T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARTHROSPIRA PLATENSIS'İN ÖZGÜN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETİMİNDE KULLANIMI VE BİYOPROSES OPTİMİZASYONU

Akif Emre KAVAK

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Didem BALKANLI

Eş Danışman

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Temmuz, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARTHROSPIRA PLATENSIS'İN ÖZGÜN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETİMİNDE KULLANIMI VE BİYOPROSES OPTİMİZASYONU

Akif Emre KAVAK tarafından hazırlanan tez çalışması 10.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Didem BALKANLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem BALKANLI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Melek Mümine EROL TAYGUN, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Enes DERTLİ, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Didem BALKANLI ve eş danışmanım Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "*Arthrospira platensis*'in Özgün Laktik Asit Bakterilerinin Üretiminde Kullanımı ve Biyoproses Optimizasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Akif Emre KAVAK

İmza

Aileme

ve

eşime

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, akademik hayatıma kattıklarıyla süreçleri daha kolay ilerlememi sağlayan, manevi olarak her zaman yanımda olan çok değerli danışmanım Prof. Dr. Didem BALKANLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmam boyunca değerli bilgi birikimi, yol göstericiliği ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden, bulunduğum çalışmalardaki disiplinin oluşmasında katkısı olan eş danışmanım saygı değer Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, akademik hayatıma büyük katkısı olan, tecrübeleriyle yol gösteren, desteğini her daim hissettiğim çok kıymetli Prof. Dr. Enes DERTLİ'ye gönülden teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmaları sürecinde optimizasyon çalışmaları ile ilgili destek sağlayan Doç. Dr. Akın ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım ve tez teslim süreçlerinde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım kapsamında desteklerini esirgemeyen YTÜ Biyomühendislik Bölümü, Algal Biyoteknoloji labortuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan ve doktora sürecim boyunca bana değerli fırsatlar sunan Nuvita İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. yönetimine ve bilimsel çalışmalarıma katkısı olan Nuvita Biosearch Center Ar-Ge Merkezi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük desteği ve emeği olan anneme, babama, kardeşime ve yanımda olan tüm sevdiklerime içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca moral ve motivasyonumu yüksekte tutan ve beni her zaman destekleyen, her anımda yanımda olan hayat arkadaşım, eşim İnci ZENT KAVAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akif Emre KAVAK

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ **ix**

KISALTMA LİSTESİ **x**

ŞEKİL LİSTESİ **xi**

TABLO LİSTESİ **xiii**

ÖZET **xiv**

ABSTRACT **xvi**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 3

1.3 Hipotez 4

2 GENEL BİLGİLER **5**

2.1 Laktik Asit Bakterileri 5

2.2 Mikroalgler 8

2.2.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları 10

2.2.3 Mikroalglal Proteinler ve Özellikleri 11

2.2.3 *Arthrospira platensis* 12

2.3 Fermantasyon 14

2.3.1 Mikrobiyal Fermantasyon 17

2.3.2 Hassa Fermantasyon 19

2.4 Biyoproses Geliştirme 20

2.4.1 Biyoproseslerde Ölçeklendirme 20

2.4.1.1 Ölçek Büyütme…….. 20

2.4.1.2 Ölçek Küçültme……. 22

2.4.1.2 Biyoproseslerde Mikrobiyal Kinetik……..23

2.5 Biyoreaktörler 25

2.5.1 Biyoreaktör Türleri……26

2.5.1.1 Karıştırmalı Tank Tipi Biyoreaktörler ……. 26

2.5.1.2 Kabarcık Kolon Reaktörler ……... 27

2.5.1.3 Hava Kaldırmalı Reaktörler …….. 27

2.5.1.4 Dolgulu Kolon Reaktörler ……..…….. 28

2.5.1.5Akışkan Yatak Reaktörler ……..…… 28

2.5.1.6 Piston Akış Reaktörler ……..……... 29

2.5.1.7 Membran Biyoreaktörler ……..……29

2.5.1.8 Fotobiyoreaktörler ……..…….. 29

2.5.2 Biyoreaktör İşletim Sistemleri……..…….30

2.5.2.1 Kesikli İşletim Sistemleri……. 30

2.5.2.2 Yarı-Kesikli İşletim Sistemleri……. 33

2.5.2. 3 Sürekli İşletim Sistemleri……..33

3 MATERYAL VE METOT **34**

3.1 Materyal 34

3.2 Metot 34

3.2.1 Laktik Asit Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu …… 34

3.2.1.1 Genomik DNA İzolasyonu ve RAPD-PCR…….. … 35

3.2.1.2 16S rRNA Dizilemesi ile LAB İzolatlarının Genetik Tanımlanması…….36

3.2.2 *Arthrospira platensis* Kültivasyonu …….……37

3.2.3 *A.platensis* Biyokimyasal Kompozisyon Tayini ……..… 41

3.2.3.1 Karbonhidrat İçeriği Tayini …….… 41

3.2.3.2 Yağ İçeriği Tayini …….…… 41

3.2.3.3 Protein İçeriği Tayini …….……41

3.2.3.4 Nem ve Kül İçeriği İçeriği Tayini ……..… 42

3.2.4 Fermantasyon Çalışmaları…….. ……..…43

3.2.4.1 Ön Denemeler…….. ……..……..…43

3.2.4.2 Erlen Ölçeğinde Fermantasyon Çalışmaları……..……..…43

3.2.4.3 Biyoproses Koşullarının Optimizasyonu 3 L Biyoreaktör Çalışmaları …….. ……..…44

3.2.5 D-optimal Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Aşaması…..……..45

3.2.6 Protein Hidrolizatlarının Eldesi ……...……..48

3.2.7 Analizler ……. ……...……..49

3.2.7.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi……..49

3.2.7.2 Antioksidan Analiz……..49

3.2.7.3 Canlı Hücre Sayısı …….……49

3.2.7.4 Antibakteriyel Etki……..……49

3.2.7.5 Toplam Fenolik İçerik Tayini..……..……..50

3.2.7.5 ACE inhibitör aktivitesinin belirlenmesi……...……..50

3.2.8 In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları….……51

3.2.8.1 Sitotoksisite Testi……..…..……52

3.2.8.2 Yara İyileşme Testi…….……52

3.2.9 İstatistiksel Analiz….……..53

4 BULGULAR VE TARTIŞMA 54

4.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları.....54

4.2 *A. platensis* Biyokimyasal Kompozisyon 54

4.3 Erlen Ölçeğinde Fermantasyon Çalışması Sonuçları…… 55

4.4 Biyoproses Koşullarının Deneysel ve Optimizasyon Sonuçları 3 L Biyoreaktör…… 58

4.5 Canlı Hücre Sayısı Sonuçları……...…… 64

4.6 Antibakteriyel Etki …….…….65

4.7 Toplam Fenolik İçerik …….66

4.7 ACE İnhibitör Aktivite…… ……67

4.9 In vitro Hücre Kültürü Çalışma Sonuçları……. 68

4.9.1 Sitotoksisite Testi ……. 68

4.9.2 Yara İyileşme Testi ……. 70

5 SONUÇ **74**

KAYNAKÇA **78**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **94**

SİMGE LİSTESİ

w/v	Ağırlık/Hacim
rpm	Dakikada Devir Sayısı
g	Gram
p	Güven aralığı
KDa	Kilodalton
kg	Kilogram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
mbar	Milibar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MW	Molekül ağırlığı
nm	Nanometre
h	Saat
s	Saniye
°C	Santigrad Derece
cm	Santimetre
µ	Spesifik büyüme hızı
%	Yüzde
yy	Yüzyıl

KISALTMA LİSTESİ

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ATP	Adenozin Trifosfat
ATTC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
Caco-2	Kolorektal Adenokarsinoma Hücre Hattı
CFU	Colony Forming Unit
DM	Deney Matrisi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EFSA	Eurepoean Food Safety Authority
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FS	Fermente Spirulina
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HUVEC	İnsan Endotel Hücreleri
LAB	Laktik Asit Bakterisi
MRS	Man, Ragosa and Sharpe
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
MWCO	Molekül Ağırlık Sınırı
NASA	Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Arttirilmiş Polimofik Dna
UnFS	Unfermente Spirulina
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Laktik asit bakteri türlerinin mikroskop altındaki görüntüsü **6**

Şekil 1.2 Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerinin metabolik yolakları **7**

Şekil 2.1 Farklı türde mikroalglerin mikroskop altındaki görüntüleri **8**

Şekil 2.2 *Arthrospira platensis* mikroskop görüntüsü(100x) **13**

Şekil 2.3 Mikroalg yetiştirmek için; (A) havuz sistemi, (B) fotobiyoreaktör **14**

Şekil 2.4 Hücresel metabolik yollar: (A) laktik asit fermantasyonu, (B) alkol fermantasyonu, (C) aerobik solunum **16**

Şekil 2.5 Monod Kinetiği ile büyüme modeli arasındaki ilişki **24**

Şekil 2.6 Biyoreaktör **25**

Şekil 2.7 Hava kaldrımalı reaktör sistemi **28**

Şekil 2.8 Akışkan yatak reaktör **29**

Şekil 2.9 Membran reaktör sistemi **29**

Şekil 2.10 Mikroorganizmaların kesikli işletim sisteminde büyüme eğrisi **31**

Şekil 3.1 İnkübasyon sonrasında oluşan LAB kolonilerinin petri görüntüsü **35**

Şekil 3.2 *L.rhamnosus* 23.2 suşunun: (A) Işık mikroskobu, (B) elektron mikroskobu görüntüsü **37**

Şekil 3.3 (A) Spirulina 10 L şişe kültürü, (B) liyofilize edilmiş spirulina tozu **39**

Şekil 3.4 Tez çalışmalarında kullanılan *A.platensis* mikroskop görüntüsü **39**

Şekil 3.5 Kurutma işlemlerinde kullanılan liyofilizatör cihazı **40**

Şekil 3.6 Tez çalışma planı **45**

Şekil 3.7 Tez çalışmalarında kullanılan laboratuvar tipi cam biyoreaktör **47**

Şekil 3.8 BSA kalibrasyon eğrisi **48**

Şekil 3.9 Caco-2 kolorektal kanser hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü **51**

Şekil 4.1 Erlen çalışmalarına ait görüntüler **55**

Şekil 4.2 4 farklı LAB susu (*L. rhamnosus* 23-2, *L. plantarum* T24, *L. plantarum* T21 ve *L. brevis* T27) için canlı hücre sayısı (cfu/ml) ve OD_{600} değer grafikleri……..….**58**

Şekil 4.3 (a) antioksidan tepkisi ve (b) antioksidan aktivite tepkisi için kalan grafikler……..…**61**

Şekil 4.4 (a) spirulina tozu (g/L) ve havalandırma (vvm) tasarım faktörleri, (b) spirulina tozu (g/L) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri ve (c) havalandırma (vvm) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri için kontur grafikleri……..……..…...….**63**

Şekil 4.5 FS ve UNFs 24 saatlik fermantasyon sırasıdan 3 L biyoreaktör seviyesinde *L.rhamnosus* 23.2 canlılığı ……....**65**

Şekil 4.6 Toplam fenolik içerik……....**67**

Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda biyoaktif ürünlerle muamele edilen Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı……....**68**

Şekil 4.8 0. ve 24. saatte Image J ile alınan 5X, 10X, 15X ve 20X FS örnekleri ile NC grubunun göç görüntüleri…….……...**72**

Şekil 4.9 FS örnekleri ve NC grubunun 0-24. Saat 5 göç grafiği…….……....**73**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Bazı mikroalg türleri ve geleneksel gıdaların besin içeriği……..**9**

Tablo 2.2 Ölçeklendirme çalışmalarında biyoproses değişkenleri **22**

Tablo 3.1 Solüsyon A ve Solüsyon B içerikleri miktarları **37**

Tablo 3.2 P-IV metal solüsyon bileşimi.....**38**

Tablo 3.3 Chu mikronutrient solüsyonu.....**38**

Tablo 3.5 Liyofilizasyon prosesi işlem basamakları.....**40**

Tablo 4.1 İzole edilen bakteri türleri ve adetleri **33**

Tablo 4.2 Çalışmada kullanılan *A.platensis* biyokütlesinin biyokimyasal bileşimi **50**

Tablo 4.3 Erlen ölçeğinde fermantasyon çalışmalarında suşların kinetik değerleri **56**

Tablo 4.4 Optimizasyon deney seti için 3 tasarım faktörü ve toplanan veriler....**58**

Tablo 4.5 Biyokütle (y_1) ve antioksidan aktivite (y_2) tepkilerinin uyumlarının ve ANOVA sonuçlarının özetleri **60**

Tablo 4.6 Optimizasyon ve doğrulama çalışmasının sonuçları……**62**

Tablo 4.7 Biyoaktif ürünlerin mm cinsinden patojenlere karşı alan çapları……**66**

Tablo 4.8 ImageJ uygulamasından elde edilen FS grupları yara iyileşme testi 0. ve 24. saatteki yüzde alan verileri……..**71**

ÖZET

Arthrospira platensis'in Özgün Laktik Asit Bakterilerinin Üretiminde Kullanımı ve Biyoproses Optimizasyonu

Akif Emre KAVAK

Biyomühendilsik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Didem BALKANLI

Eş-Danışman: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Biyobazlı fermente ürünler, sağlıklı sürdürülebilir diyetlere olan ilginin artması nedeniyle son zamanlarda hem insan sağlığı hem de sürdürülebilirlik açısından giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yerel peynir numunelerinden bakteri izolasyonu yapılmış ve bu kapsamda 45 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Ön çalışmalar sonucunda 4 farklı laktik asit bakterisi ile devam edilmiştir. Mevcut çalışma, 3 L'lik bir cam biyoreaktörde *Lacticaseibacillus rhamnosus* 23.2 bakterisinin spirulina ile etkileşimini ve havalandırma ve çalkalama hızının son ürün biyokütlesi ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisini belirlemek için tasarlanmıştır. Fermantasyon ortamı sadece glikoz, inorganik tuz karışımı ve spirulina tozu içermektedir. Optimizasyon modelinin sonuçlarından tahmini biyokütle ve antioksidan aktivite sırasıyla 3,74 g/L ve %84,72 olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonrası elde edilen biyoaktif üründen protein çöktürme yapılmış ve protein hidrolizatları elde edilmiştir. Bu ürünlerin antibakteriyel etki, toplam fenolik içerik ve canlı hücre sayısının değişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Toplam fenolik madde içeriği 26 mg Gallik asit eşdeğeri (GAE) g^{-1},

canlı hücre sayısı 24 saat sonunda 11.5 log CFU mL^{-1} elde edilmiştir. Antibakteriyel etki çalışmasında 4 farklı patojen ile çalışılmış ve FS ürünleri özellikle gram pozitif patojenlere karşı güçlü etkinlik göstermiştir. ACE inhibitor aktivite çalışmasında FS ürünleri %51 oranında ACE inhibitor aktivte göstermiştir. İleriki çalışmalarda elde edilen protein hidrolizatlarının hücre kültürü denemeleri yapılmış ve ürünlerin sağlık üzerine etkileri incelenmiştir. MTT ve hücre göçü (yara iyileşme) analizleri Caco-2 insan kolorektal kanser hücreleri üzerindeki kanser karşıtı ve metastatik etkiler FS, fermente edilmemiş spirulina (unFS) ile karşılaştırıldığında, FS'nin hücre canlılığını ve göçünü doz bağımlı bir şekilde önemli ölçüde azalttığını ve en güçlü etkilerin 5X seyreltmede gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Buna karşılık, unFS ürünleri daha zayıf biyoaktivite göstermiştir. Bu bulgular, fermantasyonu kanser önleme ve tedavisi için doğal bileşiklerin işlevsel özelliklerini geliştirmek için umut vadeden bir biyoteknolojik yaklaşım olarak vurgulamaktadır. Çalışmalar kapsamlı şekilde değerlendirildiğinde spirulina biyokütlesinin laktik asit bakterileri için uygun bir ortam substratı olma potansiyelini ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçların gıda, ilaç, tarım ve kozmetik endüstrilerinde potansiyel yenilikçi ürün ve stratejiler konumlandırabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fermantasyon, Biyoproses optimizasyonu, Laktik asit bakteri, Spirulina, Biyoaktif bileşikler

ABSTRACT

Use of *Arthrospira platensis* in The Production of Traditional Lactic Acid Bacteria and Bioprocess Optimization

Akif Emre KAVAK

Department of Bioengineering
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Didem BALKANLI
Co-supervisor: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Bio-based fermented products have recently become increasingly important for both human health and sustainability due to the growing interest in healthy sustainable diets. Within the scope of this thesis, bacterial isolation was made from local cheese samples and 45 lactic acid bacteria were isolated. As a result of the preliminary studies, 4 different lactic acid bacteria were used. The present study focused on health related the evaluate of fermented spirulina (FS) products *Lacticaseibacillus rhamnosus* 23.2 in a 3-L bioreactor. The fermentation medium contained only glucose, inorganic salt mixture and spirulina powder. The estimated biomass and antioxidant activity were found to be 3.74 g/L and 84.72 %, respectively, from the results of the optimization model. Protein precipitation was performed from the bioactive product after fermentation and protein hydrolysates were obtained. The effects of these products on antibacterial effect, total phenolic content and changes in the number of living cells were investigated. Total phenolic content was 26 mg Gallic acid equivalent (GAE) g^{-1}, and the number of living cells was 11.5 log CFU mL^{-1} after 24 hours of fermentation. In the antibacterial effect

study, 4 different pathogens were studied and FS products showed strong activity especially against Gram-positive pathogens. In the ACE inhibitory activity study, FS products showed 51% ACE inhibitory activity. In further studies, cell culture experiments of the obtained protein hydrolysates were conducted and the health effects of the products were examined. MTT and cell migration (scratch) assays anti-cancer and metastatic effects on Caco-2 human colorectal cancer cells FS compared to unfermented spirulina (unFS) revealed that FS significantly reduced cell viability and migration in a dose-dependent manner, with the strongest effects observed at 5X dilution. In contrast, unFS showed weaker bioactivity. These findings highlight fermentation as a promising biotechnological approach to enhance the functional properties of natural compounds for cancer prevention and treatment. When the studies were evaluated comprehensively, it was revealed that spirulina biomass has the potential to be a suitable substrate for lactic acid bacteria. It is thought that the results obtained from this thesis study can position potential innovative products and strategies in the food, pharmaceutical, agricultural and cosmetic industries.

Keywords: Fermentation, Bioprocess optimization, Lactic acid bacteria, Spirulina, Bioactive compounds

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Günümüzde sağlıklı, fonksiyonel ve alternatif biyo-tabanlı ürünler geliştirmenin sürdürülebilir bir gelecek için çok daha iyi olacağı kabul edilmekte olup biyo-tabanlı ürünler üzerine yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Fanzo vd., 2021; Rockström vd., 2020). Sürdürülebilir biyo-tabanlı ürünler ve sistemler geliştirmek; sağlık alanından gıda güvenliğine, beslenmeden tarım sektörüne baştan sona maliyet-etkili ve toplumlar için çok katmanlı faydaları olan önemli biyoteknolojik süreçlerdir (Xiang vd., 2019). Sürdürülebilir biyo-tabanlı ürünlerin üretiminde ve geliştirilmesinde fermantasyon en yaygın kullanılan biyoteknolojik proseslerden biridir (Campell vd., 2022). Fermantasyon geçmişi çok eski zamanlara dayanmasına rağmen, günümüzde hala yaygın olarak kullanılan bir teknolojidir (De vuyst vd., 2020). Fermantasyon prosesinde mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal değişiklikler, besin bileşenlerinin gıda matrisinde salınmasına veya değişmesine doğrudan katkıda bulunmakta olup ayrıca işlevsel, reolojik ve duyusal özelliklerini etkilemektedir (Abbaspour, 2024).

Son dönemlerde sürdürülebilir bir kaynak olarak mikroalgler çok fazla ön plana çıkmıştır. Mikroalgler sürdürülebilir gıda sistemlerinin geliştirilmesi ve yenilikçi dönüşüm potansiyeli ile önemli bir biyokütle kaynağıdır (Lafarga, 2019). Yeşil teknoloji ve çevre dostu üretim açısından bakıldığında, mikroalgler tarıma elverişli olmayan arazilerde üretilebilmeleri, çok çeşitli fiziksel koşullara dayanıklı olmaları ve bitkilere kıyasla metrekare başına yüksek bir üretim oranına olanak tanımaları ile bilinmektedirler (Dhara, 2025; Kevin vd., 2018).

Laktik asit bakterileri (LAB) içeren geleneksel fermente gıdaların insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri uzun yıllardan beri ortaya koyulmuştur. Bu yararların bazıları protein türevi biyoaktif ürünlerle ilgilidir. LAB tarafından üretilen protein türevi ürünler arasında ribozomal olarak üretilen ve doğal koruyucular ve

nutrasötikler olarak kullanılan protein hidrolizat yan ürünleri yer almaktadır. Çeşitli uygulama alanlarına sahip bu protein türevi ürünler endüstriyel ilgi görmektedir (Şahin vd., 2022; Barberis vd., 2018). *L. rhamnosus, L. reuteri, L. plantarum* gibi bakteriler prebiyotik olan fruktooligosakkarit (FOS), galaktooligosakkarit (GOS) ve inülin gibi bileşikleri hidrolize edebilen β-fruktozidaz ve α-galaktozidaz enzimlerine sahiptir (Lazzi vd., 2014; Bove vd., 2012). Bu enzimler, prebiyotiklerin glikozidik bağlarını kırarak faydalı monosakkaritlere dönüştürür ve böylece bağırsak mikrobiyotasındaki probiyotik bakteri sayısını artırırark önemli bir görev üstlenirler (Xiao vd., 2024). Protein hidrolizi, LAB'lerin büyüme ve metabolik fonksiyonları için kritik bir süreçtir. Bu bakteri grubu proteinlerin hidrolizini katalize eden enzimler üretmektedir ve böylece ihtiyaç duydukları amino asitlerin üretimini sağlamaktadır (Hata vd., 2023). Sahip oldukları bu yetenek, yalnızca bakterilerin ihtiyaç duyduğu serbest amino asitleri üretmekle kalmaz, aynı zamanda bazı LAB türleri biyolojik aktivitelerle donatılmış çok çeşitli peptitler de üretebilirler. Her bakteri türü çok çeşitli proteolitik aktivitelere yol açan farklı bir proteinaz içeriğine sahiptir ve proteolitik aktivite, türe ve suşa bağlı bir şekilde değişmektedir. Bu nedenle laktik asit bakterilerini kullanmak, biyoaktif peptitleri üretmek ve değerlendirmek için etkili bir stratejidir (Cicero vd., 2017; Hafeez vd., 2014). Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi sonucu değerli bileşiklerin elde edilmesi bu alanda yapılacak bilimsel çalışmalar için önemlidir. *Lactiplantibacillus plantarum, Levilactobacillus brevis, Lacticaseibacillus casei, Lactobacillus helveticus, Lacticaseibacillus rhamnosus* ve *Bacillus* türleri gibi LAB suşları, probiyotik özellikleri ve kimyasal/fonksiyonel özelliklere katkılarıyla LAB fermente spirulina ürünleri elde etmek için en sık kullanılan başlatıcı kültürler olmuştur (Öztürk vd., 2025; Bao vd., 2018; Moayedi vd., 2016). Önceki çalışmalar, spirulinanın LAB kültür ortamlarında kullanımı sonucu elde edilen ürünlerin antioksidan, antimikrobiyal, tat, aroma ve canlı hücre sayısı gibi özellikler açısından istenen etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Yay vd., 2024; Jamnik vd., 2022; Verni vd., 2021). Niccolai vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *Arthrospira platensis, Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 ile fermente edilmiştir. Fermente edilmiş spirulinanın sadece in vitro sindirilebilirliği değil aynı zamanda antioksidan ve fenolik madde içeriğinin de çalışma sonucunda arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, *Arthrospira platensis* biyokütlesinin laktik asit fermantasyonu sırasında probiyotik bakterilerin büyümesini ve aktivitesini desteklediği ve

probiyotik bazlı üretimde potansiyel bir substrat olacağı bildirilmiştir. Benzer şekilde de Marco Castro ve arkadaşları (2019), tarafından *Arthrospira platensis* biyoaktif özelliklerini iyileştirmek için *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiştir. Buna göre, fermantasyon sürecinin sonunda toplam fenolik içeriğin %112 olduğu ve DPPH radikal temizleme kapasitesinin %60 oranına yükseldiği bulunmuştur. Spirulinanın fermente biyoaktif ürünlerinin fermente edilmemiş ürünler ile in vitro etkileri ile karşılaştırıldığında fermete ürünlerin etkilerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Liu vd., (2011) *A. platensis* biyokütlesinin sütte fermantasyonundan sonra DPPH radikal temizleme kapasitesinde bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Verni vd., (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, fermente edilmiş spirulinanın fermente edilmemiş spirulinaya kıyasla daha yüksek ABTS temizleme aktivitesi gösterdiği, Alcalase ve *L. plantarum* ile fermentasyonun birleşik etkilerinin en yüksek değer olan 9,24 mmol Trolox eşdeğeri/kg olduğu bulunmuştur. Son çalışmalar biyo-tabanlı ürünler geliştirmek için mikrobiyal fermantasyon proseslerinin yoğun olarak kullanıldığını göstermektedir. Mikrobiyal fermantasyon prosesleri ile yenilikçi ve sürdürülebilir üretimler yapılabilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı; yerel kaynaklardan izole edilecek olan laktik asit bakterileri ile proteince zengin içeriğe sahip bir siyanobakteri olan *Arthrospira platensis*'in mikrobiyal fermantasyon işlemi ile biyoproses interaksiyonunu incelenmesi ve mikrobiyal fermatasyon sonucunda oluşacak protein hidrolizatlarının biyoaktivite özelliklerinin incelenmesi sonucunda potansiyel sağlık faydalarının belirlenmesidir. Tez kapsamında laktik asit bakterilerinin fermantasyon ortamına spirulina ilavesi ile biyoproses koşullarının optimizasyonunu ve biyoaktif ürünlerin *in vitro* etkilerini belirlemek ve sağlık üzerine potansiyel etkilerini ortaya koymak hedeflenmektedir. Optimizasyon çalışmaları D-optimal deneysel tasarım yardımıyla 3 L'lik bir biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Zengin bir protein kaynağı olan Spirulina'nın laktik asit bakterilerinin besi yeri ortamına eklenmesi ile laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri sayesinde potansiyel protein hidrolizatlarının elde edilmesi beklenmektedir. Elde edilecek olan bu protein hidrolizatlarının biyoaktif özellikleri araştırılacaktır. D-optimal tasarım, yinelemeli bir arama algoritması tarafından

üretilir ve belirtilen bir model için parametre tahminlerinin kovaryansını en aza indirmeyi amaçlar. Fermantasyon optimizasyon çalışmasında spirulina tozu (g/L), havalandırma (vvm) ve karıştırma hızı (rpm) dahil olmak üzere bazı operasyonel parametrelerin son ürünün biyokütle ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilecek biyoaktif ürünlerin göstereceği etkin özellikleri ile gelecek yıllarda biyo-tabanlı ürünlerin üretilmesinde ve sağlık, gıda, tarım alanlarında kullanılmasının yaygınlaştırılmasına öncülük etmek tez çalışmasının amaçları arasındadır.

1.3 Hipotez

Sağlık, gıda, kozmetik ve tarım gibi birçok alanda biyo-tabanlı ürünlere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Sürdürülebilir ve çevre dostu üretim sistemlerinin geliştirilmesi ile endüstride kullanımının yaygınlaşması artan dünya nüfusu için hayati önem arz etmektedir. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalar kapsamında biyo-tabanlı ürünler geliştirilmektedir. Özellikle son dönemlerde hızlı şekilde gelişen hassas fermantasyon biyo-tabanlı ürün geliştirilmesinde çok önemli fırsatlar sunmaktadır. Bu tez çalışmasında laktik asit bakterilerinin fermantasyon ortamına spirulina ilavesi, biyoproses koşullarının optimizasyonunu ve biyoaktif ürünlerin etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek olan biyoaktif ürünlerin, spirulina içermeyen (unfermented spirulina, unFS) ortamlara göre yüksek antioksidan ve total fenolik içermesi, patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki göstermesi, canlı hücre sayısının daha yüksek olması, ACE inhibitor aktivite göstermesi, kanser hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etki göstermesi ve kanser hücreleri üzerinde hücre göçünde belirgin bir inhibitör etki göstermesi bu çalışmanın hipotezidir.

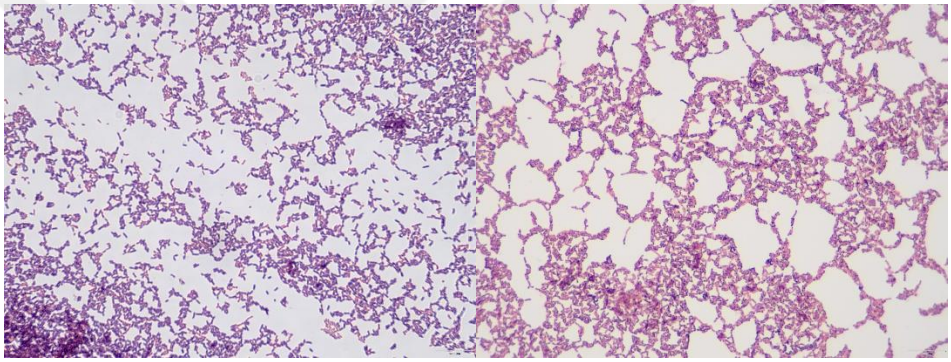
2
GENEL BİLGİLER

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakteri (LAB) türleri genellikle spor oluşturmayan, gram pozitif, sitokroma sahip olmayan, katalaz negatif, aerobik olmayan ama aerotolerant, asidi tolere edebilen, kuvvetli fermentatif olup şeker fermentasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten çubuk ya da küresel morfolojiye sahip bakteri ailesidir (Srinivash vd., 2023; Hayek vd., 2019). Genellikle laktik asit üretme yetenekleriyle karakterize edilmektedirler. LAB'ler vazgeçilmez bir fermantasyon bakterisi olarak, GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsündedir ve önemli bir probiyotik olarak kabul edilmektedirler (FAO/WHO, 2002). Şu ana kadar tanımlanmış yaklaşık 260 türü bulunan LAB'ler süt, bitki, etler, tahıllar ve vertebralıların gastrointestinal sistemi olmak üzere çok geniş bir yayılım alanına sahip mikroorganizmalardır (Wu vd., 2017). LAB endüstriyel olarak önem arz eden başlıca bakteri gruplarındandır ve gıda üretimi, sağlığı düzenleme, makromoleküllerin, enzim ve metabolitlerin üretiminde kullanılmaktadır (Pfeiler ve Klaenhammer, 2007). Bu bakterilere örnek olarak *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsi bakteriler verilebilir (Felis ve Dellaglio, 2007). LAB türleri çok miktarda biyoaktif bileşik üretebilme kapasitesine sahiptirler. Gelişim ortamları gıda, süt ürünleri ve aynı zamanda bitkisel gıdalar olduğu için, fermente ürünlerde biyoaktif moleküllere sıkça rastlanmaktadır (Burgain vd., 2014). LAB türlerinin mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 1.1'de verilmiştir.

