



The kinetics of *Rhodotorula glutinis* growth and the enhancement of catalase activity in glycerol containing media

Ayşe Ezgi Unlu, Serpil Takac

Department of Chemical Engineering, Ankara University, Ankara, 06100, Turkey

Highlights:

- Determination of *R. glutinis* growth kinetics in glycerol containing media.
- 260% increase in catalase activity by radical promoter methylene blue
- 108 fold increase in catalase activity at high dissolved oxygen concentration

Keywords:

- glycerol
- *Rhodotorula glutinis*
- catalase
- radical promoters
- dissolved oxygen concentration

Article Info:

Received: 04.11.2016

Accepted: 07.02.2017

DOI:

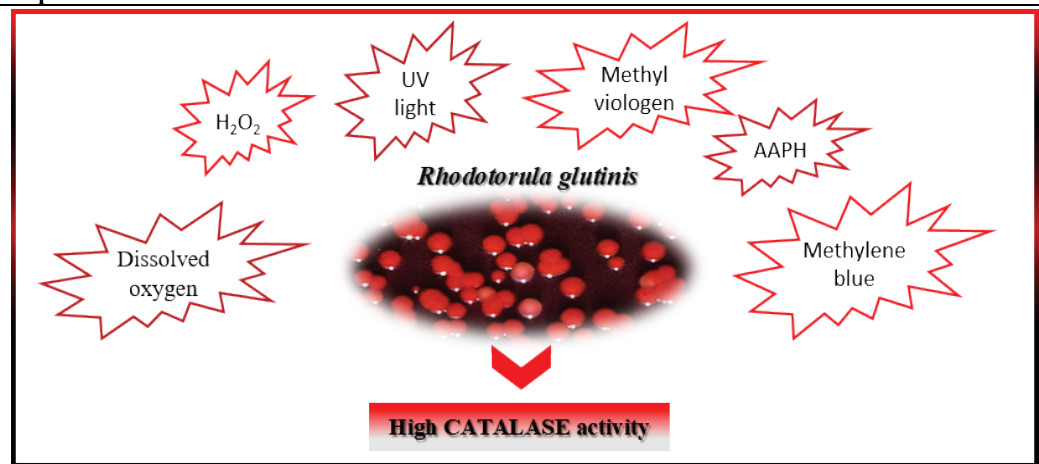
10.17341/gazimmfd.416357

Acknowledgement:

Correspondence:

Author: Ayşe Ezgi Unlu
e-mail:
aeunlu@eng.ankara.edu.tr
phone: +90 312 203 3456

Graphical Abstract



Purpose: The aim of this study is to investigate growth kinetics of *R. glutinis* in the presence of glycerol as a carbon source and also to enhance catalase (CAT) activity by using different radical promoters.

Theory and Methods: *R. glutinis* was grown on slant agar medium and then inoculated to fermentation media. The effects of different radical promoters on CAT activity such as UV light, hydrogen peroxide, α,α' -azodiisobutyramidine dihydrochloride, methylene blue, methyl viologen and dissolved oxygen concentration were investigated. Cells were disrupted by glass beads and CAT activity assay was performed spectrophotometrically.

Results: The growth kinetic model of *R. glutinis* in the presence of glycerol as the sole carbon source was found as:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s + \left(\frac{C_s^2}{K_i}\right)}$$

Substrate inhibition occurred at high levels of glycerol. The kinetic parameters were specified as; $\mu_{\max} = 0.278 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 11.84 \text{ g/L}$, $K_i = 174.5 \text{ g/L}$. CAT enzyme activity was found to show different patterns in glycerol containing medium and universal yeast medium (UYM). Radical promoters enhanced CAT activity in glycerol containing media more than UYM. This may be due to the radical scavenging effect of glucose. The highest CAT activity was obtained as 32.6 U/mg protein in bioreactor experiments using high dissolved oxygen level.

Conclusion: *R. glutinis*, having a potential to be used at biodiesel processes in the future was found to use a biodiesel process by-product, glycerol, as a carbon source and moreover, produced high activity of an antioxidant enzyme, catalase. Bioreactor experiments showed that dissolved oxygen concentration, when maintained at 100% level provided 108 fold of increase in CAT activity by *R. glutinis*. Future experiments may investigate the use of the real by-product of biodiesel process, containing impurities, and also the combined use of various radical promoters such as different chemicals and high dissolved oxygen concentration.



Gliserol varlığında *Rhodotorula glutinis* çoğalma kinetiğinin incelenmesi ve katalaz aktivitesinin artırılması

Ayşe Ezgi Ünlü*^{ID}, Serpil Takaç^{ID}

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06100, Ankara, Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- Gliserol varlığında *R. glutinis* çoğalma kinetiğinin belirlenmesi
- Küçük ölçekte radikal oluşturucu metilen mavisi etkisi ile katalaz aktivitesinde %260 artış
- Büyük ölçekte biyoreaktörde yüksek çözünmüş oksijen etkisi ile katalaz aktivitesinde 108 kat artış

Makale Bilgileri

Geliş: 04.11.2016

Kabul: 07.02.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416357

Anahtar Kelimeler:

Gliserol,
Rhodotorula glutinis,
katalaz,
radikal oluşturucu etkenler,
çözünmüş oksijen derişimi

