

**MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN
ALTERNATİF PROTEİN ÜRETİMİ**

**ALTERNATIVE PROTEIN PRODUCTION USING FRUIT
JUICE INDUSTRY WASTE**

İPEK CEREN YEŞİLDAĞ

PROF. DR REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Bana her daim destek olan canım ailem ve tüm sevdiklerime.

ÖZET

MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN ALTERNATİF PROTEİN ÜRETİMİ

İpek Ceren YEŞİLDAĞ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Haziran 2024, 169 sayfa

Bitkisel ve hayvansal protein kaynaklarının artan nüfusla beraber yükselen gıda arz ve taleplerini yeterli oranda karşılayamaması, büyük ölçüde enerji, su ve arazi gereksinimine ihtiyaç duymaları ve üretimlerinin sürdürülebilir olmaması nedeniyle alternatif bir protein kaynağına gereksinim vardır. Bu kapsamda gelecekte yaşanabilecek protein kıtlığının önüne geçilmesi için hammadde maliyeti düşük ve sürdürülebilir bir üretim prensibine sahip ürünler geliştirilmelidir. Mikrobiyal proteinler, bakteriler, algler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaların saf veya karışık kültürlerinin, hammaddeleri veya endüstri atıklarını kullanarak, belirli bir besiyerinde inkübasyonları sonucu elde edilen biyokütlenin ortamdan saflaştırılıp kurutulmasıyla üretilen proteinlerdir. Mikrobiyal protein üretimi için substrat olarak gıda endüstrisi atık ürünlerinin kullanılması düşük katma değere sahip hammaddelerden yüksek katma değerli son ürün eldesini mümkün kılmakta ve ekonomik büyümenin kaynak kullanımına bağlılığını sona erdirmektedir. Bu doğrultuda çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak meyve suyu endüstrisi atıklarından mikrobiyal protein üretilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda (HUF) bulunan 18 adet *S. cerevisiae* suşu canlandırılmış, saflıkları kontrol edilmiş ve tanımlamaları doğrulanmıştır. Ardından çalışma kapsamında gerçekleştirilecek fermantasyonlarda hücre gelişimlerinin izlenmesi ve yorumlanması için kontrol suşu olarak seçilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 ile YPD Broth besiyerinde çalışılarak temel bir hücre gelişim profili çıkarılmıştır. Canlandırılan suşlar arasından daha önceki çalışmada teknolojik özellikleri belirlenen yerel suşlar ve ticari *S. cerevisiae* suşlarının hücre gelişim profilleri, üretilen protein miktarı ve biyokütle verimleri beyaz üzüm suyu ortamında belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu yerel suşlar ile 9763 kodlu kontrol suşu çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çalışmada meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalardan fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretimi için model besiyeri formülasyonlarının oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak formülasyonda yer alacak hammadde konsantrasyonlarının belirlenmesi için, literatürde *S. cerevisiae* suşu gelişimini destekleyici ve mikrobiyal protein üretimi amacıyla kullanılan Bazal besiyeri kompozisyonu modifiye edilerek Bazal I ve Bazal II besiyeri olmak üzere iki farklı besiyeri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerlerinde kontrol suşu olan *S. cerevisiae* ATCC 9763 ile fermantasyon gerçekleştirilerek, fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik parametrelerin (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) takibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Bazal I besiyeri kompozisyonu, *S. cerevisiae* gelişimini ve mikrobiyal protein üretimini destekleyici temel formülasyon olarak seçilmiştir. Ardından yaş posaların kompozisyon analizleri (nem, kül, ham lif, indirgen şeker ve protein) gerçekleştirilerek mikrobiyal protein üretimi biyoprosesinde kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda nar çekirdeği, nar kabuğu, kayısı, elma, armut ve şeftali yaş posalarının öne çıktığı gözlemlenmiştir. Bazal I besiyeri formülasyonu, posaların indirgen şeker profilleri ve hasat zamanları göz önünde bulundurularak elma-armut (%50-50 w/w), kayısı-çilek (%70-30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) yaş posalarından dört farklı besiyeri formülasyonu oluşturulmuştur.

Yaş posalar kullanılarak formüle edilen dört farklı besiyerinde HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu yerel suşlarla, 9763 kodlu kontrol suşu ile 28°C’de 72 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonda fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik parametrelerin (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) takibi yapılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyeri, yüksek biyokütle verimine (25,51-33,14 mg/mL) ve üretilen protein miktarına (19,20-23,51 % w/w) sahip olması dolayısıyla mikrobiyal protein üretiminde substrat olarak öne çıkmıştır. Ayrıca bu besiyerinde yerel suşlar içerisinde HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşunun yüksek biyokütle verimi ile protein üretme kapasitesine sahip olması dikkat çekmiştir.

Çalışmanın son basamağında nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve bu besiyerinde en yüksek protein ve biyokütle üretimine sahip yerel HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile üretilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde kuru madde ve nem, primer metabolit, nükleik asit miktarı analizi ve yaşam döngüsü analizi (LCA) olmak üzere ileri analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda üretilen mikrobiyal proteinin insan vücudunda metabolizma ve fizyolojik açıdan olumlu etkileri bulunan metabolitleri içerdiği, insan tüketimi için kabul edilebilir sınırlar içerisinde nükleik asit konsantrasyonuna sahip olduğu ve üretime ait biyoprosesin, meyve suyu endüstrisi atıklarını değerlendirmede geleneksel yöntemlere kıyasla karbon ayak izinin daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, meyve suyu endüstrisi atıkları, fermantasyon, alternatif protein, mikrobiyal protein.

ABSTRACT

ALTERNATIVE PROTEIN PRODUCTION USING FRUIT JUICE INDUSTRY WASTE

İpek Ceren YEŞİLDAĞ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

June 2024, 169 pages

As the global population continues to expand, plant-based and animal protein sources are unable to adequately meet the growing demand for food due to their significant energy, water, and land requirements and their unsustainable production methods. Therefore, there is a need for alternative protein sources to address the potential future protein shortages. To prevent future protein shortages, products with low raw material costs and sustainable production principles should be developed. Microbial proteins are proteins produced by purifying and drying the biomass obtained by incubating of pure or mixed cultures of various microorganisms such as bacteria, algae, and fungi in a specific medium which is prepared by using raw materials or industrial wastes. The use of food industry wastes as substrates for microbial protein production enables the transformation of low-value raw materials into high-value end products, thus ending the dependence of economic growth on resource consumption.

In this context, the aim of this study was to produce microbial protein from fruit juice industry waste using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. In the first stage of the study, 18 strains of *S. cerevisiae* from the culture collection of the FoodOmics Laboratory of Hacettepe University Food Engineering Department (HUF) were revived, their purities were checked and their identifications were confirmed. Subsequently, a fundamental cell growth profile was established by working with *S. cerevisiae* ATCC 9763, which is selected as the control strain, in YPD Broth medium to monitor and interpret cell growth during fermentations to be carried out within the scope of the study. The growth profiles of cells, protein concentrations, and biomass yields of local strains which have been previously characterized for their technological properties and commercial *S. cerevisiae* strains were determined in white grape juice medium. Based on the results obtained, local strains coded HUF16M2K10004 and HUF16M3G11088, as well as the control strain coded 9763, were selected for further study.

Within the scope of the study model media formulations were developed for microbial protein production using fruit pomace. To achieve this, two different nutrient media, Basal I and Basal II, were developed by modifying the composition of the Basal medium commonly used to support *S. cerevisiae* growth and microbial protein production. Fermentations were carried out with the control strain *S. cerevisiae* ATCC 9763 in these media to monitor physicochemical (pH and protein content) and biological parameters (cell concentration and biomass yield). Based on the results obtained, the composition of Basal I medium was selected as the basic formulation supportive of *S. cerevisiae* growth and microbial protein production. Subsequently, compositional analyses of fruit pomaces (moisture, ash, crude fiber, reducing sugars, and protein) were performed to evaluate their suitability for microbial protein production in the bioprocess. It was observed that pomegranate seeds, pomegranate peel, apricot, apple, pear, and peach fruit pomaces were outstanding this regard. Based on the sugar profiles and harvest times of the pomaces, four different nutrient medium formulations were created as apple-pear (%50-50 w/w), apricot-strawberry (%70-30 w/w), peach (%100 w/w), and pomegranate peel-pomegranate seed (%50-50 w/w) fruit pomaces.

Fermentations were carried out at 28°C for 72 hours with local strains coded HUF16M2K10004 and HUF16M3G11088, as well as the control strain coded 9763, in four different nutrient media formulated using fruit pomaces. During fermentation, physicochemical (pH and protein content) and biological parameters (cell concentration and biomass yield) were monitored. According to the results obtained, the pomegranate peel-pomegranate seed (%50-50 w/w) nutrient medium stood out as a substrate for microbial protein production due to its high biomass yield (25,51-33,14 mg/mL) and protein content (19,20-23,51 %w/w). Furthermore, the local strain HUF16M3G11088 exhibited high biomass yield and protein production capacity in this nutrient medium.

In the final stage of the study, advanced analyses were performed on lyophilized dry powder form of microbial protein produced with pomegranate peel-pomegranate seed nutrient medium and the local strain HUF16M3G11088, which showed the highest protein and biomass production in this medium. These analyses included dry matter and moisture content analysis, primary metabolite analysis, nucleic acid analysis and life cycle assessment (LCA). The results indicated that the produced microbial protein contained metabolites with positive effects on metabolism and physiology in the human body, had nucleic acid concentrations within acceptable limits for human consumption, and the production process had a lower carbon footprint compared to traditional methods of managing fruit juice industry waste.

Keywords: *S. cerevisiae*, fruit juice industry waste, fermentation, alternative protein, microbial protein.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden itibaren mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanında ufkumu açan ve bu alanlara yönelmemde büyük etkisi olan, bana araştırmacı ve analitik düşünce biçimini kazandıran, yüksek lisans tez sürecimde beni destekleyen değerli danışmanım Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a,

Tez sürecimde laboratuvar çalışmalarımnda bana yardımcı olan Uz. Meltem YILDIRIM ve Uz. Yelda ZENCİR'e, laboratuvar ve araç gereçlerinin kullanımı için desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e, ayrıca analizler için altyapı sağlayan Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve özellikle yardımları için Öğr. Gör. Dr. Melis Şardan EKİZ'e, FoodOmics Laboratuvarı öğrencileri olan değerli arkadaşlarım Elif Bircan MUYANLI, Beyza SAYMAN, Bilge YILMAZ ve Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI'na,

Tez çalışmamda bana destek veren sayın Hilal AKIN ile Şerafettin YAZICI'ya ve Tunay Gıda ailesine,

Bana bu süreçte her konuda destek olan, her daim yanımda olan, benimle ilgilenen ve hastalığına rağmen bugünlere gelmem için kendini hiç düşünmeden büyük fedakarlıklar yapan, ne yapsam hakkını ödeyemeyeceğim canım annem Berrin YEŞİLDAĞ'a ve canım aile üyelerim, babam Caner YEŞİLDAĞ'a, kardeşim Tamer YEŞİLDAĞ'a, tez sürecimde bana her daim inanan ve ihtiyaç duyduğum anda bana desteğini hiç esirgemeyen Kemal Mert PURALI'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması FUK-2022-20131 numaralı proje ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İpek Ceren YEŞİLDAĞ

Haziran 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.1.1. Aminoasit Üretimi ve Protein Sekresyonu.....	11
2.2. Alternatif Proteinler.....	13
2.2.1. Mikrobiyal Proteinler	18
2.3. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları.....	23
2.3.1. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Mikrobiyal Protein Üretiminde Kullanımı.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Besiyerleri	28
3.1.2. Kimyasallar ve Sarflar.....	28
3.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşları.....	29
3.1.4. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları.....	30
3.2. Metot	31
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının Canlandırılması ve Seçimi	31
3.2.2. <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 Suşu Hücre Gelişim Profilinin Belirlenmesi	32
3.2.3. Seçilen <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Beyaz Üzüm Suyu Besiyerinde Hücre Gelişim Profillerinin ve Üretilen Protein Miktarlarının Belirlenmesi	33
3.2.4. Bazal Besiyerlerinde <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 Suşu ile Fermantasyon	37
3.2.5. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Analizi	39

3.2.6. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları ile Besiyeri Formülasyonunun Oluşturulması	45
3.2.7. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları Kullanılarak Oluşturulan Besiyerlerinde Fermantasyon	45
3.2.8. Üretilen Mikrobiyal Proteinin Analiz Edilmesi	49
3.2.8.1. Kuru madde ve Nem Analizi	49
3.2.8.2. Primer Metabolit Analizi	49
3.2.8.3. Nükleik Asit (DNA) Analizi	52
3.2.8.4. Yaşam Döngüsü (LCA) Analizi	53
3.2.9. İstatiksel Analiz	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının Canlandırılması ve Seçimi.....	55
4.2. <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 Suşu Hücre Gelişim Profilinin Belirlenmesi.....	62
4.3. Seçilen <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Beyaz Üzüm Suyu Besiyerinde Hücre Gelişim Profillerinin ve Üretilen Protein Miktarlarının Belirlenmesi	64
4.4. Bazal Besiyerlerinde <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 Suşu ile Fermantasyon.....	72
4.5. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Analizi.....	76
4.6. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları ile Besiyeri Formülasyonunun Oluşturulması .	81
4.7. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları Kullanılarak Oluşturulan Besiyerlerinde Fermantasyon	85
4.7.1. Isı Haritası ve Temel Bileşen Analizi	97
4.8. Üretilen Mikrobiyal Proteinin Analizi	101
4.8.1. Kuru madde ve Nem Analizi	102
4.8.2. Primer Metabolit Analizi	102
4.8.3. Nükleik Asit (DNA) Analizi	113
4.8.4. Yaşam Döngüsü (LCA) Analizi	114
5. YORUM.....	117
6. KAYNAKLAR	122
EKLER.....	141
EK 1.1- Bradford Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.	141
EK 1.2- BCA Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.	141

EK 1.3- <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 suşunun YPD Broth besiyerindeki 0-24 saat aralığında ölçülen absorbans değerleri ve hücre konsantrasyonları.	142
EK 1.4- Beyaz üzüm suyu besiyerinde 0-24. saatler aralığında 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşlarına ait ölçülen absorbans ve hücre konsantrasyonu değerleri.	144
EK 1.5- Beyaz üzüm suyu besiyerinde 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşlarına ait biyokütle verimleri ve üretilen protein miktarı.	150
EK 1.6- Bazal besiyerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonda takip edilen fizikokimyasal ve biyolojik parametrelerin sonuçları.	152
EK 1.7- İndirgen Şeker Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrileri	153
EK 1.8- Elma-armut (%50-%50, w/w), kayısı-çilek (%70-%30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-%50, w/w) besiyerlerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşların fermantasyon takibi sonuçları.	154
EK 1.9- Hacettepe Üniversitesi Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayım Merkezi (IFBBC) ev sahipliğinde Sagenit firması ile düzenlenen Yaşam Döngüsü Analizi (LCA) kursuna ait poster ve program. ...	162
EK 1.10- Nar kabuğu-nar çekirdeği yaş posaları ve HUF16M3G11088 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşu ile biyoproses yoluyla üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteinde yaşam döngüsü analizinde kullanılan proses akış diagramı ve proses verileri.....	164
EK 2- Tezden Türetilmiş Bildiriler	166
EK 2.2- Yeşildağ, İ. C., Akın, H., Yazıcı, Ş., Yılmaz, R, Yüksek Katma Değerli Ürünlerin Üretimi Amacıyla Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Kompozisyonunun Belirlenmesi, 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ekim 2023, Poster Sunumu.	167
EK 3- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	168
ÖZGEÇMİŞ	169

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Tez çalışmasının özet akış diyagramı.	4
Şekil 2. 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü	8
Şekil 2. 2. <i>S. cerevisiae</i> metabolizmasında fermente edilebilir şekerlerin kullanımı	9
Şekil 2. 3. <i>S. cerevisiae</i> 'nın gıda endüstrisinde ve biyoteknolojide kullanım alanları . .	10
Şekil 2. 4. Mayalarda aminoasitlerin glukoz ve amonyak kullanılarak biosentezi	11
Şekil 2. 5. <i>S. cerevisiae</i> hücresinde gerçekleşen protein sekresyonu	13
Şekil 2. 6. Bitkisel ve hayvansal bazlı gıda kaynaklarının tüketilen 1 ton protein bazında arazi kullanımı (ha), üretimlerinde harcanan su miktarları (1,000 m ³) ve ürettiği sera gazı emisyon miktarları (t CO ₂ eq)	15
Şekil 2. 7. Alternatif protein kaynakları.	17
Şekil 2. 8. Mikrobiyal protein üretimi prosesinin genel akış diyagramı	19
Şekil 2. 9. Farklı kaynaklardan 1 kg protein üretmek için gereken enerji miktarı	21
Şekil 2. 10. Gıda atıklarının yönetiminin katkıda bulunduğu Sürdürülebilir Kalkınma Amaçları (SDG).	24
Şekil 2. 11. Meyve suyu endüstrisi atıklarında bulunan lignoselülozik bileşenlere uygulanan ön işlemler ve bu ön işlemler	26
Şekil 3. 1. Beyaz Üzüm Suyu besiyerinde 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşlarına hücre gelişim profillerinin ve üretilen protein miktarlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait iş akış diyagramı.	34
Şekil 3. 2. Bazal I ve Bazal II besiyerlerinde 9763 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşu ile gerçekleştirilen fermantasyona ait iş akış deseni.	38
Şekil 3. 3. Meyve suyu endüstrisi atıklarından oluşturulan elma-armut (%50-%50, w/w), kayısı-çilek (%70-%30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-%50, w/w) besiyerlerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar ile gerçekleştirilen fermantasyona ait genel iş akış deseni.	46
Şekil 4. 1. <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 kontrol suşunun 0-24 saat aralığında 100 mL YPD Broth besiyerinde zamana karşılık “log (CFU/mL)” cinsinden hücre konsantrasyonu değişimi.....	63

Şekil 4. 2. Üzüm suyu besiyerinde A: 9763, B: MERIT™, C: HUF16M2K10004, D: HUF16M3G11088, E: HUF16M3H11101 kodlu suşlara ait besiyerlerinde 0, 24, 48 ve 72. saatlerde gerçekleştirilen fermantasyon takibi.	64
Şekil 4. 3. Beyaz üzüm suyu besiyerinde beş adet <i>S.cerevisiae</i> suşu ile gerçekleştirilen fermantasyonda 0-24. saat aralığında elde edilen hücre gelişim eğrileri.	66
Şekil 4. 4. Beyaz üzüm suyu besiyerinde 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda suşlara ait elde edilen kuru biyokütle örnekleri.....	68
Şekil 4. 5. Bazal I (A) ve Bazal II (B) besiyerlerinde 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon takibi.	73
Şekil 4. 6. <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 kontrol suşunun 0-72. saat aralığında Bazal I (A) ve Bazal II (B) besiyerlerinde analiz edilen fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) parametreler.	74
Şekil 4. 7. Yaş meyve posalarında gerçekleştirilen HPLC-RID analizinde standart şeker çözeltilerinin kromatogramı (a), örneklerle ait şeker kromatogramları (b).	79
Şekil 4. 8. Elma(%50)-Armut(%50) besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi	86
Şekil 4. 9. Kayısı(%70)-Çilek(%30) besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (log CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.	89
Şekil 4. 10. Şeftali besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.....	92
Şekil 4. 11. Nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde 9763 (A), 16M2K10004 (B) ve 16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (log CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.....	95
Şekil 4. 12. Yaş posalar kullanılarak 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda ölçülen ortalama canlı hücre sayısı (Log(CFU/mL)), biyokütle verimi (mg/mL), üretilen protein miktarı (%) ve pH değerlerine dair temel bileşen analizi (A) ve ısı haritası (B).	98

Şekil 4. 13. Nar çekirdeği-nar kabuğu (%50-50 w/w) besiyerinde HUF16M3G11088 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşu kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda elde edilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal protein	101
Şekil 4. 14. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve HUF16M3G11088 kodlu suş ile üretilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde (PPS11088) 4-50 dk arasında elde edilen metabolitlerin GC-MS toplam iyon akımı (TIC) görüntüleri..	103
Şekil 4. 15. Nar kabuğu-nar çekirdeği yaş posaları ve HUF16M3G11088 kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşu ile gerçekleştirilen fermantasyon biyoprosesi sonucunda elde edilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteine ait yaşam döngüsü analizinin kapsamı.....	115

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Alternatif protein marketinde pazarlanan bazı ürünlerin üretim metotları, yerine kullanıldıkları geleneksel protein kaynakları ve bu kaynaklara kıyasla sera gazı emisyonu, arazi ve su kullanımını azaltma oranları (%)	16
Çizelge 2. 2. Algler, bakteriler, mantarlar ve mayalar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan mikroorganizma türleri, substratlar ve elde edilen mikrobiyal proteindeki protein yüzdeleri.....	20
Çizelge 3. 1. Tez çalışması kapsamında kullanılan HUF kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşları.....	30
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılacak yaş meyve posalarının elde edildiği meyve türleri.	31
Çizelge 3. 3. <i>S. cerevisiae</i> suşlarının kültivasyonunda kullanılan Beyaz Üzüm Suyu besiyeri (pH 3,3) kompozisyonu.	35
Çizelge 3. 4. Yaş meyve posalarında indirgen şeker analizinde kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılan standart solüsyon konsantrasyonları.	43
Çizelge 4. 1. Tez çalışması kapsamında canlandırılan, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri belirlenen HUF kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşları.....	56
Çizelge 4. 2. <i>S. cerevisiae</i> suşlarının 100 mL beyaz üzüm suyunda gerçekleştirilen fermantasyondaki spesifik üreme hızları ve jenerasyon süreleri.	67
Çizelge 4. 3. Beyaz üzüm suyunda gerçekleştirilen fermantasyonda, 9763, MERIT, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu suşlara ait 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerde tespit edilen kuru biyokütle verimleri (mg/ mL) ve üretilen protein miktarları (%w/w).	69
Çizelge 4. 4. Bazal I ve Bazal II besiyerlerinin kompozisyonu.	72
Çizelge 4. 5. Çalışma kapsamında analiz edilen meyve suyu endüstrisi atıklarının yüzde cinsinden nem, kül, protein, ham lif ve indirgen şeker içeriği.	77
Çizelge 4. 6. Çalışmada analiz edilen yaş meyve posalarının kompozisyonunda bulunan şeker konsantrasyonları (%).	80
Çizelge 4. 7. Çalışma kapsamında mikrobiyal protein üretimi amacıyla fermantasyonda besiyeri hazırlanmasında kullanılacak yaş posalara ait meyvelerin hasat takvimi .	82
Çizelge 4. 8. Meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalar ile saf su kullanılarak oluşturulan besiyerlerindeki yaş posaların ve besiyerine eklenen D-Glukoz ve D-Fruktoz bileşenlerinin konsantrasyonları (g/L).	84

Çizelge 4. 9. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş ile 28°C’de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen mikrobiyal proteinin (PPS11088) %nem ve %kuru madde değerleri.....	102
Çizelge 4. 10. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve HUF16M3G11088 kodlu suş ile üretilen mikrobiyal proteine (PPS11088) ait primer metabolit analizi sonuçları.	104
Çizelge 4. 11. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş (PPS11088) kullanılarak üretilen mikrobiyal proteindeki kuru madde cinsinden nükleik asit (dsDNA) miktarları (g/100 g biyokütle)	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

L	Litre
mL	Mililitre
µl	Mikrolitre
g	gram
mg	miligram
log	logaritma
s	saat
°C	Santigrat Derece
nm	Nanometre
W	Watt
dk	Dakika

Kısaltmalar

<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CFU	Koloni oluşturan birim
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
BSA	Bovine Serum Albumin
BCA	Bikinkoninik Asit Tahlili
LCA	Yaşam Döngüsü Analizi
CO ₂ eq.	Karbondioksit eşdeğeri

1. GİRİŞ

Günümüz ekonomisinin temel özelliği, geleneksel tarım temelli gıda tedarik zincirleri ile gerçekleşen protein üretiminin, sera gazı emisyonları, arazi kullanımını ve su ayak izi gibi küresel çevresel kirlilik açısından önemli bir sorun haline gelmesidir [1]. İnsan tüketiminde protein kaynağı olarak sıklıkla hayvansal ve bitkisel proteinler kullanılmaktadır. Birleşmiş Milletler raporuna göre dünya nüfusunun 2030 yılında 8,5 milyara ulaşacağı ve nüfus artış hızı yükselerek 2050 yılında dünya nüfusunun 9,7 milyar olacağı bahsedilmektedir [2]. Bu artışla birlikte gelen gıda arz ve taleplerini karşılayabilmek için hayvansal ve bitkisel protein üretimlerinin de ciddi bir şekilde artması gerekmektedir. Ancak, hayvansal ve bitkisel proteinlerin üretimi için gereken kaynaklardan olan arazi ve su gereksinimi, sürdürülebilir bir nitelikte değildir. Bitkisel protein üretimi için ortalama 20 bin m³ su ve 10 hektar arazi gerekirken, hayvansal protein üretimi için 48 bin m³ su ve 15-20 hektar arazi gerekmektedir [3]. Bununla beraber çevre için olumsuz bir etken olan sera gazı salınımı ise bitkisel kaynaklarda 0,3-3 kg CO₂eq/kg ürün iken, hayvansal kaynaklarda yaklaşık 60 kg CO₂eq/kg ürün seviyesine ulaşmaktadır [4]. Günümüzde bitkisel proteinlerin, hayvansal proteinlere kıyasla daha çevre dostu bir nitelikte olması sebebiyle hayvansal proteinlerden bitkisel proteinlere doğru bir yönelim teşvik edilmeye çalışılsa da, 1 kg etin sahip olduğu oranda protein üretebilmek için 3-10 kg aralığında bitkisel ürünlerin işlenmesi gerekmektedir [5]. Sonuç olarak, dünya nüfusunun artması ve buna bağlı olarak bitkisel-hayvansal protein ihtiyacının da artıyor olması, küresel iklim krizinin yükselişiyle beraber tarım arazilerinin verimli kullanılamaması ve üretim için gerekli hammadde maliyetlerinin yükselmesi, hayvansal ve bitkisel protein kaynaklarının üretimi için gereken hammadde, su ve arazi ihtiyacının fazla olması sebebiyle hayvansal ve bitkisel protein üretiminin sürdürülebilir bir nitelik taşıyamamaktadır. Bu durum insanlığı gelecekte olası bir protein kaynağı kıtlığıyla yüzleşmeye itmektedir. Bu sebeple sürdürülebilir, hammadde ve kaynak tüketimi minimal seviyelerde olan alternatif bir protein kaynağına ihtiyaç vardır.

Proteinler, bitkisel ve hayvansal kaynakların dışında mikroorganizmaların biyoprosesse fermentasyon yoluyla kullanılmasıyla da üretilmektedirler. Bu kapsamda bakteriler, algler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaların kültürasyonu sonucu üretilen proteinler “mikrobiyal protein” adını almaktadır [6]. Mikrobiyal proteinler zengin

protein, aminoasit, karbonhidrat, mineral, yağ ve vitamin içeriğine sahiptirler [7]. Bu bağlamda biyodönüşüm sonucu elde edilen mikrobiyal proteinler, yeni ve değerli gıda ve gıda bileşenleri üretiminde güçlü bir çözüm önerisi olarak karşımıza çıkmaktadır [8].

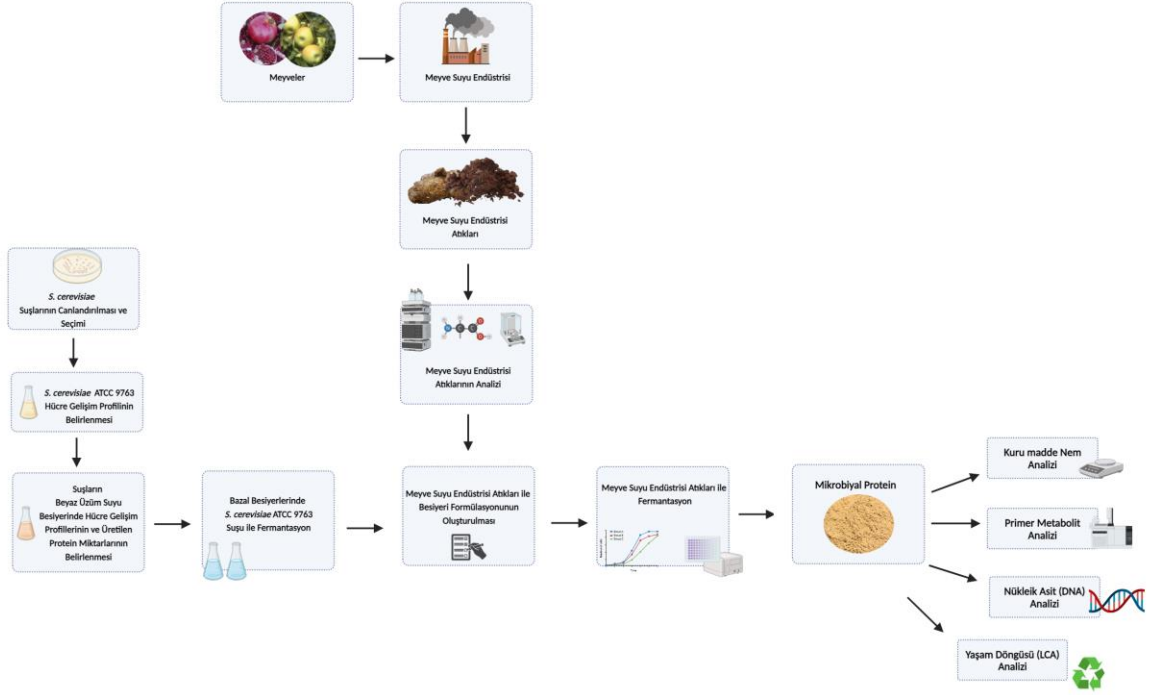
Son yirmi yılda, artan nüfus ve sağlıklı gıda tüketmeye yönelik değişen demografik özellikler nedeniyle meyve üretimine olan küresel talep artmıştır [9]. Bu bağlamda meyve üretimi için ayrılan ekim alanı da dünya genelinde giderek artmaktadır. Dünyada 2011 yılında 640 milyon tonun, 2018 yılında ise 870 milyon tonun üzerinde meyve hasadının yapıldığı tahmin edilmektedir. Üretilen meyvelerin neredeyse %50'si meyve suyu olarak işlenmekte ve sadece narenciye suyu üretiminde yılda 25 milyon ton atık oluştuğu bilinmektedir. Meyvenin %20-80'ini oluşturabilen bu atık ürünler, ciddi çevresel sorunlara yol açabilmektedir [9]. Ortaya çıkan büyük atık miktarları, günümüzde önemli bir problem olan gıda kıtlığı ve doğal kaynakların tükenmesi dikkate alındığında, meyve suyu endüstrisi atıklarının yönetimi endişe kaynağı haline gelmiştir. Bu nedenle atıkların değerlendirilmesi son zamanlarda gıda endüstrisinin sürdürülebilirliğini arttırmayı amaçlayan uluslararası bir tartışma konusu olmaktadır.

Meyve suyu endüstrisi atığı olan meyve posası, kısaca meyvelerin preslenmesiyle beraber suyu veya yağı çıkarıldıktan sonra elde edilen bir yan ürünü olarak tanımlanabilir. Meyve posası, tipik olarak önemli miktarda şeker, pektin, nişasta, lif ve ikincil bitki metabolitleri (vitaminler, polifenoller gibi) içeren, yüksek nem içeriğine sahip lignoselülozik bir malzemedir [10]. Meyve suyu işletmelerinde üretilen meyve posaları toplanmakta ve kullanıma veya işleme hazır hale getirilerek depolanmaktadır. Posanın toplanmasına yönelik altyapının mevcut olması, bu malzemeye düşük maliyetle erişmeyi kolaylaştırmaktadır. Katma değeri düşük olan meyve posaları çoğunlukla hayvan yemi olarak kullanılmakta, yakılmakta veya biyolojik gübre oluşturma amacıyla kompostlanmaktadır [10,11]. Bunun dışında posalar açık alanlara bırakılmakta ve bu durum toprak ve yeraltı suyu kirliliğine neden olmaktadır. Meyve atıkları yüksek nem içeriği ve biyolojik olarak parçalanabilir bileşikleri içermesinden dolayı zamanla çürüyerek, metan gazı adı verilen atmosferde karbondioksitten 21 kat daha fazla ısıyı hapseden güçlü bir sera gazı salınımına neden olmaktadır [12]. Dolayısıyla, meyve suyu endüstrisi atıklarının alternatif metotlarla değerlendirilmesi bir gereklilik haline gelmiştir.

Meyve suyu endüstrisi atıkları fermente edilebilir şekerler ve diğer temel besin maddeleri açısından zengin olması dolayısıyla mikroorganizmalar tarafından bir enerji kaynağı olarak etkili bir şekilde kullanılabilir [12]. Bu doğrultuda biyoproses yoluyla fermantasyon uygulanarak gerçekleştirilen mikrobiyal protein üretiminde meyve suyu endüstrisi atıkları kullanıldığında, katma değeri düşük bir hammaddeden katma değeri yüksek bir ürün geliştirilmesi, döngüsel biyoekonomiye geçiş sürecine katkıda bulunulması ve yeni bir alternatif protein kaynağı üretimi mümkündür.

Gelecekteki protein arzının güvence altına alınmasına yardımcı olmak için biyoproses uygulanarak fermantasyon yolu ile mikrobiyal protein üretimi meyve suyu endüstrisi atığı olan meyve posalarının değerlendirilmesi için kullanımı önemli bir olanaktır. Ham maddeleri istenen ürüne dönüştürmek için mikroorganizmaların kullanımını gerekli kılan fermantasyon biyoprosesi, binlerce yıldır gıda kalitesini ve güvenliğini korumanın etkili bir yolu olarak kullanılmıştır [13]. Son on yılda bilimsel dikkati tekrar üzerine çeken fermantasyon teknolojisi aynı zamanda yeni gıda ve gıda bileşenlerinin üretimi için düşük maliyetli biyoteknolojik bir yol olduğu kanıtlanmıştır [14]. Bu kapsamda ilk ekmeğin pişirilmesinden ve üzümlerin fermente edilmesinden bu yana gıda işlemenin temelinde yer alan ökaryotik endüstriyel bir mikroorganizma olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası, insan tüketimi için güvenli olması (GRAS, Generally Recognized as Safe), halihazırda fermentasyon proseslerinde sıkça kullanılıyor olması, biyokütlesinde nükleik asit içeriğinin az olmasının yansıra polisakkaritler, B vitaminleri, mineraller, esansiyel aminoasitleri içeriyor olması ve heksoz şekerleri fermente edebilme yeteneği sayesinde meyve suyu endüstrisi atıklarını metabolize edebiliyor olması onu mikrobiyal protein üretimi için en ideal aday haline getirmektedir [15].

Bu çalışmada meyve suyu endüstrisi atıklarından olan yaş posalar ile, GRAS özellikte olduğu bilinen ve geniş bir substrat yelpazesini kullanabilme yeteneğine sahip olan *Saccharomyces cerevisiae* mayaları ile biyoproses yoluyla fermantasyon uygulanarak mikrobiyal protein üretimi amaçlanmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Tez çalışmasının özet akış diyagramı.

Tez çalışması amacı kapsamında öncelikle Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda (HUF) bulunan 18 adet *S. cerevisiae* suşu canlandırılmış ve saflık durumları kontrol edilerek tanımlamaları doğrulanmıştır. Çalışma kapsamında gerçekleştirilecek fermantasyonların planlanması için *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu kullanılarak YPD Broth besiyerinde temel bir hücre gelişim profili oluşturulmuştur. Ardından suşların hücre gelişimleri, protein üretme yetenekleri ve biyokütle verimleri beyaz üzüm suyu ortamında belirlenerek yerel suşlar arasından çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçim yapılmıştır.

Çalışmada yaş posalar kullanılarak mikrobiyal protein üretimi amacıyla fermantasyon gerçekleştirilmesi için besiyeri formülasyonları oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda formülasyonda yer alacak posa miktarının belirlenmesi için, literatürde *S. cerevisiae* gelişimi ve mikrobiyal protein üretimi için kullanılan Bazal besiyeri [16] modifiye edilerek hazırlanan Bazal I ve Bazal II besiyerlerinde *S. cerevisiae* ATCC 9763 kodlu kontrol suşu ile fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda mikrobiyal protein üretiminde öne çıkan özelliklere sahip

Bazal besiyeri kompozisyonu temel formülasyon olarak seçilmiştir. Son olarak yaş posalar kullanılarak fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretimi için besiyeri formülasyonları oluşturulurken, bir önceki basamakta seçilen Bazal besiyeri formülasyonu, yaş posaların kompozisyonları ve hasat takvimleri göz önünde bulundurulmuştur. Böylelikle yaş posaların karışımlar halinde ve tek başına kullanıldığı besiyeri formülasyonları oluşturulmuştur.

Yaş posalar kullanılarak formüle edilen dört farklı besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyonda, fizikokimyasal (pH değişimi, protein üretme yeteneği) ve biyolojik parametrelerin (hücre gelişimi ve biyokütle üretimi) takibi yapılarak yerel ve ticari *S. cerevisiae* suşlarının ve yaş posa çeşitlerinin mikrobiyal protein üretim prosesindeki etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda mikrobiyal protein üretiminde öne çıkan yaş posa çeşidi ve yerel *S. cerevisiae* suşu kullanılarak üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteinde, ileri analizler (kuru madde ve nem analizi, primer metabolit analizi, nükleik asit analizi ve yaşam döngüsü analizi) gerçekleştirilmiştir.

Mevcut araştırma beyaz üzüm suyu besiyerinde hücre gelişimleri, üretilen protein miktarı ve biyokütle verimleri açısından *S. cerevisiae* suşları arasında farklılık olduğunu ve bu farklılıklara bağlı olarak mikrobiyal protein üretimi amacıyla yerel suşlar arasından seçim yapılabileceğini ortaya koymuştur. Büyük ölçekli bir işletmeden alınan yaş meyve posası örneklerinin indirgen şeker miktarlarının önemli düzeyde olması nedeniyle mikrobiyal fermantasyonda substrat olarak kullanılacakları saptanmıştır. Ayrıca posalara ait lif içeriklerinin de yüksek olması dikkat çekmiştir. Bununla beraber farklı türde yaş meyve posaları kullanılarak oluşturulan besiyeri formülasyonları ile yerel *S. cerevisiae* suşlarının mikrobiyal protein üretimi amacıyla kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Bu doğrultuda oluşturulan formülasyonlar sayesinde farklı türde yaş meyve posalarından karışımlar oluşturularak, atıkların eşzamanlı bir şekilde biyolojik olarak değerlendirilmesi mümkün kılınmıştır. Ayrıca fermantasyonda kullanılan ticari ve yerel maya suşlarına ait ölçülen fizikokimyasal ve biyolojik parametrelerin kullanılan fermantasyon ortamının türüne bağlı olduğu gösterilmiştir.

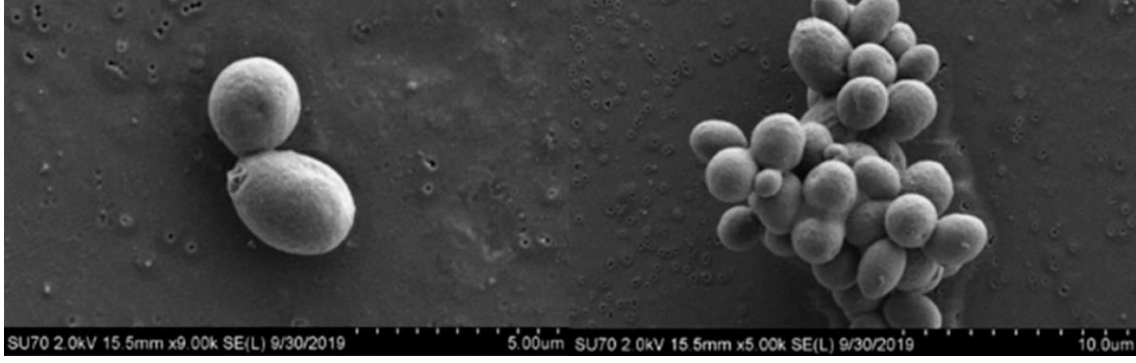
Sonuç olarak bu çalışma ekonomik büyümenin kaynak kullanımına bağlılığını sona erdiren, sürdürülebilir eylem planlarını içeren Avrupa Birliği Yeşil Mutabakatı'na ve Sürdürülebilir Kalkınma Amaçları'na hizmet etmektedir. Bu doğrultuda döngüsellik ve kaynak verimliliği kapsamında gıda israfına azaltmak, gıda atıklarını kaynak olarak kullanmak ve daha verimli endüstriyel gıda süreçlerinin oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu çalışma ile sadece arazilere bırakılan, hayvan yemi ve kompost üretiminde kullanılan yaş posaların, bileşen ekstraksiyonunda ve özellikle biyoproses yolu ile alternatif protein üretiminde yeni kaynak olarak kullanımlarını ve önemli bir alternatif protein olan mikrobiyal protein üretimi için öne çıkmasını desteklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

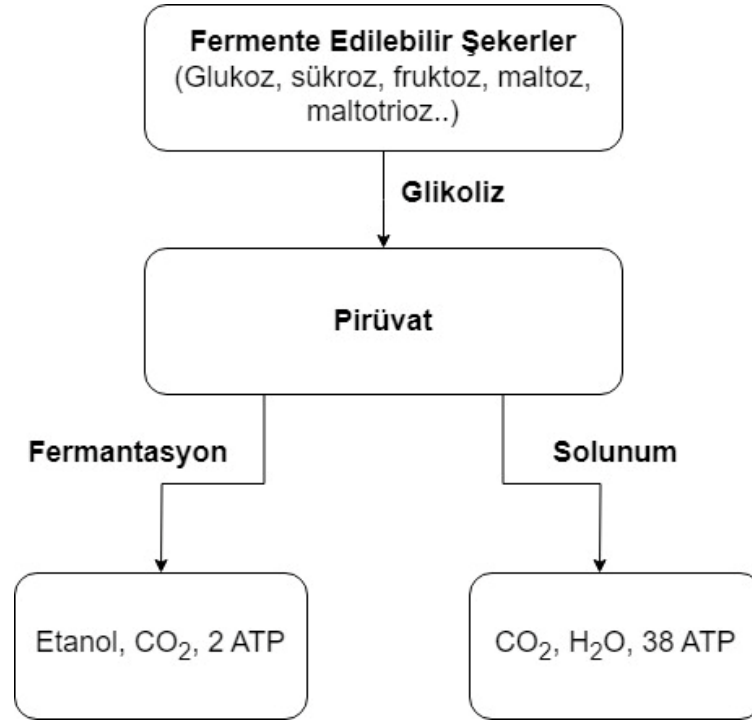
Mayalar, insan medeniyetinin çok uzun süredir önemli bir parçası olmuştur. Mayalar kullanılarak şarap yapımının en erken kanıtları Neolitik döneme, yaklaşık 7000-7400 yıl öncesine dayanmaktadır. Abydos'taki (M.Ö. 3150) bir şarap testisinden izole edilen DNA'nın, *Saccharomyces cerevisiae* mayasının dizisi ile yakından eşleştiği bildirilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* mayası, antik çağlardan beri fırıncılık, bira ve şarap yapımı gibi medeniyetin önemli yapıtaşlarında yer alan ökaryotik, tek hücreli ve model bir mikroorganizmadır [13]. *Saccharomyces* cinsi Meyen tarafından 1838'de keşfedilmiş ve 1870'de Rees tarafından tanımlanmıştır. Ardından 1888'de Hansen, bira mayası olarak *Saccharomyces cerevisiae*'yı tanımlamıştır [17]. *Saccharomyces* kelimesi “şeker mantarı” anlamına gelmekteyken, *cerevisiae* kelimesi kökenini Galce bir kelime olan kerevigia ve eski Fransızca kelime cervoise'den alır. Bu eski kelimelerin ikisi de bira anlamına gelmektedir [13].

S. cerevisiae, Saccharomycetaceae familyasının ve Saccharomycetoideae alt familyasının bir üyesidir. *S. cerevisiae* suşlarının çoğu diploid (16 çift kromozom) olmakla beraber tomurcuklanma ve askosporlar aracılığıyla üreyen tek hücreli mantarlar olarak tanımlanmaktadır [17]. Hücreler besin açısından zengin ortamlarda geliştirildiklerinde her saatte bir üreyerek tomurcuk oluşturma yeteneğine sahiptir. Ortamdaki besin kaynaklarının azalması durumunda ise, bazı suşlarının besin aramasını sağladığı düşünülen yalancı hif (pseudohyphae) adı verilen yapıları kullanarak gelişebildikleri tespit edilmiştir [18]. Türe ait vejetatif hücreler incelendiğinde küresel, oval veya silindirik şekilde (Şekil 2.1) olmakla beraber yüzeyleri açık krem renginde, düz ve pürüzsüzdür [17]. *S. cerevisiae* mayasına doğada bitkilerde, meyvelerde ve toprakta yaygın olarak rastlanılmaktadır. Bununla beraber *S. cerevisiae*'nin habitatının spesifik bir alanla sınırlı kalmadığı, karbon ve azot konsantrasyonu farklılaşan çeşitli ortamlarda gelişebildiği görülmüştür [19].



Şekil 2. 1. *Saccharomyces cerevisiae*'nın Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü [20].

Fermantasyon, kompleks organik bileşiklerin oksijen gereksinimi duyulmadan daha basit bileşiklere parçalanmasıyla birlikte enerji üretiminin gerçekleştiği (ATP molekülü üretimi) metabolik bir olaydır [21]. *S. cerevisiae* ortamdaki şeker kaynağını alkol ve karbon dioksit'e dönüştürme yeteneği sayesinde geçmişten günümüze fermantasyonda sıkça kullanılmaktadır. Bununla beraber *S. cerevisiae*'nin aerobik fermantasyon yapabilme özelliği onu diğer mikroorganizmalardan ayırmaktadır. Neredeyse çoğu mikroorganizma enerji ihtiyacını (ATP) oksijen varlığında glukozu su (H_2O) ve karbondioksit'e (CO_2) parçalayarak karşılamaktadır. Ortamda oksijen bulunmaması durumunda, glukozu fermente ederek etanol ve karbondioksit'e dönüştürmekte ve sadece iki molekül ATP üretebilmektedir. Bu sebeple çoğu mikroorganizma enerji üretimi bakımından 10 kat daha verimli olduğu için oksijen varlığında, glukozu okside ederek ATP üretimini tercih etmektedir [18]. Fakat mayalar ortamda oksijen bulunmasına rağmen glukozu fermente etmeyi seçmektedirler (Şekil 2.2). Bu sebeple enerji ihtiyaçlarını (ATP) karşılayabilmek için büyük oranda glukoz moleküllerini metabolize etmek zorundadırlar. Böylelikle fermantasyon sonucunda çeşitli ürünler üretmektedirler. Bu nedenle, üzüm suyu gibi şeker açısından zengin bir çözeltide fermantasyon verimleri yüksektir [18].