Laktik asit bakterileri fermantasyon yeteneklerine göre homozigot ve heterozigot olarak sınıflandırılmaktadır (Blajman vd., 2018). Homofermentatif laktik asit bakterileri tek bir glikoz molekülünden iki molekül laktik asit üretebilirken *Streptococcus, Lactococcus, Weissella* ve *Candida albicans* gibi heterofermentatif

laktik asit bakterileri bir glikoz molekülünden laktik asit, etanol ve karbondioksit üretebilir (Ayivi & Ibrahim, 2022). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* alt türleri genellikle yoğurt üretiminde maya kültürlerinde kullanılmaktadır. Çünkü süt fermantasyonunda en yaygın kullanılan iki bakteri cinsidir (Xu vd., 2015). *Lactobacillus* , *Streptococcus* ve *Kluyveromyces* peynir fermantasyon üretiminde baskın bakterilerdir. Bunlar arasında *Lactobacillus* daha çok lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Zheng vd., 2020). Laktik asit bakterileri fruktoz, laktoz, glikoz ve galaktoz dahil olmak üzere çeşitli karbon kaynaklarından metabolik olarak yüksek miktarda laktik asit ve diğer karbon türevi metabolitler üretebilmektedirler. Homofermentatif ve heterofermentatif LAB'lerin metabolik yolakları Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Laktik asit bakteri türlerinin mikroskop altındaki görüntüsü

LAB suşları özellikle sağlık ve gıda endüstrileri düşünüldüğünde çok önemli bir yere sahiptir. Sağlık açısından inflamatuar bağırsak hastalıkları gibi farklı patolojik durumlarının önlenmesinde ve tedavisinde önemli rol oynamaktadırlar (Martín ve Langella, 2019). Bu bağlamda, bu gruba ait bazı suşlar karakterize edilmiş ve probiyotik özellikleri geçmiş yıllarda ortaya koyulmuştur. Probiyotikler, "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Hill vd., 2014; FAO/WHO, 2001). Probiyotiklerin yararlı etkileri için önerilen etki mekanizmaları çeşitlidir ve suşlara özgüdür (Plaza-Diaz vd., 2019). Bunlar arasında goblet hücreleri tarafından sıkı bağlantı proteinlerinin ve mukus üretiminin korunması yoluyla epitel bariyerinde iyileştirmeler, bağırsak mukozasına yapışma ve patojen yapışmasının eş zamanlı inhibisyonu, antimikrobiyal maddelerin üretimi yoluyla patojenik

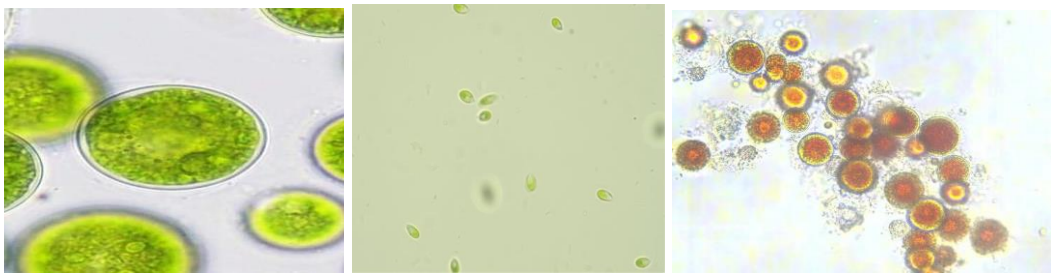
mikroorganizmaların yarışmalı dışlanması ve mukoza bağışıklık sisteminin modülasyonu yer almaktadır (Batista vd., 2020; Pachla vd., 2018). Biyoteknolojik açıdan LAB gıda endüstrisinde de önemlidir çünkü bu mikroorganizmalar yoğurt, bazı peynir ve şarap türleri gibi fermente ürünlerin üretimi ve korunmasında görev almaktadırlar. Ortamı asitleştirme yetenekleri sayesinde bu ürünlerin organoleptik özelliklerini (örneğin doku, tat ve aroma) ve besin değerini iyileştirmektedirler (Tamang vd., 2016). LAB'ler enerjinin, organik bir bileşiğin kısmi oksidasyonundan elde edildiği şeker metabolizması olarak tanımlanan fermantasyon yoluyla karbonhidratları farklı yararlı bileşiklere (çoğunlukla laktik asit) metabolize etmektedirler (Hayek ve Ibrahim, 2013). LAB'ler bakteriyel büyüme için mevcut proteinlerden, peptitler ve amino asitlerin üretim aracı olarak görev almaktadırlar. Ayrıca fermente gıdaların enzimatik modifikasyonunda büyük önem taşıyan güçlü proteolitik aktivitelere sahiptirler (Liu vd., 2022).



Şekil 1.2 Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerinin metabolik yolakları

2.2 Mikroalgler

Mikroalgler ışık enerjisini verimli bir şekilde kullanan, atmosferik CO_2'yi fikse edebilen, vasküler bitkilerden hektar başına daha fazla biyokütle üreten, etkin bir şekilde ışık enerjisini kullanarak hızlı büyüme yeteneğine sahip tek hücreli (mikroalg) fotosentetik organizmaların oluşturduğu zengin bir gruptur (Rizwan vd., 2018; Khan vd., 2018). Mikroalgler protein, yağ asitleri, vitaminler, mineraller, pigmentler ve daha pek çok değerli hücresel metabolitler bakımından zengin bir içeriğe sahip olmaları nedeniyle son yıllarda üzerinde en çok çalışılan organizma gruplarından biri haline gelmiştir (Patras vd., 2019; Vershney vd., 2015). Mikroalgler; hareket organalleri olmayan, olsa bile su hareketleriyle yer değiştirebilen, boyutları mikronlarla ifade edilebilen canlılardır. Makroalgler ise boyutları türe göre 1 – 2 cm ile 40 – 50 m arasında değişen, sucul canlılar için beslenme, barınma ve üreme ortamını oluşturan bitkisel organizmalar olarak bilinmektedirler (Richmond, 2004). Algler, dünyanın en eski yapılarından biri olarak kabul edilmektedirler. İlk keşfedilişlerinin yaklaşık 3,5 milyar yıl öncesine dayandığı tahmin edilmektedir ve mikroalglerin dünya okyanuslarında 3 milyar yıldan fazladır bulundukları bilinmektedir. Mikroalgler, dünyadaki en eski canlı türlerinden biridir (Falkowski vd., 2004). Mikroalglerin çeşitliliği (prokaryotik, siyanobakteriler ve ökaryotik) çok geniştir ancak bu çeşitlilik henüz tam olarak ortaya çıkmamıştır. Mikroalgler, tahmini tür sayısı 200.000 ila 800.000 arasında değişen son derece çeşitli bir gruptur. Şimdiye kadar sadece 50.000 türü tanımlanmış ve yaklaşık 200 tür ticarileştirilebilmiştir (Milledge vd., 2011).



Şekil 2.1 Farklı türde mikroalglerin mikroskop altındaki görüntüleri

Mikroalgler, CO_2'yi sabitleyerek güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürebilmektedir ayrıca üretim verimi karasal bitkilerden on kata kadar yüksektir. Mikroalglerin ticari üretimi yaklaşık 5.000 ton/yıl kuru maddedir (Zhu vd., 2015). Asya-Pasifik bölgesinde, kapasiteleri 3 ila 500 ton/yıl arasında değişen

yaklaşık 110 ticari mikroalg üreticisi bulunmaktadır. Dünyada alg kültürü ekiminin yaklaşık onda dokuzu Asya'da bulunmaktadır. Bunlar arasında çok sayıda ticari mikroalg üreticisi Çin, Tayvan ve Hindistan'da bulunmaktadır. Çok sayıda mikroalg türü izole edilmiş olmasına rağmen çok az mikroalg türü ticari öneme sahiptir. Bunlar arasında *Spirulina, Chlorella, Haematococcus, Dunaliella, Botryococcus, Phaeodactylum, Porphyridium, Chaetoceros, Crypthecodinium, Isochrysis, Nannochloris, Nitzschia, Schizochytrium, Tetraselmis* ve *Skeletonema* bulunmaktadır (Razzak vd., 2024; Del-Campo vd., 2007).

Günümüzde mikroalgler verimli topraklara bağımlı olmayan yenilikçi tarım ürünleri üretim potansiyeline sahip doğal bir kaynak olarak görülmektedir. Atıksu arıtımı, ağır metal giderimi, biyoplastik, biyosensör, biyo-materyal (dolgu materyali vb. gibi) ve ekotoksikolojik testler gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Sarker vd., 2024; Romano vd., 2017). Mikroalg üretiminde, üretimi yapılacak türün üretim amacına göre seçilmesi en önemli parametredir. Genel olarak mikroalg türü gıda amaçlı üretilecekse protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral içerikleri yüksek olan türlerden; arıtma için kullanılacaksa kirli bölgeden izole edilmiş türlerden (Elçık vd., 2017; Rashid vd., 2014); biyoyakıt üretimi için kullanılacaksa yüksek yağ içeriğine sahip olan türlerden seçilmesi uygun olacaktır (Rawat vd., 2013). Mikroalglerin insanlar tarafından başlıca besin desteği olarak kullanılmalarının nedeni; hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitaminler, mineraller ve pigmentler gibi önemli metabolitleri içermeleri olarak gösterilmektedir (Hu vd., 2023; Pierre vd., 2019).

Tablo 2.1 Bazı mikroalg türleri ve geleneksel gıdaların besin içeriğinin karşılaştırılması (Richmond, 2004)

Mikroalg türü	**%Protein**	**%Lipit**	**%Karbonhidrat**
Anabaena cylindrica	43-56	2-7	25-30
Chlorella pyrenoidosa	57	2	26
Synechococcus sp.	63	11	15
Spirulina maxima	60-71	6-7	13-16
Chlorella vulgaris	51-58	14-22	12-17
Euglena gracilis	39-61	14-20	14-18
Isochrysis galbana	27	17	17
Porphyridium cruentum	28–39	6–14	32–57
Dunaliella salina	57	6	32
Prymnesium parvum	28–45	22–38	25–33
Scenedesmus obliquus	50-56	12-14	10-17
Chlamydomonas rheinhardii	43	21	17
Arthrospira platensis	46-63	4-9	8-14

Ekmek mayası	39	1	38
Et	43	34	1
Süt	26	28	38
Yumurta	47	41	4
Pirinç	8	2	77
Soya	37	20	30

2.2.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalglerin gıda sanayinden enerjiye, tıptan tarım sektörüne kadar birçok farklı alanda kullanımları mevcuttur. Mikroalglerin insanlar tarafından başlıca besin maddesi ya da besin katkı maddesi olarak kullanılmalarının nedeni; hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral, pigmentler ve daha pek çok önemli metabolitleridir (Siddhnath vd., 2024; Borowitzka vd., 2018). İçerdikleri karbonhidratlar; nişasta, glikoz, sakkaroz ve diğer polisakkaritler şeklinde bulunmaktadır. Ayrıca insan vücudunda gerçekleşen biyokimyasal süreçler için gerekli olan ancak vücutta üretilemeyen Omega-3, Omega-6 yağ asitleri ve A, B1, B2, B6, B9, B12, C, D, E vitamini gibi insan sağlığı için önemli bileşenleri içermektedirler (Caporgno vd., 2019). Bütün bu özelliklerinden dolayı sağlık, kozmetik, ilaç sanayi gibi alanlarda sıklıkla kullanımları bulunmaktadır. Mikroalgler içerdikleri yüksek yağ verimi sayesinde enerji sektöründe giderek fazlaca kullanılmaya başlanmıştır. Mikroalgler, farklı türde biyoyakıtların üretilmesi için hammadde kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Singh vd., 2011). Mikroalgal biyokütlenin anaerobik bozunması ile metan gazı ortaya çıkmaktadır. Karbonhidrat içeriği içeriği yüksek mikroalglerden biyoetanol üretimi, yağ içeriği yüksek mikroalglerden biyodizel üretimi mevcuttur (Farieda vd., 2017). Ayrıca mikroalglerin üretimi esnasında oluşan fotobiyolojik reaksiyonlar ile biyohidrojen üretimi yapılabilmektedir. Ülkemizde de mikrolaglerden özellikle biyodizel üretimi için çalışmalar yoğun şekilde yapılmaktadır ve bu kapsamda biyodizel üretim tesisleri kurulmaktadır (Mata vd., 2010).

Mikroalgler özellikle pek çok farklı sektörde kullanımları ile biyoteknolojik açıdan öneme sahip mikroorganizma grubudur. Mikroalglerin bu önemi sahip oldukları çeşitli avantajlardan dolayıdır (Wang vd., 2024). Mikroalglerin avantjları maddeler halinde şu şekilde sıralanabilir:

- Çok çeşitli pH, sıcaklık, tuzluluk, havalandırma ve farklı ışık şiddetlerini tolere edebilirler

- Polisakkaritler, lipitler, pigmentler, proteinler, vitaminler, biyoaktif bileşikler ve antioksidanlar dahil olmak üzere çok çeşitli biyotabanlı ürünler üretebilme kapasiteleri vardır
- Güvenilir ve sürdürülebilir bir biyokütle kaynağıdırlar
- Biyoreaktör, fotobiyoreaktör, havuz, torba ya da şişeler gibi farklı üretim teknolojileri ile yetiştirilebilirler
- Yeşil teknoloji olduğu için çevre dostu üretim süreçleri içerir, karbon salınımını azaltır
- Büyük miktarlarda O_2 üretebilme yeteneğine sahiptirler
- Mikroalgler tek tip hücre yapısına sahip oldukları için üretilen rekombinant proteinlerde varyasyonun düşük olması beklenmektedir.

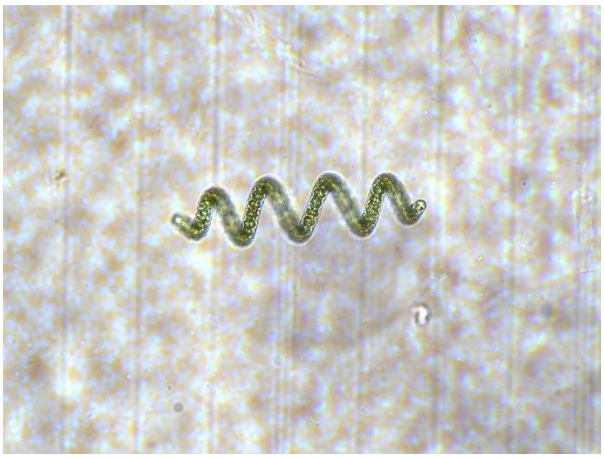
2.2.2 Mikroalgal Proteinler ve Özellikleri

Mikroalgler ve siyanobakteriler ilaç, kozmetik, gıda ve tarım endüstrilerinde uygulamaları olan; önemli miktarda protein, lipit, karbonhidrat ve çoklu doymamış yağ asitleri içeren fotosentetik ve tek hücreli organizmalardır (Ijalo vd., 2024). Bu mikroorganizmalar, türüne bağlı olarak toplam biyokütlenin %70'ine kadar protein biriktirebilirler bu nedenle gelecek için alternatif bir protein kaynağı olarak kabul edilmektedirler (Finkel vd., 2016). Proteinler mikroalg biyokütlesinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Protein bileşimi yetiştirme koşullarına bağlıdır ve proseslerdeki temel zorluk, işlevselliklerinden sorumlu olan biyomoleküllerin doğal formlarını koruyarak ekstrakte edilmesidir (Jiménez-Munoz vd., 2021). Protein ekstraksiyon işleminin ilk adımı, mikroalglerin sert hücre duvarını yıkıma uğratan ve hücre içi bileşenleri açığa çıkaran hücre lizi ya da hücre parçalanmasını içermektedir (Sankaran vd., 2018). Hücre parçalama tekniklerine örnek olarak boncuk öğütme, enzimatik işlem, ultrasonik ekstraksiyon, yüksek basınçlı homojenizasyon verilebilir. Biyokütledeki proteinler ekstrakte edildikten sonra besin takviyeleri olarak kullanılır veya besin değerlerini artırmak için gıda ürünlerine eklenmektedir. Mevcut gıda ürünlerinin teknofonksiyonel özelliklerini arttırmak için de kullanılabilirler (Bleakley vd., 2017). Köpürme, emülsiyon ve jelleşme, istenen özelliklerden bazılarıdır. Bunlar, gıda ürünlerine doku, kıvam ve lezzet tutma özelliği kazandırmaktan sorumludur ve süt ürünleri, fırınlanmış ürünler gibi bazı uygulama örnekleri bulunmaktadır.

Mikroalg proteinlerinden türetilen peptitler antioksidan, anti-inflamatuar, antitümör, antimikrobiyal, antihipertansif ve immünostimülan gibi biyoaktif özelliklere sahiptir (Martelli vd., 2020). Peptitler kimyasal hidroliz, enzimatik hidroliz ya da mikrobiyal fermantasyon yoluyla üretilebilen 2 ila 20 amino asitlik zincirlerdir (O'connor vd., 2022). Antioksidan peptitler reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücresel hasarı önleyebilir, doku çoğalmasına ve yara iyileşmesine yardımcı olabilirler. Yapılan çalışmalarda *ın vitro* ya da *in vivo* testler ile farklı kaynaklardan üretilen peptitlerin farklı sağlık etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

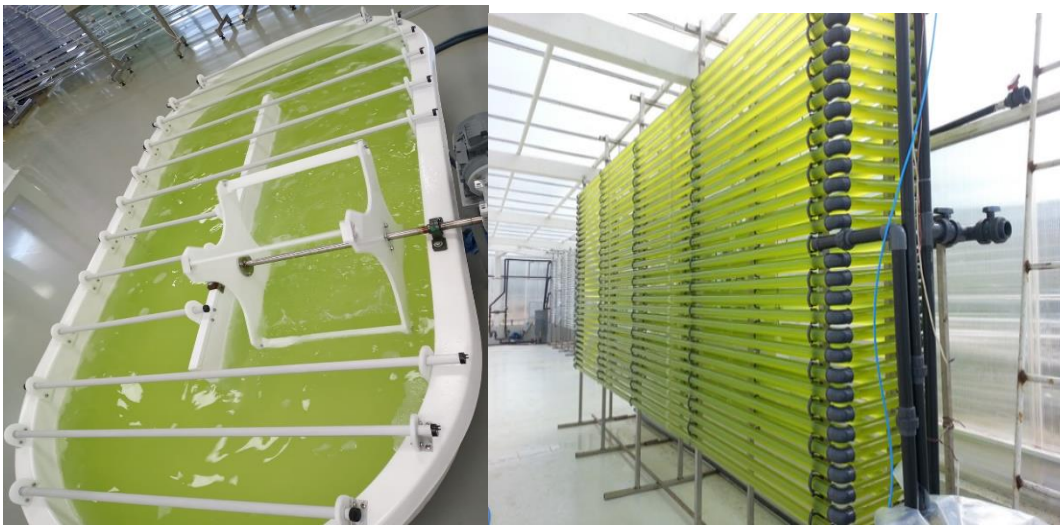
2.2.3 *Arthrospira platensis*

Bir siyanobakteri (mavi yeşil alg) olan *Arthrospira platensis* (spirulina), yoğun üretime uygun, fitoplanktonik bir organizmadır (Chaiklahan vd., 2022). *Arthrospira platensis* 16. yy'da gıda maddesi olarak Aztek uygarlığı tarafından kullanılmıştır. *Arthrospira platensis* çok hücreli ipliksi yapısı ve art arda sıralanmış silindirik trikomun heliks şeklinde dizilmesi ile oluşan filamentli bir siyanobakteridir (Richmond, 1992). *Arthrospira platensis* için mikroskop görüntüsü Şekil 2.2'de verilmiştir. Protein, karetenoid, fikosiyanin ve klorofil gibi pigmentleri, vitamin ve yağlar içerdiğinden, insan gıdası ve beslemede alternatif bir gıda olarak kullanılmaktadır ve insanlar üzerinde metabolik aktiviteyi arttırıcı etkiye sahiptir (Lupatini vd., 2017). Spirulina, yetiştirilme koşullarına bağlı olarak kuru ağırlığın %40-70 arasında protein içeriğine sahiptir. Spirulina'nın protein içeriği, tek hücreli algler ve diğer siyanobakterilerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmektedir (Gershwin ve Belay, 2007). Yapısındaki proteinlerin %90 oranından daha fazla sindirilebilir özellikte olması ve lisin, valin ve izolisin gibi esansiyel amino asitleri içermesi bu türü özellikle sağlık ve gıda endüstrisinde ön plana çıkarmaktadır (Patrizia vd., 2022). Güçlü antioksidan özelliklere sahip fikosiyanin gibi önemli ürünlerin büyük miktarda üretebilmesi nedeniyle spirulina ticari olarak daha da değer kazınmıştır (Athipayyan vd., 2024).



Şekil 2.2 *Arthrospira platensis* mikroskop görüntüsü (100x)

Spirulina sıcak (28-32 ^{0}C) iklim koşullarında yetiştirilebilmektedir. Spirulina yetiştiriciliği, gelişmiş biyokütle verimi , hücre üretkenliği, spesifik büyüme hızı ve protein içeriği için havalandırma, yüksek pH (9-11) ve yeterli ışık yoğunluğu gerektirmektedir (Lafarga vd., 2020). Yüksek pH değerini korumak ve dalgalanmaları önlemek için kültür ortamında her zaman yüksek miktarda sodyum bikarbonat bulunmalıdır. Biyokütle büyümesi için farklı fotobiyoreaktörler ve havuz sistemleri kullanılmaktadır. Fotobiyoreaktörler; açık havuzlara kıyasla ışıktan faydalanması, yüksek biyokütle eldesi, kontaminasyonun riskinin ve su kaybının (buharlaşma) az oluşu, karıştırma ve gaz transferi kolaylığı açısından çok daha performanslıdır (Pawlowski vd., 2014). Ayrıca, açık havuzların aksine, kapalı sistem oldukları için kontaminasyon riski daha düşük olup, tek tür mikroalg kültivasyonu için uygundur. Işık ve sıcaklık açık havuzlarda biyokütle gelişimi için hayati iki parametredir. Işık türünün, ışık yoğunluğunun ve fotoperiyot süresinin belirlenmesi mikroalgal kültürler için önemli proses koşullarını oluşturmaktadır (Harun vd., 2010). Açık havuz sistemi ve fotobiyoreaktör sistemi şekil 2.3'te gösterilmiştir.



(A) (B)

Şekil 2.3 Mikroalg yetiştirmek için; (A) havuz sistemi, (B) fotobiyoreaktör

Spirulina'nın, sürdürülebilir yetiştirme teknikleri, gıda matrislerinde fonkisyonel özellikleri arttırma amacıyla kullanılabilmeleri, potansiyel sağlık faydaları ve kendine has tat, aroma ve kokusu ile dünya çapında önemli bir değere sahiptir (İşleten-Hoşoğlu vd., 2020). Uluslararası birçok kuruluş spirulina'nın gelecekte kullanımının artacağına ve artan besin ihtiyacına çözüm olabileceğine vurgu yapmıştır. Örneğin; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) spriulina'yı en iyi gıda kaynaklarından biri olarak nitelendirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Spirulina'yı insanlığın en iyi sağlık ürünü olarak tanımlamıştır. NASA ise spirulina'yı 2050'li yıllarda uzayda gerçekleştirilecek çalışmalarda astronotların yiyeceği olabilecek potansiyele sahip bir besin kaynağı olarak göstermiştir (Alzahrani vd., 2018; Soni vd., 2017).

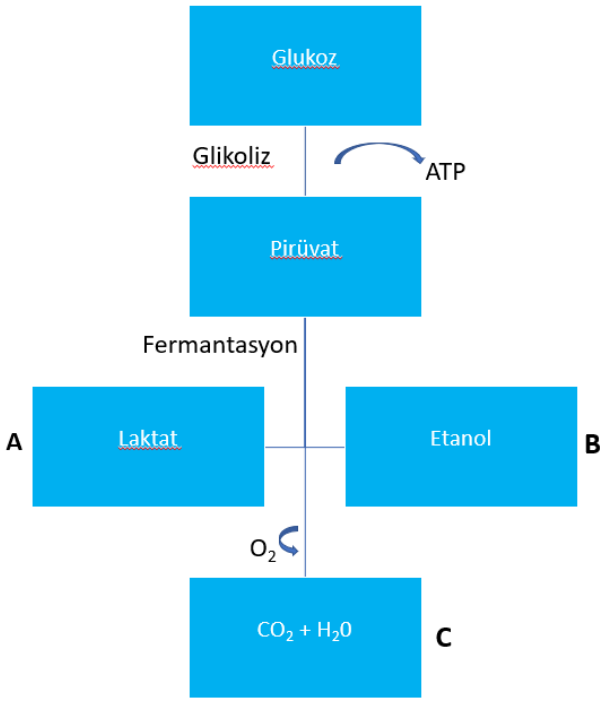
2.3 Fermantasyon

Fermantasyon, bir mikroorganizmanın karbonhidratları, genellikle nişasta veya şekeri; alkoller, asitler ve gazlar gibi daha basit bileşenlere dönüştürdüğü biyolojik bir süreçtir (Liu vd., 2018). Günümüzde Orta Doğu adı verilen bölgede ortaya çıktığı düşünülmekte olan fermantasyon, tarihi M.Ö. 10.000'e kadar uzanan çok eski bir teknolojidir (Salas-Millan vd., 2018). İnsanlar, Neolitik Dönem'den beri mutfak amaçları için fermantasyon ürünlerinden yararlanmaktadır, ancak bu teknolojinin arkasındaki bilim, 19. yüzyılın ortalarına kadar ciddi bir şekilde araştırılmamıştır (Erkmen ve Bozoğlu, 2016). Bu keşfin harekete geçirdiği

ilerlemeler, fermantasyonun pratik uygulamalarının ilaç/kimyasalların üretimi, biyoteknoloji ve beslenme gibi diğer alanlara yayılmasını sağlamıştır (Cerda vd., 2019). Fermantasyon proseslerinde yer alan en yaygın mikroorganizma grupları arasında, fermantasyon sürecini katalize eden enzimler üreten bakteriler, mayalar ve küfler bulunmaktadır (Niccolai vd., 2020). Fermantasyon sırasında mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal değişimler ürünlerin işlevsel değerini ve besinsel özelliklerini iyileştirir ve doğrudan biyoaktif bileşiklerin salınımına veya değişimine katkıda bulunmaktadır (Muralli vd., 2024).

Yaygın kullanımda, fermantasyon genellikle oksijen gerektirmeyen anaerobik bir süreci ifade etmektedir, ancak oksijen belirli fermantasyon süreçlerinde mevcut olabilir. Ortamda oksijenin varlığında, pirüvat hücresel solunumla karbondioksite (CO_2) kadar parçalanır ve böylece hücresel enerji sağlamak için birçok ATP molekülü oluşturulur (de Melo vd., 2020). Ancak, ortamda oksijen yoksa ya da düşük seviyedeyse, pirüvat kullanımı fermantasyon süreciyle devam edebilir. Temel olarak iki tür fermantasyon vardır. Bunlar; laktik asit fermantasyonu ve alkol fermantasyonudur. Laktik asit fermantasyonu, glikozun oksijensiz bir ortamda laktik asit bakterileri tarafından laktik aside (laktat) dönüştürüldüğü bir fermantasyon türüdür (Liu, 2003). Alkol fermantasyonu, şekerlerin maya ya da bazı özel bakteri türleri tarafından oksijensiz bir ortamda etil alkol ve karbondioksite parçalanması olarak ifade edilmektedir (Scarborough vd., 2020). Etil alkol ve karbondioksite ek olarak, asetaldehit, gliserin ve asetik asit gibi maddeler de alkol fermantasyonu ile oluşmaktadır (Waites vd., 2001). Fermantasyon ve hücresel solunum sonucunda oluşan bu ürünler Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

Fermantasyon teknolojisi atık akışlarından kaynak geri kazanımı için de son yıllarda giderek umut verici bir çalışma alanı haline gelmiştir. Enerji geri kazanımındaki yerleşik rolünün ötesinde, fermantasyon ile karboksilik asitlerin, özellikle asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi uçucu yağ asitlerinin üretimini de içerecek şekilde ilerlemeler olmuştur. Bu uçucu yağ asitleri ve diğer yan ürünler çeşitli işlevsellikleri nedeniyle farklı endüstriler ve biyobazlı ürün uygulamaları için önemli ilgi görmektedir (Milati vd., 2023).



Şekil 2.4 Hücresel metabolik yollar: (A) laktik asit fermantasyonu, (B) alkol fermantasyonu, (C) aerobik solunum

Fermantasyon terimi biyokimyada oksijen yokluğunda enerji üreten reaksiyonlar için kullanılmasına karşın, gıda sanayisinde daha genel bir anlam taşımaktadır. Mikroorganizmaların oksijen varlığında yaptığı parçalama reaksiyonları fermnatasyon işlemidir. Biyoteknolojide fermantasyon terimi daha da genel kullanılır ve büyük tanklarda büyütülen mikroorganizmalara yaptırılan her türlü üretime (proteinler dahil) fermantasyon adı verilmektedir. Yirminci yüzyıldan itibaren fermantasyonun besin değerinin daha fazla kabul gördüğü görülmektedir. Fermente gıdaları kişinin diyetine dahil etmesi, artan vitamin seviyeleri ve fermente gıdaların iyileştirilmiş sindirilebilirliği de dahil olmak üzere çok sayıda sağlık faydası bu ürünlere olan ilgiyi arttırmıştır. Fermantasyon süreci, gıdaları daha kolay sindirilebilir hale getiren ve onları vitaminler ve enzimlerle zenginleştiren probiyotikler üretmektedir. Ek olarak, fermantasyon bazı gıdaların dokusunu ve lezzetlerini değiştirerek onları insan damak tadına daha uygun hale getirir. Ayrıca doğal bir koruyucu görevi görür ve kimyasal koruyuculardan çok daha fazla sağlık faydası sağlar. Fermantasyon alanındaki çalışmalar gıda endüstrisi dışı alanlarda da önemli gelişmelere yol açmıştır. Farmasötik ve tıbbi alanlarda, fermantasyon antibiyotiklerin, vitaminlerin ve diğer ilaçların sentezinde kullanılmaktadır. Endüstriyel fermantasyon yoluyla çeşitli yararlı ürünler geliştirilebilir.

Fermantasyonun yan ürünlerinden birisi olan alkol, genellikle bütanol ve etanol olarak ortaya çıktığından, bu proses biyoyakıt üretmek için de kullanılabilir. Temizleme çözücüsü olarak kullanılan aseton, belirli fermantasyon türlerinin bir diğer yan ürünüdür. Fermantasyon ayrıca atık suyu arıtmak için kullanılır, bu işlem atık ürünü parçalamanın yanı sıra kullanılabilir biyoyakıt üretmenin ek faydasına sahiptir.

2.3.1 Mikrobiyal Fermantasyon

Mikrobiyal fermantasyon, bazı bakteri ya da mayaların büyüdükçe enzimleriyle proteinleri hidroliz etmeleri için protein substratlarıyla kültürlenmelerini içermektedir. Fermantasyon esnasında gerçekleşen hidroliz derecesi kullanılan suşa, proteine ve fermantasyon koşullarına bağlıdır. Fermentasyon prosesinde mikroorganizmalar, hayatta kalmak için ihtiyaç duydukları besin elementleri ve enerjiyi; etraflarındaki bileşikleri metabolize ederek, bu esnada açığa çıkan ısıdan temin etmektedirler. Mikroorganizmalar farklı proteolitik enzimlere sahiptir. Bu nedenle elde edilen hidrolizatların işlevselliği kullanılan mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir (Daliri vd., 2017). Mikrobiyal fermantasyon esnasında protein kaynağı olarak *Spirulina platensis* kullanılması sonucunda elde edilen peptitlerin antibakteriyel aktivite (Sun vd., 2015), antitümör etki (Suetsuna ve Chen, 2001), ACE-1 inhibitör aktivite (Lu vd., 2010) gösterdiği bulgulanmıştır. Birçok çalışmada *Spirulina platensis*'ten etkili biyoaktif peptitler elde edilmiş olmasına belirtilmiş ve protein kaynağı olarak *Spirulina platensis*'in seçilmiştir. DPPH, Fe^{2+} şelatlama gibi antioksidatif aktiviteler ve ACE-1 enzim inhibitörü gibi biyoaktif özelliklerin araştırılması önem arz eden konular olarak ele alınmıştır. Spirulina'dan elde edilen anti-enflamatuar, anti aterosklerotik, anti-alerjik ve antihipertansif peptitler; enflamatuar hastalıklar, hipertansiyon tedavisi için veya yeni alerjik reaksiyon inhibitör olarak fonksiyonel gıdalarda ve/veya farmasötiklerde faydalı bir bileşen olarak kullanılabilmektedir (Lu vd., 2010). Spirulina; ambalajlama ve muhafaza etme gibi gıda uygulamalarında da kullanılabilmektedirler (Samarakoon ve Jeon, 2012). Diğer yandan özellikle peptit bazlı UV koruyucuları, akne ve çeşitli cilt tedavilerinde uygulanan ilaçlarda kullanılmaktadır (Danquah ve Agyei, 2012). Biyoaktif peptitlerin çok yönlülüğü ve çok fonksiyonlu olması sebebiyle antimikrobiyal ve böcek ilaçları gibi tarımsal uygulamalarda kullanılabilmektedirler (Sun, 2013).

Mikrobiyal fermantasyon, biyoaktif peptitlerin elde edilebildiği biyoteknolojik bir süreçtir. Bu işlem, bu enzimlerin proteinleri daha kısa peptitlere hidrolize etmesi amacıyla proteolitik enzimler üretebilen mikroorganizmaların kullanılmasını içerir (Romero-Garay vd., 2021). Mikrobiyal fermantasyon işleminde daha iyi biyoaktiviteye sahip peptitler üretmek için uygun substrat, uygun mikroorganizma ve pH, sıcaklık ve nem gibi optimum çevresel koşulların ele alınması esastır (Melini vd., 2019). Peptidlerin optimal üretimini ve bunların yüksek biyoaktivitesini elde etmek için kullanılan mikroorganizma türü mikrobiyal fermantasyon için çok önemlidir (Hayes & García-Vaquero, 2016). Daha önce bahsedildiği gibi, yüksek proteinaz aktivitesine ve çeşitli peptidazlara sahip bakteri, mantar ve mayaların kullanımı yaygındır (Rizzello vd., 2017). Bununla birlikte, biyoaktif peptitleri ürettikleri proteolitik sistemler benzersiz olduğundan, mikrobiyal fermentasyon her mikroorganizma türü (bakteri, mantar veya maya) için farklılık göstermektedir (Elam vd., 2021). Bakteriler arasında, hayvan ve bitki substratlarının yanı sıra farklı ortamlara yüksek adaptasyon kabiliyetleri nedeniyle biyoaktif peptitlerin elde edilmesi için en değerli mikroorganizmalar arasında laktik asit bakterileri (LAB) öne çıkmaktadır. Çünkü bu bakteriler "dost bakteriler" olarak bilinir, “genel olarak güvenli olarak kabul edilir" ve onları karakterize eden verimli proteolitik sistem nedeniyle tercih edilmektedirler. LAB tarafından uygulanan proteolitik aktivite, bir suştan diğerine oldukça değişkendir. Hücrede gen ekspresyonundaki farklılıklar ve mutasyonlar, enzimatik aktivite için optimal koşullardaki farklılıklar, hidrolize edilen protein tipindeki farklılıklar veya mikroorganizmanın bulunduğu büyüme fazındaki farklılıklar (proteolitik aktivite, üstel fazda ve durağan fazın ilk periyodunda korunur) bu durumun sebeplerindendir. LAB'nin bu özelliği, farklı amino asit dizileri üretmek için fermantasyon işlemine avantaj sağlamaktadır ve bu nedenle peptitler yüksek çeşitlilikte biyoaktiviteye sahip olabilmektedirler (Ayyash vd., 2018).

