



**LAKTİK ASİT BAKTERİ KÜLTÜRLERİNDEN
TEK HÜCRE PROTEİN KONSANTRATLARININ
ÜRETİMİ VE TEKNOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

SEVİM ZEYNEP YÜRÜDÜR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI
Ocak-2021
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LAKTİK ASİT BAKTERİ KÜLTÜRLERİNDEN TEK HÜCRE
PROTEİN KONSANTRATLARININ ÜRETİMİ VE TEKNOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

SEVİM ZEYNEP YÜRÜDÜR

TOKAT
Ocak-2021

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından
2019/97 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, bu tezin herhangi bir kısmının başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Sevim Zeynep Yürüdür

18 Ocak 2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LAKTİK ASİT BAKTERİ KÜLTÜRLERİNDEN TEK HÜCRE PROTEİN KONSANTRATLARININ ÜRETİMİ VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

SEVİM ZEYNEP YÜRÜDÜR

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET TOKATLI

Bu tez çalışmasında, *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları kullanılarak tek hücre protein (THP) üretimi için uygun fermentasyon koşulları belirlenmiş ve üretilen tek hücrelerden proteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilerek elde edilen protein konsantratlarının kimyasal ve teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Buna göre farklı besiyeri (MR, SS, MS, SM), pH değeri (pH 6.0, 6.5, 7.0), sıcaklık (25, 30, 35°C) ve çalkalama hızlarında (50, 200 rpm) gerçekleştirilen fermentasyonlarda en yüksek biyokütle üretimi *Lb. plantarum* MF4 suşu ile MS besiyerinde 2.57 g/L (35°C, pH 7.0, 12. saat) ve *Lb. brevis* MF343 suşu ile 2.27 g/L (35°C, pH 6.5, 24. saat) olarak elde edilmiştir. Çalkalamalı fermentasyon koşullarında biyokütle üretiminde herhangi bir artış sağlanamamıştır. Fermentasyonlarda elde edilen spesifik gelişme hızı ve hacimsel verimlilik değerleri ise *Lb. plantarum* MF4 için 0.405 h⁻¹, 0.212 g/L.h; *Lb. brevis* MF343 için 0.384 h⁻¹, 0.094 g/L.h olarak hesaplanmıştır.

Optimum THP üretim koşullarında gerçekleştirilen fermentasyon ile üretilen LAB hücreleri ve ticari maya hücreleri etkili bir ekstraksiyon için sonikasyon, enzimler ve homojenizatör yardımı ile parçalandıktan sonra proteinlerin ekstraksiyonuna pH, seyreltme oranları ve NaCl gibi etmenlerin etkisi belirlenmiştir. Ekstraksiyonlarda MF4, MF343 ve Maya hücre homojenizatlarında en yüksek ekstraksiyon verimleri pH 12'de 2.25 seyreltme oranlarında sırası ile %69.84, %85.14, %55.42 olarak gerçekleşmiştir. Saflaştırma aşamasında hücre ekstraksiyon sıvılarından proteinlerin geri kazanımı için alkol ve izoelektrik çöktürme teknikleri kullanılmıştır. Alkol ile gerçekleştirilen çöktürme işlemlerinde %80 alkol konsantrasyonunda MF4 ekstraktlarında %79.73, MF343 ekstraktlarında %77.81 ve Maya ekstraktlarında ise %86.75 protein geri kazanım oranları

elde edilmiştir. İzoelektrik çöktürme ile gerçekleştirilen saflaştırmalarda ise MF4 ekstraktında pH 3.5 (%86.64), MF343’de pH 2.5 (%94.77) ve Maya için pH 3.0 (%88.77) değerinde en yüksek protein geri kazanım oranları hesaplanmıştır.

Uygun koşullarda izoelektrik çöktürme ile üretilen THP konsantratlarının kurumadadaki protein içerikleri MF4 örneğinde %72.47, MF343’de %73.09 ve Maya örneğinde ise %62.79 olarak bulunmuştur. THP konsantratlarının aspartik, glutamik ve lizin aminoasit içeriklerinin diğer aminoasitlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Üretilen THP konsantratlarının bazı teknolojik özellikleri de incelenmiş olup MF4 ve MF343 örneklerinde protein çözünürlük oranları %79 ve %98, yağ absorpsiyon kapasiteleri %16, %17, köpük kapasiteleri %220 ve %260, emülsiyon aktivite indeksleri (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksleri (ESI) ise 122.65 m²/g - 18.61 dk. ve 104.66 m²/g - 35.12 dk. olarak bulunmuştur. Laktik asit bakteri suşlarından THP üretim fermentasyon koşulları optimize edilerek üretimleri gerçekleştirilen protein konsantratlarının kimyasal ve teknolojik özellikleri belirlenerek gıda sanayii için kullanılabilirlikleri ortaya konmuştur.

2021, 116 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lb. plantarum* MF4, *Lb. brevis* MF343, Tek Hücre Proteini, Saflaştırma, Teknolojik Özellikler

ABSTRACT

THE MASTER'S DEGREE THESIS

PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN CONCENTRATES FROM LACTIC ACID BACTERIA CULTURES AND DETERMINATION OF TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS

SEVİM ZEYNEP YÜRÜDÜR

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY POSTGRADUATE EDUCATION
INSTITUTE**

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. MEHMET TOKATLI

In this study, suitable fermentation conditions for single cell protein (SCP) production were determined using *Lb. plantarum* MF4 and *Lb. brevis* MF343 strains, and the chemical and technological properties of protein concentrates obtained by extracting and purifying proteins from single cells were determined. Accordingly, the highest biomass production in fermentations performed at different media (MR, SS, MS, SM), pH value (pH 6.0, 6.5, 7.0), temperature (25, 30, 35°C) and agitation speeds (50, 200 rpm) is obtained in MS medium, as 2.57 g / L (35°C, pH 7.0, 12. hour) by *Lb. plantarum* MF4 strain and 2.27g / L (35°C, pH 6.5, 24. hour) by *Lb. brevis* MF343 strain. There was no increase in biomass production under shaking fermentation conditions. Specific growth rate and volumetric productivity values obtained in fermentations were calculated as 0.405 h⁻¹, 0.212 g / L.h for *Lb. plantarum* MF4 and 0.384 h⁻¹, 0.094 g / L.h. for *Lb. brevis* MF343.

After LAB cells and commercial yeast cells produced by fermentation performed under optimum THP production conditions were disrupted with the help of sonication, enzymes and homogenizer for an efficient extraction; the effects of factors such as pH, dilution rates and NaCl on the extraction of proteins were determined. In extractions, the highest extraction yields of MF4, MF343 and yeast cell homogenates were 69.84%, 85.14%55.42, respectively, at dilution rates of 2.25 at pH 12. In the purification stage, alcohol and isoelectric precipitation techniques were used to recover proteins from cell extraction fluids. In the precipitation processes performed with alcohol, at 80 % alcohol concentration, protein recovery rates were obtained as 79.73%for MF4 extracts, 77.81%for MF343 extracts and 86.75%for yeast extracts. In the purifications performed by isoelectric precipitation, the highest protein recovery rates were calculated at pH 3.5 (86.64%) for MF4 extract, pH 2.5 (94.77%) for MF343 and pH 3.0 (88.77%) for yeast.

The protein contents in dry matter of THP concentrates produced by isoelectric precipitation under suitable conditions were calculated as 72.47%in MF4 sample, 73.09%in MF343 sample and 62.79%in yeast sample. It has been determined that the aspartic, glutamic and lysine amino acid contents of THP concentrates are higher than other amino acids. Some technological properties of THP concentrates produced were also investigated and the protein solubility rates of samples were calculated as 79%for MF4, 98%for MF343; oil absorption capacities were calculated as 16%for MF4, 17%for MF343; foam capacities were calculated as 220%for MF4, 260%MF343; emulsion activity indices and emulsion stability indices were calculated as 122.65 m² / g - 18.61 min for MF4 and 104.66 m² / g - 35.12 min for MF343. By determining the chemical and technological properties of the protein concentrates produced by optimizing the fermentation conditions for THP production from lactic acid bacteria; their usability for the food industry has been revealed.

2021, 116 pages

Keywords: *Lb. plantarum* MF4, *Lb. brevis* MF343, Single Cell Protein, Purification, Characterization

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım sürecimde bana sabırla yardımcı olan kıymetli danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Mehmet TOKATLI'ya, laboratuvar çalışmalarımda benden yardımını esirgemeyen Arş.Gör. Semra TOPUZ'a, lisansüstü eğitimim süresince kendimi geliştirmemde katkısı olan, önemli bilgi birikimlerini benden esirgemeyen değerli hocalarıma, başta babam Eren YÜRÜDÜR ve annem Şerife Hanım DURAMAZ olmak üzere her zaman yanımda olan, bana daima sevgisini ve güvenini hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevim Zeynep YÜRÜDÜR

18.01.2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tek Hücre Proteini	4
1.2. Laktik Asit Bakterileri	8
1.3. Proteinler	10
2. LİTERATÜR ÖZETİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Laktik asit bakteri hücrelerinin üretimi ve fermantasyonlar.....	20
3.2.2. Tek hücre proteinlerinin (THP) üretimi ve ekstraksiyonu.....	23
3.2.3. Tek hücre proteinlerinin saflaştırılması	26
3.2.4. THP konsantratlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi	27
3.2.5. Kimyasal analizler	30
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	36
4.1. Laktik Asit Bakteri Suşlarının Seçimi ve Uygun Besiyeri Katkılarının Belirlenmesi	36
4.2. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 Suşlarından THP Üretimi İçin Optimum Fermantasyon Koşullarının Belirlenmesi	37
4.2.1. Besiyeri çeşidi, besiyeri başlangıç pH değeri ve inkübasyon sıcaklığının fermantasyon parametrelerine etkisi.....	38
4.2.2. Çalkalamalı inkübasyonun fermantasyon parametrelerine etkisi	59
4.2.3. Fermantasyon kinetiği parametrelerinin THP üretimi için değerlendirilmesi	61
4.3. Tek Hücre Protein (THP) üretimi.....	69
4.4. THP ekstraksiyonuna pH, seyreltme ve tuz oranlarının etkisi	72

4.4.1.	pH.....	72
4.4.2.	Seyreltme oranları.....	75
4.4.3.	Tuz	77
4.5.	THP Safılaştırılma	79
4.5.1.	Alkol ile çöktürme	79
4.5.2.	İzoelektrik çöktürme	81
4.6.	THP Konsantratlarının Kimyasal ve Teknolojik Özellikleri	82
4.6.1.	THP konsantratlarının kimyasal bileşimi	82
4.6.2.	THP konsantratlarının toplam aminoasit dağılımları.....	84
4.6.3.	THP konsantratlarının moleküler büyüklükleri	86
4.6.4.	THP konsantratlarının çözünürlük özellikleri.....	88
4.6.5.	THP konsantratlarının yağ absorpsiyon ve jel oluşturma özellikleri.....	89
4.6.6.	THP konsantratlarının köpük kapasitesi ve stabilitesi.....	91
4.6.7.	THP konsantratlarının emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI)	92
5.	SONUÇ.....	94
6.	KAYNAKLAR.....	97
7.	EKLER	104
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	116

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3. 1. Toplam karbonhidrat analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği	31
Şekil 3.2. Biüret analizlerinde kullanılan standart kurve.....	32
Şekil 3.3. Protein konsantrat üretimi akış şeması	35
Şekil 4.1. <i>Lb. plantarum</i> MF4 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen pH ve toplam asitlik değerleri.	41
Şekil 4.2. <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen pH ve toplam asitlik değerleri.	45
Şekil 4.3. <i>Lb. plantarum</i> MF4 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen biyokütle ve toplam şeker değerleri	53
Şekil 4.4. <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen biyokütle ve toplam şeker değerleri.	56
Şekil 4.5. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu ile MS besiyerinde (35°C, pH 7.0) çalkalamalı inkübatörde 0 rpm, 50 rpm ve 200 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübsyon süresince ölçülen pH, toplam asit, biyokütle ve toplam şeker değerleri.....	61
Şekil 4.6. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için statik fermentasyonlarda 12. saatte elde edilen spesifik gelişme hızı (μ) değerleri.	63
Şekil 4.7. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için statik fermentasyonlarda en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki biyokütle verimi (Y_x/s) değerleri.	65
Şekil 4.8. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için statik fermentasyonlarda en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki hacimsel verimlilik (V_{px}) değerleri.	67
Şekil 4.9. <i>Lb. plantarum</i> MF4 ve <i>Lb. brevis</i> MF343 suşu için çalkalamalı (0-200 rpm) fermentasyonlarda 12. saatte elde edilen spesifik gelişme hızı (μ) ve en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki biyokütle verimi (Y_x/s), hacimsel verimlilik (V_{px}) değerleri.	69
Şekil 4.10. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine pH'nın etkisi.....	74
Şekil 4.11. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine seyreltme oranlarının etkisi.	76
Şekil 4.12. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine tuz (NaCl) oranlarının etkisi.....	78
Şekil 4.13. MF4, MF343 ve Maya ekstraktlarından proteinlerin saflaştırılmasına etil alkol oranlarının etkisi.	80

Şekil 4.14. MF4, MF343 ve Maya ekstraktlarından proteinlerin saflaştırılmasına pH değerinin etkisi.....	82
Şekil 4.15. THP ve Whey Protein konsantrat proteinlerinin moleküler büyüklükleri (SDS-PAGE).....	88
Şekil 4.16. THP ve Whey konsantratlarının pH 7.0 değerindeki çözünürlükleri	89
Şekil 4.17. THP ve Whey konsantratlarının yağ absorpsiyon kapasiteleri	90
Şekil 4.18. THP ve Whey konsantratlarının köpük kapasiteleri.....	92
Şekil 4.19. THP ve Whey konsantratlarının köpük stabiliteleri	92



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Proteinlerin gıda sistemlerinde sahip oldukları fonksiyonel özellikler ve etkileri	2
Çizelge 1.2. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı maya türleri ve substratları....	4
Çizelge 1.3. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı küf türleri ve substratları.....	5
Çizelge 1.4. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı alg türleri ve substratları.....	6
Çizelge 1.5. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı bakteri türleri ve substratları..	7
Çizelge 1.6. Tek hücre proteini kaynaklarının % bileşimleri.....	7
Çizelge 3.1. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılacak kinetik parametreler.	21
Çizelge 3.2. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılan kinetik parametreler....	23
Çizelge 4.1. THP üretimi için kullanılan hücrelerin kimyasal kompozisyonu.....	71
Çizelge 4.2. THP konsantratlarının üretiminde ekstraksiyon için hazırlanan yağsız hücre süspansiyonunun bileşimi.....	72
Çizelge 4.3. THP konsantratlarının kimyasal kompozisyonu	84
Çizelge 4.4. THP ve Whey Protein konsantratlarının amino asit kompozisyonları (%)...	86
Çizelge 4.5. Protein konsantratlarının jel oluşturma özellikleri.....	91
Çizelge 4.6. THP ve Whey konsantratlarının Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) değerleri.....	93

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusu ile birlikte hayvansal ve bitkisel protein kaynaklarının yetersiz kalmasından dolayı, alternatif protein kaynaklarına olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Ardestani ve Alishahi, 2015). Protein mühendisliği kapsamında proteinlerin teknolojik karakterleri genetik rekombinasyonlar, protein modifikasyonları ve yeni kaynakların bulunması yolu ile geliştirilmeye çalışılmaktadır. Hali hazırda mikrobiyal hücrelerin, beslenme amacı ile tek hücre proteinlerinin (THP) üretiminde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar konusunda epey bir yol alınmış durumdadır. Ancak THP'lerden endüstriyel olarak kullanıma uygun saflaştırılmış protein katkılarının üretimi ve teknolojik karakterizasyonu ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma yer almaktadır. Özellikle laktik asit bakteri hücrelerinden bu şekilde saflaştırılmış protein katkılarının üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Proteinler canlıların diyetinde çok önemli bir yere sahip olmakla birlikte fonksiyonel özellikleri bakımından insan gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanımda da büyük rol oynamaktadır. Bu fonksiyonel özellikler arasında çözünürlük, su tutma (hidrasyon), emülsifikasyon, köpük oluşturma, jelasyon bulunur. Dünyada teknolojik ve fonksiyonel öneme sahip protein katkılarının önemi giderek artmakta ve halen kullanılmakta olan mevcut protein kaynakları tüm teknolojik özellikleri karşılayamamaktadır. Yeni protein kaynaklarının araştırıldığı Tek hücre proteinleri (THP) çalışmalarının sayısı gitgide artmakta ve aynı zamanda bu proteinlerin en verimli ve ekonomik üretim yöntemleri de araştırılmaktadır.

THP, çeşitli besiyeri kaynakları kullanılarak üretilmiş maya, küf, algler ve bakteriler gibi mikroorganizmaların hücrelerinden elde edilen proteinlerdir (Najafpour, 2007). THP endüstride hem insanlar için protein kaynağı olarak hem de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Yüksek protein içeriğinin yanı sıra (kuru hücre ağırlığının yaklaşık %60'ı) THP ayrıca yağ, karbonhidrat, nükleik asit, vitamin ve mineraller de içermektedir. THP'nin beslenme açısından önemli bir avantajı ise, çoğu bitki ve hayvansal gıdada sınırlı olan lizin ve metiyonin gibi bazı esansiyel aminoasitler bakımından zengin olmasıdır (Suman ve ark., 2015). Endüstriyel olarak üretilen THP, temel olarak insan ve hayvanların beslenmesinde kullanılmakla birlikte, gıda ürünlerinde katkı maddesi

(emülgatör, kıvam verici, jelleştirici, su bağlayıcı, vitamin ve aroma taşıyıcısı) olarak kullanımının da potansiyel taşıdığı bildirilmektedir (Vahidi ve ark., 2010). Lipinsky ve Litchfield (1974), THP üretimi ve kullanımı üzerinde çalışmış ve protein işlevselliği konusunda araştırma yapılması gerektiğine dikkat çekmiştir. Yaptığımız literatür taraması sonucu özellikle tek hücre proteinlerinin işlevselliğinin değerlendirilmesine ilişkin çok az sayıda çalışma yapıldığı belirlenmiştir.

Çizelge 1.1. Proteinlerin gıda sistemlerinde sahip oldukları fonksiyonel özellikler ve etkileri (Kinsella, 1982)

Fonksiyonellik	Etki	Gıda Sistemi
Çözünürlük	Protein çözünmesi	Meşrubatlar
Su tutma	Sudaki hidrojen bağları, Suyun hapsedilmesi	Et, Sosis, Ekmek, Kek
Viskozite	Kalınlaşma, Su bağlama	Çorbalar, Soslar
Jelasyon	Protein matris oluşumu ve yerleşmesi	Etler, Teleme ve Peynir
Adezyon-Kohezyon	Proteinin yapışkan bir madde olarak davranması	Et, Sosis, Unlu Mamüller, Makarna
Elastisite	Glutende hidrofobik bağlanma, Jellerde disülfid bağları	Et, Unlu Mamüller
Emülsifikasyon	Yağ emülsiyonlarının oluşması ve stabilizasyonu	Sosis, Sucuk, Çorba, Kek, Mayonez
Yağ Absorpsiyonu	Serbest yağların bağlanması	Et, Sosis
Aroma Bağlama	Adsorpsiyon, Hapsetme, Salınım	Emülsifiye et, Unlu mamüller
Köpük Oluşturma	Gazı hapseden stabil film oluşumu	Krema, Tatlılar, Kekler, Dondurma

LAB, Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsünde yer almakta (Stiles, 1996) ve endüstriyel gıda fermantasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Boeck ve ark., 2010). Fermente et, süt, meyve ve tahıl ürünlerinin üretiminde ve olgunlaştırılmasında büyük rolleri vardır ve bu yüzden gıda teknolojisi için önemli bakterilerdir. Laktik asit bakterileri hücresel protein içeriği açısından oldukça zengindir. Buna ek olarak çeşitli laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalarda suda çözünebilen, adezyon arttırıcı, karbonhidrat afiniteli hücre duvarı proteinleri gözlemlenmiştir (Rojas ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasında;

- Kültür koleksiyonunda bulunan laktik asit bakteri suşları içerisinde THP üretimi için uygun olan kültürlerin seçimi gerçekleştirilmiştir.
- Seçilen LAB (*Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343) suşlarından THP üretimi için uygun besiyeri ve katkılar ön denemeler ile belirlenmiştir.
- *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile THP üretiminin optimizasyonu için farklı besiyeri (MR, SS, MS, SM), pH (6.0, 6.5, 7.0), inkübasyon sıcaklığı (25, 30, 35°C) ve karıştırma hızları (50, 200 rpm) deneme planında fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir.
- Fermantasyonlar süresince kültür ortamına ait pH, toplam asitlik, biyokütle ve şeker miktarlarındaki değişimler takip edilerek, fermantasyon kinetik parametreleri olan spesifik gelişme hızları (μ), biyokütle verimi ($Y_{x/s}$), hacimsel verimlilik (V_{px}) değerleri hesap edilmiştir. THP üretim şartlarının optimizasyonu için bu verilerden yararlanılmıştır.
- Optimum THP üretim şartlarında fermantasyon yolu ile *Lb. plantarum* MF4, *Lb. brevis* MF343 ve ticari olarak satın alınan *S. cerevisiae* kültürlerinden elde edilen hücrelerden proteinlerin ekstraksiyon (pH, seyreltme oranı, NaCl) ve saflaştırma koşulları (alkol, izoelektrik çöktürme) belirlenmiştir. Böylelikle uygun THP konsantratlarının üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Üretilen THP konsantratlarının bazı kimyasal ve teknolojik özellikleri belirlenmiştir.

1.1. Tek Hücre Proteini

THP üretiminde kaynak olarak kullanılan mikroorganizmalar genel olarak maya, küf, algler ve bakterilerdir. Maya hücreleri THP olarak uzun süredir kullanılmaktadır ve I. Dünya Savaşı yıllarında Torula mayası (*Candida utilis*) ile ilk THP üretimi başlamıştır. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı maya türleri ve substratları Çizelge 1.2’ de verilmiştir. Günümüzde mayalardan elde edilen THP’nin en yaygın kullanım alanı evcil hayvan yemleridir ve sadece protein kaynağı olarak değil, lezzetlendirici olarak da kullanılmaktadır (Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). Ancak mayaların hücre duvarı zor sindirilen, kalın ve kompleks bir yapıya sahip olduğu için tüketimi insan ve hayvanlar için çok uygun değildir (Rumsey ve ark., 2007). Bakterilere göre daha büyük yapıya sahip olduğu için hasat işlemi daha kolay olmasına karşın daha düşük gelişme hızı ve protein oranına sahiptir (Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). Ayrıca maya hücreleri başta metiyonin olmak üzere kükürt içeren aminoasitler bakımından yetersiz kalmaları sebebiyle tek başlarına protein ihtiyacının karşılanması için kullanımları sınırlıdır (Oliva-Teles ve Gonçalves, 2001).

Çizelge 1.2. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı maya türleri ve substratları (Bhalla ve ark., 2007; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018)

Maya	Substrat
<i>Amoco torula</i>	Etanol
<i>Candida tropicalis</i>	Maltoz, Glikoz
<i>Candida utilis (torula)</i>	Glikoz
<i>Candida novellas</i>	N - Alkanlar
<i>Candida intermedia</i>	Laktoz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maltoz, Pentoz

1973’ten beri çeşitli küflerin farklı substratlardan protein ürettiği rapor edilmektedir. İplikçikli yapıya sahip bu küfler ile glikoz veya nişasta substratları kullanılarak üretilen proteinler mikoprotein olarak adlandırılmaktadır. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı küf türleri ve substratları Çizelge 1.3’ te verilmiştir. Protein üretmek amacıyla şimdiye kadar araştırılan mantar türleri arasında, verimlilik ve gıda güvenliği bakımından en uygun bulunanlar toksik madde içermedikleri için *Aspergillus oryzae* ve *Rhizopus arrhizus* türleridir. Bu küfler üzerinde geliştiği kompleks organik bileşikleri basit formda ürünlere dönüştürmekte ve sonuçta yüksek miktarda küf biyokütlesi

üretilmektedir (Srividya ve ark., 2013; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). THP için geliştirilen küfler genellikle %30-50 protein içermektedir (Anupama ve Ravindra, 2000; Nasser ve ark., 2011). Aminoasit bileşimi, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yönergelerinde belirtilen limitler doğrultusunda yeterli bulunmakla birlikte, treonin ve lizin aminoasitleri bakımından oldukça zengin, metiyonin içeriği ise düşüktür (Anderson ve ark., 1975). Küflerden üretilen THP genellikle, tiamin, riboflavin, biotin, niasin, pantotenik asit, piridoksin, kolin, glutatyon, folik asit vb. vitaminler açısından da iyi bir kaynaktır. Ayrıca hücre duvarları, diyet lifi olarak bilinen glukanlar bakımından zengindir (Ritala ve ark., 2017). Ancak tatsızlık, düşük gelişme hızı ve protein oranı gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Çizelge 1.3. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı küf türleri ve substratları (Bhalla ve ark., 2007; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018)

Fungus	Substrat
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Maltoz, Glikoz
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. Oryzae</i> , <i>Cephalosporium eichhorniae</i> , <i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Selüloz, Hemiselüloz
<i>Penicillium cyclopium</i>	Glikoz, Laktoz, Galaktoz
<i>Rhizopus chinensis</i>	Glikoz, Maltoz
<i>Seytaliidum aciduphlium</i> , <i>Tricoderma</i> <i>viridae</i> , <i>T. alba</i>	Seluloz, Pentoz

Yüzyıllardan beri Orta Asya ile Doğu Asya ülkelerinin algleri diyetlerinin bir parçası olarak tüketmesi nedeniyle, bu türlerin gıda (insan besin takviyeleri) veya yem (hayvan gıda takviyeleri) olarak kullanılması fikri kabul görmektedir (Ali ve ark., 2017). Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı alg türleri ve substratları Çizelge 1.4'te verilmiştir. Büyük ölçekli üretim ve tüketime uygun olan alg türlerinden bazıları *Soenedesmus*, *Chlorella*, *Spirulina* ve *Coelastrum*'dur (Prosser ve Tough, 1991). İnsan ve hayvan tüketimi için üretilen mikroalgler tipik olarak yüksek protein içeriğine sahiptir ve ayrıca yağ, vitamin (A, B, C ve E), mineral tuzlar ve klorofil de içermektedir (Gouveia ve ark., 2008). Genel olarak nükleik asit içerikleri düşüktür (Nasser ve ark., 2011). Alglerden üretilen THP'nin dezavantajları, üretim maliyetinin yüksek olmasına ek olarak insanlarda ve çiftlik hayvanlarında sindirim problemi oluşturmaktadır (Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). Kuru maddesinin %10'u selülozik hücre duvarından oluştuğundan, besin öğelerinden faydalanmak ve sindirimi kolaylaştırmak amacıyla hücre duvarının

parçalanması için ek uygulamalar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Becker, 2007; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018).

Çizelge 1.4. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı alg türleri ve substratları (Bhalla ve ark., 2007; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018)

Algler	Substrat
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>C. Sorokiana</i> , <i>C. Crispus</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Spirulina</i> <i>sp.</i> , <i>Porphyrium sp.</i>	Fotosentezle CO ₂

Bakteriler, yüksek gelişme hızı ve karbonhidrat kaynakları (nişasta, şekerler vb.) dışında çok çeşitli ortamlarda da (metan ve petrol fraksiyonları, petrokimyasallar vb.) üretilbilme imkânı ile özellikle endüstriyel boyuttaki THP üretimlerinde avantajlı konumdadır (Srividya ve ark., 2013). Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı bakteri türleri ve substratları Çizelge 1.5’ te verilmiştir. Ayrıca bakteri kaynaklı THP’nin aminoasit profili maya ve küflere göre daha uygundur. Ancak boyutlarının küçük olması hasat işlemini zorlaştırmakta ve diğer kaynaklara kıyasla daha yüksek oranda sahip olduğu nükleik asit içeriğini düşürme işlemleri de büyük çaplı üretimlerde dezavantaj oluşturmaktadır (Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). İçeriğinde yüksek oranda nükleik asit bulundurması insan beslenmesinde (destekleyici gıda ya da besin değeri arttırıcı gibi) kullanılmasına engel oluşturmaktadır. Bununla birlikte bakteriyel THP’nin gıdalarda katkı maddesi olarak (emülsifikasyon, köpük oluşturma, su tutma vb. amaçlarla) kullanımı üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. THP üretiminde birçok bakteri suşu kullanılmakla birlikte, *Methylophilus methylotrophus* generasyon süresinin iki saat olması nedeniyle THP üretiminde tercih edilmektedir (Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). Bu konuda laktik asit bakterileri (LAB) ile yapılan çalışmalar ise sınırlıdır.

Çizelge 1.5. Tek hücre proteini üretiminde kullanılan bazı bakteri türleri ve substratları (Bhalla ve ark., 2007; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018)

Bakteri	Substrat
<i>Aeromonas hydrophilla</i>	Laktoz
<i>Acromobacter delvacvate</i>	N-Alkanlar
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Etanol
<i>Bacillus megaterium</i>	NPN* maddeler
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Celulomanas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Termomonospora fusca</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Selüloz, Hemiselüloz
<i>Methylomanas methylotropus</i> , , <i>M. clara</i>	Glikoz, Amiloz, Maltoz
<i>Pseudomanas fluorescens</i>	Metanol
<i>Rhodopseudomanas capaulata</i>	Ürik asit ve diğer NPN* maddeler
	Glikoz

*Non-protein nitrogenous

Çizelge 1.6. Tek hücre proteini kaynaklarının % bileşimleri (Miller ve Litsky, 1976; Srividya ve ark., 2013; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018)

Bileşen	Bileşim (%)			
	Algler	Küf	Bakteri	Maya
Gerçek Protein	40-60	30-70	50-83	-
Toplam Nitrojen (Protein + Nükleik Asit)	45-65	35-50	60-80	45-55
Lizin	4.6-7.0	6.5-7.8	4.3-5.8	-
Metiyonin	1.4-2.6	1.5-1.8	2.2-3.0	-
Yağ	5-10	5-13	8-10	2-6
Karbonhidrat	9	-	-	-
Safra Pigmentleri ve Klorofil	6	-	-	-
Nükleik Asitler	4-6	9.70	15-16	6-12
Mineral Asitler	7	6.6	8.6	-
Amino Asitler	-	54	65	-
Kül	3	-	-	5-9.5
Nem	6	4.5-6	2.8	-
Selüloz	3	-	-	-

1.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, hareketsiz, çubuk ya da kok şekillidir (Dursun, 2010). Bazı karbonhidratları fermente ederek laktik asit, etanol, CO₂ ve asetik asit vb. üretebilmektedir. Heterotrof beslenme şekli gösteren bu bakteriler termofil ve mezofil özellik taşımakta ve 10-45°C arası sıcaklıklarda gelişebilmektedir (Kırma, 2016). Ayrıca yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedir ve asit ya da alkaliye karşı toleransları yüksektir (Evren ve ark., 2011). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus* en bilinen LAB cinslerinden bazılarıdır. Bunların arasında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* yaygın olarak süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmakta ve ürünlerde istenen özelliklere göre asitlik gelişimi, aroma oluşturma, gaz oluşturma, probiyotik etki gibi görevlerin birini ya da birkaçını gerçekleştirmektedir.

Lactococcus cinsi genelde yuvarlak şekilli olup, zincir yapısında bulunmaktadır. Homofermentatiftir, karbonhidrat kaynağı olarak laktoz kullanmakta, 10°C-37 °C aralığında gelişme gösterirken, 45°C'de ise gelişim göstermemektedir. Ayrıca gelişim için amino asitlere ihtiyaç duymaktadır. Ekşi krema, bazı peynir türleri ve tereyağ üretiminde kullanılmaktadır. *Streptococcus* cinsi laktik asit bakterileri zincir formunda bulunmaktadır. Kalın bir hücre duvarına sahiptir ve glikoz üstünde aerobik etki sergilememektedir. Bu cinse ait bazı türler zararsız saprofit karakter taşımaktadır ancak bazı türler patojeniktir. Zararsız türlerinden biri olan *Streptococcus thermophilus* starter kültür olarak yoğurt ve peynir üretiminde kullanılmakta ve termofilik karakter taşımaktadır. Bu cinsin şuşları gelişim için serbest amino asitlere ihtiyaç duymaktadır. Optimum gelişim sıcaklığı 40-45°C'dir ve ısıya karşı dirençlidir. *Leuconostoc* cinsi bakteriler genelde mezofilik karakterdedir ve şekil olarak yuvarlak, zincirli yapıda bulunmaktadır. Heterofermentatiftir ve karbonhidrat fermentasyonu sonucu laktat, CO₂ ve etanol üretmektedir. Bu cinsin starter kültür olarak kullanım alanları çeşitli peynirler, kefir, olgun krema vb.'dir. Optimum gelişme sıcaklığı 20-30°C olup, gelişim için çeşitli amino asitlere ve çoğalmak için pantotenik asit, tiyamin, biyotin ve nikotinik asite gereksinim duymaktadır. *Enterococcus* cinsi şekil olarak yuvarlak ya da ovaldır. Bu cins ısıya ve tuza

karşı tolerans göstermektedir, 10-45°C arasında ve %6.5 tuz konsantrasyonunda üreyebilmektedir. *Enterococcus* cinsinin bazı suşları gıda kaynaklı hastalıklarda bulunduğu için güvenli görülmemektedir. Ancak bazı suşları ise starter kültür ve probiyotik olarak kullanılabilir. Ayrıca bu cins gıda güvenliğinde indikatör olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin en geniş grubunu çubuk şekline sahip *Lactobacillus* cinsi oluşturmaktadır. Optimum gelişme sıcaklığı 30-40°C arasında olup, 2-53°C arasında gelişebilmektedir. Bu cinse ait türler karbonhidrat metabolizmalarına göre 3 gruba ayrılmaktadır. Grup I'de yer alan türler homofermentatiftir ve termofilik karakterdedir. Bu türlerden bazıları *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*'dir. Pentozlar ve glukonatı fermente etmemekte ve heksoz şekerlerini parçalayarak sadece laktik asit üretmektedir. Bu gruptaki türlerden bazıları probiyotik ürünlerde, yoğurt ve peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Grup II fakültatif heterofermentatif laktobasillerden oluşmaktadır. Bu laktobasiller heksoz, pentoz ve bazı substratları parçalayabilmekte ve laktik asitin yanında etanol, formik ve asetik asit de üretmektedir. Bazı türleri geleneksel fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. coryneformis* ve *Lb. curvatum* bu gruptadır. Grup III'te bulunan türler obligat heterofermentatiftir ve bu türler şekeri metabolize ederek laktik asit, etanol, CO₂ ve asetik asit üretmektedir. Bu gruptaki bazı türler gıdalarda bozulma etmeni olarak kabul edilmektedir. *Lb. brevis*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. bifementans* ve *Lb. buchneri* bu gruptaki bakterilerden bazılarıdır (Yörük ve Güner, 2011; Özer, 2016).

Bu çalışmada *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* suşları THP üretiminde kaynak olarak kullanılmıştır. Fermente sebze, süt, et ve balık ürünleri gibi birçok ortamdan izole edilebilen *Lb. plantarum* aynı zamanda insan ve hayvan mukozasında da bulunmaktadır. 15°C'de ve %4 NaCl konsantrasyonunda gelişme gösterirken, 45°C'de gelişmemektedir (Lorenzo ve ark., 2018). Çok yönlü bir tür olan *Lb. plantarum* fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak veya ürün raf ömrünü ve duyuşal özelliklerini geliştirmek amacıyla ek kültür olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı suşları probiyotik olarak nitelendirilmektedir.

Lb. brevis birçok farklı ortamdan izole edilebilmekte ve optimum olarak 30°C ve 4-6 pH değerleri arasında gelişmektedir. Fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak

kullanılmakla birlikte bazı durumlarda bozulmaya sebep olduğundan alkollü içeceklerin fermantasyonunda istenmemektedir. Son zamanlarda bu türün bazı suşları probiyotik olarak nitelendirilmektedir (Felis ve Dellaglio, 2007; Salvetti ve ark., 2012; Feyereisen ve ark., 2019).

1.3. Proteinler

Amino asitlerin polimerleri olan proteinler canlılardaki fonksiyonel görevlerine göre katalitik (lipaz, pepsin, amilaz vb.), taşıyıcı (serum albümin, hemoglobin, lipoprotein vb.), besleyici ve depo (ovalbümin, kazein vb.), kontraktil (miyozin, tubulin vb.), yapısal (keratin, resilin, elastin vb.), düzenleyici proteinler (insülin vb.) ve savunma proteinleri (immünoglobülin, trombin vb.) olarak 7 başlıkta incelenmektedir. Bunlara ek olarak henüz fonksiyonları tam olarak belirlenememiş proteinler de bulunmaktadır.

Diyetimizde büyük yer kaplayan proteinler aynı zamanda fonksiyonel ve teknolojik özellikleri ile gıda sektöründe de oldukça önemli bir yere sahiptir. Gıdalarda istenilen kaliteyi elde etmek amacıyla emülsiyon ve köpük oluşturma, jelleşme, stabilizasyon, çözünürlük artırma, su tutma ve viskozite geliştirme gibi özellikleri ile katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Proteinlerin gıda sistemlerine uygulanabilmesi için çözünürlük çok önemli bir özelliktir ve emülsifikasyon, köpük oluşturma, jelasyon gibi diğer fonksiyonel özellikler de çözünürlüğe bağlıdır (Vaclavik ve Christian, 2003). Proteinlerin çözünürlüğü bulundukları ortamın pH değerine göre değişiklik göstermektedir. Her protein için farklı spesifik bir değeri olan izoelektrik noktada (pI) ise protein çözünürlüğü minimum düzeydedir. Ayrıca ısı ve yüksek konsantrasyonlarda tuz oranı da denatürasyona sebep olarak çözünürlüğü düşürebilmektedir. Daha yüksek çözünürlük elde etmek için ise çeşitli enzimler ve düşük tuz konsantrasyonları kullanılmaktadır.

Proteinlerin emülsifikasyon, köpük oluşturma, jelasyon gibi özelliklerini etkileyen bir diğer önemli faktör de hidrasyon kapasitesidir. Hidrasyon belirli miktarda proteinin bağladığı belirli miktardaki su olarak belirtilebilmekte ve aynı zamanda şişme özelliği olarak da bilinmektedir. Su bağlayan protein şişmekte ve böylelikle spesifik bir yapı oluşturarak gıdanın viskozitesini ve yapısını etkilemektedir. Su bağlama kapasitesi sıcaklık, protein miktarı, pH ve zaman gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Proteinler doğal, ucuz ve kolaylıkla elde edilebilir olduğu için gıda endüstrisinde köpük yapıcı ve emülgatör olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Wilde ve ark., 2004). Emülsifikasyon özelliği sayesinde proteinler yağ damlacıkları etrafında bir film oluşturur ve dolayısı ile topaklanma ve sedimentasyon gibi faz ayrımı olaylarını önlerler (Yavuz ve Özçelik, 2016). Proteinlerin emülsifikasyon kabiliyetlerini belirlemek için kullanılan parametrelerden biri, birim proteinde emülsiye olan yağ miktarını ölçen “emülsiyon kapasitesi”dir. Bir diğeri ise “emülsiyon stabilitesi”dir ve belirli bir süre içinde emülsiyon yapısını bozabilecek değişikliklere (emülsiyon damlacıklarının birleşmesi, tabaka oluşumu ve bulanıklık gibi) karşı dayanıklılığı ölçer (Özcan ve Delikanlı, 2011; Yavuz ve Özçelik, 2016). Emülsifikasyon özelliği, proteinin çözünürlük ve hidrofobisite oranı gibi diğer özelliklerinden etkilenmektedir.

Köpükler, hava-su arayüzünde hava kabarcıklarının çevresinde film oluşumu ve proteinlerin yayılması ve absorpsiyonu ile oluşturulur. Farklı proteinler için farklı emülsifikasyon özellikleri olduğu gibi, her protein köpük oluşturma ve stabilizasyon açısından farklı özelliklere sahiptir (Söderberg, 2013). Proteinlerin köpük oluşturma özelliği gıda sektöründe oldukça önemli olup dondurma, kremşanti ve diğer krema ürünleri, kek gibi ürünlerde kullanılmaktadır. Bu özelliği belirlemek için köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi parametreleri kullanılmaktadır. Proteinlerin köpük oluşturma kabiliyeti de çözünürlük derecesinden doğru orantılı olarak etkilenmektedir. Bunun dışında pH değeri, lipit, şeker ve tuz konsantrasyonu vb. faktörlerden de etkilenmektedir.

Gıdaların yapısını ve dokusunu düzenlemekte kullanılan proteinlerin jel oluşturma özelliği en önemli fonksiyonel özelliklerden biridir. Denatüre olan proteinlerin düzenli bir yapı oluşturacak şekilde tekrar birleşmesi ile gerçekleşir. Gıdalarda jelasyon, proteinler ve karbonhidratlar ya da ikisinin karışımı ile sağlanabilir. Ancak proteinlerin jel oluşturma özelliği karbonhidratlara göre daha etkindir. Boyutu, esnekliği ve denatüre olma özelliğinden dolayı jelasyon için proteinler daha çok tercih edilir (Moure ve ark., 2006). Gıdaların yapısı ve dokusu, dolaylı olarak proteinlerin jelasyon özelliği tüketici kabul edilebilirliğini etkiler (Kiosseoglou ve Paraskevopoulou, 2005). Buna örnek olarak kek, omlet ve şekelermelerde yumurtanın jelasyon özelliğinin önemi verilebilir (Ikeda ve Nishinari, 2001).

Proteinlerin ekstraksiyonu zor bir işlem olmakla birlikte uzun süredir araştırmacılar tarafından materyallere uygun yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Natarajan ve ark., 2005). Verimli ve etkin bir protein ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi, sonraki işlem basamakları için oldukça önem arz etmektedir. Hücre parçalama aşaması, protein ekstraksiyon ve saflaştırma prosedürünün ilk adımıdır. Hücre duvarını parçalamak için mekanik işlemler (dondurma-çözündürme, öğütme, karıştırma, basınçlı homojenizasyon veya ultra-sonikasyon), hidrolitik enzimler (lizozim, kitinaz), deterjanlar (SDS) veya bu yöntemlerin kombinasyonları kullanılabilir (Nasseri ve ark., 2011). Uygulanan hücre parçalama yöntemi, THP'deki protein ve diğer bileşenlerin kalitesini ve miktarını etkileyebilmektedir (Ritala ve ark., 2017). Bununla birlikte, birçok yöntem geliştirilmiş ve bildirilmiş olmasına rağmen, henüz geliştirilmiş tek aşamalı bir protein ekstraksiyon yöntemi yoktur. Ayrıca, farklı organizma türleri ve analiz edilecek numune türü için mümkün olan en iyi verimi ve saflığı elde etmek amacıyla bu metotların adapte (genellikle iki veya daha fazla metot birleştirilmesi) ve optimize edilmesi gerekmektedir (Mehmeti ve ark., 2011).

Proteinlerin ekstrakte edilmesinden sonraki diğer temel işlem basamağı ise proteinlerin konsantre edilerek saflaştırılması basamağıdır. Protein ekstraktını safsızlıklardan arındırmak amacıyla çeşitli saflaştırma yöntemleri kullanılmakta ve bu yöntemler uygulanırken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar bulunmaktadır. Proteinlerin yapısı oldukça hassastır ve proteinler kolaylıkla denatüre olabilmektedir. Bu yüzden saflaştırma işlemleri ılımlı şartlarda gerçekleştirilmeli, kaynatma ve damıtma gibi işlemler kullanılmamalıdır. Ayrıca proteinlerin birbirine benzer yapıları olması sebebiyle saflaştırmada kullanılacak tekniklerin ayırt ediciliği yüksek olmalıdır (Dennison, 2010). Proteinlerin çöktürme yöntemleri ile saflaştırılması hem hızlı ayrılma sağlaması hem de ekonomik ve güvenilir olması sebebiyle yaygın olarak uygulanmaktadır (Sivasankar, 2005). Amonyum sülfat ile çöktürme proteinlerin çözünürlüğünün tuz ile azaltılması ve sonuçta çöktürülmesini temel alır. Etanol ile saflaştırma işleminde ise, polaritesi sudan daha düşük olan etanolün sulu çözeltiye eklenmesi sonucu çözücü polaritesi azalır ve proteinlerin çözünürlüğünde azalmaya neden olarak çökmesine sebep olmaktadır (Dennison, 2010). İzoelektrik noktası çöktürme yönteminde proteinler çözeltinin pH değeri düzenlenerek çöktürülmektedir (Akyüz ve Ersus Bilek, 2018).