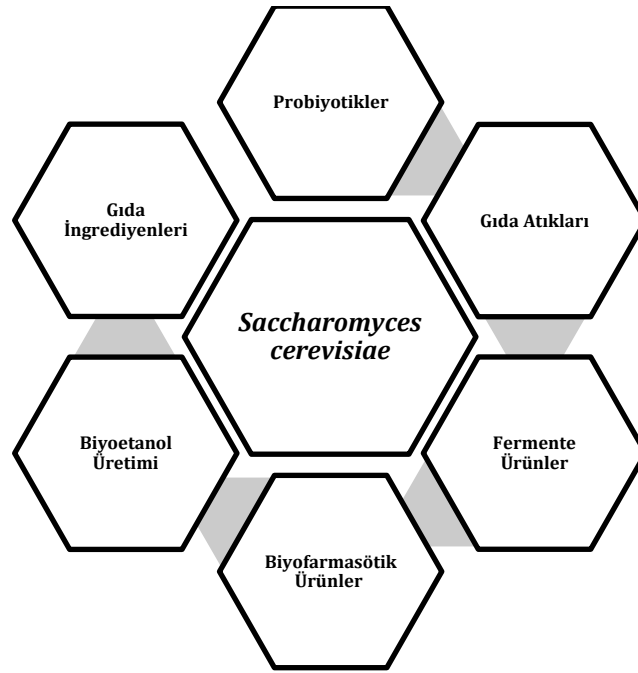
Şekil 2. 2. *S. cerevisiae* metabolizmasında fermente edilebilir şekerlerin kullanımı [22]

S. cerevisiae gelişimi için gereken fizyolojik ve biyokimyasal özellikler incelendiğinde D-glukoz, D-fruktoz ve D-mannoz gibi çeşitli heksoz şekerleri fermente edebilme yeteneğine sahiptir. Bu şekerler arasından fermantasyonda D-glukoz kullanımı en yüksektir. Bunların dışında sükröz, maltoz, maltotrioz ve D-galaktoz şekerlerini de fermente edebilmektedir. L- optik izomeriyeye sahip şekerler ve pentozlar (Ksiluloz dışında) *S. cerevisiae* tarafından fermente edilememektedir. Aynı zamanda laktik asit ve çeşitli organik asitler ile polihidroksi alkoller de fermente etme yeteneğine sahiptirler. Fermantasyon sırasında ortamda azot kaynağı olarak bulunan inorganik amonyum tuzları gelişimlerini desteklemektedir. *S. cerevisiae* ortamdaki üreyi de azot kaynağı olarak kullanabilmekle beraber nitratlar ve L-aminoasitleri metabolize edememektedir [17] .

S. cerevisiae yüksek etanol konsantrasyonlarına (%8-12 v/v) dayanıklıdır. Besiyeri ortamında gerçekleştirilen glukoz fermantasyonu sonucunda %15 (v/v) konsantrasyonda etanol üretebilmektedir. Optimum gelişim sıcaklığı 25-35°C aralığındadır. Oksijen hücre canlılığının sürdürülmesi için gerekli bir parametre iken, mikroaerofilik koşullar altında da gelişim gösterebilmektedir. Ortamda anaerobik koşullar oluştuğunda ise çeşitli

metabolitler (Ör: Yağ asitleri ve steroller) sentezlemekte ve en sonunda hücre gelişimi durmaktadır [17].

S. cerevisiae kseroofil bir mikroorganizma değildir, gelişimi için su aktivitesinin 0,89-0,91 aralığında olması gerekmektedir. Fakat ortamda su aktivitesi (a_w) düşüşü gerçekleştiğinde bu stres faktörüne tepki olarak gliserol üretmekte ve bu sayede hücre membranı ile ortam arasında bulunan osmotik basıncı dengeleyebilmektedir. Diğer tüm mayalar gibi besiyeri ortamının asidik olduğu koşullarda (4,5-6,5 pH) optimum gelişebilmektedir [17].

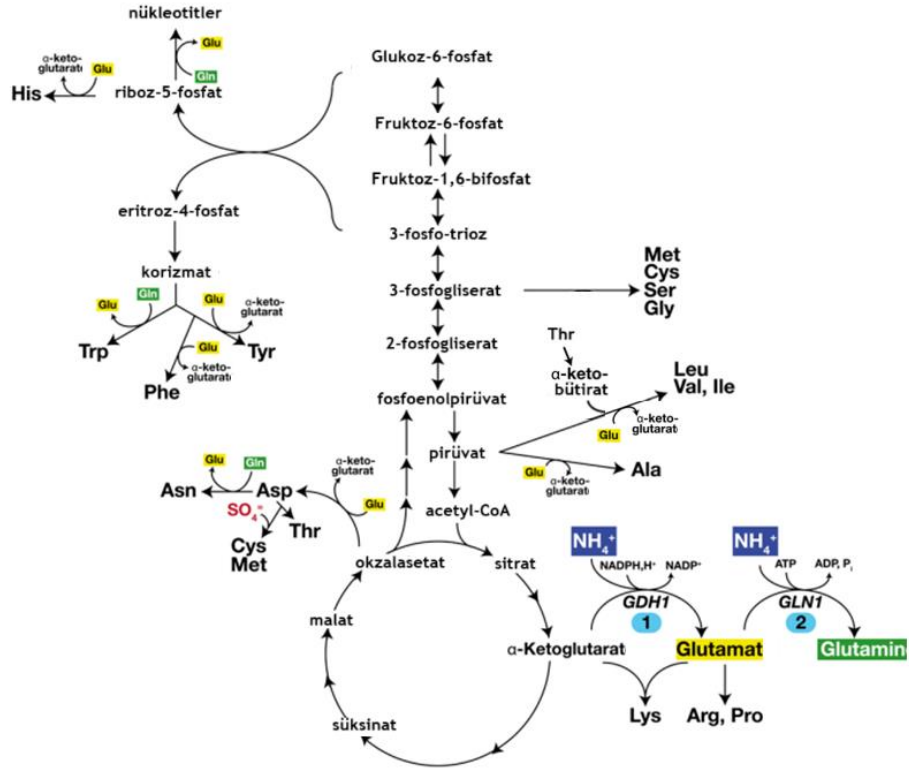


Şekil 2. 3. *S. cerevisiae*'nın gıda endüstrisinde ve biyoteknolojide kullanım alanları [23,24].

S. cerevisiae günümüzde gıda endüstrisinde fermente ürünler (şarap, bira, ekmek, kakao, kefir vb), gıda ingrediyanleri (d-dekalakton, feniletanol, maya ekstraktı, mannopteinler, glukomannanlar, ergosterol, gluklan, fruktoz şurubu), probiyotikler (*Saccharomyces boulardii*), gıda atıklarının değerlendirilmesinde (meyve ve sebze atıkları, şeker küspesi, peynir altı suyu), biyoetanol ve biyofarmasötik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Şekil 2.3) [23,24].

2.1.1. Aminoasit Üretimi ve Protein Sekresyonu

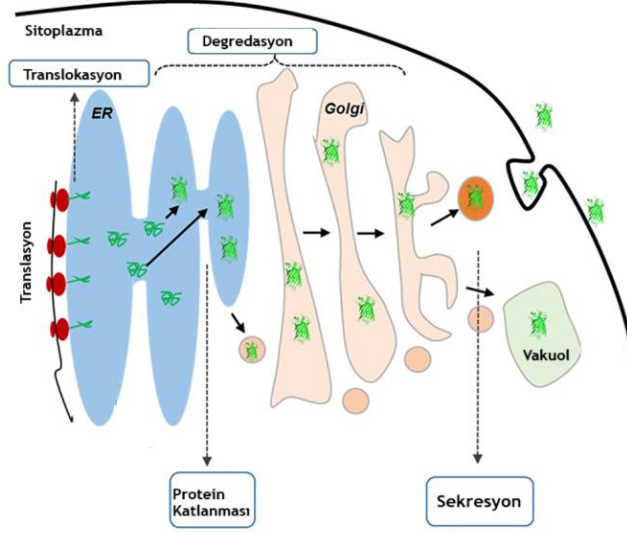
Maya hücresinde çoğu amino asit, α -ketoasitlerden sentezlenmektedir (Şekil 2.4). Amino asit sentezi trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde bir ara bileşen olan oksaloasetat veya alfa-ketoglutarat ile başlamaktadır. Ortamda bulunan amonyak iyonları ve alfa-ketoglutarat kullanılarak glutamat dehidrogenaz (GDH1) enzimi ile glutamat sentezlenmektedir. Glutamat ortamdaki amonyak iyonları ve glutamin sentetaz (GLN1) enzimi aracılığıyla glutamin sentezinde kullanılabilir. Ayrıca arjinin, lizin, prolin biyosentezleri de glutamat kullanılarak gerçekleşmektedir. Alanin, valin ve lösin aminoasitleri ortamda bulunan glukozun pirüvata dönüştürülmesi sonucu, glutamat moleküllerinin transaminasyonu yardımıyla sentezlenmektedir [25].



Şekil 2. 4. Mayalarda aminoasitlerin glukoz ve amonyak kullanılarak biyosentezi [25]. Glutamat (Glu) kullanılarak gerçekleştirilen transaminasyon reaksiyonları sarı renkle, Glutamin (Gln) kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar ise yeşil renkle işaretlenmiştir.

Metiyonin, sistein, serin ve glisin aminoasitleri ise glukozun ara bir metaboliti olan 3-fosfogliserat ve glutamat moleküllerinin transaminasyonu yardımıyla sentezlenmektedir. Asparajin, aspartik asitin glutaminin, glutamata transaminasyonu sonucu sentezlenirken, treonin, sistein ve metiyonin aspartik asite sülfür gurubu bağlanmasıyla üretilmektedir. Aromatik aminoasitlerden olan triptofan, tirozin ve fenilalanin ise 3-fosfotriozdan sentezlenmektedir. Son olarak histidin aminoasidi ise nükleotid biyosenteziyle bağlantılı olarak üretilmektedir [25] .

S. cerevisiae'da protein sekresyonu, nükleustan transkripsiyon sonucu mesajcı RNA'nın (mRNA) üretilmesi ile başlamaktadır (Şekil 2.5). Transkripsiyon sırasında DNA'yı oluşturan nükleotit dizisi RNA polimeraz enzimi tarafından bir RNA dizisi olarak kopyalanmaktadır. Transkripsiyon sonucu üretilen mesajcı RNA (mRNA) molekülleri, protein sentezi için gerekli kodlama dizilerini taşımaktadır. Nükleustan çıkarak sitoplazmadaki ribozom organeline gelen mRNA molekülleri burada ribozoma bağlanmaktadır. Ribozom içinde yer alan Ribozomal RNA (rRNA) molekülleri, protein sentezinin katalitik adımlarını yönlendirmektedir. mRNA'daki kodonlar (üçlü nükleotit sekansları), tRNA molekülleri tarafından tanınır ve her bir tRNA bu kodonlarla eşleşen bir amino asidi taşıyarak mRNA üzerindeki kodona bağlar. Bu şekilde tRNA'ların taşıdığı amino asitler birleştirerek polipeptit zincirini oluşturur. Protein sentezi, mRNA üzerindeki stop kodonuna (UAA, UAG veya UGA) ulaşıldığında durur. Bu şekilde transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'lardaki koda uygun olarak ribozomda amino asit zinciri veya polipeptit sentezlenmesine “translasyon” adı verilmektedir [26].



Şekil 2. 5. *S. cerevisiae* hücresinde gerçekleşen protein sekresyonu [27].

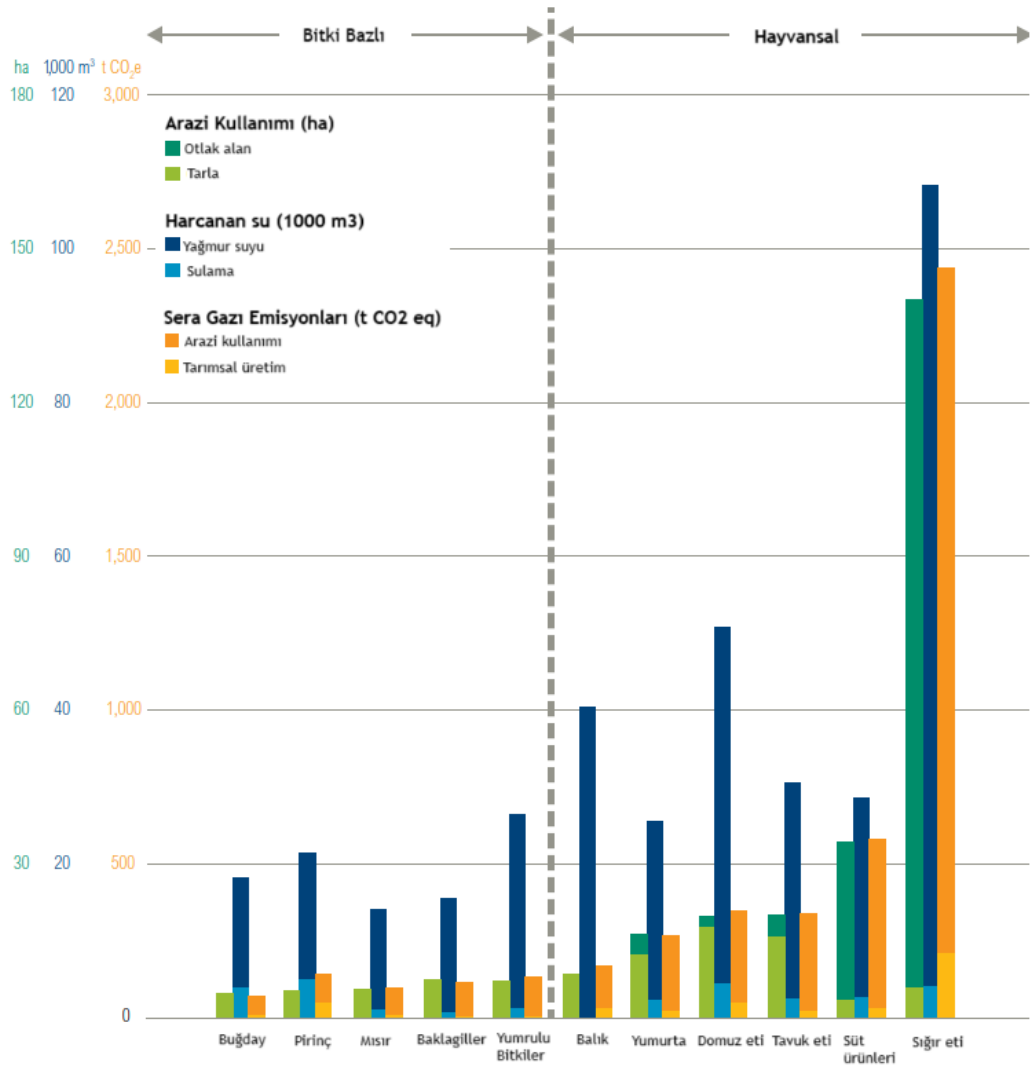
Translasyon sonucu üretilen proteinler eşzamanlı translokasyon veya post-translasyonel translokasyon mekanizmaları ile endoplazmik retikuluma (ER) ulaşır. Burada protein yapısının katlanması, modifikasyonunu ve degradasyonunu sağlayan birtakım işlemlerden geçer. Bu işlemler sırasında yapıya disülfid bağları veya şeker zincirleri eklenilebilmektedir. Sadece düzgün katlanan ve üretilen proteinler golgi aygıtına zar kesecikleri aracılığıyla taşınır ve burada şeker zincirlerinin uzatılması gibi ileri modifikasyonlar gerçekleştirilir. İşlemler sonucunda üretilen proteinler, vakuollere veya zar kesecikleri aracılığıyla hücre dışına taşınır [27] .

2.2. Alternatif Proteinler

Birleşmiş Milletler'in (BM) verilerine göre, Dünya nüfusunun 2050 yılında 9,8 milyara ulaşması beklenmekte olup, bunun sonucunda küresel gıda talebinin %60 ile %70 arasında artması öngörülmektedir. Ve FAO tarafından, artan talebin karşılanması için gıda üretiminin minimum %50 oranında artırılması gerektiği bildirilmektedir [28]. Bu doğrultuda 1960'tan günümüze kadar olan hayvansal protein tüketimini karşılamak için et ve süt üretimlerinin gittikçe arttığı, 2050 yılına gelindiğinde nüfusun ihtiyaçlarını karşılayabilmek için 435 milyon ton et ve 843 milyon ton süt üretilmesi gerektiği bildirilmektedir [29]. Bununla beraber tüketim verileri göz önüne alındığında ortalama bir insanın yılda 43 kg et tükettiği, bu durumun Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde 10

kg'dan daha az olduğu ifade edilmektedir [30]. Ve bu kapsamda, özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere üretilen hayvansal ve bitkisel proteinler yetersiz kalıp gıda kıtlığı yaşanmakta; 2022 yılında 783 milyona yakın insanın yetersiz beslendiği bildirilmektedir [31]. Ayrıca günümüzde kaynak ihtiyacının fazlalığı sebebiyle hayvansal proteinlerden bitkisel proteinlere doğru bir yönelim teşvik edilmeye çalışılsa da, 1 kg etin sahip olduğu oranda protein üretebilmek için 3-10 kg aralığında bitkisel ürünlerin işlenmesi gerekmektedir [5].

Bir başka sorun ise bitkisel ve hayvansal protein üretimi için gereken arazi ve su ihtiyacıdır. 1 ton protein üretimi için gereken su miktarı bitkisel kaynaklarda ortalama 20 bin m³ civarındayken, hayvansal kaynaklarda 48 bin m³; arazi gereksinimi ise bitkisel kaynaklarda ortalama 10 hektarken, hayvansal kaynaklar ise 15-20 hektar alandır [4]. Bitkisel ve hayvansal proteinleri üretimindeki artışın aynı zamanda beraberinde gıda kaynaklı emisyonları da artıracığı tahmin edilmektedir [32–34]. Günümüzde küresel sera gazı emisyonlarının %26'sının bitkisel, hayvansal tarım ve tedarik zinciri gibi gıda ve beslenme zincirinden, %14,5'inin ise doğrudan hayvancılık faaliyetlerinden kaynaklandığı hesaplanmıştır (Şekil 2.6) [35]. Metan gazı (CH₄) emisyonları, karbondioksit (CO₂) kıyasla 21 kat daha yüksek bir sera gazı etkisine sahip olduğu bilinmektedir. Ve metan gazı emisyonlarının %40'ının tarım sektöründen geldiği ve özellikle ruminant hayvanların sindirim sistemi fermentasyonundan ve hayvansal gübre yönetiminden kaynaklandığı belirtilmektedir [36]. Sera gazı salınımlarının artışıyla beraber küresel sıcaklık artışının 1,5 °C'nin altında tutulmaması durumunda gelecekte dünyamızı çevresel sorunlar beklemektedir [37]. Ayrıca toplam tarımsal su tüketiminin %40'ından fazlasının hayvan yemi üretiminde kullanıldığı ve bu durumun, geniş çapta su ve toprak kirliliğine, habitat kayıplarına ve biyolojik çeşitlilikte azalmaya neden olduğu bildirilmektedir [38].



Şekil 2. 6. Bitkisel ve hayvansal bazlı gıda kaynaklarının tüketilen 1 ton protein bazında arazi kullanımı (ha), üretimlerinde harcanan su miktarları (1,000 m³) ve ürettiği sera gazı emisyon miktarları (t CO₂ eq) [3].

Antibiyotikler hayvancılık sektöründe besinin gelişiminde ve hastalıkların önlenmesinde öne çıkmaktadır. Bununla beraber küresel antibiyotik satışlarının %73'ü hayvancılıkta kullanılmaktadır [39]. Bu durum antibiyotik direncine sahip bakterilerin gelişmesine sebep olmakta, halk sağlığını tehdit etmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'nin (CDC) 2019'da yayınladığı rapora göre ABD'de yılda 2,8 milyon insan antibiyotik dirençli bakterilerin yol açtığı enfeksiyona yakalanmakta, 35,000 insan ise hayatını kaybetmektedir [40]. Ayrıca hayvancılık faaliyetlerinin mevcut düzeni hayvan refahı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır [39].

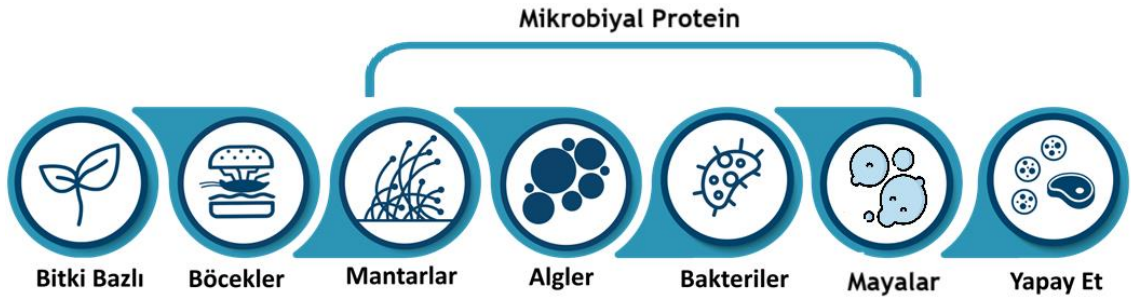
Hayvancılık sektörünün karmaşık ve çeşitli etkilerini dengelemek, geleneksel gıda sistemlerini sürdürülebilir gıda sistemlerine dönüştürmek, gıda arzını ve güvenliğini yönetebilmek önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda protein açısından zengin yeni insan gıdaları üretimi için geleneksel kaynakların yanı sıra alternatif protein kaynaklarının üretilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır.

Alternatif proteinler kaynakları, geleneksel olarak üretilen proteinlere kıyasla, üretimlerindeki arazi ihtiyacı, su tüketimi ve oluşan sera gazı emisyonları daha azdır [37]. Bununla beraber alternatif proteinlerin üretiminde antibiyotik kullanımı gerekmemesi sebebiyle antibiyotik dirençli mikroorganizmaların gelişimini önlemede büyük önemleri bulunduğu bildirilmiştir [41]. Bugün tüketicilere sunulan bazı alternatif protein ürünleri arasında birçok bitki bazlı protein ve mikrobiyal protein seçenekleri bulunmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Alternatif protein marketinde pazarlanan bazı ürünlerin üretim metotları, yerine kullanıldıkları geleneksel protein kaynakları ve bu kaynaklara kıyasla sera gazı emisyonu, arazi ve su kullanımını azaltma oranları (%) [42].

Alternatif Protein Ürünleri	Üretim Metodu	Geleneksel Protein Kaynağı	Sera Gazı Emisyonunu Azaltma Oranı (%)	Arazi Kullanımı Azaltma Oranı (%)	Su Kullanımı Azaltma Oranı (%)
Impossible Burger	Bitki bazlı	Sığır Eti	89	96	87
Beyond Burger	Bitki bazlı	Sığır Eti	89	97	99
Grillers Burger	Bitki bazlı	Tavuk Eti	85	93	95
Quorn Burger	Fermantasyon bazlı	Tavuk/Sığır Eti	75	78	-

Alternatif proteinler genellikle bitki bazlı protein, yapay et, böcekler veya mikrobiyal proteinler (tek hücre proteini) olmak üzere gruplandırılmaktadır (Şekil 2.7). Yapay et (in vitro), laboratuvarında üretilmiş veya hücre bazlı et olarak bilinmektedir. Hayvan kök hücrelerinden üretilmekle beraber üretimindeki ana adımlar, hayvan biyopsisinden kök hücrelerin izolasyonunu ve hücre kültür ortamında bunların istenilen dokulara (örneğin, iskelet kasları) proliferasyonu ve farklılaşarak önce olgun kas hücrelerine ardından daha büyük kas dokularına dönüştürülerek elde edilen son üründür [37]. Bitki bazlı alternatiflerin üretiminde soya fasulyesi, buğday, bezelye ve acı bakla gibi temel tahıllar kullanılmaktadır. Bitki bazlı alternatifler üretilirken besin maddesi alımını arttırmak amacıyla öğütülmesi ve işlenmesi gerekmektedir [43]. Bu işlemler arasında en sık kullanılan termoplastik ekstrüzyon yöntemidir [37]. Son ürün üretiminde ise çözücüler veya süperkritik CO₂ ekstraksiyon yöntemi kullanılarak protein konsantreleri ve/veya izolatları üretilir. Böcekler, özellikle Asya ve Afrika'da yüzyıllardır insan beslenmesinin bir parçası olmuştur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'na göre, dünya çapında 1900'den fazla böcek türü tüketilmektedir [44]. Mikrobiyal proteinler ise bakteri, mantarlar ve algler gibi tek hücreli mikroorganizmalar kullanılarak üretilen, yenilebilir biyokütleyi ifade etmektedir [45].



Şekil 2. 7. Alternatif protein kaynakları.

Alternatif proteinler, geleneksel protein kaynaklarına kıyasla avantajları sayesinde günümüzde gittikçe önem kazanan ve pazar payı artan kaynaklar haline gelmiştir. Bitki bazlı etin ve yapay etin 2040 yılına kadar sırasıyla toplam et pazarının %35'ine ve %25'ine sahip olacağını tahmin edilmektedir [46]. Dünya Ekonomik Formu topladığı verilere göre, 2035 yılında alternatif protein pazarının mevcut büyüklüğünün yedi katına çıkarak

yıllık 13 milyon metrik tondan 97 milyon metrik tona ulaşması ve genel protein pazarında %11'lik bir paya sahip olması beklenmektedir. Alternatif proteinlerden kilogram başına ortalama 3 dolar gelir elde edileceği ve bu durumun yaklaşık 290 milyar dolarlık bir pazar büyüklüğüne işaret ettiği ifade edilmektedir [47]

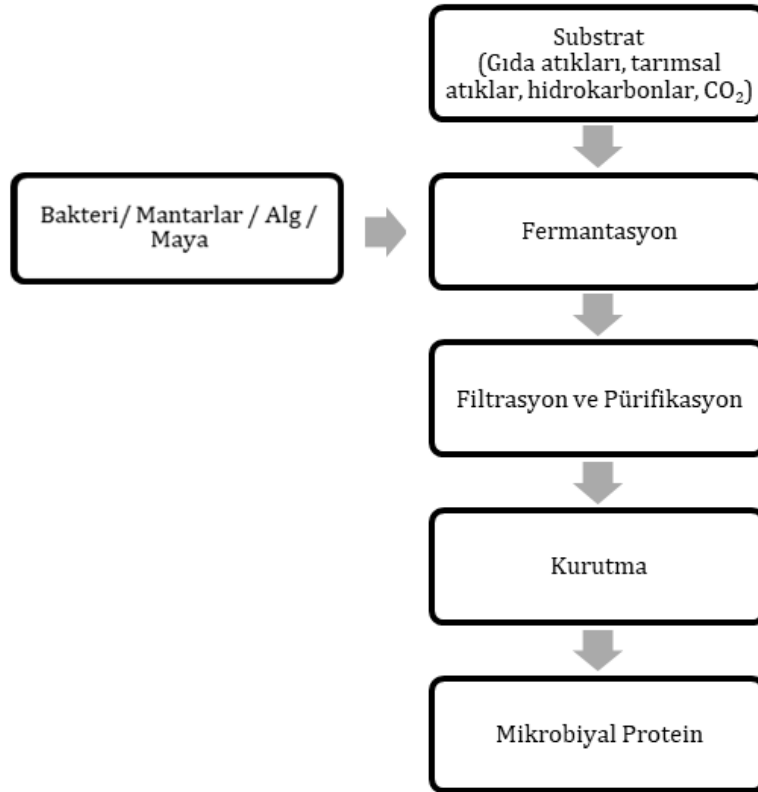
Bu çalışma meyve suyu endüstrisi atıklarından alternatif bir protein kaynağı olan mikrobiyal protein üretimini hedeflediğinden bundan sonraki bölümde mikrobiyal proteinlere değinilecektir.

2.2.1. Mikrobiyal Proteinler

Proteinler, bitkisel ve hayvansal kaynakların dışında mikroorganizmaların fermentasyon prosesinde kullanılmasıyla da elde edilebilmektedir. Bu kapsamda mikroorganizma kaynaklı proteinler mikrobiyal protein (tek hücre proteini) adını almaktadır. Mikrobiyal proteinler, çeşitli sınıflardan mikroorganizmaların (bakteri, mantar ve algler) saf veya karışık kültürlerinin belirli bir besiyerinde kültivasyonu sonucu elde edilen biyokütlenin filtrasyon ve pürifikasyonunun ardından kurutma işlemi uygulanmasıyla toz formunda üretilen proteinlerdir (Şekil 2.8) [6,48]. Bu şekilde üretilen mikrobiyal proteinler %80'e kadar oranda protein içerebilmektedir [7]. Ve protein kompozisyonunda yer alan esansiyel aminoasit içeriği FAO ve WHO tarafından tavsiye edilen miktarları karşılamaktadır [1]. Üretilen mikrobiyal proteinler, protein içeriğinin yanı sıra üretilen karbonhidratlar, mineraller, yağlar ve vitaminleri de içermektedirler [49].

Alternatif proteinlerde, bitkisel kaynaklar olarak öne çıkan soya bazlı proteinler sıkça kullanılmasına karşın, maliyetlerinin yüksek olması, duyuşal açıdan tüketici beğenirliğini henüz kazanamamış olması ve tropikal orman tahribatının %20'sine katkıda bulunması sebebiyle henüz tam anlamıyla sürdürülebilir kaynaklar değildir. Böcek bazlı proteinler ise kültür farklılıklarından dolayı tüketici onayını henüz kazanamamıştır. Son olarak, bakteri, mantarlar ve alglerin kültivasyonu ile elde edilen mikrobiyal proteinler ise, diğer kaynaklara kıyasla tarımsal arazi kullanımını azaltarak, orman tahribatını ve ilgili CO₂ emisyonlarını önemli ölçüde azaltmaktadır [50]. Bununla beraber mikrobiyal proteinin insan tüketiminde alternatif bir protein kaynağı olarak kullanılması yeni

değildir. Ekmek, peynir, yoğurt, turşu gibi fermente gıdaların üretilmesinde mikroorganizmaların rolü bulunmaktadır. Bu bağlamda mikrobiyal protein üretimi ilk olarak 1. Dünya Savaşı sırasında Almanya’da ekmek mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*), melas ve amonyum tuzları karışımına eklenmesiyle üretilmiştir. 2. Dünya Savaşı sırasında da mayalar mikrobiyal protein üretiminde kullanılarak gıdalara ve hayvan yemlerine katılmışlardır [6]. Savaştan sonra artan nüfusla beraber gıda talebinin de artmasıyla oluşan dengesizliğin giderilmesi için 1960-1970’li yıllarda İngiltere, Fransa, İtalya, Japonya, Rusya ve Tayvan’da mikrobiyal protein üretmek için fabrikalar kurulmaya başlanmıştır [51].



Şekil 2. 8. Mikrobiyal protein üretimi prosesinin genel akış diyagramı [48].

Mikrobiyal protein üretiminde genel olarak ham, atık ürünler veya endüstri yan ürünleri kullanılmaktadır. Substrat olarak özellikle yan ürünlerin tercih edilmesiyle düşük maliyetli organik atıkların katma değeri yüksek olan ürünlere ve protein kaynaklarına dönüştürülmesini mümkün kılmakla beraber çevre dostu sürdürülebilir bir üretim sağlamaktadır. Günümüzde endüstriyel ölçekte substrat olarak CO₂, etanol, nişasta,

metan, peynir altı suyu, alkanlar, glikoz şurubu, bira endüstrisi atıkları ve atık sular kullanılarak mikrobiyal protein üretilmektedir. Bunun yanı sıra çeşitli çalışmalarda meyve posaları ve kabukları, melas, pirinç kepeği, buğday samanı, küspe ve kızartma yağları kullanılarak mikrobiyal protein üretilmektedir [7]. Algler, bakteriler, mantarlar ve mayalar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan mikroorganizma türleri, substratlar ve elde edilen mikrobiyal proteindeki protein yüzdeleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Algler, bakteriler, mantarlar ve mayalar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan mikroorganizma türleri, substratlar ve elde edilen mikrobiyal proteindeki protein yüzdeleri.

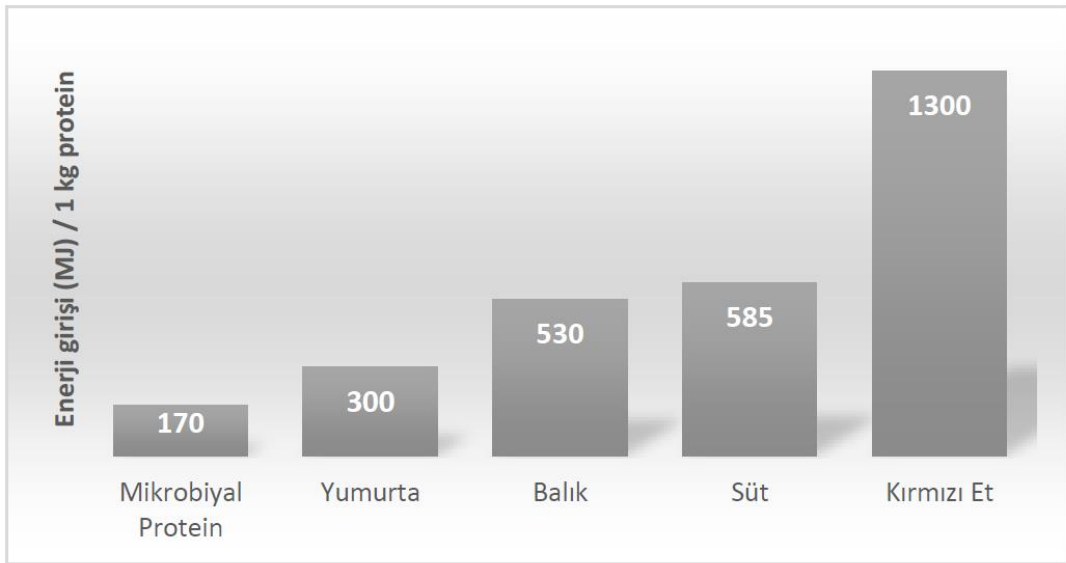
Mikroorganizma Sınıfı	Mikroorganizm Türü	Substrat	Protein (%)	Referans
Alg	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Atık su	45	[52]
Bakteri	<i>Methylocapsa acidiphila</i>	Metan gazı	59	[53]
Mantar	<i>Fusarium venenatum</i>	Glukoz (Quorn™)	44	[54]
Maya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Portakal posası, melas, bira posası (BSG)	39	[55]

Mikrobiyal proteinlerin, bitkisel ve hayvansal protein kaynaklarına kıyasla avantajları bulunmaktadır, bunlar:

- Jenerasyon sürelerinin kısa olması: Algler 2-6 saat; mayalarda 1-3 saat; bakterilerde 0,5-2 saat süre aralığında çoğalırken, bu süre tavuklarda 2-4 hafta, genç sığırlarda 1-2 ayı bulabilmektedir. Yani protein üretimi için gereken zaman

diğer kaynaklara kıyasla daha azdır. Bu kapsamda 250 kg bir inek ile 250 gr mikroorganizmanın ürettiği protein miktarı neredeyse aynı olmakla beraber, aynı koşullar altında bir inek günde 200 gram protein üretirken, mikroorganizmalar günde 25 tona kadar protein üretimini sağlayabilmektedir [5].

- Mikrobiyal proteinlerin diğer kaynaklara kıyasla üretimleri tarıma veya iklime bağlı değildir ve üretimlerinde ekilebilir arazi veya içme suyuna ihtiyaç yoktur. Mikrobiyal protein üretimi için bir tesis neredeyse her yerde kurulabilir ve potansiyel olarak kesintisiz bir şekilde çalışabilir [45].
- Ham ve endüstriyel atık ürünlerin değerlendirilmesinde kullanılabilmesi [1].
- Bitkisel ve hayvansal proteinlere kıyasla üretimlerinde gerekli olan arazi miktarı 130 kat, harcanan su miktarı ise 14 kat daha azdır. Endüstride elde edilen atık ürünlerin mikrobiyal protein üretiminde kullanılması sayesinde karbon ayak izi yaklaşık 1,7 ton CO₂eq/ton mikrobiyal protein gibi düşük bir seviyede olmaktadır [1]. Ayrıca 1 kg protein üretmek için gereken enerji miktarı diğer kaynaklara kıyasla daha azdır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. Farklı kaynaklardan 1 kg protein üretmek için gereken enerji miktarı (MJ) [56].

Bahsedilen nedenlerden dolayı mikrobiyal protein üretimi çevre dostu bir proses olarak kabul edilmekte ve küresel sürdürülebilirliği ve gelecekteki gıda güvenliğini sağlamak için güvenilir bir alternatif çözüm olarak sunulmaktadır.

Bakteriler, yüksek protein içeriklerine ulaşılması (%50-80) ve temel amino asitlerin yanı sıra vitaminler, fosfolipidler ve diğer işlevsel moleküllerini içeren mikrobiyal protein üretimini sağlayan önemli mikroorganizmalardır [57]. Bakteriler, kültürasyon sırasında hızlı gelişme, kısa jenerasyon süresine sahip olma, nişasta ve şekerlerden gaz ve sıvı hidrokarbonlara ve petrokimyasallara kadar değişen çeşitli ham maddeleri substrat olarak kullanabilme yetenekleri sayesinde öne çıkmaktadır [50]. Ancak bakterilerin mayalara ve mantarlara kıyasla hücre boyutlarının küçük ve yoğunluklarının az olması mikrobiyal protein üretimini zorlaştırmakta, bakteri hücrelerinin üretimde daha yoğun floküller haline getirilmesi gerekmektedir [58]. Bu durum da üretim maliyetini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra, tüketici açısından bakterilerin gıda olarak kullanımlarında kabulü düşüktür. Ayrıca diğer mikrobiyal protein kaynaklarına kıyasla daha yüksek miktarda nükleik asit içermektedirler (%8-12). Yüksek konsantrasyondaki nükleik asitler ise insanlarda alerjik semptomlara ve böbrek taşlarına neden olabilmektedir [7].

Algler genellikle morfoloji ve boyutlarına göre iki kategoriye ayrılır; mikroalgler ve makroalgler. İsimlerinden de anlaşılacağı gibi, mikroalgler mikroskopik fotoototrofik mikroorganizmalardır [50]. Kimyasal bileşimleri, proteinler, temel yağ asitleri (eikosapentanoik ve dokosahezanoik asitler) ve birkaç biyoaktif bileşik (pigmentler ve fenoller) içerdiği için mikroalgler, yem üretiminde kullanılmaktadır. Protein içerikleri ortalama %34 civarındadır [57]. Güneş enerjisini kullanarak karbon dioksiti ve suyu organik moleküllere dönüştürme özelliğine sahiptirler. Alglerden mikrobiyal protein üretiminde birtakım sınırlamalar bulunmaktadır. Alglerde bulunan hücre duvarı insanlarda selüloz enzimi bulunmadığından sindirilememektedir. Bu sebeple üretilen mikrobiyal proteinin insan gıdası olarak kullanılabilmesi için son üründe selüloz uygulaması yapılması gerekmektedir [50].

Mantarlar, sahip oldukları hidrolitik enzimler ve yüksek mikrobiyal protein verimleri ile hücre yoğunlukları sayesinde mikrobiyal protein üretimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır. Mantar kaynaklı mikrobiyal proteinler, çeşitli mikroblesinler içermesi (B12 vitamini, riboflavin, fosfor, çinko ve manganez gibi) ile düşük miktarda kolesterol içermeleri gibi sağlık yararlarına sahiptir. Mantarlar organik atıklar da dahil olmak üzere çeşitli atıkların biyolojik olarak parçalanmasında önemli bir rol oynayan hidrolitik

enzimlerin büyük miktarlarda salgılanmasıyla tanınmaktadır. Filamentli mantarlar ile üretilen mikrobiyal protein içeriği, %10 ila %63 arasında değişmektedir. Mikrobiyal protein üretiminde fermantasyon sırasında filamentli mantarlar, katı ortamların yüzeyinde misel oluşturarak veya daldırma kültürlerde yoğun pelletler olarak gelişebilmektedirler [45]. *Fusarium venenatum*, ticari olarak en çok bilinen mikrobiyal protein üreten mantar türlerinden biridir. Ve günümüzde ticari olarak Quorn™ firması tarafından mikrobiyal protein üretmek için kullanılmaktadır. 1985 yılında başarıyla piyasaya sürülen bu ürün “mikoprotein” olarak adlandırılmakla beraber şu anda, mikoprotein bazlı kalamar, miselyum bazlı domuz eti, tavuk filetoları ve kaz ciğeri gibi bazı ürün prototipleri geliştirilmede kullanılmaktadır [50,59].

Mayalar, mantarlar aleminde ökaryotik bir grup olmakla beraber günümüzde birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır. Bunlar arasında *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* ve *Pichia pastoris* gibi türler yer almakla beraber *Saccharomyces cerevisiae* mayası öne çıkmaktadır. Mayalar çeşitli substratları kullanma yeteneğine, yüksek protein içeriğine (kuru ağırlığın %45 ila %55'i), B kompleksi vitaminlerine sahiptirler. Asidik pH'da gelişme yetenekleri ve hücre boyutlarının büyük olması sebebiyle ortamdan saflaştırılmaları kolay olması gibi avantajlarının yanı sıra, uzun süredir geleneksel fermantasyonda kullanılmalarından dolayı bilinirlikleri ve kabul edilebilirlikleri önemli bir avantajdır [50]. Ayrıca, mayalar genellikle bakterilere kıyasla daha yüksek lizin ve malik asit içeriğine sahip olmakla beraber nükleik asit miktarları da düşüktür. Alglerle kıyasla ise maya hücrelerinin lize edilmesine gerek yoktur. Mayalar, gıda atıkları dahil olmak üzere çeşitli karbon kaynaklarını substrat olarak kullanabilmektedirler [48]. Bu tez çalışmasında ise *S. cerevisiae* kullanılarak alternatif protein kaynağı olan mikrobiyal protein üretimi gerçekleştirilecektir.

2.3. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları

İnsan nüfusu artışı ve artan sağlık farkındalığı ile beraber, meyve ve işlenmiş ürünlere olan talepler önemli ölçüde artmakta ve bu doğrultuda meyve suyu endüstrisi yıllık yaklaşık 887 milyon metrik ton meyve üretimi kapasitesiyle genişlemektedir [60]. Bununla birlikte, meyvelerin bozulmaya eğilimli ve yenilemez kısımlarından üretim,

depolama, dağıtım ve tüketim süreçlerinde büyük miktarda meyve atığı (zarar görmüş veya çürümüş meyve, kabuk, çekirdek, posa, pulp) meydana gelmektedir. Oluşan atık miktarına dair veriler incelendiğinde, sadece narenciye suyu üretiminden 25 milyon ton atık elde edilmektedir [61]. Bu meyve atıkları, biyolojik olarak parçalanabilir özelliğe sahip olduklarından, çevre için risk teşkil etmekte ve doğru bir şekilde yönetimleri sağlanmazsa ciddi kirlilik sorunlarına (sera etkisi ve küresel ısınma, su ve toprak kirliliği vb.) ve insan sağlığı risklerine neden olmaktadır. Bu sorunlara çözüm olarak günümüzde meyve atıklarının bir kısmı hayvan yemi olarak kullanılsa da, uygulanan en yaygın yaklaşımı, depolama veya yakma yöntemleridir. Ancak, uygulanan bu atık yönetim yaklaşımları ikincil atıkların oluşumu gibi başka sorunlara yol açabilmektedir [62]. Bu sebeple yeni atık yönetme yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Meyve suyu endüstrisi atıkları polisakkaritler, polifenoller, lifler ve vitaminlerce zengin içeriğe sahip olduğundan sürdürülebilir ve yenilenebilir kaynaklardır [63]. Ve bu sebeple döngüsel ekonomi kavramı doğrultusunda ticari olarak katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülme potansiyeline sahiptirler. Bununla beraber meyve suyu endüstrisi atıklarının değerlendirilmesi Şekil 2.10'da yer alan Sürdürülebilir Kalkınma Amaçları'nın (SDG) gerçekleştirilmesi açısından da önem taşımaktadır.



Şekil 2. 10. Gıda atıklarının yönetiminin katkıda bulunduğu Sürdürülebilir Kalkınma Amaçları (SDG) [64].

Meyve suyu endüstrisi atığı olan meyve posaları, kısaca meyvelerin preslenmesiyle beraber suyu veya yağı çıkarıldıktan sonra elde edilen bir yan ürünü olarak

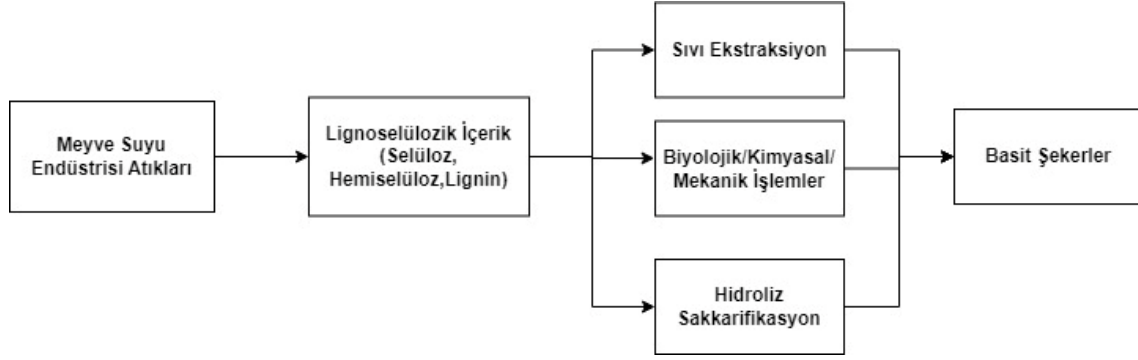
tanımlanmaktadır. Meyve posası, meyvenin yenmeyen kısımlarını oluşturan kabuk, tohum, sap ve pulpunu içerir [10]. Meyve posası, tipik olarak önemli miktarda şeker, pektin, nişasta, lif ve ikincil bitki metabolitleri (vitaminler, polifenoller gibi) içeren, yüksek nem içeriğine sahip lignoselülozik bir malzemedir [10]. Bununla beraber meyve posasının, elde edildiği meyve suyundan daha yüksek oranda biyoaktif madde içerdiği bildirilmiştir. Dolayısıyla, posalar, biyoyakıt üretiminde, biyoaktif bileşenler ile lif ekstraksiyonunda ve özellikle yeni gıda ingrediyanleri geliştirmede kullanımı umut vadeden bir kaynaktır [65,66].

2.3.1. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Mikrobiyal Protein Üretiminde Kullanımı

Bölüm 3.3'te bahsedildiği üzere meyve suyu endüstrisi atıklarından olan posalar kompozisyon bakımından zengin kaynaklar olmaları dolayısıyla döngüsel ekonomi çerçevesinde posaların yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesi önem taşımaktadır. Bu doğrultuda posaların yeniden değerlendirilmesinde ve yüksek katma değerli ürün üretiminde, gıda endüstrisi atıklarını değerlendirmede daha sürdürülebilir bir yaklaşım olan fermentasyon prosesi önerilmektedir [67].

Mikrobiyal protein üretimi, posaların değerlendirilmesinde ve inovatif gıda kaynakları üretiminde günümüzde öne çıkan konular arasındadır. Mikrobiyal protein üretiminde fermentasyonda substrat olarak kullanılan meyve suyu endüstrisi atıkları fermante edilebilir şekerler ve mikrobiyal büyümeyi destekleyen diğer temel besin maddeleri bakımından diğer kaynaklara kıyasla zengin olduğu için öne çıkmaktadırlar [12].

Meyve suyu endüstrisi atıkları lifçe zengin ve lignoselülozik içeriğe sahip materyaller oldukları için yapılarını oluşturan başlıca bileşenler arasında selüloz, hemiselüloz ve lignin yer almaktadır. Mikrobiyal protein üretiminde mikroorganizmalar bu yapısal polisakkaritleri metabolize edememektedir. Bu sebeple lignoselülozik içeriğin glukoz ve ksiloz gibi fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi proses için elzemdir. Lignoselülozik içeriğin fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesinde ekstraksiyon veya biyolojik/kimyasal/mekanik işlemler, hidroliz/sakkarifikasyon (kimyasal veya enzimatik) uygulamaları kullanılmaktadır (Şekil 2.11) [12].



Şekil 2. 11. Meyve suyu endüstrisi atıklarında bulunan lignoselülozik bileşenlere uygulanan ön işlemler ve bu ön işlemler [12].

