ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞINDAN ANTİOKSİDAN ENZİMLER ÜRETİMİ

Didem DEĞİRMENBAŞI

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2016

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Didem DEĞİRMENBAŞI tarafından hazırlanan ‘‘**Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığından Antioksidan Enzimler Üretimi**’’ adlı tez çalışması 19/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Zümriye AKSU
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19/02/2016

Didem DEĞİRMENBAŞI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞINDAN ANTİOKSİDAN ENZİMLER ÜRETİMİ

Didem DEĞİRMENBAŞI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ

Gerçekleştirilen çalışmada, zeytinyağı üretim fabrikalarının sıvı atığı zeytin karasuyu (ZK) ortamında, *Rhodotorula glutinis* kullanılarak endüstriyel antioksidan enzimler katalaz (KAT) ve süperoksit dismutazın (SOD) üretim koşulları araştırılmıştır. *R.glutinis* hücrelerinin çoğalması için uygun ZK derişimi belirlenmiş ve bu ortamda çoğalma ile enzim aktivitelerine etki eden parametreler araştırılmıştır. SOD ve KAT enzim aktivitelerine ek karbon ve azot kaynakları, sıcaklık, karıştırma hızı ve farklı türde stres koşullarının etkileri incelenmiştir. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Enzim üretimi için optimum sıcaklık ve karıştırma hızı 30^{o}C ve 150 rpm olarak bulunmuştur. Ek karbon kaynaklarından etanol yüksek spesifik SOD aktivitesi (14 U/mg protein) sağlarken, ek karbon kaynağı bulunmayan ZK ortamında yüksek spesifik KAT aktivitesi (15.35 U/mg protein) elde edilmiştir. Ek azot kaynağı eklenen ZK-UYM (Universal Yeast Medium) ortamında en yüksek spesifik SOD aktivitesi üre varlığında (22.64 U/mg), en yüksek spesifik KAT aktivitesi katkısız ortamda (67.4 U/mg) bulunmuştur. Oksidatif stres olarak hücrelere H_2O_2 ve UV ışık uygulanmıştır. *R.glutinis* hücrelerine 48 st çoğalma sonunda uygulanan oksidatif stres etkilerinden 8 dk süre ile 50 mM derişimde H_2O_2'in etki ettirilmesiyle SOD aktivitesi 2.73 kat artmış; KAT aktivitesi ise 2.22 kat artmıştır. Hücrelerin UV ışığına maruz bırakılması SOD aktivitesini çok az arttırırken, 8 dk maruz bırakılması KAT aktivitesi 1.16 kat artmıştır. Metal iyonları (Mg^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}) kontrol ortamına göre SOD ve KAT aktivitelerini artırmıştır. Çalışmada, en yüksek KAT aktivitesine (67.4 U/mg) ek azot kaynağının eklenmediği ortamda ve en yüksek SOD aktivitesine (40 U/mg) üre ve Mg^{+2} iyonu birlikte eklenen ortamda ulaşılmıştır. En yüksek hücre derişimi ($58.6x10^7$ hücre/mL) 15^{o}C'de elde edilmiştir.

Şubat 2016, 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Rhodotorula glutinis*, zeytin karasuyu, fenolik bileşikler, antioksidan enzimler, süperoksit dismutazın, katalaz

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION OF ANTIOXIDANT ENZYMES FROM OLIVE MILL WASTEWATER

Didem DEĞİRMENBAŞI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Z. Serpil TAKAÇ

Production conditions for antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) using *Rhodotorula glutinis* in the presence of olive mill wastewater (OMW) were investigated. Parameters for the growth and enzyme activities were investigated at the OMW concentration where the optimum growth was obtained. Enzyme activities were determined spectrophotometrically. The optimum temperature and agitation rate for the production of enzymes were found as 30^{o}C and 150 rpm, respectively. Ethanol provided the highest SOD activity (14 U/mg) whereas the highest CAT activity (15.35 U/mg) was obtained when no additional carbon source was present in the medium. During the growth in OMW-UYM medium, addition of urea yielded the highest SOD activity (22.64 U/mg), however, the highest CAT activity (67.4 U/mg) was reached when no additional nitrogen source was present in the medium. H_2O_2 and UV light were exposed to 48h grown cells for different periods as oxidative stress parameters. The treatment of the 48h grown cells with 50 mM H_2O_2 for 8 min increased SOD and CAT activity 2.73-fold and 2.22-fold, respectively. The exposition of cells to UV light increased SOD activity slightly, however UV treatment for 8 min increased CAT activity 1.16-fold. The metal ions (Mg^{+2},Mn^{+2},Fe^{+2},Cu^{+2}) introduced into growth medium increased enzyme activities with respect to control medium. The highest CAT activity (67.4 U/mg) was reached when no supplemental nitrogen source was present in growth medium whereas the highest SOD activity (40 U/mg) was obtained in presence of urea and Mg^{+2} ions. The highest cell concentration (58.6x10^{7} cells/mL) was obtained at 15^{o}C.

February 2016, 89 pages

Key Words: *Rhodotorula glutinis*, olive processing, phenolic compounds, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmamın ilk günüden son gününe kadar hiçbir zaman ilgisini, bilgisini esirgemeyen, yol gösteren her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum naif hocam Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırma Teknikleri dersi öğrencisi olarak başladığım günden itibaren hiç yılmadan her fırsatta bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sevgi ile öğreten aklımda yüksek lisans bile yokken beni bu yolda yürümeye ikna eden sevgili hocam Dr. Ayşe Ezgi Ünlü BÜYÜKTOPCU'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) çok teşekkür ederim.

Sen olmasan bu yüksek lisans bitmezdi bunu biliyorum. Sayın Ceren ÜLGER 3 yıl boyunca birlikte çalıştığımız her an için çok teşekkür ederim. Her seslendiğimde arkamda olduğun, her yardıma ihtiyacım olduğunda koşarak yardım ettiğin için bazen kelimelere bile ihtiyacımız olmayacak kadar bir olduğumuz için iyi ki varsın.

Her zaman yardımlarını, maddi ve manevi imkanlarını esirgemeyen bıkmadan usanmadan beni destekleyen çok sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman uyum ve ahenkle çalıştığım birlikte hem akademik hem sosyal ilişkilerimiz bulunan laboratuvar grubumuz Biyo-Ar'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın da dahil olduğu 'Zeytin Karasuyundan Katma Değer Yaratacak Biyomoleküller Üretimi (113M589)' isimli proje ile 21 ay süresince proje bursiyeri olarak beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a ve ayrıca Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ve Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ihtiyacım olduğunda sağladıkları cihaz yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Didem DEĞİRMENBAŞI
Ankara, Şubat 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER **3**
2.1 Zeytinyağı ve Üretim Prosesleri **3**
2.2 Zeytin Karasuyu **5**
2.3 Antioksidan Enzimler **6**
2.4 Süperoksit Dismutaz **7**
2.5 Katalaz **8**
2.6 Rhodotorula glutinis **9**
2.7 Kaynak Özetleri **10**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**
3.1 Materyal **17**
3.1.1 Kimyasal ve biyokimyasallar **17**
3.1.2 Zeytin karasuyu **17**
3.2 Yöntem **18**
3.2.1 Mikroorganizma ve saklama **18**
3.2.2 Mikroorganizma çoğaltma **18**
3.2.3 Hücre parçalama **19**
3.3 Analizler **19**
3.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi **19**
3.3.2 Katalaz (KAT) aktivitesi **19**
3.3.3 Protein derişimi **20**
3.3.4 Hücre derişimi **20**
3.3.5 İndirgen şeker derişimi **20**

3.3.6 Toplam fenol (TF) derişimi 21
3.3.7 HPLC analizleri 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1 UYM Ortamında *Rhodotorula glutinis* Çoğalması ve Antioksidan Enzimler Üretimi 23
4.2 Zeytin Karasuyu Miktarı Etkisi 26
4.2.1 Zeytin karasuyu miktarının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi 27
4.2.2 Zeytin karasuyu miktarının ortam pH değerine etkisi 27
4.2.3 Zeytin karasuyu miktarının hücre içi protein derişimine etkisi 28
4.2.4 Zeytin karasuyu miktarının spesifik SOD aktivitesine etkisi 29
4.2.5 Zeytin karasuyu miktarının spesifik KAT aktivitesine etkisi 29
4.2.6 Zeytin karasuyu miktarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi 30
4.2.7 Zeytin karasuyu miktarının toplam fenol derişimine etkisi 31
4.3 Karbon Kaynağı Etkisi 32
4.3.1 Karbon kaynaklarının *Rhodotorula glutinis'in* çoğalmasına etkisi 33
4.3.2 Karbon kaynaklarının ortam pH değerine etkisi 33
4.3.3 Karbon kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi 34
4.3.4 Karbon kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi 35
4.3.5 Karbon kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi 35
4.3.6 Karbon kaynaklarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi 37
4.3.7 Karbon kaynaklarının toplam fenol derişimine etkisi 37
4.3.8 Etanol derişimi etkisi 39
4.4 Azot Kaynağı Etkisi 44
4.4.1 Azot kaynaklarının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi 44
4.4.2 Azot kaynaklarının ortam pH değerine etkisi 45
4.4.3 Azot kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi 46
4.4.4 Azot kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi 46
4.4.5 Azot kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi 47
4.4.6 Azot kaynaklarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi 48
4.4.7 Azot kaynaklarının toplam fenol derişimine etkisi 49
4.5 Sıcaklık Etkisi 50
4.5.1 Sıcaklığın *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi 50
4.5.2 Sıcaklığın ortam pH değerine etkisi 52
4.5.3 Sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi 52

4.5.4 Sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi 53
4.5.5 Sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi 53
4.5.6 Sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi 54
4.5.7 Sıcaklığın toplam fenol derişimine etkisi 55
4.6 Karıştırma Hızı Etkisi 55
4.6.1 Karıştırma hızının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi 56
4.6.2 Karıştırma hızının ortam pH değerine etkisi 56
4.6.3 Karıştırma hızının hücre içi protein derişimine etkisi 57
4.6.4 Karıştırma hızının spesifik SOD aktivitesine etkisi 58
4.6.5 Karıştırma hızının spesifik KAT aktivitesine etkisi 58
4.6.6 Karıştırma hızının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi 59
4.6.7 Karıştırma hızının toplam fenol derişimine etkisi 60
4.7 Stres Koşulları Etkisi 60
4.7.1 Oksidatif stres 61
4.7.2 Metal iyonları etkisi 64
4.8 En İyi Koşullarda Üretim 68
5. SONUÇ 73
KAYNAKLAR 77
EKLER 82
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler 83
EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar 84
EK 3 Protein Derişimi Kalibrasyon Doğrusu 85
EK 4 İndirgen Şeker Derişimi Kalibrasyon Doğrusu 87
EK 5 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu 88
ÖZGEÇMİŞ 89

SİMGELER DİZİNİ

rpm	Dakikada devir
λ	Dalga boyu (nm)
g	Yerçekimi ivmesi
N	Karıştırma hızı (rpm)
T	Sıcaklık (^{o}C)

Kısaltmalar

A	Absorbans
ACN	Asetonitril
BSA	Bovin serum albümin
DNS	Dinitrosalisilik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetil asit
GPx	Glutatyon peroksidaz
h/h	Hacim / hacim
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografi
KAT	Katalaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TF	Toplam Fenol
UV	Ultraviyole
UYM	Universal yeast medium
ZK	Zeytin karasuyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 *R.glutinis*'in UYM ortamında çoğalma eğrisi (T=30 ºC, N=150 rpm).....24

Şekil 4.2 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için ortam pH'ının zaman ile değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 24

Şekil 4.3 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için hücre içi protein derişiminin zaman ile değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 25

Şekil 4.4 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için spesifik SOD aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 25

Şekil 4.5 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için spesifik KAT aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 26

Şekil 4.6 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için indirgen şeker kullanım %'sinin zaman ile değişimi (T=30 C, N=150 rpm).....26

Şekil 4.7 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 27

Şekil 4.8 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 28

Şekil 4.9 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm).....28

Şekil 4.10 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 ºC, N=150 rpm) 29

Şekil 4.11 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm) 30

Şekil 4.12 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında indirgenmiş şeker tüketimi (%) (T=30ºC, N=150 rpm).....31

Şekil 4.13 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 ºC, N=150 rpm).....32

Şekil 4.14 % 50 ZK içeren UYM ortamın çoğalmanın farklı zamanlarında fenolik madde piklerini gösteren HPLC kromatogramları 32

Şekil 4.15 %50 ZK ve farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) varlığında hücre çoğalması (T=30ºC, N=150 rpm) 33

Şekil 4.16 Farklı karbon kaynakları içeren (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) %50 ZK ortamında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 34

Şekil 4.17 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 34

Şekil 4.18 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 35

Şekil 4.19 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 36

Şekil 4.20 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında indirgen şeker tüketiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 37

Şekil 4.21 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 38

Şekil 4.22 Etanol derişiminin hücre *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 40

Şekil 4.23 Etanol derişiminin ortam pH değerine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 40

Şekil 4.24 Etanol derişiminin hücre içi protein derişimine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 41

Şekil 4.25 Etanol derişiminin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 41

Şekil 4.26 Etanol derişiminin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 42

Şekil 4.27 Etanol derişiminin indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150rpm) 43

Şekil 4.28 Etanol derişiminin toplam fenol derişimine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 43

Şekil 4.29 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında hücre çoğalması (T=30^{o}C, N=150 rpm)..... 45

Şekil 4.30 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla pH değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)..... 45

Şekil 4.31 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içere %50 ZK-UYM ortamında zamanla hücre içi protein derişimi değişimi (T=30^{o}C N=150 rpm) 46

Şekil 4.32 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla spesifik SOD aktivitesi değişimi (T=30^{o}C, N=150rpm) 47

Şekil 4.33 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla spesifik KAT aktivitesinin değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 48

Şekil 4.34 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla indirgenmiş şeker tüketiminin değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 49

Şekil 4.35 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamının toplam fenol derişime etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 50

Şekil 4.36 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi (N=150 rpm) 51

Şekil 4.37 15^{o}C'de gerçekleştirilen hücre çoğalmasının zaman ile değişiminin mikroskop görüntüleri 51

Şekil 4.38 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm) 52

Şekil 4.39 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi (N=150 rpm) 52

Şekil 4.40 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi (N=150 rpm) 53

Şekil 4.41 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (N=150 rpm) 54

Şekil 4.42 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (N=150 rpm) 54

Şekil 4.43 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm) 55

Şekil 4.44 Karıştırma hızının hücre çoğalmasına etkisi (T=30^{o}C) 56

Şekil 4.45 Farklı karıştırma hızlarında ortam pH ının zamala değişimi (T=30^{o}C) 57

Şekil 4.46 Farklı karıştırma hızlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C) 57

Şekil 4.47 Farklı karıştırma hızlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C) 58

Şekil 4.48 Farklı karıştırma hızlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C) 59

Şekil 4.49 Farklı karıştırma hızlarında indirgenmiş şeker tüketiminin zamanla değişimi (%) (T=30^{o}C) 59

Şekil 4.50 Farklı karıştırma hızlarında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C) 60

Şekil 4.51 Farklı süre ve derişimlerdeki H_2O_2 oksidatif stresinin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 61

Şekil 4.52 Farklı süreler ve derişimlerdeki H_2O_2'in hücrelerin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 62

Şekil 4.53 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın hücrelerin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 63

Şekil 4.54 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 63

Şekil 4.55 Farklı metal iyonlarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 64

Şekil 4.56 Farklı metal iyonlarının ortam pH değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 65

Şekil 4.57 Farklı metal iyonlarının hücre içi protein derişimi değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 65

Şekil 4.58 Farklı metal iyonlarının spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 66

Şekil 4.59 Farklı metal iyonlarının spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 67

Şekil 4.60 Farklı metal iyonlarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (T=30^{o}C, N=150rpm) 67

Şekil 4.61 Farklı metal iyonlarının toplam fenol derişiminin zamanla değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 68

Şekil 4.62 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 69

Şekil 4.63 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 69

Şekil 4.64 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 70

Şekil 4.65 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 70

Şekil 4.66 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 71

Şekil 4.67 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde indirgenmiş şeker tüketimi (T=30^{o}C, N=150 rpm) 71

Şekil 4.68 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm) 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Zeytin karasuyunun fizikokimyasal özellikleri 6

Çizelge 2.2 *Rhodotorula glutinis'*den üretilen bileşenler 9

Çizelge 2.3 Zeytinyağı atığından biyodönüşüm ile elde edilen katma değerli ürünler ... 12

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri* 17

Çizelge 3.2 HPLC analiz koşulları 22

Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında birim hücre başına SOD ve KAT verimlilikleri (Y) 39

1. GİRİŞ

Zeytinyağı, geleneksel Akdeniz diyetinin en önemli bileşenlerinden biridir ve Akdeniz ülkelerinin zeytinyağı üretimi için uygun koşullara sahip olduğu bilinmektedir. 2013 yılı dünyadaki en önemli beş zeytinyağı üreticileri sırasıyla İspanya (%39.2), İtalya (%15.6), Yunanistan (%10.8), Tunus (%6.8) ve Türkiye (%6.6)'dir (http://faostat3.fao.org). Bir ton zeytinin işlenmesi esnasında 1.3 m^3 zeytin karasuyu (ZK) açığa çıkmaktadır. Zeytin karasuyu koyu renkli, kendine özgü kokusu olan ve düşük pH değerlerine sahip bir atıktır; zeytin meyvesinin kendi özsuyu ve yağ çıkarma işlemi esnasında ilave edilen suyun toplamından oluşur. Zeytin karasuyunun içeriğindeki basit ve kompleks şekerler, lipidler, proteinler, mineraller ve fenoller sayesinde bu atık yenilenebilir katkı değer yaratan bileşenler için bir kaynak haline dönüşmektedir. Bu bileşenler ekstraksiyon işlemi ile geri kazanılabilir, fermantasyon üretim süreçleri için kullanılabilirler (Gonçalves vd. 2012).

Zeytinyağının hammaddesi olan zeytinin kimyasal bileşimi çok değişkendir. Zeytinin yetiştirildiği toprak tipi ve iklim koşulları gibi faktörlere bağlıdır ancak genel olarak %18-28 yağ, %40-50 vejetasyon suyu ve %30-35 zeytin hamurundan oluşur (Niaounakis ve Halvadakis 2004).

Zeytinyağı üretiminde birçok farklı yöntem kullanılabilir. Günümüzde yaygın olarak geleneksel yöntem ile iki ve üç fazlı ekstraksiyon (santrifüj) yöntemleri kullanılmaktadır. Zeytin meyvesi, antioksidan özellik gösteren fenolik bileşikler açısından çok zengin olmasına karşın bu bileşiklerin sadece %2'lik kısmı yağ fazına geçmekte; geri kalan %98'i ise zeytin karasuyu ve katı atıklara geçmektedir. Zeytin karasuyunun 50'den fazla fenolik bileşen içerdiği belirlenmiştir; bunlardan başlıcaları oleuropein, tirozol ve hidroksitirozoldür (Zbah vd. 2012).

Antioksidan maddeler, metabolik faaliyetler esnasında meydana gelen ve hücrelere zarar veren reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma sağlayan moleküllerdir. Yaş ilerledikçe, beden daha fazla serbest radikale maruz kalır ve daha fazla serbest radikal üretir. Antioksidan maddeler doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabildiği gibi kimyasal

bileşimlerine göre ve etki mekanizmalarına göre de sınıflandırılabilir. Yaygın olarak kullanılan ve en çok bilinen doğal antioksidanlar enzimlerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) en önemli antioksidan enzimlerdir. SOD ve KAT enzimleri geniş kullanım alanları, birim fiyatlarının yüksek olması ve etkilerinden dolayı endüstriyel açıdan önemli enzimlerdir.

Antioksidan aktivitesi, hücre yapısının korunmasını ve etkili bir şekilde serbest radikallerin temizlenmesini, lipid peroksidasyon reaksiyonlarının inhibe edilmesini ve diğer oksidatif hasarların engellenmesini ifade eder. Aynı zamanda pek çok anti-inflamasyon ve anti-aging gibi biyolojik fonksiyonların da temelidir. Daha da önemlisi diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi birçok kronik hastalıkların önlenmesinin, antioksidan etkinliği ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (Zou vd. 2016).

Bu yüksek lisans çalışmasında, antioksidan enzimlerin stres koşullarında aktivitelerini artırmaları nedeniyle, zeytin karasuyundaki fenolik maddelerin yaratacağı stresin süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Mikrobiyal kaynaklı olarak bu enzimlerin üretimde, *Rhodotorula glutinis* mayası kullanılmış ve hem zeytin karasuyundan gelen fenolik maddelerin yarattığı stres ile yüksek aktivitelerde SOD ve KAT enzimleri üretilmiş hem de zeytin karasuyunun arıtılması sağlanmıştır.

Çalışmada öncelikle *R.glutinis* mayasının çoğalması için uygun zeytin karasuyu miktarı belirlenmiş ve belirlenen bu miktarda *R.glutinis* çoğaltılması ve enzimlerin aktiviteleri üzerine etki eden parametreler araştırılmıştır. Bu amaçla ek karbon kaynağı, ek azot kaynağı, sıcaklık, karıştırma hızı ve farklı türde stres koşulları etkileri incelenmiştir.

Bu yüksek lisans çalışması, 113M589 nolu “Zeytin Karasuyundan Katma Değer Yaratacak Biyomoleküller Üretimi” konulu TÜBİTAK (TD 1203 ‘‘Food Waste Valorization for Sustaniable Chemicals, Materials and Fuels’’ COST Aksiyonu kapsamında) ve 12B4343001 nolu “Zeytin Fabrikası Atık Suyundan Antioksidan Enzim Üretimi İçin Ortam Tasarımı” konulu Ankara Üniversitesi BAP projeleri ile desteklenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER

2.1 Zeytinyağı ve Üretim Prosesleri

Akdeniz ve benzeri iklime sahip ülkelerde zeytin üretiminin ağırlıklı olarak gerçekleşmesi, zeytinyağı ticaretinde sınırlı sayıda ülkenin söz sahibi olmasına neden olmaktadır. Bu kapsamda, dünya zeytinyağı ihracatının yaklaşık %95'i toplam yedi ülke tarafından gerçekleştirilmektedir. Dünyada zeytinyağı talebinin yıldan yıla artıyor olması bu ülkelerin zeytinyağı ticaretindeki önemini giderek arttırmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2013 yılı verilerine göre dünyada yıllık 2.8 milyon ton zeytinyağı üretilmiştir ve bunun %69.6'sı Avrupa'da gerçekleşmiştir. 2013 yılındaki dünyadaki en önemli beş zeytinyağı üreticileri sırasıyla İspanya (%39.2), İtalya (%15.6), Yunanistan (%10.8), Tunus (%6.8) ve Türkiye (%6.6)'dir (http://faostat3.fao.org, 2015). İspanya, dünyanın en fazla ekili zeytin alanına sahip ülkesidir.

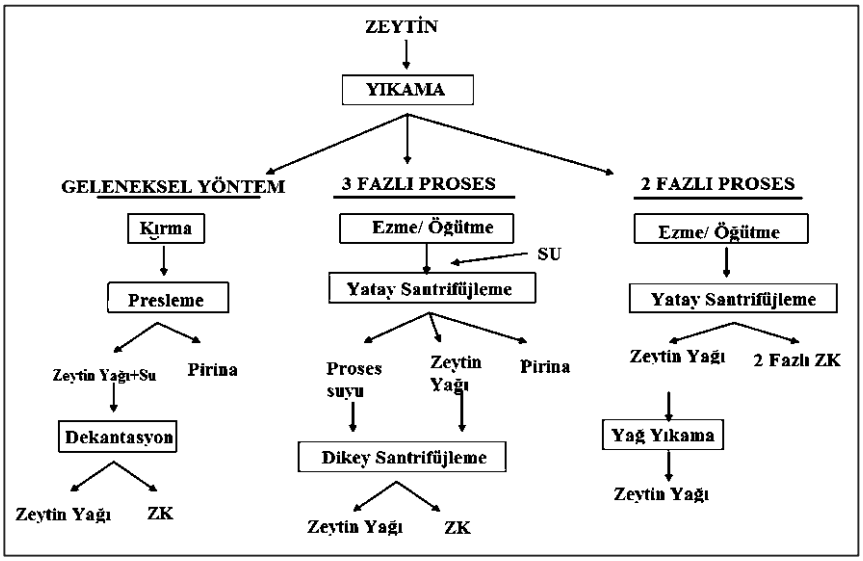
Türkiye gerek iklim gerekse toprak özellikleri bakımından zeytin üretimi için en uygun coğrafyalardan biri olup, zeytinyağı üreten ve dış satım yapan ülkeler arasında ilk beş içinde yer almaktadır. Son 15 yılın verileri incelendiğinde zeytinyağı üretimi %30 oranında artmıştır. Ancak, zeytinyağı üretimi esnasında büyük miktarda çevre için zararlı katı ve sıvı atıklar açığa çıkmaktadır. Bu atıklar sadece Akdeniz bölgesinin değil Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri ve Güney Amerika gibi yeni üreticiler içinde çevresel problem olmaya başlamıştır (Morillo vd. 2009).

Zeytinyağının ham maddesi olan zeytinin kimyasal bileşimi çok değişkendir. Zeytinin yetiştirildiği toprak tipi ve iklim koşulları gibi faktörlere bağlıdır ancak genel olarak %18-28 yağ, %40-50 vejetasyon suyu ve %30-35 zeytin hamurundan oluşur (Niaounakis ve Halvadakis 2004).

Zeytinyağı, zeytinden (*Oleaeuropaea*) elde edilen yeşilimsi- sarımtırak renkte sıvı bir yağdır. Zeytinyağı üretimi sırasında elde edilen bir sıvı atık olan zeytin karasuyu (ZK),

koyu renkli, kendine özgü kokusu olan ve düşük pH değerlerine sahiptir; zeytin meyvesinin kendi özsuyu ve yağ çıkarma işlemi esnasında ilave edilen suyun toplamından oluşur. Üretim sırasında açığa çıkan katı atık ise pirina olarak isimlendirilmektedir.

Zeytinyağı üretiminde kesikli (geleneksel) ve sürekli (üç fazlı üretim prosesi ve iki fazlı üretim prosesi) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmakta olup, her iki yöntemde de üretim sonucunda şekil 2.1'de görüldüğü gibi pirina ve karasu yan ürün olarak oluşmaktadır (Morillo vd. 2009).



Şekil 2.1 Zeytinyağı üretim prosesleri (Morillo vd 2009)

Kesikli Üretim Prosesi

Geleneksel olarak adlandırılan üretim prosesidir; aynı zamanda presleme yöntemi olarak da bilinir. Presleme prosesinde zeytinler su ile yıkanır, ezilerek öğütülür ve yoğurulur; elde edilen hamur preslenerek pirina (zeytin keki) ve zeytinyağı-su karışımı ayırılır. Bu yöntemle yağ hidrolik presler kullanılarak çıkartılır; dekantasyon ile yağ ve su kısmı birbirinden ayrılır.

Sürekli Üretim Prosesi

Sürekli üretim prosesi, yağın santrifüj (ekstraksiyon) ile ayrılmasına dayanır. Üretim, besleme, yıkama, kırma ve hamur hazırlama ünitelerinden oluşmaktadır. Bu sistemde presin yerini santrifüj almıştır ve sürekli çalışmayı sağlamıştır. 3-fazlı proses, üretim sırasında proses suyu gerektirir ve üretim sonucunda üç faz (yağ, karasu ve pirina) oluşur. Bu proses sonunda büyük hacimlerde zeytin karasuyu oluşmaktadır (Masghouni ve Hassairi 2000). 2-fazlı proses, proses suyu gerektirmez ve üretim sonucunda sadece iki faz (yağ ve pirina) oluşur. Bu sistem ekolojik olarak oldukça caziptir, çünkü sıvı faz (karasu) oluşmamaktadır. Karasuyun büyük bir bölümü pirina ile birlikte açığa çıkmaktadır. Oluşan katı faz %50-60 su, %2-3 yağ içermektedir (Masghouni ve Hassairi 2000).

2.2 Zeytin Karasuyu

Zeytinyağı üretimi esnasında açığa çıkan karasuyunun miktarı ve özellikleri; zeytinyağı üretim prosesine, işlenen zeytinin türüne, zeytin yetiştiriciliği sırasında kullanılan ilaç ve gübre cinsine, yetiştiricilik yapılan bölgenin iklimine ve yıllara bağlı olarak değişiklikler göstermektedir (Andreozzi vd. 1998).

Zeytin karasuyu; koyu renkli, kendine özgü kokusu olan yüksek organik kirlilik içeren (KOİ:40-220 g/L, BOİ:35-110 g/L) ve düşük pH:3-6'lı bir atıktır. Ayrıca yüksek toplam organik bileşik (25-45 g/L) ve yüksek polifenol (0.5-24 g/L) içeriğine sahiptir (Dermeche vd. 20013). Zeytin karasuyunun ortalama karakteristik özellikleri çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Zeytin karasuyunun fizikokimyasal özellikleri

Parametre	Birim	Vlysside vd. 2004	D'Annibale vd. 2006	Karpouzas vd. 2010	El-Abbasi vd. 2011
H	-	4.8	5.04	5.7	5.3
İletkenlik	mS/cm	12	-	11	24
KOİ	g/L	93	43	48	156
Lipidler	g/L	1.64	0.75	-	7
Polifenoller	g/L	10.7	2.52	8.8	4.1
Toplam Şeker	g/L	-	17.4	-	4.3
Toplam Azot	g/L	0.76	-	0.9	-

2.3 Antioksidan Enzimler

Metabolik fonksiyonlar esnasında serbest radikal olarak adlandırılan yüksek reaktif bileşikler vücudumuzda üretilebilirler ya da dış ortamdan alınabilirler. Serbest radikaller, moleküler yapılarından bir elektron çifti vererek yüksek reaktif hale gelirler; bu nedenle de kararlı değillerdir.

Antioksidan maddeler, metabolik faaliyetler esnasında meydana gelen ve hücrelere zarar veren reaktif oksijen türlerine karşı savunma sağlayan moleküllerdir. Antioksidanlar, doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabildiği gibi kimyasal bileşimlerine göre ve etki mekanizmalarına göre de sınıflandırılabilir.

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPX), askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), glutatyon (GSH), β-karoten ve A vitaminidir. Bu antioksidanların hem aktiviteleri hem de hücre içi seviyeleri arasında bir denge vardır ve bu organizmaların hayatta kalabilmesi için gereklidir (Matez vd. 1999).

Antioksidan enzimler, serbest radikalleri kararlı hale getirme ya da hücresel bileşenlere saldırmadan önce deaktive etme yeteneğine sahiptir. Serbest radikallere maruziyeti azaltarak ve antioksidan enzim bakımından zengin gıdalar veya antioksidan enzim takviyesi alımını artırarak vücudumuzda serbest radikallerin sebep olduğu sağlık problemlerine karşı korunma sağlayabiliriz. Bu nedenle antioksidan enzimler, optimum hücresel ve sistemik sağlığı korumak için önemlidir (El-Missiry 2012). Antioksidan enzimler superoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyonperoksidaz (GPX), insan hücrelerinde toksik reaktif oksijen türlerine karşı birlikte çalışırlar.

