

**Zeytin Karasuyundan Katma Değer Yaratacak
Biyomoleküller Üretimi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113M589

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ

Bursiyerler:

Alper KARAKAYA

Didem DEĞİRMENBAŞI

ARALIK 2015

ANKARA

ÖNSÖZ

Gerçekleştirilen proje, 109M290 nolu “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi” konulu proje ile başlatılan ve 111M441 nolu “Zeytin Karasuyunun Fenolik Maddelerinin Ardışık Homojenizasyon-Ekstraksiyon Prosesleri ile Zenginleştirilmesi ve Biyoarıtılabilirliğinin Kolaylaştırılması için Entegre Bir Proses Geliştirilmesi” konulu proje ile sürdürülen zeytin karasuyunun arıtımı ve değerlendirilmesi çalışmalarının devamı olarak ele alınmıştır. Proje aynı zamanda TD 1203 nolu “Food Waste Valorization for Sustainable Chemicals, Materials and Fuels” konulu COST Aksiyonunda da yer almaktadır. Çalışmada, zeytin karasuyunun zor bileşiminde çoğalabilen oleageneous *Rhodotorula glutinis* mayasından yüksek verim ile lipid ve yüksek aktivite ile antioksidan enzimler süperoksit dismutaz ve katalaz üretimleri amaçlanmıştır.

Projede iki bursiyer görev almış, proje kapsamından bir doktora ve bir yüksek lisans tez konusu oluşturulmuştur. COST Aksiyonu kapsamında, yurtdışındaki araştırmacılar ile bağlantılar kurulmuştur. Kasım 2013 tarihinde başlayan proje, 24 ay sonunda konu ile ilgili pilot ölçek tesis kurulabileceğine yönelik yeni projeler üretilmesini sağlayan bulgularıyla sonlandırılmıştır.

Projeyi maddi olarak destekleyerek gerçekleşmesini sağlayan TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu'na; zeytin karasuyunun sağlanmasında ve biyoarıtımda kullanılmasında katkıda bulunan Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş'nin Yönetim Kurulu Başkanı Prof.Dr.Yahya Laleli'ye; araştırmalar için alt-yapıyı sağlayan Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne; hücre sayımı laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz Doç.Dr.Ayşe Karakeçili'ye; projeyi izleyen proje danışmanına; projenin mali işlemlerini yürüten Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve COST Aksiyonu faaliyetlerini izleyen TÜBİTAK Uluslararası İşbirliği Daire Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Prof.Dr.Zekiye Serpil TAKAÇ

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Zeytin Karasuyu	4
2.2 Mikrobiyal Lipid	4
2.3 Antioksidanlar, Süperoksit Dismutaz ve Katalaz.....	5
2.4 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu	6
2.5 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzim Üretimi	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1 Kimyasallar ve Cihazlar	13
3.2 Mikroorganizma ve Saklama	14
3.3 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu	14
3.3.1 Çoğalma ortamları.....	14
3.3.2 Biyoreaktörde çoğalma ve lipid üretimi	14
3.3.3 Kuru hücre derişimi	15
3.3.4 Toplam lipid miktarı	15
3.3.5 FAME analizleri	16
3.4 Alt-proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi	16
3.4.1 Çoğalma ortamları.....	16
3.4.2 Hücre parçalama.....	17
3.4.3 Hücre derişimi	17
3.4.4 Protein derişimi	17
3.4.5 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi	17
3.4.6 Katalaz (KAT) aktivitesi	18
3.4.7 İndirgen şeker derişimi	18
3.4.8 Toplam fenol (TF) derişimi	18
3.4.9 HPLC analizleri	19

4. BULGULAR.....	20
4.1 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu	20
4.1.1 Farklı derişimlerde zeytin karasuyu içeren ortamda lipid üretimi.....	20
4.1.2 <i>R. glutinis</i> 'ten lipid üretimine karbon ve azot kaynakları derişim (C/N) etkisi	23
4.1.3 <i>R. glutinis</i> 'ten lipid üretimine gliserol derişimi etkisi	33
4.1.4 Zeytin karasuyu ve gliserolün üretilen FAME kompozisyonuna etkisi	38
4.1.5 Zeytin karasuyu bileşimindeki maddelerin lipid üretimine etkisi	42
4.1.6 Zeytin karasuyuna uygulanan önişlemin lipid üretimine etkisi	46
4.1.7 Sıcaklık etkisi	48
4.1.8 Karıştırma hızı etkisi.....	49
4.1.9 Biyoreaktörde çoğalma ve lipid üretimi	50
4.2 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi	58
4.2.1 UYM ortamında <i>R. glutinis</i> çoğalması ve antioksidan enzimler üretimi	58
4.2.2 Zeytin karasuyu derişim etkisi	61
4.2.3 Karbon kaynağı etkisi	66
4.2.4 Ek azot kaynağı etkisi.....	70
4.2.5 Sıcaklık etkisi	75
4.2.6 Karıştırma hızı etkisi.....	79
4.2.7 Stres koşulları etkisi	83
4.2.8 En iyi koşullarda üretim	86
5. TARTIŞMA/SONUÇ	90
5.1 Alt-proje-1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu	90
5.2 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi	92
KAYNAKLAR.....	93
EKLER	98
EK 1 Protein derişimi kalibrasyon doğrusu	99
EK 2 İndirgenmiş şeker derişimi kalibrasyon doğrusu.....	100
EK 3 Toplam fenol derişimi kalibrasyon doğrusu	101
EK 4 Yağ asit dağılımı örnek GC kromatogramı	102
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	103

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri (pH ve toplam fenol derişimi dışındaki analizler DÜZEN-NORWEST'de yapılmıştır)	13
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar	13
Tablo 3.3 GC analiz koşulları.....	16
Tablo 3.4 HPLC analiz koşulları	19
Tablo 4.1 Faktöriyel tasarım parametre aralıkları ve seviyeleri	23
Tablo 4.2 Faktöriyel tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları	23
Tablo 4.3 Deney değişkenlerine ait merkezi kompozit tasarım tablosu	26
Tablo 4.4 Merkezi kompozit tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları.....	26
Tablo 4.5 Faktöriyel tasarım parametre aralıkları ve seviyeleri	29
Tablo 4.6 Faktöriyel tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları	29
Tablo 4.7 Çoğalma süresi ve glukoz derişimi değişkenlerine bağlı olarak toplam lipid derişimi değişiminin ANOVA analizi.....	31
Tablo 4.8 Farklı ortamlara R. glutinis'in ürettiği üretilen lipidlerde yağ asidi dağılımı	40
Tablo 4.9 UYM çoğalma ortamına eklenen katkı maddeleri ve derişimleri	42
Tablo 4.10 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin lipiddeki yağ asitlerinin doymuşluk yüzdelerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	45
Tablo 4.11 Zeytin karasuyuna uygulanan önışlemler ve çoğalmada kullanılan ortam bileşimleri	46
Tablo 4.12 Önışlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda üretilen yağ asidi doymamışlık oranları	47
Tablo 4.13 Farklı sıcaklıklarda üretilen lipidin FAME kompozisyonu	49
Tablo 4.14 Yüzey cevap deney matrisi ve elde edilen cevaplar	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) ZK tahliye şişesi; (9) Biyoreaktör tankı.....	15
Şekil 4.1 UYM, %25 ZK-UYM ve %50 ZK-UYM ortamlarında 144 st sonunda çoğalan R. glutinis ve üretilen lipid derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)	20
Şekil 4.2 %50, %75 ve %100 ZK-UYM ortamlarında 120 st sonunda çoğalan R. glutinis ve üretilen lipid derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)	21
Şekil 4.3 UYM ve %100 ZK-UYM ortamlarında çoğalan R. glutinis hücrelerinin ürettikleri lipidin yağ asidi dağılımı (%).....	22
Şekil 4.4 %100 ZK-UYM ortamında çoğalan R. glutinis'in farklı çoğalma zamanlarında ürettiği yağ asidi dağılımı (%).....	22
Şekil 4.5 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine kuru hücre derişiminin değişimi	24
Şekil 4.6 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine toplam lipid derişiminin değişimi	24
Şekil 4.7 Çoğalma süresi ve glukoz derişiminin FAME derişiminin değişimi.....	25
Şekil 4.8 Üre ve glukoz derişimine bağlı olarak toplam lipid derişiminin değişimi	27
Şekil 4.9 Üre ve glukoz derişimine bağlı olarak FAME derişiminin değişimi	27
Şekil 4.10 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağlı olarak toplam lipid miktarının değişimi	28
Şekil 4.11 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağlı olarak FAME miktarının değişimi.....	28
Şekil 4.12 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağlı olarak kuru hücre derişiminin değişimi	30
Şekil 4.13 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağlı olarak toplam lipid derişiminin değişimi	30
Şekil 4.14 Zaman ve glukoz derişimi değişkenlerine bağlı olarak FAME derişiminin (mg/L) değişimi.....	31
Şekil 4.15 Glukoz derişimi ve zamana bağlı olarak doymuş/doymamış yağ asidi oranının değişimi.....	32
Şekil 4.16 50 ve 100 g/L glukoz eklenen ortamlarda 192. saate ait yağ asidi dağılım yüzdesi	32
Şekil 4.17 Farklı gliserol derişimlerinde çoğalan hücreler için zamanla kuru hücre derişimi ve toplam lipid derişiminin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	33
Şekil 4.18 Farklı gliserol derişimlerinde çoğalan hücreler için zamanla FAME derişiminin değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)	34
Şekil 4.19 Gliserol içermeyen ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi.....	35
Şekil 4.20 20 g/L gliserol içeren ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi.....	35
Şekil 4.21 40 g/L gliserol içeren ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi.....	36
Şekil 4.22 Gliserol içermeyen, 20 ve 40 g/L gliserol içeren ortamlarda gerçekleştirilen çoğalmaların en yüksek lipid üretim zamanlarında yağ asidi doymuşluk yüzdeleri.....	36
Şekil 4.23 40 g/L gliserol içeren ortamda en yüksek miktarda lipid üretimi görülen çoğalma süresinde yağ asitleri dağılımı	37
Şekil 4.24 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda hücre derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	38
Şekil 4.25 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda t=400 st çoğalma sonunda toplam lipid ve FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)	38

Şekil 4.26 Zeytin karasuyu ve gliserolün etkisini gösteren farklı ortamların FAME derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	39
Şekil 4.27 UYM ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	40
Şekil 4.28 UYMZK ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	41
Şekil 4.29 UYMGLY ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	41
Şekil 4.30 ZKGLY ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	42
Şekil 4.31 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin hücre ve toplam lipid derişimlerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	43
Şekil 4.32 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin toplam lipid derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	43
Şekil 4.33 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin toplam lipid ve FAME derişimlerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	44
Şekil 4.34 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin kuru hücre başına toplam lipid ve FAME derişimlerine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm, t=120 st).....	44
Şekil 4.35 Önişlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda ulaşılan hücre ve FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	46
Şekil 4.36 Önişlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda ulaşılan FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)	47
Şekil 4.37 Sıcaklığın hücre derişimi ve toplam lipid derişimine etkisi (N=150 rpm)	48
Şekil 4.38 Sıcaklığın FAME derişimine etkisi (N=150 rpm)	49
Şekil 4.39 Karıştırma hızının hücre derişimi ve toplam lipid derişimine etkisi (T=30 °C).....	50
Şekil 4.40 Karıştırma hızının FAME derişimine etkisi (T=30 °C)	50
Şekil 4.41 Hücre derişiminin sıcaklık ve pH ile değişimi.....	52
Şekil 4.42 Toplam lipid derişiminin sıcaklık ve pH ile değişimi	52
Şekil 4.43 Toplam lipid/hücre değerinin sıcaklık ve pH ile değişimi.....	53
Şekil 4.44 FAME/hücre değerinin sıcaklık ve pH ile değişimi	54
Şekil 4.45 Doymuş yağ asidi (DYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi	54
Şekil 4.46 Tekli doymamış yağ asidi (TDYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi	55
Şekil 4.47 Çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi	56
Şekil 4.48 ZK tüketim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi.....	56
Şekil 4.49 Hücre çoğalma hızının sıcaklık ve pH ile değişimi.....	57
Şekil 4.50 Toplam lipid üretim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi.....	57
Şekil 4.51 FAME lipid üretim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi.....	58
Şekil 4.52 <i>R.glutinis</i> 'in UYM ortamında çoğalma eğrisi (T=30 °C, N=150 rpm)	59
Şekil 4.53 UYM ortamında çoğalan <i>R.glutinis</i> için ortam pH'ının zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	59
Şekil 4.54 UYM ortamında çoğalan <i>R.glutinis</i> için hücre içi protein derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	60
Şekil 4.55 UYM ortamında çoğalan <i>R.glutinis</i> için spesifik SOD aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	60
Şekil 4.56 UYM ortamında çoğalan <i>R.glutinis</i> için spesifik KAT aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	60
Şekil 4.57 UYM ortamında çoğalan <i>R.glutinis</i> için indirgen şeker derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	61

Şekil 4.58 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	61
Şekil 4.59 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	62
Şekil 4.60 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	62
Şekil 4.61 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)	63
Şekil 4.62 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	64
Şekil 4.63 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında indirgenmiş şeker derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	64
Şekil 4.64 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)	65
Şekil 4.65 % 50 ZK içeren UYM ortamın çoğalmanın farklı zamanlarında fenolik madde piklerini gösteren HPLC kromatogramları	66
Şekil 4.66 Farklı karbon kaynaklarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	66
Şekil 4.67 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	67
Şekil 4.68 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	67
Şekil 4.69 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	68
Şekil 4.70 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	69
Şekil 4.71 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	69
Şekil 4.72 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında indirgen şeker derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	70
Şekil 4.73 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	71
Şekil 4.74 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının ortam pH değerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	72
Şekil 4.75 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	72
Şekil 4.76 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	73
Şekil 4.77 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	74
Şekil 4.78 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının indirgenmiş şeker derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)	74
Şekil 4.79 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının toplam fenol derişime etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)	75
Şekil 4.80 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi (N=150 rpm)	76
Şekil 4.81 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)	76
Şekil 4.82 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi (N=150 rpm).....	77

Şekil 4.83 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi (N=150 rpm).....	77
Şekil 4.84 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (N=150 rpm).....	78
Şekil 4.85 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (N=150 rpm).....	78
Şekil 4.86 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)	79
Şekil 4.87 Karıştırma hızının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C)	80
Şekil 4.88 Karıştırma hızının ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C)	80
Şekil 4.89 Karıştırma hızının hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C)	81
Şekil 4.90 Karıştırma hızının spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C)	81
Şekil 4.91 Karıştırma hızının spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C)	82
Şekil 4.92 Karıştırma hızının indirgenmiş şeker tüketimi (T=30°C)	82
Şekil 4.93 Karıştırma hızının toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C).....	83
Şekil 4.94 Farklı süre ve derişimlerde H ₂ O ₂ oksidatif stresinin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)	84
Şekil 4.95 Farklı süreler ve derişimlerdeki H ₂ O ₂ 'in hücrelerin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)	84
Şekil 4.96 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın hücrelerin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)	85
Şekil 4.97 Farklı sürelerde UV ışığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm).....	86
Şekil 4.98 En iyi koşullarda üretilen hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	86
Şekil 4.99 En iyi koşullarda üretilen ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	87
Şekil 4.100 En iyi koşullarda üretilen hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	87
Şekil 4.101 En iyi koşullarda üretilen spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)	88
Şekil 4.102 En iyi koşullarda üretilen spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	88
Şekil 4.103 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda indirgenmiş şeker tüketimi (T=30°C, N=150 rpm).....	89
Şekil 4.104 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)	89
Şekil EK 1.1 Protein tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	99
Şekil EK 2.1 İndirgen şeker tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu.....	100
Şekil EK 3.1 Toplam fenol tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu.....	101
Şekil EK 4.1 100 g/L glukoz içeren çoğalma ortamının 240. saatine ait yağ asidi dağılımı gösteren GC kromatogramı	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
g	Yer çekimi ivmesi
N	Karıştırma hızı (rpm)
T	Sıcaklık (°C)
t	Zaman (dk, st)
U	Ünite
U/mg	Spesifik aktivite
λ	Dalga boyu (nm)

Kısaltmalar

BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
BSA	Bovin serum albumin
CAT	Catalase
CZK	Cibre/ZK karışımı
ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asiti
DNS	Dinitrosalisilik asit
DYA	Doymuş yağ asiti
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FAME	Yağ asitleri metil esteri
GC	Gaz kromatografisi
GLY	Gliserol
HPLC	Yüksek basınç (performans) sıvı kromatografisi
KAT	Katalaz
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
OLE	Oleik asit
OMW	Olive mill wastewater
PEİN	Oleuropein
rpm	Devir/dakika
SOD	Süperoksit dismutaz
TAG	Triaçil gliserol
TDYA	Tekli doymamış yağ asiti
TF	Toplam fenol
TYR	Tirozol
UV	Ultraviyole
UYM	Universal yeast medium
ZK	Zeytin karasuyu
ZY	Zeytin yağı

ÖZET

Bu projede, *Rhodotorula glutinis* mayası ile zeytinyağı fabrikalarının sıvı atığı zeytin karasuyundan (ZK) yüksek verim ile mikrobiyal lipid ve yüksek aktivite ile antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) üretimi için biyoproses koşullarının bulunması amaçlanmıştır.

Projenin birinci bölümünde; *R.glutinis* zeytin karasuyu ortamında kesikli sistemde çoğaltılarak üretilen toplam lipid miktarına zeytin karasuyu derişimi, ek karbon ve azot kaynaklarının bileşimi, zeytin karasuyunda bulunan maddelerin, sıcaklık ve karıştırma hızının etkileri incelenmiştir. 2 L biyoreaktörde gerçekleştirilen sürekli işletimde ise toplam lipid miktarı üzerine sıcaklık ve pH değerlerinin etkisi Yüzey Cevap Yöntemi (RSM) uygulanarak incelenmiştir. Her koşulda üretilen lipidin yağ asitleri kompozisyonu belirlenmiştir. Çalışmada birim kuru hücre başına üretilen en yüksek toplam lipid miktarı % 52 (a/a) olarak gliserol eklenen ZK ortamında çoğalan hücrelerde elde edilmiştir. Çoğalma ortamında zeytin karasuyunun bulunması *R.glutinis*'in ürettiği lipiddeki doymamış yağ asitleri yüzdesini arttırmış ve gliserol içeren ortamda oleik asit miktarı % 57 değerine kadar çıkmıştır.

Projenin ikinci bölümünde; *R.glutinis* zeytin karasuyu ortamında çoğalırken üretilen SOD ve KAT enzimlerinin aktivitelerini yüksek yapacak zeytin karasuyu derişimi, ek karbon ve azot kaynakları, sıcaklık, karıştırma hızı ve stres koşulları kesikli sistemde incelenmiştir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi 35°C'ta 23.37 U/mg, en yüksek spesifik KAT aktivitesi ise 15°C'ta 54.07 U/mg olarak bulunmuştur. Oksidatif stres koşullarının enzim aktivitelerini SOD ve KAT için sırasıyla 2.73 ve 2.22 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Zeytin karasuyu, mikrobiyal lipid, superoksit dismutaz, katalaz, *Rhodotorula glutinis*

ABSTRACT

In this project, it is aimed to find the bioprocess conditions that produce microbial lipid with a high yield by using oleougeus yeast *Rhodotorula glutinis* in the presence of olive mill wastewater (OMW) and also to find the conditions that produce antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes with high activities.

In the first sub-project of the study; *R.glutinis* was cultivated batch-wise in the presence of OMW and the effects of OMW concentration, composition of supplemental carbon and nitrogen sources, components of OMW, temperature and agitation rate on the total lipid concentration were investigated. In the continuous operation, performed in a 2 L bioreactor, the effects of temperature and pH on the lipid production were studied by using Response Surface Methodology (RSM). The fatty acid composition of each production was also measured. The highest total lipid per dry cell mass was found as 52 % (w/w) with the addition of glycerol into OMW medium. The presence of OMW in the growth medium increased the percentage of unsaturated fatty acid accumulated in *R.glutinis* and the oleic acid concentration increased up to 57 % in the presence of glycerol.

In the second sub-project of the study; the conditions that provide high SOD and CAT enzyme activities were found by investigating the effects of OMW concentration, supplemental carbon and nitrogen sources, temperature, agitation rate and oxidative stress conditions in a batch system. The highest specific SOD activity was found as 23.37 U/mg at 35°C whereas the highest specific CAT activity was obtained as 54.07 U/mg at 15°C. It was also found that oxidative stress conditions increased SOD and CAT activities 2.73-fold and 2.22-fold, respectively.

Keywords: Olive mill wastewater, microbial lipids, superoxide dismutase, catalase, *Rhodotorula glutinis*

1. GİRİŞ

Dünyada enerji kaynaklarının sınırlı olması, sürdürülebilir prosesleri daha değerli kılmış; akademik birimler ve endüstri enerji başta olmak üzere, yığın, ara ve özellikli kimyasalların üretiminde tükenen kaynaklar yerine yenilenebilen kaynakları kullanma yönündeki çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu kapsamda, birinci jenerasyon biyorafinerilerde biyoyakıt üretimi nişasta, selüloz ve bitkisel yağlardan yapılmış; ancak bu kaynakların kullanılabilirliği ekilebilir verimli toprak miktarına ve gıda olarak kullanımı ile yarışmasına bağlı olduğu için ikinci jenerasyon biyorafinerilerde lignoselülozik biyokütle ve yenilemeyen yağ tohumları kullanılmaya başlanmıştır. İlerleyen zamanlarda biyorafinerilerde yakıt üretiminin yanı sıra önemli kimyasalların üretimleri de kaçınılmaz olmuştur. Bu üretimler, biyodizel üretimindeki yan ürün gliserolden düşük maliyetle dönüşümü için üzerinde çalışılan 1,2 veya 1,3 propandiol gibi biyoyakıt üretim prosesi ile ilgili olabileceği gibi, yakıt üretiminden bağımsız olarak lignoselülozik materyallerden doğrudan kimyasal üretimleri de olabilmektedir.

Dünyada miktarı ve çeşitliliği sürekli artmakta olan endüstriyel atıklar ise çevreyi giderek daha fazla tehdit etmekte; ulusal ve uluslararası düzenlemeler ile atıkların zararları en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Her endüstri hem atık miktarını azaltmaya hem de en uygun şekilde arıtmaya yönelik çalışmalara zorlanmaktadır. Ancak, atıklar içerdikleri değerli moleküllerin doğrudan geri kazanımı ile ticarileştirilebilecekleri gibi substrat olarak kullanılıp yeni moleküllerin üretimi ile de ticari değer kazanabilirler. Son zamanlarda atık özellikteki biyokütlenin yenilenebilir enerji ve kimyasal madde kaynağı olarak kullanılması ve bu kullanımda "yeşil teknolojiler" in uygulanması önem kazanmaktadır. Gıda endüstrisi atıkları hem yapılarında değerli madde içeren hem de değerli maddelere dönüşme potansiyelleri olan önemli bir endüstriyel atık grubudur. Başlıca nişasta, yağ ve protein içerikli olan bu atıklardan biyodizel, bioetanol ve biyogaz üretimleri popülerdir. Atığın karakterine göre amino asit, nişasta türevli maddeler, fenol, organik asit vb. maddelerin geri kazanımı/üretimleri de mümkündür.

Gerçekleştirilen bu projede, Türkiye ve Akdeniz havzası için önemli bir problem oluşturan, zeytinyağı üretim tesislerinin sıvı atığı olan zeytin karasuyunun ticari değeri olan biyomoleküllerin (mikrobiyal lipid ve antioksidan enzimler) üretiminde substrat olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Üretimlerin biyoarıtıma eşanlı olarak gerçekleşmesi nedeniyle karasuyun organik yükünün azaltılarak su ve toprağa verilmesinin de sağlanacak olması, sonuçlara ayrı bir katma değer kazandırmaktadır.

Türkiye, zeytin üretiminde dünyada önde gelen ülkelerden birisidir. 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)'dır (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QD/E>).

Zeytinyağı üretiminde kullanılan proseslerden üç fazlı sistemde fazla miktarda atık su çıkması, iki fazlı sisteme geçiş ile önlenmiş olsa da dünyada sadece İspanya'nın ağırlıklı olarak iki fazlı sisteme geçmesi Türkiye dahil diğer ülkelerde zeytinyağı fabrikalarının atık suyunun arıtılmasını önemli kılmaktadır. Üç fazlı sistem ile zeytinyağı üretiminde %20 zeytinyağı, %30 yarı-katı atık ve %50 sıvı atık (zeytin karasuyu, vejetasyon suyu) oluşmaktadır (Paraskeva ve Diamadopoulou, 2006). Dünya'da zeytinyağı üretimi sonucu yıllık açığa çıkan karasu miktarı değişkenlik göstermekle beraber, Akdeniz ülkeleri için yaklaşık 30 milyon ton olarak bildirilmiştir (Ramos-Cormenzana vd., 1996). Organik madde ve mineral madde bakımından zengin ve asidik özellikte olan zeytin karasuyu yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerlerine sahiptir (Borja vd., 2006). Zeytin karasuyunun organik fraksiyonu başlıca şekerler, polifenoller, tanenler, polialkoller, pektinler ve lipidler içerir (McNamara vd., 2008). Toplam organik bileşen miktarı 25-45 g/L'dir ve kuru ağırlığın %60'ı kadar da şeker içermektedir. Karasuda 30'dan fazla sayıda fenolik bileşen tanımlanmıştır ve bunların yapıları ve miktarları işletmenin bulunduğu bölgenin toprak ve iklim özellikleri ile kullanılan prosese göre önemli ölçüde değişmesine karşın toplam polifenol miktarı 0.5–24 g/L arasındadır (Niaounakis ve Halvadakis, 2006). Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerinin antioksidan özelliklerinin olması, bu atığın bir yan ürün olarak ele alınıp, katma değeri yüksek antioksidanların geri kazanımını önemli yapmış ve karasuyun değerlendirilmesine yönelik çalışmalar başlıca bu doğrultuda olmuştur. Ancak, geri kazanım proseslerinin ardışık basamaklar içermesi ve istenilen saflıkta molekül kazanımının yüksek maliyetli olması nedeniyle fenolik madde geri kazanımı için ticarileşen proseslerin sayısı az olmuştur (Takaç ve Karakaya, 2009).

Zeytin karasuyunun arıtılacak bir atık olarak değil de değerli maddeler üretilebilecek bir endüstriyel yan ürün olarak görülmeye başlanması ile karasuyun zor bileşiminde çoğalabilen mikroorganizmalardan lipaz (Hernández-Almanza vd., 2014), sitrik asit ve lipid (Papanikolaou vd., 2008; Sarris vd., 2011; Yousuf vd., 2010) ve biyohidrojen (Eroğlu vd., 2004) gibi ürünler elde edilmesine yönelik çalışmalar da başlatılmıştır. Bu kapsamda, bu projede lipid biriktirme kapasitesi ile bilinen oleageneous maya *Rhodotorula glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında

yüksek verim ile lipid üretmesi (Alt-proje 1) ve ayrıca zeytin karasuyundaki fenolik maddelerin yaratacağı stres ile *R. glutinis*'ten yüksek aktivitede SOD ve KAT enzimlerinin üretilmesi (Alt-proje 2) amaçlanmıştır.

Alt-proje 1'de zeytin karasuyunda farklı koşullarda çoğaltılan *R. glutinis* mayasında lipid birikimini en fazla yapan zeytin karasuyu derişimi, ek karbon ve azot kaynakları bileşimi, sıcaklık, pH gibi koşullar bulunmuş, elde edilen mikrobiyal lipid karakterize edilmiş ve biyoreaktörde sürekli işletimde yüksek miktarda lipid üretimini veren işletim koşulları belirlenmiştir. Alt-proje 2'de ise zeytin karasuyunda farklı koşullarda çoğaltılan *R. glutinis*'in endüstriyel önemi olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) antioksidan enzimlerini yüksek aktivite ile ürettiği zeytin karasuyu derişimi, ek karbon ve azot kaynakları bileşimi, sıcaklık ve stres koşulları gibi koşullar ayrı ayrı belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin Karasuyu

Zeytinyağı üretim fabrikalarının sıvı atığı olan zeytin karasuyu, koyu mor-koyu kahverenginden siyaha kadar yoğun rengi, güçlü zeytinyağı kokusu, yüksek organik kirliliği, asidik pH'ı, yüksek elektrik iletkenliği, yüksek fenol içeriği ve yüksek katı madde içeriği ile karakterize edilir. İçerdiği yüksek organik kirliliği, 35-110 g/L arasında değişen biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve 40-220 g/L arasında değişen kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ile tanımlanmaktadır. Ayrıca zeytin karasuyunun içerdiği toplam organik karbon miktarı 25-45 g/L arasında, pH'ı 4-6 arasında ve içerdiği fenolik bileşenlerin derişimi 0.5-24 g/L arasında değişmektedir. Zeytin karasuyunun organik karbon içeriğini, kuru ağırlığının % 60'ı kadarını oluşturan şekerler (artan sırayla sukroz, glukoz, mannoz ve fruktoz) ile içerdiği fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Karasudaki şeker seviyesi %1.6-4 arasında değişmektedir (Niaounakis ve Halvadakis, 2006). Zeytin karasuyu fenolik içeriği ve içerdiği uzun zincirli yağ asitleri nedeni ile yüksek düzeyde fitotoksik ve antimikrobiyal etkilere sahiptir (McNamara vd., 2008). Buna karşın, zeytin karasuyunda bulunan şekerler, lipidler, proteinler, mineral elementler ve fenoller bu atığı bu bileşenlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması üzerinden veya fermentatif ürünler üretimi üzerinden yenilenebilir bir kaynak yapmaktadır. Yapıda bulunan lipidler, zeytin karasuyunu lipolitik mikroorganizmalar için iyi bir çoğalma ortamına dönüştürür (Gonçalves vd., 2012). Zeytin karasuyunun zor bileşiminde çoğalabilen mikroorganizmalar lipid yanısıra enzim, biyoçözünür polimer, biyogaz ve biyohidrojen gibi değerli maddeler üretebilmektedirler (Hernández-Almanza vd., 2014).

2.2 Mikrobiyal Lipid

Mikrobiyal yağlar, biyodizel üretiminde üçüncü kuşak girdi olarak kabul edilirler. Tek hücre yağları olarak da isimlendirilen bu yağlar çoğunlukla triaçilgliserol (TAG) formundadırlar. Maya, fungi ve mikroalgler gibi oleageneous mikroorganizmalarda uygun koşullar yaratılarak lipid birikimi sağlanabilir. Özellikle mayalar lipid üretiminde kısa hayat döngüsü, bölge, mevsim ve iklimden bağımsız çoğalma gibi üstünlüklere sahiptir. %20-70 oranında TAG biriktiren oleageneous mayalara örnek, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lmpomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulan* ve *Yarrowia lipolytica* verilebilir (Amaretti vd., 2010). Mikrobiyal yağ birikimi için çoğalma ortamında azot kısıtlaması ön koşuldur. Bu şekilde ortamda fazla olan karbon biyokütle oluşumundan çok lipid birikimine yönelmektedir. Mikrobiyal TAG kullanımı, son yıllarda biyoyakıt endüstrisine olan ilgi nedeniyle artmıştır. Mikrobiyal lipidler, kısa zincirli alkoller ile transesterleştirilerek biyodizel

üretiminde başarı ile kullanılabilirler. Buna karşın, günümüze kadar, yüksek proses maliyeti nedeniyle bu alanda ticarileşme olmamıştır (Schneider vd., 2013). Biyodizel üretiminde, kullanılan hammaddenin serbest yağ asit oranı, yağ asitlerinin doymuşluk dereceleri ve zincir uzunlukları ürün özelliklerini etkilediği için önemlidir. Mayalar genellikle 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 yapıdaki düz zincirli yağ asitlerini üretirler ve yağ asitleri %90 TAG formundadır (Schneider vd., 2013). Hammadde olarak kullanılacak lipid kompozisyonunun dallanmışlık, doymuşluk, serbest yağ asit oranı gibi özellikleri transesterleşme reaksiyonunu, üretilen biyodizelin viskozitesini, yanıcılığını ve oksidasyon stabilitesini önemli ölçüde etkileyen parametrelerdir.

2.3 Antioksidanlar, Süperoksit Dismutaz ve Katalaz

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek -karbonhidrat, DNA, protein ve lipidlerin oksitlenmelerini önlemek veya geciktirme suretiyle- hücrelere zarar vermelerini engelleyen moleküllerdir. Hücrelere zararlı olan serbest radikaller ve toksik moleküller, süperoksit radikali (O_2^{\bullet}), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\bullet}), hidroperoksil radikali (HO_2^{\bullet}) ve hipoklorit (OCl^-) olarak sayılabilir. Organizmaların hayatta kalmaları ve fonksiyonlarını doğru şekilde yapabilmeleri için serbest radikallerin hücrelerde hızlı ve etkin biçimde elimine edilmesi gerekmektedir. Bunun için organizmalar antioksidan koruma sistemi geliştirmişlerdir. Bu koruma, enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar içermektedir (Saavedra vd., 1998). Alzheimer, Parkinson, iltihaplı romatizma, kalp ve damar hastalıkları ve sinir hastalıklarının oluşmasında serbest radikallerin rol oynadığı düşünülmektedir. Antioksidan içerikli beslenmeler sayesinde insan daha sağlıklı olmakta ve yaşlanma etkileri gecikmektedir; kalp krizi ve bazı nörolojik hastalıkların oluşma riski azalmaktadır. Antioksidan içerikli gıdaların belli seviyeleri sağlık için gerekli olmasına karşın, ilaç olarak alınan antioksidan desteğinin etkileri konusunda araştırmalar devam etmektedir. Antioksidanların sağlık açısından yararlarının yanı sıra, teknolojik uygulamaları da bulunmaktadır. Askorbik asit (AA, E300), tokoferoller (E306), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT, E321) gibi antioksidan koruyucu maddeler gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bazı antioksidanlar ise yakıtlarda ve yağlarda oksidasyonun, benzinde motorun tıkanmasına neden olan artıkları oluşturan polimerizasyonun ve kauçuk, plastik ve yapıştırıcılarda güç ve esneklik kaybına neden olan oksidatif bozulmanın engellenmesinde kullanılmaktadırlar. Antioksidanlar, ruj ve nemlendirici gibi yağ temelli kozmetik ürünlerde de bozulmanın önlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar. Antioksidan moleküllerin endüstriyel üretimi bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak yapılmakla birlikte, literatürde antioksidanların mikrobiyal üretimleri ile ilgili çalışmalar yer almaktadır.

Mikroorganizmaların yaşam sürecinde yer alan antioksidan koruma bileşenleri, hem enzimleri (süperoksit dismutaz; SOD, katalaz, KAT, tiyol peroksidazlar, vb) hem de diğer küçük moleküller olan glutatyon, pigmentler (karotenoidler, melaninler, vb.) ve fenolik bileşikleri kapsamaktadır (Belozerskaya ve Gessler, 2007). Antioksidan bileşenler hidrofilik (glutatyon) ve hidrofobik (tokoferoller) olarak ya da hücre içi kaynaklı ve hücre dışı kaynaklı (vitaminler, katkı maddeleri, ilaçlar, vb.) olarak da sınıflandırılabilirler. Hücre içi kaynaklı antioksidan bileşenler de aralarında enzim (SOD, KAT, glutatyon peroksidaz, vb) ve enzim olmayan (glutatyon, metiyonin, vb.) olarak ayrılabilirlerdir.

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), oksijeni metabolize eden hücreleri, süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korur. Süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu sağlar. SOD çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tıbbi açıdan; ışın tedavisinin zararlarının azaltılması (Housset vd., 1989; Delanian vd., 1994; Delanian vd., 2001), yaraların iyileştirilmesi (Vorauer-Uhl vd., 2002) sayılabilir. Kozmetik açıdan fibrozisin engellenmesinin yanısıra (Vozenin-Brotans vd., 2001), cilt kremleri ve makyaj malzemelerinde de katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunların yanısıra, yaşlanma karşıtı, hücre yenileyici özellikleriyle kapsüller halinde satışı bulunmaktadır.

Katalaz enzimi ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında dört tane heme grubu bulunan bir hemoproteindir. Hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. KAT enziminin aktivitesi hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalamaktır. Katalaz, gıda endüstrisinde H_2O_2 'den kaçınılması gerektiğinde genellikle glukoz oksidaz enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. Uygulamalarından biri de kurutma işleminden önce yumurtanın beyazından glukozun uzaklaştırılmasıdır. Bunun yanısıra, teneke veya şişelenmiş içeceklerin boş kalan kısmından havanın uzaklaştırılmasında, mayonez ve şaraplarda enzimatik olmayan kahverengileşmenin engellenmesinde ve gıda ambalajlarında oksitlenmeyi önlemesi amacıyla (Hengge, 1999) kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde ve kozmetik endüstrisinde, ürünlerden peroksit uzaklaştırılması amacıyla (Cook ve Worsley, 1996) kullanılmaktadır. Bunların yanısıra, H_2O_2 'nin germisit olarak kullanıldığı tüm ticari alanlarda (Chu vd., 1975) ve serbest radikal araştırmalarında (Lardinois, 1995) KAT yer almaktadır. Bunların yanı sıra, KAT enzimi de SOD gibi antioksidan, yaşlanma karşıtı, hücre yenileyici, yağ eritici ve ömür uzatıcı özellikleriyle kapsüller halinde çeşitli markalar bünyesinde ticari olarak satılmaktadır.

