

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**FARKLI STRES KOŞULLARINDA *Rhodotorula glutinis*'TEN ANTİOKSİDAN  
ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES KOŞULLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

**Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2012**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTÖPCÜ tarafından hazırlanan ‘**Farklı Stres Koşullarında *Rhodotorula glutinis*’ten Antioksidan Üretimi İçin Biyoproses Koşullarının Geliştirilmesi**’ adlı tez çalışması 15.10.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

### Jüri Üyeleri

**Başkan:** Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU

Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Özer KOLSARICI**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

### FARKLI STRES KOŞULLARINDA *Rhodotorula glutinis*'TEN ANTİOKSİDAN ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES KOŞULLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Çalışmada, antioksidan enzimler sınıfında yer alan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzimlerinin, *Rhodotorula glutinis* mayasından yüksek aktivite ile üretimi için biyoproses koşulları araştırılmıştır. Küçük ölçek (100 ml) ve kesikli işletimde sıcaklık, başlangıç pH değeri, karbon ve azot kaynaklarının etkisi incelendikten sonra, deney tasarımı yapılmıştır. SOD aktivitesinin optimum koşullarında küçük ölçekte radikal oluşturuca kaynakların, büyük ölçekte (1.5 L) ise moleküler oksijenin etkisi incelenmiştir. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. *R. glutinis* çoğalması ve enzim aktivitelerine sıcaklık etkisi UYM ortamında incelenmiş ve en yüksek spesifik KAT ve SOD aktiviteleri 10°C'da sırasıyla 22.6 U/mg ve 185.4 U/mg olarak elde edilmiştir. En yüksek hücre derişimi ve özgül çoğalma hızı sırasıyla, 4.3 mg/ml ve 0.16 st<sup>-1</sup> olarak 30°C'de elde edilmiştir. *R. glutinis*'in çoğalma için gerekli aktivasyon enerjisi 14.56 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. İncelenen karbon kaynakları arasında en yüksek spesifik KAT ve SOD aktivitelerine gliserol kullanıldığında (113 U/mg KAT ve 125 U/mg SOD) ulaşılmıştır. UYM üzerine eklenen farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının hücre çoğalması ve enzim aktiviteleri üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Gliserol derişimi, başlangıç pH değeri ve sıcaklığın faktörler olarak kullanıldığı deneysel tasarımda SOD aktivitesi için optimum koşullar 16.50 g/L gliserol derişimi, 33.9°C sıcaklık ve pH=5.47 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda modelin öngördüğü 2.70 U SOD değeri deneysel olarak 2.40 U olarak elde edilmiştir. Hücre derişimi için ise optimum koşullar; 39.27 g/L gliserol derişimi, 32.2°C sıcaklık ve pH=5.17 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda model tarafından 1.60 mg/ml olarak öngörülen değer deneysel olarak 1.32 mg/ml olarak elde edilmiştir. Gliserollü ortamda hücre çoğalma kinetiği incelendiğinde, substrat inhibisyonlu denklem kullanılarak  $\mu_{max}=0.28 \text{ st}^{-1}$ ,  $K_s=11.84 \text{ g/L}$  ve  $K_i=174.5 \text{ g/L}$  olarak elde edilmiştir. Farklı radikal oluşturuca etkenlerin enzim aktivitelerine etkisi incelendiğinde, SOD aktivitesi metil violojen ile 1.6 kat, KAT aktivitesi ise metilen mavisi ile 3.6 kat artırılmıştır. Moleküler oksijenin enzim aktivitelerine etkisi biyoreaktör sisteminde farklı oksijen aktarım stratejileri ile incelenmiş; optimum SOD üretim ortamı ve koşullarında gerçekleştirilen çoğalmanın başından itibaren ortamda %100 çözünmüş oksijen derişiminin sağlandığı koşulda enzim aktiviteleri 3.2-3.6 kat artırılmıştır.

**Ekim 2012, 158 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Katalaz, süperoksit dismutaz, *Rhodotorula glutinis*, enzim aktivitesi, gliserol, deneysel tasarım, radikal oluşturuca, çözünmüş oksijen

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### IMPROVEMENT OF BIOPROCESS CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF ANTIOXIDANT by *Rhodotorula glutinis* UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS

Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

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

Supervisor: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

The bioprocess conditions for the production of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes, which are the members of antioxidant enzyme class, at high activities from the yeast *Rhodotorula glutinis* were investigated. The effects of temperature, initial pH value, carbon and nitrogen sources were investigated with batch, small scale (100 ml) experiments. The effects of the free radical source at small scale and the effect of molecular oxygen at large scale (1.5 L) were explored under the optimum conditions that support SOD activity, which was obtained by using an experimental design method. The enzyme activities were measured spectrophotometrically. The experiments investigated the effect of temperature on the growth and on the enzyme activities of *R. glutinis* were performed in UYM. 10°C provided the highest specific CAT and SOD activities as 22.6 U/mg ve 185.4 U/mg, respectively. The highest cell concentration and the highest specific growth rate were obtained as 4.3 mg/ml ve 0.16 h<sup>-1</sup> respectively, at 30°C; while the activation energy for the growth of *R. glutinis* was calculated as 14.56 kJ/mol. Glycerol provided the highest specific CAT and SOD activities among the carbon sources investigated (113 U/mg CAT ve 125 U/mg SOD). Various organic and inorganic nitrogen sources that were added in UYM showed no significant effect on the cell growth and enzyme activities. The optimum conditions for SOD activity was identified as 16.50 g/L, pH=5.47 and 33.9°C using experimental design in which glycerol concentration, initial pH value and temperature were used as factors. Under these conditions, SOD activity was obtained as 2.40 U experimentally, while the predicted activity was 2.70 U. The optimum conditions for cell concentration obtained using the experimental design method was identified as 39.27 g/L, pH=5.17 and 32.2°C. The resulting cell concentration was 1.32 mg/ml, while the predicted value was 1.6 mg/ml. The parameters of the growth kinetics for the substrate inhibition was found to be  $\mu_{max}=0.28\text{ st}^{-1}$ ,  $K_s=11.84\text{ g/L}$  ve  $K_i=174.5\text{ g/L}$ . Among the different free radical sources investigated, methyl viologen provided a 1.6 fold increase in SOD specific activity, on the other hand, methylene blue provided a 3.6 fold increase in the CAT specific activity. The effect of molecular oxygen was studied for various oxygen strategies at the favorable conditions for the production of SOD enzyme and the highest increase (3.2-3.6 fold) was obtained at 100% dissolved oxygen level provided from the beginning of the culture.

October 2012, 158 pages

**Key Words:** Catalase, superoxide dismutase, *Rhodotorula glutinis*, enzyme activity, glycerol, experimental design, radical source, dissolved oxygen

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın 2005 yılında bitişi ardından, iş arayışlarımın arasında boş kalmamak için tutunduğum doktora çalışmamın, beni buralara kadar getirebileceğini hayal etmemiştim. Tez çalışması ve deneyler sırasında duyulan zevk ve mutluluğun, dışarıdaki herhangi bir işte bulunamayacağını fark etmem sadece bir iki iş görüşmesi kadar sürdü. Sayın hocamın benim için yazdığı ve pek çok öğrencinin yetiştiği projenin kabul edilmesiyle doktora yolculuğum başlamış oldu. Zaman ilerledikçe önümde örnek olarak gördüğüm sayın hocamın yolundan gitme fikri iyice aklıma yerleşti. Araştırma Görevliliği için çalışmalarım sonuç verdi ve sevdiğim işi yapmanın yanında para kazanır oldum. Uzaktan angarya ve sıkıcı olarak görülebilen bu akademik hayatı aklı, fikri, yol göstericiliği, azmi, çalışkanlığı, hayat duruşu ve zorlu akademik hayata yenik düşmemiş yaşam sevinci ile bana özendiren saygı, minnet ve sevgi duyduğum sayın hocam sayesinde yazıyorum bu satırları. Meşakkatli bir çalışmanın eseri olan bu tezin teşekkür kısmını merak edip okuyan sevgili kişi, huzurunda saygıdeğer ve sevgideğer danışman hocam Prof. Dr. Serpil TAKAÇ’a şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarımın başından itibaren bana destek veren, yüreklendiren, fikirleriyle çalışmalarımı yönlendiren, engin bilgilerini paylaşan, kılavuzluk eden saygıdeğer Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU ve Prof. Dr. Tülin KUTSAL’a teşekkürlerimi sunuyorum.

Labaratuvarda sürekli birlikte çalıştığımız, her konuda fikirlerimizi paylaştığımız, geçirdiğimiz sıkıntılı stresli zamanlarımızda birbirimize destek olduğumuz, neşeli zamanlarımızda sevincimi artıran, ilk geldiği zamanlarda öğrencim, zaman ilerledikçe ise her şeyimi paylaştığım yoldaşım, canım kardeşim olan Gaye BOZKOYUNLU’ya çok teşekkür ediyorum.

Doğum izninden döndüğüm zaman ilk kez karşılaştığım, kısa sürede kaynaşp, çabuk ayrılmak zorunda kaldığımız, her anımızı dolu dolu yaşadığımız, her şeyi paylaştığımız ve paylaşmaya devam ettiğimiz, çalışma azmi, aklı fikri, yaşam tarzına hayran olduğum Emine AKARDERE’ye çok teşekkür ediyorum.

Üç yıl gece gündüz birlikte çalıştığım, yüksek lisansından sonra laboratuvarımızdan ayrılan, ancak bir an bile kopmadığımız, doktora çalışmamın her aşamasında destek olan bana güç veren takım arkadaşım can dostum Banu ERDEM'e çok teşekkür ediyorum.

Dar zamanlarda ortaya attığı ilginç fikirleriyle, her alandaki değişik bakış açısıyla bize yeni ufuklar açan, gece gündüz yan yana 'omuz omuza' çalıştığımız sevgili çalışma arkadaşım Alper KARAKAYA'ya çok teşekkür ediyorum.

2009 yılında tez çalışmalarımın tam hız kazanacağı sırada hayatımın ortasına düşen sevgi yumağı, altın topum, küçük prensesim ALYA İNCİ'm için, nefes aldığım her an şükrediyorum. Benden ayrılmamak için gece yarıları labaratuvarında çizgi film izlemek zorunda kalan, okulun bahçesini oyun parkı olarak benimseyen, cam malzemeleri kırmamaya uğraşarak kendine oyunlar kuran, eski tez çıktıları üstünde resim kabiliyetini geliştiren, her akşam gözümün içine bakan canım kızım, sana ayırmam gereken vakitten çalmak zorunda kaldığım her an için senden özür diliyorum. Senin verdiğin enerji, mutluluk ve huzur olmasa bugünlere gelmem mümkün olamazdı. Varlığın yaşam kaynağım...

Yokluğumda yavruma en iyi şekilde bakan, gözüm arkada kalmadan işime konsantre olmamı sağlayan, gece gündüz demeden ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, dualarıyla her sabah işe yollayan, doktorayı tamamlayabilmemde büyük payları olan canım kayınvalidem, annem Nesrin BÜYÜKTOPCU ve canım kayınpederim, babam İsmail BÜYÜKTOPCU'ya sonsuz teşekkür, şükran ve minnetlerimi sunuyorum.

Dile kolay on dört yıldır yanımda, yanı başımda olan hayat arkadaşım, ruh eşim Tunç BÜYÜKTOPCU; varlığıyla hayatıma anlam kattığın için sana çok teşekkür ediyorum. Yaşamımın en önemli dönüm noktalarında beni hep doğru yönlendirdiğin için, aklını fikrini benimle paylaştığın için, ışıqla hayatımı aydınlattığın için çok teşekkür ediyorum. Doktora çalışmamın başlaması, sürmesi ve devamında bu hayatta ilerlemem için bana verdiğin çok büyük teşvik için teşekkür ederim. İyi ki varsın, iyi ki yanımdasın ve umarım hep olursun.

Ve son teŖekkürüm, Ŗükranım, minnetim beni yetiŖtiren, büyüten, koruyan, kollayan, beni ben yapan her değeri, her özelliği ince ince iŖleyen, buralara gelmemi sağlayan, canım annem Emel ÜNLÜ ve canım babam Dr. Halil ÜNLÜ için. Uzakta olsanız da enerjinizle sevginizle dualarınızla her zaman yanımdasınız. Her imdat dediğimde benim bile gözümde büyüyen yolları hiç yakınmadan sayısız kez aŖındırdınız. Kendimi çaresiz ve çıkmazda hissettiğim her an beni çekip aydınlığa çıkardınız. Sizinle imkansızlar ulaşılabilir oldu. Her gün bana huzur mutluluk ve yaŖama sevinci veren sevgi ve Ŗefkat dolu sesiniz olmasaydı ne yapardım bilemiyorum. Her zaman söylediğim gibi bu dünyadaki en Ŗanslı çocuk benim sizin gibi bir annem ve babam olduğu için. Sizleri çok seviyorum, iyi ki varsınız.

AyŖe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

Ankara, Ekim 2012

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                           |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                 | i    |
| ABSTRACT.....                                                                             | ii   |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....                                                                    | iii  |
| SİMGELER DİZİNİ.....                                                                      | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                      | x    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                                    | xiv  |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                                     | x    |
| 1. GİRİŞ .....                                                                            | 1    |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER.....                                           | 7    |
| 2.1 Mikroorganizmalarda Oksidatif Stres.....                                              | 7    |
| 2.1.1 Primer ve sekonder oksidatif stres faktörleri.....                                  | 7    |
| 2.1.2 Primer reaktif oksijen türleri.....                                                 | 8    |
| 2.1.3 Sekonder Radikaller ve Stresi Artıran Türler .....                                  | 12   |
| 2.1.4 ROT üretiminde geçiş metalleri ve şelatlarının rolü .....                           | 12   |
| 2.1.5 Reaktif oksijen türlerinin temel biyolojik moleküllere verdikleri<br>zararlar ..... | 13   |
| 2.2 Başlıca Antioksidan Bileşenler.....                                                   | 14   |
| 2.2.1 Enzim sistemleri .....                                                              | 16   |
| 2.2.2 Diğer moleküller.....                                                               | 19   |
| 2.3 Süperoksit Dismutaz Enzimi.....                                                       | 21   |
| 2.4 Katalaz Enzimi .....                                                                  | 23   |
| 2.5 <i>Rhodotorula glutinis</i> .....                                                     | 24   |
| 3. DENEYSEL TASARIM .....                                                                 | 28   |
| 3.1 Yanıt Yüzey Yöntemi.....                                                              | 29   |
| 3.1.1 Merkezi karma tasarım .....                                                         | 37   |
| 4. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                | 39   |
| 4.1 Materyal.....                                                                         | 39   |
| 4.2 Deneysel Yöntemler .....                                                              | 39   |
| 4.2.1 Katı agar ortamı.....                                                               | 39   |
| 4.2.2 Üretim ortamı.....                                                                  | 39   |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3 Deneysel tasarım .....                                                                                      | 40 |
| 4.2.4 Biyoreaktör deneyleri .....                                                                                 | 41 |
| 4.3 Analitik Yöntemler .....                                                                                      | 42 |
| 4.3.1 Hücre derişimi .....                                                                                        | 42 |
| 4.3.2 Hücrelerin parçalanması .....                                                                               | 42 |
| 4.3.3 Protein derişimi .....                                                                                      | 43 |
| 4.3.4 Katalaz (KAT) aktivitesi .....                                                                              | 43 |
| 4.3.5 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi .....                                                                  | 44 |
| 4.3.6 İndirgen şeker tayini .....                                                                                 | 45 |
| 5. ARAşTIRMA BULGULARI .....                                                                                      | 47 |
| 5.1 Sıcaklık Etkileri .....                                                                                       | 47 |
| 5.1.1 <i>R. glutinis</i> 'in hücre derişimi ve özgül çoğalma hızı üzerine sıcaklığın etkisi ..                    | 47 |
| 5.1.2 <i>R. glutinis</i> 'in hücre dışı pH değişimi üzerine sıcaklığın etkisi .....                               | 49 |
| 5.1.3 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi protein derişimi üzerine sıcaklığın etkisi .....                           | 50 |
| 5.1.4 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....                         | 51 |
| 5.1.5 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....             | 55 |
| 5.2 Başlangıç pH Değerinin Etkileri .....                                                                         | 59 |
| 5.2.1 <i>R. glutinis</i> 'in çoğalması üzerine başlangıç pH değerinin etkisi .....                                | 59 |
| 5.2.2 <i>R. glutinis</i> 'in hücre dışı pH değişimi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi ..                      | 61 |
| 5.2.3 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi protein derişimi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi .....               | 61 |
| 5.2.4 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi .....             | 62 |
| 5.2.5 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi ..... | 66 |
| 5.3 Karbon Kaynaklarının Etkisi .....                                                                             | 69 |
| 5.3.1 <i>R. glutinis</i> 'in çoğalması üzerine karbon kaynaklarının etkisi .....                                  | 69 |
| 5.3.2 <i>R. glutinis</i> 'in hücre dışı pH değişimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi ....                      | 74 |
| 5.3.3 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine karbon kaynaklarının etkisi .....               | 75 |

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.4 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine karbon kaynaklarının etkisi..... | 79  |
| 5.4 Azot Kaynaklarının Etkisi.....                                                                             | 83  |
| 5.4.1 <i>Rhodoturula glutinis</i> 'in çoğalması üzerine azot kaynaklarının etkisi .....                        | 83  |
| 5.4.2 <i>R. glutinis</i> 'in çoğalmasında hücre dışı pH değişimi üzerine azot kaynaklarının etkisi.....        | 85  |
| 5.4.3 <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine azot kaynaklarının etkisi...                 | 85  |
| 5.4.4 <i>R.glutinis</i> 'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine azot kaynaklarının etkisi.....    | 89  |
| 5.5 DeneySEL Tasarım .....                                                                                     | 93  |
| 5.6 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalma Kinetiği.....                                                               | 108 |
| 5.7 Radikal Oluşturucuların Etkisi .....                                                                       | 110 |
| 5.8 Çözünmüş Oksijen (%) Etkisi .....                                                                          | 116 |
| 6. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....                                                                                   | 121 |
| 6.1 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....                  | 121 |
| 6.2 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Başlangıç pH Değerinin Etkisi .....      | 124 |
| 6.3 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi .....        | 126 |
| 6.4 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi .....          | 129 |
| 6.5 DeneySEL Tasarım .....                                                                                     | 130 |
| 6.6 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalma Kinetiği.....                                                               | 133 |
| 6.7 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Radikal Oluşturucuların Etkisi .....     | 133 |
| 6.8 <i>R. glutinis</i> 'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Çözünmüş Oksijen Derişiminin Etkisi..... | 135 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                | 140 |
| EKLER.....                                                                                                     | 147 |
| EK 1 Kullanılan cihazlar.....                                                                                  | 148 |
| EK 2 Kullanılan kimyasal maddeler.....                                                                         | 149 |

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>EK 3 Hücre derişimi cevabı için ANOVA analiz sonuçları.....</b> | <b>150</b> |
| <b>EK 4 KAT aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları.....</b> | <b>152</b> |
| <b>EK 5 SOD aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları.....</b> | <b>154</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                               | <b>156</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|             |                                                                      |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|
| $B$         | İkinci dereceden model katsayıları tahmin edicisi                    |
| $b$         | Doğrusal model katsayıları tahmin edicisi                            |
| $b_0$       | Model sabiti                                                         |
| $D$         | Toplu ‘desirability’ fonksiyonu                                      |
| $d$         | Her bir yanıt için istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu ‘desirability’ |
| $E$         | Çoğalma aktivasyon enerjisi                                          |
| $Li$        | Alt sınır değeri                                                     |
| $N$         | Karıştırma hızı                                                      |
| $Q$         | Hacimsel akış hızı                                                   |
| $R$         | İdeal gaz sabiti                                                     |
| $R^2$       | Regresyon katsayısı                                                  |
| $R^2_{adj}$ | Düzeltilmiş regresyon katsayısı                                      |
| $S$         | Ağırlık sabiti                                                       |
| $T$         | Sıcaklık                                                             |
| $T_i$       | Hedef değer                                                          |
| $T$         | Ağırlık sabiti                                                       |
| $U_i$       | Üst sınır değeri                                                     |
| $vi$        | Önemlilik derecesi                                                   |
| $X$         | Bağımsız kodlanmış değişken                                          |
| $Y$         | Cevap (doğal)                                                        |
| $\square$   | Hata                                                                 |
| $\xi$       | Bağımsız doğal değişken                                              |
| $H$         | Kodlanmış cevap                                                      |
| $\Lambda$   | Dalga boyu                                                           |
| $M$         | Özgöl çoğalma hızı                                                   |

### ***Kısaltmalar***

|       |                                                 |
|-------|-------------------------------------------------|
| AA    | Askorbik asit                                   |
| AAPH  | 2,2’-azobis(2-metilpropiyonamidin)dihidroklorür |
| AN    | Amonyum nitrat                                  |
| ANOVA | Varyans analizi (Analysis of variance)          |

|       |                                            |
|-------|--------------------------------------------|
| AS    | Amonyum sülfat                             |
| BSA   | Bovin serum albumin                        |
| BHA   | Bütillenmiş hidroksianisol                 |
| CAT   | Catalase                                   |
| CCC   | Dış çemberli tasarım (circumscribed)       |
| CCF   | Yüzey merkezli tasarım (face centered)     |
| CCI   | İç çemberli tasarım (CCI)                  |
| ÇO    | Çözünmüş oksijen                           |
| DD    | Doğal değişken                             |
| DNS   | Dinitrosalisilik asit                      |
| DS    | Düşük seviye                               |
| EDTA  | Etilendiamin tetraasetik asit              |
| GSH   | Glutasyon                                  |
| KAT   | Katalaz                                    |
| KD    | Kodlanmış değişken                         |
| MKT   | Merkezi karma tasarım                      |
| PG    | Propil galat                               |
| PN    | Potasyum nitrat                            |
| PRESS | Tahminlenmiş kalıntı hata kareleri toplamı |
| ROT   | Reaktif oksijen türleri                    |
| SOD   | Süperoksit dismutaz, superoxide dismutase  |
| TBHQ  | Tersiyer bütıl hidrokinon                  |
| U     | Ünite (enzim aktivitesi)                   |
| UYM   | Universal yeast medium                     |
| YS    | Yüksek seviye                              |
| YYY   | Yanıt Yüzey Yöntemi                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1 Biyoreaktörün şematik görünümü.....                                                                                                        | 42 |
| Şekil 4.2 Bradford yöntemi ile protein tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği.....                                                                 | 43 |
| Şekil 4.3 Progallolün otooksidasyonu için örnek grafik.....                                                                                          | 45 |
| Şekil 4.4 DNS yöntemiyle indirgen şekerler için kalibrasyon grafiği.....                                                                             | 46 |
| Şekil 5.1 <i>R. glutinis</i> 'in çoğalması üzerine sıcaklığın etkisi (UYM, N=150 rpm).....                                                           | 47 |
| Şekil 5.2 Farklı sıcaklıklarda ulaşılan en yüksek kuru hücre derişimi değerleri (UYM, N=150 rpm).....                                                | 48 |
| Şekil 5.3 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in özgül çoğalma hızları (UYM, N=150 rpm).....                                                    | 49 |
| Şekil 5.4 <i>R. glutinis</i> çoğalması için ( $\ln \mu$ ; $1/T$ ) grafiği (UYM, N=150 rpm).....                                                      | 49 |
| Şekil 5.5. Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                             | 50 |
| Şekil 5.6 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                        | 51 |
| Şekil 5.7 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                             | 52 |
| Şekil 5.8 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....          | 53 |
| Şekil 5.9 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, 150 rpm).....                      | 53 |
| Şekil 5.10 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                    | 54 |
| Şekil 5.11 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                            | 56 |
| Şekil 5.12 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....         | 56 |
| Şekil 5.13 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm).....                   | 57 |
| Şekil 5.14 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (10°C hariç) (UYM, N=150 rpm).....      | 58 |
| Şekil 5.15 Farklı sıcaklıklarda <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)..... | 58 |
| Şekil 5.16 Farklı başlangıç pH değerlerinde elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                          | 60 |
| Şekil 5.17 Özgül çoğalma hızlarının farklı başlangıç pH değerleri ile değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....                                         | 60 |
| Şekil 5.18 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....         | 61 |
| Şekil 5.19 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, 150 rpm).....     | 62 |
| Şekil 5.20 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....        | 63 |
| Şekil 5.21 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)..... | 63 |

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.22 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....                                                 | 64 |
| Şekil 5.23 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....                                        | 65 |
| Şekil 5.24 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi toplam SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....                                         | 66 |
| Şekil 5.25 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)....                              | 67 |
| Şekil 5.26 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm).....                                                 | 68 |
| Şekil 5.27 Farklı başlangıç pH değerlerinde <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)                          | 68 |
| Şekil 5.28 Farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamlarında elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                               | 70 |
| Şekil 5.29 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlarda hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                                | 71 |
| Şekil 5.30 Farklı ortamlarda <i>R. glutinis</i> çoğalmasında glukoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, laktoz ve maltoz derişimlerinin zamanla değişimleri (T=30°C, N=150 rpm).....                 | 73 |
| Şekil 5.31 Farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamlarının pH değerlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                                     | 74 |
| Şekil 5.32 Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)..                           | 75 |
| Şekil 5.33 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                      | 76 |
| Şekil 5.34 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik KAT (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150rpm).....              | 77 |
| Şekil 5.35 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına spesifik KAT (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....  | 77 |
| Şekil 5.36 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi SOD (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)..                            | 79 |
| Şekil 5.37 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi SOD (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....   | 80 |
| Şekil 5.38 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik SOD (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....             | 80 |
| Şekil 5.39 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in kuru hücre başına hücre içi SOD (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)..... | 82 |
| Şekil 5.40 Farklı azot kaynakları içeren üretim ortamlarında elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                 | 83 |
| Şekil 5.41 Farklı azot kaynağı içeren ortamlarda hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                                  | 84 |

|                                                                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 5.42 Farklı azot kaynakları içeren üretim ortamlarının pH değerlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                                                                    | 85  |
| Şekil 5.43 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi KAT (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, 150 rpm).....                                                          | 86  |
| Şekil 5.44 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, 150 rpm).....                                    | 87  |
| Şekil 5.45 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi spesifik KAT (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm) .....                                           | 87  |
| Şekil 5.46 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in birim kuru hücre başına spesifik KAT (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                           | 88  |
| Şekil 5.47 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in hücre içi SOD (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                        | 90  |
| Şekil 5.48 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in birim hacim başına hücre içi SOD (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                  | 90  |
| Şekil 5.49 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in spesifik SOD (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                                      | 91  |
| Şekil 5.50 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında <i>R. glutinis</i> 'in birim kuru hücre başına SOD (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....                                    | 92  |
| Şekil 5.51 Hücre derişimi cevabı için üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                           | 98  |
| Şekil 5.52 Hücre derişimi cevabı için hat grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                                              | 99  |
| Şekil 5.53 KAT aktivitesi cevabı için üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                           | 101 |
| Şekil 5.54 KAT aktivitesi cevabı için hat grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                                              | 102 |
| Şekil 5.55 SOD aktivitesi cevabı için yüzey yanıt grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                                      | 105 |
| Şekil 5.56 SOD aktivitesi cevabı için hat grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi).....                                                                                              | 106 |
| Şekil 5.67 Biyoreaktörde çözünmüş oksijen (ÇO) ve pH değerlerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st'dan itibaren %100 ÇO, B: t=24 st'den itibaren %100 ÇO)..... | 117 |
| Şekil 5.68 Biyoreaktörde hücre derişimlerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, 0.67 L/Ldk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st'dan itibaren %100 ÇO, B: t=24 st'den itibaren %100 ÇO).....         | 118 |
| Şekil 5.69 Biyoreaktörde KAT spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st'dan itibaren %100 ÇO, B: t=24 st'den itibaren % 100 ÇO).....            | 119 |
| Şekil 5.70 Biyoreaktörde SOD spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st'dan itibaren %100 ÇO, B: t=24 st'den itibaren %100 ÇO).....             | 120 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 5.1 Farklı sıcaklıklarda hücre içi katalaz spesifik verimliliği.....                                                                                 | 55  |
| Çizelge 5.2 Farklı sıcaklıklarda maksimum hücre içi SOD spesifik verimliliği.....                                                                            | 59  |
| Çizelge 5.3 Farklı başlangıç pH değerlerinde hücre içi katalaz spesifik verimliliği<br>(UYM, T=30°C, N=150 rpm, t=24 st).....                                | 65  |
| Çizelge 5.4 Farklı başlangıç pH değerlerinde maksimum hücre içi SOD spesifik<br>verimliliği.....                                                             | 69  |
| Çizelge 5.5 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlardaki özgül çoğalma hızları (T=30°C,<br>N=150 rpm).....                                                      | 72  |
| Çizelge 5.6 Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda 96. saat sonundaki<br>substrat tüketimler ve hücre derişimleri (T=30°C, N=150 rpm).....      | 74  |
| Çizelge 5.7 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum<br>hücre içi KAT spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm).....           | 78  |
| Çizelge 5.8 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum<br>hücre içi SOD spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm) (t=24 st)..... | 82  |
| Çizelge 5.9 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlardaki özgül çoğalma hızları (T=30°C,<br>150 rpm).....                                                        | 84  |
| Çizelge 5.10 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum<br>hücre içi KAT spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm).....            | 89  |
| Çizelge 5.11 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum<br>hücre içi SOD spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm) (t=24 st).....  | 92  |
| Çizelge 5.12 MKT için seçilen faktörler ve değerleri.....                                                                                                    | 94  |
| Çizelge 5.13 MKT tasarım matrisi.....                                                                                                                        | 95  |
| Çizelge 5.14 MKT tasarımına göre yapılan deneylerin sonuçları.....                                                                                           | 96  |
| Çizelge 5.15 Hücre ve SOD aktivitesini maksimize eden koşullar ve cevapları.....                                                                             | 108 |

## 1. GİRİŞ

Gıda maddeleri ile vücuda alınan ya da metabolik tepkimeler sonucunda üretilen birçok bileşiğin, hücreler tarafından kullanılabilmesi için yükseltgenmesi ya da indirgenmesi gerekmektedir. Yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri, elektron transferi içeren tepkimelerdir. Yükseltgenme (oksidasyon) sırasında elektronlar bir atom ya da molekülden ayrılırlar. Oksidasyon tepkimeleri yaşam için çok önemli olmalarına karşın, hücrelere zarar veren zincir tepkimelerini başlatan serbest radikalleri oluşturabildiklerinden, canlılara zarar da verebilmektedirler. İnsan, hayvan, bitki ya da aerobik mikroorganizma yapılarında gerçekleşen oksidasyon tepkimelerinin birçoğu yaşam için gerekli olan moleküler oksijenin katıldığı tepkimelerdir. Metabolizma esnasında bazı çevresel bozukluklar ve kirleticiler (radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, sıcaklık etkisi, herbisitler, vb.) nedeniyle oksijen oldukça zehirli ve öldürücü ara ürünler oluşturmak üzere tepkimeye girebilir (Saavedra vd. 1998).

Oksijen kaynaklı oluşan metabolitlere ‘Reaktif Oksijen Türleri’ (ROT) de denilmektedir. ROT terimi, farklı yükseltgenmiş-indirgenmiş ve farklı elektronik uyarılma hallerindeki oksijen moleküllerini ve oksijenin hidrojen, klor ve azot ile olan bileşiklerini (NO dışında) kapsar. Bu türlerin özellikleri ve reaktivlikleri birbirinden çok farklıdır (Khan ve Wilson 1995).

ROT ve serbest radikaller adı verilen bu toksik ara ürünler arasında süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ), hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\bullet}$ ) ve hipoklorit ( $OCl^-$ ) sayılabilir. Tüm bu reaktif oksijen türleri organizmalara karşı zehirlidir. Canlı organizmaların hayatta kalması ve fonksiyonlarını doğru şekilde yapabilmesi için ROT’ların 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). Bunlar glutatyon (GSH), vitamin C ve vitamin E gibi antioksidanların yanı sıra, katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidazlar gibi çeşitli enzimler de olabilir. Hücresinin nötralizasyon kabiliyetini aşan düzeydeki ROT üretimi, hiperoksidasyona ve oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresten kaynaklanan kararsız

hal, patolojik prosesleri artırabilir ve hücre ölümüne neden olabilir (Belozerskaya ve Gessler 2007).

Yetmiş yıllık bir yaşam süresi boyunca bir insan yaklaşık 17 ton oksijen tüketir. Bunun göz ardı edilemeyecek kadar büyük bir kısmı oksijen radikallerine dönüşür (Sigler vd. 1999). Oksidatif stresin insan sağlığı üzerinde oldukça zararlı etkileri bulunmaktadır. Alzheimer, Parkinson, iltihaplı romatizma, kalp ve damar hastalıkları ve sinir hastalıklarının oluşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Antioksidan içerikleri yüksek olan meyve ve sebze kaynaklı beslenmeler sayesinde insan daha sağlıklı olmakta ve yaşlanma etkileri gecikmektedir. Ayrıca kalp krizi ve bazı nörolojik hastalıkların oluşma riski azalmaktadır. Antioksidanlar meyve, sebze, kabuklu yemiş, tahıl, et, tavuk ve balık gibi birçok yiyecekte vitamin, mineral, karotenoid ve polifenoller olarak bulunurlar(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/antioxidants.html>, <http://www.ific.org/publications/factsheets/antioxidantfs.cfm>).

Çoğu antioksidan, yiyeceklerde ayırt edici renkleriyle belli olurlar; örneğin çilek ve domatesteki yoğun kırmızı renk, havuçtaki turuncu renk, mısırdaki sarı renk, üzüm ve böğürtlendeki mavi mor renk içerdikleri antioksidanlardan kaynaklanmaktadır. Antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen en yaygın bileşenler A, C ve E vitaminleri,  $\beta$ -karoten, selenyum minerali ve likopen bileşenidir (<http://www.ific.org/publications/factsheets/antioxidantfs.cfm>). Çizelge 1.1'de bazı yiyeceklerdeki antioksidan maddeler ve yararları listelenmiştir.

Çizelge 1.1 Bazı meyve ve sebzelerdeki antioksidanlar ve yararları  
(<http://www.ific.org/publications/factsheets/antioxidantfs.cfm>)

| Antioksidan sınıfı ve bileşenleri | Kaynağı                                    | Yararları                                                                                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Karotenoidler</i>              |                                            |                                                                                                                |
| $\beta$ -Karoten                  | Havuç, çeşitli meyveler                    | Hücrelere zarar verebilecek olan serbest radikalleri nötralize eder, hücresel antioksidan korumaya destek olur |
| Likopen                           | Domates ve işlenmiş domates ürünleri       | Prostat sağlığının korunmasında yardımcı olur                                                                  |
| <i>Flavonoidler</i>               |                                            |                                                                                                                |
| Flavonoller                       | Çay, kahve, çikolata, elma, üzüm           | Kalp sağlığının korunmasında yardımcı olur                                                                     |
| <i>Fenoller</i>                   |                                            |                                                                                                                |
| Kafeik asit, ferrulik asit        | Elma, armut, turunçgiller ve bazı sebzeler | Kalp sağlığının korunmasında yardımcı olur ve hücresel antioksidan korumaya destek olur                        |
| <i>Tam tahıllar</i>               | Tahıl tohumları                            | Koroner kalp hastalıkları, kanser ve şeker hastalıkları riskini azaltır                                        |

Antioksidan vitamin ve minerallerin belli seviyeleri sağlık için gerekli olmasına rağmen, ilaç olarak alınan antioksidan desteğinin etkileri konusunda araştırmalar devam etmektedir. Sportif aktiviteler sırasında kişideki oksijen tüketimi on kattan fazla artabilir. Bu da oksidanların üretiminde büyük bir artışa neden olur ve spor sırasında ve sonrasında kaslarda yorgunluğa neden olan hasarlara yol açar. İnsan vücudundaki koruma sistemi, oluşan hasara iki ile yedi gün boyunca cevap verir. Bu süre içinde, zarar görmüş dokunun yok edilmesi için nötrofiller serbest radikaller oluşturur. Dolayısıyla ilaç ve benzeri maddeler ile alınan aşırı seviyedeki antioksidanlar, vücudun iyileştirme ve adaptasyon mekanizmalarını inhibe edebilir. Spor sonucundaki adaptasyonlardan biri, vücudun antioksidan savunmasının güçlenmesidir. Böylece

oksidatif streten kaynaklanan hastalıklara karşı vücut daha koruyucu olabilir. Bu durum, düzenli spor yapan insanların daha sağlıklı olmasının nedeni olarak düşünülmektedir.

İlaç olarak kullanılan antioksidanlar arasında vitaminler, ağrı kesici iltihap dağıtıcı ilaçlar, lokal anestezipler ve demir redoks döngüsü inhibitörleri sayılabilir.

Antioksidanların sağlık açısından yararlarının yanı sıra, teknolojik proseslerde de uygulamaları bulunmaktadır. Yiyeceklerin bozulmalarını engellemek için gıda katkıları olarak kullanılmaktadırlar. Oksijen ve güneş ışığı yiyecekleri okside ederek bozulmalarına neden olur. Askorbik asit (AA, E300), propil gallat (PG, E310), tokoferoller (E306), tersiyer bütill hidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksianisol (BHA, E320) ve bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT, E321) gibi antioksidan koruyucu maddeler katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Bazı antioksidanlar da endüstriyel ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. 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. Ayrıca ruj ve nemlendirici gibi yağ bazlı kozmetik ürünlerde de bozulmanın önlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar.

Bu kadar geniş ve çeşitli bir kullanım alanına sahip olan antioksidan moleküllerin endüstriyel üretimi önemli ölçüde bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak yapılmaktadır. Literatürde mikroorganizmalar tarafından üretimleri ile ilgili çalışmalar da yer almaktadır. Stres faktörlerinin doğası ve oksidatif stres nedeniyle nükleik asitlerde, proteinlerde, lipidlerde ve diğer hücre bileşenlerinde meydana gelen zarar tüm organizma türlerinde çok benzer olduğundan, mikroorganizmalar biyokimyasal, moleküler biyolojik ve hücresel seviyelerde oksidatif stresin farklı açılardan araştırılması için yararlı modeller olarak görülmektedir (Sigler vd. 1999).

Bu doktora çalışmasında antioksidan maddelerin enzimler sınıfında yer alan ve canlı organizmalar için çok önemli fonksiyonları olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz

(KAT) enzimlerinin mikrobiyal kaynaklı olarak farklı koşullar altında üretiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu iki enzimin antioksidanlar sınıfında ön planda yer almaları ve SOD enziminin katalizlediği tepkime sonucu ortaya çıkan  $H_2O_2$ 'nin KAT enziminin substratı olması nedeniyle, benzer koşullarda indüklenebilecekleri düşünülerek, eş zamanlı üretimlerinin incelenmesi planlanmıştır. Bu plan çerçevesinde, antioksidan maddeleri yüksek verimle üretme kapasitesi olan ve bu alanda yaygın olarak çalışılan *Rhodotorula glutinis* mayası tercih edilmiştir. Gıda katkı maddesi olarak da kullanılabildiğinden dolayı sağlık açısından zararsız olan, karotenoid üretimi araştırmalarında olumlu sonuçlar veren, ayrıca yağ biriktirebilme özelliği nedeniyle de son dönemlerde ilgi odağı olan bu mayanın, SOD ve KAT enzimlerinin eş zamanlı üretiminde olumlu sonuçlar vereceği düşünülmüştür.

Literatürde, *R. glutinis* mayası ile antioksidan madde üretimine yönelik çalışmaların büyük çoğunluğu, karotenoidler üzerine yoğunlaşmıştır. SOD ve KAT enzimlerinin yüksek verimlilik ile üretimlerine yönelik olarak, hem çoğalma ve enzim aktiviteleri için ortam bileşimi ve koşullarının incelendiği, hem de çevresel etkilerle stres yaratılarak enzim aktivitelerine etkilerinin incelendiği kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle önemli ve çeşitli alanlarda ihtiyaç duyulan bu iki enzimin *R. glutinis*'ten eş zamanlı üretimlerinin ayrıntılı olarak incelenmesinin bu alandaki eksikliğe ışık tutacağı düşünülmüştür. Bu çerçevede gerçekleştirilen doktora çalışması deneyleri, 4 ayrı alt projede gerçekleştirilmiştir.

*1. Alt Proje:* Çevresel koşullar ve çoğalma ortamı bileşiminin *R. glutinis*'in çoğalması, SOD ve KAT enzim aktivitelerine etkisi

- Sıcaklık etkisi
- Başlangıç pH değeri etkisi
- Karbon kaynaklarının etkisi
- Azot kaynaklarının etkisi

incelenmiştir.

2. *Alt Proje: Rhodotorula glutinis*'in çoğalması, SOD ve KAT enzim aktiviteleri için optimum koşulların deneysel tasarım yapılarak belirlenmesi

- En iyi karbon kaynağı derişimi, sıcaklık ve başlangıç pH değeri faktörler olarak seçilerek Merkezi Karma Tasarım (MKT) ile deney tasarımı yapılmış ve hücre derişimi, KAT ve SOD aktiviteleri için cevap yüzeylerini veren denklemler belirlenmiştir.
- Elde edilen cevap yüzeyi denklemleri kullanılarak her bir cevap için en iyi değeri veren koşullar ve ayrıca üç cevabın bir arada optimizasyonu için uygun koşullar belirlenmiş ve doğrulukları sınanmıştır.

3. *Alt Proje: Radikal oluşturucuların R. glutinis*'in SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkisi

- UV ışınma, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin)dihidroklörür (AAPH), metil violojen (paraquat) ve metilen mavisinin enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir.

4. *Alt Proje: Çözünmüş oksijenin (%) R. glutinis*'in çoğalması, SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkisi

- Çözünmüş oksijen derişiminin etkisi hücre çoğalması ile SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine ekisi biyoreaktör sisteminde incelenmiştir.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1 Mikroorganizmalarda Oksidatif Stres**

Sigler vd. (1999), oksijenin serbest radikal oluşturarak yarattığı toksik etkilerin ilk kez Gershman (1954) ve Harman (1956) tarafından önerildiğini, oksidatif stres teriminin ise ilk kez 1978 yılında Fridovich tarafından ortaya atıldığını bildirmişlerdir. Hücre ya da organizmadaki prooksidan-antioksidan dengesinin zarar görmesi (prooksidana doğru kayması ile) olarak tanımlanmıştır. Prooksidanlar, ROT oluşturarak ya da antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif stresi indükleyen kimyasallardır. Birçok çevresel oksidatif stresin (hiperbarik oksijen, gama radyasyonu, yakın UV-ışınması, ozon, peroksitler, redoks çevrimi, ilaçlar) hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler için toksik sonuçları bulunmaktadır (Sigler vd. 1999).

#### **2.1.1 Primer ve sekonder oksidatif stres faktörleri**

Reaktif oksijen türleri (ROT), normal hücre metabolizması devam ederken büyük oranda artabilirler.  $O_2$ 'nin suya indirgenmesi ve organik maddelerin  $CO_2$ 'ye oksidasyonu sırasında, oksijen moleküllerinin en fazla % 2-3 kadarı kısmi indirgenir ve farklı oksijen türleri oluşur. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R\bullet$ ), peroksit radikalleri ( $ROO\bullet$ ), alkoksi radikalleri ( $RO\bullet$ ), tiyil radikalleri ( $RS\bullet$ ), sülfenil radikalleri ( $RSO\bullet$ ), tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2\bullet$ ) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Dolayısıyla, aerobik organizma hücreleri sürekli olarak ROT'a maruz kalırlar ve yaşamları boyunca ROT bileşenleri tarafından zarar görürler.

Enerji metabolizmasının yan ürünleri olarak oluşan primer oksidanlar, süperoksit radikali ( $O_2^-\bullet$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH\bullet$ )'dir. Hidroperoksil radikali ( $HOO\bullet$ ) ise süperoksit radikalinden asidik koşullar altında oluşur. Bu primer oksidatif stres yaratan moleküller, ayrıca sekonder reaktif oksijen metabolitleri de üretebilirler ve onlar da mitokondri, hücre membranı ya da çekirdeği gibi hücre

organellerine veya bağılı ya da çözünür durumdaki enzimlere yüksek oranda zarar verirler. Birçok sekonder radikal (hidroperoksitler, alkoksil ve peroksil radikalleri, epoksitler ve aldehitler) lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ürünleridir.  $H_2O_2$  ayrıca yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu sırasında peroksizomlarda oluşan bir yan üründür.

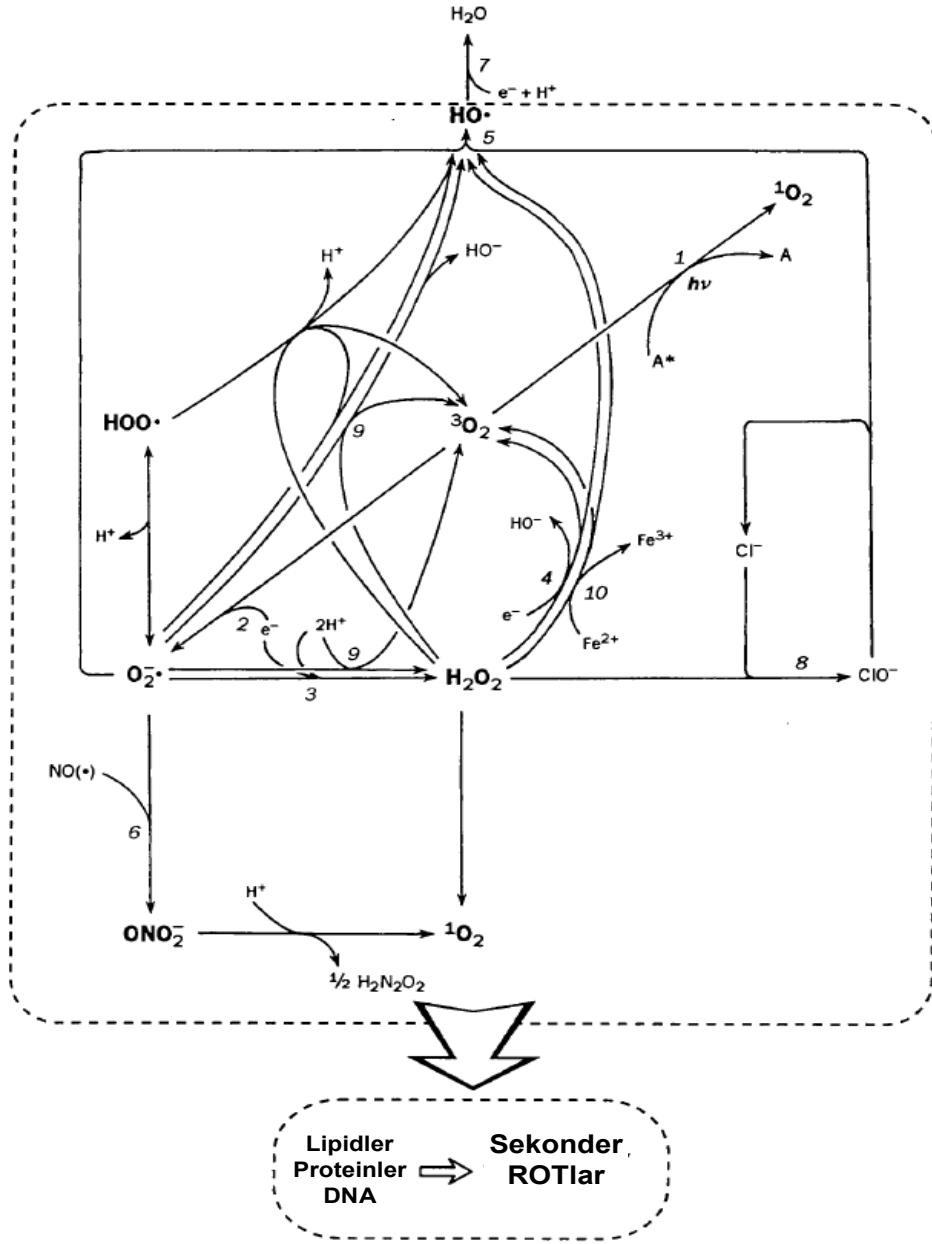
Hücre dışı oksidatif stres yaratıcı maddelerden en çarpıcı olanı oksidatif zarara da yol açabilen ozondur ( $O_3$ ). Ozon  $HO\bullet$  ve  $HOO\bullet$  radikallerine ayrışır ve organik bileşiklerle tepkimeye girerek ozonitler (siklik peroksitler) oluşturur. Ozonitler de  $R^1-CH(O\bullet)-CH(OO\bullet)-R^2$  radikalleri veya aldehitler oluştururlar. Sinyal transferinde yer alan nitrik oksit (NO) ve dezenfeksiyonda kullanılan hipoklorik asit de oksidatif zararı indükleyen oksidatif stres faktörleri arasında yer alırlar.

Oksijen radikallerinin ana hedefleri DNA, lipidler ve proteinlerdir. DNA'nın oksidatif hasarı sonucu sarmalın bir zinciri kırılır ve baz değişimleri meydana gelir. Bunun sonucunda mutasyonlar oluşur. Mitokondriyal DNA hasarı çekirdekteki DNA hasarından daha fazladır; çünkü, mitokondriler oksijen radikali üreticisidirler. Protein oksidasyonu birçok amino asit kalıntısını karbonil türevlerine dönüştürür, bu da S-S ve Tyr-Tyr çapraz bağlarını artırır. Bu da onları proteolitik parçalanmaya karşı daha hassas hale getirebilir.

Lipidlerin peroksidasyonu ikincil oksijen radikalleri yaratır ki bu da primer stres kaynağının toksik etkisinin katlanarak artmasına yol açar (Sigler vd. 1999).

### **2.1.2 Primer reaktif oksijen türleri**

Oksidanlar aerobik metabolizmada normal ürünler olarak oluşurlar; ancak, patofizyolojik koşullar altında artan seviyelerde üretilebilirler. Bunun dışında farklı türlerdeki radyasyonlar nedeniyle de oluşurlar. X-radyasyonu  $HO\bullet$  oluştururken, UV radyasyonu yüksek enerjili oksijen formu olarak da bilinen, singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşturur. Ultrason ve mikrodalga radyasyonu ve hatta kayma gerilimi bile ROT oluşturabilir. Şekil 2.1'de ROT oluşturan tepkimeler verilmiştir.



Şekil 2.1 Reaktif oksijen türleri oluşturan bazı tepkimeler (Sigler vd. 1999)

Yeryüzünde triplet enerji formu halinde bulunan  $O_2$  molekülü karardlıdır ve organik bileşiklerin büyük bir çoğunluğu ile yavaş tepkimeye girer.  $H_2O_2$  ve diğer ROT'ların (süperoksit anyon radikali  $O_2^{\bullet-}$ , peroksit radikali  $HO_2^{\bullet}$ , peroksit iyonu  $HO_2^-$ , singlet oksijen  $^1O_2$ , ve hidroksil radikali  $OH^{\bullet}$ ) üretimi, oksijenin metabolik redoks tepkimelerinde yer alması ve dış faktörler tarafından aktivasyonu sonucu gerçekleşir (Belozerskaya ve Gessler 2007).  $O_2$  molekülü kimyasal ya da fotokimyasal tepkimelerde aldığı enerji ile  $^1O_2$  haline gelir.  $^1O_2$ 'nin ömrü suda 2 mikro saniyedir.

Doymamış biyomoleküllerle (oligodoymamış yağ asitleri veya DNA'daki guanin bazları) seçimli ve çok hızlı bir şekilde tepkimeye girer ve kararsız peroksit ve hidroperoksitler oluşturur.  $^1\text{O}_2$ ; süperoksit, su, vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten ve SOD aracılığıyla yok edilir.

Oksijenin ilk tek elektron indirgenmesi (Şekil 2.1, tepkime 2) süperoksit radikalini ( $\text{O}_2^-$ ) oluşturur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otoksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksit radikali zayıf bir bazdır, birçok biyomolekül ile zayıf tepkimeye girer, nötral pH'da zayıf bir oksidandır ve hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir.  $\text{O}_2^-$  membrandan geçmez ve lipidleri peroksitle etmez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının ( $\text{Fe}^{+3}$  gibi) indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali ayrıca ubikinoller, katekoller, flavinler gibi hücre içi bileşenlerin otoksidasyonu ile de üretilir. Düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, protonlanmış hidroperoksil radikali ( $\text{HOO}\cdot$ ) halinde bulunur. Sudaki spontane dismutasyonu  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $^1\text{O}_2$  oluşturur ve bu oluşum çok hızlı gerçekleşir. Hücrede bu tepkime SOD tarafından katalizlenir.  $\text{O}_2^-$  nin hızlıca yok edilmesi hücre için çok önemlidir; çünkü,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$  veya  $^1\text{O}_2$  gibi reaktif ROT türlerine dönüşebilir.  $\text{O}_2^-$ , NO ile tepkimeye girdiğinde peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) anyonu oluşur. Peroksinitrit, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ( $\text{NO}_2$ ), hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ), nitronyum iyonu ( $\text{NO}_2^+$ ) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki, nitrik oksit (NO) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur.  $\text{O}_2^-$ 'nin düşük reaktivitesine rağmen, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antiosidan enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir. Süperoksit enzimlerdeki demirsülfür grupları ile doğrudan tepkimeye girebilir (akotinaz ve diğer  $[\text{4Fe-4S}]$  grupları içeren hidrolaz enzimleri gibi).  $\text{O}_2^-$ 'nin bu merkezlerle tepkimesi, enzimleri hücre içi ve hücre dışı ortamlarda deaktive eder ve ROT indüklü hücre yaralanmalarına neden olan hücre içi serbest demir iyonunu oluşturur. *Saccharomyces cerevisiae*'da  $\text{O}_2^-$  üretimi 6-7 nmol/dk olarak bulunmuştur (Sigler vd. 1999, Belozerskaya ve Gessler 2007).

Süperoksit dismutasyonu hidrojen peroksit oluşturur (Şekil 2.1, tepkime 3). İki süperoksit molekülü, süperoksitin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan

ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir; ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $Fe^{+2}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin ( $O_2^{\cdot-}$ ) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşturur. Hidrojen peroksitin temel formu olan  $HO_2^{\cdot}$ , süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroperoksil ( $HOO^{\cdot}$ ) radikallerinin dismutasyonu sonucu oluşur. Nötral ya da asidik pH'da hidrojen peroksit tam protonlanmış  $H_2O_2$  halinde bulunur. Dolayısıyla herhangi bir yük taşımaz, membranlardan rahatlıkla geçebilir ve hücre içinde rahatlıkla difüze olabilir. Farklı hücre bileşenleri ile birleşme yeteneği vardır ve bu sayede uzun süreli etkisi devam eder.  $O_2^{\cdot-}$  ve  $HOO^{\cdot}$ 'dan daha kuvvetli oksidandır. Fizyolojik koşullardaki hücrelerde katalazın ve heme olmayan ve serbest radikal oluşturmayan glutatyon peroksidazın etkisi ile  $H_2O_2$  seviyesi düşük tutulur (1-100 nmol/L) (Sigler vd. 1999, Belozerskaya ve Gessler 2007).

$H_2O_2$  tarafından yaratılan oksidatif hasar, geçiş metalleri veya sitokrom *c* gibi heme proteinleri ile tepkimesine dayanmaktadır. Bu tepkimeler protein merkezli radikallerin ve ferril radikallerinin oluşumuna neden olabilir. Bu moleküller de lipid peroksidasyonu gibi oksidatif prosesleri katalizlerler.  $H_2O_2$  çeşitli peroksidazlar ile çok hızlı tepkimeye girer ve diğer peroksidaz substratlarından peroksidaz radikali oluşur.