Bu tez çalışması kapsamında, kültür koleksiyonunda bulunan genotipik olarak tanımlanmış endojen LAB tek hücre proteinlerinin üretimi için uygun fermantasyon şartları (besiyeri çeşidi, pH, sıcaklık, karıştırma vb.), deneysel sonuçlardan elde edilen kinetik parametreler yolu ile belirlenerek, hücre (biyokütle) üretim şartları belirlenmiştir. Üretilen LAB hücrelerinden proteinlerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu için mekanik ve enzimatik olarak parçalanmış hücrelerin protein ekstraksiyon şartları (pH, tuz, seyreltme oranı) ve protein çöktürme tekniği (izoelektrik nokta, alkol, amonyum sülfat) belirlenmiştir. Böylelikle LAB tek hücre proteinleri saflaştırılmış ve protein konsantrat üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca üretilen THP konsantratlarının kimyasal ve teknolojik karakterizasyonu yapılarak endüstriyel kullanıma uygunluğu ortaya konmuştur.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Paraskevopoulou ve ark. (2003), kefir mikroorganizmalarından üretilen maya proteininin emülsifiye edici ve köpürme özelliklerini ve ısıl işlem uygulanmış esnek jel yapısı oluşturma kabiliyetini değerlendirmek için bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada peynir altı suyu ile kefir mikroorganizmaları kullanılarak aerobik fermantasyon gerçekleştirilmiş ve THP üretilmiştir. Çalışma kontrollü pH (5.5) ve sıcaklık (30°C) koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyokütlede, protein, lipit, karbonhidrat ve kül analizleri yapılmış ve fonksiyonel özellikleri (emülsiyon, köpürme, jelasyon) incelenmiştir. THP (%53.9 protein), yağsız soya ununa benzer emülsifiye edici özellikler sergilerken, Ibaming aktivitesi ve köpük sıvı stabilitesinin çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak, THP'nin su dispersiyonlarının ısıtılmasıyla oluşturulan jellerin doku analizleri, üretilen yapıların soya unu ile yapılan jellerle karşılaştırıldığında daha güçlü olduğunu göstermiştir.

Huang ve Kinsella (1986), fosforlanmış maya proteinlerinin gıda ürünlerindeki teknolojik potansiyelini değerlendirmek için hidrasyon ve viskozite davranışlarını incelemiştir. Bunun için düşük seviyelerde nükleik asit (%2.7) içeren maya THP'den fosfoproteinler hazırlanmıştır (%72). Yapılan çalışmada maya proteinlerinin fosforilasyon yolu ile modifiye edilmeleri sonucu çeşitli pH seviyelerinde çözünürlüğünün ve su tutma kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan fosforlanmış maya proteinlerinin, bazı gıda maddelerinde kıvam arttırıcı olarak kullanımının faydalı olabileceği öne sürülmüştür.

Otero ve ark. (2000)'nın yaptığı bir çalışmada, çeşitli işlem koşullarında maya proteini izolatlarının bazı fonksiyonel ve termal özellikleri incelenmiş ve sağlam hücrelerden izole edilmemiş proteinlerle karşılaştırılmıştır. Maya hücrelerinin yüksek basınçlı homojenizasyonu ve ardından ribonükleik asit-protein komplekslerinin ayrışması için 50°C'de inkübasyon işlemi, izole edilmiş proteinlerin yüksek derecede denatürasyonu ile sonuçlanmıştır. Sağlam hücrelerdeki proteinler, *S. cerevisiae* ve *Kluyveromyces fragilis* için sırasıyla 66.66 ve 63.67°C'de büyük bir endotermik pik sergilemiştir. Proteinlerin biyokütlesinden izolasyonunun pik sıcaklığını 50°C civarında değerlere kaydırıldığı ve nükleik asit, polisakaritler ve diğer hücre içi bileşenler gibi yabancı maddelerin

denatürasyon üzerinde koruyucu bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. İnkübasyonun protein denatürasyonunu etkileyen ana faktör olduğu, bu yüzden kaçınılması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca izole edilmiş proteinler %40'tan daha az çözünürlük göstermiş ancak su tutma özellikleri ve ıslanabilirlikleri 3.5-7.0 ml su/g protein olarak belirlenmiştir.

McElwain ve ark. (1975)'nin bir çalışmasında, THP konsantresi kurutulmuş *Candida utilis* hücrelerinden 10 dakika boyunca 95°C'de 0.2 N NaOH ile ekstre edilerek hazırlanmıştır. Çözünen protein pH 3.5'te çöktürülmüş, yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Protein izolatlarının bir kısmı süksinatlanmış, böylece serbest amino gruplarının %84'ü bloke edilmiştir. Optimum koşullar altında alkali ekstraksiyonları, toplam katıların %25-30'unu oluşturmuştur. İzolatların nükleik asit içeriği %10.4 iken, protein içeriği %67.3 olarak gözlemlenmiştir. Süksinile edilmiş (SI) ve edilmemiş (NSI) THP konsantresi, izoelektrik nokta olan pH 4'ün üzerinde benzer çözünürlükler sergilemiştir. 4'ün altındaki pH değerlerinde, SI oldukça çözünmezken, NSI pH 2'de çözünür olmuştur. Sindirilebilirlik değerleri pepsin ve pankreatin ile parçalanmış proteinden salınan lizinin yüzdesiyle ölçülmüştür. Bu değerler NSI, bütün yumurta ve SI için sırasıyla %32.7, %18.6 ve %3.3 olarak belirlenmiştir. %1 seviyesinde jelatin uygulanmış mısır yağından hazırlanan emülsiyonların kararlılıklarının (%20-50), NSI ve SI ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek jelatin seviyeleri için NSI ve SI ile karşılaştırıldığında daha kararlı emülsiyonlar üretme eğiliminde olduğu belirtilmiştir. NSI ve SI'dan hazırlanan emülsiyonları karşılaştırıldığında, NSI'nın biraz daha yüksek stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. SI'nın daha yüksek negatif yüke sahip olmasının, emülsiyon stabilitesinde istenmeyen bir etkiye sebep olduğu belirtilmiştir.

Kam ve ark. (2012) balık yemi fabrikalarında oluşan proteince zengin atık su ile *Lactobacillus acidophilus* ve *A. niger* kullanılarak THP üretimini araştırmıştır. Atık su *L. acidophilus* ve *A. niger* için substrat olarak kullanılmış ve kontrol olarak standart besiyeri ortamı ile karşılaştırılmıştır. Kontrol besiyeri ve atık suda üretilen maksimum protein sırasıyla *L. acidophilus* için %71.13 ve %68.37 ve *A. niger* için %51.36 ve %48.66 olmuştur. Çalışma sonucunda THP üretimi için atık suyun (karbon ve protein kaynağı olarak) kullanıma uygun olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca sonuçlar atık suda *L. acidophilus* ve *A. niger*'den üretilen THP'nin amino asit profilinin yetişkin insan besin gereksinimlerini karşıladığını göstermiştir (metiyonin hariç).

Parajo ve ark. (1995)'nın yaptığı bir çalışmada *Candida utilis* NRRL Y-900 hücreleri, önceden işlenmiş Okalipütüs globulus ağacının enzimatik hidrolizi ile oluşturulan glikozlu çözeltilerde kültürlenmiştir. Maya biyokütlesi, düşük nükleik asit içeriği, yüksek sindirilebilirlik ve yüksek besin değerine sahip protein konsantreleri elde etmek için NH₄OH çözeltileri ile kimyasal işlemlere tabi tutulmuştur. Bu işlemlerle başlangıç nükleik asitlerinin %95'i maya hücrelerinden uzaklaştırılmış ve biyokütlenin besinsel özellikleri geliştirilmiştir. Kimyasal işlemlerden sonra protein geri kazanımının, işlenmemiş biyoküttele bulunan miktarın %88'ini oluşturduğu gözlemlenmiştir. Protein konsantreleri, in vitro olarak yüksek sindirilebilirlik göstermiş ve amino asit profilleri, işlenmemiş hücrelerinkilerle ilişkili olarak fazla değişmemiştir. Bu sonuçlar ile çalışılan işleme prosesinin önemi gösterilmiştir.

Calloway ve Kumar (1969)'ın yaptıkları bir araştırmada, *Hydrogenomonas eutropha* THP'leri üretilerek amino asit profili ve sindirilebilirlik analizleri yapılmış, sonuçlar kazein ile karşılaştırılmıştır. Yarı-kesiksiz ototrofik kültürden toplanan ve substratsız yıkanmış *Hydrogenomonas eutropha* hücrelerinin kuru ağırlık bazında yaklaşık %13 azot içerdiği gözlemlenmiştir. Bakteriyel azotun biyolojik değeri ve sindirilebilirliği, standart protein olarak kazein kullanılarak, kısaltılmış Mitchell-Thomas azot dengesi tekniği ile fareler üzerinde belirlenmiştir. Sonuçlar, kazein azot sindirilebilirliğinin %99 ve hem kaynatılmış hem de sonikasyon ile parçalanmış bakteri hücrelerinin azot sindirilebilirliğinin %93 olduğunu göstermiştir. Kazeinin ve bakteri preparatlarının biyolojik değeri eşit olarak %77 bulunmuştur. Bakterilerin amino asit bileşimi, kazeinde olduğu gibi, kükürt içeren amino asitler ile sınırlanmıştır. Bu kompozisyon özellikleri, *H. eutropha*'nın hayvan yemlerinde protein takviyesi olarak değerli olabileceğini göstermiştir.

Akalya ve ark. (2017)'nın yaptıkları bir çalışmada farklı gıda atıkları kullanılarak THP üretilmiştir. Besiyerinde karbon kaynağı olarak karpuz, kavun, papaya, ananas kabuk hidrolizatları kullandıkları çalışmada, mikrobiyal fermantasyon için *Rhodopseudomonas*, *S. cerevisiae*, *Trichoderma harzianum* kültürleri kullanılmıştır. Besiyeri olarak kullanılan kabuk hidrolizatları glikoz ve amonyum sülfat ile zenginleştirilmiştir. Mikrobiyal kültürler ile 4 gün süren fermantasyon sonucunda, *S. cerevisiae*'nin THP üretiminde diğer suşlara göre daha yüksek verime sahip olduğunu bulmuşlardır.

Liu ve ark. (2014)'nın bir çalışmasında, iki aşamalı bir fermentasyon işlemi kullanılarak patates nişastası işleme atıklarının THP üretimi için uygun besiyeri olarak dönüştürülmesi araştırılmıştır. İlk aşamada selüloz üretimini arttırmak için UV ışınımı ve etil metil sülfon mutagenezi uygulanarak geliştirilen *A. niger* H3 mutant suşu kullanılmıştır. H3 suşu ile işlem gördükten sonra patates kalıntısında %80.54 oranında selüloz degradasyonu gözlemlenmiştir. İkinci adım olarak *Bacillus licheniformis* kullanılarak bir sıvı fermentasyonu yapılmıştır. Optimize edilmiş fermentasyon koşulları, yanıt yüzeyi metodu kullanılarak 32.8°C sıcaklık, 6.67 pH ve %1.78 inokulum konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Sonuçlarda kurutulmuş patates kalıntısında sırasıyla %6.24 ve %2.83 olan ham ve gerçek protein değerlerinin, THP'de %38.21 ve %24.86 değerlerine yükseldiği gözlemlenmiştir, ayrıca bu sonuçlar önemli miktarda atık suyun proteine dönüştürüldüğünü göstermiştir. Ek olarak üretilen THP'nin, Çin'deki yetkili bir test ajansı olan Harbin Medical University'nin değerlendirmelerine göre hayvan beslenmesi için güvenli olduğu kanıtlanmıştır.

Vrati (1984)'nin yaptığı bir çalışmada, havuz suyundan izole edilen farklı fotosentetik bakterilerin (*Rhodopseudomonas capsulata*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Rhodopseudomonas acidophila*, *Rhodospirillum rubrum* ve *Rhodospirillum tenuebiyogaz*) biyogaz tesisi atıkları üzerinde üretimi ve bu bakterilerden üretilen THP'nin kalitesi araştırılmıştır. Anaerobik olarak sindirilmiş hayvan gübresi, santrifüjleme ile katı tortu ve sıvı fraksiyonları halinde ayrılmıştır. Uçucu yağ asitleri bakımından zengin olan arıtılmış sıvı fraksiyonu fotosentetik bakterilerin büyümesini desteklemiştir. Arıtılmış sıvı faz üzerinde büyütülen farklı fotosentetik bakterilerden üretilen tek hücre proteininin esansiyel ve kükürtlü amino asitleri bakımından zengin olduğu gözlemlenmiştir. *Rhodopseudomonas capsulata* %69.37 ham ve %61.25 gerçek protein içeriğiyle en iyi tek hücre proteinini üretmiştir.

Ardestani ve Alishahi (2015), daha verimli THP üretimi için süreci optimize etmek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, THP üretimi, *A.niger* PTCC5012 kullanılarak kesikli derin kültürde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon işlemi, fraksiyonel faktöriyel istatistiksel yöntem kullanılarak yapılmıştır. Deney tasarımı ve veri analizi için Qualitek-4 yazılımı kullanılmıştır. Glikoz, magnezyum sülfat, potasyum hidrojen fosfat

konsantrasyonları ve pH, her biri dört farklı seviyede dört anahtar parametre olarak kabul edilmiştir. Bu parametreler kullanılarak *A.niger* PTCC5012'den maksimum THP elde etmek için optimum koşullar belirlenmiştir. Yazılım tarafından önerilen optimum THP ile deneysel olarak ölçülen protein arasında %94 tutarlılık gözlemlenmiştir. Glikoz konsantrasyonu, %40.95 pay ile THP üretim veriminde en etkili parametre olarak değerlendirilmiştir. Potasyum hidrojen fosfat konsantrasyonu ve ortamın pH'sı, THP üretiminde daha az rol oynamıştır. Maksimum tek hücre proteini verimine ulaşmak için en uygun koşullar, glikoz, MgSO₄ ve KH₂PO₄ konsantrasyonları için sırasıyla 70 g/L, 2 g/L ve 7 g/L ve kültür ortamı için pH 5 olarak belirlenmiştir.

Mensah ve Twumasi (2017)'nin yaptığı bir çalışmada, *S. cerevisiae* kullanılarak THP üretimi için substrat olarak ananas artıklarının özleri kullanılmıştır. Çalışma ayrıca, ananas substrat konsantrasyonunun THP verimine olan etkisine odaklanmıştır. Maya hücreleri ilk olarak Maya Patates Dekstroz Agar (YPDA) üzerinde kültürlenmiş ve daha sonra fermentasyon için aktif maya inokulumunu üretmek üzere sıvı besiyerlerine aktarılmıştır. Ardından çeşitli konsantrasyonlarda ananas özlerinin her biri 1 mL inokulum ile aşılanmıştır. Daha sonra 298 K'da inkübe edilmiş ve çoğalan maya kolonileri 24 saatlik aralıklarla 5 gün boyunca sayılmıştır. Substratın biyokimyasal analizinde bileşimin özellikleri pH 5.5 ve %4.7 (m/v) toplam çözünür şeker olarak bulunmuştur. THP için maksimum verim ve ikiye katlanma süresi (3.01 kg/m³, 1.108 saat), %60 ananas substrat konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. %100 substrat konsantrasyonu en düşük THP verimini sergilemiştir. Fermentasyon ortamında yüksek şeker konsantrasyonlarının, ozmotik basınç nedeniyle maya büyümesini baskıladığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda, gıda işleme endüstrisinde üretilen ananas atığının THP üretimi için yüksek potansiyelli ekonomik değeri olan iyi substratlar olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Substrat kullanımının THP üretimi için önemli bir parametre olduğu ve substrat çeşitliliğinin THP üretim maliyetlerinin belirlenmesinde önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir.

Kunasundari ve ark. (2013) bakteriyel THP ile birlikte başka bir ikincil ürün üretimini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada hem protein hem de polihidroksialkananoatta (PHA) ile zengin bir biyokütle üretmek için *Cupriavidus necator* hücreleri büyük ölçekte üretilmiştir. Bu biyokütle ile fareler beslenerek gözlem yapılmıştır. Sonuçta bu

biyokütlenin fareler için iyi tolere edilebilen ve güvenli bir besin olmasının yanında, farelerin güçlü çözücülerin kullanımı olmadan önemli miktarda PHA'nın saflaştırılmasını sağlayan PHA granülleri içeren dışkı toprakları ürettiği de gözlemlenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında THP üretimi için uygun olduğu ön denemeler ile belirlenmiş olan ve starter kültür olarak kullanılacak yerel laktik asit bakteri suşları (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. namurensis*, *Pediococcus ethanolidurans* vb.) daha önceki bir çalışmada Ankara-Çubuk yöresinde üretilen turşulardan izole edilmiş olup, moleküler yöntemlerle tanımlanmış (Bağder Elmacı ve ark., 2015) ve teknolojik-fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir (Tokatlı ve ark., 2015; Tokatlı ve ark., 2017). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilen 153 laktik asit bakteri suşlarının 16S rRNA gen dizi analiz sonuçlarına ait GenBank erişim numaraları (Accession number: KJ994358....KJ994509) daha önceki çalışmada belirtilmiştir (Bağder Elmacı ve ark., 2015).

Üretilen laktik asit bakteri THP konsantratları ile karşılaştırmak ve referans olması için kullanılan *S. cerevisiae* maya hücreleri için ticari yaş hamur mayası (Efsane) kullanılmıştır.

Laktik asit bakteri suşlarından ve referans maya hücresinden elde edilen protein konsantratları ile karşılaştırmak için referans protein katkısı olarak ticari protein konsantratı Whey (peynir altı suyu) (Tito, Çin) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik asit bakteri hücrelerinin üretimi ve fermantasyonlar

3.2.1.1. Suş seçimi

Tez kapsamında çalışmaya dahil edilen 8 LAB suşunun aktiveleştirme ve canlandırma işlemleri yapılarak ön denemelerde kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu amaç ile -80 °C’de depolanan kültürler ilk olarak steril ekim kabini içerisinde iğne uçlu öze yardımı ile aktiveleştirme işlemi için MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) sıvı besiyeri (pH 6.2)

içerisine aktarılmış ve daha sonra inkübatörde 30°C’de 2-4 gün boyunca gelişmeleri sağlanmıştır. Aktifleştirilen kültürler bu işlem 2-3 kez uygulanarak çalışmalarda kullanılmak üzere taze kültür olarak hazır hale getirilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmiştir. THP üretimi için belirlenen 8 LAB suşu içerisinde uygun olan kültürlerin belirlenmesi aşamasında, MRS besiyerine %1 oranında inoküle edilen kültürlerin statik inkübasyonda (30°C) hücre gelişimleri 96 saat boyunca her 24 saatte bir kültür ortamının optik yoğunlukları (OD₆₀₀) ölçülerek belirlenmiştir. THP üretimi için hücre verimi açısından uygun olan laktik asit bakteri (LAB) suşlarının belirlenmesi amacı ile yapılan ön denemelerde kullanılan suşlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada materyal olarak kullanılan LAB izolatları

LAB suşları (Accession number: KJ994358-KJ994509)
<i>Lb. brevis</i> MF105
<i>Lb. brevis</i> MF343
<i>Lb. plantarum</i> MF265
<i>Lb. plantarum</i> MF4
<i>Lb. plantarum</i> MF232
<i>Lb. buchneri</i> MF163
<i>P. ethanolidurans</i> MF179
<i>E. casseliflavus</i> MF535

3.2.1.2. Besiyeri şeker katkısı seçimi

THP üretimi için seçilen *Lb. plantarum* MF4 (Accession no: KJ994505) ve *Lb. brevis* MF343 (Accession no: KJ994380) suşlarının hücre gelişimine etki edebilecek farklı şeker katkılarının etkisi de ön denemeler ile belirlenmiştir. Aktifleştirilme için, kültürler MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe) besiyerinde (pH 6.2) 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Aktifleştirme işlemi birkaç kez tekrarlanmıştır. Bu amaç ile, ilk olarak şeker içermeyen MRS sıvı besiyeri (10g pepton, 0,8 g Beef Extract, 0,4g Yeast Extract, 0,2g K₂HPO₄, 0,1g Tween 80, 0,5g Sodium Acetate, 0,004g MnSO₄) içerisine şeker kaynağı olarak farklı oranlarda şekerli hammaddeler ilave edilmiştir. LAB suşları MRS broth, MRS+Melas (%1, %2, %4 Melas), MRS+ %4 Glikoz , MRS+ %2 Sakkaroz besiyerleri kullanılarak inkübe edilmiş ve gelişme hızları spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Kontrol grubu olarak katkı ilave edilmemiş MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada en

uygun olduğu belirlenen besiyeri kompozisyonu ile fermentasyon koşullarının optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

3.2.1.3. Doğal besiyeri seçimi

Çalışmanın diğer bir aşamasında ise doğrudan besiyeri olabilecek bazı doğal bitkisel hammadde kaynakları denemelerde kullanılmıştır. Bu amaç için piyasadan temin edilen salatalık, elma ve şeker pancarı gibi bitkisel kaynakların suları, katı meyve sıkacağı ile elde edilerek kaba filtreden geçirilmiş ve benzer şeker oranları olacak şekilde seyreltilerek doğrudan besiyeri olarak kullanılmıştır. LAB suşları ile %1 oranında inoküle edilen doğal besiyeri kaynakları (pH 6.2), 30°C’de 48 saat statik olarak inkübe edilerek mikrobiyal gelişimleri optik (OD₆₀₀) olarak izlenmiştir. Yapılan deneme sonucunda en uygun besiyeri olarak salatalık suyu belirlenmiş olup çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.1.4. Fermentasyon deneme deseni

LAB suşlarından THP üretimi için optimum fermentasyon koşullarının belirlenmesi amacı ile daha önceki ön denemeler ile seçilen *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için farklı besiyerleri ve bileşimleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları (25-30-35°C), farklı besiyeri başlangıç pH değerleri (pH 6.0-6.5-7.0) deneme deseni şartlarında fermentasyonlar geçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar süresince 0., 6., 12., 24., 36., ve 60. saatlerde besiyerlerinden örnek alınarak kültür ortamında pH, toplam asitlik (g laktik asit/mL), hücre kuru ağırlığı (g/L), toplam şeker (g/L) analizleri yapılmıştır. Uygun besiyeri türü, pH, sıcaklık şartları (35°C, MS, pH 7.0) belirlendikten sonra çalkalamalı inkübasyon (50 ve 200 rpm) denemeleri belirlenen koşullarda geçekleştirilmiştir. Bu analizlerden elde edilen veriler aracılığı ile fermentasyonlara ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. THP üretimi için kullanılan her bakteri suşu için optimum fermentasyon şartlarına, kinetik parametrelerden elde edilen veriler yoluyla karar verilmiştir. Böylelikle THP üretimi için kullanılacak her bir suşa ait uygun fermentasyon şartları (besiyeri, sıcaklık, pH, karıştırma) standardize edilmiştir. Fermentasyonların değerlendirilmesinde

kullanılan özgül spesifik gelişme hızı (μ), biyokütle verimi ($Y_{x/s}$) ve hacimsel verimlilik (V_{px}) Çizelge 3.2’de verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılan kinetik parametreler

Kinetik Parametre	Denklemler	
Spesifik gelişme hızı (μ)	$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$	$\mu = (\mu_{\max} S) / (K_s + S)$
Biyokütle verimi ($Y_{x/s}$)	$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$	$\frac{dS}{dt} = - (1/Y_{x/s})(dx/dt)$
Hacimsel verimlilik (V_{px})	$V_p = \frac{g \text{ hücre}}{L. \text{ saat}}$	
X_0 : başlangıç hücre konsantrasyonu (g/L) X : t anında mikroorganizma konsantrasyonu (g/L) ΔX : t zamanda hücre konsantrasyon artış miktarı ΔS : t zamanda substrat konsantrasyonu azalma miktarı K_s : Substrat doygunluk sabiti (g/L) μ : spesifik büyüme hızı (1/saat) $\mu_{\max}$: kültür için max spesifik büyüme hızı (1/saat) S : substrat konsantrasyonu (g/L)		

3.2.2. Tek hücre proteinlerinin (THP) üretimi ve ekstraksiyonu

3.2.2.1. Hücre üretimi

MRS sıvı besiyerinde (pH 6.2) 24-48 saat süre ile 30°C’de aktifleştirilen *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 kültürleri, 121°C’de 15 dk. şartlarında sterilize edilmiş 1000-500 mL’lik MS (MRS+Salatalık Suyu) besiyerlerine %1 oranında inoküle edilmiş ve deneme deseni kapsamında standardize edilen THP üretim şartlarında (pH 7.0, 35°C ve 12-24 saat) fermantasyonları gerçekleştirilmiştir. Hücre referansı olarak kullanılan *S.cerevisiae* maya hücreleri için ise ticari yaş maya %0.85’lik NaCl çözeltisi ile homojenize olana kadar karıştırılmış ve hücrelerin yıkaması yapılmıştır. Fermantasyon sonrası hücrelerin besiyerinden ayrılması santrifüj (Boeco U-32 R, Almanya) işlemi uygulanarak sağlanmıştır. Bunun için örnekler 9000 rpm’de 30 dakika süresince santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırılmış ve hücre çökeltisi elde edilmiştir. Hücre çökeltisinin

yıkanması amacı ile hücreler %0.85'lik NaCl çözeltisi ile 2 defa yıkanarak tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve hücrelerin besiyeri bileşenlerinden arındırılması sağlanmıştır. Bu işlemler yeterli miktarda hücre elde edene kadar tekrarlanmıştır. Toplanan hücreler sonraki aşamalarda kullanmak üzere -80°C'de dondurulmuştur.

3.2.2.2. Hücre parçalama

Besiyerinden santrifüj yolu ile toplanan LAB (*Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343) ve Maya (*S.cerevisiae*) hücrelerinden proteinlerin verimli ve etkin bir şekilde ekstrakte edilmesini sağlamak amacı ile ekstraksiyon öncesi hücrelere sonikasyon, enzim ile parçalama (Siao ve ark., 2007), homojenizasyon ve dondurma-çözündürme yöntemleri uygulanmış ve parçalanmış hücre homojenizatları elde edilmiştir (Abram ve ark., 2009).

Bu amaç ile ilk olarak toplanan yıkanmış hücre çökeltileri benzer kurumadde değerine (yaklaşık %5) kadar saf su ile sulandırılmış ve hücresel enzimatik aktivitenin sınırlandırılması amacı ile 75°C'de 15 dk.'lık bir ısı işlemi ile pastörize edilmiştir. Bu aşamadan sonra hazırlanan hücre süspansiyonlarının pH değerleri pH 6.5'e ayarlanarak LAB ve Maya hücreleri enzimatik olarak parçalanmıştır. Bunun için LAB hücrelerine lizozim enzimi (10 mg/mL), Maya hücrelerine ise kitinaz ve glukanaaz enzimleri ilave edilerek 1 saat süre ile 30°C'de inkübe edilmiştir. Ardından örnekler dondurma-çözündürme işlemi için -17°C'de 12 saat bekletilmiştir. Sonikasyon uygulaması için donmuş örnekler yarı buzlu hale gelene kadar çözündürülmüş ve küçük miktarlara ayrılarak her birine toplam 15 dk. (3 sn aralıklı olarak) süre ile 200 watt-20 kHz güçle sonikasyon (Nanolinker 200 Watt Sonikatör, Çin) uygulanmıştır. Bu uygulamanın ardından hücreler tekrar dondurulmaya bırakılmıştır. Yarı buzlu hale gelene kadar çözündürülen örneklerin her birine 15 dk. süresince 20000 devir/dk.'da homojenizasyon (IKA T18 Basic ULTRA-TURRAX, Almanya) uygulanmıştır. Ardından örneklere tekrar 200 watt güçle 5 dk. (3 sn aralıklarla) süresince sonikasyon uygulanmıştır.

Elde edilen parçalanmış hücre homojenizatlarında son ürün kalitesini arttırmak amacıyla yağ uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaç ile parçalanmış hücre homojenizat miktarlarının yaklaşık %40'ı kadar hekzan eklenmiş ve 30 dk. süre ile soğuk su banyosunda çalkalama işleminin ardından 30 dk.. bekletilmiştir (Hanmoungjai ve

Niranjan, 2002). Bekleme süresinin ardından hekzan üst fazı alınmış ve tekrar hekzan eklendikten sonra 30 dk.. daha çalkalama işlemi uygulanmıştır. Yağ ekstraksiyonu tamamlanan örneklerden hekzan fazı alınmış ve 55°C’de su banyosunda bekletilerek kalan hekzanın tamamen uzaklaşması sağlanmıştır.

Uygulanan işlemler ardından elde edilen yağsız hücre homojenizatlarından proteinlerin ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi amacı ile farklı pH, seyreltme oranı ve tuz konsantrasyonları da ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. pH değerinin protein ekstraksiyonuna etkisi

Homejenize edilmiş ve yağı uzaklaştırılmış hücre homojenizatlarından maksimum oranda verimin sağlandığı pH değerini belirlemek amacıyla, öncelikle 2.25 kat saf su ile seyreltilip karıştırılan (Classic Velp Vortex, İtalya) (2 dk., 1200 rpm) ve pH değerleri 1.0-12.0 aralıklarında ayarlanan örnekler oda sıcaklığında (25°C) inkübatörde 60 dk. süre ile çalkalanmıştır (200 rpm) (McElwain ve ark., 1975). Çalkalama işleminin 30. dakikasında örnekler vortex (2 dk., 1200 rpm) uygulandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiş ve değişim gösteren pH değerleri tekrar ayarlanmıştır. Örnekler karıştırıldıktan (2 dk., 1200 rpm) sonra çalkalama işlemine devam edilmiştir. Çalkalama sonrası ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesi amacı ile 6000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenen (Hettich Eba 21, Almanya) örneklerin üst fazlarından (sıvı faz) numune alınarak protein miktarları Biüret yöntemi ile belirlenmiştir. Aşağıdaki eşitlik 1.1 kullanılarak her bir örnek için protein ekstraksiyon verimleri hesaplanmıştır.

$$\text{Protein ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{\text{sıvı faz toplam protein miktarı}}{\text{başlangıç örnek toplam protein miktarı}} \cdot 100 \quad 1.1$$

3.2.2.4. Seyreltme oranının protein ekstraksiyonuna etkisi

Ekstraksiyonda kullanılacak uygun hücre ve su oranını belirlemek için en verimli ekstraksiyonun gerçekleştirildiği pH 12 değerinde farklı seyreltme oranları (2.25, 2.50, 2.75, 3.00, 3.25) ile hücre süspansiyon karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlara inkübatörde çalkalama işlemi (60 dk., 200 rpm) uygulanmıştır. Çalkalama işleminin 30.

dakikasında örneklere vortex uygulandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiş ve değişim gösteren pH değerleri tekrar ayarlanmıştır. Çalkalama sonrası ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesi amacı ile 6000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenen örneklerin üst fazlarından (sıvı faz) numune alınarak protein miktarları Biüret yöntemi ile belirlenmiş ve protein ekstraksiyon verimleri (%) eşitlik 1.1’e göre hesap edilmiştir.

3.2.2.5. Tuzun protein ekstraksiyonuna etkisi

Tuzun protein ekstraksiyonuna etkisini gözlemek ve maksimum verimi sağlayan koşulları belirlemek amacıyla, pH 12 ve 2.25 katlık seyreltme oranlarında ekstraksiyon ortamına 0–0.5 M konsantrasyon aralığında NaCl ilave edilerek oda sıcaklığında inkübatörde çalkalama işlemi (25°C, 60 dk., 200 rpm) uygulanmıştır (Beloborodov ve ark., 2018). Çalkalama işleminin 30. dakikasında örneklere vortex uygulandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiş ve değişim gösteren pH değerleri tekrar ayarlanmıştır. Çalkalama sonrası ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesi amacı ile 6000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenen örneklerin üst fazlarından (sıvı faz) numune alınarak protein miktarları Biüret yöntemi ile belirlenmiştir ve protein ekstraksiyon verimleri (%) eşitlik 1.1’e göre hesap edilmiştir.

3.2.3. **Tek hücre proteinlerinin saflaştırılması**

Protein ekstraksiyonu için uygun şartlar (pH 12.0, 2.25 seyreltme) belirlendikten sonra elde edilen hücre ekstraktlarındaki proteinlerin konsantre edilmesi için (THP konsantrat), protein çöktürme tekniklerinden alkol ile çöktürme ve izoelektrik çöktürme işlemleri denenerek en uygun yöntem belirlenmiştir.

3.2.3.1. Alkol ile çöktürme

Alkol ile proteinlerin çöktürülmesinde Morr ve Lin (1970) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek, hücresel protein ekstrakt sıvıları %50-%80 aralığında etil alkol içerecek şekilde hazırlanmış ve 3 saat süre ile +4°C’de bekletilerek protein çöktürme gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası 9000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenen örneklerin üst fazlarında protein miktarları Biüret yöntemi ile belirlenmiştir. Denemeler sonucunda

örneklerin protein geri kazanım oranları eşitlik 1.2 ile hesaplanmış ve en verimli koşullar belirlenmiştir.

$$\text{Protein geri kazanım (\%)} = \frac{\text{konsantrat toplam protein miktarı}}{\text{ekstrakt toplam protein miktarı}} \cdot 100 \quad 1.2$$

3.2.3.2. İzoelektrik çöktürme

İzoelektrik (IP) çöktürme için, hücre protein ekstraktlarının pH değerleri NaOH ve HCl ile 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ve 4.5 olarak ayarlanarak protein presipitasyonu için +4°C’de 3 saat bekletilmiştir. Daha sonra 9000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenen örneklerin sıvı fazı uzaklaştırılarak protein çökeltisi elde edilmiştir. Sıvı faz ve çökeltide protein miktarları Biüret yöntemi ile belirlenerek ekstraktlardan elde edilen protein geri kazanım oranları eşitlik 1.2 ile hesap edilmiştir (Nonaka ve ark., 2018).

Ekstraksiyon denemeleri sonucu MF4, MF343 ve Maya homojenizatlarında en iyi verimin elde edildiği pH 12 ve 2.25 seyreltme oranı şartlarında toplu ekstraksiyonları gerçekleştirilen örneklerin, ekstraksiyon sıvılarında bulunan proteinlerin saflaştırılmasında ise MF4 ekstraktında pH 3.5, MF343 ekstraktında pH 2.5 ve Maya ekstraktında pH 3.0 izoelektrik çöktürme teknikleri kullanılmış ve THP konsantratlarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen THP konsantratlarının bazı kimyasal ve teknolojik özellikleri belirlenmek üzere -80°C’de analizleri yapılana kadar depolanmıştır.

3.2.4. THP konsantratlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Çözünürlük

THP konsantratlarının çözünürlük dereceleri Otero ve ark. (2000) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Protein konsantratları, 0.01 M pH 7.0 Fosfat Tamponu (0.410 g Na₂HPO₄ ve 0.291 g NaH₂PO₄H₂O saf suda çözündürülerek 500 mL’ye tamamlanmıştır) ile seyreltilmiş ve yaklaşık %1 protein konsantrasyonları (pH 7.0) elde edilmiştir. Ardından örnekler oda sıcaklığında 60 dk. boyunca çalkalanmış ve ependorf

tüplerine alınarak santrifüj (25°C, 30 dk., 10000 rpm) (Hettich Micro 200, Almanya) edilmiştir. Sıvı fazdaki protein miktarı belirlenerek çözünürlükleri (%) hesaplanmıştır.

3.2.4.2. Yağ absorpsiyonu

Protein konsantratlarının yağ absorpsiyon kapasiteleri Naczk ve ark. (1985) ve Otero ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Konsantratların yağ absorpsiyon kapasitesini belirlemek amacıyla protein oranları eşit olacak şekilde seyreltilmiş örneklerden 2 mL alınarak üzerine 2 mL ticari ayçiçek yağı eklenmiştir. Örneklerin her birine 5 dk. homojenizasyon (20000 devir/dk., Ultra Turrax) uygulandıktan sonra örnekler santrifüj (30 dk., 6000 rpm) edilmiştir. Santrifüj sonrası örneklerin üstte kalan yağ fazından alınarak protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.4.3. Köpük kapasitesi ve stabilitesi

Saflaştırılmış protein konsantratlarının fonksiyonel özelliklerinden köpük kapasitesi ve stabilitesi Paraskevopoulou ve ark. (2003) tarafından belirtilen yöntem uygulanarak belirlenmiştir. Protein konsantratlarından belirli miktarlarda alınıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve %1 protein içeren dispersiyonlar (pH 7.0) elde edilmiştir. Hazırlanan dispersiyonlara 1 dk. süre ile homojenizasyon (20000 devir/dk.) uygulanmış ve toplam hacim ve sıvı fazın hacmi kaydedilmiştir. Örneklerin köpük stabilitesi için ise 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 ve 240. dakikada köpük hacmindeki değişim ölçülmüştür. Köpük oluşturma kapasitesi hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{Köpük Kapasitesi} = \frac{\text{Köpük hacmi (mL)}}{\text{Başlangıç sıvı hacmi (mL)}} \times 100$$

3.2.4.4. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI)

Örneklerin emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksini (ESI) ölçmek için Pearce ve Kinsella (1978) ve Salvador ve ark. (2010) tarafından belirtilen metot kullanılmıştır. Bunun için protein konsantratları saf su ile seyreltilerek %0,1 (w/v)' lik dispersiyonlar (toplam 20 ml'lik) hazırlanmış ve pH değeri 7.0 olacak şekilde

ayarlanmıştır. Ardından her birine 6,6 ml Ayçiçek yağı eklenerek homojenizasyon uygulanmıştır (20000 devir/dk.'da 1 dk.). Homojenize edilmiş emülsiyonların alt kısmından 50 µl örnek (sıvı faz) alınarak %0.1'lik (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Örneklerin 0. ve 10. dakikadaki absorbansları (500 nm) spektrofotometre (PG Instruments T80+, UK) ile okunmuş ve aşağıdaki formüller kullanılarak EAI ve ESI değerleri belirlenmiştir.

$$EAI \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times N}{c \times \phi \times 10000}$$

A₀: 0. dk.'daki absorbans

N: Seyreltme faktörü (100)

c: Protein dispersiyonun protein konsantrasyonu (0.001 g/ml)

φ: Yağın hacimsel fraksiyonu (6.6/26.6 = 0.248)

$$ESI (dk..) = \frac{A_0 \times t}{A_0 - A_{10}}$$

A₀ : 0. dakikadaki absorbans

A₁₀: Homojenizasyon işleminden 10 dk.. sonra okunan absorbans

t: Emülsiyonun bekleme süresi (10 dk..)

3.2.4.5. Jel oluşturma

Saflaştırılmış protein örneklerinin fonksiyonel özelliklerini belirlemek amacıyla Paraskevopoulou ve ark. (2003) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak jel oluşturma özelliği incelenmiştir. Örneklerin protein konsantrasyonu yaklaşık %10 (w/v) olarak ayarlandıktan sonra her birinden 1 mL alınarak 30 dk. boyunca 100°C'de tutulmuştur. Hemen ardından 4°C'ye alınan örnekler 24 saat boyunca bu sıcaklıkta bekletilmiş ve jelleşme oranları 2. ve 24. saatte gözlemlenerek görsel olarak derecelendirilmiştir.

3.2.5. Kimyasal analizler

3.2.5.1. Titrasyon asitliği tayini

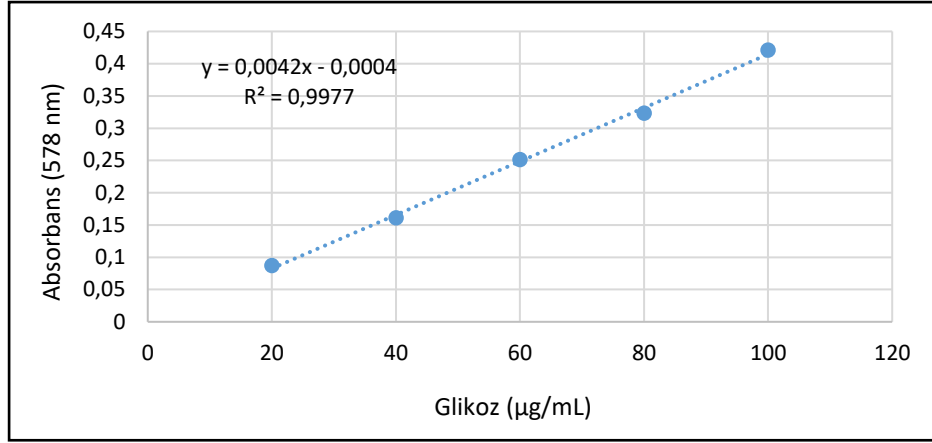
Fermantasyon süresince kültür ortamının toplam asitlik miktarı, %1'lik fenolftalein indikatörü eşliğinde, ayarlı 0,01 N NaOH ile titrimetrik olarak belirlenmiş ve sonuçlar laktik asit cinsinden (%) hesaplanmıştır.

3.2.5.2. pH tayini

LAB hücre fermantasyonu süresince besiyerlerinden alınan örneklerin ve tüm gerekli anaizlerdeki pH değerleri kalibre edilmiş pH metre (WTW Inolab pH 7110, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5.3. Toplam karbonhidrat tayini

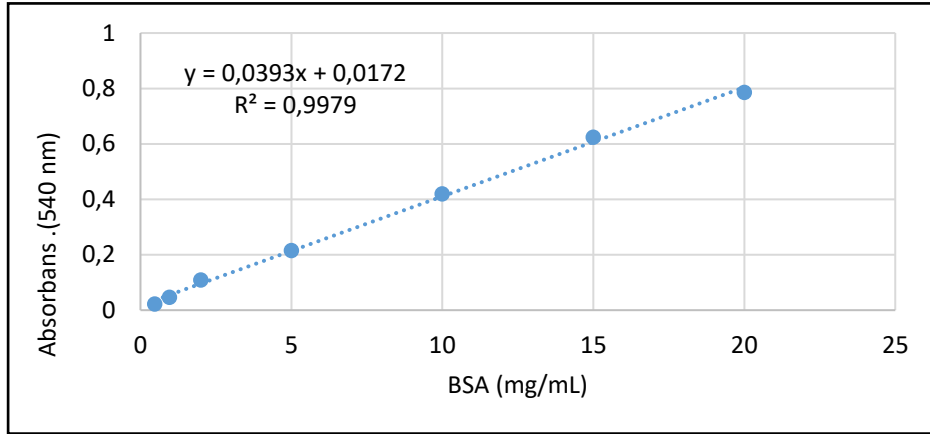
Örneklerin toplam karbonhidrat miktarlarını belirlemek için Antron testi kullanılmıştır. Örneklerden 0.5 mL alınarak her birine 1 mL %75 H₂SO₄ eklenmiş ve vortex uygulanmıştır. Ardından örneklerle 2 mL antron solüsyonu (0.5 g antron 10 mL etanol içinde çözündürülür ve %75 H₂SO₄ ile 250 mL'ye tamamlanır) eklenerek örnekler tekrar karıştırılmıştır. 100°C'de 15 dk. bekletilen örnekler mikro küvetlere alınarak 578 nm'de spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır. Toplam karbonhidratı belirlemek amacıyla kullanılacak kurveyi oluşturmak için 20, 40, 60 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarında glikoz çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Bu standart glikoz çözeltileri için de aynı adımlar uygulanmıştır.



Şekil 3. 1. Toplam karbonhidrat analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği

3.2.5.4. Protein tayini

THP konsantratlarının üretim sürecinde protein ekstraksiyon aşamalarında elde edilen fraksiyonların protein içerikleri Biüret yöntemi kullanılarak 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Herbert ve ark., 1971). Her bir örnekten 0.5 mL alınmış ve üzerine 2.5 mL Biüret solüsyonu (0.6 mol/L NaOH, 12.0 mmol/L CuSO₄, 31.9 mmol/L KNaC₄H₄O₆·4H₂O, 30.1 mmol/L KI) eklenmiştir. Örnekler karıştırıldıktan sonra 30 dk. bekletilmiş ve örneklerin absorbansları spektrofotometrede (540 nm) ölçülmüştür. Örneklerin protein içeriğini belirlemek amacıyla kullanılacak kurveyi oluşturmak için 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 ve 20 mg/mL konsantrasyonlarında bovin serum albumin (BSA) çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Bu standart protein çözeltileri için de aynı adımlar uygulanmıştır. Kurve noktalarını aşan absorbanslar gözlemlendiğinde bu absorbansları veren örnekler seyreltilerek tekrar analiz edilmiştir.



Şekil 3.2. Biüret analizlerinde kullanılan standart kurve

THP konsantratlarının üretim sürecinde elde edilen ara ve ana ürünlerin protein miktarlarının belirlenmesinde ve teknolojik özelliklerde Mikro Kjeldahl Yöntemi kullanılmıştır. Her bir örnekten 2 mL (2 gram) alınmış ve Kjeldahl tüplerine konulduktan sonra her birine 2 g K₂SO₄ ilave edilmiştir. Ardından 150 µL CuSO₄ (%5'lik) ve 5 ml H₂SO₄ eklendikten sonra tüpler kademeli olarak (~4 saat) yakılmıştır (Behrotest InKjel 625 M, Almanya). Berraklaşan örnekler soğutularak her birine 10 ml saf su eklenmiş ve örnekler sırasıyla damıtma işlemi (Behrotest Steam Distillation Unit S1, Almanya) uygulanmıştır. Bu aşamada damıtma ünitesinde %40'lık NaOH kullanılmış ve destilat borik asit çözeltisinde (%4'lük 10 ml borik asit + taşıro indikatör) toplanmıştır. Ardından destilatlar 0.02 N HCl ile titre edilmiş ve kaydedilen sonuçlar ile aşağıdaki formül kullanılarak örneklerin protein değerleri belirlenmiştir.

$$\%Protein = \frac{(V_1 - V_0) \times 0.014 \times N}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100 \times 6.25$$

V₁: Titrasyonda örnek için harcanan HCl miktarı (ml)

V₀: Şahit için harcanan HCl miktarı (ml)

N: Titrasyonda kullanılan HCl'in normalitesi

3.2.5.5. Yağ tayini

Yağ uzaklaştırma işlemi öncesi ve sonrası LAB hücre örneklerinde ve THP konsantratlarında yağ miktarları dietil eter ekstraksiyonu yolu ile Ankom yağ tayin cihazı

(Ankom XT10 Extractor, ABD) kullanılarak gravimetrik olarak belirlenmiştir. Bunun için Ankom kartuşları etüvde 105°C’de kurutulmuş ve darası alındıktan sonra 2-4 g arası örnek eklenmiştir. Ardından örnek dolu kartuşlar tekrar etüvde kurutulmuş ve Ankom cihazına yerleştirilen örneklerin ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra bir süre etüvde bekletilmiştir. Daha sonra tekrar tartılarak örneklerin yağ içeriği belirlenmiştir.