2.4 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu

Rhodotorula glutinis'in önemli özelliklerinden biri, yüksek oranda lipid biriktirebilme kapasitesidir. Ağırlığının %20'si kadar lipid üretme kapasitesi olan mikroorganizmalar oleajenik

olarak adlandırılmakta ve mikrobiyal biyodizel üretiminde kullanımları çalışılmaktadır *R. glutinis* ise, kuru ağırlığının yaklaşık yarısı kadar yüksek bir oranda lipid biriktirebilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Aşağıda çeşitli sentetik ortamların veya gıda atık sularının kullanıldığı *Rhodotorula* mayasından mikrobiyal lipid üretimine yönelik çalışmalar özetlenmiştir:

Dai vd. (2007), tarım ve orman atıklarından lipid üretimini sağlamak üzere topraktan ksiloz kullanan mayaları izole etmiş ve aralarında seçtikleri *R. glutinis* için optimum glukoz, maya özütü, pepton, başlangıç pH, aşılama hacmi, sıcaklık, karıştırma hızı değerlerinde hücre kütlelerinin %49.25 ine kadar (14.66 g/L) lipid içerdiğini belirlenmiştir. 5L hacimli biyoreaktörde yapılan üretimde ise kütlelerin %60.69 una kadar (23.41 g/L) lipid üretimi gerçekleşmiştir. Çalışmada ayrıca mısır saplarının ve *Populus euramevicana* yaprağı hidrolizatının glukoz alternatif karbon kaynağı olabilecekleri bildirilmiş ve mikrobiyal lipidin transesterleşmesi ile elde edilen biyodizelin yağ asit ester kompozisyonunun bitkisel yağdan elde edilen biyodizele yakın olduğu bulunmuştur. Xue vd. (2008), monosodyum glutamat üretim prosesinin atık suyunu *R. glutinis* fermentasyonunda kullanarak hücresel lipid oluşumunu incelemişler. Fermentasyon ortamına kesikli, yarı-kesikli ve geri-beslemeli stratejiler ile glukoz eklenerek hücre çoğalması ve lipid oluşumu gözlenmiştir. Geri-beslemeli glukoz eklemesi ile 25 g/L hücre ve %20 lipid elde edilmiştir. Eastreling vd. (2009), dekstroz, ksiloz ve gliserolün karbon kaynağı olarak tek veya karışım halinde kullanımının *R. glutinis*'in triaçilgliserol (TAG) birikimine ve yağ asitleri oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Gliserol içeren ortamlarda çoğalan hücrelerde daha yüksek TAG birikimi gözlenmiş ve sadece gliserol içeren ortamda ise doymamış yağ asit miktarı %53 ile en yüksek bulunmuştur. Wu vd. (2010), azot kısıtlamasız ortamda fosfor kısıtlaması yaratarak *Rhodospiridium toruloides* Y4'de lipid birikimini incelemişlerdir. Glukozlu ortamda C/N=6.1 ve C/P=9552 oranlarında hücresel lipid bileşimi ve lipid verimi sırasıyla %62.2 ve 0.205 g/g glukoz olarak bulunmuştur. Kraisintu vd. (2010), topraktan izole ettikleri *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 mayasını azot kısıtlamalı ortamda çoğaltarak optimum koşullarda 9.26 g/L lipid (kuru hücrenin %71.30 u) elde etmişlerdir. Hücresel lipidin ana bileşenleri %41.54 oleik asit, %22.49 palmitik asit, %15.12 linoleik asit ve 14.56 stearik asit olarak belirlenmiştir. Karatay ve Dönmez (2010), *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* ve *Rhodotorula mucilaginosa* hücrelerinin melas ortamında yüksek miktarda lipid biriktirdiklerini göstermişlerdir. *R. mucilaginosa* için en yüksek lipid miktarı ve metil ester verimi sırasıyla %69.5 ve %92.3 olarak bulunmuştur. Cheirsilp vd. (2011), *R. glutinis* mayası ve *Chlorella vulgaris* mikroalg karışık kültürünü, deniz ürünleri işleme fabrikası atığından ve şeker kamışı fabrikası melasından lipid üretimini artırmak amacıyla kullanmışlardır. Karışık kültür için lipid

üretimini en fazla yapan maya/mikroalg oranı, başlangıç pH, melas derişimi, karıştırma hızı ve ışık şiddeti değerlerinde 4.63 ± 0.15 g/L biyokütle, 2.88 ± 0.16 g/L lipid elde edilmiştir. Lipidin yağ asit bileşimi, biyodizel üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir. Zhou vd. (2013), *Rhodospordium toruloides* Y2 mayasını biyoetanol atıksuyunu arıtmada eşanlı olarak lipid açısından zenginleştirilmiş biyokütle üretiminde kullanmıştır. En uygun koşullarda hücre 3.8 g/L ve lipid miktarı da %34.9 değerindedir. Ortama kesikli beslemeli olarak glukoz eklenerek biyokütle ve lipid miktarları sırasıyla %39.5 ve %53.8 artırılmıştır. Lipidin yağ asit bileşimi bitkisel yağlara ve diğer mikrobiyal lipidlere benzer ve biyodizel üretiminde kullanılabilecek özelliktedir. Schneider vd. (2013) bira fabrikası atığını *R. glutinis* için çoğalma ortamı olarak kullanarak lipid ve karotenoid üretimlerini incelemiştir. Yüksek C/N oranının lipid birikimini desteklemesi nedeniyle, *R. glutinis*'in maltozu tüketimi güç olduğu için, sentetik bileşenler ile desteklenmiş atıktaki daha yüksek lipid birikimi olmuştur. Amaretti vd. (2010), *Rhodotorula glacialis* 11 DBVPG 4785 de -3 ile 20 °C arasında lipid oluşumunu incelemiştir. Glukoz içeren ortamda, azot kısıtlaması ile lipid birikimi başlamıştır. Karbon fazlalığı TAG üretimine pozitif etki yapmıştır. 120 g/L glukoz derişiminde çalışıldığı zaman, lipid derişimi 19 g/L, lipid/biyokütle verimi %68 ve lipid/glukoz verimi %16 olarak bulunmuştur. Sıcaklık ve glukoz derişimi arttıkça yağ asitlerinin doymamışlık derecesi de artmıştır. Zhang vd. (2011) lignoselülozik şekerlerin *R. glutinis* ile triaçilgliserollere dönüşümünü inceledikleri çalışmalarında, mikroorganizmayı önce azot zengin, sonrasında da azot kısıtlamalı ortamda çoğaltmışlardır. Çalışmada hücrelerde biriken lipid miktarı %39 a kadar çıkmıştır. Yen vd. (2015a), *Rhodotorula glutinis*'in pirinç sapı hidrolizatında çoğalmasını ve mikrobiyal lipid üretimini incelemiştir. Bu ortamda %10-20 lipid üretimi elde edilirken, ortama gliserol eklenmesiyle lipid verimi %30-40 değerlerine çıkmıştır. Çalışmada ayrıca hava kaldırmalı biyoreaktörün konvansiyonel karıştırmalı tank reaktörlere göre daha etkin olduğu bildirilmiştir. Hava kaldırmalı biyoreaktörde 30 kg/m³ indirgen şeker ve 30 kg/m³ ham gliserol eklenen ortamda 21.4 kg/m³ hücre ve 58.5 kg/m³ lipid üretilmiştir. Bir diğer çalışmada farklı sıcaklık, aydınlatma ve C/N oranı koşullarında *R. glutinis*'den karotenoid ve lipid üretimini incelenmiştir (Zhang vd., 2014a). Karanlık ve düşük sıcaklık (24 °C) koşulunda lipid içeriği yüksek iken, aydınlık ve yüksek sıcaklık (30 °C) koşulunda hücre ve karotenoid içeriği yüksektir. 5 L fermentörde lipid ve karotenoid üretimi için optimum C/N oranı sırası ile 80 ve 100 olarak bulunmuştur. Yüksek sıcaklık ve aydınlık koşulunda 28.1 g/L hücre üretilirken, düşük sıcaklık ve karanlık koşullarında C/N oranı 90 değerine ayarlandığı zaman üretilen hücre, lipid ve karotenoid değerleri sırası ile 86.2g/L, 26.7% ve 4.2mg/L olarak ölçülmüştür. Bu koşullarda hücre ve lipid verimleri %43.1 ve %11.5 olarak bildirilmiştir. Üretilen toplam lipid fraksiyonu % 79.7 18C ve %16.8 16C olarak bulunmuştur. Ölçülen toplam karotenoid fraksiyonunun ise β -

karoten (%68.4), torularodin (%21.5) ve torulen (%10.1) şeklinde dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Yen ve Liu (2014) düşük maliyetli hava kaldırmalı biyoreaktörde *R.glutinis* çoğaltmış ve yüksek havalandırma hızında hücre çoğalmasının arttığını bildirmişlerdir. 2.0 vvm havalandırma hızında 25 g/L hücre elde edilmiştir. Havalandırma hızının 2.5vvm değerine arttırıldığı koşullarda maksimum çoğalma hızının 0.22 g/L st' den 0.46 g/L st 'e arttığı gözlenmiştir. Buna karşı havalandırma hızı yerine tank iç basıncının arttırılmasının çoğalma hızını etkilenmediği bildirilmiştir. Yen vd. (2015b), *Rhodotorula mucilaginosa* mayası ile deniz suyu ortamında 5 L hava kaldırmalı biyoreaktörde hücre çoğalma parametrelerini incelemişlerdir. Saf su kullanılan ortamda 18.1 g/L hücre elde edilirken deniz suyu ortamında 17.2 g/L hücre elde edilmiştir. Buna karşın, %65 ile deniz suyu ortamında daha yüksek lipid üretilmiştir. Üretilen lipidin yağ asidi profilinde deniz suyunun etkisi gözlenmemiştir. Bir diğer çalışmada *R.glutinis*'den lipid ekstraksiyonu asit katalizli mikrodalga reaktörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Chuck vd., 2014). 120 °C ve 20 dakikada % 25 H₂SO₄ ortamında toplam lipidin %99'unun esterleştiği ve mikrodalga ışınlarının yağ asidi profilini etkilemediği gözlenmiştir. Daha yüksek katalizör derişimlerinde benzer verimin 30 saniyede gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Aynı ekstraksiyon verimi, Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile 4 saatte gerçekleşmiştir. En iyi koşullarda mikrodalga için gerekli enerjinin üretilen biyodizelin ihtiva ettiği enerji yükünden %20 daha az olduğu öne sürülmüştür. *Rhodotorula glutinis* ile yapılan bir diğer çalışmada ise biyokütle ve lipid verimini arttırmak için *Chlorella vulgaris* ile karışık kültür denenmiştir (Zhang vd., 2014b). Hava kaldırmalı biyoreaktörde gerçekleştirilen çalışmada karışık kültür ortamında, yapılan tekli kültürlerle göre hücre veriminde %17.3, toplam lipid veriminde ise %70.9 artış görülmüştür. İki farklı tür arasındaki bu sinerjestik etki O₂/CO₂ dengesi, çözünmüş oksijen ve pH düzeyleri bakımından incelenmiştir. En yüksek lipid verimi 48 saatlik karışık kültürde 2.58 g/L olarak bulunmuştur.

Zeytin karasuyu kullanılarak çeşitli mikroorganizmalar ile mikrobiyal lipid üretimine yönelik çalışmalar ise aşağıdaki makaleler ile sınırlıdır:

Papanikolaou vd. (2008), zeytin karasuyu ortamında çoğaltılan *Yarrowia lipolytica*'dan sitrik asit üretimini inceledikleri çalışmalarında, ortama zeytin karasuyu eklenmesi ile hücresel lipid miktarının arttığını ve bileşiminin değiştiğini de bildirmişlerdir. Hücresel lipid bileşimindeki C16:1/C16:0 ve C18:1/C18:0 oranları zeytin karasuyu ortamında 2-2.5 kat artmıştır. Aynı araştırma grubu, bir diğer çalışmalarında *Y. Lipolytica*'yı glukoz ile zenginleştirilmiş zeytin karasuyu ortamında ancak karbon ve azot kısıtlaması yaratarak çoğaltmışlardır. Zeytin karasuyuna adapte olmuş hücreler ile azot kısıtlamalı ortamda hücresel lipid (%34 e kadar), zeytin karasuyu içermeyen ortamda ise sitrik asit miktarı daha yüksek olmuştur. Hücresel

lipidteki yağ asit analizleri C18:1 oranının yüksek olduğunu göstermiştir (Sarris vd., 2011). Yousuf vd. (2010), zeytin karasuyunda çoğalan *Lipomyces starkey* mayasının toplam organik karbon ve toplam fenol değerlerini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir. Zeytin karasuyu fermentasyonu sırasında yüksek hücre dışı lipaz ve esteraz enzim aktiviteleri de belirlenmiş ve farklı oranlarda seyreltilmiş zeytin karasuyunda %29.5 a kadar lipid miktarı ölçülmüştür. Lipitteki yağ asitlerinin analizi ise yüksek miktarda oleik asit vermiş ve bileşimin biyodizel üretimine uygun olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, *R. glutinis* ve *R. toruloides*'in de zeytin karasuyu ortamında çoğaltıldığı, ancak lipid oluşumunun *L. starkey* in üretiminden (12.4 g/L) az olması nedeniyle bu mayalar ile çalışmaya devam edilmediği bildirilmiştir. Literatürde *R. glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında lipid biriktirmesine yönelik var olan tek çalışma budur.

2.5 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzim Üretimi

Literatürde süperoksit dismutaz ve katalazın farklı tür mikroorganizmalardan üretimine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bunlardan hiçbir zeytin karasuyu ortamında gerçekleştirilmemiştir. Zeytin karasuyu ortamında enzim üretiminde özellikle lipaz üretimi üzerine çalışılmaktadır (D'Annibale vd., 2005; Federici vd., 2009; Gonçalves vd., 2012) Aşağıda SOD ve KAT enzim üretimleri farklı mikroorganizmalar ile üretimini inceleyen çalışmalar yer almaktadır:

Tsekova ve Todorova, (2002) yaptıkları çalışmada, *Aspergillus niger*'dan SOD üretimini incelenmişlerdir. Ortama bakır eklenmesi ile enzim spesifik aktivitesi 1.6 kat artarak 90 U/mg değerine ulaşmıştır. Yan vd. (2006), *Bacillus* türleriyle yaptıkları çalışmada KAT ve SOD enzimleri üretimi üzerine çözülmüş oksijen derişimi ve menadion etkilerini incelemişlerdir. Üstel çoğalma fazının sonunda artırılan çözülmüş oksijen derişimi ve eklenen menadion ile SOD ve KAT aktivitelerinde 1.5-2.5 kat artış gözlenerek sırasıyla 55 U/mg ve 32 U/mg değerlerine ulaşılmıştır. Dellomonano vd. (2007), 28 adet maya türünde SOD aktivitesini araştırmışlar; en yüksek aktiviteyi *Kluyveromyces marxianus* ile 62 U/mg değerinde elde etmişlerdir. Üretimin artırılması amacıyla seyreltme hızı (0.067 ve 0.2 st⁻¹), havalandırma basıncı (0.3 ve 1.2 bar) ve H₂O₂ derişimi (0 ve 50 mM) etkileri incelenmiştir. Düşük seyreltme hızı, yüksek basınç ve H₂O₂ varlığı SOD aktivitesini 475 U/mg değerine yükseltmiştir. Bunun yanısıra % 60, 80 ve 90 oranında çözülmüş oksijen derişiminin incelendiği deneylerde en iyi sonuç %90 değerinde elde edilmiştir. Denizden izole edilen çeşitli maya türlerinde bulunan SOD ve KAT aktivitelerinin artırılması amacıyla yapılan bir diğer çalışmada, çoğalma ortamlarına 10 mM CuSO₄ eklenmiştir. *Cryptococcus* türü olan bir mayanın SOD aktivitesi 1 mU/μg'dan 110 mU/μg değerine çıkartılarak en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir (Abe vd.,

2001). Fungal bir tür olan *Humicola lutea* 103 ile küçük ve büyük ölçekli sistemlerde yarı kesikli üretimler gerçekleştirilmiştir. Glukozun farklı derişimleri ve ekleme sürelerinde SOD aktivitelerinin değişimi incelenmiş ve SOD aktivitesi yaklaşık 3.2 kat artırılmıştır (75 U/mg) (Krumova vd., 2007). *Debaryomyces hansenii*'den SOD üretimini inceleyen Orozco vd. (1998) ise havalandırma hızı, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı etkilerini çalışmışlardır. SOD aktivitesi puls halinde oksijen gönderilmesi ve bakır sülfat eklenmesi ile artırılmıştır. Buna göre en yüksek SOD aktiviteleri 40 °C, pH 5 ve 500 rpm karıştırma hızında bulunmuştur. Katkı maddesi olarak 0.8 mM bakır sülfat eklenmesinin ardından 30 dk sonra aktivitenin 4 kat artarak 400 U/mg değerine ulaştığı belirlenmiştir. Yan vd. (2005) fotokatalitik bir reaktör kullanarak *Bacillus sp. F26* dan KAT üretimini artırmaya çalışmışlardır. Sistemde mikroorganizma fermentörde logaritmik çoğalma fazını tamamladıktan sonra, ayrı bir sistem halinde oluşturulmuş olan fotokatalitik reaktöre beslenmiştir. Fotokatalitik reaktörde UV ışımaya ve titanyum oksit içeren bir membran yardımıyla, içinden sirküle ettirilen çözeltiye radikallerin geçmesi sağlanmıştır. Suyun UV ışımaya maruz bırakılarak biyoreaktöre gönderildiği (I), yalnızca H₂O₂'nin gönderildiği (II) ve H₂O₂'nin UV ışımaya maruz bırakılarak biyoreaktöre gönderildiği (III) üç mod arasında en yüksek KAT aktivitesi II nolu modda 24.8 U/ml olarak elde edilmiştir. *Yarrowia lypolitica* kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada Biryukova vd. (2006) üstel çoğalma fazındaki KAT ve SOD aktivitelerini incelemişlerdir. KAT için 28 U/mg ve SOD için 4.2 U/mg değerlerini elde etmişlerdir. KAT ve SOD üretiminin artırılması amacıyla, ortama H₂O₂ ve ayrıca juglone eklenmiştir. H₂O₂, KAT spesifik aktivitesini 93 U/mg değerine, SOD spesifik aktivitesini ise 6.5 U/mg değerine yükseltirken, juglone aktiviteleri sırasıyla 120 U/mg ve 21.6 U/mg değerine yükseltmiştir. Machierzynska vd. (2007) çalışmalarında farklı karbon kaynakları kullanarak *Saccharomyces cerevisiae*'nin üç suşunun SOD ve KAT aktivite değişimlerini incelemişlerdir. Gliserol, etanol ve glukozun kullanıldığı bu çalışmada en yüksek KAT ve SOD aktiviteleri 50 ve 55 U/mg olarak gliserol varlığında elde edilmiştir.

Rhodotorula glutinis'ten antioksidan enzimler SOD ve KAT üretimine yönelik sınırlı sayıda çalışmalar ise aşağıda özetlenmiştir:

R. glutinis ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları ile yapılan çalışmada, glukoz (%2) ve etanolün (%1) çoğalma ile SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir (Koleva vd., 2008). *R. glutinis*'in glukoz içeren ortamdaki hücre derişimi 7.5 g/L ve maksimum özgül çoğalma hızı 0.3 st⁻¹ iken, etanol içeren ortamda bu değerler 7.1 g/L ve 0.24 st⁻¹ olarak bulunmuştur. Elde edilen en yüksek SOD spesifik aktiviteleri glukoz içeren ortamda 29 U/mg; etanol içeren ortamda ise 30 U/mg dir. En yüksek spesifik KAT aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; etanol içeren ortam (22 U/mg) glukoz içeren ortamdaki daha yüksek aktivite sağlamıştır

(16 U/mg). *Kluyveromyces marxianus* ile her iki enzim için de 1.3 kat daha yüksek değerler elde edilmiştir. Wang vd. (2008) çalışmalarında *R. glutinis*'in çoğalma ortamı bileşiminin hücre derişimi ve SOD aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Glukoz, sukroz, maltoz ve çözünebilir nişasta (20 g/L) karbon kaynakları olarak incelendiğinde, en yüksek hücreyi 1.71 g değeri ile sukroz sağlarken en yüksek aktiviteyi 440.6 U/mg yaş hücre değeri ile maltoz sağlamıştır. Amonyum nitrat, amonyum okzalat, pepton (15 g/L), ve 'pepton (10 g/L) + maya özütü (5 g/L)' nün azot kaynağı olarak incelendiği çalışmada en yüksek yaş hücre ve SOD aktivitesi değerleri pepton içeren ortamda sırasıyla 1.6 g ve 406.8 U/mg olarak elde edilmiştir. İyonların etkisi ortama; Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , ' $Fe^{+3} + Cu^{+2}$ ', ' $Fe^{+3} + Mn^{+2}$ ' eklenerek incelenmiştir. En yüksek hücre derişimi olan 1.21 g değerine Zn^{+2} ile, en yüksek SOD aktivitesi değerine ise 418.8 U/mg yaş hücre değeri ile Fe^{+3} içeren ortamda ulaşılmıştır. Araştırma grubumuz tarafından yapılan çalışmada *R. glutinis*'ten eşanlı olarak SOD ve KAT enzimleri üretiminde sıcaklık, başlangıç pH değeri ve karbon kaynağının etkileri incelenmiş; 10 °C sıcaklığın en yüksek KAT (22.6 U/mg) ve SOD (170 U/mg) aktiviteleri verdiği; gliserolün en iyi karbon kaynağı olduğu (113 U/mg KAT ve 125 U/mg SOD) bulunmuştur (Ünlü ve Takaç, 2012). Literatürde *R. glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında SOD ve KAT ürettiğine yönelik çalışma yer almamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasallar ve Cihazlar

Ortam hazırlama ve analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıktadır. GC analizinde kullanılan gazlar yüksek saflıkta; HPLC analizlerinde kullanılan çözücüler ise kromatografik saflıktadır. Zeytin karasuyu, 2012 hasat döneminde Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi'nden (Burhaniye/Balıkesir) (iki ve üç fazlı üretim) sağlanmıştır. Projede kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Zeytin karasuyu kullanılmadan önce -30°C'da saklanmıştır. Çalışmada kullanılan cihazlar ise Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasuyunun özellikleri (pH ve toplam fenol derişimi dışındaki analizler DÜZEN-NORWEST'de yapılmıştır)

Özellik	Değer
pH	4.98
Toplam fenol derişimi	1050 mg/L
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

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Model
Laminer Akış Kabini	BiolabFaster BHG 2004-S
Sterilizatör	ALP CL-40M
Çalkalamalı Hava Banyosu	EdmundBühler TH 30; ShelLab S16R-2
GC	Shimadzu GC-2010
HPLC	Waters Alliance 2695
Biyoreaktör	Sartorius Biostat B plus Twin
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 35 R
Santrifüj	Hettich Mikro 22
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
pHmetre	Sartorius PP25
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore
Hücre Parçalayıcı	Biospec Mini Bead Beater
Etüv; Kurutucu	Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110
Işık Mikroskobu	Olympus CKX41

3.2 Mikroorganizma ve Saklama

Projede, ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) mayası kullanılmıştır. Maya, agar içeren eğik tüplerde (+4°C), petri kaplarında (+4°C) ve mikrobank™ vialerde (Pro-Lab Diagnostics Microbank™) (-30°C) saklanmış ve belli zaman aralıkları ile stok tazeleme işlemi yapılmıştır.

3.3 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu

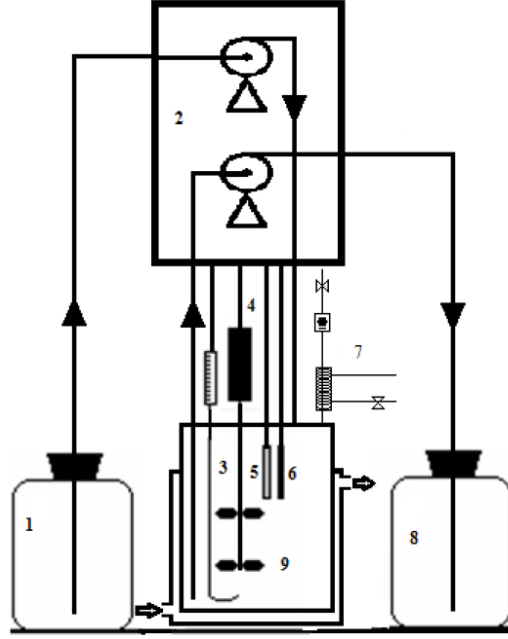
3.3.1 Çoğalma ortamları

Lipid üretiminde kullanılmak üzere *R. glutinis*'in katı agar çoğalma ortamı olarak, UYM-agar (Universal Yeast Medium) ve %100 zeytin karasuyu (ZK) içeren UYM-agar ortamları hazırlanmıştır. 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'de saklanmıştır.

Agar ortamlarında ön çoğalması yapılan hücreler serum fizyolojik ortamında homojenize edilmiştir. Ardından, çoğalma ortamlarına eşit hacimde hücre içeren serum fizyolojik aktarılarak inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin sıvı ortamlarda çoğalması ve lipid üretimi, 30°C ve 150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyolarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Biyoreaktörde çoğalma ve lipid üretimi

Biyoreaktörde *R. glutinis* hücrelerinin çoğalması ve lipid üretimi sıcaklık, karıştırma hızı, pH, gaz akış hızı ve köpük kontrol birimleri ile donanımlı biyoreaktörde toplam 2 L hacimli tanklarda incelenmiştir. Sürekli işletimde önce *R.glutinis* 1 L %25 ZK ve 1 g/L üre içeren biyoreaktör tankına inokule edilmiştir. Biyoreaktörde T=30 °C sıcaklık, N=250 rpm karıştırma hızı ve 0.6 vvm hava besleme hızı koşullarında pH sabit bir değerlere set edilmiş ve sürekli olarak steril %100 ZK beslemesi başlatılmıştır. Besleme akımı ile eş zamanlı olarak besleme hacmine eşit miktarda artırılmış ZK ortamdaki alınmıştır. Bu şekilde çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerinin asidik özellikte ZK ile set edilen değerde sabit kalması sağlanmıştır. Sürekli işletilen biyoreaktör sistemi Şekil 3.1'de yer almaktadır.



Şekil 3.1 Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) ZK tahliye şişesi; (9) Biyoreaktör tankı.

3.3.3 Kuru hücre derişimi

Ortamlardan alınan örnekler 5000 rpm'de (3200xg) 10 dk santrifüjlendikten sonra, çöken hücreler darası bilinen bir santrifüj tüpüne konularak 80 °C'de kurutulmuşlardır. Kurutma işleminden sonra santrifüj tüpündeki katının ağırlığı hassas terazide tartılarak kuru hücre derişimi mg/mL olarak hesaplanmıştır.

3.3.4 Toplam lipid miktarı

Ortamdan çöktürüldükten sonra yıkanan hücrelerdeki lipid, çözücü ekstraksiyon yöntemi ile geri kazanılmıştır. Bu amaçla, hücreler önce kloroform ve metanol eklenerek daha sonra da kloroform ve serum fizyolojik eklenerek çalkalanmış ve ortam santrifüjlenerek organik faz alınmıştır. Lipid içeren organik faz, darası bilinen cam balonlar içerisinde döner buharlaştırıcıda buharlaştırılarak kalan lipid miktarı hassas terazi ile ölçülmüştür (Bligh ve Dyer, 1959).

3.3.5 FAME analizleri

Hücrelerden ekstrakte edilen lipid için FAME analizleri gaz kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırılan lipidler 2 mL hekzan içerisinde çözülmüş, 0.2 mL 2 N KOH/metanol çözeltisi eklenmiştir. Vortekslenildikten sonra ortam santrifüjlenmiş ve üst faz GC'de analizlenmiştir. GC analiz koşulları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3 GC analiz koşulları

Enjeksiyon		
Sıcaklık	240 °C	
Taşıyıcı Gaz	He	
Basınç	261,5 kPa	
Toplam akış	124,2 mL/min	
Kolon akışı	1,2 mL/min	
Fırın		
Başlangıç sıcaklığı	100 °C	
Toplam zaman	67 dk	
Sıcaklık programı		
Artış oranı (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk)
---	100	4
3	240	12
Kolon		
Kolon adı	RT-2560	
Film inceliği	0.20 µm	
Kolon uzunluğu	100 m	
İç çap	0,25 mm ID	

3.4 Alt-proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi

3.4.1 Çoğalma ortamları

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'de saklanmıştır. Kontrol ortamı olarak UYM-agar kullanılmıştır. *R.glutinis*, UYM-agar ortamında 24 st süre ile çoğaltılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Zeytin karasuyu kullanılarak mikroorganizmanın çoğaltıldığı ve SOD ve KAT enzim üretimine çeşitli parametrelerin etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı sıvı ortam bileşimleri kullanılmıştır. Çoğalmalar, 250 mL hacimli erlenler içinde 100 mL hacminde, 30°C'de ve 150 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.

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

3.4.2 Hücre parçalama

100 mL üretim ortamı, +4°C, 10000 rpm (12000xg) koşullarında 10 dk süre ile santrifüjlenerek hücreler sıvı fazdan ayrılmıştır. Distile su ile yıkanan hücrelerin üzerlerine 5 mL fosfat tamponu (0.05 M, pH7.0) eklenmiştir. Birer 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.

3.4.3 Hücre derişimi

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

3.4.4 Protein derişimi

Hücre içi protein derişimi Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile $\lambda = 595$ nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Standart olarak bovin serum albumin (BSA) proteini kullanılarak hazırlanan kalibrasyon doğrusu EK 1'de verilmiştir.

3.4.5 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperosit dismutaz aktivitesi, Marklund'un (1974) geliştirdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 50 mM pH8.2 Tris-HCl-1mM EDTA içeren tampon içindeki 20 mM derişiminde progallol kullanılmıştır. Otooksidasyonun hızı 0.2 μ M bovin katalaz varlığında 420 nm'de absorbanstaki artış takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bir ünite SOD aktivitesi, progallol otooksidasyonunu %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

SOD aktivite hesabı için öncelikle progallolün otooksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Ölçüm ortamında 0.2 µM katalaz enzimi, 0.2 mM progallol bulunmaktadır. Bunun için 10 µM bovin katalaz enzimi stok çözeltisi ile 10 mM progallol stok çözeltisi hazırlanmıştır. Her analizde üçer kez tekrar edilerek ortalaması alınan otooksidasyon grafiği eğimi, her bir ölçüm öncesinde tekrar edilmiştir.

3.4.6 Katalaz (KAT) aktivitesi

Katalaz aktivitesi, Aebi (1984) tarafından geliştirilen yöntemine göre, H₂O₂'nin parçalanmasının izlenmesi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 0.05 M pH7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanan 10 mM H₂O₂'nin parçalanması, λ=240 nm'de 1 dk boyunca takip edilmiştir. Bir ünite katalaz aktivitesi, 25°C ve pH 7.0'de, 1 dakikada 1 mikromol H₂O₂'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.4.7 İndirgen şeker derişimi

İndirgen şeker analizi, Miller'in (1959) yayınında verilen yöntem temel alınarak yapılmıştır. Analiz için dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (10 g/L DNS, 0.5 g/L sodyum sülfid, 10 g/L sodyum hidroksit) ve sodyum potasyum tartarat (40 g/L) çözeltisi ayrı kaplarda hazırlanmıştır. 750 µL örnek (körde saf su) ile 750 µL 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. Örneklerin indirgen şeker derişim analizlerinde kullanılan ve glukoz ile hazırlanan kalibrasyon doğrusu EK 2'de verilmiştir.

3.4.8 Toplam fenol (TF) derişimi

Örnek hazırlama: Örneklerin pH değerleri %37'lik HCl ile 2'ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiştir. Döner buharlaştırıcıda etil asetatı tamamen uzaklaştırılan örnekler, daha sonra etil alkol-su karışımında (60:40) tekrar çözülmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır (Ayed vd., 2005).

Folin-Ciocalteu yöntemi: Toplam fenol analizi için, yukarıdaki aşamalardan geçirilerek 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, ağzı kapatılarak 40 °C'deki su banyosunda 30 dk tutulmuş ve örneğin λ=765 nm'de absorbansı okunmuştur.

Örneklerin toplam fenol derişimini gallik asit eşdeğeri olarak bulmak üzere hazırlanan kalibrasyon doğrusu EK 3'de verilmiştir.

3.4.9 HPLC analizleri

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin dağılımını görmek amacıyla HPLC ile analizler yapılmıştır. Bu amaçla ortamdaki 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) tekrar çözünmüştür. Daha sonra örnekler, 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Analiz koşulları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4 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°C
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector (Waters 2487)
Dalga boyu	280 nm
Taşıyıcı faz A	%70 : %30 asetonitril (ACN) : bidistile su (H ₂ O)
Taşıyıcı faz B	% 0.1 o-fosforik asit (o-H ₃ PO ₄)
Enjeksiyon hacmi	20 µL

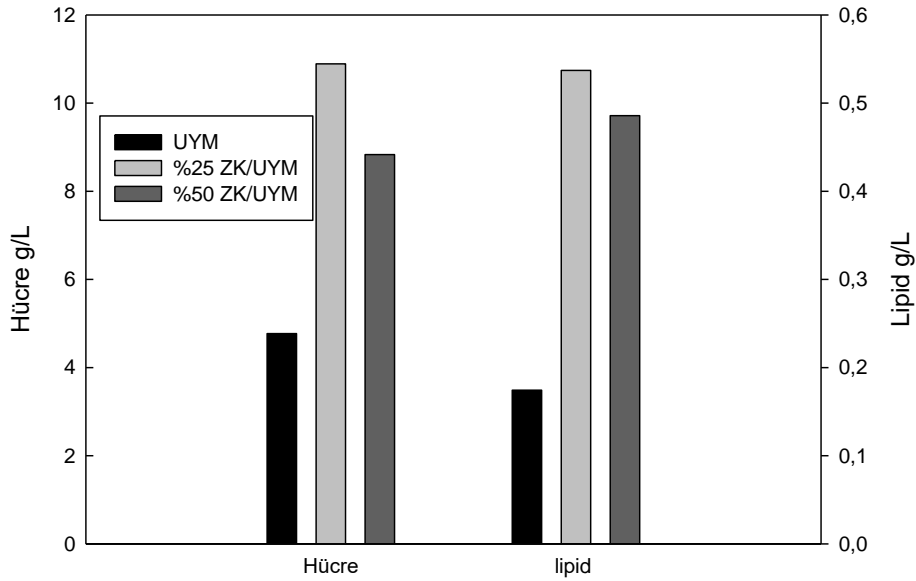
4. BULGULAR

4.1 Alt-proje 1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu

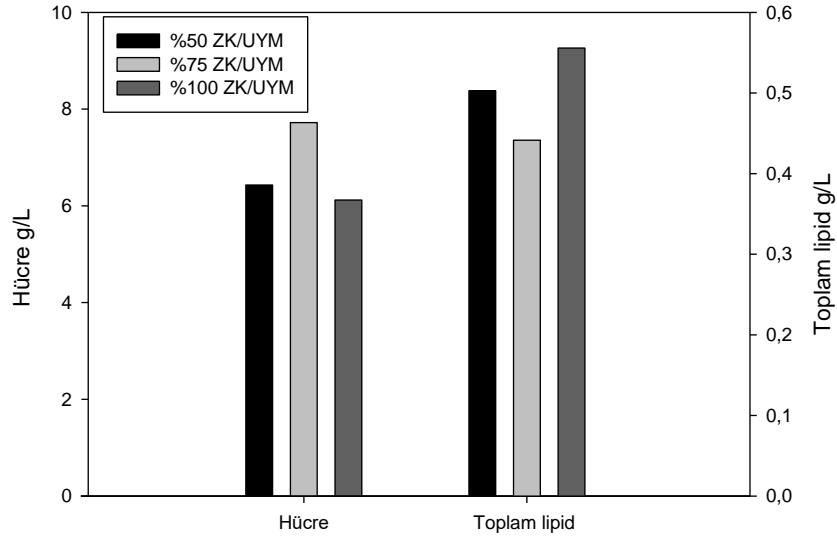
4.1.1 Farklı derişimlerde zeytin karasuyu içeren ortamda lipid üretimi

Farklı zeytin karasuyu derişimlerinde *Rhodotorula glutinis*'in çoğalması ve lipid üretimini incelemek amacıyla iki ayrı deney setinde %25, 50 75 ve 100 ZK (TF=262.5, 525, 787.5 ve 1050 mg/L) derişimlerinde çalışılmıştır. *R. glutinis*, kontrol ortamı olarak zeytin karasuyu içermeyen UYM ortamında da çoğaltılmıştır.

Şekil 4.1'de UYM, %25 ZK-UYM ve %50 ZK-UYM ortamlarında 144 st sonunda, Şekil 4.2'de ise %50, 75 ve 100 ZK-UYM ortamlarında 120 st sonunda hücrelerin derişimleri ve üretilen toplam lipid derişimleri yer almaktadır.



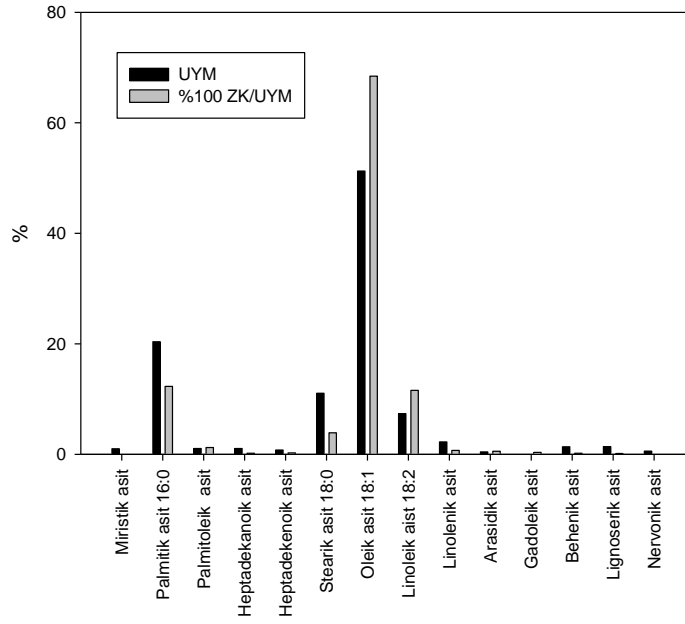
Şekil 4.1 UYM, %25 ZK-UYM ve %50 ZK-UYM ortamlarında 144 st sonunda çoğalan *R. glutinis* ve üretilen lipid derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)



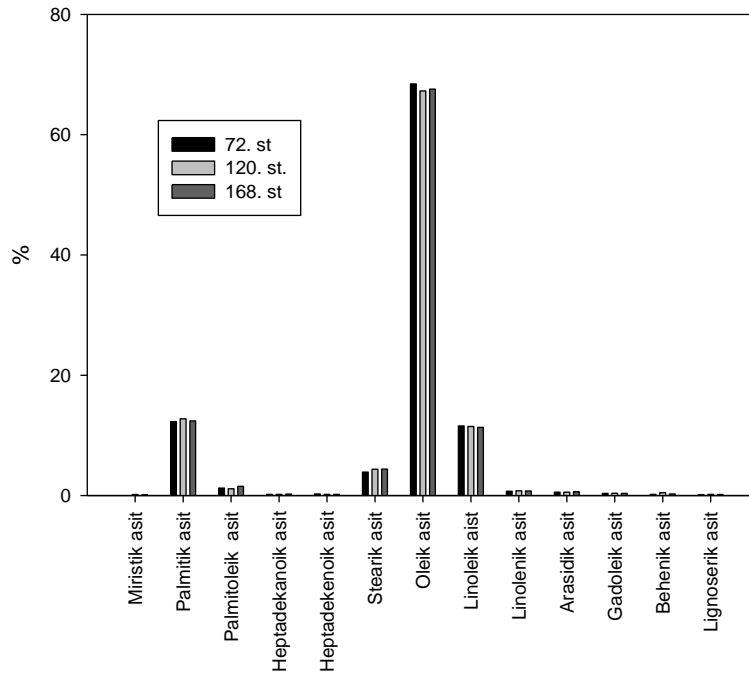
Şekil 4.2 %50, %75 ve %100 ZK-UYM ortamlarında 120 st sonunda çoğalan *R. glutinis* ve üretilen lipid derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)

ZK-UYM ortamlarında UYM ortamına göre daha fazla hücre çoğalması ve toplam lipid üretimi gözlenmiştir. Çoğalma ortamında bulunan ZK miktarının artması ile hücre derişimi %25 ZK derişimden sonra azalma göstermiştir. Üretilen toplam lipid miktarı ise %100 ZK derişiminde çoğalan hücrelerde en fazladır. Çoğalan hücre başına en fazla lipid miktarı 0.09 g/g hücre ile %100 ZK-UYM çoğalma ortamında bulunmuştur.

