaf unu agar	1 kg	8906,00 TL	8906,00 TL
FeSO ₄ .7H ₂ O	250 g	325,75 TL	325,75 TL
MnCl ₂ .4H ₂ O	500 g	414,80 TL	414,80 TL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	500 g	640,50 TL	640,50 TL
Et ekstraktı	1 kg	2000,80 TL	2000,80 TL
Maya ekstraktı	1 kg	3660,00 TL	3660,00 TL
Tripton	1 kg	2928,00 TL	2928,00 TL
Glikoz	1 kg	724,70 TL	724,70 TL
Suda çözünür nişasta	1 kg	2318,00 TL	2318,00 TL
CaCO ₃	1 kg	825,90 TL	825,90 TL
Maltoz	1 kg	4477,40 TL	4477,40 TL
Sükroz	1 kg	1403,00 TL	1403,00 TL
Gliserol	1 litre	651,50 TL	651,50 TL
Soya küspesi	5 kg	149,50 TL	149,50 TL
Et kemik unu	5 kg	73,40 TL	73,40 TL
Balık unu	5 kg	125,00 TL	125,00 TL
Tavuk unu	5 kg	82,00 TL	82,00 TL
Etil asetat	10 Litre	1354,20 TL	13542,00 TL

Kimyasal köpük kırıcı	500 g	2037,40 TL	2037,40 TL
Whatman No.1 filtre kağıdı	1 paket	438,00 TL	438,00 TL
HCl	500 ml	1068,70 TL	1068,70 TL
NaOH	500 g	318,45 TL	318,45 TL
Ters faz ODS-2 (C18) kolonu	1 adet	8857,20 TL	8857,20 TL
0,45 µm PTFE membran filtre	1 paket	2842,60 TL	2842,60 TL
Steril petri 500 adet	1 paket	1898,30 TL	1898,30 TL
Kapaklı erlen 250 ml	50 adet	100,55 TL	5027,50 TL
Kapaklı erlen 500 ml	10 adet	151,85 TL	1518,50 TL
Erlen 2 litre	10 adet	72,25 TL	722,50 TL
CH ₃ CN	2,5 L x 8 adet	3708,80 TL	29670,40 TL
Oksijen tüpü 10 L	5 adet	169,00 TL	845,00 TL
Serolojik pipet 25 ml	5 paket	1561,60 TL	7808,00 TL
Serolojik pipet 5 ml	5 paket	1293,20 TL	6466,00 TL
Pipet ucu 1000 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
Pipet ucu 100 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
Pipet ucu 10 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
50 ml santrifüj tüpü	10 paket	172,66 TL	1726,60 TL
15 ml santrifüj tüpü	10 paket	73,14 TL	731,40 TL
1,5 ml santrifüj tüpü	2 paket	97,60 TL	195,20 TL
		Toplam :	139426,40 TL

Projemiz 150000,00 TL altında bir fiyatla gerçekleştirilebilir. Bu bakımdan bilimsel bir araştırma projesi için oldukça düşük fiyatlıdır.

Proje 12 aylık bir süreçte tamamlanabilir. Buna göre proje takvimi ve iş paketleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Aylar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. iş paketi: Sarf malzemelerin temini	X	X										
2. iş paketi: Katı ve sıvı büyüme ortamı kültür koşullarının optimizasyonu			X	X	X							
3. iş paketi: Küçük ölçekte ramoplanin üretimi					X	X						
4. iş paketi: Ramoplanin ekstraksiyonu, HPLC ile miktar tayininin optimizasyonu ve diğer analizler						X	X					
5. iş paketi: Biyoreaktörde ramoplanin üretiminin optimizasyonu (Ölçek büyütme çalışmaları)							X	X	X	X		

6. iş paketi: Biyoreaktörden ramoplanin ekstraksiyonu, HPLC ile miktar tayini ve diğer analizler									X	X	X	X	
8. iş paketi: Projenin sonuçlandırılması													X

İş paketleri “yöntemde” yer alan çalışmalara göre oluşturulmuş ve detaylı olarak anlatılmıştır.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Ramoplanin antibiyotiği, VRE, MRSA, CDAD gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren ölümcül enfeksiyonlara yakalanmış hastaların tedavisi için son çaredir. Dolayısıyla bu enfeksiyonlardan dolayı tedavi gören kişiler proje fikrimizin hedef kitesidir. Bu projenin gerçekleştirilerek kullanıcılara ulaşması için ilaç sanayi ve biyoteknoloji merkezleri tarafından Ar-Ge çalışmaları yapılmalıdır. Projemizin bir ilaç firması veya biyoteknoloji merkezi tarafından deneysel olarak hayata geçirilmesi durumunda ulaşılan en iyi sonuçlar endüstriyel düzeyde üretim için optimize edilebilir. Optimize edilen endüstriyel üretim koşulları üzerine patent alınabilir. Büyük ölçekli üretimin öngördüğümüz gibi yüksek verimli ve düşük maliyetli olarak gerçekleştirilmesi durumunda ramoplanin antibiyotiği makul bir fiyattan iç ve dış piyasaya sürülebilir. Böylece gerek günümüzde sürdürülen bilimsel çalışmalar gerekse de faz çalışmalarının tamamlanmasından sonra bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için makul fiyatıyla daha ulaşılabilir olacaktır.