Mikrobiyal fermentasyon, diğer peptit türevleme tekniklerinde bulunmayan belirli faydalar sağlaamaktadır. Örneğin, farklı boyut ve dizilerde peptitler üretebilir ve bu nedenle daha fazla biyolojik aktiviteye sahip olan yüksek çeşitliliğe sahip mikrobiyal proteazlara sahiptirler. Benzer şekilde, enzimatik hidrolizde olduğu gibi sadece tek bir proteaz değil, mikroorganizmanın karakteristiği olan tüm proteazlar kümesi, öncü proteinden peptitin yeterli bir salınımına yol açan, yüksek düzeyde

proteaz aktivitesine sahiptirler. Sonuç olarak mikrobiyal fermantasyonda, kullanılan mikroorganizma ve koşullara bağlı olarak diğer peptit üretim döngülerine kıyasla proses süresi daha kısadır (LebLanc vd., 2002). Peptit üretiminde enzimatik reaksiyonlarda işlem maliyetleri yüksektir. Ancak mikrobiyal fermantasyonda ticari enzimler kullanılmadığından ve kültür maliyetleri de nispeten düşük olduğundan enzimatik hidrolizden daha az maliyetlidir. Ek olarak, LAB kullanıldığında, proteazlar hücre zarında ifade edilir, bu da üretilen biyoaktif peptitler için basit saflaştırma işlemleriyle sonuçlanmaktadır (Agyei ve Danquah, 2011).

2.3.2 Hassas Fermantasyon

Hassas fermantasyon teriminin ne zaman ortaya çıktığı belirsiz olsa da, 2015 gibi erken bir tarihte bilimsel bir makalede yer aldığı belirlenmiştir (Barton vd., 2015). Hassas fermantasyon terimi nispeten yeni olsa da, sürecin kendisi 1980'lerden beri kullanılmaktadır. Örneğin, teknolojiler onlarca yıldır insülin ve eritropoietin gibi protein hormonları üretmek için (Zhang vd., 2017) veya *Escherichia coli*'deki kimozin (rennin) gibi gıda işleme enzimleri üretmek için kullanılmıştır (Flamm, 1991). Hassas fermantasyon, hayvansal proteinleri endüstriyel ölçekte hayvancılık ihtiyacı olmadan üretmek için kullanılan yenilikçi bir yöntemdir. Rrekombinant veya heterolog proteinler olarak adlandırılan bu ürünler; bakteri, mantar veya maya gibi modifiye edilmiş mikroorganizmalar aracılığıyla üretilmektedir. Bu teknoloji gelecekte tarım sektöründe geleneksel uygulamalara gerek kalmaması, yenilikçi gıda bileşenlerinin geliştirilmesi ve katkı maddelerinin verimli bir şekilde üretilmesini hedeflemektedir. Hücresel tarım kapsamında, hassas fermantasyonun gelecekteki tarımsal gıda sistemlerinde, özellikle iklim değişikliği bağlamında veya tarımsal arazi kullanımının sınırlı olduğu bölgelerde sürdürülebilir gıda güvenliğine katkıda bulunmada önemli bir rol oynaması beklenmektedir (Soice ve Johnston, 2021). Hassas fermantasyonun çok çeşitli gıda bileşenleri üretmek için kullanılabilmesine rağmen, sistematik literatür incelemesinde, mikrobiyal üretim süreçlerinin oldukça benzer olduğunu belirlenmiştir. Farklılıkların gözlemlenmesinin muhtemel olduğu üretim aşaması, genellikle mikrobiyal üretim konakçısının (örn. bakteri, maya veya filamentli mantarlar veya mikroalgler) veya ürünün (örn. proteinler, lipitler, oligosakkaritler) türü tarafından belirlenen alt akım işlem aşamasıdır.

2.4 Biyoproses Geliştirme

Biyoproses geliştirme, bir veya birkaç substratı istenilen bir ürüne dönüştürmek için canlı organizmaları kullanan kompleks sistemlerdir (Clarke, 2013). Bakteri, mantar, maya, arke, bitki veya alg gibi mikroorganizmaların çok çeşitli ürünler üretmek için yetiştirildiği mikrobiyal üst akım ve alt akım proseslerin geliştirilmesi, takibi ve uygulanması biyoproseslerin temelini oluşturmaktadır (Rader vd., 2015). Biyoproses geliştirme, istenen verim ve saflıkta belirli bir biyoürün için sağlam tasarım alanını belirlemeyi içermektedir (Hanke vd., 2014). Biyoproses parametrelerinin etkileşimini anlamak için bir dizi deney setlerinin uygulanması gerekmektedir. Uygulanabilir tasarım alanını taramak için bol miktarda deney gerekir ve bu da çok sayıda işleme malzemesi ve zaman gerektirmektedir (Sulzbacher vd., 2013). Biyoproses geliştirmede, özellikle erken aşamada, zaman ve ölçek sınırlıdır. Bu nedenle, küçük ölçekte deneyler uygulama konusunda yüksek verimli yaklaşım, yalnızca az miktarda işleme malzemesi gerektirdiği için son derece çekicidir. Biyoteknolojik üretimlerde belirlenecek suş türü ve test edilecek işlem koşulları göz önüne alındığında, yüksek verimli yetiştirme sistemleri, kısa sürede geniş tasarım alanını örneklemek için biyoprosesler hayati bir işlev görmektedir. Ayrıca hücreleri ölçeklendirme prensiplerine uygun olarak geliştirmek endüstriyel biyoreaktör koşullarına daha kolay uyum sağlamaları için çok önemlidir (Chopra ve Dhingra, 2021; Yang vd., 2020).

2.4.1 Biyoproseslerde Ölçeklendirme

Biyoproseslerin etkili bir şekilde geliştirilebilmesi için ölçeklendirme çalışmalarının çok hassas ve tüm parametreleri göz önüne alarak yapılması gerekmektedir. Biyoproseslerin yapılarına göre ölçek büyütme ya da ölçek küçültme yapılabilir.

2.4.1.1 Ölçek Büyütme

Laboratuvar prosedürünü endüstriyel prosese dönüştürme çalışmaları ölçek büyütme olarak tanımlanmaktadır. Laboratuvar ölçeğinde iyi çalışan bir proses, büyük ölçeğe uyarlandığı zaman düşük verimle çalışabilir veya hiç çalışmayabilir (Kazi vd., 2010). Genellikle laboratuvarda çalışılan fermentasyon şartlarını direk endüstriyel ölçekli ekipmanlara uygulamak mümkün değildir. Bunun birçok nedeni vardır.

• Havalandırma ve karıştırma: Laboratuvar ölçeğinde yapılan fermantasyonlarda havalandırma ve karıştırma, endüstriyel çapta yapılan üretimlerdeki havalandırma ve karıştırmaya göre nispeten kolaydır.

• Ekipman Hacmi: Ekipman hacmi büyüdükçe yüzey/hacim oranı değişecektir. Küresel bir mikroorganizmanın hacmi $4/3\pi r^3$ 'tür. Alanı ise $4\pi r^2$'dir. Alan/Hacim=$3\pi r$'dir. Dolayısıyla hacim arttıkça yüzey alanı küçülmektedir.

• Gaz Transferi: Karıştırma, fermentör hacminden çok, maruz kalınan yüzeye bağlı olduğunda çok büyük önem taşımaktadır. Yüzey/hacim oranı nedeniyle büyük ölçekte oksijen transferi sağlamak çok zor olabilmektedir. Havalandırma yeterince yapılamazsa verim kaybı olabilir. Havalandırma çok kısa süreli dahi kesilse fermentör içinde kısmi anaerobik koşullar oluştuğu için verimi büyük oranda etkilemektedir. Karıştırmanın daha az etkili olduğu bölgelerde cep denilen kör noktalar oluşur ve mikroorganizma böyle ceplere girdiğinde fermantasyon koşullarından farklı çevre koşullarına maruz kalacağı için verim kaybı oluşur, hedeflenenin dışında başka ürünler üretilebilir (Delvigne vd., 2014).

Biyoteknolojik bir prosesin laboratuvar ortamından ticari fermentöre taşınması; çalkalamalı erlen denemeleri, laboratuvar ölçekli fermentör (5-10 L), pilot ölçekli fermentör (100-3000 L), ticari fermentör (10,000-500,000 L) gibi aşamalardan sonra gerçekleşmektedir. Çalkalamalı erlen denemelerinde hedeflenen optimizasyon parametreleri pH, sıcaklık, oksijenin çözünürlüğü, substrat seçimi ve substrat konsantrasyonun optimizasyonudur. Laboratuvar ölçekli fermentörde ise karıştırma, soğutma ve ısıtma, hava giriş ve çıkışı, pH kontrolü, besin ilavesi ve inokulasyon (aşı) oranı gibi parametreler optimize edilmeye çalışılır (Delafosse vd., 2015). Laboratuvar ölçekli çalışmaları optimal çalışma koşullarını saptamak amacıyla farklı biyoreaktör hacimlerindeki pilot tesis araştırmaları izlemektedir. Son aşama ise çalışmalardan elde edilen sonuçların tesis veya üretim ölçeğine aktarılması ve son ekonomik durumun ortaya konulmasını kapsayan endüstriyel uygulamalardır. Ölçek büyütme çalışmalarında birçok değişken bulunmaktadır. Bu proses değişkenlerinin izlenmesi ve optimize edilmesi biyoproses mühendisliğinin temel konularındandır. Ölçeklendirme çalışmalarındaki proses değişkenleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 Ölçeklendirme çalışmalarında biyoproses değişkenleri

Fiziksel Değişkenler	Kimyasal Değişkenler	Biyolojik Değişkenler
Hava (gaz) akışı	Çözünmüş CO_2	Aktif biyokütle
Biyoreaktör hacmi	Çözünmüş O_2	Hücre dışı biyokimyasal maddeler ve metabolitler
İletkenlik	Floresans	Hücre içi bileşenler: DNA, RNA, NADH, ATP, proteinler
Köpük oluşumu	İyon şiddeti	Mikrobiyal kontaminasyon
Sıvı akışı	Nütirent konsantrasyonları	Morfoloji
Optik yoğunluk	Çıkış gazı bileşenleri	Toplam biyokütle
Karıştırma hızı	Osmolarite	
Basınç	pH	
Sıcaklık	Redoks potansiyeli	
Viskozite		

2.4.1.2 Ölçek Küçültme

Ölçek büyütmede karakteristik zaman analizi kullanımın potansiyel uygulamasına rağmen daha doğru bir yaklaşım reaktörün mantıksal ölçülendirilmesidir. Ölçek küçültmedeki temel fikir büyük ölçekte mevcut olan çevresel heterojeniteyi aynı şekilde tanımlayan daha küçük ölçekli deneysel sistemler geliştirmektir. Üretim tesislerinin küçük ölçekte kopyası olarak geliştirilmesi gerekmektedir. Bu ölçekte birçok parametre daha hızlı ve daha ucuz şekilde denenebilecektir. Böylece küçük ölçekler mevcut işletim koşulları için amaçlanan değişimleri değerlendirmede kullanılabilecektir (Delvigne ve Noorman, 2017). Uygun ölçek küçültme sistemlerinin geliştirilmesi mikrobiyoreaktör geliştirmelerinin önünü açmaktadır. Ayrıca tek kullanımlık (single use) biyoreaktörlerin geliştirilmesi ve paralel sistemler olarak kullanılması ölçek küçültme işlemlerinin daha doğru gerçekleştirilmesi için umut vadeden gelişmelerdir. Bu ilerlemeler, ölçek büyütme sırasında ortaya çıkabilecek olası sorunların daha hızlı araştırılmasını sağlanması için önem arz etmektedir (Neubauer ve Junne, 2010).

2.4.2 Biyoproseslerde Mikrobiyal Kinetik

Biyoproseslerde mikrobiyal kinetik, mikroorganizmaların büyüme, substrat tüketimi ve ürün oluşum hızlarını matematiksel olarak tanımlamaktadır. Mikrobiyal kinetiklerin belirlenmesindeki temel amaç, biyoreaktördeki süreçleri anlamak, modellemek ve optimize etmektir (Shirkhan vd., 2023). Mikrobiyal kinetiklerin analizinde; biyokütle (X), spesifik büyüme hızı (μ), substrat (S), zaman (t) ve ürün oluşumu (P) en önemli kavramlardır. Spesifik büyüme hızı (μ) birim biyokütlenin birim zamanda ne kadar arttığını göstermektedir (Rezvani vd. 2017). Biyoproseslerde mikroorganizmaların zaman içerisinde gelişim hızları Denklem 1'de gösterildiği şekildedir.

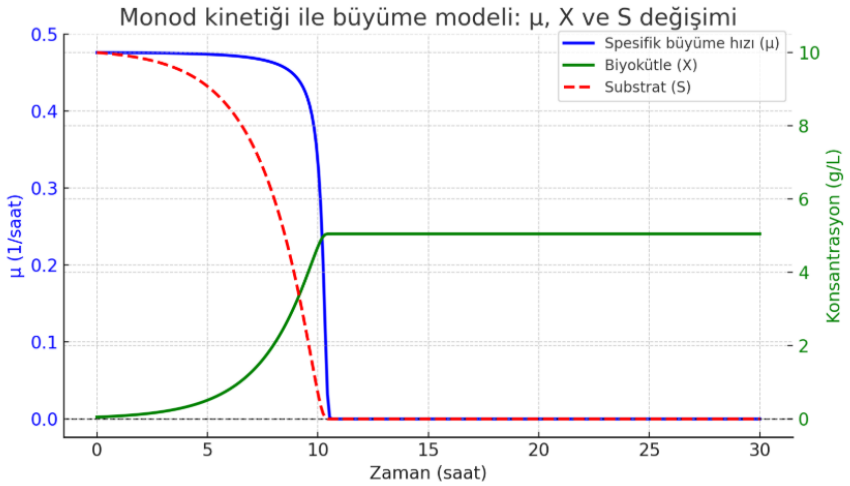
$$\frac{\mathrm{dx}}{\mathrm{dt}} = \mu \cdot x \tag{1}$$

Biyoproseslerde mikroorganizmanın kültürel şartları değişemdiğinde μ değeri sabit kalmaktadır. Ancak kültürel şartlar değiştiğinde μ substrat konsantrasyonuna göre değişmektedir. Bu durum Monod denklemi ile tanımlanmaktadır. Monod denklemi (Denklem 2) aşağıda verilmiştir.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{\mathrm{S}}{K_s + \mathrm{S}} \tag{2}$$

Burada μ_{max} maksimum spesifik büyüme hızı (h^{-1}), K_s ise yarım doygunluk sabitidir (Michaelis-Menten katsayısı). Düşük substratta μ değeri küçüktür, substrat artınca μ değeri artış gösterir ancak belrili bir noktadan sonra sabitlenmektedir (Papizadeh vd., 2020). Spesifik büyüme hızı için inhibisyon etkisi yapabilecek durumlar mevcuttur. Bunlar; substrat inhibisyonu, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen gibi çevresel inhibisyon etkileridir (Gupta vd., 2011). Ayrıca yüksek hücre yoğunluklarında hücreler birbirini sınırlandırabilir ve spesifik büyüme hızı azalabilmektedir. Spesifik büyüme hızı, substratın yeterli olduğu, çevre koşullarının optimum olduğu ve ürün inhibisyonunun olmadığı durumlarda maksimum değerine ulaşmaktadır. Proses ilerledikçe besin azalması, ürün birikimi ve çevre koşullarındaki değişim nedeniyle μ giderek düşmektedir (Mechmeche vd., 2017). Şekil 2.5'te Monod kinetiği ile büyüme modeli arasındaki ilişki verilmiştir. Grafik incelendiğinde spesifik büyüme hızı proses başlangıcında yüksek ancak substrat azaldıkça düşüş göstermektedir. Substrat proses süresince zamanla

tüketilip bitmektedir. Biyokütle miktarı ise hızla artış gösterip kültür doygunluğa ulaştığında durağanlaşmaktadır.



Şekil 2.5 Monod Kinetiği ile büyüme modeli arasındaki ilişki

Denklem 2'de μ ifadesinin karşılığı olarak Denklem 1 yazılırsa;

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \cdot x \tag{3}$$

ifadesi elde edilmektedir.

Biyoproselerde artan biyokütle ile azalan besin maddesi arasındaki oran dönüşüm (Y) katsayısı olarak tanımlanmaktadır.

$$Y = -\frac{dx/dt}{dS/dt} \tag{4}$$

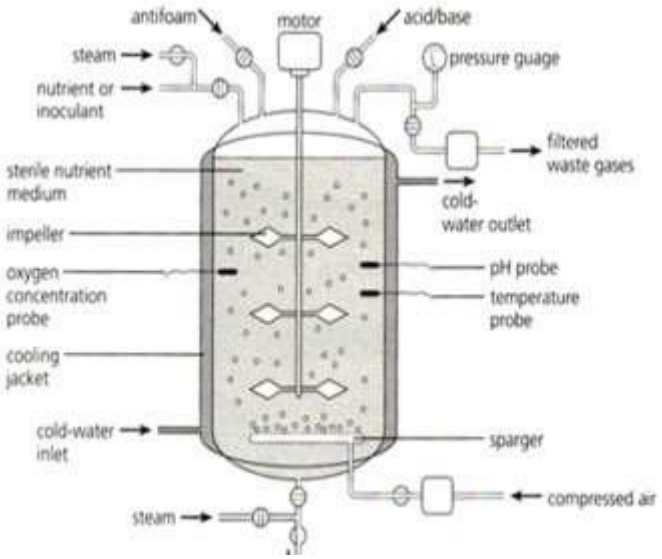
$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dx/dt}{Y} = \frac{\mu_{max}}{Y} \cdot \frac{x.S}{K_s + S} \tag{5}$$

Denklem 5; dönüşüm katsayısı ve mikroorganizma büyümesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Burada μ_{max} / Y birim biyokütle başına substratın maksimum tüketilme hızını ifade etmektedir. μ_{max} / Y ifadesi kısaca k ile gösterilmektedir. Bu noktadan hareketle Denklem 6 elde edilir.

$$\frac{dS}{dt} = -k \cdot \frac{x.S}{K_s + S} \tag{6}$$

2.5 Biyoreaktörler

Biyoreaktorler veya fermentörler; aşılar, organik asitler, amino asitler, biyoaktif peptitler ve antibiyotiklerin, enzimatik/mikrobiyal biyotransformasyonlar, biyoremediyasyon, biyodegradasyon, biyogübre vs. olarak kullanmak amacıyla mikrobiyal inokulantların üretildiği herhangi bir biyoteknoloji bazlı üretim prosesinin başlangıç materyalleri ile son ürünü arasındaki bağlantıyı sağlayan temel biyokimyasal araçlardır (Sharma, 2012; Shuler & Kargi, 1982). Biyoreaktör hücrelere besin ve oksijen transferini ve hücrelerden metabolik ürünleri kontrol eden biyomekanik ve biyokimyasal bir ortam sağlamaktadır (Williams, 2002). Ayrıca, biyokatalizör, enzim veya mikroorganizmaların ve hayvan veya bitki hücrelerinin etkisiyle organizmanın optimum büyümesi ve metabolik aktivitesi için tasarlanmış bir mühendislik eseri cihaz olarak da tanımlanabilir (Garcia-Ochoa ve Gomez, 2009). Örnek bir biyoreaktör görseli ve biyoreaktörü oluşturan parçalar/sistemler Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6 Biyoreaktör (Shuler & Kargi, 1982)

İşlevsel bir biyoreaktör tasarımı, maliyet etkin bir şekilde tutarlı ve daha yüksek kaliteli ürünler elde etmek için istenen parametrelerin doğrulanması, geliştirilmiş üretkenlik gibi konuları ele almalıdır (Abbott vd., 2013). Bir biyoreaktörün tasarımı ve çalışma şekli, organizmanın üretimine, istenen ürün oluşumu için gereken optimum koşullara, ürün değerine ve üretim ölçeğine bağlıdır. Biyoreaktörlerin en

önemli amacı, biyolojik reaksiyonu kontrol etmek, prosesin olumlu şekilde seyretmesini sağlamak ve potansiyel kontaminasyonu önlemektir (Türker, 2005).

Biyoreaktörde yeterli kütle transferi, ısı transferi, açıkça tanımlanmış akışkan mekaniği ve yetersiz ya da aşırı dozdan kaçınarak uygun substrat beslemesinin sağlanması gerekmektedir (Henzler ve Kaughin, 1985). Katıların süspansiyonunun uygun şekilde sağlanması, yeterli substrat, beslenme için tuzlar, vitaminler gibi su mevcudiyeti ve oksijen (aerobik işlemler için) ile sağlanmalıdır (Osadolor vd., 2018). Bir biyoreaktörün nitelikleri sterilizasyon, basit yapı ve ölçüm, işlem kontrol cihazları, düzenleme teknikleri, ölçeklendirme, operasyonlarda esneklik, üst akım ve alt akım işlemleriyle uyumluluk, köpük önleyici önlemler gibi tasarım gerekliliklerine uymalıdır.

2.5.1 Biyoreaktör Türleri

Endüstride farklı amaçlar için kullanılan farklı tasarımlara sahip biyoreaktör türleri bulunmaktadır. Bu biyoreaktör türleri; karıştırmalı tank biyoreaktör, kabarcık kolon reaktör, dolgulu kolun reaktör, hava kaldırmalı reaktör, akışkan yatak reaktör, piston akışlı reaktör, membran biyoreaktör ve fotobiyoreaktördür.

2.5.1.1 Karıştırmalı Tank Tipi Biyoreaktörler

Karıştırmalı tank biyoreaktörler, biyokimyasal reaksiyon dizilerini gerçekleştirebilen tek bir tanktan oluşmaktadır. Endüstride en çok kullanılan biyoreaktör türüdür ve kullanımı nispeten kolaydır (Gabelle vd., 2012). Tank, reaktanları karıştırmak için bir karıştırıcı ve entegre ısıtma ve soğutma sistemiyle donatılmıştır. Reaktanın pH'ını ve çözünmüş oksijen seviyesini kontrol etmek için tampon pH kontrolörü ve çözünmüş oksijen probu kullanılmaktadır. Bu reaktrölerin kapasitesi 1 litreden 15.000 litreye kadar değişebilmektedir. Karıştırmalı tank biyoreaktörlerinde, reaktörün yüksekliği ile çapı oranı 2 veya daha fazladır. Tankın alt kısımlarında karıştırıcı bulunmaktadır (Lee ve Dudolovic, 2014). Reaktörlerde; türbin tipi, paddle, helezon ve pervane tipi gibi birçok farklı türden karıştırıcılar kullanılmaktadır. Karıştırıcı seçimi yapılırken gerçekleştirilen proses önemlidir. Bu ortam reolojisi, hücre türü, reaktör boyutlarıyla ilişkili olarak değerlendirilebilmektedir. Bakteri kültürlerinde daha çok türbin tipi karıştırıcı kullanılırken, hücre kültürü çalışmalarında paddle tipi karıştırıcılar tercih edilmektedir. Biyoreaktör içerisindeki havanın etkin olarak dağıtılmasında da

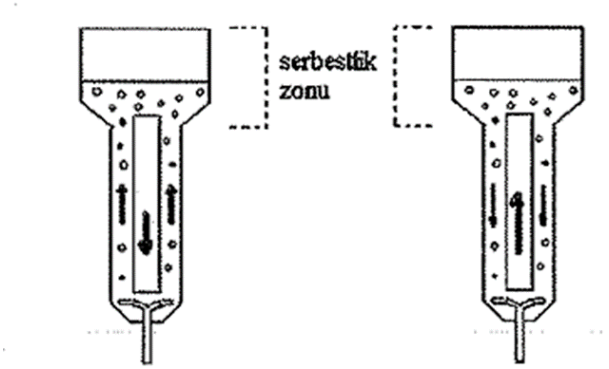
karıştırıcının tipi ve yerleşimi ile ilişkilidir. Hava dağıtıcısı (sparger) tankın tabanına yakın konumlandırılmaktadır. Ayrıca karıştırmalı tank biyoreaktörlerinin çevresine yerleştirilmiş tamponlar bulunmaktadır. Bu tamponlar yardımıyla tank içerisindeki sıvının yığın hareketi önlenip karıştırma verimi arttılmaktadır (Jamshed vd., 2018; Labik vd., 2014).

2.5.1.2 Kabarcık Kolon Reaktörler

Kabarcık kolon reaktörü, ölçeklendirilmesi kolay olan en basit reaktör tiplerinden biridir (Kantarci vd., 2008). Reaktör, gaz kabarcıklarını sıvı faza veya sıvı-katı süspansiyona iten bir gaz püskürtücüsüyle donatılmış silindirik bir kaptan oluşmaktadır. (Henzler ve Kauling, 1985). Bu tür reaktörlerde yükseklik/çap oranı genellikle 2'den daha yüksektir. Kolonun altından hava dağıtıcısı yerleştirilir. Tankın alt kısmındaki akışın heterojen yapısını bozmak için hava nozullardan çapraz şekilde beslenir. Reaktörler, metanol gibi çevreye zararsız sentetik yakıtlar üretmek için kullanılabilir. (Kawase Kumagi,1991). Kabarcık kolon reaktörler, karıştırıcılı diğer reaktörlere kıyasla daha az kayma gerilimi oluştururlar (Kantarci vd. 2008).

2.5.1.3 Hava Kaldırmalı Reaktörler

Hava kaldırmalı reaktörler iç içe geçmiş iki silindirik borudan oluşmaktadır. Borulardan birinin altından verilen hava yardımıyla ortamın hareketi sağlanıp dış borudan akım ters yönde hareket etmektedir. Bu reaktörlerde; sıvı hacmi, sirkülasyonu ve oksijen transferini iyileştirmek ve reaktördeki kesme kuvvetlerini eşitlemek için bir iki silindir tipi borudan oluşmaktadır. Şekil 2.7'de örnek bir hava kaldırmalı reaktör gösterilmiştir. Hava kaldırmalı reaktörler hem serbest hem de hareketsizleştirilmiş hücreler için kullanılabilir ve bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvan hücreleri için uygundur (Rawat vd., 2019). Hava kaldırmalı reaktörler, kontrollü akış ve proses süresiyle verimli karıştırma ile büyük tanklarda gelişmiş oksijen çözünürlüğü elde edildiğinden kütle transferini artırmıştır.



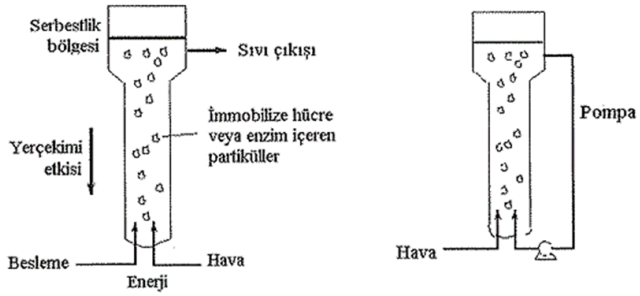
Şekil 2.7 Hava kaldırımalı reaktör sistemi

2.5.1.4 Dolgulu Kolon Reaktörler

Dolgulu kolon reaktörler biyokatalizör tanecikleriyle doldurulmuş silindirik bir borudan oluşmaktadırlar. Reaktör; polimer, seramik, ya da camdan yapılmış ve akışkanların bir uçtan diğerine akmasına izin veren çeşitli şekil ve boyutlarda mevcut olan bir dolgu yatağından oluşmaktadır (Wang vd., 1992). Fermantasyon ortamı sisteme alt veya üst kısımdan sürekli olarak beslenmektedir. Çözünmüş besin ve substrattan oluşan akışkan katı yataktan geçmektedir. Bu tür reaktör sistemlerinde boşluk oranı, basınç düşüşü, akım homojenliği gibi parametreler önemlidir.

2.5.1.5 Akışkan Yataklı Reaktörler

Akışkan yataklı reaktörler, daha küçük boyutlu parçacıklarla dolu yataklardan oluşan sistemlerdir. Bu nedenle, tıkanma, yüksek sıvı basınç düşüşü, kanallaşma ve yatak sıkışması sorunları dolgulu kolon reaktörlere kıyasla önlenmektedir. Bu reaktörler, düzgün parçacık karışımı ve sıcaklık gradyanları ile sürekli bir durumda çalışmaktadır (Ali ve Solsvik, 2020). Şekil 2.8'de akışkan yataklı reaktörler örneği verilmiştir. Bu reaktörlerde hücreler, akışkanla birlikte hareket eden hareketsizleştirilmiş küçük parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Tankın tabanına yerleştirilen bir pompa immobilize biyokatalizatörün sıvı ile birlikte hareket etmesini sağlar. Pompa sıvı ve partikülleri dikey doğrultuda itmektedir. Pompanın yukarı doğru itme kuvveti yerçekiminden dolayı partiküllerin aşağı doğru hareketi ile dengelenir. Bu durum iyi bir sirkülasyonun olması ile sonuçlanmaktadır. Daha küçük parçacık boyutu, hücrelere daha yüksek oranda kütle transferi, oksijen transferi ve besin sağlamaktadır (Veera ve Joshi, 1999).



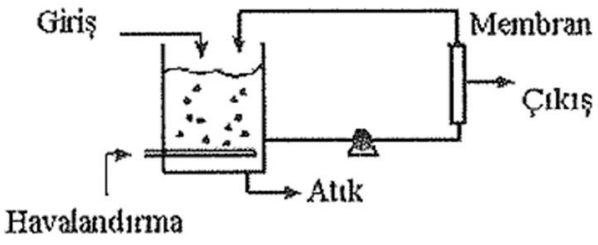
Şekil 2.8 Akışkan yatak reaktör

2.5.1.6 Piston Akış Reaktörler

Piston akış reaktörlerde sıvı, bir boru veya bir kanal boyunca hareket etmektedir. Bu tür reaktörlerde, sıvının aksiyal akış yönündeki karışması ihmal edilebilir düzeydeyken sıvı radyal yönelimde iyi karıştırılır. Substrat ve hücre konsantrasyonu reaktörde aksiyal yönde değişmektedir. Reaktörün farklı bölgelerinden alınan örneklerde farklı substrat ve ürün konsantrasyonları görülebilir (Agomuoh, 2011).

2.5.1.7 Membran Biyoreaktörler

Membran biyoreaktörler, bir besleme sıvısındaki hedef bileşenleri ayırmak için konsantrasyon, basınç gibi bir çalıştırıcı gücü, yarıgeçirgen, seçimli bir membrana uygulandığı sistemlerdir. Şekil 2.9'da bir membran biyoreaktör sistemi gösterilmiştir. Sıvı arıtılmış olarak membrandan geçerken geride konsantre formda diğer bileşenler alıkonulur. Boyutları 0.0001-1 mikron arasındaki çözünmüş ve kolloidal bileşenler farklı tiplerdeki membran prosesleri ile ayrılabilmektedir (Wang ve Serventi, 2019). Ticari olarak temin edilebilen membran prosesleri arasında mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, ters osmoz, membran elektrolitleri ve difüzyon diyalizi gösterilebilir.



Şekil 2.9 Membran biyoreaktör sistemi

2.5.1.8 Fotobiyoreaktörler

Fotobiyoreaktöler, fotosentetik mikroorganizmalardan pigment maddeleri, antibiyotikler, vitaminler gibi farmasötiklerin, kimyasal ara ürünlerin ve biyohidrojen gibi temiz enerjinin üretiminde kullanılmaktadır (Gao vd., 2017). Bu organizmalar, aynı zamanda, küresel ısınmada rol oynayan atmosferik karbondioksiti fikse ettikleri için de önem arz etmektedirler ve fotobiyoreaktörler bu açıdan da önemli reaktör türlerindendir. Fotobiyoreaktörler; cam, fiber, ya da plastik borulardan oluşabilmektedir. Bir pompa yardımıyla sisteme besleme sağlanır ve karıştırma tübüler sistem içerisinde gerçekleşir. Fotobiyoreaktör tasarımında sisteme ışık enerjisinin doğru bir şekilde sağlanması en önemli noktalardan biridir (Kong vd., 2013). Mikroalgler biyokimyasal reaksiyonlar için ışığa ihtiyaç duymaktadırlar. Mikroalglerin üretimi için temel gereksinimler; ışık kaynağı (güneş enerjisi ya da yapay ışıklandırmalar), su, karbondioksit, besin elementleri ve inorganik tuzlardır. (Kong ve Vigil, 2014). Bu gereklilikler sağlandığında alglerin fotobiyoreaktörlerde yoğun miktarlarda üretimi de mümkün olmaktadır. Fotobiyoreaktörlerde; astaksantin, beta-karoten, vegan protein gibi önemli ürünler üretilebilmektedir (Khozin-Goldberg vd., 2011).