R. glutinis hücrelerinin ürettiği lipidin karakterizasyonu için UYM ve %100 ZK-UYM ortamında çoğalan hücrelerden ekstrakte edilen lipidin yağ asidi analizi yapılmış ve 120. saate ait değerler Şekil 4.3'te verilmiştir. ZK içeren ortamda çoğalan hücrelerde UYM ortamındakine göre oleik asit ve linoleik asit miktarları fazla; buna karşın palmitik asit ve stearik asit miktarları azdır. ZK ortamı, hücrelerin ürettiği lipidi doymuş yağ asitlerinden doymamış yağ asitlerine doğru yönlendirmiştir. Şekil 4.4'te ise %100 ZK ortamında çoğalan *R. glutinis*'in farklı çoğalma zamanlarında (72, 120 ve 168 st) ürettiği yağ asidi değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre çoğalmanın ileri zamanlarında yağ asidi dağılımında önemli bir fark yoktur.



Şekil 4.3 UYM ve %100 ZK-UYM ortamlarında çoğalan *R. glutinis* hücrelerinin ürettikleri lipidin yağ asidi dağılımı (%)



Şekil 4.4 %100 ZK-UYM ortamında çoğalan *R. glutinis*'in farklı çoğalma zamanlarında ürettiği yağ asidi dağılımı (%)

4.1.2 *R. glutinis*'ten lipid üretimine karbon ve azot kaynakları derişim (C/N) etkisi

R. glutinis hücrelerinin lipid üretimine ZK ortamına eklenen karbon ve azot kaynakları derişiminin etkisi, farklı deney setlerinde Design Expert Programı kullanılarak tasarlanan faktöriyel tasarım denemeleri ile incelenmiştir.

%25 ZK ve 1g/L üre içeren ortamda ortama eklenen glukoz derişiminin lipid üretimine etkisi

Yapılan iki parametrelili (glukoz derişimi ve zaman (çoğalma süresi)) tam faktöriyel deney tasarımında parametre aralıkları ve seviyeleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Denemenin tasarım matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları Tablo 4.2'de yer almaktadır.

Tablo 4.1 Faktöriyel tasarım parametre aralıkları ve seviyeleri

Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Levels:	
Glukoz	g/L	Categoric	0	100	Levels:	3
Zaman	Saat	Categoric	48	288	Levels:	7

Tablo 4.2 Faktöriyel tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları

Erlen No	Glukoz derişimi (g/L)	Zaman (st)	C/N mol oranı
1	0	48	0.43
2	50	48	6.92
3	100	48	13.40
4	0	96	0.43
5	50	96	6.92
6	100	96	13.40
7	0	144	0.43
8	50	144	6.92
9	100	144	13.40
10	0	192	0.43
11	50	192	6.92
12	100	192	13.40
13	0	240	0.43
14	50	240	6.92
15	100	240	13.40
16	0	288	0.43
17	50	288	6.92
18	100	288	13.40

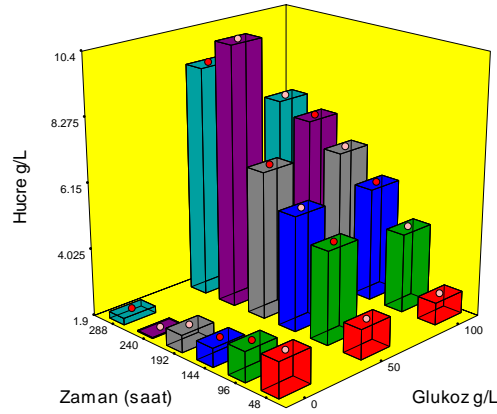
Şekil 4.5'te çoğalma ortamına eklenen glukoz derişimi ve çoğalma süresi ile kuru hücre derişimindeki değişim görölmektedir. Glukoz derişiminin 0 (C/N=0.43) değerinden 100 g/L'ye (C/N=13.41) artması ile ve çoğalma süresinin 48 st'den 288 st'e artması ile elde edilen kuru hücre derişimi artmaktadır.

Design-Expert® Software

Biyokütle

X1 = A: Glukoz

X2 = B: Zaman



Şekil 4.5 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine kuru hücre derişiminin değişimi

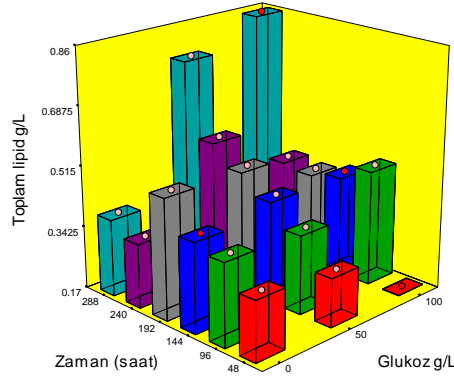
Aynı deney setinde elde edilen çoğalma süresi ve glukoz derişimi ile toplam lipid derişimindeki değişim Şekil 4.6'da yer almaktadır. Çoğalma süresi ile *R. glutinis* hücrelerinin ürettiği lipid miktarı artmış; glukoz miktarının (C/N oranının) artması ile ise çok önemli bir değişim görölmemiştir.

Design-Expert® Software

Toplam Lipid

X1 = A: Glukoz

X2 = B: Zaman



Şekil 4.6 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine toplam lipid derişiminin değişimi

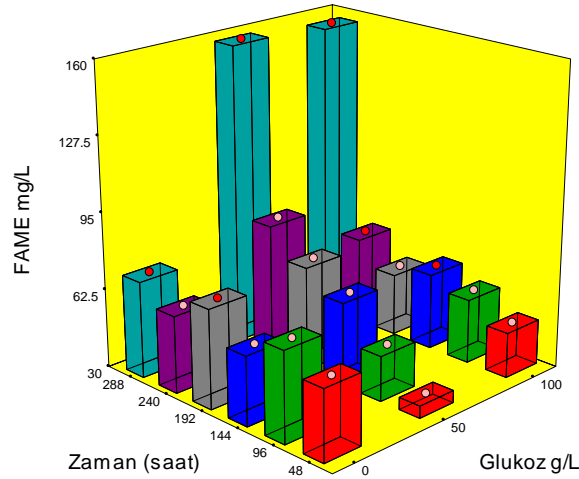
Yapılan GC analizleri FAME derişimlerini hesaplamada kullanılmıştır. Çoğalma süresi FAME derişimi üzerine -toplam lipid derişiminde olduğu gibi- glukoz derişiminden daha fazla etkilidir (Şekil 4.7). Glukoz derişiminin (C/N oranının) artması FAME derişimini önemli ölçüde etkilememiştir.

Design-Expert® Software

FAME

X1 = A: Glukoz

X2 = B: Zaman



Şekil 4.7 oğalma süresi ve glukoz derişiminin FAME derişiminin değişimi

Sonuç olarak, en yüksek lipid ve FAME miktarları 50 g/L glukoz eklenen ortamda 288. saatte sırası ile 0.78 g/L ve 158 mg/L olarak elde edilmiştir. Toplam lipid ve FAME derişimleri açısından 0-50 g/L glukoz içeren ortamların arasındaki fark, 50-100 g/L glukoz içeren ortamların arasındaki farktan daha yüksektir. Yüksek glukoz derişiminin lipid üretimine önemli bir etkisi olmamıştır.

%25 ZK ve farklı miktarlarda glukoz ve üre içeren ortamlarda C/N mol oranının lipid üretimine etkisinin merkezi kompozit deney tasarımı ile incelenmesi

Design Expert Programı yardımıyla yapılan merkezi kompozit tasarımında üç parametrelili denemenin parametre aralıkları ve seviyeleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Denemenin tasarım matrisi ve C/N mol oranları ise Tablo 4.4'te yer almaktadır.

Tablo 4.3 Deney değişkenlerine ait merkezi kompozit tasarım tablosu

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded
A	Glukoz	g/L	Numeric	36,2158577	83,7841423	-1	1
B	Üre	g/L	Numeric	1,810792885	4,189207115	-1	1
C	Zaman	Saat	Numeric	127,5656316	384,4343684	-1	1

Tablo 4.4 Merkezi kompozit tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları

Erlen No	Glukoz derişimi (g/L)	Üre derişimi (g/L)	Zaman (st)	C/N mol oranı
1	36.22	1.81	127.57	15.99
2	83.78	1.81	127.57	36.45
3	36.22	4.18	127.57	7.16
4	83.78	4.18	127.57	15.99
5	36.22	1.81	384.43	15.99
6	83.78	1.81	384.43	36.45
7	36.22	4.18	384.43	7.16
8	83.78	4.18	384.43	15.99
9	20	3	256.00	5.62
10	100	3	256.00	26.38
11	60	1	256.00	47.14
12	60	5	256.00	9.77
13	60	3	40.00	15.99
14	60	3	472.00	15.99
15	60	3	256.00	15.99
16	60	3	256.00	15.99
17	60	3	256.00	15.99
18	60	3	256.00	15.99
19	60	3	256.00	15.99
20	60	3	256.00	15.99

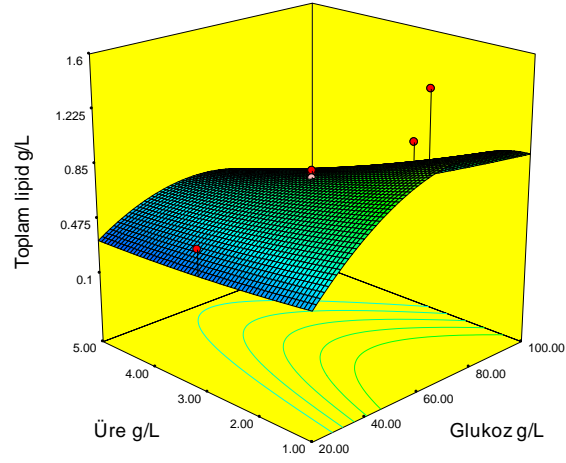
Şekil 4.8'de 70 g/L glukoz derişiminden sonra üretilen lipid miktarında artış olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte düşük üre derişimlerinde glukoz artışının etkisi yüksek üre derişimlerinden daha fazladır.

Design-Expert® Software

Toplam Lipid
1.57321
0.198571

X1 = A: Glukoz
X2 = B: Üre

Actual Factor
C: Zaman = 256.00



Şekil 4.8 Üre ve glukoz derişimine bağı olarak toplam lipid derişiminin değişimi

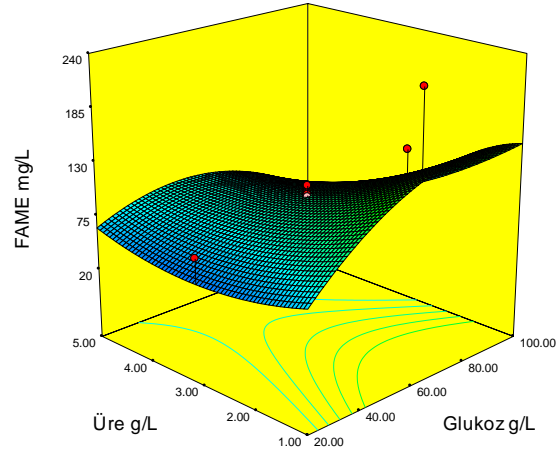
Şekil 4.9'da glukoz ve üre derişimlerindeki artışın FAME miktarına etkisinin lipid miktarına etkisi ile benzer olduğu görülmektedir.

Design-Expert® Software

FAME
237.38
20.5543

X1 = A: Glukoz
X2 = B: Üre

Actual Factor
C: Zaman = 256.00



Şekil 4.9 Üre ve glukoz derişimine bağı olarak FAME derişiminin değişimi

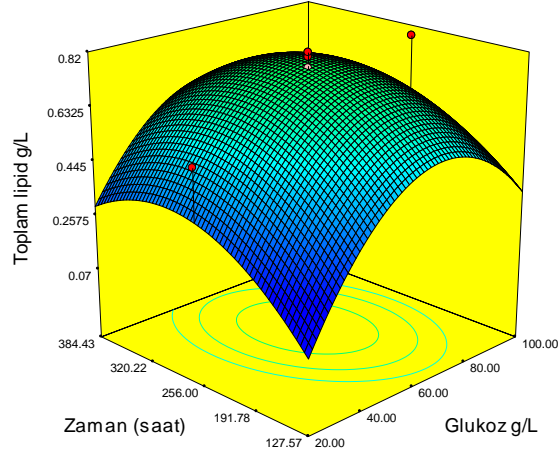
Üretilen toplam lipid ve FAME miktarlarının çoğalma süresi ve glukoz derişimi ile değişimi incelendiğinde ise hem lipid hem de FAME derişimlerinin çoğalmanın 256.saattine en fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.10, 4.11).

Design-Expert® Software

Toplam Lipid
1.57321
0.198571

X1 = A: Glukoz
X2 = C: Zaman

Actual Factor
B: Üre = 3.00



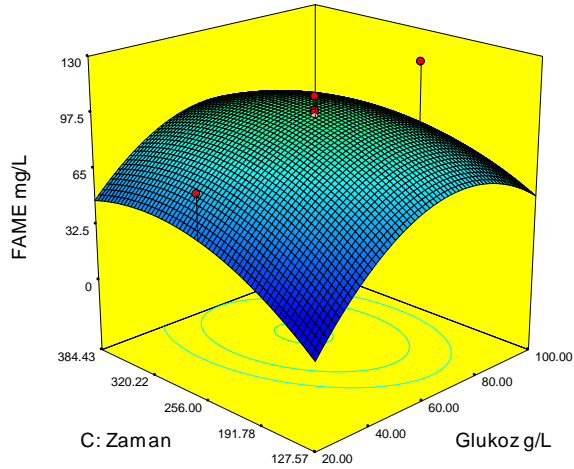
Şekil 4.10 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağılı olarak toplam lipid miktarının değişimi

Design-Expert® Software

FAME
237.38
20.5543

X1 = A: Glukoz
X2 = C: Zaman

Actual Factor
B: Üre = 3.00



Şekil 4.11 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağılı olarak FAME miktarının değişimi

%25 zeytin karasuyu ve farklı derişimlerde glukoz ve üre içeren ortamlarda yapılan deneylerde en yüksek toplam lipid ve FAME derişimleri, 60 g/L glukoz ve 1 g/L üre içeren ortamda 256. saatte, sırası ile 1.57 g/L ve 288 mg/L olarak belirlenmiştir. Tüm deneylerde ortamlarının C/N mol oranları eklenen glukoz ve üre cinsinden hesaplanmıştır. Ancak kullanılan ZK'dan gelen toplam organik karbon ve azot derişimleri eklenen değerlerin üzerinde olduğundan 0 ile 100 g/L glukoz aralığındaki değişim bile ortamın toplam C/N oranlarına çok etkili olamamaktadır.

Bu nedenle yapılan bir sonraki deneyde ortamdaki ZK yüzdesi azaltılarak glukoz desteğinin C/N oranına olan etkisi artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla ortamlar %10 ZK ile hazırlanmış, üre desteği orantılı olarak azaltılmış ve derişimi 0.4 g/L olacak şekilde eklenmiştir. Yapılan iki parametrelili deney tasarımının parametre aralıkları ve seviyeleri Tablo 4.5’de verilmiştir. Denemenin tasarım matrisi ise Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.5 Faktöriyel tasarım parametre aralıkları ve seviyeleri

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Levels:	
A	Glukoz	g/L	Categoric	0	100	Levels:	3
B	Zaman	Saat	Categoric	0	192	Levels:	5

Tablo 4.6 Faktöriyel tasarım deney matrisi ve deneylerdeki C/N mol oranları

Erlen No	Glukoz derişimi (g/L)	Zaman (saat)	C/N mol oranı
1	0	0	42
2	50	0	57
3	100	0	72
4	0	48	42
5	50	48	57
6	100	48	72
7	0	96	42
8	50	96	57
9	100	96	72
10	0	144	42
11	50	144	57
12	100	144	72
13	0	192	42
14	50	192	57
15	100	192	72

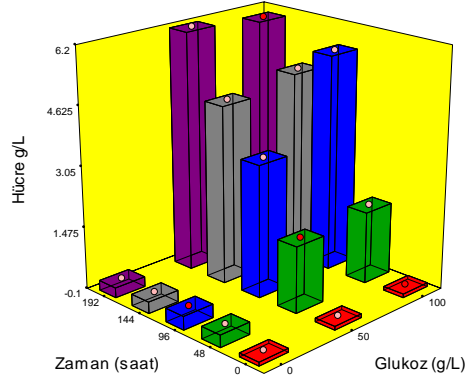
Çoğalma süresi ve glukoz derişiminin hücre derişimi üzerine etkisi Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Ortama eklenen glukoz derişiminin ve çoğalma süresinin artışı (C/N artışı) ile hücre derişimi artmaktadır.

Design-Expert® Software

Biyokütle

X1 = A: Glukoz

X2 = B: zaman



Şekil 4.12 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağı olarak kuru hücre derişiminin değişimi

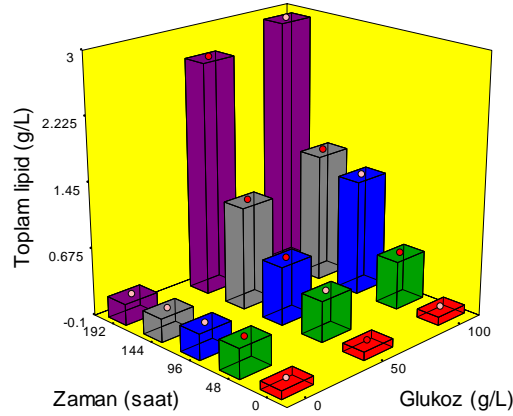
Ortamlarda çoğalan hücrelerden elde edilen toplam lipid ve FAME derişimlerinde de glukoz derişimi artışı ile artış görülmektedir (Şekil 4.13, 4.14). Ancak çoğalma süresi ile değişimler daha fazladır. ANOVA analizine göre glukoz derişimi ve zaman değişkenlerinin toplam lipid üretimi üzerine anlamlı etkileri vardır (Tablo 4.7). Üretilen en yüksek toplam lipid derişimi 50 ve 100 g/L glukoz eklenen ortamlarda 192. saatte sırasıyla 2.9 ve 2.7 g/L olarak ölçülmüştür.

Design-Expert® Software

Toplam lipid

X1 = A: Glukoz

X2 = B: zaman

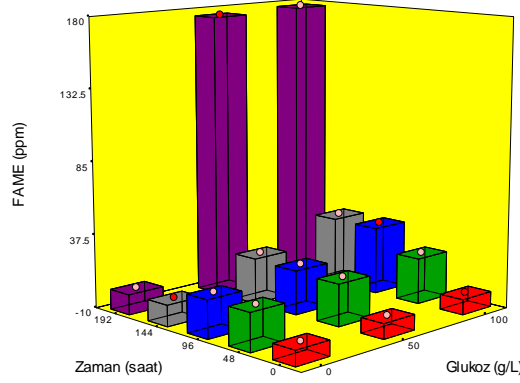


Şekil 4.13 Çoğalma süresi ve glukoz derişimine bağı olarak toplam lipid derişiminin değişimi

Design-Expert® Software

FAME

X1 = A: Glukoz
X2 = B: zaman



Şekil 4.14 Zaman ve glukoz derişimi değişkenlerine bağlı olarak FAME derişiminin (mg/L) değişimi

Tablo 4.7 oğalma süresi ve glukoz derişimi değişkenlerine bağlı olarak toplam lipid derişimi değişiminin ANOVA analizi

ANOVA for selected factorial model					
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	9.384311	6	1.564052	4.006241	0.0374
A-Glukoz	3.070074	2	1.535037	3.93192	0.0647
B-zaman	6.314237	4	1.578559	4.043401	0.0441
Residual	3.123231	8	0.390404		
Cor Total	12.50754	14			

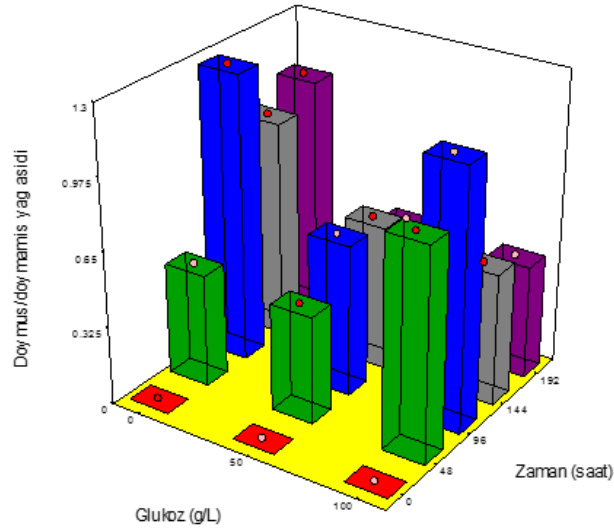
Şekil 4.15’de ortama eklenen glukoz miktarının ve çoğalma süresinin üretilen doymuş yağ asidi/doymamış yağ asidi oranına etkisi gösterilmiştir. Glukoz eklenmeyen ortamda doymuş / doymamış yağ asidi oranının 96. saate kadar arttığı ve sonra az bir azalma ile yaklaşık aynı seviyede kaldığı görülmüştür. Glukoz içeren ortamlarda ise doymuş/doymamış yağ asidi oranı glukoz içermeyen ortama göre daha düşük olmakla beraber, 50 g/L glukoz eklenen ortamın doymamışlık yüzdesi 100 g/L glukoz eklenen ortamdakine göre daha yüksektir. Ancak her iki ortamda da 96. saatten sonra doymuşluk oranının düştüğü görülmektedir. En yüksek doymamış yağ yüzdesi 50 g/L glukoz eklenen ortamda %60 olarak 48. saatte elde edilmiştir.

Design-Expert® Software

Doymus/doymamis yağ asidi

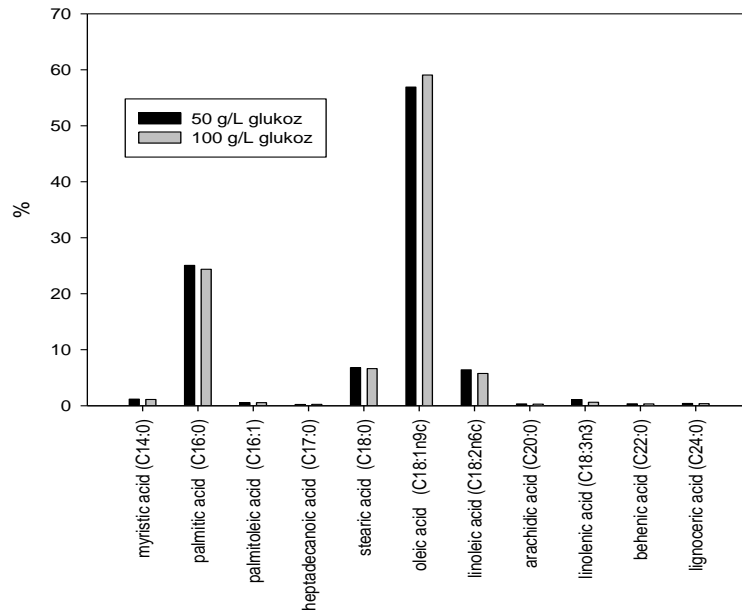
X1 = A: Glukoz

X2 = B: zaman



Şekil 4.15 Glukoz derişimi ve zamana bağlı olarak doymuş/doymamış yağ asidi oranının değişimi

Elde edilen en yüksek FAME değerleri, 50 ve 100 g/L glukoz eklenen ortamlarda 192. saatte sırası ile 28.4 ve 29.5 mg/L ortam olarak bulunmuştur. Bu ortamlara ait yağ asidi dağılımları karşılaştırıldığı zaman benzerlik gösterdikleri ve yaklaşık olarak %60 ile en yüksek yağ asidinin oleik asit olduğu görölmektedir. Bunu %25 değeri ile palmitik asit izlerken stearik asit ve linoleik asit değerleri %10'un altında görölmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 50 ve 100 g/L glukoz eklenen ortamlarda 192. saate ait yağ asidi dağılım yüzdesi

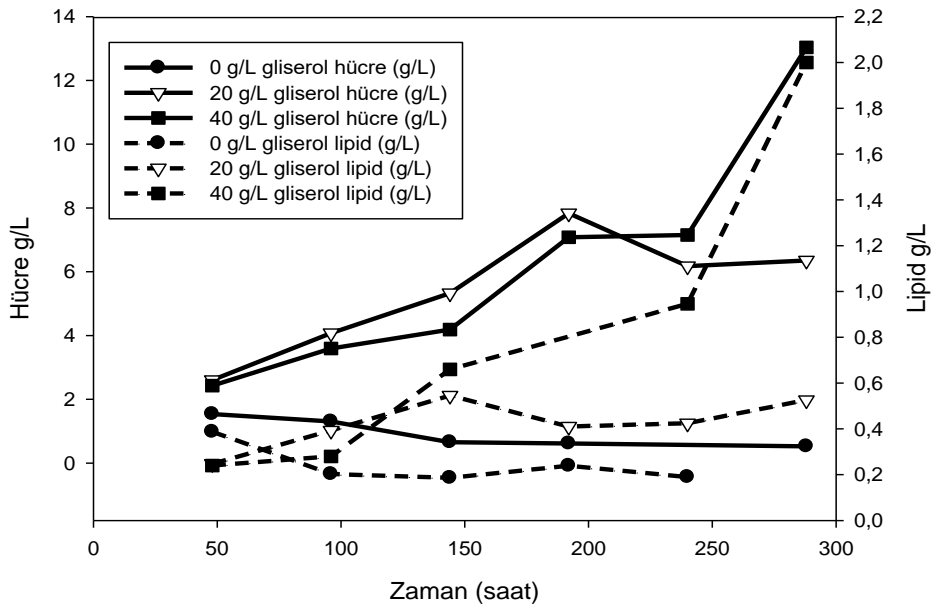
100 g/L glukoz içeren ortamın 240. saatine ait yağ asitleri dağılımını gösteren GC kromatogramı EK 4'de verilmiştir.

Ortama eklenen karbon ve azot kaynakları ile C/N oranı artırılarak yapılan çalışmalarda en yüksek lipid derişimi 0.59 g/L ve FAME derişimi 29.5 mg/L olarak %10 ZK, 0.4 g/L üre ve 100 g/L glukoz içeren ortamda (C/N=72) 192. saatte ölçülmüştür.

4.1.3 *R. glutinis*'ten lipid üretimine gliserol derişimi etkisi

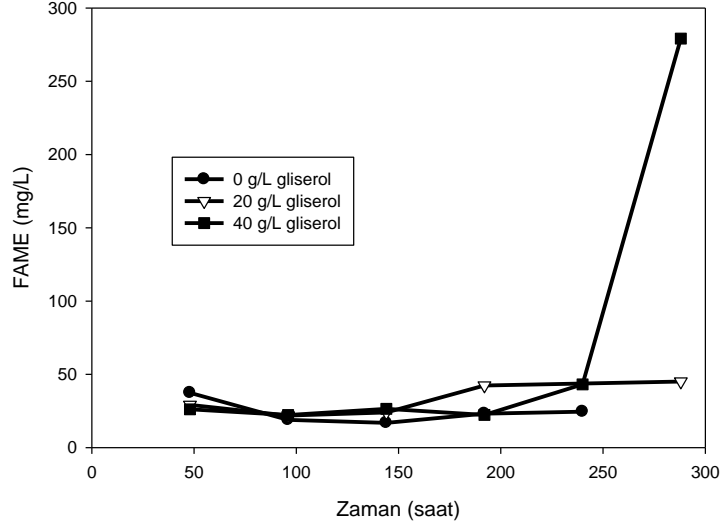
Rhodotorula glutinis'ten lipid üretimine çoğalma ortamına eklenen gliserol derişiminin etkisi, %25 ZK ve 1g/L üre içeren ortamlarda 20 ve 40 g/L gliserol değerlerinde incelenmiştir.

Şekil 4.17'de gliserol içeren ve içermeyen ortamlarda kuru hücre derişimi ile toplam lipid derişimin zaman ile değişimleri yer almaktadır. Gliserol içermeyen ortamda düşük hücre çoğalması ve lipid üretimi görülürken, hücre derişimi 20 g/L gliserol içeren ortamda en yüksek, toplam lipid derişimi ise 40 g/L gliserol içeren ortamda en yüksektir. Gliserol içermeyen ortamda çoğalan hücreler için en yüksek toplam lipid derişimi 0.48 g/L iken, 40 g/L gliserol içeren ortamda çoğalan hücreler 2.5 g/L toplam lipid üretmişlerdir.



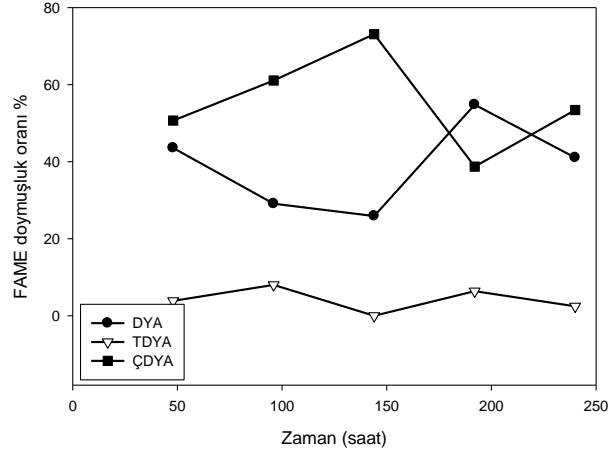
Şekil 4.17 Farklı gliserol derişimlerinde çoğalan hücreler için zamanla kuru hücre derişimi ve toplam lipid derişiminin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Sonuçlar FAME değerleri açısından incelendiği zaman, 40 g/L gliserol içeren ortamda 288. saatte bir artış görülmüştür (Şekil 4.18). Gliserol içermeyen ve 20 g/L gliserol içeren ortamdaki çoğalmalarda en yüksek FAME değerleri sırasıyla 24 ve 45 mg/L iken 40 g/L gliserol içeren ortamda 279 mg/L olarak ölçülmüştür.



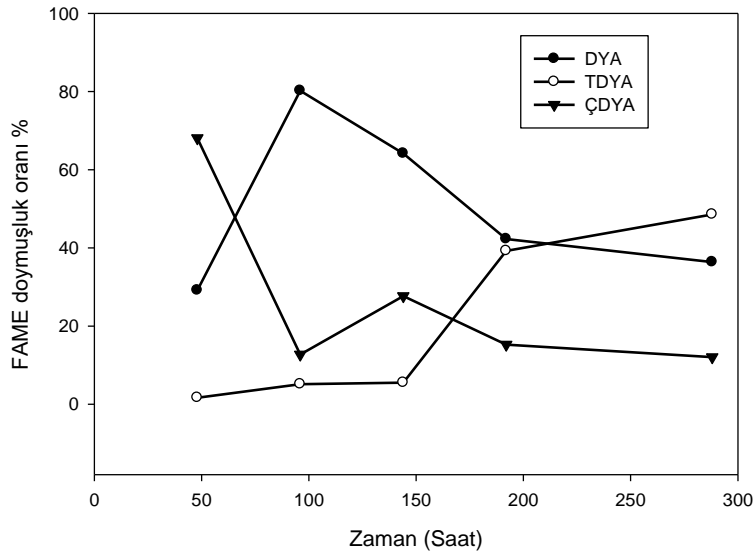
Şekil 4.18 Farklı gliserol derişimlerinde çoğalan hücreler için zamanla FAME derişiminin değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

Gliserol içermeyen ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği yağ asidi karışımının doymuş ve doymamış yağlar açısından çoğalma süresi ile değişimi incelendiği zaman; tekli doymamış yağ asitleri yüzdesinin (TDYA) önemli ölçüde değişmediği, çoklu doymamış (ÇDYA) ve doymuş yağ asitleri (DYA) arasında ters bir ilişki olduğu gözlenmektedir. Çoğalmanın 150. saatine kadar DYA oranı azalırken ÇDYA artış göstermiş daha sonra ise değişim tersine dönmüştür (Şekil 4.19).



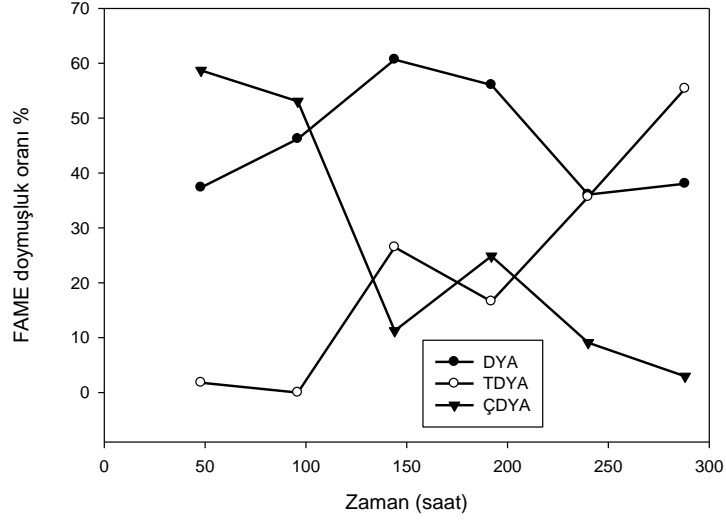
Şekil 4.19 Gliserol içermeyen ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi

20 g/L gliserol içeren ortamda gerçekleşen çoğalmalarda ise başlangıçta TDYA yüzdesi yaklaşık sabit kalırken, DYA oranı artıp ÇDYA oranı azalmıştır. İleri çoğalma sürelerinde ise DYA ve ÇDYA yüzdesinin azalıp TDYA yüzdesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.20).



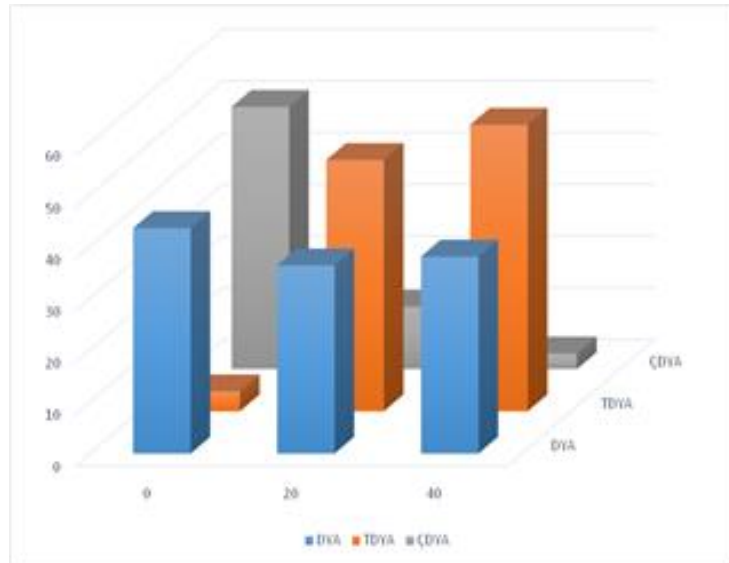
Şekil 4.20 20 g/L gliserol içeren ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi

40 g/L gliserol içeren ortamda gerçekleşen çoğalmalarda TDYA yüzdesi zamanla sürekli artarken, ÇDYA oranı artıp ÇDYA oranı azalmıştır. İleri zamanlarda hem DYA hem de ÇDYA yüzdesi zamanla azalmıştır (Şekil 4.21).



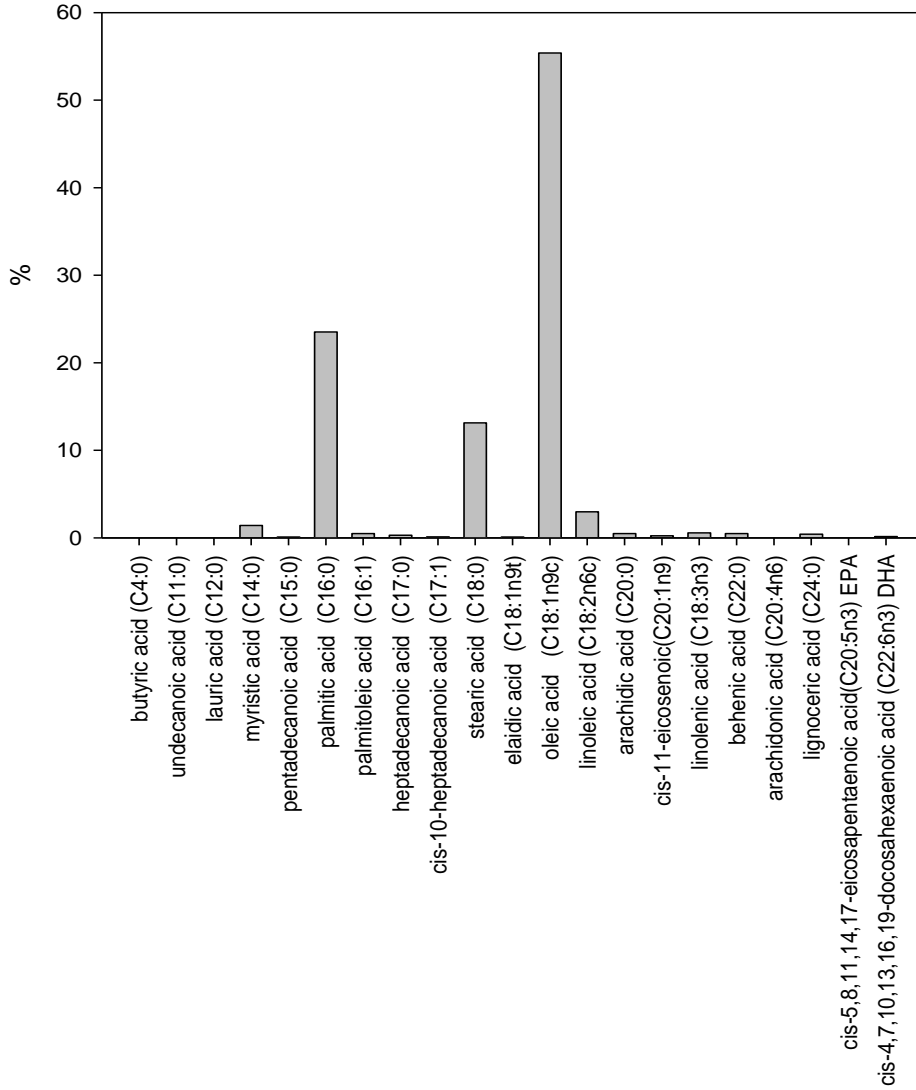
Şekil 4.21 40 g/L gliserol içeren ortamda çoğalan hücrelerin yağ asitleri doymuşluk oranının zamanla değişimi

Çalışılan ortamlarda en yüksek lipid üretimi elde edildiği saatlerdeki yağ asidi doymuşluk yüzdelerine bakıldığı zaman gliserol içermeyen ortamda ÇDYA'ların en yüksek miktarda bulunduğu (%51) görülmektedir. Gliserol içeren ortamlarda ise TDYA yüzdeleri daha yüksektir. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ortamlarda TDYA miktarları sırası ile %48 ve 55 olarak ölçülmüştür. Gliserol içermeyen, 20 ve 40 g/L gliserol içeren ortamların DYA oranları ise sırası ile %43, 36 ve 38 dir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Gliserol içermeyen, 20 ve 40 g/L gliserol içeren ortamlarda gerçekleştirilen çoğalmaların en yüksek lipid üretim zamanlarında yağ asidi doymuşluk yüzdeleri

En yüksek lipid ve FAME derişimlerinin elde edildiği 40 g/L gliserol ortamının 288. saatte oleik asit, palmitik asit ve stearik asit değerleri sırası ile % 55, 24 ve 13'tür (Şekil 4.23).