3.2.5.6. Mineral içeriğinin belirlenmesi

THP konsantratlarında ve LAB hücrelerinde toplam mineral maddeleri analiz etmek amacıyla Konlani ve ark. (1996) tarafından belirtilen yöntem kullanılmış ve mineral madde miktarları 550-600°C’de kül fırınında gravimetrik olarak belirlenmiştir (AOAC,1997). Örnekler darası alınmış porselen krozelere belirli miktarlarda konularak tartılmıştır. Ardından kül fırınına yerleştirilen dolu krozeler aşamalı olarak (yaklaşık 400°C’de 4-5 saat, yaklaşık 550°C’de 7-8 saat) yakılmıştır. Örneklerin rengi gri-beyaz bir görünüm aldığı anda örnekler desikatöre alınmış ve yeterince soğuduğunda tartımları yapılarak %kül oranı hesaplanmıştır.

3.2.5.7. Toplam kuru madde tayini

THP protein konsantratlarının ve üretim basamaklarındaki ara ürünlerin toplam kurumadde içerikleri (nem) 105±2°C’ye ayarlı etüvde gravimetrik olarak belirlenmiştir (AOAC, 1997).

3.2.5.8. Protein profillerinin ve moleküler ağırlıklarının belirlenmesi (SDS-PAGE)

Üretilen THP protein konsantratlarının protein fraksiyonlarının dağılımları ve moleküler ağırlıkları Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle her bir cam tabaka için %12 akrilamid konsantrasyonlu ayırma jeli (2.4 ml SureCast Acrylamide (%40), 2.0 ml SureCast Resolving Buffer, 3.5 ml distile su, 80 µl %10 SureCast APS ve 8 µl SureCast TEMED) ve %4 akrilamid konsantrasyonlu yığın jeli (0.30 ml SureCast Acrylamide (%40), 0.75 ml SureCast Resolving Buffer, 1.92 ml distile su, 30 µl %10 SureCast APS ve 3 µl SureCast TEMED) hazırlanmıştır. Daha

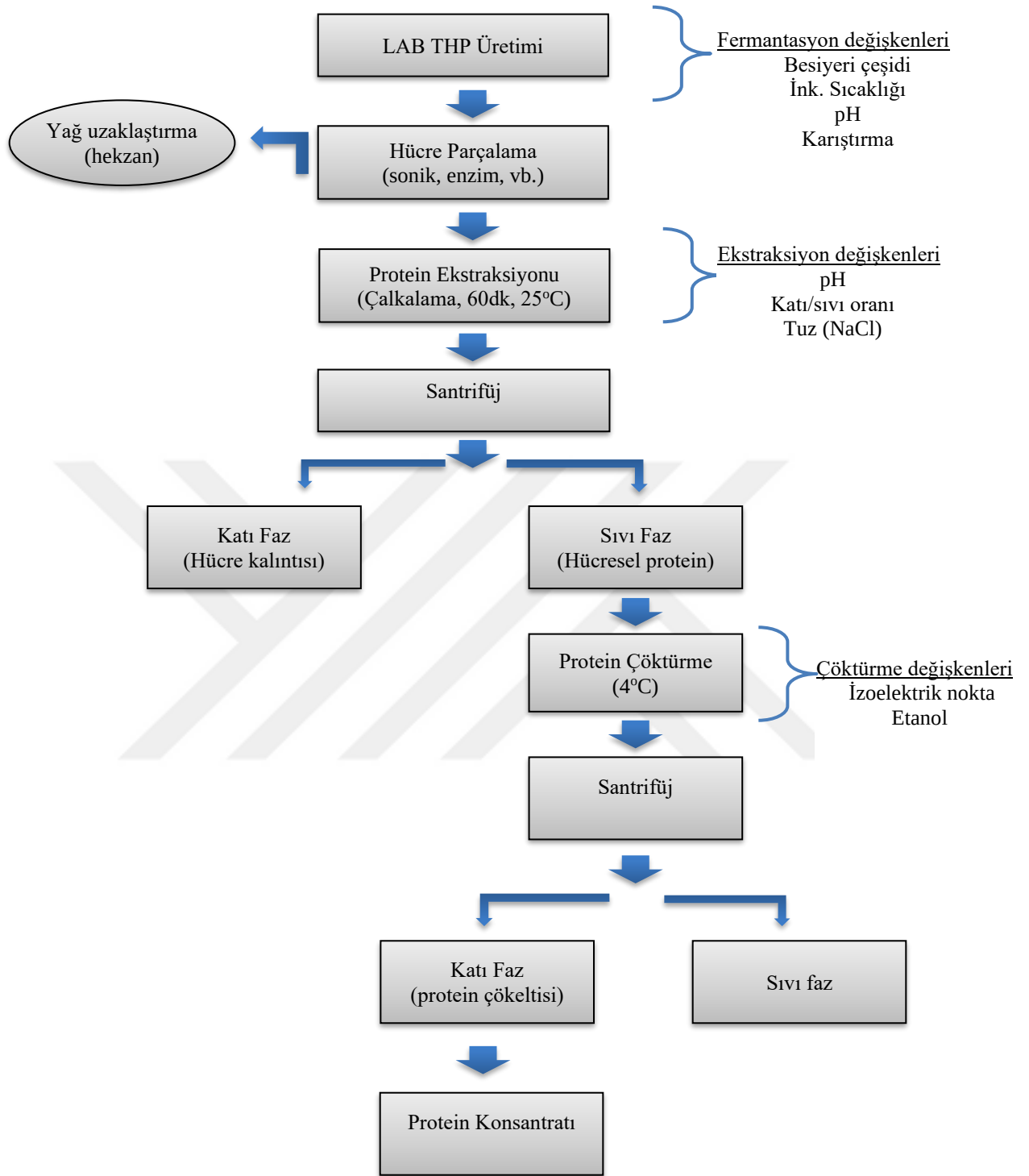
sonra örnek tamponu (19 ml distile su, 5 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 tamponu, 4 ml gliserol, 8 ml %10'luk (w/v) SDS, 4 ml 2-β-merkaptetanol, 2 ml %0,05 (w/v) bromfenolblue) hazırlanmış ve örnekler protein konsantrasyonu yaklaşık %3.5, %2.5, %1.5 ve %1 olacak şekilde örnek tamponu ile karıştırılmıştır. pH 8.3, 5X elektrot tamponu (15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS toplam hacim 1 L olacak şekilde saf su içerisinde çözündürülür) hazırlanmış ve elektroforez için kullanım esnasında 1:4 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Örnekler 5-40 µL arası farklı miktarlarda jele yüklenerek 100 (yığma jeli) ve 120 (ayırma jeli) sabit akımında yaklaşık 3 saat yürütülmüştür (Thermo Fisher Scientific Invitrogen Mini Gel Tank, UK). Elektroforez işleminin ardından jel cam tabakadan ayrılarak Commassie brilliant blue G250 (200 ml %95'lik Alkol, 50 ml Asetik Asit, 250 ml Saf su ve 0.5 g Commassie brilliant blue G250) boya solüsyonunun içinde bekletilmiş ve proteinler boyandıktan sonra boya uzaklaştırma solüsyonunun (200 ml %95'lik Alkol, 50 ml Asetik Asit ve 250 ml Saf su) içinde bekletilerek boya uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık standardı olarak Ovotransferin (78 kDa), Albumin (66.3 kDa), Avalbumin (42.7 kDa), Karboanhidraz (30 kDa), Myoglobin (16.9 kDa), Sitokrom (12.4 kDa) kullanılmıştır.

3.2.5.9. Amino asit profilinin belirlenmesi

THP konsantratları olarak üretilen ürünlerde bulunan proteinlerin amino asit profilleri hidroliz ve türevlendirme ile UFLC-UV ve HPLC-FLD'de belirlenmiş olup, bu analizler hizmet alımı şeklinde TUBİTAK-MAM'da (D.05.G106 ve D.05.G418 işletme iç metodu) gerçekleştirilmiştir (Dimova, 2003; Maria ve ark., 2004; Gheshlaghi ve ark., 2008; Zhang, ve ark., 2009).

3.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Tekerrürlü (n=2) olarak elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Minitab programı kullanılmıştır. Verilerin karşılaştırılması ise two sample T-test ve one-way (ANOVA) testleri ile yapılmıştır.



Şekil 3.3. Protein konsantrat üretimi akış şeması

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakteri Suşlarının Seçimi ve Uygun Besiyeri Katkılarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında tek hücre protein (THP) konsantratlarının üretiminde kullanılacak olan laktik asit bakteri (LAB) suşlarının belirlenmesi amacı ile daha önceki bir araştırmada Ankara-Çubuk yöresinde üretilen geleneksel turşulardan izole edilerek genotipik olarak tanımlamaları yapılmış (Bağder Elmacı ve ark., 2015) ve bazı teknolojik-probiyotik özellikleri belirlenmiş (Tokatlı ve ark., 2015; Tokatlı ve ark., 2017) kültür koleksiyonunda bulunan yaklaşık 153 LAB suşu içerisinde THP üretimi için uygun olabileceği hücresel gelişim grafikleri, bazı hücre yüzey özellikleri ve tür farklılıkları dikkate alınarak 8 farklı LAB suşu (Çizelge 3.1) ön denemeler için seçilmiştir. THP üretimi için belirlenen 8 LAB suşu içerisinde uygun olan kültürlerin belirlenmesi aşamasında, MRS besiyerinde statik inkübasyonda hücre gelişimleri 96 saat boyunca her 24 saatte bir kültür ortamının optik yoğunlukları (OD_{600}) ölçülerek belirlenmiştir. Optik yoğunluk ölçüm sonuçları değerlendirilmeye alınarak THP üretimi açısından verimli olabileceği belirlenen 2 farklı LAB türü çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. *Lb. plantarum* MF4 suşu 24 saatlik inkübasyon sonucunda fermantasyon ortamında en yüksek optik yoğunluk (OD_{600} : 1.6) değeri elde edilirken benzer şekilde diğer *Lb. plantarum* suşlarında da 24 saat inkübasyon sürelerinde yüksek optik yoğunluk değerlerine ulaşılmıştır. *Lb. brevis* suşları ise 24 saatlik inkübasyon sonunda yaklaşık 1.50-1.55 optik yoğunluğa ulaşmıştır. *Lb. buchneri* MF163, *P. ethanolidurans* MF179, *E. casseliflavus* MF535 suşları ise daha uzun sürelerde (48-96. saat) en yüksek optik yoğunluğa ulaşırlarken özellikle *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* suşlarına kıyasla daha yavaş bir gelişme göstermiştir. Bu aşamada en kısa sürede ve en yüksek gelişme gösteren *Lb. plantarum* MF4 suşu ve farklı bir LAB türünün çalışmaya dahil edilmesi amacı ile de *Lb. brevis* MF343 suşu seçilerek çalışmanın sonraki aşamalarında THP üretimi için kullanılmıştır.

THP üretimi için seçilen *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşlarının hücre gelişimine etki edebilecek farklı şeker katkılarının etkisi de ön denemeler ile

belirlenmiştir. Şeker içermeyen MRS sıvı besiyeri içerisine şeker kaynağı olarak farklı oranlarda melas (%1-%2- %4), glikoz (%4) ve sakkaroz (%2) ilave edilerek hazırlanan modifiye MRS besiyeri (pH 6.2) karışımlarında statik inkübasyonla LAB kültürlerinin hücre gelişimleri optik (OD₆₀₀) olarak izlenmiştir. MRS sıvı besiyeri içerisine %1, %2 melas ve %4 glikoz ilave edilmiş örneklerde kontrol besiyerine (MRS) ile benzer bir mikrobiyal gelişme gözlemlenirken, %4 melas ve %2 sakkaroz ilave edilmiş besiyerlerinde bakteriyel gelişmenin biraz daha yavaş gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu ön denemeler sonucunda düşük miktarlardaki melas katkısının şeker içeriği düşük besiyerlerinde kullanılabileceği görüşüne varılmıştır. Glikoz içeriğinin ise normal MRS besiyerindeki limitlerinin (%2'nin) üzerine çıkarılmasının hücre gelişme hızına önemli bir katkı sağlamadığı düşünülmüştür.

Çalışmanın diğer bir aşamasında ise doğrudan besiyeri olabilecek bazı doğal bitkisel hammadde kaynakları denemelerde kullanılmıştır. Bu amaç için piyasadan temin edilen salatalık, elma ve şeker pancarı gibi bitkisel kaynakların suları katı meyve sıkacağı ile elde edilerek kaba filtreden geçirilmiş ve kurumadde oranları benzer olacak şekilde ayarlanarak doğrudan besiyeri olarak kullanılmıştır. LAB suşları ile %1 oranında inoküle edilen doğal besiyeri kaynakları (pH 6.2), 30°C'de 48 saat statik olarak inkübe edilerek mikrobiyal gelişimleri optik (OD₆₀₀) olarak izlenmiştir. Yapılan deneme sonucunda en uygun besiyeri olarak salatalık suyu belirlenmiş olup çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.2. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 Suşlarından THP Üretimi İçin Optimum Fermantasyon Koşullarının Belirlenmesi

Lb. plantarum MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşlarından verimli bir şekilde THP üretimi için optimum fermantasyon koşulları belirlenmiştir. Bu amaç ile yukarıda bahsedilen ön denemeler ile elde edilen gözlemler ışığında deneme planında MRS sıvı besiyeri ile birlikte kullanılmak üzere salatalık suyu doğal besiyeri kaynağı olarak seçilmiştir. Ayrıca doğal besiyeri kaynağının şeker içeriği melas ile zenginleştirilmiştir. Yapılan çalışmada deneme deseni içerisinde seçilen LAB suşları ile farklı besiyerleri ve bileşimleri [MRS (MR), Salatalık Suyu (SS), MRS+Salatalık Suyu (MS), ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları (25-30-35°C), farklı besiyeri başlangıç pH değerleri (pH

6.0-6.5-7.0) uygulanarak statik inkübatörde ve ayrıca optimum üretim şartları belirlendikten sonra çalkalamalı inkübasyon koşullarında (50 ve 200 rpm) fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar süresince aseptik olarak alınan kültür ortamında pH, toplam asitlik, biyokütle (g/L), toplam şeker (Antron) değişimleri takip edilmiştir. Yapılan tüm ölçümlere ait genel veri tablosu EK1 (statik) ve EK2’de (çalkalamalı) verilmiştir. Fermentasyonlar süresince elde edilen veriler aracılığı ile tüm fermentasyonlara ait kinetik parametreler de hesaplanmıştır. THP üretimi için kullanılan her bakteri suşu için optimum fermentasyon şartlarına, kinetik parametrelerden elde edilen veriler yoluyla karar verilmiştir. Böylelikle THP üretimi için kullanılacak her bir suşa ait uygun fermentasyon şartları (besiyeri, sıcaklık, pH, karıştırma) standardize edilmiştir.

4.2.1. Besiyeri çeşidi, besiyeri başlangıç pH değeri ve inkübasyon sıcaklığının fermentasyon parametrelerine etkisi

4.2.1.1. Asitlik ve pH

Laktik asit bakterilerinin hücre gelişimine ve hücre metabolitlerin üretimine etki eden besiyeri çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, besiyeri pH değeri, viskozite, oksijen, iz elementler, karbon kaynağı gibi birçok iç ve dış faktörler bulunmaktadır. Mikroorganizmalarda hücre çoğalması ile metabolit sentezi için gerekli mikrobiyal istekler farklı olabilmektedir (Lahtinen ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında öncelikli olarak optimum hücre gelişiminin sağlandığı, yani maksimum hücre üretiminin elde edilebileceği fermentasyon koşullarının belirlenmesi çalışmamızın temel basamaklarından birini oluşturmuştur. Mikroorganizmaların hücre gelişimi ve metabolit sentezi için ihtiyaç duyulan optimum bir pH aralığı olmakla birlikte türler ve cinsler arasında önemli pH istek farklılıkları bulunabilmektedir. Bu anlamda laktik asit bakterileri geliştikleri pH istekleri açısından seçicidir. Mikroorganizmaların pH istekleri aynı cinsler ve aynı türler arasında bile değişebilmekte çoğalma ortamının iç ve dış dinamiklerine göre de şekillenebilmektedir. *Lactobacillus* türlerinde üreme ortamında bulunan organik asitlerin farklılıkları hücrelerde pH isteklerini değiştirebilmektedir. Hücrelerin optimum olmayan pH değerine sahip besiyerlerinde kalmaları hücre içi madde transferini ve hücre metabolizmasının çalışmasını etkilemesinden dolayı gelişim olumsuz yönde etkilenebilmektedir (Temiz,

1999). Laktik asit bakterilerinin pH istekleri *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* türlerinde pH 4.0- pH 7.0 aralığında yer alabilmekte ve çoğunlukla pH 2.0 ve pH 3.0 gibi düşük değerlerde yeterli bir gelişim gerçekleşmemektedir (Kıran, 2006; Adnan ve Tan, 2007).

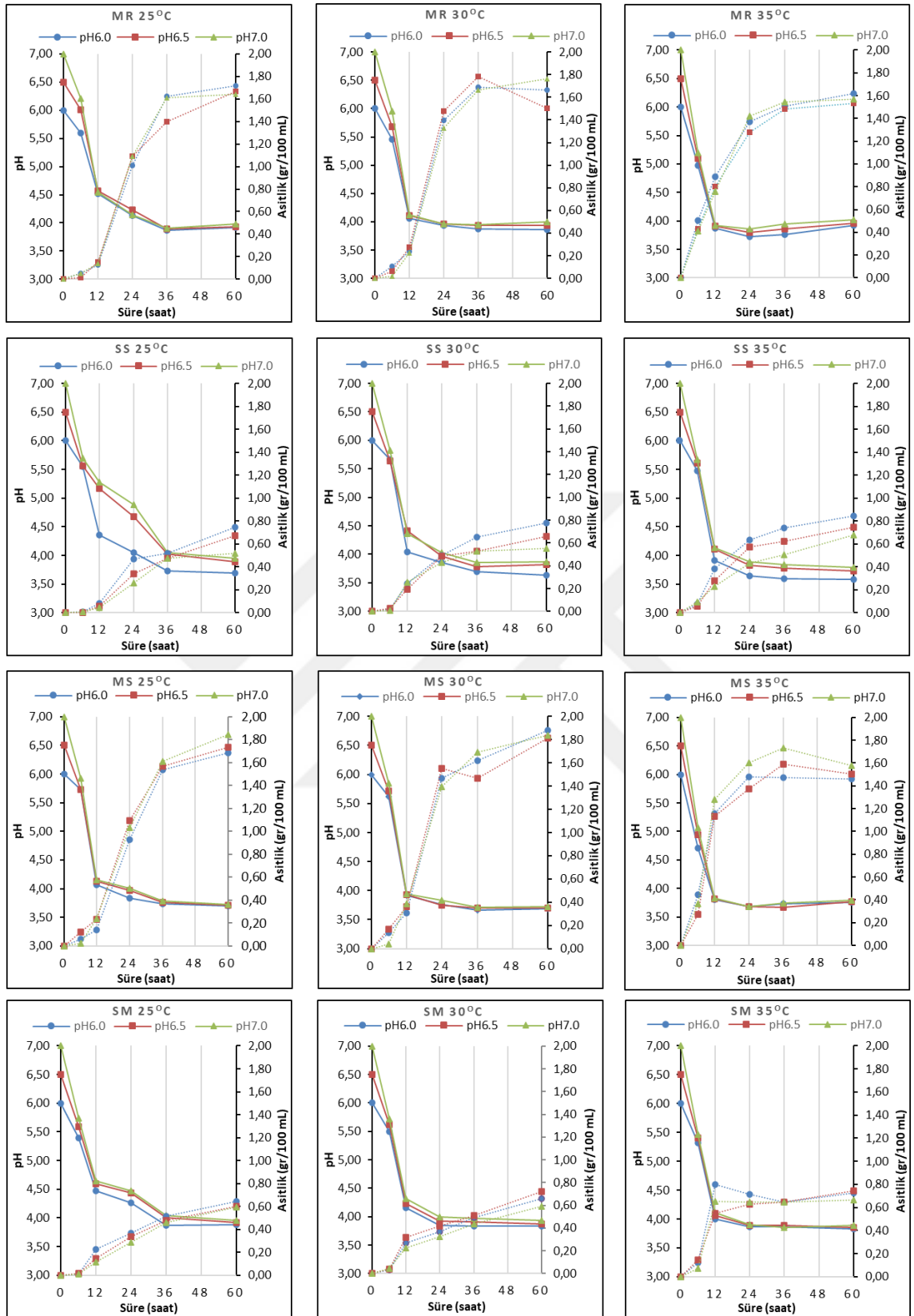
Çalışma kapsamında kullanılan besiyerlerinin (MR-SS-MS-SM) başlangıç pH değerleri belirlenirken (pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0) Tokatlı ve ark., (2017) tarafından daha önce yapılmış çalışmalarında elde edilen verilerden yararlanılarak en yüksek THP veriminin elde edileceği düşünülen üç farklı besiyeri başlangıç pH değeri (pH 6.0-pH 6.5-pH 7.0) çalışmada kullanılmıştır. Statik inkübatörde *Lb. plantarum* MF4 suşu ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince (60 saat) elde edilen pH değişimleri Şekil 4.1’de incelendiğinde, MR besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda 30°C ve 35°C inkübasyon sıcaklıklarında pH değerinin 25°C’de gerçekleştirilen fermentasyona kıyasla hızlı bir şekilde düşerek 12. saatte sırası ile pH 4.53-4.58 (25°C), pH 4.06-4.12 (30°C) ve pH 3.88-3.93 (35°C) aralığında ölçülmüştür. Fermentasyonun 12. saatinden sonra pH değerinde meydana gelen düşüşün 30°C ve 35°C’de gerçekleştirilen fermentasyonlarda daha stabil kaldığı Şekil 4.1’de gözlemlenmektedir. 25°C’de gerçekleştirilen fermentasyonda ise kültür ortamı pH değerinin diğer sıcaklıklara oranla daha yavaş bir şekilde azalarak 36. saate en düşük değerler olan pH 3.87-3.91 aralığına düştüğü belirlenmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak fermentasyon ortamlarında farklı sürelerde ölçülen pH değerlerindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Tüm sıcaklıklarda ilk 6 saatlik inkübasyon sonucunda besiyerlerinin başlangıç pH değerlerindeki farklılığa bağlı olarak ölçülen pH değerleri farklı bulunmuştur ($p<0.05$). MR besiyerinde 30°C ve 35°C’de 12. saat sonrası örneklerdeki pH düşüşü bir miktar daha devam ederek en düşük değere sırası ile pH 3.87 (36. saat) ve pH 3.73 (24. saat) ulaşmıştır.

Lb. plantarum MF4 suşu ile SS besiyerindeki fermentasyonlarda ulaşılan en düşük pH değerleri MR besiyerinden ulaşılan değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Başlangıç besiyeri pH değeri 6.0 olarak ayarlanan SS besiyerinde 25°C’de en düşük değer 36. saate pH 3.73; 30°C’de 60. saate pH 3.64; 35°C’de 24. saatte 3.65 olarak gerçekleşmiştir. SS besiyerinde tüm sıcaklıklarda da ulaşılan en düşük pH değerlerinin MR besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda elde edilen pH değerlerinden biraz daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer taraftan sıcaklık artışının pH

değerlerindeki azalmaya etkisi incelendiğinde MR besiyerindeki etkiye benzer bir durum gözlemlenmiştir. Genel olarak sıcaklık artışı ile pH değerindeki düşüş de hızlanmıştır. SS besiyerinde 35°C’de yürütülen fermentasyonda ilk 12. saatte ulaşılan pH değerlerinin 3.91-4.14 arasında gerçekleştiği ve diğer sıcaklıklarda ulaşılan değerlerden daha düşük olduğu bulunmuştur. Özellikle salatalık suyu içeren SS ve SM besiyerindeki pH değerindeki düşüşün, toplam asitlik miktarında elde edilen düşük değerlere rağmen diğer besiyerlerine oranla (MR, MS) daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum salatalık suyundaki tamponlayıcı maddelerin özellikle de protein ve peptid türevli bileşiklerin konsantrasyonunun düşük olması ile ilişkilendirilmiş olup, pH değerindeki ani düşüşler fermentasyonun başlangıç evrelerinde de gözlenmektedir.

Lb. plantarum MF4 ile MS besiyerinde pH değişim grafiği incelenecek olursa (Şekil 4.1), MR besiyerinde elde edilen pH değerlerindeki değişime benzer sonuçlar elde edilmiştir. MS besiyerinde (25°C) inkübasyonun ilk 12. saatine kadar hızla azalarak pH 4.07-pH 4.16 değerine ulaşmış ve daha sonraki süreçte pH düşüşü yavaşlayarak 60. saatte minimum pH değeri olan 3.70-3.73 değeri elde edilmiştir. MS besiyerinde 30°C ve 35°C’de fermentasyonun 12. saatinde elde edilen pH değerleri ise sırası ile 3.92-3.94 ve 3.81-3.83 olarak bulunmuş, 25°C 12. saatte ulaşılan pH değerinden daha düşük olarak gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan 35°C ‘de ilk 6. saatte meydana gelen pH düşüşü (pH 4.71- pH 5.07) diğer tüm fermentasyon şartlarına kıyasla oldukça hızlı gerçekleşmiştir. MS besiyerinde 30°C ve 35°C’de ulaşılan en düşük pH değerleri ise sırası ile 3.67-3.71 (36. saat) ve 3.69-3.69 (24. saat) olarak ölçülmüştür.

Lb. plantarum MF4 suşu ile SM besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlara ait pH değişimlerinde ise benzer şekilde düşük fermentasyon sıcaklık değerinde (25°C) 12. saate kadar meydana gelen düşüş sonrası fermentasyonun 36. saatinde en düşük seviyeye ulaşmıştır (pH 3.87- pH 4.04). SM besiyerinde 30°C ve 35°C’de ise en düşük pH değerleri 3.85-3.93 ve 3.83-3.89 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1. *Lb. plantarum* MF4 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen pH ve toplam asitlik değerleri.

Lb. brevis MF343 ile başlangıç pH değerleri farklı MR, SS, MS, ve SM besiyerlerinde farklı sıcaklıklarda statik inkübatörde gerçekleştirilen üretimlerde fermantasyon süresince (60 saat) ölçülen pH değerleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Şekil incelenecek olursa MR besiyeri kullanılarak farklı sıcaklıklarda inkübasyonlar ile elde edilen pH değerlerinin besiyeri başlangıç pH değerinden etkilendiği ve tüm sıcaklıklarda belirli bir fermantasyon süresine kadar farklı değerlerde seyrettikleri belirlenmiştir. Yüksek başlangıç pH değerine sahip besiyerlerinde fermantasyonla ulaşılan pH değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. MR besiyerinde 25°C’de 36. saate kadar sabit bir hızla düşen pH değerinin bundan sonra daha yavaş bir hızla düşerek tüm başlangıç besiyeri pH değerlerinde en düşük seviyeye 60. saatte (pH 4.54-pH 4.76) ulaştığı belirlenmiştir. MR besiyeri 30°C ve 35°C’lik inkübasyonlarda ise 24 saatte, 25°C’de elde edilen pH değerine kıyasla daha hızlı bir azalma göstererek 30°C’de pH 4.69-5.20; 35°C’de ise pH 4.72-5.17 aralığında ölçülmüştür. Bu sıcaklık değerlerinde elde edilen en düşük pH değerlerine ise 36. saatte ulaşılmış olup sırası ile pH 4.62-4.79 ve pH 4.56-4.69 aralığında belirlenmiştir.

SS besiyerinde *Lb. brevis* MF343 ile fermantasyon süresince ölçülen pH değerlerinde 24 saatlik süre sonunda ulaşılan pH değerinin 25°C’de mikrobiyal gelişme ile paralel olarak daha yüksek değerlerde (pH 4.83-pH 5.04), 30°C ve 35°C’de gerçekleştirilen inkübasyonlarda ise daha düşük düzeylerde (pH 4.50) kaldığı belirlenmiştir. SS besiyerinde fermantasyon ile ulaşılan en düşük pH değeri (pH 4.07, 30°C, 60. saat) diğer bakteri kültüründe elde edilen sonuçta olduğu gibi bu besiyerinde de düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Ancak *Lb. brevis* MF343 suşu ile SS besiyerinde ulaşılan en düşük pH değeri diğer kültür ile ulaşılan pH değerinden (pH 3.60) yüksek bulunmuştur.

MS besiyerinde ölçülen en düşük pH değerleri başlangıç besiyeri pH değeri 6.0 olan kültür ortamında 25°C’de 4.24 (60. saat); 30°C’de 4.26 (60. saat); 35°C’de ise 4.22 (36. saat) olarak elde edilmiştir. Sıcaklık artışı ile en düşük pH değerine ulaşma süresinin kısaldığı sonucu burada da görülmektedir. *Lb. brevis* MF343 suşu ile SS, MS ve SM besiyerlerinde fermantasyon süresince pH değerinde 6-12. saat aralığında düşüşte bir yavaşlamanın olduğu ve 12. saatten sonra tekrar hızlandığı grafiklerde görülmektedir. Bu durum özellikle salatalık suyunun kullanıldığı besiyerlerinde gözlemlenmesi kullanılan kültürün türü ile ilişkilendirilmiştir.

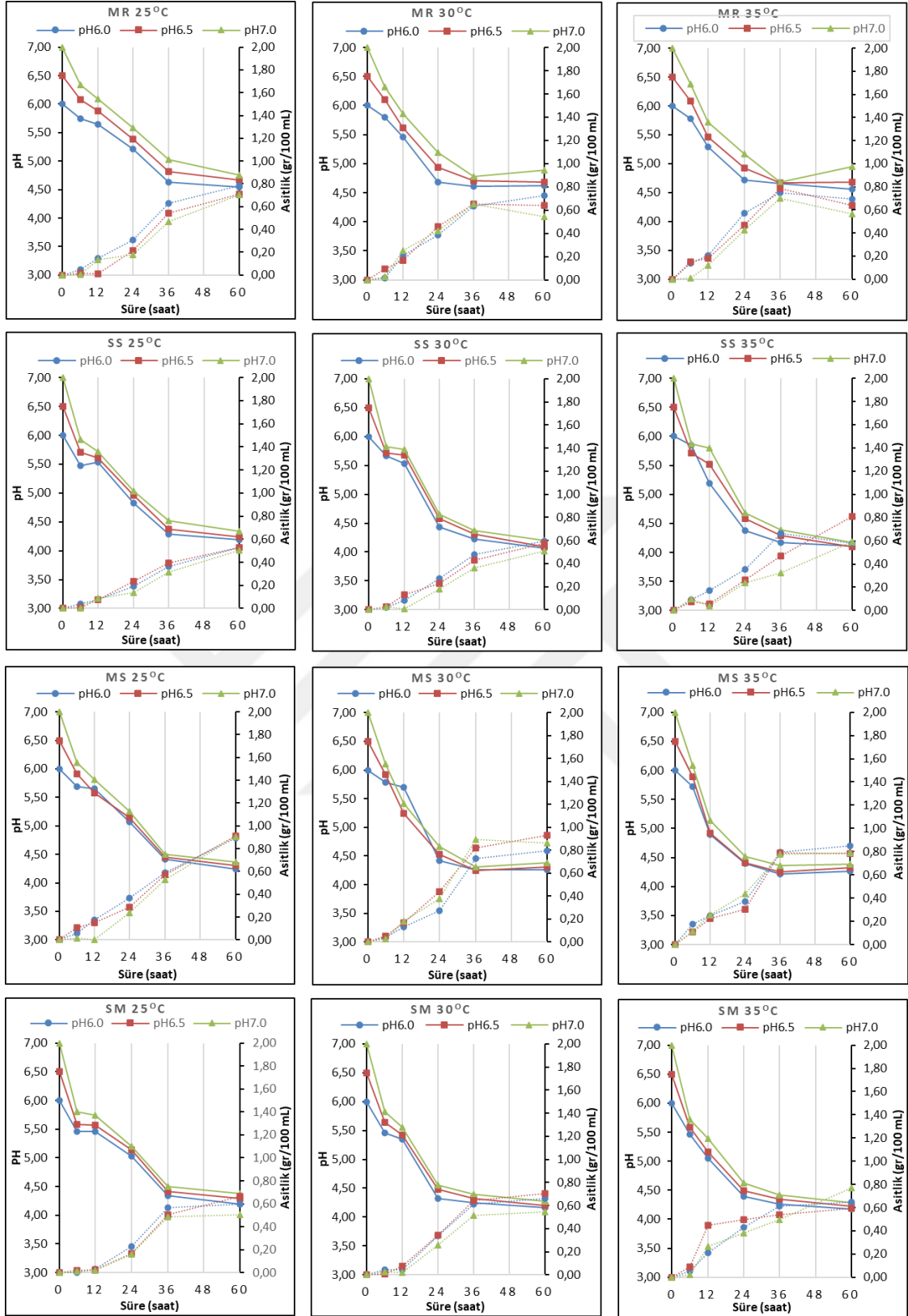
SM besiyerinde ölçülen en düşük pH değerleri ise 25°C'de 4.20 (60. saat); 30°C'de 4.17 (60. saat); 35°C'de ise 4.17 (60. saat) olarak elde edilmiştir. Genel olarak salatalık suyunun kullanıldığı SS, MS ve SM besiyerlerinde pH düşüşlerinin hızlı olduğu ve ulaşılan en düşük pH değerlerinin daha düşük kaldığı diğer kültür ile yapılan çalışmadaki sonuçta olduğu gibi burada da gerçekleşmiştir.

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında pH değişimleri incelendiğinde, 25°C'de gerçekleştirilen fermentasyonlarda meydana gelen pH düşüşleri diğer sıcaklıklara oranla daha yavaş gerçekleşmiştir. Yüksek sıcaklık değerleri özellikle laktik asit bakterilerinde optimum gelişme sıcaklığına daha yakın olmaları onların fermentasyon sonucunda ürettikleri laktik asit miktarındaki artışa bağlı olarak pH değerinde daha hızlı bir azalma ile kendini göstermektedir. Besiyeri başlangıç pH değerlerine göre fermentasyon ortamındaki pH değişimleri incelendiğinde ulaşılan en düşük pH değeri açısından besiyeri başlangıç pH değerleri önemli ölçüde bu sonucu etkilemedikleri gözlemlenmiştir. Diğer taraftan SS besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda başlangıç besiyeri pH değeri 6.0 olarak ayarlanan inkübasyonlarda pH değerinin diğer örneklerle göre daha hızlı düştüğü ve son pH değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Laktik asit bakteri gelişiminde ortam pH değerindeki değişimler özellikle tek hücre protein verimini etkileyen temel faktörlerden birisi olmaktadır. Besiyeri pH değerinde hızlı düşüşlerin yaşanması kesikli bir kültür ortamı için mikrobiyal üremenin yavaşlaması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak fermentasyonlar süresince kültür ortamlarındaki tüm pH değişim sonuçları özetlenecek olursa, *Lb. plantarum* MF4 suşu ile farklı başlangıç pH değerine sahip MR, SS, MS ve SM besiyerlerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında fermentasyon süresince ölçülen en düşük pH değeri, MR besiyerinde 3.73 ± 0.01 (35°C, pH 6.0, 24. saat); SS besiyerinde 3.60 ± 0.03 (35°C, pH 6.0, 36. Saat); MS besiyerinde 3.69 ± 0.02 (35°C, pH 6.0, 24. saat); SM besiyerinde 3.83 ± 0.01 (35°C, pH 6.0, 24. saat) olarak ölçülmüş ve değerler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). *Lb. brevis* MF343 suşu ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ise en düşük pH değeri, MR besiyerinde 4.23 ± 0.02 (25°C, pH 6.5, 24. saat); SS besiyerinde 4.07 ± 0.01 (30°C, pH 6.0, 60. saat); MS besiyerinde 4.22 ± 0.01 (35°C, pH 6.0, 36. saat); SM besiyerinde 4.17 ± 0.01 (30°C, pH 6.0, 60. saat) olarak ölçülmüş ve değerler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). *Lb. brevis* MF343

suşu ile tüm besiyerlerinde elde edilen en düşük pH değerlerinin *Lb. plantarum* MF4 ile elde edilen pH değerlerinden daha yüksek olduğu ve daha uzun sürede pH düşüşünün gerçekleştiği belirlenmiştir. Özellikle her iki bakteri suşu ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda SS besiyerlerinde ulaşılan pH değerlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.2. *Lb. brevis* MF343 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen pH ve toplam asitlik değerleri.

Laktik asit bakterileri şekerlerin fermentasyonu sonucunda temelde laktik asit üretmektedirler. Üretilen laktik asidin miktarı LAB cinsleri, türleri, besiyerinde bulunan şekerlerin tipi, fermentasyon koşulları gibi iç ve dış faktörlerin etkisi altındadır (Rodriguez-Couto ve Sanroman, 2006). Laktik asit üretimi aynı zamanda hücre gelişiminin bir fonksiyonu olarakta gerçekleşmekte ve hücrel yaşam döngüsünün temel bir metaboliti haline gelmektedir. LAB'nin metabolizması sonucu ayrıca diğer organik asitlerde üretilmektedir. Özellikle heterofermantatif LAB'inde laktik asit ile birlikte asetik asit, etanol, CO₂ gibi diğer yan ürünlerde oluşmaktadır (Carr ve ark., 2002; Hutkins, 2006). *Lb. plantarum* MF4 suşu ile MR besiyerinde 25, 30 ve 35°C'de laktik asit üretim miktarları Şekil 4.1'de incelendiğinde, ilk 12 saatlik süreçte asit üretim hızları sıcaklıktaki artışa paralel olarak yükselmiştir. İlk 12 saatte ulaşılan en yüksek toplam asitlik düzeyleri sıcaklıktaki artışa paralel olarak sırası ile %0.15, %0.28, %0.89 olarak bulunmuştur. MR besiyerinde 25°C'de en yüksek asitlik değeri 60 saatlik inkübasyon sonucunda başlangıç besiyeri pH 6.0 olan örnekte %1.71; 30°C'lik inkübasyonda 36. saatte başlangıç pH 6.5 olan örnekte %1.78; 35°C'de gerçekleştirilen inkübasyonda ise 60. saatte başlangıç pH 6.0 olan örnekte %1.62 olarak bulunmuştur. MR besiyerinde en yüksek asitlik miktarına (%1.78, p<0.05) 30°C'de 36. saatte ulaşılmıştır. Asitlik artışı diğer örneklerde çoğunlukla 60. saate kadar devam etmiştir.

SS besiyerinde *Lb. plantarum* MF4 ile elde edilen asitlik değerleri ise genel olarak SM besiyeri ile birlikte en düşük asitlik üretiminin gerçekleştiği besiyeri olmuştur (Şekil 4.1). SS besiyerinde tüm sıcaklıklarda asitlik artışı fermentasyon sonuna (60. saat) kadar devam etmiş ve en yüksek değerler 25°C'de %0.75 (pH 6.0); 30°C'de %0.78 (pH 6.0); 35°C'de %0.85 (pH 6.0) olarak bulunmuştur. 25°C ve 35°C'de ulaşılan değerler istatistiksel olarak benzer bulunmuşlardır (p>0.05). Ancak MR besiyerinde elde edilen en yüksek asitlik değerinden (%1.78) oldukça düşük kaldığı görülmektedir. Ayrıca SS besiyerinde zamana karşı asit üretim miktarlarındaki artışa ait grafik (Şekil 4.1) incelendiğinde besiyeri pH değerlerindeki değişim sonuçları ile benzer şekilde besiyeri başlangıç pH değerlerinin asit üretim miktarlarını etkilediği görülmektedir. Özellikle SS besiyeri başlangıç pH değeri 6.0 olan örneklerin tüm sıcaklık değerlerinde asit artış hızının ve ulaşılan asitlik düzeylerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

MS besiyerinde asit miktarındaki değişimler incelendiğinde (Şekil 4.1), 25°C ve 30°C’de 12. saatten sonra asitliğin hızlı bir şekilde artarak fermentasyonun sonuna (60. saat) kadar yükselişini sürdürmüş ve en yüksek seviyesine (sırası ile %1.85 ve %1.88) ulaşmıştır (p>0.05). Ancak 35°C’de gerçekleştirilen fermentasyonda başlangıç evrelerde asitlik artışı diğer sıcaklıklara kıyasla daha hızlı gerçekleşirken, ulaşılan en yüksek asitlik değeri 36. saatte %1.73 olarak bulunmuş ve diğer sıcaklıklarda ulaşılan değerlerden daha düşük (p<0.05) seviyede kaldığı görülmüştür. Ayrıca ilerleyen inkübasyon sürelerinde de asit miktarında bir miktar azalma gerçekleşmiştir. Bu durum, hızlı bir şekilde gerçekleşen mikrobiyal aktivite sonucu organik asitlerin hızla mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesine bağlanmıştır.

SM besiyerinde *Lb. plantarum* MF4 ile elde edilen sonuçların, SS besiyerinde elde edilen asitlik değerlerinde olduğu gibi en düşük asitlik üretiminin gerçekleştiği besiyeri olmuştur. 25 ve 30°C’de asitlikte meydana gelen artış 60. saate kadar devam ederek en yüksek seviyeleri olan sırası ile %0.64 ve %0.72 değerine ulaşmışlardır. Diğer taraftan 35°C’de ise 12. saatte asitlik maksimum değerine ulaşmıştır (%0.80).

Şekil 4.2 incelendiğinde, *Lb. brevis* MF343 suşu ile MR besiyerinde üretilen laktik asit miktarları *Lb. plantarum* MF4 suşu ile MR besiyerinde üretilen asit miktarlarının oldukça altında kalarak en yüksek seviyede asit üretimi 35°C (36. saat) ve 25°C’lik (60. saat) inkübasyonlarda sırası ile %0.79 - %0.79 olarak bulunmuştur (p>0.05). Bu değerler *Lb. plantarum* MF4 suşu ile SS ve SM besiyerinde ulaşılan değerler ile benzer bulunmuştur (p>0.05). Ayrıca 30°C ve 35°C’de gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyonun 36. saatinden sonra asit miktarlarının bir miktar azaldığı gözlemlenmiştir.

SS besiyerinde ise fermentasyonun sonuna kadar asitlik artışının tüm sıcaklıklarda devam ettiği ve en yüksek seviyesine 25°C, 30°C ve 35°C’de 60 saatlik inkübasyon sonunda sırası ile %0.53, %0.59, %0.81 değerine ulaştığı belirlenmiştir. SS besiyerinde elde edilen asit miktarları ise *Lb. plantarum* MF4 ile SS besiyerinde ulaşılan en yüksek değerlerden daha düşük bulunmuştur.