2.4 Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), yüksek reaktif olan süperoksit anyonunu O_2'ye ve daha az reaktif türleri H_2O_2'ye dismutasyonunu katalizleyen antioksidan enzimdir (Eşitlik 2.1) ve molekül kütlesi yaklaşık 32.5 kDa'dır. Oluşan peroksit, KAT ve GPX reaksiyonları ile kullanılır (Matez vd. 1999).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2 \qquad (2.1)$$

İnsan vücudunda SOD üç formda bulunabilir. Bunlar, sitosilik Cu/Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı SOD'dir. Süperoksitdismutazın bütün türleri azid ve flor gibi tek yüklü anyonları bağlar ancak Fe^{+2}, Mn^{+2} ya da Cu/Zn türlerinin duyarlılıkları arasında belirgin farklılıklar bildirilmiştir (Matez vd. 1999).

SOD, serbest radikallerin neden olduğu zararları azaltırken hücrelerin gençleştirme ve onarımını başlatabilmektedir. SOD ciltte bulunur ve vücudun fibroblast adı verilen cilt hücrelerinin inşası için yeterli miktarda üretilmesi gereklidir. Doğal SOD kaynakları arasında lahana, brüksel lahanası, buğday, arpa ve brokoli vardır. SOD Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı gelişimini önlemekte önemli bir rol oynar (El-Missiry 2012).

SOD, saç köklerinin içine nitrik oksit taşımakta yardımcı olmaktadır. Genetik yatkınlık veya serbest radikaller nedeniyle erken yaşta saç sökülmesi yaşayan insanlar için faydalıdır. SOD, çok güçlü bir antioksidan olduğu için saç foliküllerinin ölümüne neden olan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı savaşır (El-Missiry 2012).

2.5 Katalaz

Katalaz (EC 1.11.1.6), dört benzer tetrahedral alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir ve molekül kütlesi yaklaşık 240 kDa'dır. Katalaz, H_2O_2 ile çok etkili bir şekilde reaksiyon verir, su ve moleküler oksijen açığa çıkar (Eşitlik 2.2). Hidrojen donörleri (metanol, etanol, formik asit ya da fenoller) ile peroksidaz aktivitesi eşitlik 2.3'de gösterildiği gibidir (Matez vd. 1999).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{KAT}} 2\ H_2O + O_2 \tag{2.2}$$

$$ROOH + AH_2 \xrightarrow{\text{KAT}} H_2O + ROH + A \tag{2.3}$$

Hayvanlarda, hidrojen peroksit KAT ve GPX tarafından etkisiz hale getirilir. Katalaz, hücreleri kendi içlerinde oluşan hidrojen peroksitten korur. Normal koşullarda bazı hücre tipleri için katalaz gerekli olmasa da hücrelerin oksidatif strese karşı gösterdiği toleransta önemli bir rol oynar (El-Missiry 2012).

Katalaz, sütten peynir üretimi esnasında hidrojen peroksit giderimi için ve koruyucu olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca tekstil endüstrisinde kumaşlardaki hidrojen peroksiti kullanarak peroksitsiz malzeme yapımında kullanılır. Bir diğer kullanım alanında ise KAT içeren kontak lens solüsyonlarında, lensin tekrar kullanılmadan önce hidrojen peroksitten ayrılmasını sağlanır. Son yıllarda estetik endüstrisinde kullanılmaya da başlanmıştır (El-Missiry 2012).

2.6 Rhodotorula glutinis

Rhodotorula glutinis biyoteknolojik potansiyeli ve güvenli etkileri nedeniyle özellikle gıda endüstrisi için önemli bir mayadır. Pembe-mercan renkli, yumuşak ve nemli bir yapıdadır. *Rhodotorula* türlerinin kültürleri 30ºC'de Sabouraud-Dekstroz Agar üzerinde hızla çoğalmaktadır. *Rhodotorula* türleri, hava, toprak ve yaprak yüzeylerinde bulundukları gibi süt ve peynir ürünlerinde de bulunurlar (Hernández-Almanza vd. 2014)

Rhodotorula'nın bazı türleri, β-karoten, torulen ve torularhodin sentezi baskın olmak üzere ana karotenoid üretirler. Çeşitli *Rhodotorula* türleri büyük miktarlarda karotenoidler; etanol, asetik asit, lipid ve asetaldehitten tek hücre proteinleri üretimi gibi önemli özellikleri göstermektedir (Çizelge 2.2). Farmasötik sanayide ve atık su arıtımında kullanılırlar. Gıda katkı maddesi olarak kullanımları da yaygındır. Proteinler, lipidler ve vitaminler için iyi bir kaynak olarak bilinmektedir.

Çizelge 2.2 *Rhodotorula glutinis'*den üretilen bileşenler (Hernández-Almanza vd. 2014)

Bileşenler	**Referanslar**
Lipidler	Alvarez vd. (1992), Cheirslip vd. (2012) ve Saenge vd. (2011)
Yağ asidi	Davoli vd. (2004) ve Easterling vd. (2009)
Yağ	Lopes da Silva vd. (2011)
Lipaz	Papaparaskevas vd. (1992)
Tiyaminhidroksilaz	Thornburg vd.(1993) ve Neidigh vd. (2009)
Tannaz	Taskin (2012)
Pektinaz	Taskin (2012)
İnvertaz	Canli, Erdal, Taskin ve Kurbanoğlu(2011)
Karotenoidler	Bhosale ve Gadre (2001a) ve Bhosale vd. (2003), Davoli vd. (2004), Roadjnakamolson ve Suntornsuk (2010), Taskin vd. (2011)

R. glutinis, lipidleri trigliserid formunda üreten bir mayadır. Diğer bitkisel yağlar ve hayvansal yağlarla karşılaştırıldığında mikrobiyal yağ üretiminin birçok avantajı vardır. Bunlar kısa yaşam döngüsü, daha az emek gerektirmesi, mevsim ve iklim değişiminden etkilenmemesi ve ölçek büyütmenin kolay olması olarak sıralanabilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen lipid sadece ham petrole alternatif değil aynı zamanda biyodizel için de hammadde olarak kullanılabilir.

Rhodotorula glutinis gibi bazı maya türleri enzim üretimi için kullanılabilmektedir. En bilinen örneği hücre dışı lipaz üretimidir. Lipazın; transesterifikasyon, enantiyoseçimli hidroliz ve açilleme reaksiyonlarını da içeren endüstriyel olarak önemi olan birçok reaksiyonu katalizleme aktivitesi vardır. Ticari amaçlı üretilen lipazların çoğu mantarlardan ve mayalardan elde edilmektedir. Karbon ve azot kaynağı çeşidi ve derişimine bağlı olarak *R. glutinis*'in hücre dışı lipaz üretimini önemli ölçüde artırılmış olduğunu gösterilmiştir (Papaparaskevas vd. 1992). Ayrıca tiyaminhidroksilaz, tannaz, pektinaz ve invertaz enzimleri üzerine de çalışmalar vardır (Çizelge 2.2).

2.7 Kaynak Özetleri

Zeytin karasuyu, içerdiği fenolik bileşenlerin fitotoksik etki göstermesi nedeniyle çevreye verilmeden önce arıtılması gereken bir endüstriyel sıvı atıktır. Buna karşın, bileşiminde bulunan karbon ve azot kaynakları, zeytin karasuyunu mikrobiyal çoğalma için uygun bir ortam yapmaktadır. Zeytin karasuyunun zor bileşiminde çoğalabilen mikroorganizmalar enzim, polimer, biyoyakıt, biyogaz ve biyohidrojen gibi değerli maddeler üretebilmektedirler. Ayrıca, zeytin karasuyunun değerlendirilmesiyle içerdiği antioksidan özellikteki fenolik bileşenler geri kazanılmaktadır. Bu şekilde zeytin karasuyu arıtılacak bir atık olarak değil, değerli maddeler üretilebilecek bir endüstriyel yan ürün olarak görülmeye başlanmıştır.

Zeytin karasuyunun içinde bulunan fenoller ve yüksek organik kirliliğinden dolayı doğaya direk verilmesi canlılar açısından zararlıdır. Bu nedenle de çıkan zeytin karasuyunun önce arıtılması gerekmektedir. Arıtmada fiziksel, kimyasal, biyolojik yöntemler ayrı ayrı uygulanabildiği gibi birlikte de uygulanabilir. Zeytinyağı endüstrisi

sıvı atığı olan karasu, yüksek derişimlerdeki KOİ, BOİ ve fenol içeriğiyle karakterize edilebilir. Karasuyun fiziksel arıtımı amacıyla lagünlerde buharlaştırma, adsorpsiyon, vakumlu buharlaştırma, distilasyon ve membran filtrasyonu kullanılmaktadır. Kimyasal olarak, çöktürme ve kimyasal yükseltgeme kullanılan başlıca yöntemlerdir. Zeytin karasuyunun organik yükünü, kirliliğini ve zehirliliğini gidermek amacıyla aerobik ve anaerobik biyolojik yöntemler de kullanılabilir (Azbar vd. 2004).

Zeytin karasuyunun biyoarıtımında kullanılan mikroorganizmalara örnek olarak; *Candida holstii, Candida boidinii, Geotrichum Candidum, Candida oleophila, Candida tropicalis, Saccharomycesspp, Natural microflora, Geotrichum Candidum, Yarrowia lipolytica* verilebilir. Çizelge 2.3'te zeytin karasuyundan değerli madde üretiminde kullanılabilen mikroorganizmalar verilmiştir.

D'Annibale vd. (2006) yılında yaptıkları çalışmada, zeytin karasuyu mikroorganizma çoğalma ortamı olarak kullanılarak hücre dışı lipaz üretimi amaçlanmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552 ve Y-553), *Rhizopus arrhizus* (NRRL2286 ve ISRIM 383), *Rhizopus oryzae* (NRRL 6431), *Aspergillus oryzae* (NRRL 1988 ve 495), *Aspergillus niger* (NRRL 334), *Candida cylindracea* (NRRL Y-17506) ve *Penicillium citrinum* (NRRL 1841 ve 3754, ISRIM 118)'dır. Lipaz üretiminde zeytin karasuyu seyreltilmeden kullanılmış ve 0.5 g/L maya özütü ve 1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$ ile takviye edilmiştir. Sterilazyon öncesi ZK ortamının pH'ı 1.0M NaOH ile 6.1'e ayarlanmıştır. En yüksek lipaz aktivitesini 168 saat sonunda *C. cylindracea* (0.46 IU/mL) ve *G.candidum* (0.52 IU/mL) göstermiştir (D'Annibale vd. 2006).

Çizelge 2.3 Zeytinyağı atığından biyodönüşüm ile elde edilen katma değerli ürünler (Hernández-Almanza vd. 2014)

Atık	Tanımlanan Proses/ Biyokatalizör	Ürün	Kaynak
Zeytin karasuyu	*Clostridium* spp.(ortam %50 h/h ZK)	Bütanol (2.8-8 g/L)	Wahner vd. 1988
Zeytin karasuyu	*Arthobacter* spp.	İndolasetik asit	Tomati vd. 1990
Zeytin karasuyu	*Pseudomona saeruginosa*	Yüzey aktif madde: ramnolipid	Mercade ve Manresa 1994
Zeytin karasuyu	*Propionibacteriums hermanii*	B12 vitamini	Munoz 1998
Zeytin karasuyu	Rekombinat *Eschericha coli* P-260,	Pigment sentezi, renklendirici, alkoloid ve polimer	Martin vd. 1998
Zeytin keki	*Rhizomucorpusillus,R. rhizopodiformis*	Lipaz (farmasötik ve gıda endüstrisi)	Cordova vd. 1998
Zeytin karasuyu	*Funaliatrogii*ATCC200800, *Trametesversicolor*ATCC200801	Bitki büyüme hormonları: ciberelik asit, absisik asit, indolasetik asit ve sitokinin	Yurekli vd. 1999
Zeytin karasuyu	*Xanthomonascampestry*(ortam %50-60 h/h ZK)	Zantan sakızı; gıda ve gıda dışı uygulamalarda inceltici yada vizkozite artıcı	Lopez vd. 2001
Zeytin karasuyu	*Panus tigrinus*	Lakkaz ve Mn-peroksidaz	Fenice vd. 2003
Zeytin keki	*Aspergillus oryzae*	Nötralproteaz	Sandhya vd. 2005
Zeytin karasuyu	Polihidroksialkonat üretimi için substrat olan uçucu yağ asitlerinin eldesi için anaerobik fermentasyon	Biyoçözünür polimerler	Dionisi vd. 2005

Zeytin karasuyunun mikrobiyal değerlendirilmesi ile lipidler (Papanikolaou vd. 2008, Sarris vd. 2011, Yousuf vd. 2010), fotobiyolojik hidrojen (Eroğlu vd. 2004) gibi değerli ürünler elde edilebilir.

Gonçalves vd. (2012) yaptıkları çalışmada kesikli ve kesikli beslemeli sistemde zeytin karasuyundan lipaz üretimi araştırılmıştır. Çalışmanın amacı zeytinkarasuyu ortamına dayalı olarak kesikli ve kesikli beslemeli kültürde *Candida cylindracea, Candida rugosa ve Yarrowia lipolytica*'nın çoğalmasını incelenmesi ve lipaz üretiminin geliştirilerek zeytin karasuyunun parçalanmasının sağlanmasıdır. Deneylerde katı çoğalma ortamı olarak YPDA (10 g/L maya özütü, 20 g/L pepton, 20 g/L glukoz ve 30 g/L agar), sıvı çoğalma ortamı olarak agar katılmamış YPD kullanılmıştır. Çalışmada zeytin karasuyu ortamı seyreltilmeden kullanılmıştır. Üç mikroorganizma zeytin karasuyu ortamına uyum sağlayarak çoğaldığı gözlenmiştir. İndirgen şeker giderimi (%49 *C.cylindracea*, %43 *Y.lipolytica* ve %54 *C.rugosa*) birbirine çok yakındır. *C.cylindracea* CBS 7869, en yüksek hücre dışı lipaz üretimini göstermiştir (30 U L^{-1} h^{-1}). 24 saat kesikli olarak işletildikten sonra günde iki kez besleme yapılarak işletilen kesikli beslemeli sistemde *C. rugosa* 17 U mL^{-1}, *C. cylindracea* 11 U mL^{-1} ve *Y. lipolytica* 5 U mL^{-1} lipaz aktivitesi göstermiştir (Gonçalves vd. 2012).

Crognale vd. yaptığı çalışmada lipaz enzimi üretimi için uygun bir ortam olarak düşünülen zeytin karasuyunda lipolitik yapılarıyla bilinen *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Candida cylindracea, Geotrichum candidum, Penicillium citrinum, Rhizopus arrhizus* ve *Rizhopus oryzae* mantarları kullanılmıştır. NH_4Cl (2.4 g/dm^3) ve zeytinyağı (3 g/dm^3) ile desteklenen seyreltilmemiş zeytin karasuyu ortamında 5 günün sonunda en yüksek lipaz aktivitesini *Candida cylindracea* (9.23 U/cm^3) mantarında elde edilmiştir (Crognale vd. 2006).

Beyaz küf mantarı *Panus tigrinus* ile zeytin karasuyu kullanılarak lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerinin üretimi incelenmiştir (Crognale vd. 2006). 5g/dm^3 sukroz ve 1g/dm^3 maya özütü ile desteklenmiş zeytin karasuyu ortamında karıştırmalı tank reaktörde 13 gün sonunda 4600 U/dm^3 lakkaz aktivitesi görülmüştür. Mangan

peroksidaz aktivitesi ise aynı zeytin karasuyu ortamının hava kaldırmalı reaktörde 7 gün sonunda 410 U/dm^3 olarak bulunmuştur.

Yarrowia lipolytica'nın 62 türünün incelendiği çalışmada, çoğalma ortamı olarak hem sentetik bir ortam olan Sabouraud besiyeri hem de zeytin karasuyu kullanılarak lipaz aktivitesi incelenmiştir. Her iki ortamda da *Y. lipolytica'*nın çoğaldığı, ancak altı türün zeytin karasuyu ortamında lipaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Ortamlardaki lipaz aktivitesi karşılaştırıldığında yedi tür sentetik ortamda zeytin karasuyu ortamına göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Diğer türler ise zeytin karasuyunda sentetik ortama göre daha yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir (Lanciotti vd. 2005).

Antioksidan enzimler olan SOD ve KAT üretim kaynakları bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal olabilir. Mikrobiyal üretimde önemli makaleler aşağıda özetlenmiştir:

Debaryomyces hansenii C-11'den üretilen SOD enziminin aktivitesi ve hücre derişimine havalandırma hızı, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı etkileri incelendiği bu çalışmada karbon kaynağı olarak glukozun eklendiği ortamda hücre %50 oranında artmıştır. SOD aktivitesi ise oksijen miktarı ve bakır sülfat eklendiği koşullarda artırmıştır. En yüksek spesifik SOD aktivitesi, katkı maddesi olarak 0.8 mM bakır sülfat eklendiği ortamda 400 U/mg değerine ulaşmıştır (Orozco vd. 1998).

Aspergillus niger B-77 türünden SOD üretimi amaçlanan bir çalışmada; mikrobiyal çoğalma, bakır birikim miktarı ve SOD aktivitesinin başlangıç bakır derişimine bağlı olduğu bulunmuştur. Besi ortamına 200 mg/L bakır eklendiği zaman *Aspergillus niger* biyolojik aktivitesi kaybetmemiş ve SOD aktivitesini artırmıştır. En yüksek hücre miktarına bakır iyonunun eklenmediği ortamda ve en yüksek spesifik SOD aktivitesine 200 mg/L derişimde bakır içeren ortamda 90 U/mg değeri ile ulaşmıştır (Tsekova ve Todorova 2002).

Wang vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada *Cordyceps militaris* miseli kullanılarak metal iyonu ile karbon ve azot kaynaklarının SOD, KAT aktivitesi ve lipid peroksidasyonu

üzerine etkisi incelenmiştir. Hücreler farklı karbon kaynakları içeren ortamlarda çoğaltılmıştır. En yüksek SOD ve KAT aktiviteleri sırasıyla 44.3 U/mg protein ile % 20 patates suyu ve % 2 glukoz içeren ortamda ve 93 U/mg protein ile % 20 patates suyu ve % 1 glukoz içeren ortamlarda elde edilmiştir. % 0.1-0.5 derişim aralığında maya özütü ya da tripton ile desteklenen ortamlarda en yüksek SOD aktivitesi %0.1 maya özütü eklenen ortamda 21.1 U/mg protein ve KAT aktivitesi % 0.1 tripton eklenen ortamda 20.7 U/mg protein olmuştur. Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Mn^{+2} iyonları SOD sentezini hızlandırmıştır. Yüksek SOD aktivitesi ve düşük lipid peroksidaz seviyesinin gözlendiği Zn^{+2} ortamı radikal oksijen zararına karşı hücreleri korumak için uygun bir ortam olarak önerilmiştir (Wang vd. 2006).

Rhodotorula glutinis özellikle son yıllarda zeytin karasuyunun arıtımında (Karakaya vd. 2012, Karakaya vd. 2014, Bozkoyunlu ve Takaç 2014) ve değerli bileşenler (lipid) üretimde (Dai vd. 2007, Xue vd. 2008, Eastreling vd. 2009, Saenge vd. 2011, Schneider vd. 2013, Zhang vd. 2014) kullanılmaya başlanmıştır. Ancak *R. glutinis* ile zeytin karasuyu biyoarıtım çalışmaları sınırlıdır. Ayrıca literatürde *Rhodotorula glutinis*'in karatoneid (Tioni vd. 2005, Aksu ve Eren 2007, Saenge vd. 2011, Schneider vd. 2013, Zhang vd. 2014, Almanza vd. 2014), betakaroten (Malisorn ve Suntornsuk 2008) ve lipaz (Khayati ve Alizadeh 2013, Papaparaskevas vd. 1992) üretimi üzerine çalışmalar yer almaktadır; fakat SOD ve KAT enzimleri üzerine çalışmalar kısıtlıdır.

Rhodotorula glutinis genellikle yağ üretiminde ve etanol, asetik asit ve asetaldehitten tek hücre proteini üretiminde kullanılmaktadır. *R.glutinis* ile enzim üretimi üzerine yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Rhodotorula glutinis (CIM 1001) mikroorganizması kullanılarak invertaz (EC 3.2.1.26) enziminin üretiminin amaçlandığı çalışmada, hücreler fruktoz, glukoz, laktoz, maltoz, rafinoz ve sukroz içeren ortamlarda çoğaltılmıştır. Karbon kaynağı olarak şekerlerin kullanıldığı ortamda daha etkili enzim biyosentezi gözlenmiştir. Sadece sukroz ve rafinozun kullanıldığı ortamlarda invertaz aktivitesine rastlanmıştır. En iyi sonuca sukroz ortamında toplam spesifik invertaz aktivitesi 0.04 μkat/mg protein olarak bulunmuştur. Ayrıca enzim sentezinin hücre yaşlanmasıyla azaldığı sonucuna

varılmıştır. *R.glutinis'in* karboksimetilsellüloz, sellobioz ve nisaşta ortamlarında çoğalmadığı belirlenmiştir (Rubio 2002).

Rhodotorula glutinis ve Kluyveromyces marxianus mayaları kullanılarak yapılan bir çalışmada, çoğalma ile SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine karbon kaynağı olarak glukoz (%2) ve etanol (%1) etkileri incelenmiştir. Kontrol olarak *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılmıştır. Her üç maya da glukoz içeren ortamda etanol ortamına göre daha fazla çoğalmıştır. *Rhodotorula glutinis* mayası kullanılarak elde edilen en yüksek SOD spesifik aktiviteleri glukoz içeren ortamda 27 U/mg iken, etanol içeren ortamda 29 U/mg değerindedir. En yüksek spesifik KAT aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; etanol içeren ortam 23 U/mg değeri ile glukoz içeren ortamdan (16 U/mg) daha yüksek aktivite sağlamıştır. *Kluyveromyces marxianus* mayası SOD ve KAT enzim aktivitelerinde diğer iki mayaya göre daha yüksek aktivite göstermiştir (Koleva vd. 2008).

Yapılan çalışmada *R. glutinis* (DSM 70398) mikroorganizması kullanılarak eşanlı olarak SOD ve KAT enzimlerinin farklı koşullar altında üretimi amaçlanmıştır. UYM ortamı (3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 5 g/L pepton, 10 g/L glukoz ve 15 g/L agar) sıcaklık ve başlangıç pH değerinin incelendiği durumlarda çoğalma ortamı olarak kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak 10 g/L glukoz, 10 g/L fruktoz, 10 g/L galaktoz, 5 g/L maltoz, 5 g/L sukroz, 5 g/L laktoz, 8.3g/L ksiloz, 10 g/L sorbitol ve 20 g/L gliserol etkisi incelenmiştir; çoğalma ortamına 3 g/L maya özütü ve 5 g/L pepton eklenmiştir. Sıcaklık ve karbon kaynakları enzim aktiviteleri üzerinde belirgin etkiler yapmıştır. 10^{o}C'de en yüksek spesifik KAT ve SOD değerleri sırasıyla 22.6 U/mg protein ve 170 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Gliserol ise en iyi karbon kaynağı olarak bulunmuştur; en yüksek spesifik KAT aktivitesi 113 U/mg protein ve en yüksek spesifik SOD aktivitesi 125 U/mg protein olarak elde edilmiştir (Ünlü ve Takaç 2012).

Literatürde SOD ve KAT enziminin eşanlı olarak zeytin karasuyu ortamında üretimesine ilişkin hiçbir çalışma yer almamaktadır. Bu tez çalışması zeytin karasuyu ortamında *R.glutinis* mikroorganizması kullanılarak SOD ve KAT enzimleri üretimi üzerine yapılmış özgün bir çalışmadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal ve biyokimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler EK 1'de, kullanılan cihazlar EK 2'de verilmiştir. Analiz ve ortam hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıktadır.

3.1.2 Zeytin karasuyu

Zeytin karasuyu, 2012 hasat döneminde Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi'nden (Burhaniye/Balıkesir) sağlanmıştır. Projede kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri çizelge 3.1'de verilmiştir. Zeytin karasuyu kullanılmadan önce -30^{o}C'ta saklanmıştır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri*

Özellik	**Değer**
pH	4.98
Toplam fenol derişimi	1050 mg/L
Glukoz (İndirgenmiş şeker)	20 mg/mL
Kimyasal oksijen ihtiyacı	88593 mgO_2/L
Toplam azot	165.3 mg/L
Toplam organik karbon	44893 mg/L
Potasyum	6254 mg/L
Magnezyum	217.7 mg/L
Elektriksel iletkenlik	12.00 mS/cm

*pH, glukoz ve toplam fenol derişimi dışındaki analizler DÜZEN-NORWEST'de yapılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikroorganizma ve saklama

Çalışmada ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) mayası kullanılmıştır. Maya, eğik agar tüplerde (+4^{o}C) ve mikrobank™ viallerde (Pro-Lab Diagnostics Microbank™) (-30 ^{o}C) saklanmış ve belli zaman aralıkları ile stok tazeleme işlemi yapılmıştır.

3.2.2 Mikroorganizma çoğaltma

Antioksidan enzimler üretiminde kullanılmak üzere *R. glutinis'*in katı çoğalma ortamı, zeytin karasuyu-agar (ZK-agar) olarak isimlendirilen ortamdır. ZK-agar, su yerine ZK ile hazırlanan UYM (Universal Yeast Medium) agar ortamıdır. UYM-agar; 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 5 g/L pepton, 10 g/L glukoz ve 20 g/L agardan oluşmaktadır. *R. glutinis* katı agar ortamında 24 st süre ile inkübe edilmiş ve +4°C'ta saklanmıştır. Kontrol ortamı olarak UYM-agar kullanılmıştır. *R.glutinis,* UYM- agar ortamında 21 st süre ile çoğaltılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Zeytin karasuyu kullanılarak mikroorganizmanın çoğaltıldığı sıvı çoğalma ortamında, SOD ve KAT enzim üretimine çeşitli parametrelerin etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı ortam bileşimleri kullanılmıştır.

Hücreler, katı çoğalma ortamından sıvı üretim ortamına aktarılırken steril bidistile su içinde başlangıç absorbansı A= 0.850±25 (λ=600 nm) olacak şekilde ayarlanmış ve her erlene eşit miktarda (5ml) hücre aktarılmıştır.

R. glutinis, kontrol ortamı olarak öncelikle UYM ortamında çoğaltılmıştır. Çoğalmalar, 250 ml hacimli erlenler içinde 100 ml hacminde, 30^{o}C'de ve 150 rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Hücre parçalama

100 ml üretim ortamı, +4ºC, 10000 rpm (12000xg) koşullarında 10 dk süre ile santrifüjlenerek hücreler sıvı fazdan ayırılmıştır. Distile su ile yıkanan hücrelerin üzerlerine 5 ml fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) eklenmiştir. Bir ml hacminde parçalama tüplerine alınan süspansiyondaki hücreler, 30 s'lik periyotlar halinde 10 kez parçalanmış ve her bir parçalama periyodu ardından 30 s'lik süreler halinde buzda soğutulmuştur. Parçalama tüpleri 12000xg'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiş ve elde edilen üst faz hücre içi analizlerinde kullanılmıştır (Ünlü 2012).

3.3 Analizler

3.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperosit dismutaz aktivitesi ölçümünde, Marklund (1974)'un geliştirdiği yöntem kullanılmştır. Ölçümde substrat olarak 50 mM pH 8.2 Tris-HCl-1mM EDTA içeren tampon içindeki 20 mM derişiminde progallol kullanılmıştır. Otooksidasyon, 0.2 µM bovin katalaz varlığında 420 nm'de absorbanstaki artış 5 dakika süre ile izlenerek gerçekleştirilmiştir. Bir ünite SOD aktivitesi, progallol otooksidasyonunu %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

SOD aktivite hesabı için öncelikle progallolün otooksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Analiz ortamında 50 mg/L katalaz enzimi, 0.2 mM progallol bulunmaktadır. Her analiz öncesinde otoksidasyon grafiği hazırlanmıştır ve üçer kez tekrar edilerek ortalaması alınmıştır.

3.3.2 Katalaz (KAT) aktivitesi

Katalaz aktivitesi, Aebi (1984) tarafından geliştirilen yöntemine göre belirlenmiştir. Yöntem, H_2O_2'nin zaman içinde parçalanarak azalması temeline dayanmaktadır. Analizlerde 0.05 M pH 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanan 3.2 mM H_2O_2'nin parçalanması, λ=240 nm'de 1 dk boyunca takip edilmiştir. Bir ünite katalaz aktivitesi, 1

dakikada 1 µmol H_2O_2'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.3 Protein derişimi

Hücre içi protein derişimi Bradford (1976) yöntemine göre ile λ=595 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Kalibrasyon doğrusu: Protein derişimi için kalibrasyon doğrusu bovin serum albumin (BSA) proteini kullanılarak hazırlanmıştır (EK 3). Kalibrasyon doğrusu denklemi kullanılarak örneklerin okunan absorbans değerinden protein derişimleri hesaplanmıştır.

3.3.4 Hücre derişimi

Ortamlardan alınan örnekler içerisinde bulunan hücreler, ışık mikroskopunda Neubauer lamı kullanılarak sayılmış ve hücre sayısı/ml değerleri hesaplanmıştır.

3.3.5 İndirgen şeker derişimi

İndirgen şeker analizi, Miller (1959) tarafından verilen yöntem temel alınarak yapılmıştır. Analiz için dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (10 g/L DNS, 0,5 g/L sodyum sülfit, 10 g/L sodyum hidroksit) ve sodyum potasyum tartarat (40 g/L) çözeltisi ayrı kaplarda hazırlanmıştır. 750µl örnek (kör için saf su) ile 750µl DNS çözeltisi karıştırılarak 90°C'de 10 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µl %40'lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi konulmuş ve buz banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığına getirildikten sonra mikro küvetlere konularak λ=575 nm'de absorbans değeri okunmuştur.

Kalibrasyon doğrusu: Örneklerin indirgen şeker derişim analizlerinde kullanılacak kalibrasyon doğrusu standart olarak glukoz ile hazırlanmıştır (EK 4). Kalibrasyon doğrusu denklemi kullanılarak örneklerin absorbans değerinden indirgen şeker derişimleri hesaplanmıştır.

3.3.6 Toplam fenol (TF) derişimi

Çoğalma ortamından alınan örneklerin pH değerleri %37'lik HCl ile 2'ye getirildikten sonra, üç kez ekstraksiyon ile fenolik bileşenler etil asetat fazına alınmıştır. Döner buharlaştırıcıda etil asetatı tamamen uzaklaştırılan örnekler, etil alkol-su karışımında (60:40) çözünmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır (Ayed vd. 2005).