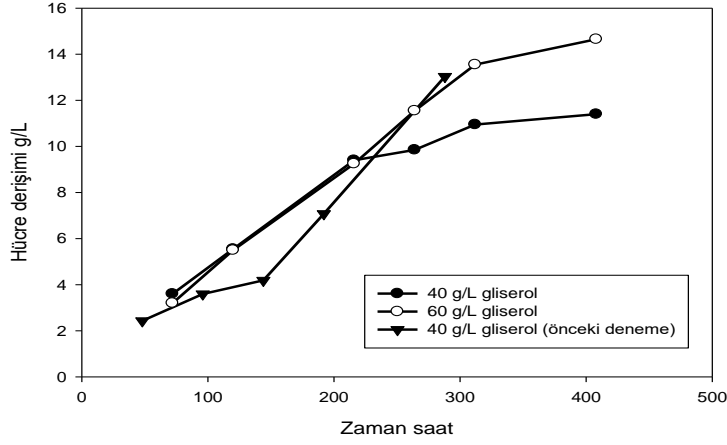


Şekil 4.23 40 g/L gliserol içeren ortamda en yüksek miktarda lipid üretimi görülen çoğalma süresinde yağ asitleri dağılımı

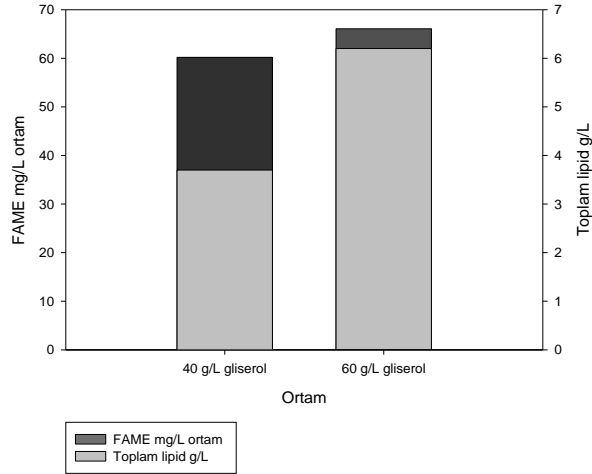
Sonuç olarak; *R. glutinis*'in ZK ortamındaki çoğalmasında gliserol katkısının hücre ve lipid üretimine önemli etkisi olduğu belirlenmiştir. 288 saat süresinde en yüksek lipid ve biyokütle üretimi 40 g/L gliserol içeren ortamda ölçülmüştür.

Çalışmada, %25 ZK ve 1 g/L üre içeren çoğalma ortamında yüksek gliserol derişim (60 g/L) etkisi ve beraberinde 40 g/L gliserol etkisinin tekrarlanabilirliği de incelenmiştir. 400 st süren üretimler sonunda 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda sırası ile 14 ve 12 g/L hücre (Şekil

4.24) ile 3.7 ve 6.2 g/L (0.26 g/g kuru hücre; %26 ve 0.52 g/g kuru hücre; %52) toplam lipid derişimleri (Şekil 4.25) ölçülmüştür. FAME değerleri ise 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda sırasıyla 60 ve 66 mg/L ortamdır (Şekil 4.25). FAME derişimi açısından her iki ortam arasında önemli fark belirlenmemiştir. 60 g/L ortamında elde edilen FAME kompozisyonu %56 oleik asit, %19 palmitik asit ve %10 stearik asit olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.24 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda hücre derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



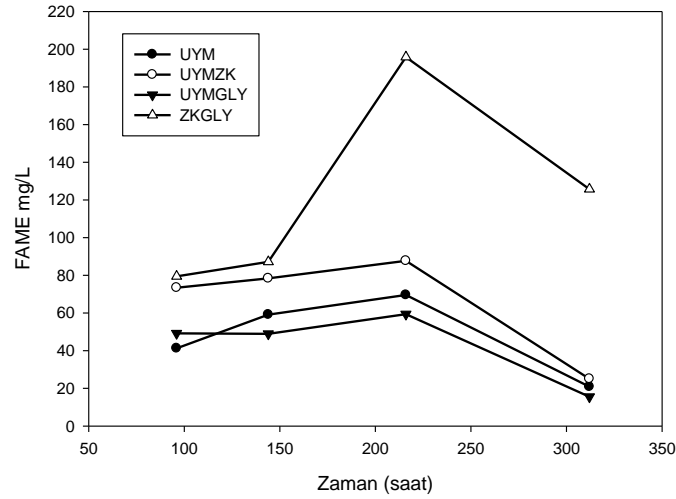
Şekil 4.25 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda t=400 st çoğalma sonunda toplam lipid ve FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)

4.1.4 Zeytin karasuyu ve gliserolün üretilen FAME kompozisyonuna etkisi

Çoğalma ortamında bulunan zeytin karasuyu ve eklenen gliserolün *R. glutinis*'in ürettiği lipidin yağ asit kompozisyonuna etkisini belirlemek amacıyla hücreler dört farklı ortamda çoğaltılmış

ve hücre derişimi ile FAME derişiminin zaman ile değişimleri izlenmiştir. Bu ortamlar: 1) UYM (kontrol ortamı), 2) UYMZK (%25 ZK içeren UYM ortamı), 3) UYMGLY (20 g/L gliserol içeren UYM ortamı) ve 4) ZKGLY (20 g/L gliserol içeren %25 ZK) dır.

312 st süren çoğalmanda en yüksek hücre derişimi gliserol içeren UYM ortamında (UYMGLY) elde edilmiştir (9 g/L). Bunu sırası ile ZKGLY (6.3 g/L) ve UYM (5.06 g/L) ortamları izlemiş ve en az hücre derişimi UYMZK ortamında (4.29 g/L) ölçülmüştür. Bu ortamlarda elde edilen FAME derişimleri karşılaştırıldığı zaman ise en yüksek değerler ZKGLY ortamında görülmüş; diğer ortamların derişimleri ise daha düşük ve birbirlerine yakın değişmiştir (Şekil 4.26). Gliserol varlığı hücre çoğalmasını, gliserol ve ZK varlığı da lipid oluşumunu artırmaktadır.



Şekil 4.26 Zeytin karasuyu ve gliserolün etkisini gösteren farklı ortamların FAME derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

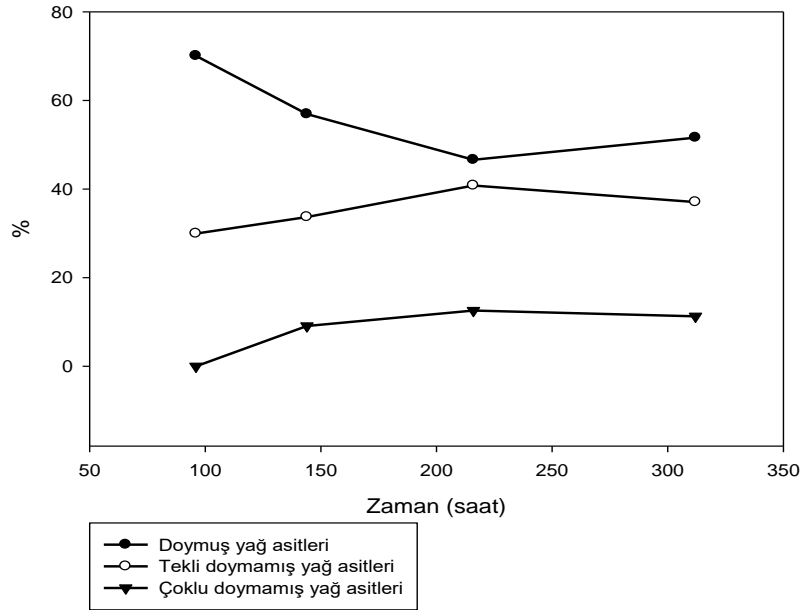
En yüksek FAME derişimlerinin ölçüldüğü t=216. saatteki yağ asidi kompozisyonları incelendiği zaman, UYM ortamında %35 olan oleik asit miktarının ortama ZK ve gliserol eklendiği zaman sırasıyla %57 ve 52 değerine yükseldiği görülmüştür (Tablo 4.8). Bu artışlar, toplam lipidin doymamışlık oranını da yükseltmektedir. ZK ve gliserolü birlikte içeren ortamda da benzer şekilde oleik asit miktarı yüksek ve %55 civarındadır. UYM ortamında ZK'nın bulunması linoleik asit miktarını etkilemezken, gliserolün bulunması %12'den %4'e düşürerek %8 lik bir doymamış yağ kaybına neden olmaktadır. Gliserolün bu etkisi ZKGLY ortamındaki linoleik asit miktarının azalmasıyla da görülmektedir. Linolenik asit ise sadece ZK içeren ortamlarda ve % 0.5-1 oranlarında görülmektedir. Bu nedenle ZK'nın doymamış yağ asidi

üretimi üzerine etkisinin önemli olduğu söylenebilir. Diğer yağ asitlerinin düzeyleri ise %1'in altında ölçülmüştür.

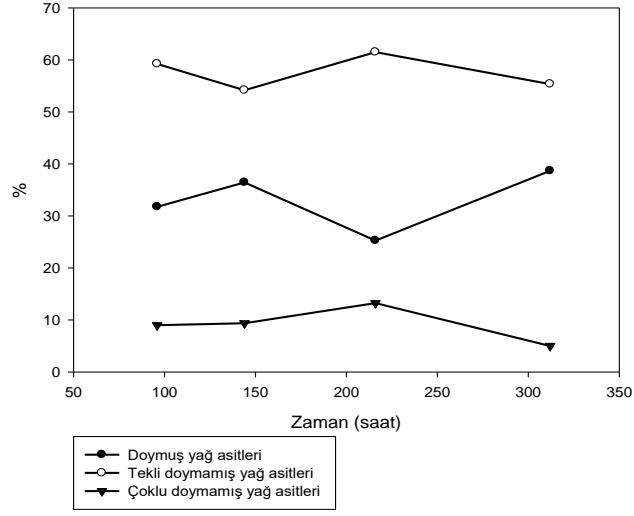
Yağ asidi kompozisyonunun doymuşluk, tekli ve çoklu doymamışlık açısından zaman ile değişimleri ise Şekil 4.27-4.30'da verilmiştir. Gliserol ve zeytin karasuyu bulunan ortamlarda doymuş, tekli doymuş ve çoklu doymuş yağ asit yüzdeleri zaman ile önemli ölçüde değişmemektedir.

Tablo 4.8 Farklı ortamlara R. glutinis'in ürettiği üretilen lipidlerde yağ asidi dağılımı

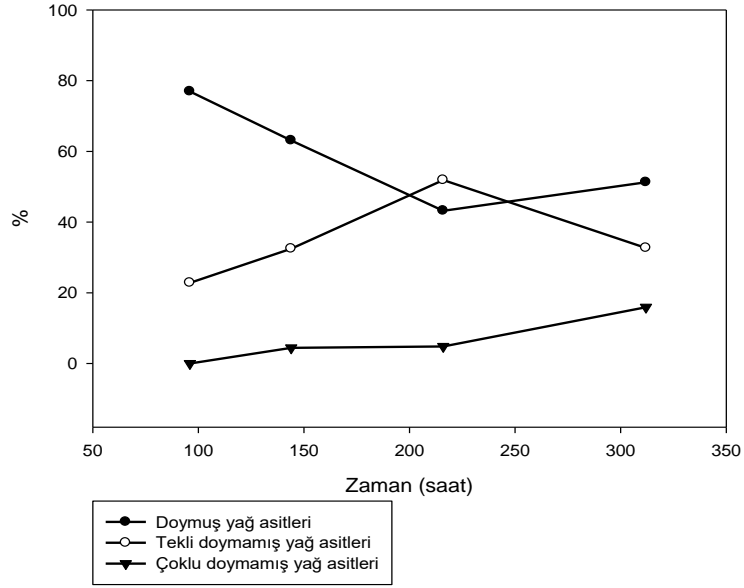
	UYM	UYMZK	UYMGLY	ZKGLY
Palmitik asit (C16:0)	23.88	16.00	23.31	21.71
Palmitoleik asit (C16:1)	0.000	0.000	0.000	0.88
Stearik asit (C18:0)	22.72	9.25	19.87	10.84
Oleik asit (C18:1)	34.77	56.96	51.89	54.59
Linoleik asit (C18:2)	12.58	12.04	4.82	8.00
Linolenik asit (C18:3)	0.000	1.19	0.00	0.58



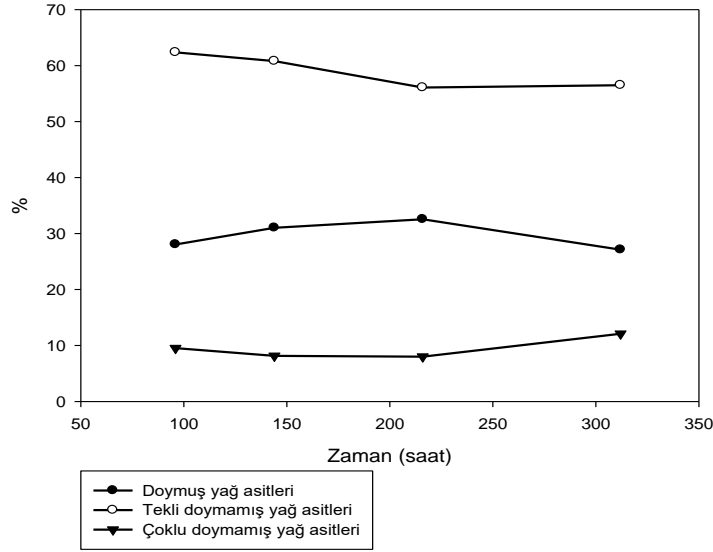
Şekil 4.27 UYM ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.28 UYMZK ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.29 UYMGLY ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.30 ZKGLY ortamında çoğalan hücrelerin ürettiği lipidin yağ asidi doymuşluk yüzdesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

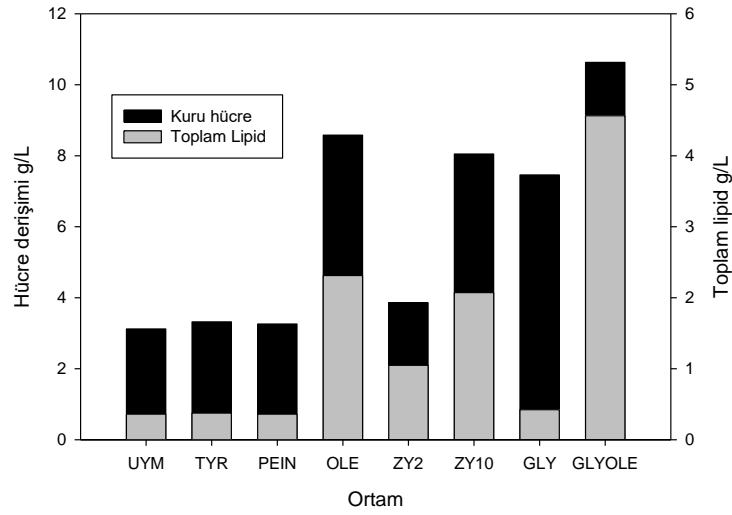
4.1.5 Zeytin karasuyu bileşimindeki maddelerin lipid üretimine etkisi

R. glutinis'in çoğalma ortamına eklenen zeytin karasuyunun, hücrelerin biriktirdiği doymamış yağ asit oranını UYM ortamındakine göre artırdığının belirlenmesi üzerine ZK'da bulunan bazı fenolik maddeler, oleik asit ve zeytinyağı, UYM ortamına ayrı ayrı eklenerek bu ortamlarda hücre çoğalması, üretilen lipid miktarları ve yağ asit kompozisyonları ölçülmüştür. Etkileri incelenen ortam bileşenleri ve derişimleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Bu bileşenler belirlenirken kullanılan ZK içindeki toplam fenol derişimi (1050 mg/L) ve fenolik madde kompozisyonu (Takaç, 2011) ile ZK içindeki ölçülen zeytinyağı derişiminin 1.98 g/L olduğu göz önüne alınmıştır.

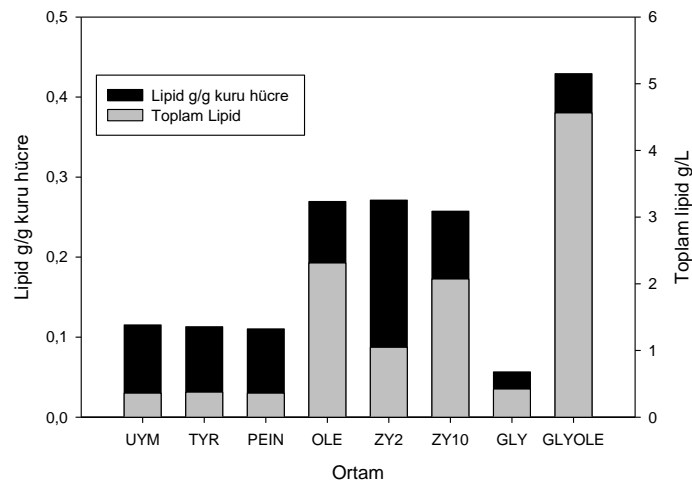
Tablo 4.9 UYM çoğalma ortamına eklenen katkı maddeleri ve derişimleri

Ortam	Katkı maddesi	Derişim
UYM	-	-
TYR	tirozol	250 mg/L
PEIN	oleuropein	250 mg/L
OLE	oleik asit	10 g/L
ZY2	zeytinyağı	2 g/L
ZY10	zeytinyağı	10 g/L
GLY	gliserol	20 g/L
GLYOLE	gliserol + oleik asit	20 g/L+10 g/L

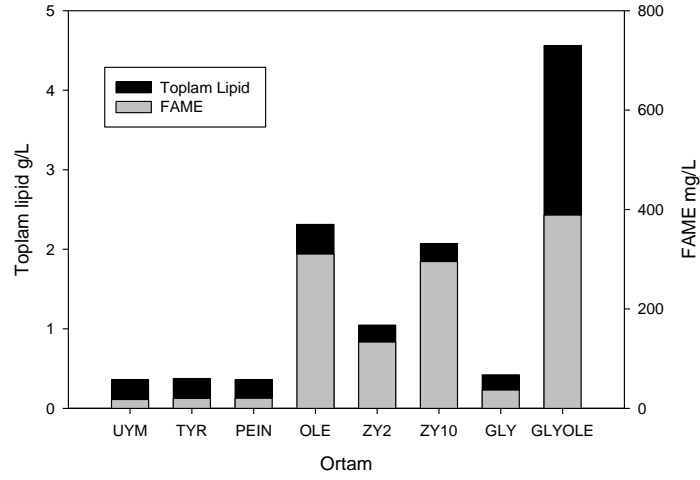
Tablo 4.9'da verilen ortamlarda 120 saat süre ile gerçekleştirilen çoğalma sonunda ulaşılan kuru hücre ve toplam lipid derişimleri Şekil 4.31'de; kuru hücre başına üretilen toplam lipid miktarları ise Şekil 4.32'de verilmiştir. İncelenen ortamlar arasında en yüksek hücre ve toplam lipid derişimlerine oleik asit ve zeytinyağı eklenen ortamlarda ulaşılmıştır. En yüksek FAME derişimi de benzer şekilde oleik asit ve zeytinyağı eklenen ortamlardaki çoğalmalarda elde edilmiştir (Şekil 4.33, Şekil 4.34).



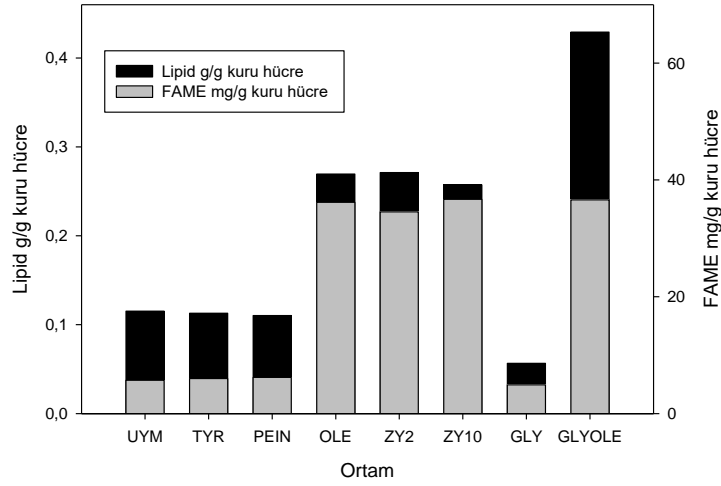
Şekil 4.31 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin hücre ve toplam lipid derişimlerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)



Şekil 4.32 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin toplam lipid derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)



Şekil 4.33 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin toplam lipid ve FAME derişimlerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)



Şekil 4.34 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin kuru hücre başına toplam lipid ve FAME derişimlerine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm, t=120 st)

Farklı bileşen içeren ortamlardaki çoğalmalarda hücrelerdeki yağ asidi dağılımı ise Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10 Çoğalma ortamına eklenen ZK bileşenlerinin lipiddeki yağ asitlerinin doymuşluk yüzdelerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)

Ortam	Doymuş yağ asitleri (%)	Tekli doymamış yağ asitleri (%)	Çoklu doymamış yağ asitleri (%)
UYM	65.30	27.52	7.18
TYR	61.60	28.79	9.61
PEIN	62.68	29.01	8.31
OLE	11.78	78.26	9.63
ZY2	19.75	68.12	11.83
ZY10	22.41	76.03	1.56
GLY	52.93	42.68	4.39
GLYOLE	12.48	76.68	10.58

Katkı maddeleri etkisinin incelendiği deneylerde, en yüksek hücre, toplam lipid ve FAME derişimleri sırası ile 10.63 g/L, 4.56 g/L ve 444 mg/L olarak GLYOLE ortamında ölçülmüştür. Kuru hücre başına üretilen lipid miktarı açısından bakıldığı zaman da GLYOLE ortamı 0.43 g/g kuru hücre (%43) ile en yüksek verime sahiptir. Ancak kuru hücre başına FAME düzeyleri açısından OLE, ZY2, ZY10 ve GLYOLE ortamları arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Şekil 4.34). Bu, GLYOLE ortamında bulunan gliserol nedeniyle; hücre içine alınarak depolanmış ya da açillenmiş formaki gliserolün ölçülen toplam lipid derişimine etkisi olarak değerlendirilmiştir. FAME analizlerinde ise yağ asitleri açillenmiş formdan esterleşerek ayrıldıkları için gliserol varlığı sonuçları etkilememiştir. Toplam lipid ve FAME derişimleri açısından OLE, GLY ve GLYOLE ortamları incelenirse en düşük üretimin GLY ortamında olduğu görülmektedir (Şekil 4.33). Ancak OLE ve GLYOLE ortamları karşılaştırıldığı zaman gliserolün toplam lipid ve FAME miktarlarını arttırdığı görülmektedir. Gliserol içeren ortamda toplam lipid derişimi düşük olmasına rağmen hücre derişimi miktarı yüksektir. Bu nedenle kuru hücre başına en düşük toplam lipid üretimi 0.056 g/g hücre ile bu ortamda ölçülmüştür. İçerdikleri zeytinyağı ve oleik asit bakımından birbirine denk olan ZY10 ve OLE ortamlarında ise eşit miktarlarda lipid ve FAME değerleri ölçülmüştür. Hücre başına FAME ve lipid derişimleri de benzerdir. Az miktarda zeytinyağı içeren ZY2 ortamında ise daha düşük düzeylerde lipid ve FAME değerleri ölçülmüştür. Buna karşın, kuru hücre başına hesaplanan lipid derişimleri aynıdır (Şekil 4.34). ZK'da bulunan fenolik maddeler tirozol ile oleuropeinin ise toplam lipid ve FAME derişimleri ile yağ asidi dağılımı üzerine etkilerinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.32,

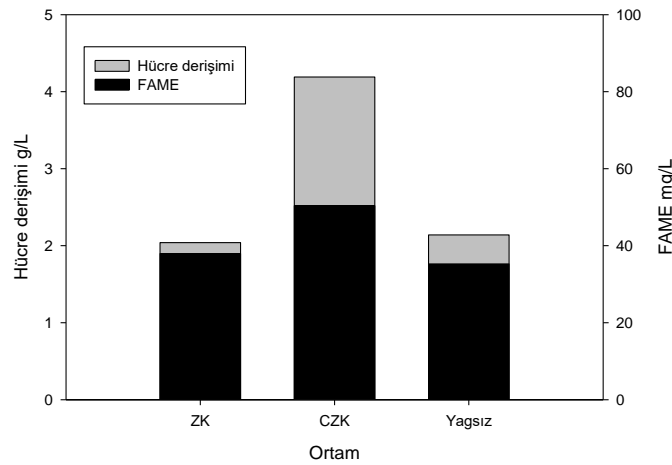
Tablo 4.10). Doymuşluk düzeyleri açısından incelendiğinde OLE, ZY10 ve GLYOLE ortamları %76 ile en yüksek tekli doymamışlık yüzdesine sahiptir. UYM ortamına gliserol katkısı ile doymuş yağ asitleri oranının az miktarda azalırken tekli doymamış yağ asidi miktarı artmaktadır. Çoklu doymamış yağ asidi oranının en yüksek olduğu ortam ise %11.8 ile ZY2'dir.

4.1.6 Zeytin karasuyuna uygulanan önışlemin lipid üretimine etkisi

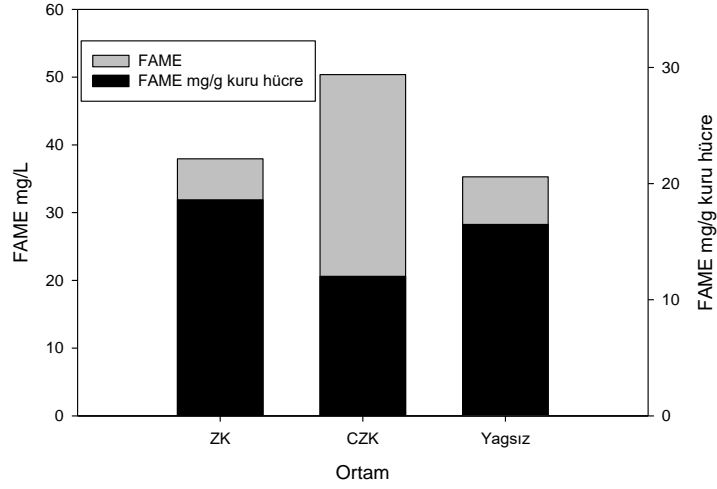
Zeytin karasuyunun hücreler tarafından kullanımı zor olan bileşiminin değiştirilmesi için zeytin karasuyuna iki farklı önışlem uygulanarak önışlem görmüş ortamlarda hücre çoğalması, FAME derişimi ve yağ asit dağılımı incelenmiştir. Birinci önışlemden ZK bir diğer projemizde belirlenen yöntem ile (Takaç, 2012) cibre ile muamele edilerek toplam fenol derişimi azaltılmış; ikinci önışlemden ise ZK'nın hekzan ile içerdiği yağ uzaklaştırılmıştır. Önışlem sonrası *R. glutinis* hücreleri Tablo 4.11'de verilen ortamlarda çoğaltılarak 120 st çoğalma sonundaki hücre, toplam lipid ve yağ asit dağılımları belirlenmiştir. Ulaşılan hücre ve FAME derişimleri Şekil 4.35'de, kuru hücre başına FAME miktarları ise Şekil 4.36'da verilmiştir.

Tablo 4.11 Zeytin karasuyuna uygulanan önışlemler ve çoğalmanda kullanılan ortam bileşimleri

Ortam	Önışlem	Çoğalma ortamı bileşimi
ZK	-	%25 ZK, 1g/L üre
CZK	Cibre/ZK karışımı (1:3 a/h), 323 dk, 150 rpm, 30°C	%25 CZK, 1g/L üre
Yağsız	ZK/hekzan (1:1 h/h) x 3, santrifüj	%25 yağsız ZK, 1g/L üre



Şekil 4.35 Önışlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda ulaşılan hücre ve FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)



Şekil 4.36 Önişlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda ulaşılan FAME derişimleri (T=30°C, N=150 rpm, t=120 st)

En yüksek hücre ve FAME derişimleri sırası ile 4.19 g/L ve 50 mg/L olarak cibre ile önişlem görmüş CZK ortamında ölçülmüştür. Kuru hücre başına üretilen en yüksek lipid miktarı da 0.083 mg/g değeri ile CZK ortamında elde edilmiştir.

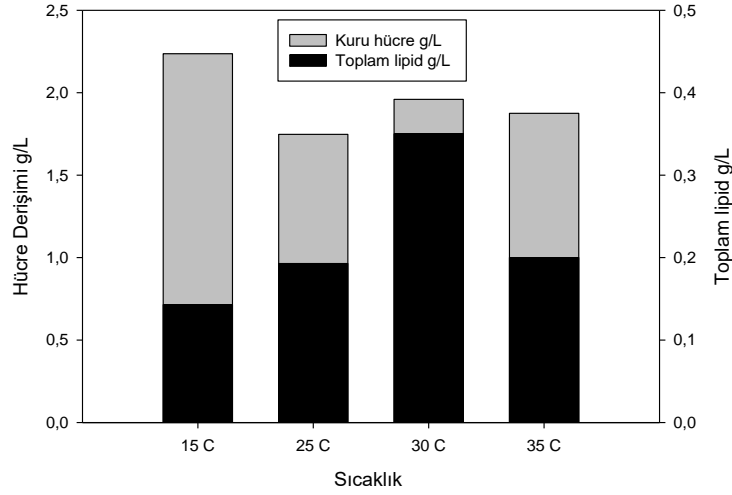
Ortalarda üretilen lipidin yağ asidi dağılımında ise en düşük doymamışlık oranı %22 ile CZK ortamında görülmüştür (Tablo 4.12). ZK ve yağı uzaklaştırılmış ZK ortamlarında doymuş ve tekli doymamış yağ asidi yüzdeleri aynıdır. Tekli doymamış yağ asitleri, ZK ve yağı uzaklaştırılmış ZK ortamlarındaki çoğalmalarda %55 ile en yüksek düzeydedir.

Tablo 4.12 Önişlem görmüş ZK ile yapılan çoğalmalarda üretilen yağ asidi doymamışlık oranları

Ortam	Doymuş yağ asitleri (%)	Tekli doymamış yağ asitleri (%)	Çoklu doymamış yağ asitleri (%)
ZK	26	55	19
CZK	22	41	37
Yağsız	25	55	19

4.1.7 Sıcaklık etkisi

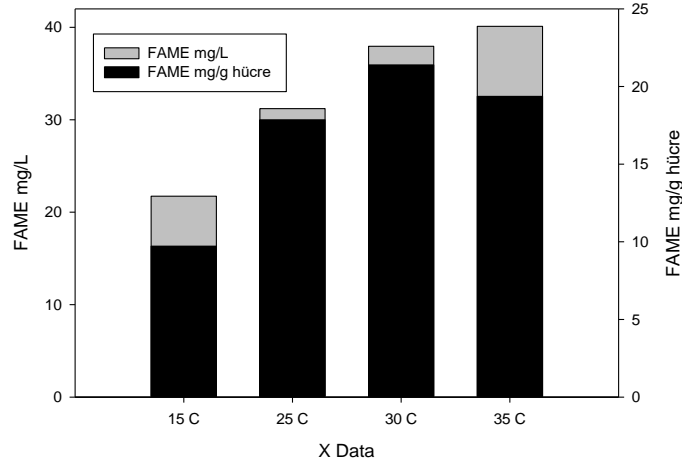
Zeytin karasuyu ortamında *R. glutinis*'ten lipid üretimine sıcaklığın etkisi, 15, 25, 30 ve 35 °C de yapılan çoğalmalar ile incelenmiştir. Çoğalma ortam bileşimi %25 ZK ve 1 g/L üredir. Farklı sıcaklıklara ait t=120 st için hücre ve toplam lipid derişimleri Şekil 4.37'de verilmiştir.



Şekil 4.37 Sıcaklığın hücre derişimi ve toplam lipid derişimine etkisi (N=150 rpm)

Düşük sıcaklıkta (15 °C) çoğalan hücre miktarı en yüksek iken 25, 30 ve 35 °C sıcaklıklarda önemli bir fark gözlenmemiştir. Toplam lipid derişimi ise sıcaklık artışı ile artmakta, 35 °C'da düşmektedir. Literatürde, *R. glutinis*'in 15-37 °C arasında çoğaldığı ve en yüksek hücre derişiminin 15 °C de elde edildiğini bildiren çalışma yer almaktadır (Latha vd., 2005).

FAME derişimleri de lipid derişimleri ile uyumlu olarak çoğalma sıcaklığı ile artmaktadır (Şekil 4.38). Sıcaklık artışıyla genel olarak; palmitik asit yüzdesinin azaldığı, oleik asit yüzdesinin arttığı, çoklu doymamışlık içeren linoleik ve linolenik asitlerin yüzdelерinin ise azaldıkları görülmektedir (Tablo 4.13). Bu değişim, *R. glutinis*'in düşük ortam sıcaklıklarında hücre içi viskozitesini dengelemek için C18:1 ve C18:2 yağ asitleri arasında metabolik geçişler yaptığının göstergesi olarak değerlendirilebilir.



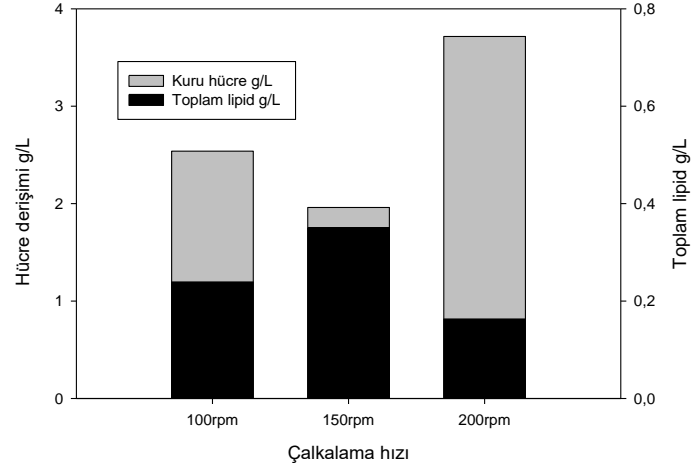
Şekil 4.38 Sıcaklığın FAME derişimine etkisi (N=150 rpm)

Tablo 4.13 Farklı sıcaklıklarda üretilen lipidin FAME kompozisyonu

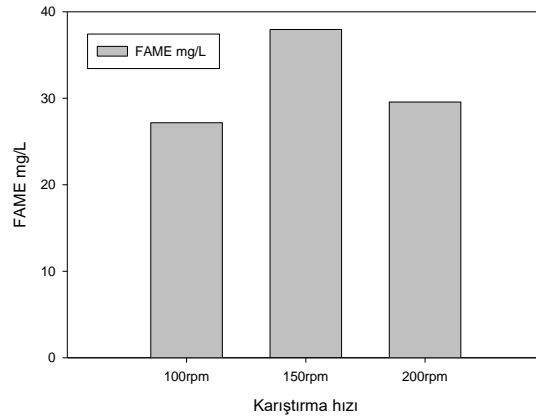
Yağ asidi	Ortam sıcaklığı (°C), %			
	15	25	30	35
Palmitik asit (C16:0)	17	15	17	13
Palmitoleik asit (C16:1)	1	1	0	1
Stearik asit (C18:0)	7	5	6	6
Oleik asit (C18:1)	55	61	55	66
Linoleik asit (C18:2)	14	10	10	11
Linolenik asit (C18:3)	3	1	1	1

4.1.8 Karıştırma hızı etkisi

Karıştırma hızının *R.glutinis* ile ZK ortamında lipid üretimine ve FAME dağılımına etkisi 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızlarında incelenmiştir. Çoğalma ortamı bileşimi %25 ZK ve 1g/L üredir. Farklı karıştırma hızlarına ait hücre ve toplam lipid derişimleri Şekil 4.39'da verilmiştir. 200 rpm'de hücre derişimi yüksek, 150 rpm'de ise lipid ve FAME derişimleri yüksek değerdedir (Şekil 4.40). Sonuçlar, karıştırma hızı ile artan oksijen aktarımının hücre derişimini artırdığı ancak stres koşulunun ortadan kalkması ile lipid üretiminin azaldığını göstermektedir.



Şekil 4.39 Karıştırma hızının hücre derişimi ve toplam lipid derişimine etkisi (T=30 °C)



Şekil 4.40 Karıştırma hızının FAME derişimine etkisi (T=30 °C)

4.1.9 Biyoreaktörde çoğalma ve lipid üretimi

Biyoreaktörde sürekli işletim ile zeytin karasuyu ortamında *Rhodotorula glutinis*'in çoğalması ve lipid üretiminin incelenmesi için öncelikle farklı sabit pH koşullarında çalışılarak hücre, toplam lipid ve fenol giderim değerleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Yüzey Cevap Yöntemi ile deney tasarımında kullanılmıştır. 30°C sıcaklıkta çalışılan sabit pH değerleri pH=6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0'dır. Bu değerlerde kuru hücre derişimleri sırasıyla 3.63, 4.12, 3.20 ve 1.74 m/L; toplam lipid derişimleri sırasıyla 0.37, 0.73, 1.08 ve 0.48 g/L; toplam fenol giderimleri ise sırasıyla %47, 56, 58 ve 60'dır.