Mayalar, mikrobiyal protein üretimi için önde gelen bir mikroorganizma grubudur, çünkü önemli miktarda lizin ve triptofan içeriğine, düşük nükleik asit içeriğine, düşük pH'da gelişme yeteneğine ve diğer mikroorganizmalara kıyasla daha büyük boyutta olmaları nedeniyle üretim sonucunda mayalar kullanılarak elde edilen biyokütlenin pürifikasyonu kolaydır. Ayrıca, mayalar geleneksel fermantasyonda uzun bir geçmişe sahip oldukları için, mikrobiyal protein üretiminde en çok kabul gören ve yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır. Ekmek ve bira mayası olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae*, mikrobiyal protein üretimi için en çok kullanılan maya türüdür. Atık ürünleri metabolize edebilme, geniş pH skalasında (2.5-8.5) ve sıcaklıkta (2-45°C) gelişim gösterebilme, biyokütlesinin B grubu vitaminleri, mineraller, polisakkaritler ve karbonhidratlarca zengin olması ve GRAS (Generally Recognized as Safe) özellikte olması mikrobiyal protein üretimi için önemli bir tür haline getirmektedir. *S. cerevisiae* ile hammaddeler (buğday, mısır vb) veya bira endüstrisi atıkları (arpa kalıntıları vb), lignoselülozik tarım atıkları, endüstri atık suları, melas, meyve ve sebze endüstrisi atıkları (posalar, kabuklar vb) mikrobiyal protein üretiminde kullanılabilir [15]. Sonuç olarak *S. cerevisiae*, gıda ve içecek üretiminde uzun bir güvenli kullanım geçmişine sahip, model bir mikroorganizma olması, fermantasyon yoluyla şekerleri proteinlere yüksek verimlilikle dönüştürme konusunda etkili olması, üretilen proteinlerin insanlar ve hayvanlar için temel amino asit gereksinimlerini karşılaması, genetik modifikasyona uygun olup, protein üretim yeteneklerinin artırılmasına veya yeni özelliklerin tanıtılması olanağına sahip

olmasından dolayı mikrobiyal protein üretimi için avantajlı bir mikroorganizmadır [15,68].

Bu çalışmada meyve suyu endüstrisi atıklarından alternatif protein üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında gerçekleştirilecek fermantasyonların planlanması için *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu kullanılarak temel bir hücre gelişim profili çıkarılmıştır. Ardından *S. cerevisiae* suşlarının beyaz üzüm suyu ortamında protein üretme yetenekleri ve suşlara ait biyokütle verimleri incelenerek çalışmanın devamında kullanılmak üzere suş seçimi gerçekleştirilmiştir.

Yaş posalar kullanılarak mikrobiyal protein üretimi amacıyla fermantasyon gerçekleştirilmesi için besiyeri formülasyonları oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda formülasyonda yer alacak posa konsantrasyonunun belirlenmesinde literatürde *S. cerevisiae* gelişimi ve mikrobiyal protein üretimi için kullanılan Bazal besiyeri kompozisyonu üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ardından yaş posalara ait kompozisyon analizleri, Bazal besiyeri kompozisyonu ve hasat takvimleri doğrultusunda besiyeri formülasyonları oluşturulmuştur. Böylelikle yaş posalardan elde edilen farklı besiyeri formülasyonlarının ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının mikrobiyal protein üretimi üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Ayrıca yaş posaların, *S. cerevisiae* ile fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretiminde substrat olarak kullanıma uygunlukları değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda yerel ve ticari *S. cerevisiae* suşlarının, yaş posalar kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal protein üretimi biyoprosesinde sahip oldukları fizikokimyasal (pH değişimi, protein üretme yeteneği) ve biyolojik özelliklerin (hücre gelişimi ve biyokütle üretimi) karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Değerlendirmeler sonucunda öne çıkan besiyeri formülasyonu ve yerel *S. cerevisiae* suşu kullanılarak üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteinde ileri analizler (kuru madde ve nem analizi, primer metabolit analizi, nükleik asit analizi ve yaşam döngüsü analizi) gerçekleştirilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerleri

Suşların canlandırılması ve geliştirilmesi için YPD Broth (Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu: Y1375) ve YPD Agar (Agar, 15 g/L Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu:Y1500) besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında seçilen *S. cerevisiae* suşlarının kültivasyonu için besiyeri olarak maya ekstraktı tozu (Yeast Extract Powder, LAB M™, Birleşik Krallık, Ürün kodu: Ürün kodu: Q27344/210) ilave edilen Beyaz Üzüm Suyu (Kavaklıdere Şarapları A.Ş., Ankara), kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar ve Sarflar

Suşların katı besiyerinde muhafazasında tek kullanımlık steril petriyerler (ISOLAB, Almanya, Ürün Kodu: 081.02.091) kullanılmıştır. Fermantasyonda spektrofotometrik ölçümler spektrofotometrik küvetler (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 098.02.002) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerinin pH'sının ayarlanmasında NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: 1.06498.1000) ve HCl (Hidroklorik Asit, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: 1.00314.2500) kullanılmıştır. Örnek alımları için 50 mL hacimli konik tabanlı polipropilen vida kapaklı şeffaf steril santrifüj tüpleri (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.02.008) ve 15 mL hacimli konik tabanlı polipropilen vida kapaklı şeffaf steril santrifüj tüpleri (StarLab GmbH, Almanya, Ürün kodu: E1415-0200) kullanılmıştır.

Bradford protein analizi Coomassie Brilliant Blue G-250 (BostonChem, ABD, Ürün kodu: BBM-802205), %95'lik Etanol (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 920.026.2500) ve %85'lik fosforik asit (Merck, Almanya, Ürün Kodu: 1.00573.2500) kimyasalları kullanılarak hazırlanan Bradford Ajanı ile gerçekleştirilmiştir. BCA protein analizi için ise BCA Reagent A (Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: B0643) ve BCA Reagent B'nin hazırlanması için ise CuSO₄ (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 911.026.1000) kimyasalları

kullanılmıştır. Protein analizlerinde kalibrasyon eğrileri BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: A2153) kullanılarak hazırlanmıştır. Analizler 96 kuyulu steril hücre kültürü petripleri (Greiner Bio-one, Avusturya, Ürün kodu: 650160) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan Bazal besiyerlerinin hazırlanmasında D-Glukoz (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu:G5400), D-Fruktoz (Merck, Almanya, Ürün kodu: 2491457), Amonyum Sülfat (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu:31119), Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck, Almanya, Ürün kodu:1.04871.1000), Magnezyum Sülfat Heptahidrat (Merck, Almanya, Ürün kodu:1.05886.0500) ve Sodyum Klorür (Merck, Almanya, Ürün kodu: 1.06404.1000) ve Kalsiyum Klorür (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün kodu:21074) kullanılmıştır.

3.1.3. *Saccharomyces cerevisiae* Suşları

Bu çalışmada, materyal olarak Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda (HUF) bulunan, önceki çalışmada [69] tanımlamaları yapılmış ve -20°C'deki gliserol stoklarda muhafaza edilen 18 adet *Saccharomyces cerevisiae* suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. Tez çalışması kapsamında kullanılan HUF kodlu *S. cerevisiae* suşları.

No	İzolasyon Kodu (HUF)	Kaynak	NCBI Erişim Kodu
1	16M1C0002	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763*	OQ876808
2	16M1C0003	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 6328*	OQ912898
3	16M1C0004	<i>S. cerevisiae</i> MERIT TM (Chr. Hansen) *	-
4	16M2K10004	Ankara	OQ912899
5	16M3B11021	Kırıkkale, Üzüm	OQ876789
6	16M3C11032	Kırşehir, Üzüm	OQ876790
7	16M3C11033	Kırşehir, Üzüm	OQ876791
8	16M3G11088	Eskişehir, Üzüm	OQ876792
9	16M3H11101	Çankırı, Üzüm	OQ876793
10	17M3C31063	Kırşehir, Üzüm	OQ876795
11	17M3D31088	Nevşehir, Üzüm	OQ876799
12	17M3E21113	Aksaray, Üzüm	OQ876802
13	17M3E21114	Aksaray, Üzüm	OQ876803
14	17M3F21122	Ankara, Üzüm	OQ876804
15	17M3H21208	Karaman, Üzüm	-
16	17M3H21209	Karaman, Üzüm	-
17	18M2Y10013	Ankara	-
18	18M2Z10001	Adana	-

*Tabloda HUF kodu ile görülen kontrol suşları, çalışma metninde daima kaynak suş numara kodları ile kullanılacaktır.

3.1.4. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları

Bu çalışmada kullanılan meyve suyu endüstri atıkları olan yaş posalar Erzincan ilinde 2004 yılında kurulan, her yıl ortalama %20'nin üzerinde büyüyen, 2019 yılından itibaren ihracat oranı %98'e yükselen meyve suyu üretim işletmesinden temin edilmiştir. Bu işletmede organik meyve suları, meyve suyu konsantreleri, püre konsantreleri ve meyve

aromaları üretilmektedir. Püre konsantresi üretimi için günde 300 ton meyve işlenirken, meyve suyu ve meyve suyu konsantresi üretimi amacıyla günde 1000 ton meyve işlenmektedir. Üretimde elma, armut, nar, şeftali, çilek, kayısı ve siyah havuç meyvelerinin işlenmesi sırasında elde edilen yaş posaların her birinden yaklaşık 2 kilogram ağırlığında alınarak Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı'na soğuk zincir kargo ile ulaştırılmış ve ivedilikle -20°C'de muhafaza altına alınmıştır. Bu doğrultuda Çizelge 3.2'de çalışmada kullanılan yaş meyve posaları ve bunların elde edildiği meyve türleri verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılacak yaş meyve posalarının elde edildiği meyve türleri.

Yaş Posa İsmi	Tür
Elma	Gala, Misket, Starking, Golden, Granny smith, Sakı Elması
Armut	Ankara Armudu, Deveci
Nar	Hicaz
Şeftali	Hale, Rebir, Cardinal
Kayısı	Apricot, Erzincan kayısı, Şekerpare
Çilek	Tiago, Aliso, Yediveren
Siyah Havuç	Kırıkhan Havuç (Hatay)

3.2. Metot

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Canlandırılması ve Seçimi

Çizelge 3.1'de verilen suşlar YPD Broth (Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu: Y1375) besiyerine aktararak canlandırılmıştır. Canlandırma işlemi etüvde (Mermert, Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) 28 °C'de 24 saat boyunca inkübasyonun ardından sıvı besiyerinde türbidite gözlenmesi ile sonlandırılmıştır. Daha sonra suşların, öze yardımıyla YPD Agar (Agar, 15 g/L Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu:Y1500) bulunan tek kullanımlık steril petrilere

(ISOLAB, Almanya, Ürün Kodu: 081.02.091) tek koloni düşürme tekniği [70,71] ile inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. 28°C’de 3-5 gün boyunca inkübasyonun ardından besiyerinde saf koloni gelişimi gözlemlendiğinde, elde edilen kültürler +4°C’de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır.

Ayrıca Çizelge 3.1’de yer alan *S. cerevisiae* suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojilerinin tanımlaması da yapılmıştır [70]. Bu doğrultuda YPD Agar (Agar, 15 g/L Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu:Y1500) katı besiyerinde saf koloni gelişimi gözlenen suşların makroskobik morfolojileri tespit edilmiştir. Mikroskobik morfolojilerinin tanımlanması amacıyla Löffler metilen mavisi çözeltisi kullanılarak basit boyama yapılmıştır [70]. Basit boyama ile hazırlanan preparatlar basit ışık mikroskopunda (Olympus LS, Japonya, Ürün kodu: CX21) görüntülenerek suşların mikroskobik morfolojileri tespit edilmiştir.

Canlandırılan, makroskobik ve mikroskobik morfolojileri doğrulanan 18 adet suştan, önceki çalışmada [72] teknolojik özellikleri (alkol üretimi, köpük oluşumu, pH ve sıcaklık değişimi) incelenen HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 izolasyon kodlu 3 adet *S. cerevisiae* suşu ile *S. cerevisiae* MERIT™ ve *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşları çalışmanın devamında kullanılmak üzere kontrol olarak seçilmiştir.

3.2.2. *S. cerevisiae* ATCC 9763 Suşu Hücre Gelişim Profilinin Belirlenmesi

Çalışmada *S. cerevisiae* suşları kullanılarak mikrobiyal protein üretimi hedefi doğrultusunda gerçekleştirilecek fermantasyonlar için temel bir hücre gelişim profili çıkarılması amacıyla, öncelikle kontrol olarak belirlenen *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu ile çalışılmıştır.

Çalışma doğrultusunda fermantasyonda kullanılacak inokulumun hazırlanması için 9763 kodlu suşa ait katı besiyerindeki kültürden öze ile örnek alınarak 10 mL YPD Broth besiyerinde (Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu: Y1375) 28 °C’de 24 saat boyunca etüvde (Memmert,

Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre konsantrasyonunun ölçülmesi amacıyla tek kullanımlık spektrofotometrik küvetler (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 098.02.002) ile UV-Vis spektrofotometrede (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, ABD) OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır [70,73]. Elde edilen absorbans değerleri, oluşturulan standart eğri denkleminde yerine konularak hücre konsantrasyonu “log (CFU/mL)” cinsinden hesaplanmıştır. Kullanılan standart eğri denklemi aşağıda yer almaktadır:

$$y=0,0949x-0,0068 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

y= 600 nm'deki absorbans değeri (A)

x= Log cinsinden hücre konsantrasyonu (CFU/mL)

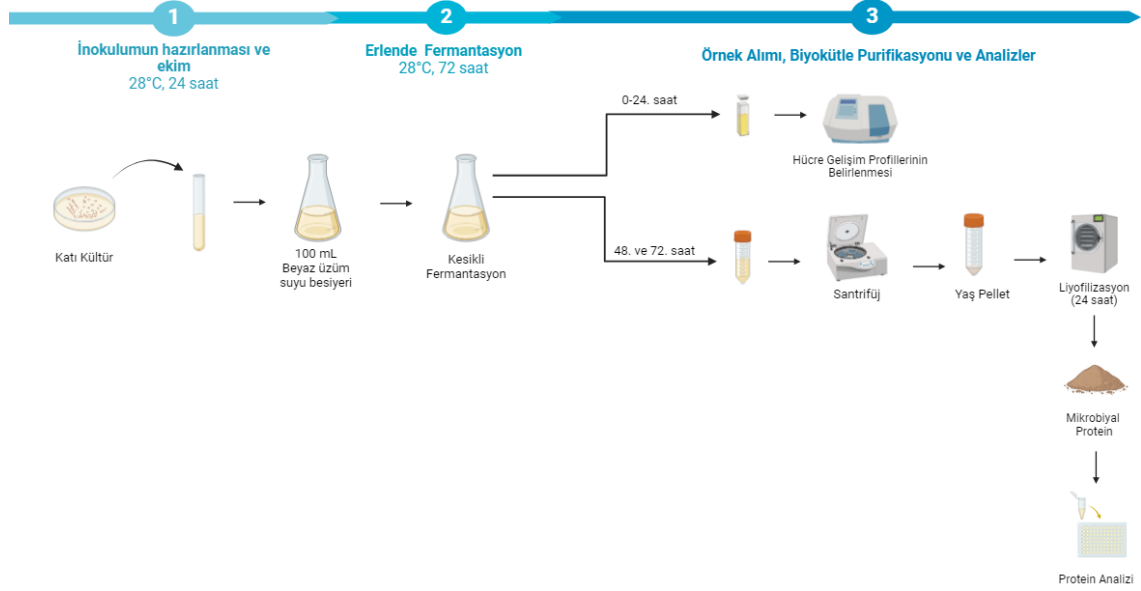
Fermantasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan inokulum ($\sim 10^{11}$ CFU/mL) 100 mL steril YPD Broth (Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu: Y1375) besiyerine (pH 6,5) aseptik koşullar altında ilave edilmiştir. Erlenler ağzları kapatılarak etüvde (Memmert, Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) 28°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Çalışmada 9763 kodlu suşun hücre gelişim profilinin çıkarılması için 0-24 saat aralığında her 2 saatte bir iki teknik tekrarlı olacak şekilde örnek alımı gerçekleştirilerek OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır [73]. Zamana karşılık ölçülen optik dansite değerleri (OD₆₀₀) eşleştirilerek hücre gelişim eğrisi elde edilmiştir.

3.2.3. Seçilen *S. cerevisiae* Suşlarının Beyaz Üzüm Suyu Besiyerinde Hücre Gelişim Profillerinin ve Üretilen Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu *S. cerevisiae* suşları ile YPD Broth yerine pastörize Beyaz Üzüm Suyu (Kavaklıdere Şarapları A.Ş., Ankara), besiyeri olarak kullanılarak fermantasyon gerçekleştirilmesi ve suşların bu ortamda hücre gelişim profillerinin ve protein üretme miktarlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Fermantasyonda kontrol olarak *S. cerevisiae*

ATCC 9763 ve MERIT™ (Chr. Hansen) suşları kullanılmıştır. Bu aşamada gerçekleştirilen deneysel çalışmalara dair iş akış diyagramı Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3. 1. Beyaz Üzüm Suyu besiyerinde 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu *S. cerevisiae* suşlarına hücre gelişim profillerinin ve üretilen protein miktarlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait iş akış diyagramı.

Beyaz üzüm suyu kompozisyonunun, *S. cerevisiae* ATCC 9763 kontrol suşu ile çalışılan YPD Broth besiyerine uyumluluğunun sağlanması için protein kaynağı olarak maya ekstraktı tozu (Yeast Extract Powder, LAB M™, Birleşik Krallık, Ürün kodu: Ürün kodu: Q27344/210) ilavesi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3). Bunun için 100 mL Beyaz Üzüm Suyu'na, 1 gram maya ekstraktı tozu eklenerek karışım 121°C'de 15 dakika boyunca sterilize edilmiştir.

Çizelge 3. 3. *S. cerevisiae* suşlarının kültivasyonunda kullanılan Beyaz Üzüm Suyu besiyeri (pH 3,3) kompozisyonu.

Bileşenler	Miktar (gr/100 mL)
Yağ	0,20
Karbonhidrat	16,30
Maya Ekstraktı Tozu	1,00
Protein	0,30
Lif	0,10
Şekerler	16,00

Fermantasyonda inokulumların hazırlanması için 9763, MERIT™ ,HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu *S. cerevisiae* suşlarına ait katı besiyerindeki kültürlerden alınarak ayrı ayrı 10 mL steril Beyaz Üzüm Suyu besiyerine ilave edilmiş ve 28°C’de 24 saat boyunca etüvde (Memmert, Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre konsantrasyonunun ölçülmesi amacıyla tek kullanımlık spektrofotometrik küvetler (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 098.02.002) ile UV-Vis spektrofotometrede (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, ABD) OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır [70,73]. Elde edilen absorbans değerleri, Denklem 3.1’de yer alan formülde yerine konularak hücre konsantrasyonu “log (CFU/mL)” cinsinden hesaplanmıştır.

Hazırlanan inokulumlar (~10¹¹ CFU/mL) aseptik koşullar altında 100 mL steril Beyaz Üzüm Suyu besiyerlerine (Çizelge 3.3) ilave edilmiştir. Erlenlerin ağızları kapatılarak 28°C’de 72 saat boyunca etüvde (Memmert, Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) inkübasyonları gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyonda ilk olarak suşlara ait hücre gelişim profillerinin çıkarılması ve kinetik parametrelerin hesaplanması amacıyla 0-24 saat aralığında örnek alınarak OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri Denklem 3.1’de verilen formülde yerine

konularak hücre konsantrasyonu değerleri “log (CFU/mL)” cinsinden belirlenmiştir. Ardından zamana karşılık hücre konsantrasyonu grafikleri çizilerek suşlara ait gelişim eğrileri elde edilmiştir. Suşlara ait elde edilen gelişim eğrileri kullanılarak Denklem 3.2’de yer alan eksponansiyel gelişim modeli kullanılarak suşlara ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. Bu doğrultuda maksimum spesifik üreme hızı (μ_{max} , saat⁻¹), jenerasyon süresi (saat) hesaplanmış ve lag süresi (saat) belirlenmiştir [74].

$$N = N_0 \times \exp (\mu_{max} \times t) \quad (\text{Denklem 3.2})$$

μ : Spesifik üreme hızı (saat⁻¹)

N: Hücre konsantrasyonu (CFU/mL)

N₀: Başlangıç Hücre konsantrasyonu (CFU/mL)

t: Zaman (saat)

Fermantasyonda suşlara ait biyokütle verimleri (mg/mL) ve üretilen protein miktarlarının (%w/w) analizi için 48. ve 72. saatlerde analizler için 50 mL hacimli santrifüj tüpleri (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.02.008) kullanılarak 15 mL hacimde örnekler alınmıştır [75]. Bu örneklerden biyokütle verimi ve üretilen protein miktarının analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için biyokütle purifikasyonu işlemi uygulanmıştır. Bu doğrultuda örnekler 6.000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek (Nüve, Ankara/Türkiye, NF-800) steril saf su ile 2 defa yıkanmıştır [76]. İşlemin ardından elde edilen yaş biyokütlelere, 24 saat boyunca liyofilizatör (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Almanya) kullanarak kurutma işlemi uygulanmıştır [75]. Kurutma işlemi sonucunda elde edilen örneklerden biyokütle verimleri (mg/mL) hesaplanmıştır.

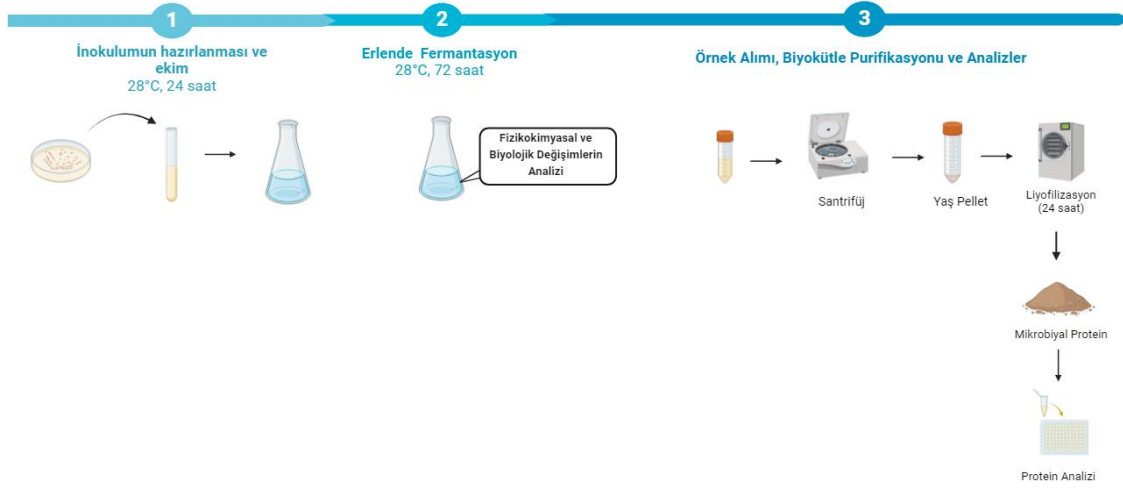
Liyofilize edilmiş biyokütlelerde protein miktarlarının belirlenmesi için Bradford protein analizi [77,78] uygulanmıştır. Bradford ajanının hazırlanmasında Coomassie Brilliant Blue G-250 (BostonChem, ABD, Ürün kodu: BBM-802205), %95’lik etanol (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 920.026.2500) ve %85’lik fosforik asit (Merck, Almanya, Ürün Kodu: 1.00573.2500) kimyasalları kullanılarak, analiz öncesi ajan Whatman No 1 filtreden (Whatman International Ltd., Birleşik Krallık) geçirilmiştir. Analiz için 1

mg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: A2153) çözeltisi kullanılarak saf suda 0 ila 1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltiler ile dilüsyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan dilüsyonlardan 50 µL alınıp üzerlerine 250 µL Bradford ajanı ilave edilmiştir. On dakika inkübasyonun ardından 96 kuyulu steril hücre kültürü petripleri (Greiner Bio-one, Avusturya, Ürün kodu: 650160) ile mikropłaka okuyucuda (BMG Labtech Spectrostar Nano Microplate Reader, Ortenberg/Almanya) 595 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Analiz edilen dilüsyonlardaki BSA konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans ölçümleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (EK 1.1).

Örnekler için dilüsyonlar standart eğri oluşturma yöntemi ile aynı oranda olmak üzere, 50 µL alınıp üzerlerine 250 µL Bradford ajanı ilave edilerek absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri EK 1.1’de verilen kalibrasyon eğrisinde yerine konularak protein miktarları hesaplanmıştır. Tüm ölçümler iki biyolojik ve iki teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Bazal Besiyerlerinde *S. cerevisiae* ATCC 9763 Suşu ile Fermantasyon

Çalışmada Bölüm 3.2.3’te elde edilen biyokütle verimi ve üretilen protein miktarları sonuçları doğrultusunda seçilen *S. cerevisiae* suşları ile biyoproses uygulanarak fermantasyonla mikrobiyal protein üretimi amacıyla, besiyeri olarak meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş meyve posalarının kullanılması planlanmıştır. Bu doğrultuda besiyerine eklenecek yaş meyve posası ve ilave bileşenlerin miktarının belirlenmesi için literatürde *S.cerevisiae* gelişimi ve mikrobiyal protein üretimi amacıyla kullanılan Bazal besiyeri [16] kompozisyonunda (D-Glucose 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, NaCl 0,1 g/L, CaCl₂ 0,1 g/L) belirli modifikasyonlar yapılarak Bazal I ve Bazal II (Çizelge 4.4) olmak üzere 2 adet besiyeri formülasyonu oluşturulmuştur. Ve besiyerlerinde kontrol olarak seçilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu ile çalışılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Bazal I ve Bazal II besiyerlerinde 9763 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile gerçekleştirilen fermantasyona ait iş akış deseni.

Bazal I ve Bazal II besiyerleri Çizelge 4.4'te yer alan bileşenleri uygun konsantrasyonlarda içerecek şekilde toplam 200 mL hacimde olarak hazırlanmıştır. Besiyerleri hazırlanırken indirgen şekerler ve fosfatlar ile amonyum sülfat ve metal tuzları ayrı steril edilmiştir (121°C'de 15 dakika). Böylelikle Maillard reaksiyonu ile oluşabilecek kayıpların ve metal tuzu çökmelerinin önüne geçilmesi hedeflenmiştir [79]. Sterilizasyonun ardından besiyerlerinin pH'sı 1 N NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: 1.06498.1000) ve 1 N HCl (Hidroklorik Asit, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: 1.00314.2500) kullanılarak 5,5'e ayarlanmıştır [16].

İnokulumun hazırlanmasında 9763 kodlu *S. cerevisiae* suşuna ait katı besiyerindeki kültürden alınarak 10 mL YPD Broth besiyerine (Bacteriological peptone, 20 g/L Glucose, 20 g/L Yeast extract, 10 g/L; Sigma-Aldrich, ABD, Ürün Kodu: Y1375) inoküle edilmiştir. İnokülasyonun ardından sıvı besiyerleri 28 °C'de 24 saat boyunca etüvde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda hücre konsantrasyonunun ölçülmesi amacıyla tek kullanımlık spektrofotometrik küvetler (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 098.02.002) ile UV-Vis spektrofotometrede (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, ABD) OD₆₀₀ ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri Denklem 3.1'de verilen formülde yerine konularak hücre konsantrasyonu “log (CFU/mL)” cinsinden hesaplanmıştır. Ardından maya hücrelerini içeren YPD Broth besiyerleri 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir [80]. Santrifüjle besiyeri kalıntıları

uzaklaştırmak amacıyla NaCl (Merck, Almanya, Ürün kodu: 1.06404.1000) kullanılarak hazırlanan %0,9 (w/v) konsantrasyonda çözelti ile santrifüj ardından elde edilen yaş pelletler iki defa yıkanmıştır [80]. Yıkama sonucunda 200 mL steril Bazal I ve Bazal II besiyerlerine aseptik koşullar altında inokulum ($\sim 10^{11}$ CFU/mL) ilave edilmiştir. Bazal I ve Bazal II besiyerlerini içeren erlenler ağızları kapatılarak 28°C'de 72 saat boyunca etüvde (Meymert, Almanya, Ürün Kodu: DIN 12880-KL) inkübe edilmiştir.

Fermantasyon boyunca 0, 24, 48 ve 72. saatlerde 50 mL hacimli steril santrifüj tüpleri (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.02.008) kullanılarak 15 mL hacimde örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde fermantasyon takibinin gerçekleştirilmesi için fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik değişimler (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) incelenmiştir [16,75,81].

Besiyerlerinde fermantasyon sırasında pH değişiminin ölçümü için el pH metresi (Adwa Instrument AD14, Bulgaristan) kullanılmıştır. Hücre sayısı (CFU/mL) takibi için yüzeye yayma yöntemi kullanılarak mikroorganizma sayımı yapılmıştır [70].

Alınan örneklerde biyokütle verimi ve üretilen protein miktarının belirlenmesi için biyokütle purifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda örnekler 6.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek (Nüve, Ankara/Türkiye, NF-800) steril saf su ile 2 defa yıkanmıştır [76]. Ardından elde edilen yaş biyokütellere 24 saat boyunca liyofilizatör (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Almanya) kullanarak kurutma işlemi uygulanmıştır [75]. Kuru biyoküteller hassas tartıda tartılarak (Radwag, Polonya, WTC200) biyokütle verimleri (mg/mL) hesaplanmıştır. Üretilen protein miktarının takibi için liyofilize edilmiş biyokütellere Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi Bradford protein analizi uygulanmıştır [77,78].

3.2.5. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Analizi

Meyve suyu endüstrisi atıklarından olan elma, armut, nar, şeftali, kayısı, çilek ve siyah havuç yaş posalarının kuru madde-nem, kül, protein, ham lif ve indirgen şeker analizleri gerçekleştirilmiştir. Kül, protein ve ham lif analizleri özel bir gıda kontrol laboratuvarında

gerçekleştirilmiştir. İndirgen şeker analizi Erzincan'da bulunan Tunay Gıda işletmesinin ArGe laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Kuru madde ve Nem Tayini

Analizin gerçekleştirilmesi için öncelikle deneyde kullanılacak kurutma kapları kapakları ile beraber etüvde (Binder GmbH, Almanya, ED115) 105°C'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur [82]. Ardından kaplar desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelene kadar soğutulup hassas tartıda (Radwag, Polonya, WTB 200) tartılmış, kurutma kabının darası alınmıştır (m_1). Yaş posalardan 3'er gram alınarak kurutma kaplarına homojen bir şekilde yayılmıştır. Ardından kurutma kabının kapağı kapatılarak tartılmıştır (m_2). İçerisinde örnek bulunan kurutma kapları kapaklar açık olacak şekilde 105°C'ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur. Kurutma sonunda, kurutma kabının kapağı kapatılarak desikatöre konulmuş ve içerisinde örnek bulunan kaplar oda sıcaklığına geldikten sonra tartılmıştır (m_3). İşlem sabit tartım alınıncaya kadar tekrarlanmıştır. Her örnekten iki paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Deney sonunda yüzde nem ve kuru madde miktarı aşağıdaki denklemler kullanarak hesaplanmıştır.

$$\% Nem = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.3})$$

$$\% Kurumadde = 100 - \% Nem \quad (\text{Denklem 3.4})$$

m_1 : Sabit tartıma getirilmiş boş kurutma kabı ve kapağının ağırlığı (g)

m_2 : Analiz örneği, kurutma kabı ve kapağının kurutma işlemi öncesi ağırlığı (g)

m_3 : İçerisinde analiz örneği bulunan kurutma kabı ve kapağının kurutma işleminden sonraki ağırlığı (g)

Toplam Kül Tayini

Yaş posalara ait örneklerde toplam kül tayininin gerçekleştirilmesi için kuru madde analizi gerçekleştirilmiş örnekler kullanılmıştır. Kül tayininde kullanılacak krozeler (ISOLAB, Almanya) sabit tartıma getirilerek hassas tartıda (Radwag, Polonya, WTB 200) darası alınmıştır (m_{dara}). Kuru maddesi önceden saptanmış örneklerden 25 g alınarak krozeyle beraber tartım yapılmıştır (m_1). Ardından kroze kül fırınına konarak beyaz renk bir kül elde edinceye kadar yakma işlemi uygulanmıştır. Yakma işleminin sonunda krozeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına soğutulup tartılmıştır (m_2). Aşağıda verilen denklem kullanılarak örneklerdeki %Kül miktarı hesaplanmıştır [83].

$$\% \text{Kül} = \frac{m_2 - m_{\text{dara}}}{m_1 - m_{\text{dara}}} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.5})$$

m_{dara} : Sabit tartıma getirilmiş krozenin ağırlığı (g)

m_1 : Analiz örneği ve krozenin işlem öncesi ağırlığı (g)

m_2 : Analiz örneği ve krozenin işlem sonrası ağırlığı (g)

Toplam İndirgen Şeker Miktarı

Posalarda indirgen şeker analizi için Jin ve arkadaşları (2019) tarafından uygulanan sıcak su ile ekstraksiyon yöntemi temel alınarak modifikasyonlarla kullanılmıştır [84]. Bunun için 1 g yaş meyve posası üzerine 10 mL ultra saf su ilave edildikten sonra vortekslenip ardından şeker ekstraksiyonu için solüsyon 121°C, 15 dakika normlarında otoklavlanmıştır (Nüve, Ankara/Türkiye, OT 23S). Otoklavlanan karışım, 5.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 200). Santrifüj ardından elde edilen süpernatant, posalardaki indirgen şeker içeriğinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır.

İndirgen şekerlerin analizi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi sistemi (Shimadzu, UFLC, Japonya) ile Refraktif İndeks Dedektörü (Shimadzu, RID-10A, Japonya) kullanılmıştır. Sistemde degasser ünitesi (Shimadzu, DGU-20A5R, Japonya),

pompa (Shimadzu, LC-20AD, Japonya), autosampler (Shimadzu, SIL-20A HT, Japonya) ve CarboSep CHO 87C, 7.8x300 mm kolonu bulunmaktadır.

Sıcak su ekstraksiyonu uygulanan örneklerden elde edilen süpernatantlar, öncelikle 0.45 µm şırınga filtreden (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün kodu: SAMP2HNNB) geçirilip 1 mL alınarak cam viallere (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 0.95.00.001.100) aktararak HPLC-RID sisteminde analiz yapılmıştır. Kolonda mobil faz olarak ultra saf su (0.6 ml/dk akış hızı) kullanılmıştır ve kolon sıcaklığı 80°C'dir. Analizde enjeksiyon hacmi 10 µL olmakla beraber analiz süresi 30 dakikadır. Örnekler üç paralel olacak şekilde analiz edilmiştir.

Analizde dış standart olarak D-glukoz, D-fruktoz, D-sorbitol ve sükroz stok çözeltileri kullanılmıştır. Stok çözeltiler sırasıyla 2,85, 2,62, 2,72 ve 3,01 g tartılarak 250 mL ultra saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır. Ardından stok şeker çözeltileri kullanılarak ultra saf su ile 0,119-10,887 g/L konsantrasyon aralığında solüsyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Hazırlanan solüsyonların HPLC-RID sisteminde analizi sonucu elde edilen pik alanları ile standart konsantrasyonları kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (EK 1.7).

Çizelge 3. 4. Yaş meyve posalarında indirgen şeker analizinde kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılan standart solüsyon konsantrasyonları.

Dış Standart Konsantrasyonu (g/L)				
Dilüsyon No	Sükroz	D-Glukoz	D-Fruktoz	D-Sorbitol
1	0,570	1,039	0,544	0,119
2	1,140	2,079	1,089	0,298
3	2,280	4,157	2,177	0,596
4	3,421	5,197	3,266	1,192
5	4,561	6,236	4,355	1,788
6	5,701	7,275	5,443	2,980
7	6,841	8,314	6,532	3,576
8			7,621	
9			8,709	
10			10,887	

Protein Analizi

Örneklerde Kjeldahl Protein tayini ile analiz gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 5 gram örnekle beraber potasyum sülfat, bakır sülfat ve konsantre sülfirik asit eklendikten sonra yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işleminin ardından %40'lık NaOH ilave edilerek destilasyon aşamasına geçilmiş ve oluşan amonyak borik asit çözeltisi içerisinde tutulmuştur. Ardından 0,1 N HCl kullanılarak destilat titre edilmiştir. Harcanan HCl miktarı kaydedilerek %Azot miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplama faktör (F) olarak 6,25 kullanılarak örneklerdeki %protein miktarı tespit edilmiştir [83].

$$\% \text{Azot} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0.014}{m} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.6})$$

$$\% \text{Protein} = \% \text{Azot} \times F \quad (\text{Denklem 3.7})$$

V₁: Titrasyonda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

V₀: Kör deneme titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

N: Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0.1 N)

m: Alınan örnek miktarı (g)

Ham Lif Analizi

Örneklerde ham lif analizi için 2 gram örnek tartılmıştır. Ardından örnek 0.255 N'deki H₂SO₄ içeren balonda 30 dakika boyunca kaynatılmıştır. Ardından solüsyon filtre kağıdından süzülerek sıcak saf su ile yıkanmıştır. Örnek üzerine 0.313 N NaOH solüsyonu eklenerek 30 dakika boyunca kaynatılmıştır. Kaynatmanın sonucunda filtra kağıdından süzülen örnek öncelikle saf su ile ardından etil alkol ve eter ile yıkanmıştır. Süzgeç kağıdındaki kalıntılar darası önceden bilinen kroze alınmıştır. Ardından kroze etüvde 130°C'de 2 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen kurutulmuş örnek desikatöre alınıp soğutulduktan sonra tartılmıştır (m₁). Ardından kroze kül fırınında 550°C'de 2 saat boyunca yakılmıştır. Desikatöre alınıp oda sıcaklığına soğutulan küllendirilmiş örnek içeren kroze tartılmıştır (m₂). Örneklerdeki %ham lif oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır [83].

$$\% \text{ Ham Lif} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.8})$$

m₁: Ham lif içeren krozenin kurutma işleminden sonraki ağırlığı

m₂: Ham lif ve kül içeren krozenin yakma işleminden sonraki ağırlığı

m: Analizde kullanılan örnek ağırlığı

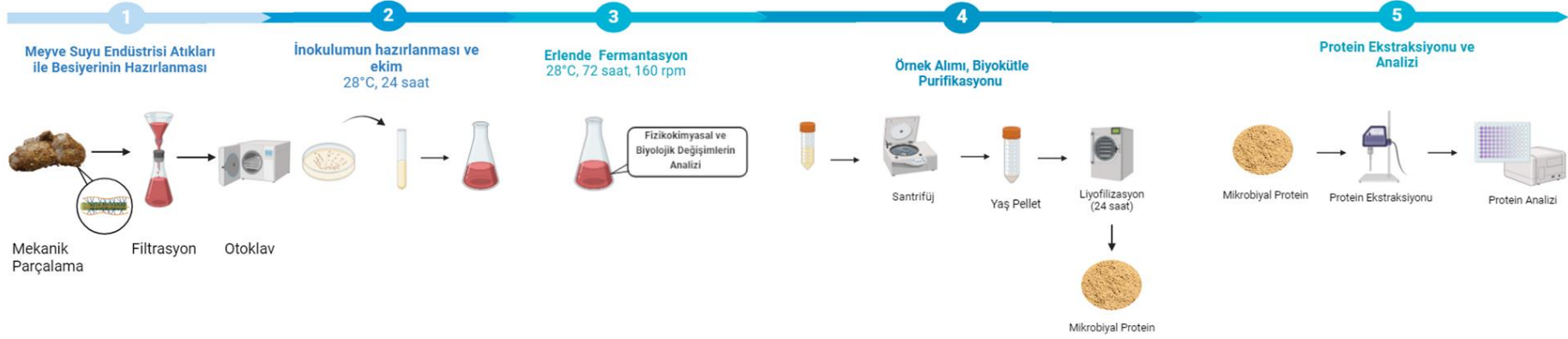
3.2.6. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları ile Besiyeri Formülasyonunun Oluşturulması

Çalışmada biyoproses uygulanarak fermantasyonla mikrobiyal protein üretimi amacıyla besiyeri olarak meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş meyve posalarının kullanılması planlanmıştır. Bu doğrultuda besiyerinin hazırlanmasında kullanılacak yaş posaların seçiminde Bölüm 3.2.5’de gerçekleştirilen indirgen şeker analiz sonuçları göz önünde bulundurulmuştur. Bununla beraber meyve suyu üretim prosesindeki hasat takvimi incelenerek aynı dönemde işlenen meyvelerden elde edilen yaş posalardan karışımlar oluşturulmuştur. Böylelikle eş zamanlı bir şekilde atık değerlendirmenin sağlanması hedeflenmiştir. Her bir karışımdaki posa çeşidine ait % (w/w) konsantrasyon belirlenirken yine Bölüm 3.2.5’te gerçekleştirilen indirgen şeker analiz sonuçları kullanılmıştır. Bu sayede fermantasyonda besiyeri hazırlanmasında kullanılacak yaş posa çeşitleri ve oluşturulacak karışımlardaki posa oranları belirlenmiştir.

Besiyerine eklenecek yaş meyve posası ve ilave bileşenlerin miktarları Bölüm 3.2.4’de Bazal besiyerleri ile gerçekleştirilen analizler sonucunda belirlenmiştir. Buna göre fermantasyonda en yüksek hücre gelişimi, biyokütle verimi ve protein üretimi gözlenen Bazal besiyeri formülasyonu temel olarak seçilmiştir. Ardından formülasyonda yer alan indirgen şeker konsantrasyonlarını karşılayacak oranda besiyerine eklenmesi gereken yaş posa miktarları hesaplanmıştır.

3.2.7. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları Kullanılarak Oluşturulan Besiyerlerinde Fermantasyon

Çalışmada biyoproses uygulanarak *S. cerevisiae* suşları ile fermantasyonla meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş meyve posalarının substrat olarak kullanılması ve mikrobiyal protein üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Meyve suyu endüstrisi atıklarından oluşturulan elma-armut (%50-%50, w/w), kayısı-çilek (%70-%30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-%50, w/w) besiyerlerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar ile gerçekleştirilen fermentasyona ait genel iş akış deseni.

Prosesin ilk aşamasında Bölüm 3.2.6'da meyve suyu endüstrisi atıklarından olan yaş posalar kullanılarak oluşturulan formülasyon (Çizelge 4.8) temel alınmıştır. Bu doğrultuda elma-armut (%50-%50, w/w), kayısı-çilek (%70-%30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-%50, w/w) posaları ile 500 mL hacimde çalışılmıştır. Çizelge 4.8'de konsantrasyonlara uyacak şekilde yaş posalar hassas tartı ile tartılmıştır (Radwag, Polonya, WTC200). Ardından posalara 500 mL saf su eklenmiştir. Lignoselülozik içeriğin degradasyonu amacıyla 5 dakika boyunca mekanik parçalama işlemi uygulanmıştır (Waring, 8011 EB Set 1 Blender Commercial, ABD). Daha sonra yaş posa-saf su karışımları 1.5 mm çaplı 14 no'lu filtreden geçirilerek kaba filtrasyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen 500 mL süzüntü erlenlere aktararak sterilizasyon gerçekleştirilmiştir (121°C 15 dakika).

Fermantasyonda kullanılacak 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlara ait inokulumlar Bölüm 3.2.4'te bahsedildiği gibi besiyerindeki inokulum konsantrasyonu %2 olacak şekilde hazırlanmıştır. İnokülasyonun ardından besiyerlerini içeren erlenler ağızları kapatılarak çalkalamalı inkübatörde 160 rpm'de (Bioevopeak ICB-S200B, Çin) 28°C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Fermantasyon boyunca 0, 24, 48 ve 72. saatlerde 50 mL hacimli steril santrifüj tüpleri (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.02.008) kullanılarak 15 mL örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde fermantasyon takibinin gerçekleştirilmesi için fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik değişimler (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) incelenmiştir. Fermantasyonda hücre konsantrasyonunun (CFU/mL) izlenmesi için yüzeye yayma yöntemi kullanılarak mikroorganizma sayımı yapılmıştır [70]. Besiyerinde pH değişimi Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde izlenmiştir.

Alınan örneklerde biyokütle verimlerinin ve protein miktarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi biyokütle purifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerde protein miktarlarının belirlenmesi için öncelikle örneklerden ayrı ayrı protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Protein ekstraksiyonu için uygulanan metotta Maehre (2018) ve Mellinas (2022) ile arkadaşlarına ait protokoller birleştirilerek kullanılmıştır [85,86]. Bu doğrultuda 0,5 gr örnek tartılarak 15 mL hacimdeki santrifüj tüpleri içerisine (StarLab GmbH, Almanya, Ürün kodu: E1415-0200) alınmıştır. Örnek üzerine NaCl (Merck, Almanya, Ürün kodu: 1.06404.1000) ve NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: 1.06498.1000) kimyasalları kullanılarak hazırlanan 30 mL %3,5 NaCl içerisinde 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir. Ardından örnekler ultrasonik homojenizatör (JY92-IIN Ultrasonic Homogenizer, Çin) ile 6 dakika boyunca ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır (98.6 W, 100% genlik, 6.48 W/cm²). Elde edilen ekstrakt su banyosunda (Nüve, Ankara/Türkiye, Ürün kodu: NB-20) 60°C'de 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından 4000 g'de 4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj (Sigma, İngiltere, Ürün kodu: 3-18K) işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant protein miktarı tayinine kadar -20°C'de saklanmıştır.

Protein analizinde BCA (Bicinchoninic Acid Assay) Protein Analizi [87] yöntemi kullanılmıştır. BCA Reagent A (Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: B0643) ve CuSO₄ (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 911.026.1000) kimyasalı ile hazırlanan BCA Reagent B 50:1 oranda karıştırılarak analiz için gerekli BCA ajanı hazırlanmıştır. Analizde öncelikle BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, ABD, Ürün kodu: A2153) %3,5 NaCl içerisinde 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 0 ila 1 mg/mL konsantrasyonlarında dilüsyonlar oluşturulmuştur. Ölçüm için 96 kuyulu steril hücre kültürü petrilere (Greiner Bio-one, Avusturya, Ürün kodu: 650160) oluşturulan dilüsyonlara 1:8 oranında BCA ajanı ilave edilmiştir. Steril hücre kültürü petrisi 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikropłaka okuyucuda (BMG Labtech Spectrostar Nano Microplate Reader, Ortenberg/Almanya) 562 nm'de absorbans ölçümü alınmıştır. Dilüsyon konsantrasyonlarına karşılık absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (EK 1.2)

Örneklerde protein ekstraksiyonu sonucu elde edilen süpernatantlardan benzer oranlarda dilüsyonlar yapılarak, 96 kuyulu steril hücre kültürü petrilerine (Greiner Bio-one, Avusturya, Ürün kodu: 650160) 1:8 oranında BCA ajanı ilave edilmiştir. Ardından 37°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonucunda mikropłaka okuyucuda (BMG Labtech Spectrostar Nano Microplate Reader, Ortenberg/Almanya) 562 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Elde edilen absorbans değerleri EK 1.2’de yer alan kalibrasyon eğrisinde yerine konularak örneklerdeki protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.8. Üretilen Mikrobiyal Proteinin Analiz Edilmesi

Bölüm 3.2.7’de meyve suyu endüstrisi atıklarından olan yaş posalar ile 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda en yüksek protein üretimine ve biyokütle verimine sahip olan besiyeri tipi ve suş seçimi gerçekleştirilerek, bu doğrultuda elde edilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde kuru madde ve nem, primer metabolit ve nükleik asit (DNA) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. Kuru madde ve Nem Analizi

Örneklerin %nem içeriğinin belirlenmesinde infrared lamba ısıtma sistemli nem tayin cihazı kullanılmıştır (OHAUS MB200, ABD). Darası alınan alüminyum kaplara örneklerden yaklaşık 0,5 gram tartılmıştır. Cihaz 105°C’ye ayarlanmıştır [88]. Cihaz ekranında yüzde nem değeri sabitlendiğinde kurutma işlemi sonlandırılarak sonuç kaydedilmiştir. Denklem 3.4’de verilen formül kullanılarak %kuru madde değerleri hesaplanmıştır.

3.2.8.2. Primer Metabolit Analizi

Üretilen toz formundaki mikrobiyal proteinde birincil metabolitlerin tespit edilmesi amacıyla Gaz Kromatografisi ve Kütle Spektrofotometresi (GC-MS) kullanılmıştır. Birincil metabolitlerin ekstraksiyonu ve derivatizasyonunda Hançerlioğulları ve arkadaşları (2023) tarafından uygulanan metot izlenmiştir [89]. Analizde örnekler 1,5 mL hacimli mikrosantrifüj tüplerine (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.03.021) ve

amber renkli GC viallerine (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 095.00.002.100) konulmuştur. Analizde kimyasal olarak %100 metanol (Supelco, ABD, Ürün kodu: 1.06007.2500), ribitol (Bostonchem, , ABD, Ürün kodu: BAM-800264) kromatografi için su (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 1.15333.2500), piridin (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün kodu: 270970), metoksiamin hidroklorür (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün kodu: 89803), N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün kodu: 69479) kullanılmıştır. Örneklerin karıştırılmasında vorteks (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya) ve çalkalayıcı inkübatör (Bioevopeak ICB-S200B, Çin) kullanılmıştır. Ultrasonifikasyon işlemi için ultrasonik banyo (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 621.05.001) süpernatant eldesi için +4°C'de çalışan santrifüj (Sigma, İngiltere, Ürün kodu: 3-18K) kullanılmıştır.