Çok reaktif olan hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), suyun yüksek enerjili (X-ray) ışıma ile ya da  $H_2O_2$ 'nin UV ışınması ile üretilir. Hidrojen peroksitin  $Fe^{+2}$  gibi geçiş metalleri ile tepkimesi de  $HO^{\cdot}$  üretir (Fenton tepkimesi).  $OH^{\cdot}$  her biyolojik molekül ile çok hızlı tepkimeye girer ( $10^9 - 10^{10}$  L/mol s); dolayısıyla ömrü çok kısadır ( $<1$  ns). Hidrojen bağını parçalayarak veya çift bağ ekleyerek ya da zincir tepkime başlatarak etkisini gösterir. Aromatik halkalara ekleme eğilimi nedeniyle aromatik amino asitler öncelikli hedefleridir. Aynı zamanda DNA bazlarına da çift bağ ekler. Ayrıca tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ( $RS^{\cdot}$ ), karbon merkezli organik radikaller ( $R^{\cdot}$ ), organik peroksitler ( $RCOO^{\cdot}$ ) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.

$O_2^{\cdot-}$ 'nin NO ile tepkimesi (Şekil 2.1, tepkime 6) çok güçlü bir oksidan olan, fizyolojik koşullar altında kararlı ve ömrü uzun olan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşturur. Lipoproteinlerde lipid peroksidasyonunu indükler, fosforilasyonu bozar ve proteinlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlayarak hücre sinyalizasyonu ile etkileşir.  $ONOO^-$  ayrışarak  $^1O_2$  oluşturabilir (Sigler vd. 1999).

Güçlü oksidan hipoklorür ( $ClO^-$ ),  $H_2O_2$  ve  $Cl^-$ 'den miyeloperoksidaz gibi enzimler tarafından oluşturulur. Birçok biyolojik molekülü perokside eder veya klorürler (Sigler vd. 1999).

### 2.1.3 Sekonder radikaller ve stresi artıran türler

Primer ROT'ların, önemli hücre bileşenleri -DNA, lipidler ve proteinler- ile tepkimesi çok sayıda sekonder radikalın oluşmasına neden olur; bunlar da hücreye zarar verirler. Metabolik substratlar, tampon bileşenleri gibi düşük molekül ağırlıklı maddeler bile oksidatif değişikliklere dayanamaz ve hücreye zarar verebilecek ürünler oluşturabilirler.

Mikroorganizmaların en çok kullandığı substrat olan glukoz, radikal tutucu olarak bilinmektedir. Ancak fizyolojik koşullar altında glukoz, serbest radikaller oluşturmak üzere otooksidasyona uğrayabilir. Sonuçta ortaya çıkan hücre hasarı düşük indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerindeki olan hücreler için önemlidir; çünkü, GSH redoks çevrimi glukoz nedeniyle oluşan serbest radikallerin hücresel tutuculuğunda anahtar basamaktır. Yüksek derişimlerde antioksidan olarak davranabilen askorbat, düşük derişimlerde prooksidan olarak davranır. Geçiş metal iyonlarının varlığında ROT oluşturan redoks çevrimine katılır.

### 2.1.4 ROT üretiminde geçiş metalleri ve şelatlarının rolü

Yavaş (organik materyallerin otooksidasyonu) veya hızlı (yanma), tüm oksijen tepkimeleri katalik aktive edici basamak tarafından başlatılmalıdır. Pratikte, hemen hemen tüm oksidasyon tepkimeleri metal katalizörler sayesinde, çoğunlukla da geçiş metal iyonları sayesinde gerçekleşir. ROT üretimi açısından en önemli geçiş metal

iyonları Fe, Cu ve bir ağır metal olan Cd'dir. Geçiş metallerinin radikal oluşturma kabiliyeti birtakım maddelerin varlığında, kompleksleşme veya şelatlamalarına bağlı olarak değişir. Çoğu hücre bileşenleri demirle şelat oluşturabilir. Demir iyonları ATP gibi fosfat bileşiklerine, sakkaritler ve organik asitlere (sitrat, pikolinat), DNA veya lipidlere gevşek bir şekilde bağlanırken; heme olmayan ferritin, hemosiderrin, transferin ve heme olan sitokrom *c* gibi proteinlere ise sıkıca bağlanır. Çözünmüş oksijen varlığında hücreler ve dokularda var olan demir, hücre proteinlerinde oksidatif modifikasyonlara ve beraberinde oksidatif strese neden olabilir. Bu nedenle, hücrelerdeki  $Fe^{+2}$  (veya  $Cu^{+2}$ ) dikkatlice kontrol edilir ve bu iyonların aşırı miktarları saklanır, şelatlanır, dışarı atılır ya da zararsız hale getirilir. Dolayısıyla bu iyonların taşınımı ve depolanması hücre bütünlüğünün korunması açısından çok önemlidir. Mikrobiyal hücrelerde geçiş metallerin normal seviyelerde tutulmasının sağlanması için birçok mekanizma bulunmaktadır. Hücredeki demir toksisitesi sadece alınan metal miktarına değil, hücrenin redoks durumuna da bağlıdır. Oksijen varlığında  $Fe^{+2}$  otooksidasyona uğrayabilir ve bu tepkime sonucunda  $H_2O_2$  oluşur. Oluşan  $H_2O_2$ 'nin diğer bir  $Fe^{+2}$  ile tepkimesi  $HO^\bullet$  oluşturur (Fenton tepkimesi).

Bakır taşınımı demir taşınımı ile iç içedir. Hücre tarafından alınan bakır, sitozolik bakır moleküler şaperonlar tarafından bağlanır ve sitozolik CuZnSOD'ye, mitokondiye veya veziküler bakır taşıyıcısına dağıtılır.

### **2.1.5 Reaktif oksijen türlerinin temel biyolojik moleküllere verdikleri zararlar**

#### ***DNA***

Hidroksil radikallerinin neden olduğu doku bozukluklarının yaklaşık yarısı, singlet oksijen tarafından indüklenenlerin ise tamamı DNA baz modifikasyonlarıdır. Timin oksidasyon ürünlerinin büyük çoğunluğu timin glikolleridir. Tek sarmallı bir DNA kalıbında timin glikolleri T-C mutasyonlarına neden olurken; çift sarmallı DNA'da replikasyonu önleyen toksik bir etki yaratır. Sitozin oksidasyon ürünleri de benzer şekilde sitozin glikolleridir. Pürinlerin halka atomları oksidasyona uğradığında ise CG-TA mutasyonlarına neden olmaktadır.

Baz hasarlarının yanı sıra, iyonlaştırıcı radyasyon ve serbest radikal atağı gibi etkiler deoksiribozda doku bozukluğuna da neden olmaktadır. Bu durumda deoksiriboz kısmi olarak oksitlenebilir ve parçalanabilir, sonuçta genetik bilginin tamamen kaybolması söz konusudur. İyonlaştırıcı radyasyon ayrıca DNA ve proteinler arasında çapraz bağlar oluştururken; radikal atakları sarmallar arası çapraz bağlar oluşturur.

### ***Lipidler***

Hem primer hem de sekonder stres yaratıcılar, lipid tabakasını oluşturan yağ asitlerinin C-C bağlarını parçalarlar. Radikal bazlı olan bu zincir tepkimelerine lipid peroksidasyonu denir ve sonuçta alkan, keton, oksiranlar ve aldehitler oluşur. Bu durum, yağ asidi zincirlerindeki polar grupların sayısının artmasına neden olarak membran akışkanlığı değiştirir ve hücre geçirgenliğinin kontrolünü kaybederek ölür. Lipid peroksidasyonun tehlikeli olan bir diğer sonucu ise, DNA'ya atak yapan sekonder oksijen radikallerinin oluşumudur. Bu radikaller ayrıca sitoplazmik proteinlerle de etkileşirler.

### ***Proteinler***

ROT nedeniyle oluşan protein oksidasyonları çok çeşitlidir. Hemen hemen tüm amino asitler ROT tarafından modifiye edilebilmektedir. Bu modifikasyon oksitlenme ( tirozin → triozin; hidroperoksit, histidin → 2-oksohistidin gibi), başka bir amino asite dönüşme (prolin → glutamik asit veya organik asit gibi ) veya dimerleşme (triozin → bitirozin) şeklinde olabilir. Amino asitler  $\alpha$ -karbon atomundan ya da alifatik yan zincirlerinden oksitlenebilirler. Bu şekilde modifiye olan proteinler hücre tarafından proteolitik olarak parçalanırlar.

## **2.2 Başlıca Antioksidan Bileşenler**

Mikroorganizmaların yaşam süreci, çevresel etkilere karşı kararlılığı ile ilgilidir. Bu kararlılık da hücrenin antioksidan koruma bileşenleri tarafından belirlenir. Antioksidan koruma, hem enzimleri (SOD, KAT, heme gurubu içeren peroksidazlar, tiyol

peroksidazlar, vb) hem de diğer küçük moleküller olan glutatyon, askorbat, pigmentler (karotenoidler, melaninler,...vb.) ve fenolik bileşikler kapsamaktadır (Belozerskaya ve Gessler 2007). Mayalarda bulunan başlıca antioksidan bileşenleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Antioksidan bileşenler hidrofilik (örneğin glutatyon) ve hidrofobik (örneğin 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 ayrılabilir. Bu bölümde mayalar için önemli olan bazı antioksidanlar ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Çizelge 2.1 Mayalarda bulunan başlıca antioksidan bileşenler  
(Moradas-Ferreira vd. 1996)

| Antioksidan madde      | Fonksiyonu                                                                                                                          |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sitoplazmik CuZnSOD    | Süperoksitin dismutasyonu                                                                                                           |
| Mitokondriyal MnSOD    |                                                                                                                                     |
| Peroksizomal katalaz A | Hidrojen peroksitin ayrışması                                                                                                       |
| Sitoplazmik katalaz T  |                                                                                                                                     |
| Sitokrom c peroksidaz  | Hidrojen peroksitin indirgenmesi                                                                                                    |
| Glutatyon              | Protein disülfür bağlarının indirgenmesi, serbest radikallerin çöpçülüğü, elektrofilik substratlarla konjugasyon, Cd’nin bağlanması |

Çizelge 2.1 Mayalarda bulunan başlıca antioksidan bileşenler  
(Moradas-Ferreira vd. 1996) (devam)

| Antioksidan madde            | Fonksiyonu                                                                                           |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glutatyon redüktaz           | Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmesi                                                               |
| Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz | NADP <sup>+</sup> 'nın NADPH'ye indirgenmesi                                                         |
| Metalotiyonein               | Cu'nun bağlanması, Fenton tepkimesinin önlenmesi, süperoksit ve hidroksil radikallerinin çöçülüşü    |
| Tiyoredoksin                 | Protein disülfür bağlarının indirgenmesi, hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitlerin indirgenmesi |
| Tiyoredoksin peroksidaz      |                                                                                                      |
| Poliaminler                  | Lipidlerin peroksidasyondan korunması                                                                |

### 2.2.1 Enzim sistemleri

Primer ROT seviyelerini düşüren ve hücrede doğrudan oluşan antioksidan enzim sistemi bileşenleri olan SOD ve KAT enzimleri hücrede çok önemli role sahiptirler. Bu enzimler ROT'lara karşı yüksek spesifiklik gösterirler, hücre içinde farklı yerlerde bulunurlar ve aktif bölgelerinde metaller içerirler. İçerdikleri bu metaller (örneğin; bakır, çinko, mangan ve demir) katalize katılırlar (Belozerskaya ve Gessler 2007).

Antioksidan koruma sistemi için çok önemli role sahip olan bu enzimlerle ilgili ayrıntılı bilgi Bölüm 2.3 ve 2.4'te verilmiştir. Aşağıda ise sisteme ait diğer enzimlerle ilgili kısa bilgiler yer almaktadır.

### ***Tiyol peroksidazlar***

Tiyol peroksidazlar; glutatyon redüktazlar, tiyoredoksinler, glutaredoksinler ve sülfiredoksinlerdir. Hidrojen peroksit ve organik peroksitleri ayrıştırırlar ve ayrıca proteinlerdeki oksitlenmiş sistein kalıntılarının indirgenmesini katalizlerler (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Glutatyon peroksidazlar***

Glutatyon peroksidaz enzimi (glutatyon:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9) sitozolde bulunur, dört adet selenyum atomu içerir, tetramer yapıdadır. Glutatyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. İki tiyoredoksin, NADPH ve tiyoredoksin redüktaz varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik peroksitlerin ayrışmasını katalizler (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Tiyoredoksinler***

Tiyoredoksinler, 12 kDa civarında küçük ısı kararlı proteinlerdir ve aktif bölgelerinde Cys-Gly-Pro-Cys amino asit motifini içerirler. Proteinlerdeki disülfür gruplarının indirgenmesinde önemli rol oynarlar. Tiyoredoksinler ayrıca, birçok peroksiredoksin için spesifik elektron vericidir. Fungideki tiyoredoksin yolizinin zarar görmesi, belli hücre içi proteinlerin konformasyonunu ve içeriğini değiştirir. ROT'ları doğrudan nötralize edebilirler ve oksitlenmişproteinleri konformasyonlarına geri döndürürler (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Glutaredoksinler***

Tiyoredoksinlerle yapısal ve fonksiyonel benzerlikteki proteinlerdir. Ditiyol ve monotiyol türleri, katalize katılan sistein kalıntılarının sayısı ile birbirinden ayırt edilirler. Glutaredoksinler, glutatyonun dahil olması ile NADPH varlığında glutatyon redüktaz tarafından indirgenir (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Glutasyon redüktaz***

Glutasyon redüktaz, NADPH varlığında, glutasyon disülfürün indirgenmesinin katalizler ve böylece hücrede indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon dengesini sağlar (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Peroksiredoksinler***

Hidroperoksitleri alkole indirgeyen antioksidan protein sınıfıdır. Bu gruptaki proteinler, -özellikle tiyoredoksin peroksidaz ve alkil hidroperoksit redüktaz-  $H_2O_2$ 'ye, peroksinitrillere ve geniş bir aralıktaki organik hidroperoksitlere karşı peroksidaz aktivitesi gösterir. Sitoplazma sıvısı ve mitokondride bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde peroksiredoksinler büyük miktarlarda ve çeşitli izoformlarda bulunurlar. Glutaredoksinler ve katalazlar ile kıyaslandığında daha az etkinlikte olmasına rağmen, hücre membranlarını peroksit oksidasyonundan korur. Bu proteinler mayalarda,  $H_2O_2$ 'nin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar. Peroksidaz tepkimesinin mekanizması tüm peroksiredoksin türleri için aynıdır ve aktif bölgedeki sistein sülfenik asite okside olur ve aynı anda peroksit substratı indirgenir. Tüm peroksiredoksinlerin aktif bölgesinde arjinin vardır ve bu kalıntı aktif bölgedeki sisteinin tiyolat formunun stabilize edilmesi için gereklidir (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Sülfiredoksinler***

Sülfiredoksinler tiyol içeren ATP-bağımlı proteinlerdir. Molekül ağırlıkları yaklaşık 13 kDa kadardır. İlk önce mayalarda daha sonra bakterilerde ve memelilerde keşfedilmiştir. Sülfiredoksinler sülfenik grubu ( $-SO_2H$ ) sülfenik gruba ( $-SOH$ ) indirgerler (Belozerskaya ve Gessler 2007).

Primer ROT seviyelerini düşüren ve hücrede doğrudan oluşan antioksidan enzim sistemi bileşenleri olan süperoksit dismutaz ve katalaz hücrede çok önemli role sahiptirler. Bu enzimler ROT'lara karşı yüksek spesifiklik gösterirler, hücre içinde farklı yerlerde

bulunurlar ve aktif bölgelerinde metaller içerirler. İçerdikleri bu metaller (örneğin; bakır, çinko, mangan ve demir) katalize katılırlar (Belozerskaya ve Gessler 2007).

### 2.2.2 Diğer moleküller

#### *Glutasyon*

Glutasyon (GSH),  $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin (tripeptit), ökaryotik hücrelerde en fazla bulunan düşük molekül ağırlıklı hidrofilik bir tiyol bileşiğidir. Maya hücrelerindeki derişimi 5 ile 20 mM arasında değişir. Hücrede bir indirgenmiş ve iki yükseltgenmiş formda bulunur. Oksitlenmiş formları glutasyon disülfür ile glutasyon disülfür ve proteinlerin karışımıdır. GSH'nin antioksidan özelliği sistein kısmındaki tiyol grubundan kaynaklanır. Hücrelerde glutasyon redüktaz enzimi ile indirgenmiş formda üretilir. Normal fizyolojik koşullarda indirgenmiş GSH'nin derişimi oksitlenmiş halinin derişiminden 10 ile 100 kat daha fazladır. Buna göre, sitoplazmadaki protein tiyolleri çoğunlukla indirgenmiş halde bulunurlar. GSH amino asit taşınımı, protein ve nükleik asitlerin sentezi, enzim aktivitesinin modülasyonu, ROT metabolizması gibi birçok hücre prosesinde yer alır. ROT'lar tarafından oksidasyonu, GSH'yi disülfür formu olan yükseltgenmiş dimerik glutasyon (GSSG) haline dönüştürür ve yeniden NADPH ve GSH redüktaz yardımıyla GSH'ye indirgenir. Hücre içi redoks homeostazını koruması ve direkt antioksidan korumaya katılmasının yanı sıra GSH, antioksidan enzimlerde bir kofaktör görevi de görür. SH grubunun yardımı ile bakır içeren enzimlerin apoproteinlerine bakır sağlar. Bu fonksiyon, hücre içi bakırın bağlanmasını artırır ve metal ve oksijen arasındaki potansiyel toksik tepkimeleri (Fenton tepkimesi gibi) engeller. GSH, Fe-S içeren dehidrojenazların fonksiyonu için de önemlidir. Bunun yanı sıra, hücre içinde üretilen toksik metabolitlerin detoksikasyonunda yer alır. Hücrenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz kalması GSH seviyesini düşürürken; ısı, etanol, aldehytler veya fungusitler gibi maddelerle muamele de GSH seviyelerinde dalgalanmaya yol açar. *S. cerevisiae*'de glutasyon biyosentezinin bozulması oksidatif strese karşı direnci azaltmaktadır (Sigler vd. 1999, Belozerskaya ve Gessler 2007).

### ***Metalotiyonein***

Metalotiyoneninler sisteince zengin olan düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Hem fizyolojik (Cu, Zn, Se, vb) hem de organizmaya yabancı (Cd, Hg, Ag, vb) ağır metalleri sistein kalıntılarındaki tiyol grubu ile bağlayabilir. Genellikle hücreler metalotiyoneinler aracılığıyla bakır ve demir gibi hücre içi geçiş metallerini tutarak, OH• radikalleri oluşumunu minimize ederler (Fowler vd. 1987, Khan ve Wilson 1995, Sigler vd. 1999).

### ***Retinol***

Retinol (vitamin A) bir karboksilik halkası ve bir yan zincir içeren isoprenoid yapıda hidrofobik bir bileşiktir. Hücreyi lipid peroksidasyonuna karşı korur (Sigler vd. 1999).

### ***Karotenoid***

Karotenoidler, izoprenoid membran koruyucu antioksidan organik pigmentlerdir. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>'yi ve peroksil radikallerini etkin bir şekilde yok eder. β-Karoten ve likopen gibi doymamış hidrokarbonlar hidrofobik membran çekirdeğinde yer alırlar. Mayalarda karotenoidlerin, özellikle de astaksantin, yaşlanma sırasında önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Sigler vd. 1999).

### ***Ubikinon***

Ubikinon ya da koenzim Q, tersinir olarak indirgenebilen bir kinondur. Mitokondrideki elektron transfer zincirinde önemli bir rol oynar. Uzun bir izoprenoid yan zincir vardır ve yan zincir uzunluğunda farklılık içeren birçok formu bulunmaktadır (Sigler vd. 1999).

### ***Tokoferol***

Lipofilik bir antioksidan olan α-tokoferol (vitamin E), sekiz adet tokoferol ve tokotrienolden oluşan antioksidan özellikteki yağda çözünür proteinlerin toplu adıdır.

Bunlardan alfa-tokoferol en çok çalışılmış olandır ve biyoeldesi en yüksek olandır. Membranlarda veya lipoprotein partiküllerindeki lipid peroksidasyonunu önlemede oldukça etkilidir. Lipid peroksil radikalleri olan LOO•'yu yok ederek lipid hidroperoksitleri oluştururlar. Meydana gelen tokoferoksil radikali LOO•'den daha az reaktiftir ve zincir tepkimesini kırar (Sigler vd. 1999).

### 2.3 Süperoksit Dismutaz Enzimi

Süperoksit dismutaz (SOD), bir metalloenzimdir (E.C: 1.15.1.1). Fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. Süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu sağlar.



SOD enzimleri tüm aerobik organizmalarda bulunurlar; ancak obligat anaeroblarda bulunmazlar. Türleri arasında bakır ve çinko içeren CuZnSOD, mangan içeren MnSOD ve demir içeren FeSOD bilinmektedir. Dismutazların aktiviteleri, içerdikleri  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  içeriklerine bağlıdır. (Smith vd. 1983, Saavedra vd. 1998, Longo vd. 1999).

SOD çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tıbbi açıdan; ırsın tedavisinin zararlarının azaltması (Housset vd. 1989, Delanian vd. 1994, Delanian vd. 2001), kemik romatizması hastalığının belirtilerinin giderilmesi (Ratcheva vd. 2000), yaraların iyileştirilmesi (Vorauer-Uhl vd. 2002), prematüre bebeklerde solunum güçlüğü sendromunun önlenmesi (Davis vd. 1999, Davis vd. 2000) sayılabilir. Kozmetik açıdan fibrozisin engellenmesinin yanısıra (Vozenin-Brotons vd. 2001), cilt kremleri ve makyaj malzemelerinde de katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunların yanısıra, yaşlanma karşıtı, hücre yenileyici özellikleriyle kapsüller halinde eczane ve internet sitelerinde satışı bulunmaktadır.

Literatürde bu değerli enzimin farklı tür mikroorganizmalardan üretimine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Tsekova ve Todorova 2002 yılında yaptıkları çalışmada,

*Aspergillus niger*'dan SOD üretimini incelenmişlerdir. SOD aktivitesinin artırılması amacıyla, ortama 200 mg/L bakır eklemişlerdir. Sonuçta spesifik aktiviteyi 1.6 kat artırarak 90 U/mg değerine ulaşımlardır. Yan vd. (2006), *Bacillus* türleriyle yaptıkları çalışmada KAT ve SOD enzimleri üretimi üzerine çözünmüş oksijen derişimi ve menadion etkilerini incelemişlerdir. Buna göre üstel çoğalma fazının sonunda artırılan çözünmüş oksijen derişimi ve eklenen menadion ile hem SOD hem de KAT aktivitelerinde 1.5-2.5 kat artış gözlenerek 55 U/mg ve 32 U/mg değerlerine ulaşılmıştır. Dellomonano vd. (2007) çalışmalarında 28 adet maya türünde SOD aktivitesi araştırmışlardır. En yüksek aktivite değerini *Kluyveromyces marxianus* ile 62 U/mg değerinde elde etmişlerdir. Üretimin artırılması amacıyla seyreltme hızı (0.067 ve 0.2 st<sup>1</sup>), havalandırma basıncı (0.3 ve 1.2 bar) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi (0 ve 50 mM) incelenmiştir. Sonuçlara göre, düşük seyreltme hızı, yüksek basınç ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığı SOD aktivitesini 475 U/mg değerine yükseltmiştir. Bunun yanısıra % 60, 80 ve 90 oranında çözünmüş 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 çalışmada, çoğalma ortamlarına 10 mM CuSO<sub>4</sub> 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 değışimi incelenmiştir. Çalışmada 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.

## 2.4 Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi (KAT) ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$  oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında dört tane heme grubu bulunan bir hemoproteindir. Hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde, bitkilerde ve bakterilerde; temel olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. KAT enziminin görevi hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalamaktır (Smith vd. 1983).



KAT enziminin substratı olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  esas olarak, oksijen molekülünün elektron taşınım zincirlerinden elektron kapması ile oluşan süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucu oluşur. Ayrıca bazı peroksidazların ürünüdür. Kolayca hidroksil radikale de dönüşebilen bu molekülün hücrelerden güvenli bir şekilde uzaklaştırılması katalazlar ve peroksidazlar tarafından gerçekleştirilir. KAT enziminin en ilginç özelliği,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin hiç bir derişiminde doygunluğa ulaşmamasıdır. Çoğu organizmada birden fazla KAT bulunmaktadır ve bazılarında katalazın hücre farklılaşması ile ilgili olduğu bulunmuştur (Lledias vd. 1998).

KAT gıda endüstrisinde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den kaçınılması gerektiğinde genellikle glukoz oksidaz enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. Ana uygulamalarından biri kurutma işleminden önce yumurtanın beyazından glukozun uzaklaştırılmasıdır. Bunun yanı sıra, 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 (lens bakımı), ürünlerden peroksit uzaklaştırılması, amacıyla (Cook ve Worsley 1996) kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra,  $\text{H}_2\text{O}_2$ '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.

KAT enzimi üretimine yönelik olarak literatürde yer alan çalışmalardan bazıları şöyledir. 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 ışıma ve titanyum oksit içeren bir membran yardımıyla, içinden sirküle ettirilen çözeltiye radikallerin geçmesi sağlanmıştır. Suyun UV ışıma maruz bırakılarak biyoreaktöre gönderildiği (I), yalnızca  $H_2O_2$ 'nin gönderildiği (II) ve  $H_2O_2$ 'nin UV ışıma maruz bırakılarak biyoreaktöre gönderildiği (III) üç mod arasında en yüksek KAT aktivitesi II nolu modda 24.8 U/ml olarak elde edilmiştir. *Yarrowia lipolytica* 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 0.3 mM  $H_2O_2$  ve ayrıca 0.05 M juglone eklenmiş ve 1 saat muamele edildikten sonra aktivite değerleri yeniden ölçülmüştür.  $H_2O_2$  KAT spesifik aktivitesini 93 U/mg değerine, SOD spesifik aktivitesini ise 6.5 U/mg değerine yükseltirken, juglone 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.

## 2.5 *Rhodotorula glutinis*

*Rhodotorula glutinis* turuncu-kırmızı renkli olan, pigmentli bir mayadır. Mayanın rengi, ışığın belli dalga boylarını bloke edebilmek için oluşturulan pigmentlerin sonucudur. Aynı zamanda tuz toleranslı olan bu maya, vitamin, protein ve lipidler açısından da zengin olduğundan, gıda katkısı olarak da çok uygundur. Önemli özelliklerinden biri, yüksek oranda lipid biriktirebilme kapasitesidir. Normalde ağırlığının %20'si kadar lipid üretme kapasitesi olan mikroorganizmalar oleojenik olarak adlandırılmaktadır ve tek hücre yağı olarak da tanımlanan mikrobiyal biyodizel üretiminde kullanılmaktadırlar. *R. glutinis* ise, kuru ağırlığının yaklaşık yarısı kadar yüksek bir

oranda lipid biriktirebilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Özellikle biyodizel üretimi araştırmalarında ön plana çıkmaktadır. Bunun yanışıra, enzimatik olmayan antioksidan maddeler olan karotenoidleri yüksek verimlilikle üretebilme özelliğinden dolayı yaygın olarak çalışılmaktadır. Ayrıca ucuz tarımsal kaynaklı maddeler kullanılarak da kolaylıkla çoğaltılabildiğinden endüstriyel açıdan da ilgi çekmektedir (Bhosale vd. 2001, Yen ve Zhang 2011).

Literatürde enzimatik olmayan maddeler arasında önemli bir yere sahip olan karotenoid türlerinin *R. glutinis*'ten üretimine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, enzimatik antioksidanlar olan SOD ve KAT enzimlerinin üretimine yönelik çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Karotenoid üretimine yönelik olarak öne çıkan bazı çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Buzzini ve Martini'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada *R. glutinis*'in farklı suşlarının, çeşitli tarımsal kaynaklı işlenmemiş maddeler (üzüm pekmezi, glukoz şurubu, pancar melası gibi) kullanılarak çoğaltılması ile karotenoidlerin üretimi incelenmiştir. Her bir ortamdaki  $\beta$ -karoten, torularhodin ve torulen içerikleri belirlenmiştir. Bhosale ve Gadre'nin 2001 yılında yaptıkları çalışmada, bir *R. glutinis* mutantından karotenoid üretiminin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Maya özütü, glukoz ve treoninin farklı oranları denerek, karotenoid üretiminin verimi artırılmış ve kullanılan *R. glutinis* mutantının önemli bir  $\beta$ -karoten kaynağı olduğı belirlenmiştir. Sakaki vd.'nin 2001 yılında yaptıkları çalışmada beyaz ışık radyasyonunun *R. glutinis*'in çoğalması ve karotenoid sentezi üzerine etkileri incelenmiştir. Beyaz ışığın çoğalmayı durduğunu ve torularhodin üretimini artırdığını bulmuşlardır.

Sakaki vd. (2002) topraktan izole edilen *R. glutinis* kullanarak ROT'ların ve bazı radikallerin karotenoid üretimine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla üretim ortamına metil violojen ve metilen mavisi gibi maddeler eklemişlerdir. Buna göre, torularhodin maddesinin süperoksit radikallerinin elimine edilmesinde önemli rol oynadığı bulunmuştur. Park vd. (2005) şeker pancarı ile *R. glutinis*'ten karotenoid üretimini istatistiksel deney tasarımı yaparak araştırmışlar ve üre, potasyum fosfat ve şeker pancarı miktarlarının üretim üzerinde etkili olduğı bulmuşlardır. Optimizasyon stratejisi

sonucunda hücre miktarı 1.9 kat, karotenoid üretim miktarı ise 2.5 kat artırılmıştır. Breierova vd.'nin 2008 yılında yaptıkları çalışmada *R. glutinis* ve diğer bir maya türünün biriktirdiği selenyumun, karotenoid üretimi ile ilişkisi araştırılmıştır. Sonuçta selenyum ile birlikte üretilen  $\beta$ -karoten, torularhodin ve torulen içeren karışımın gıda katkı maddesi olarak daha yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Literatürde yer alan çalışmalarda *R. glutinis*'ten antioksidan üretimi yukarıda özetlendiği gibi özellikle karotenoidler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bunun dışında antioksidan enzimler olan SOD ve KAT üretimine yönelik sınırlı sayıda çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

*R. glutinis* ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları ile yapılan çalışmada, glukoz (%2) ve etanolün (%1) çoğalma ve SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir (Koleva vd. 2008). 30°C ve 204 rpm koşullarında 72 saat sürdürülen çalışmada *R. glutinis*'in glukoz içeren ortamdaki hücre derişimi 7.5 g/L ve maksimum özgül çoğalma hızı ( $\mu_{max}$ ) 0.3  $st^{-1}$  iken, etanol içeren ortamda aynı parametreler 7.1 g/L ve 0.24  $st^{-1}$  olarak bulunmuştur. Elde edilen en yüksek SOD spesifik aktiviteleri glukoz içeren ortamda 29 U/mg elde edilirken, etanol içeren ortamda 30 U/mg değeri elde edilmiştir. En yüksek spesifik KAT aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; etanol içeren ortam 22 U/mg değeri ile glukoz içeren ortamdaki daha yüksek aktivite sağlamıştır (16 U/mg). Kullanılan substratların *Kluyveromyces marxianus*'tan SOD ve KAT enzimleri üzerindeki etkisi de *R. glutinis* ile benzer bulunmuş; ancak *Kluyveromyces marxianus* ile her iki enzim için de 1.3 kat daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Wang vd. (2008) ise çalışmalarında *R. glutinis*'in çoğalma ortamı bileşiminin hücre derişimi ve SOD aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. 30°C, 140 rpm'de 15 saat süre ile gerçekleştirilen çalışmada hücre derişimi yaş hücre, aktivite değerleri ise U/mg yaş hücre olarak verilmiştir. 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 okzalit, 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;  $Zn^{+2}$  (10 $\mu$ mol/L),  $Cu^{+2}$  (10 $\mu$ mol/L),  $Mn^{+2}$  (100 $\mu$ mol/L),  $Fe^{+3}$  (500  $\mu$ mol/L), ' $Fe^{+3}$  (500 $\mu$ mol/L) +  $Cu^{+2}$  (10 $\mu$ mol/L)', ' $Fe^{+3}$  (500  $\mu$ mol/L) + (100  $\mu$ mol/L)  $Mn^{+2}$ ' 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.

Bu doktora çalışmasında antioksidan maddelerin üretiminde yüksek potansiyeli olduğu bilinen *R. glutinis* mayasından, tüm canlı organizmaların antioksidan koruma sistemleri için kilit enzimler olan KAT ve SOD enzimlerinin eşanlı üretimleri incelenmiştir. Bu amaçla, sıcaklık, başlangıç pH değeri, karbon kaynağı ve azot kaynağı türlerinin etkisi geniş bir aralıktaki ayrıntılı olarak incelenmiştir. Hücre derişimi ve enzim aktivitelerinin optimum olacağı koşullar deneysel tasarımıyla belirlenmiş ve sonraki aşamalarda enzim aktivitelerinin arttırılması için radikal oluşturucu katkı maddelerinin ve temel oksidatif stres kaynağı olan oksijenin etkileri incelenmiştir.

### 3. DENEYSEL TASARIM

Deney, kontrol altındaki çeşitli durumların, deney birimlerinin bilinmeyen karakteristik özellikleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla uygulanan bir işlem veya süreç olarak tanımlanabilir. Deneyde bir veya daha fazla proses değişkenini değiştirilerek, bir veya daha fazla cevap değişkenindeki değişiklikler incelenir (Şenoğlu ve Acıtaş 2010).

Deneysel tasarım ise deney birimlerinin maruz kalacağı kontrol altındaki durumların veya koşulların düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu durumların veya koşulların düzenlenmesi belli ilkeler veya kurallar çerçevesinde geliştirilen tasarımlar yardımıyla yapılır. Yapılacak olan deneyler planlanarak, verilerin analizi sonucu geçerli ve objektif sonuçların elde edilmesi sağlanır. İyi bir tasarım sonucunda belli sayıda deneyden maksimum bilginin elde edilmesi sağlanır.

Deneysel tasarım farklı amaçlar için kullanılabilir. Bunlar arasında; alternatif prosesler arasından seçim yapılması, yanıt etkileyen kilit faktörlerin belirlenmesi, prosesin regresyon modellemesinin yapılması ve prosesin yanıt yüzeyinin şeklinin belirlenmesi sayılabilir.

Deneysel tasarımda öncelikle amaç belirlenir. Proses değişkenlerinin seçilmesinin ardından tasarım yöntemlerinden biri seçilir. Tasarım uygulanarak gerekli deneysel veriler elde edilir. Hesaplanan verilerle deneysel veriler arasındaki uyumluluk birçok istatistiksel yöntemle test edilir. Tasarımın uygunluğuna karar verilirse elde edilen sonuçlar amaca yönelik olarak kullanılır.

Endüstriyel, biyolojik ve klinik bilimlerde, sosyal bilimlerde, gıda bilimlerinde ve fizik ve mühendislik bilimlerinde genellikle bir üretim sürecinin performansını iyileştirmek vb. amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Bradley 2007, Şenoğlu ve Acıtaş 2010).

Deneysel tasarım yöntemleri arasında Tam-faktöriyel tasarımlar, Kısmi-faktöriyel tasarımlar, Rastsallaştırılmış tasarımlar, Plackett-Burman tasarımları, Yanıt Yüzey Tasarımları, vb. sayılabilir.

### 3.1 Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt Yüzeyi Yöntemi (YYY), deneylerin istatistiksel tasarımında kullanılan önemli bir optimizasyon yöntemidir. İlgilenilen yanıtın birkaç değişkenden etkilendiği ve amacın bu yanıtın optimize edilmesi olan durumların modellenmesi ve analizinde kullanılan matematiksel ve istatistiksel yöntemler bütünüdür. 1951 yılında G.E.P. Box ve K.B. Wilson tarafından geliştirilmiştir (Bradley 2007).

Yanıt Yüzeyi Yöntemi ilk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır. Myers ve Montgomery (1995) yanıt yüzey yöntemini, ‘proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem’ olarak tanımlamıştır. Yanıt yüzey yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan deneysel modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin değişkenlerinin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir (Koç ve Ertekin 2009).

Bu yöntemde yapılan tasarım sayesinde, sistemi temsil eden modeldeki terimlerin birinci dereceden ve ikinci dereceden etkileşimler hesaplanabilir ve çalışılan bölgenin yanıt yüzeyinin şekli hakkında bilgi edinilir. Bu nedenle bu tasarımlara Yanıt Yüzey Yöntemi denilmektedir. Bu tasarımlar geliştirilmiş ya da optimum proses ayarlarının belirlenmesinde, proses sorunlarının ve zayıf noktalarının giderilmesinde, sistemi kontrol edilemeyen dışsal etkilere karşı daha az hassas yapma gibi amaçlarla kullanılmaktadır. YYY’nin içeriği ise, proses veya bağımsız değişkenlerin uzayının araştırılması için deneysel strateji geliştirilmesi, verim ve proses değişkenleri arasındaki ilişkiye yaklaşan uygun bir deneysel istatistiksel modelin geliştirilmesi ve istenilen cevap değerlerini üreten proses değişkeni değerlerinin bulunması için gerekli optimizasyon yöntemlerinden oluşmaktadır (Carley vd. 2004).

YYY doğasında sıralı bir uygulama yaklaşımı söz konusudur. Buna göre; uygulama 3 fazda incelenebilir (Carley vd. 2004):

*Faz 0:* Öncelikle yüzey yanıt çalışmasında hangi faktör ya da değişkenlerin önemli olduğuna dair fikir geliştirilir. Genellikle ‘eleme deneyleri’ olarak adlandırılan bu aşamanın amacı aday değişken sayısını azaltarak sonraki deneylerin daha etkili olmasının sağlanması ve daha az sayıda deney yapılmasıdır. Bu fazın sonunda önemli bağımsız değişkenler belirlenir.

*Faz 1:* Burada amaç, bağımsız değişkenlerin mevcut değerleri kullanılarak elde edilen cevabın, optimum değerine yakınında olmasıdır. Eğer bağımsız değişkenlerin mevcut seviyeleri ya da değerleri optimum performansla uyumlu değilse, proses değişkenlerinin seviyeleri yeniden ayarlanarak yeni cevaplar elde edilmelidir.

*Faz 2:* Proses optimum değerine yakınındaysa, Faz 2 başlar. Gerçek cevap yüzeyi genellikle optimum noktanın yakınındayken, kavis gösterdiği için ikinci dereceden model ya da bazen daha yüksek dereceden model kullanılmalıdır. Uygun bir yaklaşım modeli elde edildikten sonra bu model, prosesin optimum koşullarının bulunmasında kullanılabilir.

En yaygın uygulamaları, birçok farklı girdi değişkeninin, bir prosesin kalite ya da performans özelliklerini etkilediği özel durumlardır. Burada performans ölçütü ya da kalite özelliği ‘bağımlı değişken’ ya da ‘cevap’ olarak adlandırılmaktadır. Girdi değişkenlerine ‘bağımsız değişkenler’ ya da ‘faktör’ denilmektedir, bunlar araştırmacının kontrolü altındadır. Faktörler iki veya daha fazla düzeye sahip olabilirler. Tasarım sonucunda elde edilen deneysel veriler girdiler ve çıktılar arasında ampirik bir bağıntı, yani proses modeli bulunmasında kullanılmaktadır (Carley vd. 2004).

Genellikle cevap  $y$  bağımsız değişkenleri  $\xi$  arasındaki ilişki;

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \varepsilon \quad (3.1)$$

şeklindedir. Burada gerçek cevap fonksiyonu olan  $f$ , bilinmeyen,  $\varepsilon$  ise  $f$  içinde hesaba katılmayan diğer varyasyon kaynaklarını temsil etmektedir.  $\varepsilon$  genellikle, cevaptaki ölçümden gelen hatayı, gürültüyü ya da diğer değişkenlerin etkisi, vb.’yi

içerir ve çoğunlukla normal dağılımda olduğu varsayılan istatistiksel hata olarak adlandırılır. Böylece;

$$E(y) = \eta = E[f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k)] + E(O) = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) \quad (3.2)$$

yazılabilir. Eşitlik 3.2'deki  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$  değişkenleri 'doğal değişkenler' olarak adlandırılır, çünkü ölçülen değerin doğal birimleri ile ifade edilirler, örneğin sıcaklık için °C gibi. Ancak bir çok YYY çalışmasında doğal değişkenleri, boyutsuz olarak tanımlanan kodlanmış değişkenlere  $x_1, x_2, \dots, x_k$  dönüştürmek daha uygundur. Kodlanmış değişkenler cinsinden cevap fonksiyonu olan 3.2 denklemi şöyle yazılabilir (Carley vd. 2004):

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (3.3)$$

Hesaplamanın basitleştirilmesi için bağımsız değişkenleri (-1, 1) aralığında tanımlayan kodlanmış değişkenlerin kullanılması uygundur. Bağımsız değişkenler yeniden ölçeklendirildiğinde, 0 tasarımın merkez noktasındadır ve  $\pm 1$  merkezden farklı yönlerde olan uzaklıklardır. Doğal değişkenlerin kodlanmış değişkenlere çevrimi aşağıdaki gibi yapılır (Myers ve Montgomery 1995):

$$KD = \frac{DD - \left(\frac{YS + DS}{2}\right)}{\frac{|YS - DS|}{2}} \quad (3.4)$$

Burada;

Kodlanmış değişken = KD

Doğal değişken = DD

Yüksek seviye = YS

Düşük seviye = DS

Gerçek cevap fonksiyonu olan f bilinmez olduğu için, ona yaklaşılması gerekmektedir. YYY'nin başarılı bir şekilde uygulanması için, f fonksiyonuna uygun olan bir yaklaşımın kullanılabilmesi gereklidir. Çoğunlukla birinci ya da ikinci dereceden

modeller kullanılır. Birinci dereceden model yalnızca f fonksiyonunda az bir kavisin olduğu küçük bir bölgede çalışıldığında kullanılabilir.

İki bağımsız değişken olduğu durumda kodlanmış değişkenler cinsinden birinci dereceden model aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad (3.5)$$

Eşitlik 3.5'e bazen ana etkiler modeli de denir, çünkü  $x_1$  ve  $x_2$  değişkenleri arasındaki yalnızca ana etkileri içerir. Bu değişkenler arasında bir etkileşim olduğunda modele eklenen terimlerle Eşitlik 3.5 aşağıdaki hale dönüşür (Carley vd. 2004):

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.6)$$

Eşitlik 3.6, etkileşim terimlerini içeren birinci dereceden modeldir. Etkileşim terimlerinin eklenmesi, cevap fonksiyonunda bir kavis yaratır.

Genellikle cevap fonksiyonundaki kavis, birinci dereceden model ile ifade edilemeyecek kadar güçlüdür. Bu durumlarda ikinci dereceden model kullanılmaktadır. İki değişkenli ikinci dereceden bir model Eşitlik 3.7 ile ifade edilir:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.7)$$

Bu model, küçük bir bölgede gerçek cevap fonksiyonuna yaklaşım için uygun bir modeldir. İkinci dereceden modelin tercih edilmesinin birçok nedeni bulunmaktadır. Birincisi, bu model esnektir, birçok fonksiyonel forma dönüşebilir. İkincisi, parametreler olarak adlandırılan  $\beta$  değerlerinin hesaplanması kolaydır. Bu amaçla en küçük kareler yöntemi kullanılabilir. Üçüncüsü ise, gerçek yüzey yanıt problemlerinin çözümünde ikinci dereceden modellerin uygun olduğunu gösteren birçok örneğin bulunmasıdır (Carley vd. 2004).

Genellikle birinci dereceden model;

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_k x_k \quad (3.8)$$

İkinci dereceden model ise

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_i \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.9)$$

olarak ifade edilmektedir. İkinci dereceden büyük dereceli polinomların kullanıldığı nadir durumlar da bulunmaktadır. Bu durumda gerçek cevap fonksiyonu olan  $f$ 'ye yaklaşabilmek için Taylor serisi açılımı kullanılmaktadır.

Üssel modeller de polinom modellere benzeyen ampirik modellerdir onların bazı dezavantajlarını elimine ederler. Araştırmacılar tarafından kullanılan üssel modeller Eşitlik 3.10 ve 3.11 de gösterilmiştir. Bu modellerin katsayıları da en küçük kareler yöntemi kullanılarak tahmin edilmektedir. Ancak bir dezavantaj olarak üssel modeller de polinom modeller gibi veri gurubu dışını tahmin edemezler (Koç ve Ertekin 2009).

$$y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^m \beta_i x_i^{r_i} \quad (3.10)$$

$$y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^m \beta_i (x_i - x_{0,i})^{r_i} \quad (3.11)$$

Üs  $r_i$ 'nin negatif olması ters terimleri oluşturur ve bu durum yanıtta pik ile temsil edilir.

Lineer regresyon analizi, bağımlı değişken (yanıt) ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak inceleyen istatistiksel bir tekniktir. Polinom modeller gibi lineer olan herhangi bir model, oluşturduğu yanıt yüzeyin şekli ne olursa olsun lineer regresyon modelidir. Çoklu lineer regresyon modelinde, regresyon katsayıları en küçük kareler yöntemi kullanılarak tahmin edilmektedir (Koç ve Ertekin 2009).

Regresyon modeli tahmin edildikten sonra bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağının araştırılması gerekmektedir. Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir. Bu amaçla, varyasyon katsayısının hesaplanması, regresyon analizine hipotez testlerinin uygulanması, hipotez testlerinin regresyon katsayılarına bireysel olarak uygulanması, regresyon katsayısının ( $R^2$ ) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının hesaplanması ( $R^2_{adj}$ ), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının (PRESS) hesaplanması, yeterli tahminleme (adequite precision) değerinin hesaplanması, model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) ve kalıntı analizi gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır (Koç ve Ertekin 2009).

Model uygunsuzluğu (lack of fit) testinde veriler, regresyon modeline fit ettirilmektedir. Elde edilen bu model gerçek yanıt fonksiyonuna sadece bir yaklaşım olduğu için, tahmin edilen değerler ile deneysel veriler arasındaki fark (kalıntı), sadece saf deneysel hatayı değil modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hatayı da içermektedir. Modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (lack of fit) denmektedir. İdeal olarak, istatistiksel açıdan modelin matematiksel formunun uygunsuzluğunun (lack of fit) önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması gerekmektedir (Koç ve Ertekin 2009).

Seçilen modelin istatistiksel açıdan uygun olduğunun belirlenmesinin ardından, optimizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Proseslerin optimizasyonunda genellikle sistemin performansını veya ürünün kalite kriterlerini belirleyen çok sayıda yanıtla eş zamanlı olarak çalışılır. Bu yanıtların bazılarının maksimum seviyede tutulması, bazılarının minimum seviyede tutulması, bazılarının da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenir. Birçok durumda, yanıtlar birbirleri ile rekabet halindedir, diğer bir ifadeyle bir yanıtın geliştirilmesi diğer bir yanıt üzerinde olumsuz bir etki oluşturabilir. Bu yüzden, optimizasyon çalışmalarında sistemi karakterize eden tüm yanıtların hep birlikte ele alınması gerekmektedir. Ancak bu durumda, optimizasyon oldukça karmaşık bir hal almaktadır. Bu problemi çözmek için farklı yaklaşımlar öne

sürülmüştür. Tek yanıtli optimizasyon problemlerinin çözümü durağan noktaların hesaplanması ile yapılabilir. Durağan noktaların hesaplanması 2 yolla yapılır:

- 1) Model içinde yer alan bağımsız değişkenlerin her biri için kısmi türevler alınarak sıfıra eşitlenir ve denklem sistemi çözülür. Her bağımsız değişken için elde edilen değerler modelde yerlerine konarak durağan noktalar için yanıt hesaplanır.
- 2) Matris yardımı ile de durağan noktaların hesaplanması yapılabilmektedir. Modelin matris gösterimi Eşitlik 3.12'deki gibidir.

$$Y = b_0 + x'b + x'\widehat{B}_x \quad (3.12)$$

Burada  $b_0$  model sabitini,  $b$  doğrusal ve  $B$  ise ikinci dereceden model katsayılarının tahmin edicilerini göstermektedir. Ayrıca  $x' = (x_1, \dots, x_m)$ 'dir.  $B$   $k \times k$  boyutlu simetrik matristir. Durağan noktalar Eşitlik (3.13)'ten elde edilmektedir.

$$x = \frac{1}{2} \widehat{B}^{-1} b \quad (3.13)$$

Çok yanıtli optimizasyon problemlerinin çözümünde: lineer olmayan programlama yaklaşımı, yanıtların izohips eğrileri çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing) ve desirability (istenilen hedefe ulaşma) fonksiyonu yaklaşımı gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır. Lineer olmayan programlama yaklaşımında çok yanıtli sistemlerin optimizasyonunda temel amaç olan, tüm yanıtlar arasında en iyi dengenin sağlanması karşılanamamaktadır.

Yanıtların izohips eğrilerinin çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing), çok yanıtli optimizasyon problemlerinin çözümünde kullanılan diğer bir yaklaşımdır. Her bir izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Katsayılara bağlı olarak izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası (saddle point)) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını verebilmektedir. Yanıt yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler iç etkileşimin önemli

olduğunu göstermektedir. En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzey öngörülen en yüksek veya en düşük yanıt belirtmektedir (Koç ve Ertekin 2009).

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin dışında bir de Desirability (İstenilen Hedefe Ulaşma) fonksiyonu bulunmaktadır. Bu fonksiyonun ilkesi, tüm yanıtların, boyutsuz desirability skalasını içeren “desirability fonksiyonu” olarak tanımlanan tek bir fonksiyon altında toplanmasını ve bu fonksiyonun arzu edilen sonuçları verecek şekilde maksimize edilmesini içermektedir. Farklı skalaya sahip yanıtların birlikte incelenebilmesi, yanıtların tek bir fonksiyona kolayca dönüştürülebilmesi ve kalitatif ve kantitatif yanıtların kullanılabilmesi bu yöntemin önemli avantajları arasındadır. Desirability fonksiyonu, tüm yanıtların bir araya getirildiği, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksidir ve bu değerin 1’e yaklaşması araştırmacının belirlediği kriterlerin sağlandığını belirtmektedir (3.14).

$$d_i(\hat{y}_i) = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i(\mathbf{x}) < L_i \\ \left( \frac{\hat{y}_i(\mathbf{x}) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & L_i \leq \hat{y}_i(\mathbf{x}) \leq T_i \\ \left( \frac{\hat{y}_i(\mathbf{x}) - U_i}{T_i - U_i} \right)^t & T_i \leq \hat{y}_i(\mathbf{x}) \leq U_i \\ 0 & \hat{y}_i(\mathbf{x}) > U_i \end{cases} \quad (3.14)$$

Desirability fonksiyonu  $d_i(\hat{y}_i)$ ’ler her bir yanıt ( $\hat{y}_i$ ) için ayrı ayrı hesaplanır ve daha sonra bu bireysel fonksiyonların geometrik ortalaması alınarak tek bir toplu desirability fonksiyonu (D) oluşturulur. Optimizasyon çalışmasında her bir yanıt için seçilen kritere (maksimum, minimum, hedef değeri atanması veya belli bir aralıkta olması) bağlı olarak farklı desirability fonksiyonları kullanılmaktadır. Burada,  $T_i$ , hedef değeri,  $L_i$  ve  $U_i$  sırasıyla alt ve üst sınırları belirtmektedir.  $s$  ve  $t$  ise hedef değere ulaşmanın ne kadar önemli olduğunu ve bu yanıtın ürünün toplam arzu edilebilirliğindeki rolünü belirleyen ağırlık sabitleridir.

Her bir yanıt için desirability fonksiyonları tanımlandıktan sonra geometrik ortalamaları alınarak hepsi için tek bir toplu desirability fonksiyonu (D) elde edilir. Ağırlık

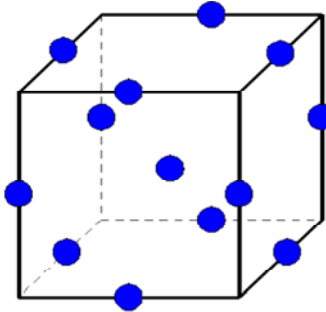
katsayılarına ilave olarak her bir yanıtın optimizasyondaki önemliliğini belirten 1’den 5’e kadar önemlilik derecesi ( $v_i$ ) de verilebilmektedir. Son toplu desirability fonksiyonu  $i$  adet yanıt için Eşitlik 3.15 ile ifade edilir. Daha sonra toplu desirability fonksiyonunu maksimize eden ( $x$ ) değişken seviyesi kombinasyonu bulunur (Koç ve Ertekin 2007).

$$D = (d_1^{v_1} \times d_2^{v_2} \times d_3^{v_3} \wedge d_n^{v_n})^{1/\sum v_i} = (\prod_{i=1}^n d_i^{v_i})^{1/\sum v_i} \quad (3.15)$$

### 3.1.1 Merkezi karma tasarım

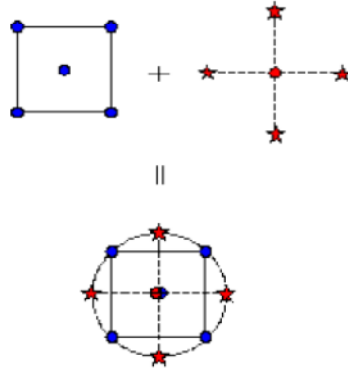
Yanıt yüzey yönteminde yaygın olarak kullanılan ikinci dereceden tasarımlar, Box-Behnken Tasarımları ve Box-Wilson Merkezi Tasarım yöntemleri olmak üzere iki ana başlıkta incelenmektedir (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>).

Box-Behnken tasarımı bağımsız bir ikinci dereceden tasarımdır, içinde herhangi gömülü bir tasarım içermez. İşletim koşulları olarak proses bölgesinin kenarlarının orta noktaları ve merkez noktası seçilir (Şekil 3.1). Her bir faktör için üç seviye gerektirir.



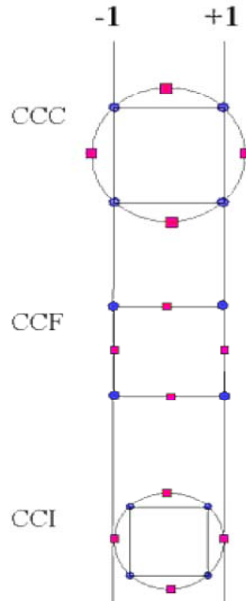
Şekil 3.1 Üç faktörlü ikinci dereceden bir proses için Box-Behnken Tasarımı (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>)

Box-Wilson Merkezi Karma Tasarımları ise yaygın olarak Merkezi Karma Tasarım (MKT) olarak anılmaktadır. İçinde gömülü olarak faktöriyel ya da fraksiyonel faktöriyel tasarım içerir. Proses cevabındaki kavisliğin hesaplanabilmesi için merkez noktalara ek olarak yıldız noktaların ( $\alpha$ ) da tasarıma katıldığı bir yöntemdir. Yıldız noktaların değeri tasarıma ve faktör sayısına bağlıdır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 İki faktörlü ikinci dereceden bir proses için Merkezi Karma Tasarımı (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>)

Merkezi Karma Tasarımının üç çeşidi bulunmaktadır. Bunlar; dış çemberli tasarım (Circumscribed, CCC), iç çemberli tasarım (Inscribed, CCI) ve yüzey merkezli (Face centered, CCF) tasarımlardır. Bu tasarımların şematik gösterimi Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3 Merkezi Karma Tasarımının çeşitlerinin tasarım şemaları (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>)

Dış çemberli tasarımın avantajı, daha geniş bir alanda tarama olanağının olması, yüksek öngörü sağlama ve basit bir faktöriyel tasarımdan karmaşık merkezi tasarıma geçişe olanak sağlamasıdır. Bu çalışmada yukarıda verilen avantajları nedeniyle dış çemberli tasarım seçilmiştir.

