

EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Probiyotik Bakteri Üretim Optimizasyonu ve
Ölçek Büyütme Çalışmaları**

Biray BALER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sait SARGIN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bornova-İZMİR

2022



Kabul ve onay sayfası





ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

Ege Üniversitesi Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükmü uyarınca hazırlamış olduğum “**Probiyotik Bakteri Üretim Optimizasyonu ve Ölçek Büyütme Çalışmaları**” başlıklı bitirme tezimde bilimsel araştırma sürecindeki etik ilkelere uyulduğunu, kullanılan kaynakların kaynak gösterme ilkelerine uygun olarak tezde belirtildiğini ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

02/06/2022

Biray BALER



ÖZET

Probiyotik Bakteri Üretim Optimizasyonu ve Ölçek Büyütme Çalışmaları

BALER, Biray

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sait SARGIN

Haziran 2022, 81 Sayfa

Bu çalışmada probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* BG24 suşunun, derin kültür fermentasyonu, optimizasyon ve ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon deneyleri için 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe Man Rogosa, Sharp (MRS) Broth üretim ortamı olarak kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları için dört parametre seçilmiştir; havalandırma (0-1 vvm), karıştırma (0-500 rpm), aşı oranı (%1-10) ve üretim süresi (2-24 saat). Yapılan analizler sonucunda 479 rpm karıştırma hızı, %3 aşı oranı ve 18 saatlik üretim süresi seçilen optimum değerlerdir. 3D model grafikleri karıştırma ve havalandırmanın aynı anda olmasının biyokütle miktarını azalttığını göstermiştir. 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe gerçekleştirilen kontrol deneyinde, optik yoğunluk 9,6; biyokütle 3,8 g/L; toplam canlı sayısı $7,6 \times 10^{11}$ kob/ml bulunmuştur. Ölçek büyütme çalışmaları 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe iki farklı yöntemle denenmiştir. Geometrik orana göre yapılan hesaplamalar neticesinde karıştırma hızı 410 rpm olan deneme üretimi gerçekleştirilmiştir. Analizler, üretimin 18. saatinde optik yoğunluğun 8, biyokütlenin 3,7 g/L ve toplam canlı sayısının $4,8 \times 10^{11}$ kob/ml olduğunu göstermiştir. Güç sayısı hesabına göre gerçekleştirilen deneme üretiminde karıştırma hızı 589 rpm belirlenmiş ve optik yoğunluk 8.735, biyokütle 4 g/L, toplam canlı sayısı $1,7 \times 10^{12}$ kob/ml ölçülmüştür. Ölçek büyütme yöntemi olarak güç sayısı hesabı seçilmiştir. Bu yöntemle, pilot ölçekli 100 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe karıştırma hızı hesabı yapılmıştır. 270 rpm karıştırma hızında üretim sonuçları; optik yoğunluk 8.2, biyokütle 2,75 g/L ve toplam canlı sayısı $1,4 \times 10^{10}$ kob/ml bulunmuştur. Optimizasyon deneylerinde yüksek havalandırmaya sahip üretimlerin yüksek sonuçlar vermesi nedeniyle 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörü ve hava kaldırmalı biyoreaktörde 1vvm hava beslemesiyle deneme üretimleri yapılmıştır. Hava beslemeli üretim sonuçları, mekanik karıştırmaya sahip üretimlere kıyasla düşük bulunmuştur. Mekanik karıştırma biyokütle üretimi için daha verimli bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, *Lactobacillus plantarum* BG24, biyoreaktör, optimizasyon, ölçek büyütme.



ABSTRACT

Optimization of Probiotic Bacteria Production and Scale-Up Studies

BALER, Biray

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Sait SARGIN

June 2022, 81 pages

In this study, optimization and scale-up studies were carried out by submerged fermentation of *Lactobacillus plantarum* BG24 strain, which is a probiotic bacterium. For the optimization experiments, *Man Rogosa, Sharp* (MRS) Broth was used as the production medium in a 5-liter stirred tank bioreactor. Four parameters were chosen for optimization studies; aeration (0-1 vvm), mixing (0-500 rpm), inoculation rate (1-10%), and production time (2-24 hours). As a result of the analysis, 479 rpm mixing speed, 3% inoculation ratio and 18 hours production time are the optimum values selected. The 3D model graphics showed that simultaneous mixing and aeration reduced the amount of biomass. In the control experiment performed in a 5 liter stirred tank bioreactor, the optical density was 9.6; biomass was 3.8 g/L; The total number of organisms was found to be 7.6×10^{11} cfu/ml. Scale-up studies were tested in a 10 liter stirred tank bioreactor with two different methods. As a result of the calculations made according to the geometric ratio, trial production was carried out with a mixing speed of 410 rpm. The analyzes showed that the optical density was 8, the biomass was 3.7 g/L and the total number of organisms was 4.8×10^{11} cfu/ml at the 18th hour of production. The mixing speed was determined at 589 rpm and the optical density was 8.735, the biomass was 4 g/L, and the total number of organisms was 1.7×10^{12} cfu/ml. Impeller power number calculation was chosen as the scale-up method. With this method, the mixing rate was calculated in a pilot scale 100 liter stirred tank bioreactor. Production results in a pilot scale bioreactor at a stirring speed of 270 rpm; the optical density was 8.2, the biomass was 2.75 g/L and the total number of organisms was 1.4×10^{10} cfu/ml. Since the productions with high aeration yielded high results in the optimization experiments, trial productions were carried out in a 10-liter stirred tank bioreactor and in an air-lift bioreactor with 1vvm air supply. Air-fed production results were found to be low compared to productions with mechanical agitation. Mechanical mixing was found to be more efficient for biomass production.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus plantarum* BG24, bioreactor, optimization, scale-up.

ÖNSÖZ

Yapmış olduğum tez çalışmam süresi boyunca bana destek ve yardımlarını esirgemeyen, değerli zamanını sürekli ayıran, çalışmama fikirleri ile yön veren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sait SARGIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, her durumda desteğini hissettiğim kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Emek ASLAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamın gerçekleşebilmesini sağlayan FBG-2019-21412 kodlu GÜDÜMLÜ Proje'ye destek veren Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, vaktini ayırarak üretim süreçlerinde bana yol gösteren Biyoproses Laboratuvarımızın değerli yetkilisi Sayın Arş. Gör. Ahmet DÜZEL'e teşekkür ederim.