Benzer şekilde MS besiyerinde *Lb. brevis* MF343 ile elde edilen asitlik miktarları diğer bakteri suşunda MS besiyerinde elde edilen asitlik miktarından oldukça düşük bulunmuştur. Söz konusu besiyerinde 30°C ve 35°C’de asitlik artışı hızlı bir şekilde 36. saate kadar devam etmiş ve daha sonra artış hızları oldukça yavaşlamıştır. 25°C’de ise asit miktarındaki artış 60. saate kadar devam etmiştir (%0.91). Aynı şekilde 30°C ve 35°C’de 60. saatte ulaşılan en yüksek asit miktarları %0.93 ve %0.85 olarak elde edilmiştir. SM besiyerinde asit üretim miktarları Şekil 4.2’de incelendiğinde ilk 36. saat boyunca asitliğin arttığı bu süreden sonra ise daha sabit değerlerde devam ettiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak asit üretim grafikleri özetlenecek olursa; *Lb. plantarum* MF4 suşu ile farklı besiyeri, sıcaklık ve başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda deneme planından elde edilen en yüksek asit üretim miktarları MR besiyerinde 1.78 ± 0.01 (30°C, pH 6.5, 36. saat); SS besiyerinde 0.85 ± 0.01 (35°C, pH 6.0, 60 saat); MS besiyerinde 1.88 ± 0.02 (30°C, pH 6.0, 60. saat); SM besiyerinde ise 0.80 ± 0.10 (35°C, pH 6.0, 12. saat) olarak bulunmuştur. *Lb. plantarum* MF4 suşunun homofermantatif bir suş olması asit verimini özellikle MR ve MS besiyerlerinde oldukça yüksek olmasına sebep olmuş ve etkili bir asit üretimi ile sonuçlandırmıştır. *Lb. brevis* MF343 suşundan elde edilen en yüksek laktik asit üretim miktarları ise MR besiyerinde 0.79 ± 0.05 (35°C, pH 6.5, 36. saat); SS besiyerinde 0.81 ± 0.24 (35°C, pH 6.5, 60. saat); MS besiyerinde 0.93 ± 0.01 (30°C, pH 6.5, 60. saat) ve SM besiyerinde 0.77 ± 0.22 (35°C, pH 7.0, 60. saat) olarak elde edilmiştir. *Lb. brevis* MF343 suşunun kullanıldığı fermentasyonlarda asit üretim miktarları diğer suşa oranla oldukça düşük kalmış ve bu durum *Lb. brevis* MF343 suşunun heterofermantatif bir suş olması ile ilişkilendirilmiştir. Laktik asit bakterilerinde heterofermantatif iz yolu ile laktik asit üretim verimi azalırken CO₂ ve alkol gibi diğer metabolitlerin sentez oranı artmaktadır. Diğer taraftan *Lb. brevis* MF343 suşu ile asit üretiminde salatalık suyu ilave edilmiş besiyerlerinde ulaşılan asit miktarlarının MR besiyeri ile aynı ve bazı besiyerlerinde bir miktar daha fazla olduğu belirlenmiştir. Besiyeri farklılıkları bu suş için asit üretim yeteneğini çok önemli bir düzeyde etkilememiştir. LAB özellikle laktik asit üretimi için yaygın bir şekilde kullanılan kültürlerdir. *Lb. plantarum* suşları asit üretim hızı ve yetenekleri açısından en bilinen türler arasında yer almaktadır (Tokatlı ve ark., 2017). Yapılan bazı çalışmalarda laktik asit bakterilerinde asit üretim miktarları incelendiğinde, Tokatlı ve ark., (2017), *Lb.*

plantarum suşlarında 24 saatlik inkübasyonda %0.29 - %1.31 ve 48 saatlik inkübasyonda %0.69 - %1.60; *Lb. brevis* suşlarında 24 saatlik inkübasyonda %0.16 – %0.39, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise %0.59 - %0.81 olarak belirlemişlerdir. Çon ve Karasu (2009), *Lb. plantarum* suşunun asit üretim miktarlarını %1.6 - %1.95 aralığında, çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile benzer bulmuşlardır. Diğer taraftan Cheriguene ve ark., (2006); *Lb. paracasei* (%0.39 - %0.76), *Lb. plantarum* (%0.55 - 0.68), *Lb. rhamnosus* (%0.75 - %0.80) suşlarında asit üretim düzeyleri ölçmüşlerdir. Herreros ve ark., (2003) çalışmalarında *Lb. plantarum* suşlarında %0.19 – %0.21, *Lb. brevis* suşlarında ise %0.19 - %0.23 olarak bizim çalışmamızda elde edilen değerlerden oldukça düşük bulmuşlardır. Fermantasyonda kullanılan *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* türlerinin suş düzeyindeki farklılığı, kullanılan besiyerleri ve fermantasyon şartlarının ve sürelerinin farklı olması diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile aralarında farklılıklar oluşturmaktadır.

4.2.1.2.Şeker ve Biyokütle

Lb. plantarum MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile farklı besiyerleri, farklı besiyeri başlangıç pH değeri ve farklı sıcaklıklarda statik inkübatörde gerçekleştirilen fermantasyonlarda elde edilen toplam şeker ve biyokütle miktarlarındaki değişimler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Ayrıca tüm statik inkübatörde fermantasyonlarda elde edilen veriler standart sapmaları ile birlikte EK 1’de yer almaktadır. Yapılan tez çalışmasının ana hedefleri arasında yer alan ve yüksek miktarlarda verimli biyokütle üretimini amaçlayan fermantasyon denemelerinde şeker tüketim hızlarına ve ortam değişkenlerine (suş, sıcaklık, besiyeri, pH) bağlı olarak farklı seviyelerde biyokütle üretim sonuçları elde edilmiştir. Burada şeker tüketim miktarları hücre (biyokütle) oluşumu için harcanmakla birlikte diğer hücresel metabolitlerin sentezi (laktik asit, CO₂, etil alkol vb.) ve hücresel enerjinin karşılanması gibi diğer unsurlar tarafından da belirlenmektedir. *Lb. plantarum* MF4 suşu tarafından MR besiyerinde şeker kullanım ve biyokütle oluşum grafikleri Şekil 4.3’de incelendiğinde, tüm inkübasyon sıcaklıklarında fermantasyonun ilk 12. saatinde maksimum biyokütle seviyelerine ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca MR besiyerinde ilk 6 saatlik sürede sıcaklık artışına paralel olarak ulaşılan biyokütle miktarlarının yükseldiği belirlenmiştir. Buna göre fermantasyonun 12. saatinde MR besiyerinde 25°C’de 2.24 g/L; 30°C’de 2.47 ve 35°C’de 2.52 g/L en yüksek biyokütle miktarları elde edilmiştir (p<0.05). Biyokütle miktarları 30°C ve 35°C’de 24

saatlik inkübasyonlarda 12. saatten sonra fermentasyonun sonuna doğru bir miktar azaldığı belirlenmiştir. Bu durum yüksek sıcaklık derecelerinde hızlı mikrobiyal üreme sonucunda ortamdaki bulanıklılık kaynağı hücrelerin hızlı otolizi sonucunda parçalanarak optik yoğunlukta (OD_{600}) bir miktar azalmaya sebep olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu azalma 25°C’de gözlemlenmemiş ve düşük sıcaklıkta ölçülen hücre kuru ağırlığı değerleri sabit bir şekilde fermentasyon sonuna kadar devam etmiştir. Biyokütle miktarlarındaki değişim şeker tüketimi ile paralel bir azalma sergilemiş ve en yüksek biyokütle miktarlarına ulaşılan 12. saate toplam şeker içerikleri 12.28 g/L (25°C), 10.49 g/L (30°C) ve 9.35 g/L (35°C) olarak gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Fermentasyon sonunda ise kalan şeker miktarları 25°C’de 2.39-1.81 g/L; 30°C’de 1.36-1.17 g/L ve 35°C’de 1.00-0.30 g/L aralığında bulunmuştur. Fermentasyon ortamında kalan şeker miktarları inkübasyon sıcaklık artışına bağlı olarak azalmıştır.

SS besiyerinde *Lb. plantarum* MF4 suşu ile elde edilen biyokütle ve toplam şeker miktarlarına ait sonuçlar Şekil 4.3’de incelenecek olursa besiyeri başlangıç pH değerlerinin inkübasyonlar süresince toplam biyokütle miktarı sonuçlarına etki ettiği belirlenmiş ve özellikle pH 6.0 başlangıç değerine sahip denemelerde tüm sıcaklıklarda ulaşılan biyokütle miktarının daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. SS besiyerinde başlangıç pH 6.0 olan örneklerde 25°C’de 36. saatte 1.83 g/L ($p<0.05$); 30°C’de 36. saatte 1.93 g/L ve 35°C 24. saatte 1.95 g/L olarak bu besiyerinde en yüksek biyokütle miktarlarına ulaşılmıştır. Bu besiyerinde de sıcaklık artışı ile birlikte elde edilen biyokütle miktarlarının arttığı görülmektedir. SS besiyerinde en yüksek biyokütle miktarına ulaşılan kültür ortamında ölçülen toplam şeker içerikleri ise 25°C’de 6.51 g/L; 30°C’de 4.61 g/L ve 35°C’de 9.77 g/L olarak farklı çıkmıştır ($p<0.05$). SS besiyerinde tüm sıcaklıklarda 60 saat sonunda kalan toplam şeker miktarları 3.25-5.54 g/L arasında değişmektedir. MR besiyeri fermentasyonunda 60 saatte kalan şeker içerikleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak daha fazla şekerin fermentasyon bitiminde ortamda kaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum salatalık suyunda bulunan şeker kompozisyonunun çok farklı olması ve bulunan tüm şekerlerin *Lb. plantarum* MF4 suşu tarafından fermente edilemediğini düşündürmektedir. Ayrıca SS besiyerinde üretilen asit ve biyokütle miktarlarındaki düşüklükte bunun sebepleri arasında gösterilebilmektedir. Şekil 4.3 incelendiğinde SS besiyerinde tüm sıcaklıklarda 12.-24. saatler arasında toplam şeker içeriklerindeki azalmanın yavaşladığı ve 24. saatten sonra tekrar şeker tüketiminin

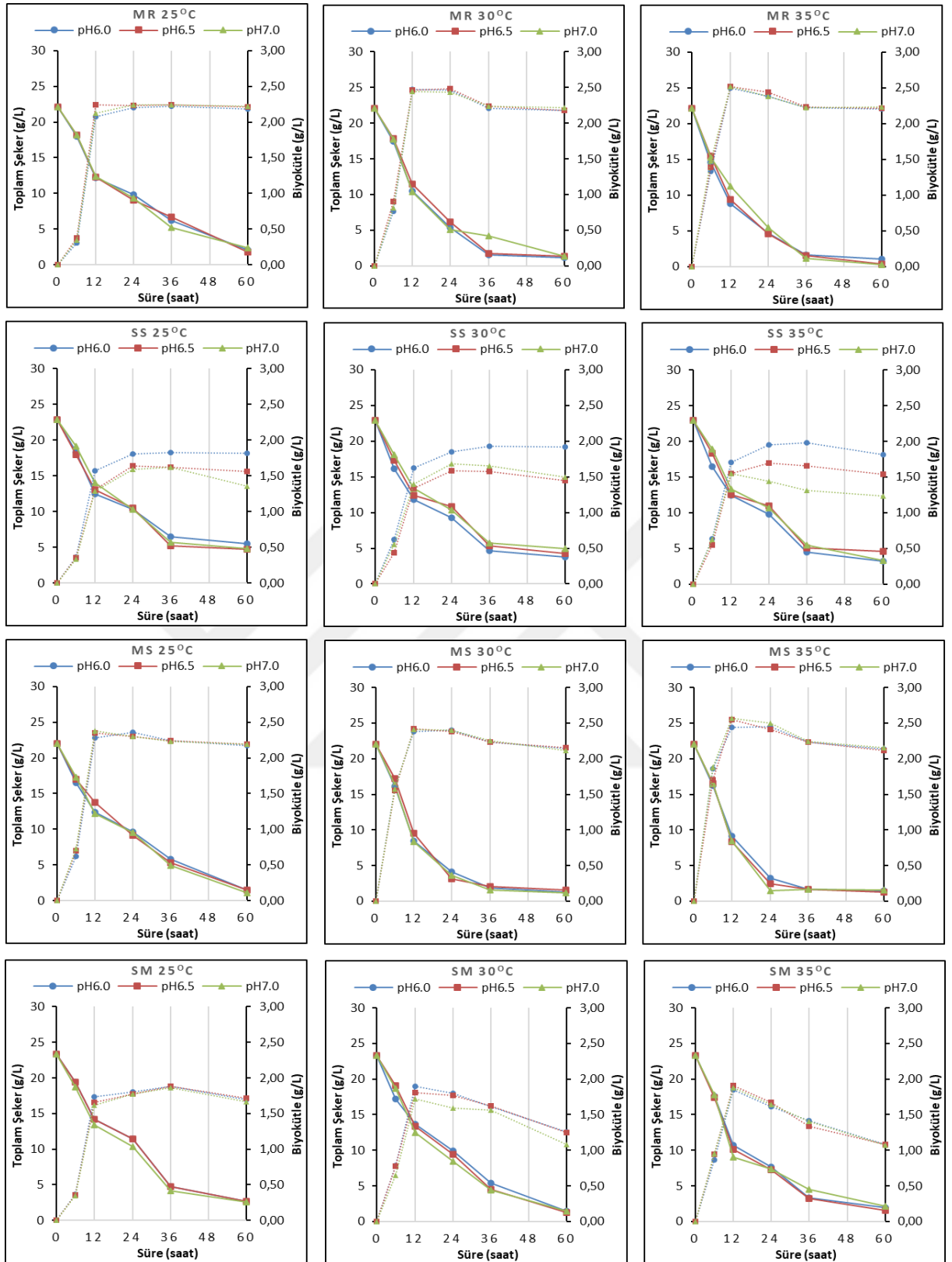
hızlanması SS besiyerinde karşılaşılan bir eğilim olmuştur. Bu durumun yine SS besiyerindeki farklı şeker kaynaklarının kullanım sıralamasından kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Lb. plantarum MF4 ile MS besiyerinde ise MR besiyerinde elde edilen sonuçlara benzer biyokütle ve şeker tüketim değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.3). MS besiyerinde de ilk 12 saatlik inkübasyon sonucunda her üç sıcaklık değerinde maksimum biyokütle miktarına ulaşılırken, 25°C’de ulaşılan biyokütle miktarı (2.38 g/L, pH 7.0) bu besiyerinde diğer sıcaklıklarda elde edilen değere göre daha düşük kalmıştır ($p<0.05$). 30 ve 35 ise en yüksek biyokütle miktarları elde edilmiş ve sırası ile 2.42 g/L (pH 6.5) ve 2.57 g/L (pH 7.0) olarak bulunmuştur. Bu sıcaklık değerlerinde elde edilen biyokütle miktarı ile tüm deneme planı kapsamında her iki bakteri suşu içerisinde en kısa sürede ulaşılan en yüksek değerler olmuştur. Özellikle 35°C ulaşılan yüksek biyokütle değerleri tüm başlangıç pH değerlerindeki örnekler için de geçerli olmuştur. Ayrıca 35°C’de MS besiyerinde başlangıç besiyeri pH değeri 6.5 olan denemede de ölçülen biyokütle miktarı (2.55 g/L) istatistiksel olarak en yüksek değer ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$). MS besiyerinde de inkübasyon sıcaklığındaki artış biyokütle miktarında artışa sebep olmuştur. Ayrıca sıcaklık artışına bağlı olarak fermentasyonun sonuna doğru bir miktar biyokütle azalması gözlemlenmektedir. MS besiyerinde toplam şeker içeriklerindeki değişime bakılacak olursa, en yüksek biyokütle miktar sonuçlarının alındığı inkübasyonun 12. saatinde örneklerdeki şeker içerikleri her üç sıcaklıkta sırası ile 12.18 g/L (25°C), 9.57 g/L (30°C) ve 8.46 g/L (35°C) olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı şekilde üç farklı sıcaklıkta MS besiyerinde fermentasyon sonunda (60. saat) kalan şeker içerikleri ise sırası ile 1.03-1.44 g/L (25°C), 1.14-1.56 g/L (30°C), 1.32-1.59 g/L (35°C) aralığında hesap edilmiştir. Kalan şeker içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak SS besiyerinde 60. saatte hesaplanan kalan şeker miktarlarından ise daha düşük bulunmuştur.

SM besiyerinde *Lb. plantarum* MF4 ile maksimum biyokütle miktarlarına 25°C’de 36. saatte (1.88 g/L), 30°C (1.90 g/L) ve 35°C (1.91 g/L) ise 12. saatte ulaşılmıştır. SM besiyerinde üç inkübasyon sıcaklıklarında ulaşılan en yüksek değerler istatistiksel olarak benzer ($p>0.05$) bulunurken MR ve MS besiyerinde ulaşılan biyokütle değerlerden daha düşük bulunmuştur. Ancak SM besiyerinde 25°C’de yüksek biyokütle değerlerine 36

saatlik daha uzun sürelerde erişilmiştir. Ayrıca *Lb. plantarum* MF4 suşu ile SM besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda 30°C ve 35°C'lik inkübasyon gruplarında 12. saatten sonra diğer besiyerlerinden farklı olarak biyokütle miktarlarında çok daha fazla bir düşüş yaşanmıştır. Bu durumun sebebi olarak salatalık suyu içerisinde katkı olarak kullanılan melasın fermentasyon sonucunda oluşturduğu bileşiklerin otoliz sürecini hızlandırmasına bağlanmıştır. SM besiyerinde tüm sıcaklıklardaki fermentasyon sonunda kültür ortamında kalan şeker miktarları ise 1.23-2.73 g/L arasında değişmektedir.





Şekil 4.3. *Lb. plantarum* MF4 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen biyokütle ve toplam şeker değerleri

Lb. brevis MF343 suşu tarafından MR, SS, MS ve SM besiyerlerinde toplam şeker ve biyokütle miktarlarındaki değişim grafikleri Şekil 4.4’de, veri tabloları ise EK1 de verilmiştir. Genel olarak *Lb. brevis* MF343 ile MR ve MS besiyerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonlarda elde edilen biyokütle miktarlarının *Lb. plantarum* MF4 suşu ile gerçekleştirilen denemelerde elde edilen biyokütle miktarlarından daha düşük kaldığı görülmektedir. Ancak SS ve SM besiyerlerinde *Lb. brevis* MF343 suşu ile ulaşılan maksimum biyokütle miktarları diğer bakteri suşunun bu besiyerlerinde elde edilen biyokütle miktarlarından biraz daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. *Lb. brevis* MF343 suşunun heterofermantatif karakterde oluşu kullanılan şekerlerin daha verimsiz olarak hücre biyokütlesine dönüşümüne sebep olmuştur. MR besiyerindeki sonuçlara bakılacak olursa en yüksek biyokütle değerleri 2.08 g/L (25°C, 36. saat); 2.16 g/L (30°C, 24. saat); 2.18 (35°C, 24. saat) olarak bulunmuştur. MR besiyerinde fermantasyon sonunda kalan şeker miktarı ise büyük miktarda azalarak 0.29-1.37 g/L arasında değişmiştir.

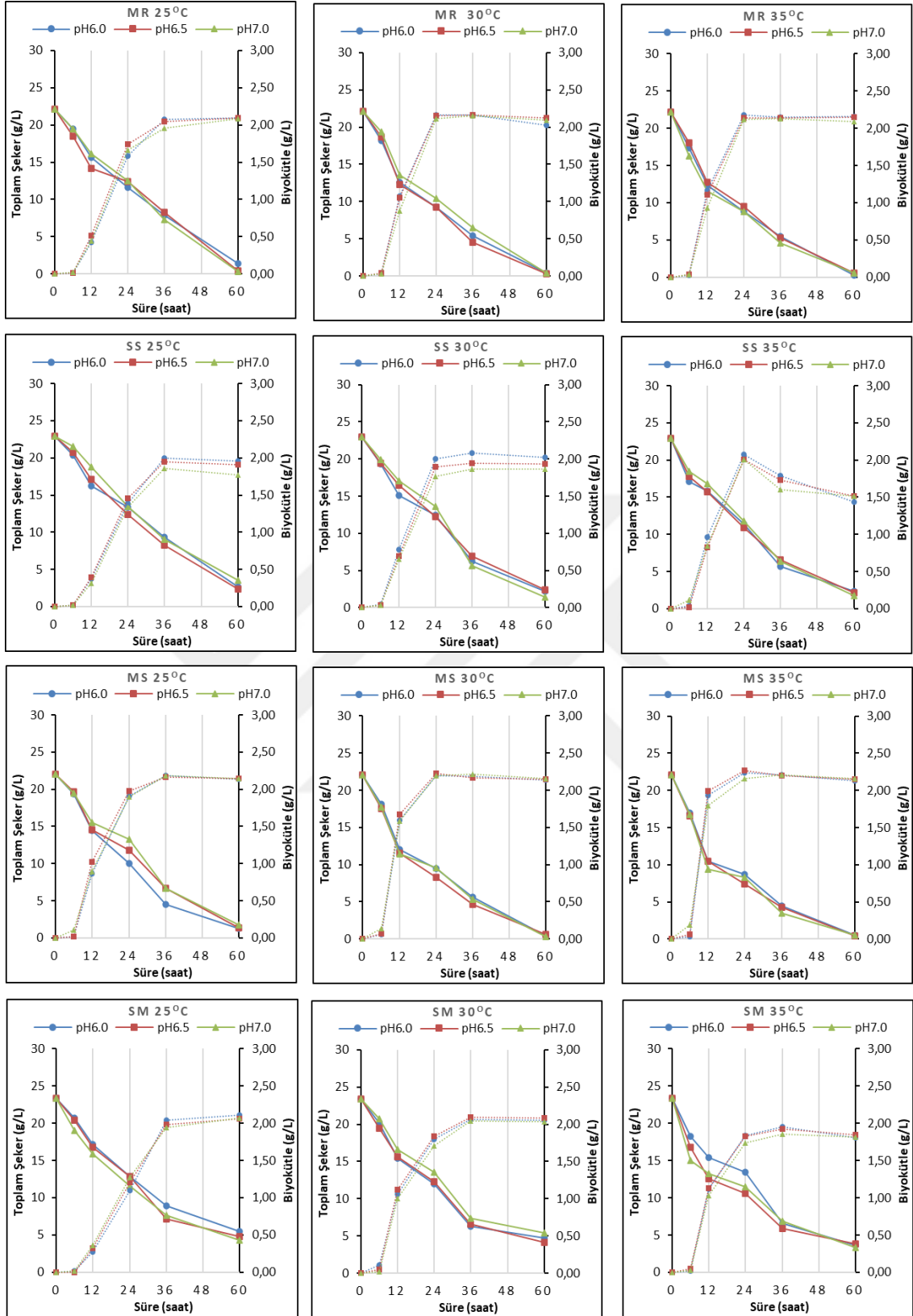
Lb. brevis MF343 ile SS besiyerinde en yüksek biyokütle miktarına 25°C’de 2.00 g/L (36. saat); 30°C’de 2.08 g/L (36. saat); 35°C’de 2.07 g/L (24. saat) olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar ile *Lb. plantarum* MF4 suşu ile SS besiyerinde elde edilen maksimum biyokütle miktarından biraz daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SS besiyerinde fermantasyon sonunda kalan şeker miktarları ise 1.42-3.59 g/L aralığında yer almıştır. Bu değerler *Lb. brevis* suşunun SS besiyerinde diğer suşa göre şeker kullanımı açısından daha başarılı olduğunu göstermiştir.

Lb. brevis MF343 ile MS besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyonlarda en yüksek biyokütle miktarları 25°C’de 2.18 g/L (36. Saat); 30°C’de 2.23 g/L (24. Saat) ve 35°C’de ise 2.27 g/L (24. saat) olarak gerçekleşmiştir. MS besiyerinde 35°C inkübasyonda en yüksek biyokütle miktarına 24 saatte ulaşılmıştır ($p<0.05$). Özellikle MS besiyerinde MR besiyerinden farklı olarak ilk 12 saate ulaşılan biyokütle miktarı yüksek düzeylerde ölçülmüştür. MS besiyerindeki fermantasyonlar sonunda kalan şeker miktarı 0.39-1.79 g/L aralığında değişmiştir.

Lb. brevis MF343 ile SM besiyerinde en yüksek biyokütle değerleri 25°C’de 2.09 g/L (60. Saat); 30°C’de 2.09 g/L (36. Saat) ve 35°C’de ise 1.95 g/L (36. saat) olarak gerçekleşmiştir. *Lb. brevis* MF343 ile SM besiyerinde elde edilen en yüksek biyokütle

miktarları *Lb. plantarum* MF4 suşu ile SM besiyerinde elde edilen maksimum biyokütle miktarından biraz daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SM besiyerinde fermantasyon sonunda kalan şeker miktarları ise 3.36-5.52 g/L aralığında yer almıştır. Bu değerler *Lb. brevis* suşunun SM besiyerinde şeker kullanım açısından oldukça yetersiz kaldığını göstermiştir. *Lb. brevis* MF343 suşunun daha önceki çalışmada (Bagder ve ark., 2015) sakkaroz şeker fermantasyon sonucunun negatif olması bu durumun açıklanmasına yardımcı olmaktadır. SM besiyeri içerisine ilave edilen melas içerisindeki şekerlerin belli bir miktarını sakkarozun oluşturması kalan şeker yüksekliğini desteklemektedir.





Şekil 4.4. *Lb. brevis* MF343 suşu için farklı besiyerleri [MRS, MRS+Salatalık Suyu (MS), Salatalık Suyu (SS) ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince ölçülen biyokütle ve toplam şeker değerleri.

Tüm besiyerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonlardan elde edilen biyokütle sonuçları özetlenecek olursa; *Lb. plantarum* MF4 suşu ile farklı besiyeri, sıcaklık ve başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen denemelerde elde edilen en yüksek biyokütle miktarları MR besiyerinde 2.52 ± 0.04 g/L (35°C, pH 6.5, 12. saat); SS besiyerinde 1.95 ± 0.03 (35°C, pH 6.0, 24. saat); MS besiyerinde 2.57 ± 0.01 g/L (35°C, pH 7.0, 12. saat); SM besiyerinde ise 1.91 ± 0.01 g/L (35°C, pH 6.5, 12. saat) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ile *Lb. plantarum* MF4 suşu ile en yüksek biyokütle üretimi (2.57 g/L) 35°C'lik inkübasyonda MS besiyerinde gerçekleşmiştir. Ancak istatistiksel olarak MR besiyerinde ulaşılan değer (2.52 g/L) ile benzer bulunmuştur ($p > 0.05$). Ayrıca MR ve MS besiyerlerinde *Lb. plantarum* MF4 ile ulaşılan en yüksek biyokütle miktarları *Lb. brevis* MF343 suşunda bu besiyerlerinde elde edilen değerlerden yüksek çıkmıştır. *Lb. brevis* MF343 suşu ile tüm fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen denemelerde ise elde edilen en yüksek biyokütle miktarları MR besiyerinde 2.18 ± 0.02 g/L (35°C, pH 6.0, 24. saat); SS besiyerinde 2.07 ± 0.01 (35°C, pH 6.0, 24. saat); MS besiyerinde 2.27 ± 0.01 (35°C, pH 6.5, 24. saat); SM besiyerinde ise 2.09 ± 0.04 (30°C, pH 6.5, 36. saat) olarak bulunmuştur. Böylece *Lb. brevis* MF343 suşu ile en yüksek biyokütle üretimi (2.27 g/L) 35°C'lik inkübasyonda MS besiyerinde gerçekleşmiştir. Laktik asit bakterileri ile ilgili yapılmış olan diğer çalışmalarda fermantasyonlarda ulaşılan biyokütle miktarları farklı sonuçlar vermektedir. Mikroorganizma gelişim hızlarının türler arasında çok farklılaşmasının yanında kullanılan besiyeri türlerinin ve kompozisyonlarının farklılığı, fermantasyon sıcaklıkları ve fiziksel durumundaki farklılıklar gibi etkilere dolaylı da elde edilen biyokütle miktarları az veya çok farklı olabilmektedir. Valencia-Garcia ve ark., (2018) kendi izole ettikleri LAB'lerinden *Lb. plantarum* suşunda 32°C'de MRS besiyerinde 12 saatlik inkübasyon sonucunda 6.40 g/L biyokütle elde etmişlerdir. Dumbrepatil ve ark., (2008) *Lb. delbrueckii* spp. *del.* suşunun normal ve mutant (UC-3) formları ile yeast ekstrakt ve melas katkılı besiyerinde gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda yeast ekstraktlı besiyerinde normal suş ile 4.5-5.8 g/L; mutant suş ile 5.8-9.8 g/L biyokütle miktarı elde ederlerken, melas kullanarak hazırladıkları besiyerinde ise mutant suş ile 2.7-15.0 g/L biyokütle miktarlarına ulaşmışlardır. Babazadeh ve ark., (2014) *Lb. plantarum* ile THP üretim amacı ile atık suları kullanarak yaptıkları çalışmalarda ise yaklaşık 3.56-4.55-5.75 g/L biyokütle miktarı elde etmişlerdir. Nancip ve ark., (2015) hurma meyvesi işleme atıklarından *Lb. casei* subsp. *rhannosus* kültürü ile kesikli ve geri beslemeli fermantasyonlar ile yaptıkları bir çalışmada, geri beslemeli denemelerde yaklaşık 8.3-

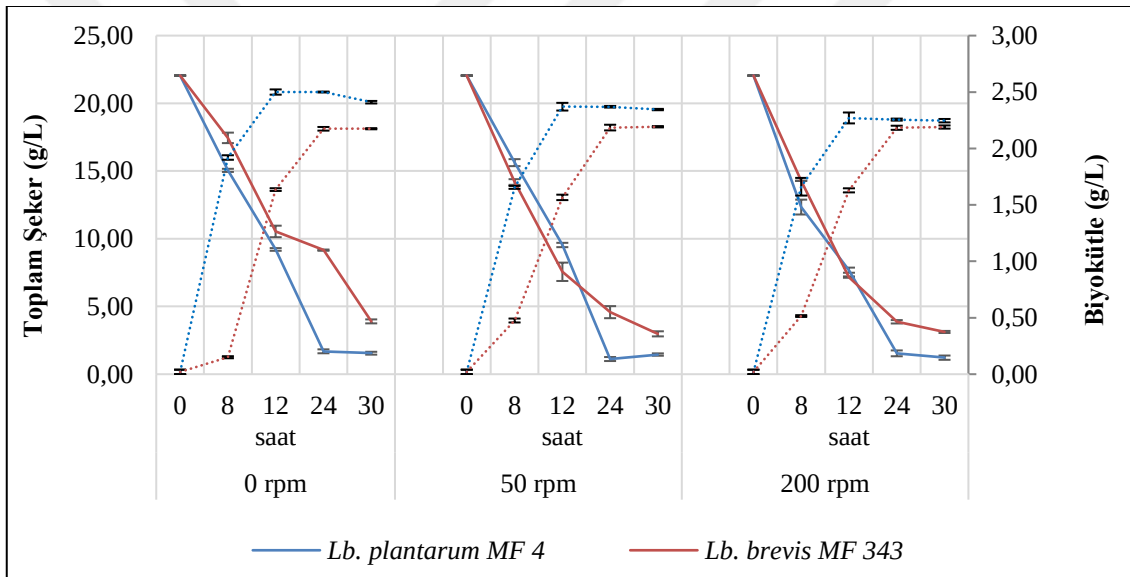
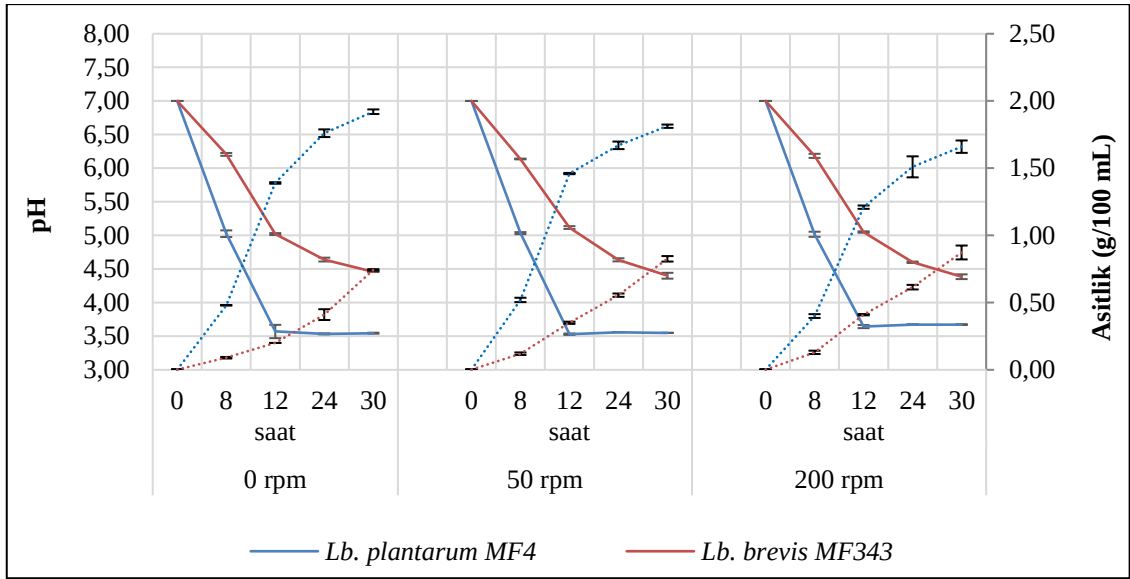
11.8 g/L biyokütle üretimi gerçekleştirmişlerdir. Waoo ve Dixit (2018) *Lb. acidophilus* kültürü ile nar ve portakal atıklarını MRS besiyeri ile karıştırarak 28°C’de 7 gün süresince yaptıkları THP üretimlerinde portakal katkılı besiyerinde 3.2 g/L ve nar katkılı besiyerinde se 5.4 g/L biyokütle elde edebilmişlerdi. Başka bir çalışmada Kam ve ark., (2012) balık işleme fabrikası atık sularından hazırladıkları besiyerinde *Lb. acidophilus* kültürü ile THP üretimleri gerçekleştirmişler ve kontrol besiyerinde yaklaşık 3.0-6.0 g/L, atık su besiyerinde ise yaklaşık 5.0-8.0 g/L biyokütle miktarı ölçmüşlerdir. Rezvni ve arkadaşlarının 2017 yılında peynir altı suyu (PAS) kullanarak hazırladıkları besiyerinde *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lc. Lactis*, *Lb. delberuckii*, *Lb. fermentum* ile 37°C’de 52 saat süre ile 50 rpm çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirdikleri kesikli fermantasyonlarda kinetik parametrelerini incelemişler ve sırası ile çalıştıkları kültürlerde biyokütle miktarlarını farklı inkübasyon süreleri sonunda maksimum 5.2 g/L, 4.3 g/L, 3.9 g/L, 3.2 g/l, 3.5 g/L olarak bulmuşlardır. Soro-Yao ve ark., (2014) ise *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus spp.* ile MRS besiyerinde 30°C’de 18 saatte gerçekleştirdikleri inkübasyonlarda biyokütle miktarlarını sırası ile 3.39 g/l, 3.39 g/L, 3.49 g/L, 3.40 g/L olarak bildirmektedirler. Altıok (2004) LAB’de kinetik modelleme konusunda yaptığı tez çalışmasında *Lb. casei* suşunun PAS ile hazırlanmış farklı besiyerlerinde 37°C’de biyokütle miktarını en yüksek yaklaşık 8 g/L olarak bulmuştur. Bomrungnok ve ark., (2012) tek basamaklı laktik asit üretimi ile ilgili çalışmalarında nişasta katkılı MRS besiyerinde 200 rpm karıştırma hızlarında sürekli fermantasyon ile 2.86-2.44 g/L biyokütle ve ayarlanmış şartlarda ise 12 g/L oldukça yüksek biyokütle miktarları elde etmişlerdir. Bizim yaptığımız tez çalışması kapsamında *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu ile MS besiyerinde 35°C’de elde edilen en yüksek biyokütle miktarları sırası ile 2.57 g/L (12 saat) ve 2.27 g/L (24 saat) olarak elde edilmiş ve bu değerlerin yukarıda bahsedilen çalışmalarda elde edilen değerlerden bir miktar düşük kaldığı belirlenmiştir. Ancak bizim çalışmamızda en yüksek biyokütle değerlerinin elde edildiği sürelerin oldukça kısa olduğu görülmektedir. Bu durum daha çok hammaddelerde bulunan şeker içeriklerinin miktarlarındaki farklılıklardan ve ortam pH değerlerinin ayarlanması ile değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca endüstriyel anlamda bir fermantasyon prosesinde biyokütle üretim miktarları irdelenirken daha çok o prosese ait fermantasyon kinetik parametrelerinin dikkate alınması gerekmektedir.

4.2.2. Çalkalamalı inkübasyonun fermentasyon parametrelerine etkisi

Statik inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda deneme deseni kapsamında elde edilen veriler ışığında, ulaşılan en yüksek biyokütle üretimi *Lb. plantarum* MF4 suşu ile 2.57 g/L (12 saat, 35°C) ve *Lb. brevis* MF343 suşu ile 2.27 g/L (24 saat, 35°C) olarak bulunmuş ve statik şartlardaki fermentasyon koşulları belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında her iki bakteri suşunda elde edilen en yüksek biyokütle miktarlarında artış sağlayabilmek için çalkalamalı inkübasyon şartlarında denemeler planlanmıştır. Bu amaçla statik şartlarda ideal besiyeri ve fermentasyon koşullarının belirlendiği MS sıvı besiyerinde (pH 7.0) *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile farklı çalkalama hızlarında (0-50-200 rpm) 35°C’de fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve fermentasyon süresince (0-30. saat) belirli aralıklarla numune alınarak statik inkübasyonda olduğu gibi fermentasyon parametreleri (pH, toplam asit, biyokütle, toplam şeker) takip edilmiştir (Şekil 4.5 ve Ek1). Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda elde edilen veriler ışığında yine bu deneme planına ait kinetik parametrelerde (spesifik gelişme hızı; μ , hücre verimi-Yx/s, hacimsel verimlilik-V_{px}) ortaya konmuştur. Karıştırma işleminin çalkalama şeklinde gerçekleştirilmesi ucuz ve basit bir sistem olmakla birlikte besiyeri viskozitesine bağlı olarak etkin bir karıştırma sağlama konusunda yetersiz kalabilmektedir. LAB’nin fermentasyonlarda çok fazla oksijen ihtiyacının bulunmaması havalandırılmalı ve kuvvetli bir karıştırma ihtiyacı doğurmamaktadır. Çalkalama işlemi özellikle ısının ve substratların homojen bir şekilde kültür ortamına dağıtılması açısından önem arz etmektedir (Henzler ve Schedel, 1991).

Şekil 4.5’de *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşlarının farklı çalkalama hızlarında fermentasyon ortamında pH değerlerindeki değişim incelenecek olursa, *Lb. plantarum* MF4 suşu ile ilk 12 saatlik sürede pH değerinde hızlı bir düşüş yaşanarak kontrol grubunda (0 rpm) pH 3.57 değerine, 50 rpm’de pH 3.53, 200 rpm’de ise pH 3.64 değerine düştüğü belirlenmiştir. Diğer taraftan *Lb. brevis* MF343 suşunda meydana gelen pH değişimleri daha yavaş bir hızla gerçekleşmiş olup en düşük pH değerine fermentasyonun 30. saatinde ulaşılarak 0 rpm için pH 4.46, 50 rpm için pH 4.40, 200 rpm için pH 4.39 olarak bulunmuştur. Çalkalama işlemi *Lb. plantarum* MF4 suşunda ulaşılan pH değerinde önemli bir fark yaratmazken ($p>0.05$), *Lb. brevis* MF343 suşunda çalkalama işlemi ile ulaşılan pH değerinin bir miktar düşük olduğu ve farkın önemli

olduğu görülmektedir ($p<0.05$). İnkübasyonlardaki asit üretim miktarları incelenecek olursa *Lb. plantarum* MF4 suşu ile yapılan üretimde hem kontrol grubunda hem de çalkalamalı grupta fermantasyon süresi boyunca (30. saat) asit üretimi devam ederek 0 rpm'de %1.92, 50 rpm'de %1.81 ve 200 rpm'de %1.66 değerine ulaştığı belirlenmiştir. Asit üretim miktarlarının çalkalama hızı arttıkça azaldığı görülmekte ve sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Çalkalamalı inkübasyonlarda *Lb. brevis* MF343 ile elde edilen asit üretim sonuçlarında ise farklı olarak üretim miktarlarının çalkalama işlemi ile bir miktar artış sağlandığı sonucu elde edilmiştir. Böylelikle en yüksek asit üretiminin 50 rpm ve 200 rpm çalkalama hızlarında (%0.87 ve %0.83) gerçekleştiği bulunmuştur. Ancak *Lb. brevis* MF343 suşu ile üretilen asit miktarlarının statik inkübasyon sonuçlarında olduğu gibi *Lb. plantarum* MF4 suşu ile üretilen asit miktarlarının çok altında kaldığı görülmektedir. Çalkalamalı fermantasyonlarda elde edilen biyokütle miktarlarında *Lb. plantarum* MF4 suşunda en yüksek seviyelerde üretim gerçekleşirken *Lb. brevis* MF343 suşunda statik inkübasyonlarda olduğu gibi biraz daha düşük biyokütle miktarları daha geç fermantasyon sürelerinde elde edilmiştir. Buna göre *Lb. plantarum* MF4 suşunda ulaşılan en yüksek biyokütle miktarına (2.50 g/L) 0 rpm çalkalama hızında yani kontrol örneğinde 12. saatte ulaşılmıştır ($p<0.05$). *Lb. plantarum* MF4 suşunda çalkalama hızındaki artış ile asit üretiminde olduğu gibi bir miktar azalma meydana gelmiştir. Bu suş ile en düşük biyokütle üretimleri benzer olarak 50 rpm (2.37 g/L) ve 200 rpm (2.27 g/L) çalkalama hızında 12. saatte elde edilmiştir ($p>0.05$). Diğer taraftan *Lb. brevis* MF343 suşunda çalkalamalı inkübasyonlarda elde edilen biyokütle oranları kontrol (0 rpm) ve çalkalamalı şartlarda (50-200 rpm) aynı seviyelerde benzer değerlerde bulunmuştur (2.19 g/L). Her iki bakteri suşu ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda 30. saatte kültür ortamında kalan toplam şeker içerikleri ise 3.90-1.22 g/L aralığında değişmiştir. Sonuç olarak statik şartlarda optimize edilmiş fermantasyon koşullarda çalkalama işleminin kültür ortamına uygulanması, biyokütle miktarlarında önemli bir artış sağlamamıştır. *Lb. plantarum* MF4 suşunda çalkalama işlemi biyokütle miktarını azaltırken, *Lb. brevis* MF343 suşunda ise biyokütle miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmamıştır. Bu sebeple verimli THP üretimi için fermantasyon koşullarının belirlenmesinde çalkalama işleminin biyokütle sentezine etkisiz olduğu kararına varılmıştır.

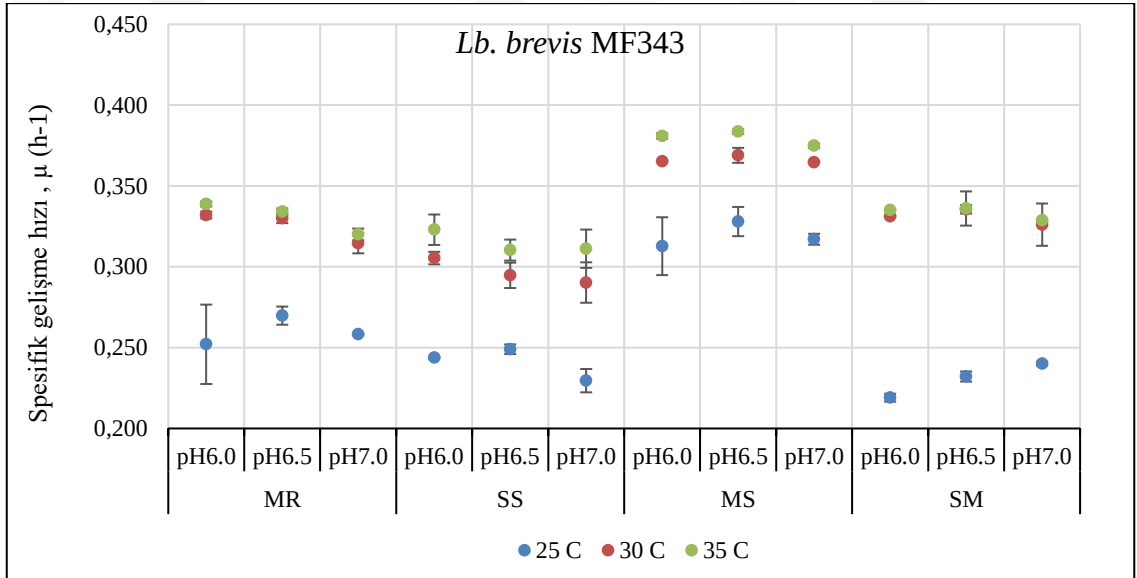
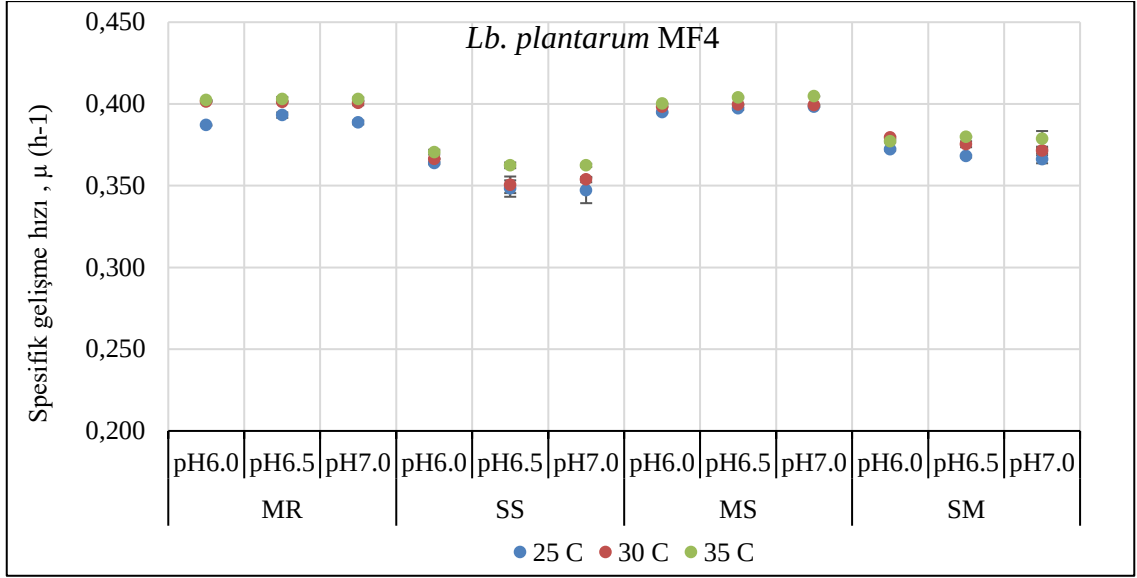


Şekil 4.5. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu ile MS besiyerinde (35°C, pH 7.0) çalkalamalı inkübatörde 0 rpm, 50 rpm ve 200 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübsyon süresince ölçülen pH, toplam asit, biyokütle ve toplam şeker değerleri.