9. Riskler

Proje gerçekleştirilirken karşılaşılabilecek riskler şunlardır:

Risk 1: En yüksek ramoplanin üretimi sağlayacak endüstriyel azot kaynağı ile iz elementler bir arada kullanıldığında ramoplanin üretiminin çok daha yüksek düzeye çıkmasını bekliyoruz. Ancak mevcut riskler çerçevesinde aksine ramoplanin üretiminde inhibisyon olabilir. Ancak bu durumun bütün besi ortamlarında olması beklenmemektedir.

Risk 2: Biyoreaktörde kontrol altında tuttuğumuzda ramoplanin üretimini arttıracak pH düşündüğümüz pH değişimi, oksijen tüketimi, köpüklenme gibi faktörler aksine bakteri hücre kütlelerinin çoğalmasına ve ramoplanin üretmemesi gibi durumlara neden olabilir. Çözüm olarak buna neden olacak faktörlerin kontrol altında tutulması tercih edilmeyecektir.

Risk 3: Antibiyotikler sekonder metabolitlerdir. Bakterinin pasaj sayısı gibi nedenlerle üretim daima aynı miktarda olmayabilir. Bunun etkisini en aza indirmek için bütün deneylerde kontrol grubuna kıyasla değişimin ne olduğu belirlenir.

Risk 4: Temin edilen endüstriyel azot kaynaklarının protein içeriği değişebilir. Bu riski bertaraf etmek için bu maddeler, analiz raporları ile, aynı satıcıdan temin edilebilir.

10. Kaynaklar

- [1] Fulco, P., & Wenzel, R. P. (2006). Ramoplanin: a topical lipoglycopeptide antibacterial agent. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 4(6), 939-945.
- [2] McCafferty ve diğerleri (2002). Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(4), 261-284.
- [3] Farver ve diğerleri (2005). Ramoplanin: a lipoglycopeptide antibiotic. *Annals of Pharmacotherapy*, 39(5), 863-868.
- [4] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r1781?lang=en®ion=TR>
- [5] Brunati ve diğerleri (2005). Influence of leucine and valine on ramoplanin production by *Actinoplanes* sp. ATCC 33076. *The Journal of Antibiotics*, 58(7), 473-478.
- [6] Erkan, D. (2015). Production of ramoplanin antibiotic by submerged fermentation, Dokuz Eylül Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
- [7] Jiang ve diğerleri (2003). Total synthesis of the ramoplanin A2 and ramoplanose aglycon. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (7), 1877-1887.
- [8] Shin ve diğerleri (2004). Total synthesis and structure of the ramoplanin A1 and A3 aglycons: two minor components of the ramoplanin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (33), 11977-11979.
- [9] Di Palo ve diğerleri (2007). A new bacterial mannosidase for the selective modification of ramoplanin and its derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, 41 (6-7), 806-811.
- [10] Sitanggang ve diğerleri (2010). *Fermentation Strategies: Nutritional Requirements*.
- [11] Cavalleri ve diğerleri (1984). A-16686, a new antibiotic from *Actinoplanes* I. fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics. *The Journal of Antibiotics*, 37 (4), 309-317.
- [12] Zhou ve diğerleri (2018). Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules*, 23(1), 125.
- [13] Almalki, M. A. (2020). Isolation and characterization of polyketide drug molecule from *Streptomyces* species with antimicrobial activity against clinical pathogens. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 125-130.
- [14] Wang ve diğerleri (2010). Optimization of the fermentation process of actinomycete strain Hhs. 015 T. *BioMed Research International*, 2010.
- [15] Lee ve diğerleri (2003). Production of teicoplanin by a mutant of *Actinoplanes teichomyceticus*. *Biotechnology Letters*, 25(7), 537-540.
- [16] Lee ve diğerleri (2005). Large-scale fermentation for the production of teicoplanin from a mutant of *Actinoplanes teichomyceticus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 787.
- [17] Benz, G. T. (2008). Piloting bioreactors for agitation scale-up. *CEP*, 104, 32-34.