Yardıma ihtiyaç duyduğumda çekinmeden sorabildiğim, kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Sayın Oğulcan ARAS ve Sayın Ertay SAVAŞ'a teşekkür ederim.

Benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, attığım her adımda ve aldığım her kararda yanımda olan, çok sevgili aileme en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi iletirim.

İZMİR

02/06/2022

Biray BALER



İÇİNDEKİLER

<u>Başlık</u>	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay Sayfası.....	iii
Etik İlkeler Uyumluk Beyanı.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1.Probiyotikler.....	3
2.1.1. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	5
2.2.Laktik Asit Bakterileri.....	6
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	7
2.3.Probiyotik Üretimi.....	7
2.3.1. Suş Seçimi.....	8
2.3.2. Medya Formülasyonu.....	9
2.3.3. Fermantasyon.....	10
2.3.4. Santrifüjleme.....	10
2.4.Biyoreaktörler.....	11
2.4.1. Karıştırmalı Tank Biyoreaktör.....	12
2.4.1.1.Çalışma prensibine göre reaktör çeşitleri.....	14
2.4.1.1.1. Kesikli fermantasyon.....	14
2.4.1.1.2. Sürekli fermantasyon.....	16
2.4.1.1.3. Yarı-kesikli fermantasyon.....	17
2.4.1.2.Biyoreaktör Tasarımı.....	18
2.4.2. Hava Kaldırma Biyoreaktörler.....	19
2.4.2.1.Hava Kaldırma Biyoreaktörlerin Avantajları.....	21
2.5.Optimizasyon.....	21
2.6.Biyoreaktörlerde Ölçek Büyütme.....	22
2.6.1. Fiziksel Özellikleri.....	25
2.6.1.1.Havalandırma ve Karıştırma.....	25
2.6.1.2.Kesme hızı (Shear Rate).....	27
2.6.1.3.Karıştırma Süresi.....	28
2.6.2. Biyokimyasal Faktörler.....	29
3. MATERYAL-METOT.....	30

3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Mikroorganizma.....	30
3.1.2. Kullanılan Besin Ortamları.....	30
3.1.3. Dilüsyon Çözeltisi.....	30
3.1.4. Kullanılan Köpük Kırıcı.....	31
3.1.5. Kullanılan Cihazlar.....	31
3.2. METOT.....	33
3.2.1. Aşı Kültürünün Hazırlanması.....	33
3.2.2. 5 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları.....	33
3.2.3. 10 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları.....	35
3.2.4. Pilot Ölçekli Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları.....	37
3.2.5. Hava Kaldırılmalı Biyoreaktörde Üretim Koşulları.....	38
3.2.6. Biyoreaktör Üretimleri Deney Tasarımı.....	38
3.2.7. Ölçek Büyütme Çalışmaları.....	40
3.2.7.1. Yoğunluk Tayini.....	41
3.2.7.2. Viskozite Tayini.....	41
3.2.8. Üretim Sonrası Tayinler.....	42
3.2.8.1. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi.....	42
3.2.8.2. Biyokütlenin Belirlenmesi.....	42
3.2.8.3. Toplam Canlı Sayımı.....	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Deneme Üretimi.....	44
4.2. Deney Tasarımı Üretim Sonuçları.....	46
4.2.1. Analiz Sonuçları.....	47
4.2.2. Optimizasyon.....	51
4.2.2.1. Kontrol Deneyi.....	52
4.3. Ölçek Büyütme Çalışmaları.....	54
4.3.1. Geometrik Oranla Karıştırıcı Ucu Hızı Hesaplama.....	54
4.3.1.1. Geometrik Oranla Ölçek Büyütme Üretimi.....	54
4.3.2. Güç Sayısına (N_p) Göre Ölçek Büyütme.....	55
4.3.2.1. Güç Sayısına Göre Deneme Üretimi.....	58
4.3.3. Ölçek Büyütme Üretimi.....	59
4.3.4. Pilot Ölçek Üretimi.....	61
4.4. Hava Beslemeli Üretimler.....	64
4.4.1. Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Hava Beslemeli Deneme Üretimi.....	65
4.4.2. Hava Kaldırılmalı Biyoreaktör Üretimi.....	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	73

ÖZGEÇMİŞ.....	82
---------------	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Probiyotik başlangıç kültürü suşları için probiyotik üretiminin şematik gösterimi.....	8
2.2. Büyüme Eğrisi.....	16
2.3. Karıştırılmalı tank biyoreaktör tasarımı.....	18
2.4.Hava kaldırmalı ve kabarcık kolonlu biyoreaktörler.....	20
2.5. Küçükten büyüğe reaktör ölçek boyutları.....	22
2.6. Bir model biyoreaktörde güç sayısı ile Reynolds sayısı.....	27
2.7. Ölçek büyütme	29
3.1. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilen MRS Broth aşısı ortamı.....	33
3.2. 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü.....	34
3.3. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü.....	35
3.4. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörü.....	36
3.5. Hava kaldırmalı biyoreaktör.....	37
3.6. Hava kaldırmalı biyoreaktörde akış bölgeleri.....	38
3.7. Viskozitemetre cihazı.....	42
3.8. Sayım öncesi petri kaplarının görüntüsü.....	43
4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> BG24 suşuna ait biyokütleye karşı zaman grafiği.....	44
4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> BG24 suşuna ait optik yoğunluğa karşı zaman grafiği.....	45
4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> BG24 suşuna ait canlı hücre sayısına karşı zaman grafiği.....	45
4.4. Predicted vs. Actual analiz grafiği.....	48
4.5. Box-Cox grafiği.....	49
4.6. 3 boyutlu model grafiği (A: Havalandırma, B: Karıştırma).....	49
4.7. 3 boyutlu model grafiği (A: Havalandırma, C: Aşı oranı).....	50
4.8. 3 boyutlu model grafiği (B:Karıştırma, D:Süre).....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