2.5.2 Biyoreaktör İşletim Sistemleri

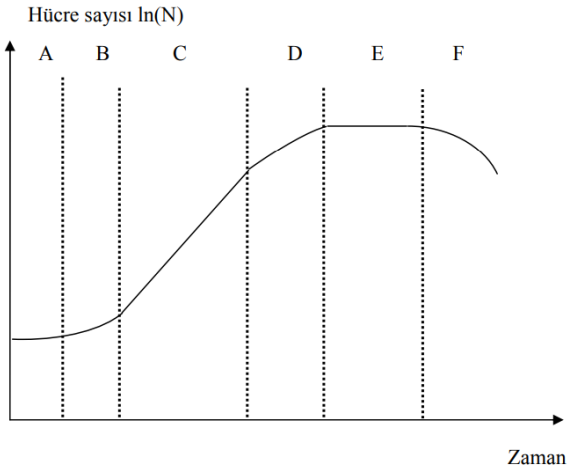
Biyoreaktörlerin tasarımının yanında reaktörlerin işletim koşullarıda biyoprosesi etkileyen parametreler arasındadır. Biyoreaktörler farklı işletim şekillerinde kullanılabilmektedir. Bu işletim sistemleri temel olarak; kesikli, yarı-kesikli ve sürekli işletim sistemleri olarak gruplandırılmaktadır. İşletim koşulları substratın dönüşümü, ürün oluşumu, ürün güvenliği ve kontaminasyon riski gibi parametreleri önemli oranda etkilemektedir.

2.5.2.1 Kesikli İşletim Sistemleri

Kesikli işletim kapalı bir sistemdir. Başlangıçta substratlar eklenir ve ürünler işlem sonunda alınmaktadır. Aeorobik fermentasyonlar tam bir kesikli işletim değildir, oksijenin sınırlı çözünmesinden dolayı sürekli olarak reaktöre beslenir ve oluşan gazlar uzaklaştırılmaktadır (Bailey ve Ollis, 1986). Reaktör içerisine sıvı giriş ve çıkışının olmamasından dolayı kesikli işletim olarak isimlendirilmektedir. Reaktörden sızma ve buharlaşma yok ise reaktördeki sıvı hacminin değişmediği kabul edilmektedir. Çoğu ticari biyoreaktör kesikli karıştırmalı akım tanklarda

yürütülmektedir. Kesikli işletilen reaktörlerde işletme maliyeti istenilen ürün derişimi veya substrat dönüşümüne ulaşılması için gereken süreye bağlı olarak değişmektedir (Bezirci vd., 2023). İşletme süresi kısaltılırsa maliyetler aşağı çekilir bu nedenle zamanın belirlenmesi gereklidir. Kesikli işletimin yaygın kullanımı ve önemi göz önüne alındığında, kesikli biyoprosesler sırasında hücre büyümesi, substrat kullanımı ve ürün oluşumu için kinetik verileri belirlemek ve analiz etmek ve proses tasarım denklemleri aracılığıyla performansı tahmin etmek daha elverişlidir.

Kesikli işletim sisteminde mikroorganizmalar belirli büyüme evrelerinden geçmektedirler. Bu evreler; proses sırasında hücre yoğunluğu, canlı hücre sayısı ve kuru ağırlık analizleri ile takip edilebilmektedir. Bu sayede prosesin gelişimi ve durumu kontrol edilebilmektedir. Şekil 2.10'da kesikli işletim sisteminde mikroorganizmaların zamana karşı büyüme grafiği verilmiştir.



Şekil 2.10 Mikroorganizmaların kesikli işletim sisteminde büyüme eğrisi

A. **Lag Fazı:** Bu ever aşılama ile birlikte başlamakatadır. Hücre büyümesinin görülmediği bu evre, hücre büyümesi başlayıncaya kadar devam etmektedir. Bu evrede mikroorganizmaların çevreye uyum sağlanması amaçlanmaktadır.
B. **Hızlanma Fazı:** Bu evrede hücre büyümleri başlar ancak bu büyümeler logaritmik değildir. Ortamdaki biyokütle miktarı hızlı artışa geçmeye başladığında bu evrenin tamamlandığı varsayılmaktadır.
C. **Logartimik Faz:** Bu evrede hücreler hızlı bir bölünme durumuna girerler ve her bir mikroorganizmanın sayısı hzılı bir şekilde artış göstermektedir.

Bu evrede hücre bölünmeleri olduğu için hücrelerin morfolojileri diğer evrelere göre daha küçüktür.

D. **Yavaşlama Fazı:** Bu evrede hücre çoğalma hızı azalmaktadır. Ancak hücre sayısı ve biyokütle artışı devam etmektedir.
E. **Durağan Faz:** Logaritmik büyüme döneminde hızlı büyüme sonucu ortamdaki besin maddeleri azalır ve hücrelerin büyümesi iyice azalmaya başlar. Büyüyen ve ölen hüvre sayısı göz önüne alındığında bu evrede toplam hücre sayısının sabit kaldığı varsayılmaktadır.
F. **Ölüm Fazı:** Bu evrede ölen hücrelerin sayısı yeni oluşan hücrelerden daha fazladır. Hücre büyümesi sınırlı olduğu için ortamın yoğunluğu ve viskozitesi azalmaktadır.

2.5.2.2 Yarı-Kesikli İşletim Sistemleri

Yarı kesikli işletimde aralıklarla veya sürekli olarak besinler/kimaysallar reaktöre beslenir ve susbtratın aşırı beslenmesi kontrol altında tutulur. Bu işlemde, daha iyi verimler ve daha yüksek seçicilik elde etmek ve reaksiyon sıcaklığını kontrol etmek için biyoreaksiyonlar devam ederken reaktöre kademeli olarak ek besinler eklenmektedir (Doran, 2013). Nispeten seyreltik substrat konsantrasyonda başlanarak, dönüşümle birlikte nütrient ilavesiyle çok yüksek büyüme hızlarından kaçınılır. Bu durum reaktörün oksijen transfer kapasitesinden çok hızlı büyüme olduğu durumlarda önemlidir. Ayrıca yüksek susbtrat konsantrasyonu inbisyon etkisi gösterebilir veya metabolik yolu değiştirebilir (Abbott vd., 2013). Yarı kesikli işletim ekmek mayası üretiminde yaygın bir şekilde kullanılır, ayrıca penisilin üretiminde rutin olarak uygulanmaktadır. Biyoreaktör içerisinde taze ortamın besleneceği boşluk olmalıdır, bazı durumlarda yeni besi ortamı eklenmeden önce kültürün bir kısmı uzaklaştırılabilir. Beslemenin; akış hızı ve zamanlaması çözünmüş oksijen ihtiyacı, çıkış gaz bileşimi takip edilerek belirlenmektedir. Yarı kesikli işletimde de ürünler, kesikli işletilen biyoreaktörlerde olduğu gibi üretim döngüsünün sonunda hasat edilmektedir. Yarı kesikli işletim sistemlerine *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarından yoğurt starter kültürlerinin üretimi örnek olarak verilebilir. Bu proseslerde fermantasyon ortamına proses süresi ilerledikçe C kaynağı ilave edilmektedir. Bu sayede mikroorganizma gelişimi sürdürülmekte ve daha fazla biyokütle ürün olarak elde edilmektedir.

2.5.2.3 Sürekli İşletim Sistemi

Sürekli işletim sisteminin karakteristik özelliği sürekli bir besleme işleminin olmasıdır. Sıvı veya pellet akışı sürekli olarak sisteme beslenir ve sıvı içerikler reaktörden sürekli olarak alınır. Uygulamada, homojen bileşim ve sıcaklık elde etmek için mekanik veya hidrolik çalkalama gerekmektedir (Martin vd., 2008). Steril veya mikroorganizmalardan oluşan bir kültür ortamı, sabit durumu korumak için biyoreaktöre sürekli olarak beslenmektedir. Reaksiyon değişkenleri ve kontrol parametreleri tutarlı kalır ve reaktör içinde zaman sabiti bir durum oluşturur. Sonuç, sürekli üretkenlik ve ürün çıktısıdır (Brian ve Harvey, 2008). Sürekli işletim istenen dönüşümleri elde etmek için büyük hacimli reaktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bu tür reaktörlerin konfigürasyonu, günümüzde endüstriyel uygulamalarda ve atık su arıtma ünitelerinde (yani aktif çamur reaktörleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. Sürekli işletim sistemi genel olarak iki farklı şekilde ele alınmaktadır. Bunlar; kemostat ve türbidostattır. Kemostat; akış hızının sabit olduğu ve proses ortamındaki tek bir bileşeninin mikroorganizma kültürünün büyüme hızını kontrol ettiği sürekli işletim sistemidir. Turbidostat ise akış hızının sabit kalmadığı ve spesifik büyüme hızının kültür reaksiyonları ile proses ortamında kontrol edildiği sürekli işletim sistemidir (Castillo-Hair vd., 2015).

3
MATERYAL VE METOT

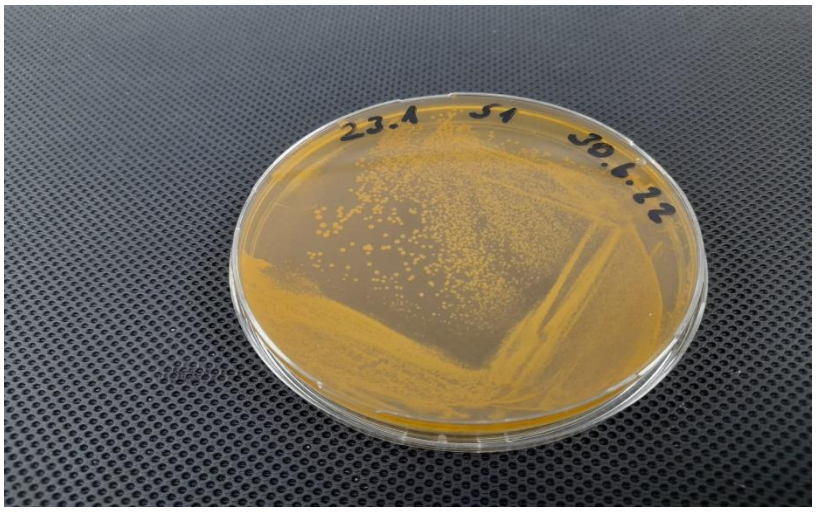
3.1 Materyal

Çalışmada materyal olarak iki fraklı mikroorganizma kullanılmıştır. Bunlar yerel kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterileri ve *Arthrospira platensis*'tir. *Arthrospira platensis* (SP, 001) mikroorganizması Nuvita Biosearch Center (NBC), İstanbul, Türkiye'den temin edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitede olup Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya), Neogen (Michigan, ABD), Lioflichem (Abruzzi, İtalya) ve Isolab Chemicals'dan (İstanbul, Türkiye) satın alınmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Laktik Asit Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Tez çalışmaları kapsamında ilk olarak laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bakteri izolasyonu için Elazığ ilinden olgunlaşmış peynir örnekleri temin edilmiştir. Temin edilen peynirler laboratuvarlara soğuk zincir altında taşınmıştır. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması için, 10 g örnek izolasyon kaynağından alınıp 90 mL %0,9 NaCl çözeltisine aktarılmış ve 2 dakika homojenize edilmiştir. %0,85 (w/v) tuzlu su ile 10^{-6}'ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlar kullanılarak, örnekler de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS), BHI ve M17 farklı selektif agar ortamlarına ekim yapılmış ve 37 ˚C'de 48 saat boyunca aerobik bir inkübatörde (BD-S 56, Binder, Tuttlingen, Almanya) inkübe edilmiştir. Anaeorbik koşullar için ise anaeorobik jar kullanılmış ve 37 ˚C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan petrilere ait örnek bir görüntü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 İnkübasyon sonrasında oluşan LAB kolonilerinin petri görüntüsü

Petrilerde oluşan koloniler arasından morfolojik olarak (şekil ve boyut) farklı olduğu görülen koloniler MRS sıvı besi yerine alınarak aerobik koşullarda 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu bağlamda toplam 46 adet koloni seçilmiştir. 46 adet örnek overnight büyümeye bırakıldıktan sonra katalaz testi uygulanmış ve örneklerin 1 tanesi hariç tamamı katalaz negatif çıkmıştır. Bu nedenden dolayı 45 örneğin tamamına gram boyama testi uygulanmıştır. Gram boyama testiyle mikroskop altında incelenen örneklerin görüntülerine göre farklı olduğu düşünülen 35 adet örnek ile çalışılmaya karar verilmiştir.

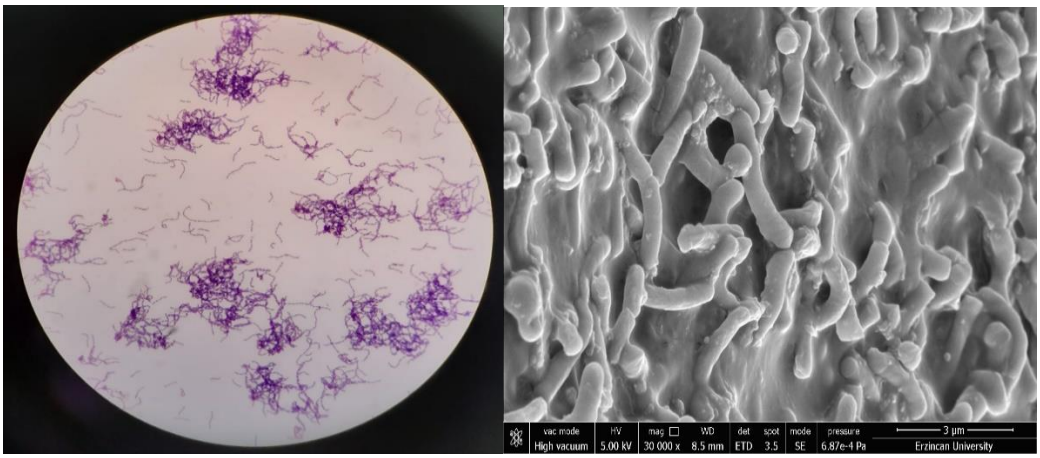
3.2.1.1 Genomik DNA izolasyonu ve RAPD-PCR

İzole edilen bakterilerin DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan sonra elde edilen DNA miktarı NanoPhotometer (Implen, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. İzole edilen DNA'lar bir sonraki adıma kadar -20 °C'de saklanmıştır. Toplam 35 LAB suşu, Rossetti ve Giraffa (2005) tarafından açıklandığı gibi, polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (RAPD) kullanılarak M13 primeri (5c-GAGGGTGGCG GTTC T-3c) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu prosedür için, steril su, M13 primeri, ana karışım ve DNA şablonu, 50 µl'lik son reaksiyon hacmi elde etmek için 100 µl PCR tüplerinde birleştirilmiş ve tüm bileşenler bir mikropipet kullanılarak iyice homojenize edilmiştir. DNA parçaları, aşağıdaki koşullar altında PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) cihazında çoğaltılmıştır: 3 dakika boyunca 94°C'de ilk denatürasyon, ardından 30 saniye boyunca 95 °C'de 30 denatürasyon döngüsü, 30 saniye boyunca

yapışma, 1 dakika boyunca 72°C'de uzatma ve 10 dakika boyunca 72°C'de son uzatma adımından oluşmaktadır. PCR ürünleri etidyum bromürle boyanmış %1'lik bir agar jel üzerine yüklenip, DNA ayrımı 90 V'da 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel, bir jel görüntüleyici (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntüleme işleminden sonra bant farklılıkları dikkate alınarak 25 bakteri suşunun ileriki analizlere alınmasına karar verilmiştir.

3.2.1.2 16S rRNA Dizilemesi ile LAB İzolatlarının Genetik Tanımlanması

RAPD-PCR ile tanımlanan 25 bakteri suşu üzerinde 16S rRNA analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA analizi için, ilgili bakteriden 1 µl DNA, 25 µl Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs), 20 mmol ileri primer AMP_F (5'GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG − 3') ve ters primer AMP_R (3'AAGGAGGTGATCCARCCGCA − 5') eklenerek 1.500 bp ürünü hedefleyen bir PCR karışımı hazırlanmıştır. Karışım 50 µl steril su ile tamamlanmıştır. 16S rRNA analizi için kullanılan PCR programı 98°C'de 2 dakika denatürasyon, ardından 98°C'de 30 saniye annealing, 57°C'de 20 saniye ve 72°C'de son 5 dakikalık uzatmayı (extesion) adımlarını içermektedir. Bu döngü 25 defa tekrarlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik bir agar jele yüklenip 40 dakika boyunca 90 V'da elektroforezle ayrılmıştır. Daha sonra jel, Bio-Rad Gel Doc EZ Imager kullanılarak görüntülenmiştir. PCR ürünleri dizilenmiş ve diziler Medsantek (İstanbul, Türkiye) tarafından hizmet alımı yapılarak tanımlanmıştır. %97-100 benzerlik gösteren diziler BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Şekil 3.2'de tez çalışmaları kapsamında kullanılan *L. rhmanosus* 23.2 suşunun ışık mikroskopu ve elektron mikroskopu altındaki görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 3.2 *L.rhamnosus* 23.2 suşunun: (A) Işık mikroskobu, (B) elektron mikroskobu görüntüsü

3.2.2 *Arthrospira platensis* Kültivasyonu

Arthrospira platensis ilk olarak laboratuvar ortamında cam tüplerde aktif edilmiştir. *A. platensis* mikroalg türü aşı kültürleri oluşturulurken SAG besin ortamı kullanılmıştır. Kullanılan besin ortamı içeriği aşağıdaki tablolarda belirtildiği gibidir.

Tablo 3.1 Solüsyon A ve Solüsyon B içerikleri ve miktarları

Solüsyon A	**500 mL**	**Solüsyon B**	**500 mL**
$NaHCO_3$	13.61 g	$NaNO_3$	2.50 g
Na_2CO_3	4.03 g	K_2SO_4	1.00 g
K_2HPO_4	0.50 g	NaCl	1.00 g
		$MgSO4 \cdot 7H_2O$	0.20 g
		$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.04 g
		P-IV Metal Solüsyonu	6 mL
		Chu Micronutrient Solüsyonu	1 mL
		Vitamin stok solüsyonu (B1, B6 ve B12)	1 mL

Solüsyon A ve B otoklavlanıp oda koşullarında soğuduktan sonra aseptik koşullarda birleştirilmiştir.

Tablo 3.2 P-IV Metal solüsyon bileşimi

Bileşen	**Miktar**
Na2EDTA	0.75 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	4 mg
$CoCl_2.6H_2O$	2 mg
$MnCl_2.4H_2O$	41 mg
$ZnCl_2$	5 mg
$FeCl_3.6H_2O$	97 mg

1000 mL distile suya, 0.750 g of Na_2EDTA eklenip ardından tamamen çözdürülme işlemi uygulanmaktadır. Son olarak Tablo 3.3'te belirtilen miktarlar eklenmektedir.

Tablo 3.3 Chu micronutrient Solüsyonu

Bileşen	**Miktar**
Na_2EDTA	50 mg
$CoCl_2.6H_2O$	20 mg
$MnCl_2.4H_2O$	12.6 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	44 mg
H_3BO_3	618 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	12.6 mg
$CuSO_4.5H_2O$	19.6 mg

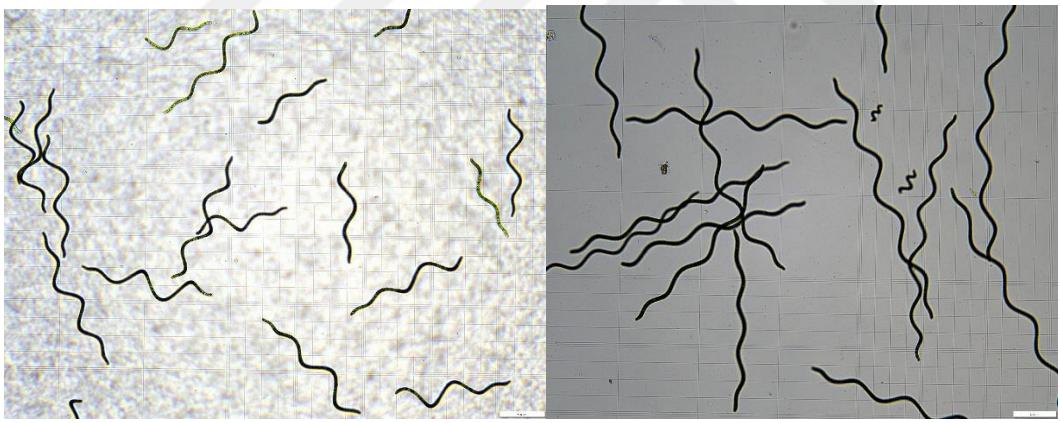
Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te belirtilen bileşenler tartılarak sırası ile 500 ml distile suya eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen bir görüntü elde edilene kadar karıştırma uygulanmıştır. Bileşenler tamamen çözündükten sonra çözelti temiz bir 1000 ml hacimli mezurda distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Tüm çözeltiler biyogüvenlik kabininde birleştirilip besi ortamı 10 L hacimli cam şişelerde hazırlanmıştır. *Arthrospira platensis* kültürünün büyüdüğü 1 L hacimli stok aşı kültürlerinden cam şişedeki besin ortamına %5 oranında aktarılmıştır. Ekimi yapılan şişeler de spirulina 14 gün boyunca 28 °C'de %5 aşı kültürü içeren 10 L'lik cam şişelerde yetiştirilmiştir (Şekil 3.3 A). Kültürün takibi günlük olarak alınan numuneler ile izlenmiştir. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan *A. platensis* mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 3.4'te verilmiştir. Suş kültürü, sıcak beyaz (3000 K) LED tüp lamba (MAS LEDtube HF 600 mm HE 7W 840 T5, Philips) tarafından sağlanan 200 µmol · m^{-2} · s^{-1}'de sürekli aydınlatma ile yetiştirilmiştir (Niangoran vd., 2021). Fotoperiyotla ilgili olarak ışık:karanlık (h:h) (16:08)

döngüleri takip edilmiştir. Kültür, 1 g/L kuru ağırlığa ulaştıktan sonra hasat edilmiş ve toz formu elde etmek için bir dondurarak kurutucuda kurutulmuştur.



(A) **(B)**

Şekil 3.3 (A) Spirulina 10 L şişe kültürü, (B) liyofilize edilmiş Spirulina tozu



Şekil 3.4 Tez çalışmalarında kullanılan *A.platensis*'in mikroskop görüntüsü

Spirulina biyokütlesinin içeridiği zengin besin elementlerinin ısıdan zarar görmemesi için liyofilizasyon prosesi kurutma yöntemi olarak seçilmiştir. Liyofilizasyon düşük sıcaklık ve düşük basınç altında gerçekleşmektedir. Liyofilizasyon prosesi 3 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; dondurma, birinci kurutma ve ikinci kurutmadır. Liyofilizasyon işleminden önce numuneler -80 ^{0}C'de 4 saat süre ile dondurulmuştur. Dondurma basamağından sonra 46 saat ve 0.22 mbar vakum altında liyofilizasyon prosesi gerçekleştirilmiştir. Proses -35 ^{0}C'den başlayıp +25 ^{0}C'de tamamlanmıştır. Liyofilizasyon prosesine ait kurutma

basamakları Tablo 3.4'te verilmiştir. Liyofilizasyon prosesi Epsilon 2-4 LSCplus (Martin Christ, Osterode, Almanya) liyofilizatör cihazında (Şekil 3.5) gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon prosesi tamamlandığında kurutulan spirulina biyokütlesi öğütülmüş ve akabinde ileri analizler için saklanmıştır. Toz formda numuneler Şekil 3.3 (B)'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4 Liyofilizasyon prosesi işlem basamakları

	BİRİNCİ KURUTMA									**İKİNCİ KURUTMA**		
	Bölüm 1	**Bölüm 2**	**Bölüm 3**	**Bölüm 4**	**Bölüm 5**	**Bölüm 6**	**Bölüm 7**	**Bölüm 8**	**Bölüm 9**	**Bölüm 10**	**Bölüm 11**	**Bölüm 12**
Süre (h)	00:30	04:00	04:00	04:00	04:00	04:00	07:30	05:00	10:00	00:10	02:00	02:00
Sıcaklık (^{0}C)	-35	-20	-15	-15	-10	0	10	20	20	20	20	25



Şekil 3.5 Kurutma işlemlerinde kullanılan liyofilizatör cihazı

3.2.3 *A. platensis* Biyokimyasal Kompozisyon Tayini

Üretimi yapılan *A. platensis* toz biyokütlesinin karbonhidrat, yağ ve protein içeriklerini belirlemek amacıyla analizler yapılmıştır.

3.2.3.1 Karbonhidrat İçeriği Tayini

Çalışmalarda kullanılacak olan *A. platensis* biyokütlesinin toplam karbonhidrat içeriği fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir (Dubois vd., 1956). Bu yöntemde ilk olarak fenol reaktifi hazırlanmıştır. 20 g distile suya 80 g fenol ilave edilerek %80 (w/w) olacak şekilde hazırlanmıştır. Karbonhidrat içeriği belirlenecek olan numune tartılıp ve ağırlığını bildiğimiz numuneye 2 ml distile su eklenmiştir. Daha sonra bunun üzerine 0,05 ml fenol reaktifi ve 5 ml H_2SO_4 eklenip inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra, alınan örneklerin UV spektrofotometrede (Shımadzu, UV1900, Tokyo, Japan) 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak da 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/L konsantrasyonlardaki glikoz çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.3.2 Yağ İçeriği Tayini

Çalışmalarda kullanılacak olan algal biyokütlenin yağ içeriği soxhlet metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde soxhlet ekstraktörüne alınan biyokütle etanol ile ekstrakte edildikten sonra kullanılan çözücü rotary evaporatör ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Marsh ve Weinstein (1966) göre yöntem izlenmiştir. Hammaddenin yağ içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Yağ\ içeriği\ (\%) = [(Wson - Wdara)/Wnumune]\ x\ 100 \qquad (7)$$

Denklemde kullanılan:

Wson : Ekstraksiyon işleminden sonra balon jojenin ağırlığı (g)

Wbalon : Eksraksiyon yapılan balon jojenin ağırlığı (g)

Wnumune : Ekstraksiyondan önce numunenin ağırlığı (g)

3.2.3.3 Protein İçeriği Tayini

Çalışmalarda kullanılacak olan Spirulina biyokütlesinin protein içeriği Lowry (Lowry vd., 1951) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptit bağları ile bir kompleks oluşturup Cu^{+1}'e indirgenmektedir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tirozin, Triptofan ve Sistein amino asitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk

oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Protein içeriği tayini için uygulanan Lowry yönteminde öncelikli olarak 0,20,40,60,80,100 mg/L BSA standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Çözelti A: 100 ml deiyonize sudaki 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH ve 1.6 g Na-K tartarat çözeltisi

Çözelti B: 100 ml deiyonize sudaki 4 g $Cu_2SO_4.5H_2O$

Çözelti C: 100:1 (v/v) oranında çözelti A : çözelti B karışımı

Protein içeriği belirlenecek olan numune tartılıp ve üzerine 3 ml çözelti C eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda 0.3 ml Folin reaktifi eklenip vortekslenmiş ve 45 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. UV spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunarak biyokütlenin protein miktarı saptanmıştır.

3.2.3.4 Kül ve Nem İçeriği Tayini

Nem içeriği tayininde yaklaşık 0.5gram toz algal biyokütle nem tayin cihazına (Ohaus MB120, Parsippany, NJ, USA) yerleştirilmiş ve 105 ^{0}C analiz yapılmıştır. Analizde denklem 16 kullanılmıştır. Elde edilen sonuç numunenin % nem içeriğini vermektedir.

Kül içeriği ise 5 g toz numune ile kül fırını (CLS Scientific, Türkiye) kullanılarak belirlenmiştir. Tartılan numune krozelere yerleştirilmiş ve cihaz 600 ^{0}C sıcaklıkta 4 saat boyunca çalıştırılmıştır (Shen vd., 2010). Denklem 8'de ki gibi hesaplama yapılmış ve numunenin (%) kül içeriği belirlenmiştir.

$$Kül\ (\%) = \frac{Son\ tartım\ (g) - Dara\ (g)}{Numune\ miktarı\ (g)} \cdot 100 \qquad (8)$$

3.2.4 Fermantasyon Çalışmaları

3.2.4.1 Ön Denemeler

Fermantasyon çalışmalarında ilk olarak elde edilen laktik asit bakterilerinin seçilimi için ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerde laktik asit bakterilerinin büyüme davranışları, biyokütle verimi ve canlı hücre sayıları parametre olarak dikkate alınmıştır. Elde edilen 5 farklı cinste toplam 35 laktik asit bakterisi suşu MRS ortamında büyütülmüş ve suş seçilimine tabi tutulmuştur. Ön deneme çalışmaları çalkalamalı inkübatörde (SI600, Stuart) 24 saat boyunca 37 ^{0}C ve 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde 4 suş ile erlen ölçeğine deneme çalışması yapılmasına karar verilmiştir. Bu 4 suş sırası ile *Lactiplantibacillus plantarum* T21, *Lacticaseibacillus rhamnosus* 23-2, *Levilactobacillus brevis* T27 ve *Lactiplantibacillus plantarum* T24 suşlarıdır. Tanımlamaları yapılan ve ön denemeler sonucunda tez çalışmaları kapsamında kullanılacak olan bu suşlar NCBI (Natıonal Center for Biotechnology Informatıon) veri tabanına kaydedilmiştir. Çalışmada tanımlanan suşlar 16 S rRNA dizisi NCBI GenBank'ta; *L. rhamnosus* 23.2 suşu PP843593, *L. plantarum* T21 suşu PP843595, *L. plantarum* T24 suşu PP843602 ve *L.brevis* T27 suşu PP843601 numarasıyla kayıtlıdır.

3.2.4.2 Erlen Ölçeğinde Fermantasyon Çalışmaları

Ön denemeler sonucu seçilen 4 suş erlenmayer ölçeğinde fermantasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Çalışmalar çalkalamalı inkübatörde 37 ^{0}C sıcaklık,150 rpm karıştırma hızında ve 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Belirli aralıklarla numune alınarak hücrelerin gelişme davranışları takip edilmiştir. Çalışmalar sonucunda kuru madde miktarı,

Kinetik parametreleri belirlemek için spesifik büyüme hızı μ değeri aşağıdaki ifade ile matematiksel olarak hesaplanmıştır:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \qquad Xt = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \qquad \mu = \frac{(\ln X1 - \ln X0)}{t} \qquad (9)$$

burada X (hücre/mL) t zamanındaki (saat) mikrobiyal popülasyondur; X_0 (hücre/mL) başlangıç mikrobiyal popülasyonudur; μ, dönüm noktasındaki tanjant olarak tanımlanan özgül büyüme hızıdır (saat başına). İkilenme süresini belirten td değeri aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir:

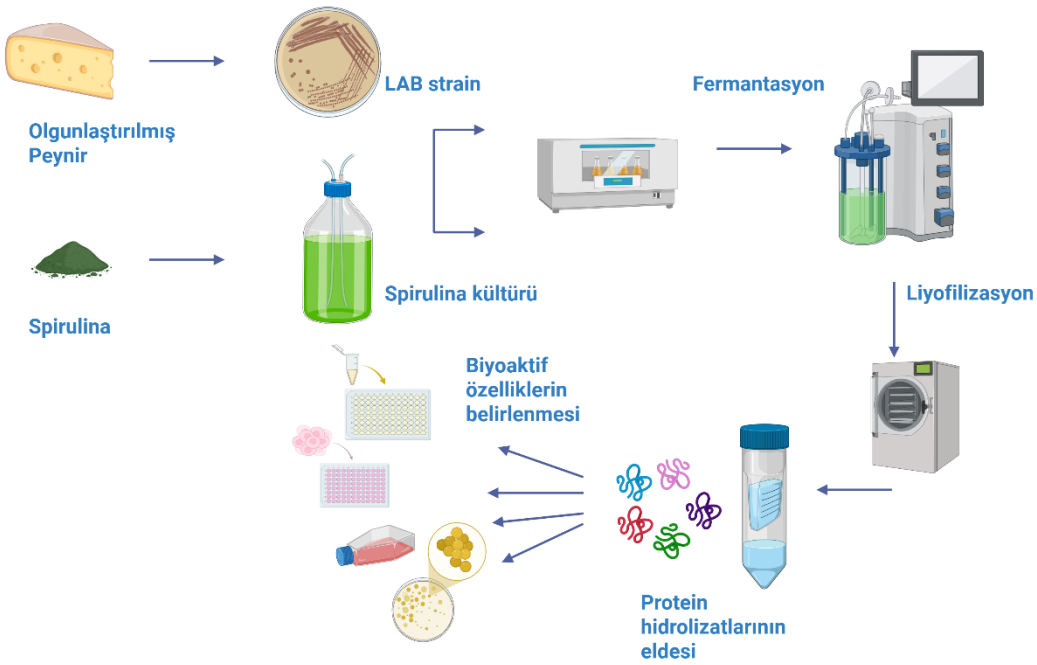
$$X_1 = 2X_0 \qquad \mu = ln\,2 \,/\, td \qquad td = 0.693 \,/\, \mu \qquad (10)$$

Burada n, logaritmik büyüme süresinin iki katına çıkma süresine bölünmesiyle elde edilen jenerasyon sayısı olup aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir:

$$n = t / td \qquad n = \Delta t / td \tag{11}$$

3.2.4.3 Biyoproses Koşullarının Optimizasyonu 3 L Biyoreaktör Çalışmaları

Erlenmeyer ölçeğinde yapılan ön çalışmalar sonucunda, fermantasyon sürecinde canlı hücre sayısı ve biyokütle gibi çıktılar açısından yüksek verimli sonuçlar *L. rhamnosus* 23.2'de elde edilmiştir. Dolayısıyla, mevcut çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir. Spirulina tozu, havalandırma ve çalkalama gibi parametrelerin etkileri, 1,5 L çalışma hacmine sahip 3 L'lik bir biyoreaktörde (Minifors 2, Infors HT, İsviçre) parti modunda araştırılmıştır. Tüm deneyler için pH 5,8'e ve sıcaklık 37 ◦C'ye ayarlanmıştır. Tüm biyoreaktör deneylerinde 5 g/L dekstroz monohidrat ve 2 g/L inorganik tuzlardan oluşan kültür ortamı ek karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Spirulina tozu 80 ^{0}C'de 15 dakika pastörize edilmiş ve ardından otoklavlanmış biyoreaktör ortamına eklenmiştir. İnorganik tuz bileşeni şu şekildedir: sodyum asetat %40; dipotasyum hidrojen fosfat %20; di-amonyum hidrojen sitrat %15; magnezyum sülfat %15 ve manganez sülfat %10. Oksijen konsnatrasyonu, bir oksijen elektrodu (InPro 6830; Mettler Toledo, İsviçre) kullanılarak hava doygunluğuna göre çözünmüş oksijen yüzdesinin (DO%) belirlenmesiyle ölçülmüştür. Fermantasyon süresi 24 saate ve aşılama oranı %5'e ayarlandı. Havalandırma oranı (0-1 vvm), çalkalama hızı (0-250 rpm) ve Spirulina tozu (0-5 g/L) optimizasyon parametreleri olarak kullanılmıştır. Çalkalama, fermantasyon sistemlerinde kütle transfer dirençlerinin üstesinden gelmede çok önemlidir ve bu doğrudan çalkalama hızıyla ilgilidir. Havalandırma oranı, aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların büyümesi için önemli bir işlem parametresidir ve bu nedenle fermantasyonu optimize etmek için seçilmiştir (Gökmen vd., 2024; Deniz vd., 2021). Tez çalışmasının genel anlamda grafiksel özeti Şekil 3.6'da verilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan 3 L laboratuvar ölçekli cam biyoreaktör ise Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.6 Tez çalışma planı

3.2.5 D-optimal Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Aşaması

Tasarım seçimi, deneysel bir çalışma için istenen hedeflere ulaşmada önemli bir kavramdır. Güncel literatürde bir dizi deneysel tasarım mevcuttur. Bu tez çalışmasında, biyoproses optimizasyonu için bir tasarım matrisi (DM) oluşturmak üzere D-optimal deneysel bir tasarım kullanılmıştır. D-optimal tasarım, bilgi matrisinin belirleyicisini en üst düzeye çıkarmayı amaçlar ve değişim algoritması DM'yi oluşturmak için kullanılmaktadır (Özdemir, 2020).