ÖZET

Endüstriyel yan ürün olan gliserolün, *R. glutinis* çoğalması ve antioksidan enzim olan katalaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çoğalma kinetiği için parametreler; $\mu_{\max} = 0,278 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 11,84 \text{ g/L}$, $K_i = 174,5 \text{ g/L}$ olarak elde edilmiş; gliserolün yüksek derişimlerinde substrat inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Radikal oluşturucu etkenlerin UYM ve gliserol içeren ortamlarda katalaz aktivitesi üzerindeki etkilerinin farkı olduğu belirlenmiştir. UYM ortamında en yüksek katalaz aktivitesi değeri 5 U/mg olarak, 20 mM H_2O_2 ile elde edilmiştir. Gliserol ortamında ise en yüksek değer %260 artış ile 10,24 U/mg olarak, 33 mM metilen mavisi ile elde edilmiştir. Oksijen etkisinin incelendiği biyoreaktör deneylerinde ise aşılamanın başlangıcından itibaren çoğalma ortamında %100 çözünmüş oksijen değeri sağlandığında, 12 h'de oksijen derişiminin serbest bırakıldığı kontrol ortamına göre 108 kat artış sağlanarak 32,6 U/mg katalaz aktivitesi elde edilmiştir

The kinetics of *Rhodotorula glutinis* growth and the enhancement of catalase activity in glycerol containing media

H I G H L I G H T S

- Determination of *Rhodotorula glutinis* growth kinetics in glycerol containing media
- 260% increase in catalase activity by radical promoter methylene blue at small scale experiments
- 108 fold increase in catalase activity at high dissolved oxygen concentration in bioreactor

Article Info

Received: 04.11.2016

Accepted: 07.02.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416357

Keywords:

Glycerol,
Rhodotorula glutinis,
catalase,
radical promoters,
dissolved oxygen

ABSTRACT

The effect of glycerol, an industrial by-product, on the growth of *R. glutinis* and the synthesis of an antioxidant enzyme catalase, was investigated. The parameters for the growth kinetics were obtained as; $\mu_{\max} = 0,278 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 11,84 \text{ g/L}$, $K_i = 174,5 \text{ g/L}$. At high concentrations of glycerol, substrate inhibition was observed. The effect of radical promoters on catalase activity were found to be different in UYM and glycerol containing media. The highest catalase activity in UYM was determined as 5 U/mg, using 20 mM H_2O_2 ; while the highest catalase activity in glycerol was determined as 10,24 U/mg using 33 mM of methylene blue. When the dissolved oxygen concentration was maintained as 100% from the beginning of the inoculation, 32,6 U/mg catalase activity was achieved, that was 108 fold of the control media where no extra oxygen was supplied.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Gliserol (propantriol); tatlı, kokusuz, renksiz bir sıvı olan ve hayvansal ve bitkisel yağların yapısında bulunan değerli bir kimyasaldır. Endüstriyel olarak sabun, deterjan, kozmetik gıda, ilaç, reçine, boya ve kağıt gibi ürünlerin eldesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, biyodizel üretim proses çıktısının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır ki; bu oldukça yüksek bir miktardır. Bu nedenle, gliserolün kullanımı ekonomik ve çevresel açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda araştırılan konulardan biri de, çeşitli mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanımıdır [1]. Bu mikroorganizmalar arasında *R. glutinis* mayası da yer almaktadır. *R. glutinis* turuncu-kırmızı renkli, 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. 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 yanı sıra, antioksidan özellikte olan karotenoidleri yüksek verimlilikle üretebilme özelliğinden dolayı yaygın olarak çalışılmaktadır. Ucuz tarımsal kaynaklı maddeler kullanılarak da kolaylıkla çoğaltılabildiğinden endüstriyel açıdan da ilgi çekmektedir [2, 3]. Literatürde *R. glutinis*'ten yararlı kimyasalların üretimi; gliserol, tek ya da ek karbon kaynağı olarak kullanılarak, araştırılmıştır. Bunlar arasında *R. glutinis*'ten lipid üretimi [4, 5] karoten üretimi [6] ve önemli antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri [7] yer almaktadır.

Katalaz enziminin (KAT) ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) fonksiyonu hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalamaktır. KAT gıda endüstrisinde H_2O_2 'den kaçınılması gerektiğinde genellikle glukoz oksidaz enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. Peynir üretiminde süttün H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında [8], sensör üretiminde [9], bira, meyve suyu, şarap, kurutulmuş gıda ve mayonezden oksijenin uzaklaştırılmasında [10], tekstil endüstrisinde ve kozmetik endüstrisinde (lens bakımı) ürünlerden peroksit uzaklaştırılmasında [11] kullanılmaktadır. Ayrıca, antioksidan, yaşlanma karşıtı, hücre yenileyici, yağ eritici ve ömür uzatıcı özellikleriyle kapsüller halinde çeşitli markalar bünyesinde ticari olarak satılmaktadır. KAT enziminin de içinde bulunduğu dünya endüstriyel enzimlerin üretim pazarının 2018 yılında 4,8 milyar dolardan (2013) 7,1 milyar dolara ulaşması beklenmektedir [12]. Bu nedenle enzimlerin üretimi ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Diğer antioksidan enzimlerin de olduğu gibi, KAT sentezinin de artırılabilmesi için hücrenin stres koşullarında olması gerekmektedir. Stres koşullarının oluşturulması ise genellikle hücre çoğalma ortamının radikal oluşturucu etkenlere maruz bırakılması ile yapılmaktadır. Farklı türden radikal ya da radikallerin oluşumuna yol açan bu etkenler, hücresel antioksidan savunmayı harekete geçirmekte ve

hedeflenen antioksidan molekülün sentezini artırmaktadır. Bu etkenler arasında H_2O_2 [13, 14], metil viyolojen (MV) (paraquat) [15], metil mavisi (MM) [15], 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin) dihidroklorür (AAPH) [15], juglon [14], menadion [13, 14], 2-merkaptotanol [16], Fe^{+3} [16], Cd^{+2} [17, 18] ve ayrıca yine Cd^{+2} [19], sodium hexametaphosphate [20] vb. sayılabilir.