## 4. MATERİYAL ve YÖNTEM

### 4.1 Materyal

Çalışmada ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) kullanılmıştır. Deneylerin gerçekleştirildiği cihazlar **Ek 1**'de, kullanılan kimyasallar ise **Ek 2**'de verilmiştir.

### 4.2 Deneysel Yöntemler

#### 4.2.1 Katı agar ortamı

Katı agar ortamı olarak universal maya ortamı (universal yeast medium: UYM) kullanılmıştır. UYM; 3g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 5 g/L pepton, 10 g/L glukoz ve 15 g/L agardan oluşmaktadır. *R. glutinis* katı agar ortamında 21 st süre ile çoğaltılmıştır.

#### 4.2.2 Üretim ortamı

Sıcaklık etkisinin incelendiği deney setinde üretim ortamı olarak, agar içermeyen UYM çözeltisi kullanılmıştır. 250 ml hacmindeki erlenlerde 100 ml hacminde hazırlanan ortamlar 150 rpm karıştırma hızında çalkalanarak 144 st boyunca incelenmiştir.

Başlangıç pH değerinin etkisinin incelendiği deneylerde, UYM ortamının pH değeri 0.1 M NaOH veya 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ayarlanmıştır.

Karbon kaynağı türünün incelendiği deney setlerinde besiyeri ortamında 3 g/L maya özütü ve 5 g/L pepton sabit tutulmuştur. Karbon kaynağı olarak; glukoz (10 g/L), fruktoz (10 g/L), galaktoz (10 g/L), maltoz (5 g/L), sukroz (5 g/L), laktoz (5 g/L), ksiloz (8.3 g/L), sorbitol (10 g/L) veya gliserol (20 g/L) eklenmiştir.

Azot kaynağı türünün incelendiği deney setlerinde ise UYM besiyeri üzerine 0.02 mol azot içeren potasyum nitrat (PN), amonyum nitrat (AN), amonyum sülfat (AS) veya üre eklenmiştir.

Karbon kaynağı, başlangıç pH değeri ve azot kaynaklarının incelendiği üretimler  $T=30^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 100 ml hacmindeki ortamda ve  $N=150$  rpm karıştırma hızında 96 saat boyunca yapılmıştır.

Üretim ortamına eklenen radikal oluşturucuların etkisi iki ayrı deney seti halinde incelenmiştir. Birinci sette UYM ortamı 24. saatte farklı süre ve/veya derişimlerde UV ışımaya,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin)dihidroklörür (AAPH) etkisine maruz bırakılmış ve yalnızca KAT aktivitesindeki değişim incelenmiştir ( $T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $N=150$  rpm). İkinci grupta ise deneysel tasarım sonucunda en iyi SOD aktivitesi sağladığı belirlenen koşullarda (ortam bileşimi: 3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol; başlangıç pH değeri 5.47,  $T=33.9^{\circ}\text{C}$ )  $N=150$  rpm'de 24 saat süre ile üretim gerçekleştirildikten sonra üretim ortamı farklı süre ve/veya derişimlerde UV ışımaya,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , AAPH, metil viyolojen ve metilen mavisi etkisine maruz bırakılmıştır. Bu radikal oluşturucuların KAT ve SOD aktiviteleri üzerindeki etkileri takip edilmiştir.

İncelenen tüm ortamlarda başlangıç hücre absorbansı  $0.26 \pm 0.02$  ( $\lambda=600$  nm) olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### **4.2.3 Deneysel tasarım**

Design Expert (7.0.0) programı deneme sürümü kullanılarak gerçekleştirilen deneysel tasarımda, Yanıt Yüzey Yöntemi'nin (YYY) bir alt yöntemi olan Merkezi Karma Tasarım (MKT) kullanılmıştır. Faktörler olarak sıcaklık, pH ve gliserol derişimi seçilmiş, buna karşılık, hücre derişimi (mg/ml), KAT aktivitesi (U) ve SOD aktivitesi (U) parametreleri cevap olarak belirlenmiştir. Altı tanesi merkez noktanın tekrarı olmak üzere toplam 20 adet deney yapılmıştır. Deneyler rasgele seçilen sıra ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçların doğruluğunun kanıtlanması için bağımsız değişkenlerin optimum seviyelerinde deneyler yeniden gerçekleştirilmiştir. Deneysel verilerin

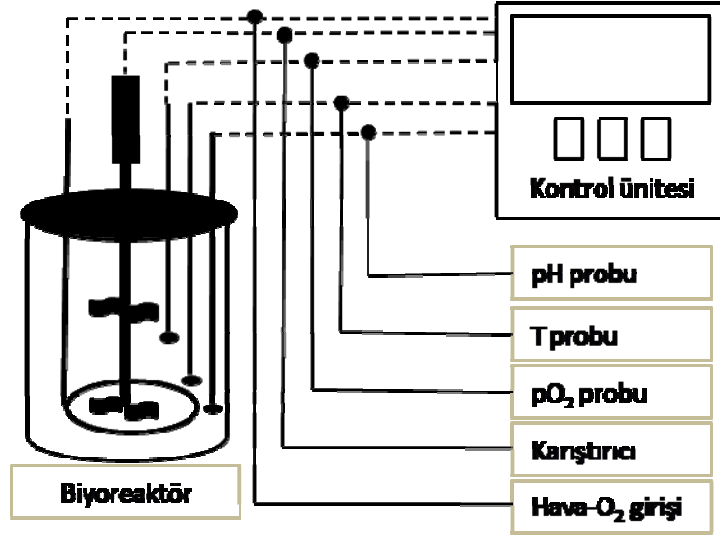
istatistiksel analizi Design Expert (7.0.0) programı deneme sürümü kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Yüzey yanıt grafikleri de Design Expert (7.0.0) programı deneme sürümü kullanılarak çizilmiştir.

Bu deney setinde azot kaynağı olarak 3 g/L maya özütü ve 5 g/L pepton kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak yalnızca gliserol kullanılmış, başlangıç pH değerleri ise seyreltik NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ayarlanmıştır. Deneyler 100 ml çalışma hacminde, T=30 °C ve N=150 rpm çalışma koşullarında gerçekleştirilmiş, 24. saat sonunda gerekli ölçümler yapılmıştır.

#### **4.2.4 Biyoreaktör deneyleri**

Katı agar ortamında 21 saat süre ile çoğaltılmış olan hücreler 150 ml hacmindeki önçoğalma ortamına, absorbansı 0.750±0.03 ( $\lambda=600$  nm) olacak şekilde aşılacaktır. Önçoğalma ortamı, 3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol bileşimindedir. Hücreler bu ortamda 30 °C ve 150 rpm karıştırma hızında 24 saat çoğaltıldıktan sonra, aynı bileşimdeki V=1.5 L hacmindeki biyoreaktör ortamına aktarılmıştır.

Biyoreaktörde sıcaklık, oksijen ve pH problemleri yardımıyla ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). Karıştırma hızı N=500 rpm’de sabit tutulmuş, sıcaklık soğutmalı sirkülatör yardımıyla T=33.9 °C’a ayarlanmış ve ortama Q=1 L/dk akış hızında kuru hava ve/veya O<sub>2</sub> beslenmiştir. Farklı sürelerde örnekler alınarak, hücre derişimi, KAT ve SOD aktiviteleri takip edilmiştir.



Şekil 4.1 Biyoreaktörün şematik görünümü

### 4.3 Analitik Yöntemler

#### 4.3.1 Hücre derişimi

Üretim ortamından 24 st aralıklarla ile örnekler alınarak saklanmıştır. Üretimin sonunda saklanmış olan tüm hücre örnekleri filtre edilmiş, saf su ile yıkanmış ve daraları alınmış filtre kağıtlarında 85 °C’da 24 st boyunca kurutulmuştur. Sabit tartıma ulaşıldığı andaki toplam kütleleri ile daraları arasındaki farktan yararlanılarak hücre kütleleri hesaplanmış, örnek hacmine bölünerek derişim değerleri elde edilmiştir.

#### 4.3.2 Hücrelerin parçalanması

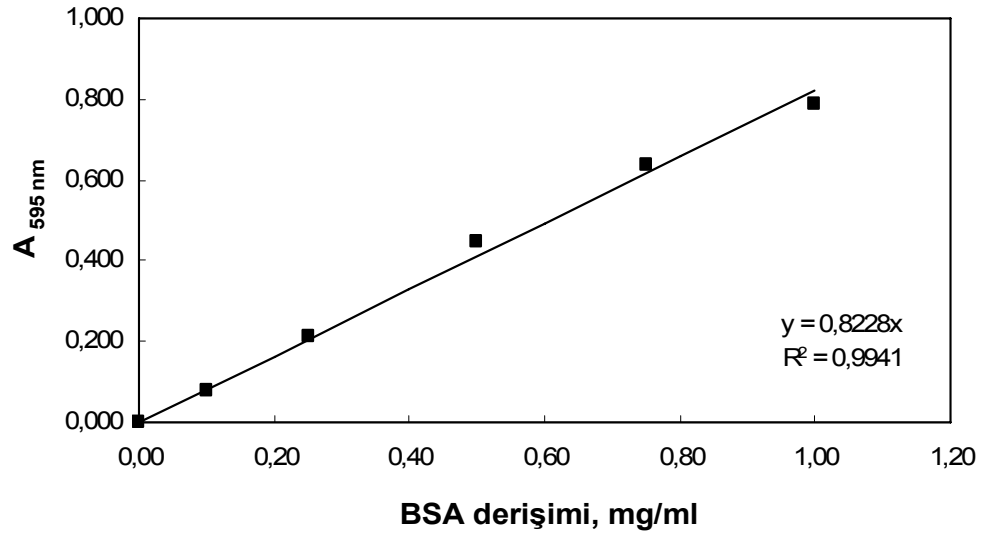
60 ml hacmindeki üretim ortamı +4°C, 12000xg koşullarında 10 dk süre ile santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücreler iki kez distile suyla yıkandıktan sonra, üzerlerine 5 ml fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) eklenmiştir. 1 ml hücre süspansiyonu 2 ml hacmindeki parçalama tüplerine alınmış, üzeri 0.5 mm çaplı cam boncuklarla tamamlanmış, 30 s’lik periyotlar halinde 4800 titreşim/dk hızında 8 kez parçalanmış ve her bir parçalama periyodu ardından 30 s’lik süreler halinde buzda soğutulmuştur. Parçalama işleminin tamamlanmasının ardından tüpler 12000xg’de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst faz, hücre içi analizlerinde kullanılmıştır.

### 4.3.3 Protein derişimi

Hücre içi protein derişimleri Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bovin serum albumin (BSA) proteini kullanılarak derişimi bilinen çözeltiler hazırlanmış, Bradford reaktifi ile tepkimeleri sonuncunda  $\lambda=595$  nm’de elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir. Buna göre;

$$C \text{ (mg/ml)} = (A_{595}) / 0.823 \quad (4.1)$$

denklemleri yardımıyla okunan absorbans değerinden protein derişimi hesaplanmaktadır.



Şekil 4.2 Bradford yöntemi ile protein tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği

### 4.3.4 Katalaz (KAT) aktivitesi

Katalaz (E. C. 1.11.1.6) enzimi aşağıdaki tepkimeyi katalizlemektedir:



Katalaz aktivitesi, Aebi (1984) tarafından geliştirilen yöntemine göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin parçalanmasının takip edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 0.05 M pH 7.0 fosfat

tamponu içinde hazırlanan 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin parçalanması,  $\lambda=240$  nm'de 1 dk boyunca takip edilmiştir. Bir U katalaz aktivitesi, 25°C ve pH 7.0'de, 1 dakikada 1 mikromol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

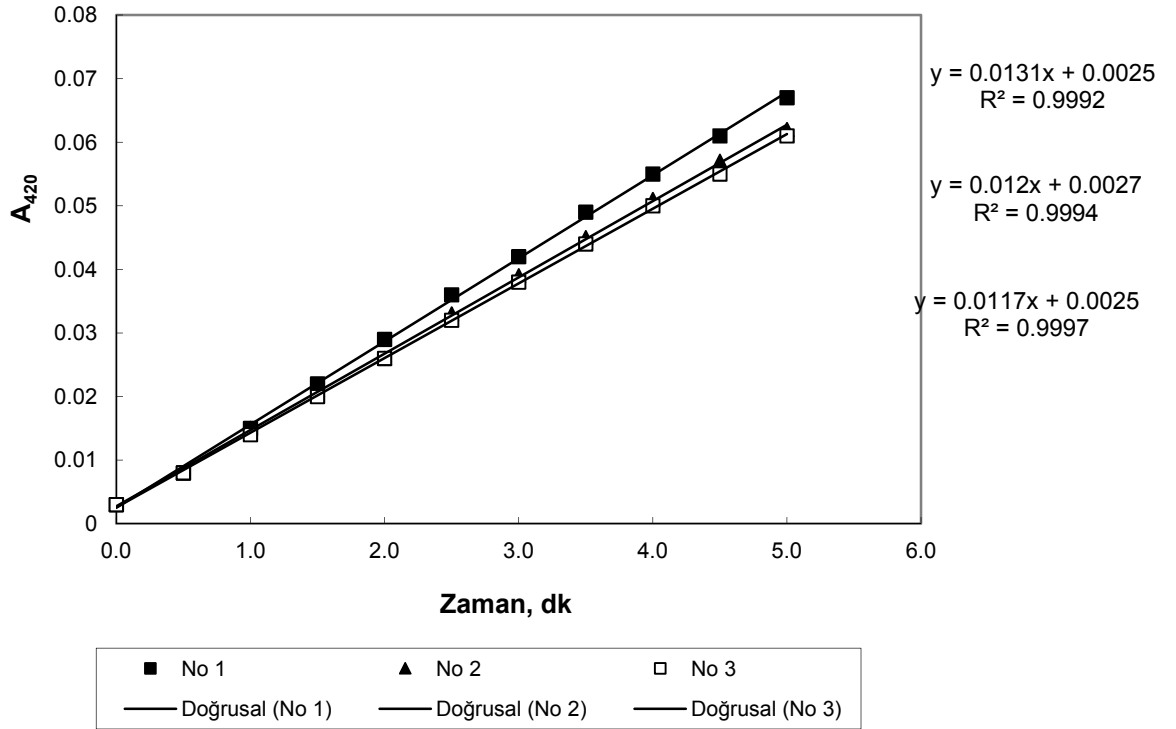
#### 4.3.5 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperoksit dismutaz (E. C. 1.15.1.1) enzimi aşağıdaki tepkimeyi katalizlemektedir:



Süperoksit dismutaz aktivitesi, Marklund (1974)'un geliştirdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 50 mM pH 8.2 Tris-HCl-1mM EDTA içeren tampon içindeki 20 mM derişiminde progallol kullanılmıştır. Otooksidasyonun hızı 0.2  $\mu$ M bovin katalaz varlığında  $\lambda=420$  nm'de absorbanstaki artış takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bir ünite SOD aktivitesi, progallol otooksidasyonunu %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Süperoksit dismutaz aktivite hesabı için öncelikle progallolün otooksidasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Ölçüm ortamında 0.2  $\mu$ M katalaz enzimi, 0.2 mM progallol bulunmaktadır. Bunun için 10  $\mu$ M bovin katalaz enzimi stoğu, 10 mM progallol stoğu hazırlanmıştır. Her analizde üçer kez tekrar edilerek ortalaması alınan otooksidasyon grafiği eğimi, her bir ölçüm öncesinde tekrar edilmiştir.

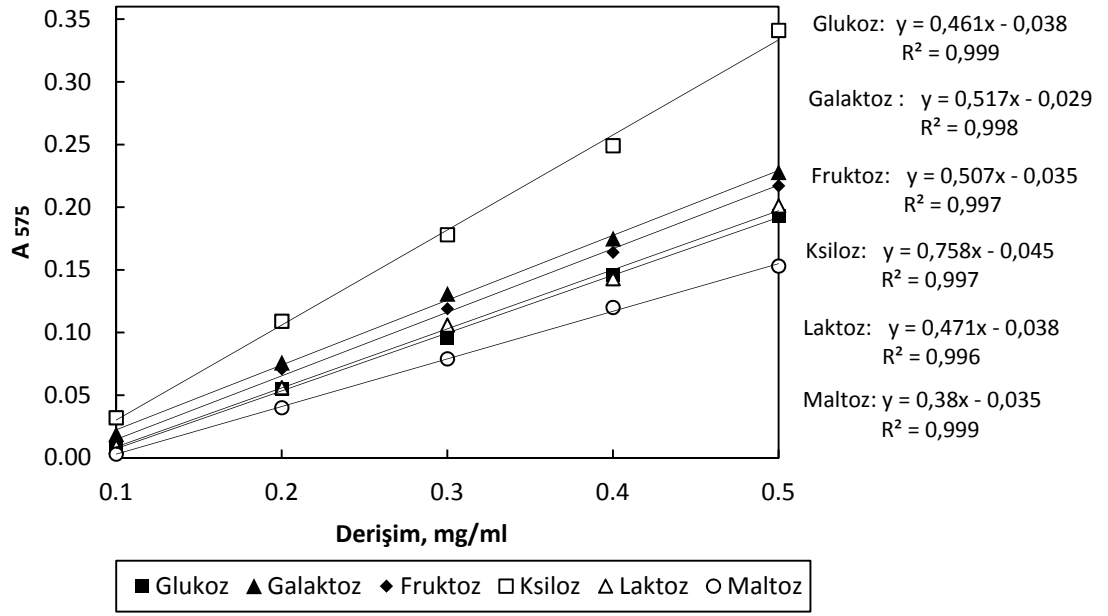


Şekil 4.3 Progallolün otooksidasyonu için örnek grafik

#### 4.3.6 İndirgen şeker tayini

İndirgen şeker tayini için Miller'in (1959) yayınında verilen yöntemi modifiye edilmiştir. Analiz için dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (10 g/L DNS, 05 g/L sodyum sülfat, 10 g/L sodyum hidroksit) ve sodyum potasyum tartarat (40 g/L) çözeltisi ayrı kaplarda hazırlanmıştır. 3 ml örnek çözeltisi ile 3 ml DNS çözeltisi karıştırılarak 90°C'de 15 dk bekletildikten sonra üzerine 1 ml sodyum potasyum tartarat çözeltisi konulmuş ve oda sıcaklığına getirildikten sonra  $\lambda=575$  nm'de absorbans değeri okunmuştur.

Örneklerin indirgen şeker tayinleri yapılmadan önce glukoz, fruktoz, ksiloz, galaktoz, laktoz, maltoz için gerekli kalibrasyon eğrileri ayrı ayrı oluşturulmuştur (Şekil 4.4).



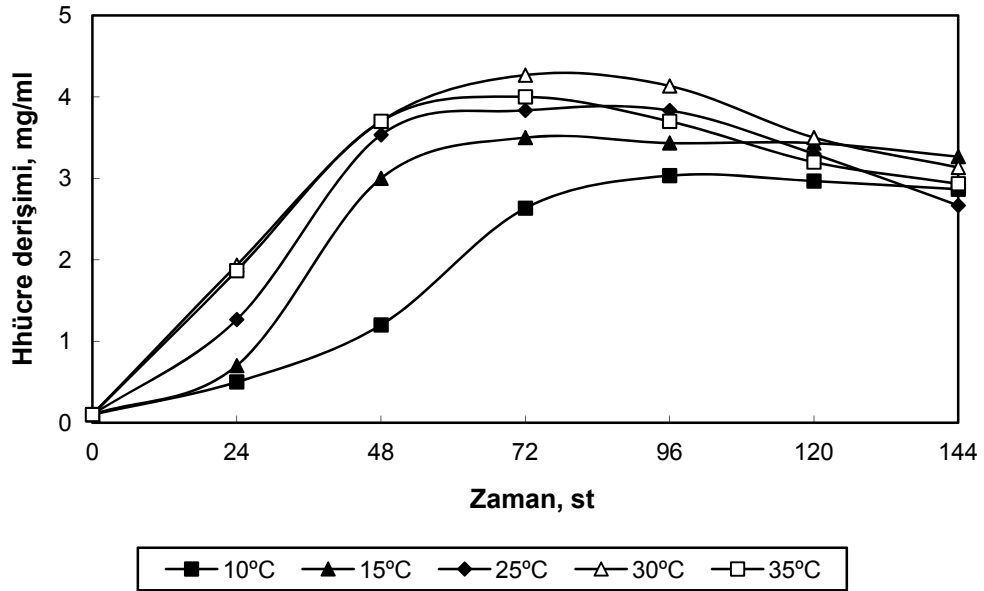
Şekil 4.4 DNS yöntemiyle indirgen şekerler için kalibrasyon grafiği

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

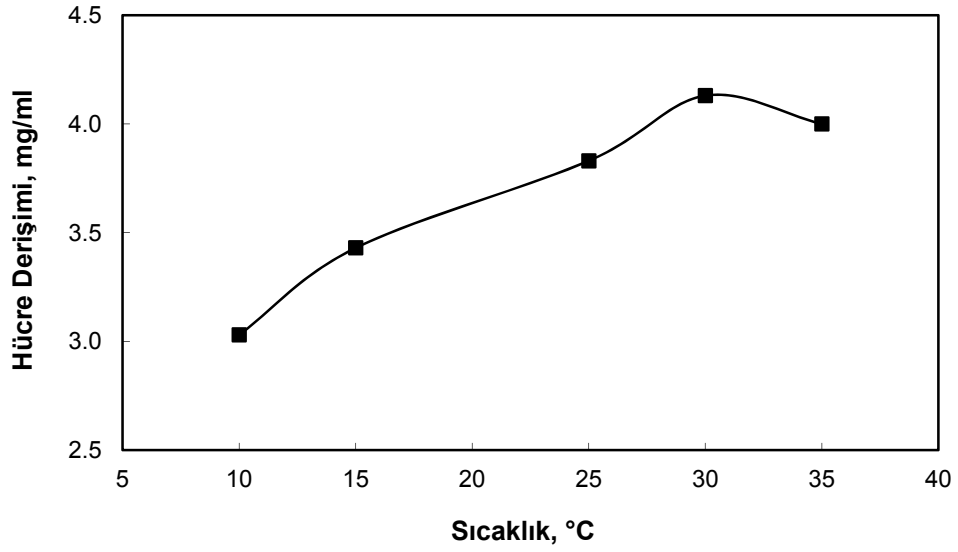
### 5.1 Sıcaklık Etkileri

#### 5.1.1 *R. glutinis*'in hücre derişimi ve özgül çoğalma hızı üzerine sıcaklığın etkisi

*R. glutinis*'in UYM ortamında çoğalması üzerine sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla 10, 15, 25, 30, 35 ve 40 °C sıcaklıklarda üretimler gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.1'de incelenen sıcaklıklarda elde edilen kuru hücre derişim değerlerinin zaman ile değişimi verilmiştir. Hücreler 72 saat sonra üstel çoğalma fazından durgunluk fazına geçmektedir. En yüksek hücre derişimi olan 4.3 mg/ml değerine 30°C'de ulaşılırken, en düşük hücre derişimi 10°C sıcaklıkta (3 mg/ml) elde edilmiştir. Düşük sıcaklıklarda daha yavaş ve daha az çoğalma olduğu, sıcaklık arttıkça çoğalma hızı ve hücre miktarının arttığı belirlenmiştir. 35°C'den itibaren sıcaklığın çoğalmayı olumsuz etkilediği görülmektedir (Şekil 5.2). 40°C'da ise çoğalma olmamıştır.



Şekil 5.1 *R. glutinis*'in çoğalması üzerine sıcaklığın etkisi (UYM, N=150 rpm)



Şekil 5.2 Farklı sıcaklıklarda ulaşılan en yüksek kuru hücre derişimi değerleri (UYM, N=150 rpm)

Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in özgül çoğalma hızları ( $\mu$ ) Eşitlik 5.1 yardımıyla hesaplanarak, grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.3).

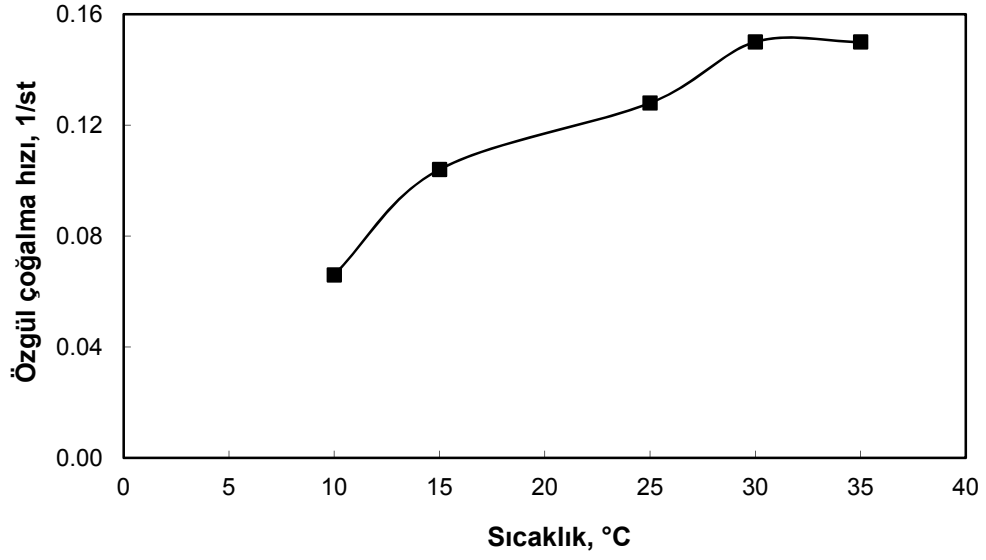
$$r_x = \frac{dCx}{dt} = \mu Cx \quad (5.1)$$

Buna göre sıcaklık arttıkça özgül çoğalma hızı artmakta, 30°C ve 35°C için ise en yüksek ve aynı değerde ( $0.15 \text{ st}^{-1}$ ) kalmaktadır.

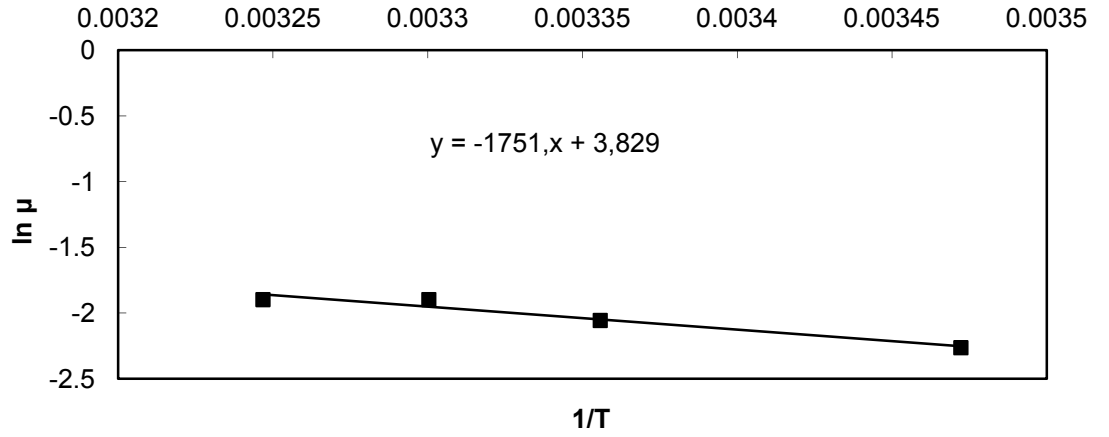
*R. glutinis*'in çoğalma için gerekli aktivasyon enerjisi ise Arrhenius denkleminde (Eşitlik 5.2 ve 5.3) yararlanılarak  $14.56 \text{ kJ/mol}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.4).

$$\mu = \mu_0 e^{(-E/RT)} \quad (5.2)$$

$$\ln \mu = \ln \mu_0 - \frac{E}{RT} \quad (5.3)$$



Şekil 5.3 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in özgül çoğalma hızları (UYM, N=150 rpm)

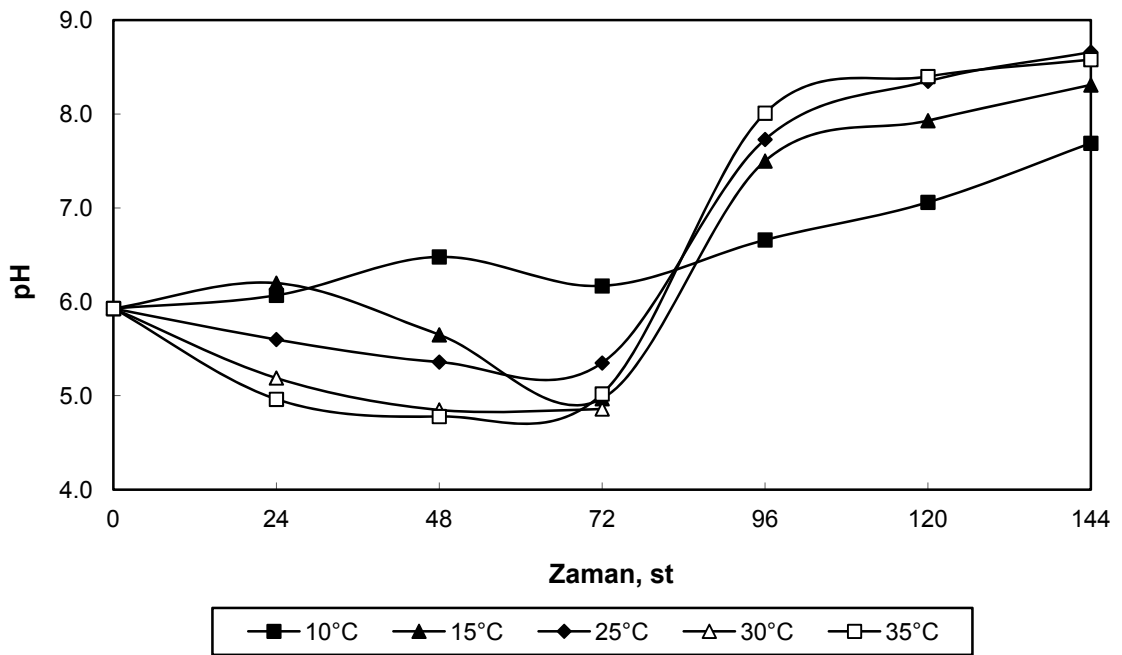


Şekil 5.4 *R. glutinis* çoğalması için (lnμ ; 1/T) grafiği (UYM, N=150 rpm)

### 5.1.2 *R. glutinis*'in hücre dışı pH değişimi üzerine sıcaklığın etkisi

Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi Şekil 5.5'te verilmiştir. Üretim ortamlarının başlangıç pH değeri 5.93 olarak ölçülmüştür. 10°C dışında incelenen tüm sıcaklıklarda hücre dışı pH değerinin zamanla önce azaldığı, daha sonra ani bir artma eğiliminde olduğu gözlenmektedir. Hücre dışı pH değerinde gözlenen bu dönüm noktası, durgunluk fazının başlangıcı olan 72. saate

karşılık gelmektedir (Şekil 5.1). Buna göre, pH değeri durgunluk fazına ulaşana kadar hücre dışına salgılanan maddeler ile düşük değerlerde seyretmekte, çoğalma sona erdiğinde ise artmaktadır. Hücre dışı pH değerindeki bu değişim, özellikle yüksek özgül çoğalma hızının elde edildiği 30°C ve 35°C sıcaklıklarında daha belirgindir. Özgül çoğalma hızının en az olduğu 10°C’de ise hücre dışı pH’da çok net bir artma ve azalma gözlenmemektedir. Hücre dışı pH değerinin ulaştığı en düşük değer 4.78 olarak 35°C sıcaklıkta; en yüksek değer ise 8.66 olarak 25°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

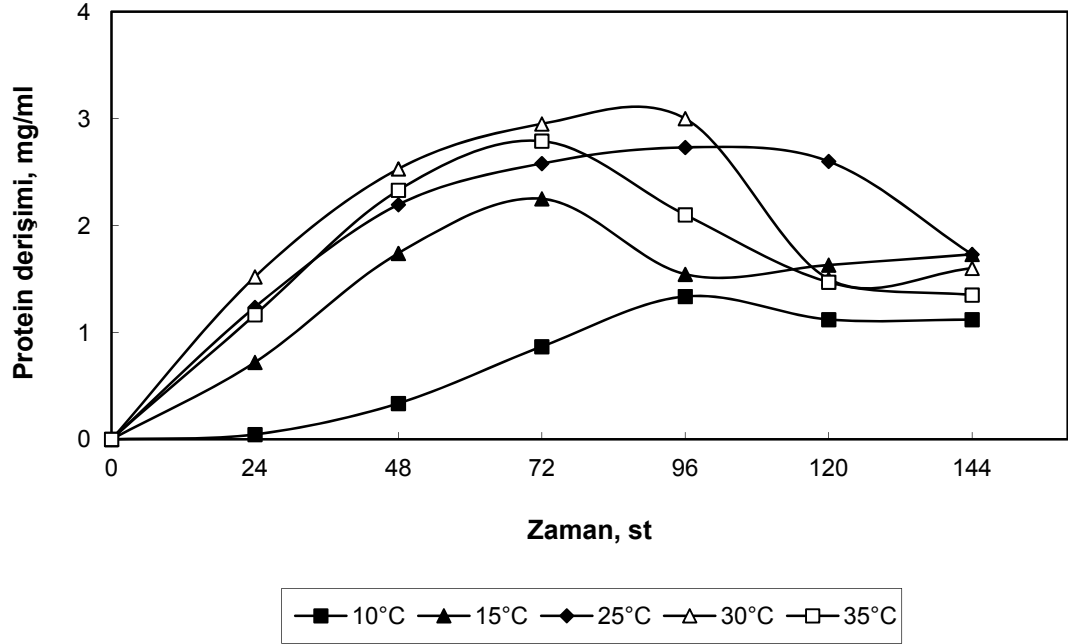


Şekil 5.5 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*’in hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)

### 5.1.3 *R. glutinis*’in hücre içi protein derişimi üzerine sıcaklığın etkisi

*R. glutinis*’in hücre içi protein derişimlerinin farklı sıcaklıklardaki zamanla değişimi Şekil 5.6’da verilmiştir. En yüksek hücre içi protein derişiminin 30°C’de 3.00 mg/ml olarak, en düşük protein derişiminin ise 10°C’de 1.12 mg/ml olarak elde edildiği görülmektedir. Hücre çoğalması ile birlikte değerlendirildiğinde protein derişimi değerlerinin beklenen değişimi sergilediği görülmektedir. Zamanla değişim

değerlendirildiğinde ise, 96. saat civarına kadar artma eğiliminde olan hücre içi protein değerlerinin, daha sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir.



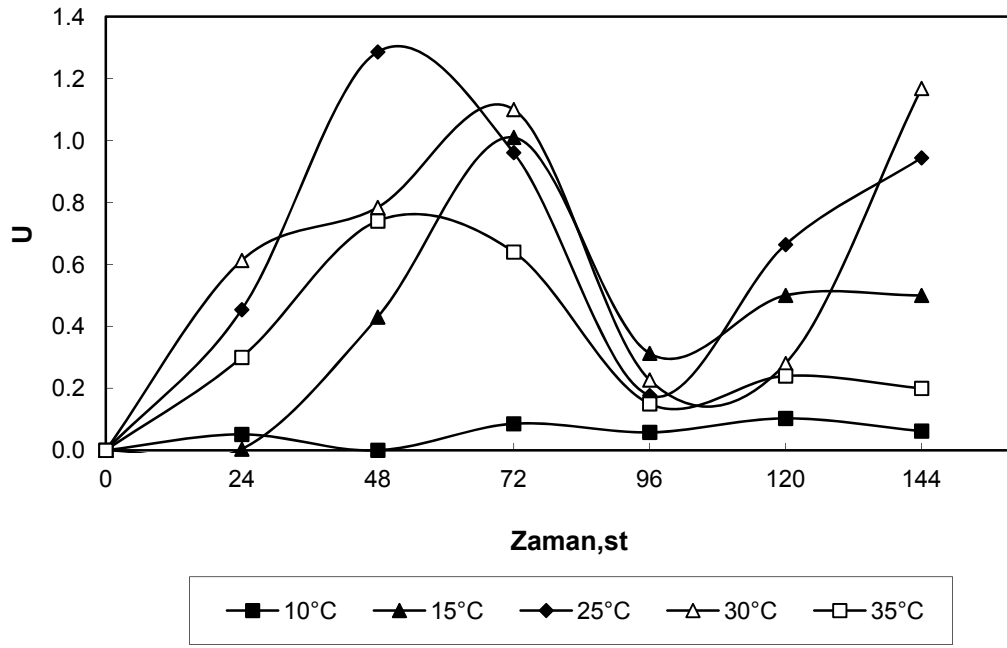
Şekil 5.6 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi protein derişimlerinin zamanla değışimi (UYM, N=150 rpm)

#### 5.1.4 *R. glutinis*'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

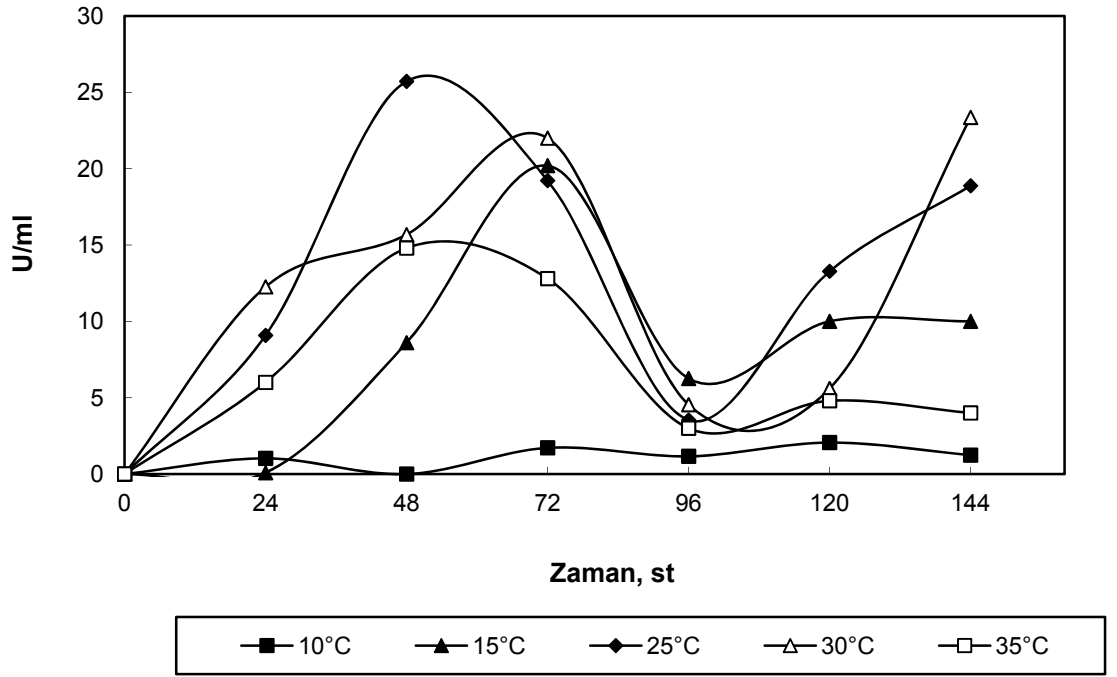
Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi KAT enzim aktivitesinin (U) ve birim hacim başına enzim aktivitesinin (U/ml) zamanla değışimi sırasıyla Şekil 5.7 ve 5.8'de gösterilmiştir. Her bir sıcaklık için farklı bir zamana kadar artma, daha sonra azalarak yeniden artma eğiliminde oldukları görülmektedir. Hücre dışı pH değerlerinin dönüm noktası olan ve durgunluk fazına geçişi ifade eden 72. saate kadar tüm sıcaklıklar için en yüksek aktivite değerlerine ulaşılmış ve sonrasında bir azalma başlamıştır. Ulaşılan en yüksek aktivite değerleri (U) açısından değerlendirildiğinde, 25°C (1.29 U) > 30°C > 15°C > 35°C > 10°C (0.1 U) olduğu belirlenmiştir. En yüksek U/ml değerine 25°C'de 25.72 U/ml olarak ulaşılırken, en düşük değer ise 10°C'da 1.03 U/ml olarak elde edilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi spesifik katalaz aktivitesinin (U/mg) zamanla değışimi ise Şekil 5.9'da verilmiştir. Zamanla spesifik aktivitenin değışimi

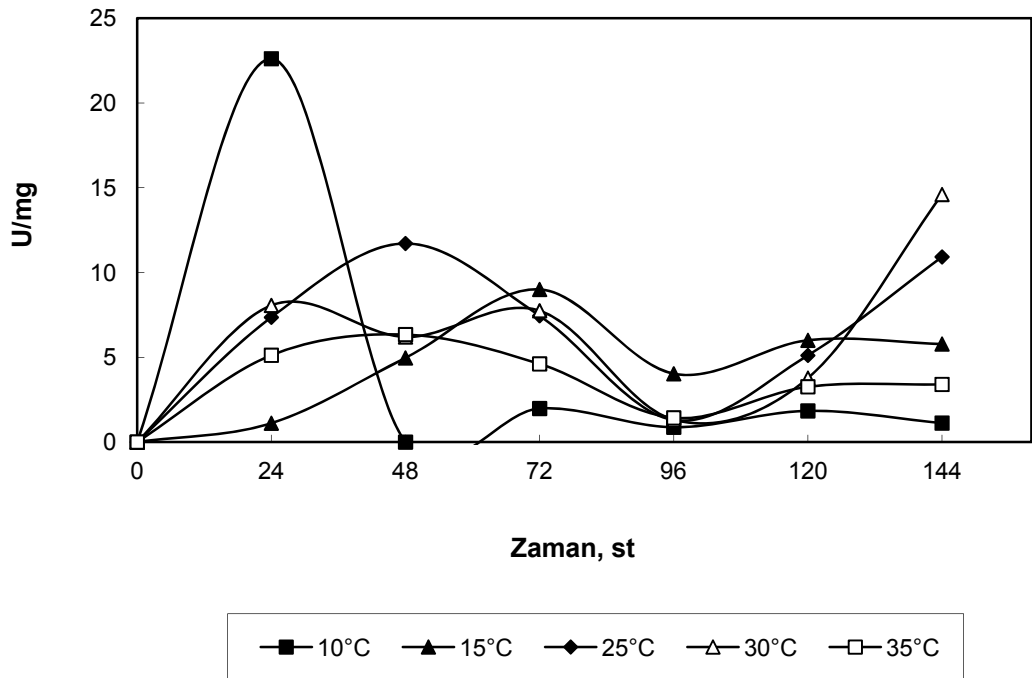
incelendiğinde önce artma, sonra azalma ve yeniden artma eğilimi olduğu görülmektedir. Aktivitelerin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde ise ulaşılan en yüksek KAT aktivite değerlerinin sırasıyla 10°C (22.61 U/mg) > 25°C > 15°C > 30°C > 35°C (6.34 U/mg) şeklinde olduğu belirlenmiştir. 10°C’de toplam katalaz aktivite değeri en düşük olduğu halde, bu sıcaklıkta hücre içi protein değeri de düşük olduğu için, spesifik katalaz aktivite değeri diğer sıcaklıklara göre daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 5.7 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)



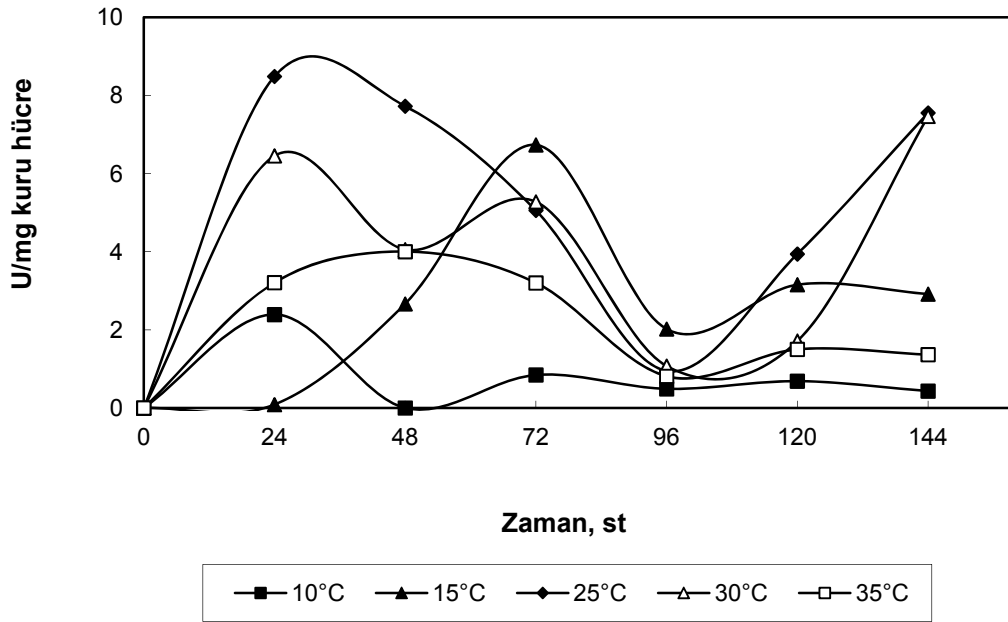
Şekil 5.8 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)



Şekil 5.9 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, 150 rpm)

Şekil 5.10’da farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*’in kuru hücre başına KAT aktivitesinin (U/mg kh) zamanla değişimi verilmiştir. Diğer KAT aktivite grafiklerinde olduğu gibi burada da zamanla benzer bir artma ve azalma olduğu görülmektedir. En yüksek aktivite değerlerinin sırasıyla 25°C (8.49 U/mg kh) > 15°C > 30°C > 35°C > 10°C (2.39 U/mg kh) şeklinde olduğu belirlenmiştir. Durgunluk fazının başlangıcı olan 72. saatten itibaren tüm değerlerin azalma eğiliminde olduğu, son saatlerde ise yine artma olduğu gözlenmiştir.

Toplam, spesifik ve kuru hücre başına katalaz aktiviteleri birlikte değerlendirildiğinde, her bir sıcaklıkta iki maksimum verme eğiliminde oldukları görülmektedir.



Şekil 5.10 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*’in kuru hücre başına KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)

*R. glutinis*’ten yüksek katalaz aktivitesi için hangi sıcaklık ve sürenin daha uygun olduğunun belirlenebilmesi için spesifik verimlilikler hesaplanmıştır (Çizelge 5.1). Buna göre 24. saatte 0.35 U/mg kh/st değeri ile 25°C’de en yüksek verimliliğin elde edildiği, bu değeri yine 24. saatte 0.27 U/mg kh/st ile 30°C’nin takip ettiği belirlenmiştir.

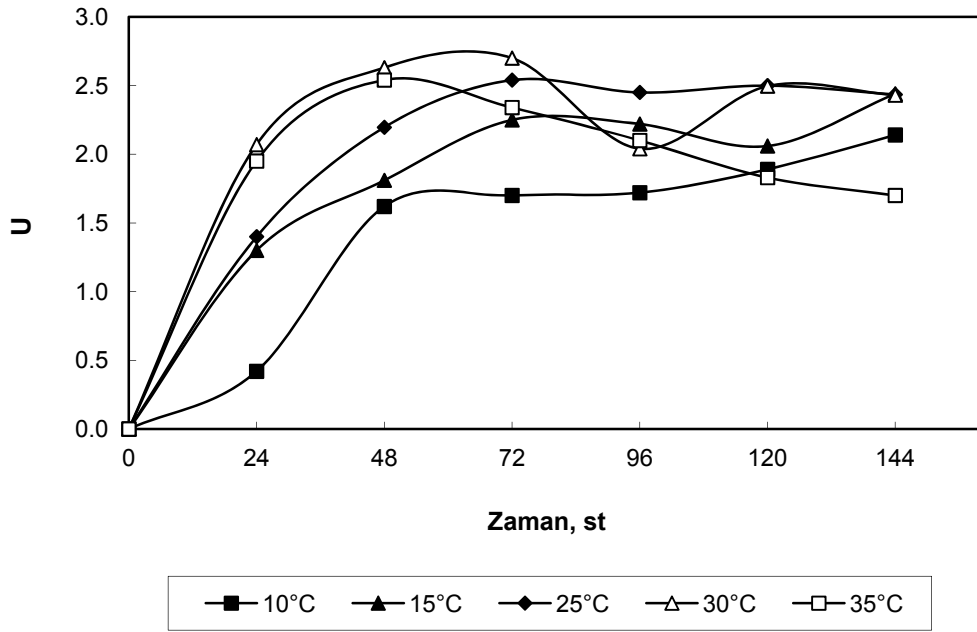
Çizelge 5.1 Farklı sıcaklıklarda hücre içi katalaz spesifik verimliliği

| Sıcaklık , °C | Hücre içi KAT spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) | Süre, st |
|---------------|----------------------------------------------------|----------|
| 10            | 0.10                                               | 24       |
| 15            | 0.09                                               | 72       |
| 25            | 0.35                                               | 24       |
| 30            | 0.27                                               | 24       |
| 35            | 0.13                                               | 24       |

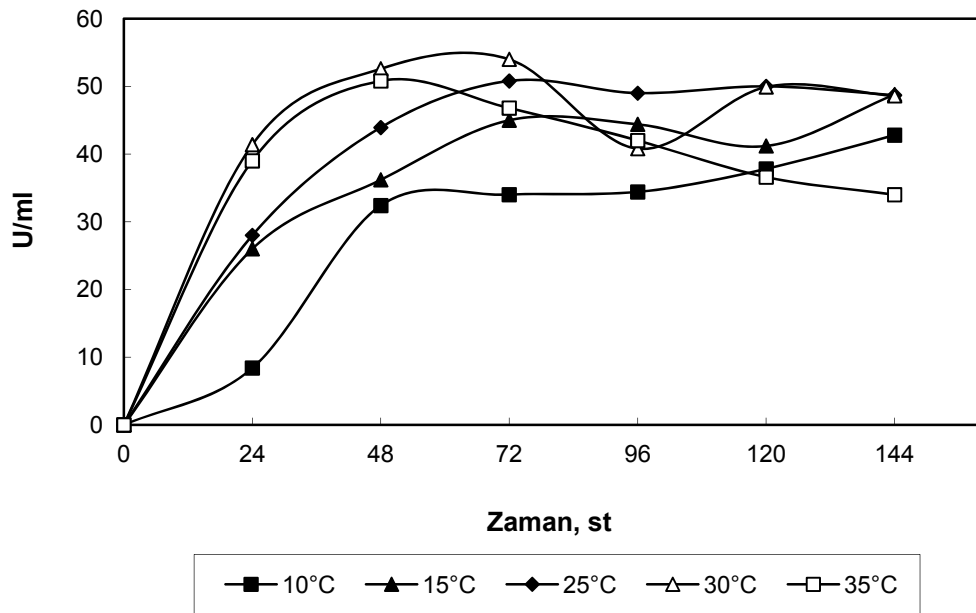
#### 5.1.5 *R. glutinis*'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi SOD aktivitesinin (U) ve birim hacim başına SOD aktivitesinin (U/ml) zamanla değişimi sırasıyla Şekil 5.11 ve 5.12'de verilmiştir. Toplam aktivite değerleri  $30^{\circ}\text{C}$  (2.7 U) >  $35^{\circ}\text{C}$  =  $25^{\circ}\text{C}$  >  $15^{\circ}\text{C}$  >  $10^{\circ}\text{C}$  (2.14 U) şeklinde değişmektedir. Birim hacim başına aktivite değerleri de aynı sıralamayı takip etmiş ve en yüksek değer olan 49.92 U/ml değerine  $30^{\circ}\text{C}$ 'de ulaşılmıştır. KAT aktivite değerlerinden farklı olarak SOD için U ve U/ml değerlerinin 72. saate kadar arttığı, daha sonra büyük bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

*R. glutinis*'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin (U/mg) farklı sıcaklıklarda zamanla değişimi Şekil 5.13'te verilmiştir. En yüksek spesifik SOD aktivitesi değerinin  $10^{\circ}\text{C}$ 'da elde edildiği görülmektedir. Toplam SOD aktivite değerlerinin zamanla değişimi incelendiğinde  $10^{\circ}\text{C}$  deneyinin 24. saatteki spesifik aktivite değerinin 185.44 U/mg gibi yüksek olmasının nedeni protein derişimi düşük (0.05 mg/ml) olmasıdır.