Şekil	Sayfa
4.9. 3 boyutlu model grafiği (A:Havalandırma, D:Süre).....	51
4.10. 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.....	56
4.11. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.....	58
4.12. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktöründe optik yoğunluk-zaman grafiği.....	59
4.13. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktöründe biyokütle-zaman grafiği.....	60
4.14. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörde toplam canlı-zaman grafiği.....	60
4.15. 100 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.....	62
4.16. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde optik yoğunluk-zaman grafiği.....	62
4.17. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde biyokütle-zaman grafiği.....	63
4.18. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde toplam canlı sayımı-zaman grafiği.....	63
4.19. Hava kaldırmalı biyoreaktörde optik yoğunluk-zaman grafiği.....	67
4.20. Hava kaldırmalı biyoreaktörde biyokütle-zaman grafiği.....	67
4.21. Hava kaldırmalı biyoreaktörde toplam canlı-zaman grafiği.....	68



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	4
2.2. Biyoreaktör tasarım formülleri.....	19
2.3. Farklı seviyelerde ölçek büyütme faktörlerinin genel etkileri.....	23
3.1. Design expert 7.0 Box-Behnken deney tasarımı.....	39
4.1. Design expert 7.0 deney tasarım sonuçları.....	46
4.2. Deney tasarım üretimlerinin ANOVA sonuçları.....	47
4.3. Deneysel tasarımına ait standart sapma ve R^2 değerleri.....	48
4.4. Kontrol deneyleri tablosu.....	52
4.5. Kontrol deneyi sonuçları.....	53
4.6. Geometrik oranla ölçek büyütme deneyi sonuçları.....	55
4.7. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde, güç sayısına göre ölçek büyütme sonuçları.....	58
4.8. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde, güç sayısına göre ölçek büyütme sonuçları.....	65

1. GİRİŞ

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenlidir, “pro” ve “biota” olarak iki kısımdan oluşmaktadır. “Yaşam için” anlamını taşıyan bu kelime, canlı mikroorganizmalar için kullanılmaktadır (Taşdemir A., 2017). Probiyotik kelimesi, ilk olarak 1965 yılında Lilley ve Stillwell tarafından bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve diğerinin büyümesini teşvik eden maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu formda kullanımı kalıcı olmamıştır ve daha sonra Sperti (1971) tarafından mikrobiyal büyümeyi uyarıcı doku özütlerini tanımlamak için kullanılmıştır. Fuller (1989), probiyotikleri 'bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek konakçı hayvanı faydalı bir şekilde etkileyen canlı bir mikrobiyal yem takviyesi' olarak tanımlamıştır. Bu gözden geçirilmiş tanım, bir probiyotiğin uygulanabilir olması ihtiyacını vurgulamıştır (Fuller R., 1989).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya ve Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan raporlara göre bir mikroorganizmaya probiyotik denmesi için belli koşullar bulunmaktadır. Mikroorganizma, sindirim sistemi boyunca canlı kalabilmeli, toksik bir etkiye sahip olmamalı, hızlı gelişebilmeli ve sindirim sistemi koşullarına kolay uyum sağlamalıdır (Bağdatlı, A. ve Kundakçı, A., 2013).

Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandıklarında konağın sağlığı üzerinde yararlı bir etkiye sahip olabilen canlı organizmalar olarak tanımlanır. Probiyotiklerin, ishal, üst solunum yolu enfeksiyonları, atopik egzama ve bazı inflamatuvar durumlar dahil olmak üzere çeşitli durumlarda etkili olduğu gösterilmiştir (King, S. vd., 2014).

Probiyotik mikroorganizmaların seçiminin teorik temeli 3 basamaktan oluşmaktadır. Mikroorganizmanın güvenliğine, işlevine (hayatta kalma, bağlılık, kolonizasyon, antimikrobiyal üretim, bağışıklık uyarımı ve patojenlerin önlenmesi) ve teknolojik yönlerine (sütte büyüme, duyu özellikler, stabilite, faj direnci, süreçlerde uygulanabilirlik) bakılmaktadır (Saarela, M. vd., 2000).

Canlılarda probiyotik seçimi için kullanılan mikroorganizmanın canlılığının florasında bulunması gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin (LAB) mide ve ince bağırsakta canlılığını kaybetmemesi için düşük pH ve safra tuzlarına dirençli olması

gerekmektedir (Yoon, K. Y., vd., 2006). İnsan bağırsak florasında en sık tespit edilen mikroorganizmalar *Bifidobacteriae* ve *Lactobacillus*'tur.

Lactobacillus plantarum bir laktik asit bakterisidir. *Lactobacillus plantarum*, tek başına veya kısa zincirler halinde gruplanmış çubuk morfolojisine sahip, heterofermentatif fakültatif anaerobik bir gram-pozitif mikroorganizmadır. Çeşitli gıda fermantasyon işlemlerinde bir başlangıç kültürü olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda nihai ürünlerin güvenliğine de katkıda bulunur ve probiyotik olarak kullanılır (Todorov and Franco, 2010).

Biyoreaktörler, çeşitli mikroorganizmaları, enzimleri vb. üretmeye yarayan kapalı kaplardır. Biyoreaktörlerde doğru ortam parametrelerini kullanarak üretim optimum hale getirilir. Pek çok ölçeğe sahip biyoreaktörler, endüstriyel ölçekli üretimlerde, probiyotik üretiminde kullanılır.