Bu maddeler üretim ortamına baştan itibaren düşük derişimlerde sürekli beslenebildiği gibi, belli bir anda daha yüksek bir derişimde eklenerek, hücrelerdeki antioksidan madde üretimlerindeki değişiklik izlenmektedir. Bunların dışında UV ışımının ve hatta beyaz ışığın da [21] radikal oluşturma etkisi kullanılmaktadır. Bu çalışmada amaç; gliserolün tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda *R. glutinis*'in çoğalma kinetiğinin incelenmesi ve gliserol varlığında *R. glutinis*'ten KAT enzim sentezinin radikal oluşturucu etkenler kullanılarak artırılmasıdır.

2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHODS)

2.1. Materyal (Materials)

Çalışmada ticari olarak sağlanan *R. glutinis* (DSM 70398) kullanılmıştır. Malt özütü, maya özütü, ve agar Scharlau'dan; glukoz Applichem'den (Darmstadt, Germany); ve pepton, metil viyolojen Fluka'dan (Missouri, USA) satın alınmıştır. Metilen mavisi ve H_2O_2 Merck'den (Darmstadt, Germany); gliserol ve AAPH ise Sigma'dan (St. Louis, USA) alınmıştır.

2.2. Üretim Ortamları (Fermentation Media)

Katı agar ortamı olarak üniversal 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 h süre ile çoğaltılmıştır (Edmund Bühler TH 30). Kinetik çalışmaları için kullanılan ortamda 3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton bulunmaktadır. İncelenen gliserol derişimleri 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g/L olarak belirlenmiştir. Belli zaman aralıklarında alınan örneklerle ölçülen hücre derişimleri kullanılarak özgül çoğalma hızları hesaplanmıştır. Deneyler 250 ml hacmindeki erlenlerde 100 ml hacminde gerçekleştirilmiştir ($T=32,2^{\circ}C$, $N=150$ rpm). Radikal oluşturucu etkenlerin incelenmesi amacıyla, UYM 24. saatte farklı süre ve/veya derişimlerde UV ışıma, H_2O_2 ve AAPH etkisine maruz bırakılmış ve KAT aktivitesindeki derişim incelenmiştir ($T=30^{\circ}C$, $N=150$ rpm). Karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı ortam bileşimi: 3 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 16,5 g/L gliserol şeklindedir. $N=150$ rpm'de 24 saat süre ile üretim gerçekleştirildikten sonra üretim ortamı farklı süre ve/veya derişimlerde UV ışıma, H_2O_2 , AAPH, metil viyolojen ve metilen mavisi etkisine maruz bırakılmıştır. İncelenen tüm ortamlarda başlangıç hücre absorbansı $0,26 \pm 0,02$ ($\lambda=600$ nm) (Shimadzu UV-1601) olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözünmüş oksijen derişiminin incelendiği biyoreaktör (Sartorius Biostat B plus Twin)

deneyleri için hücre katı agar ortamında 21 saat süre ile çoğaltıldıktan sonra 150 ml hacmindeki önçoğalma ortamına, absorbansı $0,750 \pm 0,03$ ($\lambda=600$ nm) olacak şekilde aşılanmıştır. 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 çözülmüş oksijen, prob yardımıyla ölçülmüştür. Karıştırma hızı $N=500$ rpm'de sabit tutulmuş ve ortama $Q=1$ L/min akış hızında kuru hava ve/veya O_2 beslenmiştir.

2.3. Hücrelerin Parçalanması (Cell Disruption)

Üretim ortamı, $+4^\circ\text{C}$, $12000 \times g$ koşullarında 10 min süre ile santrifüjlenerek elde edilen hücreler iki kez distile suyla yıkandıktan sonra üzerlerine 5 ml fosfat tamponu (0.05 M, pH 7,0) eklenmiştir. 0,5 mm çaplı cam boncuklar eklenerek 30 s'lik periyotlar halinde 4800 titreşim/min hızında 8 kez parçalanmış (Biospec Mini Bead Beater) ve her bir parçalama periyodu ardından 30 s'lik süreler halinde buzda soğutulmuştur. Parçalama işleminin tamamlanmasının ardından tüpler $12000 \times g$ 'de 10 min boyunca santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina Mikro 22). Elde edilen üst faz, hücre içi analizlerinde kullanılmıştır.

2.4. Hücre Derişimi (Cell Concentration)

Üretim ortamından alınan örnekler filtre edilmiş, saf su ile yıkanmış ve daraları alınmış filtre kağıtlarında 85°C 'da 24 h boyunca kurutulmuştur. Sabit tartıma ulaşıldığı andaki toplam kütleleri ile daraları arasındaki farktan yararlanılarak hücre kütleleri hesaplanmış ve örnek hacmine bölünerek derişim değerleri elde edilmiştir.

2.5. Protein Derişiminin Ölçülmesi (Protein Assay)

Hücre içi protein derişimleri Bradford [22] yöntemine göre, standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılarak belirlenmiştir.