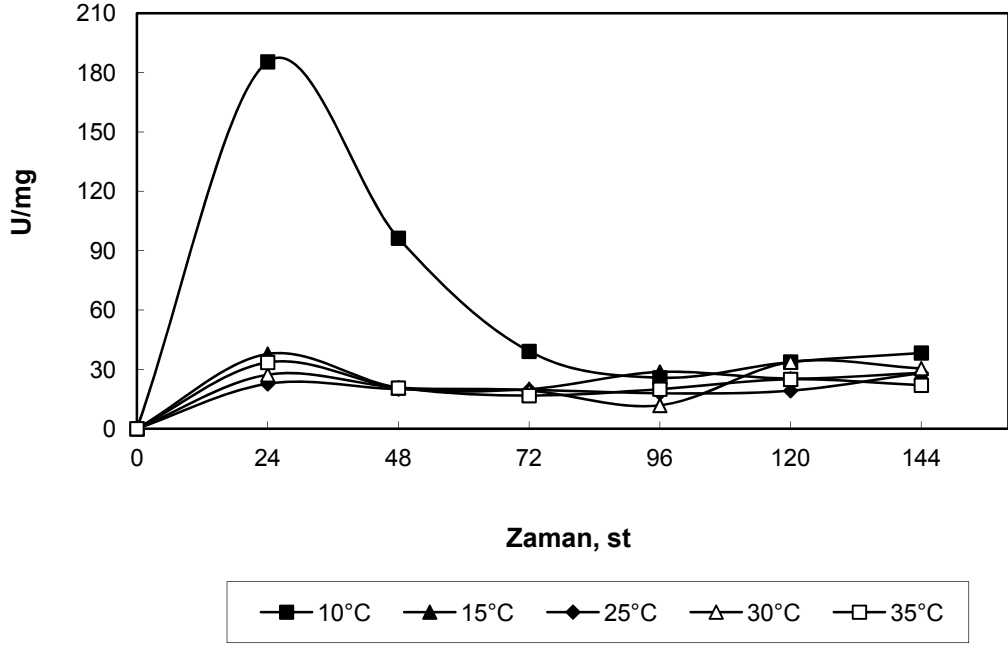
Şekil 5.11 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)



Şekil 5.12 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)

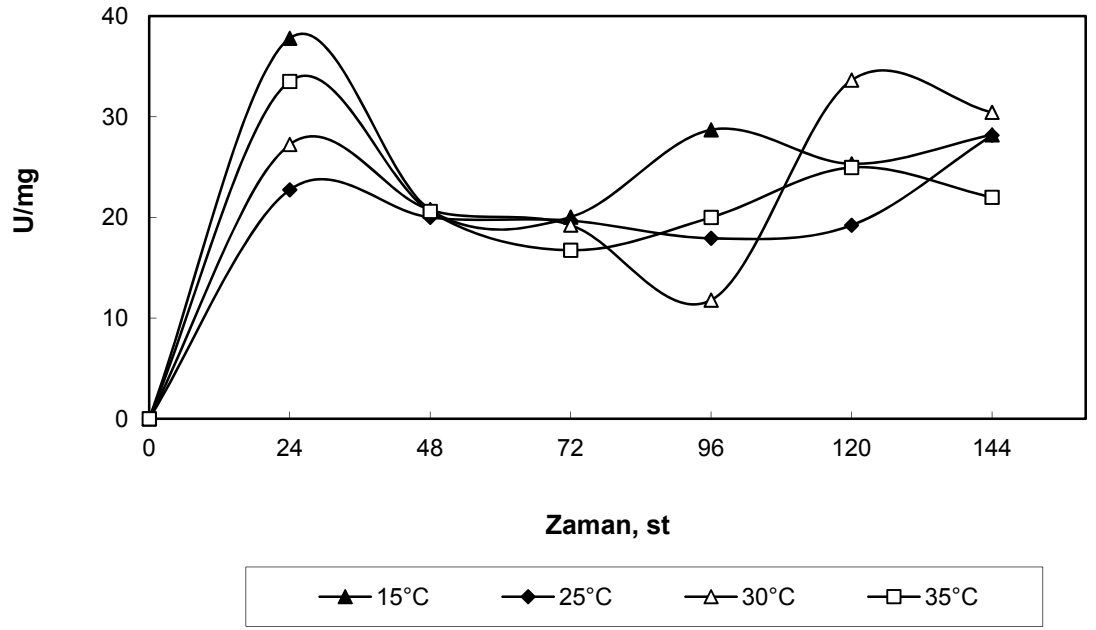
Bu değerdeki proteinin ortamdan saflaştırılması çok zor olduğundan, diğer sıcaklıklardaki aktivite değerlerinin daha net incelenebilmesi için Şekil 5.14'te 10°C

dışındaki sıcaklıklarda elde edilen spesifik SOD aktivitelerinin değişimi verilmiştir. Bu durumda en yüksek aktiviteden en düşük aktiviteye doğru sıralama yapıldığında 15°C (38 U/mg) > 35°C > 30°C > 25°C (28.16 U/mg) olduğu görülmektedir. 24. saatte her bir sıcaklıkta en yüksek aktivite değerlerine ulaşıldığı, daha sonraki saatlerde ise ikinci bir maksimum verme eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

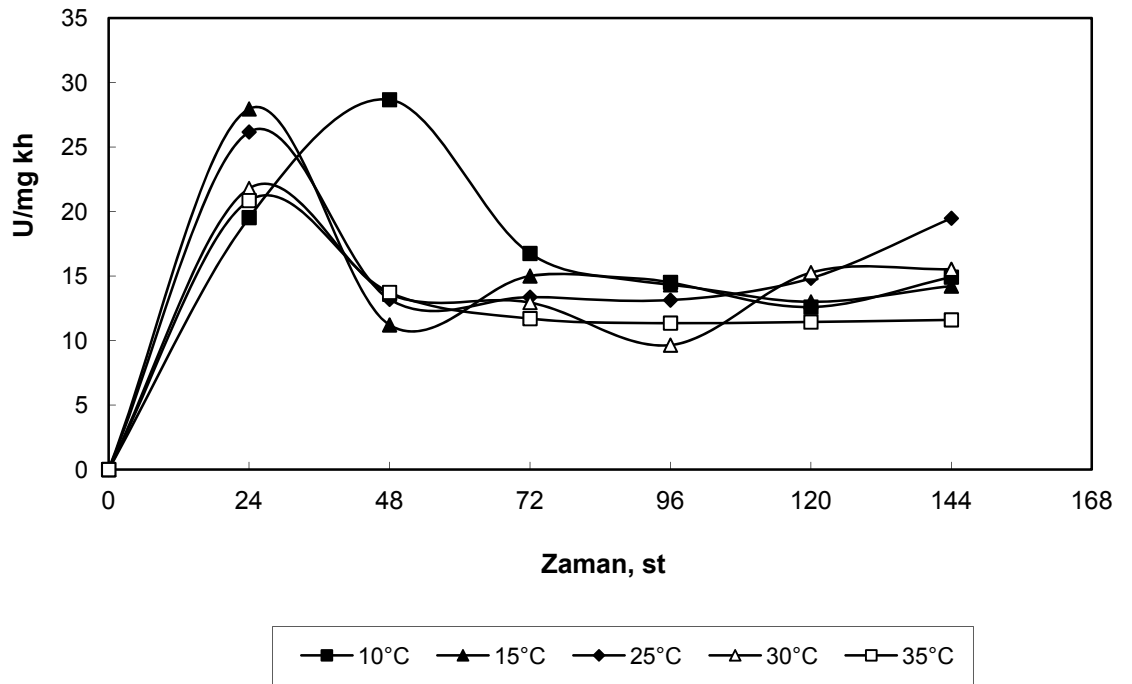


Şekil 5.13 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)

SOD aktiviteleri kuru hücre başına (U/mg kh) değerlendirildiğinde ise (Şekil 5.15) sıralamanın 10°C (29 U/mg kh) > 15°C > 25°C > 30°C > 35°C (20.86 U/mg kh) şeklinde olduğu belirlenmiştir. Durgunluk fazının başlangıcı olan 72. saatten itibaren aktivite değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.14 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (10°C hariç) (UYM, N=150 rpm)



Şekil 5.15 Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in kuru hücre başına hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, N=150 rpm)

Farklı sıcaklıklarda *R. glutinis*'in SOD aktiviteleri açısından en uygun sıcaklığın ve sürenin bulunması amacıyla hesaplanan spesifik verimlilik değerleri Çizelge 5.2'de yer almaktadır. Her bir sıcaklık için en yüksek değerlere 24. saatte ulaşılmıştır. Maksimum spesifik verimlilik değeri 15 °C'de 1.16 U/mg kh/st olarak elde edilmiştir.

Çizelge 5.2 Farklı sıcaklıklarda maksimum hücre içi SOD spesifik verimliliği

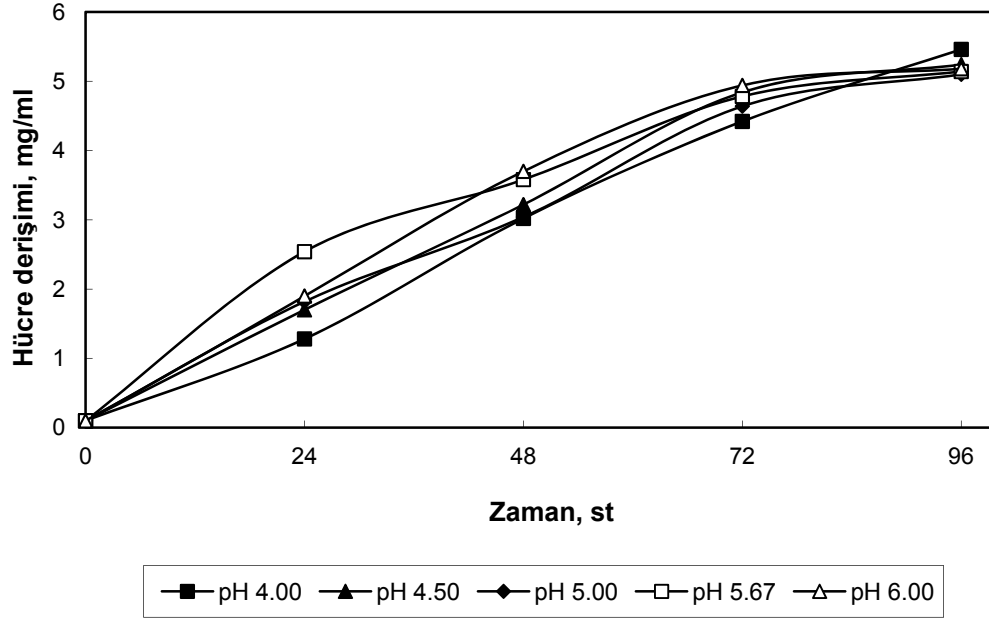
| Sıcaklık , °C | Hücre içi SOD spesifik verimliliği (t = 24 st)<br>(U/mg kh/st) |
|---------------|----------------------------------------------------------------|
| 10            | 0.83                                                           |
| 15            | 1.16                                                           |
| 25            | 1.09                                                           |
| 30            | 0.91                                                           |
| 35            | 0.87                                                           |

## 5.2 Başlangıç pH Değerinin Etkileri

### 5.2.1 *R. glutinis*'in çoğalması üzerine başlangıç pH değerinin etkisi

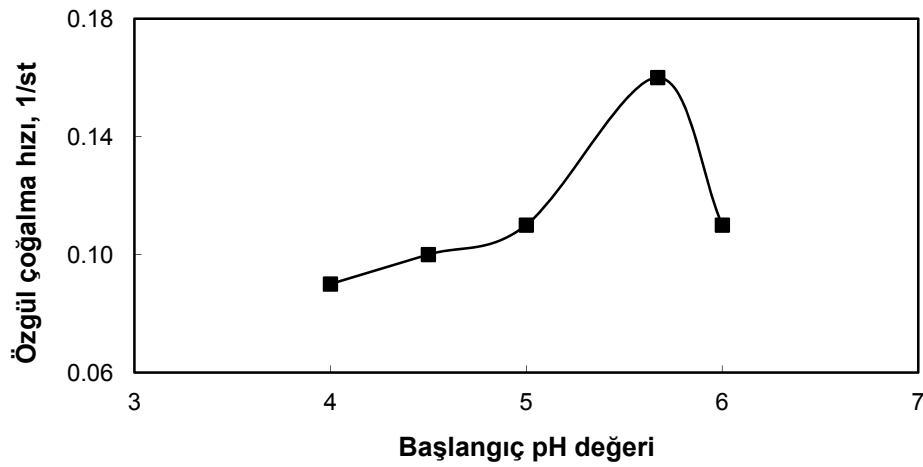
*R. glutinis*'in 100 ml'lik UYM ortamında çoğalması üzerine başlangıç pH değerinin etkilerinin incelenmesi amacıyla pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.67 ve 6.0 değerlerindeki ortamlarda üretimler gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH değerlerinden biri olarak kullanılan pH = 5.67 değeri hazırlanan UYM ortamının doğal pH değeridir. Diğer pH değerleri seyreltik NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak ayarlanmıştır. Üretimler 30°C sıcaklıkta ve 150 rpm karıştırma hızında 96 saat boyunca yapılmıştır.

Şekil 5.16'da farklı başlangıç pH değerlerinde elde edilen kuru hücre derişiminin zamanla değişimi verilmiştir.



Şekil 5.16 Farklı başlangıç pH değerlerinde elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değişimi ( $T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $N=150\text{ rpm}$ )

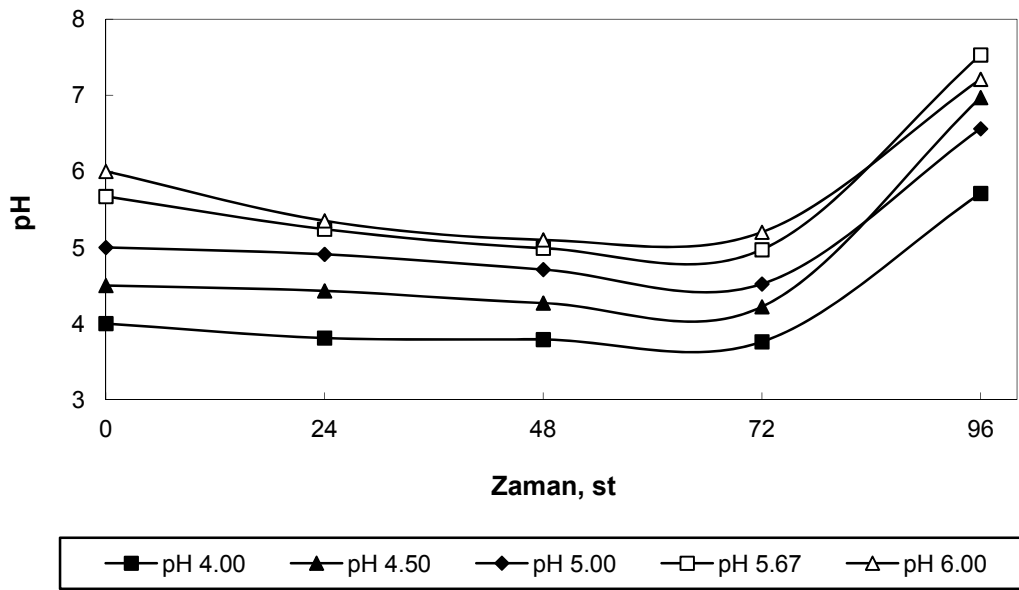
Tüm başlangıç pH değerlerinde ulaşılan hücre değerleri birbirine çok yakın bulunmuştur. Ulaşılan en yüksek hücre derişimi  $5.46\text{ mg/ml}$  olarak  $\text{pH} = 4.0$  başlangıç pH değeri ile, en düşük hücre derişimi  $5.10\text{ mg/ml}$  olarak  $\text{pH} = 5.0$  başlangıç pH değeri ile elde edilmiştir. Farklı başlangıç pH değerlerinde özgül çoğalma hızları hesaplandığı zaman ise, en yüksek değerin  $0.16\text{ st}^{-1}$  olarak, UYM ortamının doğal pH değerinde (5.67) ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 5.17).



Şekil 5.17 Özgül çoğalma hızlarının farklı başlangıç pH değerleri ile değişimi (UYM,  $T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $N=150\text{ rpm}$ )

### 5.2.2 *R. glutinis*'in hücre dışı pH değişimi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi

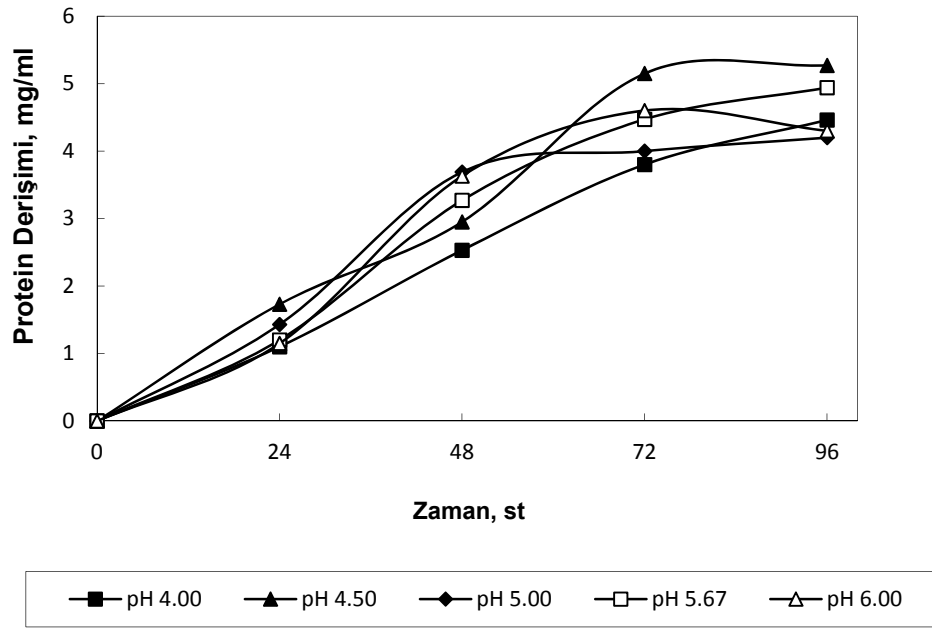
Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in çoğalmasında hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi Şekil 5.18'de verilmiştir. Başlangıç pH değeri yükseldikçe 72. saate kadar hücre dışı pH değerlerinin daha fazla azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Durgunluk fazının başlangıç noktası olan 72. saatin ardından hücre dışı pH değerlerinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 5.18 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

### 5.2.3 *R. glutinis*'in hücre içi protein derişimi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi

Şekil 5.19'da farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi verilmiştir. Buna göre en yüksek protein derişimine pH = 4.5 başlangıç değerinde 5.27 mg/ml olarak, en düşük protein derişimine ise pH = 6.0 başlangıç değerinde 3.48 mg/ml olarak ulaşılmıştır.

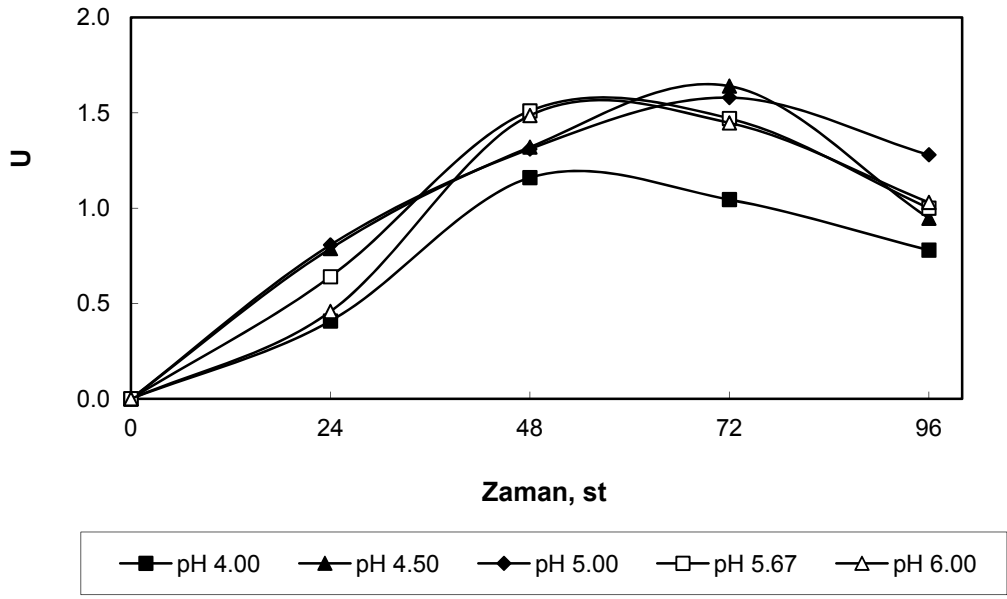


Şekil 5.19 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi protein derişimlerinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, 150 rpm)

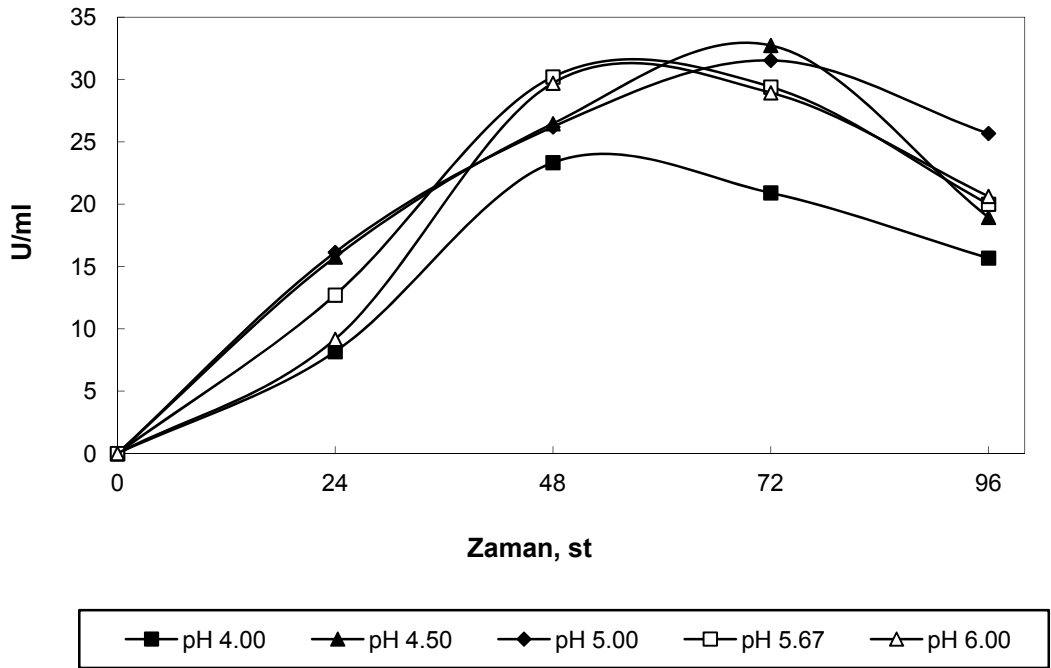
#### 5.2.4 *R. glutinis*'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi

Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi katalaz aktivitesinin (U) zamanla değişimi Şekil 5.20'de gösterilmiştir. Tüm üretim ortamları arasında elde edilen en yüksek KAT aktivite değeri pH = 4.5 başlangıç değerinde 1.64 U olarak bulunmuştur. Diğer en yüksek aktivite değeri olan 1.58 U değerine ise pH = 5.0 başlangıç değerinde ulaşılmıştır. 96. saatte tüm üretim ortamlarında KAT aktivite değerinin azaldığı gözlenmektedir. pH = 4.0 üretim ortamında aktivite değerleri tüm saatler boyunca en düşük seviyede ilerlemiştir.

Şekil 5.21'de ise birim hacim başına KAT aktivitesi değerlerinin (U/ml) zamanla değişimi görölmektedir. En yüksek KAT aktivitesi 32.74 U/ml olarak pH = 4.5 üretim ortamında 72. saatte, ikinci en yüksek aktivite değeri ise 31.54 U/ml olarak pH = 5.0 başlangıç değeri ortamında yine 72. saatte elde edilmiştir.



Şekil 5.20 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

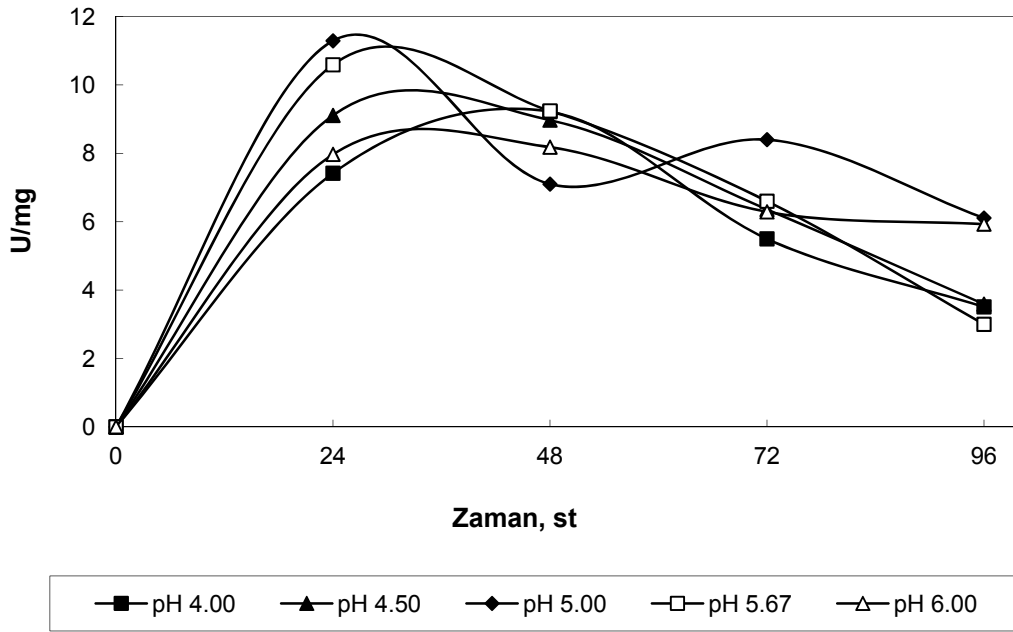


Şekil 5.21 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

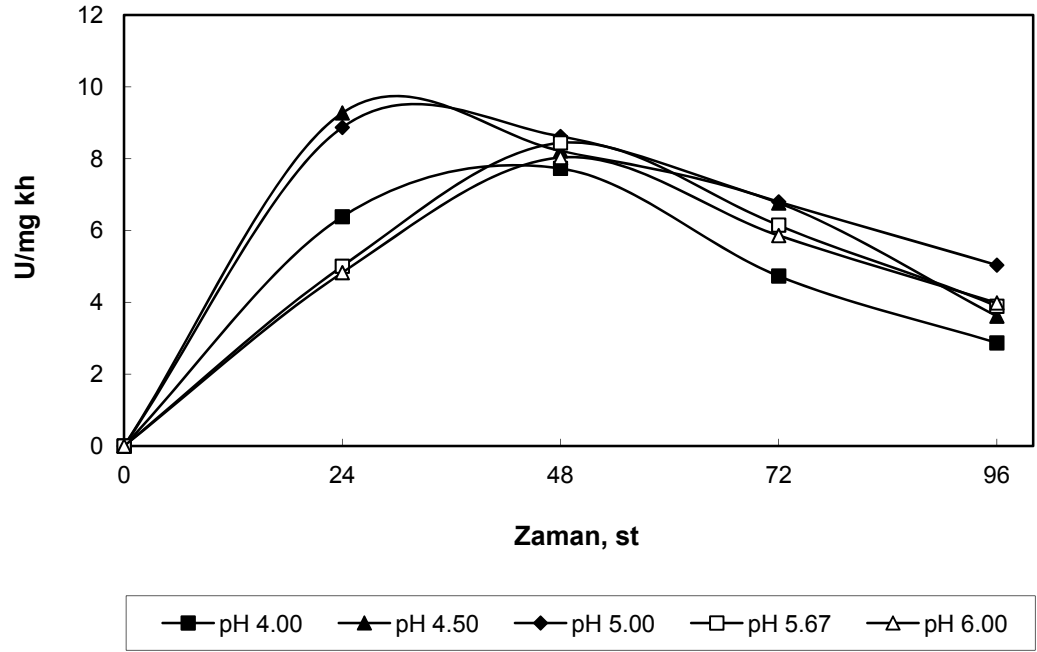
Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in spesifik KAT aktivitesinin (U/mg) zamanla değişimi Şekil 5.22'de verilmiştir. Buna göre en yüksek spesifik aktivite değeri 11.29 U/mg olarak pH = 5.0 başlangıç değeri ortamında, ikinci en yüksek değer ise 10.59 U/mg olarak pH = 5.67 başlangıç değeri ortamında 24. saatte elde edilmiştir.

Kuru hücre başına KAT aktiviteleri (U/mg kh) değerlendirildiğinde (Şekil 5.23), başlangıç pH değeri 4.5 olan üretim ortamında 9.27 U/mg kh olarak 25. saatte en yüksek aktivite elde edilirken, başlangıç pH değeri 5.0 olan üretim ortamında 8.87 U/mg kh olarak 24. saatte ikinci en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir.

KAT aktivitelerinin tümü (Şekil 5.20-5.23) birlikte ele alındığında, 96. saatte aktivitelerin düştüğü görülmektedir. Bunun yanı sıra, aktiviteler en yüksekten düşüğe doğru incelendiğinde, ardışık iki değer arasında en fazla %5 civarında fark olduğu ve pH 4.5 ile pH 5.0 değerlerinin en yüksek aktivite değerlerini sağladığı belirlenmiştir.



Şekil 5.22 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in spesifik KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 5.23 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in kuru hücre başına KAT aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

*R. glutinis*'ten yüksek KAT aktivitesi için hangi başlangıç pH değeri ve süresinin daha uygun olduğunun belirlenebilmesi için aktiviteler spesifik verimlilik açısından da değerlendirilmiştir (Çizelge 5.3). Her bir başlangıç pH değeri için en yüksek değerlere 24. saatte ulaşılmıştır. Buna göre 0.39 U/mg kh/st değeri ile pH = 4.50 başlangıç ortamında en yüksek verimliliğin elde edildiği, bu değeri 0.37 U/mg kh/st ile pH = 5.00 başlangıç ortamının takip ettiği belirlenmiştir.

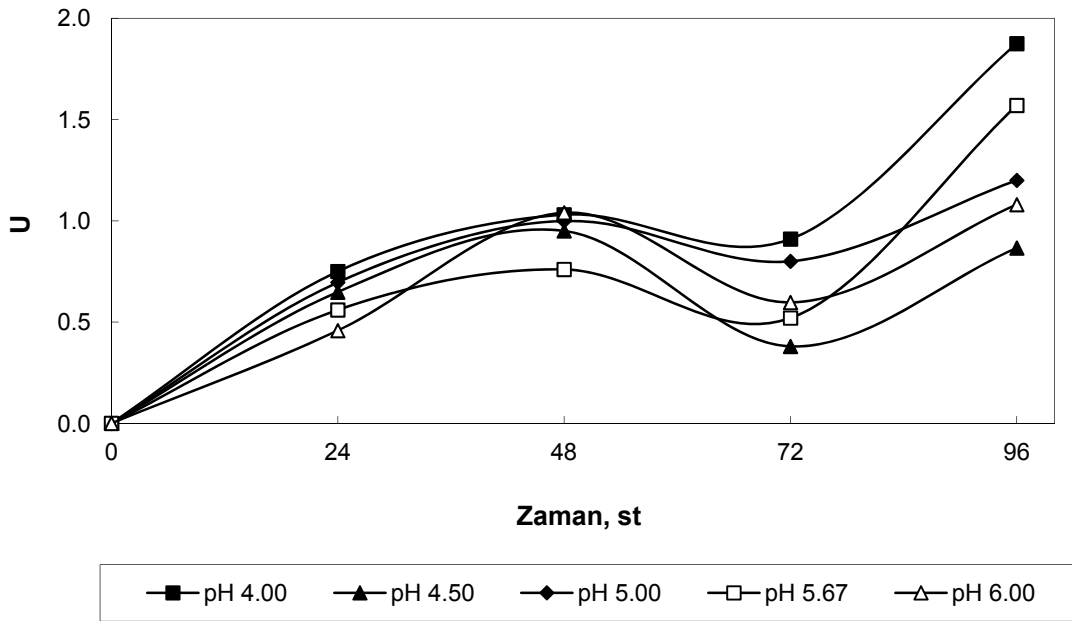
Çizelge 5.3 Farklı başlangıç pH değerlerinde hücre içi katalaz spesifik verimliliği (UYM, T=30°C, N=150 rpm, t=24 st)

| pH   | Hücre içi KAT spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) (t=24 st) |
|------|--------------------------------------------------------------|
| 4.00 | 0.27                                                         |
| 4.50 | 0.39                                                         |
| 5.00 | 0.37                                                         |
| 5.67 | 0.21                                                         |
| 6.00 | 0.20                                                         |

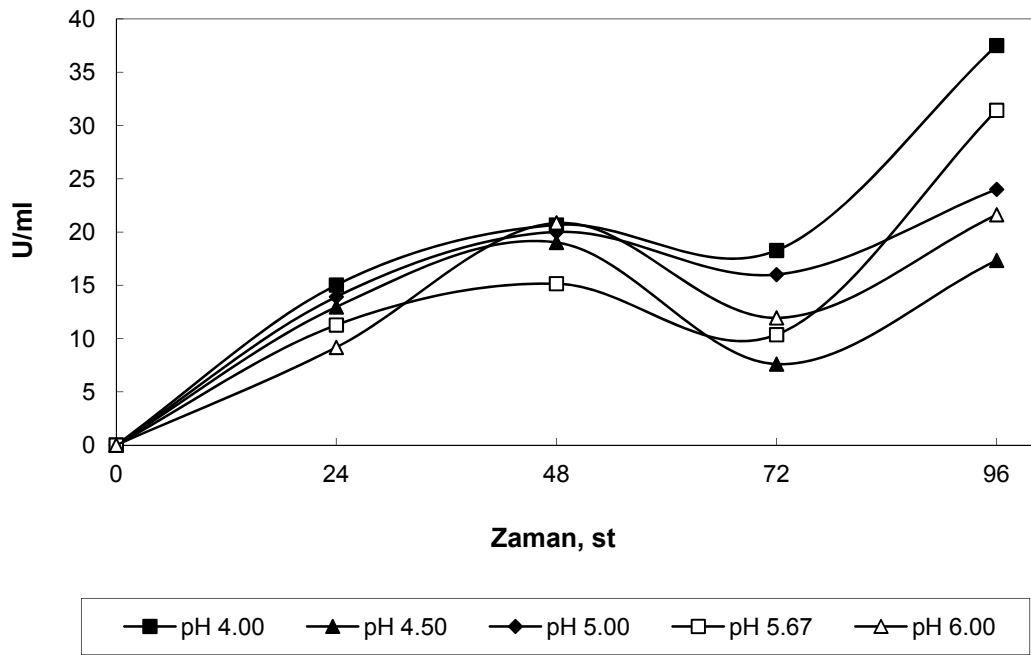
### 5.2.5 *R. glutinis*'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine başlangıç pH değerinin etkisi

Farklı başlangıç pH değerlerinde çoğalan *R. glutinis*'in hücre içi SOD aktivitesinin (U) zamanla değişimi Şekil 5.24'te, birim hacim başına hücre içi SOD aktivitesinin (U/ml) zamanla değişimi ise Şekil 5.25'te verilmiştir.

Aktivite değerlerinin 48. saatte bir maksimum verip, 96. saatte ikinci maksimum verme eğiliminde oldukları görülmektedir. 96. saatte en yüksek toplam SOD aktivitesi değeri 1.88 U olarak pH = 4.0 başlangıç ortamında, onu takip eden değer ise 1.57 U olarak pH = 5.67 başlangıç pH değeri ortamında elde edilmiştir. Yine 96. saat değerleri ele alındığında birim hacim başına aktivite değerlerinde de sıralama değişmemiştir. En yüksek SOD aktivitesi pH = 4.0 başlangıç ortamında 37.5 U/ml, onu takip eden aktivite pH = 5.67 başlangıç ortamında 31.42 U/ml olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.24 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi toplam SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

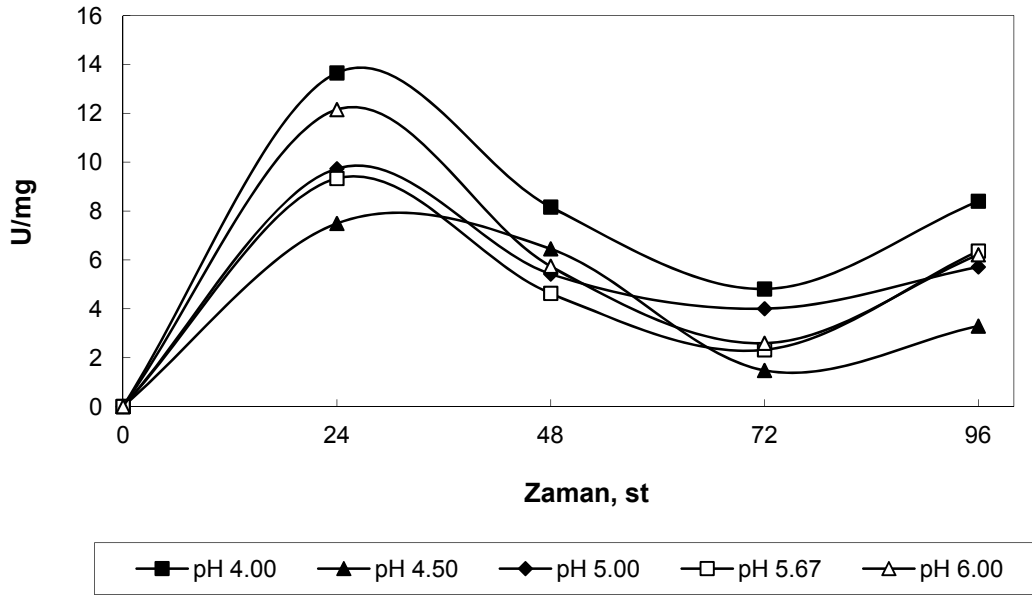


Şekil 5.25 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

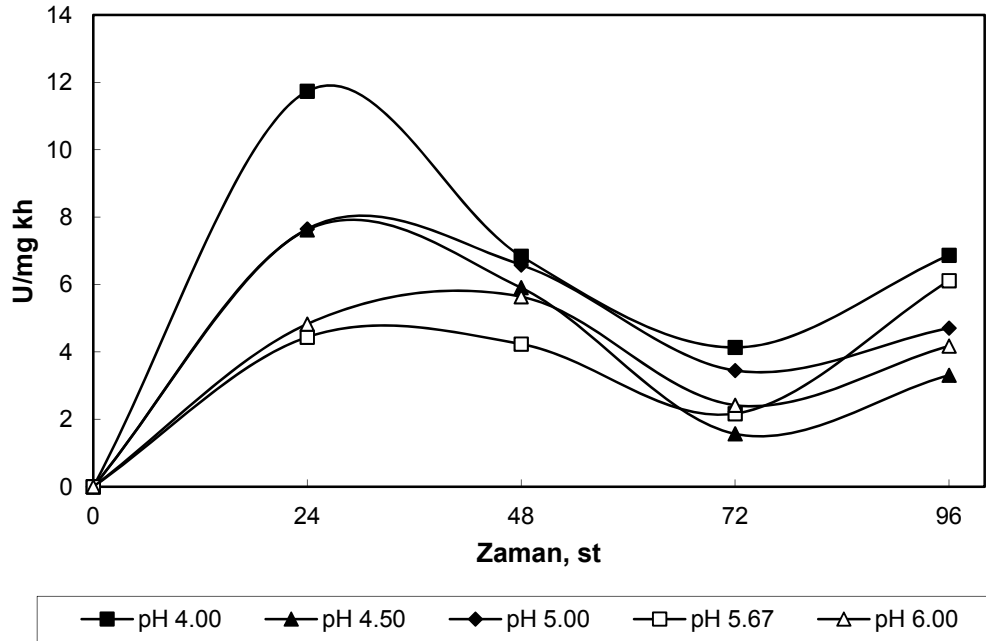
Ekonomik açıdan sürenin kısa tutulması avantajlı olduğundan, ilk maksimum veren 48. saatteki aktivite değerleri de incelenmiştir. Buna göre, ilk üç sırada birbirine çok yakın değerler gösteren pH = 6.0, 4.0 ve 5.0 başlangıç ortamlarında sırasıyla 1.04 U, 1.03 U ve 0.95 U SOD toplam aktiviteleri elde edilmiştir. Benzer şekilde birim hacim başına aktivitelerde ilk üç sırada pH = 6.0, 4.0 ve 5.0 başlangıç ortamlarında sırasıyla 20.86 U/ml, 20.66 U/ml ve 20 U/ml elde edilmiştir.

Şekil 5.26'da farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in hücre içi spesifik SOD aktivitesinin (U/mg kh) zamanla değişimi yer almaktadır. Buna göre, maksimum değerlere 24. saatte ulaşılmıştır. En yüksek spesifik SOD aktivitesi 13.6 U/mg olarak pH = 4.0 başlangıç ortamında, ikinci en yüksek spesifik SOD aktivitesi ise 12.15 U/mg olarak pH = 6.0 başlangıç ortamında elde edilmiştir.

Kuru hücre başına SOD aktivitelerinde (U/mg kh) yine en yüksek aktivite değerine pH = 4.0 başlangıç ortamında 11.73 U/mg kh olarak ulaşılmıştır (Şekil 5.27). pH = 5.67 başlangıç ortamının tüm saatler boyunca en düşük seviyede seyrettiği gözlenmiştir.



Şekil 5.26 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 5.27 Farklı başlangıç pH değerlerinde *R. glutinis*'in kuru hücre başına hücre içi spesifik SOD aktivitesinin zamanla değişimi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

Farklı başlangıç pH değerlerindeki üretim ortamlarında *R. glutinis*'in SOD aktiviteleri açısından en pH değeri ve sürenin bulunması amacıyla hesaplanan spesifik verimlilik değerleri Çizelge 5.4'te verilmiştir. Buna göre en yüksek spesifik verimlilik değeri pH =

4.00 başlangıç değerinde 0.49 U/mg kh/st olarak elde edilmiştir. Tüm başlangıç pH değerleri için en yüksek değerler 24. saatte elde edilmiştir.

Çizelge 5.4 Farklı başlangıç pH değerlerinde maksimum hücre içi SOD spesifik verimliliği

| pH   | Hücre içi SOD spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) |
|------|----------------------------------------------------|
| 4.00 | 0.49                                               |
| 4.50 | 0.32                                               |
| 5.00 | 0.32                                               |
| 5.67 | 0.19                                               |
| 6.00 | 0.20                                               |

### 5.3 Karbon Kaynaklarının Etkisi

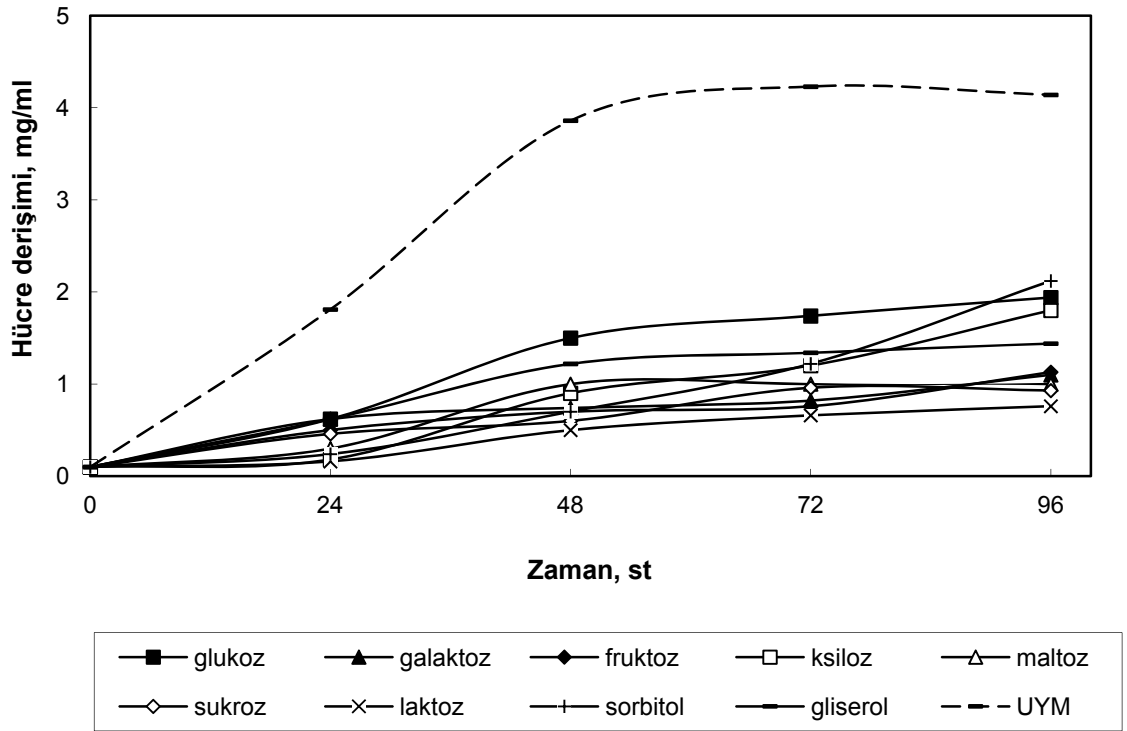
#### 5.3.1 *R. glutinis*'in çoğalması üzerine karbon kaynaklarının etkisi

*R. glutinis*'in çoğalması üzerine karbon kaynaklarının etkisinin incelenmesi amacıyla ortama glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, sukroz, laktoz, ksiloz, sorbitol veya gliserol eklenmiştir. Kontrol ortamı olarak UYM kullanılmıştır.

Şekil 5.28'de farklı karbon kaynaklarının hücre derişimi üzerine etkisi, Şekil 5.29'da ise hücre içi protein derişimine etkisi grafiğe geçirilmiştir. Hücre derişimlerinde en yüksek değeri (4.23 mg/ml) sağlayan UYM ortamının hücre içi protein derişimlerinde de en yüksek değeri (5.73 mg/ml) sağladığı görülmektedir. Hücre derişimi ve hücre içi protein derişim değerlerinin zamanla değışimleri birbirlerine benzerdir. Şekil 5.28 ayrıntılı olarak incelendiğinde, UYM dışındaki ortamlar için ilk 24 saatte glukoz, galaktoz ve gliserol içeren ortamlar en yüksek hücre derişimini vermiş, 96. saatte ise en yüksek hücre derişimleri sırasıyla sorbitol (2.12 mg/ml), glukoz (1.94 mg/ml), ksiloz (1.80 mg/ml), gliserol (1.44 mg/ml), sukroz (1.26 mg/ml), galaktoz (1.10 mg/ml), fruktoz (1.06 mg/ml), laktoz (0.76 mg/ml), maltoz (0.48 mg/ml) ortamlarında elde edilmiştir. Sorbitol ve ksiloz içeren üretim ortamlarının diğerlerinden farklı olarak 96.

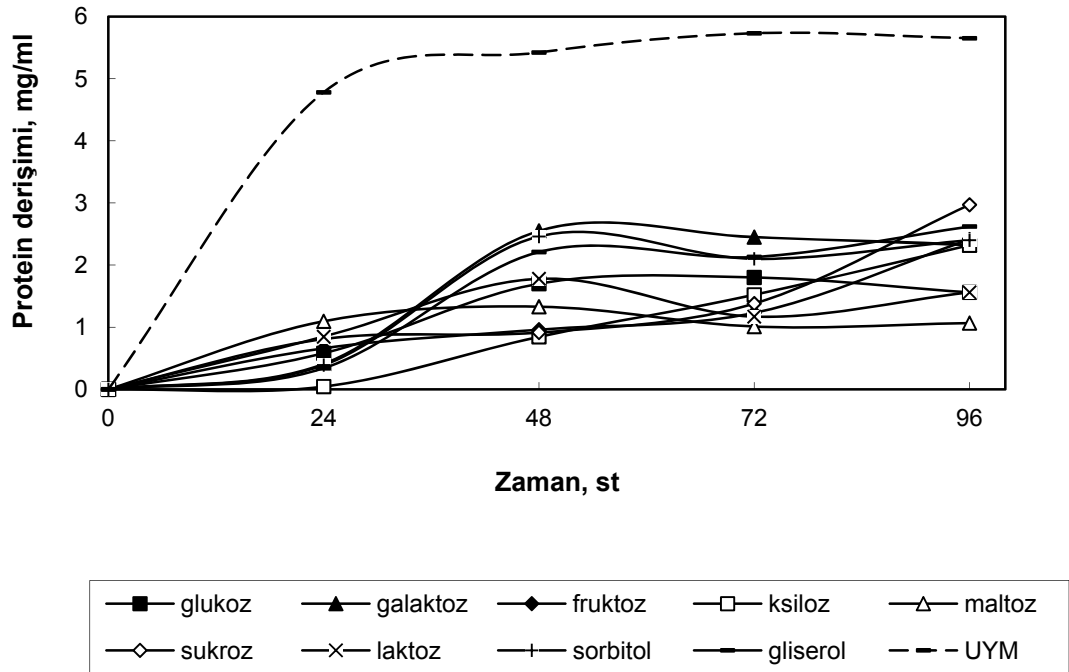
saat sonunda durgunluk fazına geçmemiş oldukları, çoğalmaya devam ettikleri görülmektedir.

UYM üretim ortamında, diğer karbon kaynaklarından farklı olarak bulunan ve şeker içeriği açısından zengin olan malt özütünün, yüksek hücre çoğalmasının nedeni olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.28 Farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamlarında elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

Kullanılan karbon kaynağı türlerine göre hücre derişimleri değerlendirildiğinde; monosakkaritler arasında glukoz (1.94 mg/ml) > ksiloz > galaktoz = fruktoz olduğu görülmektedir. Disakkaritler sıralandığında ise sukroz (1.26 mg/ml) > laktoz > maltoz iken; şeker alkollerinde gliserol (1.44 mg/ml) > sorbitol şeklinde bir sıralama olduğu belirlenmiştir.



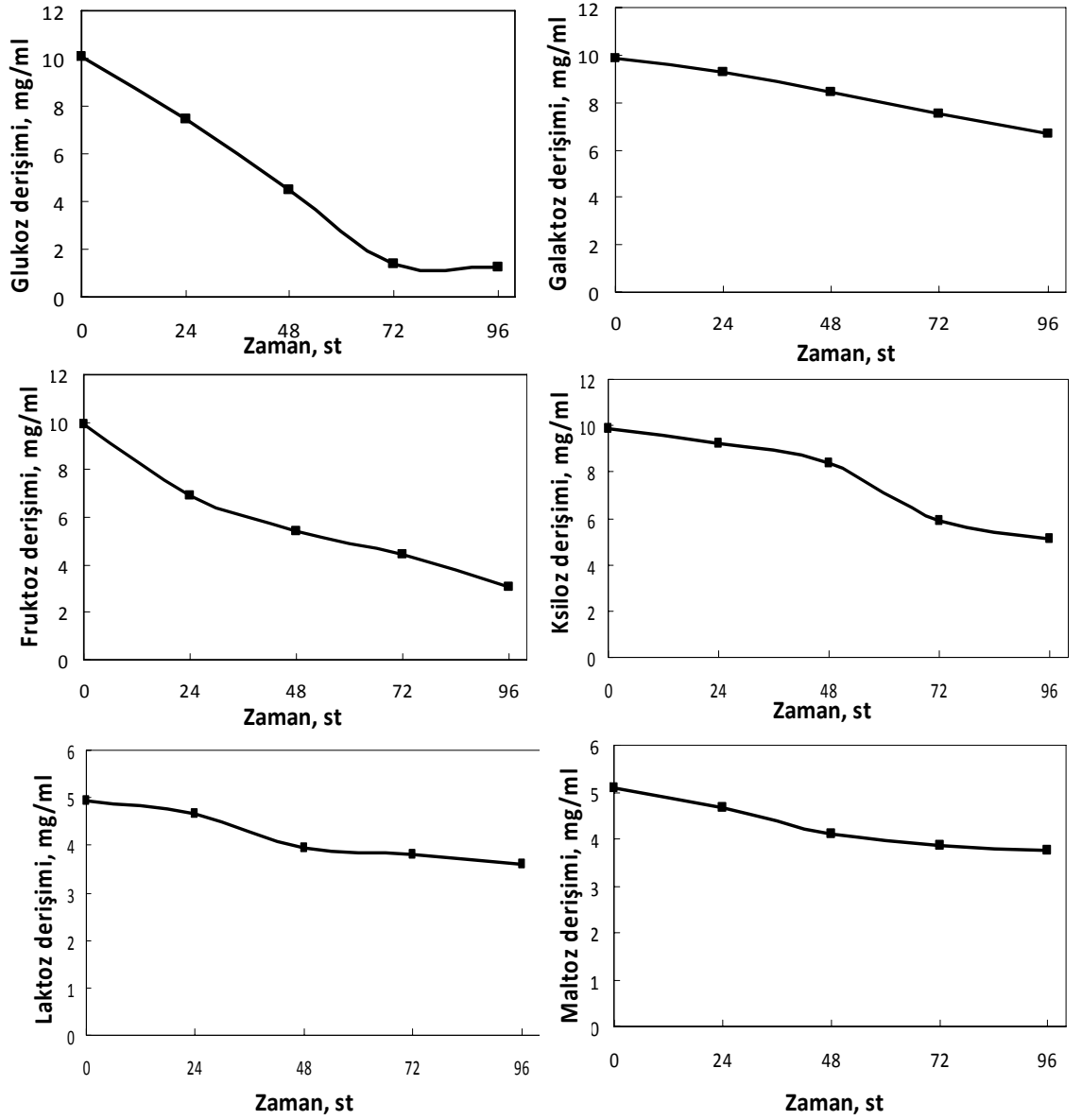
Şekil 5.29 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlarda hücre içi protein derişimlerinin zamanla değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

Çizelge 5.5'te farklı karbon kaynağı içeren ortamlar için hesaplanan özgül çoğalma hızları yer almaktadır. Buna göre en yüksek özgül çoğalma hızları sağlayan ortamlar UYM > galaktoz > gliserol = glukoz şeklindedir. En düşük özgül çoğalma hızına ise sorbitol, ksiloz ve laktoz ile ulaşılmıştır. Hücre derişimleri ile özgül çoğalma hız verilerinin birbiri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Kullanılan farklı karbon kaynaklarının hücre tarafından ne ölçüde tüketildiğinin belirlenebilmesi için, zamanla alınan örneklerde indirgen şeker tayini yapılmıştır. DNS yöntemi yardımıyla belirlenen farklı karbon kaynaklarının zamanla derişim grafikleri Şekil 5.30'da verilmiştir. Buna göre ilk 24 saatte glukoz ve fruktozun tüketilme hızlarının diğer karbon kaynaklarına göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

Çizelge 5.5 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlardaki özgül çoğalma hızları  
(T=30°C, N=150 rpm)

| Karbon kaynağı | Özgül çoğalma hızı, $\mu$ (st <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-----------------------------------------------|
| UYM            | 0.14                                          |
| Galaktoz       | 0.11                                          |
| Gliserol       | 0.09                                          |
| Glukoz         | 0.09                                          |
| Maltoz         | 0.08                                          |
| Fruktoz        | 0.07                                          |
| Sukroz         | 0.07                                          |
| Ksiloz         | 0.05                                          |
| Laktoz         | 0.05                                          |
| Sorbitol       | 0.04                                          |



Şekil 5.30 Farklı ortamlarda *R. glutinis* çoğalmasında glukoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, laktoz ve maltoz derişimlerinin zamanla değışimleri (T=30°C, N=150 rpm)

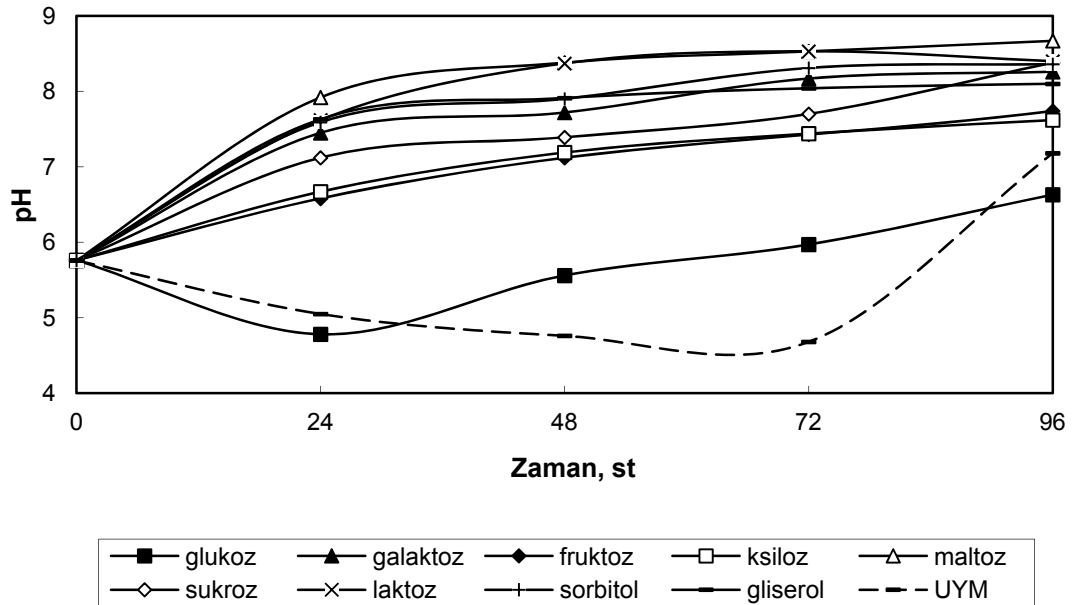
Çizelge 5.6'da kullanılan substratların 96. saat sonunda ne kadar tüketildiğı ve bu saatte ulaşılan hücre derişim değeri yer almaktadır. Buna göre en fazla glukoz (% 88), daha sonra fruktoz (% 70) tüketilmiş, en az laktoz ve maltoz tüketilmiştir. En yüksek hücre derişimleri açısından değerlendirildiğinde ise en fazla tüketilen glukozlu ortamda en yüksek hücre derişimine ulaşıldığı gözlenmiştir.