Elde edilen ilk verilen ışığında; *R. glutinis*'in ZK ortamında sürekli işletilen biyoreaktörde çoğaltılmasında kontrollü olarak sabit tutulan pH ve sıcaklığın hücre çoğalması, lipid üretimi ve FAME dağılımı üzerine etkisi Yüzey Cevap Yöntemi (RSM) ile deney tasarımı yapılarak incelenmiştir. Deney tasarımı sıcaklık aralığı 15-35 °C ve pH aralığı 6-8 olarak seçilmiştir. Tablo 4.14'te oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.14 Yüzey cevap deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney No	Sıcaklık	pH	Hücre derişimi g/L	Toplam lipid derişimi g/L	Toplam FAME derişimi mg/L
1	17.9	6.29	2.82	0.24	10.41
2	32.1	6.29	1.86	0.10	8.52
3	17.9	7.71	3.5	0.31	11.43
4	32.1	7.71	3.53	0.19	10.57
5	15	7	2.53	0.25	14.54
6	35	7	3.36	0.19	14.32
7	25	6	2.09	0.26	14.23
8	25	8	4.17	0.24	12.89
9	25	7	3	0.22	13.07
10	25	7	3.01	0.21	12.71
11	25	7	3.07	0.22	13
12	25	7	3.31	0.2	12.92
13	25	7	3.39	0.23	13

Hücre çoğalmasına sıcaklık ve pH parametrelerinin etkisinde kuadratik modelin (Eş.4.1) verilere uygun olduğu görülmüştür (prob>F 0.0068). Modele göre pH, hücre derişimi üzerinde en önemli parametredir.

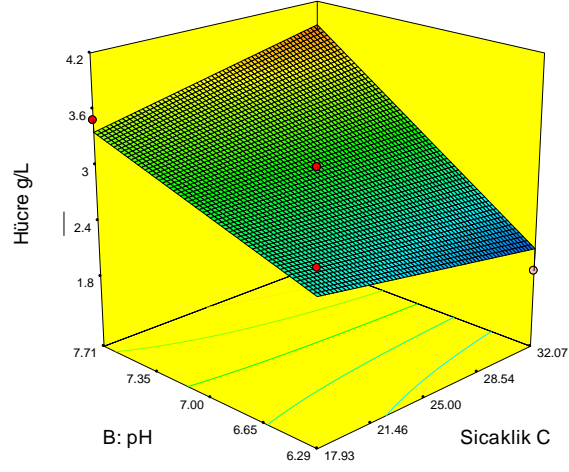
$$\text{Hücre} = 7.96 - 0.28 * \text{sıcaklık} - 1.36 * \text{pH} + 0.049 * \text{sıcaklık} * \text{pH} - 1.14167\text{E-}003 * \text{sıcaklık}^2 + 0.076 * \text{pH}^2 \quad (4.1)$$

Hücre derişimi, sıcaklık, pH için yüzey cevap grafiği incelenirse, düşük pH değerlerinde sıcaklık artışı ile biyokütle artışı olmamaktadır. Yüksek pH değerlerinde ise sıcaklık artışı ile hücre artışı görülmektedir. pH artışı ile ise her sıcaklık aralığında hücre derişiminde artış görülmektedir. Yüksek sıcaklıklarda hücrenin artış oranı daha fazladır (Şekil 4.41)

Design-Expert® Software

Biyokütle
4.174
1.86

X1 = A: sıcaklık
X2 = B: pH



Şekil 4.41 Hücre derişiminin sıcaklık ve pH ile değişimi

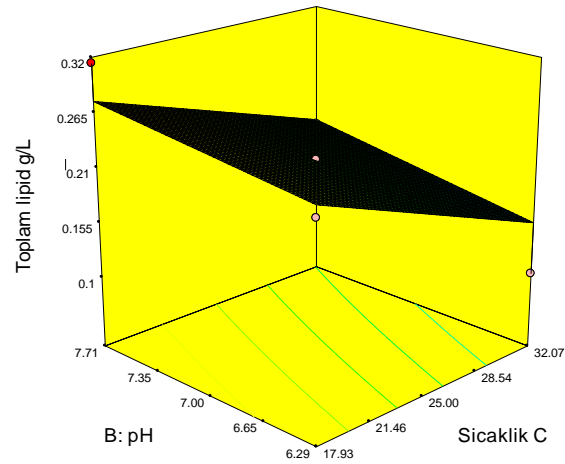
pH ve sıcaklığın üretilen toplam lipid üzerine etkisi incelendiğinde ise sıcaklık en önemli parametredir (prob>F 0.053) ve sıcaklık artışıyla lipid üretimi azalmaktadır (Eş 4.2; Şekil 4.42). pH koşulunun ise toplam lipid üzerine etkisi görülmemektedir.

$$\text{Toplam lipid} = 0.32 - 0.01 * \text{sıcaklık} + 0.008 * \text{pH} + 0,000625 * \text{sıcaklık} * \text{pH} \quad (4.2)$$

Design-Expert® Software

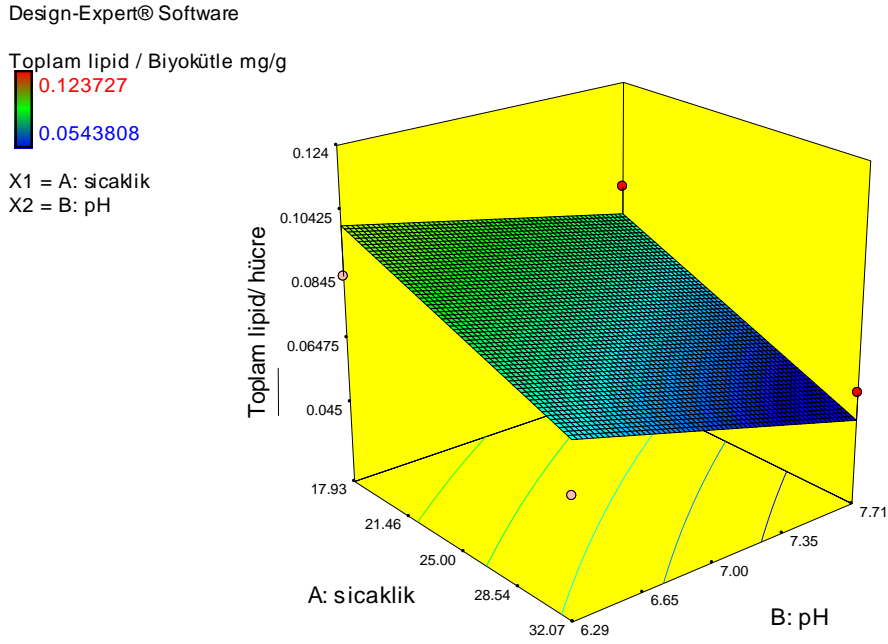
Toplam lipid
0.314286
0.103571

X1 = A: sıcaklık
X2 = B: pH



Şekil 4.42 Toplam lipid derişiminin sıcaklık ve pH ile değişimi

Veriler çoğalan hücre başına üretilen toplam lipid miktarları olarak değerlendirilirse hem sıcaklık (prob>F 0.0128) hem de pH (prob>F 0.00543) parametrelerinin önemli etkisi olduğu görülmektedir. Prob>F değerlerinden de anlaşılacağı gibi sıcaklığın etkisi daha fazladır. Sıcaklık azaldıkça hücre başına üretilen toplam lipid miktarı artmaktadır (Şekil 4.43).



Şekil 4.43 Toplam lipid/hücre değerinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Sıcaklık ve pH'ın birim hücre başına üretilen FAME miktarları üzerine etkisi incelendiği zaman pH parametresinin (prob>F 0.005) sıcaklıktan (prob>F 0.86) daha önemli olduğu görülmektedir. Hücre başına düşen FAME değerleri pH azaldıkça artarken, düşük pH ve yüksek pH düzeylerindeki fark sıcaklık azaldıkça azalmaktadır (Şekil 4.44).

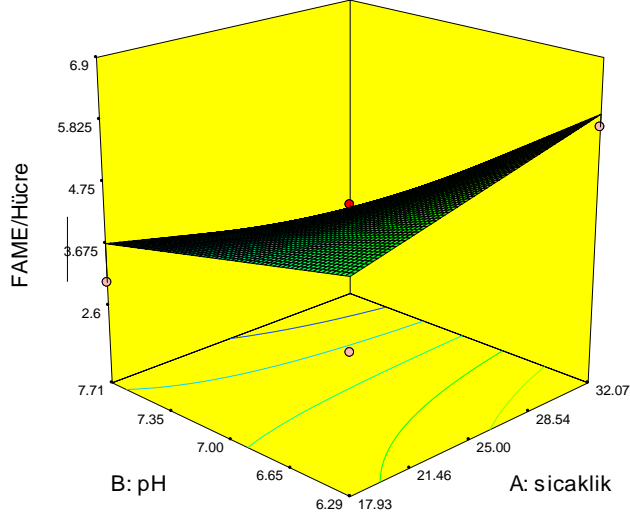
Design-Expert® Software

FAME/Biyokütle



X1 = A: sıcaklık

X2 = B: pH



Şekil 4.44 FAME/hücre değerinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Sıcaklık ve pH parametrelerin etkisi üretilen FAME dağılımı açısından incelenirse doymuş yağ asidi (DYA) oranına sıcaklığın daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Yüze cevapına göre DYA oranı sıcaklıkla doğrusal bir değişim göstermemekte, düşük sıcaklıklarda yüksek düzeylerde iken 25 °C'de en düşük düzeye ulaşmakta ve sıcaklık artışıyla tekrar artmaktadır. En yüksek DYA oranı ise yüksek sıcaklık ve pH koşullarında görülmektedir (Şekil 4.45).

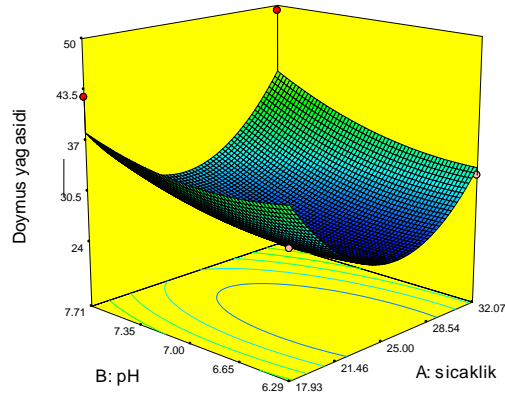
Design-Expert® Software

Doymus yağ asidi



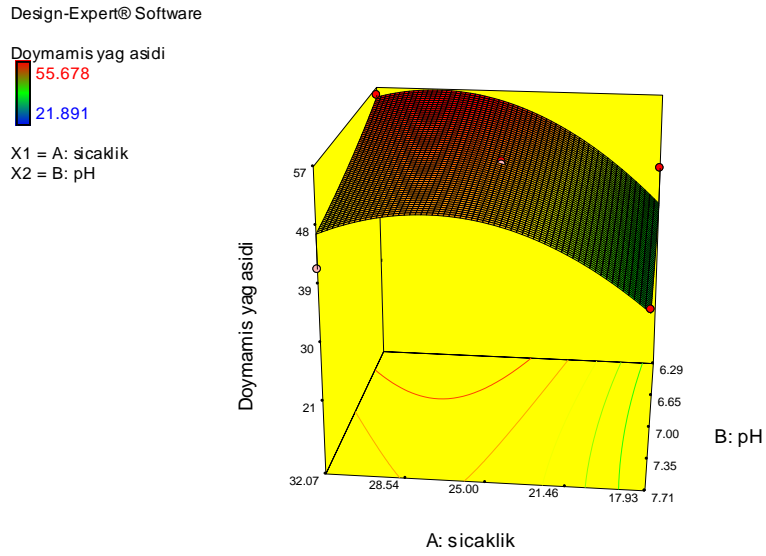
X1 = A: sıcaklık

X2 = B: pH



Şekil 4.45 Doymuş yağ asidi (DYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Tekli doymamış yağ asitlerine (TDYA) ait veriler ise sıcaklığın en önemli parametre olduğu görülmektedir (prob>F 0.0034). Yüzey cevap grafiğine göre düşük sıcaklıklardan 25 °C düzeylerine doğru TDYA yüzdesi artış gösterirken daha yüksek sıcaklıklarda azalma eğilimindedir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Tekli doymamış yağ asidi (TDYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Üretimlerde çoklu doymamışlık içeren yağ asitleri (ÇDYA) yüzdeleri değerlendirildiği zaman sıcaklığın en önemli parametre olduğu görülmektedir (prob>F 0.0003). Yüzey cevap grafiğinde, yüksek sıcaklıklarda ÇDYA oranı pH artışı ile artış göstererek pH 7 düzeylerinden sonra platoya ulaşmaktadır. Ancak düşük sıcaklıklarda pH etkisi görülmemektedir. Genel ÇDYA oranı sıcaklığın azalmasıyla artmaktadır. Ancak sıcaklıkla ilişkili artış, düşük pH düzeylerinde daha fazladır (Şekil 4.47).

Design-Expert® Software

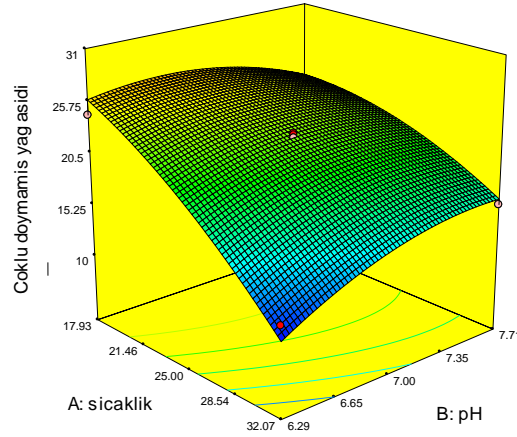
Çoklu doymamış yağ asidi

30.3293

10.493

X1 = A: sıcaklık

X2 = B: pH



Şekil 4.47 Çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) yüzdesinin sıcaklık ve pH ile değişimi

Sürekli işletimde birim zamanda hücrelerin kullandığı ZK miktarının da (ZK tüketimi; mL/st) önemli bir değer olması nedeniyle sıcaklık ve pH ile sisteme beslenen ZK hızının değişimi de ayrıca değerlendirilmiştir (Şekil 4.48). ZK akış hızının, pH azaldıkça logaritmik olarak artma eğiliminde olduğu görülmektedir (prob>F 0.0237). Sıcaklığın azalması ile de akış hızı az da olsa artmaktadır (prob>F 0.2106) F değerlerinden de anlaşılacağı gibi hücrelerin ZK'yı tüketim hızına pH'nın akış hızına etkisi daha fazladır. Sonuç olarak düşük pH ve düşük sıcaklıklarda daha fazla hücre çoğalmaktadır.

Design-Expert® Software

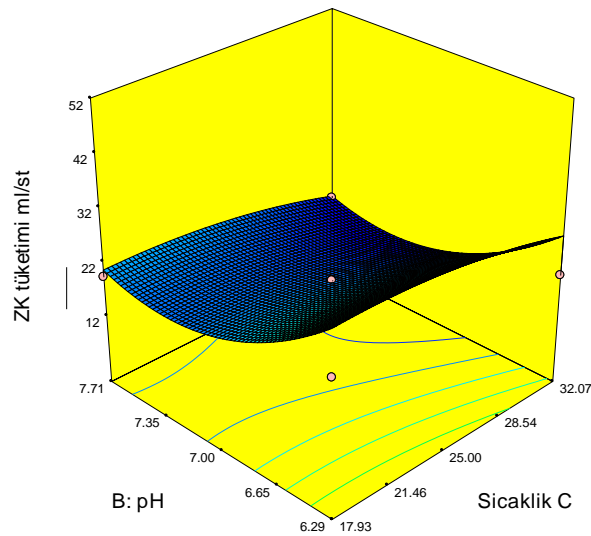
ZK tüketimi

51.2464

14.3763

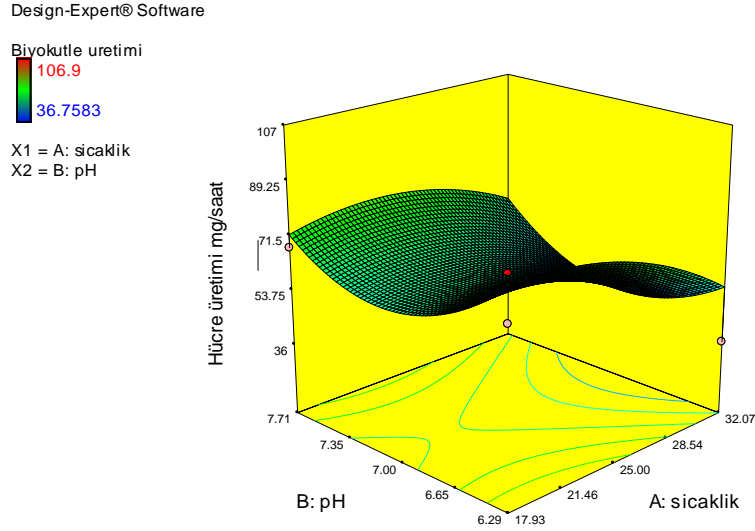
X1 = A: sıcaklık

X2 = B: pH



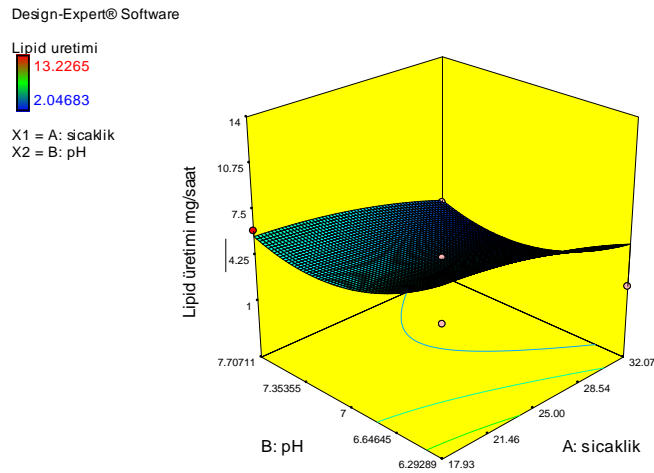
Şekil 4.48 ZK tüketim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi

Elde edilen akış hızları verilerinden yararlanılarak her işletim için ortalama hücre çoğalma hızı (mg/st), toplam lipid üretim hızı (mg/st) ve FAME üretim hızı (mg/st) hesaplanmıştır. Buna göre, hücre çoğalma hızı, pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Düşük pH düzeylerinde yüksek olan hücre çoğalma hızı, pH 7 düzeylerine kadar azalma ve daha sonra artma eğilimindedir (Şekil 4.49). Sıcaklık artışı ile hücre çoğalma hızı önce artıp sonra azalmaktadır.



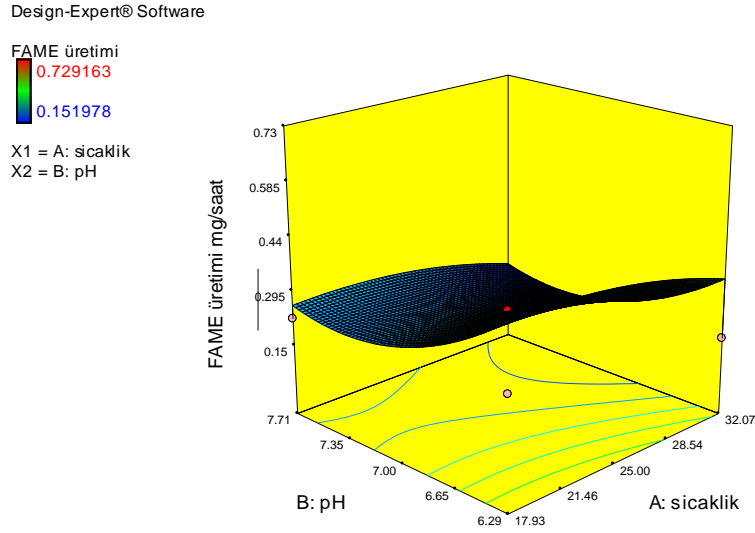
Şekil 4.49 Hücre çoğalma hızının sıcaklık ve pH ile değişimi

Toplam lipid üretiminde pH değerinin azalması ile üretim hızının arttığı görülmektedir (Şekil 4.50). Sıcaklıkla üretilen lipid değişimi ise hücre çoğalma hızında olduğu gibi sıcaklıkla önce artış daha sonra azama göstermektedir.



Şekil 4.50 Toplam lipid üretim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi

FAME üretim hızı açısından da toplam lipid üretimine benzer yüzey cevabı görülmektedir (Şekil 4.51). pH artışı ile FAME üretim hızı artmakta, sıcaklıkla ise önce artış sonra azalma görülmektedir.



Şekil 4.51 FAME lipid üretim hızının sıcaklık ve pH ile değişimi

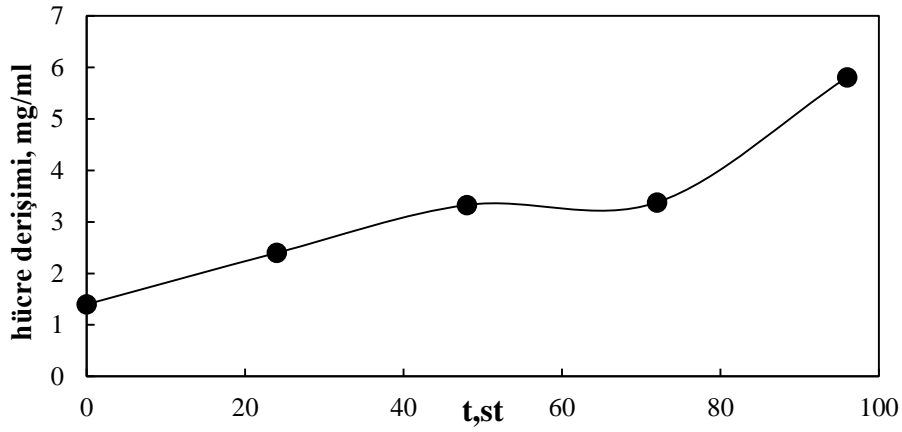
Biyoreaktörde yapılan işletimlerde merkezi kompozit deney tasarım setinin yıldız noktalarının tekrarlanabilirliğini görmek amacıyla için yıldız noktalardan biri olan pH=6.29 ve T=17.9 °C koşullarında yeni bir üretim yapılmıştır. Tasarlanan deney seti içerisinde aynı koşullarda yapılan işleme ait veriler ile tekrar deneyinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Buna göre; deney seti içerisindeki pH=6.29 ve T=17.9 °C koşullarında elde edilen 2.8 g/L hücre, 0.24 g/L toplam lipid, 24.7 ml/st ZK tüketim hızı, 69.5 mg/L hücre üretim hızı ve 5.87 mg/st toplam lipid üretim hızı; tekrar denemesinde 3.3 g/L hücre (%17 fark), 0.24 g/L toplam lipid (%20 fark), 20.2 ZK tüketim hızı (%22 fark), 66.7 mg/st hücre üretim hızı (%4 fark) ve 5.85 mg/st toplam lipid üretim hızı (%0.3 fark) olarak hesaplanmıştır.

4.2 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi

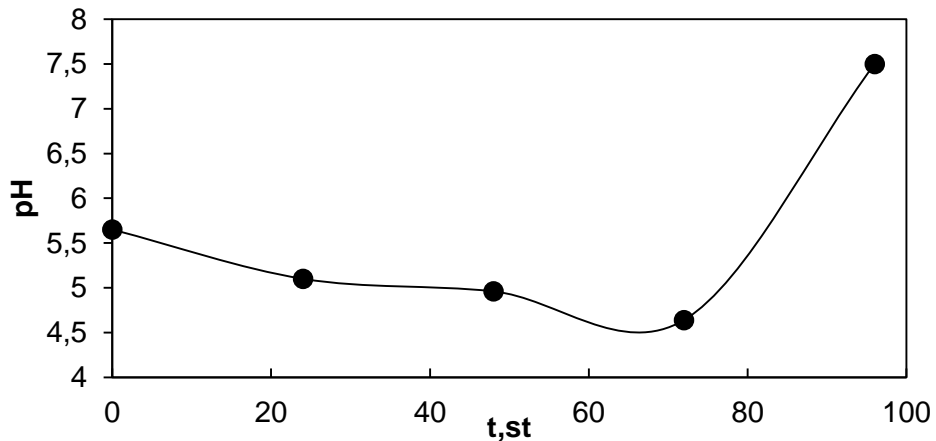
4.2.1 UYM ortamında *R. glutinis* çoğalması ve antioksidan enzimler üretimi

Rhodotorula glutinis'in zeytin karasuyu ortamında antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) üretimlerini incelemeye önce karşılaştırma amacıyla değerlendirmek üzere sıvı UYM ortamında 96 saat süre ile üretim yapılmıştır. Çoğalma eğrisi, zaman ile ortam pH'ı, protein derişimi, spesifik SOD aktivitesi, spesifik KAT aktivitesi ve indirgen şeker derişiminin zaman ile değişimi Şekil 4.52 - Şekil 4.57'de gösterilmiştir.

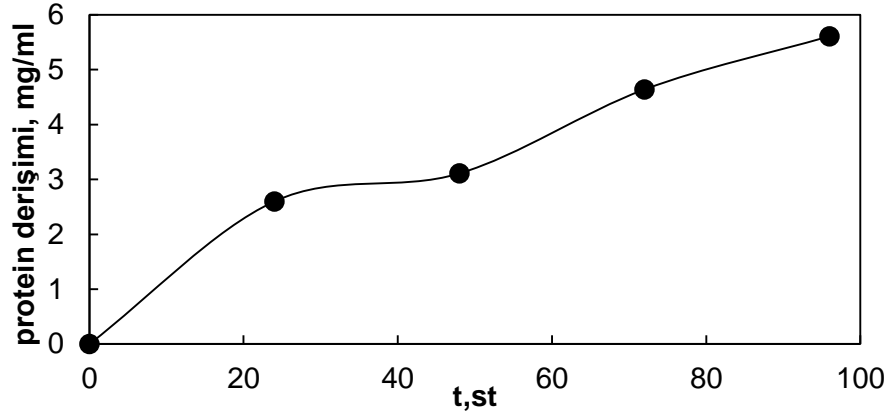
UYM ortamındaki çoğalmada, hücre çoğalmasının hızlanmaya başladığı zamanlarda ortam pH'ında azalma gözlenmiş, sonrasında artmaya devam etmiştir. pH değerindeki düşmenin nedeni, hücre dışı asidik metabolik ürünlerin sentezlenmesi olarak değerlendirilmiştir. Hücre çoğalmasına paralel olarak hücre içi protein 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; spesifik KAT aktivitesi ile 10.91 U/mg'dır. 96 saat süren üretim sonunda %77 indirgenmiş şeker tüketimi sağlanmıştır.



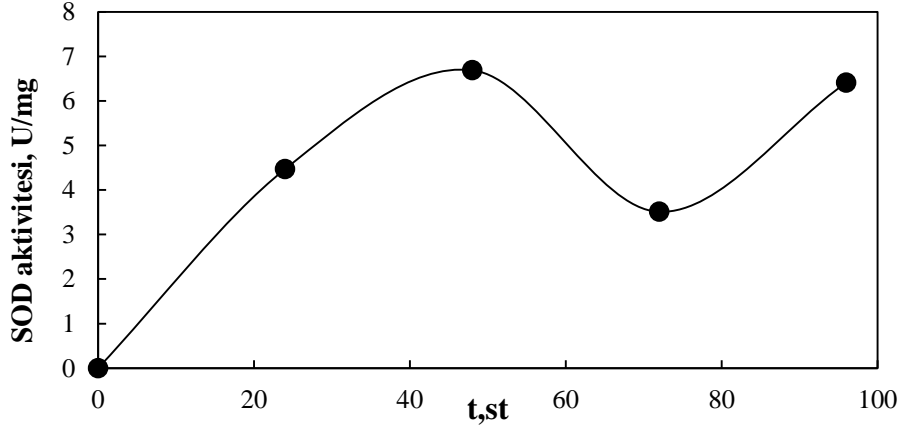
Şekil 4.52 *R. glutinis*'in UYM ortamında çoğalma eğrisi (T=30 °C, N=150 rpm)



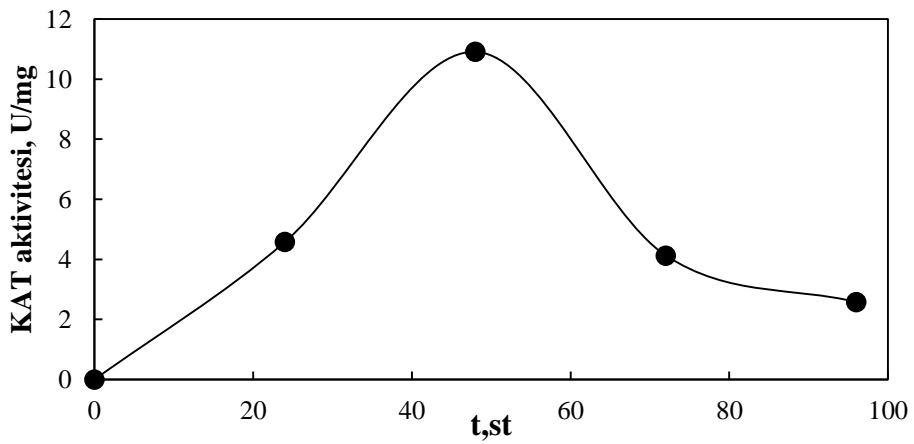
Şekil 4.53 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için ortam pH'ının zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



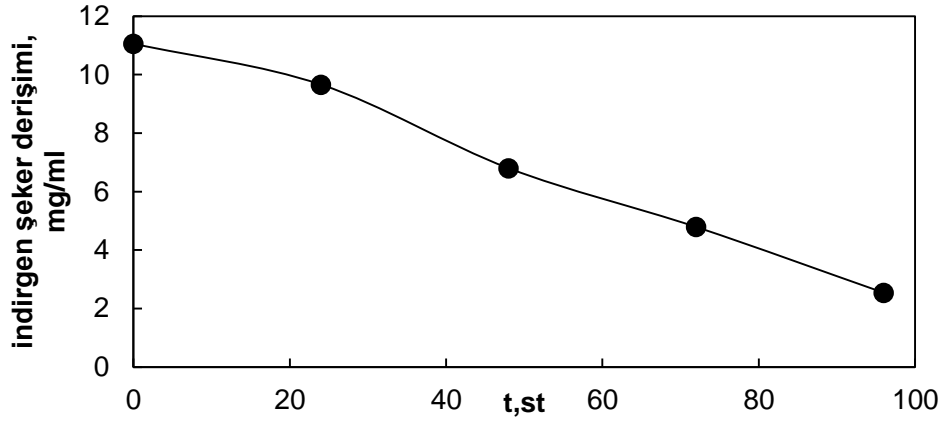
Şekil 4.54 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için hücre içi protein derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.55 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için spesifik SOD aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.56 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için spesifik KAT aktivitesinin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

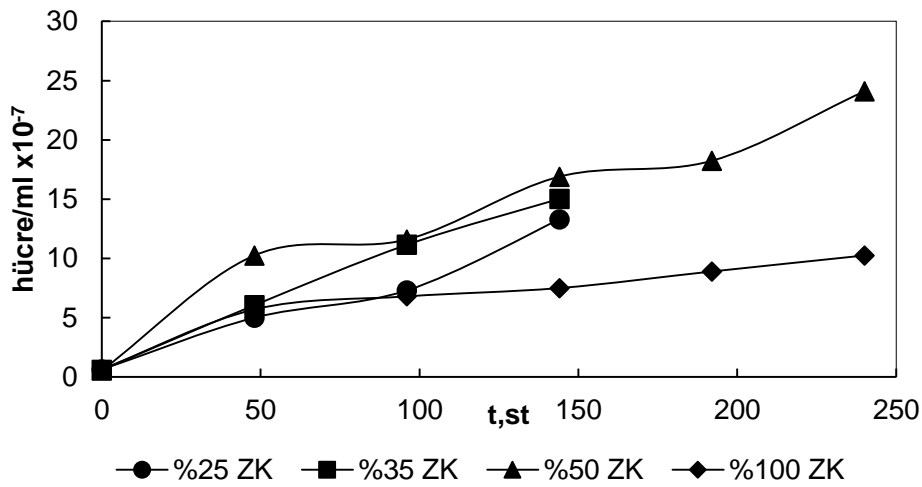


Şekil 4.57 UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* için indirgen şeker derişiminin zaman ile değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

4.2.2 Zeytin karasuyu derişim etkisi

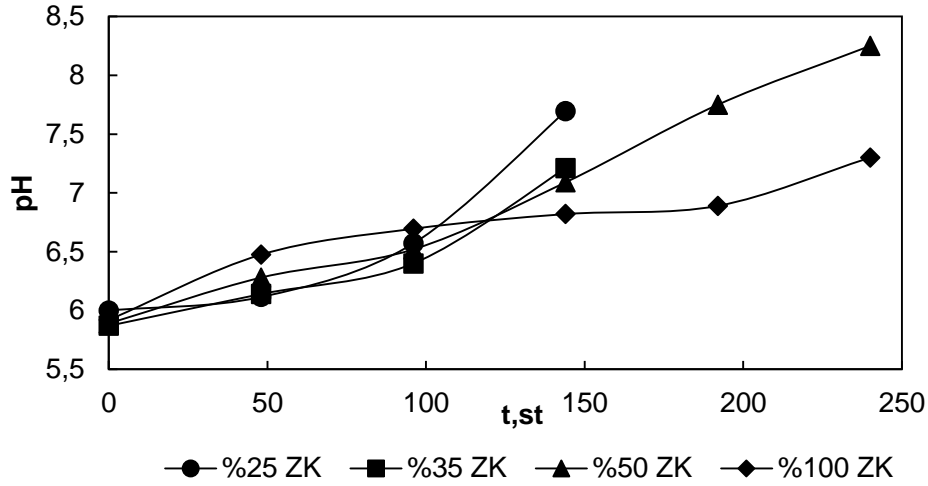
Zeytin karasuyunun *R. glutinis*'den antioksidan enzimler SOD ve KAT üretimine etkisi, bileşiminde % 25, 35, 50 ve 100 zeytin karasuyu (TF = 262.5, 525, 787.5 ve 1050 mg/L) içeren UYM ortamlarında gerçekleştirilen çoğalmalar ile incelenmiştir.

Zeytin karasuyu derişiminin artması ile hücrelerin üstel çoğalma fazına geçme süreleri uzamış; ortamdaki karasuyunun %50 ye kadar artışı ile hücre derişimi artarken, %100 ZK içeren ortamda çoğalan hücre sayısı azalmıştır (Şekil 4.58). Çalışılan koşullarda en yüksek *R. glutinis* derişimine %50 ZK-UYM ortamında 144. saat sonunda 16.9×10^7 hücre/ml olarak ulaşılmıştır.



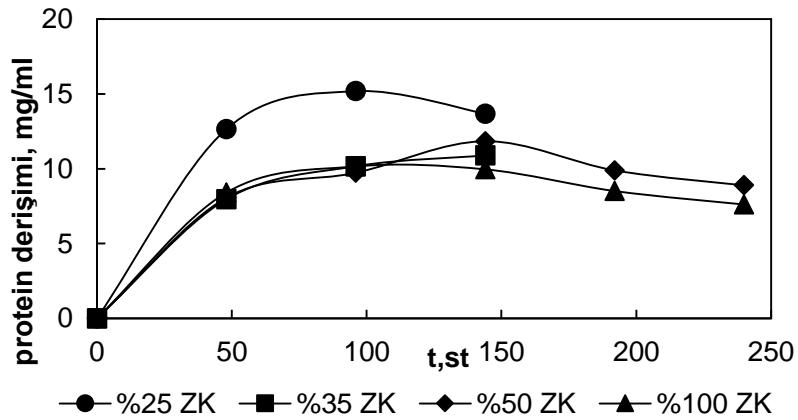
Şekil 4.58 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

R. glutinis mayası, zeytin karasuyu ortamında çoğalırken ortam pH değerinin artışına neden olmakta ve bu artış çoğalmanın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Karakaya vd., 2012; 2014). Bu çalışmada da farklı derişimlerdeki ZK-UYM ortamlarında *R. glutinis* hücreleri çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerini artırmışlar ve çoğalmanın az olduğu %100 ZK-UYM ortamında bu artış da daha az olmuştur (Şekil 4.59).



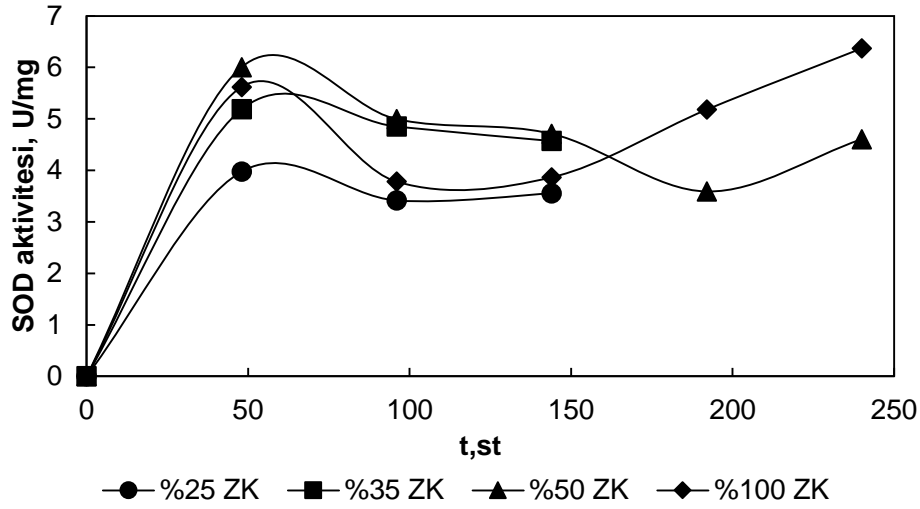
Şekil 4.59 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

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 4.60). En yüksek hücre içi protein derişimine en düşük derişimde ZK içeren %25 ZK-UYM ortamında ulaşılmıştır.