Analiz için 100 mg öğütülmüş 1,5 mL hacimli mikrosantrifüj tartılmıştır. Üzerine 800 µL %100 metanol, 100 µL iç standart ribitol (1 mg/mL) ve 100 µL kromatografi için su eklenmiştir. Ardından tüp 1 dk süreyle vortekslenmiştir. Ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi için örnekler 60 dakika boyunca 35°C'de ultrasonik banyoda muamele edilmiştir. Bu süreçte her 10 dakikada bir vorteks yapılmıştır. Elde edilen karışım 10.000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Kalan pellet üzerine 800 µL %100 metanol ve 200 µL kromatografi için su eklenmiştir. Ardından tüp tekrar 1 dakika vortekslenmiştir. Tüpler tekrar ultrasonik banyoda muamele edilip, santrifüjlenmiştir. Süpernatant bir önceki işlem sonucu elde edilen süpernatant ile 1 dakika boyunca vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Karışım 10.000 xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından 1 mL sıvı süpernatant 1,5 mL amber renkli GC vialine alınarak azot gazı (Yüksek Safılıkta Azot Gazı, Hat Grup, Ankara, Türkiye) akışı altında kurutulmuştur. Kurutulan örnek derivatizasyon işlemi için 200 µL piridin içerisinde çözünen metoksiamin hidroklorür (20 mg/mL) içinde çözülmüştür. Ardından örnekler 37°C'de 90 dakika boyunca 400 rpm'de çalkalanmıştır. Çalkalama işleminin sonunda örnek üzerine 200 µL N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid eklendikten sonra tekrar 90 dk 37°C'de 400 rpm çalkalamayla inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözelti analizden önce -20°C'de saklanmıştır.

GC-MS analizleri için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'nde bulunan Agilent 7890B GC/ 5977A Series MSD Systems cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizde Agilent 122-5532G DB-5MS+DG 30 m x 250 µm x 0.25 µm kolonu kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 0.5 µl ve split oranı 50:1 olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olan helyum ile 1 mL/dk akış hızında örnekler sisteme enjekte edilmiştir. Çözücü gecikmesi (solvent delay) 2 dk olup; fırın sıcaklığı başlangıçta 80 °C'de 1 dk ayarlanmış ve 5°C/dk sıcaklık artış hızıyla 290 °C'ye çıktıktan sonra 7 dk 290°C'de kalacak şekilde programlanmıştır. Kütle aralığı 10-600 (amu) değerleri arasında ayarlanmıştır. Süreç boyunca tüm örnekler iki biyolojik ve iki teknik tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir.

Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar ve piklere ait spektrumlar Enhanced Data Analysis (Agilent J&W Scientific, ABD) programında incelenmiştir. Piklerin tanımlanması Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) MS Search 2.4 ve Wiley W10N14 (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, ABD) kütüphanelerindeki spektrum verileri karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Metabolitlere ait kantitatif değerlendirmede tek bir iç standart pikine dayalı yarı kantifikasyon tekniği uygulanmıştır. Tanımlanan metabolitlerin miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$Q = \frac{A_{\text{metabolit}}}{A_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_{\text{materyal}}} \quad (\text{Denklem 3.9})$$

Q: Metabolit miktarı

$A_{\text{metabolit}}$: Metabolitin pik alanı

A_{IS} : İç standartın pik alanı

M_{IS} : İç standartın kütlesi (mg)

M_{materyal} : Örneğin kütlesi (mg)

3.2.8.3. Nükleik Asit (DNA) Analizi

Son üründe nükleik asit miktarının belirlenmesi için üründeki DNA miktarı analiz edilmiştir. DNA miktarı analizi EURX markasına ait GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Polonya, ürün kodu: E3580) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Analizde 2 mL hacimdeki mikrosantrifüj tüplerinde (ISOLAB, Almanya, Ürün kodu: 078.03.023) gerçekleştirilmiştir. DNA lizisi için β -mercaptoethanol (Sigma Aldrich, ABD) ve Lyticase (Sigma-Aldrich, ABD, Ürün No: SAE0098-20KU) kullanılmıştır. İnkübasyonlar kuru inkübatörde (Major Science Co., Ltd, Taoyuan City/Tayvan, MD-01N) gerçekleştirilmiştir. Analizde süpernatant eldesi için santrifüj (Nüve, Ankara/Türkiye, NF-800) ve belirli yerlerde karıştırma için vorteks (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya) kullanılmıştır.

DNA'nın lize edilmesi için öncelikle 2 mL mikrosantrifüj tüpüne alınan 10 mg toz örnek üzerine 300 μ L %0,001 (v/v) β -mercaptoethanol içerisinde Lyse BG buffer eklenmiştir. Çözelti 11.000 xg'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından tekrar %0,001 (v/v) β -mercaptoethanol içerisinde Lyse BG buffer eklenerek pipetle karıştırma yapılmıştır. Ardından karışıma 30 μ L Lyticase (20 mg/mL) ve 2 μ L RNase A eklenmiştir. Tüpler kuru inkübatör kullanılarak 30°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından izolasyon aşaması için tüplere 15 μ L Proteinase K solüsyonu eklenerek 3 saniye boyunca vortekslenmiştir. Ardından örnekler 55°C'de 30 dk boyunca kuru inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunda 10 dakikada bir tüpler çalkalanmıştır. Ardından örnekler 350 μ L SOL BG eklenmiş ve 3 sn boyunca vortekslenmiştir. Örnekler 55°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda örnekler 15 sn boyunca vortekslenip 2 dk boyunca 11.000 xg'de santrifüjlenmiştir. Ardından elde edilen süpernatant DNA bağlama kolonuna aktarılmıştır. Süpernatant içeren kolonlar 11.000 xg'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj ardından 450 μ L Wash BGX buffer eklenip tekrar 11.000 xg'de 1 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır. Ve bu işlem toplamda iki kez tekrarlanmıştır. En sonunda süpernatant içeren kolona herhangi bir kimyasal eklenmeden 11.000 xg'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından kolonlar yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip ve

üzerlerine 50 µL Elution buffer eklenmiştir. İlavenin ardından tüpler oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. Son adım olarak 11.000 xg'de 1 dk boyunca gerçekleştirilen santrifüjün ardından elde edilen süpernatant DNA miktarı tayininde kullanılmıştır. Elde edilen örnekler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi için NanoDrop One Microvolume (Thermo Scientific, ND-ONE-W) cihazı kullanılmıştır. Analiz iki biyolojik ve teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.4. Yaşam Döngüsü (LCA) Analizi

Yaşam döngüsü analizi proses sonucunda üretilen ürünün mevcut kaynaklara ve kirliliğe olan etkisini bütünsel olarak tespit edilmesi, ürünün sürdürülebilirliğinin ölçümü ve yönetimi açısından önem taşımaktadır. Bu doğrultuda çalışmada proses sonucu elde edilen üründe yaşam döngüsü analizi gerçekleştirilmeden önce, analizin öğrenilmesi için ve elde edilen bilginin yaygınlaştırılması için Hacettepe Üniversitesi Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayım Merkezi (IFFBC) ev sahipliğinde Sagenit firması ile birlikte bir eğitim düzenlenmiştir. Eğitime ait poster ve program EK 1.9'da yer almaktadır.

Liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteine ait yaşam döngüsü analizi (LCA), IPCC'nin "AR6 Climate Change 2021: The Physical Science Basis" adlı raporu [90] baz alınarak ve SimaPro 9.4 yazılımı için özel bir firmadan hizmet alınarak gerçekleştirilmiştir. Üretimde, proses sırasındaki tüm girdi/çıktılar için emisyon faktörleri SimaPro 9.4 yazılımı yardımıyla hesaplanarak ürüne ait karbon ayak izi (CO₂ emisyon miktarı) belirlenmiştir.

3.2.9. İstatiksel Analiz

Tez kapsamında elde edilen analiz verilerine IBM SPSS v.23.0 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) doğrultusunda Tukey'in Dürüstçe Anlamalı Fark post hoc çoklu karşılaştırma testleri (Tukey HSD) %95 güven aralığında uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen ve homojen olmayan veri setleri için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) doğrultusunda %95 güven aralığında Dunett's T3 testi uygulanmıştır. Anlamalı fark olarak $p \leq 0.05$ kabul edilmiştir.

Farklı tür besiyeri ve suşlarla gerçekleştirilen fermantasyonlarda analiz edilen parametrelerin ilişkilendirilebilmesi için tüm analizleri kapsayacak biçimde sonuçlar +2 ile -2 aralığında normalize edilerek OriginLab programında Isı Haritası oluşturulmuş ve Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulanmıştır.

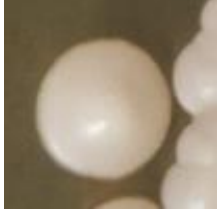
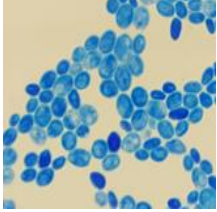

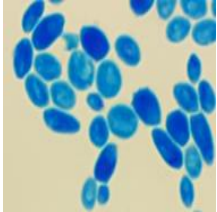

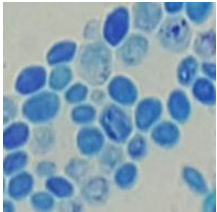
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Canlandırılması ve Seçimi

Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda (HUF) bulunan, -20°C'deki gliserol stoklarda muhafaza edilen ve önceki çalışmada tanımlamaları yapılan [69] 18 adet *Saccharomyces cerevisiae* suşu, YPD Broth sıvı besiyerine ekilerek 28°C'de 24 saat boyunca inkübasyonun ardından canlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Canlandırma işlemi tamamlanan suşlar, YPD Agar katı besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile inoküle edilmiştir [70,71]. Katı besiyerinde saf koloni gelişimi gözlenmesinin ardından suşların makroskobik ve mikroskobik morfolojileri belirlenmiştir. Bu doğrultuda çalışılan suşlara ait izolasyon kodları, kaynak, NCBI erişim kodu ve makroskobik, mikroskobik morfoloji bilgileri Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Saccharomyces cerevisiae suşlarının makroskobik morfolojileri oval, açık krem renğinde, pürüzsüz ve/veya parlak yüzeyde bir profile sahipken [17,91], mikroskobik morfolojileri ise oval, silindirik veya ovoid-kısa ve ovoid uzun şekle sahip olmalıdır [92]. Bu doğrultuda Çizelge 4.1'de yer alan makroskobik morfolojiler incelendiğinde 9763 ve 6328 ile HUF kodlu 16M2K10004, 16M3G11088, 16M3H11101, 17M3C31063, 17M3D31088, 17M3F21122 ve 17M3H21209 suşlarının oval, pürüzsüz ve açık krem renğinde bir profile sahip olduğu, 18M2Z10001 izolasyon kodlu suшта ise oval, pürüzsüz ve açık krem renğinde bir makroskobik morfoloji olmasıyla beraber diğer incelenen suşlara kıyasla koloni yarıçapının görece daha küçük olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra MERIT™ ile HUF kodlu 16M3B11021, 16M3C11032, 16M3C11033, 17M3E21113, 17M3E21114 ve 17M3H21208 suşlarının ise oval, pürüzsüz, parlak ve açık krem renğinde bir profile sahip olduğu görülmüştür

Çizelge 4. 1. Tez çalışması kapsamında canlandırılan, makroskobik ve mikroskobik morfolojileri belirlenen HUF kodlu *S. cerevisiae* suşları.

No	İzolasyon Kodu (HUF)	Kaynağı	NCBI Erişim Kodu	Makroskobik Morfoloji	Mikroskobik Morfoloji
1	16M1C0002	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763*	OQ876808		
2	16M1C0003	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 6328*	OQ912898		
3	16M1C0004	<i>S. cerevisiae</i> MERIT TM * (Chr. Hansen)	-		

4	16M2K10004	Ankara	OQ912899		
5	16M3B11021	Kırıkkale, Üzüm	OQ876789		
6	16M3C11032	Kırşehir, Üzüm	OQ876790		
7	16M3C11033	Kırşehir, Üzüm	OQ876791		

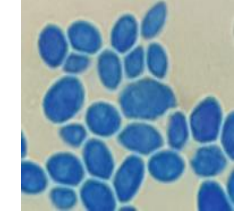
8	16M3G11088	Eskişehir, Üzüm	OQ876792		
9	16M3H11101	Çankırı, Üzüm	OQ876793		
10	17M3C31063	Kırşehir, Üzüm	OQ876795		
11	17M3D31088	Nevşehir, Üzüm	OQ876799		

12

17M3E21113

Aksaray, Üzüm

OQ876802

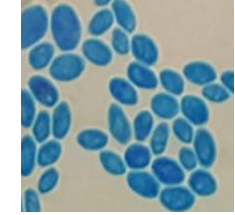


13

17M3E21114

Aksaray, Üzüm

OQ876803

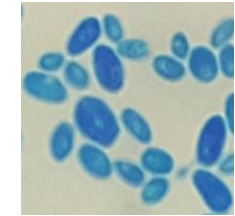


14

17M3F21122

Ankara, Üzüm

OQ876804

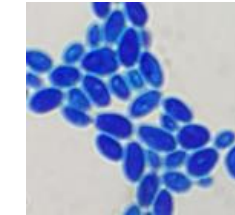


15

17M3H21208

Karaman, Üzüm

-

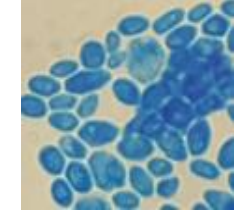


16

17M3H21209

Karaman, Üzüm

-

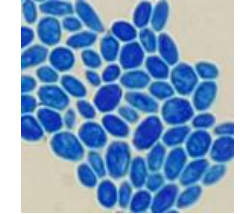


17

18M2Y10013

Ankara

-

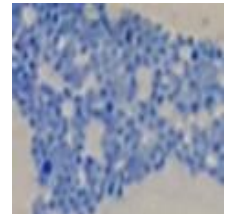


18

18M2Z10001

Adana

-



*Tabloda HUF kodu ile görülen kontrol suşları çalışma metninde kaynak suş kodları ile kullanılacaktır.

Suşlara dair elde edilen mikroskobik morfolojiler incelendiğinde 9763, 6328 ve MERIT™ ile HUF kodlu 16M2K10004, 16M3C11032 17M3C31063, 17M3D31088, 17M3E21113 ve 18M2Z10001 izolasyon suşların hücre görünümü ovoid ve kısa olarak; 16M3B11021, 16M3C11033, 16M3G11088, 16M3H11101, 17M3E21114, 17M3F21122 , 17M3H21208, 17M3H21209 ve 18M2Y10013 ise hücre görünümü ovoid ve uzun profile sahip olduğu tespit edilmiştir.

Canlandırılan ve mikroskobik-makroskobik karakterizasyonu elde edilen 18 adet suş arasından fermantasyonla mikrobiyal protein üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla seçim yapılmıştır. Bu seçim, hem canlandırma ve karakterizasyon sonuçları göz önüne alınarak hem de Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirilen önceki çalışmada [72] suşlara ait incelenen teknolojik özellikler (alkol üretimi, köpük oluşumu, pH ve sıcaklık değişimi) doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Yapılan alışmada [72] MERIT™ ile HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 izolasyon kodlu dört adet suşun geliştikleri ortalama sıcaklık, farklı pH'larda gelişim yetenekleri, alkol ürettikleri günler ile oluşturdukları maksimum köpük hacmi incelenmiştir. İnceleme sonuçlarına göre bu suşların oda sıcaklığında (25°C) ve düşük pH seviyelerinde (pH 3,07 – 3,13) optimum düzeyde gelişebildikleri bildirilmiştir. Ayrıca belirtilen suşların sırasıyla pH 3,3 , 4 ve 7 gibi farklı pH değerlerinde çok iyi düzeyde gelişim gösterebildiği tespit edilmiştir. Alkol retme yetenekleri bakımından MERIT™, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar 5. gün alkol üretmeye başlarken, HUF16M3H11101 kodlu suş 4. gün alkol üretmeye başlamıştır.

S. cerevisiae suşunun etanol toleransının olması çalışma devamında gerçekleştirilecek fermantasyonlarda önemli bir parametredir [93]. HUF16M3H11101 izolasyon kodlu suşun 4. günde alkol üretmeye başlaması sebebiyle tez çalışmasının devamında fermantasyon süresi 3 gün (72 saat) olarak sınırlı tutulmasına karar verilmiştir.

Çalışmada fermantasyonda oksijen transferi için önemli olan maksimum köpük oluşum hacmi incelediğinde HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101

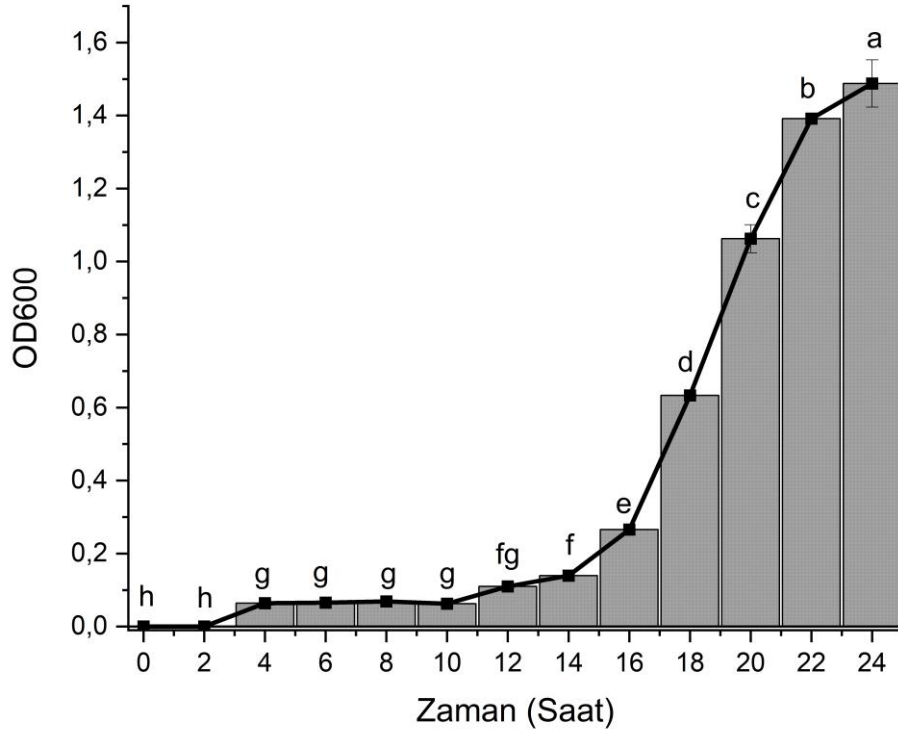
izolasyon kodlu suşlar 1,00 cm civarında köpük oluşturma kabiliyetine sahipken, MERIT™ (Chr. Hansen) kodlu suş 1,5-2,00 cm aralığında köpük oluşturmaktadır.

Sonuç olarak suşların *S. cerevisiae* kültürasyonunda kullanılan sıcaklık (20-30°C) ve pH (4,5-6,5) parametrelerinde çok iyi gelişim göstermesi ile beraber düşük pH düzeylerini ve pH değişimlerini tolere edebilmeleri, fermantasyonda aerasyon üzerinde önemli bir parametre olan köpük oluşturma kabiliyetlerinin [94,95] de düşük olması sebebiyle canlandırılan suşlar arasından *S.cerevisiae* MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 izolasyon kodlu suşların tez çalışmasının devamında kullanılmasına karar verilmiştir. Bu suşlar arasında yer alan *S.cerevisiae* MERIT™ kodlu ile beraber çalışmanın devamında *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

4.2. *S. cerevisiae* ATCC 9763 Suşu Hücre Gelişim Profilinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında kontrol suşu olarak seçilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 kullanılarak suşa ait hücre gelişim profili belirlenmiştir. Bu doğrultuda 9763 izolasyon kodlu suş ile 100 mL YPD Broth besiyerinde 28°C’de 24 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonda 0 ile 24. saat aralığında her 2 saatte bir örnek alımı gerçekleştirilerek zamana karşılık optik dansite değişimi (OD₆₀₀) ölçülerek suşa ait hücre gelişim eğrisi oluşturulmuştur.

Tipik bir mikroorganizma büyüme eğrisi büyümenin dört farklı aşamasını içerir: adaptasyon aşaması (lag fazı), hücre bölünmesinin maksimum hızda gerçekleştiği logaritmik faz (log fazı), hücre bölünme hızının ölüm hızına eşit olduğu durağan faz ve ortamdaki bileşenlerin tükenmesi veya toksik ürünlerin birikmesiyle meydana gelen ölüm fazı [96,97].

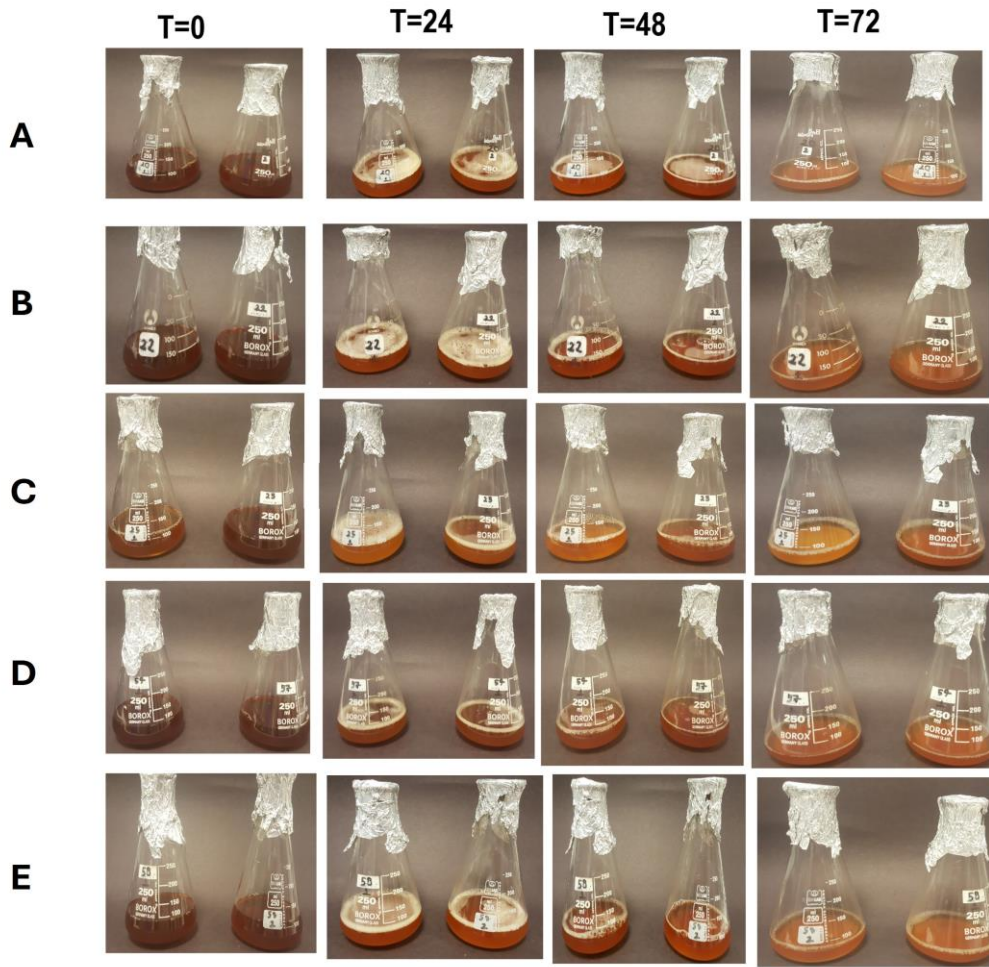


Şekil 4. 1. *S. cerevisiae* ATCC 9763 kontrol suşu ile 0-24 saat aralığında 100 mL YPD Broth besiyerinde zamana karşılık optik dansite (OD₆₀₀) değişimi. Farklı harflere sahip değerler Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.

Şekil 4.1’de yer alan hücre gelişim eğrisi incelendiğinde, *S. cerevisiae* ATCC 973 suşuna ait lag ve log faz hakkında evreleri hakkında bilgi edinilmektedir. Burada lag fazının 0-12. saat aralığında gerçekleştiği ve bu zaman aralığındaki optik dansite ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmektedir (p>0,05). Logaritmik faz evresi ise 12. saat itibarıyla başlamıştır. Ve hücre konsantrasyonunda artışının etkisiyle birlikte ölçülen optik dansitenin de arttığı, logaritmik faz evresinin 12-24. saatler aralığında sürdüğü görülmektedir.

4.3. Seçilen *S. cerevisiae* Suşlarının Beyaz Üzüm Suyu Besiyerinde Hücre Gelişim Profillerinin ve Üretilen Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Beyaz üzüm suyu, içeriğinde yağ, karbonhidrat, protein ve lif kaynaklarının bulunması ve pH değerinin 3,3 olması sebebiyle çalışmanın bir sonraki adımında yaş meyve posalarından oluşturulacak fermantasyon ortamına benzerlik göstermektedir. Bundan dolayı beyaz üzüm suyu burada besiyeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca azot kaynağı olarak %1,0 oranında maya ekstraktı tozu da ilave edilen beyaz üzüm suyu besiyerinin bileşimi Çizelge 3.3’de verilmiştir.



Şekil 4. 2. Üzüm suyu besiyerinde A: 9763, B: MERIT™, C: HUF16M2K10004, D: HUF16M3G11088, E: HUF16M3H11101 kodlu suşlara ait besiyerlerinde 0, 24, 48 ve 72. saatlerde gerçekleştirilen fermantasyon takibi.

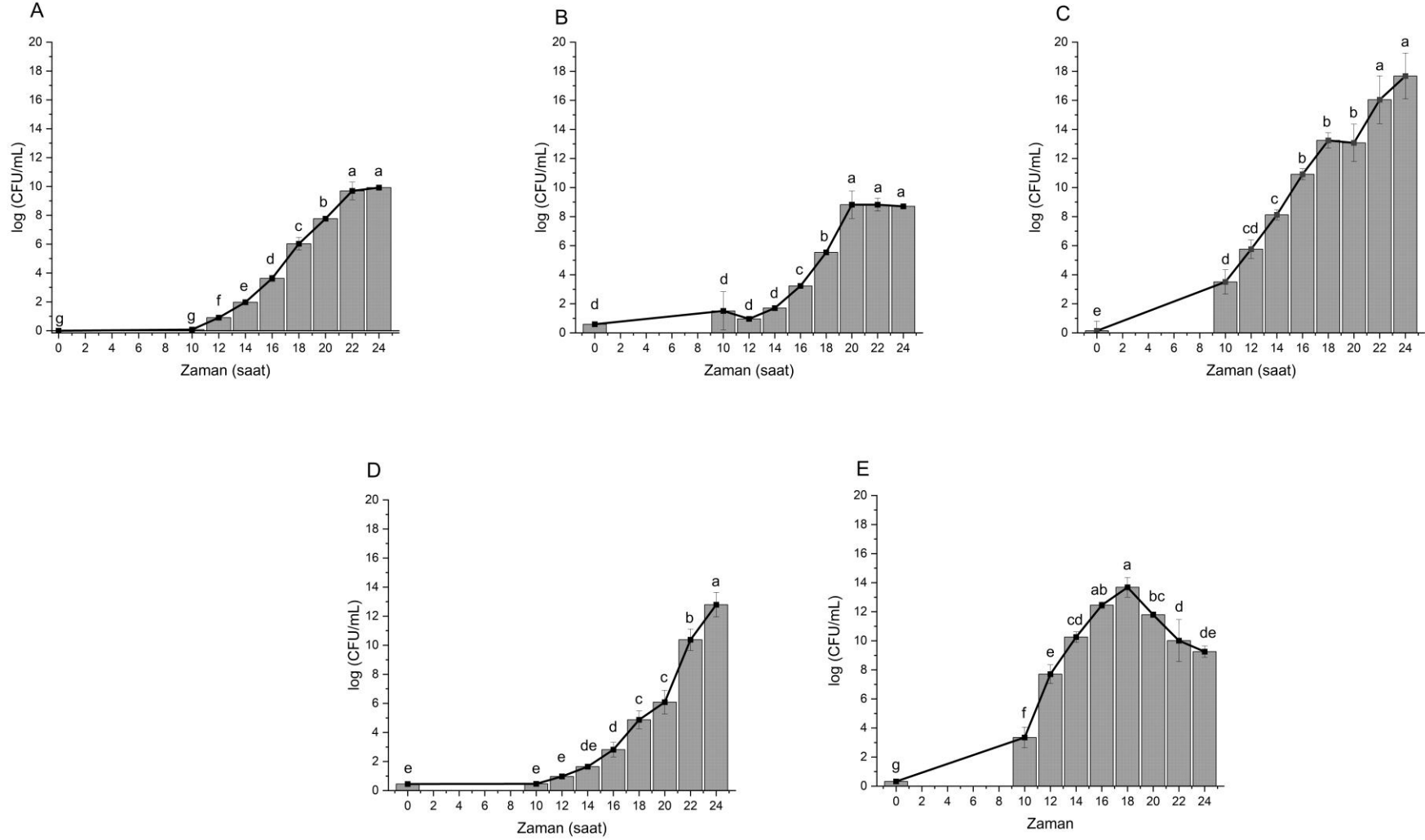
Çalışmanın bu aşamasında, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 *S. cerevisiae* suşları, beyaz üzüm suyu besiyerinde 28°C’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 4.2). İnkübasyonun 0-24. saat aralığında hücre gelişim profillerinin, 48. ve 72. inkübasyon saatlerinde ise protein üretme miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kontrol olarak *S.cerevisiae* ATCC 9763 ve *S. cerevisiae* MERIT™ (Chr. Hansen) kodlu suşlar kullanılmıştır.

Hücre gelişim profillerinin belirlenmesi için örneklerin tamamında, 0-24. saat aralığında 10. saatten itibaren her 2 saatte bir OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. Bölüm 4.2’de elde edilen sonuçlar doğrultusunda YPD Broth besiyerinde lag fazı 0-12. saatler aralığında gözlemlendiğinden 10. saat itibariyle örnek alımına başlanmıştır. Bu doğrultuda ölçülen absorbans değerleri Denklem 3.1’de yerine konularak hücre konsantrasyonu “log (CFU/mL)” cinsinden belirlenmiştir. Ardından zamana karşılık hücre konsantrasyonu grafikleri çizilerek suşlara ait gelişim eğrileri ayrı ayrı elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Şekil 4.3 incelendiğinde sırasıyla 9763 (A), MERIT™ (B) ve HUF16M3G11088 (D) kodlu suşlarda lag fazlarının sırasıyla 0-10, 0-14 ve 0-12. saatler aralığında gerçekleştiği görülmektedir. Hücrenin besiyeri ortamına adapte olduğu ve henüz hücre bölünmelerinin gerçekleşmemesi sebebiyle bu aralıklarda hücre konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). HUF16M2K10004 (C) ve HUF16M3H11101 (E) kodlu suşlarda lag fazının 0-10 saat aralığından daha kısa sürdüğü söylenebilir.

Logaritmik faz 9763 (A), MERIT™ (B), HUF16M2K10004 (C), HUF16M3G11088 (D) ve HUF16M3H11101 (E) kodlu suşlar için sırasıyla 12-22, 12-20, 10-24, 12-24 ve 10-18. saatler aralığında gözlenmiştir.

Suşlarda 9763 (A) ve MERIT™ (B) kodlu olanların sırasıyla 22. ve 20. saatten sonra durağan faza geçtiği, HUF16M3H11101 (D) kodlu suşun ise 18. saat itibariyle ölüm fazına girdiği görülmüştür.



Şekil 4. 3. Beyaz üzüm suyu besiyerinde beş adet *S.cerevisiae* suşu ile gerçekleştirilen fermantasyonda 0-24. saat aralığında elde edilen hücre gelişim eğrileri (A: 9763, B: MERIT™, C: HUF16M2K10004, D: HUF16M3G11088, E: HUF16M3H11101 kodlu suş).

Kontrol suşu olan 9763 kodlu suşa ait YPD Broth (Şekil 4.1) ve beyaz üzüm suyu besiyerindeki (Şekil 4.3) gelişim eğrisine dair sonuçlar karşılaştırıldığında lag fazı YPD Broth besiyerinde 12 saat iken, beyaz üzüm suyunda 10 saat olarak gözlenmiştir. Buna göre kontrol suşunun üzüm suyu besiyerinde adaptasyon fazı daha kısa sürmüştür. Logaritmik faz ise her iki besiyerinde de 12-22. saatler aralığında gerçekleşmektedir.

Sonuç olarak 9763 ile MERIT™; HUF16M2K10004 ile HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşların benzer gelişim profili gösterdiği tespit edilmiştir.

Ayrıca Şekil 4.3’de suşlara ait elde edilen gelişim eğrilerindeki logaritmik faz aralığı kullanılarak, Denklem 3.2’de yer alan formül doğrultusunda spesifik üreme hızı (μ_{max} , s⁻¹) ve jenerasyon süresi (saat) hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

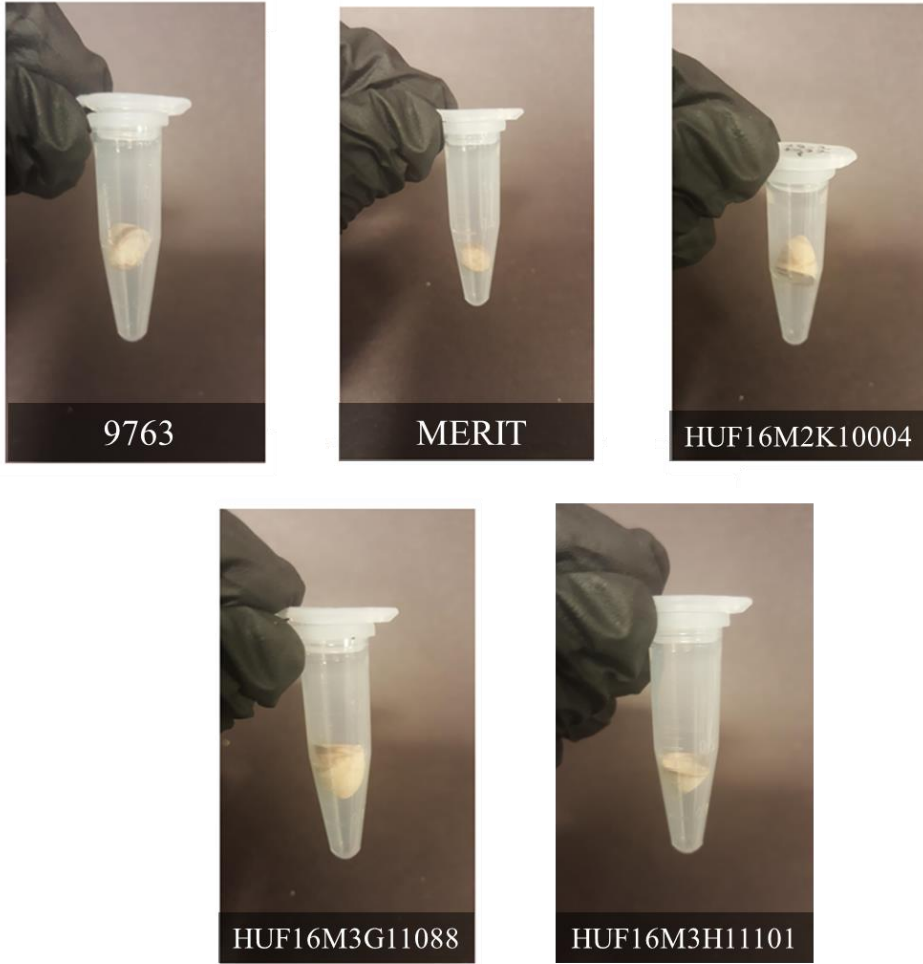
Çizelge 4. 2. *S. cerevisiae* suşlarının 100 mL beyaz üzüm suyunda gerçekleştirilen fermantasyondaki spesifik üreme hızları ve jenerasyon süreleri.

Suş İzolasyon Kodu	Spesifik Üreme Hızı (s ⁻¹)	Jenerasyon Süresi (s)
9763	0,29±0,02 ^a	2,44±0,14 ^a
MERIT™	0,26±0,02 ^a	2,69±0,23 ^a
HUF16M2K10004	0,14±0,01 ^b	5,09±0,45 ^b
HUF16M3G11088	0,29±0,07 ^a	2,52±0,6 ^a
HUF16M3H11101	0,11±0,02 ^c	6,69±1,56 ^c

Örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=12) Dunnett T3 testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Çizelge 4.2 incelendiğinde suşların spesifik üreme hızları ve jenerasyon sürelerinde 9763, MERIT™ ile HUF16M3G11088 suşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05). Suşlara ait kinetik parametrelerde spesifik üreme hızı yüksek ve jenerasyon süresi düşük olanlar, besiyerinde optimum gelişim göstermektedir. Bu doğrultuda ticari suşlar olan 9763 ve MERIT™ ile HUF16M3G11088 kodlu suşa ait

kinetik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması nedeniyle HUF16M3G11088 kodlu suşun diğer iki HUF kodlu suşa göre besiyerinde daha iyi gelişim gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4. 4. Beyaz üzüm suyu besiyerinde 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda suşlara ait elde edilen kuru biyokütle örnekleri.

Çalışmada gerçekleştirilen fermantasyonda 9763, MERIT, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu suşlara ait 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerden elde edilen kuru biyokütle (Şekil 4.4) ağırlıkları kullanılarak hesaplanan biyokütle verimleri (mg/ mL) ve üretilen protein miktarları (%w/w) Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4. 3. Beyaz üzüm suyunda gerçekleştirilen fermantasyonda, 9763, MERIT, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu suşlara ait 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerde tespit edilen kuru biyokütle verimleri (mg/ mL) ve üretilen protein miktarları (%w/w).

İzolasyon Kodu (HUF)	Zaman (saat)	Kuru Biyokütle Verimi (mg/mL)	Üretilen Protein Miktarı (%w/w)
9763	48	4,68±0,34 ^d	2,28±0,19 ^{abc}
	72	2,98±0,27 ^e	2,44±0,21 ^{ab}
MERIT™	48	3,12±0,43 ^e	2,27±0,06 ^{abc}
	72	5,42±0,12 ^{bc}	2,22±0,23 ^{abc}
HUF16M2K10004	48	6,20±0,06 ^a	1,57±0,17 ^{cd}
	72	6,04±0,010 ^{ab}	2,28±0,07 ^{abc}
HUF16M3G11088	48	5,76±0,27 ^{ab}	1,88±0,18 ^{bcd}
	72	6,21±0,10 ^a	1,93±0,19 ^{bcd}
HUF16M3H11101	48	2,27±0,14 ^f	1,16±0,49 ^d
	72	5,02±0,12 ^{cd}	2,92±0,51 ^a

Aynı sütunda yer alan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0,05.

Çizelge 4.3 incelendiğinde 9763 kodlu sušta 48. saatte biyokütle verimi $4,68\pm 0,34$ mg/mL iken 72. saate gelindiğinde azalarak $2,98\pm 0,27$ mg/mL'ye düştüğü görülmüştür. Literatür incelendiğinde *S. cerevisiae* ile meyve posaları kullanılarak hazırlanan 10 çeşit besiyerinde 25°C'de 10 gün boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda, tüm besiyerlerinde 96. saat itibariyle biyokütle miktarında benzer bir şekilde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir [98]. Bu azalmanın nedeni belirli süre sonunda ortamdaki besin maddelerinin ve karbon kaynağının sınırlı mevcudiyeti olarak açıklanmaktadır. Bu çalışmada açıklanan biyokütle verim sonuçlarındaki düşüşün benzer nedenle gerçekleştiği öngörülebilmektedir. Suşa ait üretilen protein miktarları incelendiğinde ise 48. saatte $2,28\pm 0,19$ (%w/w) oranında protein elde edilirken 72. saate gelindiğinde değer $2,44\pm 0,21$ (%w/w) olarak tespit edilmiştir. MERIT™ kodlu sušta 48. saatte biyokütle verimi $3,12\pm 0,43$ mg/mL iken, 72. saate gelindiğinde artarak $5,42\pm 0,12$ mg/mL'ye ulaşmıştır. Buna karşın üretilen protein miktarında fermantasyon boyunca değişim gözlenmemekle beraber 72. saatin sonunda $2,22\pm 0,23$ (%w/w) oranında toplam protein tespit edilmiştir.

HUF16M2K10004 kodlu sušta Tukey testine göre fermantasyon boyunca elde edilen ortalama biyokütle verimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Biyokütle verimi 48. saatte $6,20\pm 0,06$ mg/mL iken 72. saatte $6,04\pm 0,01$ mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber 48. saatte üretilen protein miktarı $1,57\pm 0,17$ iken 72. saate gelindiğinde artarak $2,28\pm 0,07$ değerine ulaşmıştır. HUF16M3G11088 kodlu sušta 48. saatteki biyokütle verimi $5,76\pm 0,27$ mg/mL iken 72. saate gelindiğinde artarak $6,21\pm 0,1$ mg/mL'ye ulaşmıştır. Benzer şekilde 48. saatte $1,88\pm 0,18$ (%w/w) olarak tespit edilen protein değeri 72. saate gelindiğinde artarak $1,93\pm 0,19$ 'a (%w/w) ulaşmıştır. HUF16M3H11101 kodlu sušta ise biyokütle verimi 48. saatte $2,27\pm 0,14$ mg/mL iken 72. saate gelindiğinde artarak $5,02\pm 0,12$ mg/mL'ye ulaşmıştır. Biyokütle verimi artışıyla benzer bir şekilde, 48. saatteki üretilen protein miktarı ($1,16\pm 0,49$) 72. saate ($2,92\pm 0,51$) artmıştır.

Çizelgeye göre 48 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek biyokütle verimleri HUF16M2K10004 ($6,20\pm 0,06$ mg/mL) ve HUF16M3G11088 ($5,76\pm 0,27$ mg/mL) kodlu suşlarda elde edilmiştir. En düşük biyokütle verimine sahip suş ise HUF16M3H11101 ($2,27\pm 0,14$ mg/mL) kodlu suştur. İnkübasyonda 72. saate gelindiğinde ise en yüksek

biyokütle verimleri sırasıyla HUF16M3G11088 (6,21±0,1 mg/mL), HUF16M2K10004 (6,04±0,01 mg/mL) ve MERIT™ (5,42±0,12 mg/mL) kodlu suşlarda tespit edilmiştir. En düşük biyokütle verimi 9763 (2,98±0,27 mg/mL) kodlu suşta tespit edilmiştir. Fermantasyon sonucunda üretilen biyokütle miktarlarının ortalama 5 mg/mL civarında olduğu görülmektedir. Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında elde edilen biyokütle verimlerinin literatürle uyumlu olduğu söylenebilir. Örneğin; *S. cerevisiae* ile Bazal besiyeri bileşenleri kullanılan besiyerinde 25°C’de 120 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucu elde edilen biyokütle verimlerinin de 0-5 mg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir [16].

Fermantasyonda 48. saatte en yüksek proteini (%w/w) 9763 (2,28±0,19), MERIT (2,27±0,06) ve HUF16M3G11088 (1,88±0,18) kodlu suşlar üretirken, HUF16M3H11101 kodlu suş tarafından üretilen protein miktarı en düşüktür (1,16±0,49). Fermantasyon sonucunda ise en yüksek proteini %w/w cinsinden sırasıyla HUF16M3H11101 (2,92±0,51), 9763 (2,44±0,21), HUF16M2K10004 (2,28±0,07) ve MERIT (2,22±0,23) suşları üretmiştir. Elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak, çalışmanın ilerleyen basamaklarında meyve suyu endüstrisi atıklarından olan yaş posalar ile gerçekleştirilecek fermantasyon için suş seçimi yapılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda spesifik üreme hızı yüksek, kısa jenerasyon süresine sahip, biyokütle verimi ve ürettiği protein miktarı yüksek olan suşlar büyük önem taşımaktadır. Çizelge 4.2 ve 4.3’teki sonuçlar bu parametreler açısından değerlendirildiğinde 9763, MERIT™, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar mikrobiyal protein üretiminde öne çıkmaktadırlar. Bu sebeple çalışmanın devamında kullanılmak üzere HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu ve kontrol suşu olarak ise meyve suyu endüstrisi atıkları ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda [99,100] sık kullanılması sebebiyle 9763 kodlu suş seçilmiştir. MERIT™ kodlu suşun ise alkol fermantasyonunda ve şarapçılıkta endüstriyel kullanımı önerilmektedir [101]. Çalışmada yalnızca bir kontrol suşu ile devam edilmesi hedeflendiğinden MERIT™ kodlu suş tercih edilmemiştir

4.4. Bazal Besiyerlerinde *S. cerevisiae* ATCC 9763 Suşu ile Fermantasyon

Meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalar ile biyoproses uygulanarak fermantasyonla mikrobiyal protein üretimi amacıyla kullanılacak besiyeri formülasyonunun tasarlanması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda Bölüm 3.2.2’de *S. cerevisiae* gelişimi için temel olarak kullanılan YPD Broth besiyerindeki indirgen şeker ve azot kaynaklarının oranı ve literatürde yer alan Bazal besiyeri kompozisyonu [16] modifiye edilerek iki farklı besiyeri kompozisyonu oluşturulmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Bazal I ve Bazal II besiyerlerinin kompozisyonu.

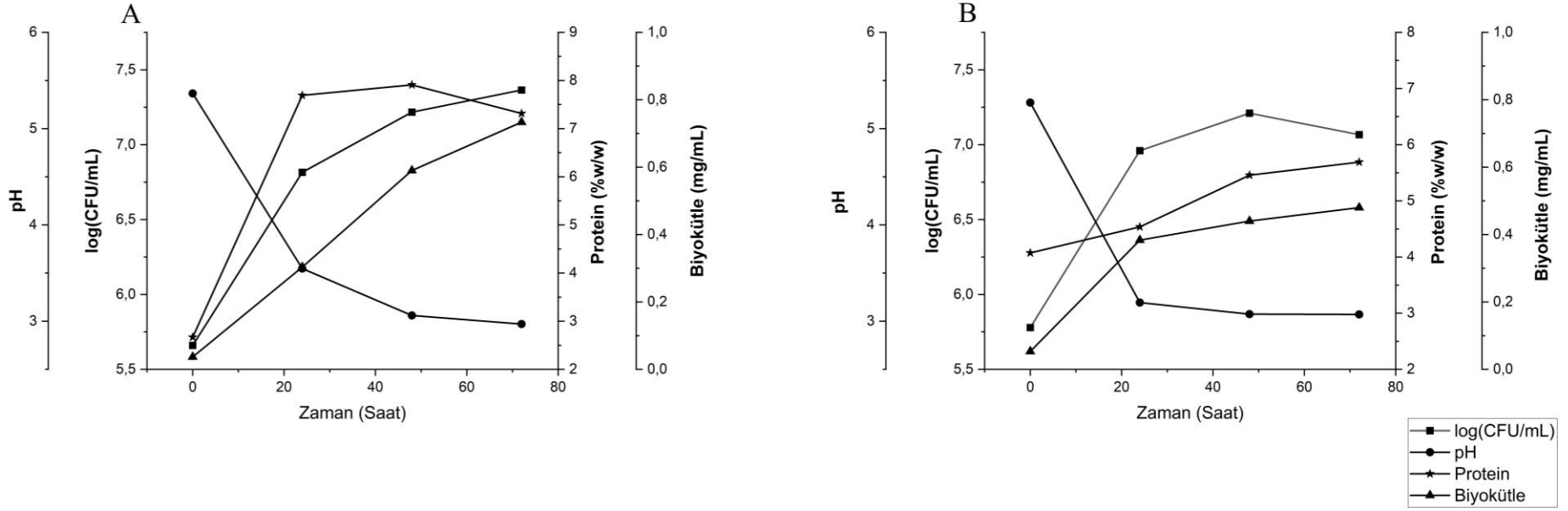
	Bazal I Besiyeri (g/L)	Bazal II Besiyeri (g/L)
D-Glucose	10	10
D-Fructose	10	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	15
KH ₂ PO ₄	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5
NaCl	0,1	0,1
CaCl ₂	0,1	0,1

S. cerevisiae metabolizması için elzem bileşenler içerisinde yer alan indirgen şekerlerden D-Glukoz ve D-Fruktoz ile azot kaynağı olan amonyum sülfat konsantrasyonları önemlidir [17]. Bu doğrultuda Çizelge 4.5’te verilen besiyeri formülasyonları oluşturulmuştur. Bazal I ’de, YPD Broth besiyerinde indirgen şeker kaynağı olan D-Glukoz konsantrasyonu yarı yarıya azaltılmış ve azaltılan oranda D-Fruktoz (10 g/L) eklenmiştir. Azot kaynağı olarak yer alan Peptone ve Yeast Extract bileşenlerinin toplam konsantrasyonu (30 g/L) sabit tutulmuştur. Bazal II’de ise YPD Broth içeriğindeki D-Glucose ve azot kaynaklarının oranı (2/3) korunarak formülasyon oluşturulmuştur.