Toplam fenol analizi için, analize hazırlanan örnekten 20 µl cam tüplere alınmış; üzerine 1.58 ml saf su ve 100 µl Folin reaktifi eklenmiştir. Çok iyi bir şekilde vortekslenen çözelti 8 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 µl doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenerek tekrar vortekslenen tüp, ağızı kapatılarak 40 ºC'deki su banyosunda 30 dk tutulmuş ve λ=765 nm'de absorbansı okunmuştur.

Kalibrasyon doğrusu: Toplam fenol analizinde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asitin etil alkol içinde hazırlanan farklı derişimleri ile çalışma doğrusu çizilmiş ve örneklerin toplam fenol derişimi gallik asit eşdeğeri olarak (mg gallik asit/L) hesaplanmıştır (EK5).

3.3.7 HPLC analizleri

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin dağılımını görmek amacıyla HPLC ile analizler yapılmıştır. Bu amaçla ortamdan alınan örneklerin pH değerleri %37'lik HCl ile 2'ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiştir. Döner buharlaştırıcıda etil asetat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra etil alkol-su karışımında (60:40) çözünmüştür. Daha sonra örnekler, 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Analiz koşulları çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 HPLC analiz koşulları

Değişken	**Özellik**
Kolon	XTerra RP18 (Waters)
Kolon boyutu	4.6 mm x 150 mm x 5 μm
Hareketli faz akış hızı	0.3 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25^{o}C
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector (Waters 2487)
Dalga boyu	280 nm
Taşıyıcı faz A	%70:%30 asetonitril (ACN): bidistile su (H_2O)
Taşıyıcı faz B	% 0.1 *o*-fosforik asit (*o*-H_3PO_4)
Enjeksiyon hacmi	20 μL

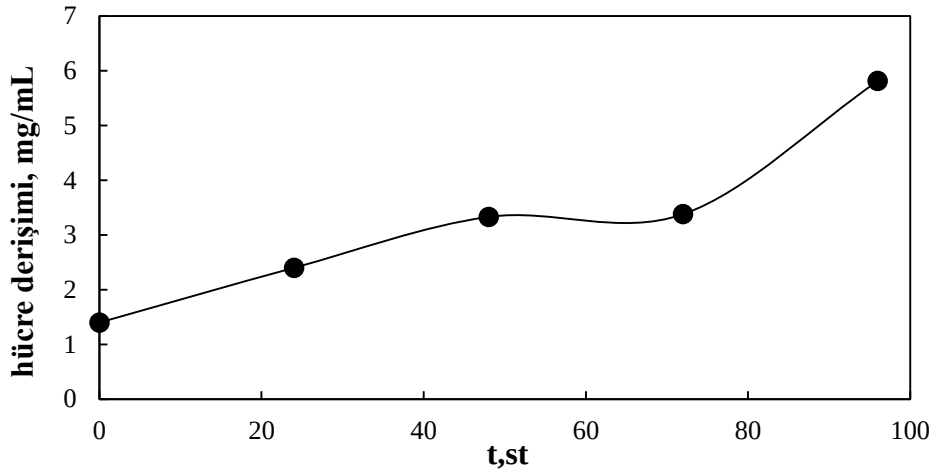
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 UYM Ortamında *Rhodotorula glutinis* Çoğalması ve Antioksidan Enzimler Üretimi

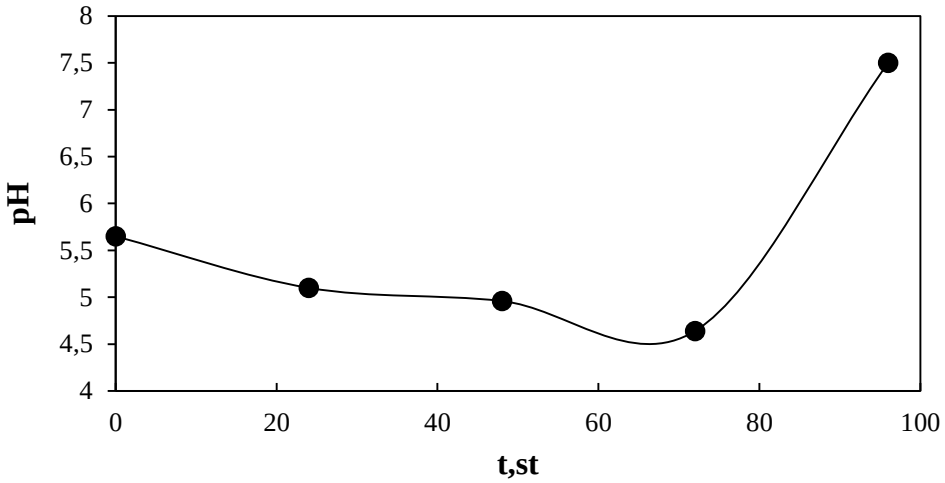
*Rhodotorula glutinis'*in zeytin karasuyu ortamında antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) üretimlerini incelemeden önce karşılaştırma amacıyla agar içermeyen UYM ortamında üretimler yapılmıştır.

R.glutinis'in UYM ortamında çoğalması 96 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Çoğalma eğrisi, zaman ile ortam pH'ı, protein derişimi, spesifik SOD aktivitesi, spesifik KAT aktivitesi ve % indirgen şeker kullanımı şekil 4.1 - 4.6'da gösterilmiştir.

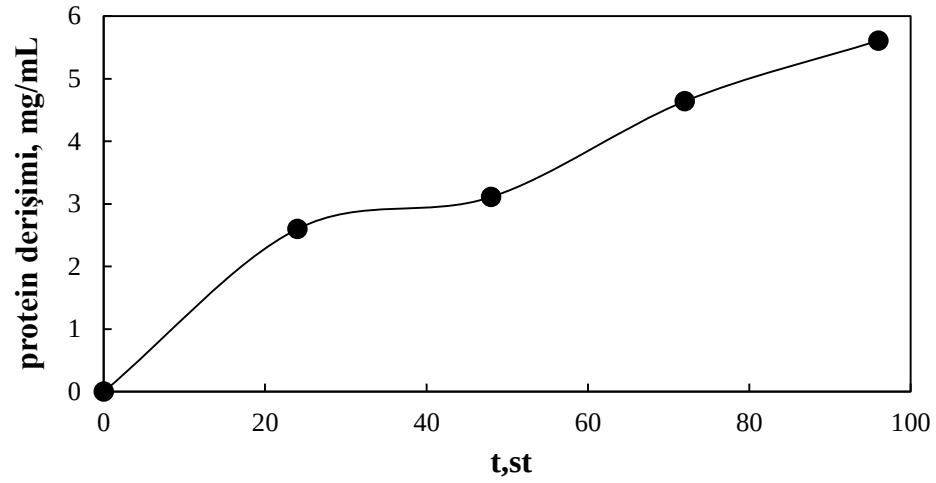
UYM ortamındaki çoğalmada, hücre çoğalmasının hızlanmaya başladığı zamanlarda ortam pH'ında azalma gözlenmiş, sonrasında artmaya devam etmiştir. pH değerindeki düşmenin nedeni, hücre dışı asidik metabolik ürünlerin sentezlenmesi olarak değerlendirilmiştir. Hücre çoğalmasına paralel olarak hücre içi protein derişimi de artmıştır. Spesifik SOD aktivitesi zaman ile önce artış göstermiş sonra azalmış ve daha sonra da ikinci bir artışa geçmiştir. İkinci artışın nedeni hücrelerin substrat olarak kullandığı glukozun tüketilmesi ile hücreler üzerinde stres oluşmasıdır (Ünlü ve Takaç 2012). Spesifik KAT aktivitesi ise zamanla önce artış sonra azalış göstermektedir. Ulaşılan en yüksek spesifik SOD aktivitesi 6.69 U/mg protein; spesifik KAT aktivitesi ile 10.91 U/mg protein'dir. Literatürde yapılan bir çalışmada *R. glutinis* çoğalması ve enzim aktiviteleri UYM ortamında incelenmiş; en yüksek spesifik KAT ve SOD aktiviteleri 10°C'da sırasıyla 22.6 U/mg protein ve 185.4 U/mg protein olarak elde edilmiştir (Ünlü 2012). 96 saat süren üretim sonunda %77 indirgenmiş şeker tüketimi sağlanmıştır.



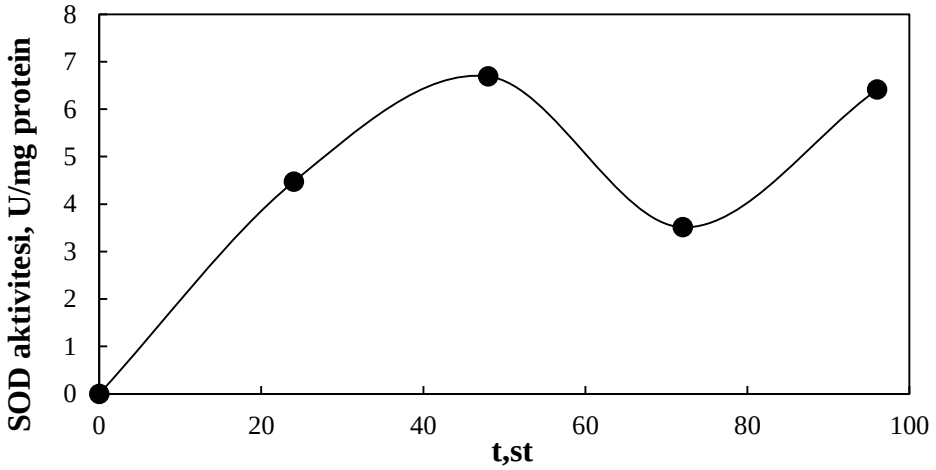
Şekil 4.1 *R.glutinis*'in UYM ortamında çoğalma eğrisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm)



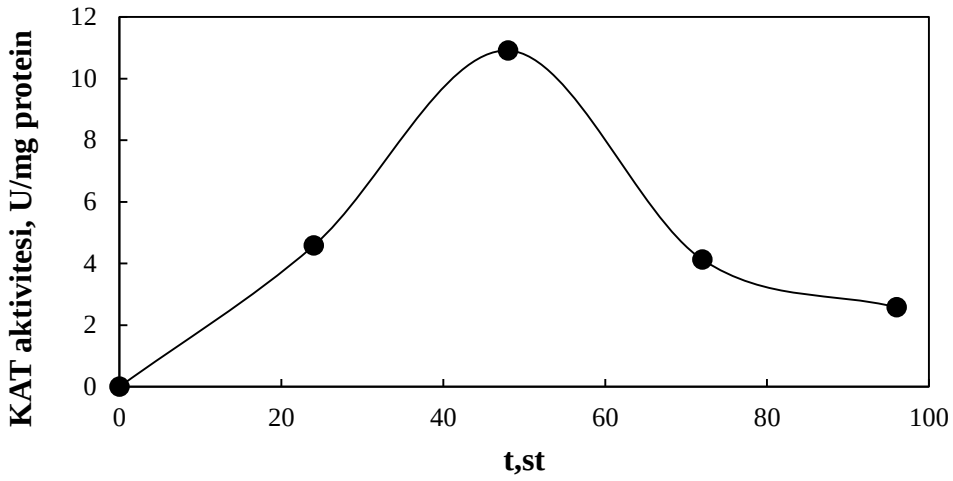
Şekil 4.2 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için ortam pH'ının zaman ile değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)



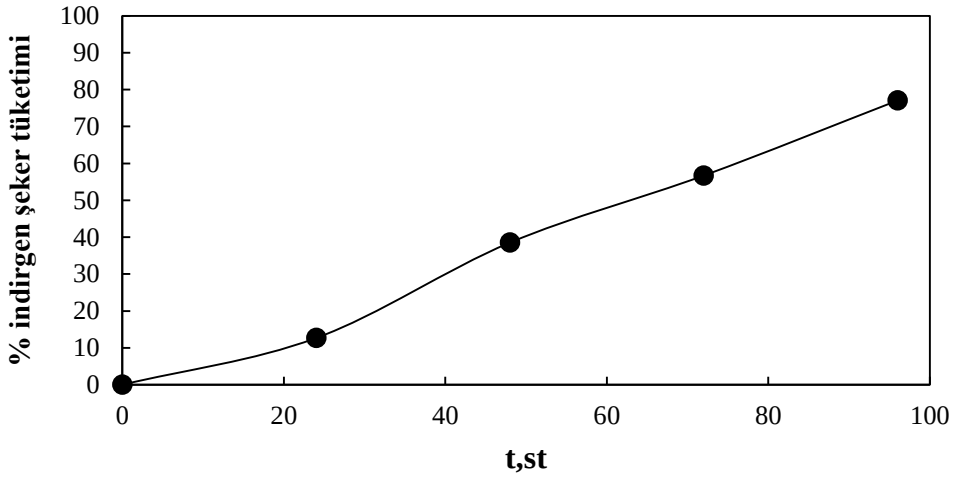
Şekil 4.3 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için hücre içi protein derişiminin zaman ile değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)



Şekil 4.4 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için spesifik SOD aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)



Şekil 4.5 UYM ortamında çoğalan *R.glutinis* için spesifik KAT aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)



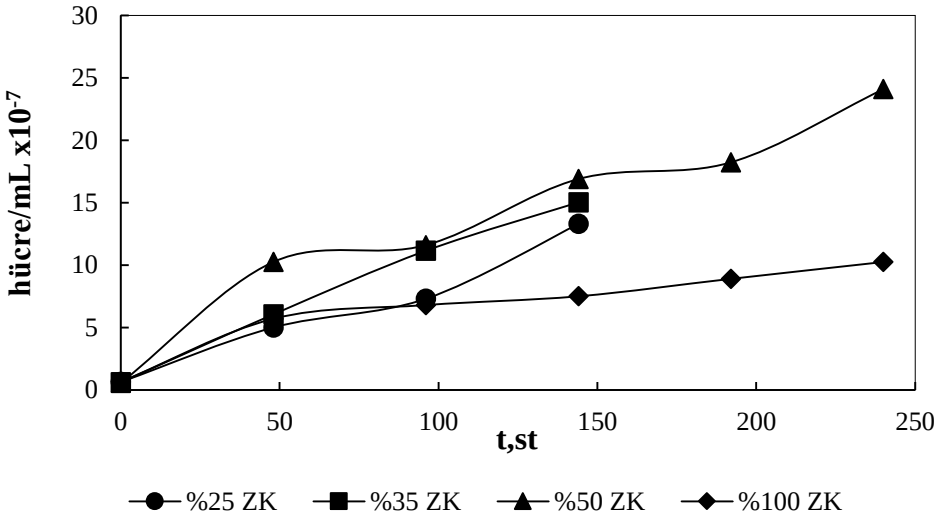
Şekil 4.6 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için indirgen şeker kullanım %'sinin zaman ile değişimi (T=30 C, N=150 rpm)

4.2 Zeytin Karasuyu Miktarı Etkisi

Zeytin karasuyunun *R. glutinis*'den antioksidan enzimler SOD ve KAT üretimine etkisi, bileşiminde %25, 35, 50 ve 100 (h/h) zeytin karasuyu (TF = 262.5, 525, 787.5 ve 1050 mg/L; indigenmiş şeker derişimi 5, 7, 10 ve 20 mg glukoz/mL) içeren UYM ortamlarında gerçekleştirilen çoğalmalar ile incelenmiştir.

4.2.1 Zeytin karasuyu miktarının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi

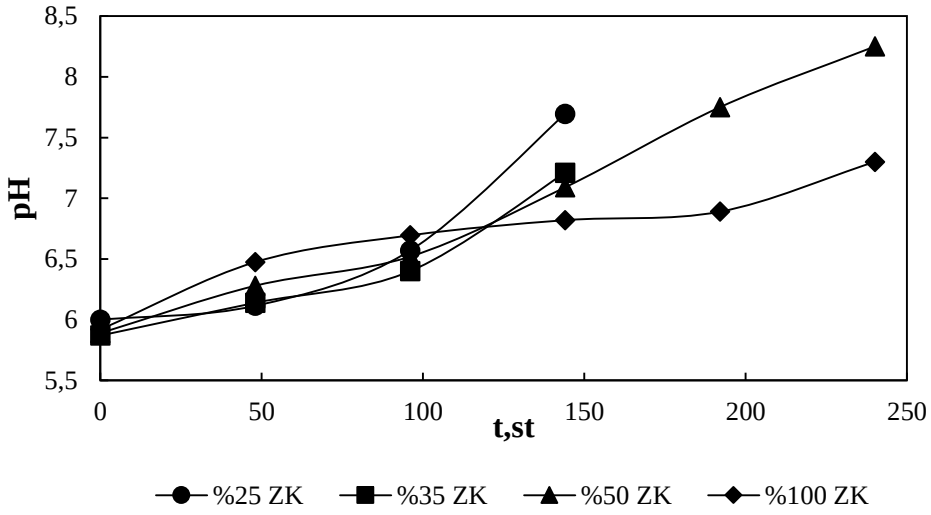
Farklı derişimlerde zeytin karasuyu içeren UYM ortamlarında gerçekleştirilen çoğalmalarda hücre derişiminin zamanla değişimi şekil 4.7'de verilmiştir. Zeytin karasuyu derişiminin artması ile hücrelerin üstel çoğalma fazına geçme süreleri uzamış; ortamdaki karasuyunun % 50 ye kadar artışı ile hücre sayısı artarken, % 100 ZK içeren ortamda çoğalan hücre sayısı azalmıştır. Çalışılan koşullarda en yüksek *R. glutinis* derişimine % 50 ZK-UYM ortamında 144. saat sonunda 16.9 $x10^7$ hücre/mL olarak ulaşılmıştır. % 100 zeytin karasuyu derişimi diğer ortamlarla karşılaştırıldığında hücre çoğalmasını inhibe ettiği literatürde de yer almaktadır (Karakaya vd. 2012)



Şekil 4.7 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.2.2 Zeytin karasuyu miktarının ortam pH değerine etkisi

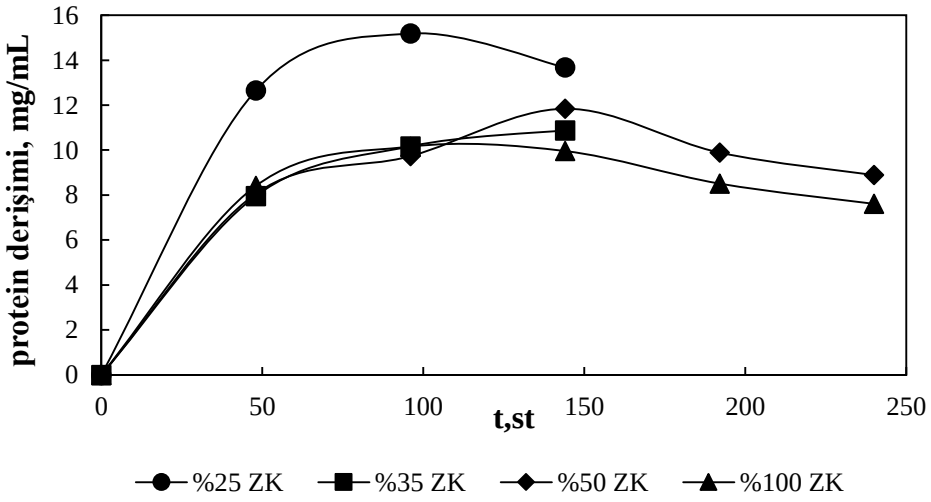
R. glutinis mayası, zeytin karasuyu ortamında çoğalırken ortam pH'ının artışına neden olmakta ve bu artış çoğalmanın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Karakaya vd. 2012). Bu çalışmada da farklı derişimlerdeki ZK-UYM ortamlarında *R. glutinis* hücreleri çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerlerini artırmışlar ve çoğalmanın az olduğu % 100 ZK-UYM ortamında bu artış da daha az olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.2.3 Zeytin karasuyu miktarının hücre içi protein derişimine etkisi

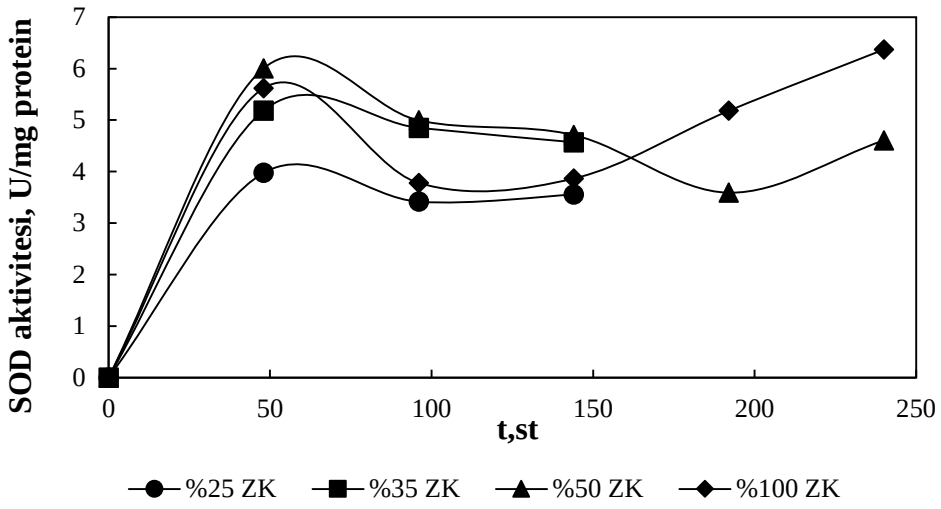
Farklı derişimlerde ZK içeren ZK-UYM ortamlarında zaman ile hücre içi protein derişimi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.9). En yüksek hücre içi protein derişimine en düşük derişimde olan % 25 ZK-UYM ortamında ulaşılmıştır. Protein derişiminde ilerleyen saatlerdeki düşüş, hücre çoğalmasında üstel fazın bittiği zaman denk gelmektedir.



Şekil 4.9 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.2.4 Zeytin karasuyu miktarının spesifik SOD aktivitesine etkisi

Farklı derişimlerde ZK içeren ZK-UYM ortamlarında zaman ile spesifik SOD aktivitesi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise önce sabit kalmış ve sonrasında tekrar yükselmiştir (Şekil 4.10). İleri saatlerde görülen ikinci artışın nedeni substratın tükenmesi ile hücreler için bir stres ortamının oluşması ve SOD aktivitesinin indüklenmesidir. En yüksek spesifik SOD aktivitesine 144 saat sonunda 4.71 U/mg protein değeri ile % 50 ZK-UYM ortamında ulaşılmıştır.

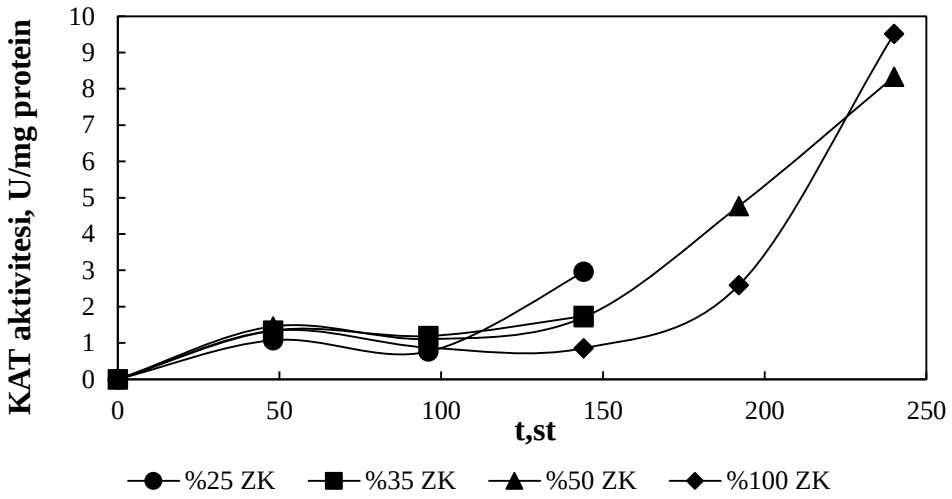


Şekil 4.10 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 ºC, N=150 rpm)

4.2.5 Zeytin karasuyu miktarının spesifik KAT aktivitesine etkisi

Farklı derişimlerde ZK içeren ZK-UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesi, başlangıçtaki artıştan sonra uzun bir süre artış göstermemiş; sonrasında tekrar daha yüksek bir hızla artmaya başlamıştır (Şekil 4.11). Bu değişimin nedeni, ortamda bulunan besin kaynaklarının tükenmesi nedeniyle hücrelerin kendi bünyesindeki karbon ve azot kaynaklarını (organik asit ve amino asitler) kullanmaları ve böylece reaktif oksijen türleri oluşumundaki artış olarak belirtilmiştir (Ünlü ve Takaç 2012). 144 saat çoğalma sonunda en yüksek spesifik KAT aktivitesi 2.96 U/mg değeri ile % 25 ZK-

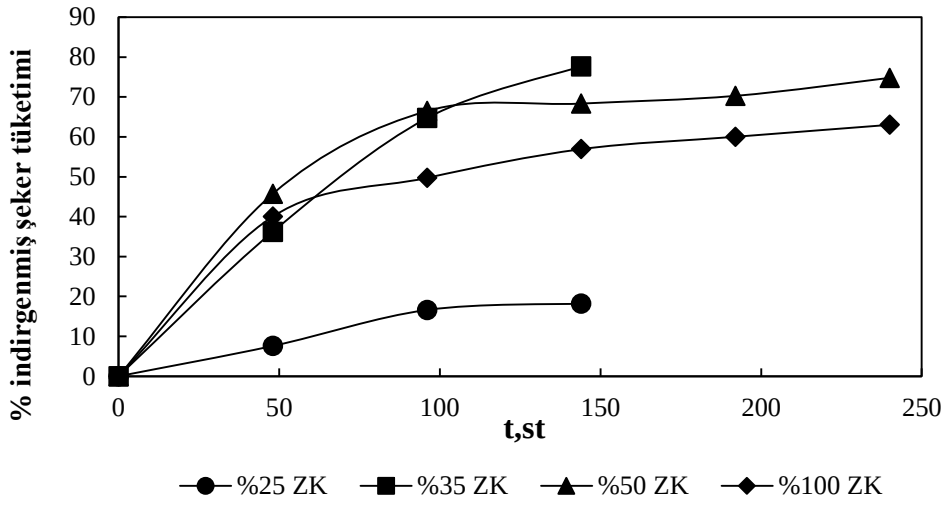
UYM ortamında bulunmuştur. 240 saat çoğalma sonunda ise % 100 ZK-UYM ortamında 9.52 U/mg spesifik KAT aktivitesine ulaşmıştır.



Şekil 4.11 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.2.6 Zeytin karasuyu miktarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi

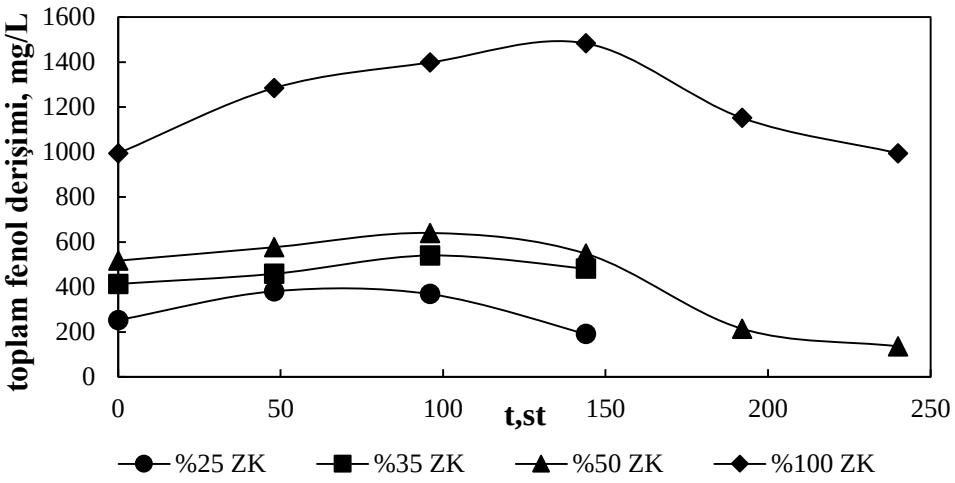
Farklı derişimlerde ZK içeren ZK-UYM ortamlarında indirgenmiş şeker derişimi zamanla azalma göstermiş ve başlangıç ZK derişimine bağlı olarak farklı zamanlarda yaklaşık sabit değerlere gelmiştir (Şekil 4.12). İndirgenmiş şeker tüketiminin zaman ile değişimi, *R. glutinis'in* ZK içeren UYM ortamlarında şeker tüketiminin % 80'lere ulaştığını göstermektedir.