Çizelge 5.6 Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda 96. saat sonundaki substrat tüketimleri ve hücre derişimleri (T=30°C, N=150 rpm)

| Karbon kaynağı | Substrat tüketimi, % | Hücre derişimi, mg/ml |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| Glukoz         | 88                   | 1.94                  |
| Fruktoz        | 70                   | 1.06                  |
| Ksiloz         | 48                   | 1.80                  |
| Galaktoz       | 32                   | 1.10                  |
| Laktoz         | 27                   | 0.76                  |
| Maltoz         | 26                   | 0.48                  |

### 5.3.2 *R. glutinis*'in hücre dışı pH değışimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

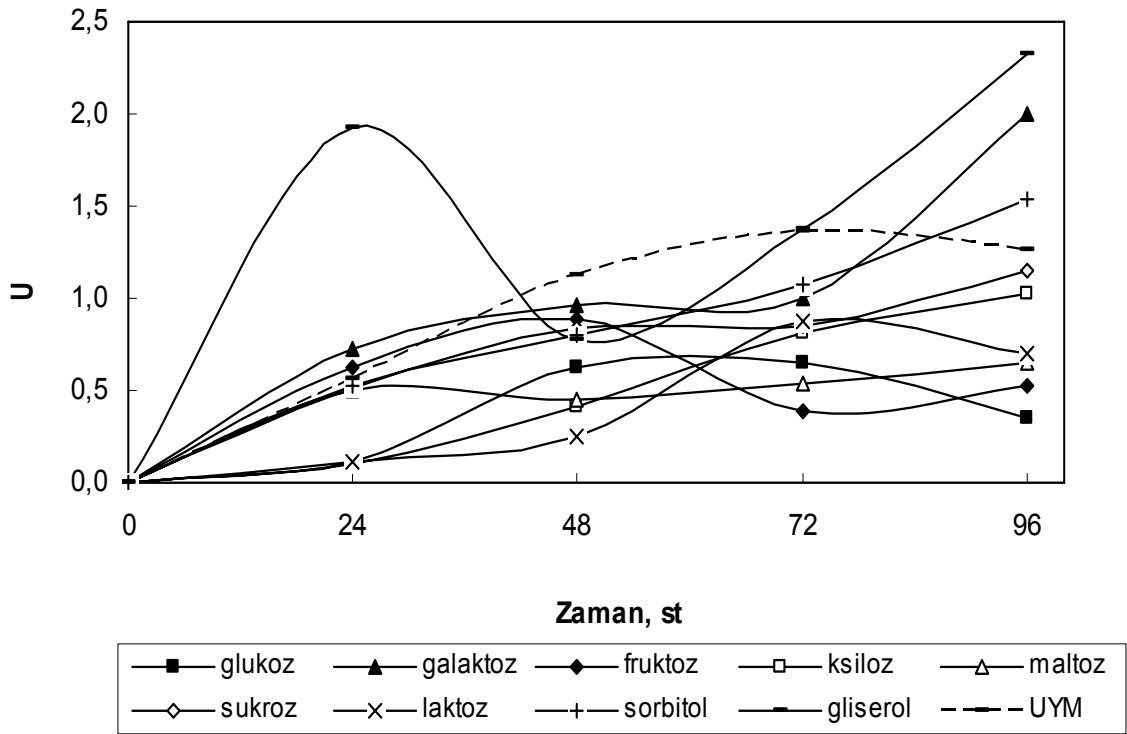
Şekil 5.31’de her bir üretim ortamının pH değerin zamanla değışimi yer almaktadır. Buna göre UYM ortamı ve glukoz içeren ortamlarda başlangıçta pH değeri azalmış, daha sonra artmıştır. UYM ortamında, sıcaklık etkilerinin incelendiği deney setlerinin tümünde gözleendiği gibi, üstel çoğalma fazının bittiği 72. saatte pH değeri artış olmuştur. Bunun dışındaki tüm ortamlarda ise başlangıçtan itibaren pH değeri artış olduğu gözlenmiştir.



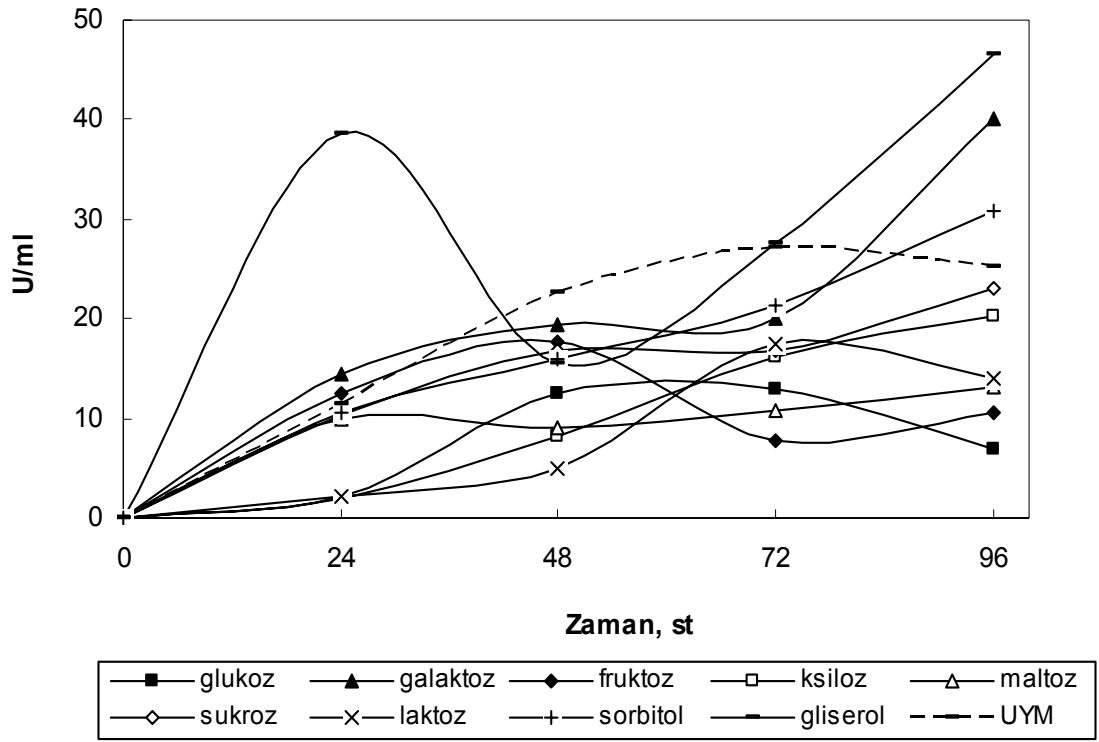
Şekil 5.31 Farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamlarının pH değeri zamanla değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

### 5.3.3 *R. glutinis*'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında elde edilen KAT aktivite değerlerinin (U) zamanla değişimleri Şekil 5.32'de görülmektedir. En yüksek KAT aktivitesi gliserolün kullanıldığı üretim ortamında, 24. saatte 1.93 U; 96. saatte ise 2.33 U olarak elde edilmiştir. Gliserolün ardından en yüksek aktivite değerleri galaktoz ve fruktoz içeren ortamlarda elde edilmiştir. Ksiloz, galaktoz, fruktoz, sukroz ve sorbitolün kullanıldığı ortamlarda KAT aktivite değeri zamanla artarken, UYM, laktoz ve maltoz içeren ortamlarda 72. saatte en yüksek değerine ulaşmış, gliserollü ortamda ise iki adet maksimum vermiştir. Buna göre kullanılan karbon kaynağına göre aktivitelerin zamanla değişim karakteristiklerinin farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.



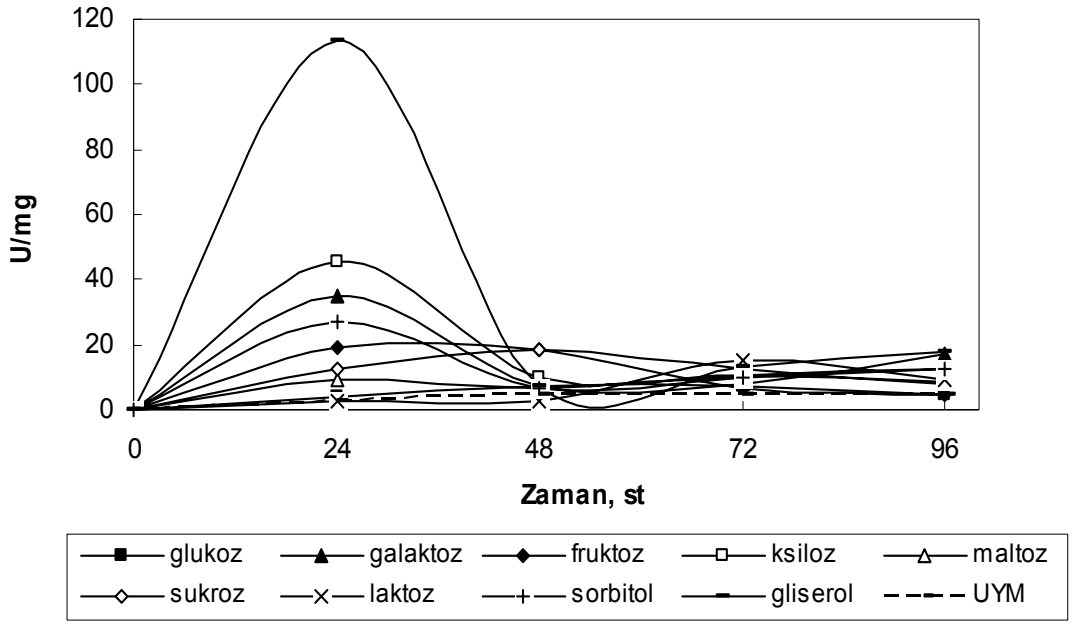
Şekil 5.32 Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi KAT (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



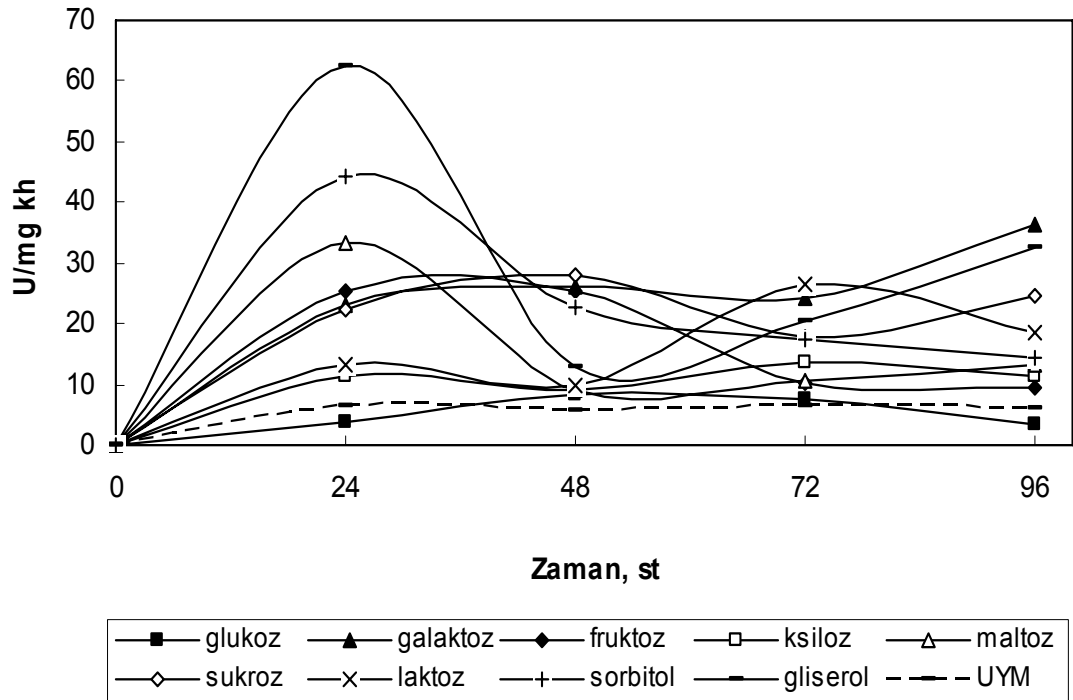
Şekil 5.33 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

KAT spesifik aktiviteleri (U/mg) incelendiğinde ise (Şekil 5.34), en yüksek değerlerin çoğunlukla 24. saatte elde edildiği görülmektedir. Ancak sukroz ve glukoz için 48. saatte, laktoz ve maltoz için ise 72. saatte en yüksek değerler elde edilmiştir. En yüksek aktivite değerleri sıralandığında, gliserol (113 U/mg) > ksiloz (46 U/mg) > galaktoz (35 U/mg) > sorbitol (27 U/mg) olduğu görülmektedir. En düşük değerler UYM, maltoz ve laktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda elde edilmiştir.

Farklı karbon kaynakları için kuru hücre başına elde edilen KAT aktivitelerinin (U/mg kh) zamanla değişimleri Şekil 5.35'te görülmektedir. İlk 24 saatteki değerler sıralandığında; gliserol (62 U/mg kh) > sorbitol (44 U/mg kh) > maltoz (33 U/mg kh) olduğu görülmektedir. En düşük değerler ise glukoz, UYM, ksiloz ve laktoz ortamlarında elde edilmiştir.



Şekil 5.34 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi spesifik KAT (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150rpm)



Şekil 5.35 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in kuru hücre başına spesifik KAT (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

KAT aktivite değerleri genel olarak incelendiğinde (Şekil 5.32-5.35), tüm aktiviteler için en yüksek değerlerin karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında elde edildiği görölmektedir. Sorbitol birim kuru hücre başına spesifik aktivite açısından gliserolün hemen ardından en yüksek değeri sağlamış; spesifik aktivite değerlerinde de disakkaritlere göre daha yüksek daha yüksek sonuçlar vermiştir. Monosakkaritlerden galaktoz ön plana çıkarken, glukoz en düşük aktivite sağlayan karbon kaynağı olmuştur. Disakkaritlerden laktozun da KAT aktivite değerleri açısından olumlu bir etki sağlamadığı gözlenmiştir.

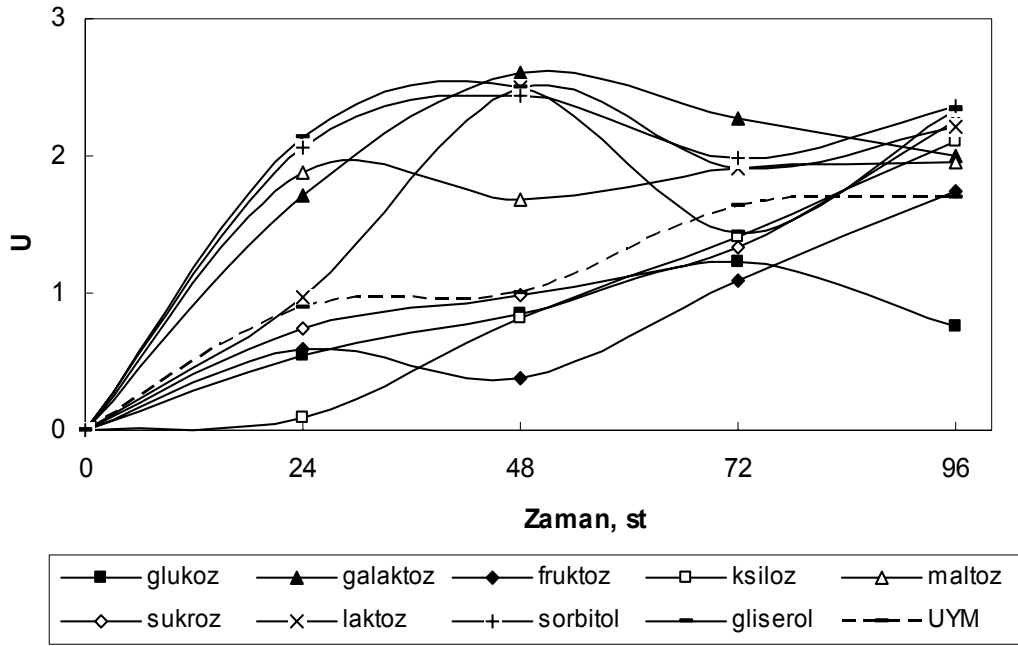
Kullanılan karbon kaynakları spesifik verimlilik açısından Çizelge 5.7’de değerlendirilmiştir. En yüksek verimlilik gliserol içeren ortamda 2.59 U/mg kh/st olarak elde edilirken, sorbitol 1.84 U/mg kh/st değeri ile ikinci sırada yer almıştır. Disakkaritlerden maltoz, monosakkaritlerden ise fruktoz ön plana çıkmıştır. En yüksek hücre derişimi sağlayan glukoz ise KAT spesifik verimliliği açısından en son sırada yer almıştır.

Çizelge 5.7 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum hücre içi KAT spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm)

| Karbon kaynağı | Hücre içi KAT spesifik verimliliği (U/mg kh/st) | Süre, st |
|----------------|-------------------------------------------------|----------|
| Gliserol       | 2.59                                            | 24       |
| Sorbitol       | 1.84                                            | 24       |
| Maltoz         | 1.38                                            | 24       |
| Fruktoz        | 1.05                                            | 24       |
| Sukroz         | 0.58                                            | 24       |
| Galaktoz       | 0.54                                            | 24       |
| Laktoz         | 0.37                                            | 24       |
| UYM            | 0.26                                            | 24       |
| Ksiloz         | 0.19                                            | 24       |
| Glukoz         | 0.17                                            | 48       |

#### 5.3.4 *R. glutinis*'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

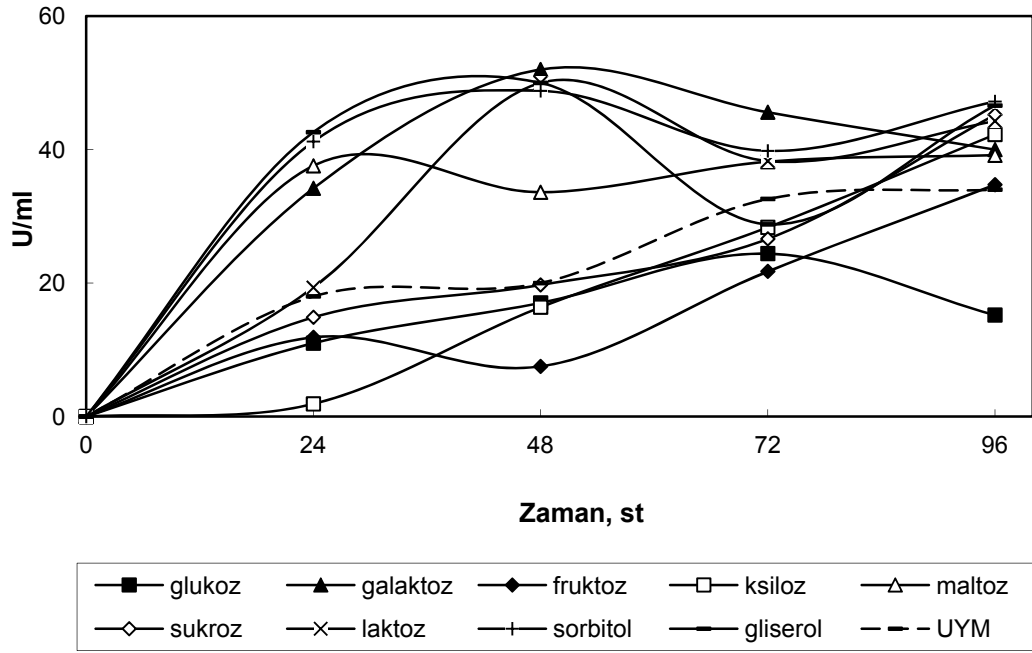
Farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamlarında *R. glutinis*'in hücre içi SOD aktivitesinin (U) zamanla değişimi Şekil 5.36'da, birim hacim başına hücre içi SOD aktivitelerinin (U/ml) zamanla değişimi ise Şekil 5.37'de verilmiştir.



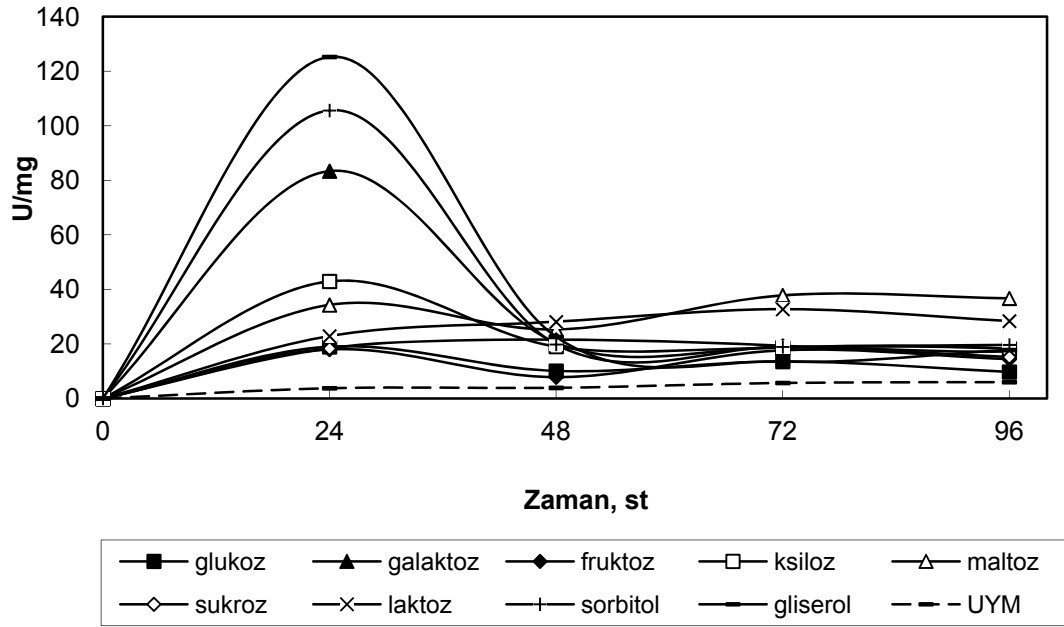
Şekil 5.36 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi SOD (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

En yüksek SOD aktiviteleri 48. saatte galaktoz (2.6 U) = gliserol = sorbitol = laktoz olarak elde edilmiştir. Birim hacim başına aktivite değerleri incelendiğinde ise, toplam aktivite değerleri ile paralellik göstermekte; en iyi değerler; galaktoz (52 U/ml) > gliserol (50 U/ml) > sorbitol (49 U/ml) olarak sıralanmaktadır (Şekil 5.37).

Spesifik SOD aktivitelerinin (U/mg) 24. saatte en yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir (Şekil 5.38). En yüksek aktiviteleri sağlayan üretim ortamları sıralandığında; gliserol (125 U/mg) > sorbitol (105 U/mg) > galaktoz (83 U/mg) olduğu görülmektedir. En düşük spesifik aktiviteler ise UYM, fruktoz, sukroz ve glukoz ortamlarında elde edilmiştir.



Şekil 5.37 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi SOD (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



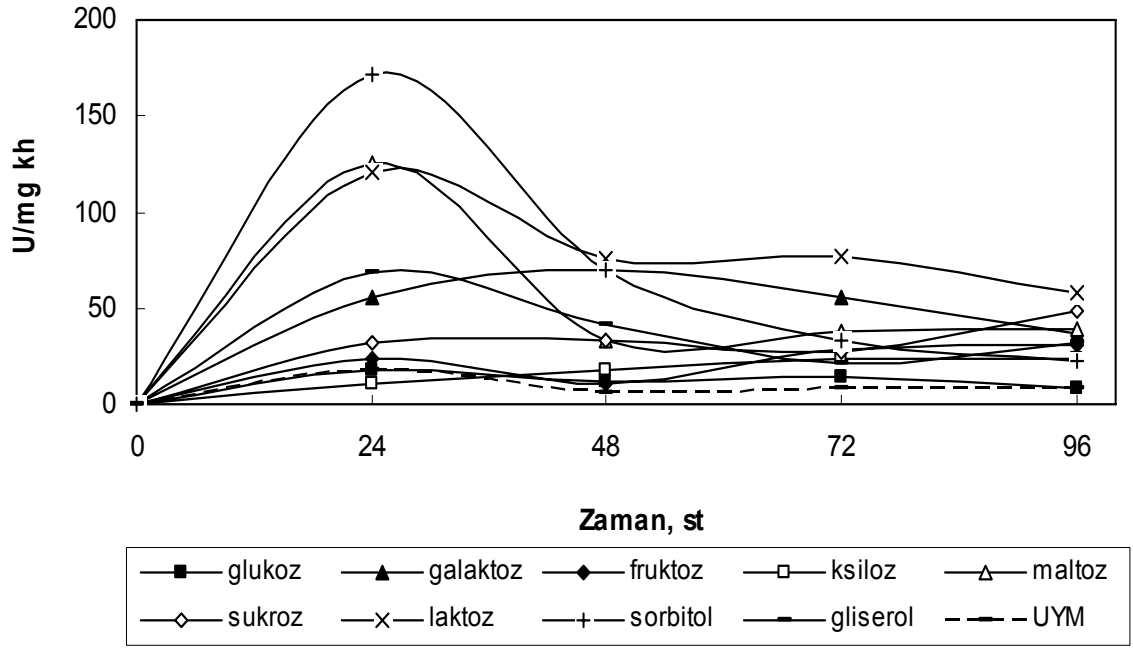
Şekil 5.38 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi spesifik SOD (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Kuru hücre başına SOD aktiviteleri (U/mg kh) (Şekil 5.39), spesifik SOD aktivitelerine benzer şekilde en yüksek değerlerine 24. saatte ulaşmışlardır. Buna göre sorbitol (173 U/mg kh) > maltoz (125 U/mg kh) > laktoz (120 U/mg kh) en yüksek spesifik aktivitelerin elde edildiği ortamlardır. Ksiloz, UYM ve fruktoz içeren ortamlarda ise en düşük değerler elde edilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının SOD aktiviteleri üzerindeki etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, gliserol ve sorbitolün tüm aktivite türleri arasında en iyi sonuçları veren karbon kaynakları olduğu belirlenmiştir. Galaktoz, toplam aktivite cinsinden en iyi değeri sağlamış, ancak spesifik ve kuru hücre başına olan aktivitelerde daha alt sıralarda yer almıştır. Fruktoz, UYM, glukoz ortamları da en düşük aktivite sağlayan ortamlar olarak belirlenmiştir.

Kullanılan karbon kaynakları Çizelge 5.8’de SOD spesifik verimlilikleri açısından da değerlendirilmiştir. En yüksek değer sorbitol içeren ortamda 7.15 U/mg kh/st olarak elde edilirken, disakkaritlerden maltoz ve laktoz sırasıyla 5.22 U/mg kh/st ve 5.03 U/mg kh/st değerleriyle yüksek spesifik verimlilik sağlayan karbon kaynakları olmuşlardır. Her bir ortamda en yüksek değerlere 24. saatte ulaşılmıştır.

Karbon kaynaklarının ile genel bir değerlendirme yapılacak olursa, gliserol ve sorbitolün KAT ve SOD enzim aktiviteleri üzerinde olumlu bir etkisi bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.39 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in kuru hücre başına hücre içi SOD (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişim (T=30°C, N=150 rpm)

Çizelge 5.8 Farklı karbon kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum hücre içi SOD spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm) (t=24 st)

| Karbon kaynağı | Hücre içi SOD spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) |
|----------------|----------------------------------------------------|
| Sorbitol       | 7.15                                               |
| Maltoz         | 5.22                                               |
| Laktoz         | 5.03                                               |
| Gliserol       | 2.86                                               |
| Galaktoz       | 1.46                                               |
| Sukroz         | 1.35                                               |
| Glukoz         | 0.74                                               |
| UYM            | 0.73                                               |
| Ksiloz         | 0.33                                               |
| Fruktoz        | 0.32                                               |

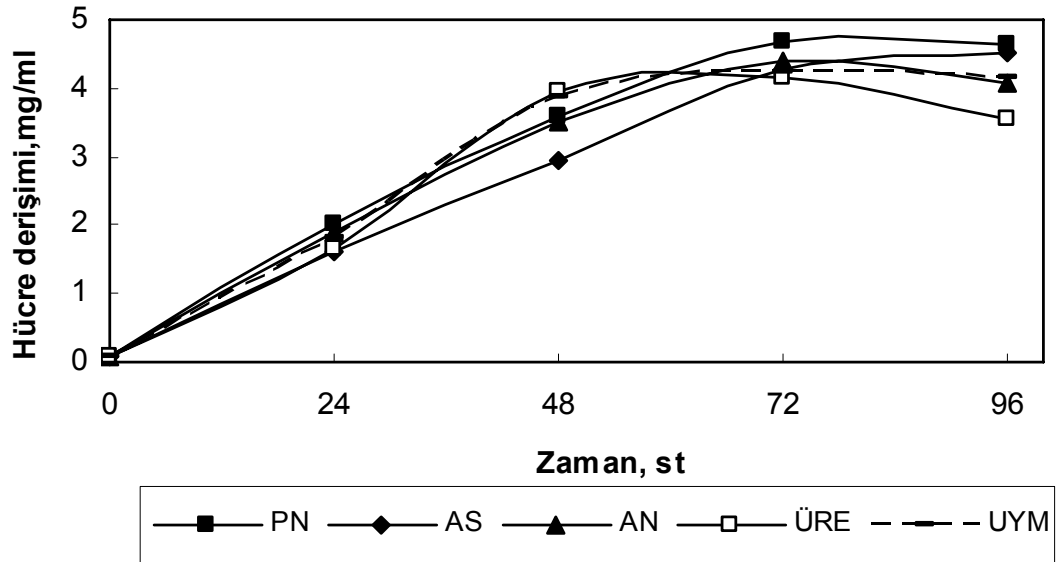
## 5.4 Azot Kaynaklarının Etkisi

### 5.4.1 *Rhodoturula glutinis*'in çoğalması üzerine azot kaynaklarının etkisi

*R. glutinis*'in çoğalması üzerine azot kaynaklarının etkisinin incelenebilmesi için UYM ortamı üzerine 0.02 mol azot içeren potasyum nitrat (PN), amonyum nitrat (AN), amonyum sülfat (AS) ve üre eklenmiş ve UYM ortamı kontrol olarak kabul edilmiştir.

Şekil 5.40'da farklı azot kaynaklarının hücre derişimi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek hücre derişimi değerlerine PN (4.67 mg/ml) ve AS (4.50 mg/ml) ortamlarında ulaşılmıştır. Diğer üretim ortamlarında elde edilen değerler birbirine yakın bulunmuştur.

Çizelge 5.9'da farklı azot kaynağı içeren ortamlar için hesaplanan özgül çoğalma hızları yer almaktadır. Buna göre AS dışındaki bütün ortamlarda özgül çoğalma hızları birbiri ile aynı bulunmuştur ( $0.14 \text{ st}^{-1}$ ).

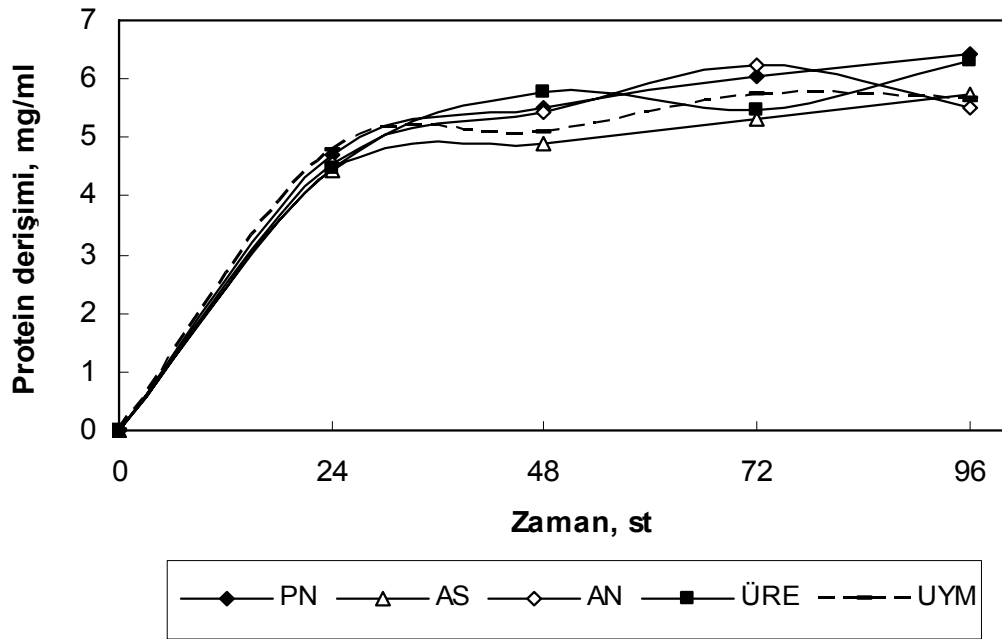


Şekil 5.40 Farklı azot kaynakları içeren üretim ortamlarında elde edilen kuru hücre derişimlerinin zamanla değışimi ( $T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $N=150 \text{ rpm}$ )

Şekil 5.41’de zamanla protein derişimlerinin değışimi verilmiştir. En yüksek protein derişimlerine PN ve ÜRE ile ulaşılmıştır (6.35 mg/ml).

Çizelge 5.9 Farklı karbon kaynağı içeren ortamlardaki özgül çoğalma hızları (T=30°C, 150 rpm)

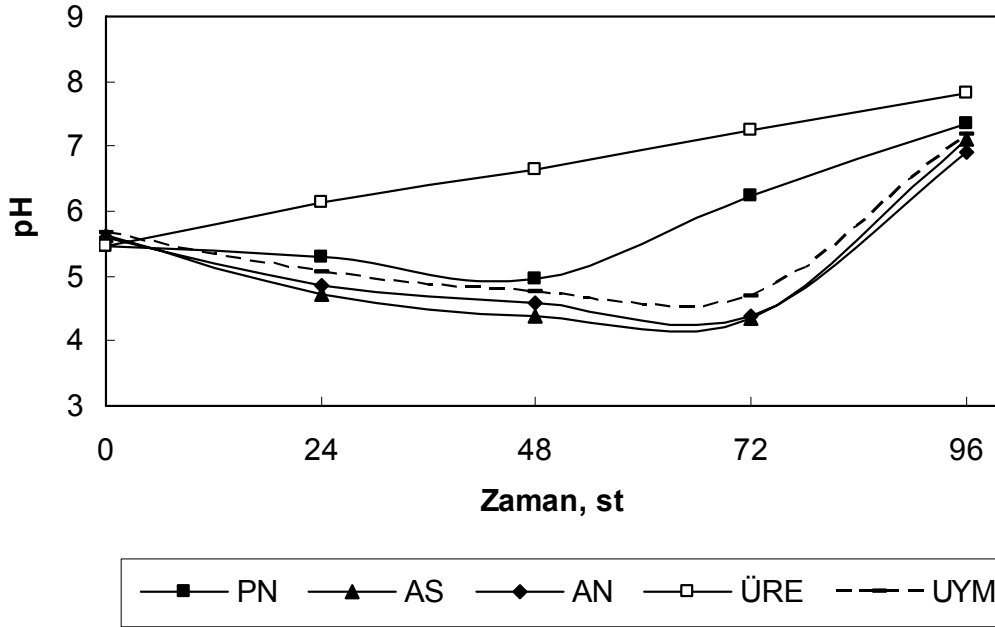
| Azot kaynağı | Özgöl çoğalma hızı, $\mu$ (st <sup>-1</sup> ) |
|--------------|-----------------------------------------------|
| UYM          | 0.14                                          |
| PN           | 0.14                                          |
| AN           | 0.14                                          |
| ÜRE          | 0.14                                          |
| AS           | 0.10                                          |



Şekil 5.41 Farklı azot kaynağı içeren ortamlarda hücre içi protein derişimlerinin zamanla değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

#### 5.4.2 *R. glutinis*'in çoğalmasında hücre dışı pH değişimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Şekil 5.42'de farklı azot kaynağı içeren ortamlarında hücre dışı pH değerlerinin zamanla değişimleri görülmektedir. Buna göre, UYM, AN ve AS ortamlarının pH değerleri durgunluk fazına geçiş süresi olan 72. saate kadar azalmış, daha sonra artmıştır. Bu profillerden farklı olarak PN içeren ortamın pH değeri 48. saatten itibaren artmış, üre içeren ortamın pH değeri ise başlangıçtan itibaren sürekli artmıştır. En yüksek pH değerine sahip olan üre ortamında çoğalma en az olmuştur.



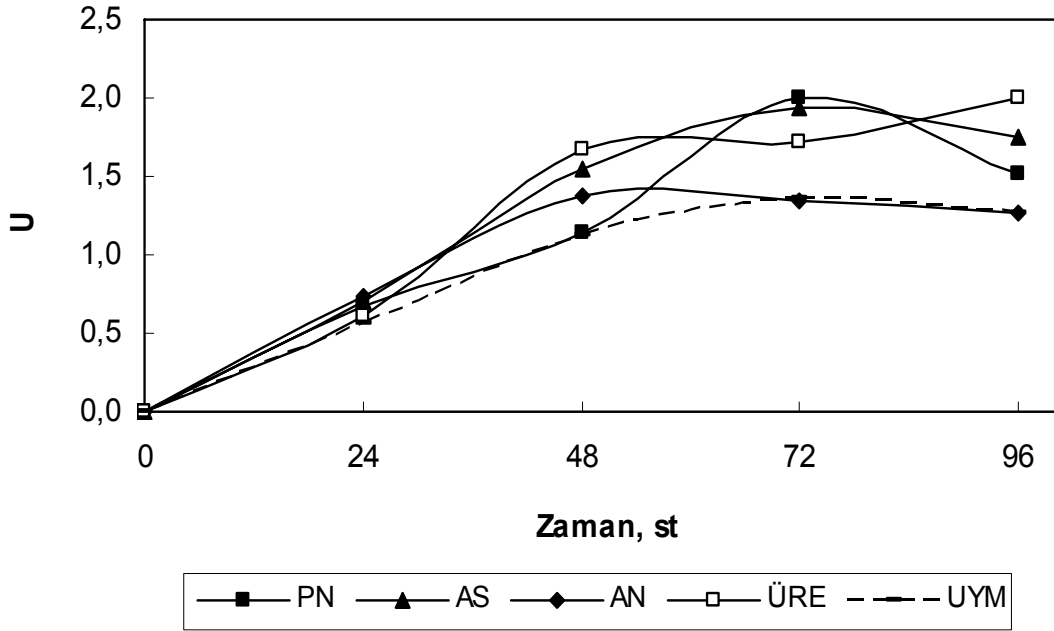
Şekil 5.42 Farklı azot kaynakları içeren üretim ortamlarının pH değerlerinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

#### 5.4.3 *R. glutinis*'in hücre içi katalaz aktivitesi üzerine azot kaynaklarının etkisi

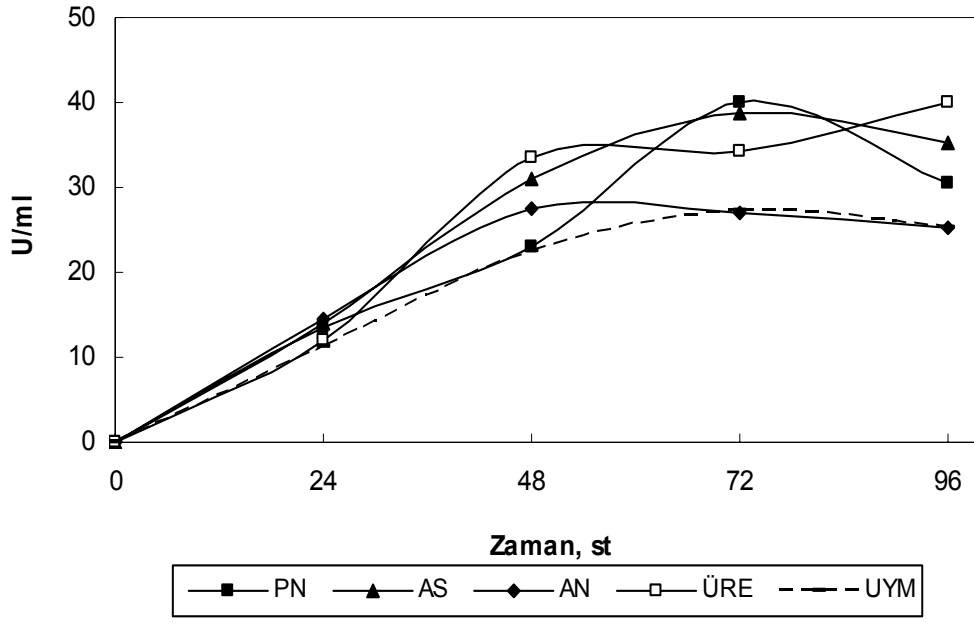
Farklı azot kaynaklarıyla yapılan deneyler sonucu elde edilen KAT aktivitesinin (U) zamanla değişim grafiği Şekil 5.43'te verilmiştir. Buna göre; en yüksek KAT aktivite değerlerine ÜRE ortamında 96. saatte, diğer ortamlarda ise 72. saatte ulaşıldığı görülmektedir. Buna göre en yüksek aktivite değerleri PN (2.0 U) ve AS (1.9 U) ile elde edilmiştir.

Birim hacim başına KAT aktiviteleri (U/ml) değerlendirildiğinde ise, değişim profillerinin Şekil 5.43 ile aynı olduğu ve en yüksek değerin PN ortamında 40 U/ml olarak elde edildiği görülmektedir (Şekil 5.44).

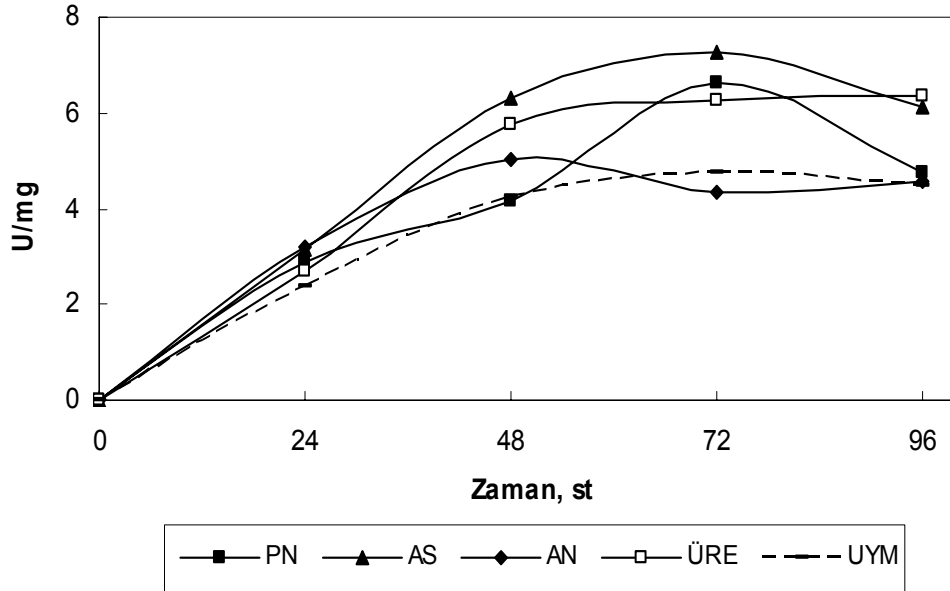
Zamana karşı spesifik KAT aktiviteleri (U/mg) incelendiğinde ise, en yüksek değerlerin AS içeren ortamda 7.3 U/mg olarak, daha sonra PN (6.6 U/mg) ve ÜRE ortamlarında elde edildiği görülmektedir (Şekil 5.45).



Şekil 5.43 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi KAT (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, 150 rpm)



Şekil 5.44 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi KAT (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, 150 rpm)

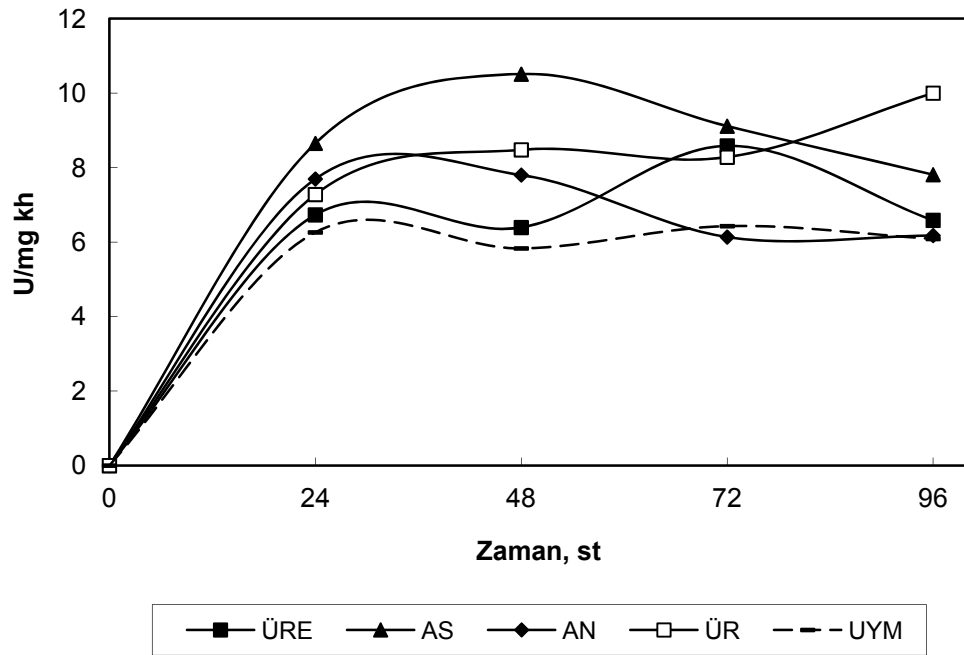


Şekil 5.45 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi spesifik KAT (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Birim kuru hücre başına spesifik KAT aktivitelerinin (U/mg kh) farklı azot kaynağı içeren ortamlardaki değerlerinin zamanla değişim grafiği Şekil 5.46'da verilmiştir. Spesifik KAT aktivite değerlerine benzer şekilde en yüksek 10.50 U/mg kh değerine AS ile ulaşılmış, onu ÜRE ortamı takip etmiştir.

Farklı azot kaynaklarının hücre içi KAT aktiviteleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; AS, PN ve ÜRE ortamları ön plana çıkmaktadır. Kontrol ortamı olarak kullanılan UYM ise tüm KAT aktivite değerlerinde son sırada yer almıştır.

Çizelge 5.10'da kullanılan azot kaynakları KAT spesifik verimliliği açısından değerlendirilmesi yer almaktadır. Buna göre en yüksek değer AS ortamında 0.22 U/mg kh/st olarak elde edilmiş, onu ÜRE (0.18 U/mg kh/st) ve AN (0.16 U/mg kh/st) ortamları takip etmiştir.



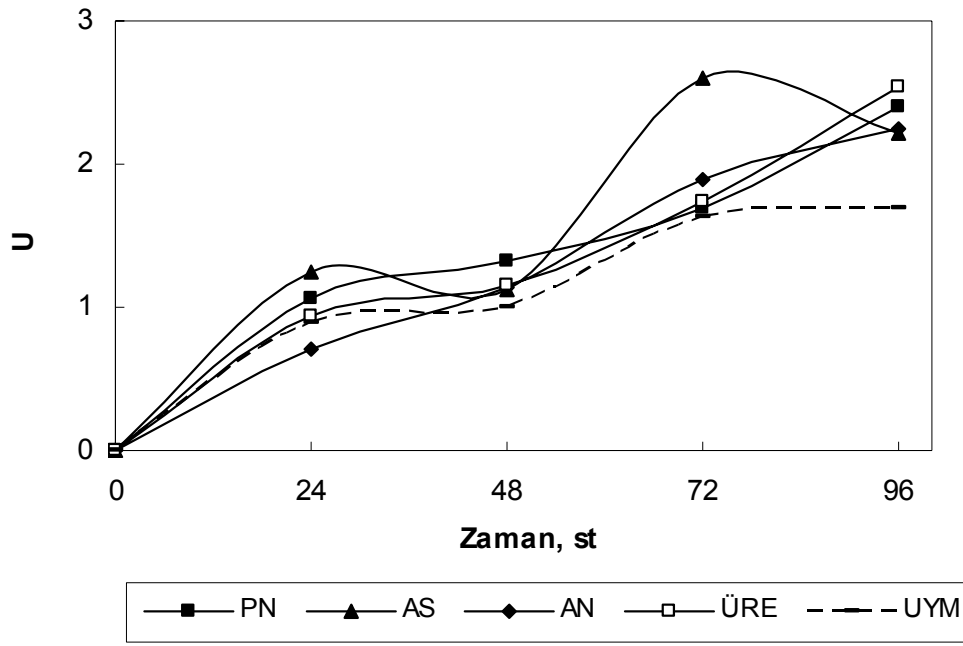
Şekil 5.46 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in birim kuru hücre başına spesifik KAT (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Çizelge 5.10 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum hücre içi KAT spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm)

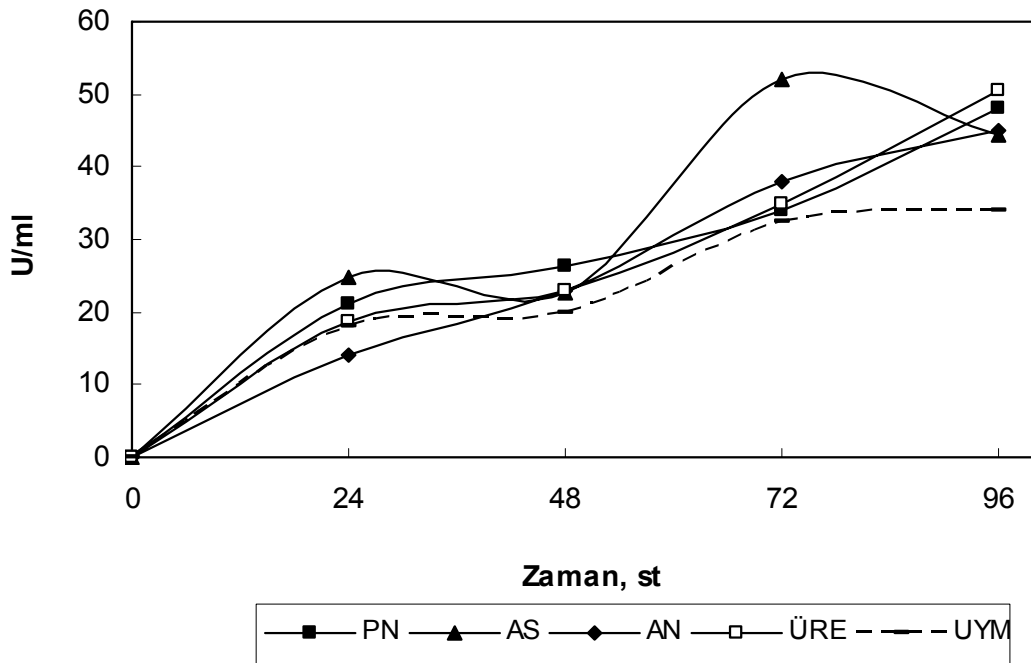
| Azot kaynağı | Hücre içi KAT spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) |
|--------------|----------------------------------------------------|
| AS           | 0.22                                               |
| ÜRE          | 0.18                                               |
| AN           | 0.16                                               |
| PN           | 0.12                                               |
| UYM          | 0.09                                               |

#### 5.4.4 *R. glutinis*'in hücre içi süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Farklı azot kaynakları içeren üretim ortamlarının SOD aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Buna göre toplam aktivite değerlerinin (U) zamanla değişimleri izlendiğinde (Şekil 5.47) AS ortamının 24 ve 72. saatlerde iki adet maksimum verdiği, diğer eğrilerin ise zamanla artma eğiliminde oldukları görülmektedir. En yüksek SOD aktivite değerine AS içeren ortamda 72. saatte 2.6 U olarak ulaşılmıştır. Birim hacim başına aktiviteler incelendiğinde (U/ml), zamanla değişim profillerinin toplam aktivite profilleri ile aynı olduğu ve en yüksek değer AS ortamında 52 U/ml olarak elde edildiği belirtilebilir (Şekil 5.48).



Şekil 5.47 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in hücre içi SOD (U) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

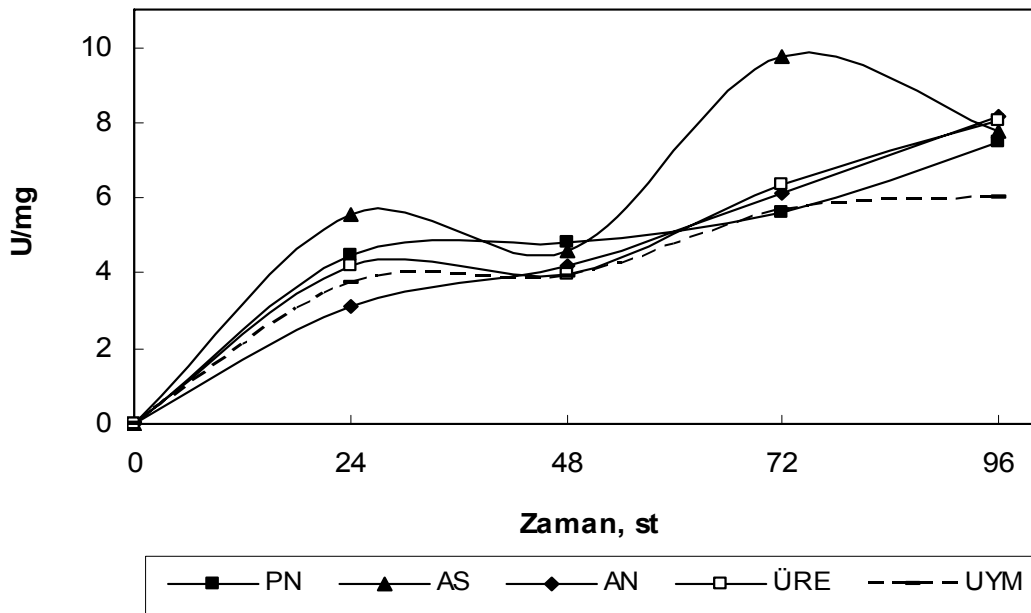


Şekil 5.48 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in birim hacim başına hücre içi SOD (U/ml) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

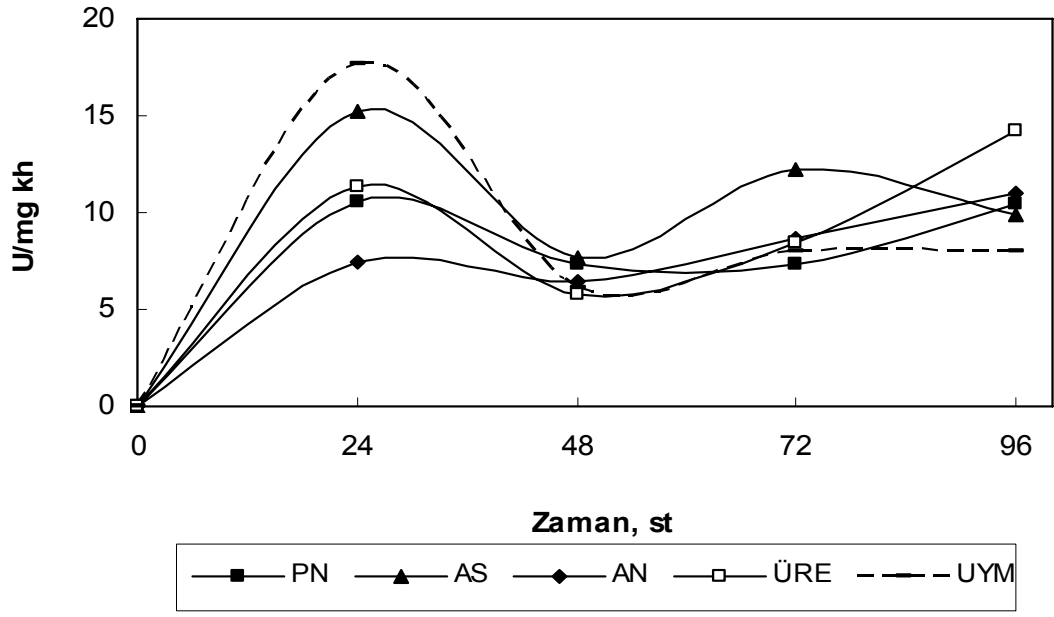
Spesifik SOD aktivitelerinin (U/mg) yer aldığı Şekil 5.49’da yine AS içeren ortamda en yüksek değerin elde edildiği gözlenmiştir (9.8 U/mg).

Birim kuru hücre başına spesifik aktivite (U/mg kh) grafiğinde ise diğerlerinden farklı olarak, her bir farklı azot kaynağı içeren ortamda 24. saatte en yüksek değerlere ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 5.50). Elde edilen en yüksek veriler ve ortamları; UYM (17.6 U/mg kh) > AS (15.2 U/mg kh) > ÜRE (11.3 U/mg kh) > PN (10.5 U/mg kh) > AN (7.5 U/mg kh) şeklinde sıralanmıştır.