Brinques ve ark., yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus plantarum* ile probiyotik üretiminin optimizasyonunu araştırmışlardır (Brinques vd., 2009). Georgieva ve ark, çalışmalarında peynirden izole ettikleri *L. plantarum* için büyüme parametrelerini incelemişlerdir (Georgieva, R. vd., 2009). Razmjooei ve ark., farklı karbon kaynaklarının *L. plantarum* üzerindeki etkilerini gözlemlemişlerdir (Razmjooei, M. vd., 2020). İncelenen çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, *L. plantarum* kullanılarak probiyotik üretimiyle ilgili pek fazla çalışma olmamakla birlikte, yapılan bu çalışmalarda yalnızca üretim optimizasyonu ele alınmıştır. Ölçek büyütme çalışmalarına rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, bir probiyotik bakteri olan *Lactobacillus plantarum* BG24 suşunun laboratuvar ölçekli biyoreaktörde üretiminin optimize edilmesi ve ölçek büyütme parametrelerinin belirlenmesidir. Proses sırasında derin kültür yöntemi uygulanmış ve besiyeri olarak MRS Broth kullanılmıştır. Üretim optimizasyonu için, 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde başlandıktan sonra ölçek büyütme çalışmaları için 10 litrelik ve 100 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörler kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Probiyotikler

Dünya çapında çoğunluğunu probiyotik gıdaların oluşturduğu fonksiyonel ürünlerin tüketimine yönelik bir eğilim söz konusudur ve bu durum gün geçtikçe artmaktadır. Probiyotikler, “bağırsak yolundaki mikrofloranın dengesini iyileştirerek konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı bir mikrobiyal takviye” olarak tanımlanmaktadır (T. R. Klaenhammer, 2001; FAO/WHO, 2003).

Antibiyotiklerin birçok yararlı etkisi olmasına rağmen, aşırı kullanımları patojenik mikroorganizmalara karşı direnç gelişimine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu, 2006 yılında Avrupa Birliği'nin antibiyotiklerin hayvancılıkta büyüme destekleyici olarak kullanımını yasaklamasına yol açmıştır (Andersson vd., 2001). Son yıllarda probiyotikler genellikle umut verici bir alternatif olarak önerilmiştir (Botes vd., 2008).

Yaklaşık 20 yıl önce probiyotikler, hayvancılıkta antibiyotiklerin rolünün en azından bir kısmını üstlenebilecek bir alternatif olarak düşünölmeye başlanmıştır (Fuller R., 1989). Daha yakın zamanlarda, insan tüketimi için özellikle fermente süt ürünleri olmak üzere probiyotiklerin geliştirilmesine hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan ilgide güçlü bir artış olmuştur (Lode J. A. and Dora I. Pereira, 1999).

Probiyotiklerin sağlıkla ilişkisi uzun bir geçmişe sahiptir. Tissier, sağlıklı anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsak mikrobiyotasının, formöl mama ile beslenen ve ishalden muzdarip bebeklerde bulunmayan bifid şekilli bifidobakterilere sahip çubukların baskın olduğunu gözlemlediğinden bu yana bir asırdan fazla zaman geçmiştir. Bu durum, probiyotiklerin sağlığın korunmasında rol oynadıkları kavramını ortaya koymuştur (Kechagia vd., 2013).

Bireylerin sağlık durumu, gastrointestinal sistemde yaşayan mikroflora tarafından belirlenir. Diyet, stres, hastalıklar, tedaviler ve çevre, bağırsaktaki mikroorganizmaların bileşimini ve aktivitesini etkiler. Gastrointestinal mikrofloranın dengesini yeniden kurmanın bir yolu, faydalı laktobasiller ve bifidobakterilerin probiyotikler veya probiyotik gıdalar şeklinde verilmesidir. Probiyotikler, yeterli

miktarlarda uygulandığında konakçıya faydalı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Gibson, G.R., 2004).

Oral probiyotik tüketimi, yararlı bir “yeniden dengeleyici” şekilde bağırsak mikroflora dengesini değiştirmeye etki eder ve böylece tüketicinin sindirim sağlığına yardımcı olur. Probiyotikler ayrıca ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve huzursuz bağırsak sendromu gibi bağırsak rahatsızlıklarını iyileştirmede yerleşik faydaları ile bilinir. Kalp hastalığı, otizm ve alerji gibi diğer durumlarda da faydalıdırlar (Savini, M, vd., 2010).

Probiyotiklerin ana bileşenleri, probiyotik gıdaların üretiminde de uygulanan laktik asit bakterileri (Lactobacillus, Enterococcus, Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc) ve bifidobakterilerdir. Bu probiyotik bakterilerinin sağlık üzerinde bağışıklık sistemini güçlendirme, gastrointestinal enfeksiyonları, diareyi ve gıda kaynaklı bazı alerjileri önleme gibi faydaları vardır (Randazzo vd., 2013; Segers and Lebeer, 2014). En büyük oranı laktobasildir (Remzi Cholakov vd., 2014). Tablo 2.1’de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Karahan Z. C. ve Güvener E., 1999).

Bakteriler			Küf ve Mayalar
<u>Lactobacillus lactis</u> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<u>Bifidobacterium animalis</u> <i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. thermophilus</i>	<u>Streptococcus cremoris</u> <i>S. thermophilus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. lactis</i> <i>S. diacetylactis</i>	<u>Aspergillus niger</u> <i>A. oryzae</i>
		<u>Bacteroides capillus</u> <i>B. suis</i> <i>B. ruminola</i>	<u>Saccharomyces boulardii</u> <i>S. cerevisiae</i>
	<u>Bacillus subtilis</u> <i>B. pumillus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. lentus</i>	<u>Enterococcus faecalis</u> <i>E. faecium</i>	
		<u>Propionibacterium shermanli</u> <i>P. freudenreich</i>	<u>Candida torulopsis</u>
	<u>Pediococcus cerevisiae</u> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	<u>Escherichia coli</u>	
		<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	

2.1.1.Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Probiyotiklerin etkisini yöneten temel mekanizmalar tamamen açık olmasa da ağırlıklı olarak in vitro çalışmalardan elde edilen bilgiler, probiyotiklerin etkilerinin aşağıdaki gibi özetlenebileceğini göstermektedir:

- ✓ Bağışıklık sistemi modülasyonu
- ✓ Mikroorganizmalarla doğrudan etkileşim
- ✓ Toksinlere karşı inhibitör etki

Probiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin, ana biyokimyasal yolların artırılması veya baskılanması nedeniyle konakçıdaki epitel bariyerinin bütünlüğünün korunması yoluyla elde edildiği düşünülmektedir. Özellikle, laktobasillerin epitel hücreleri için önemli olan proteinleri kodlayan belirli genlerin düzenlenmesini modüle ettiği gösterilmiştir. Bu proteinler, patojenlerin neden olduğu bozulmalardan sonra epitel hücre fonksiyonunun onarımını artırabilir (M. Bermudez-Brito vd., 2012).