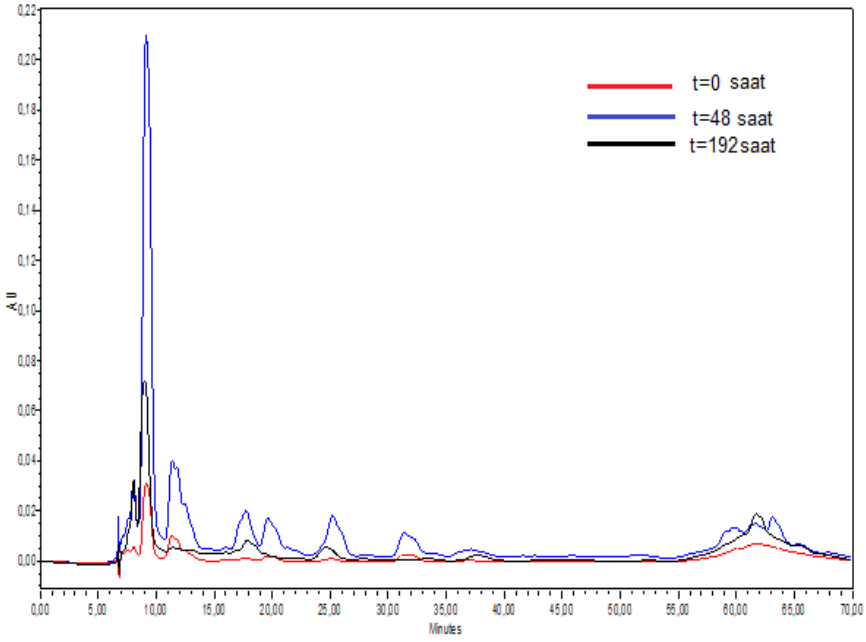
Şekil 4.12 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında indirgenmiş şeker tüketimi (%) (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.2.7 Zeytin karasuyu miktarının toplam fenol derişimine etkisi

Farklı derişimlerde ZK içeren ortamların her birinde toplam fenol derişimi zamanla önce artış, sonra azalma göstermektedir (Şekil 4.13). *R. glutinis* hücrelerinin glukoz ile ZK kaynaklı fenolik maddeler içeren ortamda çoğalırken, karbon kaynağı olarak öncelikle glukozu tüketmesi ve sonrasında fenolik bileşenleri kullanması beklenmektedir. Toplam fenol derişiminin azalmaya başlama zamanı, yaklaşık glukoz tüketiminin sonlandığı zamana denk gelmektedir (Şekil 4.12). Ancak toplam fenol derişimi, başlangıç zamanlarında sabit kalmayıp artmaktadır. Bu artış, zeytin karasuyunun yapısında bulunan büyük molekül ağırlıklı oleoropeinin enzimatik olarak parçalanıp küçük molekül ağırlıklı ve toplam fenol derişim analizi ile tayin edilebilen fenolik maddelere dönüşmesi ile açıklanabilir. Çoğalmanın başlangıcında ve ilerleyen zamanlarda yapılan HPLC analizleri, toplam fenol derişiminin arttığı ileri zamanlarda fenolik madde sayısının başlangıçtan daha fazla olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 ºC, N=150 rpm)



Şekil 4.14 % 50 ZK içeren UYM ortamın çoğalmanın farklı zamanlarında fenolik madde piklerini gösteren HPLC kromatogramları

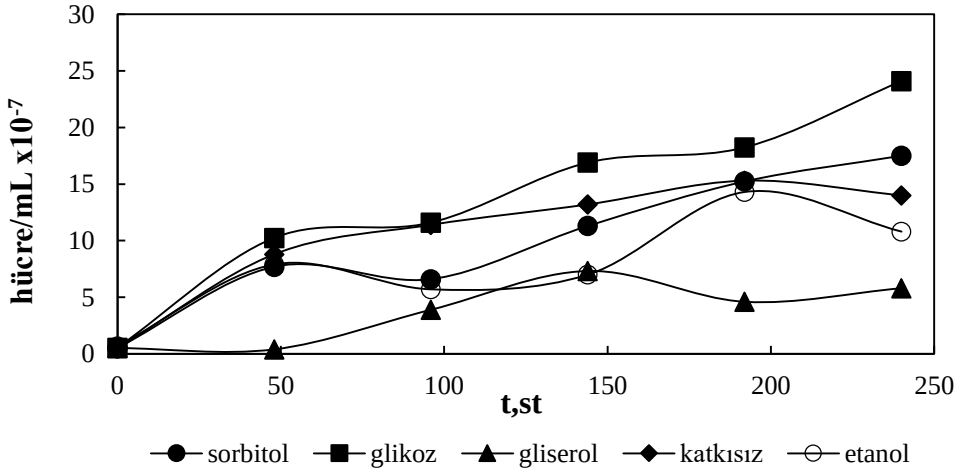
4.3 Karbon Kaynağı Etkisi

R. glutinis çoğalması ve antioksidan enzimler SOD ve KAT üretmesi üzerine ek karbon kaynaklarının etkisi, %50 ZK (h/h) (TF=525 mg/L, indirgen şeker 10 mg/mL) içeren çoğalma ortamına UYM ortam bileşimine karbon kaynağı olarak glukoz (10 g/L),

sorbitol (10 g/L), gliserol (20 g/L) ve etanol (%1 h/h) eklenerek incelenmiştir. Kontrol olarak ek karbon kaynağı içermeyen %50 ZK-UYM ortamda çoğalma gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 Karbon kaynaklarının *Rhodotorula glutinis'in* çoğalmasına etkisi

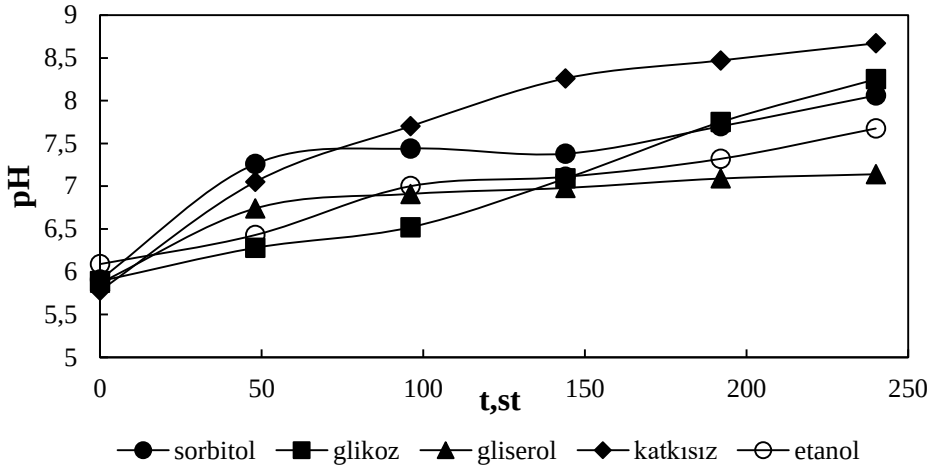
Farklı karbon kaynakları varlığında gerçekleştirilen çoğalmalarda zamanla *R. glutinis* derişiminin zamanla değişimi şekil 4.15'de verilmiştir. 240 saat sonunda en yüksek hücre derişimine $24.1x10^7$ hücre/mL değeri ile glukoz eklenen ortamda ulaşılmıştır. En düşük hücre derişimi ise ($5.8x10^7$ hücre/mL) gliserol içeren ortamda ölçülmüştür. *R. glutinis* mayasının, karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda etanol ortamına göre daha fazla çoğaldığı bildirilmiştir (Koleva vd. 2008).



Şekil 4.15 %50 ZK ve farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) varlığında hücre çoğalması (T=30ºC, N=150 rpm)

4.3.2 Karbon kaynaklarının ortam pH değerine etkisi

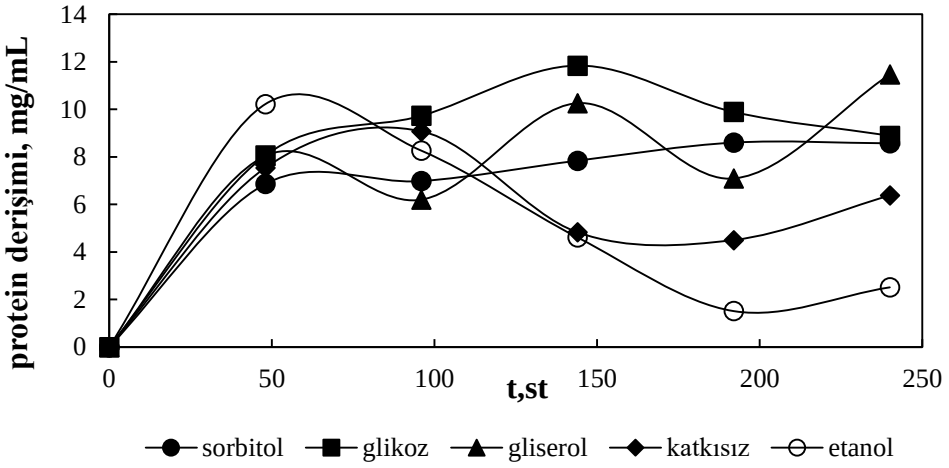
R. glutinis zeytin karasuyu ortamında çoğalırken ortam pH değerinin de arttığı bilinmektedir (Karakaya vd. 2012, Karakaya vd. 2014, Bozkoyunlu ve Takaç 2014). Bu çalışmada da farklı karbon kaynakları varlığında *R. glutinis* hücrelerinin çoğalmasına paralel olarak ortam pH değerlerinin artışı gözlenmiştir (Şekil 4.16). En yüksek pH artışı ek karbon kaynağının bulunmadığı ortamda elde edilmiştir.



Şekil 4.16 Farklı karbon kaynakları içeren (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) % 50 ZK ortamında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.3.3 Karbon kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi

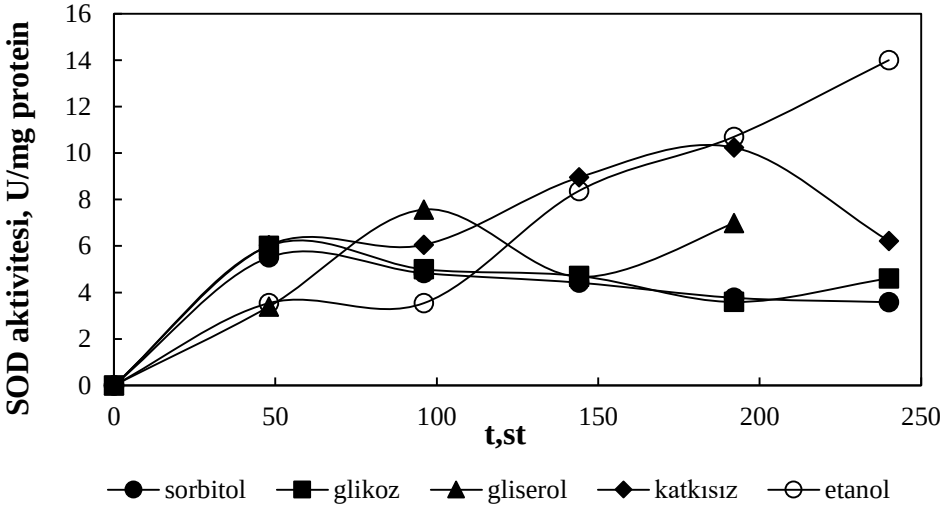
Etkileri incelenen tüm karbon kaynakları varlığında, hücre içi protein değeri başlangıçta zamanla artmış; sonra kullanılan karbon kaynağına göre sabit kalmış veya azalmıştır (Şekil 4.17). Protein derişimindeki azalma yaklaşık hücre çoğalma hızının yavaşladığı saatlere karşılık gelmektedir. Glukoz ve sorbitol varlığında protein derişimi kararlılık gösterirken, etanol ve katkısız ortamlarda zamanla azalmıştır. Zaman ile protein derişiminde en fazla azalma ise etanol varlığında gözlenmiştir.



Şekil 4.17 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.3.4 Karbon kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi

Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen çoğalmalarda, çoğalmanın ilk 100 saati boyunca spesifik SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu saatten sonra ise etanol varlığında enzim aktivitesi hızla artmaya devam etmiş; diğer karbon kaynakları ise bu artışı sağlayamamışlardır (Şekil 4.18). Herhangi bir karbon kaynağı eklenmeyen ortam ise -ileri saatlerde- etanolden sonra en yüksek spesifik SOD aktivitesini sağlayan ortam olmuştur. 240 saat etanol içeren ortamda 14 U/mg protein spesifik SOD aktivitesine ulaşılmıştır. Sonuçlar, etanolün hücre için stres ortamı yaratıp SOD aktivitesini indüklediğini göstermektedir.

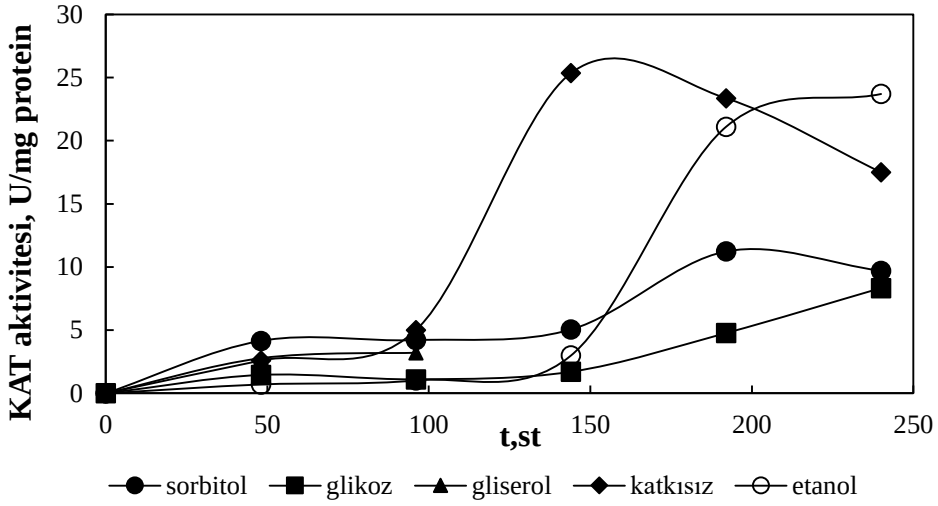


Şekil 4.18 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren % 50 ZK ortamında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.3.5 Karbon kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi

Farklı karbon kaynakları ile gerçekleştirilen çoğalmalarda, çoğalmanın ilk zamanlarında spesifik KAT aktivitesindeki artış az olmuş; 100-150 saat sonrasında KAT aktivitesi artmaya başlamış ve bu artış en fazla etanol içeren ve katkısız ortamlarda gözlenmiştir (Şekil 4.19). 240 saat süren çoğalmada etanol varlığında ulaşılan spesifik KAT aktivitesi 23.7 U/mg protein'dir. Spesifik KAT aktivitesinin, başlangıçtaki artıştan sonra uzun bir süre artış göstermeyip sonrasında tekrar artmaya başlamasının nedeni, ortamda

bulunan besin kaynaklarının tükenmesi sonucu hücrelerin kendi bünyesindeki karbon ve azot kaynaklarını kullanmaları ve böylece reaktif oksijen türleri oluşumundaki artış olarak belirtilmiştir (Ünlü ve Takaç 2012).

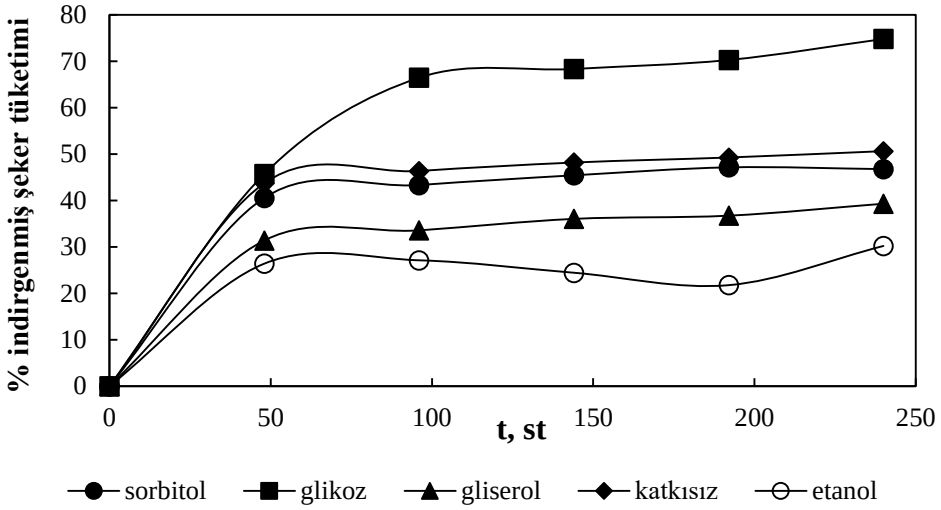


Şekil 4.19 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

Araştırma grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada, *R. glutinis*'in çoğalması ile KAT ve SOD aktiviteleri üzerine karbon kaynaklarının etkisi glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, sukroz, laktoz, ksiloz, sorbitol ve gliserol ile incelenmiştir. Sonuçlar, en zengin şeker içeriğine sahip olan malt özütü içeren UYM ortamında en yüksek hücre derişiminin elde edildiğini göstermiştir. Karbon kaynaklarının KAT ve SOD aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde ise, her iki enzim için de öne çıkan ilk iki substratın gliserol ve sorbitol olduğu görülmüştür (Ünlü ve Takaç 2012). *C. militaris* miselinin kullanıldığı bir çalışmada ise, SOD ve KAT aktiviteleri üzerine karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz ve maltozun etkileri incelenmiş ve elde edilen aktiviteler sırasıyla SOD için 17.4 U/mg protein, 15.4 U/mg protein ve 12.1 U/mg protein; KAT için ise sırasıyla 69.3 U/mg, 73.7 U/mg ve 59.3 U/mg olarak bildirilmiştir (Wang vd. 2006). *R. glutinis* DFR-PDY'nin çoğalması üstüne karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, galaktoz, sukroz, maltoz, ksiloz, riboz ve arabinozun etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada, en yüksek hücre derişimi glukoz eklenen ortamda elde edilmiş, laktoz eklenen ortamda ise hücre çoğalması gözlenmemiştir (Latha vd. 2005).

4.3.6 Karbon kaynaklarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının varlığındaki çoğalmalarda *R.glutinis* hücrelerinin eklenen karbon kaynakları yanında zeytin karasuyunda bulunan glukozu da kullanması beklenmektedir. Bu nedenle ortamlardan zamanla alınan örneklerde indirgen şeker analizi yapılmış ve sonuçlar şekil 4.20'de verilmiştir. Ek karbon kaynağı olarak etanol, sorbitol ve gliserol içeren ortamlarda sadece zeytin karasuyundan gelen indirgen şeker derişiminin ölçülebilmesi nedeniyle (diğerleri indirgen şeker değildir) şeker tüketiminde fazla bir artış olmadığı, glukoz içeren ortamda ise artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20). Glukozun eklendiği ortamda 240 st sonunda % 74.8 indirgen şeker kullanımı gerçekleşmiştir. Herhangi bir karbon kaynağının eklenmediği ortamda ise %39.9 indirgen şeker kullanımı ölçülmüştür.

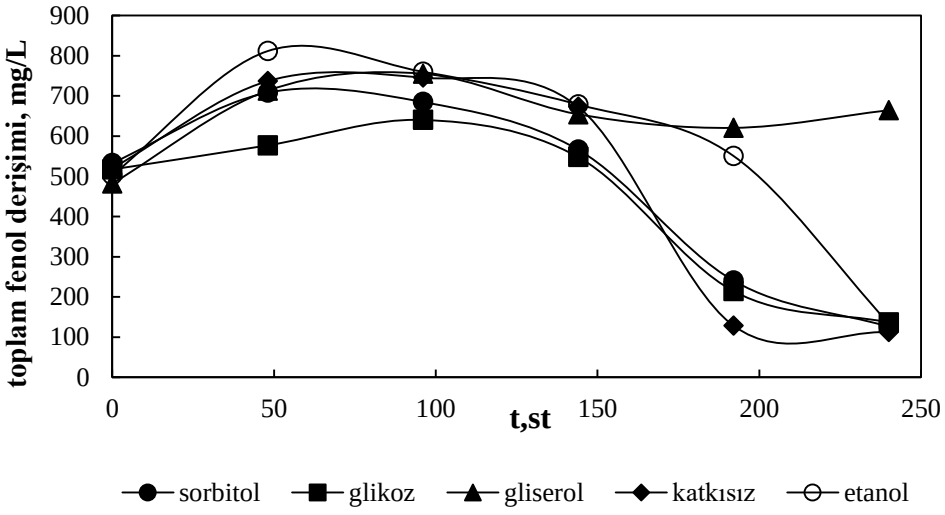


Şekil 4.20 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında indirgen şeker tüketiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.3.7 Karbon kaynaklarının toplam fenol derişimine etkisi

R. glutinis çoğalma ortamına eklenen tüm karbon kaynakları varlığında, ortamdaki fenol derişimi zamanla önce artmış sonra azalmıştır (Şekil 4.21). Gözlenen bu artışın, zeytin karasuyu yapısında bulunan fenolik bileşen oleoreopeinin enzimatik parçalanması nedeniyle olduğu ve sonraki azalmanın ise ortamdaki karbon kaynağı tükenmesi sonucu

fenollerin kullanılmaya başlanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Gliserol dışında eklenen tüm karbon kaynakları varlığında 240 saat çoğalma sonunda ortamdaki toplam fenol önemli ölçüde kullanılmıştır. En yüksek fenol giderimi karbon katkısız (% 78.4), etanol (% 73) ve glukoz (% 72) ortamlarında ölçülmüştür.



Şekil 4.21 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

Zeytin karasuyu içeren çoğalma ortamında bulunan karbon kaynaklarının birim hücre başına elde edilen SOD ve KAT aktivitelerine etkisi verim (Y) olarak tanımlanmış ve sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde en yüksek birim hücre başına verim SOD enzimi için (1.38) ve KAT enzimi için (2.34) için etanol eklenen ortamda elde edilmiştir.

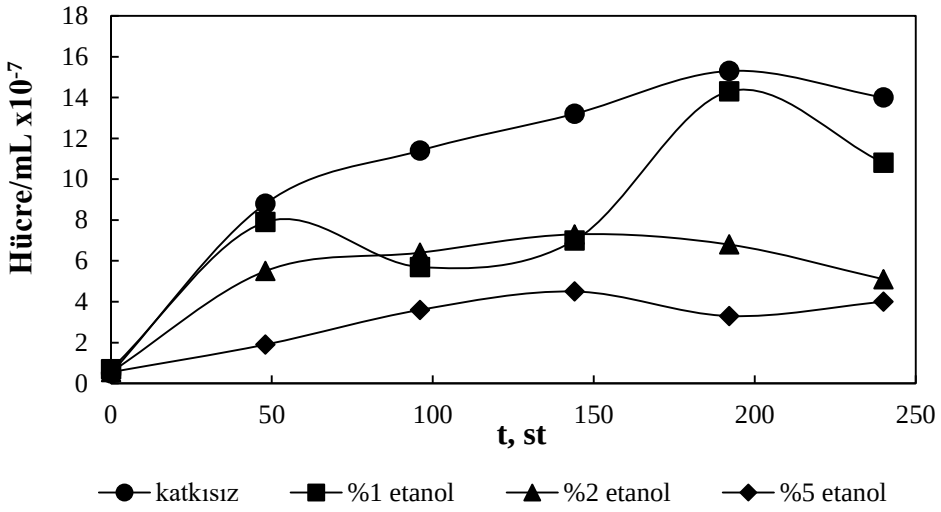
Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynakları (10 g/L glukoz, 10 g/L sorbitol, 20 g/L gliserol ve %1 h/h etanol) içeren %50 ZK ortamında birim hücre başına SOD ve KAT verimlilikleri (Y)

	Glukoz		**Sorbitol**		**Etanol**		**Katkısız**	
zaman (st)	$Y_{SOD/CX}$	$Y_{KAT/CX}$	$Y_{SOD/CX}$	$Y_{KAT/CX}$	$Y_{SOD/CX}$	$Y_{KAT/CX}$	$Y_{SOD/CX}$	$Y_{KAT/CX}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
48	0.62	0.15	0.77	0.58	0.49	0.10	0.73	0.31
96	0.45	0.10	0.79	0.69	0.71	0.20	0.55	0.46
144	0.29	0.10	0.41	0.47	1.33	0.47	0.70	1.99
192	0.20	0.27	0.26	0.76	0.79	1.55	0.69	1.58
240	0.20	0.35	0.21	0.57	**1.38**	**2.34**	0.46	1.30

4.3.8 Etanol derişimi etkisi

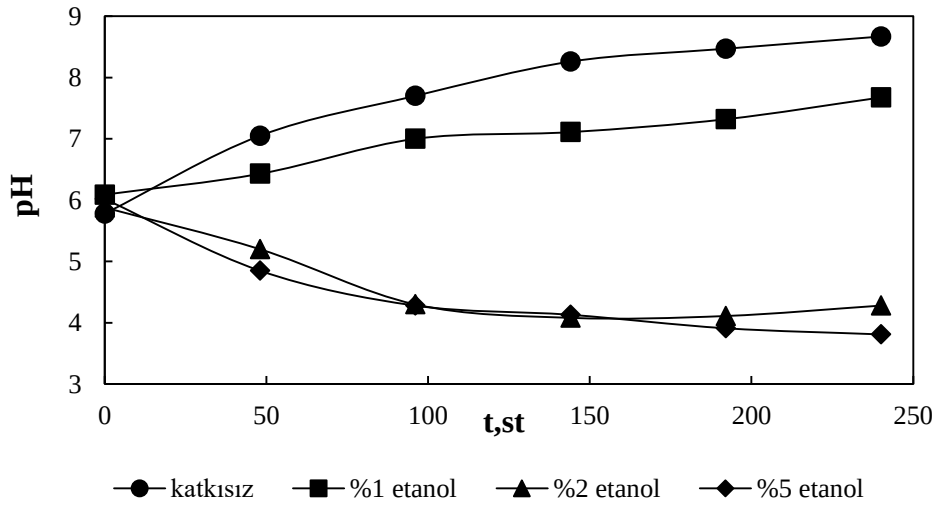
Zeytin karasuyu ortamında çoğalan *R. glutinis'*in ortama eklenen etanol (%1 h/h) ile daha yüksek aktivitede SOD ve KAT enzimleri ürettiği belirlendiği için etanolün farklı derişimlerinin hücre çoğalması ve enzim üretimi üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir. Bu amaçla % 50 ZK (TF=525 mg/L) içeren UYM ortam bileşimine % 1, 2 ve 5 (h/h) etanol eklenerek hücre çoğalması gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak karbon kaynağı içermeyen % 50 ZK-UYM ortamı kullanılmıştır.

Etanol derişiminin *R. glutinis* çoğalmasına etkisi şekil 4.22'de gösterilmiştir. En yüksek hücre derişimine çoğalmanın 200. saatinde 15.3×10^7 hücre/mL değeri ile hiçbir karbon kaynağının eklenmediği ortamda ulaşılmıştır. % 1 etanol derişiminden yüksek derişimler hücre çoğalması üstünde negatif etkiye sebep olmuştur. Bu, yüksek derişimdeki etanolün hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermektedir. Etanolün maya çoğalması üzerine inhibisyon etkisi yaptığı bilinmektedir (Thomas ve Rose 1979, Brown vd. 1981).



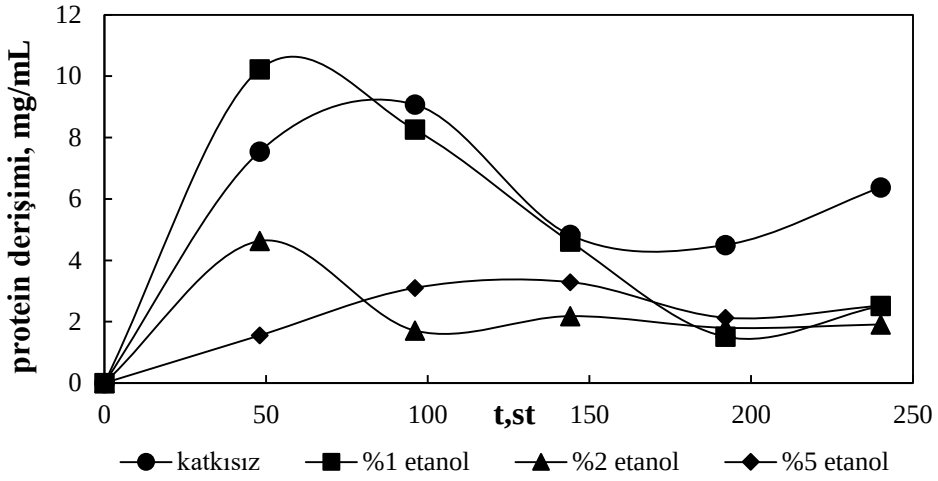
Şekil 4.22 Etanol derişiminin hücre *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

Etanol derişiminin ortam pH değerine etkisi ise şekil 4.23'de gösterilmiştir. Karbon kaynağı eklenmeyen ve % 1 etanol eklenen ortamlarda pH zaman ile artarken çoğalmanın hemen hemen hiç olmadığı % 2 ve % 5 etanol ortamlarında zaman ile pH azalmıştır.



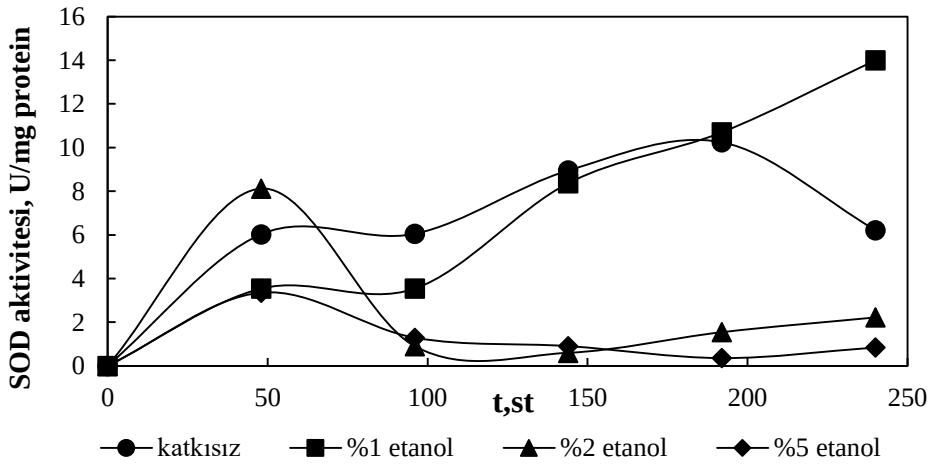
Şekil 4.23 Etanol derişiminin ortam pH değerine etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

Etanol derişiminin hücre içi protein derişimine etkisi şekil 4.24'de verilmiştir. İlk 48 saatte örneklerin hepsinde hücre içi protein değeri artmış, daha sonra zamanla azalma meydana gelmiştir.



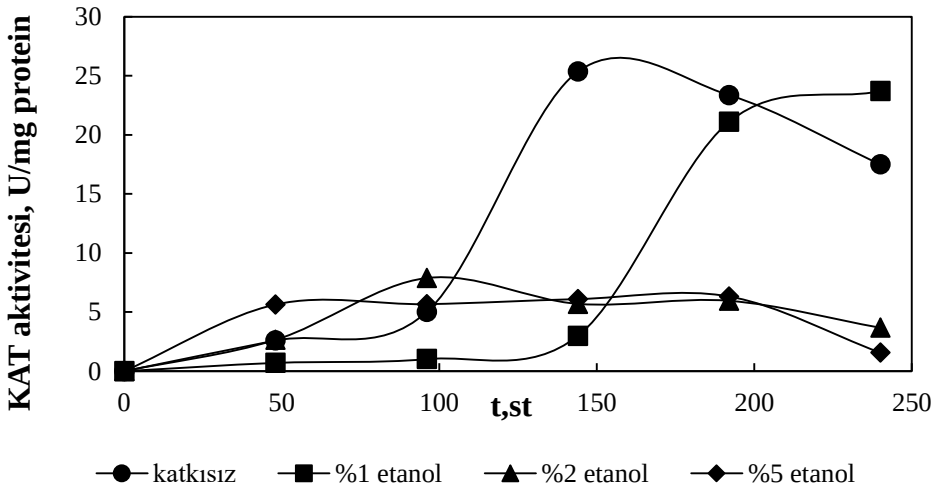
Şekil 4.24 Etanol derişiminin hücre içi protein derişimine etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

Etanol derişiminin spesifik SOD aktivitesine etkisinin zaman ile değişimi şekil 4.25'de gösterilmiştir. İlk 48 saat değerlerine bakıldığında en yüksek spesifik SOD aktivitesini % 2 etanol ortamı (8.12 U/mg protein) göstermesine karşın 240 saat sonunda en yüksek spesifik SOD aktivitesi sırasıyla % 1 etanol (14 U/mg protein), katkısız ortam (6.22 U/mg protein), % 2 etanol (2.21 U/mg protein) ve % 5 etanol (0.84 U/mg protein) ortamında ölçülmüştür.