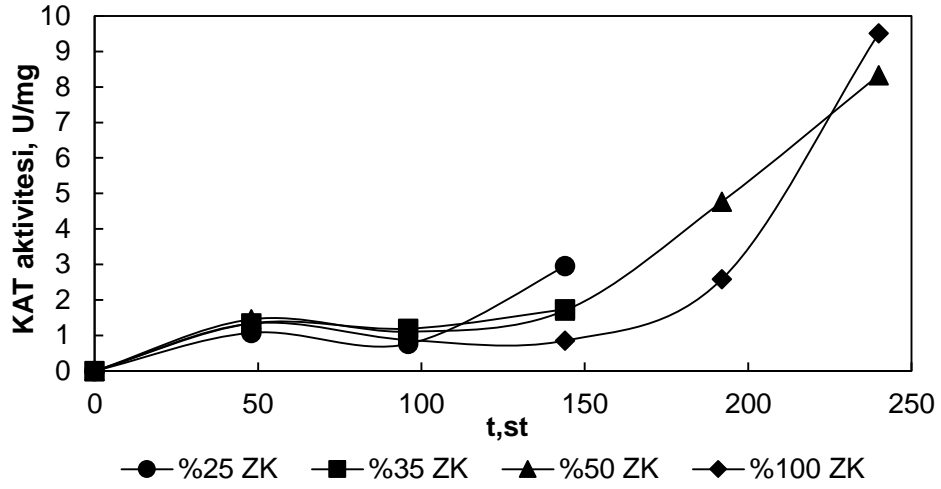
Şekil 4.60 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

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 4.61). İleri saatlerde görülen ikinci artışın nedeni substratın tükenmesi ile hücreler için bir stres ortamının oluşması ve SOD aktivitesinin indüklenmesi olarak değerlendirilmiştir (Ünlü ve Takaç, 2012). En yüksek spesifik SOD aktivitesine 144 saat sonunda 4.71 U/mg değerine %50 ZK-UYM ortamında ulaşılmıştır.



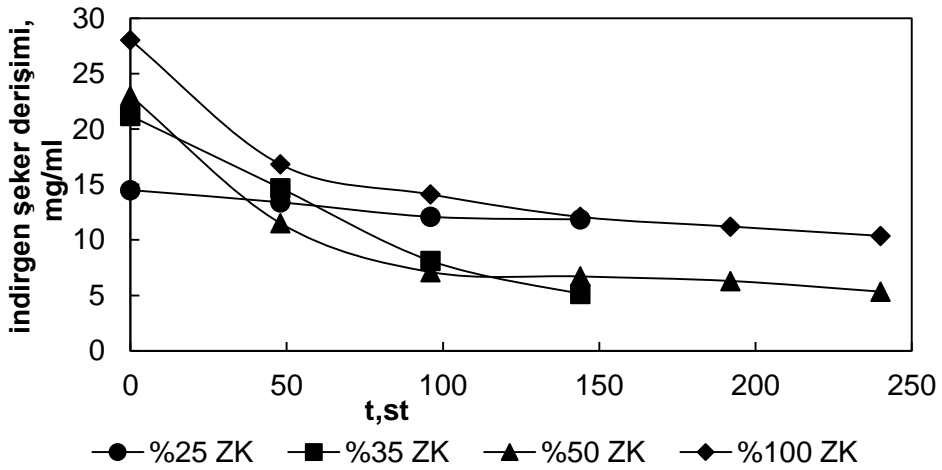
Şekil 4.61 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

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 4.62). Bunun nedeni, ortamda bulunan besin kaynaklarının tükenmesi nedeniyle hücrelerin kendi bünyesindeki karbon ve azot kaynaklarını (organik asit ve amino asit) kullanmaları ve böylece reaktif oksijen türleri oluşumundaki artış olarak belirtilmiştir (Ünlü ve Takaç, 2012). 144 saat çoğalma sonunda en yüksek spesifik KAT aktivitesine 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 ulaşılmıştır.



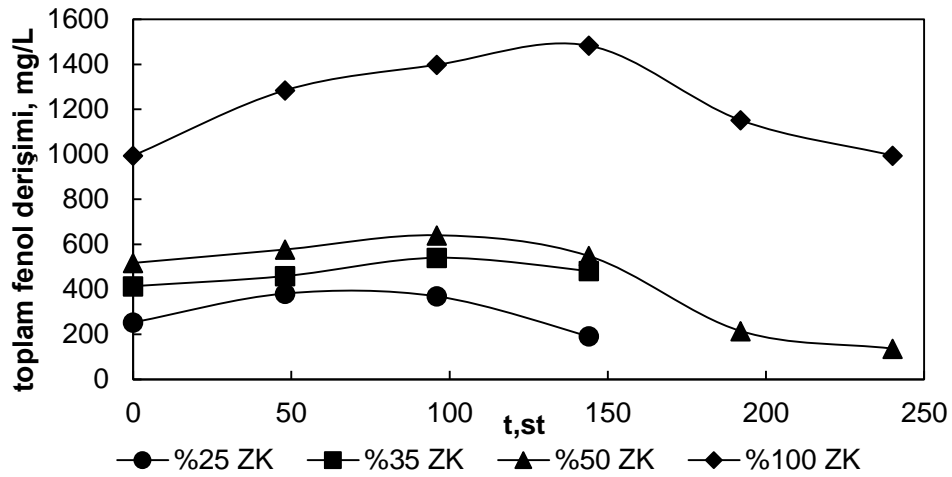
Şekil 4.62 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

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 4.63). *R. glutinis*'in ZK içeren UYM ortamlarında şeker tüketimi %80 değerine ulaşmıştır.

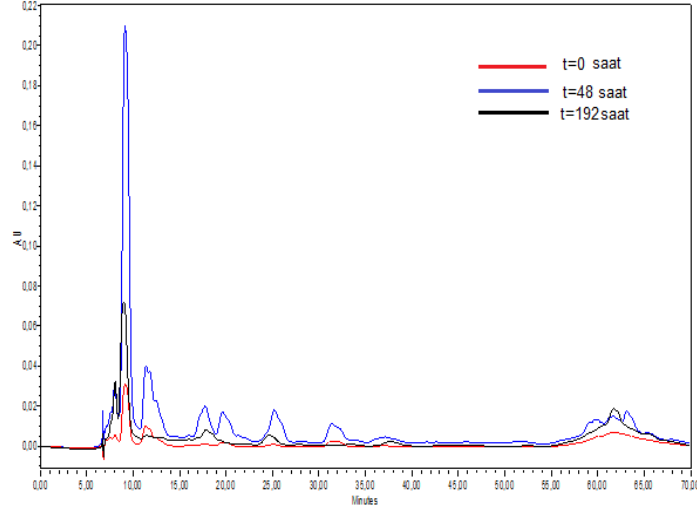


Şekil 4.63 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında indirgenmiş şeker derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

Farklı derişimlerde ZK içeren ortamların her birinde toplam fenol derişimi zamanla önce artış, sonra azalma göstermektedir (Şekil 4.64). *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 4.63). Ancak toplam fenol derişimi, başlangıç zamanlarında sabit kalmayıp artmaktadır. Bu artış, zeytin karasuyunun yapısında bulunan büyük moleköl ağırlıklı oleuropeinin enzimatik olarak parçalanıp küçük moleköl 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 4.65).



Şekil 4.64 Farklı derişimlerde ZK içeren UYM ortamlarında toplam fenol derişiminin zamanla değışimi (T=30 °C, N=150 rpm)

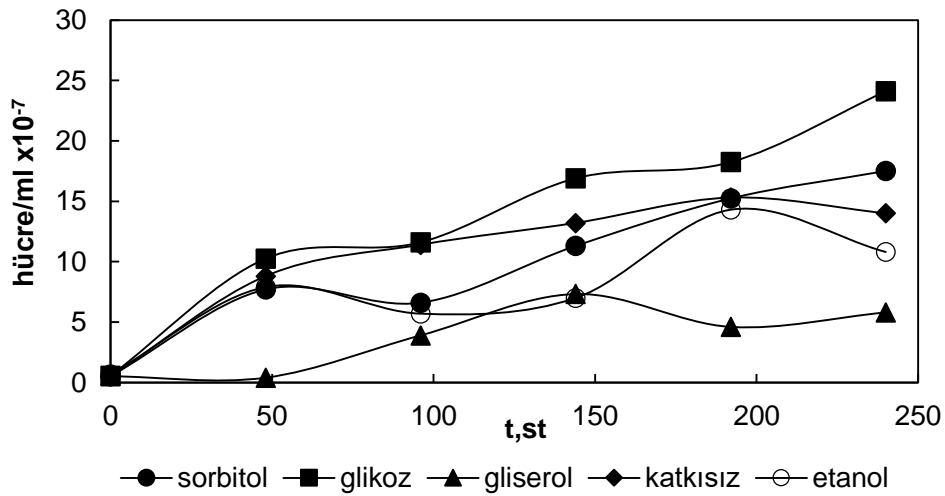


Şekil 4.65 % 50 ZK içeren UYM ortamın çoğalmanın farklı zamanlarında fenolik madde piklerini gösteren HPLC kromatogramları

4.2.3 Karbon kaynağı etkisi

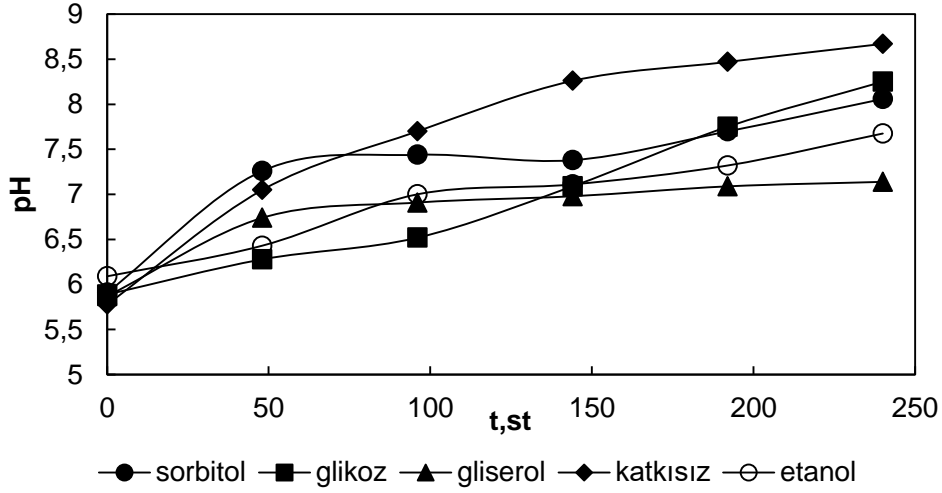
Karbon kaynaklarının *R. glutinis* çoğalması ve antioksidan enzimler SOD ve KAT üretmesi üzerine etkisi %50 ZK (TF=787.5 mg/L) içeren ortama ek karbon kaynağı olarak glukoz (10 g/L), sorbitol (10 g/L), gliserol (20 g/L ve etanol (%1 h/h) kullanımı ile incelenmiştir.

Farklı karbon kaynakları varlığında gerçekleştirilen çoğalmalarda zamanla *R. glutinis* derişimindeki değişim Şekil 4.66'de verilmiştir. 240 saat sonunda en yüksek hücre derişimine 24.1×10^7 hücre/ml değeri ile glukoz içeren ortamda ulaşılmıştır.



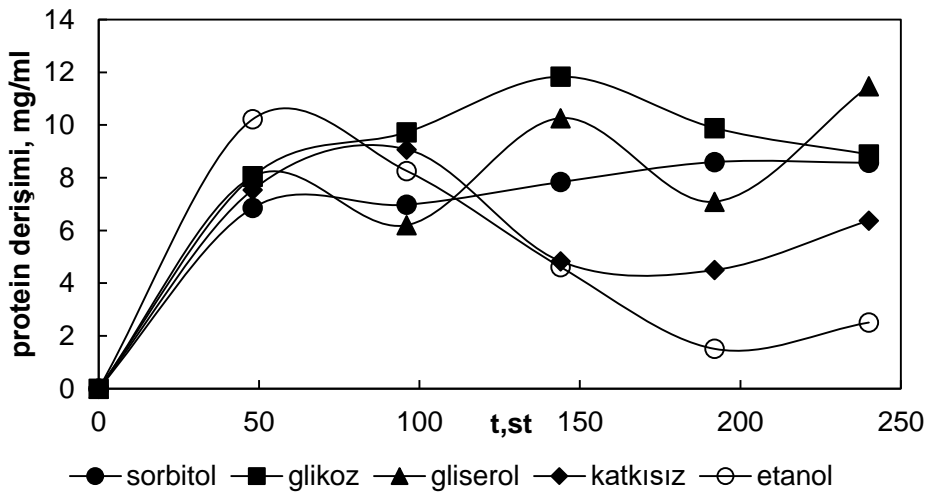
Şekil 4.66 Farklı karbon kaynaklarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı karbon kaynakları varlığında *R. glutinis* hücrelerinin çoğalmasına paralel olarak ortam pH değerleri de artırmışlardır (Şekil 4.67). En yüksek pH artışı hiçbir karbon kaynağının eklenmediği ortamda gözlenmiştir.



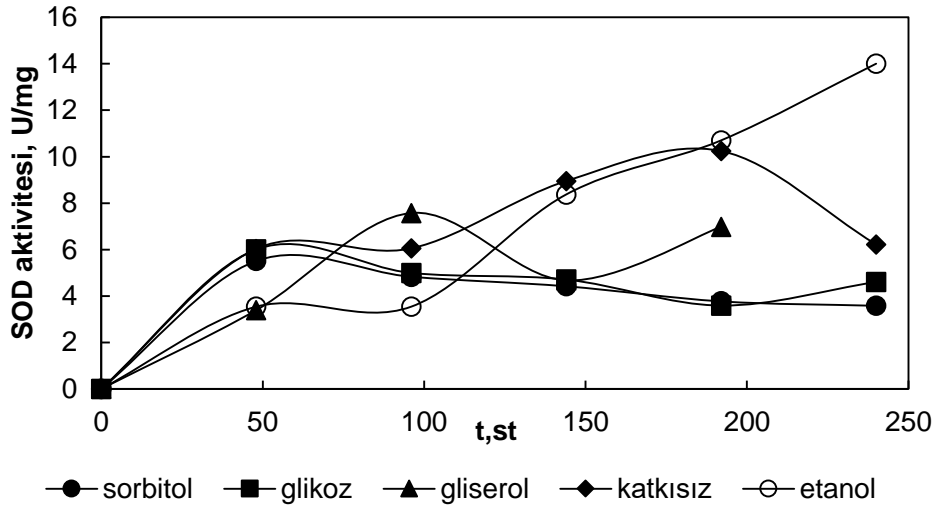
Şekil 4.67 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Etkileri incelenen tüm karbon kaynakları varlığında, hücre içi protein değeri başlangıçta zamanla artmış; sonra kullanılan karbon kaynağına göre sabit kalmış veya azalmıştır (Şekil 4.68). Glukoz ve sorbitol varlığında protein derişimi kararlılık gösterirken, etanol ve katkısız ortamlarda zamanla azalmıştır. En fazla azalma etanol varlığında gözlenmiştir.



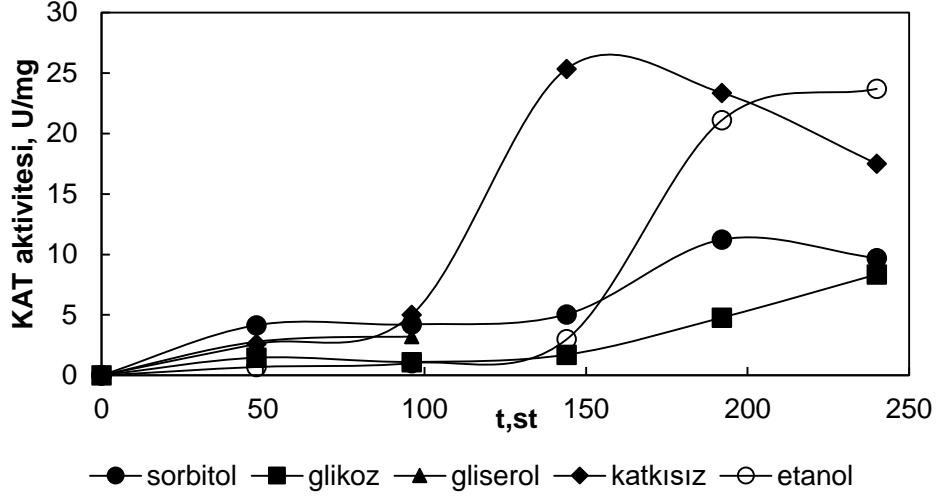
Şekil 4.68 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

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 4.69). 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 spesifik SOD aktivitesine ulaşılmıştır. Sonuçlar, etanolün hücre için stres ortamı yaratıp SOD aktivitesini indüklediğini göstermektedir.



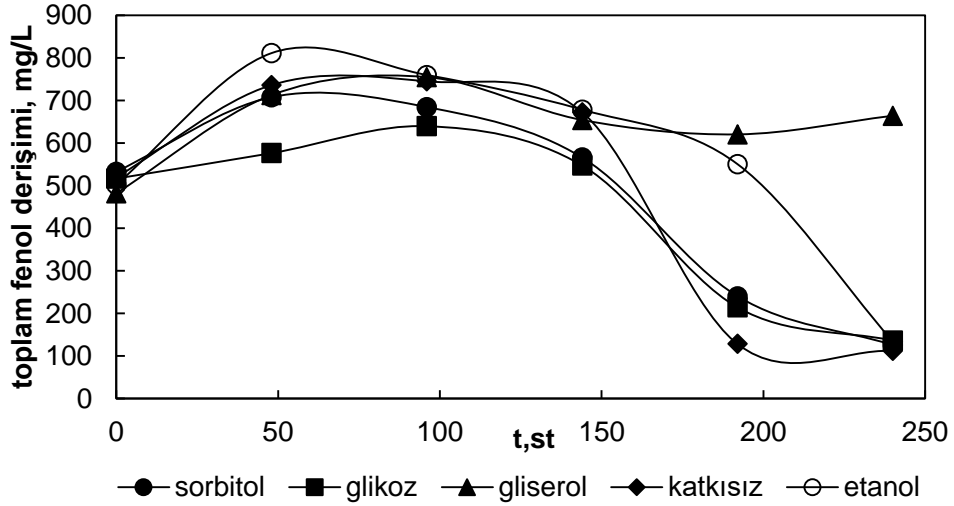
Şekil 4.69 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı karbon kaynakları ile 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 etanol içeren ve katkısız ortamlarda gözlenmiştir (Şekil 4.70). 240 saat süren çoğalmada etanol varlığında ulaşılan spesifik KAT aktivitesi 23.7U/mg'dır.



Şekil 4.70 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

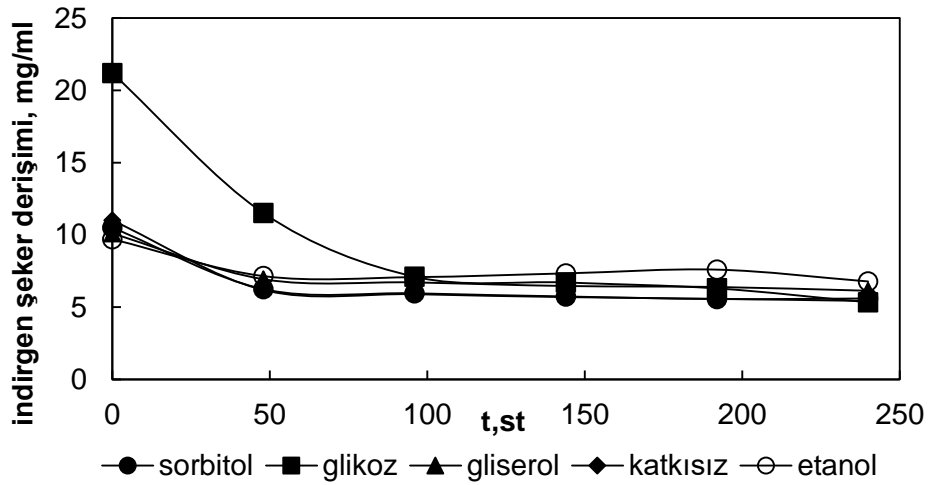
R. glutinis çoğalma ortamına eklenen tüm karbon kaynakları varlığında, ortamdaki fenol derişimi zamanla önce artmış sonra azalmıştır (Şekil 4.71). Gözlenen artışın, oleoreopeinin enzimatik parçalanması ile ve azalmanında ortamdaki karbon kaynağı tükenmesi ile fenollerin kullanılmaya başlanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.71 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

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 4.72'te verilmiştir. Ek karbon kaynağı olarak etanol, sorbitol ve gliserol içeren ortamlarda sadece zeytin karasuyundan gelen indirgen şeker derişiminin ölçülebilmesi nedeniyle (diğerleri indirgen şeker değildir) önemli bir azalma olmadığı, glukoz içeren ortamda ise önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.72). Glukozun eklendiği ortamda 240 st sonunda %74.8 indirgen şeker kullanımı gerçekleşmiştir. Karbon kaynağının eklenmediği ortamda da %50.6 civarında indirgen şeker kullanımı ölçülmüştür.



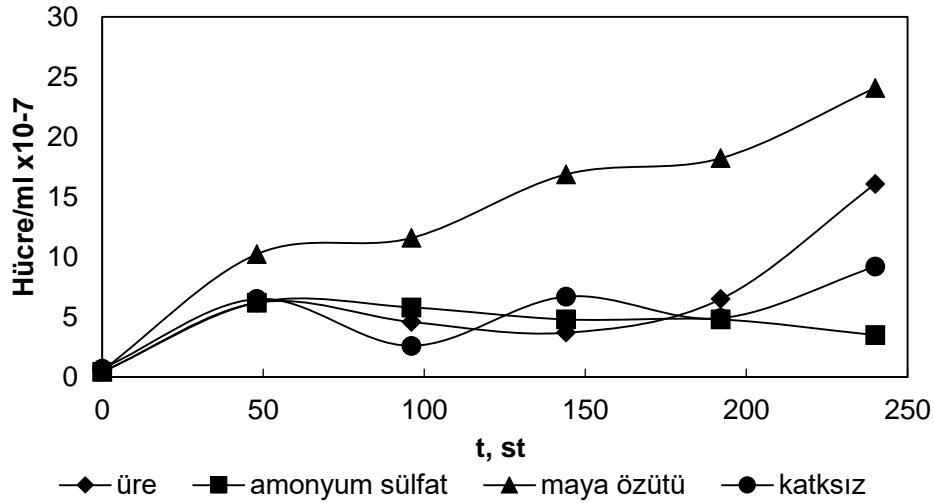
Şekil 4.72 Farklı karbon kaynakları içeren %50 ZK ortamında indirgen şeker derişiminin zamanla değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

4.2.4 Ek azot kaynağı etkisi

R. glutinis'in çoğalması ve SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine %50 ZK içeren UYM çoğalma ortamına ek azot kaynağı olarak maya özütü, amonyum sülfat ile ürenin etkisi incelenmiş ve katkısız %50 ZK içeren UYM ortamındaki çoğalma ile karşılaştırılmıştır. 240 saat süreyle 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 değışimleri incelenmiştir.

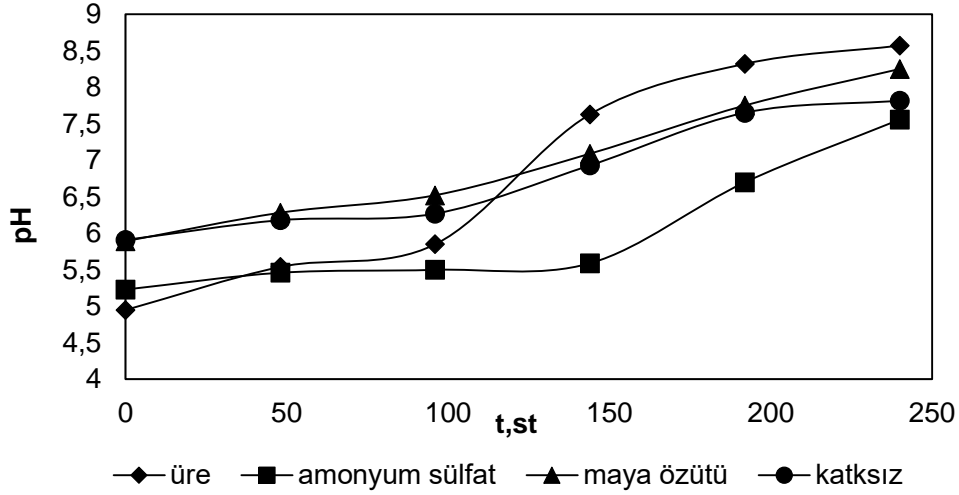
Ek azot kaynağı olarak 0.02 mol azot içeren amonyum sülfat, üre ve ayrıca maya özütü (3 g/L) içeren %50 ZK içeren UYM ortamlarında (ZK-UYM) gerçekleştirilen çoğalmalarda hücre derişiminin zamanla değışimi Şekil 4.73'te verilmiştir. Azot kaynağı katkısının yapılmadığı ortam ile karşılaştırıldığı zaman hücre çoğalmasında maya özütünün pozitif etkisi olduğu; amonyum sülfatın ve ürenin ise önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Çalışılan

koşullarda en yüksek *R. glutinis* derişimine maya özütünün eklendiği ortamında t=240 st'de $24,1 \times 10^7$ hücre/ml olarak ulaşılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarında, 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). Zeytin karasuyunun UYM ile desteklendiği bir diğer çalışmada ise üre eklenen ortamda *R. glutinis* çoğalmasının daha fazla olduğu gözlenmiştir (Karakaya vd., 2012).



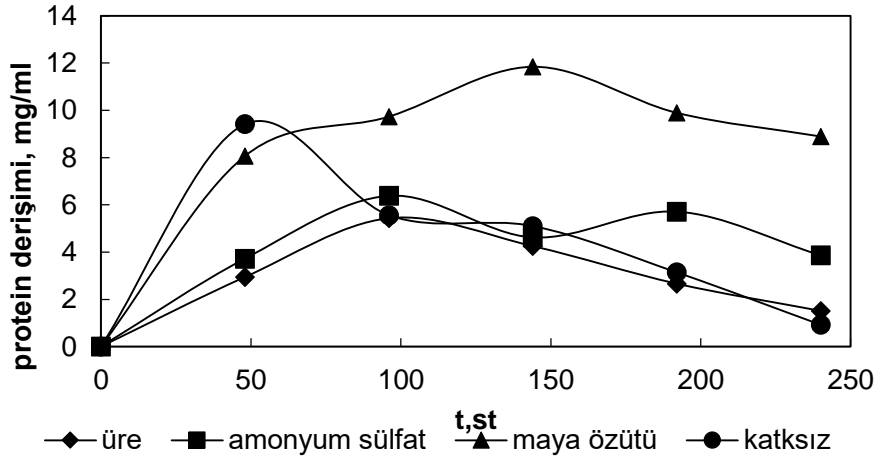
Şekil 4.73 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı azot kaynaklarının eklendiği 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 4.74).



Şekil 4.74 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının ortam pH değerine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

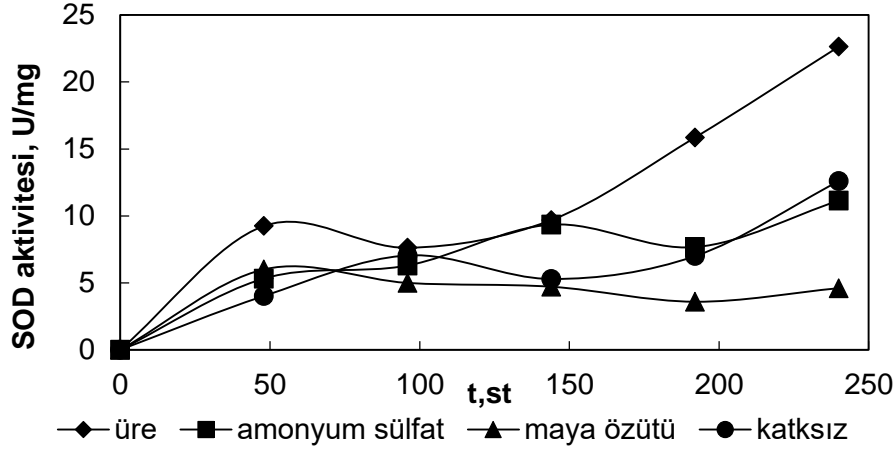
Farklı azot kaynaklarını içeren ZK-UYM ortamlarında hücre içi protein derişimi ise çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.75). En yüksek hücre içi protein derişimine t=144.st sonunda 11.84 mg/ml değeri ile maya özütünün eklendiği ortamda ulaşılmıştır.



Şekil 4.75 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının hücre içi protein derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

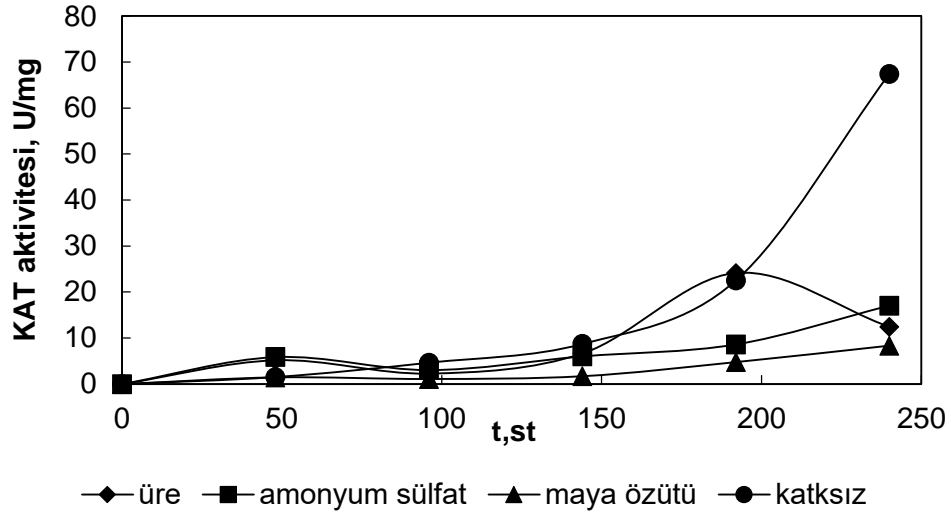
Farklı azot kaynakları içeren %50 ZK-UYM ortamında, spesifik SOD aktivitesi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise önce sabit kalmış ve sonrasında tekrar yükselmiştir (Şekil 4.76). İleri saatlerde görülen ikinci artışın nedeni substratın tükenmesi ile

hücreler için bir stres ortamının oluşması ve SOD aktivitesinin indüklenmesi olarak değerlendirilmiştir (Ünlü ve Takaç, 2012). En yüksek spesifik SOD aktivitesine 240 saat sonunda 22.64 U/mg değerine üre eklenen ortamda ulaşılmıştır. Maya özütü varlığında ise kontrol ortamına göre daha az SOD aktivitesi ölçülmüştür.



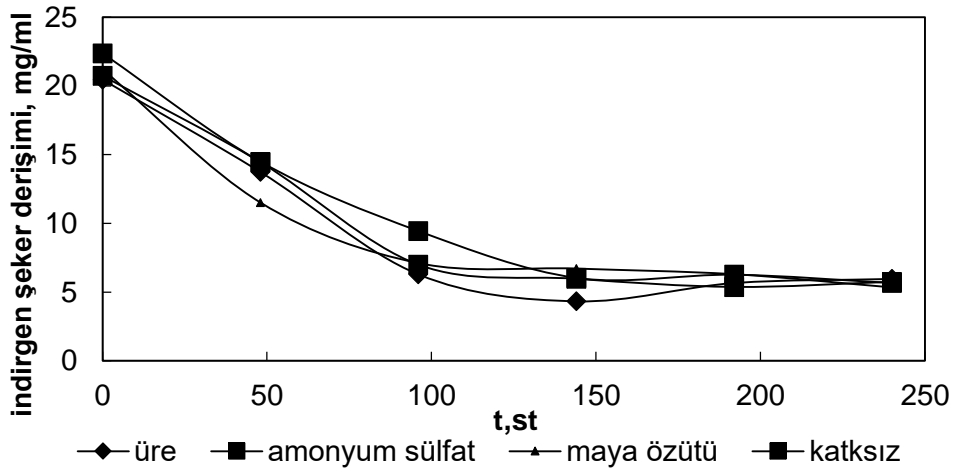
Şekil 4.76 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı azot kaynaklarını içeren %50 ZK-UYM ortamlarında spesifik KAT aktivitesi, başlangıçtaki artıştan sonra uzun bir süre sabit kalmış; sonrasında tekrar daha yüksek bir hızla artmaya başlamıştır (Şekil 4.77). Bunun nedeni, ortamda bulunan besin kaynaklarının tükenmesi nedeniyle hücrelerin kendi bünyesindeki karbon ve azot kaynaklarını kullanmaları ve böylece reaktif oksijen türleri oluşumundaki artıştır (Ünlü ve Takaç, 2012). t=240 saat çoğalma sonunda en yüksek spesifik KAT aktivitesine 67.4 U/mg değeri ile ek azot kaynağının eklenmediği ortamında ulaşılmıştır. 240 saat sonunda spesifik KAT aktiviteleri sırasıyla; katkısız (67.4 U/mg), amonyum sülfat (17.05 U/mg), üre (12.45 U/mg) ve maya özütünün (8.33 U/mg) eklendiği ortamlardır.



Şekil 4.77 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

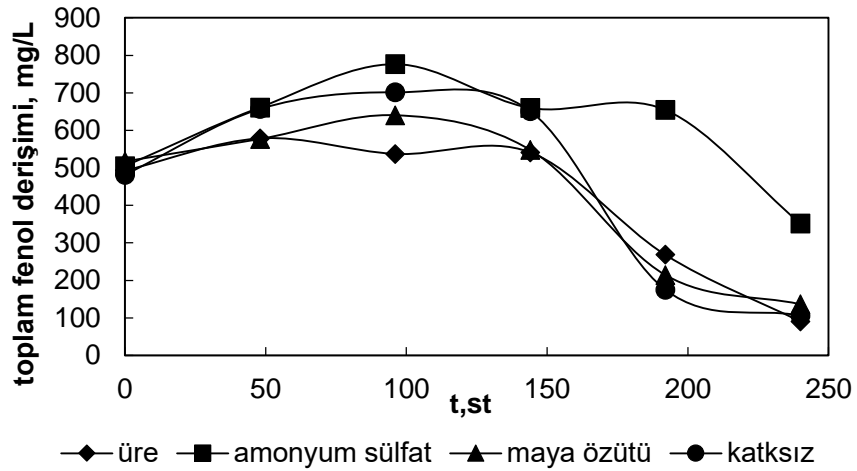
Farklı azot kaynaklarının varlığında ZK-UYM ortamlarında indirgenmiş şeker derişimi zamanla azalma göstermiş ve başlangıç ZK derişimine bağlı olarak farklı zamanlarda yaklaşık sabit değerlere gelmiştir (Şekil 4.78). En yüksek indirgen şeker tüketimi, 144.st sonunda %79 ile ek azot kaynağı olarak üre eklenen ortamda elde edilmiştir.



Şekil 4.78 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının indirgenmiş şeker derişimine etkisi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı azot kaynaklarının varlığında, UYM-ZK ortamlarının her birinde toplam fenol derişimi zamanla önce artış, sonra azalma göstermektedir (Şekil 4.80). *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 4.79). Ancak toplam fenol derişimi, başlangıç zamanlarında sabit kalmayıp artmaktadır. Bu artış, zeytin karasuyunun yapısında bulunan büyük molekül ağırlıklı oleuropeinin enzimatik olarak parçalanıp küçük molekül ağırlıklı ve toplam fenol derişim analizi ile tayin edilebilen fenolik maddelere dönüşmesi ile açıklanabilir.



Şekil 4.79 ZK-UYM ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının toplam fenol derişime etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

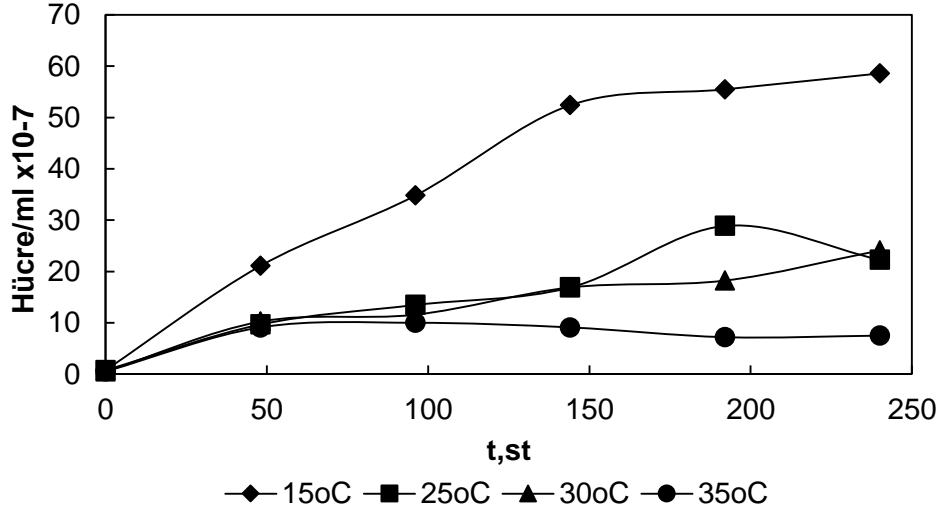
4.2.5 Sıcaklık etkisi

R. glutinis'in çoğalması ve spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi %50 ZK içeren UYM çoğalma ortamında 15- 35°C sıcaklık aralığında 240 st süre ile incelenmiştir.

ZK-UYM ortamında 15, 25, 30 ve 35 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilen çoğalmalarda hücre derişiminin zamanla değişimi Şekil 4.80'de verilmiştir. Hücre çoğalmasının 15 °C da en yüksek olduğu ve artan sıcaklık ile azaldığı görülmüştür. En yüksek hücre derişimi 15°C'de 240. saat sonunda $58,6 \times 10^7$ hücre/mL olarak ölçülmüştür.

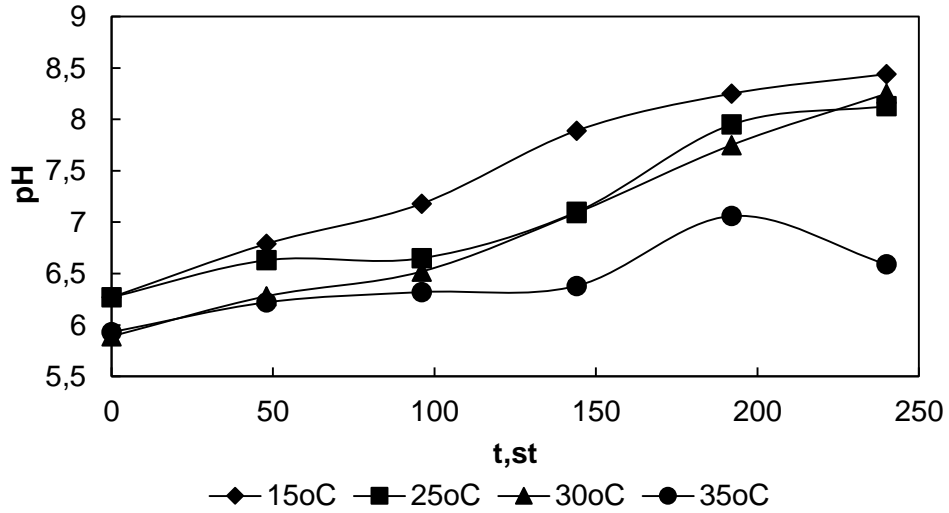
Çalışmada kullanılan *R. glutinis* için UYM ortamında optimum çoğalma sıcaklığı 25°C olarak verilmiştir (www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-70398.html). Ancak, önceki çalışmalarımızda da 15 °C'da *R. glutinis* hücrelerinin yüksek sıcaklıklara yakın bir değerde çoğaldığı gözlenmiştir (Ünlü ve Takaç, 2012). Bu çalışma da 15 °C sıcaklıkta yüksek sıcaklıklara göre daha fazla hücre oluşumunun belirlenmesinin nedeninin zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelerin yarattığı stres olduğu düşünülmektedir. Düşük sıcaklıkta enzimatik olarak

parçalanamayan fenolik maddeler hücre üzerinde stres oluşturmakta ve bu stres nedeniyle hücre çoğalma koşullarını değiştirebilmektedir.