4.2.3. Fermentasyon kinetiği parametrelerinin THP üretimi için değerlendirilmesi

Spesifik gelişme hızı (μ) mikroorganizmalar için belirli şartlar altında gerçekleşen biyokütle artışlarındaki kültür ortamına bağlı bir kinetik parametredir. Yani hücrelerin belirli şartlarda ve belirli bir kültür ortamında saatte biyokütle artış oranlarını vermektedir. Bu bakımdan spesifik gelişme hızları mikroorganizmaların kendine özgü

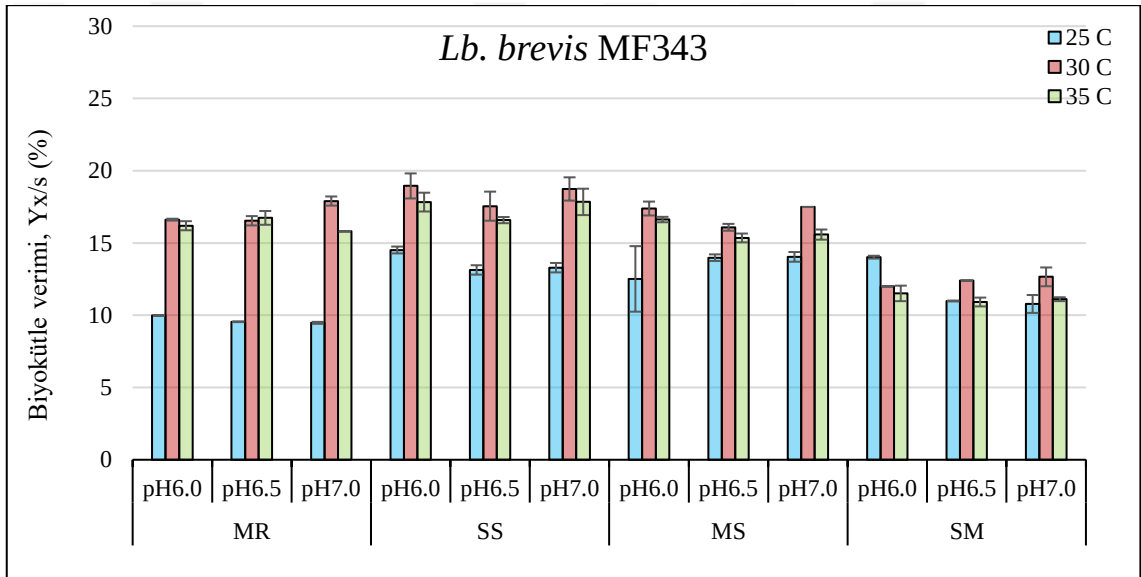
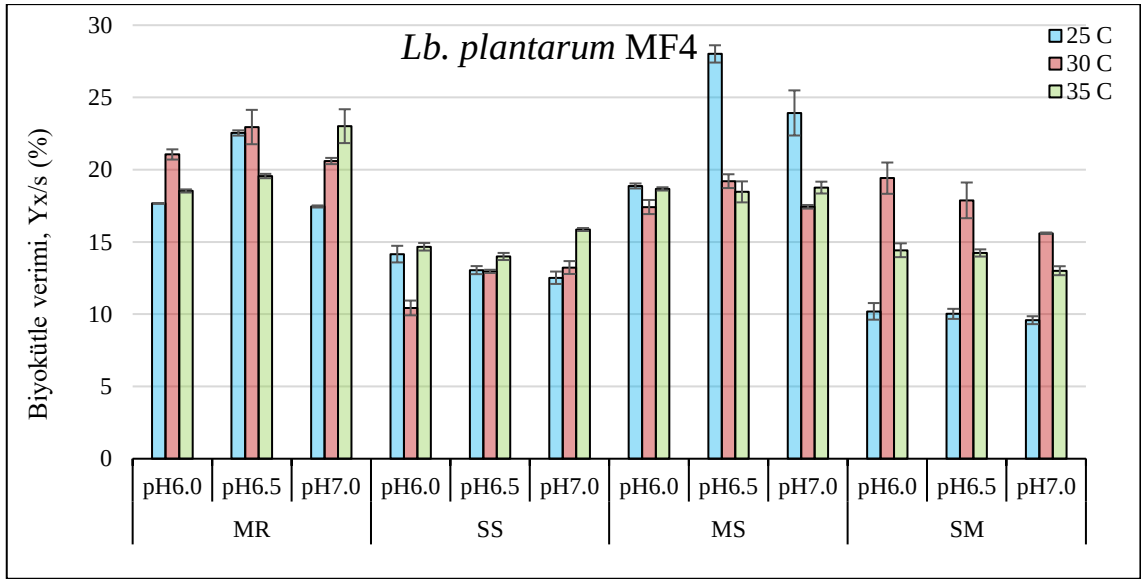
gelişmelerini ifade eden sabit bir değerdir. Biyokütle miktarındaki artış hem aktif ve logaritmik evredeki hücreleri hemde ölü hücrelerin hepsini kapsamaktadır. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile statik şartlarda farklı besiyerleri (MR, SS, MS, SM), farklı sıcaklıklar (25°C, 30°C, 35°C) ve farklı besiyeri başlangıç pH (6.0, 6.5, 7.0) değerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonların 12. saatine kadar olan sürelerdeki biyokütle miktarları (g/L) dikkate alınarak yöntem kısmında belirtilen formül kullanılarak hesap edilen spesifik gelişme hızları (μ) Şekil 4.6 ve EK 4'te verilmiştir. *Lb. plantarum* MF4 suşu için hesaplanan spesifik gelişme hızları MR ve MS besiyerlerinde daha yüksek bulunurken özellikle SS besiyerinde hesaplanan spesifik gelişme hız değerlerinin daha düşük kaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan tüm besiyerlerinde inkübasyon sıcaklığındaki artış ile spesifik gelişme hızlarında bir miktar yükselme gözlemlenmektedir. Buna göre MR besiyerinde en yüksek spesifik gelişme hızı 30 ve 35°C'de ortalama 0.403 h^{-1} , SS besiyerinde 35°C'de 0.370 h^{-1} , MS besiyerinde 35°C'de 0.405 h^{-1} , SM besiyerinde 0.380 h^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu değerler içerisinde MR ve MS besiyerlerinde elde edilen spesifik gelişme hızlarının birbirine benzer ve en yüksek değerler olduğu görülmektedir. Inkübasyon sıcaklık değerinin 35°C olması spesifik gelişme hızlarına olumlu bir etki etmiştir. Diğer taraftan *Lb. plantarum* MF4 suşu ile MS besiyerinde 35°C'de çalkalamalı inkübasyonlarda elde edilen spesifik gelişme hızları Şekil 4.9'da incelendiğinde karıştırma hızının spesifik gelişme hızına katkı sağlamadığı ve kontrol grubuna (0 rpm) kıyasla bir miktar düşürdüğü belirlenmiştir. 50 ve 200 rpm karıştırma hızlarında elde edilen spesifik gelişme hızları 0.394 h^{-1} olarak benzer bulunmuştur ($p>0.05$). *Lb. brevis* MF343 suşu ile statik inkübasyon şartlarında gerçekleştirilen fermantasyonlara ait grafik Şekil 4.6'da incelenecek olursa, tüm besiyerlerinde 25°C'de hesaplanan spesifik gelişme hızlarının diğer sıcaklıklara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. *Lb. brevis* MF343 suşu ile MS besiyerinde hesaplanan gelişme hızı 35°C'de en yüksek değere (0.384 h^{-1}) ulaşmıştır. Ayrıca MS besiyerinde 30°C'de elde edilen gelişme hızları da diğer besiyerlerinde elde edilen hızlardan daha yüksek bulunmuştur. *Lb. brevis* MF343 ile 50 ve 200 rpm karıştırma hızlarında ise (Şekil 4.9) kontrol grubuna (0 rpm) göre benzer gelişme hızları (0.367 h^{-1}) elde edilmiştir ($p>0.05$). Ancak *Lb. brevis* MF343 suşu ile elde edilen en yüksek spesifik gelişme hızı (0.384 h^{-1}) değerinin *Lb. plantarum* MF4 suşu ile elde edilen değerden (0.405 h^{-1}) düşük kaldığı görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.6. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu için statik fermantasyonlarda 12. saatte elde edilen spesifik gelişme hızı (μ) değerleri.

Biyokütle verimi ($Y_{x/s}$), fermantasyonlarda hücrenin birim substrat başına oluşturduğu ürünlerin miktarı olarak tanımlanmaktadır. Substratların ne kadarının hücreye veya metabolitlere dönüştürüldüğünün önemli bir göstergesidir. Tür farklılıkları, substrat farklılıkları veya koşullardaki değişimler bu verimi etkileyebilmektedir. Biyokütle üretimlerinde teorik verim değerlerine yaklaşma önemli olmaktadır. Ancak bir endüstriyel üretim sürecinde tek başına ürün verim değerleri yeterli olmamakta, aynı zamanda hacimsel verimlilik (V_p) değerlerinin dikkate alınması gerekmektedir.

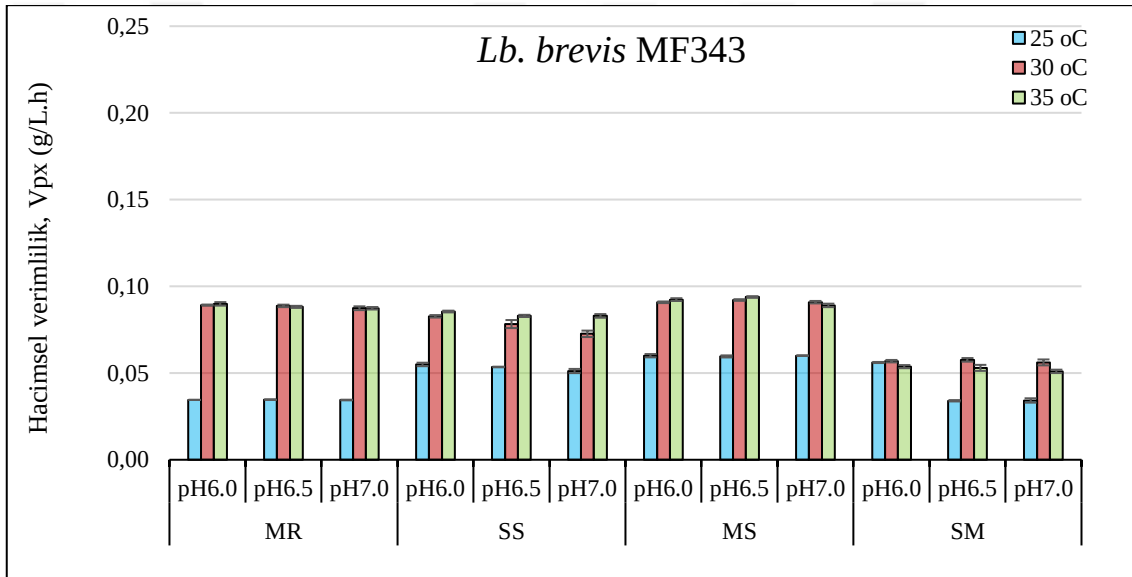
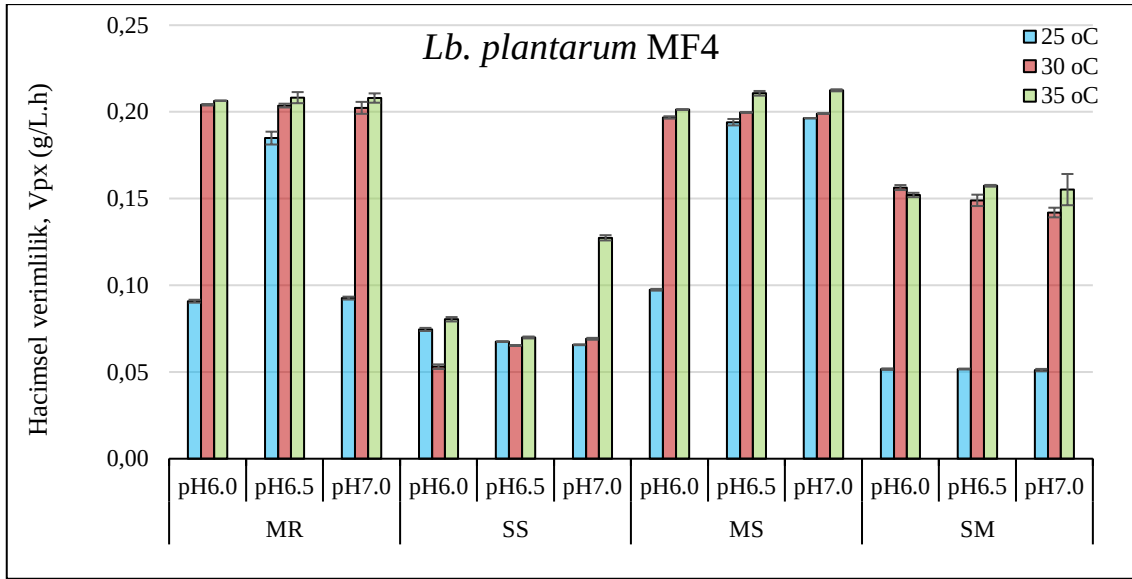
Biyokütle verimi ortamdaki kullanılabilir maliyetli substratların ne kadar etkin bir şekilde hücreye dönüştürüldüğünün önemli bir göstergesi olmaktadır. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile statik şartlarda farklı besiyerleri (MR, SS, MS, SM), farklı sıcaklıklar (25°C, 30°C, 35°C) ve farklı besiyeri başlangıç pH (6.0, 6.5, 7.0) değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonların en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerle ait hesap edilen biyokütle verimleri (Yx/s) Şekil 4.7 ve EK 4'te yer almaktadır. Şekil 4.7 incelendiğinde *Lb. plantarum* MF4 suşu ile MS besiyerinde 25°C'de en yüksek biyokütle verim değerine (%28.01) ulaşıldığı bulunmuştur. MS besiyerinde en yüksek biyokütle değerine ulaşılan 35°C'de ise biyokütle verimi ortalama %18 olarak hesap edilmiştir. Diğer taraftan MR besiyerinde elde edilen verim değerleri SS ve SM besiyerlerine kıyasla yüksek çıkmıştır. *Lb. brevis* MF343 suşunda ise SS besiyerinde elde edilen verim değerlerinin biyokütle miktarı ile ters olarak biraz daha yüksek olduğu bulunmuştur. En yüksek biyokütle miktarına ulaşılan MS besiyerinde 35°C'de verim değeri ortalama %16 olarak hesap edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde hesap edilen biyokütle verimleri (Yx/s) ise Şekil 4.9'da verilmiştir. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için 50 ve 200 rpm çalkalama hızları biyokütle veriminde herhangi bir artış sağlamamış ve kontrol grubuna göre (0 rpm) daha düşük çıkmıştır. Özellikle 200 rpm hızındaki verim düşüşü oldukça fazla olmuştur.



Şekil 4.7. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu için statik fermantasyonlarda en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki biyokütle verimi ($Y_{x/s}$) değerleri.

Hacimsel verimlilik (V_p), birim zamanda birim hacimden alınan ürün miktarı olarak ifade edilmektedir. Bu değer özellikle endüstriyel üretim süreçlerinde üretim verimliliğinin belirlenmesinde önemli bir parametre olmaktadır. Hacimsel verimlilik özellikle saflaştırma basamağının bulunduğu THP üretimi veya enzim üretimi gibi biyoteknolojik süreçlerde maliyeti belirleyen temel bir veri sağlamaktadır. Hacimsel verimliliğin yüksek olması gerek üretim süresinin kısa olması hem de üreten sıvı içerisindeki etken maddenin konsantrasyonu anlamında avantaj sağlamaktadır. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile statik şartlarda farklı besiyerleri (MR, SS, MS, SM), farklı sıcaklıklar

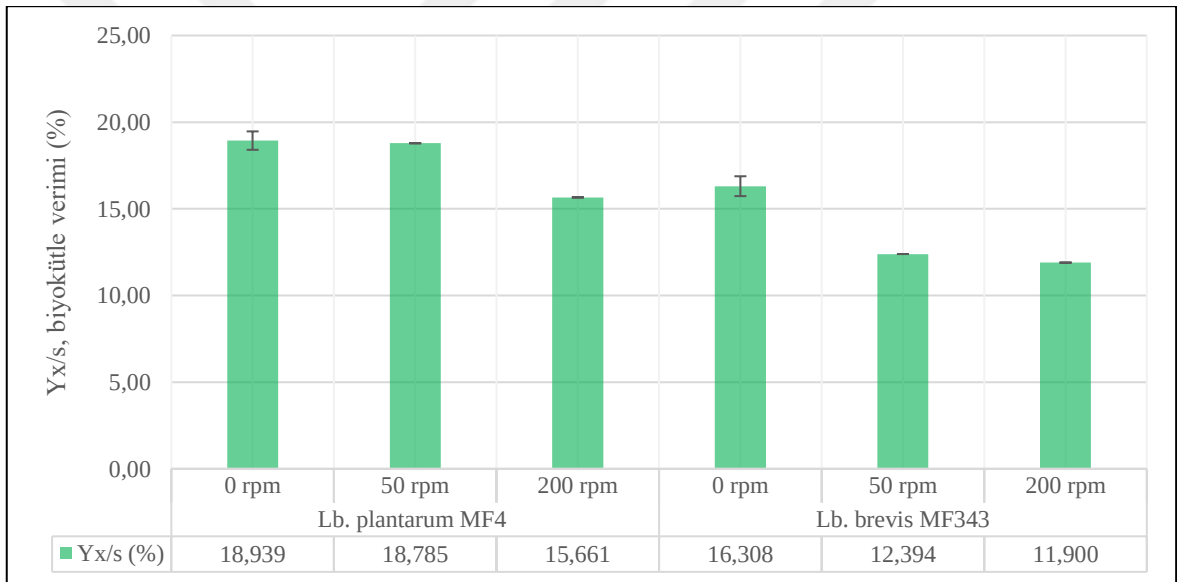
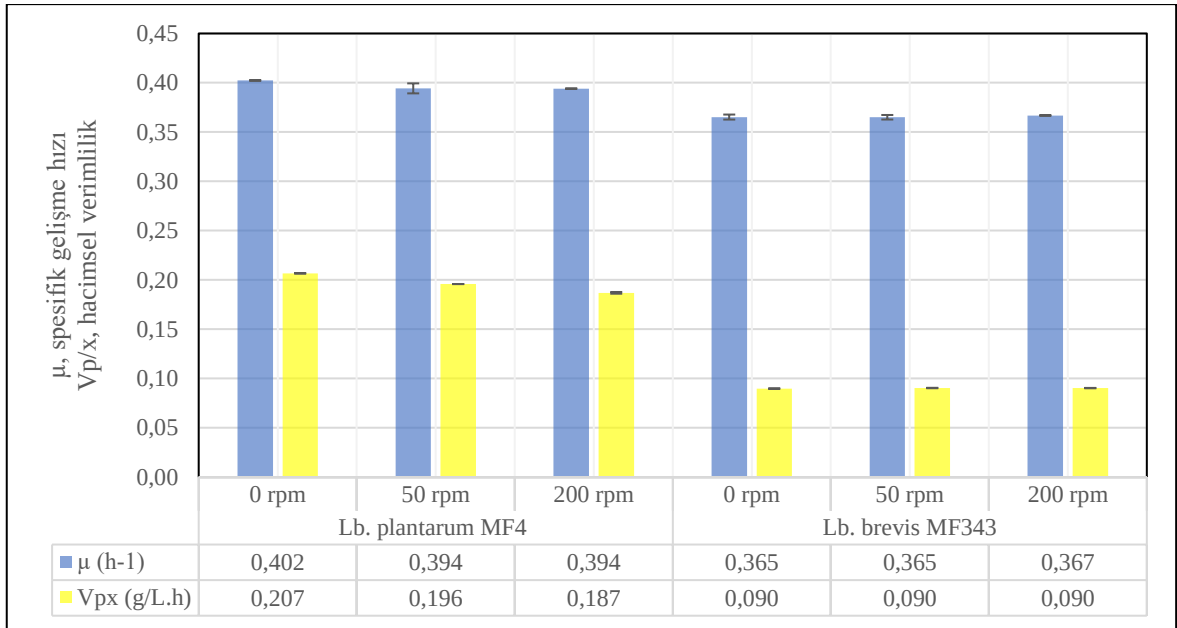
(25°C, 30°C, 35°C) ve farklı besiyeri başlangıç pH (6.0, 6.5, 7.0) değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonların en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerle ait hesap edilen hacimsel verimlilik (V_{px}) Şekil 4.8 ve EK 4'te yer almaktadır. Şekil 4.8 incelendiğinde *Lb. plantarum* MF4 suşu ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda MR ve MS besiyerlerinde elde edilen hacimsel verimliliklerin daha yüksek olduğu görülmektedir. SS besiyerinde elde edilen verimlilik değerleri ise oldukça düşük kalmıştır. En yüksek hacimsel verimlilik değeri MS besiyerinde 35°C'de 0.212 g/L.h (pH 7.0) ve 0.211 g/L.h (pH 6.5) hesaplanmıştır. MR besiyerinde ise 30°C ve 35°C'de en yüksek verimlilik değerleri 0.204-0.208 g/L.h olarak hesap edilmiştir. Özellikle düşük sıcaklıklarda (25°C) hesaplanan verimlilik değerlerinin düşük düzeylerde aldığı görülmektedir. *Lb. brevis* MF343 suşuna ait verimlilik değerleri Şekil 4.8'de incelenirse, verimlilik değerlerinin diğer suşa göre oldukça düşük kaldığı görülmekte ve bu durum geciken hücre üremesi ile açıklanabilmektedir. MR ve SS besiyerinde 30-35°C'de elde edilen verimlilik değerleri birbirine yakın olarak 0.073-0.090 g/L.h aralığında bulunmuştur. En yüksek verimlilik değeri ise MS besiyerinde 0.094 g/L.h (35°C, pH 6.5) hesaplanmıştır. SM besiyerinde ise hesaplanan verimlilik değerleri en düşük düzeyde kalmıştır. Diğer taraftan çalkalamalı inkübasyon şartlarında *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için hesaplanan hücre verimliliği değerlerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.8. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu için statik fermantasyonlarda en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki hacimsel verimlilik (Vpx) değerleri.

Laktik asit bakterileri ile ilgili olarak yapılan bazı kinetik çalışmalarda farklı parametre değerleri hesap edilebilmektedir. Valencia-Garcia ve ark., (2018) yaptıkları kinetik çalışmalarda *Lb. plantarum* suşunda 32°C’de MRS besiyerinde 12 saatlik inkübasyon sonucunda Yx/s değerini %30, μ değerini 0.08 h⁻¹; *St. infantarius* suşunda 37°C’de M17 besiyerinde 18 saatlik inkübasyon sonucunda Yx/s değerini %24, μ değerini 0.10 h⁻¹; *Lc. lactis* suşunda 32°C’de M17 besiyerinde 12 saatlik inkübasyon sonucunda Yx/s değerini %24, μ değerini 0.08 h⁻¹ olarak bulmuşlardır. Nancip ve ark., (2015) *Lb. casei subsp. rhamnosus* kültürü geri beslemeli denemelerde spesifik gelişme hızını yaklaşık 0.075-

0.100 h⁻¹ aralığında hesaplamışlardır. Rezvni ve arkadaşlarının 2017 yılında peynir altı suyu (PAS) kullanarak hazırladıkları besiyerinde *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lc. Lactis*, *Lb. delberuckii*, *Lb. fermentum* ile 37°C’de 52 saat süre ile 50 rpm çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirdikleri kesikli fermantasyonlarda kinetik parametrelerini incelemişler ve sırası ile çalıştıkları kültürlerde biyokütle verimini (Y_{x/s}) farklı inkübasyon süreleri sonunda maksimum %11.9, %11.7, %11.4, %11.4 olarak; spesifik gelişme hızlarını ise 12. saat sonunda sırası ile 0.25-0.23-0.18-0.180.32 h⁻¹ olarak hesaplamışlardır. Soro-Yao ve ark., (2014) ise *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus spp.* ile MRS besiyerinde 30°C’de 18 saatte gerçekleştirdikleri inkübasyonlarda spesifik gelişme hızlarını sırası ile 0.54-1.14-1.05-0.57 h⁻¹ olarak hesaplamışlardır. Altıok (2004) *Lb. casei* suşunun PAS ile hazırlanmış farklı besiyerlerinde spesifik gelişme hızını 0.260-0.268 h⁻¹; biyokütle verimini (Y_{x/s}) ise 0.255-0.064 aralığında bulmuştur. Bomrungnok ve ark., (2012) nişasta katkılı MRS besiyerinde 200 rpm karıştırma hızlarında sürekli fermantasyon ile spesifik gelişme hızını 0.2 h⁻¹ olarak bulmuştur. Yang ve ark., (2018) laktik asit bakterilerine spesifik gelişme hızını 0.78 h⁻¹ olarak; Ficoseco ve ark., (2018) MRS besiyerinde spesifik gelişme hızlarını *Lb. acidophilus* için 0.48-0.31 h⁻¹, *Lb rhamnosus* için 0.62-0.38 h⁻¹ olarak hesap etmişlerdir.



Şekil 4.9. *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu için çalkalamalı (0-200 rpm) fermentasyonlarda 12. saatte elde edilen spesifik gelişme hızı (μ) ve en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği sürelerdeki biyokütle verimi ($Y_{x/s}$), hacimsel verimlilik (V_{px}) değerleri.

4.3. Tek Hücre Protein (THP) üretimi

Lb. plantarum MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için fermentasyon deneme planları sonuçlarının değerlendirilmesi ve en yüksek biyokütle üretiminin ve en iyi biyokütle verimlilik sonuçlarının elde edildiği fermentasyon koşullarında başlangıç pH değeri 7.0 olan MRS+Salatalık Suyu (MS) besiyerinde 35°C’de statik inkübasyon şartlarında (12-

24 saat) fermentasyonları gerçekleştirilerek THP üretimi aşamasına geçilmiştir. Bu amaç ile MRS sıvı besiyerinde (pH 6.2) 24-48 saat süre ile 30°C’de aktifleştirilen *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları, 121°C’de 15 dk. şartlarında sterilize edilmiş 1000-500 mL’lik (MRS+Salatalık Suyu (MS) besiyerlerine %1 oranında inoküle edilmiş ve deneme deseni kapsamında standardize edilmiş THP üretim şartlarında (besiyeri, sıcaklık, pH, süre) fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.

THP üretim amacı ile belirlenmiş optimum koşullarda üretilerek toplanan yıkanmış LAB hücreleri ve yıkanmış *S.cerevisiae* maya hücrelerine ait hücre bileşimi Çizelge 4.1’de verilmiştir. THP konsantratların üretiminde kullanılacak olan hücrelerin genel bileşimleri incelenecek olursa *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 hücrelerinde yağ, protein ve kül içeriklerinin benzer değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p>0.05$). Maya hücresinde ise LAB’ine göre yağ (%9.07), karbonhidrat (%11.42) içeriğinin daha yüksek protein (%50.38), kül içeriğinin (%14.03) ise ise daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). LAB’de ölçülen protein miktarları ise yaklaşık kurumaddede %55 olarak bulunmuştur. Yağ içeriği özellikle proteinlerin ekstraksiyonu açısından sorun oluşturabilmekte ve hidrofobik interaksiyonlar aracılığı ile oluşan emülsifiye yapılar ekstraksiyon verimlerini düşürebilmektedir (Cheftel ve ark., 1985). Hücrelerin başlangıç bileşenleri ekstraksiyon ve saflaştırma sonunda elde edilecek ürünlerin verimlerini ve aynı zamanda THP konsantratlarının teknolojik özelliklerini etkileyen temel etkenler arasında yer almaktadır. İyi bir ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri ile mevcut protein dışındaki bileşenlerin son ürünlerdeki miktarları azaltılabilir. Yapılan çalışmalarda yaklaşık Maya hücrelerinde %30-70 protein, %2-6 yağ, %5-10 karbonhidrat %5-10 kül, bakterilerde ise %50-83 protein, %8-10 yağ, %3-8 karbonhidrat %3-7 kül oranları bildirilmektedir (Miller ve Litsky, 1976; Anupama ve Ravindra, 2000; Nasser ve ark., 2011; Srividya ve ark., 2013; Demirel ve Şentürk Demirel, 2018). Kam ve ark., (2012), atık sularda ürettikleri *Lb. acidophilus* hücre bileşimlerini %4.20-%5.10 kül, %68.37-%71.13 protein, *A. niger* hücrelerinde ise %3.49-%3.30 kül, %48.66-%51.36 protein içeriği olduğunu bildirmektedirler. Bizim hücre örneklerimizde kül içerikleri oldukça yüksek bulunmuş ve bu durum hücrelerin hazırlanmasında kullanılan fizyolojik tuzlu su ve pH ayarlamada kullanılan NaOH ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.1. THP üretimi için kullanılan hücrelerin kimyasal kompozisyonu

	<i>Lb. plantarum</i> MF4	<i>Lb. brevis</i> MF343	<i>S.cerevisiae</i> (Ticari)
Kurumadde (%)	4.97 ±0.005 ^a	5.74 ±0.011 ^b	7.59 ±0.033 ^c
Yağ (%)	3.17 ±0,525 ^a	3.61 ±0.256 ^a	9.07 ±0.638 ^b
Protein (%)	55.46 ±1,985 ^a	55.03 ±1.256 ^a	50.38 ±0.544 ^b
Karbonhidrat (%)	8.77 ±0,862 ^a	5.11 ±0.862 ^b	11.42 ±0.184 ^c
Kül (%)	25.04 ±2,481 ^a	21.44 ±1.573 ^a	14.03 ±1.026 ^b

*Bileşenlerin kurumadedeki oranları verilmiştir

**a,b,c, Aynı satırlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

Besiyerinden santrifüj yolu ile toplanan ve yıkanan laktik asit bakteri suşları (*Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343) ve *S.cerevisiae* maya hücrelerinden proteinlerin verimli ve etkin bir şekilde ekstrakte edilmelerini sağlamak amacı ile ekstraksiyon öncesi hücrelere sonikasyon, enzim ile parçalama, Ultra-Turrax homojenizasyon ve dondurma-çözündürme yöntemleri ile ortak ön ekstraksiyon işlemleri uygulanmış ve parçalanmış hücre çökeltisi hekzan ile muamele edilerek yağsız hücre süspansiyonları elde edilmiştir. Yağsız hücre süspansiyonlarının kimyasal kompozisyonu ise Çizelge 4.2’de yer almaktadır. Özellikle yağ uzaklaştırma işlemi sonrası tüm örneklerin kurumadedeki yağ içerikleri azalarak *Lb. plantarum* MF4 hücre süspansiyonunda %1.43, *Lb. brevis* MF343 hücre süspansiyonunda %0.61, *S.cerevisiae* hücre süspansiyonunda ise %0.61 değerine gerilemiştir. Ön ekstraksiyon aşamaları için sulandırılarak hazırlanan hücre süspansiyonlarının kurumadde değerleri ise %4.15-%4.97 aralığında değişmiştir. Çalışmada ekstraksiyon aşamaları için temel oluşturacak yağsız hücre süspansiyonlarının kurumadde içerikleri birbirine yakın olarak ayarlanmaya çalışılmakla birlikte kurumadde içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer taraftan hekzan ile yağ uzaklaştırma aşamasında *Lb. plantarum* MF4 hücre süspansiyonunda kurumadedeki protein oranında (%47.71) bir miktar azalma gözlemlenmiştir. Bu durum yağ uzaklaştırılması aşamasında hekzan ile birlikte bir miktar protein kaybı yaşandığını göstermektedir. Özellikle lipofilik karakterdeki protein yapılarının hekzan ile uzaklaşmış olabileceğini düşündürmektedir. Kurumadedeki protein açısından en yüksek oran *Lb. brevis* MF343 yağsız hücre süspansiyonunda %61.78 olarak elde edilmiştir. *Lb. plantarum* MF4 ve Maya yağsız hücre süspansiyonunda ise protein oranları sırası ile %47.71 ve %50.73 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. THP konsantratlarının üretiminde ekstraksiyon için hazırlanan yağsız hücre süspansiyonunun bileşimi

	<i>Lb. plantarum</i> MF4	<i>Lb. brevis</i> MF343	<i>S.cerevisiae</i> (Ticari)
Kurumadde (%)	4.97 ±0.005 ^a	4.15 ±0.000 ^b	4.26 ±0.026 ^c
Yağ (%)	1.43 ±0.328 ^a	0.61 ±0.890 ^{ab}	0.61 ±0.371 ^b
Protein (%)	47.71 ±0.544 ^a	61.78 ±0.852 ^b	50.73 ±0.236 ^c
Karbonhidrat (%)	7.58 ±0.243 ^a	4.45 ±0.000 ^b	15.18 ±0.019 ^c
Kül (%)	24.96 ±1.749 ^a	21.47 ±2.698 ^a	14.28 ±1.567 ^b

*Bileşenlerin kurumaddedeki oranları verilmiştir

**^{a,b,c}, Aynı satırlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

Bu aşamadan sonra parçalanmış ve yağı uzaklaştırılmış homojenize hücre süspansiyonunda bulunan tek hücre proteinlerin ekstraksiyon verimlerine pH, seyreltme oranı ve tuz (NaCl) gibi faktörlerin etkileri tek tek deneysel olarak belirlenmiştir.

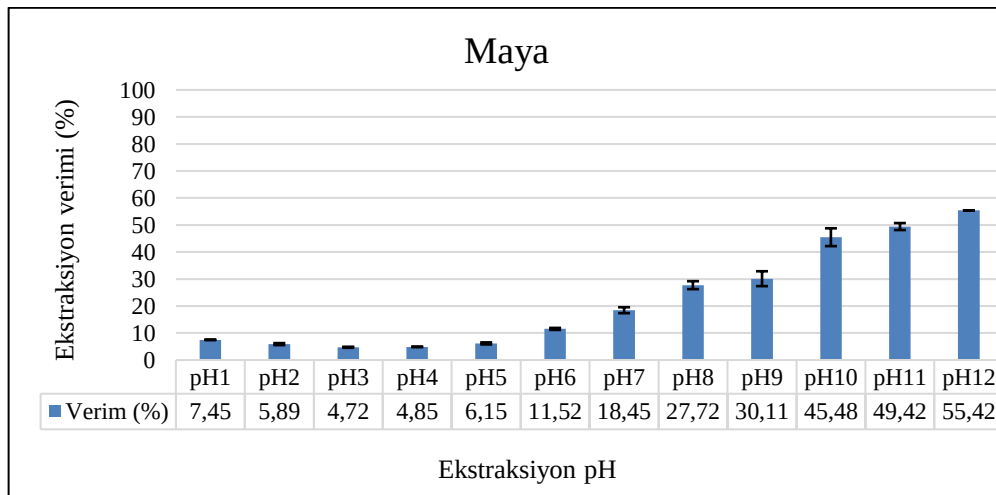
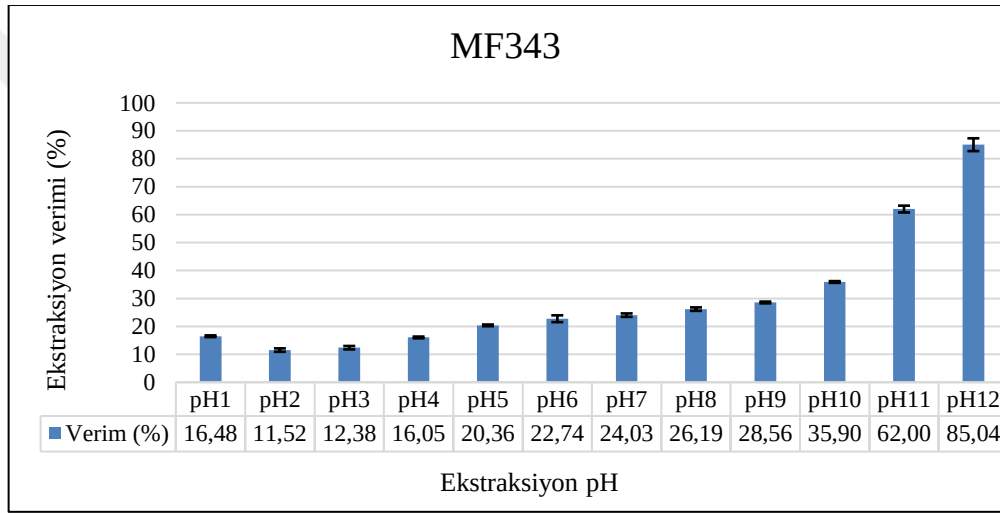
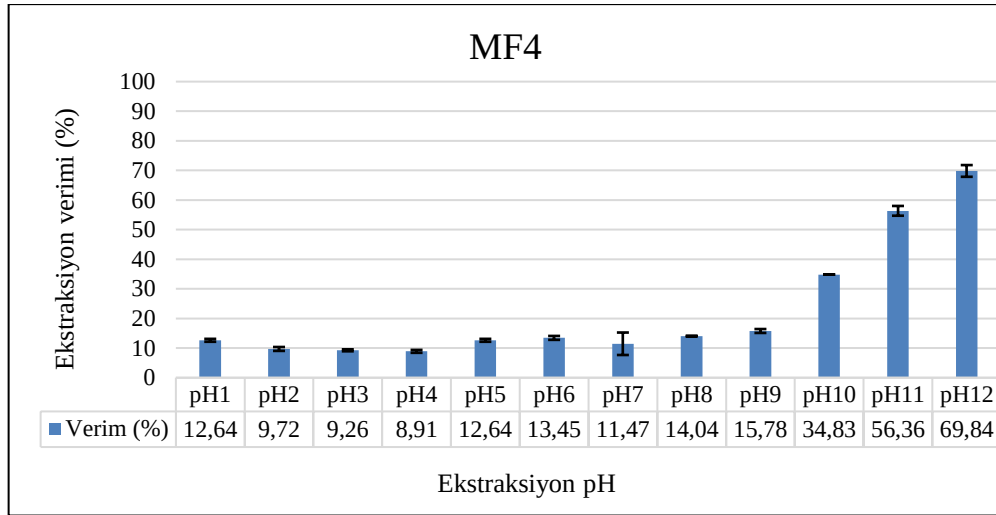
4.4. THP ekstraksiyonuna pH, seyreltme ve tuz oranlarının etkisi

Proteinlerin ekstraksiyonunda kullanılan teknikler ve değişkenler hem protein kalitesini hemde verimi etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Genellikle sulu sistemlerde gerçekleştirilen ekstraksiyon teknikleri yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle proteinlerde alkali ekstraksiyon başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (Sanchez-Vioque ve ark., 1999). Ekstraksiyonlarda düşük miktarlarda tuzların kullanımı proteinler arasındaki hidrofilik ve hidrofobik interaksiyonları etkileyerek çözünürlükte değişiklikler oluşturabilmektedir. Tuz ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda meydana gelen iyonik değişimler verimi ve ekstrakte olan proteinlerin kimyasını değiştirebilmektedir (Mwasaru ve ark., 2000; Moure ve ark., 2001).

4.4.1. pH

Ön işlem uygulanmış ve parçalanmış homojenize yağsız hücre çözeltisinden maksimum oranda protein geri kazanımının sağlandığı pH değerini belirlemek amacıyla seyreltme oranları sabit (2.25 kat) olacak şekilde hazırlanan yağsız hücre süspansiyonları pH değerleri 1.0-12.0 aralıklarında ayarlanarak 60 dk. süre ile oda sıcaklığında (25°C) çalkalama işlemi (200 rpm) uygulanmıştır. Çalkalama sonrası protein ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesi amacı ile örneklerin santrifüj sonrası üst fazlarındaki protein

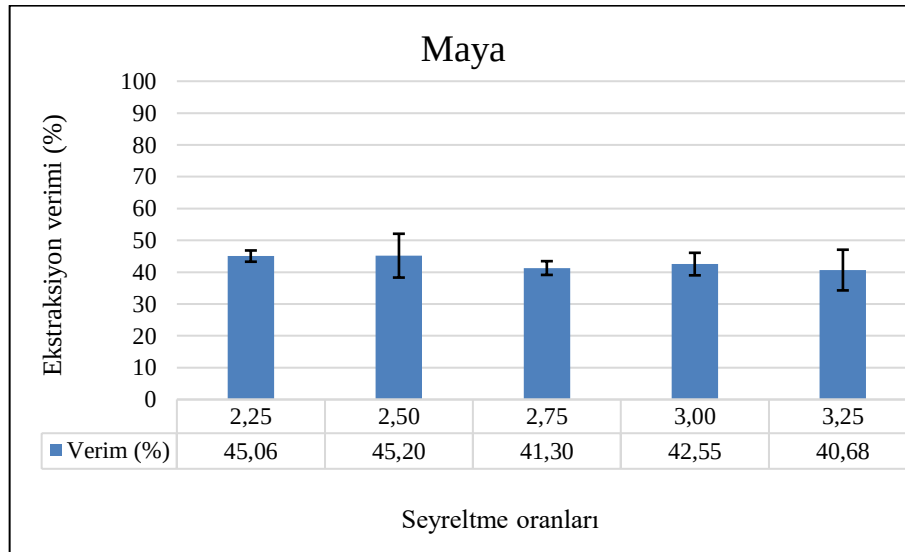
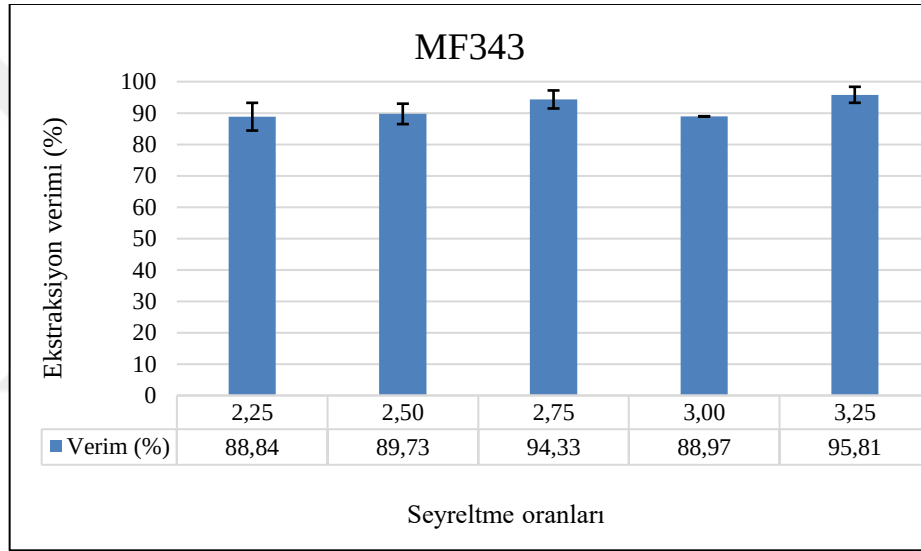
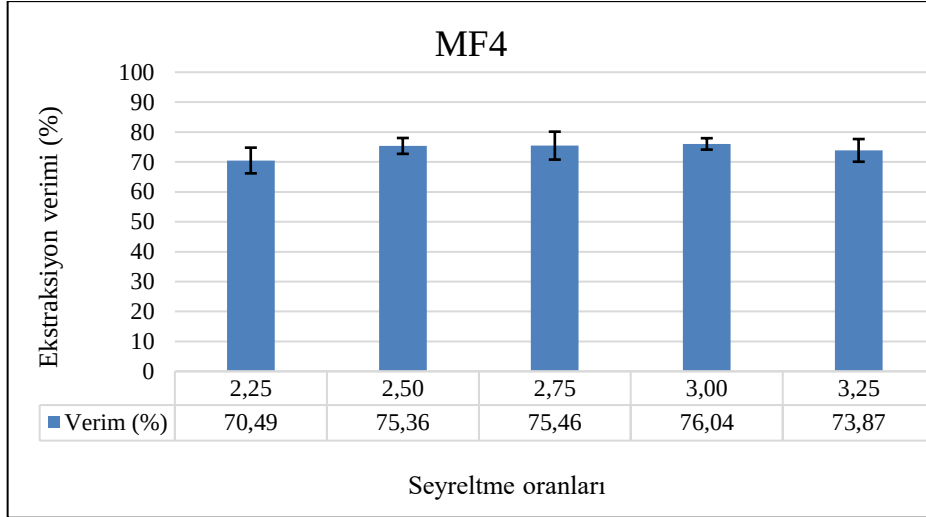
miktarları belirlenmiş ve protein ekstraksiyon verimleri hesap edilmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde farklı ekstraksiyon pH değerlerinin hücre protein ekstraksiyon verimlerini etkilediği görülmektedir. MF4 yağsız hücre homojenizatında gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işlemlerinde en düşük ekstraksiyon verimleri pH 4.0, pH 3.0 ve pH 2.0’de benzer ($p>0.05$) düzeylerde gerçekleşmiş ve sırası ile %8.91, %9.26 ve %9.72 olarak bulunmuştur. MF4 homojenizatında en yüksek protein ekstraksiyon verimi ise pH 12.0’de %69.84 olarak bulunmuştur ($p<0.05$). MF4 hücre protein ekstraksiyonlarında düşük pH değerlerinde elde edilen verim oranları düşük kalırken alkali pH şartlarında ekstraksiyon veriminin artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. MF343 hücre homojenizatlarında ise en düşük protein ekstraksiyon verimi pH 2.0 (%11.52) ve pH 3.0’de (%12.38), en yüksek verim ise pH 12.0’de %85.04 olarak MF4 ve Maya homojenizatlarından daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). MF343 homejenizatlarında da asidik pH değerlerindeki ekstraksiyon verimleri düşük bulunurken MF4 homojenizatlarına kıyasla asidik pH ekstraksiyon verimleri biraz daha iyi bulunmuştur. Maya hücresi için en düşük ekstraksiyon veriminin gerçekleştiği pH 4.0 ve pH 3.0 değerlerinde ekstraksiyon verimleri sırası ile %4.85 ve %4.72 olarak belirlenmiştir. Maya hücrelerinden proteinlerin ekstraksiyonunda pH artışına bağlı olarak protein ekstraksiyon oranları artarak pH 12.0 değerinde en yüksek değere (%55,42) ulaşmıştır. Maya homojenizatlarında pH 12.0’da ulaşılan en yüksek verim değerinin MF4 ve MF343 örneklerine kıyasla düşük değerlerde kaldığı gözlemlenmiştir. Maya hücrelerinde asidik pH ekstraksiyonlarında benzer şekilde diğer hücrelere kıyasla en verimsiz sonuçları vermiştir. Bu sonuçlar ışığında üç farklı mikroorganizma türü (MF4, MF343 ve Maya) için belirlenen en iyi ekstraksiyon pH değeri 12.0 olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon verimleri ile ilgili çalışmanın bundan sonraki aşamalarında uygun ekstraksiyon pH değeri 12.0 olarak ayarlanmıştır.