Bifidobakteriyel suşlar gibi probiyotiklerin, esas olarak laktik asit ve asetik asit üretimine atfedilen antimikrobiyal etkileri yoluyla konağı koruduğu kanıtlanmıştır. Bu bileşikler, önemli bir pH düşüşüne neden olarak patojenik mikroorganizmaların büyümesine elverişli olmayan bir ortam yaratır (A. Cheikhyoussef vd., 2008).

Bazı laktik asit bakteri suşlarının da hücre yüzeylerindeki demir kaynaklarını bağlayarak patojenleri onlardan yoksun bıraktığı gösterilmiştir. Patojenik mikroorganizmalara karşı probiyotik etki, yalnızca metabolitlerin salgılanması ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda bunların yapışma önleyici etkilerine de dayanmaktadır. Bu yapışma önleyici eylemler, probiyotik bakterilerin epitel hücreleri üzerindeki spesifik reseptörler için patojenlere karşı rekabetini, karbonhidrat yapısındaki reseptörleri bozan proteinlerin salgılanmasını ve biyosüpfaktanların üretimini içerir (T. A. Oelschlaeger, 2010).

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) grubu, çubuk ve kokoid morfolojisine sahip Gram pozitif, spor oluşturmeyan bakterileri içerir. Bu bakteriler genel olarak hareketsiz ve laktik asit üreticileridir. (Mares, A. vd., 1994)

Sadece laktik asit üreten organizmalar homofermentatif olarak adlandırılırken, laktik asidin yanı sıra karbondioksit oluşumu ile şekeri dönüştüren organizmalar heterofermentatif olarak sınıflandırılır. LAB yedi taksonomik cinse ayrılır: *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* (çubuk) ve *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* (cocci). (Singh, U.P. vd., 2007) *Lactobacillus* cinsi, çubuk morfolojisi olan mikroorganizmaları içerir.

Laktik asit bakterileri (LAB), organoleptik özelliklere, lezzete ve dokuya katkıda bulunan çeşitli gıda fermantasyon süreçlerinde başlatıcılar veya probiyotik kültürler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Laktik asit veya diğer antimikrobiyal bileşiklerin üretimi nedeniyle, nihai ürünün güvenliğine de yardımcı olurlar. Bununla birlikte, her bir LAB suşunun ilgili gıda işlemede başarılı bir şekilde uygulanmasından önce, birkaç faktörün tahmin edilmesi gerekir. Sıcaklık, pH, büyüme ortamının türü, oksijen ve bazı nötrleştiricilerin eklenmesi gibi fermantasyon koşulları, laktobasillerin büyüme aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Georgieva, R. vd., 2009). Bunlar arasında, büyüme ortamının türü, büyüme aktivitesinde ve depolamaya dayanıklı konsantre kültürlerin üretiminde önemli bir rol oynar. LAB için de Man Rogosa, Sharp (MRS) broth, M-17, Elikar's broth, yağsız süt ve peynir altı suyu permeatı gibi çeşitli ortamlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Mäyry-Mäkinen A. and Bigret N., 1993). Uygun büyüme ortamını seçmek için maliyet, yüksek sayıda hücreye ulaşma yeteneği ve hasat yöntemleri gibi farklı yönler dikkate alınmalıdır.

Laktik asit bakterileri, diğer mikroorganizmaların aksine, midedeki gastrik asit ve pankreatik salgılara karşı dirençlilik gösterir. Sindirim sistemine geçerek canlı kalmayı başarabilen LAB'nin probiyotik olma özelliği söz konusudur.

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Orijinal olarak *L. plantarum*, Orla-Jensen(1919) ve Holland(1920) tarafından *Streptobacterium plantarum* olarak belirlenmiştir. Daha sonra Pederson(1957) tarafından substrat olarak sebzeleri kullanabilen tipik bir LAB olarak tanımlanmıştır.

L. plantarum, tek başına veya kısa zincirler halinde gruplandırılmış, yaklaşık $0,9-1,2 \times 1,0-8,0$ µm boyutunda, çubuk morfolojisine sahip bir mikroorganizmadır. *L. plantarum* heterofermentatif, fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır.

Çoğu organik asit (örneğin malik, tartarik ve asetik asitler) *L. plantarum* tarafından metabolize edilerek karbondioksit, laktik asit ve asetik asit üretimine neden olabilir (Todorov and Franco, 2010).

Yüksek asit toleransı, fermantasyon işlemi sırasında kontaminasyonu önleyen önemli bir özelliktir. *L. plantarum*, en iyi laktik asit üreticilerinden biridir (Brinques vd., 2009).

Gıda teknolojilerinde kullanılan en yaygın *Lactobacillus* türlerinden biri homofermentatif metabolizmaya ve yüksek asit toleransına sahip olan ve genellikle güvenli (GRAS) organizma olarak kabul edilen *Lactobacillus plantarum*'dur. Birçok *L. plantarum* suşu şu anda probiyotik olarak pazarlanmaktadır (De Vries, M. C. vd., 2006).