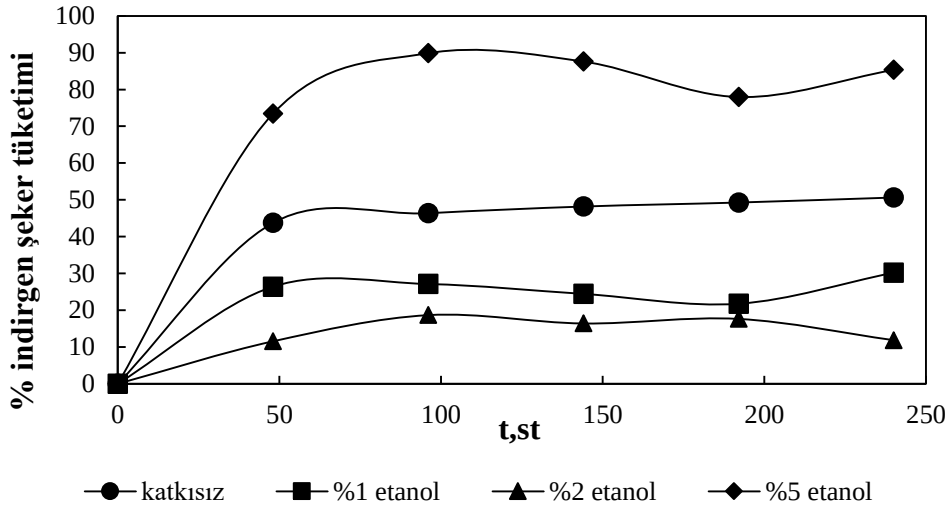
Şekil 4.25 Etanol derişiminin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

Etanol derişiminin zamanla spesifik KAT aktivitesindeki değişim şekil 4.26'da gösterilmiştir. İlk 96 saatte incelenen dört ortamda da spesifik aktivitede bir artış gözlenmezken ilerleyen saatlerde % 1 etanol ve katkısız ortamlarda yüksek aktiviteler ölçülmüş, % 2 ve % 5 etanol ortamlarında ise aktivitelerde azalma gözlemlenmiştir.



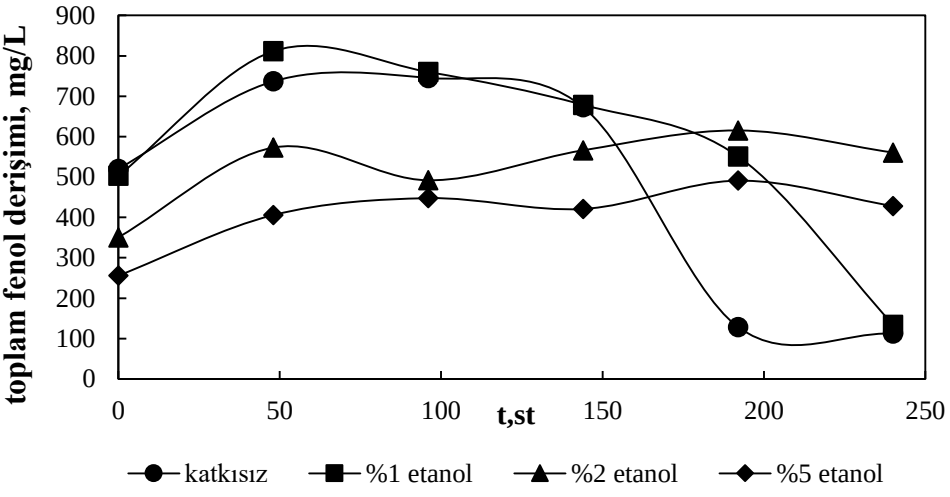
Şekil 4.26 Etanol derişiminin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

Farklı etanol derişimlerinde zamanla indirgenmiş şeker tüketimindeki değişim şekil 4.27'de verilmiştir. En yüksek indirgen şeker tüketimi % 5 etanol eklenen ortamda %89.9 ile sağlanmıştır. En düşük indirgen şeker tüketimi ise % 2 etanol eklenen ortamda %11.8 olmuştur. Metanol, etanol 1-propanol ve 2 propanolün (% 5-10 derişimlerinde) DNS metodunu etkilediği ve glukoz miktarında artma olarak pozitif hata verdiği bildirilmiştir (Numan vd. 2015). Bu sebeple hücre çoğalmasının en az olduğu % 5 etanol derişiminde en yüksek glukoz tüketimi gözükmektedir.



Şekil 4.27 Etanol derişiminin indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (T=30 ºC, N=150rpm)

Etanol derişiminin toplam fenol derişimine etkisi şekil 4.28'de gösterilmiştir. Etanol eklenmeyen ortamda % 78.4 ve % 1 etanol eklenen ortamda % 73 ile en yüksek fenol giderimi gerçekleşmiştir. % 2 ve % 5 etanol ortamlarında spesifik bir değişim gözlenmemiştir.



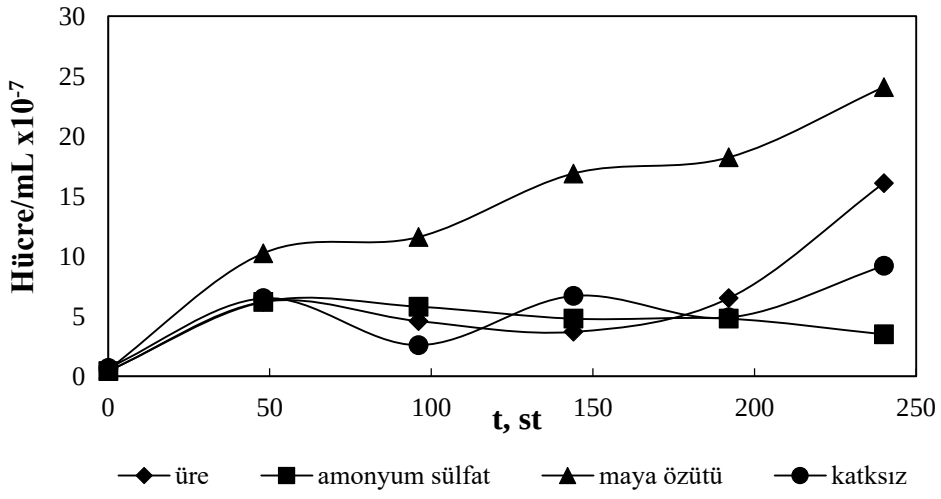
Şekil 4.28 Etanol derişiminin toplam fenol derişimine etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

4.4 Azot Kaynağı Etkisi

Rhodotorula glutinis'in çoğalması ile SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine ek azot kaynaklarının etkisi, hacmen % 50 ZK (TF=525 mg/L, indirgen şeker 10 mg/mL) içeren çoğalma ortamına azot kaynağı olarak 3 g/L maya özütü, 0.02 mol azot içeren amonyum sülfat ve üre içeren UYM ortam bileşimi eklenmiş ve azot katkısız ortamındaki çoğalma ile karşılaştırılmıştır. 240 saat süre ile gerçekleştirilen çoğalmalar için, hücre derişimi, ortam pH'ı, protein derişimi, spesifik SOD aktivitesi, spesifik KAT aktivitesi, indirgen şeker derişimi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimleri incelenmiştir.

4.4.1 Azot kaynaklarının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi

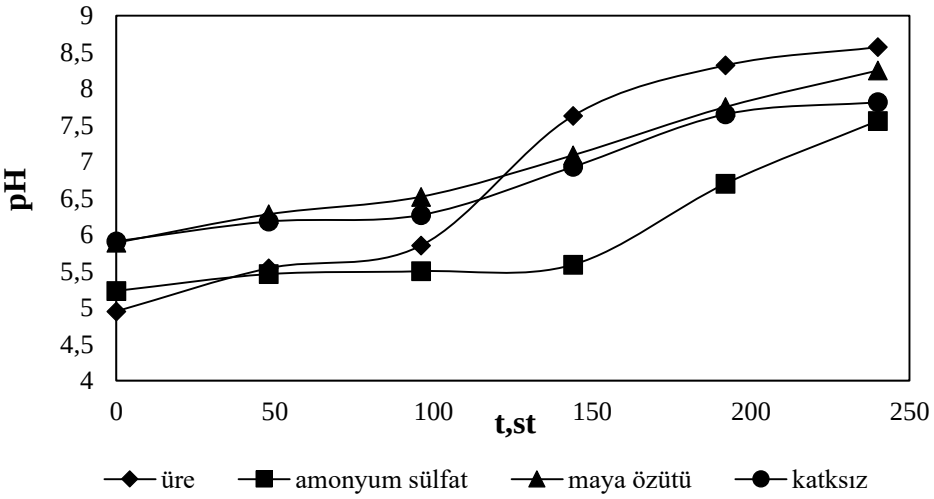
Ek azot kaynağı olarak 0.02 mol azot içeren amonyum sülfat, üre ve 3 g/L maya özütü içeren %50 ZK-UYM ortamlarında gerçekleştirilen çoğalmalarda hücre derişiminin zamanla değişimi şekil 4.29'de verilmiştir. Azot kaynağı katkısının yapılmadığı ortam ile karşılaştırıldığı zaman hücre çoğalmasında maya özütünün pozitif etkisi olduğu; amonyum sülfat ve ürenin ise önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Çalışılan koşullarda en yüksek *R. glutinis* derişimine maya özütünün eklendiği ortamında 240 st'de $24.1x10^7$ hücre/mL olarak ulaşılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda, UYM çoğalma ortamına eklenen azot kaynaklarının *R. glutinis* çoğalmasına olumlu etkileri olduğu ve en yüksek hücre derişimine amonyum sülfat eklenen ortamda ulaşıldığı belirlenmiştir (Ünlü ve Takaç 2012). % 25 zeytin karasuyu derişimindeki (TF=262.5 mg/L) diğer çalışmada ise üre eklenen ortamda *R. glutinis* çoğalmasının daha fazla olduğu gözlenmiştir (Karakaya vd. 2012). *R.glutinis'*in çoğalması üzerine azot kaynaklarının etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise en yüksek hücre derişimine maya özütünün eklendiği ortamda ulaşılmıştır (Latha vd. 2004).



Şekil 4.29 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında hücre çoğalması (T=30ºC, N=150 rpm)

4.4.2 Azot kaynaklarının ortam pH değerine etkisi

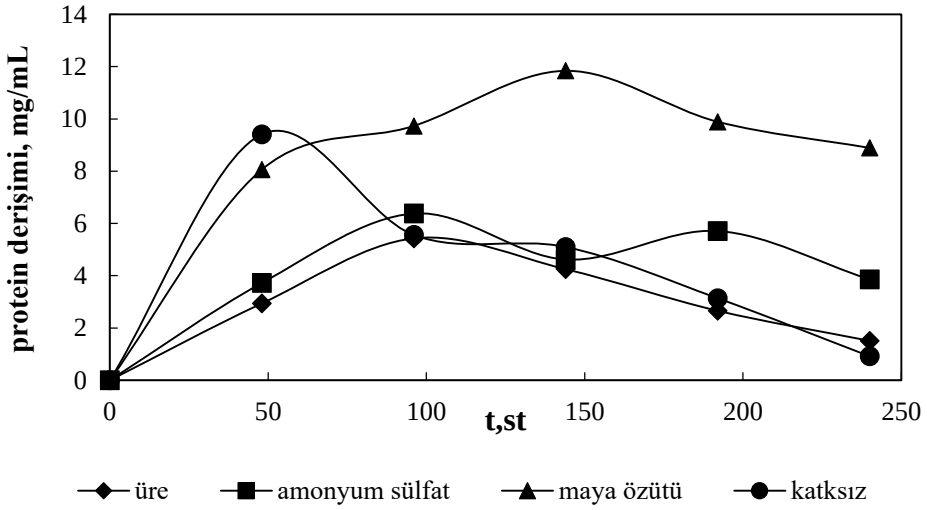
R. glutinis, zeytin karasuyu ortamında çoğalırken ortam pH artışı artmakta ve bu artış hücre çoğalmasının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Karakaya vd. 2012, 2014). Farklı azot kaynaklarının eklendiği bu çalışmada da %50 ZK-UYM ortamlarında *R.glutinis* hücreleri çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerlerini artırmışlar ve çoğalmanın az olduğu amonyum sülfat ortamındaki artış daha az olmuştur (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla pH değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.4.3 Azot kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi

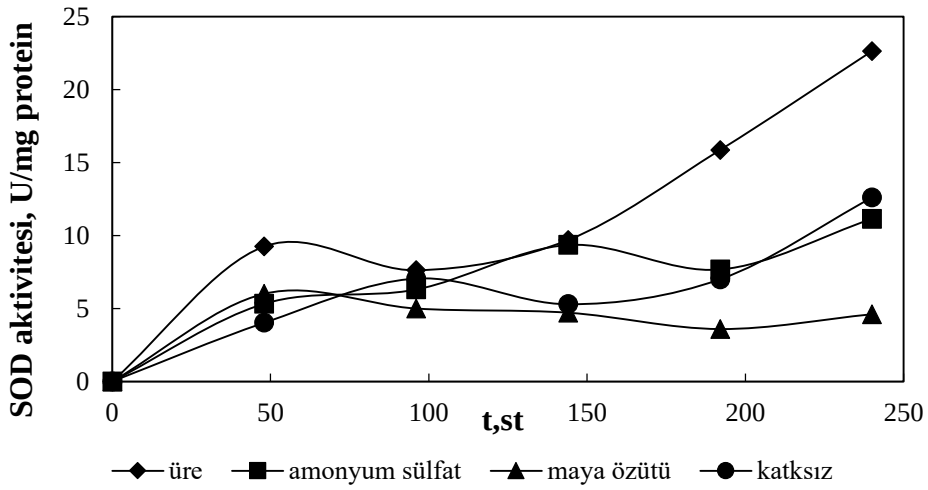
Farklı azot kaynaklarını içeren %50 ZK-UYM ortamlarında hücre içi protein derişimi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.31). En yüksek hücre içi protein derişimine 144 saat sonunda 11.84 mg/mL değeri ile maya özütünün eklendiği ortamda ulaşılmıştır.



Şekil 4.31 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla hücre içi protein derişimi değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.4.4 Azot kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi

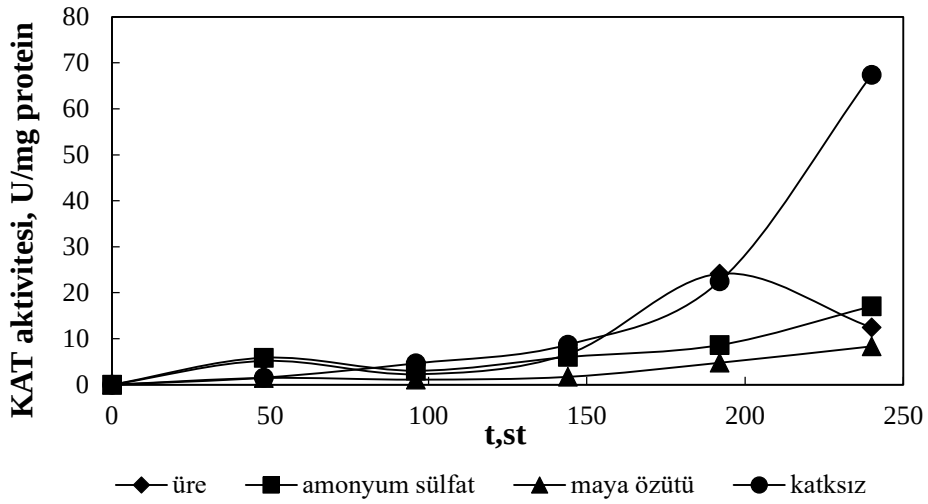
Farklı azot kaynakları içeren % 50 ZK-UYM ortamında, spesifik SOD aktivitesi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise önce sabit kalmış ve sonra tekrar yükselmiştir (Şekil 4.32). İleri saatlerde görülen ikinci artışın nedeni substratın tükenmesi ile hücreler için bir stres ortamının oluşması ve SOD aktivitesinin indüklenmesidir. En yüksek spesifik SOD aktivitesine 240 saat sonunda 22.64 U/mg protein değerine üre eklenen ortamda ulaşılmıştır. Maya özütü varlığında ise kontrol ortamına göre daha düşük SOD aktivitesi ölçülmüştür.



Şekil 4.32 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla spesifik SOD aktivitesi değişimi (T=30^{o}C, N=150rpm)

4.4.5 Azot kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi

Farklı azot kaynaklarını içeren % 50 ZK-UYM (h/h) ortamlarında spesifik KAT aktivitesi, başlangıçtaki artıştan sonra uzun bir süre sabit kalmış; sonra tekrar daha yüksek bir hızla artmaya başlamıştır (Şekil 4.33). İkinci artışın ortamda bulunan besin kaynaklarının tükenmesi nedeniyle hücrelerin kendi bünyesindeki karbon ve azot kaynaklarını kullanmaları ve böylece reaktif oksijen türleri oluşumundaki artış olarak belirtilmiştir (Ünlü ve Takaç 2012). 240 saat çoğalma sonunda en yüksek spesifik KAT aktivitesine 67.4 U/mg protein değeri ile ek azot kaynağının eklenmediği ortamında ulaşılmıştır. 240 saat çoğalma sonunda spesifik KAT aktiviteleri sırasıyla; katkısız (67.4 U/mg protein), amonyum sülfat (17.05 U/mg protein), üre (12.45 U/mg protein) ve maya özütünün (8.33 U/mg protein) eklendiği ortamda elde edilmiştir.

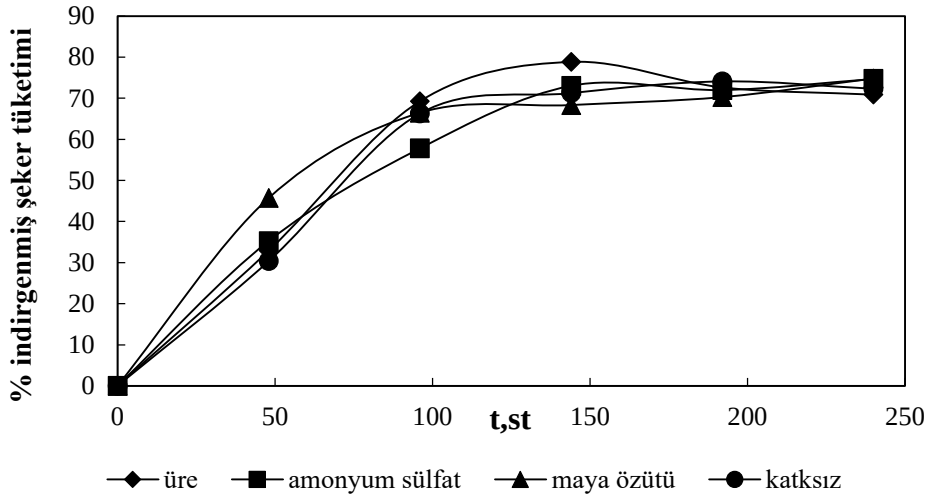


Şekil 4.33 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla spesifik KAT aktivitesinin değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

Elde edilen spesifik aktivite değerleri araştırma grubumuz tarafından UYM ortamında gerçekleştirilen çalışma ile karşılaştırılmıştır (Ünlü 2012). İlgili çalışmada en yüksek spesifik SOD ve KAT aktiviteleri amonyum sülfat ve üre eklenen ortamlarda ulaşılmıştır. UYM ortamında elde edilen en yüksek spesifik SOD aktivitesi 9.8 U/mg ve spesifik KAT aktivitesi 7.3 U/mg protein değeridir. Bu çalışmada, zeytin karasuyu ortamında elde edilen değerler bir önceki çalışmadan SOD enzimi için % 57, KAT enzimi için % 89 daha fazladır.

4.4.6 Azot kaynaklarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi

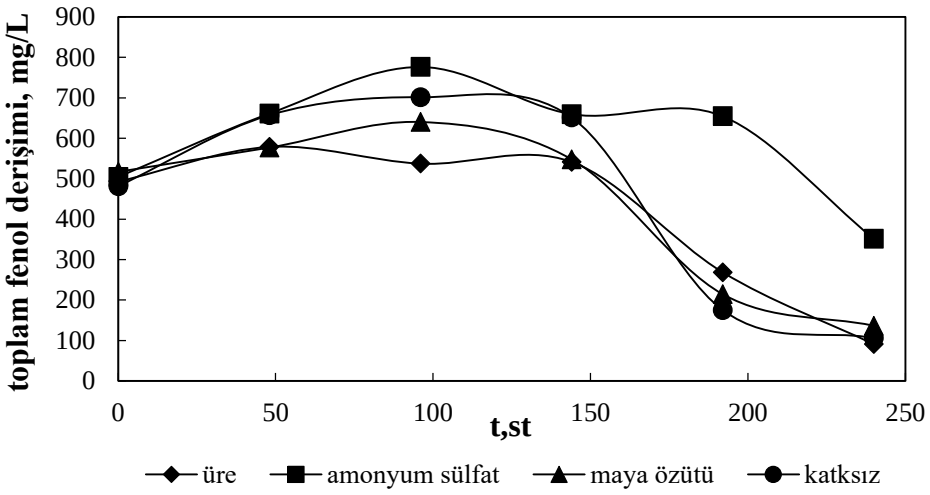
Farklı azot kaynaklarının varlığında ZK-UYM ortamlarında indirgenmiş şeker derişimi zamanla azalma göstermiş ve başlangıç ZK derişimine bağlı olarak farklı zamanlarda yaklaşık sabit değerlere gelmiştir. İndirgenmiş şeker tüketiminin zaman ile değişimi şekil 4.34'de verilmiştir. Tüm ek azot kaynakları varlığında 240 saat sonunda yaklaşık % 75 indirgen şeker tüketimi belirlenmiştir.



Şekil 4.34 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamında zamanla indirgenmiş şeker tüketiminin değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.4.7 Azot kaynaklarının toplam fenol derişimine etkisi

Farklı azot kaynaklarının varlığında, UYM-ZK ortamlarının her birinde toplam fenol derişimi zamanla önce artış, sonra azalma göstermektedir (Şekil 4.35). *R. glutinis* hücrelerinin glukoz ile ZK kaynaklı fenolik maddeler içeren ortamda çoğalırken karbon kaynağı olarak öncelikle glukozu tüketmesi ve sonrasında fenolik bileşenleri kullanması beklenmektedir. Toplam fenol derişiminin azalmaya başlama zamanı, glukoz tüketiminin yaklaşık tüketiminin sonlandığı zamana (144.saat) denk gelmektedir (Şekil 4.34). Ancak toplam fenol derişimi, başlangıç zamanlarında sabit kalmayıp artmaktadır. Bu artış, zeytin karasuyunun yapısında bulunan büyük molekül ağırlıklı oleoropeinin enzimatik olarak parçalanıp küçük molekül ağırlıklı ve toplam fenol derişim analizi ile tayin edilebilen fenolik maddelere dönüşmesi nedeniyledir.



Şekil 4.35 Farklı azot kaynakları (maya özütü, amonyum sülfat ve üre) içeren %50 ZK-UYM ortamının toplam fenol derişime etkisi (T=30 ºC, N=150 rpm)

4.5 Sıcaklık Etkisi

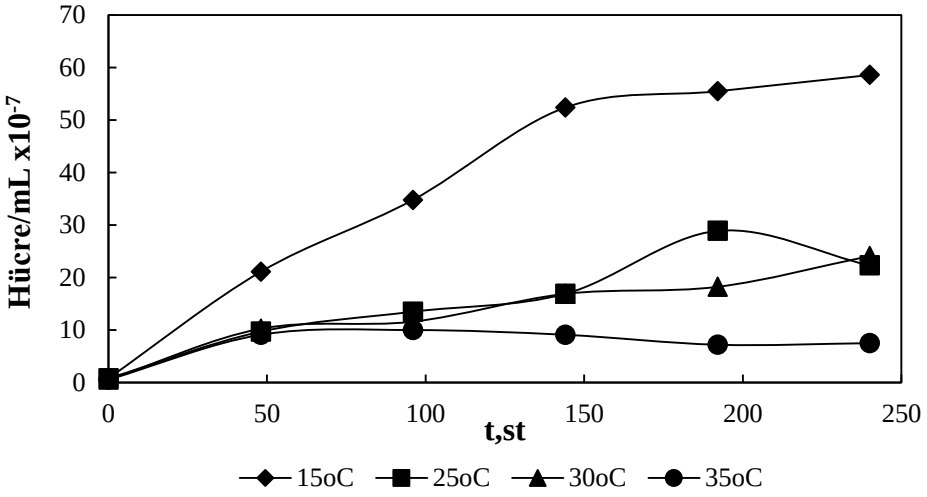
Rhodotorula glutinis'in çoğalması ve spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi % 50 ZK içeren UYM çoğalma ortamında 15, 25, 30 ve 35ºC sıcaklıklarda 240 saat süre ile incelenmiştir.

4.5.1 Sıcaklığın *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi

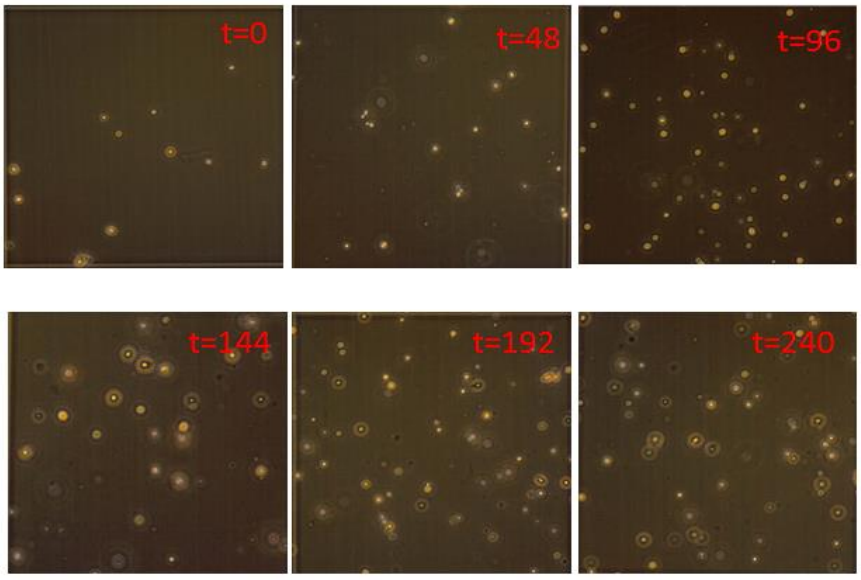
ZK-UYM ortamında 15, 25, 30 ve 35 ºC sıcaklıklarda gerçekleştirilen çoğalmalarda hücre derişiminin zamanla değişimi şekil 4.36'da verilmiştir. Hücre çoğalmasının 15 ºC da en yüksek olduğu ve artan sıcaklık ile çoğalma hızının azaldığı görülmüştür. En yüksek hücre derişimi 15ºC'de 240. saat sonunda $58.6x10^7$ hücre/mL olarak ölçülmüştür. Şekil 4.37'de 15ºC sıcaklıkta çoğalan *R. glutinis* hücrelerinin zaman ile değişim mikroskop görüntüleri yer almaktadır.

Çalışmada kullanılan ticari *R. glutinis* için UYM ortamında optimum çoğalma sıcaklığı 25ºC olarak verilmiştir (www.dsmz.de, 2015). Ancak, önceki çalışmalarda da *R. glutinis* hücrelerinin düşük sıcaklıklarda yüksek bir değerde çoğaldığı gözlenmiştir (Ünlü ve Takaç 2012). Bunun nedeni zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelerin

yarattığı strestir. Düşük sıcaklıkta enzimatik olarak parçalanamayan fenolik maddeler hücre üzerinde stres oluşturmakta ve bu stresin hücre çoğalma koşullarını değiştirmesinin 15ºC'nin en yüksek hücre derişimini sağlamasına ek bir neden olduğu düşünülmektedir. Latha vd. (2004) yaptıkları çalışmada *R. glutinis* hücrelerinin 15-37ºC arasında çoğalabildiğini ve 42ºC'de hücre çoğalmasının olmadığını bulmuşlardır. En yüksek kuru hücre miktarını 15ºC'de elde etmişlerdir.



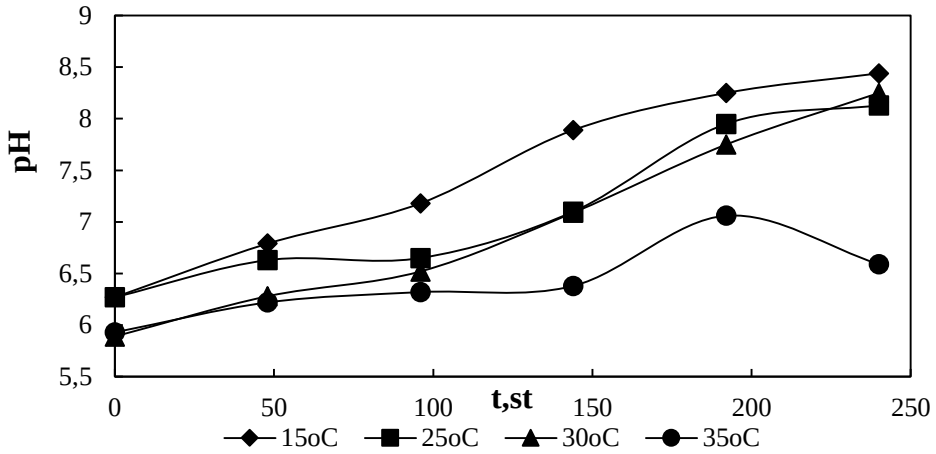
Şekil 4.36 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi (N=150 rpm)



Şekil 4.37 15ºC'de gerçekleştirilen hücre çoğalmasının zaman ile değişiminin mikroskop görüntüleri

4.5.2 Sıcaklığın ortam pH değerine etkisi

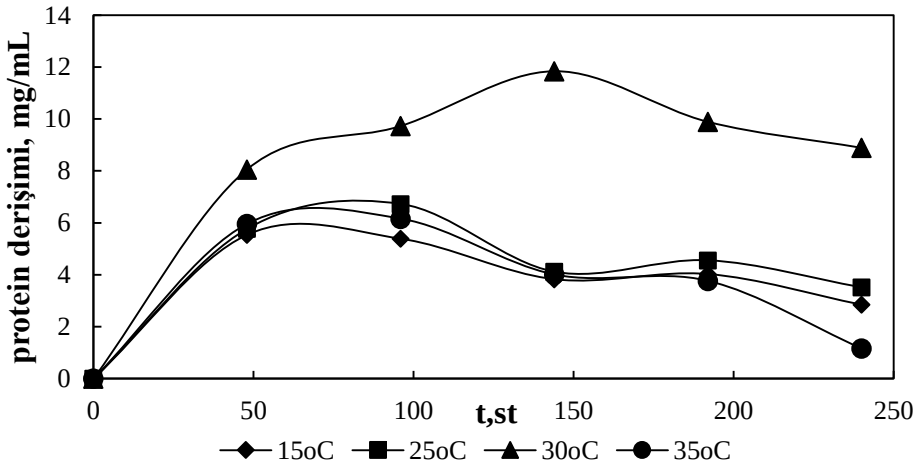
Farklı sıcaklıklardaki çoğalmalarda zaman ile ortam pH değerleri artırmıştır (Şekil 4.38). En yüksek pH değeri hücre çoğalmasının en fazla olduğu 15ºC'de gözlenmiştir.