2.6. Katalaz (KAT) Aktivitesinin Ölçülmesi (Catalase Activity Assay)

Katalaz aktivitesi, Aebi [23] tarafından geliştirilen yöntemine göre, H_2O_2 'nin parçalanmasının takip edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde $0,05$ M pH 7,0 fosfat tamponu içinde hazırlanan 10 mM H_2O_2 'nin parçalanması, $\lambda=240$ nm'de 1 min boyunca takip edilmiştir (Shimadzu UV-1601). Bir ünite (U) katalaz aktivitesi, 25°C ve pH 7,0'de, 1 dakikada 1 mikromol H_2O_2 'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

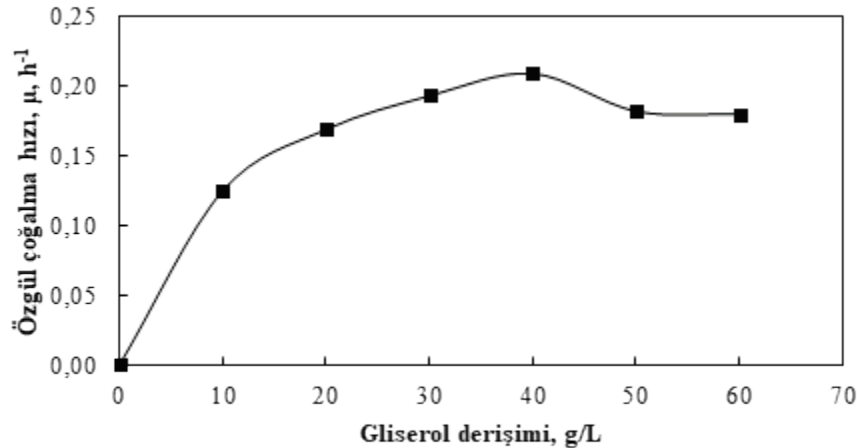
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

3.1. *R. glutinis* çoğalma kinetiği (Growth Kinetics of *R. glutinis*)

Gliserolün değerlendirilmesi, yüksek miktarda bir endüstriyel yan ürün olması sebebiyle büyük önem taşımaktadır. 2012 yılında yayımlanmış olduğumuz bir çalışmada, mayaların temel üretim ortamı olan UYM ortamı dahil olmak üzere pek çok farklı ortamda *R. glutinis* çoğalması incelenmiştir [7]. Kullanılan çeşitli karbon kaynakları incelendiğinde, gliserolün çoğalmayı en çok destekleyen şeker alkolü olduğu belirlenmiştir. Literatürde bu ortamdaki çoğalma kinetiği verileri yer almamaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada *R. glutinis*'in tek karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında çoğalma kinetiği incelenmiştir (Şekil 1). 50 ve 60 g/L gliserol derişimlerinde, substrat inhibisyonu gözlenmiştir. Substrat inhibisyonu varlığında hücre çoğalması için kinetik model Eş. 1'de yer almaktadır [24].

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s + \left(\frac{C_s^2}{K_i}\right)} \quad (1)$$

Elde edilen veriler yardımıyla, çoğalma kinetiği için ilgili parametreler; $\mu_{\max} = 0,278 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 11,84 \text{ g/L}$, $K_i = 174,5 \text{ g/L}$ olarak elde edilmiştir. Bu verilere göre gliserolün yüksek derişimlerinde önemli inhibisyon oluştuğu görülmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 1. Başlangıç gliserol derişimi ile *R. glutinis*'in özgül çoğalma hızının derişimi (The change in the specific growth rate of *R. glutinis* with initial glycerol concentration)

3.2. UYM çoğalma ortamında *R. glutinis*'ten KAT aktivitesine radikal oluşturucuların etkisi

(The Effect of Radical Promoters on Catalase Activity by *R. glutinis* in UYM)

R. glutinis'ten KAT üretiminin artırılması için, radikal oluşturucu etkenlerin incelenmesinde öncelikle mayaların çoğalmasını en çok destekleyen temel ortam olan UYM kullanılmıştır. Radikal oluşturucu etkenin kullanılmadığı ortam kontrol olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar Şekil 2'de sunulmuştur. Antioksidan savunma sistemini harekete geçiren etkenlerden biri, çeşitli mekanizmalarla değişik türden birçok radikalin oluşmasına neden olan UV ışımadır. Üç farklı süre boyunca UV ışımaya maruz bırakılan ortamdaki hücreler parçalandıktan sonra KAT aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre UV ışımının KAT aktivitesini en çok artırdığı sürenin 8 min olduğu belirlenmiştir. KAT spesifik aktivite değeri kontrol ortamına göre %25 artış göstererek 4,31 U/mg değerine ulaşmıştır. Ancak UV ışımaya 16 min boyunca maruz bırakılan *R. glutinis* hücrelerinin KAT aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2).

H₂O₂'nin etkisi ise 20, 50 ve 100 mM olmak üzere üç farklı derişimde incelenmiştir. Mayaların en fazla dayanabildiği H₂O₂ derişimi 100 mM [25] olduğu için daha yüksek derişimler kullanılmamıştır. Bu maddeye maruz kalma süresi olarak incelenen 120 min, 30 min ve 15 min sürelerinin sonunda KAT aktivitesi gözlenememiş, dolayısıyla maruz kalma süresi 8 min'e indirilmiştir. Bu sürede incelenen derişimler arasında KAT aktivitesini en çok artıran değerin 20 mM H₂O₂ derişimi olduğu belirlenmiş; %45 artış ile 5 U/mg değerine ulaşılmıştır. Ancak, derişim arttıkça aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2). 100 mM derişimde kontrol ortamına göre daha düşük değerin elde edilmesi, H₂O₂'nin yüksek derişimlerinin KAT aktivitesi