Azot kaynaklarının SOD aktivitesi üzerindeki etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, AS ve üre eklenen üretim ortamlarının ön plana çıktığı görülmektedir. Kontrol ortamı olarak alınan UYM ise toplam SOD aktivitesi, spesifik SOD aktivitesi açısından son sırada yer alırken, birim hücre başına spesifik aktivite değerlerinde ilk sırada yer aldığı gözlenmiştir.



Şekil 5.49 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in spesifik SOD (U/mg) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 5.50 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamında *R. glutinis*'in birim kuru hücre başına SOD (U/mg kh) aktivitesinin zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Spesifik SOD verimlilik değerleri Çizelge 5.11'de yer almaktadır. Buna göre en yüksek değer UYM ortamında elde edilirken, bunu AS ve PN ortamları takip etmiştir.

Çizelge 5.11 Farklı azot kaynaklarının incelendiği üretim ortamlarında maksimum hücre içi SOD spesifik verimlilikleri (T=30°C, N=150 rpm) (t=24 st)

| Azot kaynağı | Hücre içi SOD spesifik verimliliği<br>(U/mg kh/st) |
|--------------|----------------------------------------------------|
| UYM          | 0.73                                               |
| AS           | 0.63                                               |
| PN           | 0.44                                               |
| ÜRE          | 0.15                                               |
| AN           | 0.11                                               |

## 5.5 Deneysel Tasarım

*Rhodotorula glutinis*'ten antioksidan özellikteki KAT ve SOD enzimlerinin üretimleri üzerine sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynaklarının etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinin ardından, çeşitli faktörlerin etkilerinin eşanlı incelenerek, en yüksek hücre derişimi, KAT ve SOD aktivitelerini sağlayabilecek optimum değerlerin elde edilmesi planlanmıştır. Bu değerler her seferde tek bir parametrenin değiştirildiği klasik deneysel yöntemler ile değil, parametreler arası etkileşimlerin de hesaplanabildiği deneysel tasarım yöntemleriyle bulunabilmektedir. Bu amaçla, birinci ve ikinci dereceden etkileşimlerin hesaplanabildiği ve çalışılan bölgenin yanıt yüzey şeklinin belirlenebildiği deneysel tasarım yöntemi olan yanıt yüzey yöntemi (YYY)'nin kullanılmasına karar verilmiştir YYY'nin çeşitli alt yöntemleri arasından, merkezi karma tasarım (MKT) seçilmiştir. Merkezi Karma Tasarımı türleri arasından ise; tasarım bölgesini daha geniş bir alanda tarama olanağı olması, yüksek öngörü sağlaması ve basit bir faktöriyel tasarımdan karmaşık merkezi tasarıma geçişe olanak sağlaması nedeniyle dış çemberli tasarım (Circumscribed, CCC) seçilmiştir.

Faktör seçimi aşamasında hücre derişimi, KAT ve SOD aktivitelerini en fazla etkileyen değişkenler ön planda tutulmuştur. Buna göre sıcaklık birinci faktör olarak seçilmiştir. Karbon kaynakları arasından en yüksek aktivite değerlerini sağlamış olan gliserolün derişimi ikinci faktör, ortam başlangıç pH değeri ise üçüncü faktör olarak seçilmiştir. Üretim ortamına tek bir azot kaynağı konulduğunda yeterli çoğalmanın gözlenmemesi, ayrıca UYM ortamına azot kaynağı eklendiğinde aktiviteler üzerinde önemli bir etki göstermemesi nedeniyle, deneysel tasarımda bu parametrenin yer almamasına karar verilmiştir.

Deneysel tasarım, Design Expert (7.0.0) deneme sürümü kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 5.12'de tasarım için seçilen faktörler ve değerleri yer almaktadır. Bu değerler Bölüm 5.1-5.4'te sunulmuş olan deney verileri yardımıyla belirlenmiştir. Yüksek ve düşük seviyelerin dışında dış çemberli tasarımda yer alan uç noktalar olan yüksek yıldız ve düşük yıldız seviyeleri de dikkatle belirlenerek, uygulanabilir ve mantıklı değerler olmasına dikkat edilmiştir.

Çizelge 5.12 MKT için seçilen faktörler ve değerleri

| Seviye                      | Kodlanmış<br>değer | Faktör                 |                           |                               |
|-----------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|                             |                    | Sıcaklık,<br>T<br>(°C) | Başlangıç<br>pH<br>Değeri | Gliserol<br>Derişimi<br>(g/L) |
| Yüksek                      | +1                 | 28.0                   | 6.00                      | 50.00                         |
| Orta                        | 0                  | 21.5                   | 5.25                      | 35.00                         |
| Düşük                       | -1                 | 15.0                   | 4.50                      | 20.00                         |
| Yüksek Yıldız (+ $\alpha$ ) | + 1.682            | 32.4                   | 6.51                      | 60.23                         |
| Düşük Yıldız (- $\alpha$ )  | - 1.682            | 10.6                   | 3.99                      | 9.77                          |

Çizelge 5.12’de verilen faktörlere karşılık elde edilmesi istenen cevaplar ise, hücre derişimi (mg/ml), KAT aktivitesi (U) ve SOD aktivitesi (U) olarak belirlenmiştir. Merkezi Karma Tasarım yöntemine göre oluşturulan matris ve yapılacak 20 adet deney setine ait değerler Çizelge 5.13’de yer almaktadır.

Tasarlanan 20 adet deney, rasgele sıra ile gerçekleştirilmiş, merkez nokta deneyleri 6 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen cevaplar Çizelge 5.14’te yer almaktadır.

Tüm cevaplar elde edildikten sonra, her bir cevap tek tek analizlenmiş, uygun olan yanıt modeli seçilmiş, program tarafından hesaplanan istatistiksel veriler değerlendirilmiş ve yanıt yüzey grafikleri elde edilmiştir. Daha sonra her bir cevap için uygun olan model program tarafından çözdürülerek, en yüksek cevabı sağlayan faktör değerleri belirlenmiş, ayrıca istenilen hedefe ulaşma “desirability fonksiyonu” yardımıyla üç cevap için ortak bir optimum nokta belirlenmiştir.

Öncelikle hücre derişimi cevabının analizleri yapılmıştır. Design Expert (7.0.0) deneme sürümü programı tarafından önerilen modeller arasından model uygunsuzluğu (lack of fit) değeri istatistiksel olarak anlamsız olan yüksek dereceli bir polinom model olan ikinci dereceden model seçilmiştir.

Çizelge 5.13 MKT tasarım matrisi

| Deney<br>numara | Değişkenler         |       |                        |       |                               |       |
|-----------------|---------------------|-------|------------------------|-------|-------------------------------|-------|
|                 | Sıcaklık,<br>T (°C) |       | Başlangıç pH<br>değeri |       | Gliserol<br>Derişimi<br>(g/L) |       |
|                 | Seviye              | Değer | Seviye                 | Değer | Seviye                        | Değer |
|                 |                     |       |                        |       |                               |       |
| 1               | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 2               | -1                  | 15.0  | +1                     | 6.00  | -1                            | 20.00 |
| 3               | +1                  | 28.0  | -1                     | 4.50  | -1                            | 20.00 |
| 4               | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 5               | -α                  | 10.6  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 6               | +1                  | 28.0  | +1                     | 6.00  | -1                            | 20.00 |
| 7               | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 8               | -1                  | 15.0  | +1                     | 6.00  | +1                            | 50.00 |
| 9               | +1                  | 28.0  | -1                     | 4.50  | +1                            | 50.00 |
| 10              | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | +α                            | 60.23 |
| 11              | +α                  | 32.4  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 12              | +1                  | 28.0  | +1                     | 6.00  | +1                            | 50.00 |
| 13              | 0                   | 21.5  | +α                     | 6.51  | 0                             | 35.00 |
| 14              | -1                  | 15.0  | -1                     | 4.50  | -1                            | 20.00 |
| 15              | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | -α                            | 9.77  |
| 16              | 0                   | 21.5  | -α                     | 3.99  | 0                             | 35.00 |
| 17              | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 18              | -1                  | 15.0  | -1                     | 4.50  | +1                            | 50.00 |
| 19              | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |
| 20              | 0                   | 21.5  | 0                      | 5.25  | 0                             | 35.00 |

Çizelge 5.14 MKT tasarımına göre yapılan deneylerin sonuçları

|              | Cevaplar         |                |                |
|--------------|------------------|----------------|----------------|
|              | Hücre            | KAT            | SOD            |
| Deney numara | derişimi (mg/ml) | aktivitesi (U) | aktivitesi (U) |
| 1            | 1.28             | 0.69           | 1.65           |
| 2            | 0.32             | 0.07           | 0.29           |
| 3            | 1.50             | 0.77           | 2.49           |
| 4            | 1.25             | 0.63           | 1.70           |
| 5            | 0.22             | 0.042          | 0.17           |
| 6            | 1.34             | 0.63           | 0.22           |
| 7            | 1.24             | 0.65           | 2.03           |
| 8            | 0.31             | 0.04           | 1.81           |
| 9            | 1.39             | 0.86           | 0.38           |
| 10           | 1.22             | 0.59           | 1.50           |
| 11           | 1.61             | 1.21           | 0.78           |
| 12           | 1.56             | 0.61           | 2.16           |
| 13           | 1.05             | 0.38           | 1.80           |
| 14           | 0.29             | 0.08           | 1.25           |
| 15           | 1.09             | 0.33           | 1.26           |
| 16           | 1.15             | 0.59           | 0.97           |
| 17           | 1.22             | 0.68           | 1.65           |
| 18           | 0.44             | 0.10           | 0.32           |
| 19           | 1.30             | 0.54           | 1.25           |
| 20           | 1.20             | 0.69           | 1.33           |

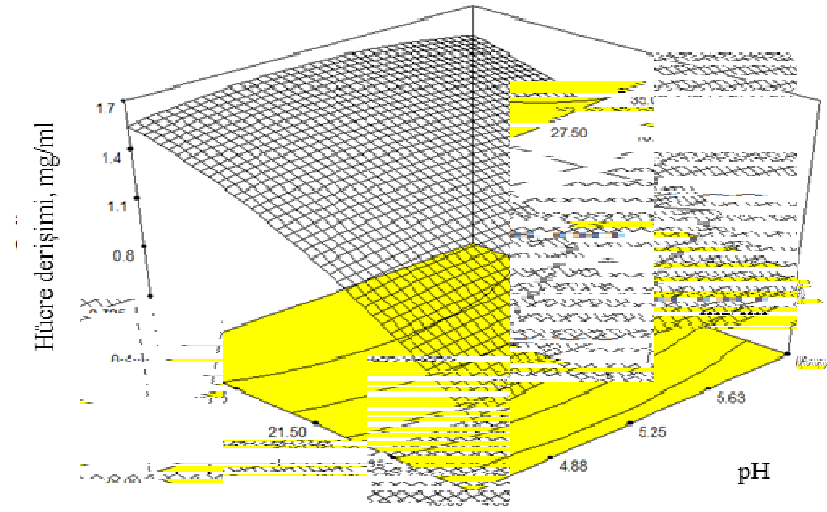
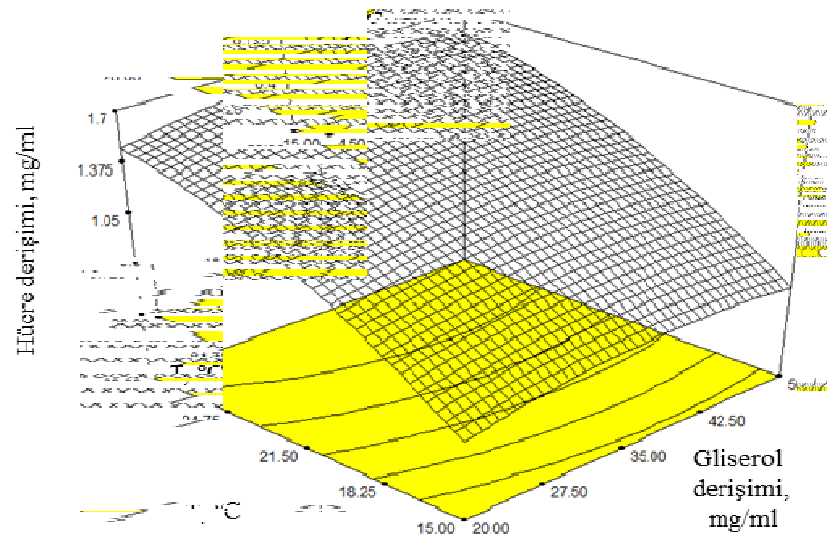
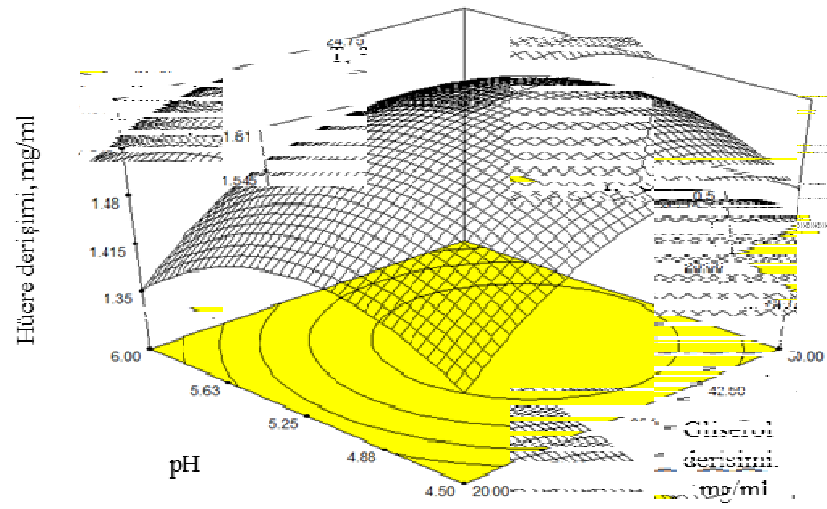
Denklemdede yer alan bazı terimler, istatistiksel açıdan anlamsız oldukları için, geriye doğru eleme (backward elimination) yöntemi ile, model hiyerarşisinin korunmasına dikkat edilerek, elenmişlerdir. Elde edilen modelin ayrıntılı varyans analizi (ANOVA) Ek 3’te verilmiştir.

Hücre derişimi için elde edilen modelin son şekli Eşitlik 5.4'te verilmiştir. Burada sıcaklık T °C, gliserol derişimi Gli ise g/L birimindedir.

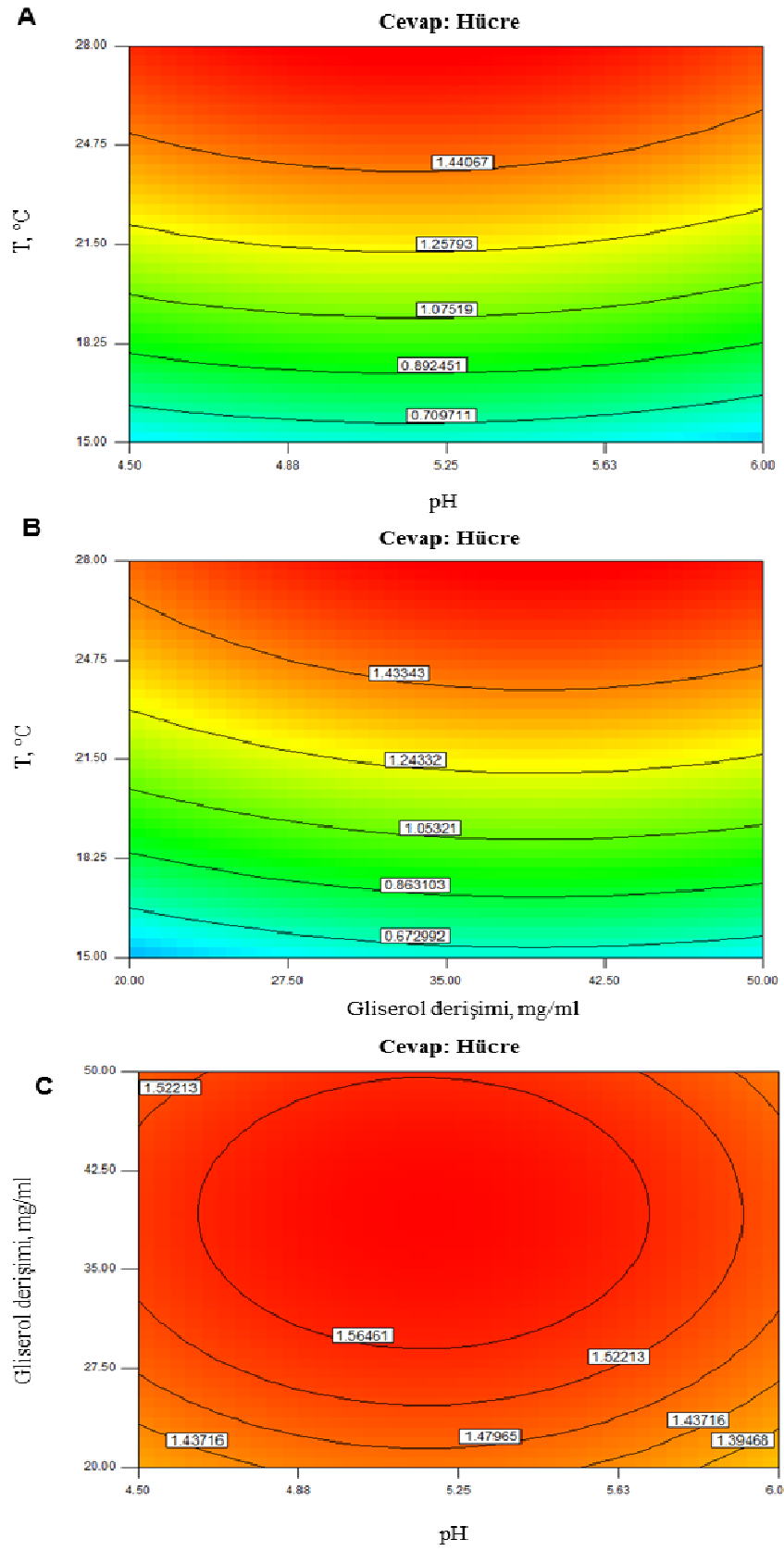
$$\text{Hücre derişimi (mg/ml)} = -6.68439 + 1.56882 \cdot \text{pH} + 0.22972 \cdot T + 0.031654 \cdot \text{Gli} - 0.15181 \cdot \text{pH}^2 - 3.56927 \times 10^{-3} \cdot T^2 - 4.03100 \times 10^{-4} \cdot \text{Gli}^2 \quad (5.4)$$

Bu model için  $R^2=0.9310$ ,  $R^2_{adj}=0.8992$  ve öngörülen  $R^2=0.7993$  olarak belirlenmiştir. Program tarafından Model F değeri 29.25 olarak hesaplanarak, modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra, model uygunsuzluğu (lack of fit) değeri 0.79 olarak tespit edilmiş ve saf hataya göre anlamsız olduğu belirlenmiştir. Buna göre seçilen modelin, daha ileri analizlerde kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Modelde yer alan terimlerden T,  $\text{pH}^2$ ,  $T^2$ ,  $\text{Gli}^2$ 'nin istatistiksel açıdan anlamlı oldukları belirlenmiştir. Model üzerinde en çok etkili olan terimin sıcaklık ( $p < 0.0001$ ) olduğu belirlenmiştir.

Hücre derişimi cevabı için üç boyutlu yanıt yüzeyi ve hat grafikleri sırasıyla şekil 5.51-5.52'de verilmiştir.

**A****B****C**

Şekil 5.51 Hücre derişimi cevabı için üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri (A: T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi)



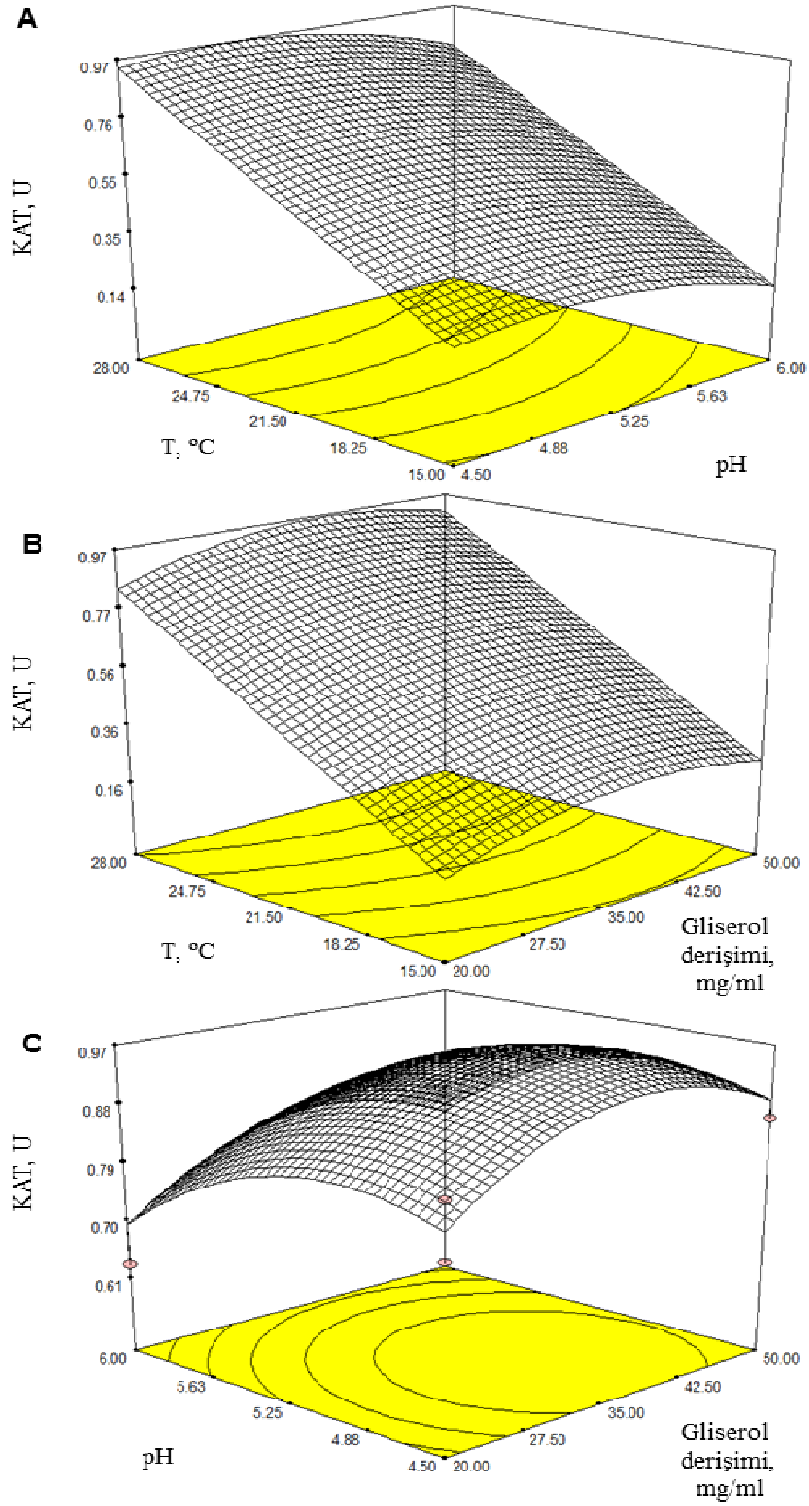
Şekil 5.52 Hücre derişimi cevabı için hat grafikleri (A: T-pH derişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi)

Buna göre, gliserol 38.24 g/L derişimde iken elde edilen grafiklerde (Şekil 5.51 A, 5.52 A), pH sabitken sıcaklık arttıkça hücre derişiminin arttığı; sıcaklık sabit iken ise, hücre derişiminin pH 4.5'ten 5.25 değerine doğru arttığı, ancak pH 6.00 değerine doğru tekrar azaldığı gözlenmiştir. Başlangıç pH=5.21 değerinde sabitken, elde edilen grafiklerde (Şekil 5.51 B, 5.52 B); sıcaklık arttıkça hücre derişiminin arttığı, sabit sıcaklıkta ise, gliserol derişimi arttıkça hücre derişiminin arttığı görülmektedir. Sıcaklık 27.5 °C değerinde sabit tutularak elde edilen grafiklerde ise (Şekil 5.51 C, 5.52 C), gliserol derişimi sabitken, pH değerinin orta değerlerinde hücre derişiminin arttığı, uç değerlerinde ise azaldığı belirlenmiştir. Başlangıç pH değeri sabitken ise hücre derişiminin, gliserol derişimi 35-45 g/L civarında iken en yüksek olduğu, bu değerler dışında ise azaldığı gözlenmiştir.

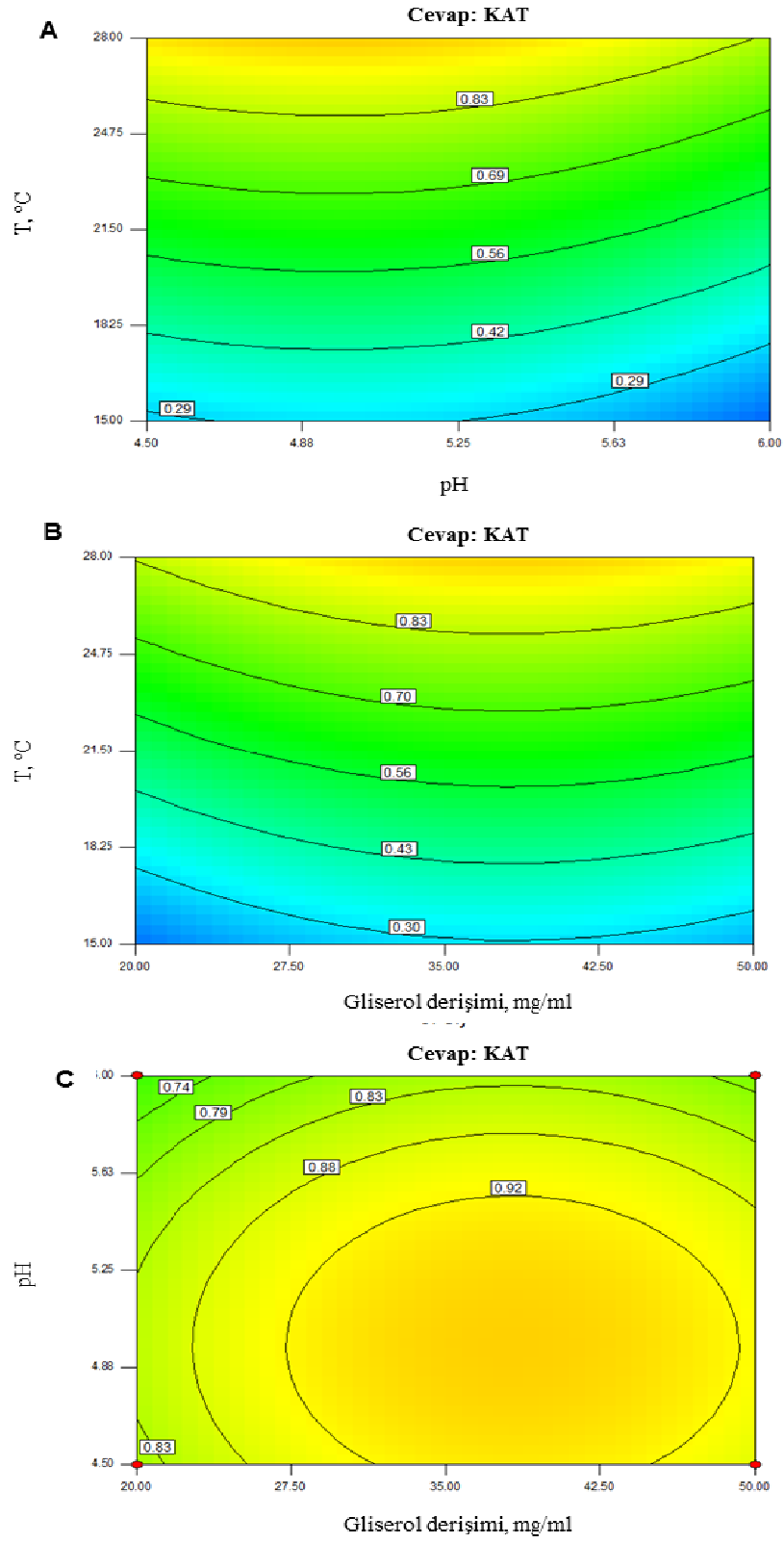
KAT enzim aktivitesinin (U) cevabına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, Design Expert (7.0.0) deneme sürümü programı tarafından önerilen tek model olan ikinci dereceden model seçilmiştir. Denklemden istatistiksel açıdan anlamsız olan terimlerin azaltılması açısından geriye doğru eleme (backward elimination) yöntemi ile eleme yapılarak modeldeki terim sayısı azaltılmıştır. KAT enzim aktivitesi cevabı için elde edilen model Eşitlik 5.5'te verilmiştir. Burada sıcaklık T °C, gliserol derişimi Gli ise g/L birimindedir.

$$\text{KAT (U)} = -4.36106 + 1.34381 \cdot \text{pH} + 0.051575 \cdot T + 0.028907 \cdot \text{Gli} - 0.13551 \cdot \text{pH}^2 - 3.78071 \times 10^{-4} \cdot \text{Gli}^2 \quad (5.5)$$

Bu model için  $R^2 = 0.9360$ ,  $R^2_{\text{adj}} = 0.9131$  ve öngörülen  $R^2 = 0.8063$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen modelin ayrıntılı varyans analizi (ANOVA) **Ek 4**'te verilmiştir. Program tarafından Model F değeri 40.95 olarak hesaplanarak, modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Model uygunsuzluğu (lack of fit) değeri 2.21 olarak verilmiş ve saf hataya göre anlamsız olduğu belirlenmiştir. Modeldeki terimlerin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda pH, T,  $\text{pH}^2$ ,  $T^2$  terimlerinin anlamlı oldukları bulunmuştur. Model üzerindeki en etkili terimin sıcaklık olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.0001$ ). KAT aktivitesi için üç boyutlu yanıt yüzeyi ve hat grafikleri Şekil 5.53-5.54'te yer almaktadır.



Şekil 5.53 KAT aktivitesi cevabı için üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi)



Şekil 5.54 KAT aktivitesi cevabı için hat grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi)

Gliserol 37.03 g/L derişimde iken elde edilen grafikte, pH sabit iken, sıcaklık arttıkça KAT aktivitesinin arttığı; sıcaklık sabit iken ise, pH değeri arttıkça arttığı, pH= 5.6 civarından itibaren yeniden azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.53 A, 5.54 A). pH=4.76 değerindeyken, sıcaklık ve gliserol derişimi incelendiği zaman (Şekil 5.53 B, 5.54 B); gliserol derişimi sabit iken, sıcaklık arttıkça KAT aktivitesinin arttığı, sabit sıcaklıkta ise, gliserol derişiminin 37 g/L derişime doğru KAT aktivitesinin arttığı, daha yüksek derişimlerde ise azalmaya başladığı belirlenmiştir. Sıcaklık 28.00 °C değerinde sabit tutularak elde edilen grafikte ise (Şekil 5.53 C, 5.54 C), gliserol derişimi sabit iken, pH değeri arttıkça KAT aktivitesinin önce arttığı, pH=5.4 civarından itibaren yeniden azaldığı belirlenmiştir. Başlangıç pH değeri sabit iken gliserol derişiminin orta değerlerinde yüksek aktivite olduğu, uç noktalarında azaldığı belirlenmiştir. Şekil 5.53 ve 5.54 genel olarak değerlendirildiğinde, en yüksek KAT aktivitesinin elde edilebilmesi için daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.

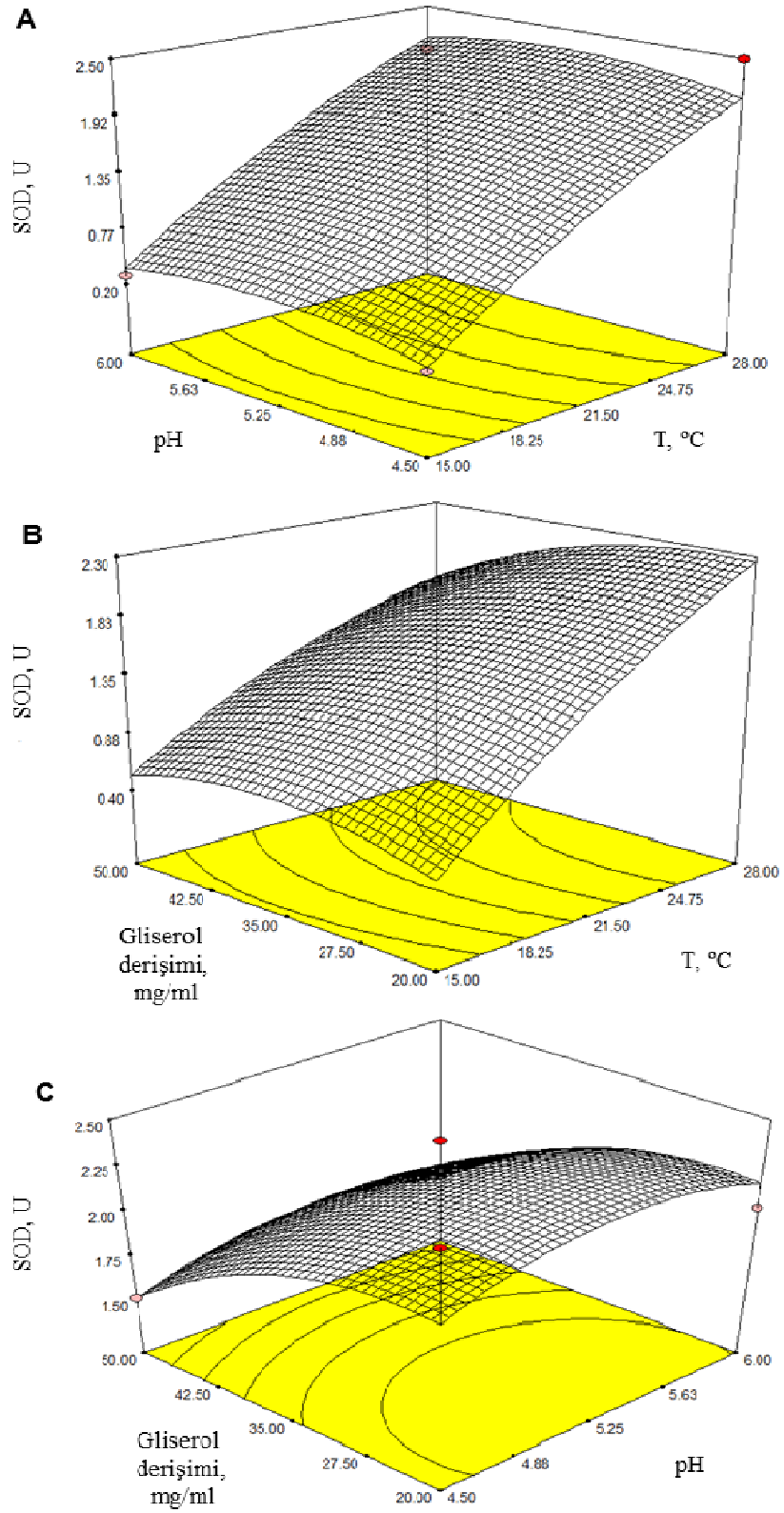
SOD aktivitesi (U) için cevaplar değerlendirildiğinde, program tarafından yalnızca ikinci dereceden model uygun görülmüştür. Model hiyerarşisi korunarak, istatistiksel olarak anlamsız olan terimler modelden çıkarıldığı zaman elde edilen cevap denklemi Eşitlik 5.6'da verilmiştir. Burada sıcaklık T °C, gliserol derişimi Gli ise g/L birimindedir.

$$\text{SOD (U)} = -12.30567 + 2.98584 \cdot \text{pH} + 0.31297 \cdot T + 0.089500 \cdot \text{Gli} - 1.73077 \cdot 10^{-3} T \cdot \text{Gli} - 0.28070 \cdot \text{pH}^2 - 3.27689 \times 10^{-3} \cdot T^2 - 8.74599 \times 10^{-4} \cdot \text{Gli}^2 \quad (5.6)$$

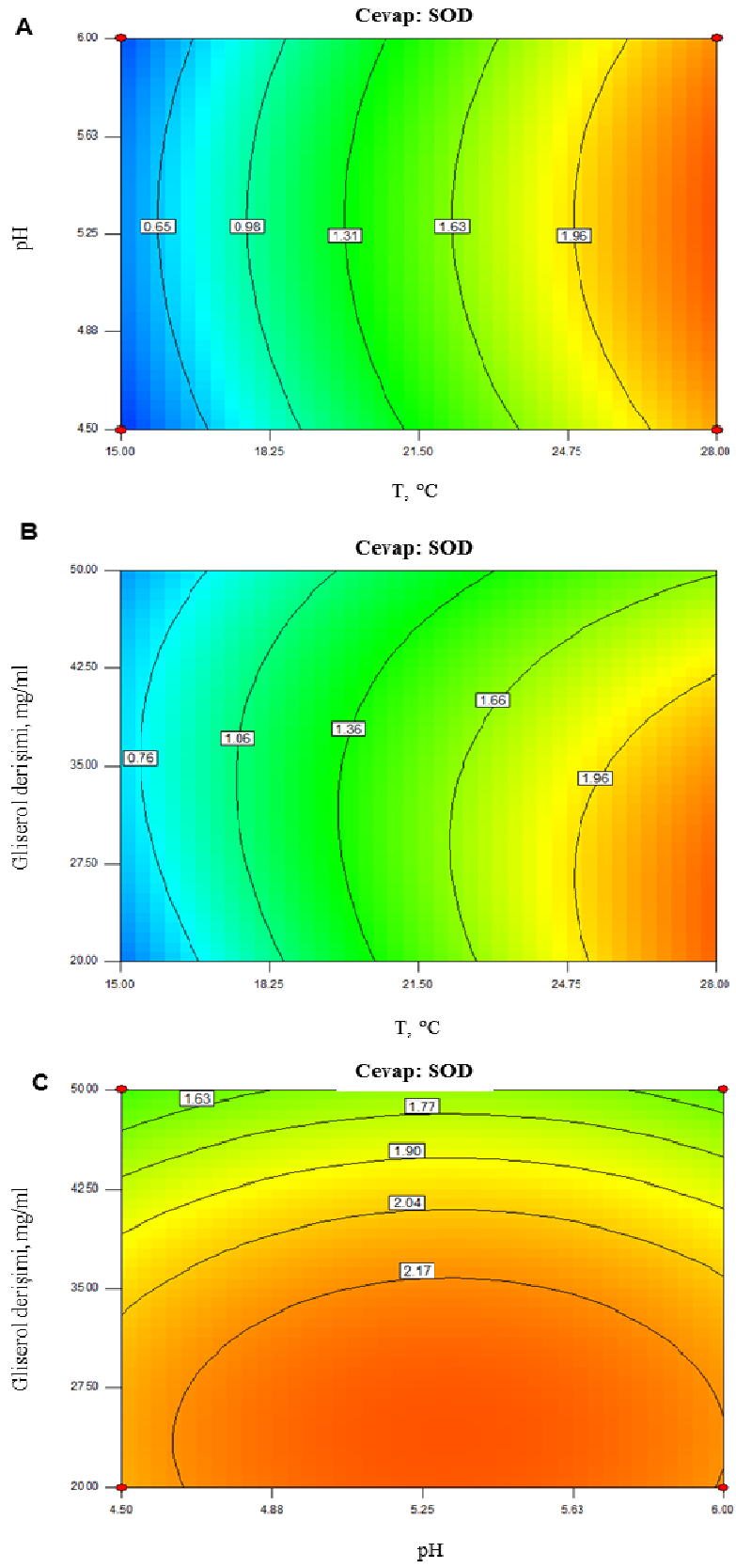
Bu denklemde diğer iki cevapta gözlenmeyen (T\*Gli) ikili etkileşimi terimi de yer almaktadır. Bu da, sıcaklık ve gliserol derişiminin birlikte cevap üzerinde (SOD aktivitesi) etkili olduğunu göstermektedir. Model için  $R^2 = 0.9156$ ,  $R^2_{\text{adj}} = 0.8664$  ve öngörülen  $R^2 = 0.7709$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen modelin ayrıntılı varyans analizi (ANOVA) Ek 5'te verilmiştir. Program tarafından Model F değeri 18.61 olarak hesaplanarak, modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Model uygunsuzluğu (lack of fit) değeri 0.62 olarak verilmiş ve saf hataya göre anlamsız olduğu belirlenmiştir. Modeldeki terimlerin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda T,  $\text{pH}^2$ ,  $\text{Gli}^2$  terimlerinin anlamlı oldukları bulunmuştur. SOD aktivitesi üzerindeki en

etkili olan terimin, diğ er iki cevapta da olduğu gibi, sıcaklık olduğu bulunmuştur ( $p<0.0001$ )

SOD aktivitesi i in    boyutlu yanıt y zeyi grafikleri ve hat grafikleri sırasıyla şekil 5.55-5.56'da verilmiştir. Gliserol 20.00 g/L derişimde iken elde edilen grafikte, pH sabit iken, sıcaklık arttı a SOD aktivitesinin arttığı; sıcaklık sabit iken ise, pH arttı a  nce arttığı sonra azaldığı belirlenmiştir g zlenmiştir (şekil 5.55 A, 5.56 A).  $pH=5.70$  değerindeyken, sıcaklık ve gliserol derişimi grafiğe ge irildiğinde (şekil 5.55 B, 5.56 B); gliserol derişimi sabit iken, sıcaklık arttı a SOD aktivitesinin arttığı, sabit sıcaklıkta ise, gliserol derişimi arttı a cevabın  nce artıp, 35 g/L civarından itibaren yeniden azalmaya başladığı belirlenmiştir. Sıcaklık 28.00  C değerinde sabit tutularak elde edilen grafikte ise (şekil 5.55 C, 5.56 C), gliserol derişimi sabit iken, başlangı  pH değerinin orta değerlerinde SOD aktivitesinin arttığı, u  değerlerinde ise azaldığı belirlenmiştir. Başlangı  pH değeri sabitken ise gliserol derişimi arttı a cevap değerinin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 5.55 SOD aktivitesi cevabı için yüzey yanıt grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-glisserol derişimi, C: pH-glisserol derişimi)



Şekil 5.56 SOD aktivitesi cevabı için hat grafikleri (A:T-pH değişimi, B: T-gliserol derişimi, C: pH-gliserol derişimi)

Tüm cevaplar için yanıt yüzeyini ifade eden denklemler elde edildikten sonra her bir cevabı maksimize eden faktör seviyeleri araştırılmıştır. Hücre ve SOD için bu seviyeler program tarafından sağlanırken, KAT cevabını optimize eden verilere ulaşılamamıştır. KAT aktivitesi için üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri ve hat grafikleri incelendiğinde (Şekil 5.53, 5.54) en yüksek değerden oldukça uzak olduğu görülmektedir. Hat grafiklerinin değerleri tasarım alanı dışına çıkarılarak, maksimum noktanın yeri belirlenmeye çalışıldığında, 40°C gibi yüksek bir noktada en yüksek değere ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Ancak gerçekte bu değerde hücre çoğalamamaktadır. Dolayısıyla KAT aktivitesi cevabı maksimize edilememiştir.

Hücre derişimi ve SOD aktivitesini maksimize eden faktör değerleri ve yapılan deneyler sonucunda elde edilen cevaplar Çizelge 5.15'te verilmiştir. Her bir cevabın ayrı ayrı maksimize edilmesinin yanısıra SOD aktivitesi ve hücre derişimi için ortak bir istenen hedefe ulaşma 'desirability' fonksiyonu tanımlanarak program tarafından verilen koşullarda yapılan deney sonuçları da Çizelge 5.15'te yer almaktadır. Maksimum hücre derişimi elde edilmesi için koşullar  $T=32.2^{\circ}\text{C}$ , başlangıç pH = 5.17, gliserol derişimi = 39.27 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre öngörülen cevap 1.6 mg/ml olarak belirlenirken deneysel olarak 1.32 mg/ml hücre derişimi elde edilmiştir. Bu koşullarda SOD aktivitesi 2.17 U olarak elde edilmiştir. Maksimum SOD aktivitesi için (U) koşullar  $T=33.9^{\circ}\text{C}$ , başlangıç pH = 5.47, gliserol derişimi = 16.50 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre öngörülen cevap 2.7 U olarak belirlenirken deneysel olarak 2.4 U SOD aktivitesi elde edilmiştir. Bu koşullardaki hücre derişimi ise, 0.95 mg/ml olarak elde edilmiştir. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak, hücre derişimi ve SOD aktivitesinin önem derecesi en yüksek seviyede tutulduğunda koşullar  $T=33.7^{\circ}\text{C}$ , başlangıç pH = 5.22, gliserol derişimi = 31.07 g/L olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucunda öngörülen hücre derişimi 1.7 mg/ml iken, 2.2 mg/ml derişimine ulaşılmış; öngörülen SOD aktivitesi ise 2.6 U iken, 2.0 U elde edilmiştir.

Öngörülen ve deneysel olarak elde edilen cevaplar arasındaki farklar incelendiğinde, maksimum hücre derişimi için %17.5, maksimum SOD aktivitesi için ise %11 fark bulunmuştur. Bu değerler kullanılabilir ve uygun değerlerdir. İki cevap için de ortak bir maksimum veren koşulların arandığı desirability fonksiyonu ile hücre derişimi ise,

öngörülen değerden %30 fazla bulunurken, SOD aktivitesi %23 daha az bulunmuştur. Buna göre, cevaplar (hücre derişimi ve SOD aktivitesi) tek tek maksimize edildiğinde, öngörülen değerlere daha yakın sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 5.15 Hücre ve SOD aktivitesini maksimize eden koşullar ve cevapları

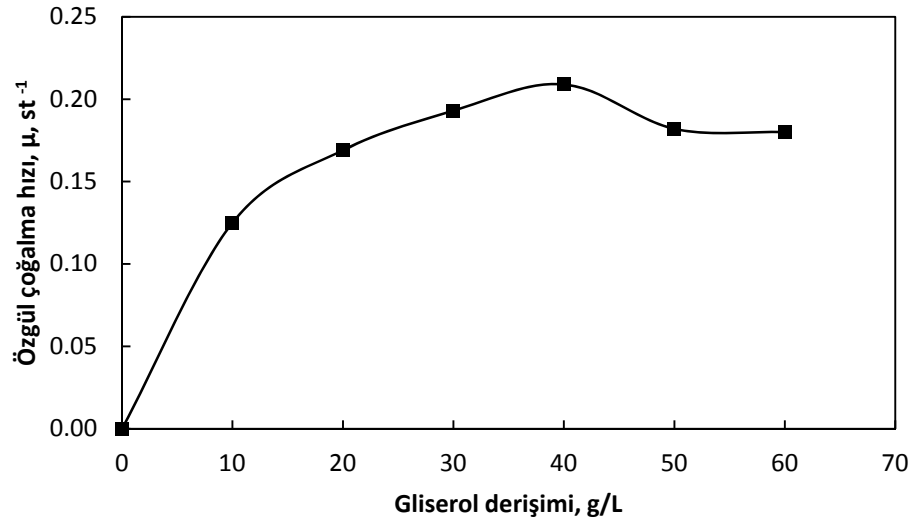
| Cevap           | T, °C | Başlangıç<br>pH<br>değeri | Gliserol<br>derişimi,<br>g/L | Öngörülen<br>cevap     | Elde edilen<br>deneysel<br>cevap |
|-----------------|-------|---------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Hücre, mg/ml    | 32.2  | 5.17                      | 39.27                        | 1.60                   | 1.32                             |
| SOD, U          | 33.9  | 5.47                      | 16.50                        | 2.70                   | 2.40                             |
| Hücre ve<br>SOD | 33.7  | 5.22                      | 31.08                        | hücre: 1.7<br>SOD: 2.6 | hücre: 2.2<br>SOD: 2.0           |

### 5.6 *R. glutinis*'in Çoğalma Kinetiği

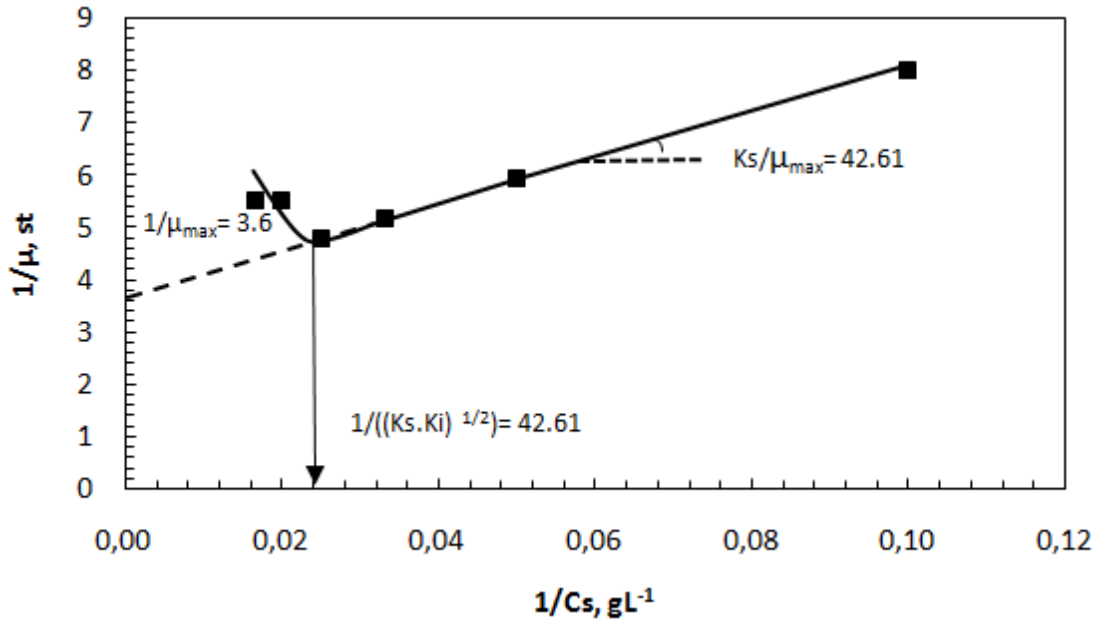
İncelenen karbon kaynakları arasında en yüksek antioksidan enzim aktivitelerini sağlayan substrat olan gliserol varlığında *R. glutinis*'in çoğalma kinetiği elde edilmiştir. Üretim sıcaklığı olarak, deneysel tasarım sonucunda hücre için en yüksek derişimi sağlayan 32.2°C seçilmiştir. Gliserol derişimleri 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g/L olarak belirlenmiştir. Belli zaman aralıklarında alınan örneklerle ölçülen hücre derişimlerinden özgül çoğalma hızları hesaplanmıştır (Şekil 5.57). Gliserol derişimi 50 ve 60 g/L değerlerinde, substrat inhibisyonu gözlenmiştir. Substrat inhibisyonu varlığında hücre çoğalması için kinetik model Eşitlik 5.6'da yer almaktadır.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} Cs}{Ks + Cs + (Cs^2 / Ki)} \quad (5.6)$$

Maksimum özgül çoğalma hızı ( $\mu_{\max}$ ), Monod sabiti ( $Ks$ ) ve inhibisyon sabiti ( $Ki$ ) şekil 5.58 yardımıyla elde edilmiştir.



Şekil 5.57 Başlangıç gliserol derişimi ile özgöl çoğalma hızının değişimi  
(3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton,  $T=32.2^{\circ}C$ ,  $N=150$  rpm)



Şekil 5.58 Substrat inhibisyonlu model; ( $1/\mu$ ;  $1/C_s$ ) grafiği

Substrat inhibisyonlu model için  $\mu_{max} = 0.278 \text{ st}^{-1}$ ,  $K_s = 11.84 \text{ g/L}$ ,  $K_i = 174.5 \text{ g/L}$  olarak elde edilmiştir. Bu verilere göre gliserolün oldukça yüksek derişimlerinde yüksek inhibisyon oluştuğu görölmektedir.

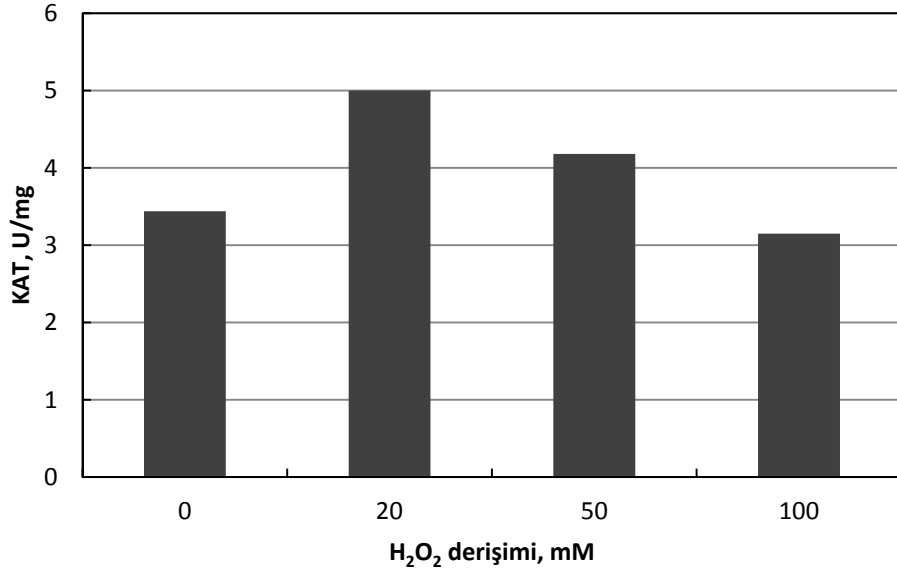
## 5.7 Radikal Oluşturucuların Etkisi

*Rhodotorula glutinis*'ten KAT ve SOD enzimlerinin üretiminin artırılması için üretim ortamı 24. saat sonunda belli süre ve/veya derişimlerde radikal oluşturucu etkenlere maruz bırakılmıştır. Bu etkenler; UV ışıma, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AAPH, metil viyolojen ve metilen mavisidir. İki ayrı grup halinde gerçekleştirilen deney setinin birinci grubunda, *R. glutinis* UYM ortamında 24 st çoğaltıldıktan sonra (T=30°C, N=150 rpm) farklı süre ve/veya derişimlerde UV ışıma, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin) dihidroklorür'e (AAPH) maruz bırakılmıştır. Bu grupta yalnızca KAT enzim aktivitesi takip edilmiştir. Radikal oluşturucu eklenmeyen UYM ortamında 24. st'de ölçülen enzim aktivitesi kontrol olarak kabul edilmiştir.

İlk olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etki süresi ve derişiminin etkisi incelenmiştir. Mayaların en fazla dayanabildiği H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi 100 mM olarak bildirilmiştir (Gille vd. 1993). Buna göre 24 st çoğalma sonunda ortama 50 ve 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 120 dk süre ile 30°C ve 150 rpm'de çalkalandıktan sonra yapılan ölçümlerde hiç aktivite gözlenemmiştir. Süre bir sonraki denemede 30 dk'ya indirilmiş ancak yine aktivite gözlenememiştir. Maruz kalma süresinin çok uzun olduğu düşünülerek, daha kısa süreler denenmiş ve radikal oluşturuculara maruz bırakma süresinin 8 dk olarak uygulanmasına karar verilmiştir. Çoğaltılmış hücrelerin 8 dk süre muamele edildikleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminin (20, 50, 100 mM) KAT aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek spesifik aktivitenin 20 mM derişimde elde edildiği (5 U/mg), derişim arttıkça aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.59). 100 mM derişimde ise kontrol ortamının (0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aktivite değerine göre daha düşük değer elde edilmesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek derişimlerinin inhibisyon etkisini göstermektedir.