2.3. Probiyotik Üretimi

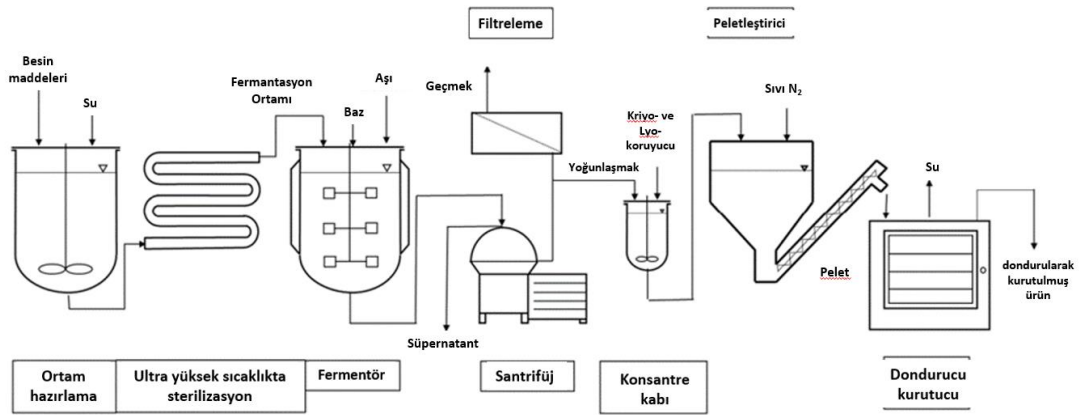
Probiyotiklere yönelik artan talep ve probiyotiklerin tanıtıldığı yeni gıda pazarları, endüstriyi yüksek miktarlarda probiyotik kültürleri canlı ve istikrarlı bir biçimde üretmeye zorlamaktadır. Kurutulmuş konsantre probiyotik kültürler, özellikle rafa dayanıklı fonksiyonel ürünler için saklama, taşıma ve taşıma kolaylığı göz önüne alındığında, fonksiyonel gıdalara dahil etmek için en uygun formdur (J. A. Muller vd., 2009).

İmalat açısından bakıldığında, probiyotik ürün, istenen uygulama için kullanılabilmesi için önemli ölçüde yüksek bir verime sahip olmalı ve konsantre, canlı hücresel biyokütleden oluşmalıdır. Bir probiyotik üründe belirli bir canlı hücre değeri

şart koşulmamakla birlikte, minimum 10^9 koloni oluşturan birim (kob) dozu yeterli kabul edilir (Konstantinos Flevaris vd., 2021).

Sürekli olarak yüksek performans gösteren LAB ve bifidobakteriler de üretim sürecinin ne kadar iyi kontrol edildiğine bağlıdır. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, aynı türden bile suşlar arasında, hassasiyet ve üretim sürecine tepki açısından performansı etkileyen önemli bir çeşitlilik vardır. Laboratuvar ölçeğinde geliştirme, pilot ölçekte ölçek büyütme ve ardından ticari ölçek büyütme sırasında bu hassasiyetler keşfedilir ve süreç, tutarlı yüksek performansın elde edilebilmesi için ayarlanır. Her bir suş için süreç oluşturulduktan sonra, bu süreci her seferinde aynı şekilde yürütmek önemlidir (Fenster vd., 2019).

Probiyotik uygulamaları için LAB ve bifidobakterilerin üretim süreçleri, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi aşağıdaki ortak adımlara sahiptir.



Şekil 2.1. Probiyotik başlangıç kültürü suşları için probiyotik üretiminin şematik gösterimi (Fenster vd., 2019).

2.3.1. Suş Seçimi

Suş seçimi, probiyotik üretim sürecindeki ilk hayati adımdır. Tür seçimi, yalnızca belirli bir probiyotik takviyesi oluşturma hedefinize ve potansiyel sağlık iddialarınıza bağlıdır. Sindirimi, bağışıklık sisteminizin sağlığını, ara sıra strese karşı sağlıklı bir yanıtı veya daha fazlasını desteklemek için farklı suş seçimleri yapılmalıdır.

Her türün belirli özellikleri vardır ve belirli faydaları desteklerler. Bazı suşlar sağlıklı bağıışıklığı desteklerken, diğerleri laktoz sindirimini destekler. Yüksek kaliteli takviyeler üretmek için mükemmel kalitede probiyotik ham maddelere ihtiyaç vardır. Seçilen suşlar, etkinliklerini kanıtlamak için bağırsakta hayatta kalmalıdır (Gene Bruno, 2022).

Yüksek performanslı probiyotikler ve süt ürünleri başlatıcılar üretmek için, her suşun üretim sürecinin farklı yönlerinin benzersiz beslenme gereksinimleri ve hassasiyetleri iyi anlaşılmalı ve üretim süreci içinde barındırılmalıdır. Bu suş bağımlılıkları tipik olarak laboratuvar ölçeğinde geliştirme sırasında belirlenir ve işlenir, pilot uygulamada ölçeklendirilir ve işlem sonlandırılmadan ve ticari üretim devam etmeden önce ticari düzeye ölçeklendirilir.

Başarılı bir şekilde yüksek performanslı probiyotikler ve süt ürünleri başlatıcılar üretmek için suşların beslenme ihtiyaçları ve süreç hassasiyetleri açısından iyi anlaşılması gerekir. Ayrıca, karmaşık ham maddelerin (yani maya ekstraktlarının) bileşimi ve ana fermentasyona yol açan ve buna dahil olan besin değerinin nasıl değiştiği iyi anlaşılmalıdır (Fenster vd., 2019). Üretim süreci çok iyi kontrol edilmelidir.

2.3.2. Medya Formülasyonu

Büyüme için hangi kontrol edilebilir parametrelerin ve besinlerin optimize edilebileceğini kontrol etmek için probiyotik suşu incelenir. Bir probiyotik üreticisi bu çalışmayı yürütmenize yardımcı olabilir. Besin maddelerinin ve proses parametrelerinin benzersiz kombinasyonu oluşturulduğunda, büyük ölçekli bir üretim başlayabilir (Gene Bruno, 2022).

Özel gereksinimleri olan büyüme ortamında, alerjenler için süt, soya, glüten ve fındık gibi en yaygın diyet alerjenlerinden kaçınılmalıdır. Vejetaryen ve vegan üretim için sırasıyla et ve süt kaynaklarından kaçınılmalıdır. Süt ürünleri başlangıç kültürleri için, süt bazlı bir ortam kullanılabilir. Diyet takviyeleri için, süt, soya ve et özlerinin çıkarılması, alternatif nitrojen kaynaklarının araştırılmasını gerektirir. Buğdaydan elde

edilen karbon kaynaklarından, glüten ile potansiyel kontaminasyon nedeniyle kaçınılmalıdır (Di Cerbo A. and Palmieri B., 2015).

Doğru dozda ham madde içeren etkili bir formülün yanı sıra, doğal olarak safraya ve aside dayanıklı suşların seçilmesi hayati önem taşır. Ayrıca bağırsakta hayatta kalma açısından test edildiğinden emin olmalısınız. Seçilen suşlar daha sonra fermentasyon ve stabilizasyona tabi tutulur.