Şekil 4.38 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)

4.5.3 Sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi

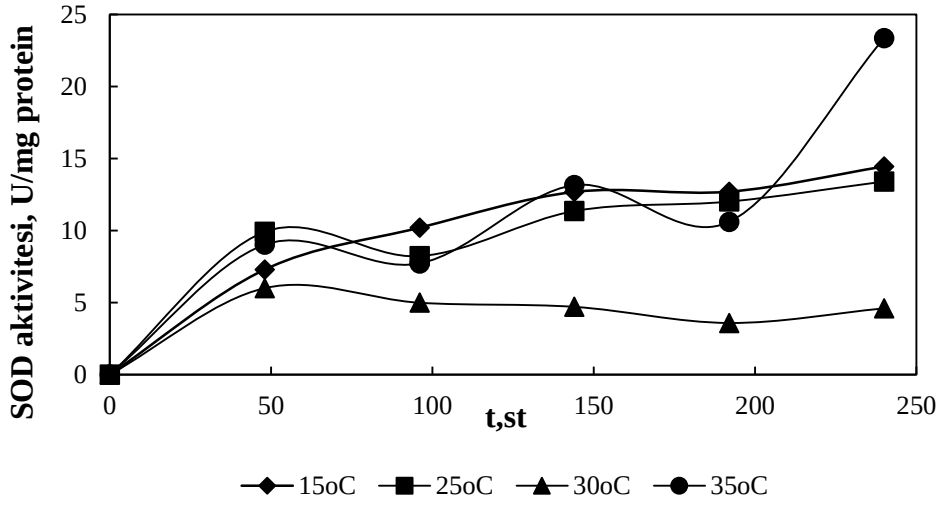
25, 30 ve 35ºC sıcaklıklarda, hücre içi protein değeri zamanla artmış ve yaklaşık 144.saatin sonunda azalmaya başlamıştır (Şekil 4.39). En yüksek hücre içi protein derişimine 30ºC sıcaklığında 8.89 mg/mL olarak ulaşılmıştır.



Şekil 4.39 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi (N=150 rpm)

4.5.4 Sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi

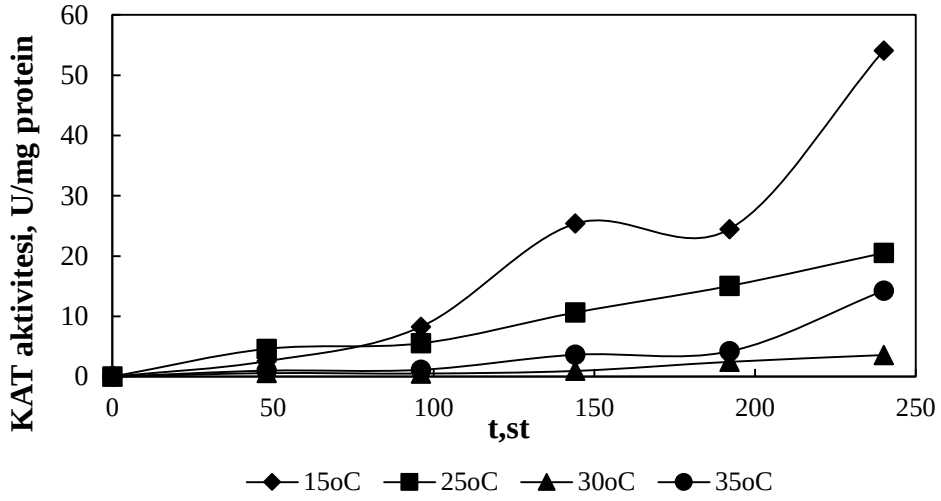
İncelenen tüm sıcaklıklarda, çoğalmanın ilk 48 saati boyunca spesifik SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu saatten sonra ise 15ºC sıcaklıkta enzim aktivitesi hızla artmaya devam etmiş; diğer sıcaklıklarda ise yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4.40). Denenen en yüksek sıcaklık olan 35ºC'de ise ilk 192 saat boyunca dalgalı bir artış sergilerken 240. saat sonunda en yüksek (23.37 U/mg protein) spesifik SOD aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.40 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi (N=150 rpm)

4.5.5 Sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi

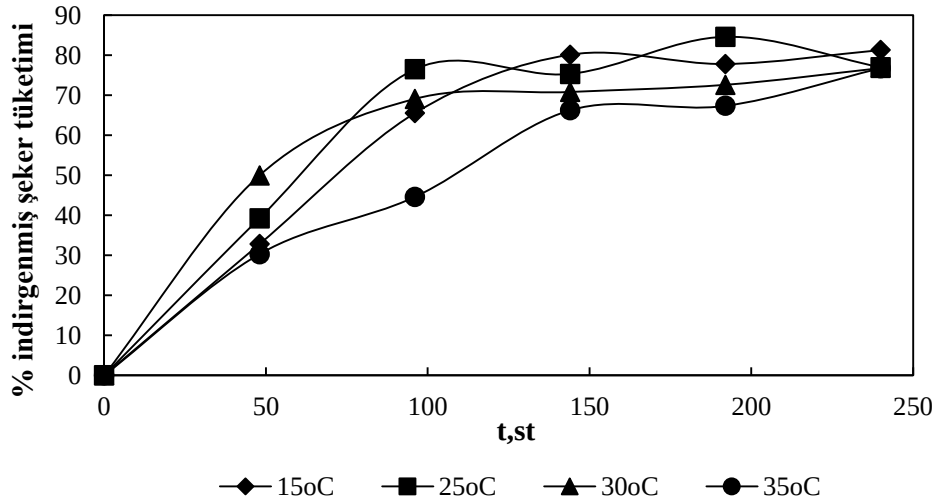
Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen çoğalmalarda, çoğalmanın ilk zamanlarında spesifik KAT aktivitesindeki artış az olmuş; yaklaşık 100-150 saat sonrasında KAT aktivitesi artmaya başlamış ve bu artış en fazla 15ºC'de gözlenmiştir (Şekil 4.41). 240 saat süren çoğalmada 15ºC'de ulaşılan spesifik KAT aktivitesi 54.07 U/mg protein'dir.



Şekil 4.41 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (N=150 rpm)

4.5.6 Sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi

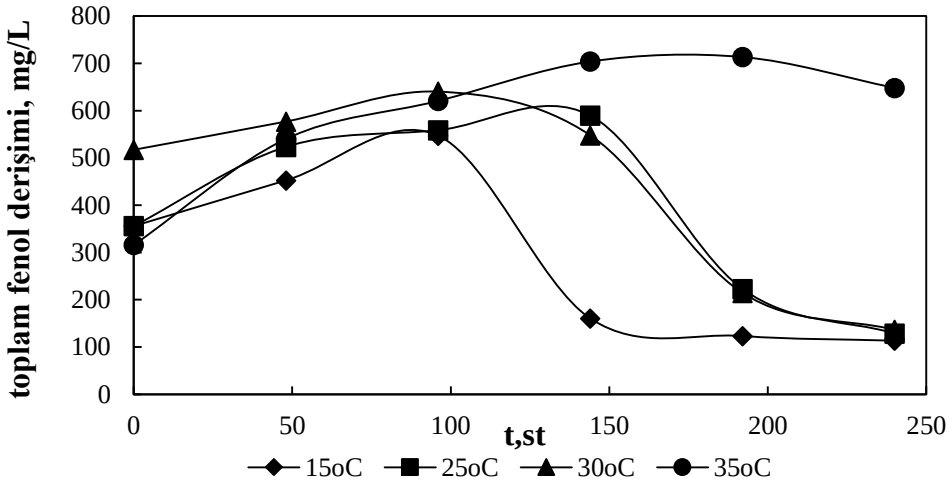
Farklı sıcaklıklarda çoğalan *R.glutinis* hücreleri zeytin karasuyunda bulunan glukozu farklı hızlar ile tüketmiştir. 15, 25 ve 30ºC sıcaklıklarda 35ºC'ye göre daha yüksek indirgen şeker kullanım hızı vardır (Şekil 4.42). İncelenen tüm sıcaklıklarla 240 st sonunda yaklaşık % 80 indirgen şeker kullanımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.42 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (N=150 rpm)

4.5.7 Sıcaklığın toplam fenol derişimine etkisi

R. glutinis farklı sıcaklıklardaki çoğalma ortamında, ortamdaki fenol derişimi zamanla önce biraz artmış sonra azalmıştır (Şekil 4.43) Düşük sıcaklıklarda bu düşüş daha erken saatlerde gözlemlenmektedir. Artışın nedeni, düşük sıcaklıkta oleorepeinin enzimatik parçalanmasının daha az olması ve doğrudan fenolik maddelerin tüketimine geçilmesi olarak değerlendirilmektedir. En yüksek çoğalma hızının da gözlendiği 15ºC'de 240 saat sonunda toplam fenol tüketimi %68 iken en yüksel fenol giderimi % 74 oranında 30ºC'de gerçekleşmiştir.



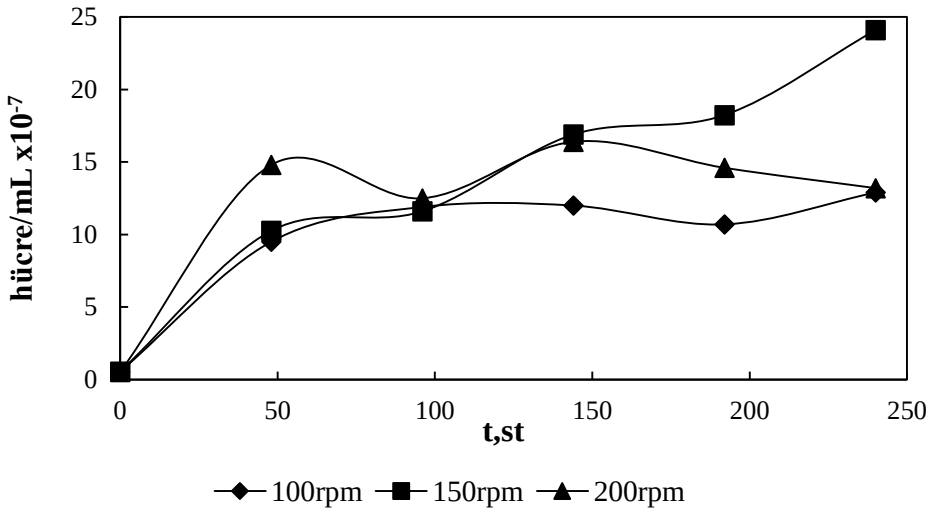
Şekil 4.43 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)

4.6 Karıştırma Hızı Etkisi

% 50 ZK-UYM (h/h) ortamında *Rhodotorula glutinis* çoğalması ile spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine karıştırma hızının etkisi 100, 150 ve 200 rpm değerlerinde incelenmiştir. Hücre derişimi, ortam pH değeri, protein derişimi, spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri, toplam fenol derişimi ve indirgen şeker derişiminin zamanla değişimleri izlenmiştir.

4.6.1 Karıştırma hızının *Rhodotorula glutinis* çoğalmasına etkisi

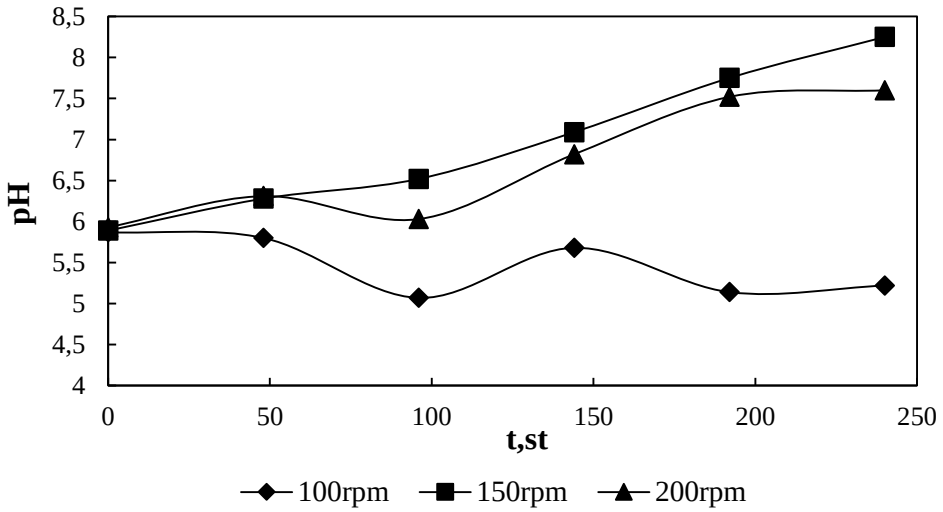
Şekil 4.44'de farklı karıştırma hızlarında zamanla hücre derişiminin değişimi yer almaktadır. En yüksek hücre derişimine 150 rpm'de ulaşılmış, en düşük derişim ise 100 rpm'de elde edilmiştir. Bu sonuçlar, düşük karıştırma hızında oksijen aktarım hızının da düşük olması, buna karşın yüksek karıştırma hızında hücreler üzerine stres yaratılması olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.44 Karıştırma hızının hücre çoğalmasına etkisi (T=30^{o}C)

4.6.2 Karıştırma hızının ortam pH değerine etkisi

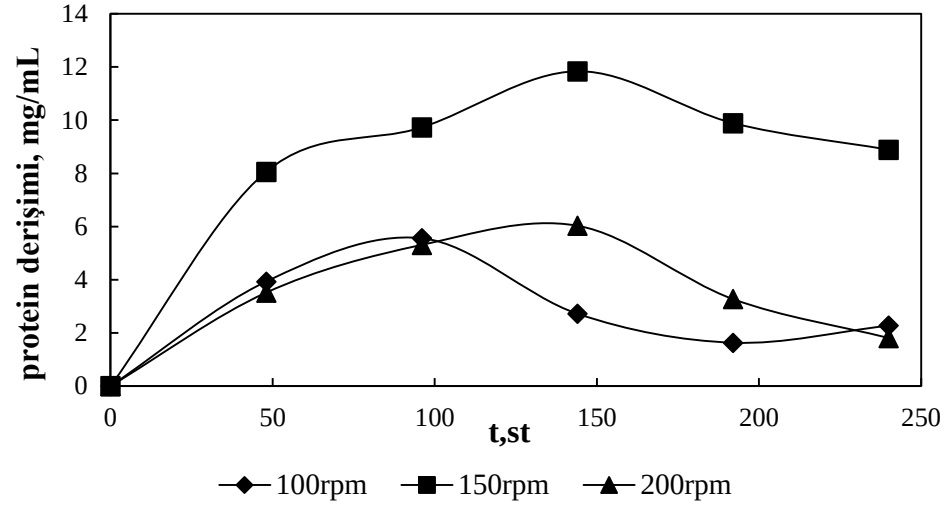
150 ve 200 rpm karıştırma hızlarında *R.glutinis* hücrelerinin çoğalmasına paralel olarak ortam pH'ı da zaman ile artırmışlardır (Şekil 4.45). Çoğalmanın az olduğu 100 rpm karıştırma hızında ise ortam pH'ının zaman ile azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.45 Farklı karıştırma hızlarında ortam pH ının zamala değişimi (T=30^{o}C)

4.6.3 Karıştırma hızının hücre içi protein derişimine etkisi

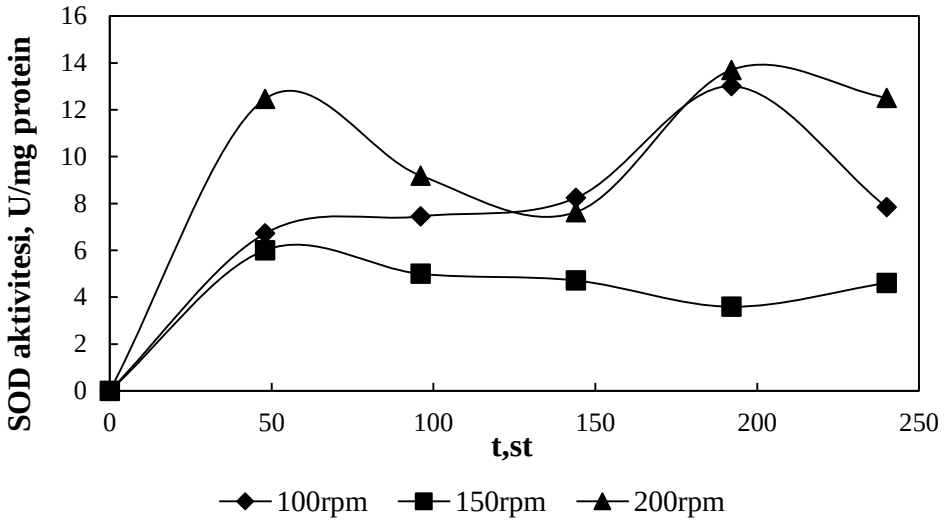
Çalışılan karıştırma hızlarında hücre içi protein derişimi, çoğalmanın başlarında zaman ile artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.46). En yüksek hücre içi protein derişimine 144.st sonunda 150 rpm'de (11.84 mg/mL) ulaşılmıştır.



Şekil 4.46 Farklı karıştırma hızlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C)

4.6.4 Karıştırma hızının spesifik SOD aktivitesine etkisi

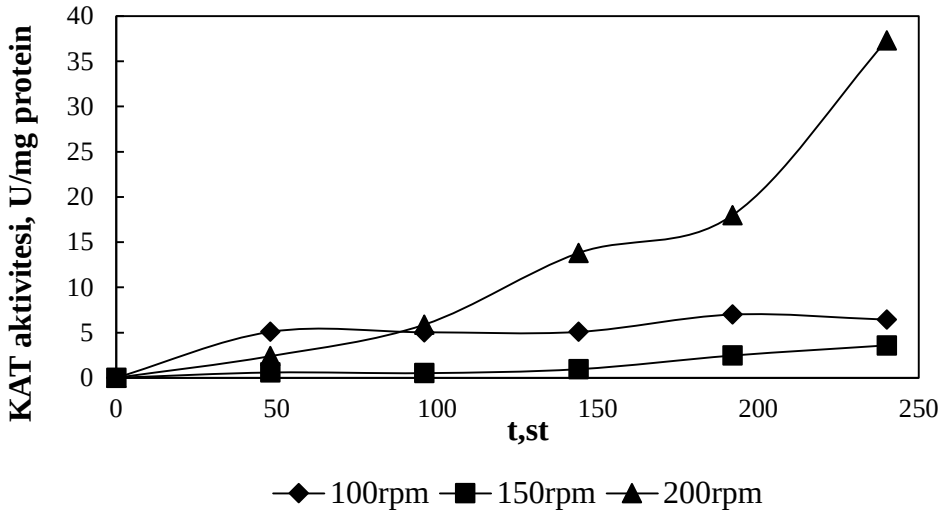
R. glutinis'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin (U/mg protein) farklı karıştırma hızlarında zamanla değişimi şekil 4.47'de verilmiştir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi değerinin (13.7 U/mg protein) 200 rpm karıştırma hızında 192. saatte elde edildiği görülmektedir. Çoğalmanın en yüksek olduğu 150 rpm'de ise SOD aktivitesi en azdır.



Şekil 4.47 Farklı karıştırma hızlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C)

4.6.5 Karıştırma hızının spesifik KAT aktivitesine etkisi

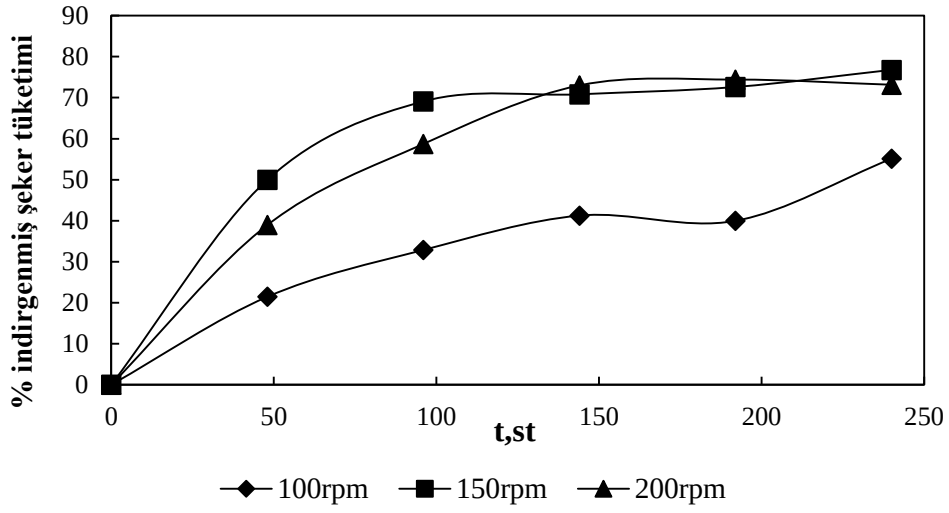
Farklı karıştırma hızlarında *R. glutinis*"in hücre içi spesifik katalaz aktivitesinin (U/mg protein) zamanla değişimi ise şekil 4.48'de verilmiştir. KAT aktivitesinde 100 rpm için 96.saate kadar bir artma olmuş ve sonrasında ise belirgin bir değişim gözlenmemiştir. 200 rpm için ise 48.saatten başlayarak 240.st sonuna kadar bir artış söz konusudur. En yüksek spesifik KAT aktiviteleri 240 saat sonunda sırasıyla 200 rpm (37.31 U/mg protein) > 100 rpm (6.43 U/mg protein) > 150 rpm (3.59 U/mg protein) şeklinde elde edilmiştir.



Şekil 4.48 Farklı karıştırma hızlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30^{o}C)

4.6.6 Karıştırma hızının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi

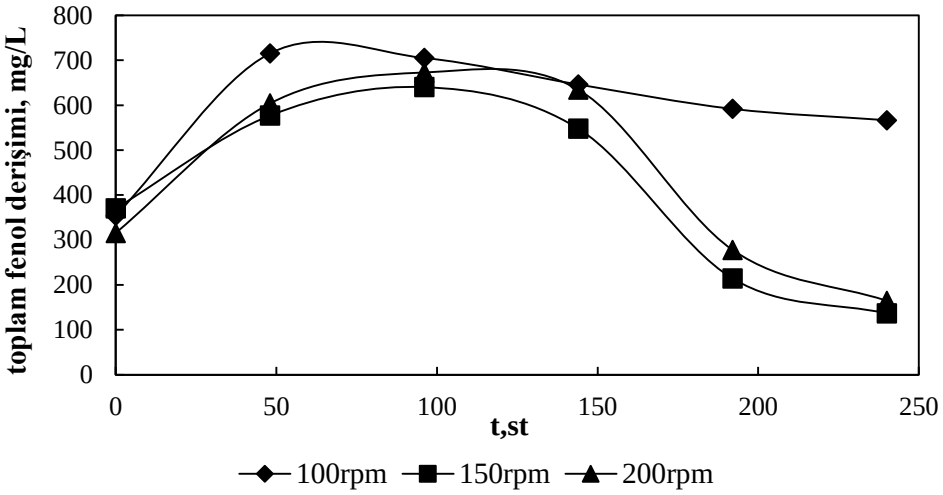
Çalışılan tüm karıştırma hızlarında indirgenmiş şeker tüketimi zamanla artış göstermiş ve yaklaşık 144. saat sonunda sabit değerlere gelmiştir (Şekil 4.49). 240.st sonunda 150 rpm (% 77) ve 200 rpm (% 73)'lik indirgenmiş şeker tüketimi en yüksek değerlere ulaşmıştır. Düşük karıştırma hızında ise 240 saat sonunda indirgen şeker tüketimi %55 oranında kalmıştır.



Şekil 4.49 Farklı karıştırma hızlarında indirgenmiş şeker tüketiminin zamanla değişimi (%) (T=30^{o}C)

4.6.7 Karıştırma hızının toplam fenol derişimine etkisi

Farklı karıştırma hızlarında zaman ile toplam fenol derişiminin değişimi şekil 4.50'de gösterilmiştir. İlk 48 saat üç karışma hızı toplam fenol derişimi üzerine benzer etki gösterse de 100 rpm karıştırma hızında 96.st sonrasında toplam fenol derişiminde önemli bir azalma gözlenmezken 150 ve 200 rpm karıştırma 144.st sonrasında fenol giderim miktarı artmaktadır. 240 saat çoğalma sonrasında en yüksek toplam fenol giderimi 150 rpm'de % 63 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.50 Farklı karıştırma hızlarında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C)

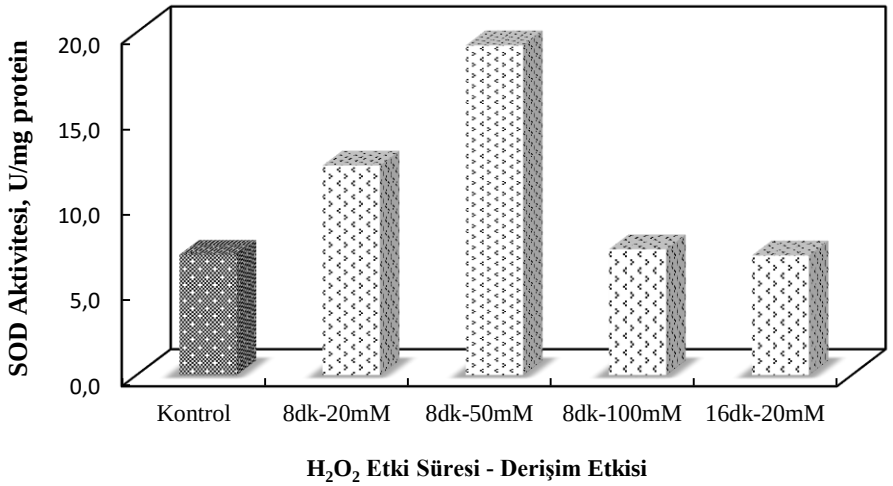
4.7 Stres Koşulları Etkisi

*Rhodotorula glutinis'i*n enzim aktiviteleri üzerine stres koşulları çoğalma ortamında oksidatif stres yaratılarak incelenmiştir. Dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Çalışmada, oksidatif stres olarak 48 saat süre ile % 50 ZK-UYM ortamında çoğalan hücrelere, farklı derişimlerde H_2O_2 farklı sürelerde etki ettirilerek ve ayrıca UV ışığı farklı sürelerde etki ettirilerek uygulanmıştır.

4.7.1 Oksidatif stres

H_2O_2 Etkisi

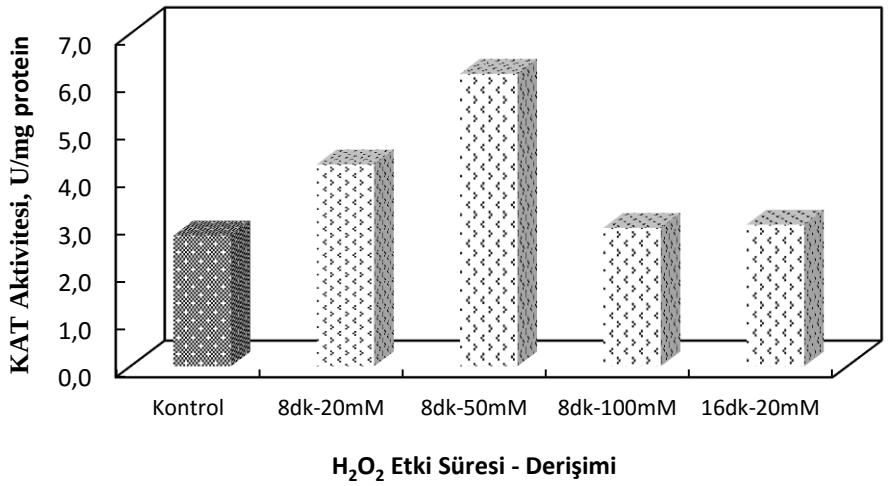
48 saat süreyle % 50 ZK-UYM (h/h) ortamında çoğalan hücrelere 20mM, 50mM ve 100mM derişimlerinde H_2O_2 8 dk süre ile, 20mM derişiminde H_2O_2 ise 16 dk süre ile eklenmiştir. H_2O_2'nin yarattığı oksidatif stresin SOD aktivitesi üzerine etkisi şekil 4.51'de verilmiştir. 20mM derişimindeki H_2O_2 8 dk süre ile uygulandığında kontrol ortamına göre spesifik SOD aktivitesini 1.74 kat artırmıştır.



Şekil 4.51 Farklı süre ve derişimlerdeki H_2O_2 oksidatif stresinin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ^oC, N=150 rpm)

H_2O_2 etkisinin spesifik KAT aktivitesi üzerine etkisi ise şekil 4.52'de verilmiştir. En yüksek aktiviteye 50mM derişimde H_2O_2 48 saat süre ile çoğaltılmış hücrelere 8 dk süre ile uygulandığında elde edilmiştir. Süre etkisi sonuçları incelendiğinde 20mM derişiminde H_2O_2, 16 dk süre uygulandığında 8 dk süre uygulanandığında elde edilen spesifik aktiviteye göre %30 oranında azalma meydana gelmiştir. Yüksek derişim ve sürelerde H_2O_2 uygulaması hem SOD ve hem de KAT enzim aktivitesi üzerinde negatif etkiye sebep olmuştur. Literatür ile karşılaştırılırsa, 8 dk süre uygulanan 50mM derişimindeki H_2O_2 ile elde edilen zeytin karasuyu ortmındaki spesifik KAT aktivitesi (6.16 U/mg protein), UYM ortamına (4.18 U/mg protein) göre daha yüksek sonuçlar vermiştir (Ünlü vd. 2012). Bunun nedeni karasuyundan gelen fenolik maddelerin

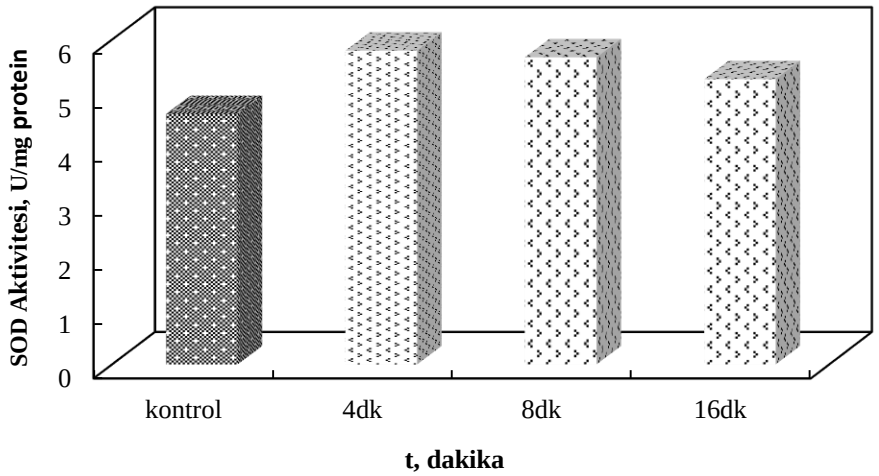
yarattığı strestir. Chen vd. (2015), H_2O_2'nin *R.glutinis'*in yaşayabilirliği ve ROS biriktirmesi üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada H_2O_2 etkisinin zaman ve doza bağlı olarak hücrelerin yaşayabilirliğini azalttığı ve kontrole göre daha fazla ROS birikimine neden olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.52 Farklı süreler ve derişimlerdeki H_2O_2'in hücrelerin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

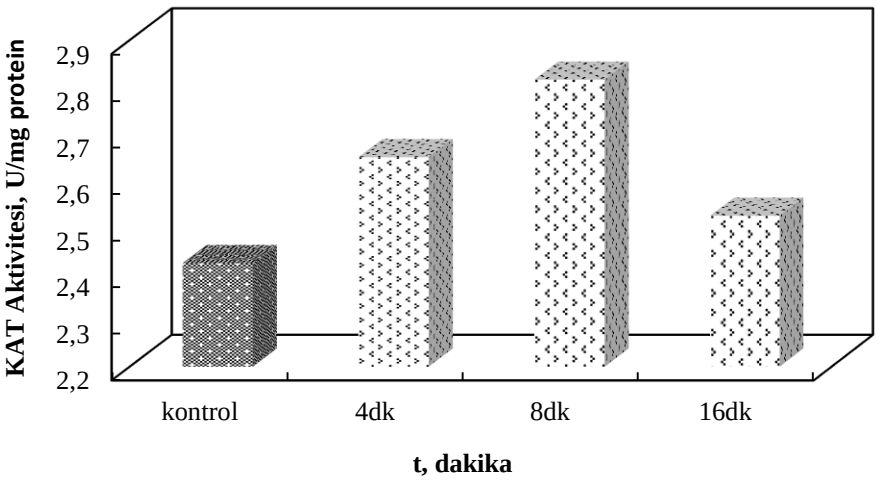
UV Işık Etkisi

Enzim aktivitelerine UV ışık etkisi çoğalmanın 48. saatindeki örneklere 4, 8 ve 16dk süreler ile uygulanmıştır (Şekil 4.53). Spesifik SOD aktivitesi, uygulanan sürelerde kontrol ortamına göre daha yüksek değerler göstermiştir; ancak uygulama süresinin belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 4.53 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın hücrelerin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 ^{o}C, N=150 rpm)

Uygulanan stres koşullarında, en yüksek spesifik KAT aktivitesi (2.82 U/mg protein) UV ışığın 8 dk süre uygulandığı durumda elde edilmiştir. Bu koşulda kontrol ortamına göre aktivitede 1.16 kat artış olmuştur (Şekil 4.54). Hücreler 16 dk süre ile UV ışığına maruz bırakıldığında ise aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* hücrelerine 24 saat çoğalma sonunda uygulanan UV ışık etkisi spesifik KAT aktivitesini 4 ve 8 dk süre ile uygulandığında arttırmış, 16 dk uygulandığında ise kontrol ortamına göre azaltmıştır (Ünlü 2012).