Optimizasyon ile laktik asit bakteri kültür ortamını optimize etmeyi ve elde edilecek ürünün en yüksek biyokütle verimi ve antioksidan aktivitesinin bulunması hedeflenmektedir. Tasarım faktörleri ve toplanan deneysel veriler Tablo 4.2'de sunulmaktadır. Tablo 4.4'de gösterildiği gibi, üç tasarım faktörü aşağıdaki gibi belirtilmiştir: A=spirulina tozu (g/L), B=havalandırma (vvm) ve C=çalkalama (rpm). Ayrıca, iki yanıt değişkeni aşağıdaki gibi belirtilmiştir: y_1=biyokütle (g/L) ve y_2=antioksidan aktivite (%). Tablo 4.4'de, D-optimal tasarımın DM'si, y_1 ve y_2 yanıtları için deneysel çalışmayı yürütmek üzere on gerekli tasarım noktası, beş uyumsuzluk tasarım noktası ve beş tekrar tasarım noktasından oluşmaktadır. DM, değişim prosedürü ile oluşturulmuştur ve hesaplama süresi 1266,57 saniyedir. Dahası, deneysel çalışmalar deneysel önyargı olmaksızın rastgele oluşturulmuştur.

Tahmini biyokütle (g/L) tepkisi, aşağıdaki gibi verilmiştir:

$$\hat{\mu}_1(\mathbf{x}) = \hat{\phi}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{d} + \mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}$$

$$\text{Burada, } \mathbf{x}=\begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix},\ \mathbf{d} = \begin{bmatrix} \hat{\phi}_1 \\ \hat{\phi}_2 \\ \hat{\phi}_3 \end{bmatrix} \text{ ve } \mathbf{D} = \begin{pmatrix} \hat{\phi}_{11} & \hat{\phi}_{12}/2 & \hat{\phi}_{13}/2 \\ \hat{\phi}_{21}/2 & \hat{\phi}_{22} & \hat{\phi}_{23}/2 \\ \hat{\phi}_{31}/2 & \hat{\phi}_{32}/2 & \hat{\phi}_{33} \end{pmatrix}. \tag{12}$$

Burada biyokütle regresyon fonksiyonunun i'inci katsayısıdır. Ayrıca, d ve D sırasıyla biyokütle (g/L) tepkisi için tahmini regresyon katsayılarının vektörünü ve matrisini temsil etmektedir. Benzer şekilde, tahmini antioksidan aktivite (%) tepkisi, μ_2, aşağıdaki şekilde elde edilmektedir.

$$\hat{\mu}_2(\mathbf{x}) = \hat{\varphi}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{e} + \mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}$$

$$\text{Burada } \mathbf{x}=\begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix},\ \mathbf{e} = \begin{bmatrix} \hat{\varphi}_1 \\ \hat{\varphi}_2 \\ \hat{\varphi}_3 \end{bmatrix} \text{ ve } \mathbf{E} = \begin{pmatrix} \hat{\varphi}_{11} & \hat{\varphi}_{12}/2 & \hat{\varphi}_{13}/2 \\ \hat{\varphi}_{21}/2 & \hat{\varphi}_{22} & \hat{\varphi}_{23}/2 \\ \hat{\varphi}_{31}/2 & \hat{\varphi}_{32}/2 & \hat{\varphi}_{33} \end{pmatrix}. \tag{13}$$

burada antioksidan aktivite regresyon fonksiyonunun i'inci katsayısını belirtmektedir. Ardından, e ve E sırasıyla antioksidan aktivite (%) tepkisi için tahmini regresyon katsayılarının vektörü ve matrisidir.

Ondan büyük bir maksimum/min oranı bir dönüşümü göstermektedir. Tablo 4.4'de, antioksidan aktivite (%) tepkisi için maksimum/min oranı 11,927'dir, bu nedenle bir dönüşüm yararlıdır. Veriler antioksidan aktivite (%) tepkisi için %0 ile %100 arasında toplandığından logit dönüşüm tekniği seçilmiştir. Dönüşüm antioksidan aktivite (%) tepkisi için aşağıdaki gibi elde edilmektedir.

$$\text{logit}\left(y_{2,i}\right) = \ln\left(\frac{y_{2,i} - ll}{ul - y_{2,i}}\right) \text{ and } i = 1,\ 2,\ ...,\ 20 \tag{14}$$

burada alt sınır (*ll*) ve üst sınır (*ul*) sırasıyla %0 ve %100'ü ifade etmektedir.

Sunulan iki amaçlı optimizasyon modeli, sınır kısıtlamalarıyla uğraşırken biyokütle (g/L) ve antioksidan aktivite (%) tepkileri için genel arzu edilebilirlik (desirability) fonksiyonunu maksimize etmeyi amaçlamaktadır. Genel arzu edilebilirlik fonksiyonu, biyokütlenin ve antioksidan aktivitenin geometrik ortalama arzu edilebilirlik fonksiyonları kullanılarak hesaplanmaktadır. İki amaçlı model aşağıdaki şekilde sunulmuştur.

maximize $\left(d_1\left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)*d_2\left(\text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)\right)\right)^{1/2}$

Kısıtlar altında $-1\le A,B,C\le+1$

Burada,

$$d_1\left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)=\begin{cases}0,\ \left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)<L_1\\ \left(\dfrac{\left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)-L_1}{T_1-L_1}\right),\ L_1\le\left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)\le T_1,\\ 1,\ \left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)>L_1\end{cases} \tag{15}$$

$$d_{cr}\left(\text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)\right)=\begin{cases}0,\ \text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)<L_2\\ \left(\dfrac{\text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)-L_2}{T_2-L_2}\right),\ L_2\le\text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)\le T_2,\\ 1,\ \text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)>L_2\end{cases}$$

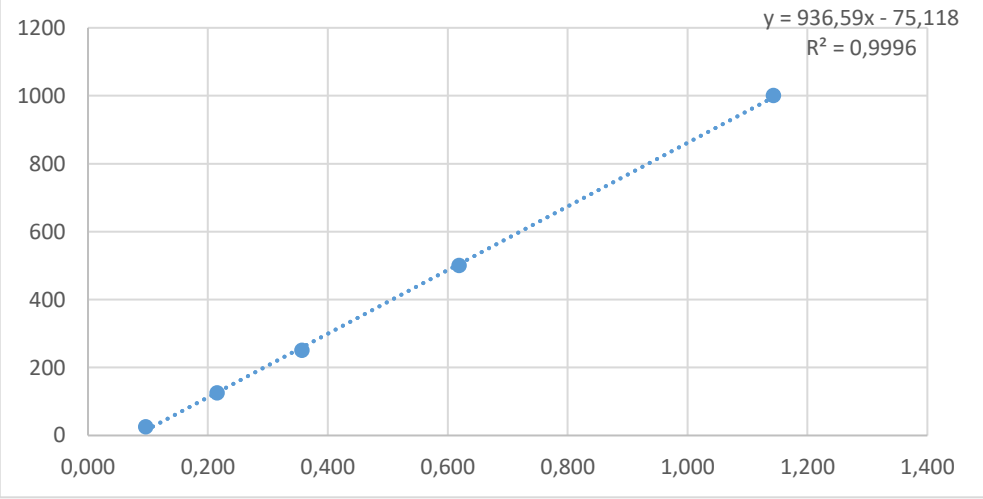
Denklem 6, $d_1\left(\hat{\phi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{d}+\mathbf{x}'\mathbf{D}\mathbf{x}\right)$ ve $d_2\left(\text{Logit}\left(\hat{\varphi}_0+\mathbf{x}'\mathbf{e}+\mathbf{x}'\mathbf{E}\mathbf{x}\right)\right)$ biyokütlenin ve antioksidan aktivitenin arzu edilebilirlik fonksiyonlarını temsil etmektedir. Ayrıca, L_1 ve L_2 iki yanıt için alt değerlerdir. Ayrıca, T_1 ve T_2 iki yanıt için belirtilen hedef değerleri belirtmektedir. Ek olarak, deneysel veri analizi ve grafik çizimi için Design-Expert yazılımı (Sürüm 12.0.3.0) kullanılmıştır. (15)'de optimum faktör ayarlarını elde etmek için MATLAB optimizasyon araç kutusu (Sürüm R2014a) kullanılmıştır.



Şekil 3.7 Tez çalışmalarında kullanılan laboratuvar tipi cam biyoreaktör

3.2.6 Protein Hidrolizatlarının Eldesi

Toplam çözünür protein içeriği BCA (Bicinchoninic acid assay) testi ile saptanmıştır. BCA testi, alkali bir ortamda proteinler tarafından Cu^{2+}'nin Cu^{+}'ye indirgenmesine ve ardından spektrofotometre kullanılarak 570 nm'de ölçülebilen bisinkoninik asitle mor bir kompleks oluşumuna dayalı olarak protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan bir kolorimetrik yöntemdir. Test prosedürü kullanılan kitin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ürünlerindeki çözünür protein içeriğini tahmin etmek için FS örnekleri 4 °C'de 20 dakika boyunca 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler proteinleri çökeltmek için 16 saat boyunca %80 etanol ile muamele edilmiştir. Bundan sonra örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Üst sıvılar uzaklaştırıldıktan hemen sonra peletler oda sıcaklığında 15 dakika kurutulmuş ve 25 mM tris-HCl tamponu (pH 7.0) ile çözdürülmüştür. Elde edilen numuneler 10 KDa MWCO filtreye sahip 50 ml falcon tüplerinden geçirilmiştir (Amicon, Merck Milipore, Almanya). İleriki çalışmalarda kullanılan tüm biyoaktif ürünler 10 KDa moleküler ağırlığı ve altındaki elüsyonlardan oluşmaktadır. Elüsyonlar toplanmış ve ileriki çalışmalara kadar +4 ^{0}C'de saklanmıştır. Çalışma da standart olarak 25, 125, 250, 500 ve 100 µg/mL olacak şekilde BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Çalışmanın kalibrasyon eğirisi Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 BSA kalibrasyon eğrisi

3.2.7 Analizler

3.2.7.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

Kuru hücre ağırlığı, nem analizöründeki (Ohaus MB120, İsviçre) 1 g numunedeki ıslak madde değerinden hesaplanan biyokütle ağırlığıdır. Kullanılan denklem aşağıda verilmiştir (Kavak vd., 2024).

$$Kuru\ ağırlık\ miktarı\left(\frac{g}{L}\right) = yaş\ ağırlık\ \frac{g}{L} \cdot kuru\ ağırlık\ (\%) \quad (16)$$

3.2.7.2 Antioksidan Analiz

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi, antioksidanların serbest radikalleri nötralize etme kapasitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Testin temel prensibi, DPPH'nin mor renginin, numunenin antioksidan özellikleri nedeniyle sarıya dönmesidir. Bu testte, 0,2 mM DPPH çözeltisi numuneyle 9:1 oranında karıştırılıp analiz gerçekleştirilmektedir. Karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra, absorbanslar 517 nm'de ölçülmüştür (Rizzello vd., 2017).

$$\%DPPH = \left(\frac{AbsDPPH - AbsSample}{AbsDPPH}\right) x\ 100 \quad (17)$$

3.2.7.3 Canlı Hücre Sayısı

Fermantasyon, biyoreaktör üretimlerinden farklı zaman aralıklarında numuneler alınarak izlenmiş ve canlı hücreleri saymak için dökme plaka yöntemi kullanılmıştır. *L. rhamnosus* 23.2 kolonisi, aerobik koşullar altında MRS agar ortamında sayılmıştır. Canlı hücre sayımlarındaki değişiklikler log CFU/mL olarak belirlenmiştir.

3.2.7.4 Antibakteriyel Etki

Biyoaktif ürünün antibakteriyel aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica, Listeria monocytogenese* patojenik bakteriler Brain Heart Infusion broth'a (Neogen, ABD) ekilmiştir. Liyofilize biyoaktif ürün ve patojenik bakterilerin yoğunluğu McFarland (%0,5) standardına göre ayarlanmıştır. Test edilecek her patojenden 100 µl BHI agar yüzeyine yayılmıştır (Tsega vd., 2023). Kuyular (6 mm çapında) steril bir kuyu delici kullanılarak hazırlanıp toplanan biyoaktif ürünün 100 µL'si kuyulara ekilmiştir. Daha sonra plakalar difüzyon için 37 ^{0}C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

1 mm veya daha büyük çaplı net bir inhibisyon bölgesi (6 mm kuyu çapı hariç) pozitif inhibisyon olarak kabul edilmiş ve gerçek değerler verilmiştir (EFSA, 2018).

3.2.7.5 Toplam Fenolik İçerik

Toplam fenolik içerik analizi, Singleton vd., (1999) göre, 0 ve 24 saatte 10 mL deiyonize suda çözülmüş 0,1 g liyofilize biyoaktif ürün içeren Folin Ciocalteu analiz örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğin 100 µL'lik alikotlarına, suda %2'lik 2 mL sodyum karbonat (Merck, Darmstadt, Almanya) eklenmiştir. 2 dakika sonra, %50'lik 100 µl Folin Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, 25 °C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Her bir örneğin absorbansı, bir UV-Vis spektrofotometrik mikro plaka okuyucusu (AMR 100, Allshengen, Çin) kullanılarak 760 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, gallik asitin (0 ila 500 µg mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, ABD) bir kalibrasyon eğrisi aracılığıyla gallik asit eşdeğerleri (mg GAE g^{-1}) olarak ifade edilmiştir. 0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki gallik asit kalibrasyon çözeltileri ikişer kez hazırlanmıştır.

3.2.7.6 ACE İnhibitör Aktivitesinin Belirlenmesi

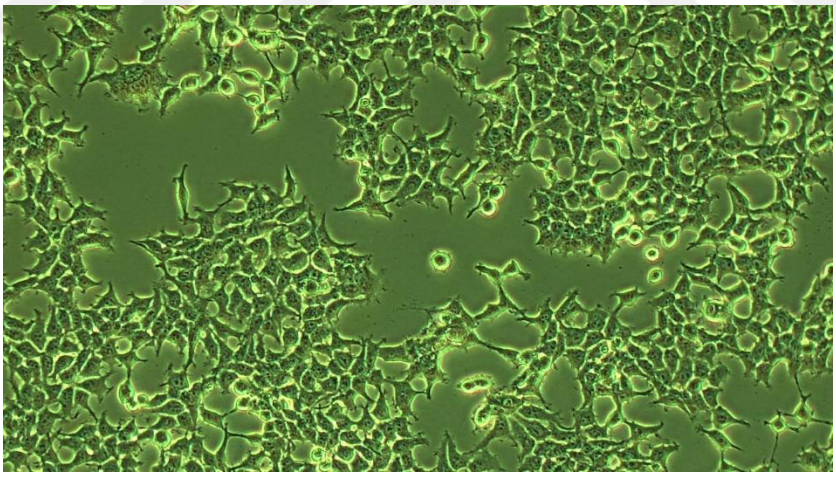
Biyoaktif ürünlerin ACE inhibitör aktivitesi, Kariyawasam vd., (2021), tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Her 50 µL biyoaktif ürün için, 150 µL 0,1 U/mL ACE çözeltisine ve pH 8,3'te 0,3 M NaCl içeren 100 µL 0,1 M sodyum borat tamponuna eklenmiştir. Karışım, 10 dakika boyunca 37 ˚C'de bekletilmiştir. Çalışmada kullanılan ACE enzim reaktifi, Abcam'den (Cambridge, UK) temin edilmiştir. 0,3 M NaCl (pH 8,3) içeren 0,1 M sodyum borat tamponunda 5 mM hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL; Sigma-Aldrich, ABD) içeren 50 µL'lik karışım, reaksiyon karışımına eklenip 37 ˚C'de 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon, 250 µL 1 N HCl eklenerek sonlandırışmıştır. Ayrıca, reaksiyon sırasında açığa çıkan hippurik asidi çıkarmak için 200 µL etil asetat eklemesi yapılmıştır. Numuneler vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 30 dakika boyunca 4 ˚C'de 4500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplandıktan sonra, etil asetat 90 ˚C'de bir su banyosu (Bandelin, Almanya) kullanılarak tamamen buharlaştırılmıştır. Elüsyonlar 1,0 mL sodyum borat tamponunda çözülmüş ve 25 °C'ye soğutulmuştur. Tüm numunelerin absorbansları 228 nm'de üç kez ölçülmüştür. Sonuçlar, aşağıdaki formül kullanılarak ACE (%) üzerindeki inhibitör aktivite olarak belirlenmiştir:

$$ACE(\%) = (1 - A_{sample}/A_{control}) \cdot 100 \quad (18)$$

Burada As, peptit çözeltisinin absorbansı ve Ac, kontrol örneğinin absorbansıdır.

3.2.8 *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Caco-2 insan kolorektal adenokarsinom hücreleri in vitro deneyler için kullanıldı. Caco-2 hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) aracılığıyla elde edilmiştir. Hücreler, Freshney vd., (2015) tarafından açıklandığı gibi standart kültür koşulları altında (37 °C, %5 CO_2 ve %95 nem) %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş DMEM ortamında inkübe edilmiştir. Tek tabaka yaklaşık %80-90 birleşmeye ulaştığında (Şekil 3.9), hücreler fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkanıp %0,25 tripsin-EDTA kullanılarak hücreler kaldırılmıştır. Süspansiyon daha sonra santrifüj edilip, üstteki sıvı atılmış ve elde edilen hücre peleti 1 mL taze büyüme ortamında yeniden süspanse edilmiştir. Hücre canlılığı ve konsantrasyonu, Anvajo Fluidlab R-300 Hücre Sayacı kullanılarak belirlenmiştir. Gerekli canlı hücre sayısı bu ölçüme dayanarak hesaplanmış ve sonraki deneylerde kullanılmak üzere büyüme ortamında ayarlanmıştır (Alsharif ve ark., 2021; Riss ve ark., 2016).



Şekil 3.9 Caco-2 kolorektal kanser hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü

3.2.8.1 Sitotoksisite Testi

Biyoaktif ürünler için sitotoksik aktivite testi gerçekleştirilmiştir. Bu test için Çakır-Koç ve arkadaşları (2018) tarafından açıklanan modifiye edilmiş yöntem izlenmiştir. Sitotoksisite Caco-2 adenokarsinom hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Caco-2 hücreleri %10 (h/h) fetal sığır serumu (FBS) (PAN-Biotech, Almanya), %1 (h/h) esansiyel olmayan amino asitler (PAN-Biotech, Almanya) ve

%1 (h/h) penisilin-streptomisin (PAN-Biotech, Almanya) ile beslenmiş ve 4,5 g/L glikoz içeren Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle'ın minimal esansiyel ortamında (DMEM) (PAN-Biotech, Almanya) 56 °C'de bir saat boyunca inaktive edilmiştir. Deneyler 37 °C'de ve %5 CO2: %95 hava atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kuyuların ortam kısımları çıkarıldıktan sonra kuyulara MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) (AFG Bioscience, Illinois, ABD) çözeltisi eklenmiştir. Mikro plakalar, 37 ◦C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, 450 nm'deki optik yoğunluk (OD) bir mikro plaka okuyucusu (AMR100 Mikro Plaka Okuyucusu, Hangzhou, Çin) kullanılarak belirlenmiştir. Aşağıdaki formül (Denklem (19)) canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \left(\frac{A_{sample}}{A_{control}}\right) \times 100 \qquad (19)$$

Burada As, peptit çözeltisinin absorbansı ve Ac, kontrol örneğinin absorbansıdır.

3.2.8.2 Yara İyileşme Testi

Caco-2 hücreleri 37 °C, %5 CO_2 ortamında DMEM ortamında kültürlenmiştir. Hücreler %70-80 confluent seviyesine ulaştığında, deney yapılacak 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına $1x10^4$ hücre/kuyucuk ekilmiştir. Hücreler kültür plaklarında tam olarak confluent seviyesine ulaşınca, bir 200 µl mikropipet ucu kullanılarak hücrelerin ortasına yatay bir çizik çizilmiştir. Hücrelere 5X, 10X, 15X ve 20X katsayılarında FS-DMEM süspansiyonu eklenmiştir. Negatif kontrol grubu için, spirulina grupları yerine sadece hücre kültürü ortamı eklenmiştir. Hücre göçünün izlenmesi için, mikroskop altında çizik bölgesi gözlemlenmiştir. 0. saatten başlayarak belirli aralıklarla 4X objektifte mikroskoptan "Motic Image Plus 3.0" uygulaması ile görüntüler alınıp, deney 24.saatte sonlandırılmıştır. Göç ve hücre proliferasyonu, çizilen bölgenin kapanma oranı ile değerlendirilmiştir. Yara iyileşmesinin hızını incelemek için, görüntüler üzerinde ImageJ uygulaması kullanılarak çizilen alan ölçülmüştür. Yara bölgesinin kapanma oranı, yüzde olarak Denklem (20) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Yara kapanma (\%)} = [(A_0h - A_t) / A_0h] \times 100 \qquad (20)$$

burada A_0h, 0 zamanındaki yara alanıdır ve A_t, t zamanındaki yara alanıdır.

3.2.9 İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS İstatistik yazılım paketi (sürüm 29.0, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Kantitatif veriler Duncan çoklu aralık testleri ($p < 0,05$) ile Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. Toplam bakteri hücre sayıları (CFU/ml) istatistiksel analizden önce logaritmik bir değere dönüştürülmüştür.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

İzolasyon çalışmaları kapsamında spesifik besi ortamlarına ekilen bakteriler Lactobacillus türlerinin seçilmesi için fenotipik analizlere tabi tutulmuştur. Lactobacillus suşlarının seçiminde gram boyama yapılmış ve mikroskop ile suşların morfolojisi incelenmiştir. Ayrıca katalaz testi uygulanmış ve katalaz negatif bakteriler seçilmiştir. Katalaz testi bakteri kolonilerine %3'lük H_2O_2 damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığının kontrol edildiği temel bir analiz yöntemidir. Fenotipik analizler sonucunda Lactobacillus dışında olan türler seçilmemiş ve elimine edilmiştir. Genomik DNA ekstraksiyonu ve RAPD-PCR analizlerinden sonra elde edilen bakteri DNA'ları 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Analiz sonucunda yaklaşık 1500 baz çiftlik gen dizilimi NCBI veri tabanına yüklenmiş ve identifikasyon sonuçları alınmıştır. İzolasyonlar sonucunda 5 farklı Lactobacillus cinsi bakteri türü tespit edilmiş ve adetleri ile birlikte Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 İzole edilen bakteri türleri ve adetleri

Suş	Adet
Lacticaseibacillus rhamnosus	13
Lactiplantibacillus plantarum	9
Lactobacillus helveticus	4
Limosilactobacillus fermentum	3
Levilactobacillus brevis	6

4.2 *A. platensis* Biyokimyasal Kompozisyon

Toz formdaki spirulinanın biyokimyasal bileşimi analiz edilmiş ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan spirulinanın protein içeriğinin yaklaşık %60 olduğu bulundu. Birçok çalışma spirulina protein içeriğinin %40-70 arasında olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2023; Jain vd., 2019; Hamme vd., 2009). Öte yandan karbonhidrat içeriği %23 ve lipit içeriği %9,6'dir. Spirulina ürünleri yüksek protein içerikleri nedeniyle yaygın olarak tanıtılmaktadır. Öte yandan spirulina,

protein içeriğinin yanı sıra lipit, karbonhidrat ve vitamin içeriğiyle önemli bir besin bileşeni olarak görünmektedir (Ovando vd., 2018).

Tablo 4.2 Çalışmada kullanılan *A. platensis* biyokütlesinin biyokimyasal bileşimi

	Karbonhidrat	Protein	Lipid	Kül	Nem
Arthrospira platensis	23 ± 0.5	59.4 ± 0.3	9.6 ± 0.4	5.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2

Not: Veriler alg tozunun %'si olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama ± s.d. olarak ifade edilmiştir.

4.3 Erlen Ölçeğinde Fermantasyon Çalışma Sonuçları

Erlen ölçeğinde fermantasyon çalışmalarında 4 farklı LAB suşu, suş seçilimi için erlen ölçeğinde fermantasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Erlenlerde 24 saat boyunca gerçekleştirilen çalışmalarda belirli aralıklara numuneler alınarak biyoprosesler takip edilmiştir. Çalışma şartları 37 ^{0}C ve 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin başlangıç pH'ı 5,8 olarak ayarlanmıştır. Çalışma sonucunda spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi ve jenerasyon sayısı hesaplanmıştır. Spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi ve jenerasyon sayısı mikrobiyal prosesler için takip edilmesi gereken önemli parametreler olarak gösterilmektedir (Gao vd., 2009). Suşlara ait bu parametrelere ait veriler Tablo 4.3'te yer almaktadır. Ayrıca erlen çalışmalarına ait görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir. Hücrelerin OD ve canlı hücre sayıları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de grafikler ile gösterilmiştir.

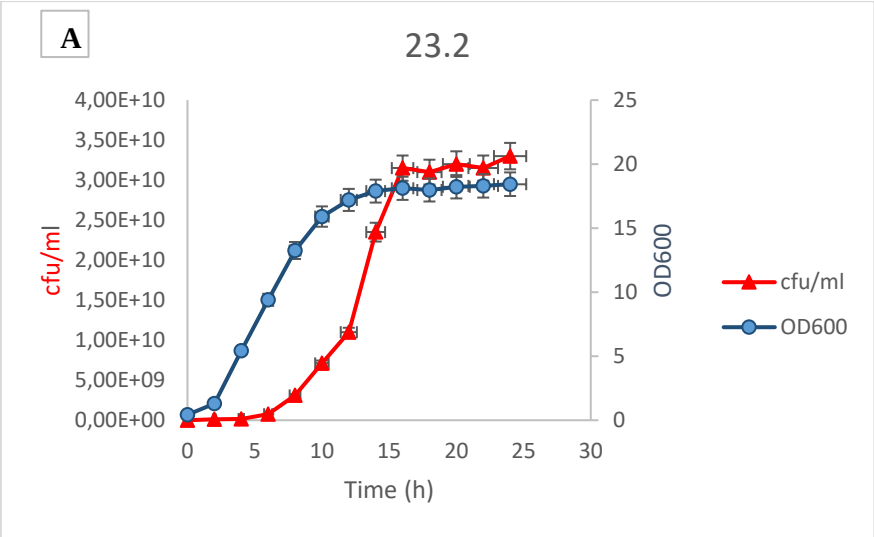


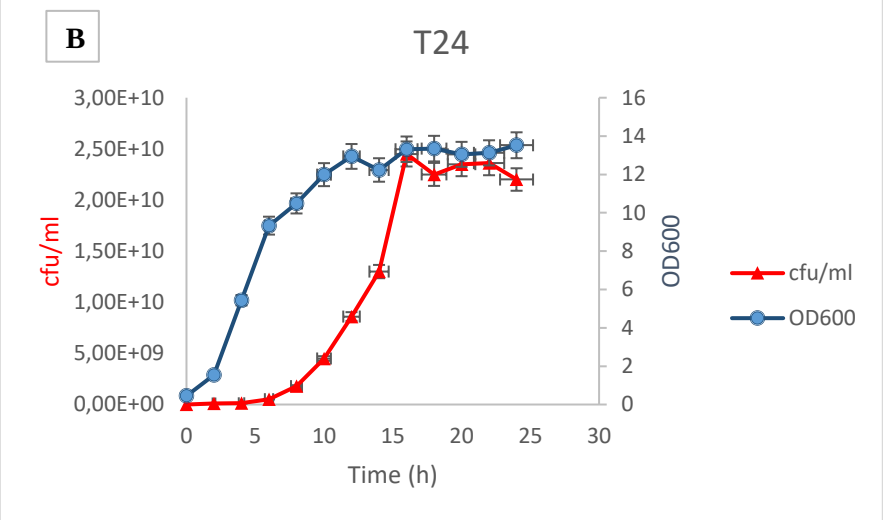
Şekil 4.1 Erlen çalışmasına ait görüntüler

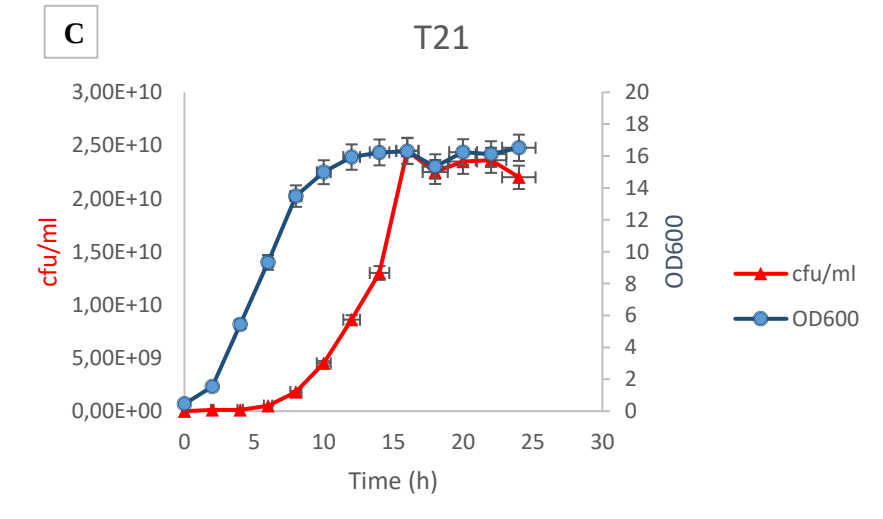
Fermantasyon çalışmaları esnasında 23.2, T24 ve T21 suşları biyokütle üretimi açısından verimli olarak görülmüştür. Ancak T27 suşu biyokütle olarak düşük yoğunlukta gelişmiştir. Spesifik büyüme hızı ve jenerasyon sayısı 23.2 suşunda yüksek bulunmuştur. Suşların büyümesi yaklaşık 3-4 saatlik bir alışma fazı, 12 saatlik dik bir üstel faz ve bunu takip eden yaklaşık 6 saatlik bir durağan faz ile karakterize edilmiştir. LAB'ler için genellikle 18-24 saat arasında bir gelişim süreci gözlenmektedir. Bu süre içerisinde logartmik faz ve durağan fazın belirlenmesi krtik öneme sahiptir (Zhang vd., 2009). Mikrobiyal büyüme sırasında hücre sayısındaki konsantrasyonun artmasının, kuru biyokütle konsantrasyonundaki artışa eşdeğer olduğu görülmüştür. Mikrobiyal proseslerin birçoğunda bu durum doğru orantılı şekilde gerçekleştiği bildirilmiştir (Choi vd., 2015). Ayrıca, OD600 değeri arttıkça kuru kütle miktarı da genellikle artmıştır. Logaritmik büyüme aşamasında ikilenme süresi 1,41 ile *L.rhamnosus* 23.2 suşunda bulunmuştur. T24, T21 ve T27 suşlarının sırasıyla ikilenme süreleri 1,53, 1,74 ve 1,67 olarak bulunmuştur. Canlı hücre sayısı ve spesifik büyüme hızı verilerinde *L. rhamnosus* 23.2 suşu ön plana çıkmıştır. T24 ve T21 suşları potansiyel adaylar olarak ön plana çıkmış ancak tez çalışmasının B planı olarak konumlandırılmıştır. T27 suşu ise seçilen suşlar arasında son tercih olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar istatistiki açıdan karşılaştırıldığında ve proses koşulları düşünüldüğünde g/L, spesifik büyüme hızı ve yüksek OD sonuçları nedeniyle optimizasyon çalışmasına ve ileriki tez çalışmalarına *L. rhamnosus* 23.2 ile geçilmesi kararlaştırılmıştır.