2.3.3. Fermantasyon

Probiyotik yapmak için hammadde dünyanın her yerinden temin edilebilir. Ayrıca probiyotikler, tazeliği ve kaliteyi korumak için özel olarak üretilmiştir. Bakterilerin yetiştirilmesi 6 hafta kadar sürebilir. Kültürler büyürken yetiştirme süreci aceleyle getirilmemelidir.

Fermantasyon bölümü, inokulum hazırlama ve üretim fermentasyon adımlarını içerir. Üretim fermentörü için yeterli hacimde inokulum üretmek amacıyla, bir dizi çalkalama şişesi ve aşı fermentörü kullanılabilir (Konstantinos Flevaris vd., 2021).

Fermantasyon sırasında, istenmeyen kontaminasyonu ortadan kaldırmak için tüm besinler ve ekipman sterilize edilir. Suş, ortama steril koşullarda eklenir. Suş, besleyici ve ılık bileşen banyosunda istenen sayıya (KOB – Koloni Oluşturan Birimler) ulaşana kadar çoğalır. Bu işlem sırasında, bakterilerin besin metabolizmasının yan ürünü olan metabolitler de oluşur (Gene Bruno, 2022).

2.3.4. Santrifüjleme

Kültürler hazır olduğunda, probiyotik suşları santrifüj yoluyla metabolitlerden ayırabilir. Probiyotiklerin stabilitesi, probiyotik üretim sürecinde yakından dikkat edilmesi gereken bir diğer kritik husustur. Probiyotik ürünler paketlenildikleri andan itibaren stabilitelerini/tazeliklerini kaybetmeye başlarlar. Uzun süreli depolamada ek stabilite ve etkiyi korumak için soğutma, nemli ortamlardan kaçınma ve kurutma gibi çeşitli yöntemler kullanılır. Bu işlemlerden sonra probiyotik kuru bir toza dönüştürülür.

2.4. Biyoreaktörler

Biyoreaktörler, kontrollü, çevresel koşullar altında biyolojik bir işlemin gerçekleştirilebildiği kapalı sistemlerdir. Düşük değerli bir substratın canlı hücreler veya enzimler tarafından daha yüksek değerli bir ürün üretmek için kullanıldığı bir cihazdır. Bir biyoreaktör sistemi, bir biyoreaktör, sensörler, bir kontrol sistemi ve biyoreaktör içindeki koşulları izlemek ve kontrol etmek için yazılım içerir. Biyoreaktörler, farmasötiklerin, gıda biyo-bazlı malzemelerin (poli-laktik asit gibi), gıda işleme, fermentasyon, biyoyakıtların üretiminde ve ayrıca atık işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Inderjeet Kaur and Arun Dev Sharma, 2021).

Bir biyoreaktör, mühendislik ürünleri üretmek için biyolojik, biyokimyasal ve biyomekanik gereksinimleri sağlayan kontrol edilebilir bir ortam sağlar. Biyoreaktör istenen biyolojik ürünü yaratmayı amaçladığından, iç ve dış kütle transferi, ısı transferi, akışkan hızı, kesme gerilimi vb. reaksiyon parametrelerinin yakından izlenmesi önemlidir (Jagriti S. vd., 2014).

Eşsiz performans özelliklerine sahip gelişmiş ve sağlam biyoreaktör tasarımı, doğal ve genetiği değiştirilmiş hücre sistemlerinden faydalı biyoteknolojik ürünlerin üretiminde esastır. Bu durum reaksiyon hızlarını en üst düzeye çıkarmak, çıkış oranlarını optimize etmek ve maliyeti en aza indirmek için önemlidir.

Bir biyoreaktör aşağıdakileri sağlamalıdır (Sanjogta Thapa Magar, 2021):

- ✓ Ajitasyon/çalkalama (hücre ve ortamın karıştırılması için),
- ✓ Havalandırma (aerobik fermentörler); O₂ temini için,
- ✓ Sıcaklık, pH, basınç, havalandırma, besin besleme ve sıvı seviyesi gibi faktörlerin düzenlenmesi,
- ✓ Sterilizasyon ve sterilitenin korunması ve
- ✓ Hücrelerin/ortamın geri çıkarılması.

Biyoreaktör terimi genellikle biyokatalizör olarak canlı bir hücre kullanan bir tür biyoreaktör olan fermenter ile eşanlamlı olarak kullanılır. Fermentasyon, aerobik veya anaerobik koşullar altında gıda üzerinde mikroorganizmaların büyümesine atıfta bulunur. Fermentörler camdan, cam egzotik alaşımlardan, paslanmaz çelikten, cam kaplı çelikten ve göstergelerle donatılmış plastik tanklardan oluşur. Bunlar, özel saf

bakteri, mantar ve maya kültürlerinin büyümesi, enzimlerin üretimi ve geniş bir fermente ürün yelpazesi için kullanılır (Jagriti S. vd., 2014).

Bir fermentör, fermantasyon endüstrilerinde ticari üretim için kullanılır ve daha yüksek değerli bir ürün üretmek için canlı hücreler veya enzimler tarafından düşük değerli bir substratın kullanıldığı bir cihazdır. Fermentörler, gıda işleme, fermantasyon, atık arıtma vb. için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyoreaktörler, biyolojik varlıkları destekledikleri ve kontrol ettikleri ölçüde geleneksel kimyasal reaktörlerden farklıdır. Organizmalar kimyasallardan daha hassas ve daha az kararlı olduğundan, biyoreaktör sistemleri, proses bozulmaları ve kontaminasyonlar üzerinde daha yüksek derecede kontrol sağlamak için yeterince sağlam olmalıdır. Biyoreaktör koşulları, canlı mikroorganizmaların tanımlanmış koşullar altında aktivite göstermeleri için elverişli olmalıdır. Biyolojik organizmalar, doğaları gereği mutasyona uğrayacağı ve dolayısıyla organizmanın reaksiyonunun biyokimyasını veya fiziksel özelliklerini değiştireceği için, arzu edilen biyolojik aktiviteyi sürdürmek ve istenmeyen aktiviteleri en aza indirmek belirli zorluklardır (Williams, J.A, 2002).