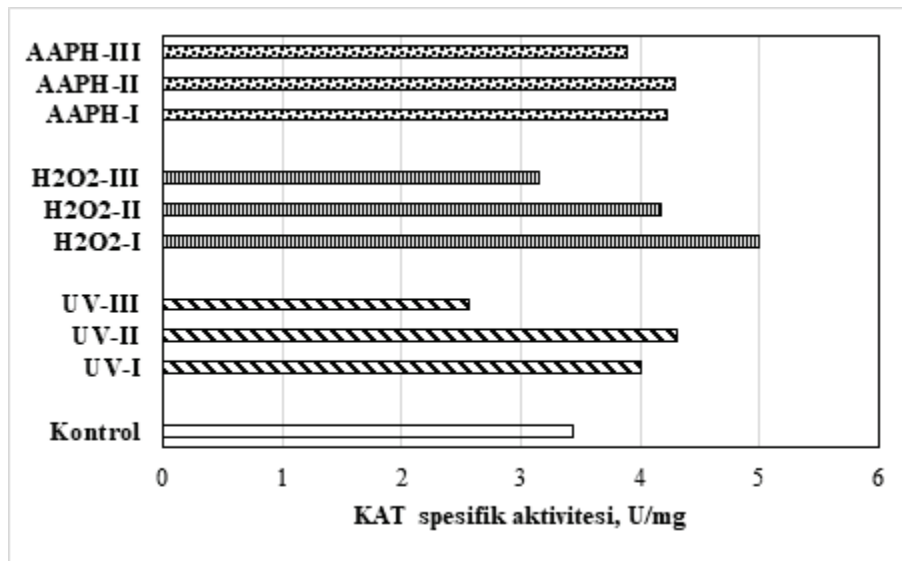
üzerindeki inhibisyon etkisini göstermektedir. AAPH çözündüğü ortamda önce karbon merkezli radikaller oluşturmakta, bu radikaller de oksijen ile tepkimeye girerek peroksil radikalleri oluşturmaktadır [15]. İncelenen tüm AAPH derişimlerinde, KAT aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. En yüksek spesifik aktivite değeri ise 4,3 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 2). UYM ortamında çoğalan *R. glutinis* hücrelerine uygulanan radikal oluşturucu etkenlerin KAT aktivitesi üzerine etkileri kıyaslandığında, kontrol ortamına göre en yüksek değerin, 5 U/mg olarak, 20 mM H₂O₂ ile elde edildiği belirlenmiştir.

3.3. Gliserol varlığında *R. glutinis*'ten KAT aktivitesine radikal oluşturucuların etkisi

(The Effect of Radical Promoters on Catalase Activity by *R. glutinis* in the Presence of Glycerol)

Gliserol varlığında çoğalan hücrelerin radikal oluşturucu etkenlere karşı sentezlediği KAT enzim aktivitesinde sergilediği değişikliklerin incelenmesi amacıyla, benzer ölçümler bu ortamda da gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir radikal oluşturucu etken kullanılmadığında, gliserol varlığındaki kontrol ortamında, KAT aktivitesinin 2,84 U/mg KAT olduğu belirlenmiştir. Bu değerin UYM kontrol ortamındaki değerden (3,44 U/mg KAT) %17 daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Bunun yanı sıra, gliserol varlığında incelenen tüm H₂O₂ derişimlerinin KAT aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi yarattığı belirlenmiştir (Şekil 3). Gliserolün H₂O₂ ile okside olduğu bilinmektedir. Bu tepkime sonucu oluşan ürünlerin, mayanın dayanabileceğinden fazla miktarda radikal oluşumuna sebep olarak aktiviteyi tamamen azalttığı düşünülmektedir.

UV ışımaya etkisinin aktivite üzerine etkisi 8, 16 ve 32 min maruz kalma sürelerinde incelenmiştir. En yüksek KAT



Şekil 2. Radikal oluşturucu etkenlerin UYM ortamında üretilen KAT aktivitesi üzerine etkisi (UV-I :4 min, UV-II: 8 min, UV-III: 16 min, UV-IV: 32 min; H₂O₂-I: 20 mM, H₂O₂-II: 50 mM, H₂O₂-III: 100 mM; AAPH-I: 0,5 mM, AAPH-II: 1,25 mM, AAPH-III: 2,5 mM)
(The effect of radical promoters on catalase activity in UYM)

aktivitesi değeri 16 min süre sonunda %126 artış ile 6,44 U/mg KAT olarak elde edilmiştir (Şekil 3). UV ışımaya maruz bırakılma süresi 32 min'e yükseltildiğinde ise inhibisyon gözlenmiştir.