Şekil 4.10. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine pH'nın etkisi.

4.4.2. Seyreltme oranları

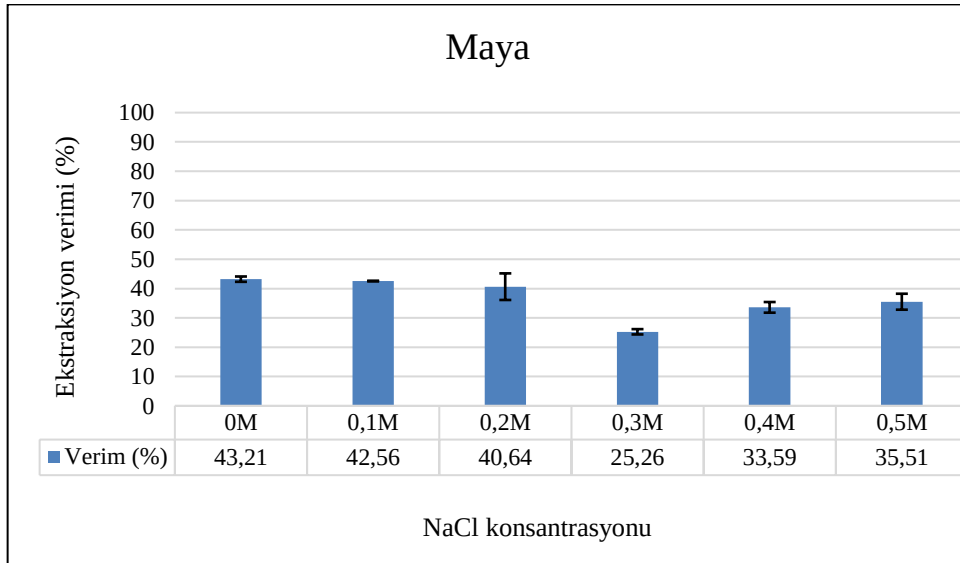
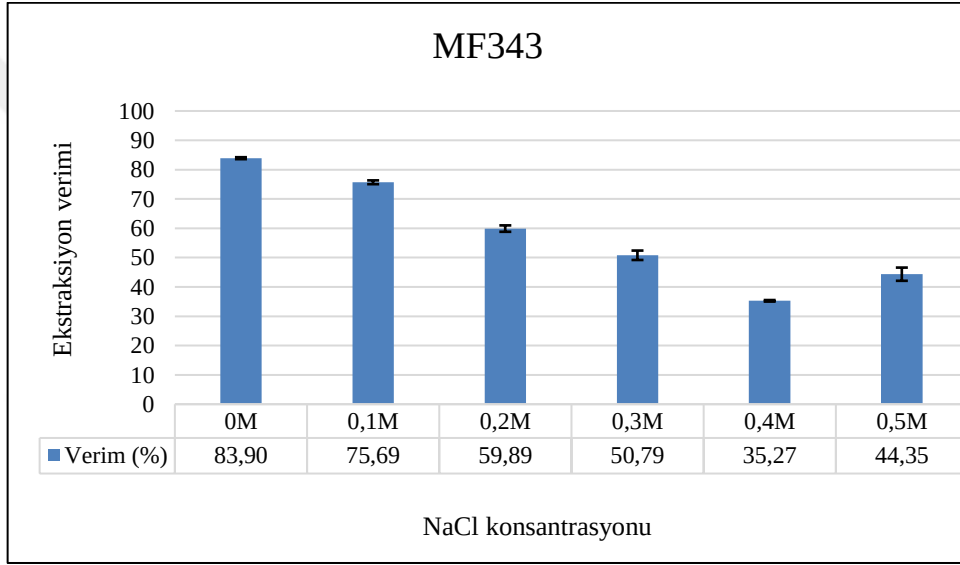
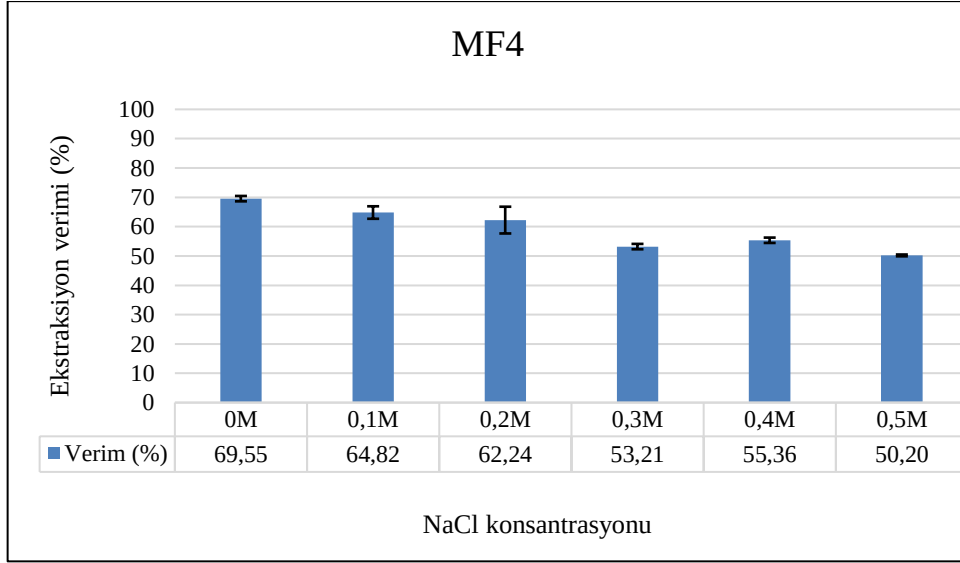
Homojenize hücre süspansiyonlarından (pH 12.0) proteinlerin ekstraksiyon verimlerine seyreltme oranlarının (2.25, 2.50, 2.75, 3.00, 3.25) etkisini belirlemek için yapılan çalışmalara ait sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. MF4 hücre homojenizatı ile farklı seyreltme oranlarında gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda (pH 12.0) tüm seyreltme oranlarında bulunan ekstraksiyon verimleri istatistiksel olarak benzer bulunmuş olup ortalama %70-%76 aralığında hesap edilmiştir ($p>0.05$). MF4 hücre süspansiyonunda seyreltmenin ekstraksiyon verimine herhangi bir katkısının olmadığı görülmüştür. MF343 homojenizatlarında da benzer şekilde seyreltme oranlarının ekstraksiyon verimine katkısının olmadığı bulunmuş ve verim değerleri %88-%95 aralığında değişmiştir. Maya hücrelerinde ise ekstraksiyon verimleri %40-%45 aralığında değişmiştir. Hücre süspansiyonlarının seyreltilmesinin ekstraksiyon verimlerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tüm örneklerde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine seyreltme oranlarının etkisi.

4.4.3. Tuz

Hücre süspansiyonlarındaki en uygun protein ekstraksiyon pH (12.0) ve seyreltme oranları (2.25kat) belirlendikten sonra tuzun (NaCl) verime etkisini görmek için farklı tuz konsantrasyonlarında (0.1-0.5M) ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır. Tuzun protein ekstraksiyon verimine etkileri Şekil 4.12’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde MF4 homojenizatlarında artan tuz konsantrasyonu ile birlikte protein ekstraksiyon veriminin bir miktar düştüğü görülmektedir. En yüksek verim (%69.55) tuz kullanılmayan örnekte hesaplanmış olup, en düşük verim (%50.20) ise 0.5M NaCl ilave edilen örnekte elde edilmiştir ($p<0.05$). MF343 hücre homojenizatlarında en yüksek verim tuz ilave edilmeyen örnekte %83.90 bulunurken genel olarak tuz konsantrasyonundaki artışa paralel bir şekilde verimlerde kademeli olarak hızla azalmıştır (0.5M hariç). Maya hücrelerinde ise 0.1M ve 0.2M tuz kullanılan örneklerde elde edilen verim değerleri tuz kullanılmayan örnekte elde edilen verim sonuçları ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$). Maya örneklerinde 0.2M tuz konsantrasyonundan sonra verim değerleri azalma göstermiştir. Sonuç olarak NaCl ilavesi hiçbir hücre homojenizatında protein ekstraksiyon verimlerinde anlamlı bir artış sağlayamamıştır. Özellikle MF343 hücre süspansiyonları ilave edilen tuz konsantrasyonlarından önemli ölçüde olumsuz olarak etkilenmiştir.



Şekil 4.12. MF4, MF343 ve Maya homojenize hücre süspansiyonlarından proteinlerin ekstraksiyon verimlerine tuz (NaCl) oranlarının etkisi.

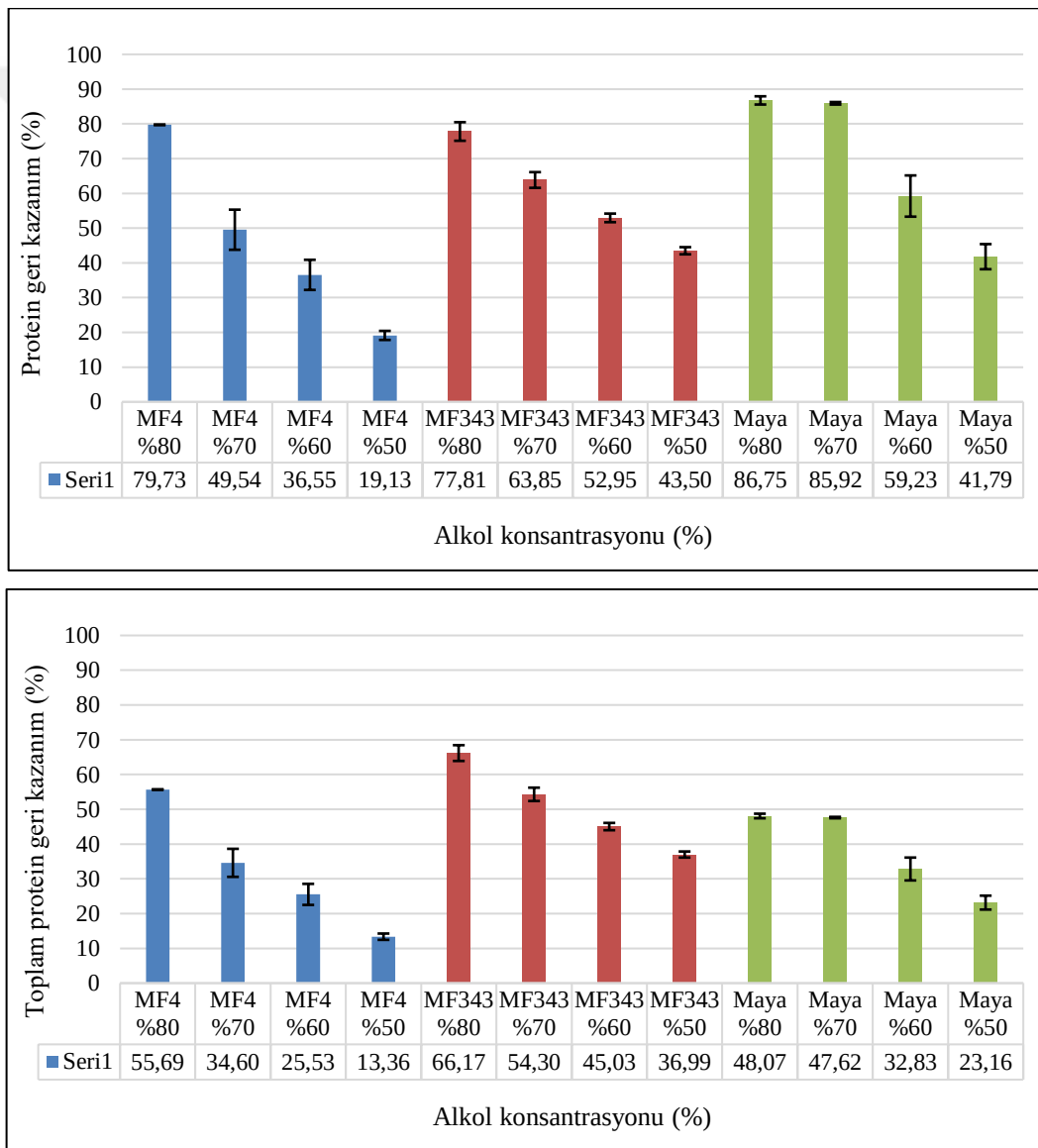
4.5.THP Saflaştırılma

Organik çözücüler proteinler ile interaksiyona girerek hidrofobik etkileşimlerde yarattığı değişimler ile protein moleküllerinin su ile olan bağlantılarını koparır ve çökmelerine sebep olur. Gıda sanayisinde proteinlerin saflaştırılmasında etil alkol kullanımı yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Etil alkol protein molekülünün su ile olan afinitesini bozarak onunla yarışmakta ve hidrasyonu bozmaktadır (Donnelly, 1987; Lerici ve Manzocco, 2000). Amonyum sülfat gibi yaygın bir şekilde kullanılan tuzların proteinlerin saflaştırılmasında seçici davranışı önemli bir konu olmaktadır. Tuzların protein molekülleri üzerinde geçici olarak yarattıkları iyonik değişimler sonucu protein molekülleri denatürasyona uğramadan hidrasyonlarını kaybetmektedir. Hidrofobik interaksiyonların artışı ile sonuçlanan bu durum protein moleküllerinin kararlılığını bozarak protein-protein interaksiyonlarını artırmaktadır (Metin, 2007). Ayrıca izoelektrik çöktürme teknikleri de protein konsantratlarının hazırlanmasında kullanılabilmektedir (Sumner ve ark., 1980).

4.5.1. Alkol ile çöktürme

MF4, MF343 ve Maya hücre homojenizatlarının belirlenen seyreltme oranlarında (2.25 kat) ve pH 12.0'de gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstrakt sıvıları %50-%80 aralığında etil alkol içerecek şekilde hazırlanmış ve çöktürme sonucunda elde edilen protein geri kazanım oranları hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.13'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde MF4 ve MF343 sıvı protein ekstraktlarında artan alkol konsantrasyonu ile birlikte saflaştırma verimlerinin arttığı görülmektedir. MF4 ekstraktında elde edilen en yüksek protein geri kazanım oranı %80 alkol konsantrasyonunda %79.73 olarak gerçekleşmiş olup, MF343 ekstraktında %80 alkol konsantrasyonunda elde edilen değer (%77.81) ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$). MF4 ekstraktında alkol konsantrasyonundaki azalma ile protein geri kazanım oranlarındaki azalma MF343 ekstraktına kıyasla daha hızlı gerçekleşmiştir. Maya ekstraktında ise en iyi geri kazanım oranları %80 ve %70 alkol konsantrasyonlarında elde edilmiş olup sırası ile %86.75 ve %85.92 olarak hesaplanmıştır. Maya ekstraktında ulaşılan geri kazanım oranları MF4 ve MF343 örneklerinde ulaşılan geri kazanım oranlarından daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Alkol özellikle protein moleküllerindeki hidrofobik

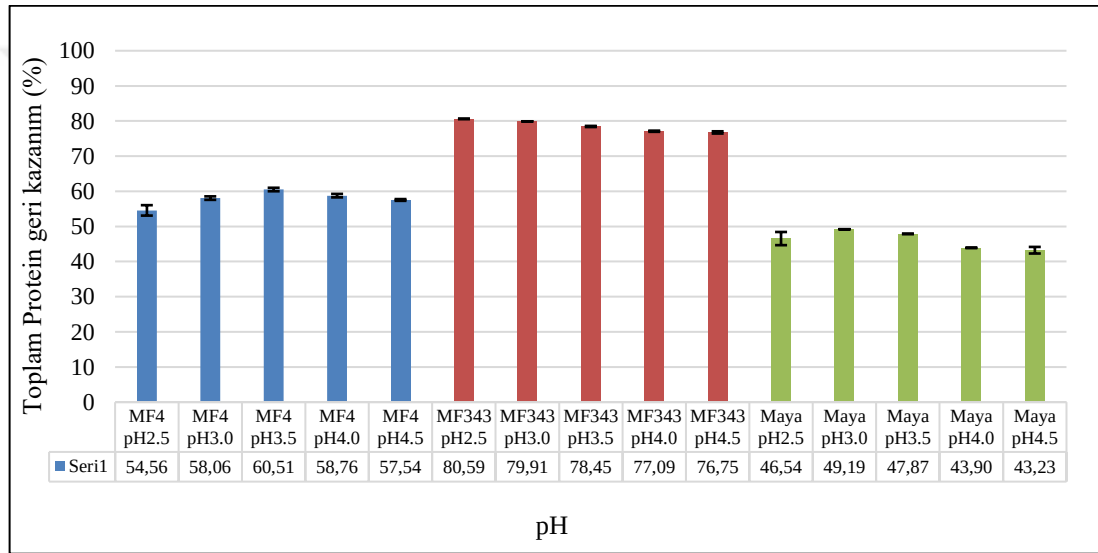
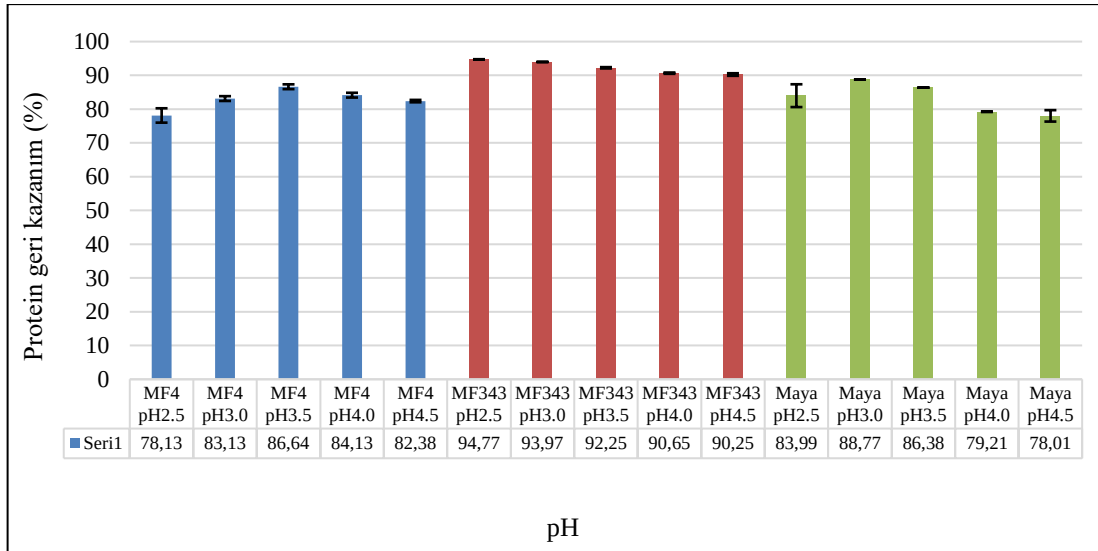
interaksiyonları bozarak ve protein moleküllerinin su ile olan interaksiyonlarını engelleyerek proteinlerin çökmelerine sebep olmaktadır. Ayrıca yüksek alkol konsantrasyonlarında çoğu protein molekülünde geri dönüşümsüz bir denatürasyon meydana gelebilmektedir. Protein moleküllerini üç boyutlu konformasyonel stabilitesi alkol gibi yüksek dehidrate edici moleküller tarafından değiştirilebilmektedir. Alkol etkisi ile çalışmada kullanılan hücre protein ekstraktlarından proteinlerin kısmi saflaştırılmasında önemli verimler elde edilmiş olmakla birlikte denatüre edici ve protein yapılarını bozucu etkisinden dolayı çalışmanın ileriki aşamalarında alkol ile protein saflaştırma işlemi tercih edilmemiştir.



Şekil 4.13. MF4, MF343 ve Maya ekstraktlarından proteinlerin saflaştırılmasına etil alkol oranlarının etkisi.

4.5.2. İzoelektrik çöktürme

İzoelektrik noktada proteinlerin çöktürülmesi protein moleküllerinin net yüklerinde meydana gelen değişimin bir sonucudur. Çalışma kapsamında ekstraksiyon aşamasında denenen pH değerlerinden yola çıkarak hücre ekstraktlarındaki proteinlerin izoelektrik noktada çöktürülerek saflaştırılması için pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0 ve pH 4.5 değerine getirilen çözeltilerde protein geri kazanım oranları hesap edilmiştir (Şekil 4.14). Şekil incelenecek olursa, MF4 ekstraktlarında en yüksek protein geri kazanım oranı pH 3.5'te %86.64 olarak; MF343 ekstraktında pH 2.5'de %94.77 olarak; Maya ekstraktında ise pH 3.0'da %88.77 olarak bulunmuştur. İzoelektrik noktada proteinlerin geri kazanılmasında en yüksek oran MF343 ekstraktında elde edilmiştir ($p < 0.05$). Tüm ekstraktlarda maksimum geri kazanımın sağlandığı pH değerlerinin altında ve üstünde geri kazanım oranlarında hafif bir düşüş yaşanmıştır.



Şekil 4.14. MF4, MF343 ve Maya ekstraktlarından proteinlerin saflaştırılmasına pH değerinin etkisi.

4.6. THP Konsantratlarının Kimyasal ve Teknolojik Özellikleri

4.6.1. THP konsantratlarının kimyasal bileşimi

Protein konsantratlarının üretiminde farklı ekstraksiyon ve saflaştırma tekniklerinin kullanımı sonucu elde edilen ürünlerin kimyasal bileşimi ve özellikleri arasında farklılıklar olabilmektedir. Özellikle izoelektrik çöktürme tekniklerinin kullanıldığı saflaştırma işlemlerinde örneklerdeki tüm protein fraksiyonları geri kazanılamamaktadır. Ultrafiltrasyon gibi tekniklerde ise daha çok protein çeşitliliği sağlanabilmektedir (Sanchez-Vioque ve ark., 1999; Makri ve ark., 2005). Ekstraksiyon denemeleri sonucu

MF4, MF343 ve Maya homojenizatlarında en iyi verimin elde edildiği pH 12 ve 2.25 seyreltme oranı şartlarında toplu ekstraksiyonları gerçekleştirilen örneklerin, ekstraksiyon sıvılarında bulunan proteinlerin saflaştırılmasında ise MF4 ekstraktında pH 3.5, MF343 ekstraktında pH 2.5 ve Maya ekstraktında pH 3.0 izoelektrik çöktürme teknikleri kullanılmış ve THP konsantratlarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen THP konsantratlarının ve ticari Whey protein konsantratın kimyasal bileşimi Çizelge 4.3’de verilmiştir. THP konsantratlarının kurumaddedeki yağ içerikleri açısından incelendiğinde MF4 konsantratları için %1.46, MF343 için %0.72, Maya için %0.65 ve Whey için %0.89 olarak elde edilmiştir. Konsantratların yağ içerikleri ekstraksiyon için kullanılan örneklerin yağ içerikleri ile orantılı olarak son üründe de yer aldığı görülmektedir. Buna göre ekstraksiyon öncesi en yüksek yağ içeriğine sahip MF4 homojenizatlarından üretilen THP konsantratlarında da en yüksek yağ içeriği bulunmuştur. Örneklerin yağ içerikleri bakımından MF343 ve Maya örneklerinin yağ içerikleri (%0.72-%0.65 yağ) istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0.05$). THP konsantratlarında son ürünlerde kalan yağ miktarı hekzan ile yağ uzaklaştırma işlemi yapılmasına rağmen son ürüne kadar belli miktarlarda geçmiştir. Bu durum hidrofobik karakterdeki proteinlerin yağ molekülleri ile sıkı bir şekilde kurdukları interaksiyonlara bağlanmaktadır. Ayrıca yağ ekstraksiyonunda kullanılan hekzanın tüm lipit yapısındaki yapıları uzaklaştırmada biraz yetersiz kaldığını da göstermektedir. Diğer taraftan son ürünlerde bulunan yağ içeriği THP konsantratlarının teknolojik özelliklerini de etkileyen temel bir faktör olmaktadır. Özellikle köpük oluşumu açısından yağlar olumsuzluklara sebep olabilmektedir. Protein konsantratlarının üretimi ile ilgili yapılmış çalışmalarda kullanılan tekniklere ve hammaddeye bağlı olarak son ürün yağ içerikleri değişmekle birlikte Fernandez-Quintela ve ark., (1997), bezelye protein izolatlarında %1.46, soya protein izolatında %2.15 olarak bulmuşlardır. THP konsantratlarına ait protein içerikleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. Örneklerin saflaştırma sonrası elde edilen protein içerikleri MF4 ve MF343 konsantratlarında %72.47 ve %73.09 olarak benzer ($p>0.05$) bulunurken en yüksek protein içeriği hazır ticari olarak satın alınan Whey protein konsantratı örneğinde %81.13 olarak elde edilmiştir. Maya konsantratı örneğinde ise elde edilen protein içeriği daha düşük düzeyde kalmıştır. Protein karışımlarının konsantrat olarak adlandırılabilmesi için en az protein içeriklerinin %50’nin üzerinde olması beklenmektedir. Yüksek protein içeriğine sahip konsantratların üretimi için, ultrafiltrasyon tekniklerinin kullanımı ile istenmeyen karbonhidrat ve mineral gibi

bileşiklerin eliminasyonu ile başarılabilmektedir. Çalışmamızda üretilen THP konsantratları içerisinde karbonhidrat ve mineral içeriklerinin yüksek seviyelerde kalması kurumaddedeki protein içeriklerinde oransal azalmaya sebep olmuştur. Konsantratların elde edilmesinde hammadde kadar kullanılan tekniklerde son üründe karbonhidrat içeriğini belirleyen faktörler arasında yer almaktadır. Saflaştırma basamağında yıkama işlemleri veya ürünün su tutma kapasiteleri son üründe kalan karbonhidrat içeriklerini belirleyebilmektedir. İzoelektrik çöktürme teknikleri karbonhidratların uzaklaştırılmasında başarısız olabilmektedir. Bu tür sorunların giderilmesi amacı ile çöktürmelerin su veya alkoller ile yıkama işlemleri ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (Fidantsi ve Doxastakis, 2001; Makri ve ark., 2005; Subagio, 2006). Çalışmamızda üretilen THP konsantratlarının karbonhidrat içerikleri Çizelge 4.3'te incelenecek olursa Maya konsantratında oldukça yüksek karbonhidrat içeriği bulunurken (%14.09), en düşük içeriğin ise MF4 konsantratında olduğu (%5.99) görülmektedir. MF343 konsantratında ölçülen karbonhidrat içeriğinin (%8.54) başlangıç hücre homojenizatlarındaki (%4.45) içeriğe kıyasla daha yüksek bulunduğu dikkat çekmektedir ($p<0.05$). Örneklerin kül içerikleri incelendiğinde özellikle MF343 konsantratında elde edilen kül miktarının ekstraksiyon öncesi örneğe göre daha yüksek bir azalma gösterdiği belirlenmiştir. Gerek ekstraksiyon aşamasında gerekse izoelektrik çöktürme aşamasında kullanılan asit ve bazların miktarının fazla olması son ürünlerdeki kül miktarlarının yüksek çıkmasında ana etken olduğunu düşündürmektedir.

Çizelge 4.3. THP konsantratlarının kimyasal kompozisyonu

	MF4	MF343	Maya (Ticari)	Whey (Ticari)
Kurumadde (%)	6.25 $\pm$ 0.849 ^{ab}	6.43 $\pm$ 0.029 ^a	7.00 $\pm$ 0.062 ^b	13.17 $\pm$ 0.000 ^c
Yağ (%)	1.46 $\pm$ 0.10 ^a	0.72 $\pm$ 0.10 ^b	0.65 $\pm$ 0.10 ^b	0.89 $\pm$ 0.05 ^c
Protein (%)	72.47 $\pm$ 0.40 ^a	73.09 $\pm$ 0.91 ^a	62.79 $\pm$ 0.91 ^b	81.13 $\pm$ 2.53 ^c
Karbonhidrat (%)	5.99 $\pm$ 0.10 ^a	8.54 $\pm$ 0.15 ^b	14.09 $\pm$ 0.56 ^c	7.45 $\pm$ 0.02 ^d
Kül (%)	16.72 $\pm$ 1.20 ^a	11.43 $\pm$ 0.86 ^b	12.90 $\pm$ 0.46 ^c	3.73 $\pm$ 1.05 ^d

*Bileşenlerin kurumaddedeki oranları verilmiştir

**a,b,c, Aynı satırlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

4.6.2. THP konsantratlarının toplam aminoasit dağılımları

Çalışma kapsamında üretilen THP konsantratlarının ve referans protein olarak kullanılan Whey konsantratının toplam aminoasit profilleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Analiz yöntemi gereği 17 farklı aminoasitin miktarları ve dağılımları belirlenmiştir. Protein

konsantratlarında aminoasit dağılımı gerek beslenme fizyolojisi açısından gerekse proteinlerin fonksiyonel özellikleri açısından temel belirleyici etkenlerden biri olmaktadır. Çizelge incelendiğinde MF4, MF343, Maya ve Whey protein konsantratlarında oransal olarak en fazla aspartik, glutamik ve lizin aminoasitleri bulunmuştur. MF4 ve Maya konsantratlarında aspartik ve glutamik asit oranları yakın değerlerde (%15-%13) bulunurken Whey konsantratında bu iki amino asitin oranı daha fazla (%19) bulunmuştur. Aspartik asit MF343 ve Whey örneklerinde birbirine yakın değerlerde yaklaşık %20 oranında bulunmuştur. Aspartik ve glutamik asit protein moleküllerinde negatif (-) elektriksel yükün temel kaynağını oluşturmaktadır. Lizin içeriği açısından da Maya ve Whey örneklerinin bu aminoasidi bir miktar daha fazla içerdikleri görülmektedir. MF4 ve MF343 konsantratlarının arjinin, alanin aminoasitleri açısından diğer konsantratlara kıyasla daha yüksek içeriğe sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Prajo ve ark., (1994) *Candida utilis* suşu ile ağaç hidrolizatlarından ürettikleri protein konsantratlarında amino asit dağılımlarını (%) 8.4-9.6 Asp, 6.2-7.0 Thr, 5.7-5.9 Ser, 16.7-13.0 Glu, 4.1-5.4 Pro, 5.1-4.5 Gly, 7.4-6.7 Ala, 8.1-8.5 Lys olarak bildirmişlerdir. Erdman ve ark., (1977) bazı Laktobasil suşlarından farklı ekstraksiyon metodlarını kullanarak elde ettikleri proteinlerin aminoasit dağılımlarını (%) inceledikleri çalışmalarında, yaklaşık 4-13 Ile, 4-10 Lys, 1-2 Met, 2-4 Phe, 3-6 Thr, 4-6 Val, 2-4 Tyr, 7-9 ala, 4- Arg, 7-14 Asp, 9-14 Glu, 3-4 Gly, 1-2 His, 2-3 Pro ve 2-3 Ser aminoasit oranları elde etmişlerdir. Kam ve ark., (2012), atık suları kullanarak ürettikleri *Lb. acidophilus* THP'lerinin aminoasit dağılımlarını (%) yaklaşık 6 Asp, 9 Glu, 3 Ser, 5 Gly, 2 His, 5 Arg, 3 Thr, 6 Ala, 3 Pro, 2 Thy, 4 Val, 2 Met, 5 Leu, 3 Phe, 4 Lys olarak, *A. niger* THP'lerinde ise 5 Asp, 8 Glu, 3 Ser, 2 Gly, 1 His, 2 Arg, 4 Thr, 3 Ala, 3 Pro, 3 Thy, 3 Val, 1 Met, 5 Leu, 2 Phe, 4 Lys olarak bulmuşlardır. Çalışma sonuçlarımız farklı mikroorganizma suşlarından elde edilen proteinlerin aminoasit profilleri ile kıyaslandığında, MF4 ve MF343 konsantratlarında özellikle lizin, arjinin, aspartik ve glutamik asit aminoasit içeriklerinin diğer çalışmalara göre daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan küfler ve maya hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, hücre proteinlerinin aminoasit profilleri ile çalışmamızda üretilen konsantratların aminoasit dağılımları kıyaslandığında MF4, MF343, maya örneklerinin aspartik asit, lizin aminoasitleri açısından daha zengin, threonin, serin, prolin aminoasitleri açısından ise daha fakir bir içeriğe sahip oldukları görülmektedir.

Çizelge 4.4. THP ve Whey Protein konsantratlarının amino asit kompozisyonları (%)

Aminoasit	MF4 (%)	MF343 (%)	Maya (%)	Whey (%)
Aspartik (Asp)	15.78±0.13 ^{Aa}	20.14±0.05 ^{Ab}	15.39±0.13 ^{Aa}	19.04±0.24 ^{Ac}
Glutamik (Glu)	14.01±0.07 ^{Ba}	12.05±0.03 ^{Bb}	13.48±0.06 ^{Bc}	19.72±0.19 ^{Bd}
Serin (Ser)	3.52±0.00 ^{Ca}	2.87±0.05 ^{Cb}	3.39±0.06 ^{Cc}	3.23±0.13 ^{Cc}
Glisin (Gly)	4.45±0.00 ^{Da}	3.71±0.00 ^{Db}	3.74±0.02 ^{Db}	1.50±0.04 ^{Dc}
Histidin (His)	1.93±0.00 ^{Ea}	1.60±0.00 ^{Eb}	1.91±0.00 ^{Ea}	1.49±0.13 ^{Db}
Arjinin (Arg)	8.67±0.07 ^{Fa}	6.01±0.06 ^{Fb}	3.41±0.03 ^{Cc}	3.05±0.03 ^{Ed}
Threonin (Thr)	3.12±0.00 ^{Ga}	2.88±0.03 ^{Cb}	2.02±0.13 ^{EKc}	2.69±0.03 ^{Fd}
Alanin (Ala)	6.89±0.02 ^{Ha}	5.31±0.00 ^{Gb}	4.50±0.06 ^{Gc}	3.52±0.03 ^{Gd}
Prolin (Pro)	2.41±0.02 ^{Ia}	2.13±0.00 ^{Hb}	2.81±0.02 ^{Hc}	3.34±0.01 ^{Cd}
Tyrozine (Tyr)	4.03±0.00 ^{Ja}	2.56±0.03 ^{Ib}	3.26±0.02 ^{Ic}	2.25±0.04 ^{Hd}
Valin (Val)	4.67±0.02 ^{Ka}	3.71±0.03 ^{Db}	4.33±0.05 ^{Jc}	3.61±0.05 ^{Gd}
Metiyonin (Met)	1.77±0.03 ^{La}	2.11±0.03 ^{Hb}	1.93±0.00 ^{Kc}	1.84±0.02 ^{Id}
İzolösin	3.92±0.00 ^{Ma}	2.75±0.00 ^{Jb}	3.65±0.02 ^{Lc}	3.19±0.01 ^{Jd}
Lösin (Leu)	5.63±0.02 ^{Na}	4.25±0.05 ^{Kb}	5.77±0.00 ^{Mc}	7.33±0.04 ^{Kd}
Fenilalanin (Phe)	3.00±0.02 ^{Oa}	2.27±0.02 ^{Lb}	3.61±0.03 ^{Lc}	2.21±0.00 ^{Hd}
Lizin (Lys)	13.03±0.10 ^{Pa}	10.39±0.23 ^{Mb}	15.81±0.08 ^{Nc}	14.46±0.24 ^{Ld}
Triptofan (Thr)	1.49±0.00 ^{Ra}	1.36±0.03 ^{Nb}	1.61±0.03 ^{Oc}	1.89±0.02 ^{Id}
Toplam	98.33±0.02^a	86.11±0.20^b	90.61±0.16^c	93.89±1.90^d

*UFLC-UV ve HPLC-FLD cihazı ile Tubitak-MAM tarafından analizleri yapılmıştır (D.05.G106 ve D.05.G418 işletme iç metodu)

**Aminoasit kompozisyonları 100 g protein içerisindeki oranlardır

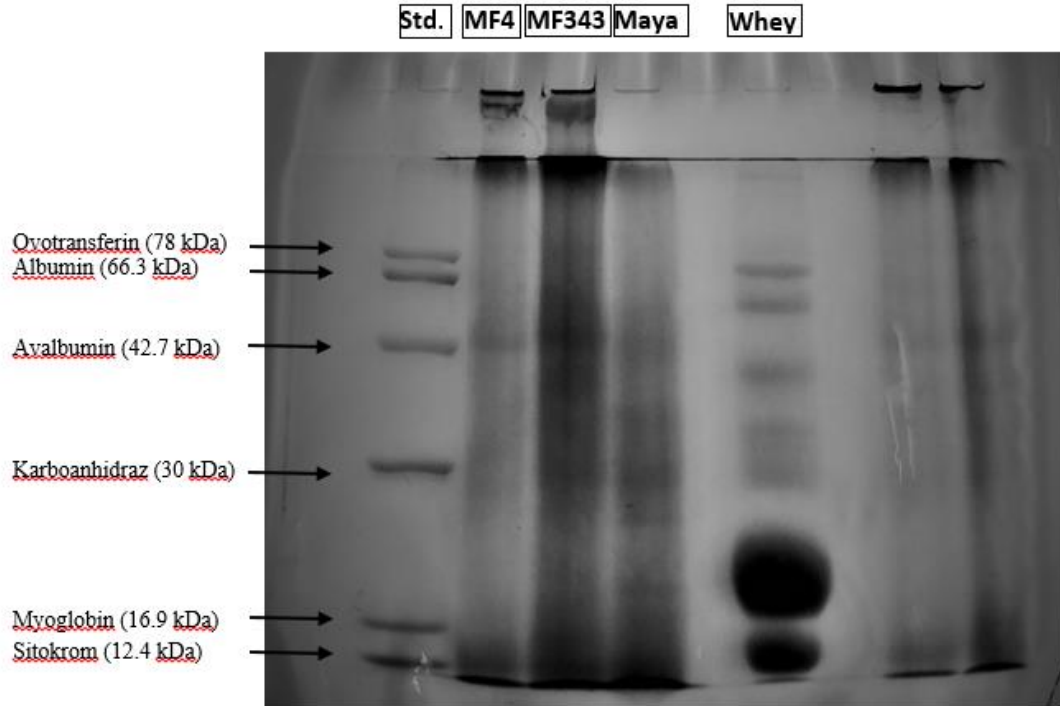
***a,b,c, Aynı satırlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

***A,B,C, Aynı sütunda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

4.6.3. THP konsantratlarının moleküler büyüklükleri

Üretilen THP konsantratlarının ve referans protein konsantratu olan Whey protein konsantratının toplam protein profillerine ait elektroforez (SDS-PAGE) bant görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Elektroforez işlemleri birkaç kez tekrar edilerek en iyi görünür bantlar elde edilene kadar çalışılmıştır. Çalışmada MF4, MF343 ve Maya THP konsantratlarında belirgin bantlar elde edilememekle birlikte iç içe geçmiş sürüntü bantlar şeklinde görüntüler elde edilebilmiştir. Özellikle MF4 ve MF343 konsantratlarında yürüme jeli ve ayırma jeli içerisine nüfuz edememiş büyük protein yapılar

gözlemlenmektedir. Bu durum muhtemelen büyük protein fraksiyonlarından veya protein agregatlarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarındaki zorlayıcı kimyasal şartlar bazı protein yapılarında agregat oluşumuna sebep olabilmektedir. MF4 konsantratında jel içerisine girebilmiş ve bant oluşturmuş protein sayısı oldukça azdır. Özellikle yaklaşık 42 kDa boyutlarında ve çok silik ve dağılmış 30 kDa boyutlarında bantlar izlenmektedir. MF4 örneğinde az miktarda 12 kDa boyutlarında birikmiş kısa protein parçaları da gözlemlenmektedir. MF343 konsantratlarında ise jel içerisine girememiş yoğun bir protein bant birikimi görülmektedir. MF343 örneğinde 42-66 kDa aralığında geniş bir protein bandı yer alırken bant sürüntüsü 30 kDa aralığa kadar gitmektedir. Maya konsantratında örnekteki tüm proteinler jel içerisine girmiştir. Maya örneklerinde büyük protein fraksiyonları veya agregat oluşumu gözlemlenmemiştir. Maya örneklerinde yaklaşık 42 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 27 kDa ve 20 kDa boyutlarında dağınık bantlar mevcuttur. Whey protein konsantratının jel içerisinde oluşturduğu bantlar daha net ve belirgin görülmektedir. Whey protein örneğinde ise yaklaşık 66 kDa, 55 kDa (BSA), 38 kDa (kazein), 30 kDa (kazein), 20 kDa (β -laktoglobulin) ve 12 kDa (α -laktoalbumin) büyüklüklerinde protein bantları elde edilmiştir. Özellikle α -laktoalbumin ve β -laktoglobulin fraksiyonları belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir. LAB proteinlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda Mehmeti ve ark., (2011) *E. Faecalis*, *Lc. Lactis* ve *Pediococcus* türlerinde hücresel proteinlerin moleküler ağırlıklarını 175 kDa ve 7 kDa aralığında değiştiğini ve en yoğun protein bantlarının ise 80-30 kDa aralığında yer aldığını bildirmişlerdir. Rajas ve ark., (2002), *Lb. plantarum* suşunda yüzey proteinlerini araştırdıkları çalışmalarında hücredeki temel protein yapısının 29 kDa ağırlığında olduğunu bulmuşlardır. Chen ve ark., (2016) ise *E. Faecalis* suşundan gerçekleştirdikleri protein ekstraksiyonu sonucu moleküler ağırlıklarını 20 kDa, 27 kDa, 40 kDa, 50 kDa ve 70 kDa olarak bulmuşlardır.