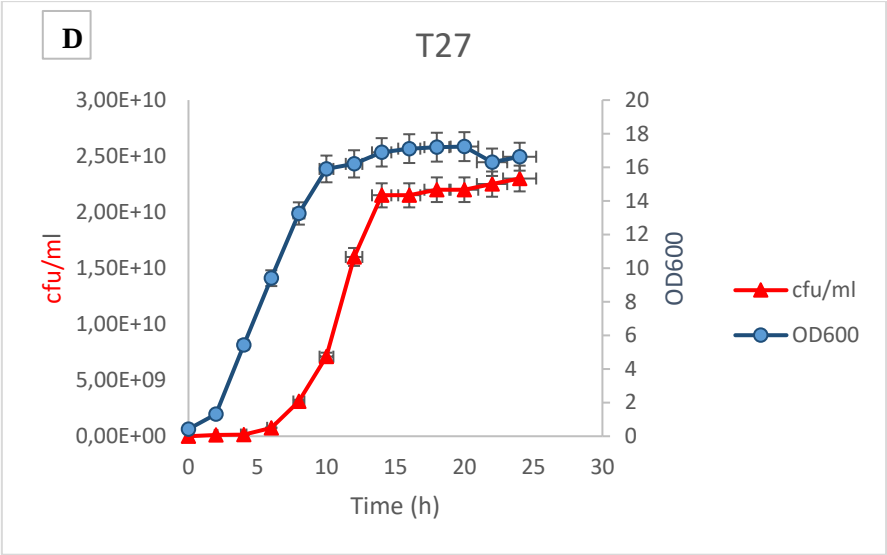
Tablo 4.3 Erlen ölçeğinde fermantasyon çalışmalarında suşların kinetik değerleri

Suş	**μ**	**td**	**n**
L. rhamnosus 23.2	0,491	1,41	17,00
L. plantarum T24	0,452	1,53	15,65
L. plantarum T21	0,398	1,74	13,78
L. brevis T27	0,414	1,67	14,34


A
23.2
4,00E+10
3,50E+10
3,00E+10
2,50E+10
2,00E+10
1,50E+10
1,00E+10
5,00E+09
0,00E+00
cfu/ml
25
20
15
10
5
0
OD600
0
5
10
15
20
25
30
Time (h)
cfu/ml
OD600


B
T24
3,00E+10
2,50E+10
2,00E+10
1,50E+10
1,00E+10
5,00E+09
0,00E+00
cfu/ml
16
14
12
10
8
6
4
2
0
OD600
0
5
10
15
20
25
30
Time (h)
cfu/ml
OD600


C
T21
3,00E+10
2,50E+10
2,00E+10
1,50E+10
1,00E+10
5,00E+09
0,00E+00
cfu/ml
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
OD600
0
5
10
15
20
25
30
Time (h)
cfu/ml
OD600



Şekil 4.2 4 farklı LAB susu (*L. rhamnosus* 23.2, *L. plantarum* T24, *L. plantarum* T21 ve *L. brevis* T27) için canlı hücre sayısı (cfu/ml) ve OD_{600} değer grafikleri

4.4 Biyoreaktörde Biyoproses Koşullarının Deneysel Optimizasyon Sonuçları

Erlen ölçeğindeki optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen *L. rhmanosus* 23.2 suşu ile 3 L hacimli cam biyoreaktörde yapılan optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4 Optimizasyon deney seti için üç tasarım faktörü ve toplanan veriler

Tasarım Faktörü					
Faktör	Bağımsız Değişken	Birim	Düşük seviye kodlanmamış/kodlanmış	Yüksek seviye kodlanmamış/kodlanmış	
A	spirulina powder	g/L	-1/0.00	+1/5.00	
B	Aeration	vvm	-1/0.00	+1/1.00	
C	Agitation	rpm	-1/0.00	+1/250.00	
DM of a D-optimal design and collected data for the two responses					
Run	Faktör A spirulina powder (g/L)	Faktör B Aeration (vvm)	Faktör C Agitation (rpm)	Yanıt y_1 Biyokütle (g/L)	Yanıt y_2 Antioksidan aktivite (%)
1	5.00	1.00	0.00	6.52	10.21
2	0.00	0.00	0.00	1.15	5.50
3	0.00	1.00	250.00	2.63	25.60
4	5.00	0.00	88.62	7.65	16.20
5	1.62	0.00	108.75	6.12	11.50

6	1.62	0.57	250.00	8.54	36.70
7	0.00	1.00	0.00	2.34	13.45
8	2.98	1.00	149.13	7.45	63.10
9	5.00	0.00	250.00	7.95	17.40
10	5.00	0.65	250.00	8.89	23.51
11	0.00	0.00	0.00	1.54	6.21
12	3.44	0.31	171.83	6.78	45.67
13	0.00	1.00	0.00	2.13	11.34
14	2.98	0.40	0.00	4.16	37.89
15	2.98	1.00	149.13	6.54	65.60
16	0.00	1.00	250.00	5.87	18.36
17	5.00	1.00	0.00	9.25	14.40
18	1.77	0.00	250.00	5.69	27.88
19	5.00	0.57	81.11	10.56	25.61
20	0.00	0.40	149.01	4.20	24.72

Tablo 4.4, biyokütle (y_1) ve antioksidan aktivite (y_2) tepkilerinin uyumlarının ve ANOVA sonuçlarının özetlerini göstermektedir. Ayrıca, model indirgemeleri y1 ve y2 tepkilerinin modellerini iyileştirir; bu nedenle, Tablo 4.5'de indirgenmiş kübik modeller (RCM'ler) kullanılmıştır. Önemsiz model terimleri, bir hiyerarşi sağlamak için gerekli olanlar hariç tutularak y_1 ve y_2 tepkileri için çıkarılmıştır.

Maksimum belirleme katsayısı (R_2), ayarlanmış R^2(R^2_{adj}) ve mutlak öngörülen belirleme katsayısı (R^2_{pre}) değerleri, y_1 ve y_2 yanıtları için Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Bu değerler y_1 ve y_2 yanıtları için yeterince iyidir. Ayrıca, farkların her yanıt için ve arasında 0,2'den az olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, değerler Tablo 4.5'deki değerlerle uyumludur. Sonra, yeterli hassasiyet değerleri sinyal-gürültü oranlarını ölçer ve y_1 ve y_2 yanıtlarının oranları, oranlar dörtten büyük veya eşit olduğu durumda arzu edilmektedir. Her iki yanıt için de yeterli nicel göstergeler elde edilmiştir. Tablo 4.5 F-değerlerini ve p-değerlerini göstermektedir. Bu değerlere dayanarak, y_1 ve y_2 yanıtlarının modelleri anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, RCM'ler kullanıldığında y_1 ve y_2 yanıtları için anlamlı model terimleri Tablo 4.4'de sunulmuştur. Uyum eksikliğinin her iki yanıt için de anlamsız olduğu bulunmuştur. Burada uyum eksikliğinin anlamsız olması istenmiştir. Yüksek R^2 ve R^2_{adj} değerler, deneysel sonuçlar ile modelden elde edilen değerler arasındaki yakın etkileşimin bir göstergesidir (Wu vd., 2018). Mevcut çalışmada, elde edilen yüksek R^2 ve R^2_{adj}

değerlerden deneysel ve tahmin edilen değerlerin birbirine çok yakın olduğu ve kurulan modelin başarısını gösterdiği söylenebilir.

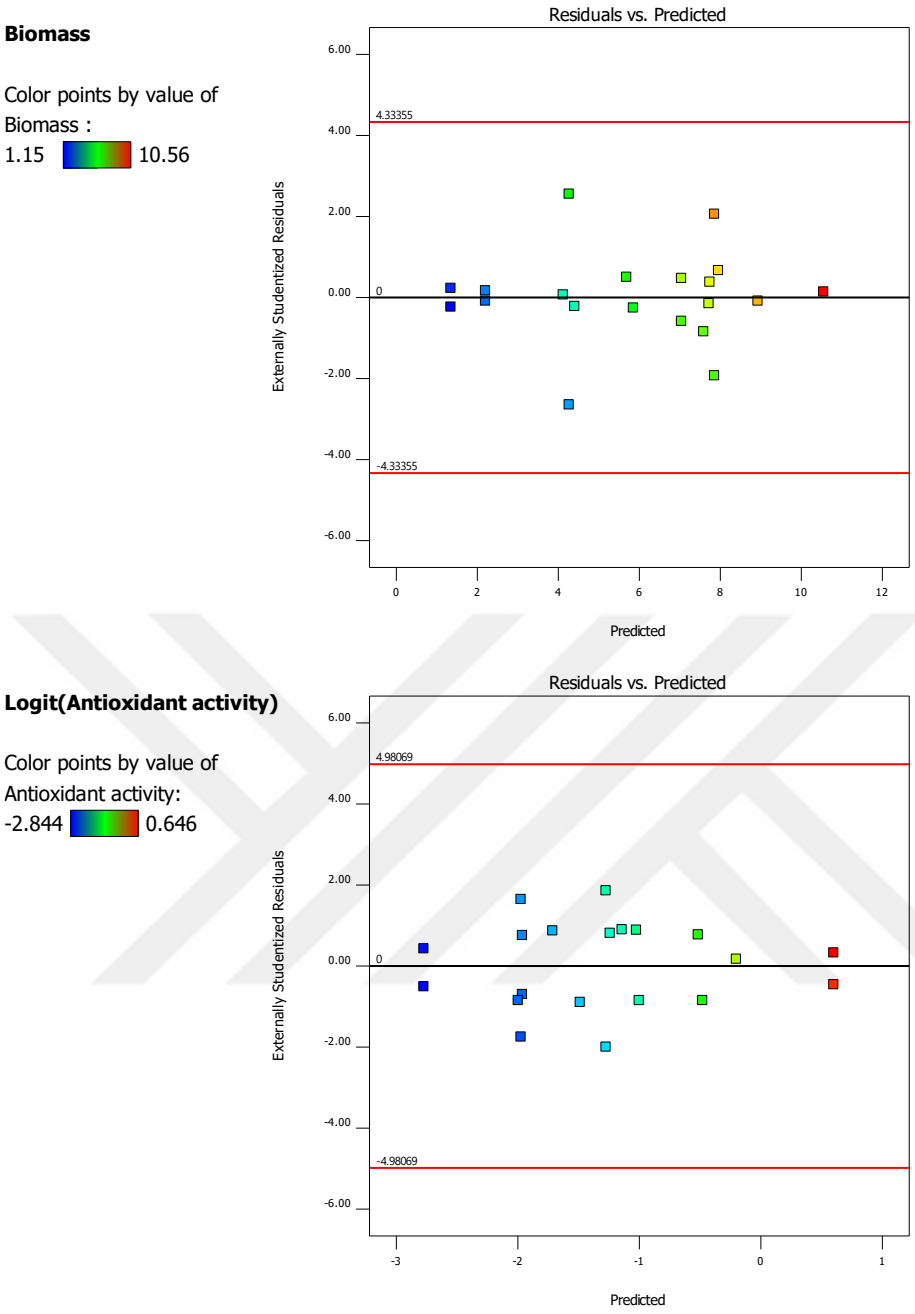
Tablo 4.5 Biyokütle (y_1) ve antioksidan aktivite (y_2) tepkilerinin uyumlarının ve ANOVA sonuçlarının özetleri

Yanıta ilişkin istatistiklerin özeti	y_1/y_2
R^2	0.9255/0.9863
R^2_{adj}	0.8428/0.9629
R^2_{pre}	0.6781/0.7730
Yeterli hassasiyet	11.3290/22.9862

ANOVA sonuçları biyokütle (y1) ve antioksidan aktivite (y2) tepkilerini gösterir

Kaynak (y_1/y_2)	*SoS* (y_1/y_2)	*DoF* (y_1/y_2)	*MS* (y_1/y_2)	*F*-değeri (y_1/y_2)	*p*-değeri (y_1/y_2)	Açıklama (y_1/y_2)
Model	134.24/16.72	10/12	13.42/1.39	11.19/42.05	0.0006/<0.0001	*S/S*
A	-/1.62	-/1	-/1.62	-/48.82	-/0.0002	*-/S*
B	12.15/-	1/-	12.15/-	10.13/-	0.0111/-	*S/-*
C	38.27/1.67	1/1	38.27/1.67	31.89/50.24	0.0003/0.0002	*S/S*
AB	26.61/2.42	1/1	26.61/2.42	22.17/73.07	0.0011/<0.0001	*S/S*
AC	18.42/3.05	1/1	18.42/3.05	15.35/92.02	0.0035/<0.0001	*S/S*
BC	7.13/1.23	1/1	7.13/1.23	5.94/37.06	0.0375/0.0005	*S/S*
A^2	3.63/0.89	1/1	3.63/0.89	3.02/26.96	0.1160/0.0013	*NS/S*
B^2	-/1.62	-/1	-/1.62	-/48.89	-/0.0002	*-/S*
C^2	-/1.20	-/1	-/1.20	-/36.33	-/0.0005	*-/S*
A^2B	13.69/4.25	1/1	13.69/4.25	11.40/128.22	0.0082/<0.0001	*S/S*
A^2C	31.55/2.63	1/1	31.55/2.63	26.29/79.23	0.0006/<0.0001	*S/S*
AB^2	18.20/3.53	1/1	18.20/3.53	15.16/106.44	0.0037/<0.0001	*S/S*
AC^2	28.71/3.13	1/1	28.71/3.13	23.92/94.35	0.0009/<0.0001	*S/S*
Model	10.80/0.23	9/7	1.20/0.03			
Uygunluk Eksikliği	1.31/0.03	4/2	0.3283/0.02	0.1730/0.3952	0.9430/0.6929	*NS/NS*
Saf Hata	9.49/0.20	5/5	1.90/0.04			
Toplam	145.04/16.96	19/19				

Not: SoS=Kareler toplamı, DoF=Serbestlik derecesi, MS=Ortalama kareler, S=Anlamlı, NS=Anlamlı değil.



Şekil 4.3 (a) antioksidan tepkisi ve (b) antioksidan aktivite tepkisi için kalan grafikler

Şekil 4.3e göre, noktalar merkeze nispeten yakın bulunmuştur ve merkez etrafında kabaca simetrik olarak dağılmıştır. Ayrıca, Şekil 4.3'te hiçbir desen gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, RCM'ler deneysel veriler için iyi uyum sağlamaktadır.

Biyokütle (y_1) ve antioksidan aktivite (y_2) tepkilerinin RCM'leri, kodlanmış denklemler açısından aşağıdaki şekilde elde edilmiştir.

$$\hat{\mu}_1(\mathbf{x}) = 6.40 + 4.16B + 8.00C - 7.92AB - 6.24AC + 2.01BC - 1.10A^2 - 9.64A^2B - 15.22A^2C - 17.33AB^2 + 21.83AC^2 \quad (21)$$

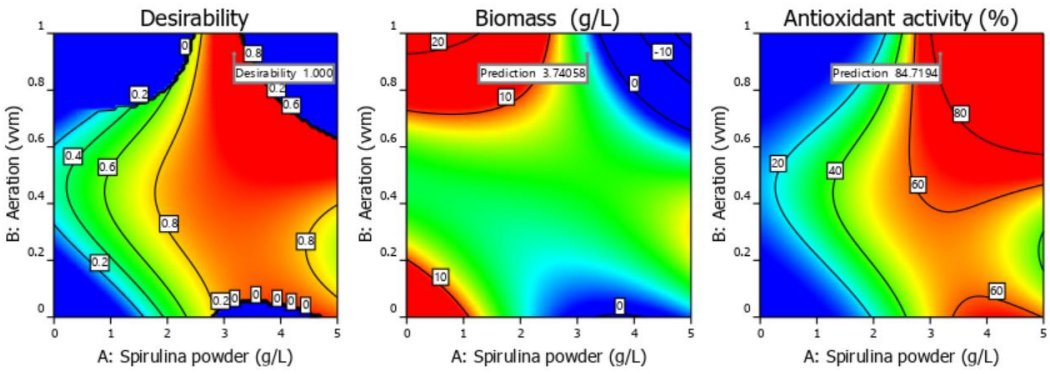
$$\hat{\mu}_2(Logit(\mathbf{x})) = 0.26 + 1.28A - 1.88C + 2.56AB + 1.49AC - 1.23BC - 0.66A^2 - 0.79B^2 - 0.68C^2 + 1.74A^2B + 4.94A^2C + 4.87AB^2 - 7.22AC^2 \quad (22)$$

Denklem (9)'da tanıtılan iki amaçlı optimizasyon modeli, Denklem (21) ve (22) ile modellenmiştir. İki amaçlı optimizasyon modelinin amacı, en yüksek biyokütle ve antioksidan aktiviteyi elde ederken en yüksek arzu edilebilirlik fonksiyonunu elde etmektir. Optimum tasarım faktörleri şu şekilde bulunmuştur: A=3,18 g/L, B=0,93 vvm ve C=119,97 rpm. İki amaçlı optimizasyon modelinin sonuçlarından, tahmini biyokütle (g/L) ve antioksidan aktivite (%) sırasıyla 3,74 ve 84,72 olarak bulunmuştur. Ayrıca, genel arzu edilebilirlik değeri de bir olarak elde edilmiştir. Bu arzu edilebilirlik değeri, yanıtların oldukça arzu edilebilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca, optimizasyon sonuçlarını doğrulamak için doğrulama çalışması yürütülmüştür. Tablo 4.6'da gösterildiği gibi, doğrulama çalışmasından gerçek biyokütle (g/L) ve antioksidan aktivite (%) sırasıyla 4,23 ve 81,59 olarak elde edilmiştir. Bu nedenle, en yüksek biyokütle ve antioksidan aktiviteye ulaşmak için iki amaçlı optimizasyon ve doğrulama deney sonuçlarının uyumlu olduğu bildirilmiştir.

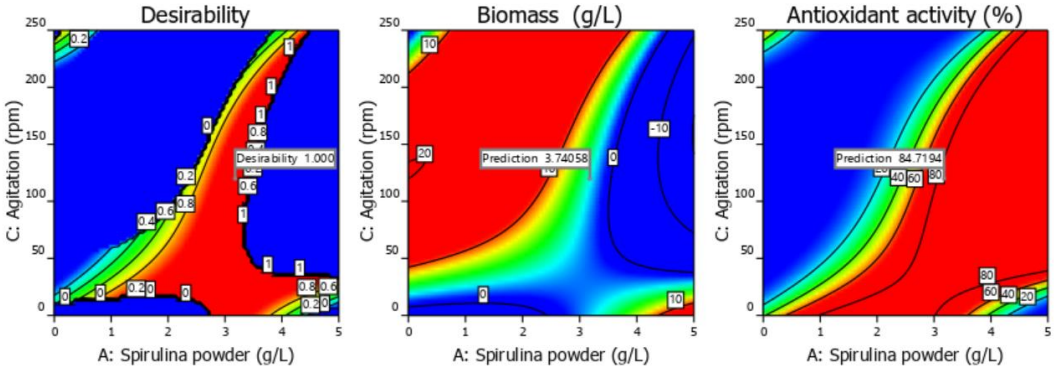
Tablo 4.6 Optimizasyon ve doğrulama çalışmasının sonuçları

Çözüm	A=spirulina powder (g/L)	B=Aeration (vvm)	C=Agitation (rpm)	y_1=Biyokütle (g/L)	y_2=Antioksidan aktivite (%)
İki amaçlı optimizasyon	3.18	0.93	119.97	3.74	84.72
Doğrulama çalışması	3.18	0.93	119.97	4.23	81.59

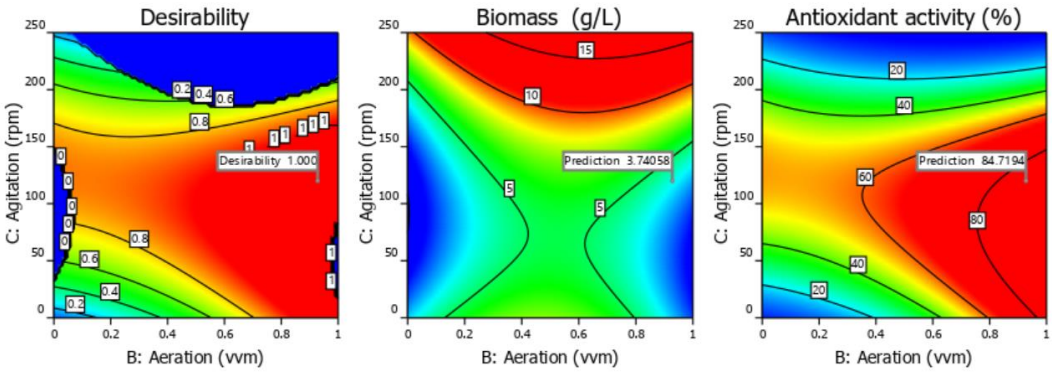
Şekil 4.4, kontur grafikleri kullanılarak tasarım faktörleri için arzu edilebilirlik ve tahmini yanıt değerlerinin nasıl değiştiğini göstermektedir. Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, en yüksek arzu edilebilirlik olan 1.000, A=3.18 g/L, B=0.93 vvm ve C=119.97 rpm olarak elde edilmiştir. Ayrıca, tahmini biyokütle (g/L) ve antioksidan aktivite (%) değerleri Şekil 4.4'te gözlemlenebilir ve en yüksek koşullar sırasıyla 3.74 g/L ve %84.72 olarak elde edilmiştir.



(a) Spirulina tozu (g/L) ve havalandırma (vvm) tasarım faktörleri için kontur çizimleri



(b) Spirulina tozu (g/L) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri için kontur çizimleri

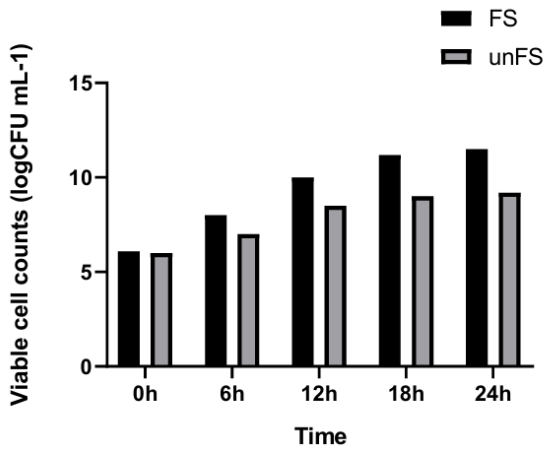


(c) Havalandırma (vvm) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri için kontur çizimleri

Şekil 4.4 (a) spirulina tozu (g/L) ve havalandırma (vvm) tasarım faktörleri, (b) spirulina tozu (g/L) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri ve (c) havalandırma (vvm) ve çalkalama (rpm) tasarım faktörleri için kontur grafikleri

4.5 Canlı Hücre Sayısı

L. rhamnosus 23.2'nin büyümesi, 24 saatlik fermantasyonlar boyunca farklı biyoreaktör çalışmalarına ait belirli zaman noktalarında örnekler alınarak izlenmiştir. Şekil 4.5, farklı biyoreaktör çalışmaları için *L. rhamnosus* 23.2'nin canlı hücre sayılarını göstermektedir. Sonuçlar, Spirulina'nın *L. rhamnosus* 23.2'nin büyümesini destekleyen zengin bir ortam olduğunu göstermektedir. Her iki çalışmada da, canlı hücre sayısı başlangıçta yakın aralıklarla ölçülmüştür. 24 saat sonra, Spirulina içeren ortam, Spirulina içermeyen ortamdan daha yüksek canlı hücre sayısına sahip olduğu bulunmuştur. Biyoreaktör üretimlerinin başlangıç aşamasında, canlı *L. rhamnosus* hücre sayısı 5–6 log CFU mL^{-1} ile başlamış ve FS için 24 saatlik fermantasyonun bir sonucu olarak 11,5 log CFU mL^{-1}'in üzerine çıkmıştır. Ancak, fermente edilmemiş spirulinadaki canlı hücre sayısı fermente edilmiş spirulinadakinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca, başlangıçta, unFS, canlı *L. rhamnosus* hücrelerinin sayısı 5 log CFU mL^{-1} ile başlayıp 24 saatlik fermantasyonun sonunda 7,6 log CFU mL^{-1}'in üzerine çıkmıştır. Önceki çalışmalar, fermantasyon ortamındaki spirulinanın varlığının LAB'nin canlı hücre sayısını artırdığını göstermiştir. Yay vd., (2024) *K. marxianus* ve *L. helveticus* suşlarının büyüme ortamında 6 g/L laktoz ve spirulina kullanmışlardır. FS ürünlerinin hücre canlılığı 48 saat sonra 5 log CFU mL^{-1}'den 9 log CFU mL^{-1}'e yükselmiştir. Niccolai vd., 2019 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, tek bileşen olarak liyofilize *A. platensis* F&M-C256 biyokütlesi (92 g kuru ağırlık L^{-1}) içeren bir fermantasyon ortamında 72 saat boyunca büyütülmüştür. Çalışma sonucunda, maksimum bakteri konsantrasyonuna (10,6 ± 0,2 log CFU mL−1) 48 saatlik fermantasyondan sonra ulaşılmıştır. Jamnik ve arkadaşları (2022), *L. plantarum* ile aşılanmış *A. platensis* besiyerinin laktik asit fermantasyonunda pH, laktik asit ve LAB büyümesini izlediler. *L. plantarum* büyümesinin ilk 24 saatte en hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Başlangıçta, kültürlenebilirlik 7,0 log CFU/g iken, 24 saat sonra 8,5 log CFU/g'a yükselmiştir. Laktik asit 72 saatte 9,3 g/L konsantrasyona ulaşmış, ilk 24 saatte hızlı bir artış gözlenmiş ve verim değeri 7,4 g/L'ye ulaşmıştır.



Şekil 4.5 FS ve unFS'de 24 saatlik fermantasyon sırasında 3 L biyoreaktör seviyesinde *L. rhamnosus*'un canlılığı. Değerler ortalama ± s.d. olarak ifade edilmiştir.

4.6 Antibakteriyel Etki

Patojenik mikroorganizmaların büyümesini engelleme yeteneği, LAB'nin konağı korumak için gerçekleştirdiği mekanizmalardan biridir. Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi, antibakteriyel aktivite gösteren küçük peptit bileşiklerine yol açmaktadır. Bu bileşikler, istenmeyen kontaminasyonu önleyen doğal koruyucular olarak endüstriyel üretimlerde takdir edilmektedir (Sun vd., 2015; Hwanhlem vd., 2010). Biyoaktif ürünlerin *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı antibakteriyel etkilerinin analizinin sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir. İlk çalışma (FS), incelenen dört farklı patojen üzerinde de inhibe edici etkiler göstermiştir. Genel olarak, biyoaktif ürünler *L. monocytogenes* ve *S. aureus* patojenine karşı inhibisyon göstermiştir. Yüksek etkinlik gösteren ilk çalışmada *E. coli*'ye karşı inhibisyon gözlenmiştir. Spirulina olmadan yapılan ikinci çalışmanın sonuçları incelendiğinde, fermente edilmiş spirulina ile anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Benzer sonuçlar, spirulina olmadan fermente edilmiş çalışmalada gram-negatif bakterilerde karşılaştırıldığında elde edilmiştir. Her iki çalışmada da *S.enterica* için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çok sayıda çalışma, laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini ve etkinliğini göstermiştir (Poimenidou vd., 2023; Georgieva vd., 2015). Yang ve arkadaşları (2024), *L. monocytogenes*'e karşı önemli antibakteriyel aktiviteye sahip olan *L. plantarum* suşunun bakteriyostatik mekanizmalarını araştırdıklarını ve 12 farklı patojenik bakteri arasında *L. monocytogenes*'e karşı en yüksek antibakteriyel

etkiyi bulduklarını belirtmişlerdir. Tolpeznikaite vd., (2023), Fermente Spirulina (FS) ürünlerinin antibakteriyel etkisinin Gram-pozitif bakterilere karşı Gram-negatif bakterilere göre çok daha iyi ifade edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, FS'nin *S. aureus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Laktik asit bakterileri çeşitli yollarla patojenlerin büyümesini engelleyebilir, ince dış zarın geçirgenliğini artırabilir, hücre içi ozmotik basıncı değiştirebilir ve makromoleküllerin sentezini engelleyebilir. Biyoaktif ürünün, bakteriyosin üretim mekanizmaları üreterek *L. monocytogenes* zar taşıma ile ilgili genlerin ifadesini engelleyebileceğini, dolayısıyla hücre zarı yapısını bozabileceğini ve metabolik canlılığı, biyofilmi ve büyümeyi engelleyebileceği varsayılmaktadır.

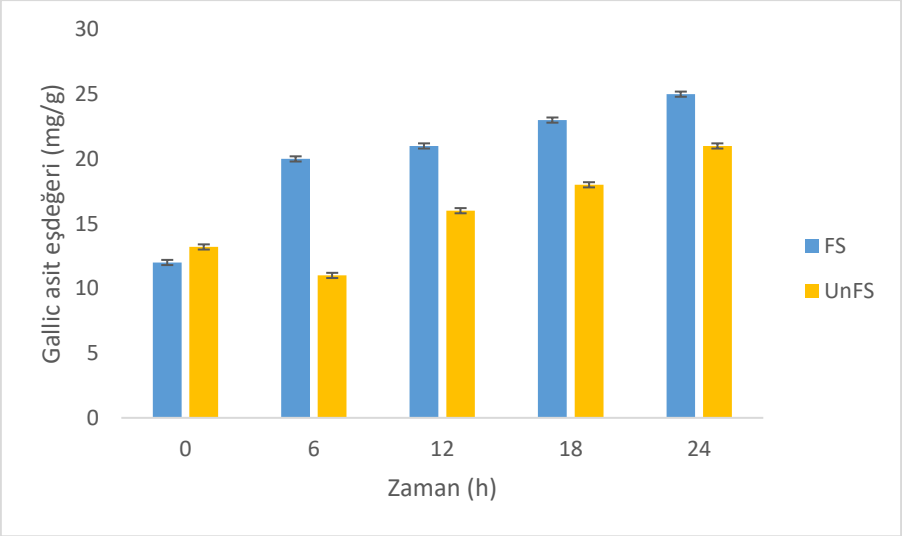
Tablo 4.7 Biyoaktif ürünlerin patojenlere karşı gösterdikleri alan çapları (mm)

	Gram-negatif		Gram-pozitif	
Çalışma	***Escherichia coli***	***Salmonella enterica***	***Listeria monocytogenes***	***Staphylococcus aureus***
FS	8.1	4.6	15.4	6.3
unFS	6.2	4.3	7.7	5.2

4.7 Toplam Fenolik İçerik Tayini

Toplam fenolik içerik analizi için örneklerdeki toplam fenolik bileşik miktarı mg/L^{-1} gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiş ve sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir. En yüksek toplam fenolik içerik 26,1 mg GAE g^{-1}, fermente edilmiş spirulina ürününde 24 saatte elde edilmiştir. Fermente edilmiş spirulina, toplam fenolik içeriğinin 18 ve 24 saatte daha yüksek olduğu bulundu. Spirulina içermeyen toplam fenolik içeriğinin fermente edilmiş spirulina çalışmasından daha düşük olduğu bulunmuştur. Fenolik bileşikler antioksidan kapasitesine önemli katkıda bulunanlar olarak kabul edilmektedir (Ayyash vd., 2018). Spirulina'nın toplam fenolik içeriği, suşa, kültüre ve fermantasyon koşullarına bağlı olarak 5 ila yaklaşık 50 mg GAE g^{-1} arasında değişmektedir (AbdEl-Baki vd., 2009; Harttman vd., 2007). Filannino ve arkadaşlarına (2015) göre, laktik asit bakterileri tarafından fenolik asit türevlerinin suşa özgü metabolizmasını desteklemektedir ve substratın içsel faktörlerine güçlü bir şekilde bağlıdır. Fenolik bileşikler, *A. platensis* biyokütlesinden salınan fikosiyanin ve antioksidan potansiyeli olan bileşiklerle biyolojik aktiviteden sorumlu ana bileşiklerden biridir. Ek olarak, spirulina'nın

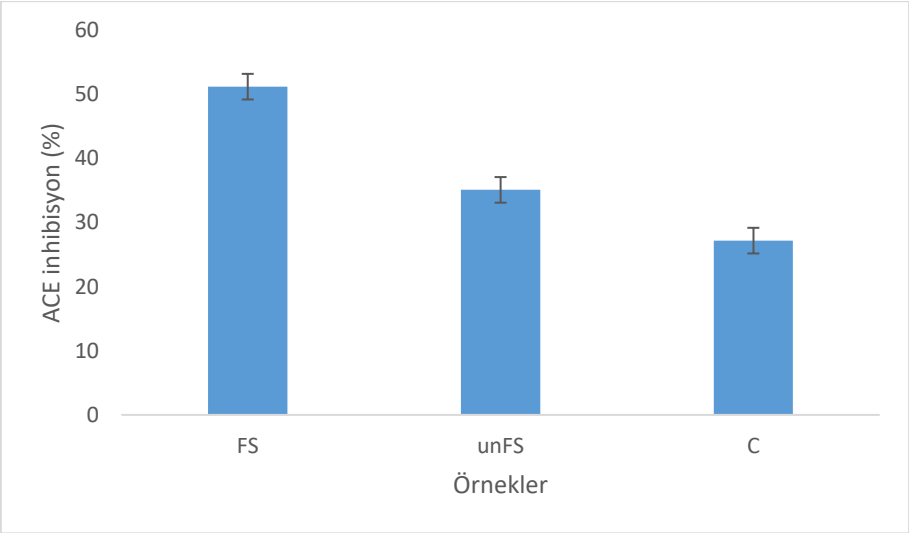
toplam fenolik bileşiği pH, ışık, sıcaklık ve aşağı akış işlemi gibi yetiştirme koşullarından etkilenebilir. Ayrıca, fermantasyon süreci gallik asit gibi polifenolleri serbest bırakmış, fikosiyaninleri fikosiyanobiline dönüştürmüş veya antioksidanı artıran diğer metabolitleri üretmiş olabilir ve bu durum spirulina'nın bir LAB kültür ortamında kullanılmasının olumlu etkisini göstermektedir (Lamuela-Raventós vd., 2018; Lahrichi vd., 2013). Spirulina hücresel antioksidan enzimleri aktive ederek, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını önler, serbest radikalleri temizler ve katalaz aktivitesini artırır. Böylece antioksidan ve toplam fenolik madde içeriğine olumlu katkıda bulunmaktadır (Wu vd., 2016).