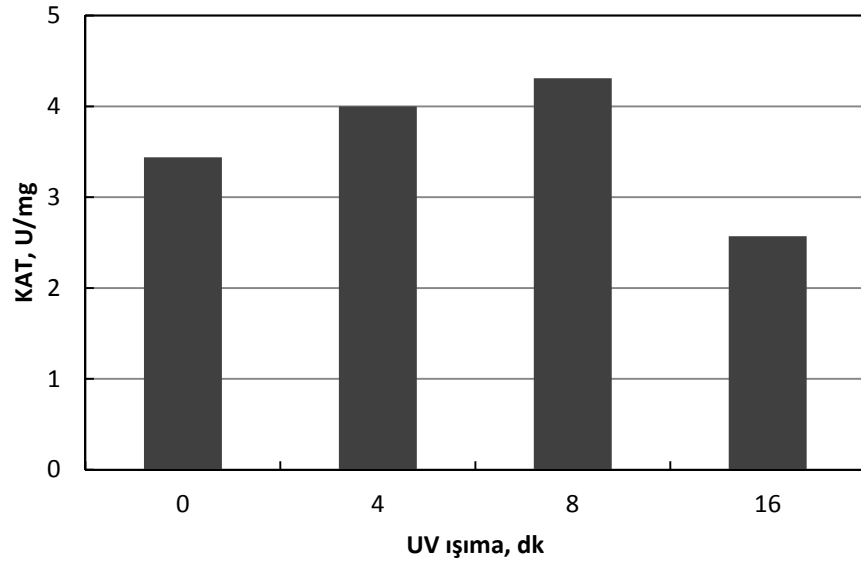
UYM ortamında ikinci olarak incelenen radikal oluşturucu etken, çeşitli mekanizmalarla ve değişik türden birçok radikalın oluşmasına neden olan UV ışımadır. *R. glutinis* UYM ortamında 24 st çoğaltıldıktan sonra, 30°C ve 150 rpm'de 4, 8 ve 16 dk'lar boyunca UV ışımaya maruz bırakılmıştır. Ölçülen KAT aktiviteleri kıyaslandığında, en yüksek spesifik aktiviteye 8. dk'da ulaşıldığı (4.31 U/mg), 16. dk'da ise inhibisyon olduğu görülmüştür (Şekil 5.60).

Birinci grubun son deney setinde kullanılan AAPH, ortamda önce karbon merkezli radikaller oluşturmakta, bu radikaller de oksijen ile tepkimeye girerek peroksil radikalleri oluşturmaktadır (Sakaki vd. 2002).

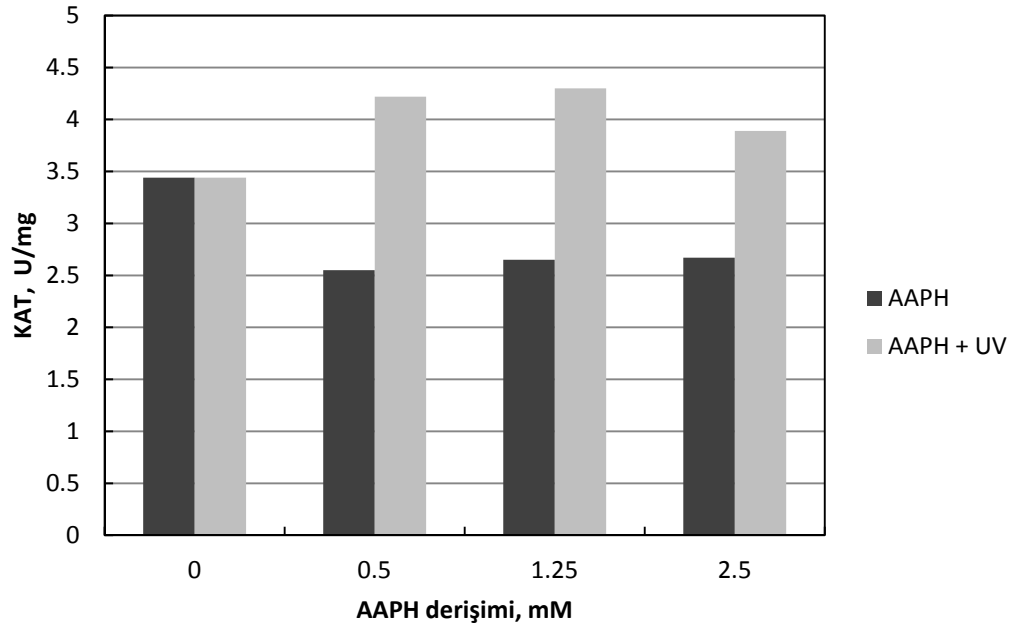


Şekil 5.59 KAT spesifik aktivitesi üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminin etkisi (UYM, T=30°C, N=150 rpm, t=8dk)

UYM ortamına 24 st çoğalma sonunda eklenen AAPH, incelendiği 3 derişimde de (0.5, 1.25, 2.5 mM) KAT spesifik aktivitesi üzerinde % 22-26'lık olumsuz bir etki yaratmıştır (Şekil 5.61). Olumsuz etkinin nedeni araştırıldığında, AAPH'nin ılıman koşullarda radikal oluşturma hızının düşük olduğu, ancak UV ışımaya altında artırılabilirdiği bilgisine ulaşılmıştır (Pasanphan vd. 2010). AAPH ile yeniden planlanan deney setinde, gerekli miktarda AAPH tek başına 20 dk boyunca UV ışımaya maruz bırakılmış, daha sonra ortama eklenmiştir. Bu şekilde yinelenen deney setinde AAPH'nin radikal oluşturma hızı artırılmış ve her üç derişimde de (0.5, 1.25, 2.5 mM) KAT aktivitesini artırdığı bulunmuştur (sırasıyla; 4.22 U/mg, 4.3 U/mg, 3.89 U/mg) (Şekil 5.61). İncelenen radikal oluşturmalar arasında KAT spesifik aktivitesindeki en yüksek artış kontrol ortamına (UYM) göre, 1.45 kat artış ile 5 U/mg olarak, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılarak elde edilmiştir. Onu 1.25 kat artış ve 4.3 U/mg ile 1.25 mM AAPH+UV takip etmiştir.



Şekil 5.60 KAT spesifik aktivitesi üzerine UV ışıma süresinin etkisi (UYM, T=30°C, N=150 rpm)

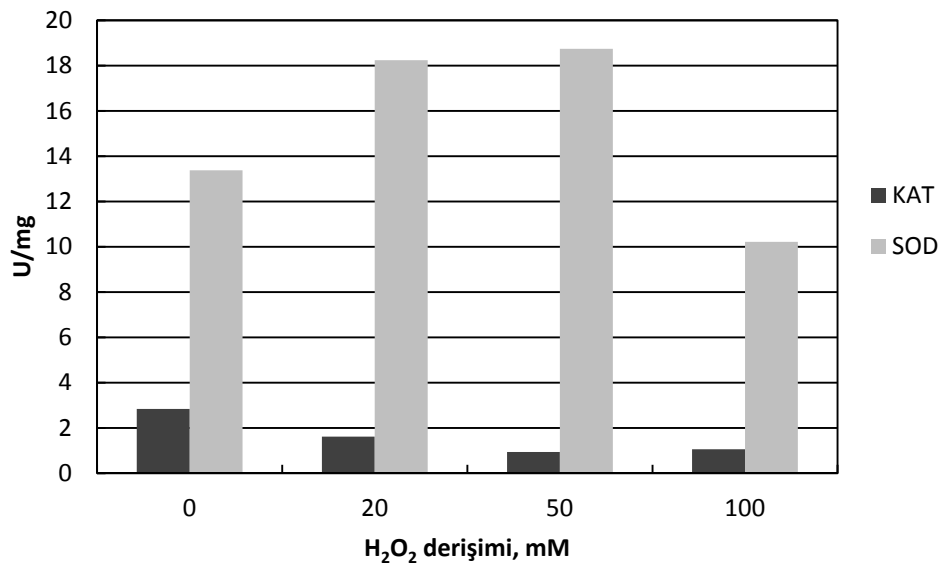


Şekil 5.61 KAT spesifik aktivitesi üzerine AAPH derişimi ve AAPH derişimi + UV etkisi (UYM, T=30°C, N= 150 rpm)

Radikal oluşturuçuların enzim aktiviteleri üzerine etkisinin incelendiğı ikinci grup deney setinde ise, deneysel tasarım ile SOD aktivitesi için en yüksek değeri sağlayan ortam bileşimi ve koşulları kullanılmıştır (3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, başlangıç pH= 5.47, T=33.9°C ve 150 rpm). Bu sette radikal oluşturuçucu olarak

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV ışına ve AAPH'nin yanı sıra, metil viyolojen ve metilen mavisi de kullanılmıştır. Analizlerde hem SOD hem de KAT aktivitesi takip edilmiştir.

İlk olarak 20, 50 ve 100 mM derişimlerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etkisi incelenmiştir. Buna göre, incelenen tüm derişimler KAT aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi yaratmıştır (Şekil 5.62). Birinci grupta incelenmiş olan UYM ortamında KAT üretimini arttıran H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimleri, gliserol içeren ortamda olumsuz sonuçlar vermiştir. SOD aktivitesi ise 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye kadar artmış (18.74 U/mg), 100 mM değerinde ise azalmıştır.

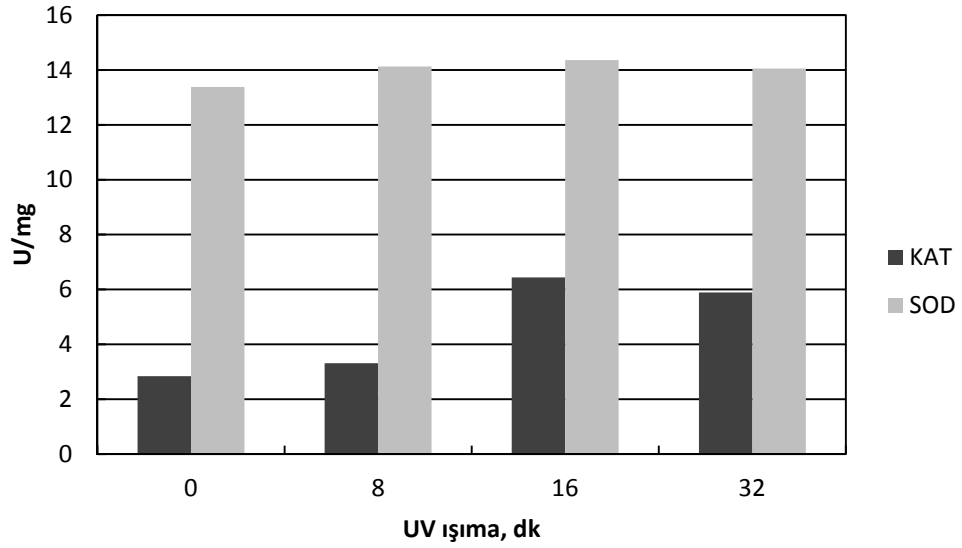


Şekil 5.62 KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminin etkisi (3 g/Lmaya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, pH= 5.47, T=33.9°C, N=150 rpm)

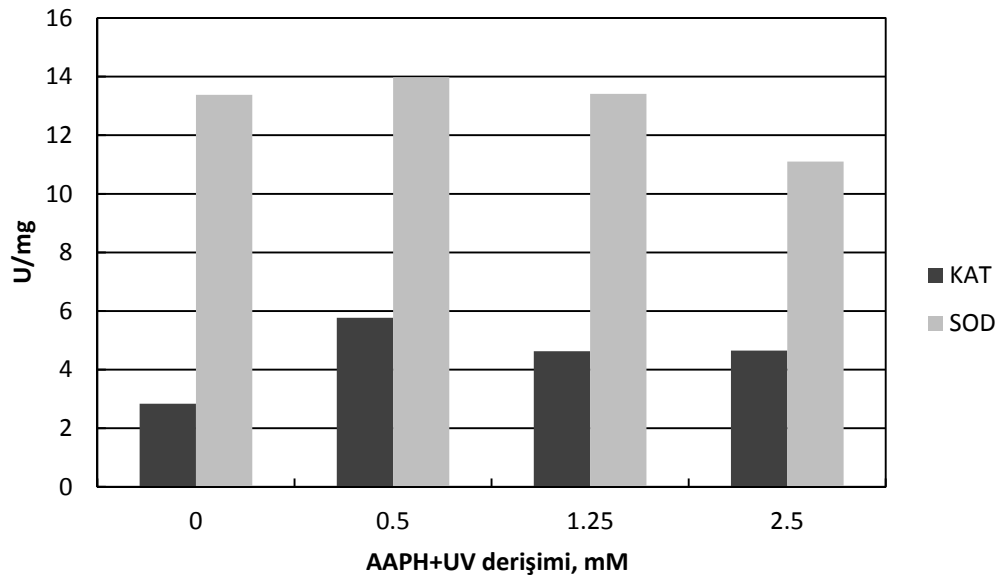
İkinci olarak incelenen UV ışına etkisi, 8, 16 ve 32 dk boyunca incelenmiştir. UYM ortamının kullanıldığı birinci grup sette 16 dk'da inhibisyon görülürken, gliserol içeren ortamda inhibisyon gözlenmemesi üzerine UV ışına etki süresi 32 dk'ya çıkartılmıştır. UV ışınanın SOD aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (en fazla %7 artış) (Şekil 5.63). KAT aktivitesi ise, hücreler 16 dk süre ile UV ışınaya maruz kaldığında, 2.3 kat artarak 6.44 U/mg protein değerine ulaşmıştır.

AAPH, birinci grup deney setinde olduğu gibi, üretim ortamına eklenmeden önce 20 dk boyunca UV ışınaya maruz bırakılmıştır. 0.5, 1.25, ve 2.5 mM derişimlerin incelendiği deney setinde hem KAT hem de SOD aktiviteleri 0.5 mM AAPH derişiminde artmış

(sırasıyla 5.77 U/mg ve 13.98 U/mg), daha sonraki derişimlerde ise azalmıştır (Şekil 5.64).



Şekil 5.63 KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerine UV ışımanın etkisi (3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, pH= 5.47, T=33.9°C , N=150 rpm)

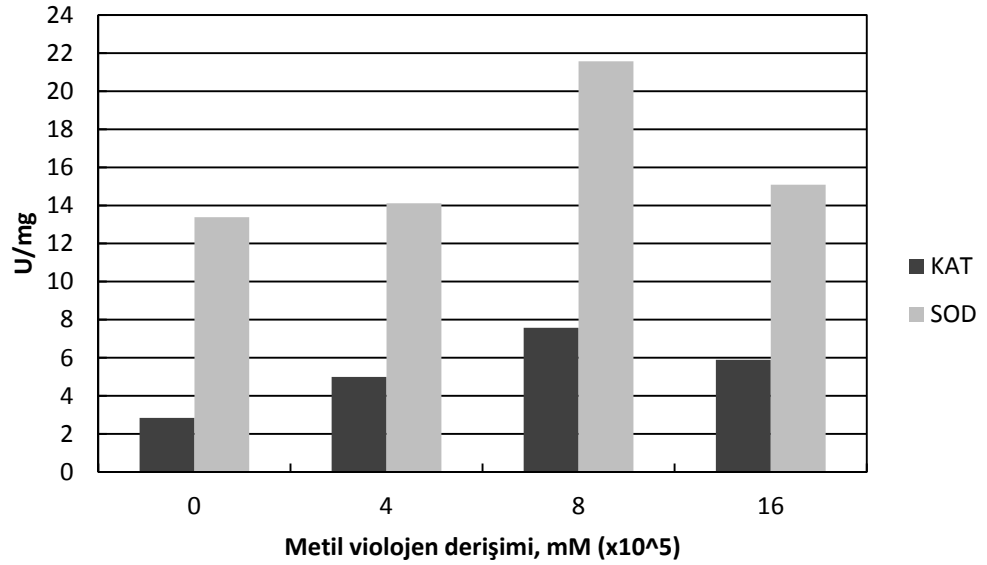


Şekil 5.64 KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerine AAPH derişiminin etkisi (3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, pH= 5.47, T=33.9°C, N=150 rpm)

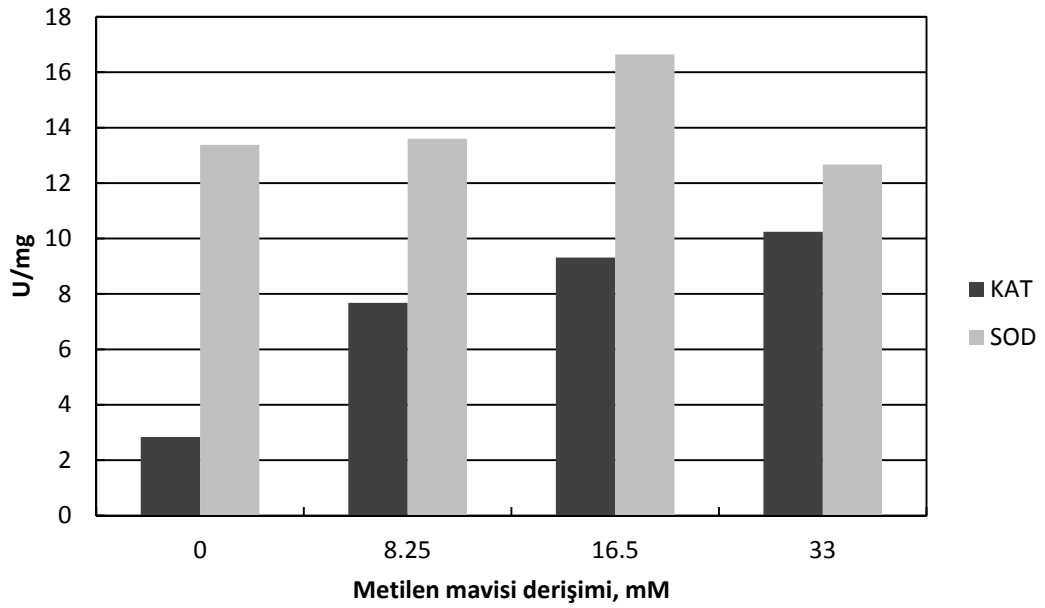
Metil viyolojen ya da parakuat olarak anılan ve ortamda süperoksit radikali oluşturan katkı maddesi 24 st çoğalmadan sonra ortama  $4 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-5}$  ve  $16 \times 10^{-5}$  mM

derişimlerde eklenmiştir.  $8 \times 10^{-5}$  mM metil viyolojen, *R. glutinis*'in hem SOD hem de KAT spesifik aktivitelerini sırasıyla 1.6 kat (21.57 U/mg), ve 2.7 kat (7.57 U/mg) arttırarak en olumlu etkiyi yaratmıştır.  $16 \times 10^{-5}$  mM derişiminde ise aktiviteler üzerine inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 5.65).

Son olarak üretim ortamında singlet oksijen radikali oluşturan metilen mavisinin 8.25, 16.5 ve 33 mM derişimleri incelenmiştir. Tüm derişimlerin KAT spesifik aktivitesi üzerinde artış yarattığı ve en yüksek değerin 33 mM metilen mavisi ile (10.24 U/mg) elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 5.66). SOD spesifik aktivitesinde en büyük artış olan 1.24 kat artışı 16.64 U/mg değeri ile 16.5 mM derişimindeki metilen mavisi sağlamıştır.



Şekil 5.65 KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerine metil viyolojen derişiminin etkisi (3g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, pH= 5.47, T=33.9°C, N= 150 rpm)



Şekil 5.66 KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerine metilen mavisi derişiminin etkisi (3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16.5 g/L gliserol, pH= 5.47, T=33.9°C, N=150 rpm)

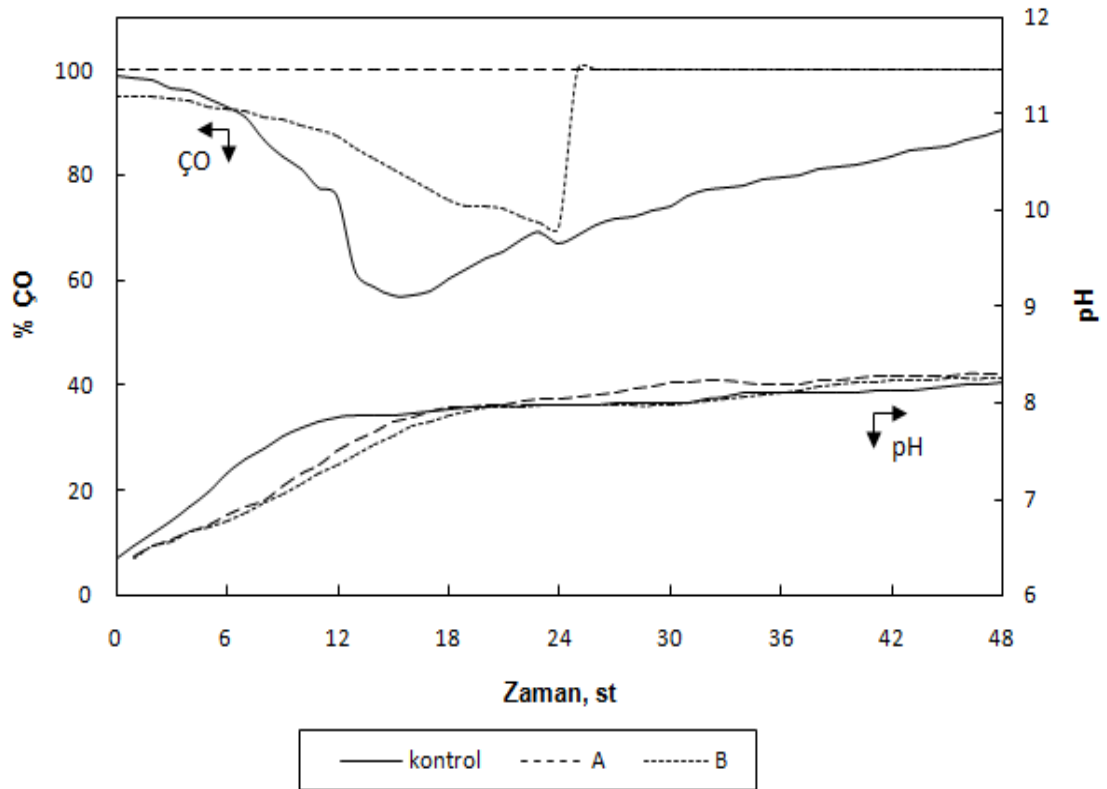
### 5.8 Çözünmüş Oksijen (%) Etkisi

*Rhodotorula glutinis*'ten SOD ve KAT enzimlerinin üretimine, radikal oluşumunda en etkin role sahip olan oksijenin etkisinin araştırılması amacıyla, biyoreaktörde gerçekleştirilecek deneyler tasarlanmıştır. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen etkisinin belirlenebilmesi için kontrol ortamı olarak tasarlanan deneyde üretim ortamındaki çözünmüş oksijen (ÇO) %100 olduğunda aşılama yapılmış ve üretim boyunca  $Q=1$  L/dk ( $Q/V= 0.67$  L/L dk) kuru hava beslemesi yapılmıştır. Oksijenin etkisi iki ayrı ÇO işletimi (A, B) kullanılarak incelenmiştir. İlk işletimde (A), çoğalmanın başından sonuna kadar ortamda %100 ÇO sağlanmıştır. Bu, sisteme  $Q=1$  L/dk kuru hava beslenirken ÇO azaldığında fazladan saf oksijen gazı gönderilerek sağlanmıştır. İkinci işletimde ise (B), yine %100 ÇO ile deneye başlanmış, ilk 24 st sadece  $Q=1$  L/dk kuru hava beslenerek, ortamdaki ÇO serbest bırakılmış, 24. st sonunda saf oksijen gazı gönderilerek deney sonuna kadar %100 ÇO sağlanmıştır. Çalışmalarda, üretim ortamı olarak, deneysel tasarım ile SOD aktivitesi maksimize eden ortam kullanılmıştır (16.5 g/L gliserol, 3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, T=33.9°C). 1.5 L toplam çalışma hacmine,

1/10 oranında aşılama yapılmış olan ortam N=500 rpm’de çalıştırılmış ve tüm deneylerde Q=1 L/dk akış hızında kuru hava beslenmiştir.

Üretim ortamlarındaki pH ve ÇO değerlerinin değişimleri Şekil 5.67’te verilmiştir. Kontrol ortamında ÇO değerlerinin 15. st civarına kadara azaldığı, daha sonra artmaya başladığı gözlenmektedir. Aynı saatler, ortam pH değerinin de arttığı zamanla eşleşmekte ve aynı zamanda üstel çoğalma fazının ortalarına denk gelmektedir (Şekil 5.68). Daha sonra hücre azalmasının yavaşlamasıyla birlikte ortamdaki ÇO değeri de artmaya başlamaktadır. Her üç işletimde de, pH değişimlerinin benzer oldukları görülmektedir (Şekil 5.67).

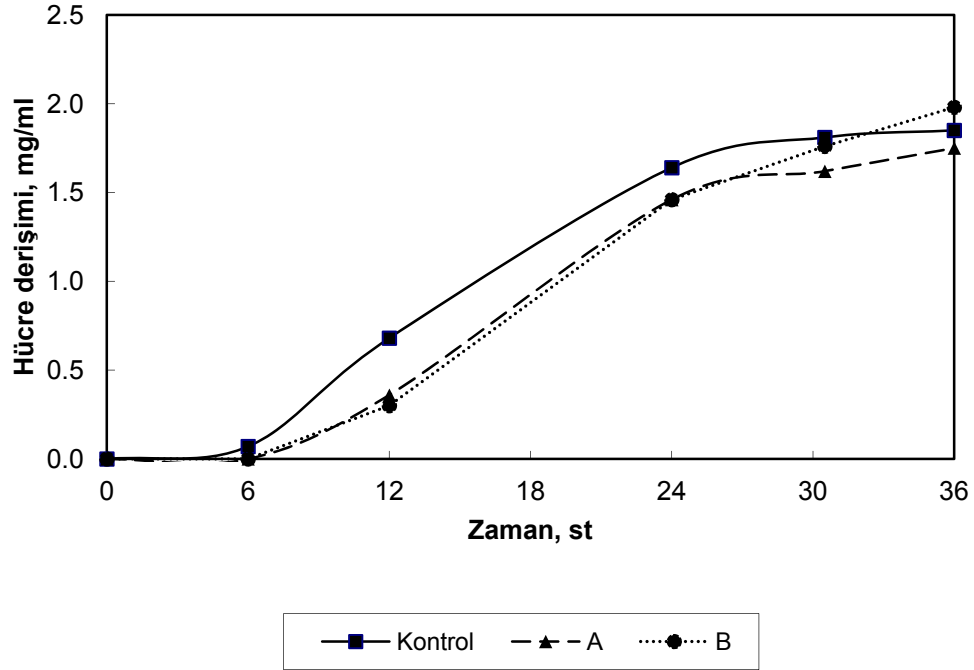
Ulaşılan hücre derişimleri incelendiğinde (Şekil 5.68), aralarında büyük fark olmamakla birlikte işletim B’nin daha yüksek derişime ulaştığı görülmektedir (2.47 mg/ml).



Şekil 5.67 Biyoreaktörde çözünmüş oksijen (ÇO) ve pH değerlerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st’den itibaren %100 ÇO, B: t=24 st’den itibaren %100 ÇO)

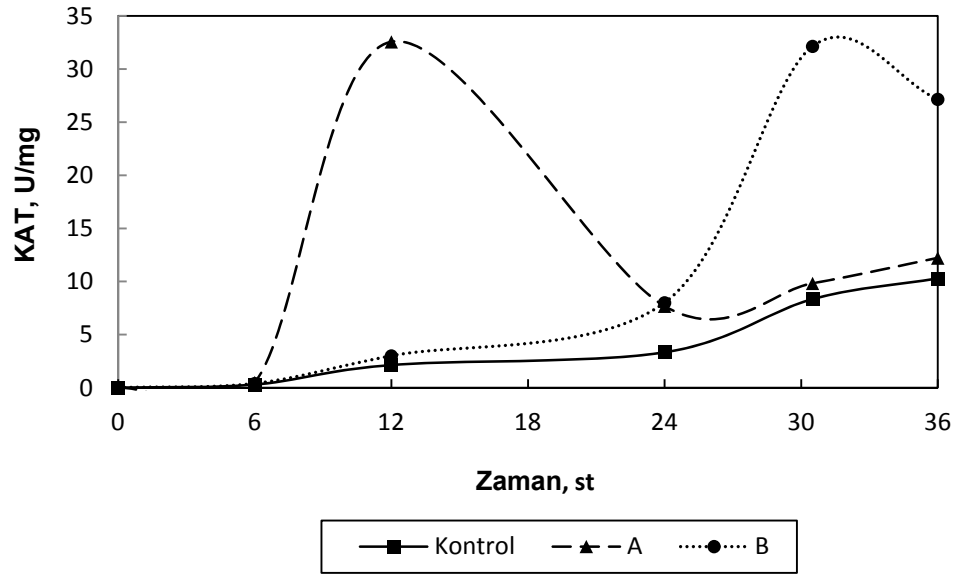
İşletim A'da ise, kontrol ortamına göre biraz daha az çoğalma olmasına rağmen, son saatlerde aynı hücre derişimine ulaştıkları gözlenmektedir (2.24 mg/ml).

KAT spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 5.69'da verilmiştir. Burada çözünmüş oksijen derişiminin KAT üzerindeki olumlu etkisi net olarak görölmektedir. Baştan itibaren oksijenin en yüksek seviyede tutulduğu işletim A'da 12. st'de spesifik aktivite kontrol ortamına göre 16 kat artarak 32.2 U/mg değerine ulaşmıştır. İlerleyen saatlerde ise kontrol ortamına benzer bir değer ve değişim göstermiştir. 24. st'den itibaren %100 ÇO'nun kullanıldığı işletim B'de ise, 30. st'de aktivite 3.8 kat artarak yine 32.1 U/mg değerine ulaşmıştır.

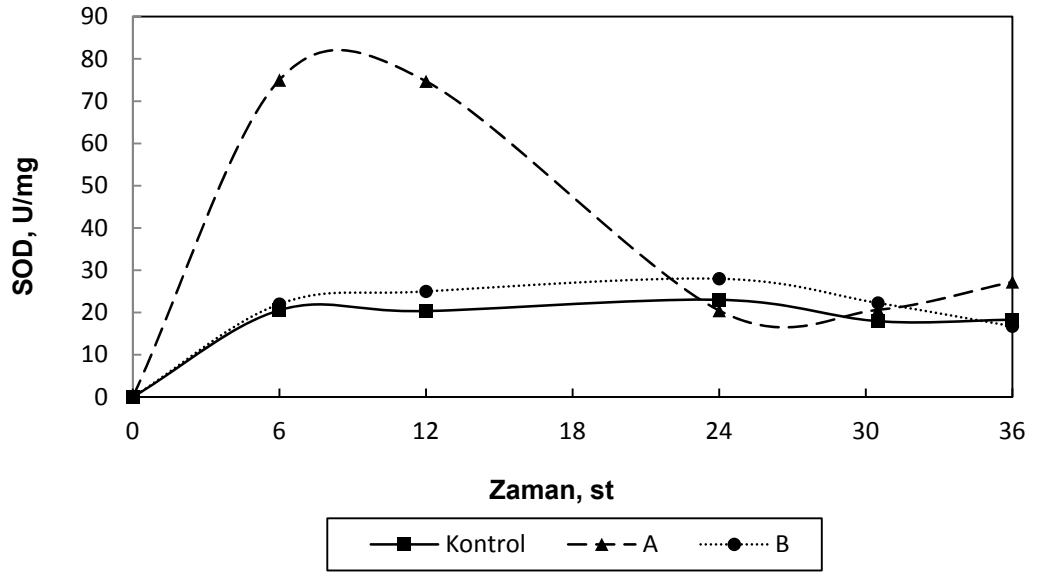


Şekil 5.68 Biyoreaktörde hücre derişimlerinin zamanla değişimi (Q=1 L/dk, 0.67 L/Ldk, T=33.9°C, 500 rpm, V=1.5 L; kontrol: serbest işletim, A: t=0 st'dan itibaren %100 ÇO, B: t=24 st'den itibaren %100 ÇO)

SOD spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 5.70’te yer almaktadır. Burada KAT enziminden farklı olarak oksijenin aktiviteyi artırıcı etkisi yalnızca işletim A’da gözlenmiştir. Bu işletimde 6 ve 12. saatlerde kontrol ortamına göre 3.6 kat artış sağlanarak 75 U/mg değerlerine ulaşılmıştır. SOD spesifik aktivitesi daha sonra azalmıştır. İşletim B’de ise oksijenin SOD aktivitesi üzerinde artırıcı bir etkisi olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.69 Biyoreaktörde KAT spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi ( $Q=1$  L/dk,  $T=33.9^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm,  $V=1.5$  L; kontrol: serbest işletim, A:  $t=0$  st’den itibaren %100  $\text{CO}$ , B:  $t=24$  st’den itibaren % 100  $\text{CO}$ )



Şekil 5.70 Biyoreaktörde SOD spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi ( $Q=1$  L/dk,  $T=33.9^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm,  $V=1.5$  L; kontrol: serbest işletim, A:  $t=0$  st'dan itibaren %100  $\text{CO}$ , B:  $t=24$  st'den itibaren %100  $\text{CO}$ )

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

### 6.1 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Hücre çoğalması, enzim üretimleri ve aktiviteleri üzerinde en önemli etkiye sahip çevresel faktörlerden birisi sıcaklıktır. Bu çalışmada sıcaklığın *R. glutinis*'in hücre derişimi, özgül çoğalma hızı, hücre dışı pH değişimi, SOD ve KAT enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. İncelenen her özellik için uygun olan sıcaklıkların birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Hücre derişimi ve özgül çoğalma hızları açısından değerlendirildiğinde, en uygun sıcaklığın 30°C olduğu belirlenmiştir. Literatürde *R. glutinis*'in çoğalması üzerine sıcaklık etkisini inceleyen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmalardan bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Aksu ve Eren (2007) IPRAŞ atık suyundan elde ettikleri *R. glutinis*'i 20 g/L glukoz, 2.5 g/L maya ekstraktı, 2 g/L malt ekstraktı, 2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren 150 ml hacmindeki ortamda çoğaltmışlardır. Sıcaklık etkilerinin incelenmesi amacıyla 25°C, 30°C ve 35°C'yi deneyerek 5 g/L olan en yüksek hücre derişimine 30°C'de ulaşmışlardır. Martinez vd. (2006) üzümünden elde edilen *R. glutinis*'i (L-1816) %2 glukoz, %2 pepton ve %1 maya ekstraktı içeren 125 ml hacmindeki ortamda çoğaltmışlardır. Sıcaklık etkilerinin incelenmesi amacıyla 20°C, 25°C, 28 °C ve 37°C kullanılmış ve en uygun sıcaklığın 28°C olduğu bulunmuştur.

Bu doktora çalışmasında ise UYM ortamında en yüksek hücre derişimi olarak 4.3 mg/ml olarak elde edilmiştir. Literatürde üretim ortamlarının farklı substrat bileşimleri ile zenginleştirilerek hücre derişimlerinin artırıldığı çalışmalardan örnekler şöyledir: Koleva vd. (2008) *R. glutinis* (NBIMCC583) kullanarak %1 maya ekstraktı, %1 bakteopepton ve %2 glukoz içeren ortamda 30°C'da 7.5 mg/ml hücre derişimine ulaşmışlardır. Oudin vd. (1999) çalışmalarında *R. glutinis* CBS 3044 kullanmışlar ve UYM ortamından dört kat daha fazla şeker içeren ve farklı iyonlar içeren 20 ml hacmindeki üretim ortamında 24°C'da 7 mg/ml hücre değerine ulaşmışlardır. Buzzini ve Martini (1999) *R. glutinis*'in 14 farklı alt türü ile gerçekleştirdikleri çalışmada altı

adet farklı substrat bileşimi içeren ortamlar deneyerek 8 mg/ml hücre derişimine ulaşmışlardır.

Özgöl çoğalma hızları ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında birbirinden farklı sonuçlar göze çarpmaktadır. Koleva vd. (2008), *R. glutinis*'ten (NBIMCC583) SOD ve KAT enzimleri üretimi için inceledikleri ortamda 30°C'da özgöl çoğalma hızını 0.3 st<sup>-1</sup> olarak bulmuşlardır. Aksu ve Eren (2007) *R. glutinis*'ten karotenoid üretimi için en iyi ortam koşullarında ve 30°C sıcaklıkta özgöl çoğalma hızını 0.24 st<sup>-1</sup> olarak bulmuşlardır. Martinez vd. (2006) çalışmalarında *R. glutinis*'ten  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaz üretimi için optimum sıcaklıkta ve farklı tuz bileşimlerinde özgöl çoğalma hızlarını incelediklerinde en yüksek değeri 0.198 st<sup>-1</sup> olarak bulmuşlardır. Bu doktora çalışmasında ise 30°C ve 35°C sıcaklıklar için özgöl çoğalma hızı 0.15 st<sup>-1</sup> değeri elde edilmiştir.

Literatürde *R. glutinis*'in hücre dışı pH değerinin farklı sıcaklıklarda zaman ile değişimini takip eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada ilgi çeken nokta, hücre dışı pH değerinin önce zamanla azalması, durağan fazın başlarında aniden artmasıdır. Bu değişimin çoğalmanın fazla olduğu sıcaklıklarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir.

Bu doktora çalışmasında ölçülen enzim aktiviteleri toplam aktivite (U), birim hacim başına aktivite (U/ml), birim protein başına spesifik aktivite (U/mg), birim kuru hücre başına spesifik aktivite (U/mg kh) ve spesifik verimlilik (U/mg kh/st) açısından ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her açıdan 'en iyi' sonucu sağlayan koşulların birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Literatürde hücre içi enzimlerin genellikle birim protein başına spesifik aktivite (U/mg) olarak değerlendirildiği göz önünde bulundurularak, bu çalışmada en yüksek U/mg değerlerini sağlayan koşullar temel alınarak ilerlenmiştir.

Sıcaklığın KAT ve SOD spesifik aktiviteleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, en yüksek değerlerin oldukça düşük bir sıcaklık olan 10°C'ta sırasıyla 23 U/mg ve 185 U/mg olarak elde edildiği görülmüştür. Literatürde *R. glutinis*'ten KAT ve SOD enzim aktivitelerinin sıcaklıkla değişimini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. *R. glutinis*'ten KAT ve SOD enzim aktivitelerinin bir arada incelendiği tek çalışma olan

Koleva vd. (2008), en yüksek KAT aktivitesini etanolü substrat olarak kullanarak 22 U/mg değerinde, en yüksek SOD aktivitesini ise yine etanolü substrat olarak kullanarak 28 U/mg değerinde elde etmişlerdir.

*Rhodotorula glutinis* mayası, incelenen antioksidan enzim aktiviteleri açısından diğer hücrelerle kıyaslandığında, bazılarına göre daha düşük, bazılarına göre daha yüksek değerler sağlamıştır. Diğer hücrelerden üretimlere yönelik örnek bazı çalışmalar şöyledir: *Debaryomyces hansenii* ile yapılan bir çalışmada en yüksek SOD aktivitesi 170 U/mg (Orozco vd. 1998), *Cryptococcus sp.* ile yapılan bir çalışmada 110 U/mg SOD aktivitesi (Abe vd. 2001) elde edilmiştir. Safran bitkisinden ise en yüksek SOD aktivitesi 9 U/mg olarak elde edilmiştir (Attar vd. 2004).

Doktora çalışmasının ön denemelerinde ve sıcaklık etkilerinin incelendiği deneylerde tüm parametrelerin etkileri 144 st boyunca takip edilmiştir. Bu süre içinde SOD ve KAT enzim aktivitelerinin zamanla değişimlerinde çoğunlukla iki adet maksimum olduğu gözlenmiştir. Daha sonraki deneylerde süre 96 st'e kısaltılmış; bu nedenle de bazı koşullarda aktivitelerin ulaştığı ikinci maksimum değerler gözlem dışı kalmıştır. Ancak çalışma boyunca incelenen çoğu parametre için elde edilen aktivite grafiklerinde 96. st sonunda ikinci bir artma eğilimi gözlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde, benzer profilin, *Humicola lutea*'dan SOD enzimi üretiminde de elde edildiği görülmektedir. Krumova vd. (2007)'nin yaptıkları bu çalışmada birinci maksimum aktivite değerinin durgunluk fazının başlangıcında, ikinci maksimum aktivite değerinin de durgunluk fazının sonlarına doğru olduğunu bulmuşlardır. Bir antioksidan enzim olan SOD'nin durgunluk fazının sonlarına doğru ikinci maksimum değerini verme nedeninin, 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. Ayrıca araştırmacılar benzer davranışın *Candida maltosa* ve *Cordyceps militaris*'ten SOD üretiminde de gözlendiğini belirtmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmadaki KAT enziminin de SOD ile benzer amaçlar için üretilen bir enzim olduğu göz önünde bulundurularak, zamanla iki adet maksimum verme sebebi yukarıda anlatıldığı gibi açıklanabilir.

İncelenen antioksidan enzim aktiviteleri spesifik verimlilik açısından değerlendirildiğinde KAT enzimi için 15°C hariç, tüm sıcaklıklar için en yüksek değerlerin 24. saatte elde edildiği belirlenmiştir. Burada spesifik aktivite değerlerinden farklı olarak daha yüksek sıcaklıkların, KAT için 25°C, SOD için ise 15°C, en iyi sonuçları sağladığı belirlenmiştir.

## **6.2 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Başlangıç pH Değerinin Etkisi**

Hücre çoğalması, enzim üretimleri ve aktiviteleri üzerinde en önemli etkiye sahip çevresel faktörlerden bir diğeri de ortam pH değeridir. Başlangıçta ayarlandıktan sonra serbest bırakılan pH değerinin hücre derişimi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenirken, özgül çoğalma hızları açısından oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. UYM ortamının doğal pH değeri olan pH = 5.67 ile en yüksek özgül çoğalma hızı olan 0.16 st<sup>-1</sup> değerine ulaşılmıştır. Literatürdeki veriler incelendiğinde, Cho vd. (2001) *R. glutinis*'i hücre dışı polisakkaritlerin incelenmesi amacıyla 30 g/L glukoz, 2.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>, and 0.1 g/L NaCl içeren 100 ml besiyerinde çoğaltmışlardır. Başlangıç pH değeri olarak 2-9 değerleri arası taranmış, en yüksek hücre derişimi değeri pH = 7'de 7 mg/ml olarak ulaşılmıştır. Martinez vd. (2006) üzümünden elde edilen *R. glutinis*'i (L-1816) %2 glukoz, %2 pepton ve %1 maya ekstraktı içeren 125 ml hacmindeki ortamda çoğaltmışlardır. pH etkilerinin incelenmesi amacıyla pH = 4-7 arası araştırılmış ve pH = 5.2'nin çoğalma için en uygun pH olduğu bulunmuştur ( $\mu=0.197$  st<sup>-1</sup>). Aksu ve Eren (2007)'nin başlangıç pH değeri olarak pH = 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 değerlerinin inceledikleri çalışmada *R. glutinis* için en yüksek özgül çoğalma hızına pH = 6'da (0.24 st<sup>-1</sup>), en yüksek hücre derişimine ise pH = 6.5'te (4.9 g/L) ulaştıkları belirlenmiştir. Wang vd. (2008) ise *R. glutinis*'ten SOD üretimini inceledikleri çalışmalarında pH = 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 değerlerini incelemişler ve hücre çoğalması açısından en yüksek değeri 1.6 g/L yaş hücre olarak pH = 5.0'da elde etmişlerdir.

Hücre dışı pH değerlerinin, sıcaklık etkilerinin incelendiği bölümde zamanla önce azalıp sonra arttığı belirlenmişti. Bu bölümde hücrelerin yine aynı profili sergileme

eğiliminde olduğu, ancak başlangıç pH değerinin hali hazırda düşük olduğu durumlarda (pH = 4.0, 4.5, 5.0) ise, daha fazla bir azalma olmadığı ve durgunluk fazının başlangıcına denk gelen pH artışının korunduğu belirlenmiştir.

KAT enzim aktivitelerinin zamanla değişimleri spesifik aktiviteler açısından incelendiğinde, en yüksek değer pH = 5 başlangıç değerinde 11.29 U/mg olarak; en yüksek SOD spesifik aktivite değerinin ise pH = 4 başlangıç ortamında 13.65 U/mg olarak elde edildiği belirlenmiştir. Aynı başlangıç pH değerleri, spesifik verimlilik değerleri açısından da en yüksek değerleri sağlamıştır. Literatürde, *R. glutinis*'ten SOD üretiminin incelendiği bir çalışmada, başlangıç pH = 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 incelenmiş ve en yüksek aktiviteye pH = 5.0 değerinde 405 U/mg yaş hücre olarak ulaşılmıştır (Wang vd. 2008). Literatürde *R. glutinis*'ten KAT enzim aktivitesinin başlangıç pH değeri ile değişimini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sarkar ve Suraishkumar (2011), doğal çevrede en yaygın iki stres olan pH ve sıcaklık etkilerinin, hücrelerde süperoksit radikali oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis* ile gerçekleştirdikleri çalışmada pH = 5, 6, 8 ve 9 değerlerini incelemişler ve 8 ve 9 değerlerinde hücredeki süperoksit radikali seviyelerinin sırasıyla %22 ve 160 olarak belirlemişlerdir. Bir saat boyunca 42, 45, 48 ve 55°C değerlerinde sıcaklık stresine maruz bırakılan hücrelerde ise süperoksit radikali seviyeleri sırasıyla % 52, 150, 220 ve 314 olarak elde edilmiştir (optimum çoğalma sıcaklığı 37°C). Bu bilgiler ışığında, süperoksit radikalini elimine eden SOD enziminin bu streslerden daha fazla etkilenmesi beklenmektedir. Bu çalışmada elde edilen sıcaklık ve pH verileri bu açıdan değerlendirildiğinde, SOD spesifik aktivitesinin en uygun çoğalma pH değeri olan pH = 5.67'den 4.00 değerine düştüğünde 1.46 kat arttığı, KAT spesifik aktivitesinin ise azaldığı, ortam sıcaklığının en uygun değer olan 30 °C'dan 10°C değerine düştüğünde ise SOD spesifik aktivitesinin 8.15 kat, KAT spesifik aktivitesinin ise 2.82 kat arttığı belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, SOD enziminin bu streslerden KAT enzime göre daha fazla etkilendiği görülmektedir.

### 6.3 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

*R. glutinis*'in çoğalması, KAT ve SOD aktiviteleri üzerine karbon kaynaklarının etkisinin incelenmesi amacıyla glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, sukroz, laktoz, ksiloz, sorbitol ve gliserolün etkileri incelenmiştir. Bu karbon kaynakları ile elde edilen sonuçlar, sıcaklık ve pH etkisinin incelendiği ortam olan UYM ortamı ile kıyaslanmıştır. Hücre derişimleri ve özgül çoğalma hızları açısından değerlendirildiğinde en yüksek değerler zengin şeker içeriğine sahip olan malt özütü içeren UYM ortamında elde edilmiştir (4.23 mg/ml). UYM'nin ardından monosakkaritler arasında glukoz en yüksek hücre derişimi sağlarken (1.94 mg/ml), galaktoz en yüksek özgül çoğalma hızını sağlamıştır (0.11 st<sup>-1</sup>). Disakkaritler arasında ise sukroz en yüksek hücre derişimi sağlarken (1,26 mg/ml), maltoz en yüksek özgül çoğalma hızını sağlamıştır (0.08 st<sup>-1</sup>). Literatürde *R. glutinis*'ten pigment üretimine yönelik olarak yapılan bir çalışmada, ksiloz, riboz, arabinoz, glukoz, fruktoz, galaktoz, sukroz, laktoz ve maltozun etkisi C/N=40:1 olacak şekilde, 2 g/L sodyum nitrat varlığında incelenmiştir (Latha vd. 2005). On iki gün boyunca yapılan üretimler sonucunda monosakkaritlerden galaktozun (12 g/L), disakkaritlerden ise sukrozun (10 g/L) en yüksek hücre derişimini sağladıkları belirtmişlerdir. *R. glutinis*'ten SOD üretiminin incelendiği bir başka çalışmada ise, karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, maltoz ve nişasta kullanılmıştır (Wang vd. 2008). En yüksek hücre derişimine 1.71 g/L olarak 20 g/L sukroz kullanıldığında ulaşılmıştır.

Janda ve Hedenström, 1974 yılında yayınladıkları çalışmalarında bazı disakkaritlerin *R. glutinis*'e taşınım olaylarını ayrıntılı olarak incelemişlerdir. *R. glutinis*'in sukrozu parçalayabilmek için çözeltiye invertaz enzimi salgıladığını belirtmişler, maltozu ise spesifik alım sistemleri ile hücre içine aldıktan sonra parçaladığını bildirmişlerdir. Buna göre bu çalışmada maltozun sukroza göre daha yüksek özgül çoğalma hızı sağlamasının nedeni, direk hücre içine alınarak kullanılmaya başlanması olarak yorumlanmıştır.

Ayrıca Janda ve Hedenström (1974), sukroza bağlı olan glukozun normal glukozu göre daha yavaş tüketildiğini belirtmişlerdir. Buna göre, invertaz enzimi ile gerçekleşen hidroliz tepkimesi bu sistemde kısıtlayıcı basamak olmaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre hem hücre derişimi açısından (Şekil 5.28) hem de özgül çoğalma hızları açısından değerlendirildiğinde (Çizelge 5.5) glukozun sukroza göre daha yüksek değerler sağladığı görülmektedir. Aynı çalışmada incelenen disakkaritlerin *R. glutinis* tarafından tüketim hızlarının sukroz > trehaloz > maltoz > sellobiyoz > laktoz olduğunu belirtilmiş ve glukozun fruktoza göre daha çabuk tüketildiği bildirilmiştir (Janda ve Hedenström 1974). Bu çalışmada da Şekil 5.30 verileri ayrıntılı olarak incelendiğinde ilk 24 saatte maltozun (% 8.5) laktozdan (% 5.5) daha fazla tüketildiği bulunmuştur. Janda ve Hedenström (1974) ayrıca *R. glutinis*'in glukozu fruktozdan daha fazla ve daha çabuk tükettiği bilgisine yer vermişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde ilk 72 saatte ortamda bulunan glukozun % 86'sı tüketilirken, fruktozun % 55'i tüketilmiştir (Şekil 5.30).

İncelenen karbon kaynaklarının hücre dışı pH değişimlerine etkisi incelendiğinde, sıcaklık ve pH etkilerinin incelendiği, yani UYM ortamının kullanıldığı deneylerden farklı pH profilleri gözlenmiştir. UYM ortamı ve yalnızca glukoz içeren ortamların pH değişimleri birbirlerine ve önceki bölümlere benzer profil sergilerken, diğer tüm ortamlarda başlangıçtan itibaren artan ve sonra yaklaşık sabit kalan bir değişim gözlenmiştir. Hücre dışı pH profillerinin arasındaki bu farkın sebebiyle ilgili literatür araştırması yapılmıştır. *R. glutinis*'in şeker taşıma mekanizması ile ilgili ayrıntılı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, şeker taşınım sisteminin yüksek ve düşük afiniteli olmak üzere iki bileşenden oluştuğu bildirilmiştir (Höfer ve Misra 1975). Yüksek afiniteli bileşenin pH 4.5'te faaliyet gösterirken, pH 6.5 gibi daha yüksek değerlerde her iki bileşenin de faaliyet gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, *R. glutinis*'e şeker taşınım hızının pH 4-4.5 civarında en yüksek değere ulaştığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda tamponlanmamış *R. glutinis* süspansiyonlarında, hücrelerin ortama proton salarak pH değerini 4 civarına getirdiği belirtilmiştir (Höfer ve Misra 1975).

Bu bilgiler ışığında ve glukozun en çok tercih edilen substrat olduğu göz önüne alındığında, glukoz ve glukoz içeren UYM ortamlarındaki pH azalmasının nedeninin,

*R. glutinis*'in ortama proton salarak yüksek afiniteli bileşenini aktif hale getirmesi ve dolayısıyla şeker taşınım hızını en yüksek değerine ulaştırması olduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan, Höfer ve Misra (1978) monosakkaritlerin ve poliollerin *R. glutinis* tarafından hücreye taşınım olayını incelemişler ve monosakkaritlerin hücreye girmesine proton alımının eşlik ettiğini belirtmişlerdir. Plazma membranında bulunan aktif bir bölge sayesinde gerçekleşen bu durumun, çözeltilerde alkalizasyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Buna göre glukozdan farklı bir karbon kaynağı türünün kullanıldığı ortamlardaki pH artışının, normal şeker taşınım sistemi gereği oluşan alkalizasyon sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu ortamlarda bulunan karbon kaynaklarının glukozu göre daha az tercih edilmesi nedeniyle, hücrenin yüksek afiniteli bileşenini ortaya çıkarmak için ortama proton salgılamadığı kanısına ulaşılmıştır.

Karbon kaynaklarının KAT ve SOD enzim aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde, her ikisi için de öne çıkan ilk iki substratın gliserol ve sorbitol olduğu görülmektedir. Literatürde gliserol ile gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışmada *R. glutinis*'ten lipid üretimine yönelik olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda biyodizel üretiminin yan ürünü olan gliserolün, sisteme geri beslenerek hücre tarafından tekrar kullanılması sonucunda maliyetin düşürülmesi amaçlanmaktadır (Easterling vd. 2009, Saenge vd. 2011). Gliserolün *Saccharomyces cerevisiae*'dan KAT üretimini artırdığı bilgisine rastlanmıştır (Machierzynska vd. 2007).

Glukoz içeren UYM ortamında ve tek başına glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda antioksidan enzim aktivitelerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda glukozun, radikal tutucu olarak görev yaptığı (Sigler vd. 1999) ve bir çok maya türünde, antioksidan savunma sisteminde görevli proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Koleva vd. 2008). *E. coli*'den KAT ve SOD enzimlerinin üretimlerinin incelendiği bir başka çalışmada da bu çalışmadakine benzer şekilde glukozun aktiviteler üzerinde baskılayıcı etki yarattığı bildirilmiştir (Latha vd. 2005).

#### **6.4 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi**

Azot kaynaklarının etkisinin incelenmesi amacıyla üretim ortamına tek tek konulan amonyum sülfat, amonyum nitrat ve ürenin yeterli çoğalmayı sağlayamadıkları belirlenmiştir. Bu nedenle incelenmesi planlanan azot kaynaklarının, (potasyum nitrat, PN; amonyum sülfat, AS; amonyum nitrat, AN; üre) UYM ortamı üzerine eklenerek deneylerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Çoğalma ortamına eklenen PN ve AS'nin UYM ortamına kıyasla daha fazla hücre derişimi sağladığı belirlenmiştir (sırasıyla, %12 ve %9). Azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği bir çalışmada, maya özütü, pepton, kazein asit hidrolizati, üre, sodyum nitrat, amonyum nitrat ve amonyum tartarat kullanılmış ve en yüksek hücre derişimi olan 9 g/L değerine pepton (2.8 g/L) ve maya özütü (2.4 g/L) ile ulaşılmıştır (Latha vd. 2005). Yine azot kaynağı etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, pepton, (pepton + maya özütü), amonyum nitrat, amonyum okzalat kullanılmış ve en yüksek hücre derişimine pepton (15 g/L) ve (pepton (10 g/L) + maya özütü (5 g/L)) ile ulaşımlardır (1.6 g/L ve 1.55 g/L). Bu doktora çalışmasında, UYM ortamında bulunan azot kaynakları, yukarıda verilen iki çalışmada en iyi oldukları bulunan pepton (5 g/L) ve maya özütü (3 g/L)'dir. Yukarıda kıyaslanan çalışmalardan farklı olarak pepton ve maya özütü üzerine eklenen PN ve AS'nin daha yüksek hücre derişimlerini sağladığı görülmüştür.