Şekil 4. 5. Bazal I (A) ve Bazal II (B) besiyerlerinde 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon takibi.

Meyve suyu endüstrisi atıkları olan posalar ile gerçekleştirilecek fermentasyon için besiyeri formülasyonunun hazırlanması amacıyla öncelikle Bazal I ve Bazal II besiyerlerinde kontrol olarak seçilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu ile çalışılmıştır. Bu doğrultuda 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda (Şekil 4.5) her iki besiyerinde biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) parametrelerin değişimi izlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. *S. cerevisiae* ATCC 9763 kontrol suşunun 0-72. saat aralığında Bazal I (A) ve Bazal II (B) besiyerlerinde analiz edilen fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) parametreler.

Şekil 4.6 incelendiğinde Bazal I besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda 0-72. saat aralığında suşun logaritmik faz evresinde olduğu gözlenirken, Bazal II besiyerinde 48. saat itibariyle hücre konsantrasyonu azalmaya başlamıştır. Fermantasyon sonucunda hücre konsantrasyonu “log(CFU/mL)” cinsinden Bazal I besiyerinde $7,36 \pm 0,03$, Bazal II besiyerinde $7,07 \pm 0,09$ olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon sonucunda Bazal I besiyerinde Bazal II’ye kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek hücre konsantrasyonuna ulaşılmıştır ($p < 0,05$).

Fermantasyonun başlangıcında inokülasyonun ardından biyokütle verimleri 24. saatte Bazal I’de $0,037$ mg/mL’den $0,30$ mg/mL’ye; Bazal II’de $0,053$ mg/mL’den $0,38$ mg/mL’ye yükselmiştir. Fakat 48. saat itibariyle Bazal I besiyerinde artış hızı yükselerek $0,59$ mg/mL’ye çıkarken Bazal II besiyerinde $0,44$ mg/mL olarak saptanmıştır. Fermantasyonun 72. saatinde Bazal I için elde edilen biyokütle verimi ($0,73 \pm 0,3$ mg/mL) Bazal II ‘ye ($0,48 \pm 0,01$ mg/mL) kıyasla daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,05$). Fermantasyon süresince hücre konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı olarak elde edilen biyokütle miktarlarının da arttığı görülmektedir. Literatür incelendiğinde, sentetik besiyerleri kullanılarak *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda biyokütle veriminin ortalama 0-5 mg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir [16,102]. Bu doğrultuda elde edilen biyokütle verimlerinin de literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Fermantasyon süresince iki fermantasyon ortamında da 24 saat aralıklarla pH değişimi ölçülmüştür. Bazal I için inokülasyonun ardından $5,36$ olan pH değeri 24. saatte $3,55$ ’e düşmüştür. Bazal II besiyerinde ise 24. Saatte pH değeri $5,27$ ’den $3,19$ ’a düştüğü tespit edilmiştir. Bazal I ve Bazal II besiyerinde 48. saate gelindiğinde pH’lar sırasıyla $3,06$ ve $3,07$ değerlerindeyken, fermantasyon sonucunda Bazal I için pH’sı ($2,97 \pm 0,01$) Bazal II pH’sına ($3,07 \pm 0,01$) kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bazal I besiyerinde fermantasyon boyunca ölçülen pH değişimleri Bazal II besiyerinden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0,05$).

Fermantasyon sürecinde üretilen protein miktarları (%w/w) incelendiğinde 0-48. saatler aralığında iki besiyeri için de artış gözlenmiştir. Fermantasyon sonucunda ise Bazal I

besiyerinde ($7,31 \pm 0,10$), Bazal II besiyerine kıyasla daha yüksek oranda protein üretilmiştir ($5,69 \pm 0,30$).

Bazal I ortamı Bazal II ortamı ile karşılaştırıldığında fermantasyon sonucunda elde edilen hücre konsantrasyonu (\log (CFU/mL)), üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle veriminin (mg/mL) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın sebebinin besiyerlerindeki şeker ve azot konsantrasyonlarının farklılığından kaynaklandığı açıktır. Bazal I besiyerinde, Bazal II'den farklı olarak D-Fructose (10 g/L) bileşeni bulunmakla beraber azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 kat daha yüksek konsantrasyonda yer almaktadır. Bu sebeple gerçekleştirilen fermantasyonda indirgen şeker ilavesi ve azot kaynağının konsantrasyonunun artırılmasının hücre gelişimine, biyokütle verimine ve protein üretimine pozitif etki ettiği görülmüştür. Bu doğrultuda Bazal I besiyeri formülasyonunun *S.cerevisiae* gelişimini destekleyici bir besiyeri formülasyonu olduğuna karar verilmiştir.

4.5. Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Analizi

Çalışma materyali olan elma, armut, nar, şeftali ve siyah havuç posalarının kompozisyonları analiz edilmiştir. Analiz edilen posalara ait kompozisyon bilgileri Çizelge 4.5'te yer almaktadır

Çizelge 4. 5. Çalışma kapsamında analiz edilen meyve suyu endüstrisi atıklarının yüzde cinsinden nem, kül, protein, ham lif ve indirgen şeker içeriği. Aynı sütün içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama \pm SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p<0.05$.

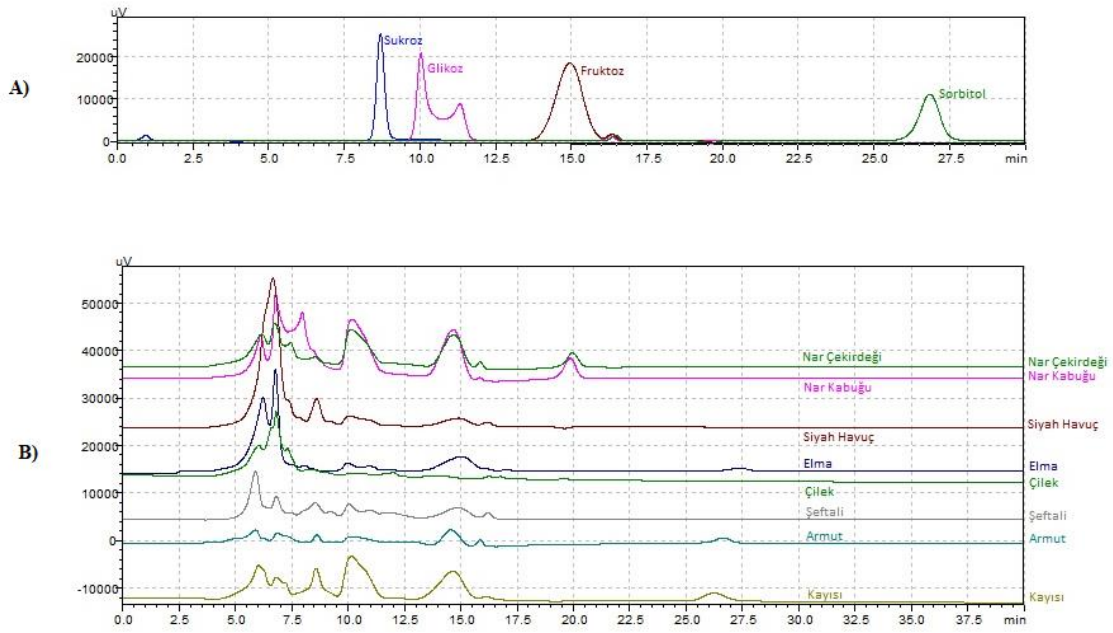
Yaş Meyve Posası	Nem (%)	Kül (%)	Protein (%)	Ham Lif (%)	İndirgen Şeker (%)
Elma	77,63 \pm 0,19 ^a	0,49 \pm 0,02 ^c	1,90 \pm 0,01 ^d	8,81 \pm 0,72 ^c	2,51 \pm 0,48 ^c
Armut	46,17 \pm 2,31 ^d	0,46 \pm 0,02 ^c	1,10 \pm 0,01 ^f	24,97 \pm 2,05 ^a	1,97 \pm 0,13 ^c
Nar Çekirdeği	55,21 \pm 1,23 ^c	0,98 \pm 0,04 ^c	6,00 \pm 0,1 ^a	8,68 \pm 0,71 ^c	6,07 \pm 0,36 ^b
Nar Kabuğu	71,77 \pm 0,32 ^b	1,17 \pm 0,05 ^a	1,10 \pm 0,01 ^f	4,56 \pm 0,37 ^d	9,97 \pm 2,17 ^a
Şeftali	78,93 \pm 0,18 ^a	0,49 \pm 0,02 ^c	1,50 \pm 0,01 ^e	11,95 \pm 0,98 ^b	2,23 \pm 0,25 ^c
Çilek	55,35 \pm 0,57 ^c	0,99 \pm 0,04 ^b	5,20 \pm 0,1 ^b	12,77 \pm 1,05 ^b	0,5 \pm 0,18 ^c
Kayısı	79,46 \pm 0,16 ^a	0,90 \pm 0,04 ^b	3,60 \pm 0,1 ^c	3,13 \pm 0,26 ^d	8,43 \pm 1,34 ^{ab}
Siyah Havuç	79,21 \pm 0,45 ^a	1,17 \pm 0,05 ^a	3,40 \pm 0,1 ^c	4,34 \pm 0,36 ^d	1,43 \pm 0,4 ^c

Çizelge 4.5 incelendiğinde analizler sonucu meyve posalarının nem içeriklerinin %46,17- %79,46 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Yüzde cinsinden nem içeriği en yüksek meyve posası çeşitlerinin elma ($77,63\pm 0,19$), nar kabuğu ($71,77\pm 0,32$), şeftali ($78,93\pm 0,18$), kayısı ($79,46\pm 0,16$), siyah havuç ($79,21\pm 0,45$) posalarının olduğu görülmektedir. Posalardaki kül içeriğinin yüzde cinsinden 0,46-1,17 aralığında olduğu görülmektedir. En yüksek kül içeriğine sahip posaların nar kabuğu ($1,17\pm 0,05$), siyah havuç ($1,17\pm 0,05$), çilek ($0,99\pm 0,04$), nar çekirdeği ($0,98\pm 0,04$) ve kayısı ($0,90\pm 0,04$) olduğu görülmektedir. En düşük kül içeriğine sahip posaların ise ortalama %0,48 kül içeriği ile elma, armut, şeftali olduğu tespit edilmiştir.

Posalardaki yüzde protein içeriğinin % 1,1- 6 aralığında değişim gösterdiği görülmektedir. İstatiksel olarak en yüksek protein içeriğine sahip posa türlerinin nar çekirdeği ($6,0\pm 0,1$) ve çilek ($5,20\pm 0,1$) olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ve nar posasında, çekirdek kısmında ($6\pm 0,1$) kabuğa ($1,1\pm 0,01$) kıyasla daha yüksek oranda protein bulunduğu gözlemlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da buradan elde edilen sonuçları destekler nitelikte olan sonuçlara göre nar çekirdeğinde %7,17 oranda protein bulunurken kabukta %3,8 oranında protein bulunduğu tespit edilmiştir [103]. Posalar arasında en düşük protein içeriğine sahip olanlar armut ve nar kabuğu olup ($1,1\pm 0,01$) aralarında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ham lif içerikleri incelendiğinde değerlerin %3,13- %24,97 aralığında değiştiği görülmektedir. En yüksek ham lif içeriğine sahip posaların armut ($24,97\pm 2,05$), çilek ($12,77\pm 1,05$) ve şeftali ($11,95\pm 0,98$), en düşük lif içeriğine sahip olanların ise kayısı ($3,13\pm 0,26$), siyah havuç ($4,34\pm 0,36$) ve nar kabuğu ($4,56\pm 0,37$) olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde armut posasının lignin, selüloz ve hemiselüloz içeriği sebebiyle diğer posalara kıyasla lifçe daha zengin olduğu belirtilmektedir [104].

Posaların toplam indirgen şeker içerikleri incelendiğinde en yüksek indirgen şeker içeriğine sahip posaların nar kabuğu ($9,97\pm 2,17$), kayısı ($8,43\pm 1,34$) ve nar çekirdeği ($6,07\pm 0,36$) olduğu görülmektedir. Literatürde de çalışmayla uyumlu olarak narda %10- 13 ve kayısı posasında %5,87 oranında indirgen şeker tespit edilmiştir [105,106]. En düşük indirgen şeker içeriğine sahip posalar ise çilek ($0,5\pm 0,18$), siyah havuç ($1,43\pm 0,4$), armut ($1,97\pm 0,13$), şeftali ($2,23\pm 0,25$), ve elmadır ($2,51\pm 0,48$).

Posalardaki D-glukoz, D-fruktoz, D-sorbitol ve sükröz profillerinin ayrıntılı olarak belirlenmesi için HPLC-RID sistemi kullanılarak tanımlama ve miktar analizi uygulanmıştır. Bu analizde kullanılan glukoz, fruktoz, sükröz ve sorbitol standartlarının alıkonma süreleri sırasıyla 8,5, 10, 15 ve 27 dakikadır. Bu doğrultuda posalarda gerçekleştirilen analiz sonuçları, standart D-glukoz, D-fruktoz, D-sorbitol ve sükröz solüsyonların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak posalardaki sükröz, glukoz, fruktoz ve sorbitol profilleri belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Yaş meyve posalarında gerçekleştirilen HPLC-RID analizinde standart şeker çözeltilerinin kromotogramı (a), örneklere ait şeker kromotogramları (b).

Glukoz ve fruktoz monosakkaritleri tüm posalarda tespit edilmiştir. Elma posası ve nar kabuğu dışındaki diğer posalarda ise sorbitol mevcuttur. Örneklerde sükröz pikleri 8.5 dakikada; glukoz pikleri 10. dakikada; fruktoz pikleri 15.dakikada; sorbitol pikleri ise 27. dakikada gözlenmiştir. Gerçekleştirilen analiz sonucu yaş meyve posalarının sahip oldukları monosakkarit kompozisyonuna dair ayrıntılı bilgi ise Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre glukoz açısından en zengin posalar nar kabuğu ($5,08 \pm 0,97\%$), kayısı ($4,8 \pm 1\%$) ve nar çekirdeğidir ($3 \pm 0,19$). Glukoz içeriği en düşük olan posalar elma, şeftali, çilek ve siyah havuç olup bu örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

Çizelge 4. 6. Çalışmada analiz edilen yaş meyve posalarının kompozisyonunda bulunan şeker konsantrasyonları (%).*

Yaş Meyve Posası	Glukoz (%)	Fruktoz (%)	Sükroz (%)	Sorbitol (%)
Elma	0,78±0,09 ^c	1,72±0,39 ^{cd}	ND	0,26±0,03 ^{ab}
Armut	0,65±0,07 ^c	1,32±0,07 ^{de}	0,26±0,03 ^{cd}	0,38±0,05 ^{ab}
Nar Çekirdeği	3,00±0,19 ^b	3,06±0,17 ^{bc}	0,17±0,01 ^d	ND
Nar Kabuğu	5,08±0,97 ^a	4,89±1,20 ^a	ND	ND
Şeftali	0,97±0,04 ^c	1,26±0,21 ^{de}	0,56±0,03 ^{bc}	0,08±0,01 ^c
Çilek	0,24±0,09 ^c	0,26±0,09 ^e	0,12±0,01 ^d	ND
Kayısı	4,8±1,00 ^a	3,63±0,34 ^{ab}	1,40±0,12 ^a	0,68±0,43 ^a
Siyah Havuç	0,78±0,19 ^c	0,65±0,21 ^{de}	0,62±0,27 ^b	ND

*Aynı sütün içerisinde bulunan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Fruktoz içeriği yüksek posalar ise yine aynı şekilde nar kabuğu (4,89±1,2%), kayısı (3,63±0,34%) ve nar çekirdeğidir (3,06±0,17%). Fruktoz konsantrasyonu en düşük posaların ise elma, armut, şeftali, çilek ve siyah havuç olduğu, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı tespit edilmiştir (p>0,05). Elma ve nar kabuğunda analiz sonucunda sükroz şekeri tespit edilmemiştir. Bununla beraber sükroz miktarı istatistiksel olarak en yüksek posanın kayısı (1,40±0,12%) olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sükroz içeriği en düşük olanlar ise armut, nar çekirdeği ve çilektir. Nar çekirdeği, nar kabuğu, çilek ve siyah havuç posalarında sorbitol bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla beraber elma, armut, ve kayısıda istatistiksel olarak benzer oranlarda sorbitol bulunduğu tespit edilmiştir (p>0,05).





















Yapılan analizler kapsamında posaların içeriğini oluşturan temel bileşenlerin sırasıyla ham lif, indirgen şeker ve protein olduğu görülmektedir. Nar çekirdeği, nar kabuğu ve kayısı yaş posaları kül, protein ve indirgen şeker açısından; elma, armut ve şeftali posaları

ham lif açısından zengin kaynaklar olarak öne çıkmaktadır. Bu doğrultuda nar çekirdeği, nar kabuğu, kayısı, elma, armut ve şeftali yaş posaları bileşen ekstraksiyonunda kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Bununla beraber nar çekirdeği, nar kabuğu ve kayısı yaş posalarının *S. cerevisiae* tarafından fermente edilebilen zengin bir indirgen şeker içeriğine sahip olması, onları biyoproses işlemlerinde ideal karbon kaynakları yapmaktadır [12]. Meyve suyu endüstrisi atıklarından olan posaların yeni gıda ve gıda bileşenleri üretiminde yönelik potansiyellerinin değerlendirilebilmesi için kompozisyonlarının analiz edilmesi elzem nitelik taşımaktadır. Bu bölüm, gelecekteki meyve posalarının karakterizasyonuna dair çalışmalara katkı sağlandığı gibi, çalışmanın devamında mikrobiyal protein üretimi için fermantasyonda kullanılacak besiyeri formülasyonunu oluşturmada temel olarak kullanılacaktır.

4.6. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları ile Besiyeri Formülasyonunun Oluşturulması

Meyve suyu endüstrisi atıkları ile biyoproses uygulanarak, fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretimi amacıyla *S. cerevisiae* gelişimini destekleyici bir besiyeri formülasyonu hazırlanması hedeflenmiştir. Bu besiyerinde kullanılacak yaş posa çeşitlerinin belirlenmesi için posalara ait Çizelge 4.5’de yer alan indirgen şeker miktarları esas alınmıştır. Bu doğrultuda elma, armut, nar çekirdeği, nar kabuğu, şeftali, çilek ve kayısı posaları ile çalışılmaya karar verilmiştir. Ayrıca, meyve suyu üretim prosesinde, hasat takviminde (Çizelge 4.7) aynı dönemde işlenen meyve çeşitlerinden elde edilen farklı yaş posa çeşitlerinden eşzamanlı bir şekilde atıkların biyolojik olarak değerlendirilmesinin gerçekleştirilebilmesi için posalardan karışımlar oluşturulmuştur. Bu doğrultuda elma ve armut posasından (%50-50, w/w) ; nar kabuğu ve nar çekirdeği posasından (%50-50, w/w); kayısı ve çilek posalarından (%70-30, w/w) karışımlar oluşturulmuştur. Fermantasyonda tek çeşit posa kullanılarak hazırlanan besiyerinin mikrobiyal protein üretimine etkisinin incelenmesi için de şeftali posası tek başına kullanılmıştır.

Çizelge 4. 7. Çalışma kapsamında mikrobiyal protein üretimi amacıyla fermantasyonda besiyeri hazırlanmasında kullanılacak yaş posalara ait meyvelerin hasat takvimi [107].

Meyve Çeşidi	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Armut												
Elma												
Nar												
Çilek												
Kayısı												
Şeftali												
Siyah Havuç												

Karışımlarda posalara ait yüzdelerin belirlenmesinde yaş posaların sahip oldukları ve *S. cerevisiae* gelişimi için temel karbon kaynakları olan, indirgen şeker içerikleri göz önüne alınmıştır [12,17]. Yaş posaların kompozisyonlarına dair analiz sonuçlarını içeren Çizelge 4.5 incelendiğinde aynı dönemde hasat edilen elma ve armut meyvelerine ait posaların indirgen şeker içerikleri benzerdir ($p>0,05$), bu sebeple oluşturulacak karışımda iki posa çeşidinden de %50 (w/w) oranında kullanılmasına karar verilmiştir. Aynı dönemde işlenen kayısı ve çilek meyvelerine ait posalarda, kayısı posasının indirgen şeker içeriği çileğe göre yüksektir. Bu sebeple kayısı ve çilek posalarından sırasıyla %70 (w/w) ve %30 (w/w) oranlarında alınarak bir karışım oluşturulmasına karar verilmiştir. Siyah havuç posasının düşük indirgen şeker içeriğine sahip olması sebebiyle kullanılması tercih edilmemiştir. Nar hasadı sonucu elde edilen nar kabuğu ve nar çekirdeği posalarından da %50 (w/w) oranında alınarak bir karışım oluşturulmasına karar verilmiştir.

Bölüm 4.4'te gerçekleştirilen analizler sonucunda Bazal I besiyeri formülasyonunun *S. cerevisiae* gelişimini destekleyici bir fermantasyon ortamı olduğuna karar verilmiştir. Bu sebeple meyve suyu endüstrisi atıkları kullanılarak gerçekleştirilecek fermantasyonlarda Baza I besiyeri kompozisyonu, besiyeri formülasyonu oluşturulurken kullanılmıştır.

Bazal I besiyeri formülasyonunda yer alan indirgen şeker kaynaklarından olan D-Glukoz ve D-Fruktoz konsantrasyonlarını karşılayacak oranda besiyerine eklenmesi gereken yaş posa konsantrasyonları hesaplanmıştır. Hesaplanan miktarlar kullanılarak yaş posalar ve saf su ile oluşturulan besiyerlerinde elma-armut (%50-50, w/w) karışımı ve şeftali posalarının yüksek viskoziteye sahip besiyerleri oluşturduğu gözlemlenmiştir. Yüksek viskoziteye sahip besiyerleri fermantasyon sırasında karıştırmada zorluk yaratmakta ve dolayısıyla oksijen transferini etkilemektedir. Ayrıca fermantasyon ortamında "ölü bölgeler" olarak adlandırılan bölgelerin oluşmasına sebep olmakta ve fermantasyonda üretim veriminin düşmesine neden olmaktadır [108]. Bu sebeple fermantasyonda besiyerine eklenen elma-armut karışımı ve şeftali posalarına ait miktarlar azaltılarak, gözlenen viskozitenin azaltılması böylelikle fermantasyon sırasında ölü bölgelerin oluşumunun engellenmesi hedeflenmiştir. Ve besiyerinde temel indirgen şeker kaynağı olan yaş posaların miktarının azaltılmasının, *S. cerevisiae* gelişimini etkilememesi için

elma-armut ve şeftali posaları kullanılarak oluşturulan besiyerlerinde, azaltılan miktarı karşılayacak oranda D-Glukoz ve D-Fruktoz bileşenleri eklenmiştir.

Çizelge 4. 8. Meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalar ile saf su kullanılarak oluşturulan besiyerlerindeki yaş posaların ve besiyerine eklenen D-Glukoz ve D-Fruktoz bileşenlerinin konsantrasyonları (g/L).

Besiyeri İçeriği	Besiyerine Eklenen Yaş Posa Kons. (g/L)	Besiyerine Eklenen D-Glukoz Kons. (g/L)	Besiyerine Eklenen D-Fruktoz Kons. (g/L)
Elma-Armut (%50-50, w/w)	352,113	7,50	4,65
Nar Kabuğu-Nar Çekirdeği (%50-%50, w/w)	251,26	-	-
Şeftali (%100, w/w)	257,732	7,50	6,75
Kayısı-Çilek (%70-30, w/w)	381,68	-	-

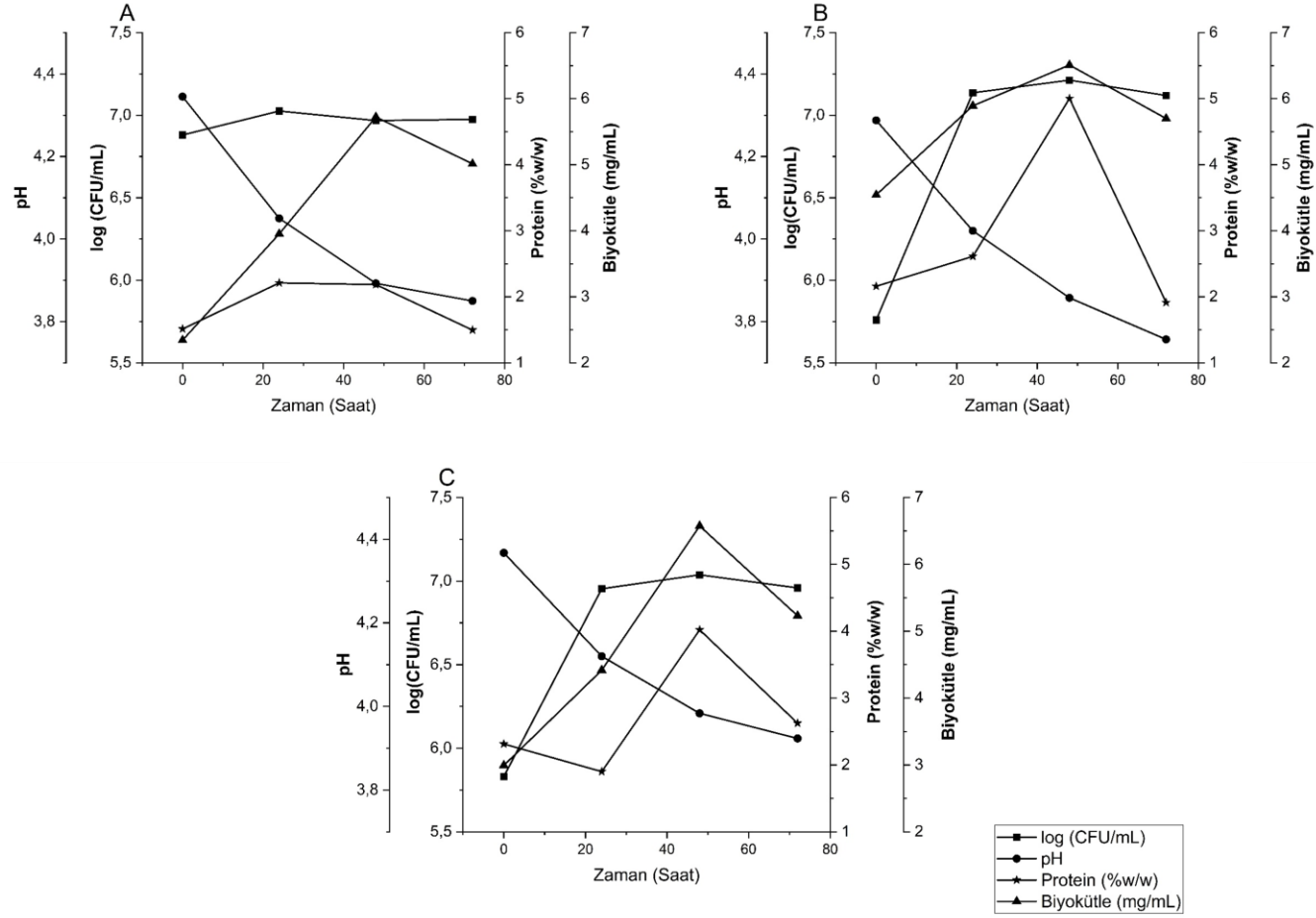
Yapılan analizler ve bunların değerlendirilmesi sonucunda meyve suyu endüstrisi atıkları kullanılarak mikrobiyal protein üretimi amacıyla oluşturulan, *S. cerevisiae* gelişimini destekleyici model formülasyona ait bilgi Çizelge 4.8’de yer almaktadır. Elde edilen formülasyonda, farklı meyve posası kombinasyonlarından oluşturulan besiyerlerindeki yaş posa konsantrasyonları, posaların indirgen şeker analizi ve bazal besiyeri analiz sonuçlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Çizelge 4.8’de verilen karışım miktarları göz önüne alındığında, farklı besiyerlerine eklenen bileşenlerin içeriğinin değişiklik gösterdiği, buna göre kayısı-çilek karışımının en yüksek yaş posa

konsantrasyonuna (381,68 g/L) sahip olduğu görülmektedir. Nar kabuğu-nar çekirdeği ve kayısı-çilek karışımlarının ortalama indirgen şeker içeriklerinin sırasıyla %8,02 ve %6,05 olması nedeniyle besiyerlerine D-glukoz ve D-fruktoz eklenmemiştir.

4.7. Meyve Suyu Endüstrisi Atıkları Kullanılarak Oluşturulan Besiyerlerinde Fermantasyon

Çizelge 4.8’de oluşturulan besiyeri formülasyonu kullanılarak elma-armut (%50-50, w/w) ; kayısı ve çilek posalarından (%70-30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) yaş posalarından oluşan 4 çeşit besiyerinde, 500 mL hacimde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar ile Bölüm 3.2.7’de belirtildiği şekilde inokulum hazırlanarak ve ayrı ayrı inokülasyon yapılarak 160 rpm’de 28°C’de 72 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen fermantasyon boyunca bütün örneklerde biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) parametrelerin değişimi izlenmiştir.

Şekil 4.8’de elma-armut (%50-50, w/w) besiyerinde suşların 160 rpm’de 28°C’de 72 saatlik fermantasyon boyunca 24 saat aralıklarla ölçümü gerçekleştirilen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) analizlerin sonuçları görülmektedir. İnokülasyonun ardından “log (CFU/mL)” cinsinden hücre konsantrasyonları 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için sırasıyla $6,88 \pm 0,02$, $5,76 \pm 0,06$ ve $5,83 \pm 0,04$ olan değerler 24. saate gelindiğinde artarak $7,03 \pm 0,01$, $7,14 \pm 0,03$ ve $6,95 \pm 0,02$ değerlerine ulaştığı görülmüştür. Fermantasyonda üç suş için de 24-48. saat aralığı itibariyle hücre gelişiminin yavaşladığı ve durağan faza girildiği görülmektedir. Fermantasyon sonucunda 72. saate gelindiğinde ise 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için hücre konsantrasyonu “log (CFU/mL)” cinsinden sırasıyla $6,97 \pm 0,06$, $7,12 \pm 0,03$ ve $6,96 \pm 0,01$ değerlerine ulaşmıştır. Fermantasyon sonucunda HUF16M2K10004 kodlu suş, 9763 kontrol suşu ve HUF16M3G11088 kodlu suşa kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek hücre konsantrasyonuna ulaştığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4. 8. Elma(%50)-Armut(%50) besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi

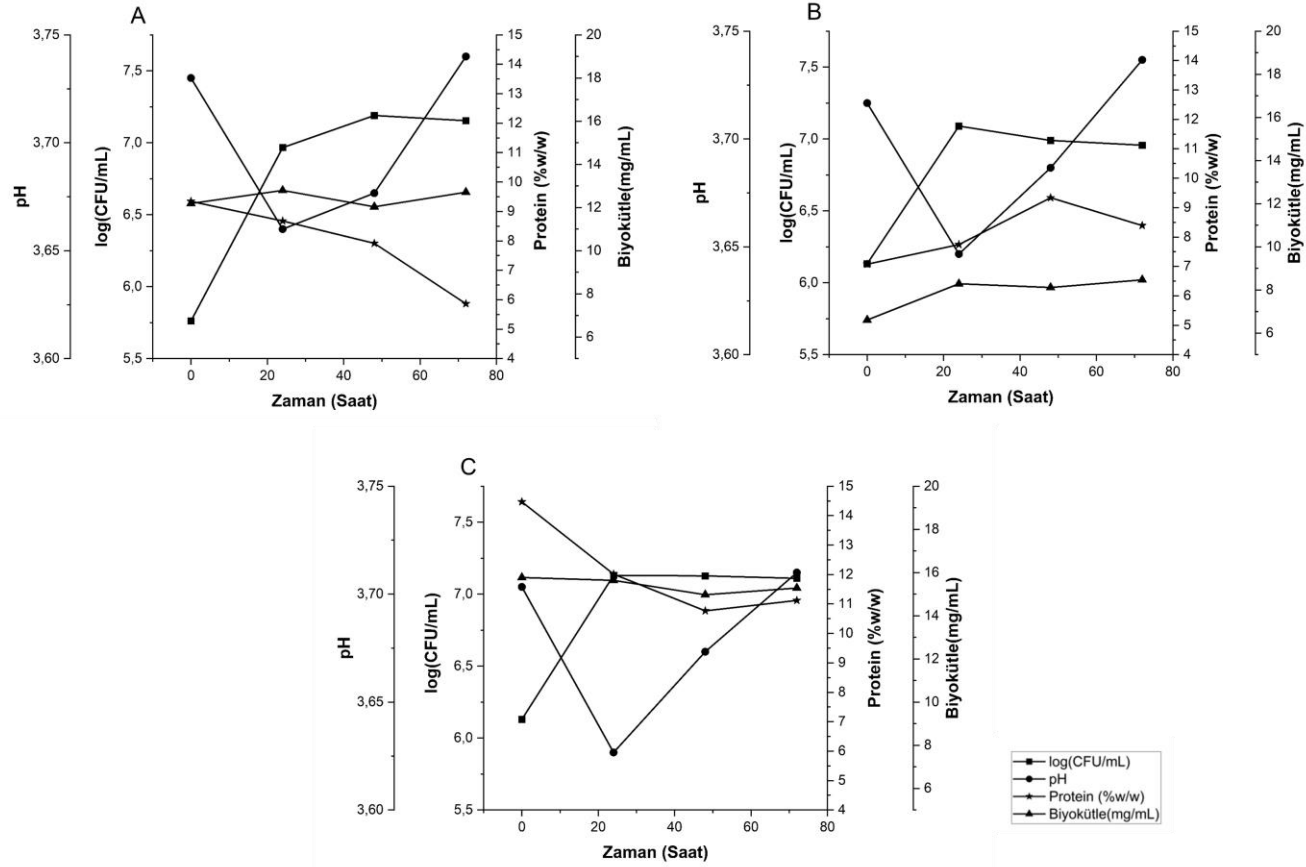
Fermantasyon boyunca 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlara ait besiyerlerinde 0-48. saatler aralığında biyokütlede artış gözlenerek sırasıyla $5,72\pm 0,17$, $6,51\pm 0,3$ ve $6,57\pm 0,56$ mg/mL biyokütle verimleri elde edilmiştir. Ardından 72. saate gelindiğinde üretilen biyokütle miktarı azalarak, sırasıyla $5,01\pm 0,14$, $5,7\pm 0,6$, $5,23\pm 0,84$ mg/mL değerlerine ulaşmıştır. Literatürde meyve atıklarından oluşan besiyerinde *S. cerevisiae* ile 30°C'de 96 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda $6,00 \pm 0,4$ mg/mL biyokütle verimi elde edildiği bildirilmiştir [109]. Bu doğrultuda 48. ve 72. saatte tespit edilen biyokütle verimlerinin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Biyokütle veriminin 48. saatin ardından azalmasının sebebi Bölüm 4.3'te tartışıldığı üzere ortamda bulunan *S. cerevisiae* gelişimi için gerekli olan karbon kaynaklarının tükenmeye başlamasından kaynaklanıyor olabilir.

Besiyerinde meydana gelen pH değişimi incelendiğinde, 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyonda başlangıçta sırasıyla $4,34\pm 0,01$, $4,29\pm 0,01$ ve $4,36\pm 0,01$ olarak ölçülen pH değerlerinin 24. saate gelindiğinde düşerek sırasıyla $4,04\pm 0,01$, $4,03\pm 0,03$ ve $4,12\pm 0$ değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir. Fermantasyon boyunca pH düşüşü devam ederek, 72. saate gelindiğinde besiyeri pH'ları sırasıyla $3,84\pm 0,01$, $3,76\pm 0,01$ ve $3,92\pm 0,01$ olarak ölçülmüştür. Fermantasyon sonucunda elde edilen pH değerleri istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklılık göstermekle beraber ($p<0,05$), en düşük pH değeri HUF16M2K10004 kodlu suş ile çalışıldığında elde edilmiştir.

Fermantasyon süresince üretilen protein miktarı incelendiğinde, 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlara ait ortamlarda başlangıçtaki protein miktarları sırasıyla $1,51\pm 0,08$, $2,16\pm 1,51$ ve $2,31\pm 0,18$ (%w/w) olarak tespit edilmiştir. Fermantasyonda 48. saate gelindiğinde üretilen protein miktarlarında 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda yaklaşık %1 ($2,19\pm 0,08$), %3 ($5,00\pm 0,1$) ve %2 ($4,02\pm 0,05$) oranında artış gözlenmiştir. Literatürde elma posası kullanılarak hazırlanan besiyerinde *S. cerevisiae* kullanılarak 25°C'de 7 gün boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda $\%5,0\pm 0,1$ üretilen protein miktarı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda çalışmada HUF16M2K10004 kodlu suş kullanılarak tespit edilen protein miktarının literatürle uyumlu olduğu söylenebilir [110].

Sonuç olarak elma-armut (%50-50, w/w) besiyerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar ayrı ayrı kullanılarak 160 rpm’de 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda, üç suş için de en yüksek hücre konsantrasyonu, biyokütle verimi ve üretilen protein miktarlarına 48. saatte ulaşılmıştır. Bununla beraber HUF16M2K10004 kodlu suşun 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlara kıyasla daha yüksek hücre konsantrasyonuna ulaştığı, protein üretme kapasitesinin ve biyokütle veriminin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Kayısı-çilek (%70-30, w/w) besiyerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlarla 160 rpm’de 28°C’de 72 saatlik fermantasyon boyunca 24 saat aralıklarla ölçümü gerçekleştirilen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) analizlerin sonuçları Şekil 4.9’da görülmektedir. Hücre konsantrasyonları değişimleri incelendiğinde, üç suşta da 0-24. saatler aralığında artış gözlenmiştir. Fermantasyonda 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için 24. saatin sonucunda hücre konsantrasyonları “log (CFU/mL)” cinsinden sırasıyla $6,97 \pm 0,02$, $7,09 \pm 0,09$ ve $7,13 \pm 0,02$ olarak tespit edilmiştir. Ardından 48. saatte değerlerin sırasıyla $7,19 \pm 0,01$, $6,99 \pm 0,01$ ve $7,13 \pm 0,02$ ’ye ulaştığı görülmektedir. Bu doğrultuda HUF16M2K10004 kodlu suşun 24. saatten sonra durağan faza ve ardından ölüm fazına girmeye başladığı; HUF16M3G11088 kodlu suşun ise durağan faza girdiği söylenebilir. Fermantasyon sonucunda hücre konsantrasyonları “log (CFU/mL)” cinsinden karşılaştırıldığında ise en yüksek gelişimi 9763 kodlu kontrol suşu ($7,15 \pm 0,01$) ve HUF16M3G11088 ($7,11 \pm 0,01$) kodlu suş göstermiştir.



Şekil 4. 9. Kayısı(%70)-Çilek(%30) besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (log CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.

Fermantasyon sırasında elde edilen biyokütle verimleri (mg/mL) incelendiğinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için başlangıçta sırasıyla $12,19 \pm 0,36$, $6,61 \pm 0,09$ ve $15,77 \pm 0,34$ mg/mL olan değerlerin 24. saate gelindiğinde artarak $12,79 \pm 0,54$, $8,29 \pm 0,36$ ve $15,64 \pm 0,25$ 'e ulaştığı tespit edilmiştir. Fermantasyonda 24. saatten sonra 9763 ve HUF16M2K10004 kodlu suşlarda biyokütle veriminde değişim gözlenmezken, HUF16M3G11088 kodlu suşta ise fermantasyon boyunca biyokütle veriminde değişim meydana gelmemiştir. Fermantasyon sonucunda 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlara ait tespit edilen biyokütle verimleri sırasıyla $12,71 \pm 0,18$, $8,47 \pm 0,02$ ve $15,28 \pm 0,61$ mg/mL'dir.

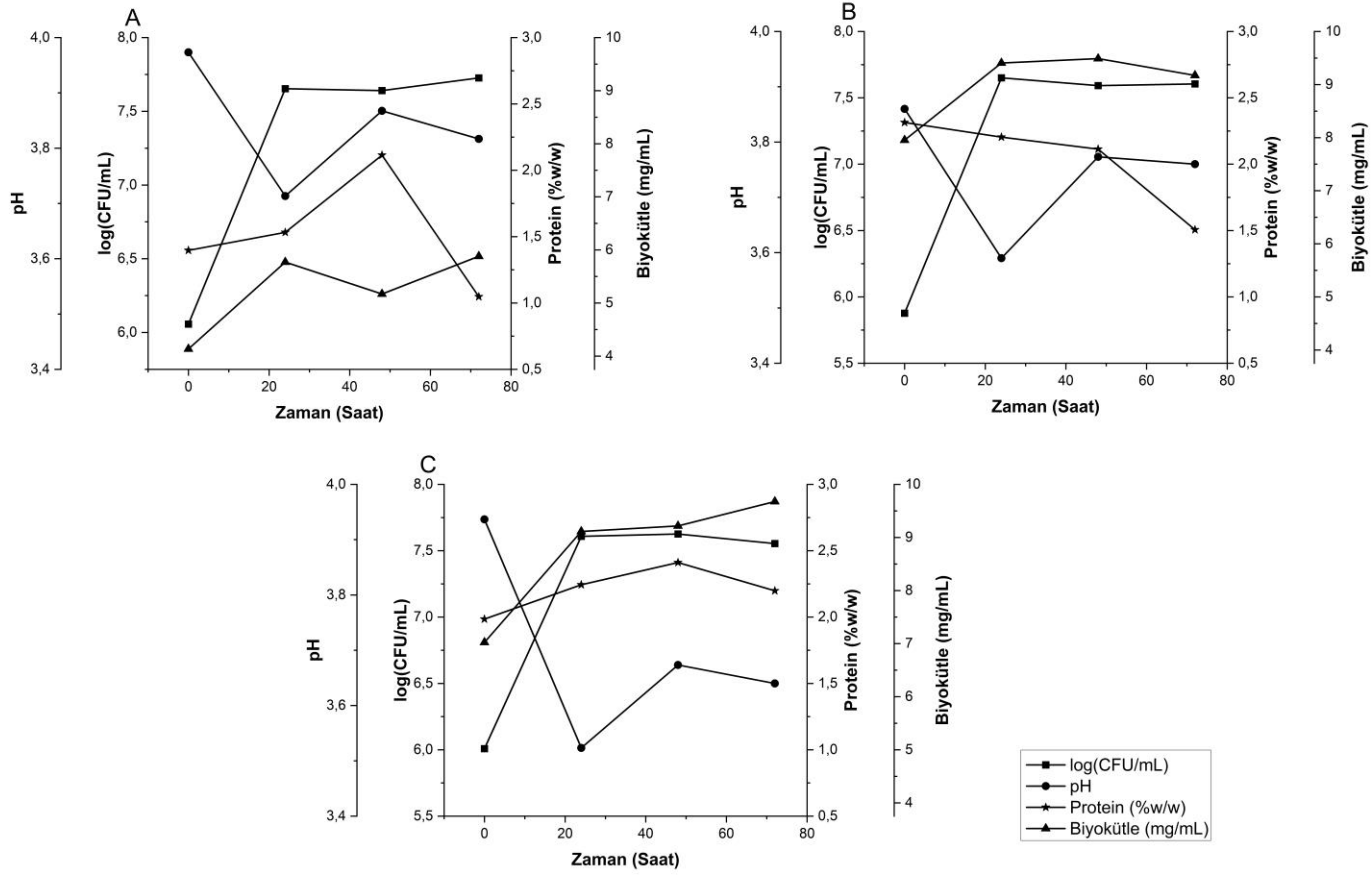
Fermantasyonda ölçülen pH değişimlerinde inokülasyonun ardından 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 suşlar için pH değerlerinin sırasıyla $3,73 \pm 0,02$, $3,72 \pm 0,01$, $3,70 \pm 0,01$ 'den $3,66 \pm 0,01$, $3,65 \pm 0,01$ ve $3,63 \pm 0,01$ 'e düştüğü gözlemlenmiştir. Değerlerin üç suş için de 24. saatten sonra artış gösterdiği tespit edilmiştir. Fermantasyon sonucunda ise pH değerleri sırasıyla $3,74 \pm 0,01$, $3,74 \pm 0,01$ ve $3,71 \pm 0,01$ 'dir.

Fermantasyon ortamında üretilen protein miktarları incelendiğinde 0.saatte 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar için sırasıyla $9,34 \pm 0,92$, $7,08 \pm 0,27$ ve $14,47 \pm 0,17$ (%w/w) olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyonda 48. saate gelindiğinde HUF16M2K10004 kodlu suşta üretilen protein miktarının %2 arttığı ($9,34 \pm 0,09$) tespit edilmiştir. Ancak 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda fermantasyon süresince analiz edilen protein miktarları, başlangıçta ölçülen değerlerin altında kalmıştır.

Kayısı-çilek (%70-30, w/w) besiyerinde pH değerlerinin 24. saatten itibaren arttığı gözlenmiştir. Literatürde *S. cerevisiae* ile beyaz üzüm şırası kullanılarak oluşturulan besiyerinde 20°C'de 160 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda 0-50. saat aralığında pH değerlerinin 3,32'den 3,14'e düştüğü, ardından değerlerin fermantasyon boyunca yükseldiği ve 3,29 değerine ulaştığı gözlenmiştir [111]. Değerlerdeki bu yükselişin aynı zaman aralığındaki etanol konsantrasyonu artışından kaynaklandığı bildirilmiştir. Buradaki çalışmada fermantasyon ortamında etanol ölçümü yapılmamakla beraber pH ölçüm profilinin benzerliği nedeni ile ortamda etanol inhibisyonu olabileceği

yorumlanmıştır. Ayrıca literatürde %5, 10 ve 20 oranlarında kayısı posası kullanılarak oluşturulan besiyerlerinde biyoetanol üretimi amacıyla 30 °C'de 72 saat süreyle fermantasyon gerçekleştirilmiş ve kayısı posasından besiyeri formülasyonu oluşturulmadan önce %1 oranında sülfirik asit ve selülaz enzimi kullanılarak lignoselülozik içeriğin degradasyonu için ön işlem uygulanmıştır [112]. Bu çalışmada ise elde edilecek proteinin gıda amaçlı kullanımı hedeflendiğinden lignoselülozik içeriğin degradasyonu için yalnızca mekanik olarak bir parçalama işlemi kullanılmıştır. Bununla beraber meyve posasıyla gerçekleştirilen fermantasyonda yüksek viskozite sebebiyle oksijen transferinin etkileneceği ve fermantasyon veriminin düşebileceği bildirilmiştir [108]. Ayrıca bir başka araştırmada *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyonda kullanılan substratın viskozitesinin hücre morfolojisine etki ettiği ve mikroorganizma gelişiminde stres yaratabileceği tespit edilmiştir [113]. Bu durumda, kayısı-çilek (%70-30, w/w) besiyerinde lignoselülozik degradasyonun sağlanması için yapılan işlemin yetersiz kalması veya besiyerin viskoz yapıda olması nedeniyle *S. cerevisiae* suşlarının gelişiminin etkilenmesi sonucunda suşların karbon kaynaklarını kullanabileceği uygun koşullar oluşmadığı yorumu yapılabilir. Dolayısıyla, bu koşullar 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için bir stres faktörü oluşturarak fermantasyonda beklenen şekilde protein ve biyokütle üretiminin gerçekleşmemesine neden olduğu şeklinde açıklanabilir. Fakat olası stres faktörlerine HUF16M2K10004 kodlu suşun diğer suşlara kıyasla daha iyi adapte olduğu gözlenmiştir.