Şekil 4.6 Toplam fenolik içerik, biyoaktif ürünlerin g'ı başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Çubuklar ortalama ve standart sapmayı göstermektedir.

4.8 ACE İnhibitör Aktivitesi

ACE, yüksek kan basıncının korunmasında rol oynayan anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye dönüştürmektedir. Çalışma biyoaktif ürünlerin ACE inhibisyon aktivitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Örnekler biyoaktif FS, unFS ürünleri ve kontrol (C) olarak steril PBS kullanılmıştır. Çalışma sonuçları % olarak Şekil 4.7'de verilmiştir. Çalışma sonucunda femente spirulina biyoaktif ürünlerinin ACE ingibisyon etkisi daha fazla bulunmuştur. Sırasıyla FS ve unFS örneklerinin ACE inhibisyon aktivitesi 51.23 ± 10.2%, and 35.12 ± 4.1% bulunmuştur. Kontrol (C) örneğinin aktivitesi 27.2 ± 2.9% bulunmuştur.



Şekil 4.7 FS, unFS ve C örneklerinin ACE inhibitör aktivitesi

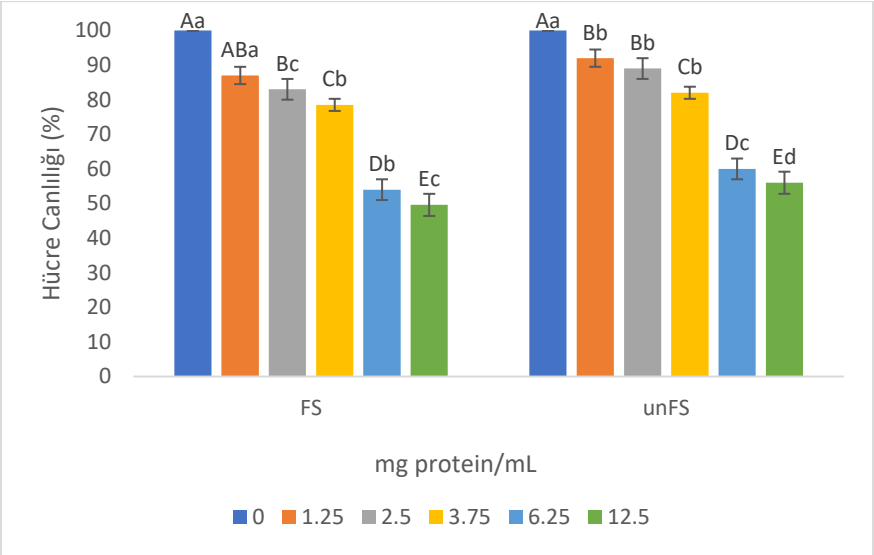
Dünya genelinde yaygın bir rahatsızlık olan yüksek tansiyon kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan, kontrol altına alınabilir bir risk faktörüdür. Yüksek tansiyon tedavisinde gıda proteini kaynaklı doğal ürünler ve mikrobiyal prosesler sonrasında üretilen ACE inhibitörlerinin kullanımı, yan etkileri bulunmadığı için daha güvenli bir alternatif olarak görülmektedir (Donkor vd., 2005). Ancak bu inhibitörler yüksek konsantrasyonlarda aktivite gösterebildiği için jenerik ilaçlar gibi hastalığın doğrudan tedavisinde değil destek takviyesi bağlamında kullanılması düşünülmektedir. Cavalheiro vd., (2020), fermente sütteki protein içeriği ne kadar yüksekse, ACE inhibitör etkisinin de o kadar yüksek olduğunu bildirmiştir. Spesifik amino asit dizilerine ve proteolitik aktiviteye sahip çeşitli LAB salınımlı ACE inhibitör peptitlerle fermente edilmiş gıdalarda yüksek ACE inhibisyon etkisi görülmüştür. Bu nedenle, LAB'ler aracılığıyla üretilen hidrolize proteinlerin ACE inhibitör etkisi gösterdiği düşünülebilir (Cheon vd., 2020).

4.9 *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

4.9.1 Sitotoksisite Testi

İn vitro hücre kültürü çalışmaları kapsamında biyoaktif ürünlerde sitotoksik etki değerlendirme için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. Kontrol örneğinin konsantrasyonu ile FS çalışmasının en düşük konsantrasyonu (1.25 mg protein/mL) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Hücre canlılıkları sırasıyla 1,25, 2,5 ve 3,75 mg protein/mL için %87, %83 ve %78 bulunmuştur. FS çalışması için en yüksek inhibisyon en yüksek örnek

konsantrasyonunda (12,5 mg protein/mL) tespit edilmiştir. Hücre canlılığı bu konsantrasyonda %47,2 olarak bulunmuştur. Spirulina olmadan yapılan çalışmada en yüksek inhibisyon 12,5 mg protein/mL konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Spirulina olmadan yapılan sitotoksik etkinin fermente edilmiş spirulinadan daha düşük olduğu bulunmuştur. Öztürk vd., (2025) *K. marxianus* ve *L. helveticus*'un FS ürünlerinin ve bunların fermente edilmemiş spirulina karşılıklarının HUVEC ve RAW264.7 hücre canlılığını %60'ın altına düşürmediğini ve biyoaktif ürünlerin biyouyumlu olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. Rosa vd., (2020), düşük konsantrasyonlarda probiyotik peynir altı suyu içeceklerinin PC-3 hücre hattı için hiçbir etkisi olmadığını, ancak yüksek konsantrasyonlarda antiproliferatif etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Yay ve ark. (2024), *L. helveticus* ve *K. marxianus* spirulina fermantasyonunun, Tarama, "basamaklı" FS'nin kolon kanseri hücrelerinin (HT-29) canlılığını doz bağımlı bir şekilde %72'ye varan bir azalma ile önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Dahası, "basamaklı" FS'nin ≤ 500 µg/mL-1 dozları, hücresel canlılığı tehlikeye atmadan nitrik oksit salınımını bastırmada güvenli ve etkili olduğunu kanıtlamıştır. Kayacan-Cakmakoglu vd., (2024), yoğurt fermantasyonu ile elde edilen biyoaktif peptitlerin sitotoksik etkilerini incelemiştir. Biyoaktif peptitlerin Caco-2 hücrelerine karşı antiproliferatif etkilere sahip olduğunu bulmuşlardır. Grover vd., (2021), spirulinanın ekstraksiyonu ile elde edilen bir pigment olan C-fikosiyaninin, hayvan modeli üzerinde yapılan bir çalışmada güçlü bir immünomodülatör etkiye sahip olduğunu ve ayrıca sitotoksik bir etkiye sahip olmadığını bildirmiştir. Mevcut çalışma bulguları, kolon kanseri bağlamında, pilot ölçekli üretimin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler göstermede belirgin ve gelişmiş etkinliğini vurgulayarak, bu fermente ürünün biyoaktif bileşikleri açısından daha fazla araştırılması için potansiyel bir yol sunmaktadır. Spirulina içerisinde bulunan fitopigmentlerin (karotenoidler, klorofil, fikosiyanin) ve polisakkaritlerin sitotoksik etkiye katkıda bulunmuştur.



Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda biyoaktif ürünlerle muamele edilen Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı (%) 0 kontrol hücrelerini temsil eder ve diğer örnekler uygulanan biyoaktif ürünün konsantrasyonunu gösterir. A-E Aynı konsantrasyondaki farklı büyük üst simge harfleri örnekler arasındaki farkları gösterir. a-e Aynı örnekteki farklı küçük üst simge harfleri örnekler arasındaki farkları gösterir. Çubuklar ortalama ve standart sapmayı gösterir.

4.9.2 Yara İyileşme Testi

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında ikinci olarak, biyoaktif ürünlerin yara iyileştirici özellikleri çizik testi ile incelenmiştir. Bu amaçla Caco-2 hücrelerinin 6 kuyucuklu plakaya ekimleri gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğunda hücreler %90 konfluensiye ulaştıktan sonra iki boyutlu bir yara modeli oluşturulmuş, biyoaktif ürünler uygulanmış ve Caco-2 hücrelerinin yara kapanma oranları 24 saatlik inkübasyona kadar takip edilmiştir. Çalışmada, fermente Spirulina (FS) örneğinin Caco-2 kolorektal adenokarsinom hücre hattında hücre göçü üzerindeki etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Farklı kat sayı oranlarında (5X, 10X, 15X, 20X) uygulanan FS örneklerinin, yara iyileşme modeli temelinde 24 saatlik hücre göçü üzerindeki etkileri kantitatif olarak analiz edilmiştir. Çalışma sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir. Elde edilen bulgular, FS'nin hücre göçü üzerinde belirgin bir inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Negatif kontrol grubunda %49 oranında hücre göçü gerçekleşirken, FS uygulanan gruplarda bu oran anlamlı şekilde azalmıştır. Özellikle 5X FS grubunda hücre göçü %0,75'e kadar düşerek, FS'nin yüksek konsantrasyonlarda hücre göçünü

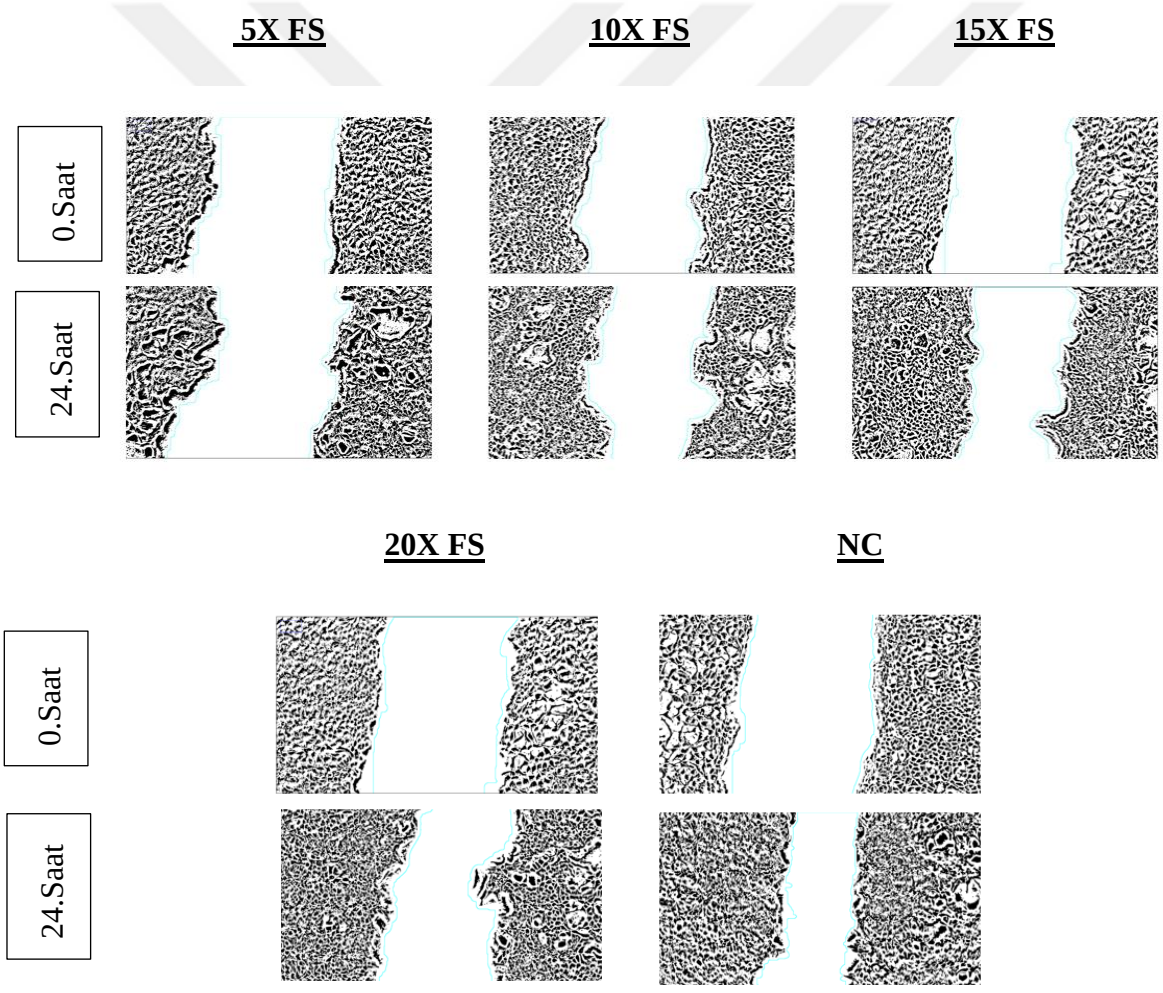
baskılayıcı etkisinin son derece güçlü olduğunu göstermiştir.10X FS grubunda hücre göçü %11 olarak ölçülmüş ve bu konsantrasyonda da göç baskılanmıştır. Ancak 20X FS grubunda hücre göçü %34,37 olarak gerçekleşmiştir; bu oran, 10X ve 5X gruplarına göre daha yüksek olup, beklenen inhibitör etkinin azaldığını göstermektedir. Bu bulgu, FS'nin doza bağlı etkinlik profilinin doğrusal olmadığını ve bazı konsantrasyonlarda etkinin azalabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, 15X FS grubunda hücre göçü %27 olarak ölçülmüştür. Bu durum, FS içeriğinde bulunan bazı biyolojik aktif bileşenlerin hücre göçü üzerinde konsantrasyona bağlı çift yönlü bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Düşük seviyelerdeki immünmodülatör veya büyüme faktörü benzeri maddelerin hücre hareketliliğini teşvik edebileceği bildirilmektedir (Jalali vd.2025; de Marco Castro vd., 2019). Yara iyileşme çalışmasına ait görütüler Motic AE200 invert mikroskop ile çekilmiş ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.9'de ise FS örneklerinin ve NC grubunun 0-24 saat arasındaki yüzde göç grafiği verilmiştir. Bu çalışma, FS'nin kolorektal kanser hücrelerinde hücre göçü üzerine etkisini gösteren öncü bir bulgu niteliğindedir. Bulgular, FS'nin anti-metastatik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmekte ve bu potansiyelin özellikle bazı konsantrasyonlarda daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. FS'nin üstün aktivitesi, fikosiyanin, fenolik bileşikler ve biyoaktif peptitler dahil olmak üzere fermantasyondan türetilen biyoaktif bileşiklerin zenginleştirilmiş bileşimine atfedilebilir (Abdel-Daim vd., 2015). Bu moleküllerin, sitoskeletal dinamiklerde, hücre dışı matris yeniden şekillenmesinde ve kanser hücresi göçü ve metastazı için gerekli olan hücre yapışma süreçlerinde yer alan temel sinyal yollarını modüle ettiği bilinmektedir (Syarina vd., 2015). FS'nin daha düşük seyreltmelerinde gözlemlenen daha güçlü inhibisyon, muhtemelen bu aktif metabolitlerin daha yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan doz bağımlı bir biyolojik yanıtı daha fazla desteklemektedir.

Tablo 4.8 ImageJ uygulamasından elde edilen FS grupları yara iyileşme testi 0. ve 24. saatteki yüzde alan verileri

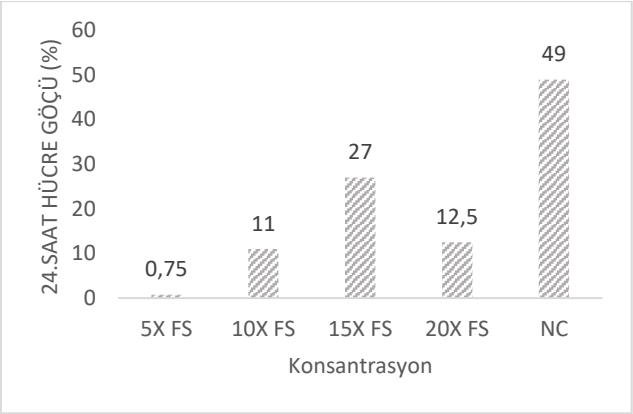
0.saat	
Numune	**Alan(%)**
5X FS	40.83
10X FS	34.22
15X FS	37.94

20X FS	31.94
NC	38.83

24.saat	
	Alan(%)
5X FS	40.52
10X FS	30.40
15X FS	27.19
20X FS	20.96
NC	20.02



Şekil 4.8 0. ve 24. saatte ImageJ ile alınan 5X, 10X, 15X ve 20X FS örnekleri ile NC grubunun göç görüntüleri.



Şekil 4.9 FS örneklerinin ve NC grubunun 0-24 saat arasındaki yüzde göç grafiği

5
SONUÇ

Günümüzde sürdürülebilir ve güvenilir biyotabanlı ürünlere olan ilgi giderek artmaktadır. Artan dünya nüfusu ile birlikte yenilikçi biyoaktif bileşenlere ihtiyaç artacaktır. Bu nedenle, zengin içeriğe sahip sürdürülebilir bir biyokütle kaynağı olan mikroalglerden işlevsel ve yenilikçi bileşenler geliştirmek önemli bir biyoteknolojik üretim eğilimi olarak ortaya çıkmıştır. Bu tez kapsamında, toplamda 45 farklı laktik asit bakterisi yerel peynirlerden izole edilip 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Bu 45 tür arasından seçilen 4 farklı tür (*Lactiplantibacillus plantarum* T-21, *Lactiplantibacillus plantarum* T-24, *Lacticaseibacillus rhamnosus* 23.2 ve *Levilactobacillus brevis* T-27) fermente edilmiş yenilikçi spirulina ürünleri geliştirme amacıyla çalışmalara tabi tutulmuştur. Seçilen bu 4 türden *L. rhamnosus* 23.2 suşu erlen denemelerinde daha başarılı bulunduğu için ileri çalışmalara alınmıştır. Biyoproses optimizasyonunda spirulina tozu, havalandırma ve karıştırma hızı bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Fermantasyon çalışmaları sonucunda elde edilen biyoaktif protein hidrolizatlarının biyoaktivite ve hücre kültürü testleri uygulanmıştır. *L. rhamnosus* 23.2 suşunun canlı hücre sayısının spirulina içeren ortamda daha fazla olduğu bulunmuştur. Fermente spirulina biyoaktif ürünleri güçlü antioksidan etkiler göstermiştir. Toplam fenolik madde içeriğinde FS protein hidrolizatlarının unFS'ye göre yüksek sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. FS ürünleri için toplam fenolik madde içeriği 26,1 mg GAE g^{-1} iken, unFS ürünlerde 18 mg GAE g^{-1} toplam fenolik madde içeriği bulunmuştur. Ayrıca, biyoaktif ürünlerin potansiyel sağlık yararlarını incelemek için ACE inhibitör aktivitesi, hücre göçü ve MTT çalışmaları yürütülmüştür. ACE inhibitör aktivitesi çalışmalarında FS örnekleri %51'lik bir inhibisyon ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra unFS ve C örnkeleri sırasıyla %35 ve %27 aktivite göstermiştir. FS ve unFS'nin anti-metastatik ve antikanser potansiyeli, Caco-2 kolorektal adenokarsinoma kanser hücreleri kullanılarak MTT ve hücre göçü (çizilme) testi ile in vitro karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda FS'nin hücre göçünü önemli ölçüde engellediğini ve hücre canlılığını doz bağımlı bir şekilde azalttığını, buna karşın unFS'nin nispeten sınırlı biyoaktivite gösterdiğini göstermektedir. Hücre göçü testi, FS tedavisinin Caco-2 hücrelerinin

göç kapasitesini, özellikle düşük seyreltmelerde, önemli ölçüde bastırdığını ve fermantasyonla geliştirilen güçlü anti-metastatik etkileri vurguladığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde, MTT testi sonuçları, FS'nin kanser hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etki uyguladığını ve en düşük canlılığın en yüksek FS konsantrasyonunda gözlemlendiğini göstermiştir. Biyoaktif ürünler ACE inhibisyon aktivitesi göstermiş ve önemli bir sağlık potansiyeli ortaya koymuştur. Çalışma sonuçları, fermantasyonun yalnızca doğal spirulina bileşenlerinin biyoyararlanımını iyileştirmekle kalmayıp aynı zamanda önemli antikanser ve antioksidan özelliklere sahip yeni, biyolojik olarak aktif metabolitlerin üretimine de yol açtığını göstermektedir. Fermantasyon yoluyla zenginleştirilen fikosiyanin, fenolik bileşikler ve biyoaktif peptitler gibi temel biyoaktif moleküller, kanser hücresi çoğalması, göçü ve sağ kalımında yer alan kritik yolları hedefleyerek bu etkilerin aracılık edilmesinde önemli roller oynamaktadır. Bu metabolik ve biyolojik fonksiyonlar sayesinde biyoaktif ürünlerin kayda değer sağlık etkileri bulunmuştur.

Bu çalışma, spirulina biyokütlesinin farklı bakteri türleri için uygun bir substrat olabileceğini ve antiproliferatif, antibakteriyel, ACE inhibisyonu sağlayan, güçlü antioksidan özelliklere sahip ve fenolik içeriği yüksek fonksiyonel özellikli yeni spirulina ürünlerinin oluşumuna yol açabileceğini ortaya koymuştur. Sağlık faydaları olan, güvenilir ve sürdürülebilir ürünlerin geliştirilmesi için tez kapsamında yapılan çalışmalar önemli kazanımlar sağlanmıştır. Ayrıca, biyoproses optimizasyonu ile biyotabanlı ürünlerin geliştirilmesi için gelecekte yapılacak olan çalışmalara ışık tutulacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasının verileri ile pilot ya da endüstriyel ölçekte ürün üretimi ya da ürün geliştirmeler yapılabilir. Bu sayede yenilikçi protein hidrolizatlarının üretimi ve kullanımı yaygınlaşabilir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar incelendiğinde aşağıdaki öneriler ve çıkarımlar yapılabilir:

- Hassas ya da mikrobiyal fermantasyon prosesi kullanılarak yenilikçi, güvenilir ve sağlığa faydalı biyoaktif ürünler üretilebilir.

- Spirulina'nın laktik asit bakterilerinin besi ortamında substrat olarak kullanılma potansiyeli ortaya koyulmuştur. Günümüzde biyoproseslerde ara girdi ve substrat temini konusunda ciddi sorunlar yaşanmaktadır. Spirulina zengin içeriği sayesinde yenilikçi bir substrat olarak mikrobiyal proseslerde kullanılabilir.

- Spirulina'nın başta pre-probiyotik ve biyoaktif özellikleri ile yeni, doğal ve işlevsel gıda/yem bileşikleri talep eden mevcut nutrasötik, farmasötik ve fonksiyonel gıda pazarlarını çeşitlendirmek için iyi bir stratejik yaklaşım sunulabilir.

- Ko-kültür çalışmaları yaygınlaşabilir. Özellikle mikroalger ile birçok farklı mikroorganizma grubu birlikte çalışılabilir. Zengin bileşiklerin geliştirilmesi ve fonksiyonel ürünler yaygınlaştırılabilir.

- Biyoaktif ürünlerin ilaç, gıda ve diğer alanlarda kullanımı yaygınlaştırılabilir. Özellikle potansiyel sağlık faydalarına yönelik birçok farklı çalışma yapılabilir.

- Biyoaktif peptitlerin üretimi için mikrobiyal fermantasyon prosesine yönelik çalışmalar arttırılabilir. Mikrobiyal fermantasyon yeşil dönüşüme daha uygun, ekonomik ve sürdürülebilir bir üretim şekli sunmaktadır. Mikrobiyal fermantasyon çalışmaları özellikle endüstride daha fazla kullanılabilir.

- Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi sayesinde yenilikçi nutrasötik ürünler geliştirilip gıda/gıda takviyesi piyasasına sunulabilir.

- Çalışma sonuçları pilot ya da endüstriyel ölçeğe uyarlanabilir ve bu sayede büyük ölçekli biyoaktif peptitler, kısa zincirli yağ asitleri, ekzopolisakkaritler gibi biyoaktif ürünlerin üretim yapılabilir.

- Elde edilen deneysel çıktılar ile yenilikçi üretim ve saflaştırma prosesleri geliştirilebilir.

- Mikroalglerin biyoteknolojik üretim süreçlerinde kullanılması ile CO_2 salınımı azaltılabilir ve küresel ısınmanın etkileri azaltılabilir.

KAYNAKÇA

Abbaspour, N. (2024). Fermentation's pivotal role in shaping the future of plant based foods: An integrative review of fermentation processes and their impact on sensory and health benefits. Appl. Food Res. 2024, 4, 100468.

Abbott M. S R, Harvey A. P, Perez G. V, Theodorou M. K. (2013). Biological processing in oscillatory baffled reactors: operation, advantages and potential, Bioprocessing Biopharmaceutical Technology Centre, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK; The Centre for Process Innovation, Redcar, UK.

AbdEl-Baki, H.H.; El Baz, F.K.; El-Baroty, G.S. (2009). Production of pheno lic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. Afr. J. Biotechnol. 2009, 8:7059–7067.

Abdel-Daim, M. M., Farouk, S. M., Madkour, F. F., Azab, S. S. (2015). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. Immunopharmacology and Immunotoxicology, *37(2):*126-39.

Acien, F.G.; Fernandez, J.M.; Magan, J.J.; Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnol. Adv. 2012, 30, 1344–1353.

Agomuoh P.Kelechi, (2011). Bioreactors, Cyprus International University. Dec 27, 2011.

Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical grade bioactive peptides. Biotechnology Advances, 29(3), 272–277.

Ali, H.; Solsvik, J. (2020). Axial distributions of bubble–liquid mass transfer coefficient in laboratory-scale stirred tank with viscous Newtonian and non-Newtonian fluids. Phys. Fluids 2020, 32, 123308.

Alsharif, K. F., Alzahrani, A. S., Alhumaid, A. M., et al. (2021). Advances in the use of Caco-2 cell line for drug absorption and transport studies. Pharmaceuticals, 14(2), 147.

Alzahrani, M. A. J., Perera, C. O., & Hemar, Y. (2018). Production of bioactive proteins and peptides from the diatom Nitzschia laevis and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from Spirulina platensis and Chlorella vulgaris. International Journal of Food Science and Technology, 53(3), 676–682.

Athiyappan, K.D.; Routray, W.; Paramasivan, B. (2024). Phycocyanin from Spirulina: A Comprehensive Review on Cultivation, Extraction, Purification, and Its Application in Food and Allied Industries. Food Humanity. 2024, 2, 100235.

Ayivi, R. D., and S. A. Ibrahim. (2022). "Lactic Acid Bacteria: AnEssential Probiotic and Starter Culture for the Production of Yoghurt."International Journal of Food Science & Technology 57: 7008–7025.

Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S., & Liu, S. Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α-amylase and α-glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. Food Chemistry, 239, 588–597.

Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Book Company , JAPAN, 984s.

Bao, J.; Zhang, X.; Zheng, J.; Ren, D.; & Lu, J. (2018). Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. Food Chem. 2018, 264, 64–72.

Barati, B.; Zafar, F.F.; Rupani, P.F.; Wang, S. (2021). Bacterial pretreatment of microalgae and the potential of novel nature hydrolytic sources. Environ. Technol. Innov. 2021, 21, 101362.

Barberis, S. E., Origone, A. L., Adaro, M. O., & Bersi, G. (2018). Bioactive Peptides as Functional Food Ingredients. In Microbial Biotechnology: Principles and Applications, Third Edition. Elsevier Inc.

Barton, N.R., Burgard, A.P., Burk, M.J., Crater, J.S., Osterhout, R.E., Pharkya, P., Steer, B.A., Sun, J., Trawick, J.D., Van Dien, S.J., Yang, T.H. and Yim, H. (2015). An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 42(3): 349–360.

Batista V.L., da Silva T.F., de Jesus L.C.L., Coelho-Rocha N.D., Barroso F.A.L., Tavares L.M., Azevedo. V., Mancha-Agresti. P., Drumond. M.M. (2020). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. Front Microbiol. 2020 Sep 17;11: 544490.

Bezirci, E., Tas ¸pınar-Demir, H., Turanlı-Yıldız, B., Erdem, A., Alemdar, F., & Türker, M. (2023). Propionic acid production via two-step sequential repeated batch fermentations on whey and flour. Biochemical Engineering Journal, 192, 1–9. Article 108816.

Blanken W, Cuaresma M, Wijffels R H, Janssen M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. Algal Res 2(4): 333–340.

Blajman JE, Páez RB, Vinderola CG, Lingua MS, Signorini ML. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. J Appl Microbiol. 2018 Dec 1;125(6).

Bleakley S., Hayes M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. Rev. Foods.6:33.

Brian McNeil and Harvey L. M. (2008). Practical Fermentation Technology, John Wiley & Sons, Ltd., ISBN: 978-0-470-01434-9.

Borowitzka, M.A. (2018). Microalgae in Medicine and Human Health. In Microalgae in Health and Disease Prevention; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 195–210. ISBN 978-0-12-811405-6.

Bove, C. G., Angelis, M. D., Gatti, M., Calasso, M., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2012). Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus*

strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*, *12*(21), 3206-3218.

Burgain J, Scher J, Francius G, Borges F, Corgneau M, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C, Gaiani C (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. Adv Colloid Interf Sci 213:21–35.

Campbell, R.; Hauptmann, A.; Campbell, K.; Fox, S.; Marco, M.L. Better Understanding of Food and Human Microbiomes through Collaborative Research on Inuit Fermented Foods. Microbiome Res. Rep. 2022, 1, 5.

Caporgno, M.P., Mathys, A. (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. Frontiers in Nutrition, 5: 58.

Castillo-Hair SM, Igoshin OA, Tabor JJ. (2015). How to train your microbe: methods for dynamically characterizing gene networks. Curr Opin Microbiol. 2015 Apr;24:113-23.

Cavalheiro, G.F.; Baptista, D.P.; Galli, B.D.; Negrão, F.; Eberlin, M.N.; Gigante, M.L. (2020). High protein yogurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. Food Chem. 2020, 333, 127482.

Cerda, A.; Artola, A.; Barrena, R.; Font, X.; Gea, T.; Sanchez, A. Innovative production of bioproducts from organic waste through solid-state fermentation. Front. Sustain. Food Syst. 2019, 3, 63.

Chopra, B. & Dhingra, A. K. (2021). Natural products: a lead for drug discovery and development. Phytother. Res. 35, 4660–4702.

Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. Br J Pharmacol, 174: 1378–1394.

Chai, K.F.; Voo, A.Y.H.; Chen, W.N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2020, 19, 3825–3885.

Chaiklahan, R.; Chirasuwan, N.; Srinorasing, T.; Attasat, S.; Nopharatana, A.; Bunnag, B. Enhanced Biomass and Phycocyanin Production of *Arthrospira* (Spirulina) *Platensis* by a Cultivation Management Strategy: Light Intensity and Cell Concentration. Bioresour. Technol. 2022, 343, 126077.

Cheon, M.J.; Lim, S.M.; Lee, N.K.; Paik, H.D. (2020). Probiotic properties and neuroprotective effects of *Lactobacillus buchneri* KU200793 isolated from Korean fermented foods. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1227.

Choi GH, Lee NK, Paik HD (2021). Optimization of medium composi tion for bio mass production of Lactobacillus plantarum 200655 using response surface methodology. J Microbiol Biotechnol 31(5):717–725.

Clarke, K.G. (2013). Bioprocess engineering. An Introductory Engineering and Life Science Approach. 1st Edition - October 31, 2013.

Çakır-Koç, R.; Budama-Kilinc, Y.; Kaya, Z.; Berber Orcen, B.; Ucarkus, E. (2018). Coconut oil-loaded chitosan nanoparticles for the treatment of acne vulgaris: Cytotoxicity, antibacterial activity, and antibiofilm properties. Fresenius Environ. Bull. 2018, 27(5), 2642–2648.

Daliri, E.B.M., Oh, D.H. ve Lee, B.H. (2017). Bioactive peptides. Foods, 6(5): 32.

Delafosse, A., Calvo, S., Collignon, M.L., Delvigne, F.,Crine, M., and Toye, D. (2015). Euler-Lagrange approachto model heterogeneities in stirred tank bioreactors –comparison to experimental flow characterization and par-ticle tracking. Chem Eng Sci 134: 457–466.