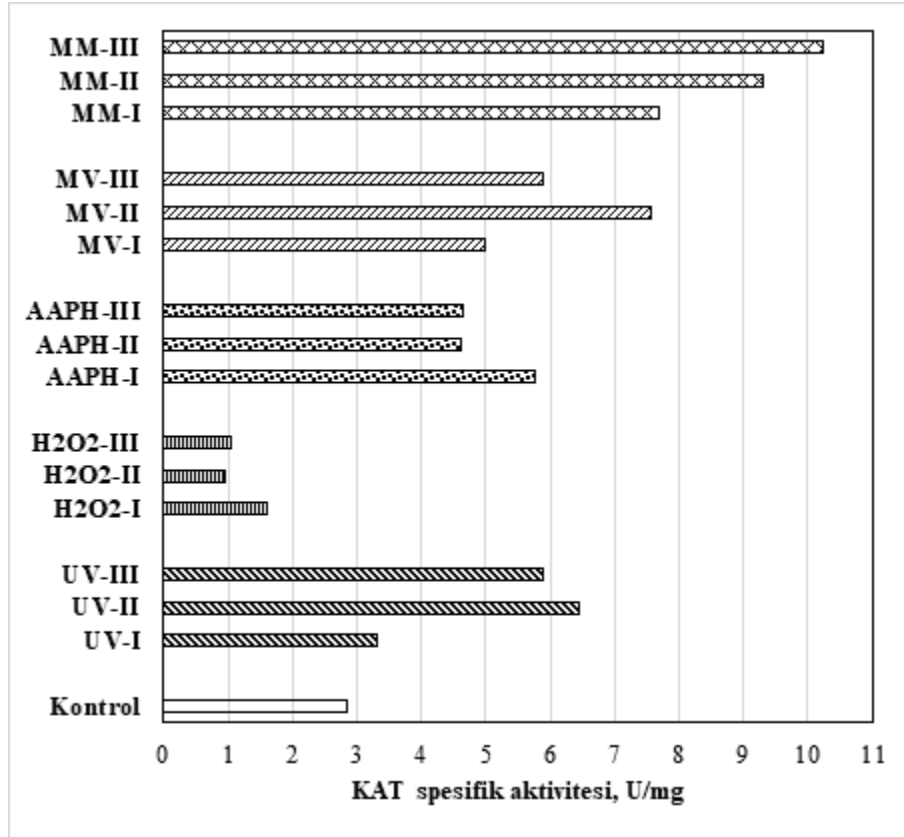
AAPH etkisi incelendiğinde, en yüksek aktivite değeri 5,77 U/mg olarak 0,5 mM derişimde elde edilmiştir. Daha yüksek derişimlerde ise aktivitenin azaldığı ancak her birinde kontrol ortamına göre daha yüksek değerler elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 3).

Radikal oluşturucu etkenler, UYM ve gliserol içeren ortamda çoğaltılan *R. glutinis* hücrelerinin KAT aktivitesi değerlerine göre kıyaslandığında, H₂O₂ dışındaki tüm radikal oluşturucu etkenlerin gliserol ortamında uygulandığında KAT aktivitesinde daha yüksek değerler sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu ortamda ek olarak iki radikal oluşturucu etken daha incelenmiştir. Bunlardan biri parakuat olarak da anılan ve ortamda süperoksit radikali oluşturan MV'dir. Çok zararlı olan bu radikal oluşturucunun antioksidan enzim olan KAT aktivitesini inhibe etmeden artırabilmesi için oldukça düşük derişimlerde çalışılması gerekmektedir. Ön deneyler sonucunda belirlenen uygun derişim aralığına göre, en yüksek aktivite değeri 8×10^{-5} mM derişiminde, %166 artış ile 7,57 U/mg olarak elde edilmiştir

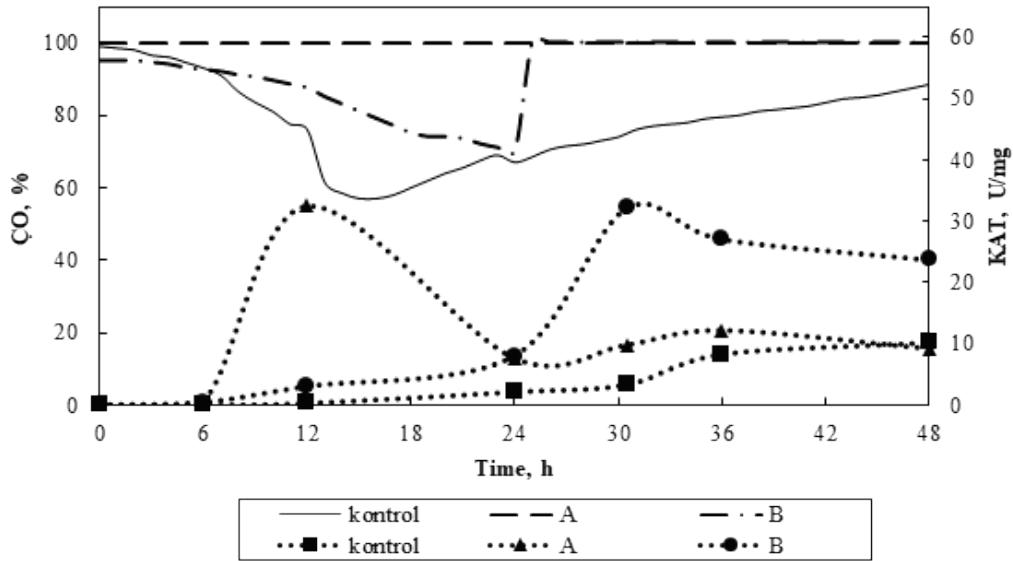
(Şekil 3). Bir diğer ek radikal oluşturucu etken olarak ise MM seçilmiştir. MM ortamda çözündüğünde singlet oksijen radikali oluşturmaktadır. Yapılan ön deneylere göre belirlenen derişim değerleri uygulandığında, her üç derişim değerinde de KAT spesifik aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 3). En yüksek aktivite olan 10,24 U/mg değerine 33 mM derişimdeki MM ile ulaşılmıştır.

Karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığı durumda incelenen radikal oluşturucu etkenler arasında *R. glutinis*'ten KAT aktivitesini en çok artıran maddenin MM (33 mM) olduğu belirlenmiştir. Kontrol ortamına göre aktiviteyi %260 oranında artırmıştır. Bu değer aynı zamanda radikal oluşturucu etkenler kullanıldığında elde edilen en yüksek değer olarak belirlenmiştir.