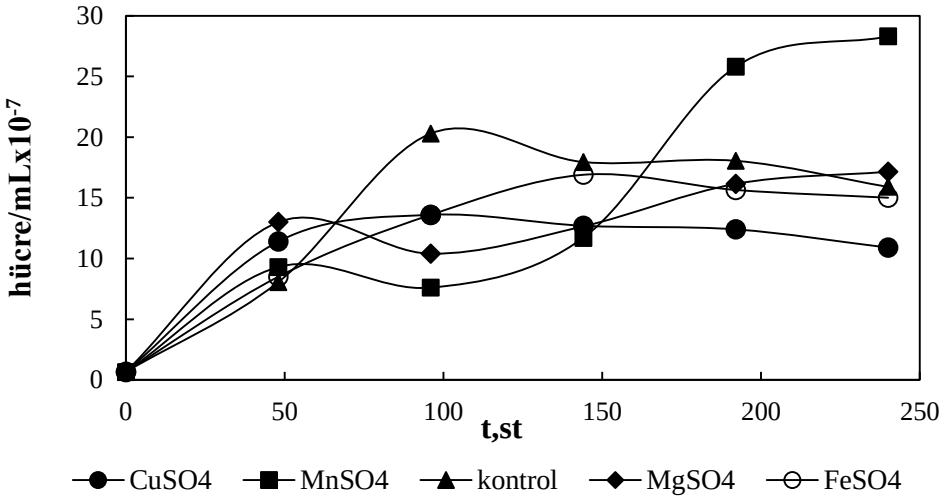


Şekil 4.54 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

4.7.2 Metal iyonları etkisi

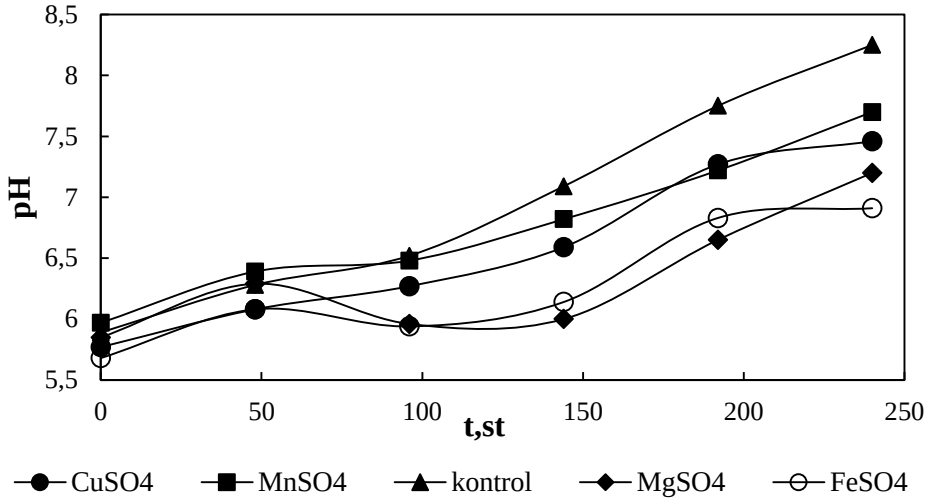
Metal iyonları aktivatör veya inhibitör etki göstererek hücre çoğalması sırasında enzim aktivitesini değiştiren önemli bileşenlerdir. Bu çalışmada. *R. glutinis*'den antioksidan enzimlerin üretimi üzerine metal iyonu etkisini denemek üzere çoğalma ortamına 0.05 M derişiminde $CuSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$ ve $FeSO_4$ ayrı ayrı eklenmiştir. Bu tuzlar UV ışık altında 2 saat sterillendikten sonra steril % 50 ZK-UYM (h/h) ortamlarına katılmıştır. Kontrol olarak herhangi bir metal iyonu eklenmeyen ortam kullanılmıştır.

Farklı metal iyonlarının varlığında gerçekleştirilen çoğalmalarda zamanla *R. glutinis* derişimindeki değişim şekil 4.55'de verilmiştir. 240 saat sonunda en yüksek hücre derişimine $28.3x10^7$ hücre/mL değeri ile Mn^{+2} iyonu eklenen ortamda ulaşılmıştır. En düşük hücre derişimi ise Cu^{+2} iyonu eklenen ortamda ölçülmüştür.



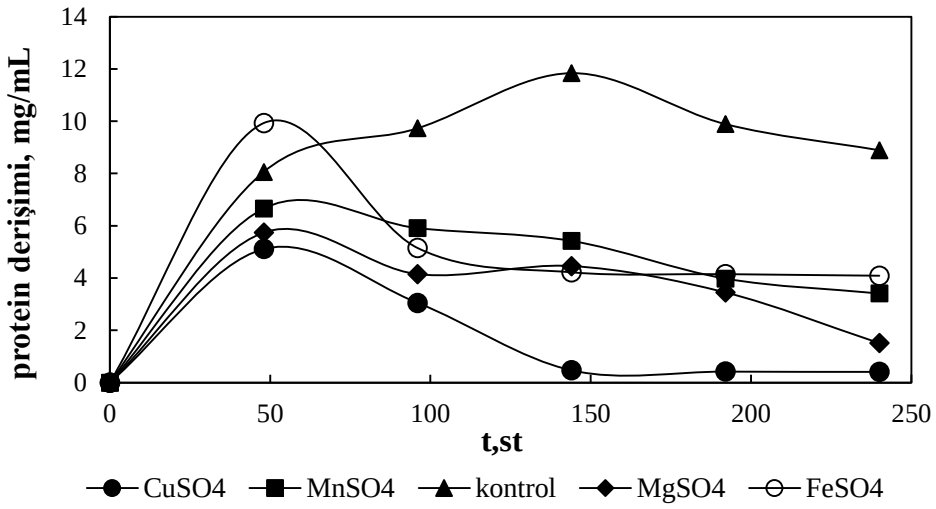
Şekil 4.55 Farklı metal iyonlarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

Metal iyonlarının eklenmesi sonucu bütün ortamlarda pH artışı gözlenmiştir; ancak pH değerleri metal iyonu eklenmeyen kontrol ortamına göre daha düşüktür (Şekil 4.56).



Şekil 4.56 Farklı metal iyonlarının ortam pH değişimine etkisi (T=30ºC, N=150 rpm)

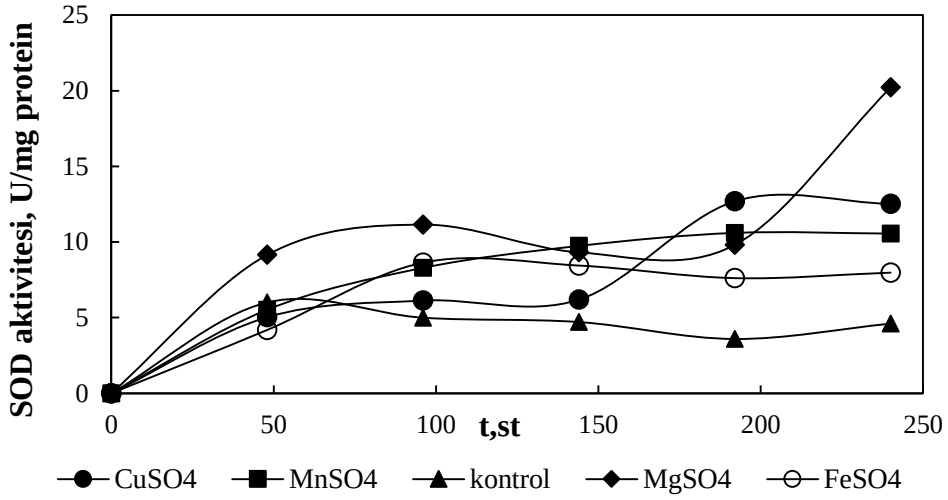
Metal iyonları eklenen ortamlarda zaman ile hücre içi protein derişimi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.57). Hücre içi protein derişimine en yüksek değerine 144 saat çoğalma sonunda kontrol ortamında ve en düşük değerine Cu^{+2} iyonu eklenen ortamda ulaşılmıştır.



Şekil 4.57 Farklı metal iyonlarının hücre içi protein derişimi değişimine etkisi (T=30ºC, N=150 rpm)

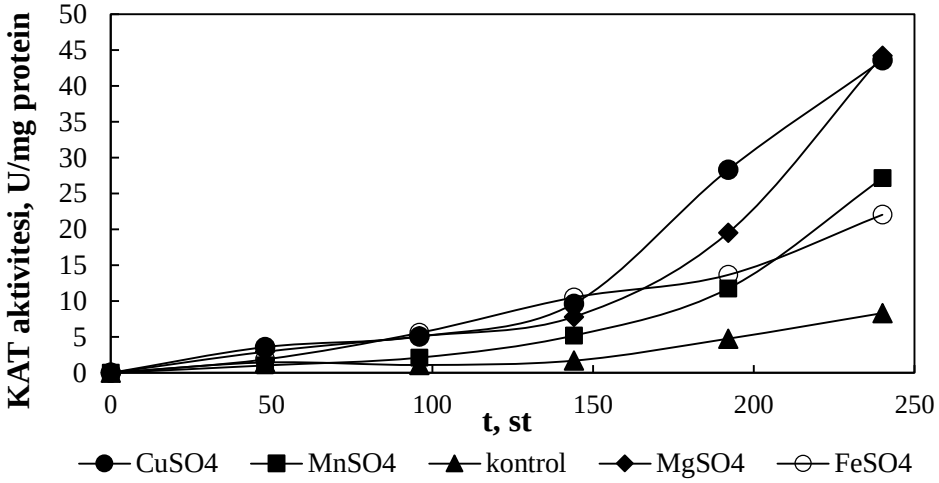
Farklı metal iyonları ile 240 saat süre gerçekleştirilen çoğalma boyunca spesifik SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir(Şekil 4.58). En yüksek spesifik SOD aktivitesine 20.21

U/mg protein değeri ile Mg^{+2} iyonu eklenen ortamda ulaşılmıştır ve bunu sırasıyla Cu^{+2}. Mn^{+2}. Fe^{+2} ve kontrol ortamı izlemektedir. Eklenen metal iyonlarının hepsinin kontrol ortamından daha yüksek değerler göstererek beklenen sonuca ulaşılmıştır. Metal iyonlarının *Escherichia coli* hücrelerinde SOD aktivitesi üzerine etkisini inceleyen Zhu vd. (2013) Luria-Bertani (LB) ortamına 5mM derişiminde Mn^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}, Na^{+}, Al^{+3}, Zn^{+2}, $Co^{+2,}$ Fe^{+3}, Cd^{+2}, Cu^{+2}, Ni^{+2}, Fe^{+2} iyonlarını eklemiştir. Mn^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}, Na^{+} ve Al^{+3} iyonları SOD aktivitesini artırırken Mn^{+2} SOD üretimi üzerinde en etkili iyon olmuştur.



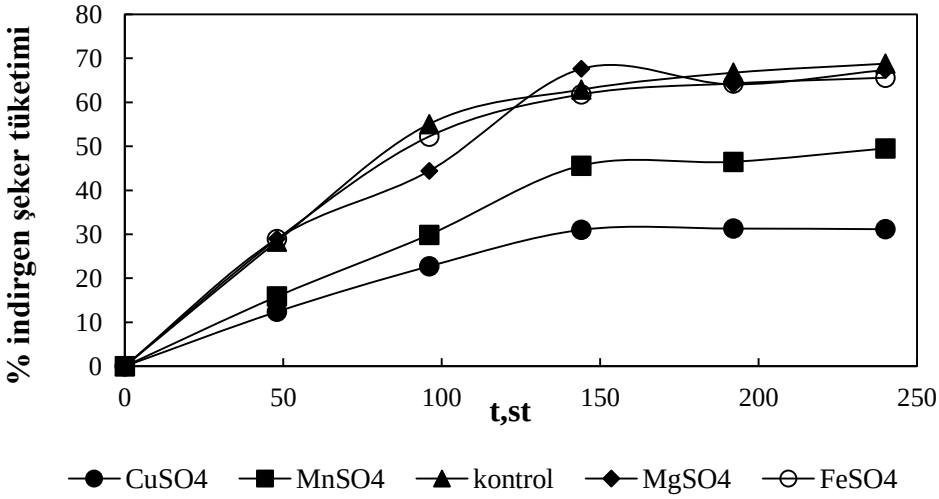
Şekil 4.58 Farklı metal iyonlarının spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimine etkisi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

Farklı metal iyonları ile gerçekleştirilen çoğalmaların ilk zamanlarında spesifik KAT aktivitesindeki artış az olmuş; yaklaşık 100-150 saat sonrasında KAT aktivitesi hızla artmaya başlamış ve bu artış en fazla Mg^{+2} ve Cu^{+2} iyonları eklenen ortamlarda gözlenmiştir (Şekil 4.59). 240 saat süren çoğalmada ulaşılan spesifik KAT aktivitesi Mg^{+2} iyonu varlığında 44.21 U/mg protein ve Cu^{+2} iyonu varlığında ise 43.59 U/mg protein'dir. Ag^{+} gibi toksik olan ağır metaller dışındaki metal iyonlarının yarattığı stres katalaz aktivitesini artırmaktadır (Atli vd. 2006). Demir klorür ($FeCl_3$), bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$), nikel klorür ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), kalsiyum klorür ($CaCl_2 \cdot 5H_2O$), magnezyum klorür ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve mangan klorür ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) kullanılan bir çalışmada, Ni^{+2} (1mM, %132.6), Ca^{2+} (1mM, %130) , Mg^{2+} (1.5mM, %137) ve Mn^{2+} (1.5 mM, %115) iyonları katalaz aktivitesi artmıştır (Kandukuri vd. 2012).



Şekil 4.59 Farklı metal iyonlarının spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimine etkisi (T=30ºC, N=150 rpm)

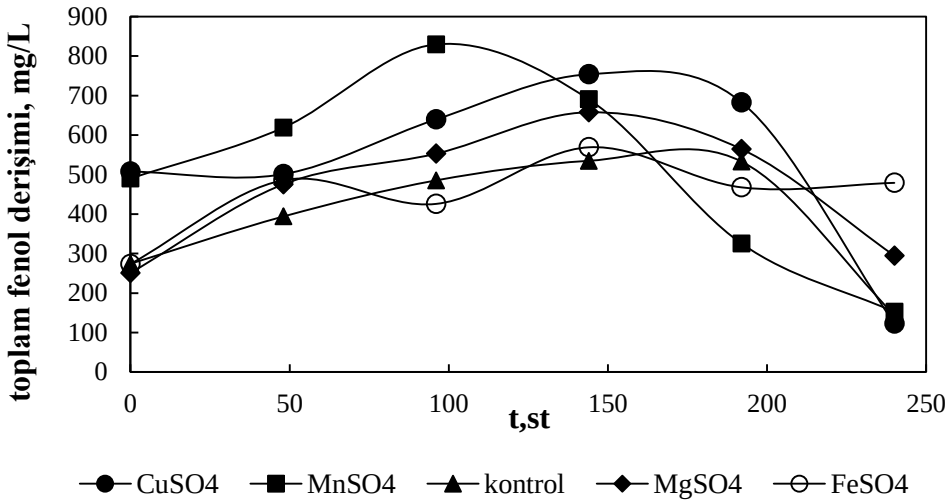
Farklı metal iyonlarının varlığındaki çoğalmalarda ortamlardan farklı zamanlarda alınan örneklerde indirgen şeker tayini yapılmış ve indirgen şeker tüketimi şekil 4.60'da verilmiştir. Mg^{+2} ve Fe^{+2} iyonları eklenen ortamlar ile kontrol ortamında 240 st sonunda yaklaşık %70, Mn^{+2} iyonu eklenen ortamda %50 ve Cu^{+2} iyonu eklenen ortamda %30 civarında indirgen şeker kullanımı ölçülmüştür.



Şekil 4.60 Farklı metal iyonlarının indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (T=30ºC, N=150rpm)

.

R. glutinis çoğalma ortamına eklenen tüm metal iyonlarının varlığında ortamdaki fenol derişimi zamanla önce artmış sonra azalmıştır (Şekil 4.61). En yüksek fenol giderimi 240 saat sonunda %69 ile Mn^{+2} ve %76 oranında Cu^{+2} içeren ortamlarda gerçekleşmiştir.

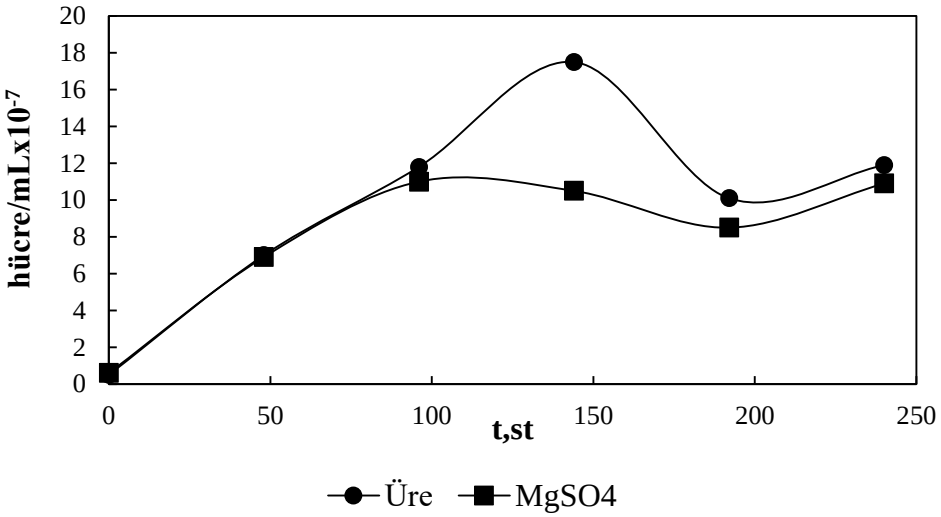


Şekil 4.61 Farklı metal iyonlarının toplam fenol derişiminin zamanla değişimine etkisi (T=30ºC, N=150 rpm)

4.8 En İyi Koşullarda Üretim

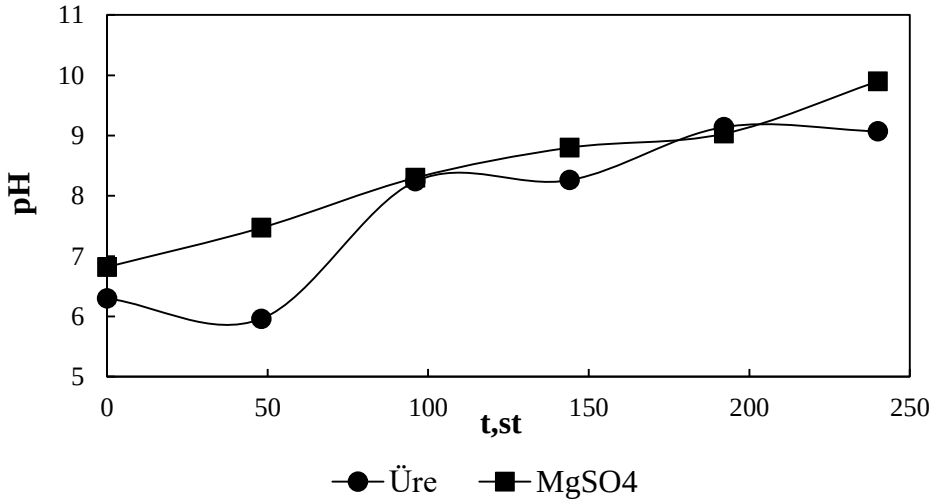
Çalışmada yapılan her bir deney setinde elde edilen en yüksek değerler incelendiği zaman hacimce %50 zeytin karasuyu derişiminde 30ºC'de 150rpm de yapılan üretimlerde *i)* ek karbon kaynağı eklenmeyen ancak ek azot kaynağı olarak üre eklenen ortamda (Üre) ve *ii)* üre içeren ortama ayrıca Mg^{+2} metal iyonunda eklendiği ortamda ($MgSO_4$) yüksek enzim aktiviteleri elde edildiği için bu ortamlar en üretim ortamları olduğu belirlenmiştir.

%50 ZK- UYM (h/h) ortamında en iyi koşullarda üretilen *R. glutinis*'in hücre derişiminin zamanla değişimi şekil 4.62'de verilmiştir. Çalışılan koşullarda en yüksek *R. glutinis* derişimine üre eklenen ortamda 144. saat sonunda 17.5 $x10^7$ hücre/mL olarak ulaşılmıştır.



Şekil 4.62 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

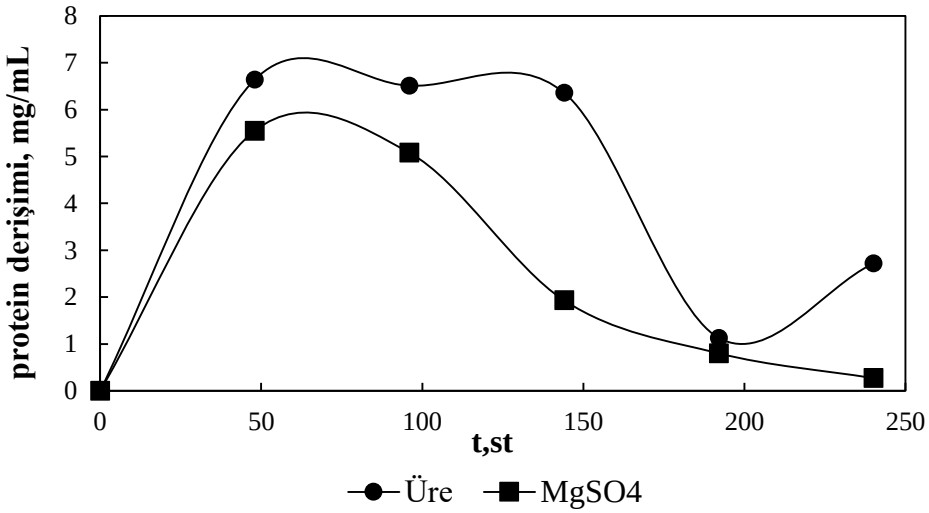
En iyi koşullarda üretilen *R.glutinis* hücreleri, çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerlerini de artırmışlardır (Şekil 4.63).



Şekil 4.63 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30^{o}C, N=150 rpm)

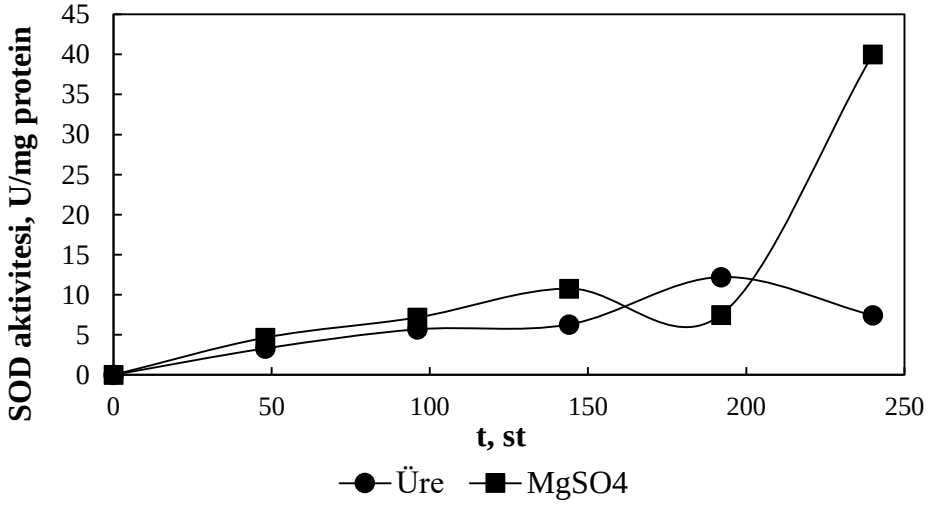
En iyi koşullarda gerçekleştirilen deneylerde zaman ile hücre içi protein derişimi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme

gözlenmiştir (Şekil 4.64). En yüksek hücre içi protein derişimine 48 saat çoğalma sonunda 6.64 mg/mL değeriyle üre eklenen ortamda ulaşılmıştır.



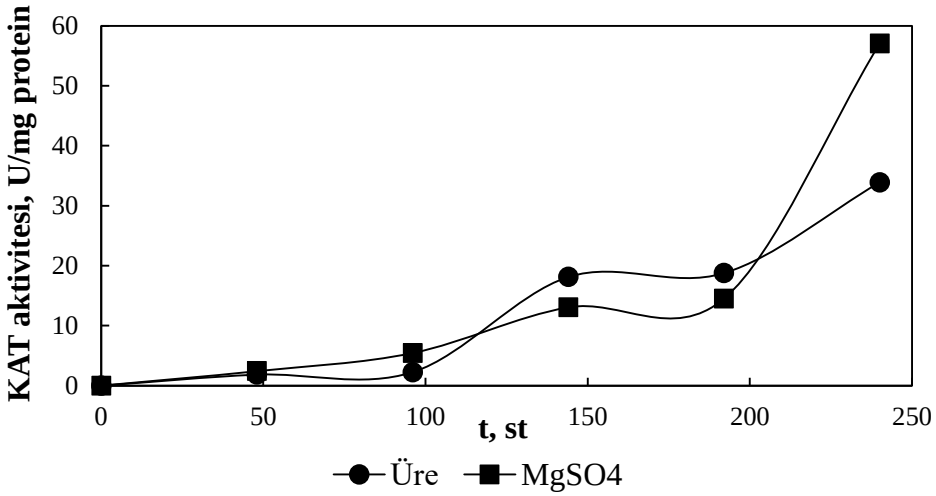
Şekil 4.64 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

En iyi koşullarda üretimin gerçekleştirildiği ortamlarda zaman ile spesifik SOD aktivitesinde 240 saat boyunca belirgin bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.65). En yüksek spesifik SOD aktivitesine 240 saat sonunda 40 U/mg protein değerine Üre+$MgSO_4$ eklenen ortamda ulaşılmıştır.



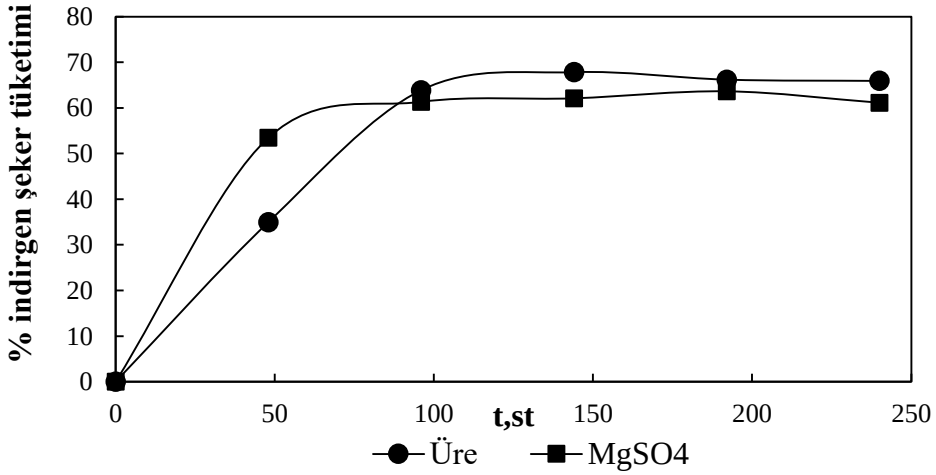
Şekil 4.65 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

En iyi koşullarda üretim gerçekleşen ortamların her ikisinde de spesifik KAT aktivitesi, 96.saatten sonra hızlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.66). 240 saat çoğalma sonunda Üre+$MgSO_4$ eklenen ortamda 57.04 U/mg protein spesifik KAT aktivitesine ulaşılmıştır.