Delvigne, F., Zune, Q., Lara, A.R., Al-Soud, W., and Soren-sen, S.J. (2014). Metabolic variability in bioprocessing:implications of microbial phenotypic heterogeneity. TrendsBiotechnol 32: 608–616.

Delvigne F, Noorman H. (2017). Scale-up/Scale-down of microbial bioprocesses: a modern light on an old issue. Microb Biotechnol. 2017 Jul;10(4):685-687.

De Vuyst, L.; Leroy, F. (2020). Functional Role of Yeasts, Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Fermentation Processes. FEMS Microbiol. Rev. 2020, 44, 432–453.

de Man, J.C.; Rogosam, M. and Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 1960, 23, 130-135.

de Marco Castro, E.; Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. (2019). Effect of fermentation on enhancing the nutraceutical properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). Fermentation. 2019, 5.

de Melo Pereira G., V., Dão P. De Carvalho Neto, Ana C. De O. (2020). Junqueira, Susan G. Karp, Luiz A. J. Letti, Antonio I. Magalhães Júnior, and Carlos R. Soccol, (2020), "A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry", Food Reviews International, 36:2, 135-167.

Deniz, I.; Demir, T.; Oncel, S.S.; Hames, E.E.; Vardar-Sukan, F. (2021). Effect of Agitation and Aeration on Keratinase Production in Bioreactors Using Bioprocess Engineering Aspects. Protein J. 2021, Jun;40(3):388-395.

Dhara D. (2025). Bioprospecting of Seaweed Secondary Metabolites as Emerging Functional Ingredients, Recent Advances in Seaweed Biotechnology, 10.1007/978-981-96-0519-4_6, (161-186).

Doran, P.M. (2013). Reactor Engineering. Bioprocess Engineering Principles (Second Edition). Chapter 14, 2013, Pages 761-852.

Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N.P. (2005). Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. J. Food Sci. 2005, 70, 375–381.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. T.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956, 28, 350–356.

EFSA. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA J. 2018;16(3):5206.

Elam, E., Feng, J., Lv, Y.-M., Ni, Z.-J., Sun, P., Thakur, K., et al. (2021). Recent advances on bioactive food derived anti-diabetic hydrolysates and peptides from natural resources. Journal of Functional Foods, 86, 104674.

Elcik, H, Çakmakcı, M. (2017). Mikroalg üretimi ve mikroalglerden biyoyakıt eldesi Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University 32:3 795-820.

Erkmen, O.; Bozoglu, T.F. (2016). Basic principles of food fermentation. In Food Microbiology: Principles into Practice; Erkmen, O., Bozoglu, T.F., Eds.; John Wiley and Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2016; Volume 2: Microorganisms in Food Preservation and Processing, pp. 228–252

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R., (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. Sci. 305,354–360.

Fanzo, J. et al. 2021.Viewpoint: rigorous monitoring is necessary to guide food system transformation in the countdown to the 2030 global goals. Food Policy 104, 102163.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. Ontario, Canada: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. FAO/WHO.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: American Cordoba Park Hotel. Rome, Italy: FAO/WHO; 2001. p. 1–2.

Farieda M., Samera M., Abdelsalam E., Yousef R.S., Attia Y.A., Ali A.S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements, Renewable and Sustainable Energy. Reviews 79,2017, pp. 893-913.

Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8, 44–61.

Finkel, Z.V.; Follows, M.J.; Liefer, J.D.; Brown, C.M.; Benner, I.; Irwin, A.J. (2016). Phylogenetic Diversity in the Macromolecular Composition of Microalgae. PLoS ONE 2016, 11, e0155977.

Flamm, E.L. (1991). How FDA approved chymosin: A case history. Bio/Technology, 9(4): 349–351.

Freshney, R. I. (2015). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (7th ed.). Wiley-Blackwell.

Gabelle, J.-C.; Jourdier, E.; Licht, R.B.; Chaabane, F.B.; Henaut, I.; Morchain, J.; Augier, F. (2012). Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of Trichoderma reesei in stirred bioreactors. Chem. Eng. Sci. 2012, 75, 408–417.

Gao X, Kong B, Vigil RD. (2017). Comprehensive computational model for combining fluid hydrodynamics, light transport and biomass growth in a

Taylor vortex algal photobioreactor: Lagrangian approach. Bioresour Technol. 2017 Jan;224:523-530.

Gao X, Qiao SY, Lu WQ. (2009). Determination of an economical medium for growth of Lactobacillus fermentum using response surface methodology. Lett Appl Microbiol 49:556–561.

Garcia-Ochoa F, Gomez E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview, Biotechnol Adv; vol., 27 pp 153–176.

Georgieva, R.; Yocheva, L.; Tserovska, L.; Zhelezova, G.; Stefanova, N.; Atanasova, A.; Danguleva, A.; Ivanova, G.; Karapetkov, N.; Rumyan, N.; Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2015, 29, 84–91.

Gershwin, M.E.; Belay, A. (Eds.) Spirulina in Human Nutrition and Health; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007.

Grover, P.; Bhatnagar, A.; Kumari, N.; Narayan, B.A.; Kumar, N. D.; Purkayastha, J. (2021). C-Phycocyanin-a novel protein from *Spirulina platensis- In vivo* toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies. Saudi J. Biol. Sci. 2021, Mar;28(3):1853-1859.

Gökmen, G.G.; Sarıyıldız, S.; Cholakov, R.; Nalbantsoy, A.; Baler, B.; Aslan, E.; Düzel, A.; Sargın, S.; Göksungur, Y.; Kışla, D. (2024). A novel *Lactiplantibacillus plantarum* strain: probiotic properties and optimization of the growth conditions by response surface methodology. World J. Microbiol. Biotechnol. 2024, Jan 9;40(2):66.

Gupta S, Abu-Ghannam N, Scannell AGM. (2011). Growth and kinetics of Lactobacillus plantarum in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. Food Bioprod Process. 2011;89:346–355.

Hafeez, Z.; Cakir-Kiefer, C.; Roux, E.; Perrin, C.; Miclo, L.; and Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. Food Res. Int. 2014, 63, 71–80.

Hamme, V.; Sannier, F.; Piot, J.M.; Didelot, S.; Bordenave-Juchereau, S. (2009). Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: Contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. J. Dairy Res. 2009, 76, 152–157.

Hanke, Alexander T., Ottens, Marcel, (2014). Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. Trends Biotechnol. 32, 210–220.

Hartmann, R.; Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr Opin Biotechnol. 2007 Apr;18(2):163-9.

Hata, N. N. Y., Surek, M., Sartori, D., Serrato, R. V., & Spinosa, W. A. (2023). Role of acetic acid bacteria in food and beverages. Food Technology and Biotechnology, 61, 85–103.

Hayek, S.A., Gyawali, R., Aljaloud, S.O., Krastanov, A. & Ibrahim, S.A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. Journal of Dairy Research, 86, 490–502.

Hayek, S.A. & Ibrahim, S.A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. Food and Nutrition Sciences, 4, 73–87

Hayes, M., & García-Vaquero, M. (2016). Bioactive compounds from fermented food products. Food Engineering Series, 293–310.

Henzler, H.J. and Kauling, J. (1985). Scale-up of mass transfer in highly viscous liquids in Fifth European Conference on Mixing, Wurzburg, Germany, Cranfeld, BHRA, pp. 303–312.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014;11:506–14.

Hu, J.; Meng, W.; Su, Y.; Qian, C.; Fu, W. (2023). Emerging Technologies for Advancing Microalgal Photosynthesis and Metabolism toward Sustainable Production. Front. Mar. Sci. 2023, 10, 1260709.

Hwanhlem, N.; Watthanasakphuban, N.; Riebroy, S.; Benjakul, S.; H-Kittikun, A.; Maneerat, S. (2010). Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2010, 45(3):594–601

Ijaola, A. O., Akamo, D. O., George, T. T., Sengul, A., Adediji, M. Y., and Asmatulu, E. (2024). "Algae as a potential source of protein: A review on cultivation, harvesting, extraction, and applications." Algal Research, Vol. 77, pp. 1-18.

İşleten-Hosoglu, M., Karagul-Yuceer, Y., & Guneser, O. (2020). Aroma characterization of heterotrophic microalgae Crypthecodinium cohnii using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry during different growth phases. Algal Research, 49, Article 101928.

Jain, S.; Anal, A.K.; (2017). Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 2017, 54, 1062–1072.

Jalali, P., Almasi, P., Faramarzi, M., Hamishehkar, H., & Kouhsoltani, M. (2025). Effect of *spirulina platensis* algae purified bioactive peptides on wound healing after periodontal flap surgery: a randomized clinical trial. Scientific Reports, *15*(1), 1-10.

Jiménez-Munoz, Luis Miguel, Guilherme M. Tavares, and Milena Corredig. (2021). "Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality." (2021) Vol.3, July 2021, Pages 139-150.

Kantarci N, Fahir B, et.al. (2008). Department of Chemical Engineering, Bogazic¸ University, 34342, Bebek-Istanbul, Turkey.

Kariyawasam, K.M.G.M.M.; Lee, N.K.; Paik, H.D. (2021). Synbiotic yoghurt supplemented with novel probiotic *Lactobacillus brevis* KU200019 and fructooligosaccharides. Food Biosci. 2021, 39, 100835.

Kavak, A.E.; Zent, İ.; Sağır, E.M.; Oncü, G; Simsek, F.İ. (2024). Characterization of nuvita biosearch center (NBC) isolated lactic acid bacteria strains from

human origin and determination of growth kinetic profiles of selected cultures under bioreactor. Ann. Microbiol. 2024, 74, 26

Kayacan Çakmakoğlu, S.; Dere, S.; Bekiroğlu, H.; Bozkurt, F.; Karasu, S.; Dertli, E.; Türker, M. (2024). Production of bioactive peptides during yogurt fermentation, their extraction and functional characterization. Food Biosci. 2024, vol.61.

Kawase, Y. & Kumagai, T. (1991). Apparent viscosity for non-Newtonian fermentation media in bioreactors, Bioprocess Eng. Edition 7, pp 25–28.

Kazi, F.K., Fortman, J., Anex, R., Kothandaraman, G., Hsu, D., Aden, A., Dutta. A. (2010). Techno-Economic Analysis of Biochemical Scenarios for Production of Cellulosic Ethanol.

Kevin A. Martínez Andrade, Chiara Lauritano, Giovanna Romano, Adrianna Ianora. (2018). Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. Department of Integrative Marine Ecology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, 80121.

Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. Microbial Cell Factories, 17: 36.

Khozin-Goldberg, I.; Iskandarov, U.; Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from Photosynthetic Microalgae: Occurrence, Biosynthesis, and Prospects in Biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011, 91, 905–915.

Kong, B., Shanks, J.V., Vigil, R.D. (2013). Enhanced algal growth rate in a Taylor vortex reactor. Biotechnol. Bioeng. 110, 2140–2149.

Kong, B., Vigil, R.D. (2014). Simulation of photosynthetically active radiation distribution in algal photobioreactors using a multidimensional spectral radiation model. Bioresour. Technol. 158, 141–148.

Jamnik, P.; Mahnic, N.; Mrak, A., Pogacnik, L.; Jersek, B.; Niccolai, A.; Rutar, J.M.; Ogrinc, N.; Dusak, L.; Ferjancic, B.; Korosec, M.; Cerar, A.; Lazar, B.; Lovse, U.; Pungert, T.; Fabjan, P.; Ulrih, N.P. (2022). Fermented Biomass of *Arthrospira platensis* as a Potential Food Ingredient. Antioxidants. 2022, 11.

Jamshed, A.; Cooke, M.; Ren, Z.; Rodgers, T.L. (2018). Gas–liquid mixing in dual agitated vessels in the heterogeneous regime. Chem. Eng. Res. Des. 2018, 133, 55–69.

Labík, L.; Moucha, T.; Petrícek, R.; Rejil, J.F.; Valenz, L.; Haidl, J. (2017). Volumetric mass transfer coefficient in viscous liquid in mechanically agitated fermenters: Measurement and correlation. Chem. Eng. Sci. 2017, 170, 451–463.

Lafarga T, Fernández-Sevilla JM, González-López C, Acién-Fernández FG. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. Food Res Int. 2020 Nov;137:109356.

Lafarga, T. (2019). Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. Algal Res, 41, 101566.

Lahrichi S.L.; Affolter M.; Zolezzi I.S.; Panchaud, A. (2013). Food peptidomics: Large scale analysis of small bioactive peptides – A pilot study. J. Proteom. 2013, 88: 83-91.

Lamuela-Raventós, R.M. (2018). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In Measurement of Antioxidant Activity & Capacity; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2018; pp. 107–115.

Lazzi, C., Turroni, S., Mancini, A., Sgarbi, E., Neviani, E., Brigidi, P., & Gatti, M. (2014). Transcriptomic clues to understand the growth of Lactobacillus rhamnosus in cheese. BMC microbiology, 14, 1-14.

LeBlanc, J. G., Matar, C., Vald´ez, J. C., LeBlanc, J., & Perdigon, G. (2002). Immunomodulating Effects of Peptidic Fractions Issued from Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. J Dairy Sci. 85(11), 2733–2742.

Lee, B.W.; Dudukovic, M.P. (2014). Determination of flow regime and gas holdup in gas–liquid stirred tanks. Chem. Eng. Sci. 2014, 109, 264–275.

Liu G, Chu M, Nie S, Xu X, Ren J. (2022). Effects of *Ilisha elongata* protein, soy protein and whey protein on growth characteristics and adhesion of probiotics. Curr Res Food Sci. 2022 Nov 4;5:2125-2134.

Liu, L.; Wang, J.; Rosenberg, D.; Zhao, H.; Lengyel, G.; Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. J. Archaeol. Sci. 2018, 21, 783–793.

Liu, J.G.; Hou, C.W.; Lee, S.Y.; Chuang, Y.; Lin, C.C. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of Spirulina (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. Process Biochem. 2011, 46, 1405–1410.

Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. International Journal of Food Microbiology, 83(2), 115–131.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265–275.

Lu, J., Ren, D. F., Xue, Y. L., Sawano, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *spirulina platensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(12), 7166–7171.

Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(3), 724–732.

Martelli, F.; Cirlini, M.; Lazzi, C.; Neviani, E.; Bernini, V. (2020). Edible Seaweeds and Spirulina Extracts for Food Application: In Vitro and In Situ Evaluation of Antimicrobial Activity towards Foodborne Pathogenic Bacteria. Foods 2020, 9, 1442.

Martín R, Langella P. (2019). Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. Front Microbiol. 2019 May 21;10:1047.

Martin M, Montes FJ, Galan MA (2008). On the contribution of the scales of mixing to the oxygen transfer in stirred tanks, Chem Eng J., pp 145(2) 232–241.

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renewable Sustainable Energy Rev., 14 (1), 217-232.

Marsh, J. B.; Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. J. Lipid Res. 1966, 7, 574–576.

Mechmeche M, Kachouri F, Yaghlane HB, Ksontini H, Setti K, Hamdi M. (2017). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth parameters of *Lactobacillus plantarum* in protein-rich isolates from tomato seed. Food Sci Technol Int 23(2):128–141.

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. Nutrients, 11 (1189), 1–24.

Millati, R., Wikandari, R., Ariyanto, T., Hasniah, N., Taherzadeh, M.J. (2023). Anaerobic digestion biorefinery for circular bioeconomy development. Bioresour. Technol. Rep.

Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 10, 31–41.

Murali RD, Vishnu Priya S, Swetha, Antony U. (2024). Traditionally fermented foods and beverages for nutritional security and global acceptance In: Food production, diversity, and safety under climate change. Berlin: Springer (2024). 77–87.

Moayedi, A.; Mora, L, Aristoy, M.; Hashemi, M.; Safari, M.; Toldr´a, F. (2016). ACE- Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fragments Obtained from Tomato Processing By-Products Fermented Using Bacillus subtilis: Effect of Amino Acid Composition and Peptides Molecular Mass Distribution. Appl. Biochem. Biotechnol. 2016, 181, 48–64.

Neubauer, P., and Junne, S. (2010). Scale-down simulatorsfor metabolic analysis of large-scale bioprocesses. Curr Opin Biotechnol. 21: 114–121.

Niangoran, N.G.U.F.; Buso, D.; Zissis, G.; Prudhomme, T. (2021). Influence of light intensity and photoperiod on energy efficiency of biomass and pigment production of Spirulina (*Arthrospira platensis*). OCL. 2021, 28, 37.

Niccolai, A., Bazec, K., Rodolfi, L., Biondi, N., & Zlatic, E., Jamnik, P., & Tredici, M.R. (2020). Lactic Acid Fermentation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) in a Vegetal Soybean Drink for Developing New Functional Lactose-Free Beverages. Frontiers in Microbiology, 11, 560–684.

Niccolai, A.; Shannon, E.; Abu-ghannam, N.; Biondi, N.; Rodolfi, L. (2019). Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) biomass for probiotic-based products. J. Appl. Phycol. 2019, 31, 1077–1083.

O'Connor, J., Garcia-vaquero, M., Meaney, S., and Tiwari, B. K. (2022). "Bioactive Peptides from Algae: Traditional and Novel Generation Strategies, Structure-Function Relationships, and Bioinformatics as Predictive Tools for Bioactivity." Marine Drugs, Vol. 20, No. 5, pp. 1–16.

Osadolor, O.A.; Jabbari, M.; Nair, R.B.; Lennartsson, P.R.; Taherzadeh, M.J. (2018). Effect of media rheology and bioreactor hydrodynamics on filamentous fungi fermentation of lignocellulosic and starch-based substrates under pseudoplastic flow conditions. Bioresour. Technol. 2018, 263, 250–257.

Ovando, C.A.; de Carvalho, J.C.; Vinícius de Melo Pereira, G.; Jacques, P.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. (2018). Functional Properties and Health Benefits of Bioactive Peptides Derived from Spirulina: A Review. Food Rev. Int. 2018, 34, 34–51.

Özturk, N.; Yay, C.; Cinar, Z. O.; Atalay, H. N.; Guneser, O.; Hosoglu, M. I.; Tumer, T. B. (2025). Optimizations related to the use of *Lactobacillus helveticus*, *Kluyveromyces marxianus* in monoculture, and co-culture for production of *Spirulina*-based fermented products. Algal Res. 2025, vol.86.

Özdemir, A. (2020). D-optimal experimental design for production models in nonstandard experiments. Qual. Reliab. Eng. Int. 2020, 36(5), 1537-1552.

Pachla, A., Wicha, M., Ptaszyn´ ska, A.A., Borsuk, G., Trokenheim, Ł.Ł., Małek, W. (2018). The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of Apis mellifera L. derived from a Polish apiary. J. Appl. Genet. 59, 503–514.

Papizadeh M, Rohani M, Hosseini SN, Shojaosadati SA, Nahreva nian H, Talebi M, Pourshafie MR. (2020). Screening for effi cient nitrogen sources for overproduction of the biomass of the functionally probiotic *L. plantarum* strain RPR42 in a cane molasses-based medium. AMB Express 10(1):1–14.

Patras, D., Moraru, C. V., and Socacıu, C. (2019). "Bioactive Ingredients from Microalgae: Food and Feed Applications. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj- Napoca." Food Science and Technology, Vol. 76, No. 1, pp. 1-9.

Patrizia Calella, Mirella Di Dio, Giuseppe Cerullo at all. (2022). Antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory effects of Spirulina in disease conditions: a systematic review. Int J Food Sci Nutr. 2022 Dec;73(8):1047-1056.

Pfeiler E.A.; Klaenhammer T.R. (2007). The genomics of lacticacid bacteria. Trends Microbiol. 2007, 15:546–53.

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. Adv Nutr. 2019 Jan 1;10(suppl_1):S49-S66.

Pierre, G.; Delattre, C.; Dubessay, P.; Jubeau, S.; Vialleix, C.; Cadoret, J.P.; Probert, I.; Michaud, P. (2019). What Is in Store for EPS Microalgae in the Next Decade? Molecules, 2019, 24, 4296.

Poimenidou, S.V.; Skarveli, A.; Saxami, G.; Mitsou, E.K.; Kotsou, M.; Kyriacou, A. (2023). Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth, Adherence and Invasion in Caco-2 Cells by Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Healthy Neonates. Microorganisms. 2023**,** Jan 31;11(2):363.

Rader RA, Langer ES. (2015). Biopharmaceutical manufacturing: historical and future trends in titers, yields and efciency in commercial-scale bioprocessing. Bioprocess J. 2015;13:47–52.

Rashid N., Ur Rehman M.S., Sadiq M., Mahmood T., Han J.-I. (2014). Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production, Renewable Sustainable Energy Rev., 40, 760-778.

Rawat, J.M.; Bhandari, A.; Raturi, M.; Rawat, B. (2019). Agrobacterium rhizogenes Mediated Hairy Root Cultures: A Promising Approach for Production of Useful Metabolites. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 103–118

Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, Appl. Energy, 103, 444-467.

Razzak, S.A.; Bahar, K.; Islam, K.O.; Haniffa, A.K.; Faruque, M.O.; Hossain, S.Z.; Hossain, M.M. (2024). Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future. Green Chem. Eng. 2024, 5, 418–439.

Rezvani F, Ardestani F, Najafpour G. (2017). Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. Braz J Microbiol. 2017 Apr-Jun;48(2):251-258.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., et al. (2016). Cell Viability Assays. In S. Markossian et al. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rizzello, C. G., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., and Gobbetti, M. (2017). Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 241, 252–261.

Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology; Blackwell Science: Oxford, UK; Ames, IA, USA, 2004.

Richmond A. (1992). Micro-algal Biotechnology, Spirulina, Cambridge University Press, Cambridge.

Rizwan, M.; Mujtaba, G.; Memon, S.A.; Lee, K.; Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 2018, 92, 394–404.

Rockström, J.; Edenhofer, O.; Gaertner, J.; DeClerck, F. (2020). Planet-Proofing the Global Food System. Nat. Food 2020, 1, 3–5.

Romano, G.; Costantini, M.; Sansone, C.; Lauritano, C.; Ruocco, N.; Ianora, A. (2017). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. Mar. Environ. Res. 128, 58–69.

Romero-Garay MG, Montalvo-González E, Hernández-González C, Soto-Domínguez A, Becerra-Verdín EM, De Lourdes García-Magaña M. (2021). Bioactivity of peptides obtained from poultry by-products: A review. Food Chem X. 2021 Dec 9;13:100181.

Rosa, L. S.; Santos, M. L.; Abreu, J. P.; Balthazar, C. F.; Rocha, R. S.; Silva, H. L.; Esmerino, E. A.; Duarte, M. C. K. H.; Pimentel, T. C.; Freitas, M. Q.; Silva, M. C.; Cruz, A. G., & Teodoro, A. J. (2020). Antiproliferative and apoptotic effects of probiotic whey dairy beverages in human prostate cell lines. Food Res. Int. 2020, 137, Article 109450.

Salas-Millan, J.-A.; Aznar, A.; Conesa, E.; Conesa-Bueno, A.; Aguayo, E. (2022). Functional food obtained from fermentation of broccoli by-products (stalk): Metagenomics profile and glucosinolte and phenolic compounds characterization by LC-ESI-QqQ-MS/MS. LWT, 2022, 169, 113915

Sarker, A.; Ahmmed, R.; Ahsan, S.M.; Rana, J.; Ghosh, M.K.; Nandi, R. A. (2024). comprehensive review of food waste valorization for the sustainable management of global food waste. Sustain. Food Technol. 2024, 2, 48–69.

Sankaran, R., Show, P.L., Cheng, Y.S., Tao, Y., Ao, X., Nguyen T.D.P., Quyen, D.V. (2018). "Integration process for protein extraction from microalgae using liquid biphasic electric flotation (LBEF) system". Molecular Biotechnology, 60: 749-776.

Scarborough, M.J., Hamilton, J.J., Erb, E.A., Donohue, T.J., Noguera, D.R. (2020). Diagnosing and predicting mixed-culture fermentations with unicellular and guildbased metabolic models. MSystems 5 (5).

Sharma K.R. (2012). Design and operational key factors of bioreactor, Biotech Articles.

Shen, J., S. Zhu, X. Liu, H. Zhang, and J. Tan. (2010). "The prediction of elemental composition of biomass based on proximate analysis," Energy Convers. Manag., vol. 51, no. 5, pp. 983–987, May 2010.

Shirkhan, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Akbari-Adergani, B., & Nasoohi, N. (2023). The role of lactic acid bacteria in production of bioactive peptides in fermented milk with antioxidant and antidiabetic properties. Journal of Food Measurement and Characterization, 17, 4727–4738.

Shuler, M. L. and F. Kargi, Bioprocess Engineering. (1982). Rehm, H. J and Reed, G. 1982, Biotechnology – A Comprehensive Treatise.

Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D. (2011). Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels, Bioresour. Technol., 102 (1), 26- 34.

Siddhnath, Surasani, V. K. R., Singh, A., Singh, S. M., Hauzoukim, Murthy, L. N., and Baraiya, K. G. (2024). "Bioactive compounds from micro - algae and its application in foods : a review." Discover Food, Vol. 4, No. 27, pp. 1-20.

Soice, E. and Johnston, J. (2021). How cellular agriculture systems can promote food security. Frontiers in Sustainable Food Systems, 5.

Soni, R. A., Sudhakar, K., and Rana, R. S. (2017). "*Spirulina* – From growth to nutritional product: A review." Trends in Food Science and Technology, Vol. 69, pp. 157–171.

Souza L.V., Martins E., Moreira I.M.F.B., de Carvalho A.F. (2022). Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. Int J Microbiol. 2022 Dec 14;2022:6264170.

Srinivash, M.; Krishnamoorthi, R.; Mahalingam, P.U.; Malaikozhundan, B.; Keerthivasan, M. (2023). Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. J. Agric. Food Res. 2023, 11100517.

Sulzbacher, Katrin, Balling, Peter, Schembecker, Gerhard. (2013). INOSIM Bio-new approaches for bioprocess simulation and optimization. Comput. Aided Chem. Eng 32. Elsevier, pp. 865–870.

Sun, Y., Chang, R., Li, Q., Li, B. (2015). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. Eur Food Res Technol. 1-8.

Syarina, P. N., Karthivashan, G., Abas, F., Arulselvan, P., Fakurazi, S. (2015). Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. EXCLI Journal, *2;14*:385-93.

Şahin, B.; Hosoglu, M. I.; Guneser, O.; & Karagul-Yuceer, Y. (2022). Fermented *Spirulina* products with Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts: Special reference to their microbial, physico-chemical and sensory characterizations. Food Biosci. 2022, 47, Article 101691.

Tamang J.P., Shin D.H., Jung S.J., Chae S.W. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. Front Microbiol. 2016 Apr 26;7:578.

Tolpeznikaite, E.; Bartkevics, V.; Skrastina, A.; Pavlenko, R.; Ruzauskas, M.; Starkute, V.; Zokaityte, E.; Klupsaite, D.; Ruibys, R.; Rocha, J.M.; Bartkiene, E. (2023). Submerged and Solid-State Fermentation of *Spirulina* with Lactic Acid Bacteria Strains: Antimicrobial Properties and the Formation of Bioactive Compounds of Protein Origin. Biology (Basel). 2023, Feb 3;12(2):248.

Tsega, K.T.; Maina, K.J.; Tesema, N.B. (2023). Characterization of potential probiotics Lac tobacillus species isolated from the gastrointestinal tract of Rhode Island Red (RIR) chicken in Ethiopia. Heliyon. 2023, 9, e17453.

Türker, M. (2005). Biyoreaksiyon Mühendisliği. Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellenmesi. Kitap, Su Vakfı Yayınları.

Veera U. P, Joshi J.B. (1999). Measurement of gas holdup profile by gamma ray tomography, Effect of sparger design and height of dispersion in bubble column, Transaction of Institution of Chemical Engineering.

Waites M. J., Morgan N. L., and Rockey J. S. (2001). "Industrial Microbiology: An Introduction", First Edition, Blackwell Scientific Publications.

Wang, X.; Ma, S.; Kong, F. (2024). Microalgae Biotechnology: Methods and Applications. Bioengineering 2024, 11, 965.

Wang, X.; Li, W.; Mahsa, G.C.; Zhang, C.; Ma, K.; Rui, X.; Li, W. (2023). Co-cultivation effects of *Lactobacillus helveticus* SNA12 and *Kluveromyces marxiensis* GY1 on the probiotic properties, flavor, and digestion in fermented milk. Food Res. Int. 2023, 169.

Wang, Y. & Serventi, L. (2019). Sustainability of dairy and soy processing: A review on wastewater recycling. Journal of Cleaner Production. Volume 237, 10 November 2019, 117821.

Wang G, Zhang W, Jacklin C, Freedman D, Eppstein L, Kadouri A. (1992). Modified Celli Gen-packed bed bioreactors for hybridoma cell cultures, Cytotechnology (a), 9(1-3):41-9.

Williams J. A., (2002). Keys to bioreactor selections, Environmental &Production Solutions, LLC, cep magazine.

Wu, W. J.; Ahn, B. Y. (2018). Statistical Optimization of Medium Components by Response Surface Methodology to Enhance Menaquinone-7 (Vitamin K-2) Production by *Bacillus subtilis*. J. Microbiol Biotechn. 2018, 28, 902-908.

Wu, C.; Huang, J.; Zhou, R. (2017). Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. Crit. Rev. Microbiol. 2017, Aug;43(4):393-404.

Wu, Q.; Liu, L.; Miron, A.; Klímová, B.; Wan, D.; Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. Arch. Toxicol. 2016, Aug;90(8):1817-40.

Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. Food Science and Human Wellness, 8(3), 203–243.

Xiao, H., Molina, G. E. S., Tovar, M., Quoc, H. M., Hansen, E. B., & Bang-Berthelsen, C. H. (2024). Isolation and characterisation of plant-based lactic acid bacteria from spontaneously fermented foods using a new modified medium. LWT, 192, Article 115695.

Xu, Z., Li, S., Gong, G., Liu, Z., Wu, Z., and Ma, C. (2015). Influence of different acidifying strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus on the quality of yoghurt. Food Sci. Technol. Res. 21, 263–269. doi: 10.3136/ fstr.21.263.

Varshney, P.; Mikulic, P.; Vonshak, A.; Beardall, J.; Wangikar, P.P. (2015). Extremophilic Micro-Algae and Their Potential Contribution in Biotechnology. Bioresour. Technol. 2015, 184, 363–372.

Verni, M.; Dingeo, C.; Rizzello, C.G.; Pontonio, E. (2021). Lactic acid bacteria fermentation and endopeptidase treatment improve the functional and nutritional features of *Arthrospira platensis*. Front. Microbiol. 2021, 12, 1–14.

Yang, X.; Peng, Z.; He, M.; Li, Z.; Fu, G.; Li, S.; Zhang, J. (2024). Screening, probiotic properties, and inhibition mechanism of a *Lactobacillus* antagonistic to *Listeria monocytogenes*. Sci. Total Environ. 2024, Jan 1;906:167587.

Yang, D., Park, S. Y., Park, Y. S., Eun, H. & Lee, S. Y. (2020). Metabolic engineering of Escherichia coli for natural product biosynthesis. Trends Biotechnol. 38, 745–765.

Yay, C.; Cinar, Z.O.; Donmez, S.; Tumer, T.B.; Guneser, O.; Hosoglu, M.I. (2024). Optimizing bioreactor conditions for *Spirulina* fermentation by *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces marxianus*: Impact on chemical & bioactive properties. Bioresour. Technol. 2024, 403, 130832.

Zhang, Y.-H. P., Sun, J. and Ma, Y. (2017). Biomanufacturing: history and perspective. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 44(4–5): 773–784.

Zhang T, Li L, Wang XF, Zeng ZH, Hu YG, Cui ZJ. (2009). Effects of Lactobacillus buchneri and Lactobacillus plantarum on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25:965–971.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E. et al. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70, 2782–2858.

Zhu, L. (2015). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, Renew Sust Energ., 41, 1376-1384, 2015.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Kavak, A. E., Balkanlı, D., Sağdıç, O. (2024). Determination of Antioksidan Properties Functional Products Obtained From The Fermentation of Lactic Acid Bacteria and *Spirulina Platensis*. Istanbul International Modern Scientific Research Congress. VI 5-7 July /2024 İstanbul, Türkiye.

2. Kavak, A. E., Balkanlı, D., Sağdıç, O. (2024). Antimicrobial Effects of Products Obtained by Fermentation of Spirulina and Different Lactic Acid Bacteria Species**.** 6. International Mediterranean Scientific Research Congress. 13-15 August 2024, Rome, Italy.

3. Kavak, A. E., Balkanlı, D., Sağdıç, O., Özdemir, A., Dertli, E. (2024). Optimization of bioprocess conditions for Spirulina fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* and determination of antimicrobial properties of obtained bioactive compounds. V. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2024 27–29 August 2024 İzmir, Türkiye.

4. Kavak, A. E., Balkanlı, D., Sağdıç, O. (2024). Fermented Spirulina products with *Lactiplantibacillus plantarum*: Evaluation of antioxidant activity of peptides obtained by ultrafiltration. V. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2024 27–29 August 2024 İzmir, Türkiye.

Makaleler

1. Kavak, A. E., Balkanlı, D., Sagdıc, O., Özdemir, A., Dertli, E. (2025). Optimized Spirulina Fermentation with *Lacticaseibacillus rhamnosus*: Bioactive Properties and Pilot-Scale Validation. Fermentation 2025, 11, 248. https://doi.org/10.3390/fermentation11050248