İncelenen radikal oluşturucu etkenler değerlendirildiğinde, UYM ve gliserol ortamlarında çoğaltılan *R. glutinis*'in KAT enzimi sentezi açısından oldukça farklı davrandığı gözlenmektedir. Bu da çoğalma ortamının enzim üretimi üzerindeki etkisinin önemli olduğunu göstermektedir. Sigler vd. [26] çalışmalarında Gutteridge (1984)'nin glukozu radikal tutucu olarak tanımladığını bildirmiştir. Bu durumda UYM ortamında tüketilmeden kalan glukoz, radikal tutucu olarak davranarak daha az KAT sentezine neden olması



Şekil 3. Radikal oluşturucu etkenlerin gliserol ortamında üretilen KAT aktivitesi üzerine etkisi (UV-I :4 min, UV-II: 8 min, UV-III: 16 min, UV-IV: 32 min; H₂O₂-I: 20 mM, H₂O₂-II: 50 mM, H₂O₂-III: 100 mM; AAPH-I: 0,5 mM, AAPH-II: 1,25 mM, AAPH-III: 2,5 mM; MV-I: 4×10^{-5} mM, MV-II: 8×10^{-5} mM, MV-III: 16×10^{-5} mM; MB-I: 8,25 mM, MB-II: 16,5 mM, MB-III: 33 mM)
(The effect of radical promoters on catalase activity in glycerol containing media)



Şekil 4. Biyoreaktörde çözülmüş oksijen (ÇO) ve KAT spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi
(The change in dissolved oxygen and catalase activity with time in bioreactor)

mümkündür. Bunun yanı sıra gliserol yapısında bulunan hidroksil gruplarının, ortamda bulunan radikalleri artırıcı yönde tepkimelere katılması nedeniyle KAT aktivitesini artırıcı yönde etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

3.4. Gliserol varlığında *R. glutinis*'ten KAT aktivitesine çözülmüş oksijen derişiminin etkisi (The Effect of Dissolved Oxygen on Catalase Activity by *R. glutinis* in the Presence of Glycerol)

R. glutinis'ten KAT enzim üretimine, çözülmüş oksijen etkisinin araştırılması amacıyla, biyoreaktör deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol ortamı olarak tasarlanan deneyde üretim ortamındaki çözülmüş oksijen (ÇO) %100 olduğunda aşılama yapılmış ve üretim boyunca $Q=1$ L/min ($Q/V=0,67$ L/L min) kuru hava beslemesi yapılmıştır. Oksijenin etkisi iki ayrı ÇO profili (A, B) kullanılarak incelenmiştir. İlk işletimde (A), çoğalmanın başından sonuna kadar ortamda %100 ÇO sağlanmıştır. Bu, sisteme $Q=1$ L/min kuru hava beslenirken ÇO azaldığında fazladan saf oksijen gazı gönderilerek sağlanmıştır. İkinci işletimde ise (B), yine %100 ÇO ile deneye başlanmış, ilk 24 h sadece $Q=1$ L/min kuru hava beslenerek, ortamdaki ÇO serbest bırakılmış, 24. h sonunda saf oksijen gazı gönderilerek deney sonuna kadar %100 ÇO sağlanmıştır.

Üretim ortamındaki ÇO değerlerinin değişimi ve KAT spesifik aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 4'te verilmiştir. Kontrol ortamında ÇO değerlerinin 15. h civarına kadara azaldığı, daha sonra artmaya başladığı gözlenmektedir. Bu işletimde KAT aktivitesi uzun süre düşük değerlerde seyrettikten sonra 36. saatte artarak 8,34 U/mg değerine ulaşmıştır.

Aşılamanın yapıldığı ilk andan itibaren çözülmüş ÇO değerinin %100 değerinde sabit tutulduğu işletim A'da ise 12. h'de spesifik aktivite kontrol ortamına (0,3 U/mg) göre

108 kat artarak 32,6 U/mg değerine ulaşmıştır. İlerleyen saatlerde ise aktivite azalarak kontrol ortamına benzer bir değer ve değişim göstermiştir. Aşılamanın ardından 24. h'den itibaren %100 ÇO'nun kullanıldığı işletim B'de ise, 30. h'de aktivite kontrol ortamına (3,3 U/mg) göre 9,7 kat artarak yine 32,1 U/mg değerine ulaşmıştır (Şekil 4).

Elde edilen sonuçlara göre yüksek çözülmüş oksijenin KAT enzimi üzerinde çok önemli bir artırıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen bu deneylerde KAT aktivite değerinin de erlen ortamlarına göre oldukça yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. Özellikle aşılamanın başlangıcından itibaren sağlanan %100 ÇO değeri, kısa sürede (12 h) aktivite üzerinde 108 kat artış yaratmıştır. Elde edilen bu değer çalışmada sağlanan en yüksek değerdir. Literatürde ise farklı mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise oksijenin KAT aktivitesini artırdığı, azalttığı ya da etkilemediğini bildiren çalışmalara rastlanmıştır. Kreiner vd. [13] *Aspergillus niger*'den KAT enzim aktivitelerini inceledikleri çalışmada, üstel çoğalma fazının ortalarında sisteme oksijence zenginleştirilmiş hava gönderildiğinde aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. Taniguchi vd. [27] ise *Streptococcus lactis* ile biyoreaktör ortamında yaptıkları çalışmada, üretim ortamına 6 atm basınçta oksijen göndererek çözülmüş oksijen seviyesini artırdıklarında, KAT aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirtmişlerdir. Diğer taraftan Pinheiro vd. [8] *Cluyveromyces marxianus* ile yaptıkları çalışmada, üretimin başından itibaren yüksek oksijen basıncı uygulandığında KAT aktivitesinde azalma gözlediklerini belirtmişlerdir.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