Şeftali besiyerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlarla 160 rpm'de 28°C'de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda 24 saat aralıklarla ölçümü gerçekleştirilen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) analizlerin sonuçları Şekil 4.10'da görülmektedir. Bu besiyerinde üç suş için de inokülasyondan sonra 24. saate gelindiğinde hücre konsantrasyonları artış göstererek "log (CFU/mL)" cinsinden ortalama 7,6'ya ulaşmıştır. Üç suş da 24. saatin ardından durağan faza girmiştir. Fermantasyonda 72. saatin sonuna gelindiğinde "log (CFU/mL)" cinsinden en yüksek hücre konsantrasyonu sırasıyla 9763 (7,73±0,01) kodlu suшта tespit edilmiştir.



Şekil 4. 10. Şeftali besiyerinde 9763 (A), HUF16M2K10004 (B) ve HUF16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.

Fermantasyon süresince 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda besiyerindeki biyokütle verimi değişimi incelendiğinde, fermantasyon başlangıcında sırasıyla $4,13\pm 0,14$, $7,95\pm 0,05$ ve $7,02\pm 0,77$ mg/mL olan değerlerin 24. saatte artarak $5,77\pm 0,16$, $9,41\pm 0,16$ ve $9,11\pm 0,52$ mg/mL'ye ulaştığı görülmektedir. Suşlarda biyokütle verimlerinde genel olarak artış gözlenmekle beraber, artış hızı hücre konsantrasyonu gelişimi ile doğru orantılı olarak, 48. saat itibariyle suşların durağan faza girmesi sebebiyle giderek yavaşlamıştır. Fermantasyon sonucunda elde edilen biyokütle verimleri (mg/mL) sırasıyla $5,88\pm 0,19$, $9,17\pm 0,05$ ve $9,68\pm 0,21$ olmakla beraber, istatikselsel olarak en yüksek biyokütle verimine sahip suş HUF16M3G11088 kodlu suştur ($p<0,05$).

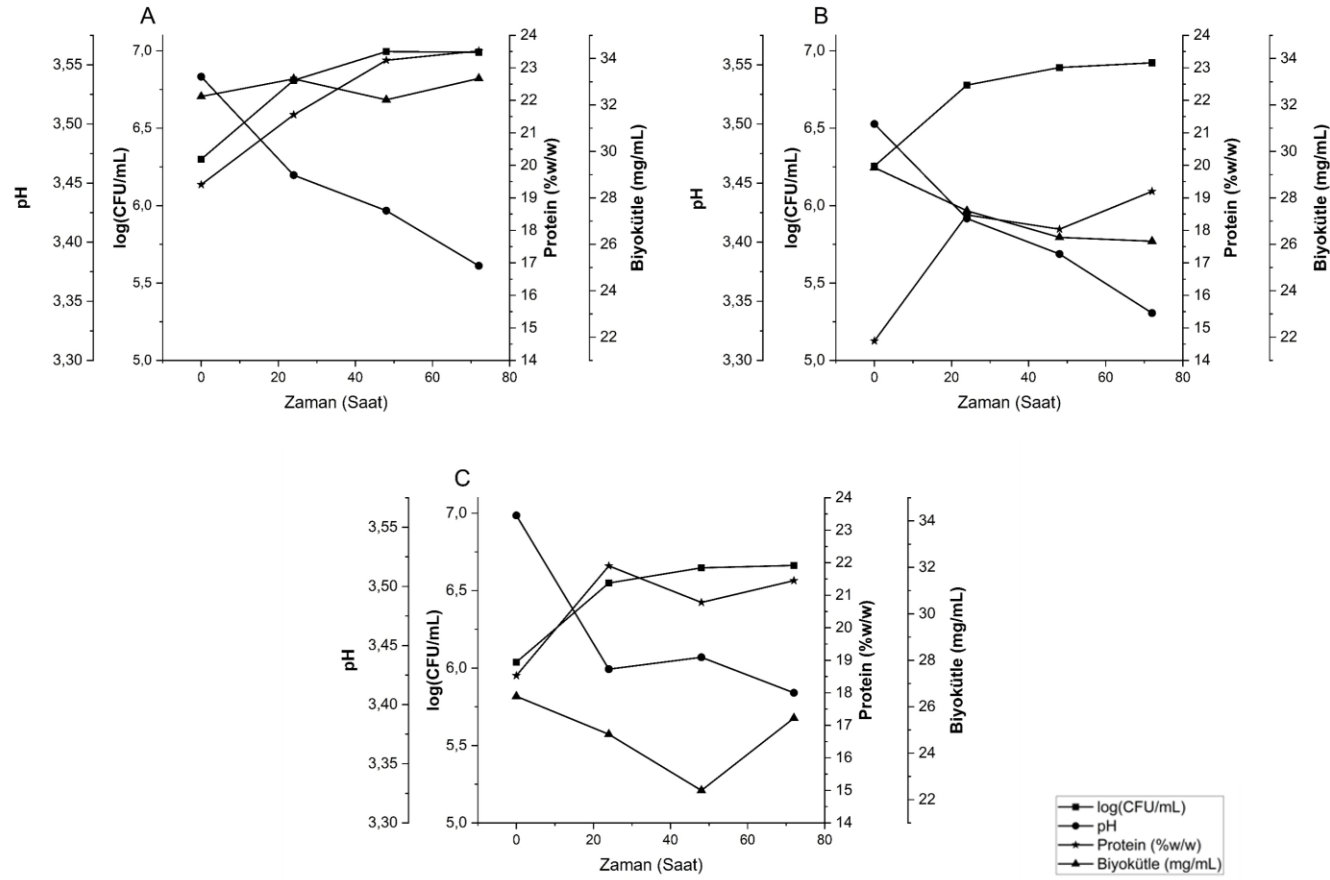
Besiyerindeki pH değişimi incelendiğinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar için başlangıçta sırasıyla $3,97\pm 0,01$, $3,86\pm 0$ ve $3,94\pm 0,01$ olan pH değerlerinin 24. saatte azalarak $3,71\pm 0,04$, $3,59\pm 0$ ve $3,52\pm 0,01$ 'e düştüğü gözlemlenmiştir. Ardından pH değerlerinde 48. saat itibariyle artış gözlenmiştir.

Fermantasyon süresince üretilen protein miktarları (%w/w) incelendiğinde inokülasyonun ardından protein değerlerinin sırasıyla $1,4\pm 0,96$, $2,31\pm 0,94$ ve $1,98\pm 0,9$ iken 24. saate gelindiğinde $1,53\pm 0,59$, $2,2\pm 0,63$ ve $2,24\pm 0,59$ 'a ulaştığı görülmektedir. Fermantasyonda 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda 48. saate gelindiğinde üretilen protein miktarları yaklaşık %1 (w/w) civarında artış göstererek sırasıyla $2,11\pm 0,59$ ve $2,41\pm 0,27$ değerlerine ulaşmıştır. Fermantasyonda 0-48. saatler aralığında HUF16M2K10004 kodlu suşta ise üretilen protein miktarında değişim olmadığı ve ardından 48-72. saat aralığında azaldığı gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonucunda en yüksek protein üretimine sahip suş ise HUF16M3G11088 ($2,19\pm 0,24$) kodlu suş olmuştur.

Şeftali besiyerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşların 24. saat itibariyle durağan faza girdiği ve ortamın pH değerlerinin arttığı görülmektedir. Bununla beraber 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda üretilen protein miktarlarının 48. saatte en yüksek değere ulaştığı ardından azalmaya başladığı görülmektedir. Fermantasyonda pH değerlerindeki yükseliş, kayısı-çilek (%70-%30, w/w) besiyerinde

de bahsedildiği üzere etanol konsantrasyonu artışından kaynaklanıyor olabilir. Benzer şekilde besiyeri viskozitesinin yüksek olması sebebiyle hücre gelişimi üzerinde oluşan stres de suş gelişimini, protein ve biyokütle verimini etkilediği şeklinde yorumlanabilir. Bununla beraber literatürde benzer bir durum incelendiğinde ise, papaya meyvesi kabuklarından oluşturulan besiyerinde karışık maya ve bakteri suşları kullanılarak 25°C’de 168 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda üretilen protein miktarının fermantasyon boyunca azalış gösterdiği ve bu durumun ortamda hücre gelişimi için besleyici bileşenlerin azalmasından veya hücre kültürünün yaşlanması ve otolizinden kaynaklandığı bildirilmiştir [114]. Sonuç olarak, 9763 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda oluşan stres faktörüne rağmen protein üretiminde artış gözlenirken, ortamdaki besleyici bileşenlerin azalması sebebiyle artışın yavaşladığı, HUF16M2K10004 kodlu suşun ise stres faktörlerinden etkilenecek fermantasyonda beklenen şekilde protein ve biyokütle üretiminin gerçekleşmemesine neden olduğu yorumu yapılabilir.

Şekil 4.11’de nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlarla 160 rpm’de 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda 24 saat aralıklarla ölçümü gerçekleştirilen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) analizlerin sonuçları Şekil 4.8’de görülmektedir. Bu besiyerinde başlangıçtaki hücre konsantrasyonları “log (CFU/mL)” cinsinden 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar için sırasıyla 6,3±0,05, 6,26±0,01 ve 6,04±0,06 iken 24. saatte artarak 6,81±0,01, 6,78±0,01 ve 6,55±0,03 değerlerine ulaşmıştır. Suşlarda hücre konsantrasyonlarındaki artışın 48. saate kadar devam ettiği dikkat çekmektedir. Bu doğrultuda 48. saate gelindiğinde hücre konsantrasyonları sırasıyla 7,00±0,03, 6,89±0,01 ve 6,65±0,04 değerlerine ulaştığı ve 48. saatin ardından üç suşun da durağan faza girdiği gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonucunda, 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar için hücre konsantrasyonları “log (CFU/mL)” cinsinden sırasıyla 6,99±0,02, 6,92±0,07 ve 6,66±0 olarak tespit edilmiştir. Bu doğrultuda fermantasyon sonucunda 9763 (6,99±0,02) ve HUF16M2K10004 (6,92±0,07) kodlu suşlar en yüksek hücre konsantrasyonuna sahiptir.



Şekil 4. 11. Nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde 9763 (A), 16M2K10004 (B) ve 16M3G11088 (C) izolasyon kodlu suşlarla gerçekleştirilen fermantasyon boyunca analiz edilen hücre sayısı (log CFU/mL), pH, üretilen protein miktarı (%w/w) ve biyokütle verimi (mg/mL) değişimi.

Fermantasyonda başlangıçta 9763 kodlu suş için $32,36 \pm 0,82$ mg/mL olan biyokütle verimi 24. saate gelindiğinde artarak $33,12 \pm 2,73$ mg/mL'ye ulaşmıştır. Fermantasyon boyunca HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşların biyokütle verimlerinde dalgalanmalar gözlenmiştir. Bununla beraber 9763 kodlu suşta 24. saatin ardından biyokütle verimlerinde değişim gözlenmemiştir. Fermantasyon sonucunda ise istatikselsel olarak en yüksek ($p < 0,05$) biyokütle verimi 9763 kodlu kontrol suşu kullanılarak elde edilirken ($33,14 \pm 0,81$ mg/mL), HUF16M2K10004 ($26,13 \pm 0,1$ mg/mL) ve HUF16M3G11088 ($25,51 \pm 0,55$ mg/mL) izolasyon kodlu suşlara ait biyokütle verimleri birbirinden anlamlı fark göstermemektedir ($p > 0,05$).

Besiyerinde meydana gelen pH değişimleri incelendiğinde üç suşta da genel olarak fermantasyon boyunca pH'da düşüş gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonucunda istatikselsel olarak en düşük pH değerine HUF16M2K10004 ($3,34 \pm 0,01$) izolasyon kodlu suş ile ulaşılmıştır ($p < 0,05$). Başlangıçta 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlara ait pH değeri sırasıyla $3,54 \pm 0,01$, $3,50 \pm 0,01$ ve $3,56 \pm 0,01$ iken, 72. saatin sonunda ölçülen pH değerleri sırasıyla $3,38 \pm 0,01$, $3,34 \pm 0,01$ ve $3,41 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir.

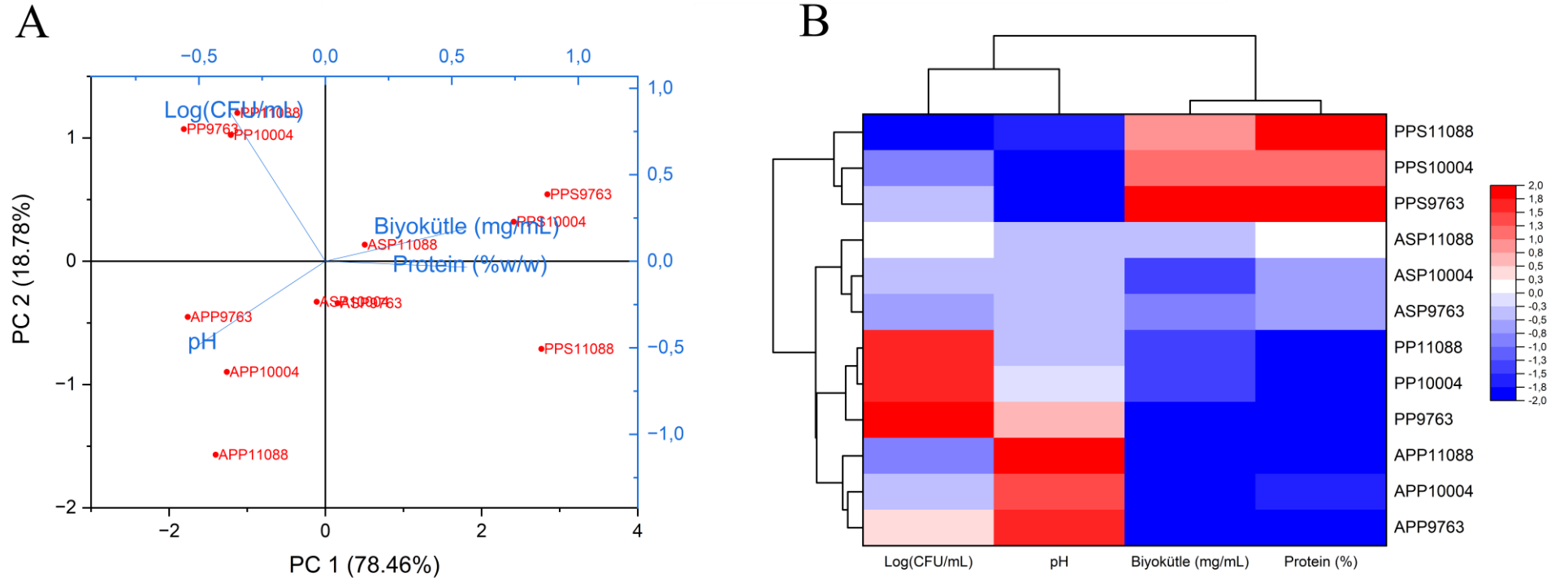
Suşlarda fermantasyon boyunca hücre gelişimiyle uyumlu olarak üretilen protein miktarında artış olduğu görülmektedir. Başlangıçta 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar kullanılarak ölçülen protein miktarları $19,41 \pm 0,03$, $14,60 \pm 0,01$ ve $18,53 \pm 0,1$ (%w/w) iken, artış göstererek 24. saate gelindiğinde $21,55 \pm 0,03$, $18,48 \pm 0,08$ ve $21,9 \pm 0,43$ (%w/w) değerlerine ulaşmıştır. Ardından 48. saate gelindiğinde 9763 kodlu suşta üretilen protein miktarında artış devam ederek $23,23 \pm 0,31$ 'e (%w/w) ulaşmıştır. HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlarda ise 48-72. saatler aralığında üretilen protein miktarlarında dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Bununla beraber fermantasyon sonucunda en yüksek protein üretimine sahip suşların 9763 ($23,52 \pm 0,1$) ve HUF16M3G1108 ($21,45 \pm 0,18$) kodlu suşlar olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde nar meyvesi atıkları kullanılarak *S. cerevisiae* ile 25°C'de 240 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda üretilen protein miktarının 96. saatte en yüksek değere ulaşarak $9,64 \pm 1,22\%$ şeklinde tespit edildiği bildirilmiştir [98]. Buna

göre, 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlar ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50 w/w) besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada literatüre kıyasla daha yüksek oranda protein üretilmiştir.

Nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde en yüksek protein üretimine 9763 kodlu kontrol suş ile ulaşılmıştır. Yerel suşlar arasında ise protein üretimi en yüksek suşun HUF16M3G11088 olduğu tespit edilmiştir. Nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyonda, elma-armut (%50-50), kayısı-çilek (%70-30 w/w) ve şeftali (%100 w/w) besiyerlerine kıyasla daha yüksek biyokütle verimine ve protein üretimine ulaşılmıştır. Ayrıca, nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) besiyerinde 24-48 saat aralığında hücre konsantrasyonunda artış gözlemlenirken diğer besiyerlerinde ise 24. saat itibarıyla suş gelişimi yavaşlayarak durağan faza girdikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) yaş posa karışımını içeren ortam hem 9763 hem de kullanılan orijinal ve yerel suşlar için fermantasyon yolu ile mikrobiyal protein üretimi için uygun olduğu tespit edilmiştir.

4.7.1. Isı Haritası ve Temel Bileşen Analizi

Elma-armut (%50-50, w/w) ; kayısı ve çilek posalarından (%70-30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) yaş posalarından hazırlanan besiyerlerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 izolasyon kodlu suşlarla 28°C'de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda ölçülen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) parametreler ile suşlar ve besiyeri çeşitleri arasındaki ilişkinin incelenmesi için temel bileşen analizi (Şekil 4.12, A) ve ısı haritası analizleri (Şekil 4.12, B) uygulanmıştır. Analiz gerçekleştirilirken 72 saat boyunca suşlara ve besiyerlerine ait ölçülen parametrelere ait veriler normalize edilerek kullanılmıştır.



Şekil 4. 12. Yaş posalar kullanılarak 28°C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda ölçülen ortalama canlı hücre sayısı (Log(CFU/mL)), biyokütle verimi (mg/mL), üretilen protein miktarı (%) ve pH değerlerine dair temel bileşen analizi (A) ve ısı haritası (B). APP: Elma-Armut (%50-50, w/w), PPS: Nar çekirdeği-nar kabuğu (%50-50), ASP: Kayısı-çilek (%70-30, w/w), PP: Şeftali. 9763: Kontrol suşu, 10004: HUF16M2K10004 kodlu suş, 11088: HUF16M3G11088 kodlu suş.

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere PCA analizinde gözlemlenen veriler, toplam varyasyonunun %97,24’ünü oluşturmuştur. Birinci ana bileşenin (PC1) nar çekirdeği-nar kabuğu (%50-50, w/w) ve kayısı-çilek (%70-30, w/w) örneklerini, elma-armut (%50-50 w/w) ve şeftali (%100, w/w) örneklerinden ayırmıştır. Nar çekirdeği-nar kabuğu besiyerinde (PPS) HUF16M3G11088 kodlu suşa (11088) ait örneğin (PPS11088) ayrı kümelenildiği gözlemlenmiştir.

PCA analiz sonuçlarına göre PPS örnek gruplarının APP (Elma-armut, %50-50 w/w) ASP (Kayısı-çilek, %70-30 w/w) ve PP (Şeftali, %100 w/w) örnek gruplarına kıyasla daha yüksek protein ve biyokütle verimine sahip olması sebebiyle birinci ana bileşenin pozitif tarafında yer aldığı görülmektedir. PP (Şeftali, %100 w/w) örnek gruplarında, Bölüm 4.7’de belirtildiği gibi, besiyerlerindeki olası yüksek viskozite veya etanol inhibisyonu nedeniyle diğer besiyerlerine kıyasla daha düşük protein üretimi ve biyokütle verimi ile sonuçlanmış olabilir.

Şekil 4.12’de yer alan ısı haritasında (B) renk skalası örneklerle göre otomatik olarak ölçeklendirilen, +2 ila -2 arasında normalleştirilmiş analiz değerlerinin yoğunluklarını temsil ederken, koyu kırmızı ve mavi sırasıyla yüksek ve düşük tepe yoğunluklarını temsil etmektedir. Örneklerin ilişkisini gösteren dendrogramda sol sütunda 2 ana grup olduğu görülmektedir; ilk grupta APP (Elma-armut, %50-50 w/w), PP (Şeftali, %100 w/w), ASP (Kayısı-çilek %70-30 w/w) ve ikinci grupta ise PPS (Nar kabuğu-nar çekirdeği, %50-50 w/w) örnekleri yer almaktadır. Sol sütunda protein (%) içeriklerine göre ayırım incelendiğinde PPS (Nar çekirdeği-nar kabuğu, %50-50 w/w) örnek grubunda 72 saatlik fermantasyon sonucunda ortalama %20,66 protein içeren PPS11088’in, sırasıyla %17,58 ve %21,93 protein içeriğine sahip olan PPS10004 ve PPS9763’ten ayrıldığı görülmektedir. Ortalama 24,79-32,71 mg/mL biyokütle verimine sahip PPS (Nar çekirdeği-nar kabuğu %50-50 w/w) besiyeri diğer APP (Elma-armut, %50-50 w/w), PP (Şeftali, %100 w/w) ve ASP (Kayısı-çilek %70-30 w/w) besiyerlerinden ayrılmaktadır. Üretilen ortalama protein miktarı ve biyokütle verimi açısından en yüksek değere sahip besiyerinin PPS (nar çekirdeği-nar kabuğu %50-50, w/w) olduğu görülmektedir. PPS örnekleri arasında ise üretilen ortalama protein miktarı ve biyokütle

verimi en düşükten en yükseğe sırasıyla PPS1004, PPS11088 ve PPS9763 olduğu tespit edilmiştir.

Ölçülen biyolojik (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) ve fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) parametrelere ait dendrogramda ise 2 ana grup olduğu görülmektedir. Birinci grupta canlı hücre konsantrasyonu (CFU/mL) ve pH değerleri izlenebilirken, ikinci grupta biyokütle ve protein değerleri görülmektedir. Elde edilen ısı haritası profili ve PCA analizi uyumluluğu doğrultusunda canlı hücre sayısı (CFU/mL) değerleri ile pH; ortalama biyokütle verimi ve üretilen protein miktarı değişiminin birbiriyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.

Meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalar ile oluşturulan besiyerlerinde 28°C'de 72 saat boyunca 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşlar ile gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda en düşük biyokütle verimi elma-armut (5,01-5,70 mg/mL) besiyerinde tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle verimi ise nar çekirdeği-nar kabuğu besiyerinde (25,51-33,14 mg/mL) gözlenmiştir. En düşük protein üretimi elma-armut (1,50-2,62 %w/w) ve şeftali (1,05-2,20 %w/w) besiyerlerinde tespit edilmiştir. En yüksek protein üretimi gerçekleştirilen besiyeri ise nar çekirdeği-nar kabuğu besiyeridir (19,20-23,51 %w/w).

Sonuç olarak ısı haritası ve PCA ile açıklanan sonuçların Bölüm 4.7'de incelenen sonuçları destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Fermantasyonda kullanılan ortamlar birbiriyle karşılaştırıldığında nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri (PPS), mikrobiyal protein üretimi için yüksek biyokütle verimine ve protein üretimine sahip bir substrattır. PPS besiyerinde en yüksek biyokütle verimine sahip suş 9763 (33,14±0,81 mg/mL) kodlu suştur. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyerinde yerel suşlar olan HUF16M2K10004 (26,13±0,10 mg/mL) ve HUF16M3G11088 (25,51±0,55 mg/mL) kodlu suşlar ürettikleri biyokütle miktarı bakımından karşılaştırıldığında ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). Üretilen protein miktarları incelendiğinde ise en düşük protein üretimi HUF16M2K10004 (19,2 ±0,01 %w/w) suşun kullanıldığı durumda tespit edilmiştir. En yüksek protein üretimi 9763 (23,52±0,1 %w/w) kodlu suşta tespit edilirken,

HUF16M3G11088 kodlu suşun ($21,45 \pm 0,18$ %w/w) da orijinal ve yerel suşlar arasında en yüksek protein üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.8. Üretilen Mikrobiyal Proteinin Analizi

Bölüm 4.7’de yaş posalar ile 28°C ’de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda elde edilen veriler ile temel bileşen ve ısı haritası analizleri değerlendirildiğinde, biyoproses uygulanarak fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretiminde incelenen substratlar arasında nar kabuğu-nar çekirdeği besiyerinin (PPS) öne çıktığı görülmektedir. Bu ortamda en yüksek protein ve biyokütle üretimi 9763 kodlu kontrol suşunda gözlenmekle beraber, kontrol suşuna alternatif olan yerel HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suş ile üretilen mikrobiyal protein ileri analizler için seçilmiştir. Bu amaçla nar kabuğu-nar çekirdeği besiyerinin (PPS) HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suş kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda elde edilen örneğe, Bölüm 3.2.4’te belirtilen biyokütle pürifikasyonu işlemi uygulanmıştır. İşlem sonucunda elde edilen Şekil 4.13’de gösterilen liyofilize kuru toz formdaki üründe gerçekleştirilen kuru madde-nem, primer metabolit, nükleik asit (DNA) ve yaşam döngüsü (LCA) analizlerinin sonuçları aşağıda tartışılmıştır.



Şekil 4. 13. Nar çekirdeği-nar kabuğu (%50-50 w/w) besiyerinde HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda elde edilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal protein.

4.8.1. Kuru madde ve Nem Analizi

Örneklere gerçekleştirilen nem ve kuru madde analizlerine dair veriler Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

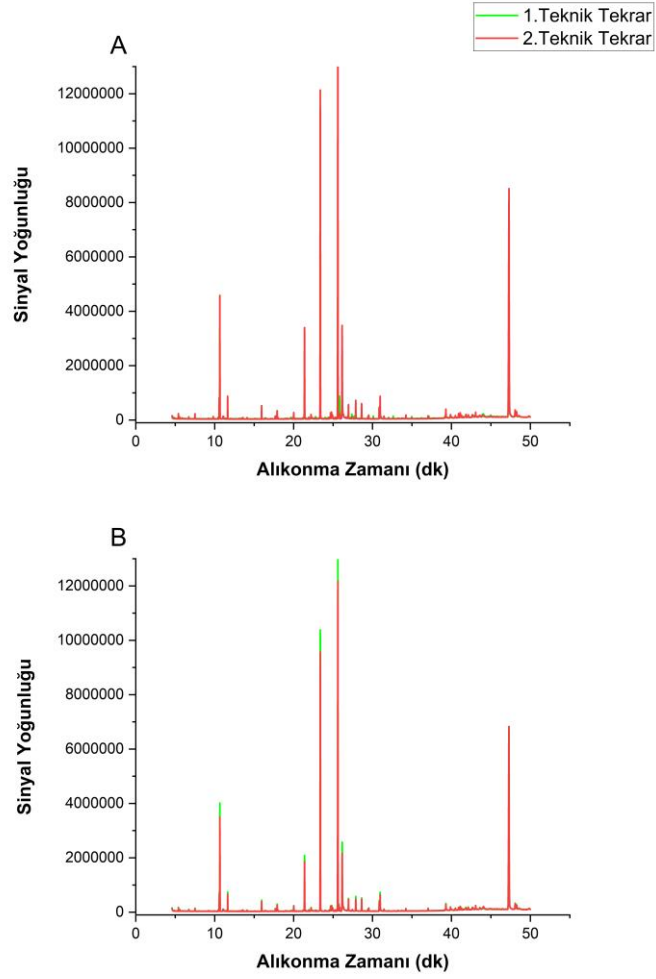
Çizelge 4. 9. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş ile 28°C’de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen mikrobiyal proteinin (PPS11088) %nem ve %kuru madde değerleri.

%Nem	Ortalama %Nem	%Kuru madde	Ortalama %Kuru madde
6,10		93,90	
9,70	7,90 ± 1,47	90,30	92,10 ± 1,47
7,90		92,10	

Literatürdeki çalışmalarda toz halindeki mikrobiyal proteine ait nem oranları yaklaşık %4-10 aralığında değişmektedir [115,116]. Buna göre Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş ile 28°C’de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen mikrobiyal proteinin (PPS11088) nem içeriği %7,90 ± 1,47 olduğundan elde edilen sonuç literatürle uyumludur.

4.8.2. Primer Metabolit Analizi

Bu çalışmada nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş ile 28°C’de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen liyofilize kuru toz formdaki üründe mikrobiyal proteinde GC-MS sistemi ile iki biyolojik ve iki teknik tekrar olacak şekilde hedeflenmemiş birincil metabolit analizi Denklem 3.9 kullanılarak kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda toplamda 71 adet metabolit varlığı tespit edilmiştir. Metabolitlerin toplam iyon akımı (TIC) kromatogram görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4. 14. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve HUF16M3G11088 kodlu suş ile üretilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde (PPS11088) 4-50 dk arasında elde edilen metabolitlerin GC-MS toplam iyon akımı (TIC) görüntüleri. A) Birinci biyolojik tekrara ait kromatogramlar; B) İkinci biyolojik tekrara ait kromatogramlar.

Kromatogramlar, 4 ile 50 dakikalık GC-MS analizi süresince hedeflenmemiş birincil metabolitlere ait pikleri göstermektedir. Tüm metabolitler derivatizasyon işlemi dolayısıyla trimetilsilil (TMS) türevleri formunda elde edilmiş ve on gruba ayrılmıştır: (1) aminoasit ve türevleri, (2) yağ asitleri ve türevleri, (3) gliserolipitler, (4) organik asit ve türevleri, (5) şekerler ve türevleri, (6) alkoller ve türevleri, (7) fenolik bileşikler, (8) vitaminler, (9) fitosteroller, (10) diğerleri. Metabolitlerin adı, alıkonma zamanı ve metabolit miktarına dair bilgi Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 10. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve HUF16M3G11088 kodlu suş ile üretilen mikrobiyal proteine (PPS11088) ait primer metabolit analizi sonuçları.

No	Metabolit Adı	Metabolit Miktarı (mg/kg)*			
		RT (dk)	1.Biyolojik Tekrar	2.Biyolojik Tekrar	Toplam
Aminoasit ve türevleri					
1	L-Alanine, 2TMS derivative	6,719	0,028±0,004	0,016±0,003	0,045±0,008
2	L-Valine, 2TMS derivative	9,211	0,012±0,001	0,007±0,001	0,018±0,003
3	Urea, 2 TMS derivative	9,799	ND	0,028±0,000	0,028±0,000
4	Glycine, 3TMS derivative	11,393	0,015±0,001	0,010±0,001	0,025±0,003
5	L-Serine, 3TMS derivative	12,783	0,010±0,001	0,004±0,002	0,014±0,004
6	L-Threonine, 3TMS derivative	13,405	0,016±0,001	0,009±0,002	0,025±0,004
7	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	19,047	0,009±0,000	0,007±0,003	0,016±0,002
Yağ asitleri ve türevleri					
8	Myristic acid, TMS derivative	23,989	0,034±0,014	0,036±0,012	0,069±0,011
9	Palmitelaidic acid, TMS	27,460	0,058±0,004	0,046±0,002	0,103±0,007
10	Palmitic Acid, TMS derivative	27,874	0,331±0,004	0,256±0,028	0,587±0,046

11	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	30,845	0,217±0,012	0,179±0,053	0,396±0,038
12	Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative	30,961	0,411±0,020	0,288±0,011	0,699±0,072
13	Stearic acid, TMS derivative	31,449	0,065±0,004	0,058±0,025	0,123±0,015
Gliserolipitler					
14	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	37,035	0,089±0,006	0,057±0,019	0,145±0,022
15	Glycerol monostearate, 2TMS derivative	39,879	0,158±0,008	0,109±0,021	0,267±0,031
Organik asit ve türevleri					
15	3-Hydroxybutyric acid, 2TMS derivative	5,877	ND	0,009±0,001	0,009±0,001
16	Sorbic acid, TMS derivative	9,392	0,008±0,002	ND	0,008±0,002
18	Butanedioic acid, 2TMS derivative	11,641	0,303±0,001	0,214±0,003	0,516±0,051
19	Glyceric acid, 3TMS derivative	12,035	0,010±0,001	0,006±0	0,017±0,002
20	Itaconic acid, 2TMS derivative	12,325	0,008±0,002	0,004±0,001	0,012±0,003
21	4-Hydroxybutanoic acid, 2TMS derivative	13,16	ND	0,008±0	0,008±0
22	Malic acid, 3TMS derivative	15,947	0,190±0,001	0,131±0,001	0,321±0,034
23	2-Isopropylmalic acid, O-trimethylsilyl-, bis(trimethylsilyl) ester	17,915	0,136±0,002	0,096±0,002	0,232±0,023
24	Pentanedioic acid, 2-(methoxyimino)-, bis(trimethylsilyl) ester	18,022	0,027±0,001	0,019±0,002	0,045±0,005

25	3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	19,141	0,015±0	0,013±0,002	0,028±0,002
26	Terephthalic acid, 2TMS derivative	22,682	0,018±0,002	ND	0,018±0,002
27	Azelaic acid, 2TMS derivative	22,913	0,032±0,003	0,017±0,011	0,049±0,011
28	Citric acid, 4TMS derivative	23,384	5,692±0,2	3,865±0,072	9,557±1,062
29	Quinic acid (5TMS)	24,169	0,017±0,001	0,015±0,01	0,033±0,006
Şekerler ve türevleri					
30	Erythritol, 4TMS derivative	16,448	0,019±0,002	0,013±0,001	0,032±0,004
31	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetrakis(trimethylsilyl) deriv., (, (R*,R*)-)	17,677	0,052±0,001	0,035±0,003	0,087±0,009
32	D-Arabinose, tetrakis(trimethylsilyl) ether, ethyloxime (isomer 2)	20,023	0,131±0,004	0,092±0,006	0,222±0,023
33	D-(+)-Arabitol, 5TMS	20,985	0,009±0,00	ND	0,009±0
34	D-Galactose, 6-deoxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	21,176	0,023±0,001	0,027±0,01	0,051±0,006
35	Xylitol, 5TMS	21,286	0,037±0,002	0,029±0,006	0,066±0,006
36	D-(+)-Ribono-1,4-lactone (R,S,R)-, 3TMS derivative	21,520	0,024±0,00	0,018±0,008	0,042±0,006
37	D-Ribofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	22,308	ND	0,035±0,014	0,035±0,014
38	D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	22,315	0,036±0,003	ND	0,036±0,003

39	L-Threitol, 4TMS derivative	22,769	0,029±0,003	ND	0,029±0,003
40	D-(+)-Talofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	23,538	0,026±0,002	0,022±0,009	0,048±0,006
41	D-(+)-Gluconolactone, 4TMS	24,680	0,143±0,003	0,095±0,004	0,238±0,028
42	D-Allose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	24,814	0,126±0,001	0,089±0,006	0,215±0,022
43	Gluconic acid, γ -lactone, 4TMS	24,904	0,087±0,006	0,092±0,034	0,179±0,02
44	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o- methyloxyme, (1Z)-	24,948	0,072±0,004	0,061±0,008	0,133±0,008
45	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o- methyloxyme, (1E)-	25,235	0,023±0,017	0,024±0,008	0,047±0,011
46	Sedoheptulose, 6TMS derivative	25,486	0,046±0,021	0,045±0,013	0,09±0,014
47	D-Mannitol, 6TMS	25,606	7,56±0,136	5,076±0,016	12,635±1,436
48	D-Galactonic acid, 6TMS	26,886	0,072±0,002	0,069±0,002	0,14±0,002
49	D-Gluconic acid, 6TMS	26,945	0,282±0,013	0,228±0,022	0,51±0,035
50	Myo-Inositol, 6TMS	28,616	0,272±0,004	0,229±0,035	0,501±0,032
51	D-Ribose, 4TMS derivative	33,708	ND	0,031±0,02	0,031±0,02
52	D-Myo-Inositol, 1,2,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) phosphate	34,222	0,088±0,004	0,071±0,014	0,159±0,013
53	Sucrose, 8TMS derivative	39,287	ND	0,202±0,008	0,202±0,008

54	D-(+)-Cellobiose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 1)	41,115	0,262±0,005	0,194±0,041	0,456±0,046
Alkoller ve türevleri					
55	2,3-Butanediol, 2TMS derivative	5,403	0,044±0,001	0,035±0,001	0,079±0,006
56	Ethanolamine, 3TMS derivative	10,434	0,023±0,001	0,014±0,004	0,038±0,006
57	Glycerol, 3TMS derivative	10,652	1,642±0,017	1,165±0,006	2,807±0,276
58	1,2,3-Butanetriol, 3TMS derivative	11,042	0,039±0,003	0,028±0	0,068±0,007
59	Hexaethylene glycol, 2TMS derivative	32,024	ND	0,041±0,03	0,041±0,03
Fenolik bileşikler					
60	Gallic acid, 4TMS derivative	26,150	1,750±0,005	1,321±0,285	3,072±0,297
61	Epigallocatechin (6TMS)	41,837	0,151±0,008	0,125±0,019	0,277±0,019
Vitaminler					
62	γ-Tocopherol, TMS derivative	42,742	0,115±0,006	0,132±0,05	0,247±0,031
Fitosteroller					
63	β-Sitosterol, TMS derivative	48,252	0,421±0,027	0,287±0,074	0,708±0,09

Diğerleri					
64	Silane, chlorotrimethyl-	5,994	0,002±0,001	0,0003±0	0,002±0,001
65	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	10,574	0,291±0,015	0,199±0,005	0,49±0,053
66	2-Pentamethyldisilanyloxybutane	13,02	ND	0,004±0,00	0,004±0,00
67	3,4-Dimethyl-1-pentamethyldisilyloxycyclohexane	15,068	0,010±0,00	0,010±0,00	0,018±0,002
68	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	22,212	0,09±0,00	0,07±0,006	0,154±0,012
69	[(2-{3,4-Bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}-3,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl)oxy](trimethyl)silane	41,265	0,121±0,01	0,041±0,044	0,162±0,053
70	5.alpha.-Androstan-2-hydroxymethylene-17.alpha.-methyl-17.beta.-ol-3-one, tri-trimethylsilyl	42,124	0,284±0,036	0,208±0,006	0,491±0,049
71	2,3,7,8-Tetrakis[(trimethylsilyl)oxy]chromeno[5,4,3-cde]chromene-5,10-dione	47,286	8,144±0,333	5,588±0,595	13,732±1,528

RT: Her bir metabolitin alıkonma zamanı

*: Tüm değerler, analiz edilen örneklerin kg'ı başına mg dahili standart (adonitol) eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 4.10 incelendiğinde nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve HUF16M3G11088 kodlu suş ile üretilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde alanin, valin, glisin, serin, treonin ve glutamik asit olmak üzere 6 adet aminoasit tespit edilmiştir. Ve örnekte bulunan miktar bakımından başlıca aminoasitlerin alanin, glisin ve treonin olduğu görülmektedir. Özellikle örnekte bulunan treonin ve valin aminoasitleri, FAO tarafından günlük diyetle tüketilmesi önerilmekte ve esansiyel aminoasitler olarak önem taşımaktadır [117,118]. Denklem 3.9 kullanılarak elde edilen treonin ve valin aminoasit miktarı oranı (1,39 thr:val), FAO tarafından yetişkinlerde günlük diyetle bulunması önerilen treonin ve valin aminoasit miktarları oranı (0,58 thr:val) ile uyumludur [117]. Alanin proteinlerde sıkça tespit edilen esansiyel olmayan aminoasitlerden biridir [119]. Örnekte diğer aminoasitlere kıyasla en yüksek miktarda L-Alanin aminoasitinin bulunduğu görülmektedir. Valin aminoasidi ise proteinlerin yapıtaşında bulunan esansiyel bir aminoasit olup insan vücudunda kas gelişimini ve onarımını desteklemektedir [120]. Esansiyel olmayan aminoasitlerden biri olan glisin aminoasidi ise peptit ve protein üretiminde yapıtaşı olarak görev almakla beraber insanlarda beyinde nörotransmitter bileşen olarak görev almaktadır [121]. Serin aminoasidi ise bitkisel ve hayvansal kaynaklarda bulunan esansiyel olmayan bir aminoasit olmakla beraber insanlarda protein sentezinde, hücre gelişiminde görev almakta ve nörolojik hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır [122]. Treonin aminoasiti ise yumurta ve süt gibi gıdalarda sıkça bulunan, *S. cerevisiae* ve bitki metaboliti olan esansiyel bir aminoasittir [123]. Glutamik asit ise esansiyel olmayan aminoasit olup, insan vücudunda birçok metabolik yolakta yer alan ve gıdalarda umami tadın algılanmasını sağlayan öncü bir bileşendir [124,125]. Ayrıca umami tat veren bileşenler günlük diyetle tuz alımını azaltmalarından dolayı önem taşımaktadır [126]. Bu doğrultuda ürünün bir gıda ingrediyesi olarak kullanımında ve tuz alımını azaltma potansiyeli olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada tespit edilen aminoasitler literatürde muz, turunçgil, patates kabuğu ve havuç posası ile *S. cerevisiae* kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda üretilen mikrobiyal proteinde kalitatif olarak benzerdir [127]. Bunlara ek olarak kuru toz formdaki son üründe bir aminoasit türeviden oluşan 0.028 mg/kg miktarında tespit edilmiştir. Üretilen fermantasyon sırasında *S. cerevisiae* tarafından arjinin aminoasitinin ornitin ve üreye degrades edilmesiyle üretildiği bildirilmektedir [128].

Son üründe miristik, palmitelaidik, palmitik, 9,12-oktadekadienoik (linoleik asit), oleik ve stearik (oktadekanoik asit) yağ asitleri olmak üzere toplamda 6 adet yağ asidi saptanmıştır. Örnekte başlıca bulunan yağ asitleri ise oleik ve palmitik yağ asitleridir. Miristik asit (tetradekanoik asit) uzun zincirli doymuş bir yağ asidi (C14:0) olmakla beraber insan vücudunda yağ birikimine neden olmaktadır. Buna karşın insan vücudunda protein üretim mekanizmalarında rol almaktadır [129]. Palmitelaidik asit (düz zincirli, tekli doymamış (C16:0) bir yağ asiti olmakla beraber palmitoleik asitin izomeridir. Bu yağ asidinin insulin duyarlılığı, kolesterol metabolizması ve hemostaz üzerinde olumlu etkilerinin olduğu ve glikoz veya doymuş yağ asitleri tarafından tetiklenen beta hücre apoptozunu önleyebileceği öne sürülmüştür [130]. Palmitik asit (C16:0), gıdalarda en çok rastlanan doymuş yağ asidi olmakla beraber yağ hücrelerinin membran fosfolipitleri ve triaçilgliserollerin yapısını oluşturmaktadır [131]. Bir omega-6 yağ asidi olan 9,12-oktadekadienoik (linoleik asit) asit cilt sağlığında ve koroner kalp hastalığı riskini azaltmada rol alan bir yağ asidir [132]. Oleik asit (C18:1) ise tekli doymamış omega-9 yağ asidi olmakla beraber bitkisel ve hayvansal kaynaklarda sık bulunmaktadır. Yüksek antioksidan özelliği sayesinde yağ bileşimine katıldığında ürün oksidasyonunu önlemektedir. Aynı zamanda kandaki LDL kolesterol seviyelerini düşürerek kalp hastalığı risklerini azaltmaktadır [130]. Stearik asit (C18:0) uzun zincirli doymuş bir yağ asidi olmakla beraber diğer uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin aksine kandaki kolesterol düzeylerini yükseltmemektedir. Bu sebeple gıdalarda doymuş veya trans yağ asitlerinin yerine stearik asit ile değiştirilmesi önerilmektedir [133]. Literatürde şeker pancarı küspesi ve *S. cerevisiae* kullanılarak üretilen mikrobiyal proteinde, bu çalışmayla benzer bir şekilde miristik, palmitik, stearik, palmitoleik ve oleik asit tespit edilirken bileşimi oluşturan ana yağ asidinin palmitik asit olduğu bildirilmiştir [115].

Örnekte gliserolipitler olarak sınıflandırılan [134] 1-Monopalmitin ve Gliserol monostearat bileşenleri tespit edilmiştir. Palmitik asitin gliseril esteri olan 1-monopalmitin anti-tümör özelliği olan bitkilerde tespit edilen biyoaktif bir bileşendir [135]. Literatürde mango [136] ve *Tetracera scandens* [137] bitkisinde gerçekleştirilen GC-MS analizleri sonucunda 1-monopalmitin bileşeni tespit edilmiştir. Gliserol monostearat ise 1-monopalmitine benzer şekilde bitki kökenli bir metabolit olup *Tetracera scandens* [137] bitkisinde ve domates ile çeşitli maya suşları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonda [138] metabolit olarak tespit edilmiştir.

Örnekte analiz sonucunda toplamda 15 adet organik asit ve türevi tespit edilmiştir. Organik asitler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklarda doğada yaygın olarak bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bununla beraber endüstriyel ölçekte organik asit üretimi mikrobiyal kaynaklı gerçekleşmekte ve günümüzde mikroorganizmalardan izole edilen 100'den fazla organik asit bulunmaktadır [139]. Mikrobiyal biyodönüşüm yoluyla başlıca üretilen ve bu çalışmada tespit edilen organik asit türleri arasında sitrik asit ve itakonik asit yer almaktadır [140]. 3-Hidroksibütirik asit hayvanlarda, mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan önemli bir metabolit olup, insanlarda açık durumunda enerji kaynağı olarak kullanılabilir [141]. Sorbik asit, doğal bir koruyucu olup antimikrobiyal etkisinden dolayı taze meyvelerde kullanılabilir [142]. Bütandioik asit, itakonik asit, malik asit, ve sitrik asit fermantasyon sırasında *S. cerevisiae* tarafından üretilebilen başlıca organik asitlerdir [143–145]. Sitrik asit aynı zamanda meyvelerin yapısında da yer almakla beraber klinik çalışmalar sonucunda hücreler üzerinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bulunduğu, bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve karaciğer ile beyin sağlığını koruduğu bildirilmiştir [146]. Gliserik asit, 4-Hidroksibutanoik asit, pentanedioik asit esteri, azelaik asit ve tereftalik asitin ise bitki bazlı metabolitler olduğu tespit edilmiştir [134,147]

Analiz sonucunda yaklaşık 25 çeşit şeker ve türevi tespit edilmiştir. Bu doğrultuda tespit edilen metabolitler arasında D-Mannitol, D- Sellobiyoz, D-Arabinoz, D-Glukonolakton, D-Alloz, D-Galaktoz, D-Glukonik asit, Sükroz ve Myo-inositol öne çıkmaktadır. D-Mannitol bir şeker alkolü olup, narda bulunan bir fitokimyasaldır [148]. D-Arabinoz, D-Galaktoz, D-Alloz, D-Glukonik asit ve sükroz metabolitlerinin de bitki bazlı fitokimyasallar olduğu bildirilmiştir [149,150]. Örnekte tespit edilen Myo-İnositol membran moleküllerinin bir parçası olup literatürde *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyonda metabolit olarak tespit edilmiştir [151]. İnositollerin insan vücudunda süperoksitleri temizleme, insulin direncinde olumlu etkide bulunma, kanser oluşumunda tümör baskılayıcı görevi görme, beyinde nöral aktiviteyi düzenleme ve psikiyatrik hastalıklarda kullanılma, beyindeki β -amyloid proteinlerini stabilize ederek Alzheimer ve demans gibi rahatsızlıklarda etkili olma gibi özellikleri bulunmaktadır [152,153].

Örnekte Gliserol ve 2,3-Bütandiol ana alkol bileşikleri olarak tespit edilmiştir. Fermantasyonda çeşitli karbon kaynakları (glukoz, gliserol, melas veya lignoselülozik atıklar) ile bakteri veya mayalar kullanılarak biyodönüşüm yoluyla 2,3-Bütandiol, elde edilmektedir [154].