Ortamlarda hücre dışı pH değışimleri incelendiğinde ise üre eklenmiş olan ortamın diğerlerine göre daha farklı bir profil sergilediği görülmektedir. Bu bölüme kadar hücre dışı pH değışimlerinde yalnızca karbon kaynağı olarak glukozun etkili olduğu ve farklı bir profile neden olduğu, diğer tüm ortamlarda ise benzer bir değışim olduğu görülmüştü. Bu bölümde ise azot kaynaklarından ürenin çoğalma ortamında diğerlerine göre daha farklı bir etki yaratarak hücre dışı pH değışim profili değıştirdiği gözlenmiştir. Literatürde bu konuya ait herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

UYM ortamı üzerine eklenen azot kaynaklarının, incelenen antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde de olumlu bir etkisi olduğu belirlenmiştir. KAT enziminin incelenen tüm aktivitelerinde (U, U/ml, U/mg, U/mg kh) ve SOD enziminin ise birim kuru hücre başına spesifik aktivite değeri hariç diğer tüm aktivitelerinde UYM ortamının son sırada yer aldığı, diğer tüm kaynakların daha yüksek değerler sağladığı belirlenmiştir. Antioksidan enzimler açısından öne çıkan azot kaynakları ise AS, PN, üre olarak belirlenmiştir. Wang vd. (2008) çalışmalarında SOD aktivitesi açısından da peptonun en yüksek değeri sağladığını bildirmişlerdir. Enzimatik olmayan antioksidan moleküller olan karotenoidlerin de *R. glutinis*'ten üretimlerinde sodyum nitrat (Latha vd. 2005) ve amonyum sülfat (Saenge vd. 2011) öne çıkan azot kaynakları olarak bildirilmiştir.

## 6.5 Deneysel Tasarım

*Rhodotorula glutinis*'ten antioksidan özellikteki KAT ve SOD enzimlerinin üretimleri üzerine sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynaklarının etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinin ardından, en yüksek hücre derişimi, KAT ve SOD aktivitelerini sağlayabilecek koşulların bir araya getirilebilmesi için deneysel tasarım yapılmıştır. Üç faktörlü olması planlanan tasarım için faktörlerden ilki sıcaklık olarak belirlenmiştir. Diğer iki faktörden birisinin karbon kaynakları arasından seçilmesi planlanmıştır. UYM ortamında ulaşılan hücre derişimi, gliserol içeren ortama göre daha fazla olmasına rağmen, elde edilen yüksek spesifik aktivite değerleri nedeniyle (Bölüm 5.3) ikinci faktör olarak gliserol derişiminin seçilmesine karar verilmiştir. Gliserol aynı zamanda *R. glutinis*'ten biyodizel üretiminin araştırıldığı çalışmalarda, yüksek verim sağladığı bildirilen ve bu nedenle son zamanlarda ilgi çeken bir karbon kaynağıdır (Easterling vd. 2009, Saenge vd. 2011, Cheirsilp vd. 2012). Bölüm 5.4'te incelenen azot kaynakları çoğalma ortamına tek başlarına konulduğunda *R. glutinis*'in yeterli derecede çoğalamadığı gözlenmiştir. Hücrelerin çoğalması için pepton ve maya özütünün çok önemli olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle UYM'deki bileşimleriyle kullanılmasına ve tasarıma dahil edilmemesine karar verilmiştir. Son faktör olarak, aktivite ve hücre derişimleri üzerinde etkili olan başlangıç pH değeri seçilmiştir.

Seçilen faktörlerin etkisinin inceleneyeceği cevaplar hücre derişimi, SOD aktivitesi (U) ve KAT aktivitesi (U) olarak belirlenmiştir. Deneysel olarak ölçülen iki ayrı parametrenin, (aktivite ve protein) aynı cevap üzerinde deneysel hatayı artıracağı düşünülerek, cevap olarak spesifik aktivite (U/mg) yerine, toplam aktivite (U) değerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Gerçekleştirilen deneysel tasarım ile (Bölüm 5.5) elde edilen değerlere göre hücre derişimi için seçilen modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $R^2 = 0.9310$ ,  $R^2_{adj} = 0.8992$  ve öngörülen  $R^2 = 0.7993$ , model  $F = 29.25$ , model uygunsuzluğu (lack of fit) = 0.79 (saf hataya göre anlamsız)). Modelde yer alan terimlerden T,  $pH^2$ ,  $T^2$ ,  $Gli^2$ 'nin istatistiksel açıdan anlamlı oldukları belirlenirken, model üzerinde en çok etkili olan terimin sıcaklık ( $p < 0.0001$ ) olduğu belirlenmiştir. Hücre derişimi için yüksek sıcaklık, yüksek gliserol derişimi ve orta değerde başlangıç pH değerinin uygun olduğu görölmektedir (şekil 5.51, 5.52).

Maksimum hücre derişimi elde edilmesi için koşullar  $T=32.2^{\circ}C$ , başlangıç pH = 5.17, gliserol derişimi = 39.27 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre öngörülen cevap 1.6 mg/ml olarak belirlenirken deneysel olarak 1.32 mg/ml hücre derişimi elde edilmiştir.

SOD aktivitesi için elde edilen model de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $R^2= 0.9156$ ,  $R^2_{adj} = 0.8664$  ve öngörülen  $R^2= 0.7709$ , model  $F=18.61$ , model uygunsuzluğu (lack of fit)=0.62 (saf hataya göre anlamsız)). Modeldeki terimlerden T,  $pH^2$ ,  $Gli^2$  terimlerinin anlamlı oldukları bulunmuştur. SOD aktivitesi üzerindeki en etkili olan terimin de hücre cevabında olduğu gibi, sıcaklık olduğu bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). Yanıt yüzey grafikleri değerlendirildiğinde, sıcaklığın yüksek değeri, gliserolün düşük derişimleri ve başlangıç pH değerinin orta değerinin uygun olduğu belirlenmiştir (şekil 5.53 - 5.54).

Maksimum SOD aktivitesi için (U) koşullar  $T=33.9^{\circ}C$ , başlangıç pH = 5.47, gliserol derişimi = 16.50 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre öngörülen cevap 2.7 U olarak belirlenirken deneysel olarak 2.4 U SOD aktivitesi elde edilmiştir.

İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak, hücre derişimi ve SOD aktivitesinin önem derecesi en yüksek seviyede tutulduğunda koşullar  $T=33.7^{\circ}\text{C}$ , başlangıç  $\text{pH} = 5.22$ , gliserol derişimi  $= 31.07 \text{ g/L}$  olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucunda öngörülen hücre derişimi  $1.7 \text{ mg/ml}$  iken,  $2.2 \text{ mg/ml}$  derişimine ulaşılmış; öngörülen SOD aktivitesi ise  $2.6 \text{ U}$  iken,  $2.0 \text{ U}$  elde edilmiştir. Ancak, cevaplar (hücre derişimi ve SOD aktivitesi) tek tek maksimize edildiğinde, öngörülen değerlere daha yakın sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, hücre derişimini maksimum yapan ve SOD aktivitesini maksimum yapan koşulların birbirinden net bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Hücre çoğalmak için yüksek miktarda karbon kaynağına ihtiyaç duyarken, stres altında üretilen enzim olan SOD için karbon kaynağı kısıtlamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Benzer sonuç, karbon kaynağı etkisinin incelendiği deney verilerinde de (Bölüm 5.3) elde edilmiştir. UYM ortamı yüksek hücre derişimi sağlarken, gliserol kullanılan ortamda daha az çoğalma olmuş, ancak çok daha yüksek SOD spesifik aktivite elde edilmiştir.

KAT enzim aktivitesi için kullanılan modelin de diğer iki cevap gibi istatistiksel açıdan uygun olduğu belirlenmesine rağmen ( $R^2 = 0.9360$ ,  $R^2_{\text{adj}} = 0.9131$  ve öngörülen  $R^2 = 0.8063$ ,  $F=40.95$ , model uygunsuzluğu (lack of fit)  $= 2.21$  (saf hataya göre anlamsız)) bu cevabı maksimum yapan koşullar bulunamamıştır. Yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde de (Şekil 5.55, 5.56), optimum noktadan uzak olunduğu göze çarpmaktadır. Yüzey yanıt grafiklerinin sınırları faktör seviyelerinin oldukça fazla dışına taşındığında, öngörülen maksimum noktaya da yaklaşılmaktadır; ancak bu noktanın sıcaklık açısından değeri, pratikte çoğalmanın gözlenemediği  $40^{\circ}\text{C}$  civarında bulunmuştur. Sıcaklığın enzim aktiviteleri üzerindeki çoğunlukla çan eğrisi şeklinde olmaktadır ancak, KAT enzimi için bu eğrilik ikinci dereceden bir polinomdan çok üçüncü dereceden bir polinomla ifade edilebilir olduğu düşünülmektedir.

## 6.6 *R. glutinis*'in Çoğalma Kinetiği

*Rhodotorula glutinis*'ten antioksidan enzim üretimlerinde en yüksek spesifik aktiviteyi sağlayan karbon kaynağı olan gliserol, literatürde biyodizel üretim çalışmalarında ön plana çıkmaktadır. Biyodizel üretim prosesinde yan ürün olarak elde edilen gliserolün, yine biyodizel üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olan bir maya olan *R. glutinis* tarafından substrat olarak kullanılabiliyor olması ekonomik açıdan büyük yararlar sağlamaktadır. Henüz araştırma aşamasında olan ve endüstriyel olarak uygulanabilme potansiyeli yüksek olan bu konu, bu doktora çalışmasında en yüksek spesifik aktivite değerlerini sağlayan karbon kaynağı olarak gliserolün öne çıkmasıyla aynı sistemde birim fiyatı yüksek ve endüstriyel açıdan kıymetli birden fazla ürünün üretilbilme potansiyelini ortaya çıkarmıştır.

*R. glutinis*'in gliserollü ortamdaki çoğalma kinetiği verileri incelendiğinde, 50 ve 60 g/L başlangıç gliserol derişimlerinde özgül çoğlama hızının azaldığı belirlenmiştir. Deneysel tasarım sonucunda elde edilen verilerde de benzer şekilde hücre değerlerinin 40 g/L gliserol derişiminden sonra azalmaya başladığı görülmüştür. Kinetik parametrelere göre, gliserolün oldukça yüksek derişimlerinde *R. glutinis* çoğalması büyük ölçüde inhibe olmaktadır. Literatürde bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 6.7 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Radikal Oluşturucuların Etkisi

Çevresel koşullar ve ortam bileşiminin yanı sıra, antioksidan özellikteki enzimatik veya enzimatik olmayan maddelerin hücre tarafından üretimlerinin artırılması için üretim ortamlarına radikal oluşturucu bazı maddeler de eklenmektedir. Bu maddeler arasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kreiner vd. 2002, Biryukova vd 2006), metil viyolojen (paraquat) (Sakaki vd. 2002), metil mavisi (Sakaki vd. 2002), AAPH (Sakaki vd. 2002), juglon (Biryukova vd. 2006), menadion (Kreiner vd. 2002, Biryukova vd. 2006), 2-merkaptotanol (Kim vd. 1989), Cd<sup>+2</sup> (Brennan ve Schiestl 1996, Li ve Yuan vd. 2006, 2008), Fe<sup>+3</sup> (Kim vd. 1989), vb. sayılabilir. Bunların dışında UV ışımanın ve hatta beyaz ışığın da (Sakaki vd.

2001) radikal oluřturma etkisi kullanılmaktadır. Bu maddeler üretim ortamına bařtan itibaren dūřuk deriřimlerde sūrekli beslenebildiđi gibi, belli bir anda daha yūksek bir deriřimde eklenerek, hūcrelerdeki antioksidan madde üretimlerindeki deđiřiklik izlenmektedir.

Bu çalıřmada radikal oluřturucuların etkisi iki ayrı grupta incelenmiřtir. Birinci grupta (UYM, 30°C, 150 rpm) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV ıřıma ve AAPH etkenlerinin yalnızca KAT enzim aktivitesi ūzerine etkisi, ikinci grupta ise (16.5 g/L gliserol, 3 g/L maya ūzūtū, 5 g/L pepton, 33.9°C, 150 rpm) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV ıřıma, AAPH, metil viyolojen ve metilen mavisinin, hem SOD hem de KAT enzim aktiviteleri ūzerindeki etkileri incelenmiřtir.

Birinci grupta radikal oluřturucu etkisi olmayan kontrol ortamında, UYM, spesifik KAT aktivitesi 3.44 U/mg iken, ikinci grubun radikal oluřturucu etkisi olmayan kontrol ortamında spesifik KAT aktivitesi 2.84 U/mg olarak elde edilmiřtir. Birinci grupta incelenen tūm radikal oluřturucular arasında en yūksek aktivite 1.45 kat artıř ile 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamda elde edilirken, ikinci grupta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin incelenen tūm deriřimleri KAT aktivitesi ūzerinde inhibisyon etkisi yaratmıřtır. Bu da çođalma ortamının enzim ūretimi ūzerindeki etkisinin ūnemli olduđunu gōstermektedir. Sigler vd. (1999) alıřmalarında Gutteridge (1984)'nin glukozu tutucu olarak tanımladıđını bildirmiřtir. Birinci grupta çođalma ortamında 24 st sonunda tūketilmeden kalmıř olan glukozun tuttuđu radikaller dıřında kalanlar, inhibisyona neden olmadan KAT aktivitesini artırmıř olabilir. İkinci grupta ise var olan radikaller ve daha yūksek sıcaklık nedeniyle, KAT aktivitesi azalmıř olabilir.

UV ışıma etkisinin KAT aktiviteleri ūzerindeki etkisi iki ayrı grup için kıyaslandığında, her iki ortamda da enzim aktivitesinin artırıldığı, ancak UYM ortamında 8 dk maruz kalma sūresinden sonra, 1.45 kat artmış olan KAT aktivitesinin azaldığı, gliserol içeren ortamda ise 16 dk maruz kalma sūresinden sonra 2.27 kat artmış olan KAT aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

AAPH etkisinin incelendiği ortamlar kıyaslandığında ise, birinci grup deneylerde en yüksek aktivite 1.25 mM AAPH içeren ortamda 4.3 U/mg olarak, ikinci grup deneylerde ise 0.5 mM AAPH içeren ortamda 5.77 U/mg olarak elde edilmiştir.

KAT spesifik aktivitesinin üzerine aynı radikal oluşturucuların iki ayrı ortamdaki etkileri incelendiği zaman, gliserol içeren ortamın kullanıldığı ikinci grup deney setinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dışında aktivitelerin kontrol ortamına göre daha fazla artırıldığı belirlenmiştir. Bu durumda gliserol içeren ortamda radikal oluşturucu katkı maddelerinin etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir. Gliserol yapısında bulunan hidroksil grupları, ortamda bulunan radikalleri artırıcı yönde tepkimelere katılmasının bu aktivitelerin daha fazla artmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

İkinci grup deney setinde ise birinci gruptan farklı olarak incelenen metil viyolojen ve metilen mavisi katkı maddelerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde diğer maddelere göre daha fazla artırıcı etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

İkinci grupta spesifik KAT aktivitesi üzerinde radikal oluşturucuların etkisi ve sıralaması, metilen mavisi (3.6 kat) > metil viyolojen (2.66 kat) > UV ışınım (2.27 kat) > AAPH (2.03) şeklinde bulunmuştur. Benzer bir sıralama SOD spesifik aktivitesi için yapıldığında metilen metil viyolojen (1.61 kat) > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.40 kat) > metilen mavisi (1.24 kat) > UV ışınım (1.27 kat) > UV ışınım (1.05) > AAPH (1.04) şeklinde olduğu belirlenmiştir. AAPH ve metil viyolojen maddeleri aynı derişimlerde maksimum SOD ve KAT spesifik aktiviteyi sağlayarak aynı etkiyi göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre her madde farklı mekanizmalar ile radikal oluşturmakta ve SOD ve KAT enzimleri üzerindeki etkileri farklı olabilmektedir. Literatürde aynı radikal oluşturucuların SOD ve KAT enzimleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

#### **6.8 *R. glutinis*'in Çoğalması, KAT ve SOD Aktiviteleri Üzerine Çözünmüş Oksijen Derişiminin Etkisi**

*Rhodotorula glutinis*'ten KAT ve SOD enzim aktivitelerinin üzerine moleküler oksijenin etkisinin incelenmesi amacıyla biyoreaktör deneyleri yapılmıştır. Oksijen moleküllerinin etkisi, biyoreaktöre saf oksijen beslenerek incelenmiştir. En yüksek

oksijen seviyesi olarak, %100 çözülmüş oksijen (ÇO) kullanılmıştır. Kontrol ortamı olarak kullanılan deneyde oksijen seviyesi üstel çoğalma fazının ortalarına kadar azalmış, daha sonra tekrar artmaya başlamıştır (Şekil 5.65).

Tüm deneylerde ortam pH değerinin zamanla artarak, çoğalma fazının sonlarına doğru sabit kaldığı gözlenmiştir. Karbon kaynağı türünün incelendiği Bölüm 5.3'te gliserolün substrat olarak kullanıldığı ortamdaki hücre dışı pH değeri de (Şekil 5.31) benzer bir değişim göstermiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen deneyler sonucunda oksijenin hücre dışı pH değişimi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Farklı işletimlerde hücre derişimi değerlerinin zamanla değişimlerinde önemli bir fark olmamasına rağmen, kontrol ortamında hücre değerlerinin biraz daha yüksek seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 5.66) İşletim B'de ise, 36 st sonunda hücre derişiminin devam eden bir artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Literatürde yüksek çözülmüş oksijenin *R. glutinis*'in çoğalmasını artırdığı bildirilmiştir (Pan vd. 1986, Yen ve Zhang 2011). Diğer taraftan işletim A'da aynı etkinin gözlenmemesi, gecikme fazında ortamda bulunan üst seviyedeki çözülmüş oksijenin, hücre çoğalması üzerinde olumlu etki yaratmadığını göstermektedir.

Yüksek çözülmüş oksijenin KAT enzimi üzerinde önemli bir artırıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.67). Hem işletim A, hem de B'de KAT spesifik aktivite değerleri ortamdaki ÇO değeri artırıldığı andan itibaren sırasıyla sırasıyla 16.5 kat ve 3.8 kat artarak aynı değere ulaşmışlardır (32.1-32.2 U/mg). SOD spesifik aktiviteleri incelendiğinde (Şekil 5.68) ise işletim A'da 3.7 kat artış gözlenirken, işletim B'de aktivite değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Hücre yalnızca gecikme fazında yüksek oksijen seviyesine maruz kaldığında yüksek oranda SOD üretmiştir. Kreiner vd. (2000) *Aspergillus niger*'dan SOD ve KAT enzim aktivitelerini inceledikleri çalışmada, üstel çoğalma fazının ortalarında sisteme oksijence zenginleştirilmiş hava gönderildiğinde her iki enzimin de aktivitelerinin arttığını, ancak üretimin başından itibaren oksijence zenginleştirilmiş hava kullanıldığında ise SOD aktivitesinde kontrol ortamına göre bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Literatürde farklı türdeki mikroorganizmalardan SOD ve KAT üretimleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, oksijenin her zaman aktiviteyi artırıcı yönde etkisinin olmadığı ve bu iki önemli antioksidan enzimin aynı koşullarda indüklenmediği durumların varlığı bildirilmiştir. Örneğin Taniguchi vd. (1991), *Streptococcus lactis* ile biyoreaktör ortamında yaptıkları çalışmada, üretim ortamına 6 atm basınçta oksijen göndererek çözünmüş oksijen seviyesini artırdıklarında, SOD aktivitesinin 2 kat arttığı ancak KAT aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirtmişlerdir. Pinheiro vd. (2002) *Kluyveromyces marxianus* ile yaptıkları çalışmada, üretimin başından itibaren yüksek oksijen basıncı uygulandığında SOD aktivitesinin 6.2 kata kadar artırıldığını, ancak benzer etki sonucunda KAT aktivitelerinde bir azalma gözlediklerini belirtmişlerdir.

### **Toplu Değerlendirme:**

Bu doktora tez çalışmasında amaç, antioksidan enzimler sınıfında yer alan ve canlı organizmalar için çok önemli fonksiyonları olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzimlerinin mikrobiyal kaynaklı olarak farklı koşullar altında üretiminin incelenmesi olarak belirlenmiştir. Üretim için, antioksidan maddeleri yüksek verimle üretme kapasitesi olan, karotenoid üretimi araştırmalarında olumlu sonuçlar veren, ayrıca yağ biriktirebilme özelliği nedeniyle de son dönemlerde ilgi odağı olan ve bu alanda yaygın olarak çalışılan *R. glutinis* mayası tercih edilmiştir.

Literatürde *R. glutinis*'ten enzimatik olmayan antioksidan madde üretimlerine yönelik birçok çalışma olmasına rağmen, SOD ve KAT enzimlerinin bir arada üretimlerinin kapsamlı olarak incelendiği bir çalışma yer almamaktadır. Çalışmada bu alandaki eksikliğin doldurulması amaçlanmıştır. Elde edilen verilerin genel değerlendirilmesi aşağıda özetlenmiştir:

Yapılan ön çalışmalarda enzim aktivitelerini ifade eden birimler için (U, U/ml, U/mg, U/mg kh) en yüksek değeri sağlayan üretim koşullarının birbirinden farklı olduğu belirlenmiş ve çalışma boyunca incelenen parametrelerin çoğunluğu için bu geçerli olmuştur. *R. glutinis*'in SOD ve KAT enzimleri, hücre içi enzimler oldukları için hücre derişimi değerinin önemi de göz ardı edilmemiştir. Ancak, yapılan tüm çalışmalarda yüksek hücre derişimi ve yüksek enzim aktivitesini sağlayan koşulların da benzer

şekilde birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle elde edilen verilerin her açıdan değerlendirilebilmesi amacıyla hücre derişimleri, aktivite değerleri, verimlilik değerleri tüm birimleriyle sunulmuştur.

Sıcaklık, ortam başlangıç pH değeri, karbon ve azot kaynaklarının incelenmesinin ardından üretilen protein başına yüksek spesifik aktiviteyi (U/mg) sağlayan koşullar ön planda tutulmuştur. Bu değerlendirme ile gliserol optimum derişimi belirlenecek karbon kaynağı olarak, sıcaklık ise düşük değerlerinde enzim aktiviteleri için sağladığı yüksek değerler nedeniyle optimum değeri belirlenecek parametre olarak deneysel tasarıma eklenmiştir. Tasarımın uygulanması sırasında cevap olarak belirlenen birimin yalın olması gerektiğinden, ayrıca protein değerinin ölçümünden gelen hatayı da içinde barındırabilecek bir cevabın tasarımı başarısız yapacağı göz önüne alınarak cevap olarak tasarımda spesifik aktivite yerine, toplam aktivite (U) tercih edilmiştir. Toplam aktiviteye göre yapılan tasarımda elde edilen sonuçlar -bu aşamaya kadar spesifik aktivite değerlerine göre tespit yapılması nedeniyle- beklenenden farklı bulunmuştur. Düşük sıcaklıkta göze çarpan yüksek spesifik aktivite değerleri yerine en iyi toplam aktivite için sıcaklığın yüksek değerlere kaydığı belirlenmiştir. Bu aşamadan itibaren tasarımdan önceki veriler yeniden toplam aktivite cinsinden değerlendirildiğinde, sıcaklık ve gliserol derişimi açısından tüm çalışma boyunca optimuma yakın noktalarda çalışılmış olduğu, dolayısıyla ulaşılan toplam aktivite değerlerinde tasarımın ardından çok büyük bir değişme olmadığı belirlenmiştir. Buna göre birim protein başına spesifik aktivitelerin en yüksek değerlerinin deneysel tasarım bölümüne kadar yapılan deneylerde elde edilmiş olduğu düşünülmektedir.

Tasarım sonrasında ortama eklenen radikal oluşturunucu etkenler ve ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi gliserol varlığında incelendiği halde, spesifik aktivitelerde, sıcaklık ve karbon kaynağının incelendiği çalışmalarda olduğu gibi, çok yüksek değerlere ulaşmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin, uzun süre boyunca gliserolü karbon kaynağı olarak kullanan *R. glutinis*'in bu substrata adapte olması nedeniyle daha hızlı ve fazla çoğalması sonucu, aynı sürede eski verilere göre daha fazla protein üretmiş olmasıdır. Bu şekilde daha düşük spesifik aktivite değerleri elde edilmiştir.

Çalışmada elde edilen en çarpıcı veri, bu iki önemli enzimin *R. glutinis*'ten üretiminde ilk kez gliserolün kullanılmasıdır. Gliserolün önemi, son zamanlarda çevre kirliliğine verilen önemin artması nedeniyle ilgi odağı olan biyodizel üretiminde yan ürün olarak oluşmasıdır. Gliserolün *R. glutinis*'in çoğalmasında substrat olarak kullanıldığı ve mayadaki lipid birikiminin incelendiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Gelecekte bu üretim araştırmaları endüstriyel ölçeğe uygulanabildiğinde, aynı proseste SOD ve KAT enzimlerinin de üretilme ihtimali ortaya çıkmıştır.

Bu engin konunun sadece küçük bir kısmına ışık tutan bu çalışmanın devamı planlandığında, öncelikle enzim üretimini artıracak radikal oluşturucu etkenlerin birlikte kullanılması araştırılmalıdır. Bu şekilde enzim üretimleri en yüksek seviyede tutulduktan sonra uygun koşullarda saflaştırılmaları gerekmektedir. SOD ve KAT enzimlerinin en uygun üretim koşulları birebir aynı olmasa da aynı ortamda her iki enzimin de üretilbildiği belirlenmiştir. Tek bir üretim ortamından her iki enzimin de saflaştırılmalarının mümkün olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abe, F., Miura, T., Nagahama, T., Inoue, A., Usami, R. and Horikoshi, K. 2001. Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of superoxide dismutase activity by  $\text{Cu}^{2+}$ . *Biotechnology Letters* 23; 2027–2034.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, *Methods Enzymology*, 105; 121–125.
- Aksu, Z. and Eren, A. T. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal* 35;107–113.
- Anonymous. 1998. US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 1998. Web sitesi. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/antioxidants.html>. Erişim Tarihi: 19.10.2008.
- Anonymous. 2003. NIST/SEMATECH. Web sitesi. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>. Erişim Tarihi: 15.01.2009
- Anonymous. 2012. INTERNATIONAL FOOD INFORMATIPON COUNCIL FOUNDATION, Web Sitesi. <http://www.ific.org/publications/factsheets/antioxidantfs.cfm>. Erişim Tarihi: 05.04.2012.
- Attar, F., Keyhani, E. and Keyhani, J. 2006. A Comparative Study of Superoxide Dismutase Activity Assays in *Crocus sativus* L. Corms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (1); 101-106.
- Belozerskaya, T. A. and 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.
- Bhosale, P. and Gadre, R. V. 2001. Optimisation of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in Applied Microbiology*, 33; 12-16.
- Biryukova, E. N., Medentsev, A. G. , Arinbasarova, A. Y. and Akimenko, V. K. 2006. Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stres. *Microbiology*, 75 (3); 293-298.
- 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.

- Bradley, N. 2007. The Response Surface Methodology. Masters Thesis, Indiana University of South Band, 84 p. India.
- Breierova E., Gergor, T., Marova, I., Certik, M., Kogan and G. 2008. Enhanced antioxidant formula based on selenium-supplemented carotenoid producing yeast biomass. *Chemistry nad Biodiversity*, 5; 440-446.
- Brennan, R. J. and Schiestl, R. H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research*, 356; 171-178.
- Buzzini, P. and Martini, A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71; 41-44.
- Carley, K. M., Kamneva, N. Y. and Reminga, J. 2004. Response Surface Methodology, CASOS Technical Report, Carneige Mellon University, 31p, US.
- Cheirsilp, B., Kitchia, S. and Torpee, S. 2012. Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology* 62 (3); 987-993.
- Cho, D. H., Chae, E. J. and Kim, E. Y. 2001. Synthesis and Characterization of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 95; 183-193.
- Chu, H., Leeder, J., and Gilbert, S. 1975. Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products, *J Food Sci*, 40; 641.
- Cook, J. N., Worsley, J. L. 1996, US patent 5521091.
- Davis, J. M., Rosenfeld, W. N. and Richter, S. E. 1999. The effects of multiple doses of recombinant human CuZn superoxide dismutase (rhSOD) in premature infants with respiratory distress syndrome (RDS). *Pediatr Res*. 45; 193A.
- Davis J. M., Richter, S. E., Biswas, S., Rosenfeld, W. N., Parton, L., Gewolb, I. H., Parad, R., Carlo, W., Couser, R. J., Baumgart, S., Atluru, V., Salerno, L. and Kassem, N. 2000. Long-term follow-up of premature infants treated with prophylactic, intratracheal recombinant human CuZn superoxide dismutase. *J Perinatol*. 20(4); 213-6.

- Delanian, S., Baillet, F., Huart, J., Lefaix, J.L., Maulard, C. and 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. and Lefaix JL. 2001. Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage, *Radiother Oncol.* 58(3); 325-31.
- Dellomonano, C., Amaretti, A., Zanoni, S., Pompei, A., Matteuzzi, D. and 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. and Licha, M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100; 356-361.
- Fowler, B.A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y., Webb, M. 1987. Nomenclature of metallothionein, *Experientia. Supplementum*, 52; 19-22.
- Gille, G., Sigler, K. and Höfer, M. 1993. Response of catalase activity and membrane fluidity of aerobically *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to aeration and the presence of substrates. *Journal of General Microbiology*, 139; 1627-1634.
- Hengge, A. 1999. Re: how is catalase used in industry. *General Biology. MadSci Network*. <http://madsci.org/posts/archives/mar99/921636249.Gb.r.html>. Erişim tarihi: 01.03.2009.
- Housset, M., Baillet F., Michelson. A. M. and Puget, K. 1989. Action of liposomal superoxide dismutase on measurable radiation-induced fibrosis. *Ann Med Interne* 140 (5); 365-367.
- Höfer, M. and Misra, P. C. 1978. Evidence for a Proton/Sugar Symport in the Yeast *Rhodotorula gracilis (glutinis)*. *Biochem. J.* 172; 15-22.
- Janda, S. and Hedenström, M. 1974. Uptake of Disaccharides by the Aerobic Yeast *Rhodotorula glutinis*. *Arch. Microbiol.* 101; 273-280.
- Khan, A. U. and Wilson, T. 1995. Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chemistry & Biology* July 2;437-445.

- Koleva, D. I., Petrova, V. Y. and Kujumdzieva, A. V. 2008. Improved production by fed-batch cultivation and some properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. Canadian Journal of Microbiology 54; 957-963.
- Kreiner, M., Harvey, L. M. and McNeil, B. 2002. Oxidative stress response of a *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. Enzyme and Microbial Technology, 30; 346-353.
- Kim, I. H., Kanghwa, K. and Rhee, S. G. 1989. Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O<sub>2</sub>, Fe<sup>+3</sup>, or 2-mercaptoethanol. Proc. Natl. Acad. Sci., 86; 6018-6022.
- Krumova, E., Angelova, P. D., Pashova, S., Stefanova, L., Van Beeumen, J., Vassilev, S., Angelova and 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.
- Koç B. ve Ertekin, F. K. 2009. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir.
- Latha, B. V., Jeevaratnam, K., Murali, H. S. and Manja, K. S., 2005. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. Indian Journal of Biotechnology, 4; 353-357.
- Lardinois, O. 1995. reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide, Free Radic Res, 22; 251.
- Lledias, F., Rangel, P. and Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. The journal of Biological Chemistry, 273 (17); 10630-10637.
- Longo, V. D., Liou, L. L., Valentine, J. S. and Gralla E. B. 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase, Archives of Biochemistry and Biophysics, 365 (1):131–142.
- Li, Z. and Yuan, H. 2006. Characterization of cadmium removal by *Rhodotorula* sp. Y11. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73; 458-463.
- Li, Z. and Yuan, H. 2008. Responses of *Rhodotorula* sp. Y11 to cadmium. Biometals, 21; 613-621.

- Macierzyńska E., Grzelak, A. and Bartosz, G. 2007. The effect of growth medium on the antioxidant defense of *Saccharomyces cerevisiae*. Cellular & Molecular Biology Letters, 12; 448 – 456.
- Marklund, S. and 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.
- Martínez, C., Gertosio, C., Labbe, A., Pérez, R. and Ganga, M. A. 2006. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Electronic Journal of Biotechnology 9 (4); 407-413
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Plper, P., Mager and W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. Molecular Microbiology, 19 (4); 651-658.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31; 426-428.
- Myers, R. H. and Montgomery, Douglas C. 1995. Response Surface Methodology: process improvement with steepest ascent, the analysis of response Surfaces, experimental designs for fitting response surfaces, John Wiley and Sons, Inc, pp.183-351. New York.
- Orozco, M. R., Herna'ndez-Saavedra, N. Y., l Valle, F. A., Gonzalez, B. A. and 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.
- Oudin, P., Toth, J. A. and Balogh, C. 1999. Quantitation of intracellular polychlorobiphenyls during growth of *Rhodotorula glutinis*. Biotechnology Techniques, 13; 101-105.
- Park, P. K., Cho, D. H., Kim, E. Y. and Chu, K. H. 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:429–434.
- Pan, J. G., Kwak, M. Y. and Rhee, J. S. 1986. High Density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen enriched air. Biotechnol. Lett. 8 (190); 715-718.

- Pasanphan, W., Buettner, G. R. and Chirachanchari, S. 2010. Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study', Carbohydrate Research, 345; 135-140.
- Pinheiro, R., Belo, I. and Mota, M. 2002. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. Appl. Microbiol. Biotechnol., 58; 842, 847.
- Ratcheva, I., Stefanova, Z., Vesselinova, A., Nikolova, S., Kujumdjieva, A. and Neychev, H. 2000. Treatment of adjuvant arthritis in mice with yeast superoxide dismutase. Pharmazie, 55(7); 533-537.
- Saavedra, N. Y. H., Eglyi J. M. and 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.
- Saengea, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. and Bourtoom, T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46; 210–218.
- Sakaki, H., Nochide, H., Nakanishi, T. Tada, A., Miki, W. and Komemushi, S. 2001. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* Using weak whight light irradiation. Journal of Biosciçence and Bioengineering, 92 (3); 294-297.
- Sakaki, H., Nochide, H., Komemushi, S. and Miki, W. 2002. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. Journal of Bioscience and Bioengineering, 93 (3); 338-340.
- Sarkar, P., Suraishkumar and G. K. 2011. pH and temperature stresses in bioreactor cultures: intracellular superoxide levels. Industrial and Engineering Chemistry Research, 50; 13129, 13136.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N. and Hofer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms–1 microbial vs. higher cells - damage and defenses in relation to cell aging and death. Folia Microbiology, 44 (6): 587-624.
- Smith, E., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P. and White, A. 1983. Principles of Biochemistry. 7th Edition, Mc Graw-Hill International Editions, Singapur.

- Şenoğlu, B. ve Acıtaş, Ş. 2010. İstatistiksel Deney Tasarımı, 1. Basım, Nobel Yayınevi, Ankara.
- Taniguchi, M., Hoshino, K., Itoh, T., Kumakura, H. and Fujii, M. 1991. Production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis* by a combination of use of hyperbaric oxygen and fermentation with cross-flow filtration. *Biotech. Bioeng.* 39; 886-890.
- Tsekova, K. and Todorova, D. 2002. Copper (II) accumulation and superoxide dismutase activity during growth of *Aspergillus niger* B-77. *Z. Naturforsch.* 57c; 319-322.
- Wang , S. L., Chen, G. T., Qi, G. H., Yang, Z. P. and 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.
- Vorauer-Uhl, K., Fürnschließ, E., Wagner, A., Ferko, B. and Katinger, H. 2002. Reepithelialization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound Repair Regen.*, 10(6);366-71.
- Vozenin-Brotons, M.C., Sivan, V., Gault, N., Renard, C., Geffrotin, C., Delanian, S., Lefaix, J. L. and 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.
- Yen, H. W. and Zhang, Z. 2011. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112 (1); 71-74.
- Yan, G., Hua, Z., Li, Y., Liu, D. and Chen, J. 2005. Enhanced catalase synthesis by a novel combined system of photopercatalytic reactor and fermentor. *Biotechnology Letters*, 27; 683-687.
- Yan, G., Zhaozhe, H., Liu, D., Du, G. and Chen, J. 2006. Influence of oxygen level on oxidative stress response of *Bacillus* sp. F26 to menadione. *Process Biochemistry*, 41; 764-769.

## **EKLER**

**EK 1** Doktora çalışmasında kullanılan cihazlar

**EK 2** Doktora çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

**EK 3** Hücre derişimi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

**EK 4** KAT aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

**EK 5** SOD aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

**EK 1** Kullanılan cihazlar

| <b>Cihaz</b>             | <b>Model</b>                         |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Biyoreaktör              | Sartorius Biostat B plus Twin        |
| Çalkalamalı Hava Banyosu | Edmund Bühler TH 30; Shel Lab S16R-2 |
| Hücre parçalayıcı        | Biospec Mini Bead Beater             |
| Kurutucu                 | Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110     |
| Laminer Akış Kabini      | Biolab Faster BHG 2004-S             |
| pHmetre                  | Sartorius PP25                       |
| Santrifüj                | Hettich Rotina Mikro 22              |
| Soğutmalı Santrifüj      | Hettich Rotina 35 R                  |
| Sterilizatör             | Alp CL-40M                           |
| Terazi                   | Mettler Toledo                       |
| Ultrasaf Su Cihazı       | Millipore                            |
| UV-VIS Spektrofotometre  | Shimadzu UV-1601                     |

**EK 2** Kullanılan kimyasal maddeler

| <b>Kimyasal</b>                    | <b>Firma</b>   | <b>Katalog No</b> |
|------------------------------------|----------------|-------------------|
| Agar                               | Scharlau       | 07-004            |
| Amonyum nitrat                     | Sigma          | A9642             |
| Amonyum sülfat                     | Sigma          | A4915             |
| 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin) | Aldrich        | 440914            |
| dihidroklorür (AAPH)               |                |                   |
| Bovin serum albumin                | Sigma          | A9647             |
| Coomasie Brilliant blue            | Applichem      | A1092             |
| Dipotasyum hidrojen fosfat         | Merck          | 5104              |
| Dinitrosalisilik asit              | Sigma          | D0550             |
| Etanol                             | Sigma          | 32221             |
| Etilendiamin tetraasetik asit EDTA | Sigma          | E9884             |
| Fenol                              | Applichem      | A1594             |
| Fosforik asit                      | Applichem      | A0989             |
| Fruktoz                            | Merck          | 1004007           |
| Galaktoz                           | Merck          | 104062            |
| Gliserol                           | Sigma          | G5516             |
| Glukoz                             | Applichem      | A1349             |
| Hidroklorik asit                   | Merck          | 100304            |
| Hidrojen peroksit                  | Merck          | 107209            |
| Katalaz                            | Sigma          | C9322             |
| Ksiloz                             | Merck          | 10868901          |
| Laktoz                             | Merck          | 107657            |
| Malt özütü                         | Scharlau       | 07-080            |
| Maltoz                             | Merck          | 105910            |
| Maya özütü                         | Scharlau       | 07-079            |
| Metil viyolojen                    | Fluka          | 36541             |
| Metilen mavisi                     | Merck          | 115943            |
| Pepton                             | Fluka          | 70171             |
| Pirogallol                         | Sigma          | 254002            |
| Potasyum fosfat                    | Riedel de Haen | 30407             |
| Potasyum dihidrojen fosfat         | Merck          | 104873            |
| Potasyum nitrat                    | Sigma          | P8394             |
| Sodyum hidroksit                   | Sigma-Aldrich  | 06203             |
| Sodyum potasyum tartarat           | Fluka          | 60410             |
| Sodyum sülfat                      | Riedel de Haen | 13471             |
| Sorbitol                           | Merck          | 107758            |
| Sukroz                             | Applichem      | A2211             |
| Sülfürik asit                      | Merck          | 100713            |
| Trisma base                        | Sigma          | T6066             |
| Üre                                | Merck          | 108488            |

### EK 3 Hücre derişimi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

Response1Cell

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

| Source         | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |                 |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|-----------------|
| Model          | 3.87           | 6  | 0.64        | 29.25   | < 0.0001         | significant     |
| A-pH           | 4.881E-003     | 1  | 4.881E-003  | 0.22    | 0.6456           |                 |
| B-T            | 3.35           | 1  | 3.35        | 152.26  | < 0.0001         |                 |
| C-Gly          | 0.036          | 1  | 0.036       | 1.65    | 0.2216           |                 |
| A <sup>2</sup> | 0.11           | 1  | 0.11        | 4.77    | 0.0479           |                 |
| B <sup>2</sup> | 0.33           | 1  | 0.33        | 14.88   | 0.0020           |                 |
| C <sup>2</sup> | 0.12           | 1  | 0.12        | 5.38    | 0.0373           |                 |
| Residual       | 0.29           | 13 | 0.022       |         |                  |                 |
| Lack of Fit    | 0.16           | 8  | 0.020       | 0.79    | 0.6346           | not significant |
| Pure Error     | 0.13           | 5  | 0.025       |         |                  |                 |
| Cor Total      | 4.15           | 19 |             |         |                  |                 |

The Model F-value of 29.25 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case B, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model

### EK 3 Hücre derişimi cevabı için ANOVA analiz sonuçları (Devam)

The "Lack of Fit F-value" of 0.79 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 63.46% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

|           |       |                |        |
|-----------|-------|----------------|--------|
| Std. Dev. | 0.15  | R-Squared      | 0.9310 |
| Mean      | 1.05  | Adj R-Squared  | 0.8992 |
| C.V. %    | 14.17 | Pred R-Squared | 0.7993 |
| PRESS     | 0.83  | Adeq Precision | 18.984 |

The "Pred R-Squared" of 0.7993 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8992.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 18.984 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

| Factor         | Coefficient | df | Standard | 95% CI |             | VIF  |
|----------------|-------------|----|----------|--------|-------------|------|
|                | Estimate    |    | Error    | Low    | High        |      |
| Intercept      | 1.27        | 1  | 0.061    | 1.14   | 1.40        |      |
| A-pH           | -0.019      | 1  | 0.040    | -0.11  | 0.068       | 1.00 |
| B-T            | 0.50        | 1  | 0.040    | 0.41   | 0.58        | 1.00 |
| C-Gly          | 0.052       | 1  | 0.040    | -0.035 | 0.14        | 1.00 |
| A <sup>2</sup> | -0.085      | 1  | 0.039    | -0.17  | -9.356E-004 | 1.02 |
| B <sup>2</sup> | -0.15       | 1  | 0.039    | -0.24  | -0.066      | 1.02 |
| C <sup>2</sup> | -0.091      | 1  | 0.039    | -0.18  | -6.239E-003 | 1.02 |

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned} \text{Cell} = & \\ & +1.27 \\ & -0.019 * A \\ & +0.50 * B \\ & +0.052 * C \\ & -0.085 * A^2 \\ & -0.15 * B^2 \\ & -0.091 * C^2 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned} \text{Cell} = & \\ & -6.68439 \\ & +1.56882 * \text{pH} \\ & +0.22972 * T \\ & +0.031654 * \text{Gly} \\ & -0.15181 * \text{pH}^2 \\ & -3.56927\text{E-}003 * T^2 \\ & -4.03100\text{E-}004 * \text{Gly}^2 \end{aligned}$$

#### EK 4 KAT aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

| Response                                                                                                                                                                                                                                                             | 2           | CAT |                |        |             |                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----|----------------|--------|-------------|-----------------|
| ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model                                                                                                                                                                                                                   |             |     |                |        |             |                 |
| Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]                                                                                                                                                                                                       |             |     |                |        |             |                 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                      | Sum of      |     | Mean           | F      | p-value     |                 |
| Source                                                                                                                                                                                                                                                               | Squares     | df  | Square         | Value  | Prob > F    |                 |
| Model                                                                                                                                                                                                                                                                | 1.78        | 5   | 0.36           | 40.95  | < 0.0001    | significant     |
| A-pH                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.048       | 1   | 0.048          | 5.54   | 0.0337      |                 |
| B-T                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1.53        | 1   | 1.53           | 177.01 | < 0.0001    |                 |
| C-Gly                                                                                                                                                                                                                                                                | 0.018       | 1   | 0.018          | 2.11   | 0.1681      |                 |
| A <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                       | 0.085       | 1   | 0.085          | 9.75   | 0.0075      |                 |
| C <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                       | 0.11        | 1   | 0.11           | 12.15  | 0.0036      |                 |
| Residual                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.12        | 14  | 8.671E-003     |        |             |                 |
| Lack of Fit                                                                                                                                                                                                                                                          | 0.097       | 9   | 0.011          | 2.21   | 0.1983      | not significant |
| Pure Error                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.024       | 5   | 4.880E-003     |        |             |                 |
| Cor Total                                                                                                                                                                                                                                                            | 1.90        | 19  |                |        |             |                 |
| The Model F-value of 40.95 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.                                                                                                                |             |     |                |        |             |                 |
| Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.                                                                                                                                                                                          |             |     |                |        |             |                 |
| In this case A, B, A <sup>2</sup> , C <sup>2</sup> are significant model terms.                                                                                                                                                                                      |             |     |                |        |             |                 |
| Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.                                                                                                                                                                                             |             |     |                |        |             |                 |
| If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.                                                                                                                              |             |     |                |        |             |                 |
| The "Lack of Fit F-value" of 2.21 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 19.83% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit. |             |     |                |        |             |                 |
| Std. Dev.                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.093       |     | R-Squared      | 0.9360 |             |                 |
| Mean                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.51        |     | Adj R-Squared  | 0.9131 |             |                 |
| C.V. %                                                                                                                                                                                                                                                               | 18.40       |     | Pred R-Squared | 0.8063 |             |                 |
| PRESS                                                                                                                                                                                                                                                                | 0.37        |     | Adeq Precision | 22.671 |             |                 |
| The "Pred R-Squared" of 0.8063 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9131.                                                                                                                                                                        |             |     |                |        |             |                 |
| "Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 22.671 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.                                                                    |             |     |                |        |             |                 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                      | Coefficient |     | Standard       | 95% CI | 95% CI      |                 |
| Factor                                                                                                                                                                                                                                                               | Estimate    | df  | Error          | Low    | High        | VIF             |
| Intercept                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.62        | 1   | 0.032          | 0.55   | 0.69        |                 |
| A-pH                                                                                                                                                                                                                                                                 | -0.059      | 1   | 0.025          | -0.11  | -5.280E-003 | 1.00            |
| B-T                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0.34        | 1   | 0.025          | 0.28   | 0.39        | 1.00            |
| C-Gly                                                                                                                                                                                                                                                                | 0.037       | 1   | 0.025          | -0.017 | 0.091       | 1.00            |
| A <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                       | -0.076      | 1   | 0.024          | -0.13  | -0.024      | 1.01            |
| C <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                                                                       | -0.085      | 1   | 0.024          | -0.14  | -0.033      | 1.01            |

#### EK 4 KAT aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları (Devam)

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}\text{CAT} = & \\ & +0.62 \\ & -0.059 * A \\ & +0.34 * B \\ & +0.037 * C \\ & -0.076 * A^2 \\ & -0.085 * C^2\end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}\text{CAT} = & \\ & -4.36106 \\ & +1.34381 * \text{pH} \\ & +0.051575 * T \\ & +0.028907 * \text{Gly} \\ & -0.13551 * \text{pH}^2 \\ & -3.78071\text{E-}004 * \text{Gly}^2\end{aligned}$$

## EK 5. SOD aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları

Response

3

SOD

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

| Source         | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |                 |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|-----------------|
| Model          | 8.66           | 7  | 1.24        | 18.61   | < 0.0001         | significant     |
| A-pH           | 0.011          | 1  | 0.011       | 0.16    | 0.6964           |                 |
| B-T            | 7.17           | 1  | 7.17        | 107.88  | < 0.0001         |                 |
| C-Gly          | 0.25           | 1  | 0.25        | 3.69    | 0.0789           |                 |
| BC             | 0.23           | 1  | 0.23        | 3.43    | 0.0889           |                 |
| A <sup>2</sup> | 0.36           | 1  | 0.36        | 5.40    | 0.0384           |                 |
| B <sup>2</sup> | 0.28           | 1  | 0.28        | 4.16    | 0.0642           |                 |
| C <sup>2</sup> | 0.56           | 1  | 0.56        | 8.39    | 0.0134           |                 |
| Residual       | 0.80           | 12 | 0.066       |         |                  |                 |
| Lack of Fit    | 0.37           | 7  | 0.053       | 0.62    | 0.7279           | not significant |
| Pure Error     | 0.43           | 5  | 0.085       |         |                  |                 |
| Cor Total      | 9.46           | 19 |             |         |                  |                 |

The Model F-value of 18.61 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case B, A<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 0.62 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 72.79% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

|           |       |                |        |
|-----------|-------|----------------|--------|
| Std. Dev. | 0.26  | R-Squared      | 0.9156 |
| Mean      | 1.26  | Adj R-Squared  | 0.8664 |
| C.V. %    | 20.42 | Pred R-Squared | 0.7709 |
| PRESS     | 2.17  | Adeq Precision | 14.948 |

The "Pred R-Squared" of 0.7709 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8664.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 14.948 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

## EK 5 SOD aktivitesi cevabı için ANOVA analiz sonuçları (Devam)

The "Lack of Fit F-value" of 0.62 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 72.79% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good — we want the model to fit.

|           |       |                |        |
|-----------|-------|----------------|--------|
| Std. Dev. | 0.26  | R-Squared      | 0.9156 |
| Mean      | 1.26  | Adj R-Squared  | 0.8664 |
| C.V. %    | 20.42 | Pred R-Squared | 0.7709 |
| PRESS     | 2.17  | Adeq Precision | 14.948 |

The "Pred R-Squared" of 0.7709 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8664.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 14.948 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

| Factor         | Coefficient | df | Standard | 95% CI |             | VIF  |
|----------------|-------------|----|----------|--------|-------------|------|
|                | Estimate    |    | Error    | Low    | High        |      |
| Intercept      | 1.60        | 1  | 0.11     | 1.37   | 1.83        |      |
| A-pH           | 0.028       | 1  | 0.070    | -0.12  | 0.18        | 1.00 |
| B-T            | 0.72        | 1  | 0.070    | 0.57   | 0.88        | 1.00 |
| C-Gly          | -0.13       | 1  | 0.070    | -0.29  | 0.018       | 1.00 |
| BC             | -0.17       | 1  | 0.091    | -0.37  | 0.030       | 1.00 |
| A <sup>2</sup> | -0.16       | 1  | 0.068    | -0.31  | -9.911E-003 | 1.02 |
| B <sup>2</sup> | -0.14       | 1  | 0.068    | -0.29  | 9.535E-003  | 1.02 |
| C <sup>2</sup> | -0.20       | 1  | 0.068    | -0.34  | -0.049      | 1.02 |

**Final Equation in Terms of Coded Factors:**

$$\begin{aligned}
 \text{SOD} = & \\
 & +1.60 \\
 & +0.028 * A \\
 & +0.72 * B \\
 & -0.13 * C \\
 & -0.17 * B * C \\
 & -0.16 * A^2 \\
 & -0.14 * B^2 \\
 & -0.20 * C^2
 \end{aligned}$$

**Final Equation in Terms of Actual Factors:**

$$\begin{aligned}
 \text{SOD} = & \\
 & -12.30567 \\
 & +2.98454 * \text{pH} \\
 & +0.31297 * T \\
 & +0.089500 * \text{Gly} \\
 & -1.73077\text{E-}003 * T * \text{Gly} \\
 & -0.28070 * \text{pH}^2 \\
 & -3.27689\text{E-}003 * T^2 \\
 & -8.74599\text{E-}004 * \text{Gly}^2
 \end{aligned}$$

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU  
**Doğum Yeri** : Susurluk/ Balıkesir  
**Doğum Tarihi** : 19.10.1979  
**Medeni Hali** : Evli  
**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

**Lise** : Bandırma Kültür ve Eğitim Vakfı Özel Lisesi, 1997  
**Lisans** : Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 2002  
**Yüksek Lisans** : Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 2005

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Araştırma Görevlisi, 2005-...

### Yayınları:

#### ▪ SCI (core)

- 1) 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**, DOI:10.3109/10731199.2012.668910.
- 2) Takaç, S., Ünlü, A. E., Erdem, B. 2010. Oxygen Transfer Strategy Modulates the Productions of Lipase and Esterase Enzymes by *Candida rugosa*, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 64, 150-154.
- 3) Takaç, S., Ünlü, A. E. 2009. Effects of alcohol and buffer treatments on the activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase, **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 39 (2), 124-141.
- 4) Takaç, S., Erdem, B., Ünlü, A. E. 2009. Impact of inoculation strategy on the progress of *Candida rugosa* cultivation. **Artificial Celss, Blood Substitutes & Biotechnology** 37 (3), 130-137.

▪ **Uluslararası kongreler**

***Sözlü Sunum:***

Ünlü, A. E., Erdem, B., Takaç, S. **Oxygen Transfer Strategy Modulates The Productions Of Lipase And Esterase Enzymes By *Candida rugosa*, International Enzyme Engineering Symposium, 1-5 October 2008.**

***Poster sunumlar:***

- 1) Ünlü, A. E., Takaç, S., 24.09/01.10/2011 The Effects of pH and Temperature on the Production of Antioxidant Enzymes by *Rhodotorula glutinis*. **European Biotechnology Congress 2011**, İstanbul, Current Opinion in Biotechnology, 22S S55, İstanbul, Turkey.
- 2) Takaç, S., Ünlü, A. E., 21-24/08/2005. Effect of Alcohol Treatment on Hydrolytic Activity of *Candida rugosa* Lipase. **12<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology**, Journal of Biotechnology 118: S111-S112, Copenhagen, Denmark.
- 3) Takaç, S., Ünlü, A. E. 21-24/08/2005. Effect of pH in the 2-propanol Treatment of *Candida rugosa* Lipase on its Enantioselectivity in the Hydrolysis of Racemic Naproxen Methyl Ester, **12<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology**, Journal of Biotechnology 118:S112-S113, Copenhagen, Denmark
- 4) Takaç, S., Ünlü, A. E., 29/8-1/9/2004. Enhancement of Activity, Stability, and Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase by 2-Propanol Treatment for the Production of S-Naproxen, **2<sup>nd</sup> International Congress on Biocatalysis (Biocat 2004)**, Book of Abstracts 89, Hamburg, Germany.

▪ **Ulusal kongreler**

***Poster sunumlar:***

- 1) Ünlü, A. E., Değirmenbaşı, D., Takaç, S., 3-6/9/2012. *Rhodotorula glutinis*'in katalaz aktivitesi üzerine bazı radikal oluşturucuların etkisi, **Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10)** Bildiri Özetleri Kitabı, P3, İstanbul.
- 2) Büyüktopçu, A.E., Erdem, B. Takaç, S., 28-31/10/2007. *Candida rugosa* Proteinlerinin Klasik Proteom Bilim Yaklaşımı ile Analizi, **15. Biyoteknoloji Kongresi**, Bildiri Özetleri Kitabı, 34, Antalya.

- 3) Erdem, B., Büyüktopçu, A. E., Takaç, S. 5-8/9/2006. İki Fazlı Sistemde *Candida rugosa* Lipazı ile Rasemik ve S-Naproksen Metil Esterlerin Hidroliz Tepkimelerinin Kinetik Sabitlerinin Bulunması, **Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-7)** Bildiri Özetleri Kitabı, BT023, Eskişehir.
- 4) Takaç, S., Ünlü, A. E., Bakkal, M., Mutlu, D., 7-10/9/2004. Lipaz Biyokatalizörlüğünde Enantioseçimli Hidroliz ile S-Naproksen Üretim Tepkimesinin Kinetiği, **Altıncı Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-6)** Bildiri Özetleri Kitabı, RM11, İzmir.