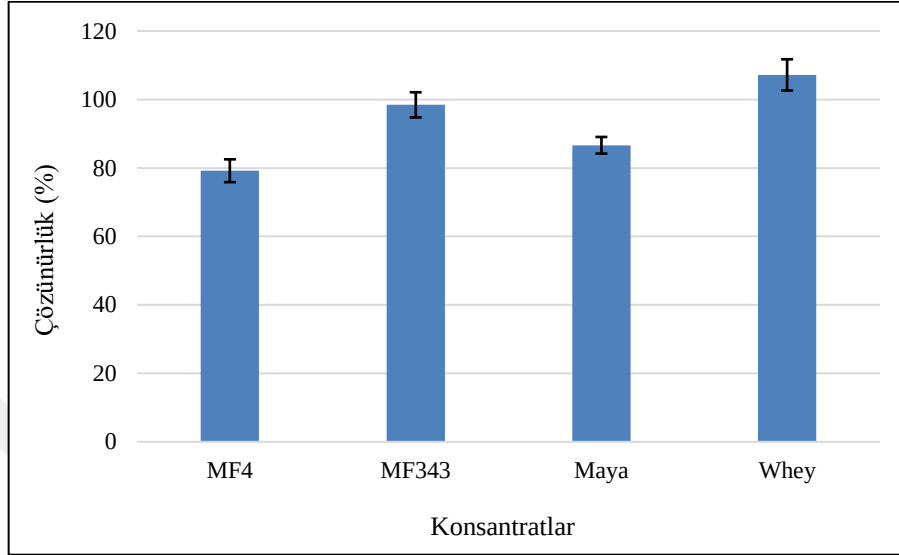


Şekil 4.15. THP ve Whey Protein konsantrat proteinlerinin moleküler büyüklükleri (SDS-PAGE)

4.6.4. THP konsantratlarının çözünürlük özellikleri

MF4, MF343, Maya ve Whey protein konsantratlarından %1 protein içerecek şekilde fosfat tamponunda hazırlanan çözeltilerin pH 7.0'da çözünürlük oranları değerlendirilmiştir (Şekil 4.16). Proteinlerin özellikle gıdaya yakın pH değerlerindeki çözünürlük seviyeleri konsantratların kullanılabilirliği açısından oldukça önemlidir. Ayrıca çözünme yetenekleri proteinlerde meydana gelen konformasyonel değişimler, denatürasyonlar ve kimyasal modifikasyonların göstergesi olabilmektedir. Proteinlerin köpük oluşumu, emülsifikasyonları gibi teknolojik karakterlerinin de temel belirleyicisi olmaktadır (Prinyawiwatkul ve ark., 1997). Proteinlerde çözünme yetenekleri iyonik şiddet, sıcaklık, pH, tuzlar, diğer organik moleküllerin varlığı gibi faktörlerin etkisindedir (Cheftel ve ark., 1985). Protein konsantratlarına ait çözünürlük değerleri (%) incelenecek olursa, tam çözünme Whey (%107) ve MF343 (%98) konsantratlarında gerçekleşmiştir. En düşük çözünme ise MF4 örneğinde %79 olarak elde edilmiştir. Tüm örneklerdeki çözünürlük değerleri genel olarak yüksek bulunmuştur. Otero ve ark., (2000) maya hücre protein konsantratlarında pH 7.0 değerinde çözünürlük değerlerini *S. cerevisiae*'da %36-

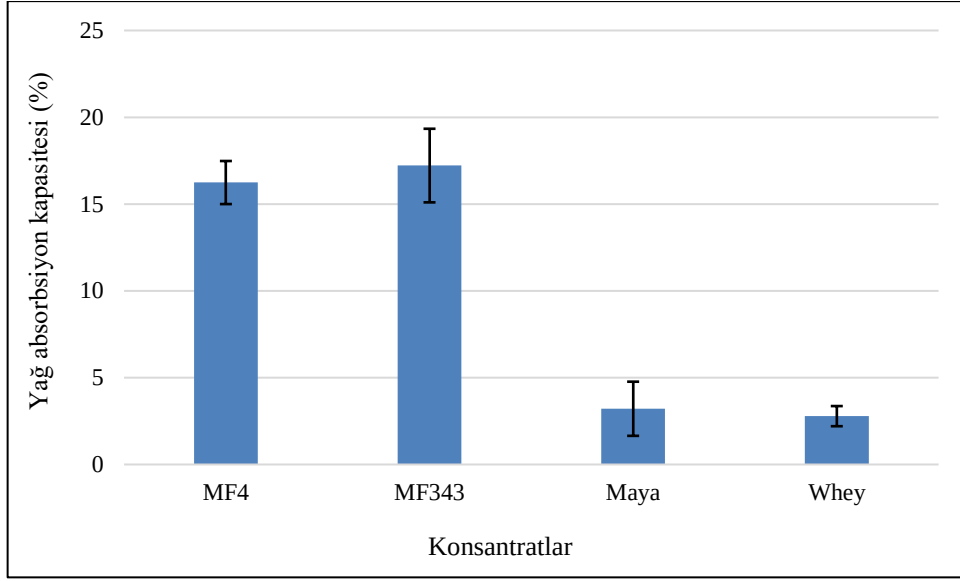
%17, *K. fragalis* 'de %37.42-%22.54 olarak bulmuşlardır. Salvador ve ark. (2010), kan hücre protein konsantratlarında yaptıkları bir çalışmada çözünürlük değerlerini pH 3.0'da %100-%98, pH 4.0'da %98-%93, pH 5.0'da %94-%92 aralığında bildirmektedirler.



Şekil 4.16. THP ve Whey konsantratlarının pH 7.0 değerindeki çözünürlükleri

4.6.5. THP konsantratlarının yağ absorpsiyon ve jel oluşturma özellikleri

Proteinler yağ gibi hidrofobik karakterli bileşiklerle olan interaksyonu, gıdalarda katkı olarak kullanılan konsantratların özellikle yağca zengin ürünlerde teknolojik etkilerini arttırmaktadır. Protein molekülündeki hidrofobik aminoasitlerin dağılımı temelde yağ absorpsiyonunu etkilemektedir. Diğer taraftan konsantratların protein dışındaki bileşenleri de yağ absorpsiyon kapasitelerini etkilemektedir (Cheftel ve ark., 1985). THP ve Whey konsantratlarının yağ absorpsiyon özelliklerinin belirlemek için örneklerin yağ ile homojenizasyonu sonrası yağ fazında dağılan proteinlerin miktarı ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.17). Yağ absorpsiyon sonuçları MF4 (%16.24) ve MF343 (%17.22) THP konsantratlarında en yüksek değerlerde elde edilmiş olup istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0.05$). Diğer taraftan Whey ve Maya konsantratlarında ise yağ absorpsiyonları daha düşük bulunmuş olup LAB THP konsantratlarına göre oldukça az yağ absorpsiyon kapasitesi göstermişlerdir. Özellikle Whey protein konsantratının suda çözünürlük derecesi ile ters orantılı bir şekilde yağ absorpsiyonu düşük çıkmıştır.



Şekil 4.17. THP ve Whey konsantratlarının yağ absorpsiyon kapasiteleri

Jelleşme protein moleküllerinin aminoasit kompozisyonu ve üç boyutlu yapıları ile doğrudan ilişkilidir. Diğer taraftan kükürtlü amino asitlerin varlığı, diğer bileşenlerin moleküler arası bağlantıları jel oluşumuna önemli katkılar sağlamaktadır (Adebowale ve Lawal, 2003; Arogundade, 2006). Çizelge 4.5 incelenecek olursa Jel oluşturma özelliklerinin belirlenmesinde 2. saat jelleşme sonuçları MF4 (+), MF343 (+), Maya (-), Whey (-) olarak; 24. saat jelleşme sonuçları ise MF4 (+++), MF343 (+++), Maya (+), Whey (-) olarak gerçekleşmiştir. MF4 ve MF343 konsantratlarının özellikle maya konsantratından daha düşük karbonhidrat içermesine rağmen daha iyi jelleşme karakteri göstermişlerdir. Protein jellerinde sadece proteinin kimyasal yapısı değil ortamda bulunan diğer bileşenlerde dolaylı yoldan proteinlerdeki jelleşmeyi etkileyebilmektedir. Yaptığımız çalışmada yaklaşık %10 protein konsantrasyonunda MF4 ve MF343 protein konsantratlarında 2. saate zayıf bir jelleşme gözlemlenirken, 24. saatte çok iyi jelleşme gözlemlenmiştir. Çalışmamızda minimum jel oluşturan konsantrasyonlar belirlenmemiştir. Protein konsantratlarının jelleşme özellikleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda minimum jel oluşturan konsantrasyonları kuşburnu proteinlerinde %6-8 (Moure ve ark., 2001), bezelye, bakla, soya için %18, %14, %16 (Fernandez-Quintela ve ark., 1997), fasulye konsantratlarında %8-16 aralığında bulunmuştur.

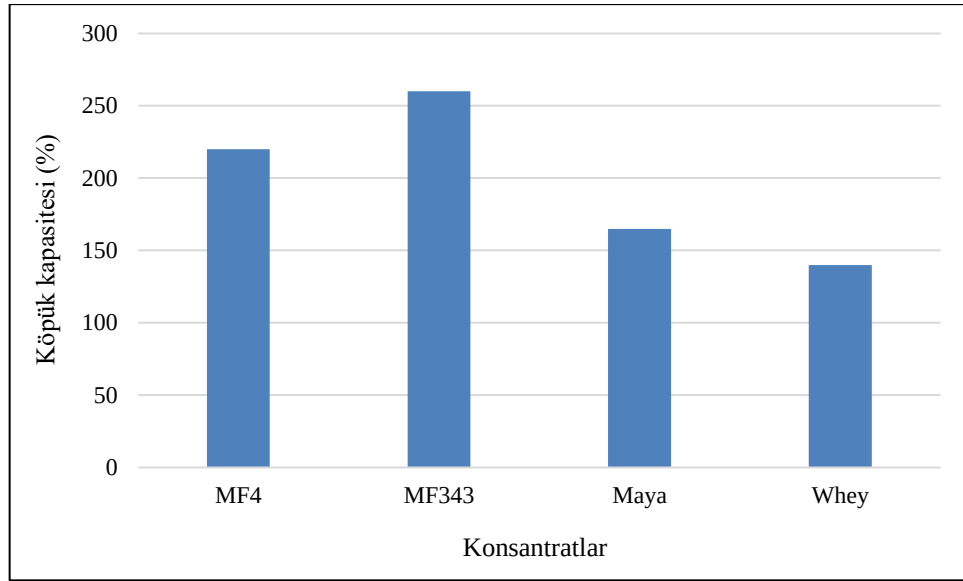
Çizelge 4.5. Protein konsantratlarının jel oluşturma özellikleri

	MF4	MF343	Maya	Whey
2. saat	+	+	-	-
24. saat	+++	+++	+	-

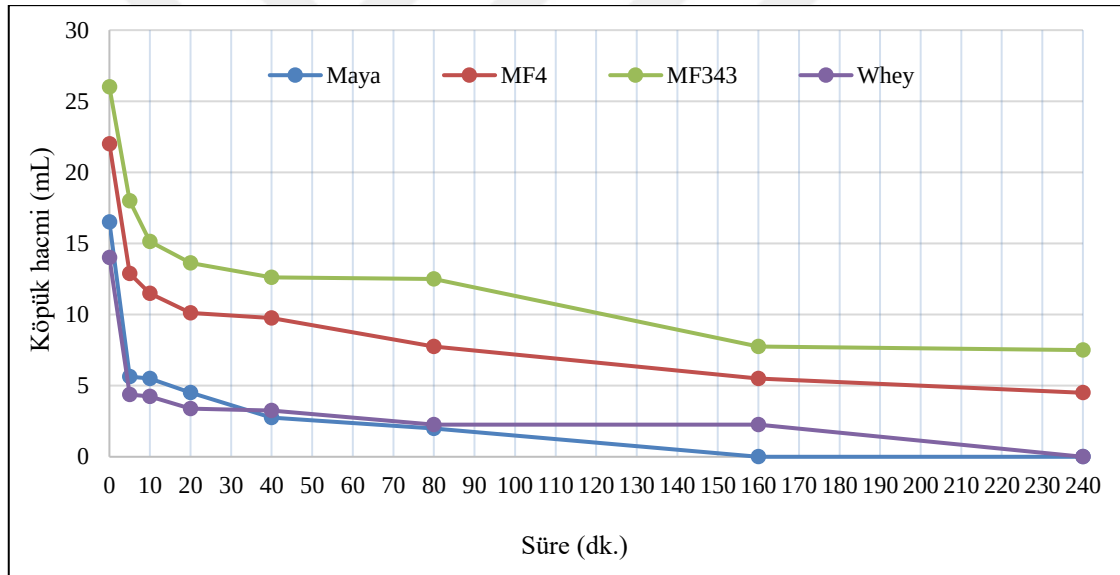
4.6.6. THP konsantratlarının köpük kapasitesi ve stabilitesi

Köpük hava ile su arayüzeyleri arasında oluşan bir interaksyondur. Köpükler sıvı sistem içerisinde havanın hapsolması ve sıvı bir faz tarafından çevrelenmesi ile oluşmaktadır. Sıvı içerisindeki havanın uzun süreli olarak kalabilmesi için arayüzeyde dağılan ve yüzey gerilimini azaltan bir sisteme ihtiyaç vardır. Köpük oluşumunda stabiliteyi sağlamada temelde proteinler ve yüzey aktif bileşikler temel bir rol oynamaktadır. Köpük oluşumu proteinlerin üç boyutlu yapıları, aminoasit kompozisyonu ve bazı çevresel şartların etkisi altındadır (Massoura ve ark., 1998; Makri ve ark., 2005). MF4, MF343, Maya THP konsantratları ve Whey konsantratında pH 7.0'da ölçülen köpük kapasiteleri Şekil 4.18'de verilmiştir. MF343 konsantratında köpük kapasitesi değeri %260, MF4 örneğinde %220, Maya örneğinde %165 ve Whey örneğinde ise %140 olarak bulunmuştur. THP konsantratlarının köpük kapasitelerinin oldukça yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. Özellikle referans olarak kullanılan Whey protein konsantratında ölçülen değerlerin oldukça üzerinde kalmıştır. Protein konsantratları ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda örneklerin köpük kapasiteleri soya proteinlerinde %22 (Fernandez-Quintela ve ark., 1997), protein konsantratlarında %6.5 (Arogundade, 2006), prinç protein konsantratlarında %8.7 (Chandi ve Sogi, 2006), keten protein izolatlarında %42 (Martinez-Flores ve ark., 2005), fasulye izolatlarında %134 (Adebawale ve Lawal, 2003) olarak belirlemiştir.

Örneklerin köpük hacimlerinde zamana karşı meydana gelen azalmaya ait grafik Şekil 4.19'da incelenecek olursa, Maya ve Whey konsantratlarında köpük hacimlerinin daha hızlı bir şekilde azalarak köpüğün tamamen kaybolduğu görülmektedir. Diğer taraftan MF4 ve MF343 örneklerinde ise köpük hacmindeki azalma daha yavaş bir hızla seyrederek 240. dakikaya kadar belirli bir hacimde kalmıştır. Tüm örneklerde 2. dakikadan sonra köpük hacmindeki azalma hızı yavaşlamıştır.



Şekil 4.18. THP ve Whey konsantratlarının köpük kapasiteleri



Şekil 4.19. THP ve Whey konsantratlarının köpük stabiliteleri

4.6.7. THP konsantratlarının emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI)

Örneklere ait emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi değerleri Çizelge 4.6'te verilmiştir. Aktivite indeksi değerleri protein moleküllerinin ara yüzeye (su/yağ) absorblanma kabiliyetinin bir ölçüsüdür. Protein konsantratlarının aktivite indeksleri MF4 için 121.65 m²/g, MF343 için 104.66 m²/g, Maya için 154.99 m²/g ve Whey için

122.21 m²/g olarak bulunmuştur. Emülsiyon aktivite indeksi en yüksek Maya örneğinde hesaplanmıştır (p<0.05). MF4 ve Whey konsantratlarında hesaplanan aktivite indeksleri ise benzer bulunmuştur (p>0.05). En düşük aktivite indeksi ise MF343 konsantratında elde edilmiştir. Salvador ve ark., (2010) protein konsantratlarında yaptıkları çalışmada %0.1 protein oranında EAI değerini 445 m²/g, %0.5 protein oranında 203-301 m²/g, %1 protein oranında ise 132-170 m²/g olarak bildirmişlerdir. Webb ve ark., (2002) yaptıkları çalışmada ise EAI değerlerini buğday proteininde 155 m²/g, kazein için 82 m²/g, soya için 115 m²/g olarak bulmuşlardır.

Örneklerin 10. dk. emülsiyon stabilite indeksleri (ESI) Çizelge 4.6'te incelendiğinde, en yüksek stabilite indeksinin (45.63 dk.) Maya örneğinde elde edildiği görülmektedir. Maya konsantratı EAI ve ESI değerleri bakımından en iyi örnek olarak belirlenmiştir. MF4 ve Whey örneklerinin ESI değerleri benzer bulunmuştur. MF343 konsantratı ise MF4 ve Whey örneğinden daha yüksek ESI değerine (35.12 dk.) sahip olmuştur.

Çizelge 4.6. THP ve Whey konsantratlarının Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) değerleri

Konsantrat	Emülsiyon Aktivite İndeksi EAI (m ² /g)	Emülsiyon Stabilite indeksi ESI (dk.)
MF4	121.65±0.53 ^a	18.61±1.07 ^a
MF343	104.66±4.07 ^b	35.12±3.41 ^b
Maya	154.99±3.02 ^c	45.63±5.59 ^c
Whey	122.21±7.35 ^a	24.36±5.14 ^a

5. SONUÇ

Tez çalışmasında THP üretiminde kullanılacak LAB suşları için uygun besiyeri kompozisyonunun belirlenmesi için ön denemelerde salatalık suyu ve melas katkılarının hücre gelişimi açısından kullanılabileceği sonucuna varılarak bu kapsamda farklı besiyerleri ve bileşimleri [MRS (MR), Salatalık Suyu (SS), MRS+Salatalık Suyu (MS), ve Salatalık Suyu+Melas (SM)], farklı inkübasyon sıcaklıkları (25-30-35°C), farklı besiyeri başlangıç pH değerleri (pH 6.0-6.5-7.0) statik inkübatörde ve ayrıca optimum üretim şartları belirlendikten sonra çalkalamalı inkübasyon koşullarında (50 ve 200 rpm) fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince kültür ortamında pH, toplam asitlik (%), biyokütle (g/L), toplam şeker (g/L) değişimleri takip edilmiştir. Fermentasyonlarda en yüksek biyokütle üretimi *Lb. plantarum* MF4 için MS besiyerinde 35°C sıcaklıkta fermentasyonun 12. saatinde 2.57 g/L olarak, *Lb. brevis* MF343 için MS besiyerinde 35°C sıcaklıkta fermentasyonun 24. saatinde 2.27 g/L olarak elde edilmiştir. Bu değerler ile en yüksek biyokütle üretiminin *Lb. plantarum* MF4 suşu ile gerçekleştirildiği belirlenmiş olup endüstriyel biyokütle üretimlerinde üretilen biyokütle miktarlarının tek başına anlamlı olmadığı, aynı zamanda fermentasyonlarda hesaplanan kinetik parametrelerinde değerlendirmede dikkate alınması gerekmektedir. Özellikle hammadde kaynaklarının pahalı olduğu proseslerde substrat dönüşüm oranları, hücre verimi (Y_x/s) ve mikroorganizmalar açısından da spesifik gelişme hızı (μ) gibi parametreler önem kazanmaktadır. Hacimsel verimlilik (V_{px}) değerleri ise fermentasyon proseslerinde kitlesel üretimlerde maliyetleri belirleyen temel kriterler arasında yer almaktadır. Bu açıdan yaptığımız çalışmada fermentasyonlardan elde edilen veriler ile hesaplanan kinetik parametre değerleri; *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için spesifik gelişme hızları sırasıyla 0.405 h^{-1} ve 0.384 h^{-1} , hacimsel verimlilikleri ise 0.212 g/L.h ve 0.094 g/L.h olarak hesaplanmıştır. Kinetik parametreleri açısından fermentasyonlarda özellikle *Lb. plantarum* ile gerçekleştirilen üretimlerde hacimsel verimlilik değerlerinin *Lb. brevis*'e göre yaklaşık iki kattan fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar *Lb. plantarum* ile gerçekleştirilen biyokütle üretimlerinin çok daha kısa sürede ve fazla miktarlarda gerçekleştiğini göstermektedir. Hacimsel verimlilik değerlerinin yüksek olması üretilen biyokütlenin besiyeri ortamından uzaklaştırılması maliyetlerini de olumlu etkilemektedir. Düşük hacimsel verimlilik değerlerinde birim hacimden ayrılan biyokütle konsantrasyonu azaldığı için maliyetler artmaktadır.

Çalışmada diğer besiyerleri sonuçları incelendiğinde MRS besiyerinde her iki bakteri suşu için de MS besiyerinde alınan sonuçlara yakın biyokütle miktarları ve verimlilik sonuçları elde edilmiştir. Ancak besiyeri maliyeti açısından salatalık suyunun belirli miktar MRS besiyeri ile karıştırılması daha ekonomik olmuştur. İnkübasyon sıcaklıkları açısından da 30°C ve 35°C sonuçları daha yakın bulunmuştur.

Lb. plantarum MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları için fermentasyon deneme planları sonuçlarının değerlendirilmesi ve en yüksek biyokütle üretiminin ve en iyi biyokütle verimlilik sonuçlarının elde edildiği fermentasyon koşullarında başlangıç pH değeri 7.0 olan MRS+Salatalık Suyu (MS) besiyerinde 35°C’de statik inkübasyon şartlarında (12-24 saat) fermentasyonları gerçekleştirilerek THP üretimleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonrası üretilen hücreler besiyeri içerisinden santrifüj yolu ile uzaklaştırılarak yıkanma işlemi uygulanmıştır. Hücrelerdeki proteinlerin kolay bir şekilde ekstrakte olmasını sağlamak amacı ile MF4, MF343 ve ticari Maya hücreleri ortak işlemlerden geçirilmiştir. Bu aşamada hücre çökeltileri enzimatik (lizozim, kitinaz, glukanaaz) ve mekanik olarak (sonikasyon, dondurma-çözündürme, homojenizasyon) parçalanmış ve yağı hekzan ile uzaklaştırılmıştır. Protein ekstraksiyonu için hazırlanan parçalanmış hücre süspansiyonlarının (homojenizat) farklı pH değeri, seyreltme oranı ve NaCl konsantrasyonlarında ekstraksiyon verimleri bulunmuştur. Özellikle ekstraksiyon sıvısının pH değeri verimi önemli ölçüde etkilemiştir. Tüm hücre homojenizatlarında en iyi ekstraksiyon verimi pH 12’de gerçekleşmiştir. MF4, MF343 ve Maya homojenizatlarında bu pH değerinde elde edilen verim değerleri sırası ile %69.84, %85.04 ve %55.42 olarak elde edilmiştir. Birçok proteinlerin çözünürlükleri alkali şartlarda daha iyi olduğu için alkali ekstraksiyon temelde tercih edilen bir yol olmaktadır. MF343 homojenizatından proteinlerin daha verimli bir şekilde ekstrakte edildiği bulunurken, Maya homojenizatında daha verimsiz bir ekstraksiyon gerçekleşmiştir. Ekstraksiyon verimlerinde hücre duvar yapıları temel belirleyici faktör olmaktadır. Protein ekstraksiyon çalışmalarında seyreltme oranı en iyi 2.25 kat olarak bulunurken, ortama ilave edilen düşük miktarlardaki NaCl’nin önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

MF4 ve MF343 protein ekstraktlarında alkol konsantrasyonu ile birlikte saflaştırma verimlerinin arttığı bulunmuştur. MF4 ekstraktında elde edilen en yüksek protein geri

kazanım oranı %80 alkol konsantrasyonunda %79.73 olarak gerçekleşmiş olup, MF343 ekstraktında %80 alkol konsantrasyonunda elde edilen değer (%77.81) ile benzer bulunmuştur. İzoelektrik çöktürme denemesinde ise MF4 ekstraktlarında en yüksek protein geri kazanım oranı pH 3.5’da %86.64 olarak; MF343 ekstraktında pH 2.5’de %94.77 olarak; Maya ekstraktında ise pH 3.0’da %88.77 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında her bir THP ekstraktında uygun saflaştırma yöntemi ve pH değerleri belirlenmiştir. Protein geri kazanım oranlarının daha yüksek olması ve proteinlere verdiği zararın daha az olması sebebi ile izoelektrik çöktürme yöntemi proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Protein çöktürme işlemlerinde nötral tuzlar, organik çözücüler, ısıl işlem gibi farklı teknikler kullanılabilmektedir.

Belirlenen koşullarda izoelektrik çöktürme ile üretilen THP konsantratlarının kurumadadaki protein içerikleri MF4 örneğinde %72.47, MF343’te %73.09 ve Maya örneğinde ise %62.79 olarak bulunmuştur. THP konsantratlarının aminoasit profilleri incelendiğinde aspartik, glutamik ve lizin aminoasit içeriklerinin diğer aminoasitlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MF4 ve MF343 konsantratlarının arjinin, alanin aminoasitleri açısından diğer konsantratlara kıyasla daha yüksek içeriğe sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Proteinlerin sahip oldukları aminoasit dağılımı ürünlerin teknolojik ve beslenme özelliklerini önemli ölçüde belirlemektedir. Özellikle hidrofobik ve hidrofilik aminoasit dengesi emülsifikasyon özelliklerinin doğasını belirlemektedir. Çalışmada MF4, MF343 ve Maya THP konsantratlarında belirgin bantlar elde edilememiş, iç içe geçmiş sürüntü şeklinde bant görüntüleri elde edilebilmiştir. Özellikle MF4 ve MF343 konsantratlarında yürüme jeli ve ayırma jeli içerisine girememiş büyük protein yapılar gözlemlenmektedir. Üretilen THP konsantratlarının bazı teknolojik özellikleride incelenmiş olup MF4 ve MF343 örneklerinde protein çözünürlük oranları %79, %98, yağ absorpsiyon kapasiteleri %16, %17, köpük kapasiteleri %220, %260, emülsiyon aktivite indeksleri (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksleri (ESI) ise 122.65 m²/g - 18.61 dk. ve 104.66 m²/g - 35.12 dk. olarak bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda yerel kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakteri suşları ile THP üretim fermentasyon koşulları optimize edilerek, uygun THP ekstraksiyon ve saflaştırma koşulları ortaya konmuştur. Üretilen THP konsantratları özellikle gıda sanayii için uygun kullanım alanlarını belirlemek üzere teknolojik özellikleri incelenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abram, F., Gunnigle, E., ve O'Flaherty, V., 2009. Optimisation of protein extraction and 2-DE for metaproteomics of microbial communities from anaerobic wastewater treatment biofilms. *Electrophoresis*, 30, 4149–4151.
- Adebowale, K.O., Lawal O.S., 2003. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 83, 237-246.
- Adnan, A.F.M. ve Tan, I.K.P., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380-1385.
- Akalya, V., Monisha, C., Rajeshwari, M., Suryaprabha, S., Manivasagan, V.ve Ramesh Babu, N., 2017. Identification of single cell protein producing properties from fruit waste. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 6(04), 95-98.
- Akyüz, A. ve Ersus Bilek, S., 2018. Protein çöktürme yöntemlerinin karşılaştırılması. *Çukurova Tarım Gıda Bil. Der.*, 33(2), 83-92.
- Ali, S., Mushtaq, J., Nazir, F. ve Sarfraz, H., 2017. Production and processing of single cell protein (SCP) - A Review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(7), 86-94.
- Altıok, D., 2004. Kinetic modelling of lactic acid production from whey. Yüksek lisans tezi, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Anderson, C., Longton, J., Maddix, C., Scammell, G. W. ve Solomons, G. L., 1975. The growth of microfungi on carbohydrates. *Single-Cell Protein II*, Editör: S. Wang. MA: MIT Press, Cambridge, 314-329.
- Anupama, & Ravindra, P., 2000. Value-added food: single cell protein. *Biotechnol. Adv.*, (18), 459–479.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International (16th. Pub). Arlington, VA, USA.
- Ardestani, F., & Alishahi, F., 2015. Optimization of single cell protein production by *aspergillus niger* using taguchi approach. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 5(2), 73-79.
- Arogundade, L.A., 2006. Functional characterization of tef (*eragostics tef*) protein concentrate: influence of altered chemical environment on its gelation, foaming, and water hydration properties. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 831-838.
- Babazadeh, M., Soltani, M., Kamali, A. ve Asl, M. S., 2014. Production of single cell protein from Stickwater of kilka fish meal factory using *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus licheniformis*. *WALIA journal*, 30(S3), 96-101
- Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. 2015. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiol*, 60, 241-251.
- Becker, E. W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207-210.
- Beloborodov, S., Bao, J., Krylova, S., Shala-Lawrence, A., Johnson, P., ve Krylov, S., 2018. Aptamer facilitated purification of functional proteins. *Journal of Chromatography B*, 1073, 201-206.

- Bhalla, T. C., Sharma, N. N., ve Sharma, M., 2007. Production of metabolites, industrial enzymes, amino acids, organic acids, antibiotics, vitamins and single cell proteins. *J. Environ. Issues*, 6, 34-78.
- Boeck, T., Rubiano, L., Nadal, I., Monedero, V., Martinez, G., ve Yebra, M., 2010. Sorbitol production from lactose by engineered *Lactobacillus casei* deficient in sorbitol transport system and mannitol-1-phosphate dehydrogenase. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 85, 1912-1992.
- Bomrungnok W., Sonomoto K., Pinitglang S. ve Wongwicharn A., 2012. Single step lactic acid production from cassava starch by *Lactobacillus plantarum* sw14 in conventional continuous and continuous with high cell density. *APCBEE. Procedia*, 2, 97-103.
- Calloway, D. H. ve Kumar, A. M., 1969. Protein quality of the bacterium *Hydrogenomonas eutropha*. *Applied Microbiology*, 17(1), 176-178.
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: A Literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- Chandi, G.K., Sogi, D.S., 2006. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of food engineering*, Article in press.
- Chaplin, M., 1994. Monosaccharides. *Carbohydrate analysis - a practical approach*, Ed: M. Chaplin ve J. Kennedy. Oxford University Press, Inc., New York, 1-41.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D., 1985. Amino acids, peptides and proteins. Ch. 5 in *Food Chemistry* O.R. Fennema (Ed.), 246-369. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Cheriguene, A., Chougrani, F. and Bensoltane, A. 2006. Identification and characterization of lactic acid bacteria from Algerian goat's milk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 9 (7); pp. 1242-1249.
- Çon, A.H. and Karasu, N., 2009. Determination of antagonistic starter cultures for pickle and olive fermentation processes. *Czech J. Food. Sci.*, vol. 27 (3); pp. 185-193.
- Demirel, R. ve Şentürk Demirel, D., 2018. Tek hücre proteinlerinin insan ve hayvan beslemede kullanımı. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 8(3), 327-336.
- Dennison, C., 2010. Protein saflaştırma rehberi. (M. Oktay, Çev.), Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Dimova, N., 2003. RP-HPLC Analysis of aminoacids with UV-Detection, *Bulgarian Academy of Science*, Tome 56, No 12.
- Donnelly, W.J., 1987. Ethanol stability of casein solutions as related to storage stability of dairy based alcoholic beverages. *J. Food Sci.*, 52(2), 389-393.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. ve Gokhale, D., 2008. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 333-335.
- Dursun, D., 2010. Ankara çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği, Ankara.
- Erdman, M. D., Bergen, W. G. ve Reddy, C. A., 1977. Amino acid profiles and presumptive nutritional assessment of single-cell protein from certain *Lactobacilli*. *Applied and environmental Microbiology*, 33(4), 901-905.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E. ve Evren, S., 2011. Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1), 11-17.
- Felis, G. E. ve Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, 8, 44-61.

- Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S., Martinez, J.A., 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 331-342.
- Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C. M., . . . van Sinderen, D. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. *Viruses*, 11(5), 393.
- Ficoseco C.A., Mansilla F.I., Maldonado N.C., Miranda H., Fátima Nader-Macias M.E., Vignolo G.M. (2018). Safety and growth optimization of lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle for probiotic formula design. *Front Microbiol*, 9, 2220.
- Fidantsi, A., Doxastakis, G., 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 119-124.
- Gheshlaghi, R., Scharer, J.M., Moo-Young, M. ve Douglas, P.L., 2008. Application of statistical design for the optimization of aminoacids separation by reverse-phase hplc, *Analytical Biochemistry*, 383, 93-102.
- Gouveia, L., Batista, A. B., Sousa, I., Raymundo, A., ve Bandarra, N. M., 2008. Microalgae in novel food products. *Food Chemistry Research Developments*, Papadopoulos, K.. Nova Science Publishers, New York, 75-111.
- Hanmoungjai, P. P. ve Niranjana, K., 2002. Enzyme-assisted water extraction of oil and protein from rice bran 77, 771-776. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77, 771-776.
- Herbert, D., Phipps, P. ve Strange, R., 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Meth. Microbial.*, 5B, 249-300.
- Henzler, H. J., ve Schedel, M., 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess. Eng.*, 7(3), 123-131.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González-Prieto, M.J. and Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from armada cheese (Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, vol. 13; pp. 469-479.
- Huang, Y. T. ve Kinsella, J. E., 1986. Functional properties of phosphorylated yeast protein: solubility, water-holding capacity, and viscosity. *J. Agric., Food Chem.*, 34, 670-674.
- Hutkins, R.W., 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*. Blackwell Publishing, Oxford, 473p, UK.
- Ikeda, S. ve Nishinari, K., 2001. On solid-like rheological behaviors of globular protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 15, 401-406.
- Zhang, J., Xue, X., Zhou, J., Chen, F., Wu, L., Li, Y. and Zhao, J., 2009. Determination of tryptophan in bee pollen and royal jelly by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 23(9), 994–998.
- Kam, S., Kenari, A. A. ve Younesi, H., 2012. Production of single cell protein in stickwater by *Lactobacillus acidophilus* and *Aspergillus niger*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21,403– 417.
- Kıran, F., 2006. Hücre duvarı protein profilleri ve pilazmid içeriklerine göre laktik asit bakterilerinin moleküler tanısı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, 130s., Ankara.
- Kırma, İ., 2016. Gıda kaynaklı laktik asit bakterileri kullanılarak ekzopolisakkarit üretimi. (yüksek lisans tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Kiosseoglou, V. ve Paraskevopoulou, A., 2005. Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions. *Food Hydrocolloids*, 19, 527–532.

- Konlani, S., Delgenes, J. P., Moletta, R., Traore, A. ve Doh, A., 1996. Optimization of cell yield of *Candida krusei* so1 and *Saccharomyces* Sp. Lk3g cultured in Sorghum hydrolysate. *Bioresource Technology*, 57, 275-281.
- Kunasundari, B., Murugaiyah, V., Kaur, G., Maurer, FHJ. ve Sudesh, K., 2013. Revisiting the single cell protein application of *Cupriavidus necator* H16 and recovering bioplastic granules simultaneously. *PLoS ONE* 8(10): e78528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.007852>.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. ve von Wright, A. (Eds.), 2011. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.
- Lerici, C.R. ve Manzocco, L., 2000. Biological activity of ethanol in relation to its vapour pressure. Note 1: Inactivation of polyphenoloxidase in model systems. *LWT-Food Sci. Technol.*, 33(8), 564-569.
- Lipinsky, E. S. ve Litchfield, J., 1974. Single-cell protein in perspective. *Food Technol.*, 28, 16-24.
- Liu, B., Li, Y., Song, J., Zhang, L., Dong, J., ve Yang, Q., 2014. Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose*, 21, 3637–3645 .
- Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N. ve Vorobiev, E., 2016. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies*, 36, 181-192.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saravia, J. A. ve Franco, D., 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. Editörler: F. J. Barba, A. S. Sant'Ana, V. Orlie ve M. Koubaa, *Innovative Technologies for Food Preservation*. 53-107, Academic Press.
- Makrı, E., Papalamprou, E., Doxastakis, G., 2005. Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous european legume crops (lupine, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 19, 583-594.
- Yust, M.M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., Millán, F. ve Alaiz, M., 2004. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section, food chemistry*, 85(2), 317-320.
- Martinez-Flores, H.E., Soto, E.B., Garnica-Romo, M.G., Saldana, A.L., Penagos, C.J.C., 2005. Chemical and functional properties of flaxseed protein concentrate obtained using surface response methodology.
- Massoura, E., Vereijken, J.M., Kolster, P., Derksen, J.T.P., 1998. Proteins from *Crambe abyssinica* oilseed. I. Isolation Procedure. *Journal of The American Oil Chemists. Society*, 75, 329-335.
- McElwain, M., Richardson, T. ve Amundson, C., 1975. Some functional properties of succinylated single cell protein concentrate. *J. Milk Food Technol.*, 38(9), 521-526.
- Mehmeti, I., Kiran, F. ve Osmanagaoglu, O., 2011. Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2178-2185.
- Mensah, J. ve Twumasi, P., 2017. Use of pineapple waste for single cell protein (SCP) production and the effect of substrate concentration on the yield. *J Food Process Eng.*, 40:e12478, 1-9.

- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Ed;Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, 555-598 s, Ankara.
- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Miller, B. M. ve Litsky, W.,1976. Single cell protein in industrial microbiology. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Moure, A., Rua, M., Sineiro, J., Dominguez, H., 2001. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*. 74: 327-339.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H. ve Parajo, J. C., 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 945-963.
- Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J., Che Man, Y.B., 2000. Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeonpea (*cajanus cajan*) and cowpea (*vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional Properties. *Food Chemistry*, 71, 157-165.
- Naczki, M., Diosady, L. ve Rubin, L., 1985. Functional properties of canola meals produced by a two-phase solvent extraction system. *J. Food Sci.*, 50, 1685-1692.
- Najafpour, G. D., 2007. CHAPTER 14 - Single-Cell Protein. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, Elsevier BV, Amsterdam, 332-341.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A. ve Boudrant, J., 2015. The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 893-902.
- Nasseri, A. T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H. ve Ghasemi, Y., 2011. Single cell protein: production and process. *Am. J. Food Technol.*, (6), 103-116.
- Natarajan, S., Xu, C., Caperna, T. J. ve Garrett, W. M., 2005. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem.*, 342: 214-220.
- Nonaka, T., Tsurui, N., Mannen, T., Kikuchi, Y. ve Shiraki, K., 2018. A new pH-responsive peptide tag for protein purification. *Protein Expression and Purification*, 146, 91-96.
- Oliva-Teles, A. ve Gonçalves, P., 2001. Aquaculture enhancement. *J. Chem. Eng.*, 202: 269 - 278.
- Otero, M. A., Wagner, J. R., Vasallo, M. C., Garcia, L. ve Anon, M. C., 2000. Thermal behavior and hydration properties of yeast proteins from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Food Chemistry*, 69, 161-165.
- Özcan, T. ve Delikanlı, B., 2011. Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 25(2), 77-88.
- Özer, B., 2016. Fermente süt ürünleri, probiyotik organizmalar ve peynir. N. Aran içinde, gıda biyoteknolojisi (s. 201-207). İstanbul: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Parajo, J., Santos, V., Dominguez, H., Vazquez, M. ve Alvarez, C., 1995. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. *Food Chemistry*, 53, 157-163.
- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G. ve Kiosseoglou, V., 2003. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*, 36, 431-438.
- Pearce, K. ve Kinsella, J., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716-723.

- Prinyawiwatkul, W., Beuchat, L.R., Mcwatters, K.H., Phillips, R.D., 1997. Functional properties of Cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, boiling and fungal fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 480-486.
- Prosser, J. I. ve Tough, A. J., 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical reviews in biotechnology*, 10(4), 253-274.
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M. ve Wiebe, M. G., 2017. Single cell protein—state-of-the-art, *Industrial Landscape and Patents 2001–2016*. *Front. Microbiol.*, 8: 2009.
- Rezvani, F., Ardestani, F. ve Najafpour, G., 2017. Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *brazilian journal of microbiology*, 48(2), 251-258.
- Rojas, M., Ascencio, F. ve Conway, P. L., 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104r that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2330–2336.
- Rodríguez – Couto, S. and Sanromán, M., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering*, vol. 76; pp. 291-302.
- Rumsey, G., Hughes, S. ve Kinsella, J., 2007. Use of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen by lake trout. *J. World Aquac. Soc.*, 21: 2005 - 2009.
- Salvador, P., Sagner, E., Parés, D., Carretero, C. ve Toldrà, M., 2010. Foaming and emulsifying properties of porcine red cell protein concentrate. *Food Sci Tech Int*, 16(4), 289-296.
- Salvetti, E., Torriani, S. ve Felis, G. E., 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217-226.
- Sanchez-Vioque., R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F., 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*. 64: 237-243.
- Sieo, C., Wong, B., Abdullah, N. ve Ho, Y., 2007. effects of extraction methods and age of cells on the whole-cell protein patterns of *Lactobacillus*. *Research Journal of Microbiology*, 2(10), 727-734.
- Sivasankar, B., 2005. *Bioseparations: principles and techniques*. PHI Learning Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Soro-Yao, A. A., Aka, S., Thonart, P. ve Djè, K. M., 2014. Assessment of the potential of lactic acid bacteria as dried starter culture for cereal fermentation. *The Open Biotechnology Journal*, 8(1).
- Söderberg, J., 2013. *Functional properties of legume proteins compared to egg proteins and their potential as egg replacers in vegan food*. Uppsala: Publikation / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap.
- Srividya, A. R., Vishnuvarthan, V. J., Murugappan, M., & Dahake, P. G., 2013. Single Cell Protein - A Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*, 2(4), 472-485.
- Stiles, M. E., 1996. *Biopreservation by lactic acid bacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.
- Subagio, A., 2006. Characterization of Hyacinth Bean (*lablab purpureus* L. Sweet) seeds from indonesia and their protein isolate. *Food Chemistry*, 95: 65-70.
- Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S. ve Pradeep, B., 2015. Single Cell Protein Production: A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(9), 251-262.