Analiz sonucunda fenolik bileşenler olan Gallik asit ve Epigallokateşin metabolitleri tespit edilmiştir. Gallik asit bitkisel kökenli polifenolik bir sekonder metabolit olmakla beraber çok kuvvetli bir antioksidan bileşendir [155]. Bununla beraber antikarsinojenik, antimutajenik, antianjiogenik ve antienflamatuvar özellikleri bulunmaktadır[156]. Benzer bir şekilde Epigallokateşin de bitkisel kökenli polifenolik bir metabolit olup kanser ve nörolojik, kardiyovasküler, solunum ve metabolik bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır [157].

Analiz sonucunda örnekte E vitamini sınıfında yer alan γ -Tokoferol tespit edilmiştir. E Vitamini yağda çözünebilen ve birden çok formu olan bir vitamin olmakla beraber sadece γ -Tokoferol formu insan vücudu tarafından kullanılabilir. Başlıca rolü, hücrelere zarar verebilecek serbest radikaller olarak adlandırılan serbest elektronları temizleyerek antioksidan olarak işlev görmektir. Bununla beraber bağışıklığı desteklemekte ve kalp sağlığı üzerinde olumlu etkisi bulunmaktadır [158].

β -Sitosterol neredeyse tüm bitkilerde bulunan kolesterol ile çok benzer bir bileşime sahip olan bitki sterollerinin bir grup alt bileşeninden biridir ve fitosteroller olarak bilinir. Kolesterolü düşürme etkileri bulunmakla beraber antioksidan, anjiyogenik, immünomodülatör, antidiyabetik, anti-enflamatuvar, antikanser ve antinociceptive (ağrı kesici) aktivitelere sahiptir [159].

4.8.3. Nükleik Asit (DNA) Analizi

Üretilen mikrobiyal proteinin insan tüketimine uygunluğunun belirlenmesi için nükleik asit miktarının analiz edilmesi önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda günde 2 gramdan fazla nükleik asit tüketiminin kandaki ürik asit seviyesini arttırarak gut hastalığına sebep olabileceği bildirilmiştir [160–162]. Bu doğrultuda insan tüketimine uygunluğu için,

mikrobiyal proteinde tespit edilen nükleik asit konsantrasyonunun maksimum %2 seviyesinde olması tavsiye edilmiştir [163].

Çizelge 4. 11. Nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş (PPS11088) kullanılarak üretilen mikrobiyal proteindeki kuru madde cinsinden nükleik asit (dsDNA) miktarları (g/100 g biyokütle)

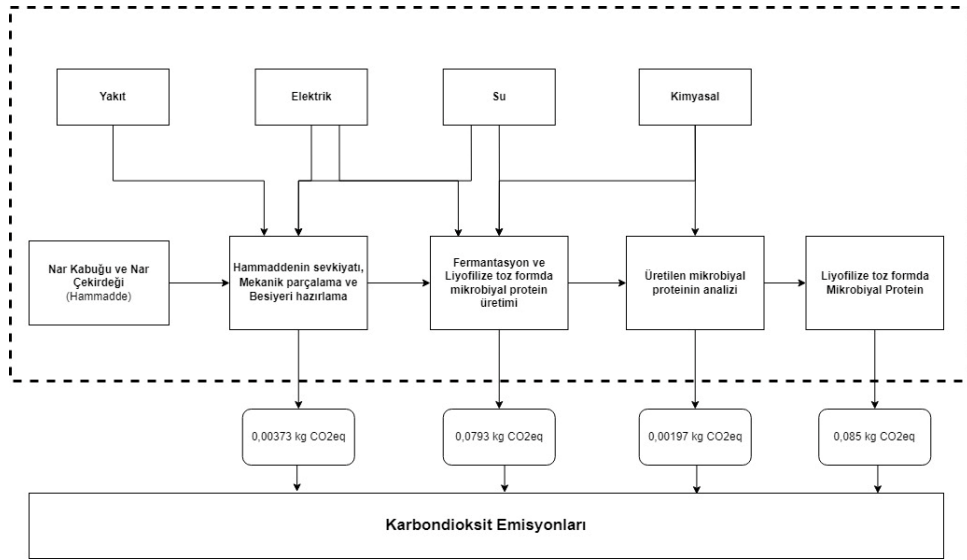
dsDNA (g/100g biyokütle)	Ortalama dsDNA (g/100g biyokütle)
0,326	
0,327	0,327 ± 0,001
0,327	

Çizelge 4.11’de 9 nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş (PPS11088) ile 28°C’de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen mikrobiyal proteindeki kuru madde cinsinden nükleik asit miktarının $0,327 \pm 0,001$ (g/100g biyokütle) olduğu görülmektedir. Literatürde *S. cerevisiae* ve fermantasyon substratı olarak şilempe kullanılarak 28°C’de 48 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda 2,38 (g/100 g biyokütle) oranında nükleik asit tespit edildiği bildirilmiştir [164]. Bu doğrultuda üretilen mikrobiyal proteindeki nükleik asit miktarının %2’den düşük olması sebebiyle insan tüketimi için kabul edilebilir olduğu söylenebilir.

4.8.4. Yaşam Döngüsü (LCA) Analizi

Nar kabuğu-nar çekirdeği yaş posaları ve HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile biyoproses yoluyla üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteinin beşikten-kapıya sebep olduğu CO₂ emisyonları yaşam döngüsü analizi uygulanarak hesaplanmıştır. Bu analizde fonksiyonel birim, üretilen 1 gr mikrobiyal proteindir. Yaşam döngüsü analizi gerçekleştirilirken proses basamakları üçe ayrılmıştır (Şekil 4.15). İlk basamak nar kabuğu ve nar çekirdeği posalarının Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Laboratuvarı’na sevkiyatını, posanın mekanik parçalanmasını ve saf su kullanılarak besiyeri hazırlama işlemlerini içermektedir. İkinci basamak ise hazırlanan besiyeri ile 28°C’de 72 saat

boyunca gerçekleştirilen fermantasyon biyoprosesini ve biyokütle purifikasyonu yoluyla liyofilize toz formda mikrobiyal protein üretimi işlemlerini kapsamaktadır. Son basamak ise üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteine ait gerçekleştirilen analizlere aittir. Yukarıda açıklanan üç basamağa ait EK 1.10' da verilen detaylı proses diyagramı ve veriler kullanılarak yaşam döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda proseste kullanılan hammadde miktarı, üretimde ve analizde harcanan tüm kimyasallar ile harcanan enerji miktarları ve prosesten çıkan atık miktarları dikkate alınarak her bir proses basamağına ait emisyon miktarı CO₂ eşdeğeri cinsinden SimaPro 9.4 yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4. 15. Nar kabuğu-nar çekirdeği yaş posaları ve HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile gerçekleştirilen fermantasyon biyoprosesi sonucunda elde edilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteine ait yaşam döngüsü analizinin kapsamı.

Verilerin tamamı sisteme girildiğinde sırasıyla hammaddenin sevkiyatı, mekanik parçalama ve besiyeri hazırlama basamağı için 0,00373 kg CO₂ eq./gr ürün; fermantasyon ve liyofilize toz formda mikrobiyal protein üretimi için 0,0793 kg CO₂ eq./gr ürün; üretilen mikrobiyal proteinin analizi için 0,00197 kg CO₂ eq./gr ürün emisyon miktarı hesaplanmıştır. Ve üretilen son ürünün emisyon miktarının ise 0,085 kg CO₂ eq./gr ürün olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde meyve posasının yakma, araziye bırakılma, kompostlama veya hayvan yemi olarak kullanılması gibi durumlarda yayılan emisyon miktarları belirlenmiş ve sırasıyla 8771,13 , 1841,57 , 1273,78 ve 963,3 ton CO₂ eq./yıl cinsinden hesaplanmıştır [11]. Bildirilen sonuçlarla, bu çalışmada elde edilen mikrobiyal proteinin emisyon miktarı karşılaştırıldığında, posanın mikrobiyal protein üretiminde kullanılması durumunda %0,1'den düşük bir oranda emisyon oranına; yakılması durumunda %68,3; araziye bırakılması durumunda %14,3 ; kompostlanması durumunda %9,91; hayvan yemi olarak kullanılması durumunda %7,5 oranda emisyon oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda posaların mikrobiyal protein üretimi biyoprosesinde değerlendirilmesinin, geleneksel atık yönetim uygulamalarına kıyasla daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir uygulama olduğu söylenebilir.

5. YORUM

Meyve ürünlerine olan talep, artan insan nüfusu ve sağlık farkındalığı ile önemli ölçüde yükselmektedir. Ancak, üretim sonucunda oluşan ve biyolojik olarak parçalanabilir ürünler olan meyve suyu endüstrisi atıkları açık alanlara bırakılmakta ve bu durum toprak, su kirliliği ve metan gazı salınımı gibi çevresel sorunlara yol açmaktadır. Günümüzde bu sorunlara çözüm olarak uygulanan atık yönetimi yaklaşımları sürdürülebilir olmamakla beraber ikincil atıkların oluşumuna yol açabilmektedir. Bu sebeple sürdürülebilir, çevre dostu ve inovatif atık yönetim teknolojilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Meyve suyu endüstrisi atıklarından olan posalar, insan metabolizması ve sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan değerli biyoaktif bileşikler (lif, polisakkaritler, fenolik bileşikler, fitokimyasallar ve antioksidanlar) içermektedir. Kompozisyon açısından zengin olmakla beraber sürdürülebilir ve yenilenebilir olan bu kaynaklar, döngüsel ekonomi kavramı doğrultusunda ticari olarak katma değeri yüksek gıda ingrediyenlerine dönüştürülme potansiyeline sahiptirler. Bu doğrultuda atık yönetiminde fermantasyon prosesi uygulanarak yenilikçi alternatif protein kaynaklarının üretimi öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı GRAS özellikte olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanarak meyve suyu endüstrisi atıklarından sürdürülebilir bir üretim prensibine sahip, bitkisel ve hayvansal proteinlere alternatif bir protein kaynağı üretmektir. Bu amaç doğrultusunda farklı besiyerleri formülasyonlarının ve *S. cerevisiae* suşlarının mikrobiyal protein üretimindeki etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda yapılan değerlendirmeler ile aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda (HUF) bulunan 18 adet *S. cerevisiae* suşu canlandırılmış ve saflık durumları kontrol edilerek tanımlamaları doğrulanmıştır.
- Çalışma kapsamında gerçekleştirilecek fermantasyonlar sırasında hücre gelişimlerinin izlenmesi ve yorumlanması için temel bir hücre gelişim profili çıkarılmıştır. Bu amaçla doğrulanan suşlar arasından kontrol suşu olarak seçilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 kodlu suş ile YPD Broth besiyerinde çalışılmıştır. Elde

edilen sonuçlar doğrultusunda lag fazının 0-12. saatler ve logaritmik fazın 12-24. saatler aralığında gerçekleştiği tespit edilmiştir.

- Canlandırılan suşlar arasından daha önceki çalışmada [72] teknolojik özellikleri belirlenmiş olan yerel *S.cerevisiae* suşları ve kontrol olarak ticari suşlar ile 28°C’de 72 saat boyunca beyaz üzüm suyu ortamında fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonda suşlara ait hücre gelişim profilleri, üretilen protein miktarı ve biyokütle verimleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda kontrol olarak seçilen ticari suşların birbiri ile, yerel suşlardan ise HUF16M2K10004 ile HUF16M3G11088 kodlu suşların benzer gelişim profili gösterdiği gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonucunda ise HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu yerel suşların sahip olduğu kinetik parametreler, biyokütle verimleri ile ürettiği protein miktarları açısından öne çıkması sebebiyle çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Böylelikle yapılan çalışmada beyaz üzüm suyu ortamında üretilen protein miktarı ve biyokütle verimi açısından *S. cerevisiae* suşları arasında farklılık olduğunu ve bu farklılıklara bağlı olarak suşlar arasından seçim yapılabileceği ortaya konmuştur.
- Çalışmada fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretimi amacıyla meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posalardan model besiyeri formülasyonları oluşturulmuştur. Formülasyonlar oluşturulurken aşağıdaki adımlar izlenmiştir:
 - İlk olarak formülasyonda yer alacak posa konsantrasyonunun belirlenmesi için literatürde *S. cerevisiae* suşu gelişimini destekleyici ve fermantasyonla mikrobiyal protein üretiminde kullanılan Bazal besiyeri kompozisyonu [16] üzerinde modifikasyonlar yapılarak Bazal I ve Bazal II besiyeri olmak üzere iki farklı besiyeri ile çalışılmıştır. Bu besiyerlerinde kontrol suşu olan *S. cerevisiae* ATCC 9763 ile fermantasyon gerçekleştirilerek, fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik parametrelerin (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) takibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Bazal I besiyerinde daha yüksek hücre gelişimi, üretilen protein miktarı ve biyokütle verimi gözlenmiştir. Bu sebeple Bazal I besiyeri kompozisyonu, *S. cerevisiae* gelişimini ve mikrobiyal protein üretimini destekleyici temel formülasyon olarak seçilmiştir.

- Ardından yaş posaların kompozisyonları ayrıntılı bir şekilde analiz edilerek yeni gıda ve gıda bileşenleri üretiminde yönelik potansiyelleri değerlendirilmiş ve bu sayede gelecekteki meyve posalarının karakterizasyonuna dair çalışmalara katkı sağlanmıştır. Bu doğrultuda nar çekirdeği, nar kabuğu, kayısı, elma, armut ve şeftali yaş posalarının fermente edilebilir indirgen şeker içerikleri dolayısıyla mikrobiyal protein üretimi biyoprosesinde substrat olarak kullanılmaya uygun olduğu sonucuna varılmıştır.
- Son adımda ise yaş posalar kullanılarak besiyeri formülasyonları oluşturulması için, Bazal I besiyeri formülasyonu ve posaların indirgen şeker profilleri göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca meyvelerin hasat zamanları da dikkate alınarak elma-armut (%50-50 w/w), kayısı-çilek (%70-30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) yaş posaları kullanılarak dört farklı besiyeri formülasyonu oluşturulmuştur.
- Meyve suyu endüstrisi atıklarından olan yaş posalar kullanılarak formüle edilen dört farklı besiyerinde 28°C'de 160 rpm'de 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda fizikokimyasal (pH ve protein miktarı) ve biyolojik parametrelerin (hücre konsantrasyonu ve biyokütle verimi) takibi yapılmıştır. Böylelikle fermantasyonda 9763 kodlu kontrol suşu, HUF16M2K10004 ile HUF16M3G11088 kodlu yerel suşlar olmak üzere üç farklı *S. cerevisiae* suşunun ve yaş posalardan oluşan dört farklı besiyerinin mikrobiyal protein üretimi biyoprosesindeki etkinlikleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda çalışmada, biyoproses yoluyla yaş posalardan mikrobiyal protein eldesinde nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-50, w/w) posa karışımının substrat olarak öne çıktığı ve bunu kayısı-çilek (%70-30, w/w), elma-armut (%50-50, w/w) ve şeftali (%100 w/w) posalarının izlediği açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca nar kabuğu-nar çekirdeği besiyerinde yerel suşlar arasında yüksek biyokütle verimi ile protein üretme kapasitesine sahip olması sebebiyle HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşunun öne çıktığı gözlemlenmiştir.

- Çalışmanın son basamağında fermantasyon yoluyla mikrobiyal protein üretiminde incelenen substratlar arasından öne çıkan nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve bu besiyerinde en yüksek protein ve biyokütle üretimini sahip yerel HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile üretilen liyofilize kuru toz formdaki mikrobiyal proteinde kuru madde ve nem, primer metabolit, nükleik asit miktarı analizi ve yaşam döngüsü analizi olmak üzere ileri analizler gerçekleştirilmiştir.
 - Gerçekleştirilen kuru madde ve nem analizi sonucunda nar kabuğu-nar çekirdeği besiyeri ve yerel HUF16M3G11088 kodlu suş ile 28°C'de 72 saat fermantasyon sonucu üretilen mikrobiyal proteinin nem içeriğinin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.
 - GC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilen hedeflenmemiş primer metabolit analizi doğrultusunda üründe aminoasitler, yağ asitleri, gliserolipitler, organik asitler, şekerler, alkoller, fenolik bileşikler, vitaminler, fitosteroller ve diğer molekül gruplarına ait toplamda 71 adet metabolit varlığı tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde biyodönüşüm sonucu elde edilen ve insan vücudunda metabolizma ve fizyolojik açıdan olumlu etkileri bulunan metabolitler gözlemlenmiştir. Üretilen mikrobiyal proteinde bulunan treonin ve valin aminoasit miktarı oranı (1,39 thr:val), FAO tarafından yetişkinlerde günlük diyetinde bulunması önerilen treonin ve valin aminoasit miktarları oranı (0,58 thr:val) [117] ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.
 - Üretilen mikrobiyal proteinin insan tüketimine uygunluğunun belirlenmesi için nükleik asit miktarı analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, ürünün sahip olduğu nükleik asit içeriğinin insan tüketimi için kabul edilebilir konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir.
 - Üretimde kullanılan prosesin çevresel etkilerinin değerlendirilmesi için yaşam döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda çalışma kapsamında gerçekleştirilen meyve posalarından mikrobiyal protein

üretimini, diğer atık yönetim uygulamalarına (yakma, araziye bırakılma, kompostlama, hayvan yemi olarak kullanılma) kıyasla karbon ayak izinin daha düşük olduğu, daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir uygulama olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında meyve suyu endüstrisi atıkları olan yaş posaların, *Saccharomyces cerevisiae* mayaları tarafından biyoproses yoluyla mikrobiyal protein üretimi için sürdürülebilir bir kaynak olarak kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Bu kapsamda yaş posaların biyoproseste kullanımı için model besiyeri formülasyonları oluşturulmuştur. Böylelikle posalardan karışımlar oluşturularak ya da tek başlarına biyoproseste substrat olarak kullanılacakları gösterilmiştir. Ayrıca yerel ve orijinal *S. cerevisiae* suşlarının da mikrobiyal protein üretimi amacıyla kullanılabilmesi ortaya konmuştur.

Gelecek çalışmalarda ise ürüne ait aminoasit profilinin detaylı belirlenmesi için protein sekanslama uygulamalarına ihtiyaç vardır. Ayrıca proses ölçeklendirmesi yapılarak, pilot ölçekte üretimler gerçekleştirilebilir ve optimize edilebilir. Üretimde biyokütle veriminin ve üretilen protein miktarlarının artırılması için karışık kültür uygulamaları yapılabilir. Veya hammaddede mevcut olan lignoselülozik içeriğin, mekanik işlemlerin yanı sıra kimyasal ve/veya biyolojik ön uygulamalarla degradasyonu sağlanabilir. Ayrıca mikrobiyal genetik uygulamaları ile mikroorganizmanın substrat kullanımı, gelişimi, stres toleransı modifiye edilerek protein üretme verimi artırılabilir. Bununla beraber üretilen mikrobiyal proteinin insan sağlığı açısından uygunluğunun tam anlamıyla belirlenmesi için patojen, toksikoloji ve alerjen analizlerinin de yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Matassa, N. Boon, I. Pikaar, W. Verstraete, Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint, *Microb Biotechnology* 9 (2016) 568–575. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>.
- [2] United Nations Department of Economic and Social Affairs (UN DESA), *World Population Prospects*, 2022.
- [3] J. Ranganathan, D. Vennard, R. Waite, B. Lipinski, T. Searchinger, P. Dumas, A. Forslund, H. Guyomard, S. Manceron, E. Marajo Petizon, C. Mouël, P. Havlík, M. Herrero, X. Zhang, S. Wirsenius, F. Ramos, X. Yan, M. Phillips, R. Mungkung, *Shifting Diets for a Sustainable Food Future*, 2016. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3808.2961>.
- [4] H. Ritchie, You want to reduce the carbon footprint of your food? Focus on what you eat, not whether your food is local, *Our World In Data* (2020). <https://ourworldindata.org/food-choice-vs-eating-local#article-citation> (accessed May 17, 2024).
- [5] P. Nigam, A. Singh, Single Cell Protein: Mycelial Fungi, in: *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2014: pp. 415–424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00311-6>.
- [6] S. UPADHYAYA, S. Tiwari, N. Arora, D.P. Singh, Microbial Protein: A Valuable Component for Future Food Security, in: 2016: p. 21. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1775.8801>.
- [7] A. Ritala, S.T. Häkkinen, M. Toivari, M.G. Wiebe, Single Cell Protein—State-of-the-Art, *Industrial Landscape and Patents 2001–2016*, *Front Microbiol* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>.
- [8] A.S. Brandão, A. Gonçalves, J.M.R.C.A. Santos, Circular bioeconomy strategies: From scientific research to commercially viable products, *J Clean Prod* 295 (2021) 126407. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126407>.

- [9] K. Kandemir, E. Piskin, J. Xiao, M. Tomas, E. Capanoglu, Fruit Juice Industry Wastes as a Source of Bioactives, *J Agric Food Chem* 70 (2022) 6805–6832. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00756>.
- [10] The Bioeconomy Consultants NNFCC, Fruit pomace production and value chains , (2020). <https://www.nnfcc.co.uk/files/mydocs/Pomace%20factsheet.pdf> (accessed May 9, 2024).
- [11] F. Gassara, S.K. Brar, F. Pelletier, M. Verma, S. Godbout, R.D. Tyagi, Pomace waste management scenarios in Québec—Impact on greenhouse gas emissions, *J Hazard Mater* 192 (2011) 1178–1185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.026>.
- [12] P. Thiviya, A. Gamage, R. Kapilan, O. Merah, T. Madhujith, Single Cell Protein Production Using Different Fruit Waste: A Review, *Separations* 9 (2022) 178. <https://www.mdpi.com/2297-8739/9/7/178>.
- [13] R. Mortimer, Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome, *CSH Press Genome Research* 403 (2000). <https://doi.org/doi:10.1101/gr.10.4.403>.
- [14] The Economist, Fermentation makes a comeback, (2017). <https://www.economist.com/christmas-specials/2017/12/19/fermentation-makes-a-comeback> (accessed May 17, 2024).
- [15] M.E. Jach, A. Serefko, M. Ziaja, M. Kieliszek, Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source, *Metabolites* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>.
- [16] M. Umesh, K. Priyanka, B. Thazeem, K. Preethi, Production of Single Cell Protein and Polyhydroxyalkanoate from *Carica papaya* Waste, *Arab J Sci Eng* 42 (2017) 2361–2369. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2519-x>.
- [17] G.G. Stewart, SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*, in: C.A. Batt, M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2014: pp. 309–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>.
- [18] M. Johnston, Bakers' and Brewers' Yeast: *Saccharomyces cerevisiae*, in: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 2013: pp. 284–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00176-5>.

- [19] F. Farid, O. Sideeq, F. Khan, K. Niaz, Chapter 5.1 - *Saccharomyces cerevisiae*, in: S.M. Nabavi, A.S. Silva (Eds.), *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Academic Press, 2019: pp. 501–508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00066-7>.
- [20] A. Patel, D. Asik, E.M. Snyder, J.A. Spornyak, P.J. Cullen, J.R. Morrow, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* Yeast Cells Labeled with Fe(III) Complexes as MRI Probes, *Magnetochemistry* 6 (2020). <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6030041>.
- [21] R.C. and D.U. and P.S.K. and S.P. Behera Sudhanshu S. and Ray, *Microorganisms in Fermentation*, in: A. Berenjian (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1.
- [22] G.M. Walker, G.G. Stewart, *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages* 2 (2016). <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>.
- [23] S.K. Nandy, R.K. Srivastava, A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications, *Microbiol Res* 207 (2018) 83–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>.
- [24] M. Parapouli, A. Vasileiadis, A.-S. Afendra, E. Hatziloukas, *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications, *AIMS Microbiol* 6 (2020) 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
- [25] P.O. Ljungdahl, B. Daignan-Fornier, Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 190 (2012) 885. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.133306>.
- [26] Alberts B., Johnson A., Lewis J., *From RNA to Protein*, in: *Mol Biol Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, 2002.
- [27] J. Sheng, H. Flick, X. Feng, Systematic Optimization of Protein Secretory Pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to Increase Expression of Hepatitis B Small Antigen, *Front Microbiol* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00875>.
- [28] A. Gengatharan, Chapter 17 - Alternative protein sources as functional food ingredients, in: B.K. Tiwari, L.E. Healy (Eds.), *Future Proteins*, Academic Press,

- 2023: pp. 359–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91739-1.00017-9>.
- [29] M.J. Boland, A.N. Rae, J.M. Vereijken, M.P.M. Meuwissen, A.R.H. Fischer, M.A.J.S. van Boekel, S.M. Rutherford, H. Gruppen, P.J. Moughan, W.H. Hendriks, The future supply of animal-derived protein for human consumption, *Trends Food Sci Technol* 29 (2013) 62–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002>.
- [30] H. Ritchie, P. Rosado, M. Roser, Meat and Dairy Production, (2023). <https://ourworldindata.org/meat-production> (accessed May 9, 2024).
- [31] Food and Agriculture Organization of the United Nations, The State of Food Security and Nutrition in the World Report, 2023.
- [32] H. Ritchie, E. Mathieu, L. Rodés-Guirao, M. Gerber, Five key findings from the 2022 UN Population Prospects, (2022). <https://ourworldindata.org/world-population-update-2022> (accessed May 12, 2024).
- [33] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Five practical actions towards low-carbon livestock, Rome, 2019.
- [34] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Water for Sustainable Food and Agriculture - A report produced for the G20 Presidency of Germany, (2017).
- [35] J. Poore, T. Nemecek, Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers, *Science* (1979) 360 (2018) 987–992. <https://doi.org/10.1126/science.aaq0216>.
- [36] IEA, Global Methane Tracker 2023, Paris, 2023. <https://www.iea.org/reports/global-methane-tracker-2023> (accessed May 12, 2024).
- [37] J. Hadi, G. Brightwell, Safety of Alternative Proteins: Technological, Environmental and Regulatory Aspects of Cultured Meat, Plant-Based Meat, Insect Protein and Single-Cell Protein, *Foods* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10061226>.
- [38] J. Heinke, M. Lannerstad, D. Gerten, P. Havlík, M. Herrero, A. Notenbaert, H. Hoff, C. Müller, Water Use in Global Livestock Production—Opportunities and

- Constraints for Increasing Water Productivity, *Water Resour Res* 56 (2020).
<https://doi.org/10.1029/2019WR026995>.
- [39] United Nations Environment Programme, What's Cooking? An assessment of the potential impacts of selected novel alternatives to conventional animal products - *Frontiers 2023 Special Issue*, 2023.
- [40] U.S. Department of Health & Human Services Centrel for Disease Control and Prevention, *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, 2019.
- [41] Good Food Institute, Alternative proteins address the threats of antibiotic resistance and pandemics, (2023). https://gfi.org/wp-content/uploads/2023/01/GFI-Fact-Sheet_-Alternative-Proteins-Address-the-Threats-of-Antibiotic-Resistance-and-Pandemics_POL22023.pdf (accessed May 12, 2024).
- [42] Good Food Institute, Environmental benefits of alternative proteins, (2023). <https://gfi.org/resource/environmental-impacts-of-alternative-proteins/> (accessed May 10, 2024).
- [43] S. Smetana, D. Ristic, D. Pleissner, H.L. Tuomisto, O. Parniakov, V. Heinz, Meat substitutes: Resource demands and environmental footprints, *Resour Conserv Recycl* 190 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2022.106831>.
- [44] A. Huis, J. Van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir, P. Vantomme, *EDIBLE INSECTS future prospects fo food and feed security*, 2013.
- [45] M. Molfetta, E.G. Morais, L. Barreira, G.L. Bruno, F. Porcelli, E. Dugat-Bony, P. Bonnarme, F. Minervini, Protein Sources Alternative to Meat: State of the Art and Involvement of Fermentation, *Foods* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11142065>.
- [46] C. Gerhardt, G. Suhlmann, F. Ziemben, D. Donnan, M. Warschun, H.-J. Kühnle, How will cultivated meat and meat alternatives disrupt the agricultural and food industry, 2019. https://www.gastronomiaycia.com/wp-content/uploads/2019/06/estudio_futuro_alimentos.pdf (accessed May 12, 2024).
- [47] B. Morach, J. Rogg, M. Brigl, Alternative proteins will transform food, mitigate climate change and drive profits. Here's how, *World Economic Forum* (2021).

- <https://www.weforum.org/agenda/2021/03/alternative-proteins-will-transform-food-mitigate-climate-change-and-drive-profits/> (accessed May 12, 2024).
- [48] B.C. Bratosin, S. Darjan, D.C. Vodnar, Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition, *Sustainability* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/su13169284>.
- [49] M. Sharif, M.H. Zafar, A.I. Aqib, M. Saeed, M.R. Farag, M. Alagawany, Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition, *Aquaculture* 531 (2021) 735885. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>.
- [50] B. Bajić, D. Vučurović, Đ. Vasić, R. Jevtić-Mučibabić, S. Dodić, Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-Industrial Residues and By-Products, *Foods* 12 (2023). <https://doi.org/10.3390/foods12010107>.
- [51] M. García-Garibay, L. Gómez-Ruiz, A.E. Cruz-Guerrero, E. Bárzana, SINGLE-CELL PROTEIN | Yeasts and Bacteria, in: B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, 2003: pp. 5277–5284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01088-9>.
- [52] Z. Rasouli, B. Valverde-Pérez, M. D’Este, D. De Francisci, I. Angelidaki, Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs, *Biochem Eng J* 134 (2018) 129–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.010>.
- [53] M. Xu, H. Zhou, X. Yang, I. Angelidaki, Y. Zhang, Sulfide restrains the growth of *Methylocapsa acidiphila* converting renewable biogas to single cell protein, *Water Res* 184 (2020) 116138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116138>.
- [54] M. Wiebe, Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption, *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (2002) 421–427. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0931-x>.
- [55] T. Aggelopoulos, K. Katsieris, A. Bekatorou, A. Pandey, I.M. Banat, A.A. Koutinas, Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production, *Food Chem* 145 (2014) 710–716. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.105>.

- [56] V. Joshi, S. Kumar, Meat Analogues: Plant based alternatives to meat products- A review, *International Journal of Food Fermentation and Technology* 5 (2016) 107–119. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2016.00001.5>.
- [57] A.G. Pereira, M. Fraga-Corral, P. Garcia-Oliveira, P. Otero, A. Soria-Lopez, L. Cassani, H. Cao, J. Xiao, M.A. Prieto, J. Simal-Gandara, Single-Cell Proteins Obtained by Circular Economy Intended as a Feed Ingredient in Aquaculture, *Foods* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11182831>.
- [58] P.T. Sekoai, Y. Roets-Dlamini, F. O'Brien, S. Ramchuran, V. Chunilall, Valorization of Food Waste into Single-Cell Protein: An Innovative Technological Strategy for Sustainable Protein Production, *Microorganisms* 12 (2024). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010166>.
- [59] Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV), Alternatif Protein Teknolojileri, 2024. <https://ttgv.org.tr/yayinlar/alternatif-protein-teknolojileri-derin-analiz-raporu-ozet> (accessed May 13, 2024).
- [60] M. Shahbandeh, Global production of fruit by variety selected 2022, Statista (2024). <https://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/> (accessed May 20, 2024).
- [61] M.T. Pacheco, F.J. Moreno, M. Villamiel, Chemical and physicochemical characterization of orange by-products derived from industry, *J Sci Food Agric* 99 (2019) 868–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9257>.
- [62] Y.K. Leong, J.-S. Chang, Valorization of fruit wastes for circular bioeconomy: Current advances, challenges, and opportunities, *Bioresour Technol* 359 (2022) 127459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127459>.
- [63] R.C. Fierascu, E. Sieniawska, A. Ortan, I. Fierascu, J. Xiao, Fruits By-Products – A Source of Valuable Active Principles. A Short Review, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00319>.
- [64] The United Nations Environment Programme (UNEP), The State of Food Waste in West Asia, 2021. <https://www.unep.org/resources/report/state-food-waste-west-asia> (accessed May 13, 2024).
- [65] F. Figuerola, M.L. Hurtado, A.M. Estévez, I. Chiffelle, F. Asenjo, Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food

- enrichment, *Food Chem* 91 (2005) 395–401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036>.
- [66] L. Santos, S. Lopes, M. Nazari, B. Biduski, V. Pinto, J. Santos, T. Bertolin, L. Santos, Fruit pomace as a promising source to obtain biocompounds with antibacterial activity, *Crit Rev Food Sci Nutr* 63 (2023) 12597–12609. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2103510>.
- [67] P.E.S. Munekata, R. Domínguez, M. Pateiro, A. Nawaz, C. Hano, N. Walayat, J.M. Lorenzo, Strategies to Increase the Value of Pomaces with Fermentation, *Fermentation* 7 (2021). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040299>.
- [68] M. Huang, G. Wang, J. Qin, D. Petranovic, J. Nielsen, Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (2018) E11025–E11032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809921115>.
- [69] M. Kurban, *Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması, Hacettepe Üniversitesi, 2019.
- [70] A. Temiz, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 7. Baskı, Hatiboğlu Yayıncılık, Ankara, 2016.
- [71] M. Pelczar, R.D. Reid, *Laboratory Exercises in Microbiology*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1958.
- [72] E.B. Muyanlı, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* İçeren Sıralı Fermantasyonda Karışık Başlangıç Kültürünün Kullanılmasına Yönelik Transkripsiyonel Yanıt, Hacettepe Üniversitesi, 2022.
- [73] I.K. Olivares-Marin, J.C. González-Hernández, C. Regalado-Gonzalez, L.A. Madrigal-Perez, *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism, *JoVE* (2018) e58192. <https://doi.org/doi:10.3791/58192>.
- [74] M.A. Reiter, J.A. Vorholt, Dashing Growth Curves: a web application for rapid and interactive analysis of microbial growth curves, *BMC Bioinformatics* 25 (2024) 67. <https://doi.org/10.1186/s12859-024-05692-y>.
- [75] T. Gervasi, V. Pellizzeri, G. Calabrese, G. Di Bella, N. Cicero, G. Dugo, Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using

- Saccharomyces cerevisiae*, *Nat Prod Res* 32 (2018) 648–653.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332617>.
- [76] E. ÇINKIR, M. DIĞRAK, *Citrullus vulgaris* Schrad. Atıklarından Tek Hücre Proteini Üretimi ve Üretimin Optimizasyonu, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 28 (2016) 21–27.
- [77] J. Hammond, N. Kruger, The Bradford Method for Protein Quantitation, *Methods Mol Biol* 3 (1988) 25–32. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:25>.
- [78] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [79] G.M. Walker, FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Media for Industrial Fermentations, in: C.A. Batt, M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, 2014: pp. 769–777. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00107-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00107-5).
- [80] A. Tropea, A. Ferracane, A. Albergamo, A.G. Potortì, V. Lo Turco, G. Di Bella, Single Cell Protein Production through Multi Food-Waste Substrate Fermentation, *Fermentation* 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/fermentation8030091>.
- [81] D. Lapeña, G. Kosa, L.D. Hansen, L.T. Mydland, V. Passoth, S.J. Horn, V.G.H. Eijsink, Production and characterization of yeasts grown on media composed of spruce-derived sugars and protein hydrolysates from chicken by-products, *Microb Cell Fact* 19 (2020) 19. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1287-6>.
- [82] P.A.R. Fernandes, S.S. Ferreira, R. Bastos, I. Ferreira, M.T. Cruz, A. Pinto, E. Coelho, C.P. Passos, M.A. Coimbra, S.M. Cardoso, D.F. Wessel, Apple Pomace Extract as a Sustainable Food Ingredient, *Antioxidants* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8060189>.
- [83] AOAC-Official Methods of Analysis Of The Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, INC., Arlington, Virginia USA, 1990.
- [84] Q. Jin, N. Qureshi, H. Wang, H. Huang, Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by *Clostridium*

- beijerinckii P260, Fuel 244 (2019) 536–544.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.01.177>.
- [85] H.K. Mæhre, L. Dalheim, G.K. Edvinsen, E.O. Elvevoll, I.-J. Jensen, Protein Determination—Method Matters, Foods 7 (2018) 5. <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/5>.
- [86] C. Mellinas, I. Solaberrieta, C.J. Pelegrín, A. Jiménez, M.C. Garrigós, Valorization of Agro-Industrial Wastes by Ultrasound-Assisted Extraction as a Source of Proteins, Antioxidants and Cutin: A Cascade Approach, Antioxidants 11 (2022) 1739. <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/9/1739>.
- [87] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal Biochem 150 (1985) 76–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [88] M.K. Kim, M.-Y. Kim, K.-G. Lee, Categorization of fruits according to their content of polyphenols and vitamin C, antiradical activity, and quality parameters, J Food Process Preserv 42 (2018) e13421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.13421>.
- [89] B.Z. Hançerlioğulları, U. Toprak, R. Yılmaz, Analyses of Metabolites in Microwave-treated Maize Flours, Food Bioproc Tech 17 (2024) 686–696. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03164-4>.
- [90] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPPC), AR6 Climate Change 2021: The Physical Science Basis, 2021.
- [91] M.N. Ali, “Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts”., Curr Res Microbiol Biotechnol 02 (2014) 316–324.
- [92] M.F. Karimy, E. Damayanti, A.E. Suryani, E. Prasetyo, R. Nurhayati, M. Anwar, A.S. Anggraeni, A simple method for analysis of Saccharomyces cerevisiae morphology by applying a high vacuum mode of the scanning electron microscopy and without chemical fixatives, IOP Conf Ser Earth Environ Sci 462 (2020) 012048. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/462/1/012048>.

- [93] F. da Silva Fernandes, É.S. de Souza, L.M. Carneiro, J.P. Alves Silva, J.V.B. de Souza, J. da Silva Batista, Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Int J Microbiol* 2022 (2022) 7878830. <https://doi.org/10.1155/2022/7878830>.
- [94] P.F. Stanbury, A. Whitaker, S.J. Hall, Chapter 9 - Aeration and agitation, in: P.F. Stanbury, A. Whitaker, S.J. Hall (Eds.), *Principles of Fermentation Technology* (Third Edition), Third Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2017: pp. 537–618. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00009-0>.
- [95] G.M. Walker, Yeasts, in: M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), Third Edition, Academic Press, Oxford, 2009: pp. 478–491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00335-7>.
- [96] S. Liu, Chapter 11 - How Cells Grow, in: S. Liu (Ed.), *Bioprocess Engineering* (Second Edition), Elsevier, 2017: pp. 629–697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00011-3>.
- [97] A. Aranda, H. Orozco, C. Picazo, E. Matallana, Yeast Life Span and its Impact on Food Fermentations, *Fermentation* 5 (2019). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020037>.
- [98] A.N. Dunuweera, D.N. Nikagolla, K. Ranganathan, Fruit Waste Substrates to Produce Single-Cell Proteins as Alternative Human Food Supplements and Animal Feeds Using Baker’s Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *J Food Qual* 2021 (2021) 9932762. <https://doi.org/10.1155/2021/9932762>.
- [99] R. Vadalà, G. Lo Vecchio, R. Rando, M. Leonardi, N. Cicero, R. Costa, A Sustainable Strategy for the Conversion of Industrial Citrus Fruit Waste into Bioethanol, *Sustainability* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/su15129647>.
- [100] S. Kanwar, G. Kumar, M. Sahgal, A. Singh, Ethanol Production Through *Saccharomyces* Based Fermentation Using Apple Pomace Amended with Molasses, *Sugar Tech* 14 (2012) 304–311. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0163-z>.
- [101] Chr.Hansen, MERIT™, (n.d.). <https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/merit> (accessed May 5, 2024).

- [102] S. Hjortmo, J. Patring, T. Andlid, Growth rate and medium composition strongly affect folate content in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int J Food Microbiol* 123 (2008) 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.004>.
- [103] T. Evan, C. Navarro, M. Carro, Chemical Composition and In Vitro Nutritive Evaluation of Pomegranate and Artichoke Fractions as Ruminant Feed, *Ruminants* 4 (2024) 1–9. <https://doi.org/10.3390/ruminants4010001>.
- [104] A.F. Rocha-Parra, M. Belorio, P.D. Ribotta, C. Ferrero, M. Gómez, Effect of the particle size of pear pomace on the quality of enriched layer and sponge cakes, *Int J Food Sci Technol* 54 (2019) 1265–1275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.14078>.
- [105] P. Melgarejo, D.M. Salazar, F. Artés, Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits, *European Food Research and Technology* 211 (2000) 185–190. <https://doi.org/10.1007/s002170050021>.
- [106] S.K. Chauhan, S.M. Tyagi, D. Singh, PECTINOLYTIC LIQUEFACTION OF APRICOT, PLUM, AND MANGO PULPS FOR JUICE EXTRACTION, *Int J Food Prop* 4 (2001) 103–109. <https://doi.org/10.1081/JFP-100002190>.
- [107] Tunay Gıda San. ve Tic. A.Ş. , Hasat Takvimi, (n.d). <https://www.tunaygida.com/tr-TR/hasat-takvimi/4/34/60/0> (accessed May 5, 2024).
- [108] G.S. Dhillon, S.K. Brar, S. Kaur, M. Verma, Rheological Studies During Submerged Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* in Stirred Fermentor Using Apple Pomace Ultrafiltration Sludge, *Food Bioproc Tech* 6 (2013) 1240–1250. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0771-8>.
- [109] O. Stabnikova, J.-Y. Wang, H. Bo Ding, Joo-HwaTay, Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium, *Bioresour Technol* 96 (2005) 747–751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.022>.
- [110] R. Rodríguez Madrera, R. Pando Bedriñana, B. Suárez Valles, Enhancement of the nutritional properties of apple pomace by fermentation with autochthonous yeasts, *LWT - Food Science and Technology* 79 (2017) 27–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.021>.

- [111] H. Akin, C. Brandam, X.-M. Meyer, P. Strehaiano, A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47 (2008) 1986–1993. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.11.014>.
- [112] E. Demiray, S.E. Karatay, G. Dönmez, Determination of Bioethanol Production from Apricot (*Prunus armeniaca*) Pomace, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64 (2021) e21200781. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200781>.
- [113] S. Atis, B. Weinstein, A. Murray, D. Nelson, Microbial Range Expansions on Liquid Substrates, *Phys Rev X* 9 (2019). <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.9.021058>.
- [114] P. Thiviya, A. Gamage, R. Kapilan, O. Merah, T. Madhujith, Production of Single-Cell Protein from Fruit Peel Wastes Using Palmyrah Toddy Yeast, *Fermentation* 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/fermentation8080355>.
- [115] Z.U. Razzaq, M.K.I. Khan, A.A. Maan, S. ur Rahman, Characterization of single cell protein from *Saccharomyces cerevisiae* for nutritional, functional and antioxidant properties, *Journal of Food Measurement and Characterization* 14 (2020) 2520–2528. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00498-x>.
- [116] E. Schulz, H.J. Oslage, Composition and nutritive value of single-cell protein (SCP), *Anim Feed Sci Technol* 1 (1976) 9–24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401\(76\)90003-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401(76)90003-1).
- [117] Dietary protein quality evaluation in human nutrition, Auckland, New Zealand, 2011. <https://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf> (accessed May 6, 2024).
- [118] Protein and Amino Acids, in: *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., National Academies Press (US), 1989.
- [119] S. Maloy, Alanine, in: S. Maloy, K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 2013: p. 58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00026-7>.

- [120] PubChem Compound Summary for CID 6287, Valine, National Center for Biotechnology Information (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valine> (accessed May 6, 2024).
- [121] M. Abdul Razak, P. Begum, B. Viswanath, S. Rajagopal, Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review, *Oxid Med Cell Longev* 2017 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/1716701>.
- [122] S.M.M. Phone Myint, L.Y. Sun, L-serine: Neurological Implications and Therapeutic Potential, *Biomedicines* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082117>.
- [123] PubChem Compound Summary for CID 6288, Threonine, National Center for Biotechnology Information (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Threonine> (accessed May 6, 2024).
- [124] O.-L. Moldovan, A. Sandulea, I.-A. Lungu, Șerban A. Gâz, A. Rusu, Identification of Some Glutamic Acid Derivatives with Biological Potential by Computational Methods, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28104123>.
- [125] K. Ninomiya, Science of umami taste: adaptation to gastronomic culture, *Flavour* 4 (2015) 13. <https://doi.org/10.1186/2044-7248-4-13>.
- [126] S. Tanaka, D. Yoneoka, A. Ishizuka, M. Adachi, H. Hayabuchi, T. Nishimura, Y. Takemi, H. Uneyama, H. Nakamura, K.S. Lwin, K. Shibuya, S. Nomura, Modelling of salt intake reduction by incorporation of umami substances into Japanese foods: a cross-sectional study, *BMC Public Health* 23 (2023). <https://doi.org/10.1186/S12889-023-15322-6>.
- [127] M.K.I. Khan, M. Asif, Z.U. Razzaq, A. Nazir, A.A. Maan, Sustainable food industrial waste management through single cell protein production and characterization of protein enriched bread, *Food Biosci* 46 (2022) 101406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101406>.
- [128] Q. Wu, K. Cui, J. Lin, Y. Zhu, Y. Xu, Urea production by yeasts other than *Saccharomyces* in food fermentation, *FEMS Yeast Res* 17 (2017) fox072. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox072>.
- [129] S. Verruck, C.F. Balthazar, R.S. Rocha, R. Silva, E.A. Esmerino, T.C. Pimentel, M.Q. Freitas, M.C. Silva, A.G. da Cruz, E.S. Prudencio, Chapter Three - Dairy

- foods and positive impact on the consumer's health, in: F. Toldrá (Ed.), *Adv Food Nutr Res*, Academic Press, 2019: pp. 95–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.002>.
- [130] E.M. Hernandez, 4 - Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties, in: T.A.B. Sanders (Ed.), *Functional Dietary Lipids*, Woodhead Publishing, 2016: pp. 69–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-247-1.00004-1>.
- [131] A.M. Martín Ortega, M.R. Segura Campos, Chapter 3 - Macronutrients and micronutrients in cancer prevention and treatment, in: M.R.S. Campos, A.M.M. Ortega (Eds.), *Oncological Functional Nutrition*, Academic Press, 2021: pp. 99–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819828-5.00003-6>.
- [132] J. Whelan, K. Fritsche, Linoleic Acid, *Adv Nutr* 4 (2013) 311–312. <https://doi.org/10.3945/an.113.003772>.
- [133] Z. Zhen, T.F. Xi, Y.F. Zheng, 11 - Surface modification by natural biopolymer coatings on magnesium alloys for biomedical applications, in: T.S.N.S. Narayanan, I.-S. Park, M.-H. Lee (Eds.), *Surface Modification of Magnesium and Its Alloys for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing, 2015: pp. 301–333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-078-1.00011-6>.
- [134] M.M. Pinc, M. Dalmagro, E. da Cruz Alves Pereira, G. Donadel, R.T. Thomaz, C. da Silva, P.D. Macruz, E. Jacomassi, A. Gasparotto Junior, J. Hoscheid, E.L.B. Lourenço, O. Alberton, Extraction Methods, Chemical Characterization, and In Vitro Biological Activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel Peels, *Pharmaceuticals* 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/ph16081173>.
- [135] L. Niu, W. Li, X. Chen, X. Su, J. Dong, Q. Liao, X. Zhou, S. Shi, R. Sun, 1-Monopalmitin promotes lung cancer cells apoptosis through PI3K/Akt pathway in vitro, *Environ Toxicol* 38 (2023) 2621–2631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tox.23897>.
- [136] M. Kaneria, K. Rakholiya, K.R. Bavaliya, M.H. Pandya, T.N. Sipai, S.A. Vadher, M. Patel, V.K. Yadav, R. Solanki, S. Patel, D.K. Sahoo, A. Patel, Untargeted metabolomics-based identification of bioactive compounds from *Mangifera indica* L. seed extracts in drug discovery through molecular docking and assessment of their anticancer potential, *J Sci Food Agric* n/a (n.d.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.13421>.