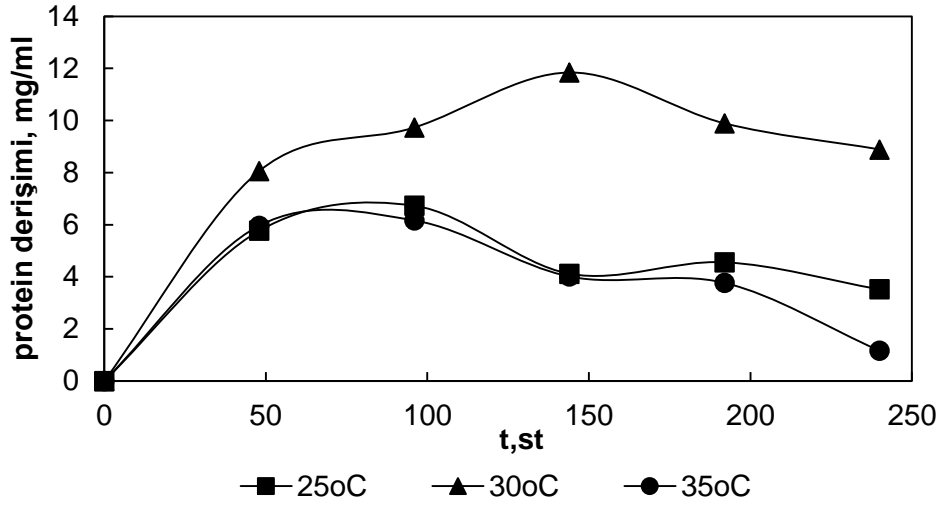
Şekil 4.80 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi (N=150 rpm)

Farklı sıcaklıklardaki çoğalmalarda zaman ile ortam pH değerleri artırmıştır (Şekil 4.81). En yüksek pH değeri hücre çoğalmasının en fazla olduğu 15°C'de gözlenmiştir.



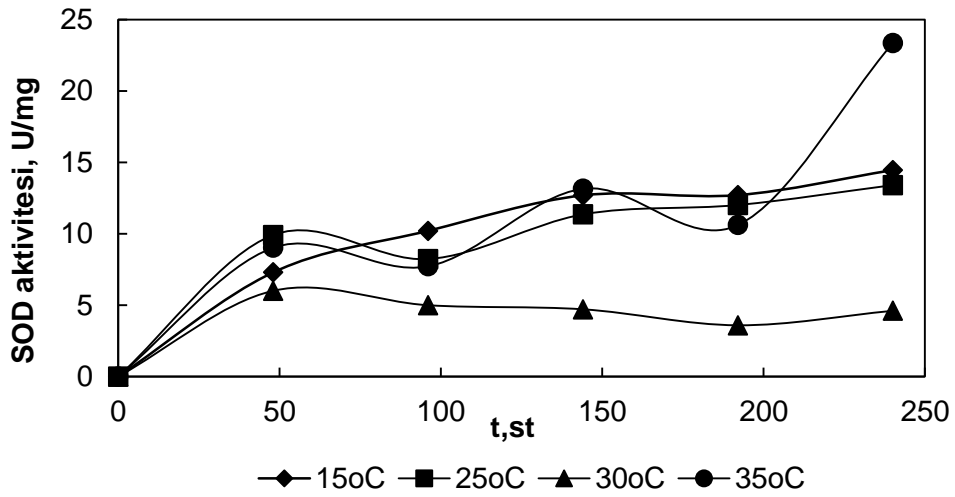
Şekil 4.81 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)

İncelenen tüm sıcaklıklarda, hücre içi protein değeri zamanla artmış ve yaklaşık 144.saatin sonunda azalmaya başlamıştır (Şekil 4.82). En yüksek hücre içi protein derişimine 30 °C sıcaklığında 8.89 mg/mL olarak ulaşılmıştır.



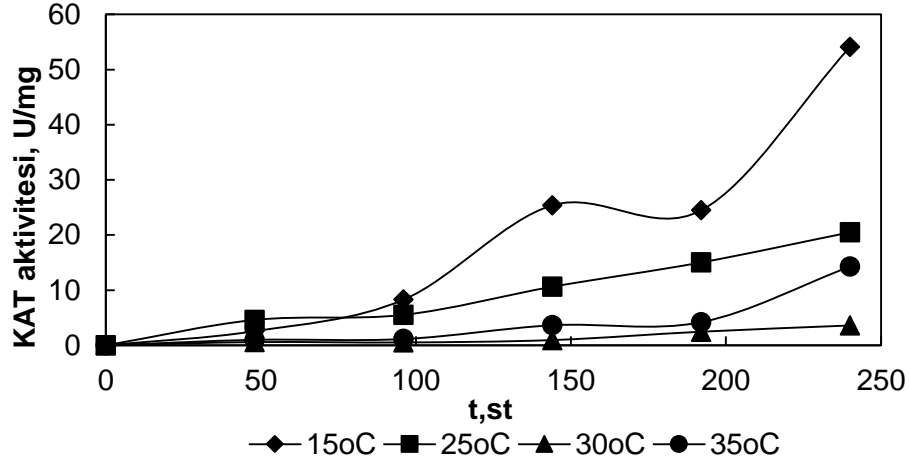
Şekil 4.82 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın hücre içi protein derişimine etkisi (N=150 rpm)

İncelenen tüm sıcaklıklarda, çoğalmanın ilk 48 saati boyunca spesifik SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu saatten sonra ise 15°C sıcaklıkta enzim aktivitesi hızla artmaya devam etmiş; diğer sıcaklıklarda ise yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4.83). Denenen en yüksek sıcaklık olan 35°C'de ise ilk 192 saat boyunca dalgalı bir artış sergilerken 240. saat sonunda en yüksek (23.37 U/mg) spesifik SOD aktivitesi göstermiştir.



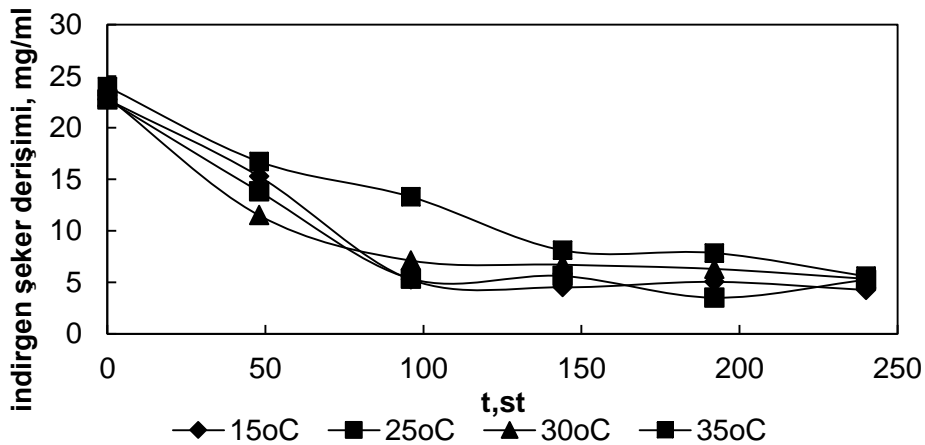
Şekil 4.83 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik SOD aktivitesine etkisi (N=150 rpm)

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 15°C'de gözlenmiştir (Şekil 4.84). 240 saat süren çoğalmada 15°C'de ulaşılan spesifik KAT aktivitesi 54.07 U/mg'dır.



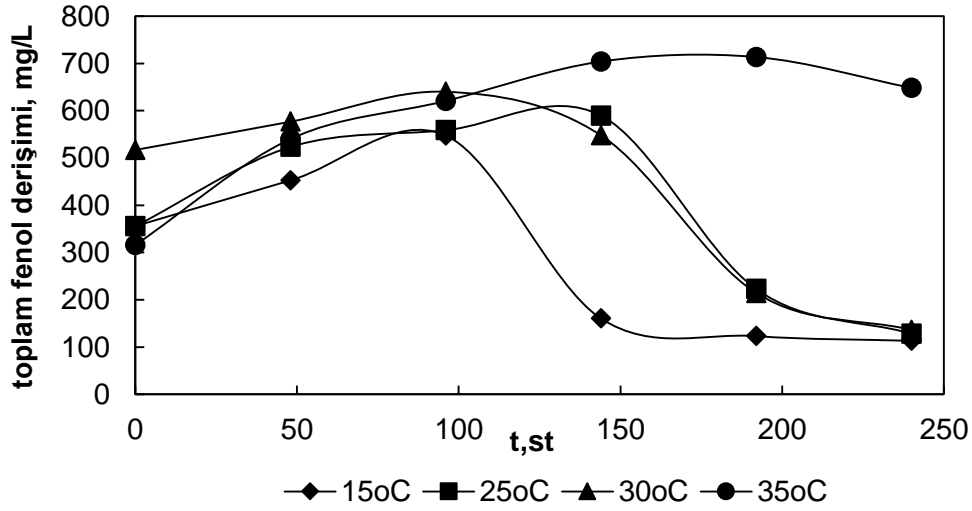
Şekil 4.84 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (N=150 rpm)

Farklı sıcaklıklarda çoğalan *R.glutinis* hücrelerinin zeytin karasuyunda bulunan glukozu farklı hızlar ile tüketmişlerdir. 15, 25 ve 30°C sıcaklıklarda 35°C'ye göre daha yüksek indirgen şeker kullanımı vardır (Şekil 4.85). İncelenen tüm sıcaklıklarla 240 st sonunda yaklaşık %80 indirgen şeker kullanımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.85 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın indirgenmiş şeker tüketimine etkisi (N=150 rpm)

R. glutinis farklı sıcaklıklardaki çoğalma ortamında, ortamdaki fenol derişimi zamanla önce biraz artmış sonra azalmıştır (Şekil 4.86) Düşük sıcaklıklarda bu düşüş daha erken saatlerde gözlenmektedir. Bunun nedeni, düşük sıcaklıkta oleorepeinin enzimatik parçalanmasının daha az olması ve doğrudan fenolik maddelerin tüketimine geçilmesi olarak değerlendirilmiştir.

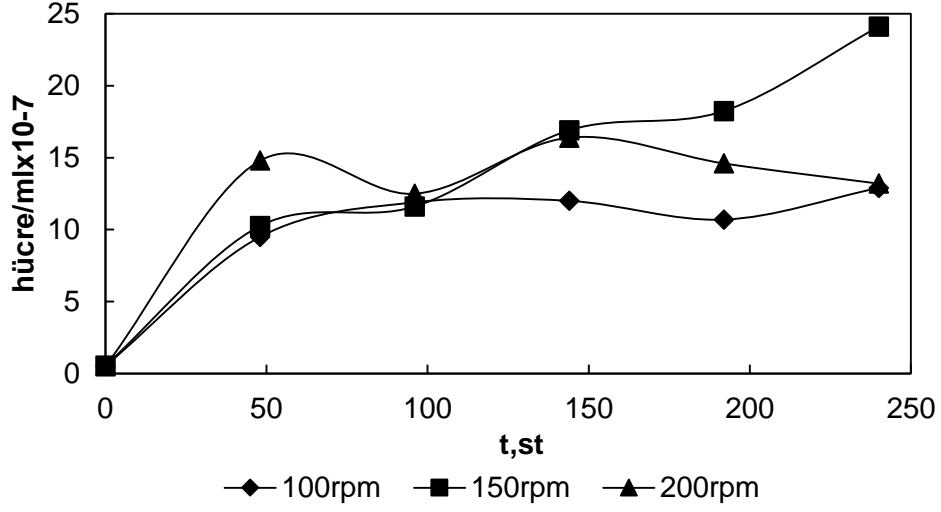


Şekil 4.86 ZK-UYM ortamındaki çoğalmada sıcaklığın ortam pH değerine etkisi (N=150 rpm)

4.2.6 Karıştırma hızı etkisi

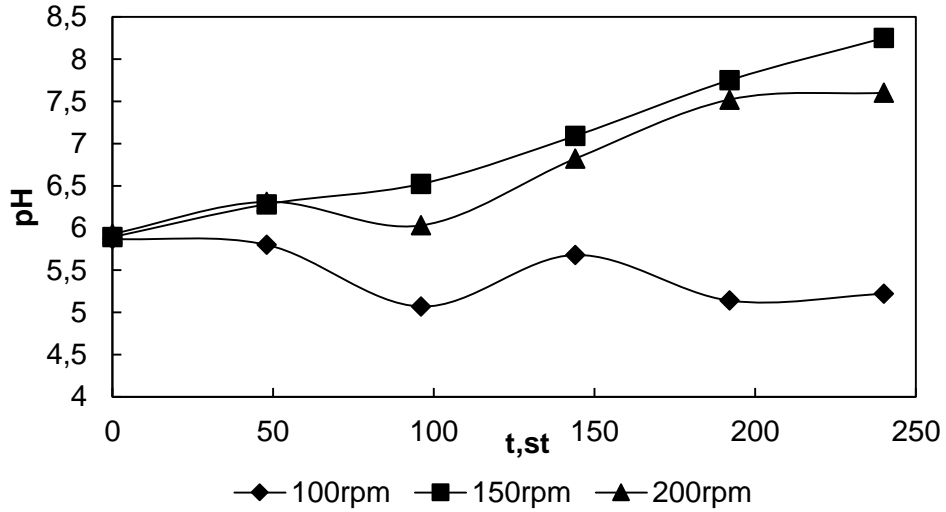
%50 ZK-UYM ortamında *R. glutinis* çoğalması ve spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine karıştırma hızının etkisi N=100, 150 ve 200 rpm değerlerinde incelenmiştir. Hücre derişimi, ortam pH değeri, protein derişimi, spesifik SOD ve KAT enzim aktiviteleri, toplam fenol derişimi ve indirgen şeker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

Şekil 4.87'de farklı karıştırma hızlarında zamanla hücre derişiminin değişimi yer almaktadır. 150 ve 200 rpm karıştırma hızlarında 100 rpm'e göre daha yüksek hücre derişimine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, düşük karıştırma hızında oksijen aktarım hızının da düşük olması, buna karşın yüksek karıştırma hızında hücreler üzerine stres yaratılması olarak değerlendirilmiştir.



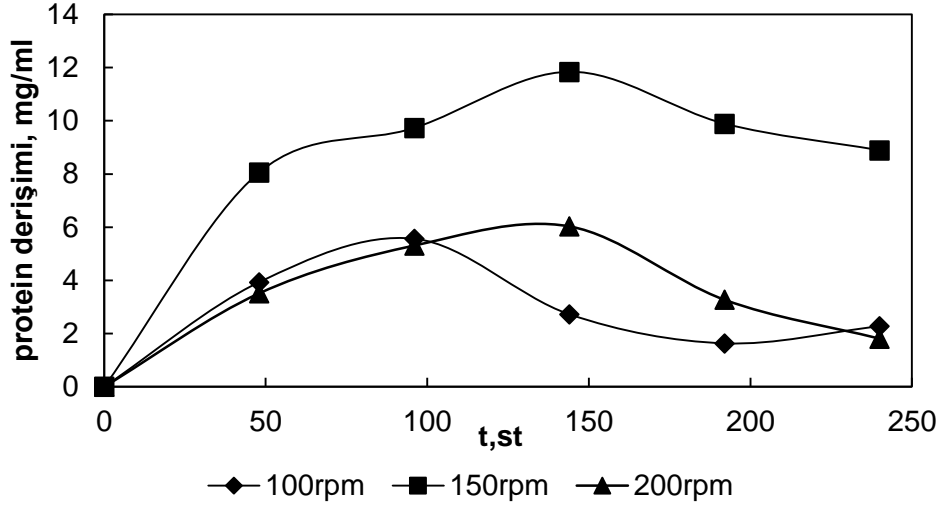
Şekil 4.87 Karıştırma hızının hücre çoğalmasına etkisi (T=30°C)

N=150 ve 200 rpm karıştırma hızlarında *R.glutinis* hücrelerinin çoğalmasına paralel olarak ortam pH'ı da zaman ile artırmışlardır (Şekil 4.88). Çoğalmanın az olduğu 100 rpm karıştırma hızında ise ortam pH'ının zaman ile azaldığı görülmektedir.



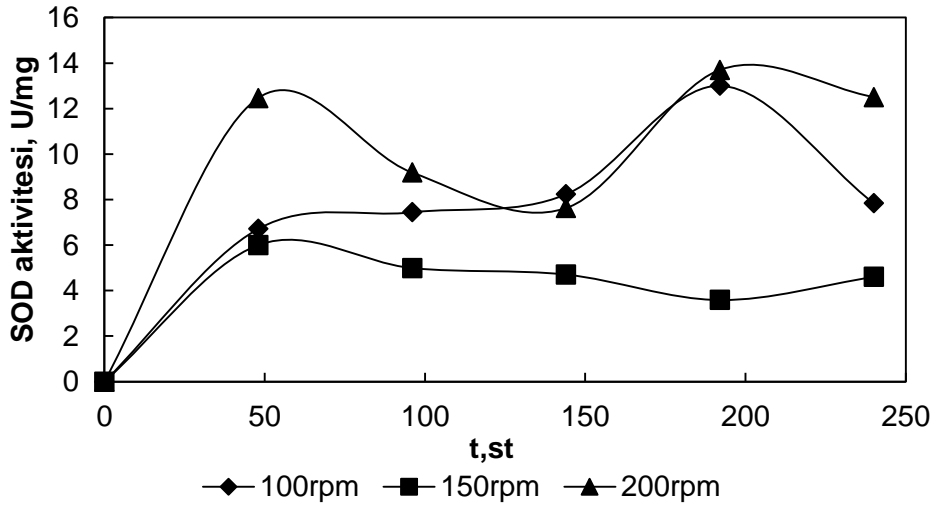
Şekil 4.88 Karıştırma hızının ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C)

Çalışılan karıştırma hızlarında hücre içi protein derişimi, çoğalmanın başlarında zaman ile artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (Şekil 4.89). En yüksek hücre içi protein derişimine 144.st sonunda N=150 rpm'de (11.84 mg/mL) ulaşılmıştır.



Şekil 4.89 Karıştırma hızının hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C)

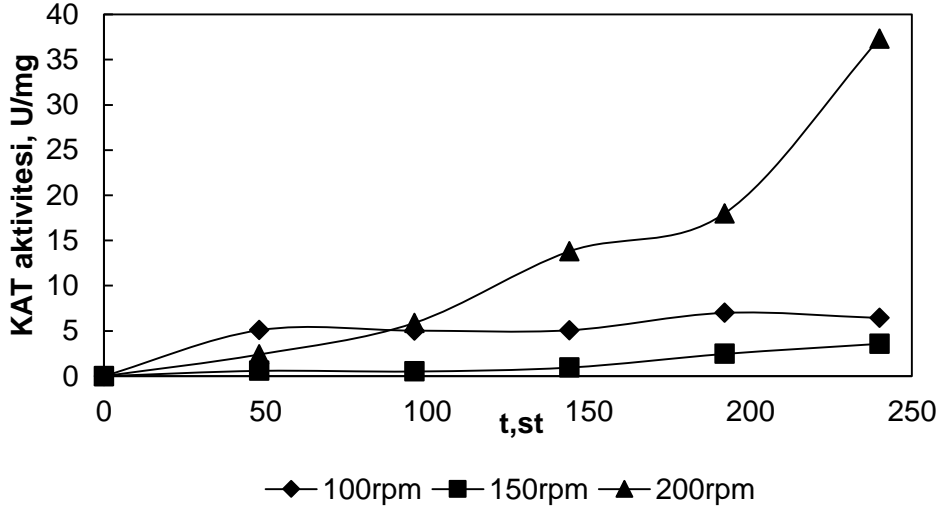
R. glutinis'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin (U/mg) farklı karıştırma hızlarında zamanla değişimi Şekil 4.90'da verilmiştir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi değerinin (13.7 U/mg) N=200 rpm karıştırma hızında 192. saatte elde edildiği görülmektedir. Çoğalmanın en yüksek olduğu 150 rpm'de ise SOD aktivitesi en düşük çıkmıştır. Yüksek karıştırma hızında hücreler üzerine yaratılan stres enzim aktivitesini artırıcı yönde etki etmiştir.



Şekil 4.90 Karıştırma hızının spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C)

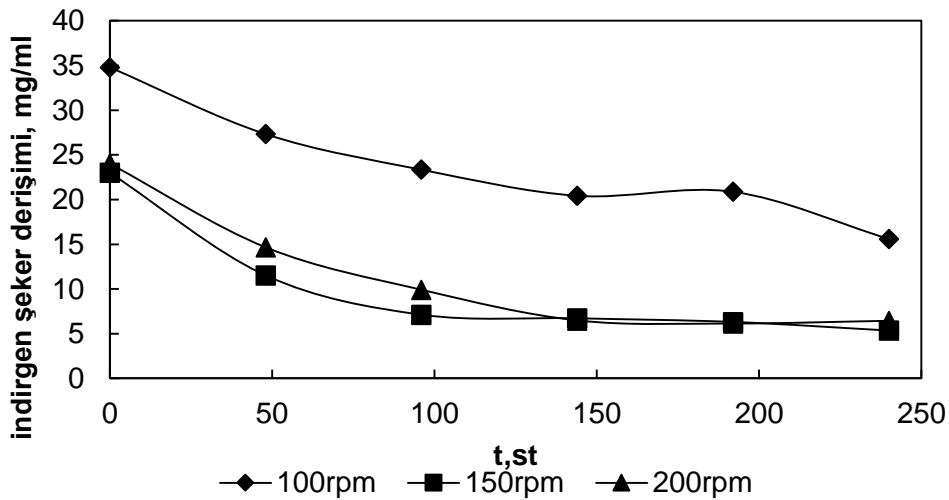
Farklı karıştırma hızlarında *R. glutinis*'in hücre içi spesifik katalaz aktivitesinin (U/mg) zamanla değişimi ise Şekil 4.91'de verilmiştir. Zamanla spesifik aktivitenin değişimi incelendiğinde 100 rpm için 96. saate kadar bir artma ve sonrasında ise belirgin bir değişim gözlenmemiştir. 200

rpm için ise 48.saatten başlayarak 240.st sonuna kadar bir artış söz konusudur. En yüksek KAT aktivite değerleri sırasıyla 200 rpm (37.31 U/mg) > 100 rpm (6.43 U/mg) > 150 rpm (3.59 U/mg) şeklinde elde edilmiştir.



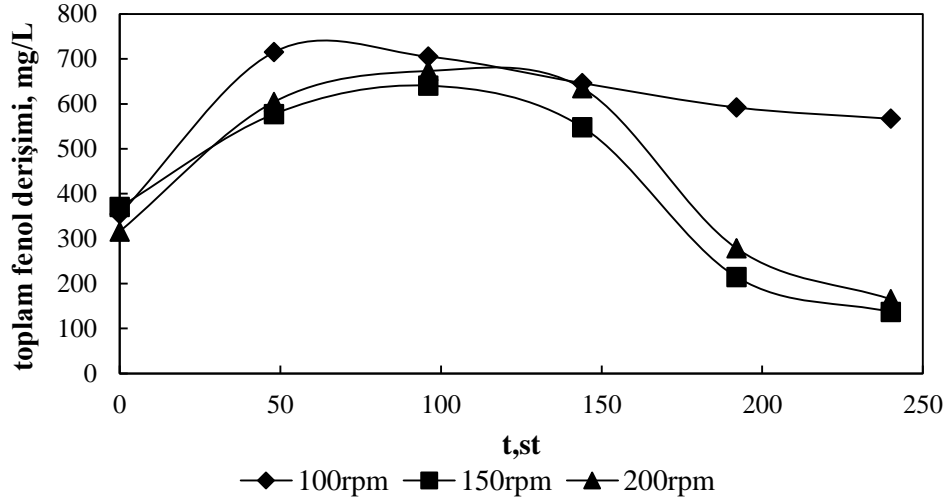
Şekil 4.91 Karıştırma hızının spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C)

Çalışılan tüm karıştırma hızlarında indirgenmiş şeker tüketimi zamanla artış göstermiş ve yaklaşık 144. saat sonunda sabit değerlere gelmiştir (Şekil 4.92). t= 240.st sonunda 150 rpm (%77) ve 200 rpm (%73)'lük indirgenmiş şeker tüketimi en yüksek değerlere ulaşmıştır. Düşük karıştırma hızında ise indirgen şeker tüketimi %55 oranında kalmıştır.



Şekil 4.92 Karıştırma hızının indirgenmiş şeker tüketimi (T=30°C)

Farklı karıştırma hızlarında zaman ile toplam fenol derişiminin değişimi Şekil 4.93'te gösterilmiştir. İlk 48 saat u karışma hızı benzer eğriler gösterse de 100 rpm karıştırma hızında 96.st sonrasında belirgin bir değişim gözlenmezken 150 ve 200 rpm karıştırma 144.st sonrasında fenol giderimi artmaktadır.



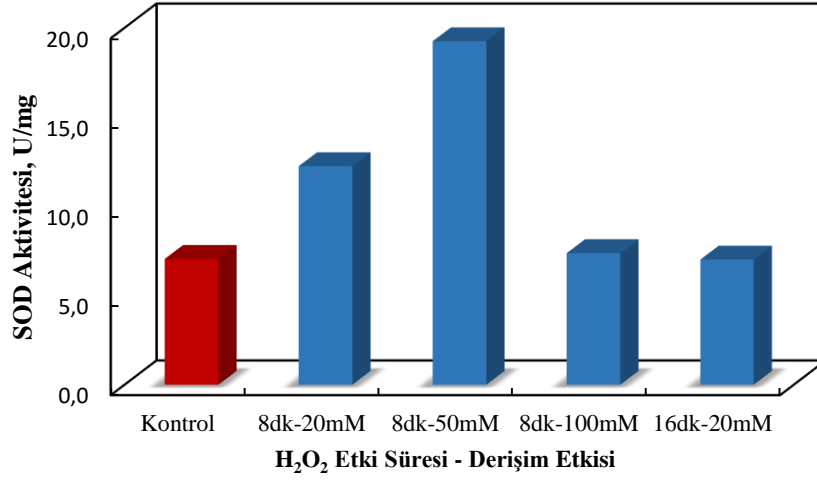
Şekil 4.93 Karıştırma hızının toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C)

4.2.7 Stres koşulları etkisi

R.glutinis'in enzim aktivitesi üzerine stres koşulları etkisi çoğalma ortamında oksidatif stres yaratılarak incelenmiştir. Dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı oksidatif stres olarak adlandırılır. Çalışmada, oksidatif stres olarak 48 saat süre ile %50 ZK-UYM ortamında çoğalan hücelere farklı derişimlerde H₂O₂ farklı sürelerde etki ettirilerek ve UV işıma farklı sürelerde etki ettirilerek uygulanmıştır.

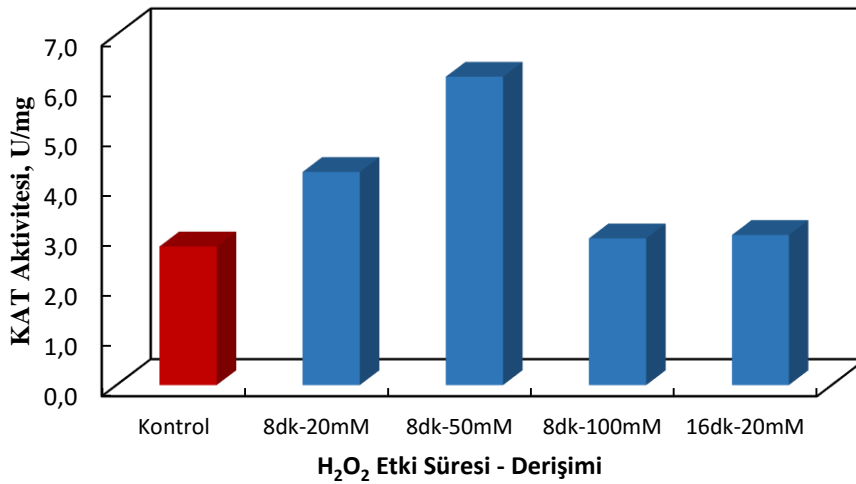
H₂O₂ Etkisi

20mM, 50mM ve 100mM derişimlerinde H₂O₂ 8 dk süre ile, 20mM derişiminde H₂O₂ ise ayrıca 16dk süre ile hücelere eklenerek bekletilmiştir. Oksidatif stresin SOD aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.94'te verilmiştir. 20mM derişimindeki H₂O₂ 8 dk süre ile uygulandığında kontrol ortamına göre ve 16 dk değerine göre daha yüksek spesifik SOD aktivitesi elde edilmiştir.



Şekil 4.94 Farklı süre ve derişimlerde H₂O₂ oksidatif stresinin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

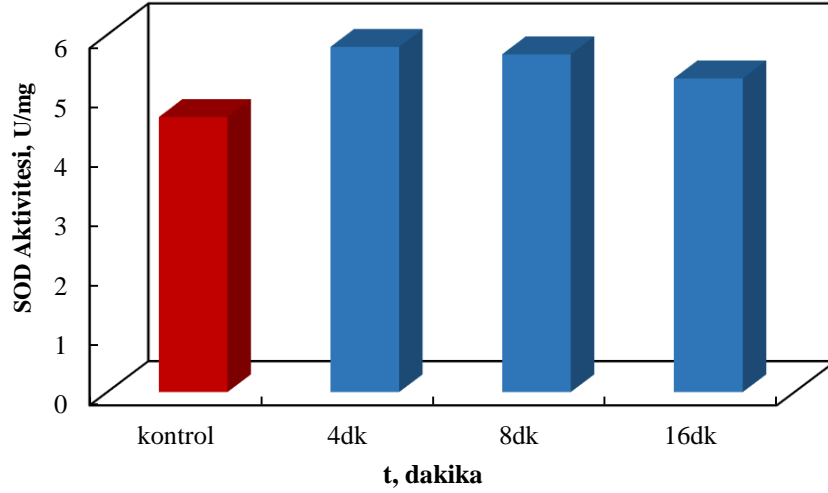
H₂O₂ etkisinin spesifik KAT aktivitesi üzerine etkisi ise Şekil 4.95’de verilmiştir. En yüksek aktiviteye 50mM derişimde H₂O₂ hücrelere 8 dk süre ile uygulandığında elde edilmiştir. 8 dk süre uygulanan 50mM derişimindeki H₂O₂ spesifik KAT aktivitesi (6.16 U/mg), UYM ortamına (4.18 U/mg) göre daha yüksektir (Ünlü vd., 2012). Yüksek derişim ve sürelerde H₂O₂ uygulandığında hem SOD ve hem de KAT enzim aktivitesi üzerinde negatif etkiye sebep olmuştur.



Şekil 4.95 Farklı süreler ve derişimlerdeki H₂O₂’in hücrelerin spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

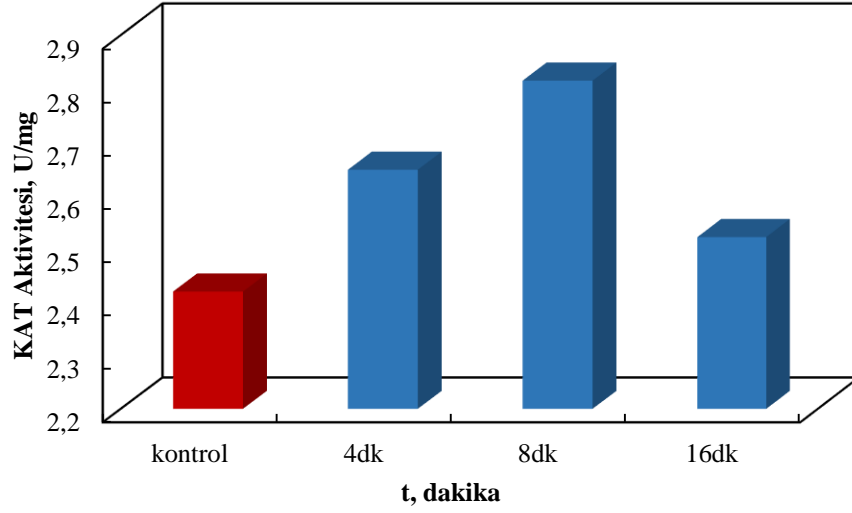
UV Işık Etkisi

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



Şekil 4.96 Farklı sürelerde uygulanan UV ışığın hücrelerin spesifik SOD aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

Stres koşullarında, en yüksek spesifik KAT aktivitesi (2.82 U/mg) UV ışığın 8 dk süre maruz kaldığında elde edilmiştir. Kontrol ortamına göre 1.16 kat artış olmuştur (Şekil 4.97). Hücreler 16 dk süre ile UV ışığına maruz bırakıldığında ise aktivitenin düştüğü belirlenmiştir.

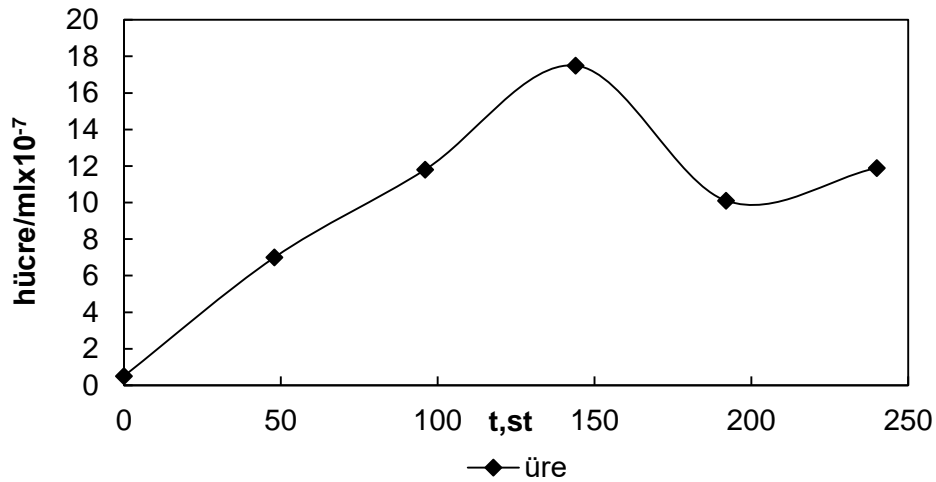


Şekil 4.97 Farklı sürelerde UV ışığın spesifik KAT aktivitesine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

4.2.8 En iyi koşullarda üretim

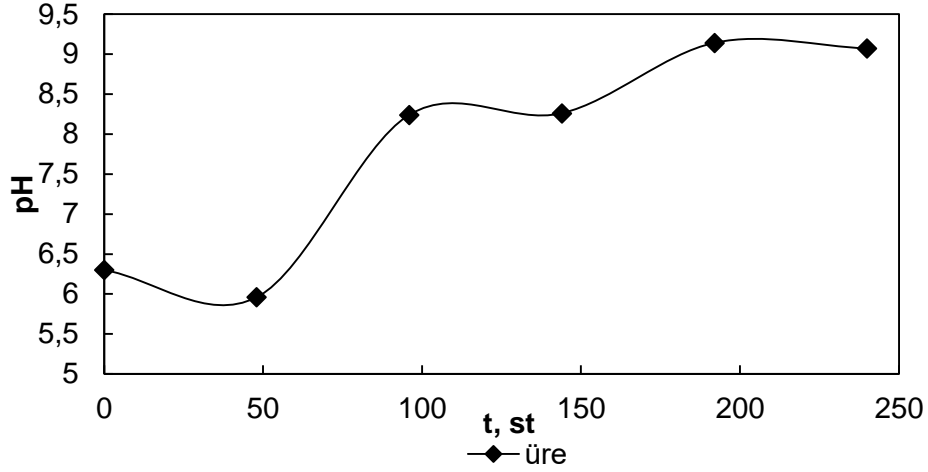
Önceki deney setlerinden elde edilen yüksek değerler incelendiğinde %50 zeytin karasuyu derişiminde 30°C'de 150 rpm de yapılan çalışmalara ek karbon kaynağı bulunmayan ancak ek azot kaynağı olarak üre ile desteklenen ortam en iyi enzim üretim ortamı olarak belirlenmiştir.

En iyi koşullarda üretilen *R. glutinis*'in hücre derişiminin zamanla değişimi Şekil 4.98'de verilmiştir. En yüksek *R. glutinis* derişimine 144. saat sonunda 17.5×10^7 hücre/mL olarak ulaşılmıştır.



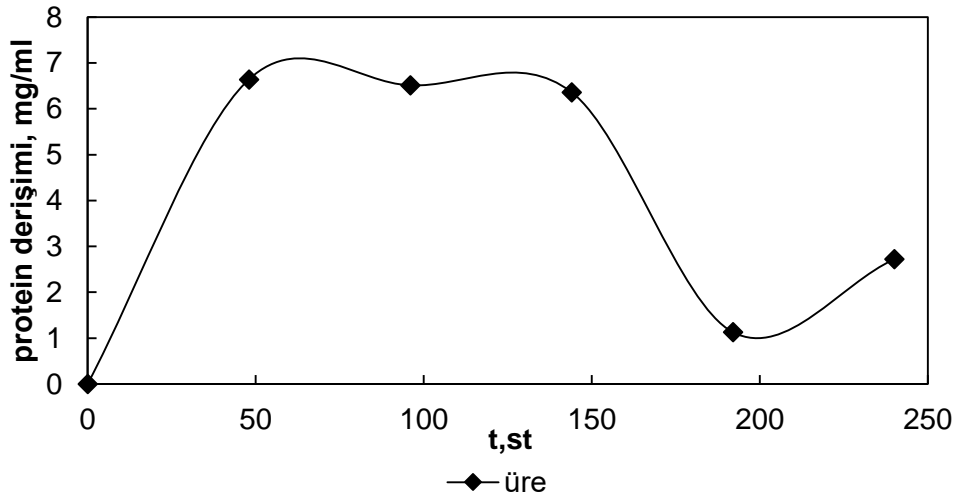
Şekil 4.98 En iyi koşullarda üretilen hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

En iyi koşullarda üretilen *R.glutinis* hücreleri çoğalmaya paralel olarak ortam pH değerini de artırmışlardır (şekil 4.99).