R. glutinis'ten antioksidan enzim üretiminde en yüksek spesifik aktiviteyi sağlayan şeker alkolü olarak belirlenmiş olan [7] ve biyodizel üretim prosesinde yan ürün olarak elde

edilen gliserolün, yine biyodizel üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olan bir maya olan *R. glutinis* tarafından substrat olarak kullanılabilir olması ekonomik açıdan büyük yararlar sağlamaktadır. Henüz araştırma aşamasında olan ve endüstriyel olarak uygulanabilme potansiyeli yüksek olan bu konu, en yüksek spesifik aktivite değerlerini sağlayan karbon kaynağı olarak gliserolün öne çıkmasıyla aynı sistemde birim fiyatı yüksek ve endüstriyel açıdan kıymetli birden fazla ürünün üretilebilme potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Bunun yanı sıra, biyoreaktör deneyleri sonucunda elde edilen yüksek katalaz aktivite artışı (108 kat) çözülmüş oksijenin olumlu etkisini göstermektedir. Bu çalışmanın devamı planlandığında, yüksek çözülmüş oksijen sağlanarak aktivite artırılması ve ek olarak radikal oluşturucu etkenlerin birlikte kullanılması araştırılmalıdır. Bu şekilde enzim üretimi en yüksek seviyede tutulduktan sonra uygun koşullarda saflaştırılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, biyodizel üretim prosesinden yan ürün olarak elde edilen ham gliserolün kullanımı da incelenmelidir. Saf gliserolün kullanıldığı bu çalışma, içinde safsızlıkların da bulunduğu yan ürün olan gliserol kullanımında şartların incelenmesine bir öngörü sağlayabilir.

5. SİMGELER (SYMBOLS)

AAPH	: 2,2'-azobis(2-metilpropiyonamidin)dihidroklorür
BSA	: Bovin serum albumin
Cs	: Substrat derişimi
ÇO	: Çözülmüş oksijen
KAT	: Katalaz
Ki	: İnhibisyon sabiti
Ks	: Substrat doyunluk sabiti
MM	: Metil mavisi
MV	: Metil viyolojen
U	: Ünite
UYM	: Universal maya ortamı
μ_{max}	: Maksimum özgül çoğalma hızı
μ	: Özgül çoğalma hızı

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Easterling E.R., French, W.T., Hernandez R., Licha M., The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*, *Bioresour. Technol.*, 100, 356-361, 2009.
- Bhosale P.B., Gadre R.V., Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 423-427, 2001.
- Yen H.W., Zhang Z., Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 71-74, 2011.
- Cheirsilp B., Kitcha S., Torpee S., 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, *Ann. Microbiol.*, 62, 987-993, 2011.
- Yen H.W., Yang Y.C., Yu Y.H., Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 453-456, 2012.
- Cutzu R., Coi A., Rosso F., Bardi L., Ciani M., Budroni M., Zara G., Zara S., Mannazzu I., From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 1009-1017, 2013.
- Unlu A.E., Takac S., Investigation of the simultaneous production of superoxide dismutase and catalase enzymes from *Rhodotorula glutinis* under different culture conditions, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.*, 40, 338-344, 2012.
- Pinheiro R., Belo I., Mota M., Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* under increased air and oxygen pressures, *Biotechnol. Lett.*, 19, 703-708, 1997.
- Havas J., Nagy G., Porjesz E., Pungor E., Molecule selective sensor for industrial use and procedure for its preparation, Google Patents, 1983.
- Dondero M., Egaña W., Tarky W., Cifuentes A., Torres J.A., Glucose oxidase/Catalase improves preservation of shrimp (*Heterocarpus reedi*), *J. Food Sci.*, 58, 774-779, 1993.
- Cook J.N., Worsley J.L., Non-mammalian-derived catalase, Google Patents, 1996.
- Global Markets for Enzymes in Industrial Applications, BCC Research, 2014.
- Kreiner M., Harvey L.M., McNeil B., Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition, *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 346-353, 2002.
- Biryukova E., Medentsev A., Arinbasarova A.Y., Akimenko V., Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress, *Microbiology*, 75, 243-247, 2006.
- Sakaki H., Nochide H., Komemushi S., Miki W., Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21, *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 338-340, 2002.
- Kim I.H., Kim K., Rhee S.G., Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 6018-6022, 1989.
- Brennan R.J., Schiestl R.H., Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast, *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, 356, 171-178, 1996.
- Li Z., Yuan H., Characterization of cadmium removal by *Rhodotorula sp.* Y11, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 458-463, 2006.
- Li Z., Yuan H., Responses of *Rhodotorula sp.* Y11 to cadmium, *Biometals*, 21, 613-621, 2008.
- Chen J., Du G., Li J., Liu L., Feng Z., Method for increasing microbial catalase production, Google Patents, 2014.
- Sakaki H., Nakanishi T., Tada A., Miki W., Komemushi S., Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation, *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 294-297, 2001.
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
23. Aebi H., Catalase in vitro, *Methods Enzymol.*, 105, 121-126, 1984.
 24. Segel I.H., *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme systems*, John Wiley and Sons, New York 1975.
 25. Gille G., Sigler K., Hofer M., Response of catalase activity and membrane fluidity of aerobically grown *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to aeration and, the presence of substrates, *Microbiology*, 139, 1627-1634, 1993.
 26. Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M., Oxidative stress in microorganisms - I, *Folia Microbiol.*, 44, 587-624, 1999.
 27. Taniguchi M., Hoshino K., Itoh T., Kumakura H., Fujii M., Production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis* by a combination of use of hyperbaric oxygen and fermentation with cross-flow filtration, *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 886-890, 1992.