- [137] A. Nokhala, M.J. Siddiqui, Q.U. Ahmed, M.S. Ahamad Bustamam, Z.A. Zakaria, Investigation of α -Glucosidase Inhibitory Metabolites from *Tetracera scandens* Leaves by GC–MS Metabolite Profiling and Docking Studies, *Biomolecules* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10020287>.
- [138] E.-J. Kim, K.-M. Cho, S.J. Kwon, S.-H. Seo, S.-E. Park, H.-S. Son, Factors affecting vinegar metabolites during two-stage fermentation through metabolomics study, *LWT* 135 (2021) 110081. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110081>.
- [139] M. Papagianni, 1.09 - Organic Acids, in: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, Burlington, 2011: pp. 109–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00011-8>.
- [140] R. Naraian, S. Kumari, Microbial Production of Organic Acids, in: *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017: pp. 93–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119048961.ch5>.
- [141] PubChem Compound Summary for CID 441, 3-Hydroxybutyric acid., National Center for Biotechnology Information (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Hydroxybutyric-acid> (accessed May 7, 2024).
- [142] T. Shibamoto, L.F. Bjeldanes, Chapter 9 - Food Additives, in: T. Shibamoto, L.F. Bjeldanes (Eds.), *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press, San Diego, 1993: pp. 157–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092577-6.50014-9>.
- [143] S. Khoomrung, J.L. Martinez, S. Tippmann, S. Jansa-Ard, M.F. Buffing, R. Nicastro, J. Nielsen, Expanded metabolite coverage of *Saccharomyces cerevisiae* extract through improved chloroform/methanol extraction and tert-butyltrimethylsilyl derivatization, *Anal Chem Res* 6 (2015) 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ancr.2015.10.001>.
- [144] Z. Alves, A. Melo, A.R.P. Figueiredo, M.A. Coimbra, A.C. Gomes, S.M. Rocha, Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* Volatile Metabolome: Indigenous versus Commercial Strains, *PLoS One* 10 (2015). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:2350158>.

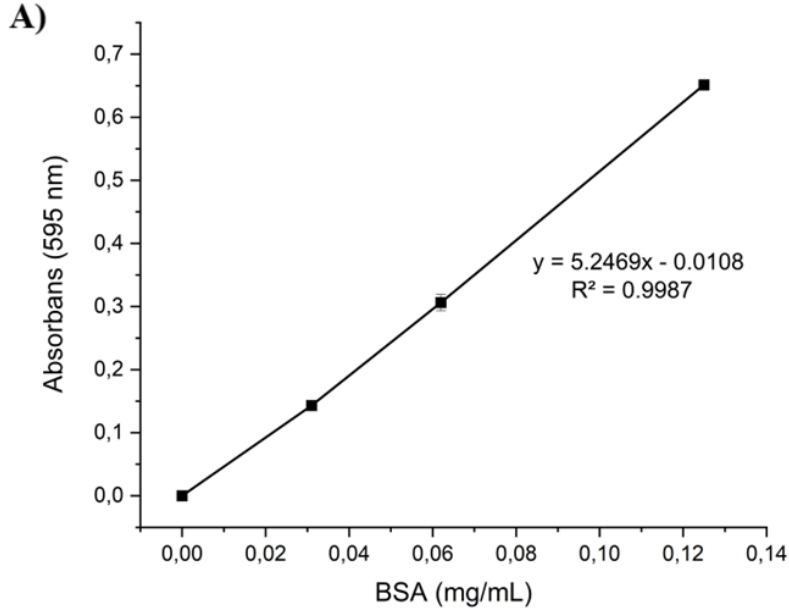
- [145] B. Sayın Börekçi, G. Kaban, M. Kaya, Citric Acid Production of Yeasts: An Overview, *Eurobiotech J* (2021). <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0012>.
- [146] S.K. Singh, R. Kaldate, A. Bisht, Chapter4.5 - Citric acid, antioxidant effects in health, in: S.M. Nabavi, A.S. Silva (Eds.), *Antioxidants Effects in Health*, Elsevier, 2022: pp. 309–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00045-8>.
- [147] V. Popova, T. Ivanova, A. Stoyanova, V. Nikolova, T. Hristeva, V.D. Zheljazkov, GC-MS Composition and Olfactory Profile of Concretes from the Flowers of Four *Nicotiana* Species, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25112617>.
- [148] N.P. Seeram, Y. Zhang, J.D. Reed, C.G. Krueger, J. Vaya, Pomegranate phytochemicals, in: *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*, 2006: pp. 3–29.
- [149] M.M. Pinc, M. Dalmagro, E. da Cruz Alves Pereira, G. Donadel, R.T. Thomaz, C. da Silva, P.D. Macruz, E. Jacomassi, A. Gasparotto Junior, J. Hoscheid, E.L.B. Lourenço, O. Alberton, Extraction Methods, Chemical Characterization, and In Vitro Biological Activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel Peels, *Pharmaceuticals* 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/ph16081173>.
- [150] C.P. Beyer, C. Barrientos-Sanhueza, E. Ponce, R. Pedreschi, I.F. Cuneo, J.E. Alvaro, Differential Hydraulic Properties and Primary Metabolism in Fine Root of Avocado Trees Rootstocks, *Plants* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/plants11081059>.
- [151] Z. Sun, T. Wang, N. Demelash, S. Zheng, W. Zhao, X. Chen, Y. Zhen, G. Qin, Effect of Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on Broilers: A Preliminary Study on the Effective Components of Yeast Culture, *Animals* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/ani10010068>.
- [152] D.R. Chhetri, Myo-Inositol and Its Derivatives: Their Emerging Role in the Treatment of Human Diseases, *Front Pharmacol* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01172>.
- [153] A.J. López-Gambero, C. Sanjuan, P.J. Serrano-Castro, J. Suárez, F. de Fonseca, The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic

- Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases, *Biomedicines* 8 (2020).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8090295>.
- [154] Y. Bai, H. Feng, N. Liu, X. Zhao, Biomass-Derived 2,3-Butanediol and Its Application in Biofuels Production, *Energies* (Basel) 16 (2023).
<https://doi.org/10.3390/en16155802>.
- [155] E.C. Rosas, L.B. Correa, M. das Graças Henriques, Chapter 28 - Antiinflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and Its Use in Arthritic Conditions, in: R.R. Watson, V.R. Preedy (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition)*, Second Edition, Academic Press, 2019: pp. 489–505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00028-3>.
- [156] S. Choubey, L.R. Varughese, V. Kumar, V. Beniwal, Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review, *Pharm Pat Anal* 4 (2015) 305–315. <https://doi.org/10.4155/ppa.15.14>.
- [157] D. Mokra, M. Joskova, J. Mokry, Therapeutic Effects of Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in Relation to Molecular Pathways Controlling Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24010340>.
- [158] Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, in: National Academies Press, Washington, D.C, 2000.
- [159] M.S. Bin Sayeed, S.M.R. Karim, T. Sharmin, M.M. Morshed, Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol, *Medicines* 3 (2016).
<https://doi.org/10.3390/medicines3040029>.
- [160] M.O.C. Coelho, A.J. Monteyne, I.D. Kamalanathan, V. Najdanovic-Visak, T.J.A. Finnigan, F.B. Stephens, B.T. Wall, Short-Communication: Ingestion of a Nucleotide-Rich Mixed Meal Increases Serum Uric Acid Concentrations but Does Not Affect Postprandial Blood Glucose or Serum Insulin Responses in Young Adults, *Nutrients* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12041115>.

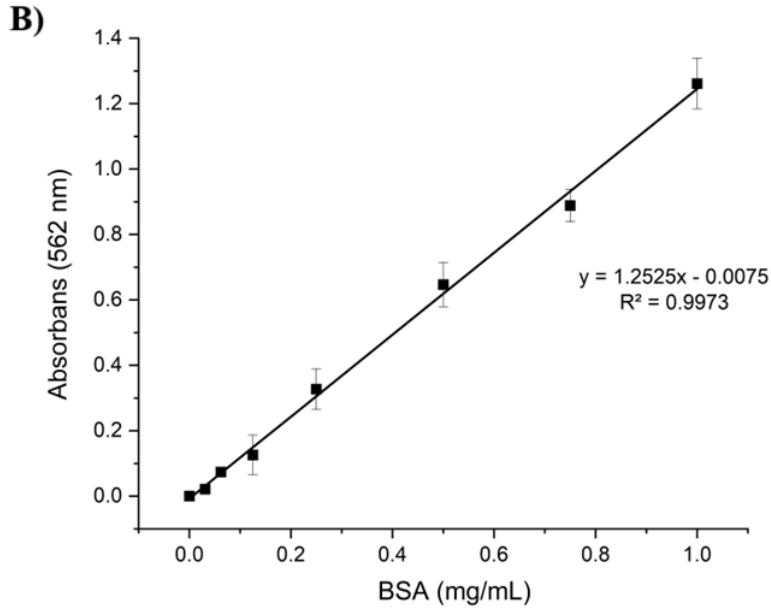
- [161] J.C. Edozien, U.U. Udo, V.R. Young, N.S. Scrimshaw, Effects of High Levels of Yeast Feeding on Uric Acid Metabolism of Young Men, *Nature* 228 (1970) 180. <https://doi.org/10.1038/228180a0>.
- [162] C.I. WASLIEN, D.H. CALLOWAY, S. MARGEN, F. COSTA, Uric Acid Levels in Men Fed Algae and Yeast as Protein Sources, *J Food Sci* 35 (1970) 294–298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1970.tb12166.x>.
- [163] N. A.T, S. Rasoul-Amini, M.H. Morowvat, G. Younes, Single Cell Protein: Production and Process, *Am J Food Technol* 6 (2011). <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>.
- [164] J.F. Pires, G.M.R. Ferreira, K.C. Reis, R.F. Schwan, C.F. Silva, Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution, *J Environ Manage* 182 (2016) 455–463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.006>.

EKLER

EK 1.1- Bradford Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.



EK 1.2- BCA Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.



EK 1.3- *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşunun YPD Broth besiyerindeki 0-24 saat aralığında ölçülen absorbans değerleri ve hücre konsantrasyonları.

Süre (saat)	Absorbans (600 nm)	Hücre Konsantrasyonu (log (CFU/mL))
0	0	0,000
0	0	0,000
0	0	0,000
0	0	0,000
2	0	0,000
2	0	0,000
2	0	0,000
2	0	0,000
4	0,067	0,778
4	0,067	0,778
4	0,061	0,714
4	0,061	0,714
6	0,067	0,778
6	0,067	0,778
6	0,064	0,746
6	0,064	0,746
8	0,069	0,799
8	0,069	0,799
8	0,069	0,799
8	0,069	0,799
10	0,068	0,788
10	0,067	0,778
10	0,058	0,683
10	0,058	0,683
12	0,114	1,273
12	0,115	1,283
12	0,106	1,189
12	0,105	1,178
14	0,127	1,410
14	0,129	1,431

14	0,149	1,642
14	0,153	1,684
16	0,264	2,854
16	0,266	2,875
16	0,266	2,875
16	0,266	2,875
18	0,63	6,710
18	0,631	6,721
18	0,635	6,763
18	0,636	6,773
20	1,03	10,925
20	1,029	10,915
20	1,09	11,557
20	1,101	11,673
22	1,383	14,645
22	1,38	14,613
22	1,401	14,835
22	1,401	14,835
24	1,434	15,182
24	1,429	15,130
24	1,545	16,352
24	1,543	16,331

EK 1.4- Beyaz üzüm suyu besiyerinde 0-24. saatler aralığında 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu *S. cerevisiae* suşlarına ait ölçülen absorbans ve hücre konsantrasyonu değerleri.

Saat	Suş Kodu	Absorbans (600 nm)	Hücre Konst. (log CFU/mL)
0	9763	0,000	0,072
0	9763	0,000	0,072
0	9763	0,000	0,072
0	9763	0,000	0,072
10	9763	0,000	0,072
10	9763	0,001	0,082
10	9763	0,000	0,077
10	9763	0,000	0,077
12	9763	0,073	0,841
12	9763	0,074	0,851
12	9763	0,085	0,967
12	9763	0,084	0,957
14	9763	0,168	1,842
14	9763	0,176	1,926
14	9763	0,188	2,053
14	9763	0,190	2,074
16	9763	0,318	3,423
16	9763	0,319	3,433
16	9763	0,355	3,812
16	9763	0,359	3,855
18	9763	0,528	5,635
18	9763	0,530	5,656
18	9763	0,597	6,362
18	9763	0,605	6,447
20	9763	0,718	7,638
20	9763	0,714	7,595
20	9763	0,742	7,890
20	9763	0,747	7,943
22	9763	0,956	10,145

22	9763	0,970	10,293
22	9763	0,865	9,187
22	9763	0,861	9,144
24	9763	0,948	10,061
24	9763	0,940	9,977
24	9763	0,927	9,840
24	9763	0,924	9,808
0	MERIT	0,050	0,599
0	MERIT	0,049	0,588
0	MERIT	0,050	0,593
0	MERIT	0,050	0,593
10	MERIT	0,225	2,443
10	MERIT	0,225	2,443
10	MERIT	-0,040	-0,350
10	MERIT	0,137	1,512
12	MERIT	0,088	0,999
12	MERIT	0,087	0,988
12	MERIT	0,082	0,936
12	MERIT	0,080	0,915
14	MERIT	0,153	1,684
14	MERIT	0,157	1,726
14	MERIT	0,155	1,705
14	MERIT	0,154	1,694
16	MERIT	0,292	3,149
16	MERIT	0,293	3,159
16	MERIT	0,306	3,296
16	MERIT	0,307	3,307
18	MERIT	0,511	5,456
18	MERIT	0,503	5,372
18	MERIT	0,533	5,688
18	MERIT	0,528	5,635
20	MERIT	0,751	7,985
20	MERIT	0,753	8,006

20	MERIT	0,905	9,612
20	MERIT	0,911	9,668
22	MERIT	0,868	9,218
22	MERIT	0,865	9,187
22	MERIT	0,795	8,449
22	MERIT	0,793	8,428
24	MERIT	0,823	8,744
24	MERIT	0,823	8,744
24	MERIT	0,819	8,702
24	MERIT	0,813	8,639
0	HUF16M2K10004	-0,081	-0,782
0	HUF16M2K10004	0,051	0,609
0	HUF16M2K10004	0,051	0,599
0	HUF16M2K10004	0,007	0,142
10	HUF16M2K10004	0,258	2,790
10	HUF16M2K10004	0,256	2,769
10	HUF16M2K10004	0,393	4,213
10	HUF16M2K10004	0,396	4,244
12	HUF16M2K10004	0,485	5,182
12	HUF16M2K10004	0,490	5,235
12	HUF16M2K10004	0,594	6,331
12	HUF16M2K10004	0,590	6,289
14	HUF16M2K10004	0,739	7,859
14	HUF16M2K10004	0,732	7,785
14	HUF16M2K10004	0,798	8,481
14	HUF16M2K10004	0,787	8,365
16	HUF16M2K10004	0,999	10,599
16	HUF16M2K10004	0,997	10,577
16	HUF16M2K10004	1,068	11,326
16	HUF16M2K10004	1,051	11,146
18	HUF16M2K10004	1,207	12,790
18	HUF16M2K10004	1,207	12,790
18	HUF16M2K10004	1,294	13,707

18	HUF16M2K10004	1,292	13,686
20	HUF16M2K10004	1,126	11,937
20	HUF16M2K10004	1,129	11,968
20	HUF16M2K10004	1,340	14,192
20	HUF16M2K10004	1,339	14,181
22	HUF16M2K10004	1,653	17,490
22	HUF16M2K10004	1,648	17,437
22	HUF16M2K10004	1,384	14,655
22	HUF16M2K10004	1,376	14,571
24	HUF16M2K10004	1,800	19,039
24	HUF16M2K10004	1,800	19,039
24	HUF16M2K10004	1,538	16,278
24	HUF16M2K10004	1,543	16,331
0	HUF16M3G11088	0,032	0,409
0	HUF16M3G11088	0,032	0,409
0	HUF16M3G11088	0,041	0,504
0	HUF16M3G11088	0,040	0,493
10	HUF16M3G11088	0,032	0,409
10	HUF16M3G11088	0,032	0,409
10	HUF16M3G11088	0,042	0,514
10	HUF16M3G11088	0,042	0,514
12	HUF16M3G11088	0,070	0,809
12	HUF16M3G11088	0,070	0,809
12	HUF16M3G11088	0,102	1,146
12	HUF16M3G11088	0,100	1,125
14	HUF16M3G11088	0,142	1,568
14	HUF16M3G11088	0,141	1,557
14	HUF16M3G11088	0,159	1,747
14	HUF16M3G11088	0,156	1,715
16	HUF16M3G11088	0,304	3,275
16	HUF16M3G11088	0,299	3,222
16	HUF16M3G11088	0,220	2,390
16	HUF16M3G11088	0,219	2,379

18	HUF16M3G11088	0,411	4,403
18	HUF16M3G11088	0,399	4,276
18	HUF16M3G11088	0,509	5,435
18	HUF16M3G11088	0,502	5,361
20	HUF16M3G11088	0,504	5,383
20	HUF16M3G11088	0,504	5,383
20	HUF16M3G11088	0,635	6,763
20	HUF16M3G11088	0,640	6,816
22	HUF16M3G11088	0,919	9,756
22	HUF16M3G11088	0,917	9,734
22	HUF16M3G11088	1,041	11,041
22	HUF16M3G11088	1,036	10,988
24	HUF16M3G11088	1,141	12,095
24	HUF16M3G11088	1,134	12,021
24	HUF16M3G11088	1,282	13,581
24	HUF16M3G11088	1,271	13,465
0	HUF16M3H11101	0,038	0,472
0	HUF16M3H11101	0,037	0,462
0	HUF16M3H11101	0,011	0,188
0	HUF16M3H11101	0,010	0,177
10	HUF16M3H11101	0,371	3,981
10	HUF16M3H11101	0,368	3,949
10	HUF16M3H11101	0,253	2,738
10	HUF16M3H11101	0,252	2,731
12	HUF16M3H11101	0,782	8,312
12	HUF16M3H11101	0,772	8,207
12	HUF16M3H11101	0,672	7,153
12	HUF16M3H11101	0,671	7,142
14	HUF16M3H11101	0,999	10,599
14	HUF16M3H11101	0,993	10,535
14	HUF16M3H11101	0,941	9,987
14	HUF16M3H11101	0,934	9,914
16	HUF16M3H11101	1,197	12,685

16	HUF16M3H11101	1,190	12,611
16	HUF16M3H11101	1,156	12,253
16	HUF16M3H11101	1,155	12,242
18	HUF16M3H11101	1,352	14,318
18	HUF16M3H11101	1,342	14,213
18	HUF16M3H11101	1,236	13,096
18	HUF16M3H11101	1,237	13,106
20	HUF16M3H11101	1,128	11,958
20	HUF16M3H11101	1,129	11,968
20	HUF16M3H11101	1,097	11,631
20	HUF16M3H11101	1,096	11,621
22	HUF16M3H11101	1,066	11,305
22	HUF16M3H11101	1,059	11,231
22	HUF16M3H11101	0,830	8,818
22	HUF16M3H11101	0,819	8,702
24	HUF16M3H11101	0,906	9,619
24	HUF16M3H11101	0,899	9,545
24	HUF16M3H11101	0,843	8,955
24	HUF16M3H11101	0,837	8,891

EK 1.5- Beyaz üzüm suyu besiyerinde 9763, MERIT™, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 ve HUF16M3H11101 kodlu *S. cerevisiae* suşlarına ait biyokütle verimleri ve üretilen protein miktarı.

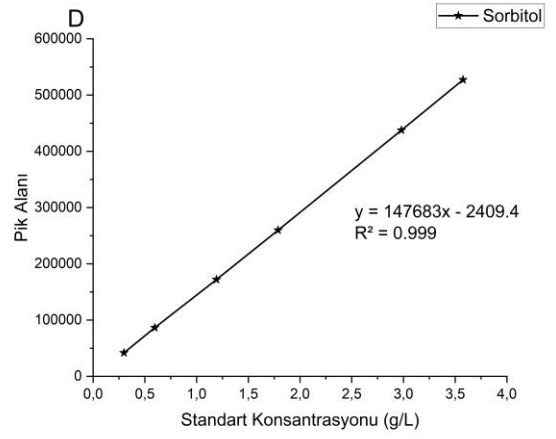
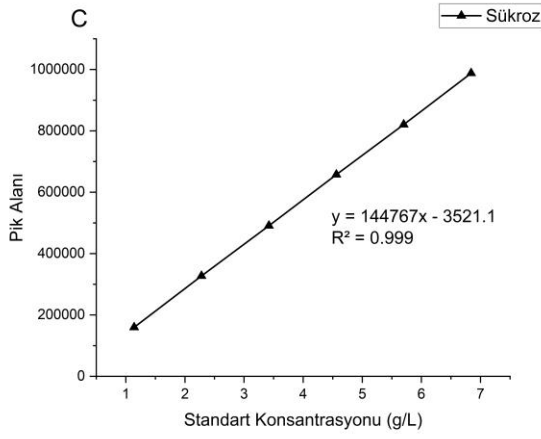
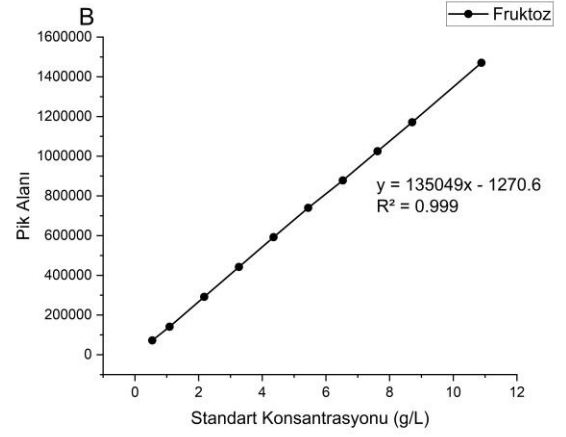
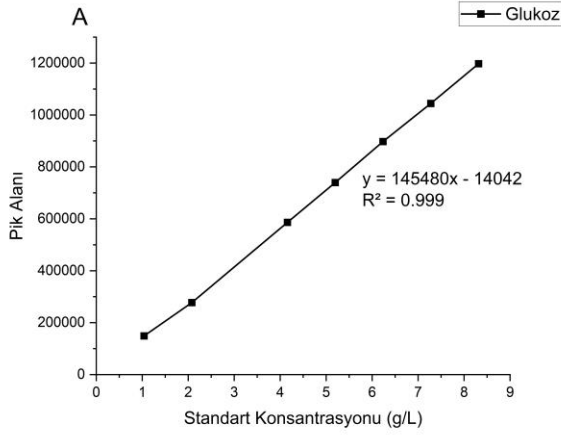
Saat	Suş Kodu	Biyokütle Verimi (mg/mL)	Üretilen Protein (%w/w)	
48	9763	5,03	2,09	
		4,34	2,47	
	MERIT	4,68	2,28	
		3,55	2,33	
		2,69	2,21	
		3,12	2,27	
		HUF16M2K10004	6,25	1,74
			6,14	1,40
	HUF16M3G11088	6,20	1,57	
		6,03	1,70	
		5,49	2,06	
	HUF16M3H11101	5,76	1,88	
		2,41	1,65	
		2,13	0,66	
2,27		1,16		
72	9763	3,25	2,24	
		2,71	2,65	

	2,98	2,44
MERIT	5,54	2,45
	5,29	1,99
	5,42	2,22
HUF16M2K10004	6,03	2,35
	6,05	2,21
	6,04	2,28
HUF16M3G11088	6,11	1,74
	6,31	2,12
	6,21	1,93
HUF16M3H11101	4,90	3,42
	5,15	2,41
	5,02	2,92

EK 1.6- Bazal besiyerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonda takip edilen fizikokimyasal ve biyolojik parametrelerin sonuçları.

Zaman (Saat)	Hücre Konsantrasyonu (Log CFU/mL)		pH		Biyokütle (mg/mL)		Protein (%w/w)	
	Bazal I	Bazal II	Bazal I	Bazal II	Bazal I	Bazal II	Bazal I	Bazal II
0	5,56	5,71	5,38	5,27	0,03	0,05	2,82	3,91
	5,76	5,85	5,35	5,27	0,04	0,05	2,52	4,24
	5,66	5,78	5,36	5,27	0,04	0,05	2,67	4,07
24	6,71	7,02	3,55	3,19	0,29	0,38	7,53	4,40
	6,92	6,90	3,54	3,20	0,31	0,39	7,85	4,67
	6,82	6,96	3,55	3,19	0,30	0,38	7,69	4,54
48	7,23	7,27	3,06	3,07	0,60	0,43	7,66	5,27
	7,20	7,15	3,06	3,08	0,58	0,45	8,16	5,65
	7,22	7,21	3,06	3,07	0,59	0,44	7,91	5,46
72	7,39	7,13	2,97	3,07	0,71	0,48	7,21	5,38
	7,34	7,00	2,97	3,07	0,76	0,48	7,42	5,99
	7,36	7,07	2,97	3,07	0,73	0,48	7,31	5,69

EK 1.7- İndirgen Şeker Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrileri



HPLC-RID ile indirgen şeker analizinde kullanılan kalibrasyon eğrileri. (A: Glukoz, B: Fruktoz, C: Sükroz, D: Sorbitol)

EK 1.8- Elma-armut (%50-%50, w/w), kayısı-çilek (%70-%30, w/w), şeftali (%100, w/w) ve nar kabuğu-nar çekirdeği (%50-%50, w/w) besiyerlerinde 9763, HUF16M2K10004 ve HUF16M3G11088 kodlu suşların fermantasyon takibi sonuçları.

Ortalama Hücre Sayım Sonuçları (log CFU/mL)					
Süre (Saat)	Suş Kodu	Elma-Armut	Kayısı-Çilek	Şeftali	Nar çekirdeği- nar kabuğu
0	9763	6,88±0,02 ^a	5,76±0,04 ^b	6,06±0,06 ^a	6,3±0,05 ^a
	HUF16M2K10004	5,76±0,06 ^b	6,13±0,07 ^a	5,88±0,06 ^b	6,26±0,01 ^a
	HUF16M3G11088	5,83±0,04 ^b	6,13±0,13 ^a	6,01±0,02 ^a	6,04±0,06 ^b
24	9763	7,03±0,01 ^b	6,97±0,02 ^b	7,65±0,03 ^a	6,81±0,01 ^a
	HUF16M2K10004	7,14±0,03 ^a	7,09±0,09 ^a	7,65±0,05 ^a	6,78±0,01 ^a
	HUF16M3G11088	6,95±0,02 ^c	7,13±0,02 ^a	7,61±0,04 ^a	6,55±0,03 ^b
48	9763	6,97±0,03 ^c	7,19±0,01 ^a	7,64±0,01 ^a	7±0,03 ^a

	HUF16M2K10004	7,21±0,01 ^a	6,99±0,01 ^c	7,59±0,02 ^b	6,89±0,01 ^b
	HUF16M3G11088	7,04±0,01 ^b	7,13±0,02 ^b	7,63±0,02 ^{ab}	6,65±0,04 ^c
72	9763	6,97±0,06 ^b	7,15±0,01 ^a	7,73±0,01 ^a	6,99±0,02 ^a
	HUF16M2K10004	7,12±0,03 ^a	6,96±0,01 ^c	7,6±0,03 ^b	6,92±0,07 ^a
	HUF16M3G11088	6,96±0,01 ^b	7,11±0,05 ^b	7,55±0,05 ^b	6,66±0,01 ^b

Aynı sütunda yer alan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0,05.

pH Ölçüm Sonuçları

Süre (Saat)	Suş Kodu	Elma-Armut	Kayısı-Çilek	Şeftali	Nar çekirdeği- nar kabuğu
0	9763	4,34±0,01 ^b	3,73±0,02 ^a	3,97±0,01 ^a	3,54±0,01 ^b
	HUF16M2K10004	4,29±0,01 ^c	3,72±0,01 ^a	3,86±0 ^c	3,5±0,01 ^c
	HUF16M3G11088	4,36±0,01 ^a	3,7±0,01 ^a	3,94±0,01 ^b	3,56±0,01 ^a
24	9763	4,04±0,01 ^b	3,66±0,05 ^a	3,71±0,04 ^a	3,46±0,01 ^a
	HUF16M2K10004	4,03±0,03 ^b	3,65±0,01 ^a	3,59±0,01 ^a	3,42±0,01 ^c
	HUF16M3G11088	4,12±0,01 ^a	3,63±0,01 ^b	3,52±0,01 ^b	3,43±0,01 ^b
48	9763	3,88±0,01 ^b	3,68±0,01 ^a	3,86±0,01 ^a	3,43±0,01 ^b
	HUF16M2K10004	3,85±0,01 ^c	3,69±0,01 ^a	3,77±0,01 ^b	3,39±0,01 ^c

	HUF16M3G11088	3,98±0,01 ^a	3,67±0,01 ^a	3,67±0,01 ^c	3,44±0 ^a
72	9763	3,84±0,01 ^b	3,74±0,01 ^a	3,82±0,01 ^a	3,38±0,01 ^b
	HUF16M2K10004	3,76±0,01 ^c	3,74±0,01 ^a	3,76±0,01 ^b	3,34±0,01 ^c
	HUF16M3G11088	3,92±0,01 ^a	3,71±0,05 ^b	3,64±0,01 ^c	3,41±0,01 ^a

Aynı sütunda yer alan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0,05.

Biyokütle Verimleri (mg/mL)					
Süre (Saat)	Suş Kodu	Elma-Armut	Kayısı-Çilek	Şeftali	Nar çekirdeği- nar kabuğu
0	9763	2,34±0,18 ^c	12,19±0,36 ^b	4,13±0,14 ^b	32,36±0,82 ^a
	HUF16M2K10004	4,54±0,23 ^a	6,61±0,09 ^c	7,95±0,05 ^a	29,3±0,63 ^b
	HUF16M3G11088	2,99±0,05 ^b	15,77±0,34 ^a	7,02±0,77 ^a	26,45±0,56 ^c
24	9763	3,95±0,29 ^b	12,79±0,54 ^b	5,77±0,16 ^b	33,12±2,73 ^a
	HUF16M2K10004	5,89±0,08 ^a	8,29±0,36 ^c	9,41±0,16 ^a	27,44±0,63 ^b
	HUF16M3G11088	4,42±0,44 ^b	15,64±0,25 ^a	9,11±0,52 ^a	24,81±0,6 ^b
48	9763	5,72±0,17 ^a	12,03±0,88 ^b	5,17±0,27 ^b	32,22±0,21 ^a
	HUF16M2K10004	6,51±0,3 ^a	8,12±0,18 ^c	9,49±0,1 ^a	26,3±0,11 ^b

	HUF16M3G11088	6,57±0,56 ^a	14,97±0,46 ^a	9,22±0,27 ^a	22,39±0,37 ^c
72	9763	5,01±0,14 ^a	12,71±0,18 ^b	5,88±0,19 ^c	33,14±0,81 ^a
	HUF16M2K10004	5,7±0,6 ^a	8,47±0,02 ^c	9,17±0,05 ^b	26,13±0,1 ^b
	HUF16M3G11088	5,23±0,84 ^a	15,28±0,61 ^a	9,68±0,21 ^a	25,51±0,55 ^b

Aynı sütunda yer alan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0,05.

Üretilen Protein Miktarı (%w/w)					
Süre (Saat)	Suş Kodu	Elma-Armut	Kayısı-Çilek	Şeftali	Nar çekirdeği- nar kabuğu
0	9763	1,51±0,08 ^a	9,34±0,92 ^b	1,4±0,96 ^a	19,41±0,03 ^a
	HUF16M2K10004	2,16±1,51 ^{ab}	7,08±0,27 ^c	2,31±0,94 ^a	14,6±0 ^c
	HUF16M3G11088	2,31±0,18 ^b	14,47±0,17 ^a	1,98±0,9 ^a	18,53±0,1 ^b
24	9763	2,21±0,08 ^b	8,68±0,74 ^b	1,53±0,59 ^a	21,55±0,03 ^a
	HUF16M2K10004	2,61±0,01 ^a	7,74±0,08 ^c	2,2±0,63 ^a	18,48±0,08 ^b
	HUF16M3G11088	1,9±0,1 ^c	12,01±0,12 ^a	2,24±0,59 ^a	21,9±0,43 ^a
48	9763	2,19±0,08 ^c	7,92±0,14 ^c	2,11±0,59 ^a	23,23±0,31 ^a
	HUF16M2K10004	5,00±0,1 ^a	9,34±0,09 ^b	2,11±0,52 ^a	18,04±0,36 ^c

	HUF16M3G11088	4,02±0,05 ^b	10,76±0,17 ^a	2,41±0,27 ^a	20,78±0,08 ^b
72	9763	1,5±0,57 ^a	5,86±0,2 ^c	1,05±0,15 ^c	23,52±0,1 ^a
	HUF16M2K10004	1,91±0,72 ^a	8,39±0,14 ^b	1,51±0,19 ^b	19,2±0,01 ^c
	HUF16M3G11088	2,62±0,83 ^a	11,12±0,07 ^a	2,2±0,24 ^a	21,45±0,18 ^b

Aynı sütunda yer alan örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0,05.

EK 1.9- Hacettepe Üniversitesi Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayım Merkezi (IFBBC) ev sahipliğinde Sagenit firması ile düzenlenen Yaşam Döngüsü Analizi (LCA) kursuna ait poster ve program.



 **Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayım Merkezi (IFBBC)**

Gıda Sektöründe Yaşam Döngüsü Analizi: Çevrimiçi Kısa Kurs

Gıda sektörü çalışanları,
Gıda Mühendisleri ile
İlgili bölüm öğrencileri, özel
ya da kamu kuruluşlarında çalışan
uzmanlar
IFBBC Kış Okuluna
davetlidir!

Bu kursta:


- Yaşam döngüsü analiz kavramı ve tarihçesi,
- Yaşam döngüsü analizinde süreç tasarımının nasıl gerçekleştiği
- Gıda sektöründe yaşam döngüsü analiz çalışmalarının amaçları ve önemi
- Gıda sektöründe yaşam döngüsü analizi yapan temel birimleri öğrenmeyi hedefliyoruz.

 27.01.2023
CUMA

 MICROSOFT
TEAMS

 SAAT
13.30 - 17.30

 KATILIMCILARA
SERTİFİKA
VERİLECEKTİR

 [KAYIT İÇİN TIKLAYIN](#)





Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayın Merkezi
(IFBBC)

Gıda Sektöründe Yaşam Döngüsü Analizi: Çevrimiçi Kısa Kurs

Program

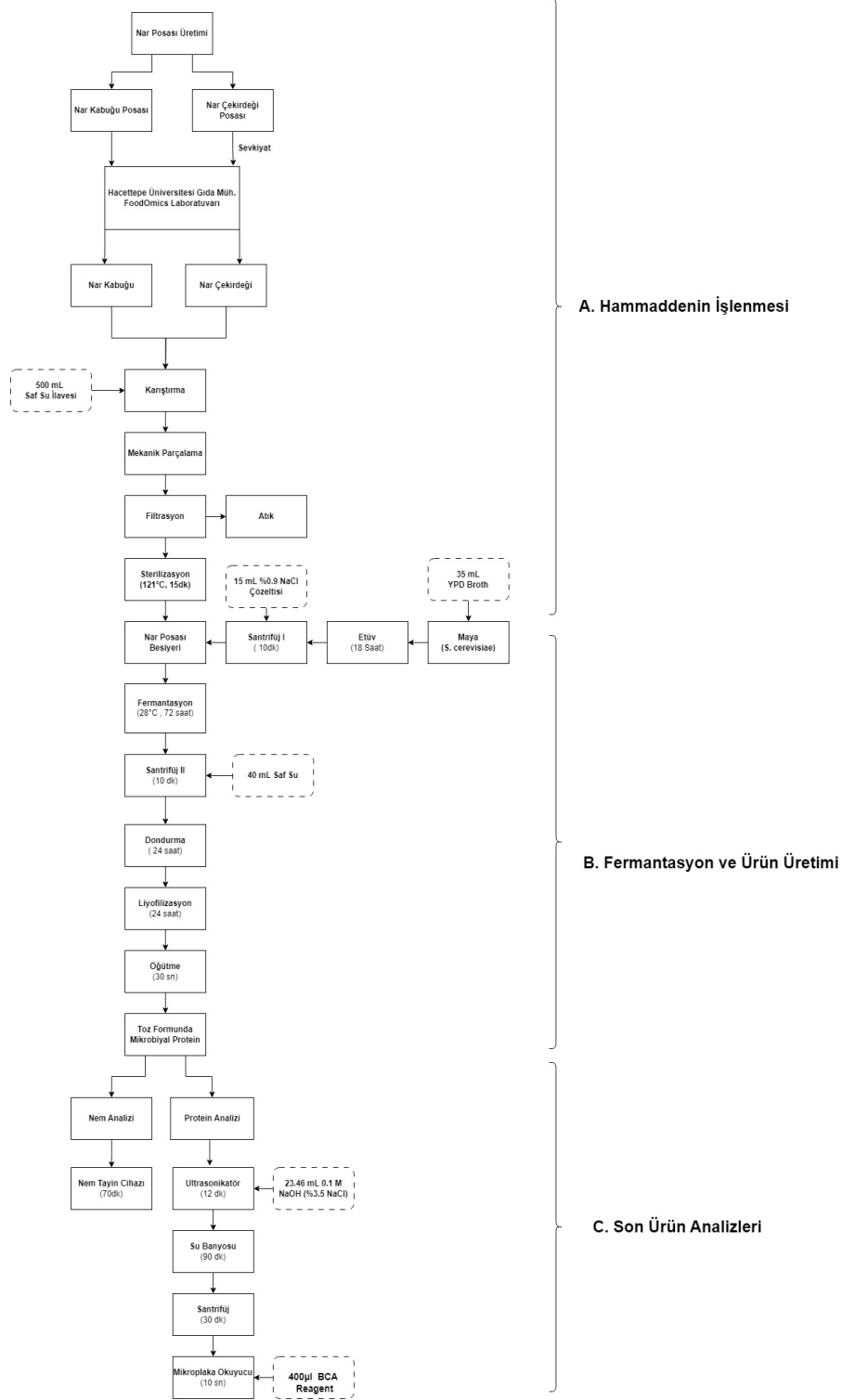
27.01.2023

13.30	Kayıt ve Kabul
13.45	Açılış konuşması Prof. Dr. Remziye Yılmaz /IFBBC
14.00-15.30	Yaşam Döngüsü Kavramı ve Tarihçesi Yaşam Döngüsü Süreçleri ve Süreç Tasarımı İlgili Standartlar (ISO 14040 Ve ISO 14044 Serisi) Konuşmacı: Bengi Çiftçi/Gıda Mühendisi
15.30-15.45	Ara
15.45-17.15	Hayat Boyu Envanter Analizi Çevresel Etkiler Döngüsel Ekonomi Konuşmacı: Yağmur Eyikoçak Koç /Çevre Mühendisi
17.15- 17.30	Soru&Cevap



SAGENİT Yön. Hizm. Org. San. ve Tic. Ltd. Şti.

EK 1.10- Nar kabuğu-nar çekirdeği yaş posaları ve HUF16M3G11088 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile biyoproses yoluyla üretilen liyofilize toz formdaki mikrobiyal proteinde yaşam döngüsü analizinde kullanılan proses akış diagramı ve proses verileri



Sistem Girdileri	Birim	Miktar
Nar kabuğu-Nar Çekirdeği	gr	125,62
Saf Su	mL	540
NaCl (%0.9)	mL	15
YPD Broth	mL	35
0.1 M NaOH (%3.5 NaCl)	mL	23,46
BCA (Bicinchoninic Acid Assay) Reagent	µl	400
Enerji Girdisi Hesabında Kullanılan Cihazlar	Süre	Güç
Blender (Mekanik parçalama için)	5 dakika	400 W
Otoklav (Sterilizasyon için)	2 Saat	3.0 kW
Etüv	18 saat	800 W
Santrifüj I&II	20 dakika	500 W
Çalkalamalı İnkübatör	72 Saat	650 W
Dondurucu	24 Saat	1 Ph
Liyofilizasyon	24 saat	0,85 Kva
Öğütme, Blender	30 saniye	400 W
Ultrasonikatör	12 dakika	98.6 W
Su banyosu	90 dakika	1600 W
Santrifüj	30 dakika	460 Watt
Mikroplaka Okuyucu	10 saniye	15 W
Çıkan Atıklar	Birim	Miktar
Suyu Sıkılmış Nar Posası Kalıntısı	gr	34,56
Sevkiyat	Birim	Miktar
Nar Çekirdeği ve Nar Kabuğu Sevkiyatı	tkm	0,000436

EK 2- Tezden Türetilmiş Bildiriler

EK 2.1- Yeşildağ, İ. C., Akın, H., Rüzgar, H., Yazıcı, Ş. , Yılmaz, R., “Analysis of Protein Secretion by Baker’s Yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, Birinci Uluslararası Biotech Studies (ICBIOS) Kongresi, 09-11 Kasım 2022, Sözlü Sunum.

November 9-11, 2022

Abstract E-Book of the 1st International Congress on Biotech Studies

Analysis of Protein Secretion by Baker’s Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ipek Ceren Yesildag¹ , Remziye Yilmaz¹ , Hilal Akin² , Hilal Ruzgar² , Serafettin Yazici²
¹Hacettepe University Department of Food Engineering FoodOmics Research Laboratory, Ankara,
TÜRKİYE
²Tunay Food, Ankara, TÜRKİYE

Baker’s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is one of the most important and widely used cell factories for protein production. Nevertheless, Its productivity is still relatively low, and with increasing market demand, it is important to identify new strains which are valuable hosts for the production of protein with a wide array of applications. Here, we analyzed the protein secretion level of the original (*Saccharomyces cerevisiae*) strains to understand their capability of protein production. The original and local (*S.cerevisiae*) strains in the FoodOmics Laboratory Culture Collection were evaluated according to their ability to secrete microbial protein. Grape juice was chosen as the medium and in order to enhance the secretory pathway, 1% yeast extract powder was added to grape juice and fermentation was carried out for 72 hours at 28°C. During the fermentation, to compare the original (*S. Cerevisiae*) (HUF16M1C0004, HUF16M2K10004, HUF16M3G11088 and HUF16M3H11101) and control (HUF16M1C0002) strains, the growth of the strains and the amount of secretion protein were monitored. As a result, specific growth rate coefficients of the studied strains were found in the range of 0.23-2.52 h⁻¹. The 0.66–1,62 g/L of microbial protein was obtained after 48 hours of fermentation, and 1,64-1,96 g/L at the end of 72 hours. The protein content was found to be significantly higher than some previous studies on (*S. Cerevisiae*). And we have successfully detected extracellular levels of proteins to choose some strains for further studies.

EK 2.2- Yeşildağ, İ. C., Akın, H., Yazıcı, Ş., Yılmaz, R, Yüksek Katma Değerli Ürünlerin Üretimi Amacıyla Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Kompozisyonunun Belirlenmesi, 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ekim 2023, Poster Sunumu.



Yüksek Katma Değerli Ürünlerin Üretimi Amacıyla Meyve Suyu Endüstrisi Atıklarının Kompozisyonunun Belirlenmesi



İpek Ceren YEŞİLDAG^{1,2}, Hilal AKIN⁴, Şerafettin YAZICI⁴, Remziye YILMAZ^{2,3*}

¹Gıda Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

²FoodOmics Laboratuvarı, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

³Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayın Merkezi (IFBBC), Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

⁴Tunay Gıda San. Ve Tic. A.Ş., Erzinca, 24000

*e-mail: remziye@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Gıda atıklarının değerlendirilmesi, atıkların karbon ayak izinin azaltılması, döngüsel ekonomi modelinin benimsenmesi ve sürdürülebilir kalkınma amaçlarının gerçekleştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu kapsamda gıda atıklarının katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülebilmesi için kompozisyonlarının analiz edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, Tunay Gıda meyve suyu üretim işletmesinden temin edilen ve üretim atıkları olan elma, armut, nar, şeftali, çilek, kayısı ve siyah havuç yaş posalarının kurumadde-nem, kül, protein, ham lif ve indirgen şeker içerikleri analiz edilerek yüksek katma değere sahip ürün üretimlerindeki hammaddeler olarak kullanıma potansiyelleri değerlendirilmiştir.

GİRİŞ

FAO'nun yayınladığı rapora göre, bir yılda üretilen gıdaların 1/3'ü atık haline gelmekte ve bu yıllık 400 milyar dolar ekonomik kayba yol açmaktadır. Kaynak kaybının yanı sıra gıda atıkları yılda 3.3 milyar ton CO₂ gazı salınımına neden olarak sera gazı emisyonlarının artmasına neden olmaktadır.



Meyve suyu endüstrisi, atık üretiminin en fazla olduğu endüstriler arasında bulunmakta beraber işlenen meyvelerin 20-80%'lik kısmı atık haline gelmektedir. Atıklar kompozisyonundaki su, lif, mineral, protein ve indirgen şekerler sayesinde biyoteknolojik uygulamalar için zengin bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Yukarıda gıda endüstrisi atıklarının değerlendirilmesi ile ilgili sürdürülebilir kalkınma amaçları gösterilmiştir.

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

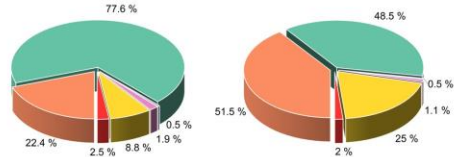


KAYNAKÇA

- [1] P.A.R. Fernandes, S.S. Ferreira, R. Bastos, I. Ferreira, M.T. Cruz, A. Pinto, E. Coelho, C.P. Passos, M.A. Coimbra, S.M. Cardoso, D.F. Wessel, Apple Pomace Extract as a Sustainable Food Ingredient, Antioxidants, 8 (2019) 189.
 [2] AOAC-Official Methods of Analysis Of The Association of Official Analytical Chemists, 19th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia USA, 1990.
 [3] Q. Jin, N. Qureshi, H. Wang, H. Huang, Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by Clostridium beijerinckii P260, Fuel, 244 (2019) 536-544.
 [4] Granucci, N., Harris, P. J., & Villas-Boas, S. G. (2023). Chemical Compositions of Fruit and Vegetable Pomes from the Beverage Industries. Waste and Biomass Valorization, 1-16.

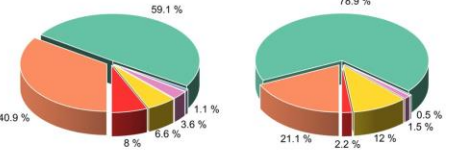
BULGULAR

Kurumadde Nem Kül
Protein Ham Lif İndirgen Şeker



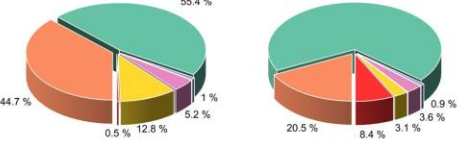
ELMA POSASI

ARMUT POSASI



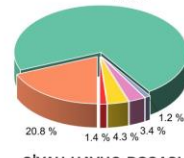
NAR POSASI

ŞEFTALİ POSASI



ÇİLEK POSASI

KAYISI POSASI



SİYAH HAVUÇ POSASI

SONUÇ ve TARTIŞMA

Analizler sonucunda meyve suyu endüstrisi atıklarından olan elma, armut, nar, şeftali, çilek, kayısı ve siyah havuç yaş posalarındaki nem içeriği % cinsinden 48.48 (Armut)- 79.46 (Kayısı) arasında değişmektedir. Aynı örneklerde kül içeriği % cinsinden 0.46 (Armut)-1.07 (Nar) oranları arasında bulunmaktadır. Protein içeriği ise % cinsinden 1.10 (Armut)-5.20 (Çilek) aralığında saptanmıştır. Ham lif içeriklerinin %3.13 (Kayısı) ile %24.97 (Armut) aralığında olduğu bulunmuştur. İndirgen şeker içeriği % 0.5 (Çilek) ile %8.43 (Kayısı) arasındadır. Posaların içeriğini oluşturan bileşenlerin yüzde miktarına göre büyüden küçüğe sırasıyla lif, indirgen şeker ve protein olduğu saptanmıştır. Analiz edilen yaş posalardaki indirgen şeker ve protein bileşenleri miktarlarının önemli düzeyde olması nedeniyle mikrobiyal fermentasyonda kullanılabilir. Ayrıca bu posalar, lif içeriğinin yüksek olması sebebiyle konsantre lif üretiminde kullanıma potansiyeline sahiptir. Elde edilen sonuçlar şimdiye kadar sadece hayvan yemi ve biyogaz üretiminde kullanılan yaş posaların^[4] biyoproses ve bileşen ekstraksiyonunda hammaddeler olarak kullanımını desteklemektedir.