- Sumner, A.K., Nielsen, M.A., Youngs, C.G., 1980. Production and evaluation of pea protein isolate. 40th. Annual Meeting of the Institute of Food Technologist, New Orleans.
- Vaclavik, V. ve Christian, E., 2003. Essentials of food science second edition. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.
- Temiz, A., 1999. Gıdalarda mikrobiyal gelişmeyi etkileyen faktörler. Gıda Mikrobiyolojisi. Ünlütürk, A., Turantaş, F. (Ed). 2.Baskı. s. 53-82, İzmir.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. Biomed Res. Int., 1-8.
- Tokatlı, M., Elmacı, S.B., İşleyen, N.A., Özçelik, F. 2017. Technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles. The Journal of Food, 42(6): 693-707.
- Vahidi, H., Mojab, F. ve Taghavi, N., 2010. Effects of carbon sources on growth and production of antifungal agents by *Gymnopilus spectabilis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 20: 219-222.
- Valencia-García, F. E., Motato-Rocha, K. E., Vera-Peña, M. Y. ve Sepúlveda-Lindarte, M. L. 2018. Kinetic parameters of lactic acid bacterial isolated from fermented milk “Suero Costeño”. Dyna, 85(206), 155-161.
- Vrati, S., 1984. Single cell protein production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluents of biogas plant . Appl Microbiol Biotechnol., 19:199-202.
- Wao01, A.A., Dixit, S., 2018. Production and Immobilization of *Lactobacillus Acidophilus* on Fruit Wastes Containing Media as Probiotics. Biological Sciences, (2), 9-18.
- Webb, M.F., Naeem, H.A., Schmidt., 2002. Food protein functionality in a liquid system: a comparison of deamidated wheat protein with dairy and soy proteins. Journal of Food Science. 67: 2896-2902.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. ve Morris, V., 2004. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. Advances in Colloid and Interface Science, 108-109, 63-71.
- Yavuz, M. ve Özçelik, B., 2016. Bitkisel Protein İzolatlarının Fonksiyonel Özellikleri. Akademik Gıda, 14(4), 424-430.
- Yörük, G. N. ve Güner, A., 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 6(2), 163-1

7. EKLER

Ek 1: *Lb. plantarum* MF4 suşu ile farklı besiyerleri, inkübasyon sıcaklıkları ve başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince kültür ortamında ölçülen pH, Toplam asitlik, Biyokütle ve Toplam şeker değerleri

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. plantarum</i> MF4	MRS broth besiyeri	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.60 ±0.01	0.06 ±0.01	0.31 ±0.02	17.94 ±0.16
				12	4.53 ±0.02	0.13 ±0.00	2.08 ±0.01	12.22 ±0.08
				24	4.13 ±0.02	1.01 ±0.06	2.20 ±0.02	9.78 ±0.11
				36	3.87 ±0.03	1.63 ±0.02	2.22 ±0.00	6.19 ±0.08
				60	3.92 ±0.08	1.71 ±0.01	2.19 ±0.02	2.06 ±0.39
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.02 ±0.01	0.01 ±0.00	0.38 ±0.06	18.22 ±0.16
				12	4.58 ±0.05	0.15 ±0.01	2.24 ±0.04	12.28 ±0.12
				24	4.23 ±0.02	1.09 ±0.01	2.23 ±0.04	9.04 ±0.02
				36	3.90 ±0.02	1.40 ±0.01	2.24 ±0.02	6.69 ±0.35
				60	3.93 ±0.00	1.67 ±0.01	2.21 ±0.02	1.81 ±0.04
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.22 ±0.09	0.05 ±0.03	0.34 ±0.11	18.22 ±0.00
				12	4.54 ±0.01	0.14 ±0.00	2.12 ±0.03	12.39 ±0.12
				24	4.14 ±0.03	1.09 ±0.01	2.24 ±0.02	9.39 ±0.06
				36	3.91 ±0.00	1.61 ±0.06	2.24 ±0.02	5.19 ±0.08
				60	3.99 ±0.01	1.64 ±0.02	2.23 ±0.01	2.39 ±0.16
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.46 ±0.10	0.11 ±0.02	0.76 ±0.23	17.41 ±0.22
				12	4.06 ±0.01	0.24 ±0.02	2.47 ±0.01	10.49 ±0.22
				24	3.94 ±0.02	1.40 ±0.01	2.46 ±0.05	5.32 ±0.14
				36	3.87 ±0.01	1.69 ±0.04	2.21 ±0.02	1.51 ±0.02
				60	3.87 ±0.01	1.66 ±0.00	2.18 ±0.02	1.17 ±0.08
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.68 ±0.04	0.06 ±0.01	0.90 ±0.07	17.83 ±0.07
				12	4.11 ±0.01	0.28 ±0.01	2.46 ±0.01	11.46 ±0.49
				24	3.96 ±0.01	1.48 ±0.02	2.49 ±0.04	6.11 ±0.25
				36	3.93 ±0.01	1.78 ±0.01	2.24 ±0.02	1.69 ±0.07
				60	3.94 ±0.01	1.50 ±0.01	2.18 ±0.07	1.36 ±0.03
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.96 ±0.05	0.02 ±0.01	0.81 ±0.06	17.73 ±0.23
				12	4.12 ±0.01	0.23 ±0.02	2.45 ±0.04	10.34 ±0.08
				24	3.96 ±0.01	1.33 ±0.03	2.44 ±0.05	5.11 ±0.04
				36	3.95 ±0.01	1.67 ±0.01	2.24 ±0.02	4.17 ±0.39
				60	4.00 ±0.00	1.76 ±0.01	2.22 ±0.02	1.33 ±0.16
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	4.98 ±0.04	0.51 ±0.03	1.33 ±0.02	14.56 ±0.31
				12	3.88 ±0.01	0.89 ±0.00	2.50 ±0.00	8.75 ±0.08
				24	3.73 ±0.01	1.37 ±0.03	2.38 ±0.03	4.67 ±0.39
				36	3.77 ±0.01	1.51 ±0.10	2.23 ±0.01	1.68 ±0.18
				60	3.93 ±0.02	1.62 ±0.01	2.21 ±0.02	1.00 ±0.08
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.10 ±0.08	0.43 ±0.02	1.39 ±0.11	15.44 ±0.63
				12	3.91 ±0.01	0.80 ±0.03	2.52 ±0.04	9.35 ±0.10
				24	3.80 ±0.01	1.28 ±0.03	2.44 ±0.03	4.55 ±0.54
				36	3.87 ±0.02	1.48 ±0.06	2.24 ±0.02	1.55 ±0.20
				60	3.97 ±0.01	1.53 ±0.01	2.22 ±0.02	0.36 ±0.19
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.20 ±0.05	0.41 ±0.01	1.48 ±0.07	15.25 ±0.27
				12	3.93 ±0.01	0.76 ±0.06	2.52 ±0.03	11.26 ±0.41
				24	3.86 ±0.00	1.42 ±0.03	2.39 ±0.04	5.44 ±0.35
				36	3.95 ±0.01	1.54 ±0.05	2.23 ±0.00	1.13 ±0.15
				60	4.02 ±0.00	1.57 ±0.01	2.23 ±0.01	0.30 ±0.02

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. plantarum</i> MF4	Salatalık suyu	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.93 ±0.00
				6	5.55 ±0.08	0.01 ±0.02	0.37 ±0.01	18.42 ±0.20
				12	4.36 ±0.05	0.08 ±0.01	1.58 ±0.02	12.49 ±0.14
				24	4.06 ±0.05	0.47 ±0.03	1.81 ±0.02	10.28 ±0.36
				36	3.73 ±0.01	0.52 ±0.00	1.83 ±0.05	6.51 ±0.09
				60	3.70 ±0.04	0.75 ±0.02	1.82 ±0.03	5.54 ±0.24
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.56 ±0.13	0.00 ±0.01	0.36 ±0.01	18.00 ±0.08
				12	5.17 ±0.04	0.06 ±0.05	1.31 ±0.08	13.10 ±0.49
				24	4.68 ±0.04	0.34 ±0.03	1.64 ±0.00	10.51 ±0.24
				36	4.03 ±0.04	0.48 ±0.01	1.62 ±0.04	5.24 ±0.21
				60	3.90 ±0.02	0.68 ±0.04	1.56 ±0.01	4.73 ±0.01
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.70 ±0.00	0.01 ±0.00	0.33 ±0.01	19.11 ±0.24
				12	5.29 ±0.02	0.04 ±0.01	1.29 ±0.12	14.06 ±0.08
				24	4.88 ±0.04	0.26 ±0.01	1.60 ±0.01	10.33 ±0.47
				36	4.06 ±0.02	0.47 ±0.13	1.62 ±0.00	5.68 ±0.14
				60	3.95 ±0.01	0.52 ±0.01	1.36 ±0.05	4.78 ±0.13
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.66 ±0.01	0.02 ±0.00	0.62 ±0.08	16.12 ±0.16
				12	4.05 ±0.01	0.24 ±0.03	1.62 ±0.00	11.82 ±0.18
				24	3.86 ±0.03	0.49 ±0.04	1.85 ±0.01	9.24 ±0.15
				36	3.70 ±0.01	0.65 ±0.03	1.93 ±0.05	4.61 ±0.43
				60	3.64 ±0.01	0.78 ±0.01	1.92 ±0.07	3.74 ±0.06
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.64 ±0.01	0.03 ±0.02	0.43 ±0.04	17.33 ±0.47
				12	4.42 ±0.01	0.20 ±0.01	1.34 ±0.08	12.43 ±0.06
				24	3.97 ±0.03	0.49 ±0.02	1.59 ±0.00	10.84 ±0.09
				36	3.79 ±0.06	0.53 ±0.05	1.57 ±0.03	5.32 ±0.08
				60	3.82 ±0.04	0.66 ±0.01	1.45 ±0.03	4.24 ±0.23
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.82 ±0.01	0.01 ±0.00	0.55 ±0.01	18.12 ±0.16
				12	4.37 ±0.01	0.25 ±0.06	1.40 ±0.03	13.38 ±0.49
				24	4.04 ±0.02	0.43 ±0.03	1.68 ±0.01	10.38 ±0.32
				36	3.86 ±0.01	0.53 ±0.01	1.66 ±0.01	5.75 ±0.27
				60	3.88 ±0.01	0.55 ±0.00	1.50 ±0.08	4.94 ±0.01
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.48 ±0.03	0.07 ±0.02	0.64 ±0.01	16.44 ±0.08
				12	3.91 ±0.06	0.39 ±0.01	1.71 ±0.03	12.44 ±0.16
				24	3.65 ±0.05	0.64 ±0.02	1.95 ±0.03	9.77 ±0.03
				36	3.60 ±0.03	0.74 ±0.06	1.98 ±0.02	4.46 ±0.04
				60	3.58 ±0.03	0.85 ±0.01	1.81 ±0.13	3.17 ±0.16
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.61 ±0.03	0.06 ±0.03	0.55 ±0.12	18.36 ±0.67
				12	4.12 ±0.04	0.28 ±0.02	1.55 ±0.03	12.56 ±0.31
				24	3.83 ±0.01	0.58 ±0.01	1.70 ±0.01	10.94 ±0.30
				36	3.79 ±0.01	0.62 ±0.03	1.66 ±0.01	5.03 ±0.02
				60	3.74 ±0.01	0.74 ±0.01	1.54 ±0.02	4.58 ±0.18
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.68 ±0.02	0.10 ±0.01	0.62 ±0.02	18.94 ±0.24
				12	4.14 ±0.01	0.23 ±0.02	1.55 ±0.02	13.29 ±0.18
				24	3.89 ±0.01	0.44 ±0.02	1.44 ±0.02	10.71 ±0.39
				36	3.84 ±0.01	0.51 ±0.05	1.32 ±0.01	5.51 ±0.36
				60	3.79 ±0.00	0.68 ±0.01	1.24 ±0.02	3.25 ±0.33

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. plantarum</i> MF4	MRS + Salatalık Suyu	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.73 ±0.00	0.06 ±0.01	0.62 ±0.06	16.56 ±0.39
				12	4.07 ±0.04	0.14 ±0.01	2.28 ±0.01	12.36 ±0.08
				24	3.84 ±0.04	0.93 ±0.04	2.36 ±0.01	9.66 ±0.05
				36	3.74 ±0.01	1.54 ±0.03	2.24 ±0.01	5.78 ±0.27
				60	3.70 ±0.01	1.68 ±0.01	2.18 ±0.00	1.44 ±0.06
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.73 ±0.03	0.12 ±0.01	0.70 ±0.02	17.00 ±0.08
				12	4.14 ±0.02	0.24 ±0.04	2.35 ±0.02	13.74 ±0.10
				24	3.98 ±0.02	1.10 ±0.04	2.30 ±0.00	9.19 ±0.09
				36	3.77 ±0.02	1.57 ±0.01	2.24 ±0.03	5.29 ±0.04
				60	3.71 ±0.00	1.74 ±0.02	2.19 ±0.01	1.44 ±0.46
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.93 ±0.03	0.03 ±0.02	0.72 ±0.02	17.28 ±0.63
				12	4.16 ±0.04	0.24 ±0.01	2.38 ±0.00	12.18 ±0.65
				24	4.01 ±0.02	1.03 ±0.04	2.30 ±0.01	9.53 ±0.10
				36	3.79 ±0.06	1.61 ±0.01	2.23 ±0.00	4.96 ±0.08
				60	3.73 ±0.00	1.85 ±0.01	2.20 ±0.03	1.03 ±0.09
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.62 ±0.01	0.14 ±0.01	1.59 ±0.03	16.13 ±0.15
				12	3.92 ±0.01	0.31 ±0.02	2.38 ±0.01	8.49 ±0.33
				24	3.76 ±0.02	1.47 ±0.03	2.40 ±0.00	4.17 ±0.10
				36	3.67 ±0.01	1.62 ±0.03	2.24 ±0.02	1.83 ±0.11
				60	3.69 ±0.00	1.88 ±0.02	2.14 ±0.01	1.29 ±0.07
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.72 ±0.01	0.17 ±0.01	1.55 ±0.04	17.17 ±0.55
				12	3.94 ±0.02	0.36 ±0.08	2.42 ±0.00	9.57 ±0.29
				24	3.75 ±0.00	1.56 ±0.05	2.39 ±0.03	3.13 ±0.06
				36	3.70 ±0.01	1.47 ±0.02	2.24 ±0.00	2.06 ±0.20
				60	3.70 ±0.01	1.82 ±0.01	2.16 ±0.01	1.56 ±0.10
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.85 ±0.00	0.04 ±0.01	1.57 ±0.02	16.32 ±0.16
				12	3.94 ±0.00	0.39 ±0.01	2.41 ±0.00	8.35 ±0.10
				24	3.84 ±0.02	1.40 ±0.04	2.40 ±0.00	3.62 ±0.23
				36	3.71 ±0.01	1.69 ±0.03	2.26 ±0.01	1.52 ±0.21
				60	3.73 ±0.01	1.84 ±0.01	2.11 ±0.05	1.14 ±0.15
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	4.71 ±0.01	0.45 ±0.26	1.86 ±0.02	16.25 ±0.51
				12	3.81 ±0.01	1.16 ±0.03	2.44 ±0.00	9.11 ±0.08
				24	3.69 ±0.02	1.48 ±0.03	2.45 ±0.01	3.23 ±0.13
				36	3.73 ±0.01	1.48 ±0.05	2.24 ±0.02	1.69 ±0.10
				60	3.76 ±0.00	1.46 ±0.01	2.13 ±0.02	1.49 ±0.12
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	4.95 ±0.02	0.27 ±0.03	1.70 ±0.02	16.53 ±0.04
				12	3.82 ±0.00	1.13 ±0.03	2.55 ±0.02	8.35 ±0.45
				24	3.69 ±0.01	1.38 ±0.02	2.41 ±0.00	2.43 ±0.39
				36	3.67 ±0.01	1.59 ±0.05	2.24 ±0.03	1.68 ±0.24
				60	3.77 ±0.00	1.50 ±0.01	2.12 ±0.04	1.32 ±0.14
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.07 ±0.21	0.37 ±0.05	1.88 ±0.01	16.50 ±0.16
				12	3.83 ±0.01	1.28 ±0.02	2.57 ±0.01	8.46 ±0.33
				24	3.69 ±0.01	1.60 ±0.04	2.50 ±0.01	1.46 ±0.06
				36	3.75 ±0.02	1.73 ±0.04	2.25 ±0.02	1.64 ±0.20
				60	3.79 ±0.00	1.58 ±0.01	2.16 ±0.00	1.59 ±0.12

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. plantarum</i> MF4	Salatalık Suyu + Melas	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.40 ±0.02	0.01 ±0.02	0.37 ±0.02	18.31 ±0.12
				12	4.48 ±0.04	0.23 ±0.02	1.74 ±0.02	12.81 ±0.47
				24	4.26 ±0.04	0.37 ±0.03	1.81 ±0.01	9.41 ±0.44
				36	3.87 ±0.01	0.52 ±0.05	1.88 ±0.02	5.08 ±1.18
				60	3.89 ±0.01	0.64 ±0.01	1.70 ±0.06	2.75 ±0.20
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.59 ±0.00	0.02 ±0.01	0.36 ±0.00	19.44 ±0.16
				12	4.59 ±0.04	0.15 ±0.06	1.66 ±0.02	14.15 ±0.10
				24	4.43 ±0.03	0.34 ±0.02	1.77 ±0.01	11.47 ±0.07
				36	4.01 ±0.06	0.47 ±0.03	1.88 ±0.01	4.75 ±0.73
				60	3.92 ±0.01	0.60 ±0.02	1.72 ±0.04	2.73 ±0.80
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.74 ±0.01	0.01 ±0.02	0.35 ±0.01	18.75 ±0.98
				12	4.65 ±0.09	0.12 ±0.05	1.62 ±0.05	13.44 ±0.04
				24	4.47 ±0.03	0.29 ±0.01	1.77 ±0.01	10.38 ±0.00
				36	4.04 ±0.04	0.46 ±0.00	1.86 ±0.02	4.15 ±0.29
				60	3.95 ±0.00	0.59 ±0.02	1.67 ±0.01	2.57 ±0.11
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.50 ±0.01	0.03 ±0.05	0.79 ±0.08	17.19 ±0.14
				12	4.16 ±0.01	0.27 ±0.02	1.90 ±0.02	13.67 ±0.63
				24	3.85 ±0.01	0.37 ±0.02	1.80 ±0.01	9.90 ±0.87
				36	3.84 ±0.01	0.49 ±0.02	1.62 ±0.01	5.35 ±0.55
				60	3.84 ±0.00	0.66 ±0.00	1.26 ±0.03	1.49 ±0.41
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.62 ±0.03	0.04 ±0.00	0.78 ±0.02	19.06 ±0.08
				12	4.24 ±0.01	0.32 ±0.01	1.81 ±0.04	13.33 ±0.47
				24	3.93 ±0.04	0.42 ±0.02	1.77 ±0.03	9.47 ±0.03
				36	3.92 ±0.01	0.51 ±0.01	1.62 ±0.12	4.48 ±0.64
				60	3.87 ±0.03	0.72 ±0.00	1.24 ±0.12	1.23 ±0.08
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.72 ±0.02	0.05 ±0.07	0.64 ±0.07	18.73 ±0.23
				12	4.32 ±0.03	0.22 ±0.01	1.72 ±0.03	12.43 ±0.18
				24	4.00 ±0.01	0.33 ±0.02	1.59 ±0.03	8.47 ±0.10
				36	3.97 ±0.01	0.43 ±0.02	1.57 ±0.01	4.39 ±0.43
				60	3.93 ±0.00	0.59 ±0.01	1.08 ±0.04	1.50 ±0.16
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.33 ±0.05	0.12 ±0.01	0.87 ±0.08	17.56 ±0.08
				12	4.00 ±0.01	0.80 ±0.10	1.85 ±0.02	10.69 ±0.31
				24	3.87 ±0.01	0.72 ±0.09	1.61 ±0.02	7.67 ±0.20
				36	3.87 ±0.02	0.65 ±0.05	1.42 ±0.01	3.37 ±0.28
				60	3.83 ±0.01	0.72 ±0.01	1.08 ±0.04	1.93 ±0.08
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.41 ±0.01	0.15 ±0.01	0.94 ±0.02	17.44 ±0.71
				12	4.06 ±0.01	0.55 ±0.01	1.91 ±0.01	10.08 ±0.27
				24	3.89 ±0.01	0.63 ±0.03	1.68 ±0.03	7.26 ±0.19
				36	3.89 ±0.01	0.65 ±0.03	1.34 ±0.04	3.22 ±0.06
				60	3.86 ±0.01	0.75 ±0.01	1.08 ±0.00	1.53 ±0.32
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.47 ±0.02	0.07 ±0.02	0.96 ±0.02	17.75 ±0.35
				12	4.11 ±0.02	0.65 ±0.01	1.88 ±0.11	9.04 ±0.49
				24	3.90 ±0.03	0.65 ±0.04	1.64 ±0.02	7.40 ±0.53
				36	3.85 ±0.06	0.64 ±0.00	1.40 ±0.13	4.55 ±0.54
				60	3.90 ±0.02	0.66 ±0.01	1.07 ±0.06	2.16 ±0.07

Ek 2: *Lb. plantarum* MF4 suşu ile farklı besiyerleri, inkübasyon sıcaklıkları ve başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince kültür ortamında ölçülen pH, Toplam asitlik, Biyokütle ve Toplam şeker değerleri

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. brevis</i> MF343	MRS Broth besiyeri (MR)	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.75 ±0.01	0.05 ±0.04	0.02 ±0.02	19.50 ±0.08
				12	5.65 ±0.04	0.15 ±0.08	0.42 ±0.12	15.60 ±0.37
				24	5.21 ±0.01	0.31 ±0.02	1.58 ±0.02	11.58 ±0.46
				36	4.63 ±0.01	0.63 ±0.02	2.08 ±0.04	7.87 ±0.01
				60	4.54 ±0.00	0.79 ±0.01	2.09 ±0.00	1.37 ±0.04
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.08 ±0.01	0.02 ±0.03	0.01 ±0.01	18.50 ±0.00
				12	5.88 ±0.01	0.01 ±0.01	0.51 ±0.03	14.13 ±0.02
				24	5.39 ±0.04	0.22 ±0.02	1.74 ±0.01	12.40 ±0.17
				36	4.82 ±0.04	0.54 ±0.02	2.04 ±0.02	8.25 ±0.33
				60	4.67 ±0.01	0.71 ±0.01	2.10 ±0.00	0.38 ±0.05
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.34 ±0.01	0.00 ±0.01	0.02 ±0.01	19.44 ±0.08
				12	6.10 ±0.01	0.13 ±0.02	0.44 ±0.00	16.18 ±0.77
				24	5.59 ±0.04	0.18 ±0.01	1.66 ±0.01	12.47 ±0.17
				36	5.03 ±0.01	0.47 ±0.02	1.95 ±0.00	7.33 ±0.10
				60	4.76 ±0.00	0.71 ±0.01	2.09 ±0.01	0.31 ±0.05
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.81 ±0.01	0.02 ±0.02	0.03 ±0.00	18.17 ±0.11
				12	5.47 ±0.01	0.21 ±0.01	1.08 ±0.03	12.64 ±0.30
				24	4.69 ±0.01	0.39 ±0.02	2.16 ±0.01	9.24 ±0.01
				36	4.62 ±0.01	0.63 ±0.02	2.16 ±0.02	5.46 ±0.15
				60	4.63 ±0.01	0.73 ±0.01	2.03 ±0.02	0.37 ±0.04
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.11 ±0.01	0.10 ±0.02	0.04 ±0.01	18.64 ±0.20
				12	5.62 ±0.03	0.17 ±0.01	1.05 ±0.04	12.32 ±0.26
				24	4.94 ±0.03	0.46 ±0.03	2.15 ±0.02	9.24 ±0.15
				36	4.71 ±0.02	0.66 ±0.06	2.16 ±0.02	4.49 ±0.24
				60	4.69 ±0.11	0.64 ±0.01	2.13 ±0.01	0.34 ±0.15
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.32 ±0.01	0.03 ±0.02	0.03 ±0.00	19.41 ±0.21
				12	5.87 ±0.04	0.25 ±0.00	0.87 ±0.07	13.53 ±0.43
				24	5.20 ±0.02	0.43 ±0.04	2.12 ±0.03	10.40 ±0.35
				36	4.79 ±0.01	0.65 ±0.04	2.15 ±0.03	6.47 ±0.11
				60	4.89 ±0.01	0.54 ±0.01	2.10 ±0.02	0.44 ±0.04
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	5.78 ±0.01	0.14 ±0.02	0.03 ±0.00	17.35 ±0.25
				12	5.29 ±0.03	0.21 ±0.02	1.17 ±0.02	12.36 ±0.39
				24	4.72 ±0.01	0.57 ±0.03	2.18 ±0.02	8.80 ±0.11
				36	4.65 ±0.03	0.75 ±0.12	2.14 ±0.00	5.46 ±0.06
				60	4.56 ±0.03	0.69 ±0.01	2.15 ±0.02	0.29 ±0.05
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.09 ±0.02	0.15 ±0.01	0.04 ±0.01	18.08 ±0.90
				12	5.46 ±0.03	0.18 ±0.01	1.10 ±0.03	12.78 ±0.16
				24	4.93 ±0.01	0.47 ±0.04	2.14 ±0.01	9.48 ±0.28
				36	4.67 ±0.05	0.79 ±0.05	2.14 ±0.01	5.23 ±0.08
				60	4.69 ±0.01	0.64 ±0.01	2.14 ±0.00	0.54 ±0.07
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.00	22.12 ±0.00
				6	6.38 ±0.00	0.01 ±0.00	0.04 ±0.01	16.31 ±0.12
				12	5.73 ±0.04	0.12 ±0.01	0.93 ±0.04	11.51 ±0.45
				24	5.17 ±0.05	0.43 ±0.04	2.12 ±0.02	8.85 ±0.13
				36	4.69 ±0.02	0.70 ±0.07	2.13 ±0.01	4.54 ±0.27
				60	4.95 ±0.00	0.57 ±0.00	2.09 ±0.01	0.53 ±0.06

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. brevis</i> MF343	Salatalık Suyu (SS)	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.47 ±0.07	0.04 ±0.03	0.02 ±0.00	20.34 ±0.32
				12	5.54 ±0.04	0.08 ±0.01	0.37 ±0.00	16.25 ±0.16
				24	4.83 ±0.04	0.19 ±0.03	1.39 ±0.02	13.36 ±0.26
				36	4.29 ±0.01	0.36 ±0.00	2.00 ±0.04	9.30 ±0.03
				60	4.19 ±0.01	0.53 ±0.01	1.96 ±0.04	2.62 ±0.13
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.71 ±0.06	0.01 ±0.01	0.02 ±0.00	20.75 ±0.11
				12	5.61 ±0.12	0.08 ±0.01	0.40 ±0.01	17.08 ±0.00
				24	4.96 ±0.01	0.24 ±0.02	1.46 ±0.02	12.38 ±0.29
				36	4.37 ±0.03	0.40 ±0.01	1.95 ±0.01	8.27 ±0.32
				60	4.24 ±0.01	0.53 ±0.01	1.90 ±0.01	2.40 ±0.44
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.93 ±0.04	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	21.53 ±0.28
				12	5.72 ±0.02	0.09 ±0.06	0.32 ±0.03	18.83 ±0.16
				24	5.04 ±0.04	0.14 ±0.02	1.34 ±0.03	13.52 ±0.34
				36	4.52 ±0.01	0.31 ±0.01	1.86 ±0.04	9.07 ±0.01
				60	4.34 ±0.01	0.50 ±0.01	1.78 ±0.00	3.59 ±0.13
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.67 ±0.29	0.02 ±0.00	0.04 ±0.02	19.38 ±0.24
				12	5.54 ±0.09	0.08 ±0.04	0.78 ±0.04	15.14 ±0.18
				24	4.44 ±0.04	0.27 ±0.03	2.01 ±0.02	12.45 ±0.39
				36	4.22 ±0.06	0.48 ±0.01	2.08 ±0.06	6.29 ±0.01
				60	4.07 ±0.01	0.59 ±0.01	2.02 ±0.01	2.24 ±0.04
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.71 ±0.03	0.03 ±0.01	0.03 ±0.01	19.39 ±0.55
				12	5.69 ±0.01	0.13 ±0.00	0.69 ±0.06	16.45 ±0.32
				24	4.59 ±0.04	0.23 ±0.03	1.90 ±0.06	12.22 ±0.30
				36	4.32 ±0.02	0.43 ±0.01	1.95 ±0.07	6.89 ±0.14
				60	4.09 ±0.01	0.58 ±0.00	1.94 ±0.06	2.38 ±0.03
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.83 ±0.05	0.03 ±0.02	0.03 ±0.00	19.95 ±0.07
				12	5.78 ±0.01	0.01 ±0.01	0.66 ±0.10	17.08 ±0.00
				24	4.66 ±0.04	0.18 ±0.01	1.76 ±0.04	13.63 ±0.16
				36	4.37 ±0.01	0.36 ±0.01	1.86 ±0.08	5.66 ±0.31
				60	4.21 ±0.02	0.51 ±0.01	1.86 ±0.05	1.42 ±0.06
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.85 ±0.01	0.09 ±0.07	0.04 ±0.00	17.14 ±0.11
				12	5.19 ±0.05	0.18 ±0.01	0.97 ±0.11	15.82 ±0.10
				24	4.38 ±0.04	0.36 ±0.01	2.07 ±0.01	11.42 ±0.49
				36	4.17 ±0.01	0.67 ±0.01	1.79 ±0.02	5.67 ±0.09
				60	4.11 ±0.04	0.58 ±0.01	1.44 ±0.00	2.37 ±0.04
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.72 ±0.05	0.08 ±0.01	0.01 ±0.01	17.81 ±0.19
				12	5.52 ±0.07	0.06 ±0.01	0.83 ±0.06	15.71 ±0.37
				24	4.59 ±0.02	0.27 ±0.02	2.01 ±0.02	10.93 ±0.06
				36	4.30 ±0.01	0.47 ±0.02	1.74 ±0.02	6.54 ±0.11
				60	4.10 ±0.00	0.81 ±0.24	1.52 ±0.04	2.19 ±0.08
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.93 ±0.00
				6	5.88 ±0.08	0.10 ±0.02	0.11 ±0.11	18.50 ±0.16
				12	5.80 ±0.08	0.04 ±0.01	0.84 ±0.12	16.85 ±0.18
				24	4.69 ±0.05	0.24 ±0.03	2.01 ±0.03	11.76 ±0.71
				36	4.39 ±0.03	0.33 ±0.00	1.61 ±0.04	6.42 ±0.51
				60	4.17 ±0.01	0.59 ±0.01	1.51 ±0.04	1.74 ±0.22

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. brevis</i> MF343	MRS Broth + Salatalık Suyu (MS)	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.70 ±0.02	0.06 ±0.03	0.02 ±0.01	19.33 ±0.16
				12	5.66 ±0.01	0.18 ±0.01	0.86 ±0.18	14.46 ±0.10
				24	5.08 ±0.02	0.37 ±0.03	1.90 ±0.03	10.07 ±0.01
				36	4.42 ±0.01	0.59 ±0.01	2.18 ±0.03	4.47 ±3.46
				60	4.24 ±0.00	0.90 ±0.01	2.13 ±0.03	1.24 ±0.01
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.92 ±0.01	0.11 ±0.04	0.02 ±0.01	19.64 ±0.35
				12	5.58 ±0.08	0.15 ±0.01	1.03 ±0.11	14.52 ±0.02
				24	5.14 ±0.03	0.29 ±0.02	1.98 ±0.03	11.81 ±0.10
				36	4.46 ±0.01	0.57 ±0.01	2.17 ±0.02	6.71 ±0.10
				60	4.30 ±0.00	0.91 ±0.01	2.15 ±0.01	1.33 ±0.09
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	6.11 ±0.00	0.02 ±0.01	0.11 ±0.00	19.53 ±0.43
				12	5.81 ±0.01	0.00 ±0.00	0.90 ±0.04	15.50 ±0.35
				24	5.26 ±0.04	0.24 ±0.03	1.90 ±0.03	13.27 ±0.17
				36	4.51 ±0.01	0.53 ±0.03	2.18 ±0.01	6.66 ±0.33
				60	4.36 ±0.00	0.91 ±0.01	2.15 ±0.01	1.79 ±0.37
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.79 ±0.04	0.04 ±0.02	0.06 ±0.02	18.15 ±0.21
				12	5.71 ±0.01	0.14 ±0.01	1.60 ±0.01	12.01 ±0.96
				24	4.43 ±0.04	0.28 ±0.04	2.20 ±0.01	9.51 ±0.28
				36	4.26 ±0.01	0.73 ±0.07	2.19 ±0.01	5.59 ±0.08
				60	4.26 ±0.01	0.80 ±0.01	2.14 ±0.02	0.39 ±0.03
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.92 ±0.01	0.05 ±0.01	0.07 ±0.04	17.51 ±0.08
				12	5.25 ±0.02	0.17 ±0.02	1.68 ±0.09	11.56 ±0.16
				24	4.53 ±0.04	0.44 ±0.03	2.23 ±0.01	8.31 ±0.13
				36	4.25 ±0.01	0.82 ±0.03	2.16 ±0.00	4.66 ±0.14
				60	4.31 ±0.00	0.93 ±0.01	2.15 ±0.02	0.61 ±0.53
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	6.10 ±0.00	0.03 ±0.03	0.14 ±0.04	17.75 ±0.17
				12	5.42 ±0.01	0.18 ±0.02	1.59 ±0.01	11.46 ±0.02
				24	4.67 ±0.03	0.38 ±0.03	2.20 ±0.02	9.58 ±0.10
				36	4.31 ±0.00	0.89 ±0.01	2.22 ±0.03	5.30 ±0.30
				60	4.38 ±0.00	0.87 ±0.04	2.16 ±0.01	0.36 ±0.02
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.73 ±0.01	0.18 ±0.02	0.04 ±0.00	16.93 ±0.06
				12	4.90 ±0.02	0.25 ±0.03	1.93 ±0.04	10.45 ±0.08
				24	4.40 ±0.00	0.37 ±0.03	2.24 ±0.02	8.72 ±0.04
				36	4.22 ±0.01	0.80 ±0.05	2.21 ±0.00	4.50 ±0.10
				60	4.27 ±0.01	0.85 ±0.00	2.13 ±0.05	0.49 ±0.02
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	5.89 ±0.01	0.11 ±0.01	0.07 ±0.01	16.56 ±0.08
				12	4.92 ±0.01	0.22 ±0.01	2.00 ±0.03	10.50 ±0.24
				24	4.41 ±0.01	0.31 ±0.01	2.27 ±0.01	7.38 ±0.22
				36	4.25 ±0.00	0.79 ±0.02	2.20 ±0.01	4.30 ±0.12
				60	4.32 ±0.00	0.78 ±0.01	2.15 ±0.02	0.47 ±0.12
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.04	22.05 ±0.00
				6	6.09 ±0.04	0.11 ±0.01	0.19 ±0.02	16.75 ±0.27
				12	5.14 ±0.03	0.25 ±0.10	1.80 ±0.03	9.38 ±0.53
				24	4.52 ±0.04	0.44 ±0.02	2.16 ±0.02	8.32 ±0.45
				36	4.36 ±0.01	0.78 ±0.01	2.21 ±0.00	3.52 ±0.27
				60	4.39 ±0.01	0.79 ±0.00	2.16 ±0.01	0.56 ±0.07

Kültür	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Başlangıç Besiyeri pH	Süre (Saat)	pH	Toplam asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. brevis</i> MF343	Salatalık Suyu + Melas (SM)	25	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.47 ±0.02	0.00 ±0.01	0.02 ±0.01	20.72 ±0.31
				12	5.46 ±0.02	0.03 ±0.01	0.28 ±0.01	17.18 ±0.25
				24	5.03 ±0.01	0.23 ±0.03	1.10 ±0.04	12.82 ±0.30
				36	4.35 ±0.01	0.57 ±0.07	2.04 ±0.01	8.95 ±0.02
				60	4.20 ±0.01	0.59 ±0.01	2.11 ±0.00	5.52 ±0.18
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.58 ±0.00	0.02 ±0.01	0.00 ±0.00	20.45 ±0.16
				12	5.57 ±0.04	0.02 ±0.01	0.32 ±0.01	16.82 ±0.10
				24	5.14 ±0.03	0.17 ±0.02	1.21 ±0.02	12.84 ±0.22
				36	4.41 ±0.01	0.50 ±0.03	1.99 ±0.02	7.12 ±0.11
				60	4.30 ±0.01	0.67 ±0.01	2.06 ±0.02	4.78 ±0.26
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.81 ±0.00	0.02 ±0.01	0.02 ±0.01	19.06 ±0.23
				12	5.74 ±0.04	0.02 ±0.00	0.36 ±0.01	15.88 ±0.06
				24	5.20 ±0.08	0.16 ±0.01	1.28 ±0.01	11.54 ±0.25
				36	4.50 ±0.00	0.49 ±0.05	1.95 ±0.02	7.60 ±0.12
				60	4.38 ±0.01	0.50 ±0.01	2.07 ±0.08	4.32 ±0.39
		30	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.46 ±0.02	0.04 ±0.01	0.11 ±0.11	20.11 ±0.14
				12	5.35 ±0.01	0.05 ±0.01	1.07 ±0.00	15.42 ±0.59
				24	4.32 ±0.01	0.34 ±0.02	1.80 ±0.01	11.96 ±0.02
				36	4.25 ±0.00	0.61 ±0.02	2.07 ±0.03	6.30 ±0.23
				60	4.17 ±0.01	0.66 ±0.00	2.06 ±0.02	4.75 ±0.04
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.64 ±0.06	0.01 ±0.00	0.05 ±0.01	19.42 ±0.59
				12	5.42 ±0.03	0.07 ±0.01	1.12 ±0.04	15.63 ±0.49
				24	4.49 ±0.04	0.35 ±0.01	1.84 ±0.02	12.30 ±0.18
				36	4.32 ±0.03	0.65 ±0.06	2.09 ±0.04	6.62 ±0.27
				60	4.20 ±0.01	0.70 ±0.00	2.08 ±0.00	4.16 ±0.07
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.82 ±0.06	0.02 ±0.01	0.02 ±0.02	20.76 ±0.13
				12	5.56 ±0.04	0.02 ±0.01	1.01 ±0.16	16.61 ±0.11
				24	4.56 ±0.05	0.26 ±0.03	1.71 ±0.01	13.54 ±0.57
				36	4.40 ±0.05	0.51 ±0.02	2.04 ±0.06	7.38 ±0.33
				60	4.28 ±0.05	0.54 ±0.01	2.03 ±0.06	5.43 ±0.60
		35	6.0	0	6.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.47 ±0.01	0.05 ±0.01	0.02 ±0.01	18.25 ±0.20
				12	5.05 ±0.01	0.21 ±0.01	1.12 ±0.00	15.42 ±0.23
				24	4.39 ±0.00	0.43 ±0.03	1.84 ±0.02	13.45 ±0.23
				36	4.26 ±0.01	0.61 ±0.02	1.95 ±0.03	6.55 ±0.50
				60	4.17 ±0.00	0.65 ±0.00	1.81 ±0.02	3.67 ±0.24
			6.5	0	6.50 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.59 ±0.06	0.09 ±0.01	0.04 ±0.01	16.75 ±1.45
				12	5.17 ±0.11	0.45 ±0.01	1.13 ±0.14	12.59 ±0.43
				24	4.50 ±0.05	0.50 ±0.01	1.82 ±0.02	10.56 ±0.53
				36	4.35 ±0.03	0.54 ±0.01	1.93 ±0.06	5.88 ±0.08
				60	4.23 ±0.02	0.59 ±0.01	1.85 ±0.00	3.87 ±0.04
			7.0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.01	23.35 ±0.00
				6	5.72 ±0.01	0.02 ±0.02	0.03 ±0.00	14.97 ±0.12
				12	5.40 ±0.01	0.26 ±0.03	1.04 ±0.01	13.27 ±0.33
				24	4.63 ±0.02	0.38 ±0.01	1.74 ±0.01	11.51 ±0.23
				36	4.42 ±0.01	0.50 ±0.02	1.86 ±0.04	6.84 ±0.12
				60	4.29 ±0.01	0.77 ±0.22	1.82 ±0.04	3.36 ±0.50

EK 3: *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşları ile çalkalamalı inkübatörde (50 rpm ve 200 rpm) gerçekleştirilen fermentasyonlarda inkübasyon süresince kültür ortamında ölçülen pH, Toplam asitlik, Biyokütle ve Toplam şeker değerleri

Kültür	rpm	Süre (Saat)	pH	Toplam Asit (%)	Biyokütle (g/L)	Toplam şeker (g/L)
<i>Lb. plantarum</i> MF4	0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	5.03 ±0.05	0.48 ±0.00	1.92 ±0.02	15.05 ±0.12
		12	3.57 ±0.10	1.39 ±0.01	2.50 ±0.02	9.21 ±0.10
		24	3.54 ±0.01	1.76 ±0.03	2.50 ±0.00	1.69 ±0.15
		30	3.55 ±0.01	1.92 ±0.02	2.41 ±0.01	1.55 ±0.11
	50	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	5.03 ±0.02	0.52 ±0.02	1.66 ±0.01	15.62 ±0.26
		12	3.53 ±0.01	1.46 ±0.00	2.37 ±0.03	9.54 ±0.16
		24	3.56 ±0.00	1.67 ±0.03	2.37 ±0.01	1.12 ±0.15
		30	3.55 ±0.00	1.81 ±0.01	2.34 ±0.01	1.45 ±0.09
	200	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	5.02 ±0.04	0.40 ±0.01	1.66 ±0.08	12.34 ±0.55
		12	3.64 ±0.02	1.21 ±0.01	2.27 ±0.05	7.68 ±0.19
		24	3.67 ±0.01	1.51 ±0.08	2.26 ±0.01	1.54 ±0.22
		30	3.67 ±0.01	1.66 ±0.05	2.25 ±0.02	1.22 ±0.16
<i>Lb. brevis</i> MF4	0	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	6.21 ±0.02	0.09 ±0.01	0.15 ±0.01	17.45 ±0.39
		12	5.02 ±0.01	0.20 ±0.00	1.64 ±0.01	10.54 ±0.43
		24	4.64 ±0.03	0.41 ±0.04	2.17 ±0.02	9.16 ±0.02
		30	4.46 ±0.00	0.74 ±0.01	2.18 ±0.01	3.90 ±0.15
	50	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	6.14 ±0.01	0.12 ±0.01	0.48 ±0.02	14.19 ±0.21
		12	5.12 ±0.02	0.35 ±0.01	1.57 ±0.02	7.56 ±0.68
		24	4.64 ±0.02	0.56 ±0.01	2.19 ±0.03	4.58 ±0.45
		30	4.40 ±0.04	0.83 ±0.02	2.19 ±0.01	2.98 ±0.19
	200	0	7.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.02 ±0.02	22.05 ±0.00
		8	6.18 ±0.03	0.13 ±0.01	0.52 ±0.01	14.28 ±0.00
		12	5.05 ±0.01	0.41 ±0.00	1.63 ±0.02	7.17 ±0.05
		24	4.60 ±0.01	0.61 ±0.02	2.18 ±0.02	3.87 ±0.13
		30	4.39 ±0.04	0.87 ±0.05	2.19 ±0.01	3.12 ±0.08

EK 4: *Lb. plantarum* MF4 ve *Lb. brevis* MF343 suşu için statik fermentasyonlarda elde edilen kinetik parametre değerleri.

Kinetik Parametre		Besiyeri											
<i>Lb. plantarum</i> MF4 Spesifik gelişme hızı, h ⁻¹ (μ)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25 C	0.387 ±0.000	0.393 ±0.002	0.389 ±0.001	0.364 ±0.001	0.348 ±0.005	0.347 ±0.008	0.395 ±0.000	0.397 ±0.001	0.398 ±0.000	0.372 ±0.001	0.368 ±0.001	0.366 ±0.002
	30 C	0.401 ±0.000	0.401 ±0.000	0.401 ±0.001	0.366 ±0.000	0.351 ±0.005	0.354 ±0.002	0.398 ±0.000	0.400 ±0.000	0.399 ±0.000	0.379 ±0.001	0.375 ±0.002	0.371 ±0.002
	35 C	0.402 ±0.000	0.403 ±0.001	0.403 ±0.001	0.370 ±0.001	0.362 ±0.002	0.362 ±0.001	0.400 ±0.000	0.404 ±0.001	0.405 ±0.000	0.377 ±0.001	0.380 ±0.000	0.379 ±0.005

Kinetik Parametre		Besiyeri											
<i>Lb. brevis</i> MF 343 Spesifik gelişme hızı, h ⁻¹ (μ)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25 C	0.252 ±0.025	0.270 ±0.006	0.258 ±0.001	0.244 ±0.000	0.249 ±0.003	0.230 ±0.007	0.313 ±0.018	0.328 ±0.009	0.317 ±0.003	0.219 ±0.002	0.232 ±0.003	0.240 ±0.001
	30 C	0.332 ±0.002	0.330 ±0.003	0.315 ±0.006	0.305 ±0.004	0.295 ±0.008	0.290 ±0.013	0.365 ±0.000	0.369 ±0.005	0.365 ±0.001	0.331 ±0.000	0.336 ±0.003	0.326 ±0.013
	35 C	0.339 ±0.002	0.334 ±0.002	0.320 ±0.004	0.323 ±0.009	0.310 ±0.006	0.311 ±0.012	0.381 ±0.002	0.384 ±0.001	0.375 ±0.001	0.335 ±0.000	0.336 ±0.011	0.329 ±0.001

Kinetik Parametre	(°C)	Besiyeri											
<i>Lb. plantarum</i> MF4 Biyokütle verimi. %(Y _x /s)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25	17.67 ±0.00	22.54 ±0.18	17.45 ±0.07	14.16 ±0.57	13.05 ±0.28	12.52 ±0.43	18.87 ±0.17	28.01 ±0.60	23.93 ±1.56	10.20 ±10.20	10.02 ±0.57	9.59 ±0.27
	30	21.05 ±0.35	22.95 ±1.19	20.60 ±0.22	10.43 ±0.51	12.96 ±0.11	13.23 ±0.45	17.42 ±0.49	19.21 ±0.48	17.43 ±0.12	19.41 ±1.08	17.88 ±1.23	15.60 ±0.05
	35	18.53 ±0.11	19.56 ±0.15	23.01 ±1.17	14.67 ±0.26	13.99 ±0.25	15.86 ±0.10	18.67 ±0.11	18.46 ±0.73	18.76 ±0.41	14.43 ±0.48	14.24 ±0.25	13.01 ±0.31

Kinetik Parametre	(°C)	Besiyeri											
<i>Lb. brevis</i> MF343 Biyokütle verimi. %(Y _x /s)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25	9.98 ±0.02	9.55 ±0.02	9.47 ±0.07	14.52 ±0.24	13.13 ±0.33	13.29 ±0.33	12.51 ±2.27	13.98 ±0.23	14.04 ±0.34	14.02 ±0.10	10.99 ±0.03	10.78 ±0.62
	30	16.61 ±0.06	16.54 ±0.32	17.90 ±0.32	18.95 ±0.87	17.55 ±1.01	18.74 ±0.81	17.38 ±0.48	16.08 ±0.24	17.49 ±0.00	12.00 ±0.02	12.39 ±0.02	12.66 ±0.65
	35	16.19 ±0.31	16.74 ±0.48	15.80 ±0.02	17.83 ±0.65	16.58 ±0.21	17.84 ±0.91	16.62 ±0.19	15.35 ±0.30	15.58 ±0.35	11.51 ±0.54	10.92 ±0.31	11.11 ±0.13

Kinetik Parametre	(°C)	Besiyeri											
<i>Lb. plantarum</i> MF4 Hacimsel verimlilik. g/L.h (Vpx)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25	0.091 ±0.001	0.185 ±0.004	0.093 ±0.001	0.075 ±0.001	0.068 ±0.000	0.066 ±0.000	0.097 ±0.001	0.194 ±0.002	0.196 ±0.000	0.052 ±0.000	0.052 ±0.000	0.051 ±0.001
	30	0.204 ±0.000	0.204 ±0.001	0.202 ±0.003	0.053 ±0.001	0.065 ±0.000	0.069 ±0.001	0.197 ±0.001	0.200 ±0.000	0.199 ±0.000	0.156 ±0.001	0.149 ±0.003	0.142 ±0.003
	35	0.206 ±0.000	0.208 ±0.003	0.208 ±0.003	0.080 ±0.001	0.070 ±0.001	0.127 ±0.002	0.201 ±0.000	0.211 ±0.001	0.212 ±0.001	0.152 ±0.001	0.157 ±0.001	0.155 ±0.009

Kinetik Parametre	(°C)	Besiyeri											
<i>Lb. brevis</i> MF343 Hacimsel verimlilik. g/L.h (Vpx)		MR			SS			MS			SM		
		pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
	25	0.035 ±0.000	0.035 ±0.000	0.034 ±0.000	0.055 ±0.001	0.053 ±0.000	0.051 ±0.001	0.060 ±0.001	0.060 ±0.001	0.060 ±0.000	0.056 ±0.000	0.034 ±0.000	0.034 ±0.001
	30	0.089 ±0.000	0.089 ±0.001	0.087 ±0.001	0.083 ±0.001	0.078 ±0.002	0.073 ±0.002	0.091 ±0.000	0.092 ±0.000	0.091 ±0.001	0.057 ±0.001	0.058 ±0.001	0.056 ±0.002
	35	0.090 ±0.001	0.088 ±0.001	0.087 ±0.001	0.085 ±0.001	0.083 ±0.001	0.083 ±0.001	0.092 ±0.001	0.094 ±0.000	0.089 ±0.001	0.054 ±0.001	0.053 ±0.002	0.051 ±0.001

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sevim Zeynep Yürüdür

Doğum Tarihi: 11.03.1994

E-mail: szeynepyurudur@gmail.com

Adres: Karşıyaka Mah. Bilgehan Sitesi. C Blok Daire:3 Merkez/Tokat

Eğitim Geçmişi

Lise: Tokat Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi (2008-2012)

Lisans: Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2012-2017)

Yüksek Lisans: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2018)