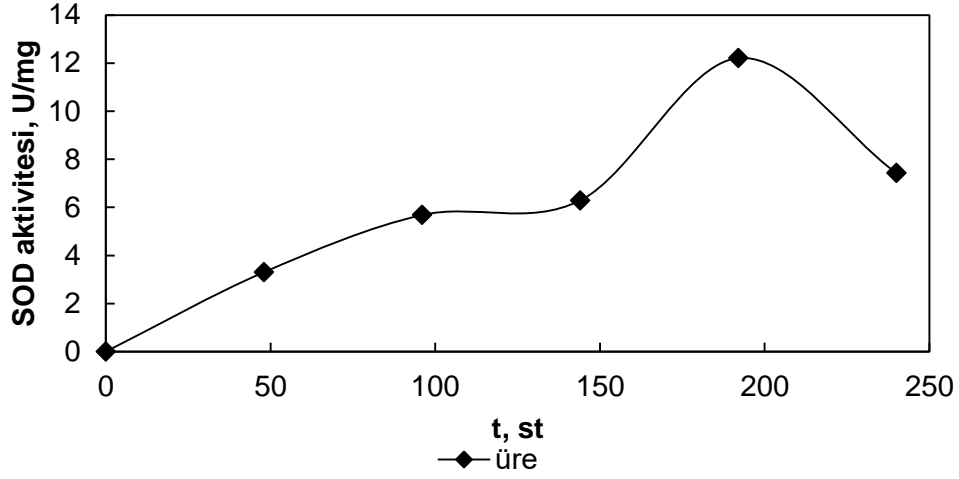
şekil 4.99 En iyi koşullarda üretilen ortam pH değerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

En iyi koşullarda geręekleřtirilen deneylerde zaman ile hücre içi protein derişimi çoğalmanın başlarında artış göstermiş, ileri zamanlarda ise artış azalarak düşme gözlenmiştir (şekil 4.100). En yüksek hücre içi protein derişimi 6.64 mg/mL'dir.



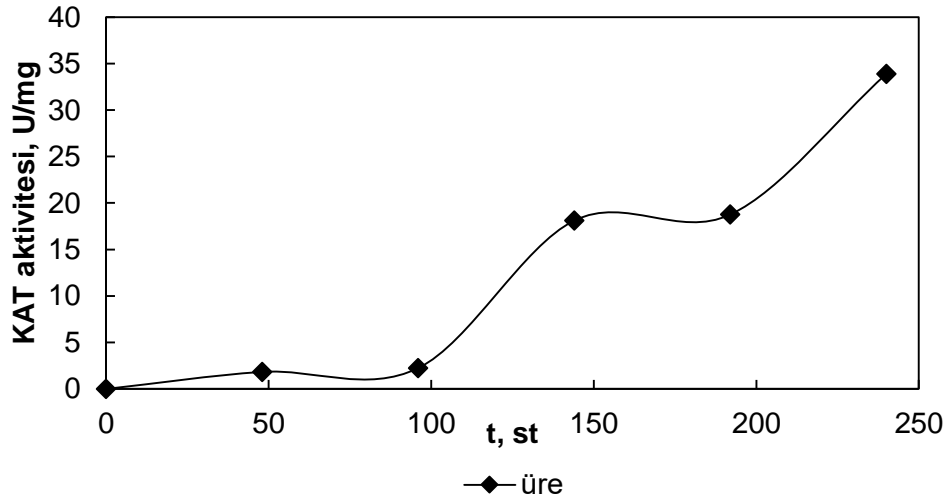
şekil 4.100 En iyi koşullarda üretilen hücre içi protein derişiminin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

En iyi koşullarda spesifik SOD aktivitesi, çoğalmanın ilk 200 saat boyunca belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 4.101). En yüksek spesifik SOD aktivitesine 200 saat sonunda 12.22 U/mg olarak ulaşılmıştır.



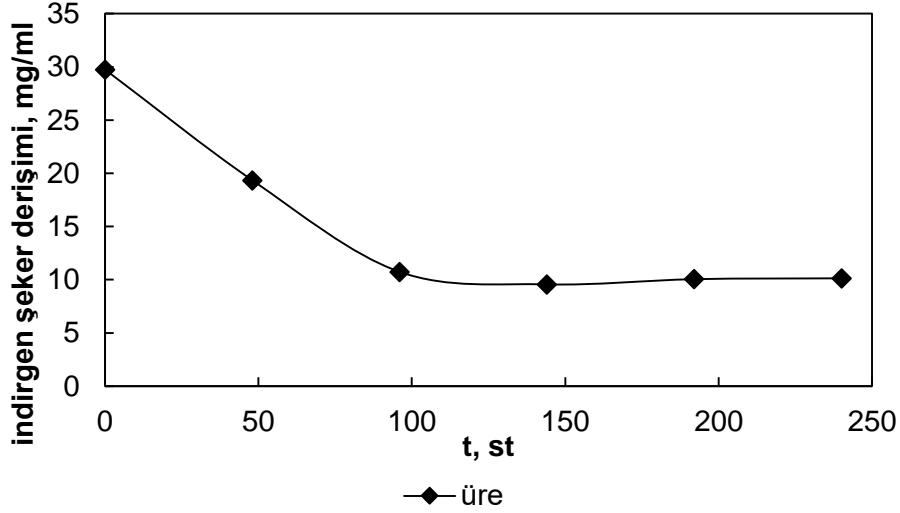
Şekil 4.101 En iyi koşullarda üretilen spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (T=30 C, N=150 rpm)

En iyi koşullarda üretim gerçekleştirilen çoğalmada spesifik KAT aktivitesi, 96.saatten sonra hızlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.102). En yüksek spesifik KAT aktivitesine 240 saat sonunda 33.9 U/mg olarak ulaşılmıştır



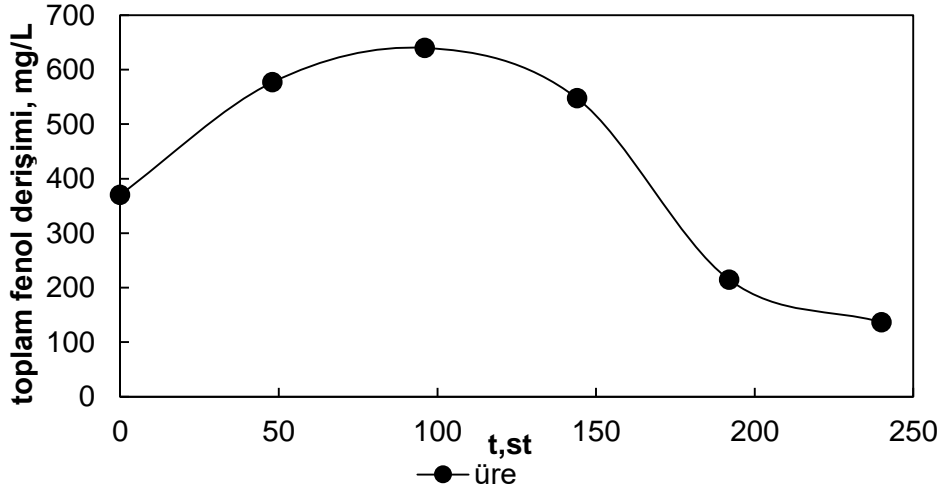
Şekil 4.102 En iyi koşullarda üretilen spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (T=30C, N=150 rpm)

İndirgen şeker tüketiminin zamanla değişimi Şekil 4.103'de verilmiştir. 240 saat sonunda %66 oranında indirgen şeker tüketimi sağlanmıştır.



Şekil 4.103 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda indirgenmiş şeker tüketimi (T=30°C, N=150 rpm)

Şekil 4.104'de zaman ile fenol derişimi verilmiştir. İlk 96 saat fenol miktarı artarken 96.saat sonrasında fenol giderimi hızlanmıştır.



Şekil 4.104 En iyi koşullarda üretilen ortamlarda toplam fenol derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Zeytin karasuyunun *Rhodotorula glutinis* mayası tarafından substrat olarak kullanılarak değerli moleküller üretimini amaçlayan proje iki alt-proje şeklinde yürütülmüştür. Her iki alt-projede de hedeflenen moleküllerin üretimi, hedeflenen başarı ölçütlerine yakın değerler ile gerçekleştirilmiştir.

5.1 Alt-proje-1. Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipid Üretimi ve Karakterizasyonu

Bu alt-projedeki temel başarı ölçütü, *R.glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında yüksek miktarda lipid biriktirmesidir ki bu literatür değerleri göz önüne alınarak $\geq\%40$ olarak hedeflenmiştir. Ancak asıl başarı, lipidin bileşiminin biyodizel üretimi için uygun olacağı koşulların belirlenmesidir. Bunun için net bir bileşim verilmemekle birlikte literatürde uzun zincirli yağ asitlerinin (C18:1, C18:2, C16:0) oranlarının yüksek olması ve halen biyodizel hammaddesi olarak kullanılan bitkisel yağlara benzer olması hedeflenmiştir. Ayrıca, mikrobiyal lipid üretiminin zeytin karasuyundaki fenol giderim derecesini düşürmeden (hedef $\geq\%80$) gerçekleşmesi de projenin bir diğer başarısı olacaktır.

Projede yapılan çalışmalarda, zeytin karasuyu varlığında *R.glutinis* hücrelerinin universal çoğalma ortamına göre daha fazla lipid ürettiği, %100 ZK ile hazırlanmış UYM ortamında üretilen toplam lipid miktarının 0.56 (%9 a/a) olduğu ve doymamış yağ asitleri oleik asit (C 18:1) ve linoleik asit (C18:2) yüzdelerinin arttığı bulunmuştur. Çoğalma ortamına eklenen glukoz ile hücre ve lipid miktarlarının arttığı ve 100 g/L glukoz eklenen ZK ortamında 2.9 g/L %49 toplam lipid üretildiği belirlenmiştir. En yüksek doymamış yağ asidi yüzdesi ise 50 g/L glukoz bulunan ortamda %60'dır. Zeytin karasuyunun yüksek C/N oranına sahip olması nedeniyle çoğalma ortamına eklenen glukoz ve üre miktarları değiştirilmesiyle elde edilen lipid miktarının fazla değişmediği gösterilmiştir.

Önemli bir diğer endüstriyel atık olan gliserolün zeytin karasuyuna eklendiği durumda çoğalan hücre ve üretilen lipid miktarlarının arttığı belirlenmiştir. En yüksek hücre miktarı (14 g/L) 40 g/L gliserol bulunan ortamda, en yüksek lipid miktarı (6.2 g/L) ise 60 g/L gliserol bulunan ortamda elde edilmiştir ki bu koşullarda birim hücre başına üretilen lipid miktarı ise %52 (a/a) 'dir. Bu üretimde yağ asidi dağılımı incelendiği bakıldığı zaman gliserolün oleik asit miktarını %35 değerlerinden %57 ye arttırarak toplam doymamışlığın artmasına neden olduğu görülmüştür.

Zeytin karasuyunun bileşimde bulunan zeytinyağı ve oleik asitin lipid üretimini arttığı, gliserol ve oleik asit ile desteklenmiş zeytin karasuyu ortamındaki çoğalmada en yüksek hücre ve toplam lipid değerlerinin sırasıyla 10.63 g/L ve 4.56 g/L olduğu bulunmuştur ki bu %43 (a/) lipid verimine karşılık gelmektedir.

Zeytin karasuyuna cibre ile yapılan önışleminin, hücre ve yağ asidi miktarlarını arttırdığı çalışmanın bir diğer bulgusudur. Cibre ile önışlem görmemiş ZK ortamında hücre derişimi 2 g/L civarında iken işleml görmüş ZK ortamında 4 g/L değerinin üzerine çıkmıştır. Ayrıca cibre ile önışlem görmüş ortamda üretilen yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asidi miktarı %37 iken işleml görmemiş ZK ortamında bu oran %19 olarak bulunmuştur.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen sürekli işlemlerde sıcaklık ile toplam lipid miktarının ve yağ asidi profilinin değişimi açıkça görülmüştür. Düşük sıcaklıklarda tekli doymamış yağ asitleri (başlıca C18:1) azalırken çoklu doymamış yağ asitleri (başlıca C18:2, C18:3) yüzdesi artmaktadır. Sürekli sistemde, işleml pH'ı ile hücrelerin zeytin karasuyunu tüketim hızları da değişmiştir. Biyoreaktördeki çoğalmalarda %60 toplam fenol giderimine ulaşılmıştır. Biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen en yüksek değerler ve hesaplanan üretim hızları ise aşağıda verilmiştir:

Hücre miktarı= 4.17 g/L (pH= 8, T= 25 °C),

Toplam lipid miktarı= 0.314 g/L (pH= 7, T= 25 °C)

DYA (Doymuş yağ asidi)= %45.9 (pH= 7, 15 °C)

TDYA (Tekli doymamış yağ asidi)= %55.7 (pH= 6.29, 32 °C)

ÇDYA (Çoklu doymamış yağ asidi)= %30 (pH= 7, 15 °C)

Toplam lipid/kuru hücre = 0.12 mg/mg (pH= 6, 25 °C)

ZK tüketim hızı 51.2 mL/st (pH= 6, 25 °C)

Hücre üretim hızı= 106.9 mg/st (pH= 6, 25 °C)

Toplam lipid üretim hızı=13.2 mg/st (pH= 6, 25 °C)

Sonuç olarak, *R. glutinis* hücreleri ile zeytin karasuyunda yüksek verim ile biyodizel üretimine uygun olabilecek özellikte mikrobiyal lipid üretim koşulları belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonra, pilot ölçek biyoreaktörlerde yüksek miktarda lipid üretimine yönlendirilmesi planlanmaktadır.

5.2 Alt -proje 2. Zeytin Karasuyundan Antioksidan Enzimler Üretimi

Bu alt-projedeki başarı ölçütü zeytin karasuyu ortamında *R. glutinis* tarafından üretilen süperoksit dimutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzim aktivitelerinin, aynı maya ile sentetik ortamlarda üretilen enzim aktivitelerine yakın bir değerde olmasıdır. Bunlar, önceki çalışmalarımızda bulunan 1.5 U KAT ve 2 U SOD değerleridir.

Projede yapılan çalışmalarda, *R. glutinis*'in çoğalma ortamına eklenen zeytin karasuyu derişimi %50 değerinde iken spesifik SOD aktivitesinin (4.71 U/mg), %100 değerinde iken ise spesifik KAT aktivitesinin (9.52 U/mg) arttığı belirlenmiştir. Çoğalma ortamına ek karbon kaynağı olarak eklenen sorbitol, glukoz, gliserol ve etanol arasından, etanol hem SOD aktivitesini (14 U/mg) hem de KAT aktivitesini (23.7 U/mg) arttırmıştır. Ek azot kaynağı olarak üre, amonyum sülfat ve maya özütünün ortama eklendiği çoğalmalarda ürenin varlığı SOD aktivitesini arttırmış (22.64 U/mg); ancak ek azot kaynakları KAT aktivitesini azaltmıştır. 15-35°C sıcaklık aralığında, yüksek sıcaklıkta SOD aktivitesi (35 °C; 23.37 U/mg, 2.69 U), düşük sıcaklıkta ise KAT aktivitesi (15 °C; 54.07 U/mg, 5.57 U) yüksek bulunmuştur. *R. glutinis* hücrelerine 48 st çoğalma sonunda uygulanan oksidatif stres etkilerinden 20 mM derişimde 8 dk süre ile H₂O₂ eklenmesi SOD aktivitesini 2.73 kat arttırmış; 50 mM derişiminde 16 dk süre ile H₂O₂ eklenmesi ise KAT aktivitesini 2.22 kat artırmıştır. Hücrelerin UV ışığına maruz bırakılması SOD aktivitesini çok az artırırken, 8 dk maruz bırakılması KAT aktivitesini 1.16 kat arttırmıştır.

Sonuç olarak, *R. glutinis* hücrelerinin zeytin karasuyu ortamında çoğalırken yüksek aktivitede süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerini ürettikleri ve koşullarının değiştirilmesi ile enzim aktivitelerinin artırılabilceği belirlenmiştir. Çalışmaların üretilen enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile sürdürülmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abe, F., Miura, T., Nagahama, T., Inoue, A., Usami, R. Horikoshi, K. 2001. "Isolation of a Highly Copper-Tolerant Yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the Induction of Superoxide Dismutase Activity by Cu²⁺", *Biotechnology Letters*, 23, 2027–2034.
- Aebi, H. 1984. "Catalase in vitro", *Methods Enzymology*, 105, 121–125.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., De Lucia, M., Leonardi, A., Rossi, M. 2010. "Single Cell Oils of the ColdAdapted Oleaginous Yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785", *Microbial Cell Factories*, 9, 73.
- Ayed, L., Asass, N., Sayadi, S., 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.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N. 2007. "Reactive Oxygen Species and the Strategy of Antioxidant Defense in Fungi: a review", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43 (5), 565-575.
- Biryukova, E.N., Medentsev, A.G. , Arinbasarova, A.Y., Akimenko, V.K. 2006. "Tolerance of the Yeast *Yarrowia lipolytica* to Oxidative Stres", *Microbiology*, 75 (3), 293-298.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8), 911–917.
- Borja, R., Rinco´n, B., Raposo, F. 2006. "Anaerobic Biodegradation of Two-Phase Olive Mill Solid Wastes and Liquid Effluents: Kinetic Studies and Process Performance", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81, 1450-1462.
- Bradford, M. M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cheirsilp, B., Suwannarat, W., Niyomdecha, R. 2011. "*Rhodotorula glutinis* and Microalga *Chlorella vulgaris* for Lipid Production from Industrial Wastes and its use as Biodiesel Feedstock", *Industrial New Biotechnology*, 28 (4), 362-368.
- Chu, H., Leeder, J., Gilbert, S. 1975. "Immobilized Catalase Reactor for Use in Peroxide Sterilization of Dairy Products", *J. Food Sci.*, 40, 641.
- Chuck, C.J., Lou-Hing, D., Dean, R., Sargeant, L.A., Scott, R.J., Jenkins, R. W. 2014. "Simultaneous Microwave Extraction and Synthesis of Fatty Acid Methyl Ester from the Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis*", *Energy*. 69, 446-454.
- Cook, J.N., Worsley, J. L. 1996. US 5521-091
- Dai, C.C., Tao, J., Xie, F., Dai, J.J., Zhao, M. 2007. "Biodiesel Generation from Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* with Xylose Assimilating Capacity", *African Journal of Biotechnology*, 6 (18), 2130-2134.

- D'Annibale A, Giovannozzi Sermanni G, Federici F and Petruccioli M. 2006. "Olive-Mill Wastewaters: A Promising Substrate for Microbial Lipase Production", *Bioresource Technology*, 97, 1828–1833.
- Delanian, S., Baillet, F., Huart, J., Lefaix, J.L., Maulard, C., Housset, M. 1994. "Successful Treatment of Radiation-Induced Fibrosis using Liposomal Cu/Zn Superoxide Dismutase: Clinical Trial", *Radiother Oncol.*, 32 (1), 12-20.
- Delanian, S., Martin, M., Bravard, A., Luccioni C., Lefaix, J. L. 2001. "Cu/Zn Superoxide Dismutase Modulates Phenotypic Changes in Cultured Fibroblasts from Human Skin with Chronic Radiotherapy Damage", *Radiother Oncol.*, 58 (3), 325-331.
- Dellomonano, C., Amaretti, A., Zanoni, S., Pompei, A., Matteuzzi, D., Rossi, M. 2007. "Fermentative Production of Superoxide Dismutase with *Kluyveromyces marxianus*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 27-34.
- Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., 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, 356-361.
- Eroğlu, E., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., 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.
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D. 2009. "Valorisation of Agro-Industrial by-products, Effluents and Waste: Concept, Opportunities and the Case of Olive Mill Wastewaters", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84, 895–900.
- Gonçalves, C., Oliveira, F., Pereira, C., Belo, I. 2012. "Fed-batch Fermentation of Olive Mill Wastewaters for Lipase Production", 87 (8), 1215–1218.
- Hengge, A. "Re: How is Catalase Used in Industry", *MadSci Network: General Biology*. <http://madsci.org/posts/archives/mar99/921636249.Gb.r.html> Erişim tarihi: 01.03.2009.
- Hernández-Almanza, A., Montanez, J.C., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. 2014. "*Rhodotorula glutinis* as Source of Pigments and Metabolites for Food Industry", *Food Bioscience*, 5, 64-72.
- Housset, M., Baillet F., Michelson. A.M., Puget, K. 1989. "Action of Liposomal Superoxide Dismutase on Measurable Radiation Induced Fibrosis", *Ann. Med. Interne.*, 140 (5), 365-367.
- Karakaya, A., Laleli, Y., 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., 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.
- Karatay S.E., Dönmez G. 2010. "Improving the Lipid Accumulation Properties of the Yeast Cells for Biodiesel Production using Molasses", *Bioresource Technology*, 101, 7988-7990.

- Koleva, D.I., Petrova, V.Y., Kujumdzieva, A.V. 2008. "Improved Production by Fed-batch Cultivation and Some Properties of Cu/Zn-Superoxide Dismutase from the Fungal Strain *Humicola lutea* 103", Canadian Journal of Microbiology, 54, 957-963.
- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., Limtong, S. 2010. "Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16", Kasetsart J. (Nat. Sci.), 44, 436-445.
- Krumova, E., Angelova, P.D., Pashova, S., Stefanova, L., Van Beeumen, J., Vassilev, S., Angelova, M. 2007. "Improved Production by Fed-Batch Cultivation and Some Properties of Cu/Zn-Superoxide Dismutase from the Fungal Strain *Humicola lutea* 103", Enzyme and Microbial Technology, 40, 524-532.
- Lardinois, O. 1995. "Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide", Free Radic. Res., 22, 251.
- Latha B V., Jeevaratnam K, Murali HS, Manja KS. 2005. "Influence of growth Factors on Carotenoid Pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from Natural Source", Indian J Biotechnol., 4 (3), 353-357.
- Macierzyńska E., Grzelak, A., Bartosz, G. 2007. "The Effect of Growth Medium on the Antioxidant Defense of *Saccharomyces cerevisiae*", Cellular & Molecular Biology Letters, 12, 448-456.
- Marklund, S., Marklund, G. 1974. "Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase", European Journal of Biochemistry, 47, 469-474.
- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal. Chem., 31, 426-428.
- McNamara, J.C., Anastasiou, C.C., O'Flaherty, V., Mitchell, R. 2008. "Bioremediation of Olive Mill Wastewater", International Biodeterioration and Biodegradation, 61, 127-134.
- Niaounakis, M., Halvadakis, C.P. 2006. Bölüm 14, Sayfa 23-64. Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey (2. Basım). Elsevier.
- Orozco, M.R., Hernández-Saavedra, N.Y., Valle, F.A., Gonzalez, B.A., Ochoa, J. 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., Aggelis, G. 2008. "Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Olive-Mill Wastewater-Based Media", Bioresour. Technol., 99, 2419-2428.
- Paraskeva, P., Diamadopoulos, E. 2006. "Technologies for Olive Mill Wastewater (OMW) Treatment: A Review", J. Chem Technol. Biotechnol., 81, 1475-1485.
- Ramos-Cormenzana A., Juirez-Jimenez B., Garcia-Pareja M.P. 1996. "Antimicrobial Activity of Olive Mill Waters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater Waste- Olive Oil", International Biodeterioration and Biodegradation, 96, 283-290.

Saavedra, N.Y.H., Eglyi J.M., Ochoa, J.L. 1998. "Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding a Copper-Zinc Superoxide Dismutase Enzyme from the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii*", *Yeast*, 14, 573-578.

Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S. 2011. "Citric Acid, Biomass and Cellular Lipid Production by *Yarrowia lipolytica* Strains Cultivated on Olive Mill Wastewater-Based Media", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 1439-1448.

Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Hetrick, H., Pham. P. 2013. "Lipid and Carotenoid Production by Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Cultivated on Brewery Effluents", *Energy*, 61, 34-43.

Takaç, S., Karakaya, A. 2009. "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater", *Recent Patents on Chemical Engineering*, 2, 230-237.

Takaç, S. 2011. Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi, TÜBİTAK 109M290 Proje Sonuç Raporu, Ankara

Takaç, S. 2012. Zeytin Karasuyunun Fenolik Maddelerinin Ardışık Homojenizasyon-Ekstraksiyon Prosesleri ile Zenginleştirilmesi ve Biyoartılabirliğinin Kolaylaştırılması için Entegre Bir Proses Geliştirilmesi, TÜBİTAK 111M441 Proje Sonuç Raporu, Ankara

Tsekova, K., Todorova, D. 2002. "Copper (II) Accumulation and Superoxide Dismutase Activity During Growth of *Aspergillus niger* B- 77", *Z. Naturforsch C.*, 57 (3-4), 319-322.

Ünlü, A.E., 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.

Ünlü, A.E., Değirmenbaşı, D., Takaç, S. 2012. "*Rhodotorula glutinis*'in Katalaz Aktivitesi Üzerine Bazı Radikal Oluşturucuların Etkisi", Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10), Bildiri Özetleri Kitabı, P3, İstanbul

Vorauer-Uhl, K., Fürnschliel, E., Wagner, A., Ferko, B., Katinger, H. 2002. "Reepithelialization of Experimental Scalds Effected by Topically Applied Superoxide Dismutase: Controlled Animal Studies", *Wound Repair Regen.*, 10 (6), 366-371.

Vozenin-Brotons, M.C., Sivan, V., Gault, N., Renard, C., Geffrotin, C., Delanian, S., Lefaix, J. L., Martin, M. 2001. "Antifibrotic Action of Cu/Zn SOD is Mediated by TGF-beta1 Repression and Phenotypic Reversion of Myofibroblasts", *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (1), 30–42.

Wang, S.L., Chen, G.T., Qi, G.H., Yang, Z.P., Li, B. 2008. "Formulation of Culture Medium for Superoxide Dismutase Production by *Rhodotorula glutinis* RY-06 Strain with High Yield of Beta-Carotene", 978-1-4244-1748-3/08, IEEE Xplore.

Wu S., Hu, C., Jin G., Zhao X., Zhao Z.K. 2010. "Phosphate-Limitation Mediated Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*", *Bioresource Technology*, 101, 6124-6129.

Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. 2008. "Studies on Lipid Production by *Rhodotorula glutinis* Fermentation using Monosodium Glutamate Wastewater as Culture Medium", *Bioresource Technology*, 99, 5923-5927.

Yan, G., Hua, Z., Li, Y., Liu, D., Chen, J. 2005. "Enhanced Catalase Synthesis by a Novel Combined System of Photocatalytic Reactor and Fermentor", *Biotechnology Letters*, 27, 683-687.

Yan, G., Zhaozhe, H., Liu, D., Du, G., Chen, J. 2006. "Influence of Oxygen Level on Oxidative Stress Response of *Bacillus sp.* F26 to Menadione", *Process Biochemistry*, 41, 764-769.

Yen, H.W., Chang, J.T., Chang, J.S. 2015a. "The Growth of Oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an Internal-Loop Airlift Bioreactor by using Mixture Substrates of Rice Straw Hydrolysate and Crude Glycerol", *Biomass and Bioenergy*, 80, 38-43.

Yen, H.W., Liao, Y.T., Liu, Y.X. 2015b. "Cultivation of Oleaginous *Rhodotorula mucilaginosa* in Airlift Bioreactor by Using Seawater", *J Biosci Bioeng.*, doi:10.1016/j.jbiosc.2015.06.007

Yen, H.W., Liu Y.X. 2014. "Application of Airlift Bioreactor for the Cultivation of Aerobic Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* with Different Aeration Rates", *J Biosci Bioeng.*, 118 (2), 95-198.

Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V., Pirozzi, D. 2010. "Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production", *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8630-8635.

Zhang, G., French, W.T., Hernandez, R., Alley, E., Paraschivescu, M. 2011. "Effects of Furfural and Acetic Acid on Growth and Lipid Production from Glucose and Xylose by *Rhodotorula glutinis*", *Biomass and Bioenergy*, 35, 734-740.

Zhang, Z., Zhang, X., Tan, T. 2014a. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* Under Irradiation/High-Temperature and Dark/Low-Temperature Cultivation", *Bioresour Technol.*, 157, 149-153.

Zhang, Z., Ji, H., Gong, G., Zhang, X., Tan, T. 2014b. "Synergistic Effects of Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* and Microalga *Chlorella vulgaris* for Enhancement of Biomass and Lipid Yields", *Bioresour Technol.*, 164, 93-99.

Zhou, W., Wang, W., Li, Y., Zhang, Y. 2013. "Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in Bioethanol Wastewater and Evaluation of Biomass Energetic Yield", *Bioresour Technol.*, 127, 435-440.

<http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-70398.html> (Erişim tarihi : 15.04.2015)

<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QD/E> (Erişim tarihi: 17.11.2015)

EKLER

EK 1 Protein derişimi kalibrasyon doğrusu

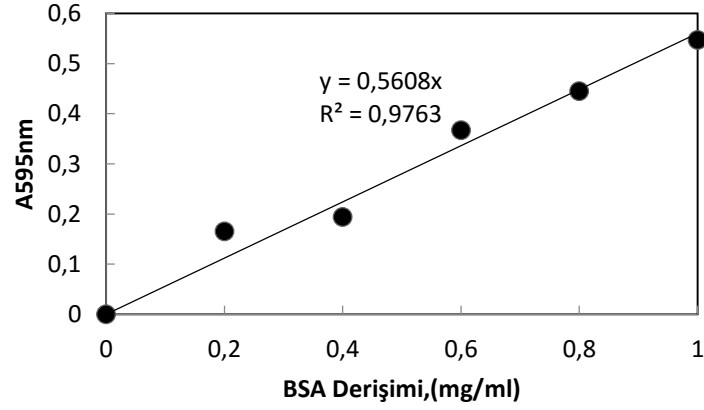
EK 2 İndirgenmiş şeker derişimi kalibrasyon doğrusu

EK 3 Toplam fenol derişimi kalibrasyon doğrusu

EK 4 Yağ asit dağılımı örnek GC kromatogramı

EK 1 Protein derişimi kalibrasyon doğrusu

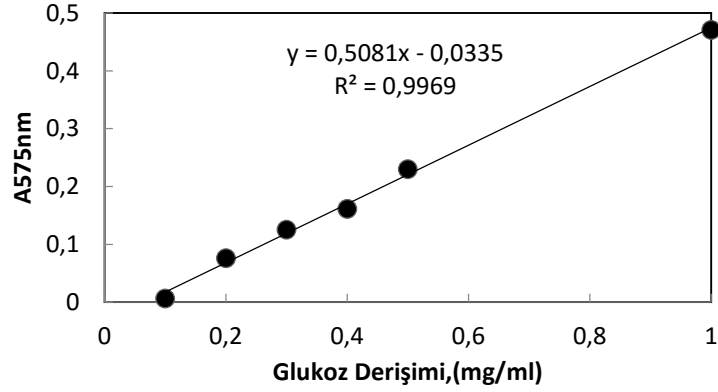
Protein derişimi kalibrasyonu hazırlanmasında standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Farklı derişimlerde BSA'nın sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bradford (1976) yöntemi her bir derişim için uygulanmış ve $\lambda=595$ nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Şekil EK 1.1).



Şekil EK 1.1 Protein tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

EK 2 İndirgenmiş şeker derişimi kalibrasyon doğrusu

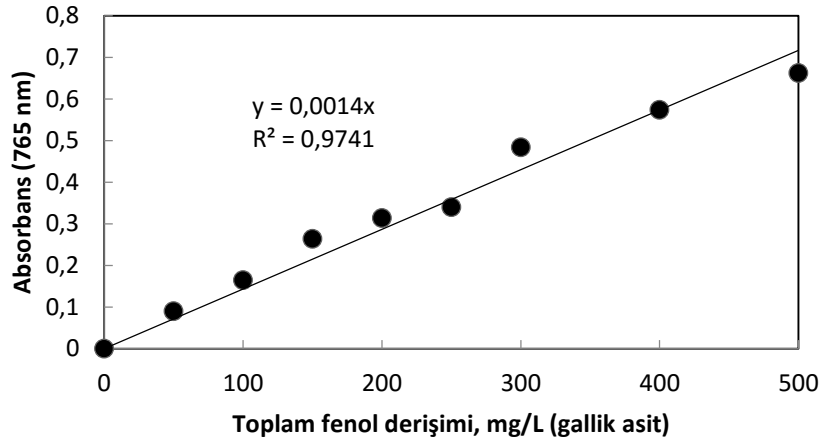
İndirgen şeker derişimi analizinde, glikozun su ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki çözeltileri standart olarak kullanılmıştır. Her bir derişim için DNS yöntemi uygulanarak spektrofotometrik olarak $\lambda=575$ nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Şekil EK 2.1).



Şekil EK 2.1 İndirgenmiş şeker tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

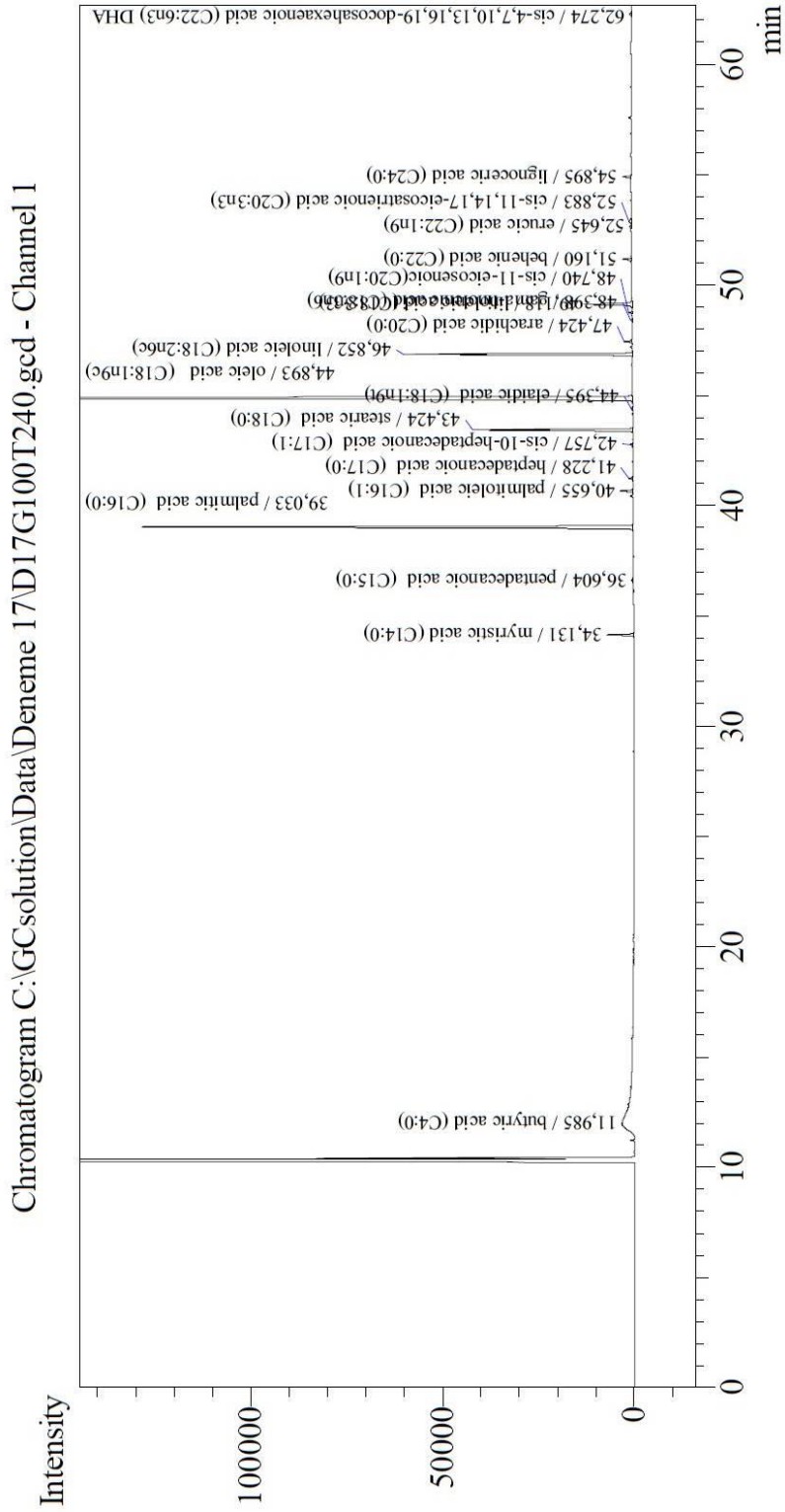
EK 3 Toplam fenol derişimi kalibrasyon doğrusu

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 gallik asit/L) hesaplanmıştır (Şekil Ek 3.1).



Şekil EK 3.1 Toplam fenol tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

EK 4 Yağ asit dağılımı örnek GC kromatogramı



Şekil EK 4.1 100 g/L glukoz içeren çoğalma ortamının 240. saatine ait yağ asidi dağılımı gösteren GC kromatogramı

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 113M589
Proje Başlığı: Zeytin Karasuyundan Katma Değer Yaratacak Biyomoleküller Üretimi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Zekiye Serpil Takaç
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü 06100 Tandoğan Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma, Geliştirme ve Üretim A.Ş. Tunus Cad. No:95 Kavaklıdere- Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.11.2013 - 01.11.2015
Öz (en çok 70 kelime) Birim kuru hücre başına üretilen en yüksek toplam lipid %52 olarak gliserol eklenen zeytin karasuyu (ZK) ortamında çoğalan hücrelerde elde edilmiştir. ZK, <i>R.glutinis</i> 'in ürettiği lipiddeki doymamış yağ asitleri yüzdesini arttırmış, gliserol içeren ortamda oleik asit miktarı %57 değerine çıkmıştır. ZK ortamında en yüksek SOD aktivitesi 35°C'ta 23.37 U/mg, en yüksek KAT aktivitesi ise 15°C'ta 54.07 U/mg olarak bulunmuştur. Oksidatif stres koşulları, SOD ve KAT aktivitelerini 2.73 ve 2.22 kat arttırmıştır.
Anahtar Kelimeler: Zeytin karasuyu, mikrobiyal lipid, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), <i>Rhodotorula glutinis</i>
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet Gerekli Değil ✓ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Uluslararası Bildiriler Sunumu poster olan bildiriler: Değirmenbaşı, D., Takaç, Z.S., 2015. "Antioxidant Enzymes Production From Olive Mill Wastewater", GCST (1 st International Conference on Green Chemistry and Sustainable Technologies), Abstract Book P.106, İzmir.