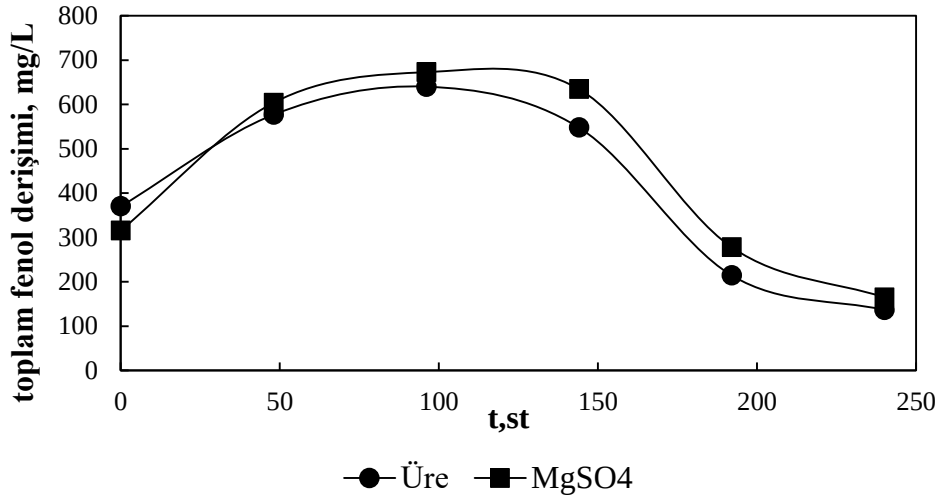
Şekil 4.66 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30ºC, N=150 rpm)

Şekil 4.67'de en iyi koşullarda gerçekleştirilen üretimler sonucundaki % indirgen şeker tüketiminin zamanla değişimi gösterilmektedir. Hem üre hem de Üre+$MgSO_4$ eklenen ortamda yaklaşık %65 oranında indirgen şeker tüketimi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.67 En iyi koşullarda yapılan üretimlerde indirgenmiş şeker tüketimi (T=30ºC, N=150 rpm)

En iyi koşullarda üretilen ortamlarda toplam fenol derişiminin zamanla değişimi Şekil 4.68'de yer almaktadır. Her iki ortam için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.68 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 ºC, N=150 rpm)

5. SONUÇ

Bu yüksek lisans çalışmasında, ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* mayasının zeytin karasuyu (ZK) ortamında antioksidan özellikteki süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzimlerini yüksek aktivitede üretecek şekilde çoğaltılması amaçlanmıştır. Zeytin karasuyunun zor bileşiminde hücrelerin çoğalabilmesi için UYM (Universal Yeast Medium) besi ortamı bileşiminden de yararlanılmıştır. *R. glutinis* hücreleri ZK ortamında çoğalırken hücre derişimi ile pH birbirine paralel olarak artmaktadır. Aktiviteler üzerine farklı parametrelerin etkisinin incelendiği kesikli üretimler 240 st sürdürülmüş ve zaman ile hücre derişimi, pH, protein miktarı, spesifik SOD aktivitesi, spesifik KAT aktivitesi, indirgen şeker tüketimi ve fenol gideriminin değişimleri incelenmiştir.

Zeytin karasuyunun yapısında birçok fenolik ve organik bileşen bulunmaktadır. Organik bileşenler çoğalmayı desteklerken, fenolik bileşenler inhibisyon etkisi yapmaktadırlar. Yüksek zeytin karasuyu derişimlerindeki üretimde hem *R. glutinis* hücrelerinin çoğalma süreleri uzamış hem de çoğalan hücre sayısı azalmıştır. Zeytin karasuyu derişiminin etkisi incelendiği deney setinde en yüksek spesifik SOD aktivitesi 6.37 U/mg protein ve en yüksek spesifik KAT aktivitesi 9.5 U/mg protein değerleri % 100 ZK-UYM (TF=1050 mg/L) ortamında elde edilmiştir. Ancak %100 ZK-UYM derişimde gerçekleştirilen çalışmalarda hücre çoğalmasının uzun sürmesi ve enzim aktivitelerinin de %50 ZK-UYM ortamına yakın olması nedeniyle sonraki çalışmalar için en uygun ZK derişimi olarak % 50 ZK (TF=787.5 mg/L) seçilmiştir.

Zeytin karasuyu bileşiminde hücrelerin çoğalmada kullanacağı karbon kaynağı (glukoz) olmasına karşın, ortamı desteklemek amacıyla ZK-UYM ortamında ek karbon kaynakları olarak glukoz, sorbitol, gliserol ve etanolün etkisi incelenmiştir. En yüksek hücre derişimine glukoz eklenen ortamda ulaşılmıştır. Gliserol, glukoz ve sorbitol eklenen ortamlar spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri için etkili bir kaynak olamamışlardır. En yüksek spesifik SOD aktivitesi (14 U/mg protein) % 1 (h/h) etanol eklenen ortamda ve en yüksek spesifik KAT aktivitesi de (25.35 U/mg protein) ek karbon kaynağı eklenmeyen ortamda ulaşılmıştır. En yüksek indirgen şeker tüketimi

hücre çoğalması ile uyumlu olarak sırasıyla glukoz (% 74.8) > katkısız ortam> sorbitol > gliserol > etanol (% 30) eklenen ortam şeklindedir. Fruktoz, glukoz, laktoz, arabinoz, maltoz ve bütün monosakkaritler indirgen şeker özelliği göstermektedir. Bu yüzden de en yüksek tüketim glukoz ve katkısız ortamlarda (zeytin karasuyundan gelen glukoz varlığında) görünmektedir. En yüksek fenol giderimi ise katkısız (% 78.4), etanol (%73) ve glukoz (% 72) eklenen ortamlarda gerçekleşmiştir.

Ek karbon kaynağı olarak eklenen etanolün spesifik SOD ve KAT enzim aktivitelerinde yüksek değerler göstermesinden dolayı çoğalma ortamında farklı derişimlerinin de etkisi incelenmiştir. Etanol içeren ortamlarda kontrol ortamına göre hücre daha düşük hızda çoğalmıştır; % 2 ve % 5 etanol eklenen ortamlarda zamanla pH'ın başlangıç değerine göre düşmesi hücre çoğalmasındaki negatif etkisini göstermektedir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi (14 U/mg protein) % 1 (h/h) etanol eklenen ortamda ve en yüksek spesifik KAT aktivitesi (25.35 U/mg protein) katkısız ortamda ulaşılmıştır. %5-10 etanol derişiminde DNS metodunu etkilediği ve glukoz miktarında artma olarak pozitif hata verdiği bu sebeple indirgen şeker tüketimi en yüksek %5 etanol eklenen ortamda % 89.9 oranında gözükmektedir. En yüksek fenol giderimi ise katkısız ortamda (% 78.4) gerçekleşmiştir.

Hücre çoğalması için gerekli bir diğer kaynak da azot kaynağıdır. ZK-UYM içeren çoğalma ortamına azot kaynağı olarak maya özütü, amonyum sülfat ve ürenin eklendiği çalışmada en yüksek hücre derişimine maya özütünün eklendiği ortamında, en yüksek spesifik SOD aktivitesine (22.64 U/mg protein) üre eklenen ortamda ve en yüksek spesifik KAT aktivitesine ise hiçbir katkı maddesinin eklenmeği (67.4 U/mg protein) ve sonrasında da üre içeren ortamda (24.14 U/mg protein) ulaşılmıştır. İndirgen şeker kullanımı ise tüm ortamlarda %70 üzerinde sağlanmıştır. En yüksek fenol giderimi üre (% 82) ortamlarda gerçekleşmiştir.

Sıcaklık, hücre çoğalması ve enzim aktivitelerini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Çalışmada en yüksek hücre derişimine 15 ^{o}C'da ulaşılmıştır. Spesifik SOD aktivitesi en yüksek değerine (23.37 U/mg protein) 35 ^{o}C; spesifik KAT aktivitesi ise (54.08 U/mg protein) 15 ^{o}C'de ulaşmıştır. İndirgen şeker kullanım yüzdesi ise bütün

ortamlarda % 75 üzerinde sağlanmıştır. Zeytin karasuyundan gelen fenolik maddelerin düşük sıcaklıkta enzimatik olarak parçalanamamasından dolayı hücre üzerinde stres oluşturmakta ve bu stres nedeniyle hücre çoğalma koşullarını değiştirebilmektedir. En yüksek fenol giderimi 30^{o}C sıcaklığında (% 74) gerçekleşmiştir.

Karıştırma hızı etkisinin incelendiği deneylerde ise en yüksek hücre derişimine 150 rpm karıştırma hızında, en yüksek spesifik SOD aktivitesine (13.7 U/mg protein) ve spesifik KAT aktivitesine (37.5 U/mg protein) 200 rpm karıştırma hızında ulaşılmıştır. İndirgen şeker kullanım yüzdesi ise çoğalma sonunda 150 ve 200 rpm hızlarında % 75 üzerinde iken 100 rpm karıştırma hızında %55'de kalmıştır. En yüksek fenol giderimi 150 rpm karıştırma hızında (% 63) gerçekleşmiştir.

Stres koşullarının etkisinin incelendiği çalışmalarda hem oksidatif stres kaynağı olarak H_2O_2 ve UV ışık hem de metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. 48 saat süre ile çoğaltılmış hücrelere uygulanan H_2O_2'nin süre ve derişim etkisi incelenmiştir. Spesifik SOD aktivitesi, 20mM derişimindeki H_2O_2 8 dk süre ile uygulandığında kontrol ortamına göre aktiviteyi 1.74 kat artırmıştır. En yüksek spesifik SOD aktivitesi (19.25 U/mg protein) ve en yüksek spesifik KAT aktivitesi (6.16 U/mg protein) 50mM derişimde H_2O_2 8 dk süre ile uygulandığında elde edilmiştir.

UV ışık etkisi 48 saat çoğaltılmış hücrelere 4, 8 ve 16 dk süre ile uygulanmıştır. UV ışık spesifik SOD aktivitesi üzerinde kontrol ortamıyla karşılaştırıldığında belirgin bir etkisi olmamıştır. En yüksek spesifik KAT aktivitesi (2.82 U/mg protein), UV ışığa 8 dk süre maruz kaldığında elde edilmiştir.

Farklı metal iyonlarının varlığında gerçekleştirilen deney setinde, en yüksek hücre derişimine ($28.3x10^7$ hücre/mL) Mn^{+2} iyonu eklenen ortamda ulaşılmıştır. En yüksek spesifik SOD aktivitesine (20.21 U/mg protein) ve spesifik KAT aktivitesine (44.21 U/mg protein) Mg^{+2} iyonunun eklendiği ortamlarda ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol ortamı ile karşılaştırıldığında eklenen metal iyonunlarının hepsi spesifik SOD ve KAT enzim aktivitesini artırmıştır. En yüksek indirgen şeker tüketimi Mn^{+2} iyonu (% 70) ve fenol giderimi Cu^{+2} iyonu (% 76) eklenen ortamda gerçekleşmiştir.

Çalışmanın sonunda en iyi koşulları belirlemek için incelenen parametrelerde en yüksek değerleri gösteren etkiler birlikte denenmiştir. % 50 zeytin karasuyu derişiminde 30^{o}C'de 150 rpm'de yapılan çoğalmalarda *i)* ek karbon kaynağı eklenmeyen ancak ek azot kaynağı olarak üre eklenen ortam ve *ii)* üre içeren ortama Mg^{+2} metal iyonu eklenen ortam kullanılmıştır. En yüksek spesifik SOD aktivitesine (40 U/mg protein) ve spesifik KAT aktivitesine (57.04 U/mg protein) Üre+Mg^{+2} iyonu eklenen ortamda ulaşılmıştır. İncelenen iki ortamda da indirgen şeker tüketimi yaklaşık %65 oranında ve fenol giderimi %63 oranında gerçekleşmiştir.

Tüm yapılan deneyler sonucu elde edilen en yüksek hücre derişimi ($58.6x10^{7}$ hücre/mL) sıcaklık etkisinin incelendiği ortamda 15^{o}C'de elde edilmiştir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi 40 U/mg protein (10.8 U/mL) olarak üre ve Mg^{+2} iyonunun birlikte eklendiği ortamda ve en yüksek spesifik KAT aktivitesi 67 U/mg protein (62 U/mL) olarak ek azot kaynağının bulunmadığı ortamda elde edilmiştir. İndirgen şeker tüketimi en yüksek ek karbon kaynağının eklenmediği ortamda (% 85) olurken en yüksek fenol giderimi %82 ile ek azot kaynağı olarak üre eklenen ortamda gerçekleşmiştir. Bu değerleri aynı maya ve çoğalma koşullarında UYM ortamı ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında spesifik SOD aktivitesi % 83 oranında ve spesifik KAT aktivitesi %84 oranında artmıştır.

Her yıl Akdeniz ülkelerinde zeytinyağı üretimi esnasında tonlarca atık olarak çıkan zeytin karasuyunun mikrobiyal olarak arıtılırken yüksek aktivitede süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri üretebildiği bu yüksek lisans çalışması ile gösterilmiştir. SOD ve KAT enzimleri, hem birim fiyatı yüksek olan hem de endüstiyel açıdan önemli enzimlerdir. Özellikle gıda endüstrisinde ve farmasötik sanayinde kullanılırlar. İleride yapılacak çalışmalar için, enzim üretim koşuları için optimum değerler geliştirilmesi ve eşanlı üretilen enzimlerin saflaştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymology, 105, 121–125.

Aksu, Z. and Eren, A.T. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochemical engineering journal, 35(2), 107-113.

Andreozzi, R., Longo, G., Majone, M. and Modesti, G. 1998. Integrated treatment of olive oil mill effluents (OME): study of ozonation coupled with anaerobic digestion. Water Research, 32(8), 2357-2364.

Anonymous. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statics Division. Web Sitesi: http://faostat3.fao.org/browse/Q/QD/E. Erişim tarihi: 13.11.2015.

Anonymous. 2015. Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Web Sitesi: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-70398.html. Erişim tarihi: 15.04.2015

Aouidi, F., Gannoun, H., Othman, N.B., Ayed, L. and Hamdi, M. 2009. Improvement of fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus paracasei* by cheese whey's addition. Process Biochemistry, 44(5), 597-601.

Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. and Canli, M. 2006. Response of catalase activity to Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 143(2), 218-224.

Ayed, L., Asass, N., Sayadi, S. and Hamdi, M. 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by geotrichum candidum. Letters in Applied Microbiology, 40(1), 7-11.

Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F. and Ozer, A. 2004. A review of waste management options in olive oil production. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34(3), 209-247.

Bozkoyunlu, G. and Takaç, S. 2014. Parameters and kinetics of olive mill wastewater dephenolization by immobilized *Rhodotorula glutinis* cells. Environmental technology, 35(24), 3074-3081.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principleof protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E.F. and Righelato, R.C. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and

complexity of the effect. European journal of applied microbiology and biotechnology, 11(3), 151-155.

Chen, J., Li, B., Qin, G. and Tian, S. 2015. Mechanism of H_2O_2 induced oxidative stress regulating viability and biocontrol ability of *Rhodotorula glutinis*. International journal of food microbiology, 193, 152-158.

Crognale, S., D'Annibale, A., Federici, F., Fenice, M., Quaratino, D. and Petruccioli, M. 2006. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81(9), 1547-1555.

D'Annibale, A., Giovannozzi Sermanni, G., Federici, F. and Petruccioli, M. 2006. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. Biores Technol, 97, 1828–1833.

Dai, C.C., Tao, J., Xie, F., Dai, J.J. and Zhao, M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. African Journal of Biotechnology, 6(18), 2130-2134.

Dermeche, S., Nadour, M., Larrocheb, C., Moulti-Matia, F. and Michaudb, P. 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. Process Biochemistry, 48, 1532–1552.

Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R. and Licha, M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. Bioresource Technology, 100(1), 356-361.

El-Missiry, M.A. 2012. Antioxidant Enzyme. InTech, 410, Rijeka, Croatia.

Eroğlu, E., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. and Eroğlu, İ. 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. International Journal of Hydrogen Energy, 29(2), 163-171.

Gonçalves, C., Oliveira, F., Pereira, C. and Belo, I. 2012. Fed-batch fermentation of olive mill wastewaters for lipase production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87(8), 1215–1218.

Hernández-Almanza, A., Montanez, J.C., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar, C.N. 2014. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience, 5, 64-72.

Kandukuri, S.S., Noor, A., Ranjini, S.S. and Vijayalakshmi, M.A. 2012. Purification and characterization of catalase from sprouted black gram (*Vigna mungo*) seeds. Journal of Chromatography B, 889, 50-54.

Karakaya, A., Laleli,Y. and Takaç, S. 2012. Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. International Biodeterioration & Biodegradation, 75, 75- 82.

Karakaya, A., Bozkoyunlu, G., Laleli,Y. and Takaç, S. 2014. Development of pH-adjustment based operational strategy to increase total phenol removal rate in biodegradation of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis.* Desalination and Water Treatment, 52(37-39), 7277-7281.

Khayati, G. and Alizadeh, S. 2013. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. Fluid Phase Equilibria, 353, 132-134.

Koleva, D.I., Petrova, V.Y. and Kujumdzieva, A.V. 2008. Improved production by fed-batch cultivation and some properties of Cu/Zn-superoxide dismutase fromthe fungal strain *Humicola lutea* 103. Canadian Journal of Microbiology, 54, 957-963.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. and Guerzoni, M. E. 2005. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. Bioresource Technology, 96(3), 317-322.

Latha, B.V., Jeevaratnam, K., Murali, H.S. and Manja, K.S. 2005. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. Indian Journal of Biotechnology, 4(4), 353-357.

Malisorn, C. and Suntornsuk, W. 2008. Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Bioresource Technology, 99(7), 2281-2287.

Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenientassay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47, 469-474.

Masghouni, M. and Hassairi, M. 2000. Energy applications of olive-oil industry by-products:—I. The exhaust foot cake. Biomass and Bioenergy, 18(3), 257-262.

MatÉs, J.M., Pérez-Gómez, C. and De Castro, I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical biochemistry, 32(8), 595-603.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426-428.

Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A. and Russell, N.J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. Applied Microbiology and Biotechnology, 82(1), 25-39.

Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P. 2006. Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey (2. Basım). Elsevier, 498, Italy.

Numan, N.Z. and Ford, J.C. 2015. Effect of ethyl alcohol on the dinitrosalicylic acid assay for reducing sugars. Research & Reviews: Journal of Chemistry, 4(3), 31-34.

Orozco, M.R., Hernández-Saavedra, N.Y., Valle, F.A., González, B.A. and Ochoa, J.L. 1998. Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. Journal of marine biotechnology, 6, 255-259.

Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2008. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. Bioresource Technology, 99(7), 2419-2428.

Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnology Letters, 14(5), 397-402.

Rubio, M.C., Runco, R. and Navarro, A.R. 2002. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry, 61(6), 605-609.

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T.T. and Bourtoom, T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46(1), 210-218.

Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 86(11), 1439-1448.

Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Hetrick, M. and Pham, P. 2013. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. Energy, 61, 34-43.

Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochemistry, 40(7), 2551-2557.

Thomas, D.S. and Rose, A.H. 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Archives of Microbiology, 122(1), 49-55.

Ünlü. A.E. 2012. Farklı Stress Koşullarında *Rhodoturula glutinis*'ten Antioksidan Enzim Üretimi İçin Biyoproses Koşullarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Ünlü, A.E. and Takaç, S. 2012. Investigation of the simultaneous production of superoxide dismutase and catalase enzymes from *Rhodotorula glutinis* under different culture conditions. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 40, 338–344.

Tsekova, K. and Todorova, D. 2002. Copper (II) accumulation and superoxide dismutase activity during growth of *Aspergillus niger* B-77. Zeitschrift für Naturforschung C, 57(3-4), 319-322.

Wang, Z.S., Gu, Y.X. and Yuan, Q.S. 2006. Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. Current microbiology, 52(1), 74-79.

Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource technology, 99(13), 5923-5927.

Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V. and Pirozzi, D. 2010. Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. J. Agric. Food Chem., 58, 8630-8635.

Zbakh, H. and El Abbassi, A. 2012. Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. Journal of functional foods, 4(1), 53-65.

Zhang, Z., Zhang, X. and Tan, T. 2014. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. Bioresource technology, 157, 149-153.

Zhu, H., Liu, J., Qu, J., Gao, X., Pan, T., Cui, Z., Zhao, X. and Lu, J. R. 2013. Stress fermentation strategies for the production of hyperthermostable superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27: effects of ions. Extremophiles, 17(6), 995-1002.

Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C. and Zhou, Z. 2016. Antioxidant activity of citrus fruits. Food Chemistry, 196, 885-896.

EKLER

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

EK 3 Protein Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

EK 4 İndirgen Şeker Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

EK 5 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

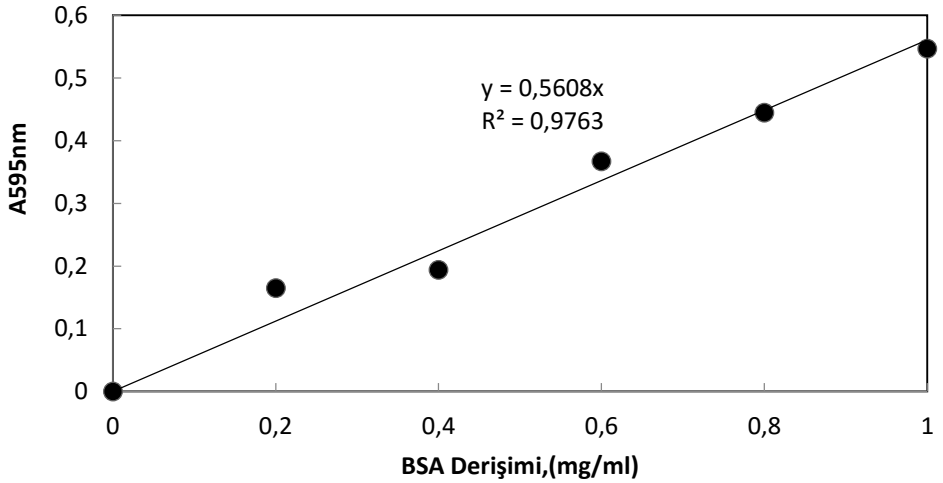
Kimyasal	Firma	Katalog No
Agar	Scharlau	07004
Amonyum sülfat	Sigma	A4915
Asetonitril	Merck	1.00030
Bakır II sülfat pentahidrat	Scharlau	CO0101
Bovin serum albumin	Sigma	A9647
Coomasie Brillant blue	Sigma	27815
Demir II sülfat heptahidrat	Sigma Aldrich	12354
Dinitrosalisilik asit	Sigma	D0550
Etanol	Sigma	32221
Etil asetat	Sigma	27227
EDTA	Applichem	A5097
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma	F9252
Fosforik asit	Applichem	A0989
o-Fosforik asit	Riedel de Haen	04107
Gliserol	Sigma	G5516
Glukoz monohidrat	Applichem	A1349
Hidroklorik asit	Sigma	32221
Hidrojen peroksit	Merck	107209
Katalaz	Sigma	C9322
Magnezyum sülfat heptahidrat	Merck	1.05886
Malt özütü	Scharlau	07080
Mangan (II) sülfat monohidrat	Sigma Aldrich	M7634
Maya özütü	Fluka	70161
Pepton	Fluka	70171
Potasyum fosfat	Riedel de Haen	30407
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	104873
Potasyum dikromat	Merck	104864
Progallol	Sigma	254002
Sodyum bikarbonat anhidröz	Scharlau	SO0116
Sodyum hidroksit pellet	Sigma Aldrich	06203
Sodyum potasyum tartarat	Fluka	60410
Sodyum sulfit	Riedel de Haen	13471
Sorbitol	Merck	107758
Trisma base	Sigma	T6066
Üre	Merck	108488

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Model**
Laminer Akış Kabini	Biolab Faster BHG 2004-S
Sterilizatör	ALP CL-40M
Çalkalamalı Hava Banyosu	Edmund Bühler TH 30; Shel Lab S16R-2
HPLC	Waters Alliance
Hücre Parçalayıcı	Biospec Mini Bead Beater
UV-VIS Spektofotometre	Shimadzu UV-1601
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 35 R
Santrifüj	Hettich Rotina Mikro 22
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
pHmetre	Sartorious PP25
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore
Etüv; Kurutucu	Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110
Işık Mikroskobu	Olympus CKX41

EK 3 Protein Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

Protein derişimi kalibrasyonu hazırlanmasında standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Farklı derişimlerde BSA'nın sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bradford (1976) yöntemi her bir derişim için uygulanmış ve λ=595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1 Protein tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

Protein derişim ölçümünde analizlerin doğruluğunu belirlemek üzere yapılan denemylerde, BSA'nın su içerisinde 1 mg/mL derişimindeki çözeltisi kullanılmıştır. Bradford yöntemi ile yapılan deneyler 5 kez tekrar edilmiştir. Absorbans değerleri ve şekil 1 kullanılarak protein derişim değerleri elde edilmiştir. Çizelge 1'deki veriler Eşitlik 1 kullanılarak standart sapma değeri hesaplanmıştır.

Bulunan standart sapma değeri (0.014), protein derişimi ortalamasının % 1.47'sine karşılık gelmektedir.

$$S=\sqrt{\frac{\sum(x_i-x_{ort})^2}{n-1}} \quad (1)$$

S= standart sapma

x_i= örneğe ait değer

x_{ort}= örneklere ait ortalama değer

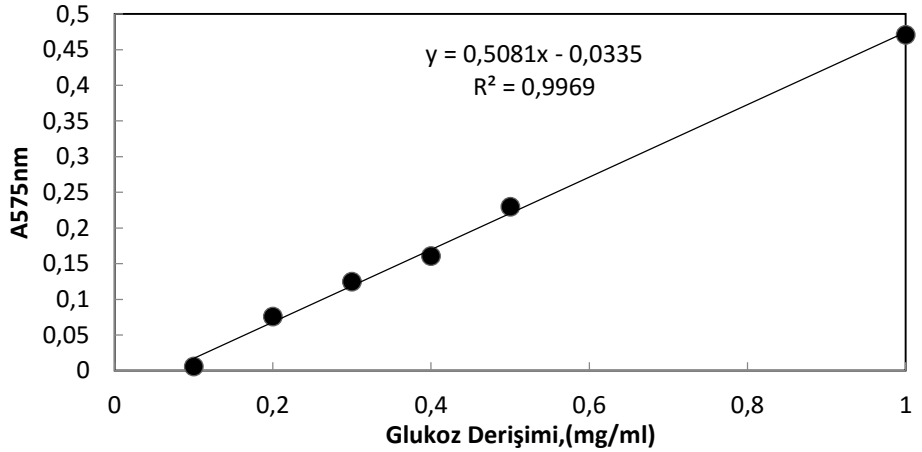
n= örnek sayısı

Çizelge 1 Protein derişimine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (mg/L)	x_i-x_{ort}	$(x_i-x_{ort})^2$
0,985	0,012	0,000149
0,967	-0,006	0,000034
0,960	-0,013	0,000170
0,961	-0,012	0,000134
0,991	0,018	0,000332

EK 4 İndirgen Şeker Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

İndirgen şeker derişimi analizinde, glukozun su ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki çözeltileri standart olarak kullanılmıştır. Her bir derişim için DNS yöntemi uygulanarak spektrofotometrik olarak λ=575 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1 İndirgen şeker tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

İndirgen şeker derişimi analizlerin doğruluğunu belirlemek üzere yapılan deneylerde, glukozun su içerisinde 1 mg/mL derişimindeki çözeltisi kullanılmıştır. DNS metodu ile yapılan deneyler 5 kez tekrar edilmiştir. Absorbans değerleri ve şekil 1 kullanılarak glukoz derişim değerleri elde edilmiştir. Çizelge 1'deki veriler EK 3'de bulunan eşitlik 1'de kullanılarak standart sapma değeri hesaplanmıştır.

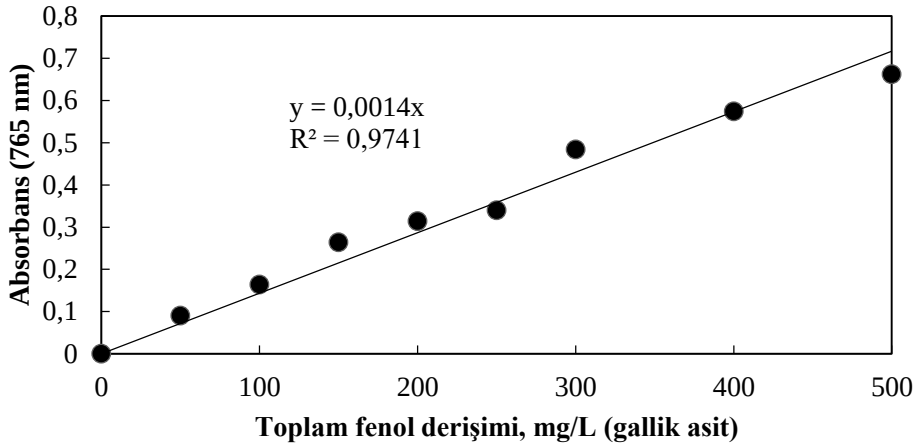
Bulunan standart sapma değeri (0.027), pik alanlarına ait değerlerin ortalamasının %2.76'sına karşılık gelmektedir.

Çizelge 1 İndirgen şeker derişimine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (mg/L)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
1,05	0,05	0,00250
0,99	-0,01	0,00010
1,00	0,00	0,00000
0,98	-0,02	0,00040
0,99	-0,01	0,00008

EK 5 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

Toplam fenol analizinde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asitin etil alkol içinde hazırlanan farklı derişimleri ile çalışma doğrusu çizilmiş ve örneklerin toplam fenol derişimi gallik asit eşdeğeri olarak (mg galllik asit/L) hesaplanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1 Toplam fenol tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

Toplam fenol derişim ölçümünde analizlerin doğruluğunu belirlemek üzere yapılan deneylerde, gallik asitin etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan 300 mg/L derişimine sahip çözeltisi kullanılmıştır. Analiz 8 kere tekrar edilerek elde edilen absorbans değerleri kullanılarak şekil 1'de verilen grafiğe göre TF derişimi bulunmuştur.

Çizelge 1'deki veriler EK 3'de bulunan eşitlik 1'e uygulandığında, toplam fenol tayini yönteminin standart sapması 7.44 olarak bulunmuştur. Bulunan standart sapma değeri (S), toplam fenol derişimine ait değerlerin ortalamasının % 2.39'na karşılık gelmektedir.

Çizelge 1 Toplam fenol tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (mg/L)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
315	4	16
325	14	196
301	-10	100
310	-1	1
311	0	0
307	-4	16
313	2	4

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Didem DEĞİRMENBAŞI

Doğum Yeri **:** Ankara

Doğum Tarihi **:** 05.05.1988

Medeni Hali **:** Bekar

Yabancı Dili **:** İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise : Gazi Çiftliği Süper Lisesi (Gazi Çiftliği Anadolu Lisesi) (2006)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2012)

: Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü (2015)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (2016)

Uluslararası Kongre Sunumlar:

Poster sunumları

1. **Değirmenbaşı, D.** and Takaç, Z.S. 2015. "Antioxidant Enzymes Production From Olive Mill Wastewater", 1st International Conference on Green Chemistry and Sustainable Technologies (GCST), Abstract Book P.106, İzmir, Turkey.

2. Takaç, Z.S., Karakaya, A. and **Değirmenbaşı, D.** 8-9/01/2015. "Microbiyal valorisation of olive mill wastewater", Citrus Waste Valorisation Workshop, Book of Abstracts, P.21, Mersin, Turkey.

Ulusal Kongre Sunum:

Poster sunumları

1. Ünlü, A.E., **Değirmenbaşı, D**. Takaç, Z.S. 3-6/9/2012. *Rhodotorula glutinis*'in katalaz aktivitesi üzerinebazı radikal oluşturucuların etkisi, Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10) Bildiri Özetleri Kitabı, P3, İstanbul.

2. Arıkaya, A., **Değirmenbaşı, D**., Takaç, Z.S. 2015. AKMBB (Ankara Kimya Mühendisliği Bölüm Birlikteliği) Proje Sergisi, Ankara, Türkiye