Biyoreaktör yapımında kullanılan malzeme aşağıdaki önemli özelliklere sahip olmalıdır (Sanjogta Thapa Magar, 2021):

- Aşındırıcı olmamalıdır.
- Fermantasyon ortamına herhangi bir toksik madde eklememelidir.
- Buhar sterilizasyon işlemini tolere etmelidir.
- Yüksek basıncı tolere edebilmeli ve pH değişikliklerine direnebilmelidir.
- Biyoreaktörün boyutları uygulamaya bağlı olarak büyük ölçüde değişir.

2.4.1. Karıştırılmalı Tank Biyoreaktör

Karıştırılmalı tank reaktörleri (STR) kimya endüstrisindeki standart reaktörlerden biridir ve bu nedenle biyolojik uygulamalar için yaygın olarak uygulanmaktadır (Williams, 2002).

Viskoz sıvılar, bulamaçlar, çok düşük gaz akış hızları ve büyük sıvı hacimleri ile kullanılırlar. STR'ler ayrıca popülerdir, çünkü gerekli substrat teması, pH ve sıcaklık kontrolü, toksik yan ürünlerin çıkarılması, tek tip hücre dağılımı ve partikül boyutunun azaltılmasına yardımcı olan iyi karıştırılmış bir duruma kolayca ulaşılır (Enes Kadic and Theodore J. Heindel, 2014).

STR'ler, düşük yatırım ve işletme maliyetleri nedeniyle endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams, 2002).

Yüksek gaz-sıvı kütle transfer katsayılarına ihtiyaç duyulduğunda STR'ler tercih edilir. Bu reaktörler genellikle endüstriyel birimler için paslanmaz çelikten veya deneysel uygulamalar için cam veya belirli plastikler gibi şeffaf malzemelerden yapılır (Enes Kadic and Theodore J. Heindel, 2014).

Karıştırılmış tank biyoreaktörleri (STBR'ler), hücreler, enzimler veya antikolar gibi biyolojik ajanların kültürlenmesi için en yaygın olarak kullanılan reaktörlerdir. Fazlar arasında iyi karışımın mekanik çalkalama ile elde edildiği reaktörlerdir. Karıştırıcı, tüm bileşikleri dağıtmak ve biyoreaktör içinde etkin bir homojen konsantrasyon elde etmek için yeterince hızlı çalkalama sağlamalıdır. Bir biyoproses için bir STBR'nin teknik tasarımı, üretime bağlı olarak gerekli hacmi belirlemelidir (Zhong, JJ, 2011).

STR'ler en geleneksel biyoreaktörlerden biridir. Kolay ölçek büyütme, iyi sıvı karıştırma ve oksijen transfer edilebilirliği, alternatif karıştırıcılar ve gereksinimlere kolay uyum sağlama gibi avantajları nedeniyle STR'ler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu tip biyoreaktörler yüksek güç tüketimi ve yüksek kesme ile ilgili endişeler gibi çeşitli sınırlamalara sahiptir. Mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında hem hayvan hücreleri hem de bitki hücreleri kesmeye duyarlıdır, bu da karıştırma ve kütle transfer gereksinimlerini ve hidrodinamik kuvvetten kaynaklanan potansiyel hasarı dengelemek için karıştırıcı sistemini modifiye etmek ve optimize etmek için kayda değer çabalarla sonuçlanır. Yeni karıştırıcı tasarımları geliştirilerek geleneksel STR'lerde çok sayıda değişiklik yapılmıştır (Wang SJ and Zhong JJ, 1996).

2.4.1.1. Çalışma prensibine göre reaktör çeşitleri

Kültürün besleme stratejisine ve biyoreaktördeki besiyerine bağlı olarak fermantasyon işleminde esas olarak üç tip reaksiyon vardır. Kesikli, sürekli ve yarı-kesikli modlar, fermantasyon işlemleriyle bir dizi değerli metabolitin üretimi için bir biyoreaktörün en yaygın kullanılan çalışma modlarıdır (Modak, J. M., & Lim, H. C., 1992).

Geleneksel kesikli karıştırmalı tank reaktörleri (STR'ler) ve sürekli karıştırılan tank reaktörleri (CSTR'ler) yüzyıllardır varlığını sürdürmektedir ve basitliklerinden dolayı kimya ve biyo-işleme endüstrisinde üretim için hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Brian McNeil & Linda M Harvey, 2008). Özel tasarım ve operasyonel niteliklere sahip diğer biyoreaktörler, foto-biyoreaktörler, döner tamburlu reaktörler, membran biyoreaktörler, paketlenmiş ve akışkan yataklı biyoreaktörler, kabarcık kolonu ve hava kaldırma biyoreaktörleri vb.'dir. Bunlar, uygulamaya özel süreçleri karşılamak için geliştirilmiştir (Jagriti S. vd., 2014).

2.4.1.1.1. Kesikli fermantasyon (Batch fermentation)

Kesikli biyoreaktör, endüstrideki en eski ve en çok kullanılan biyoreaktördür. Tarihsel ve en bilinen kullanımı alkollü içecekler (bira, şarap, viski vb.) ve ekmek üretimindedir. Kesikli biyoreaktörler, gerekli tüm bileşenleri birleştirir ve istenen ürün konsantrasyonuna ulaşılan kadar çalışır. Nihai ürünün nispeten ucuz olduğu iyi bilinen süreçlerde, ürün konsantrasyonu zamanla ilişkilendirilebilir, bu da daha düşük yatırım gereksinimlerine ve daha düşük işletme maliyetlerine yol açar. Kesikli biyoreaktör sistemleri, çevresel konuların modellenmesinde de faydalıdır (Enes Kadic and Theodore J. Heindel, 2014).

Kesikli biyoreaktörün varyasyonları sorunları sınırlamaya çalışır, ancak bazı sistematik avantajlar ve dezavantajlar mevcuttur. Çoğunlukla, kesikli biyoreaktörler basit konsept, tasarım ve proses kontrolü nedeniyle daha düşük sabit maliyetlere sahiptir; ancak, değişken maliyetler genellikle çeşitli nedenlerle daha yüksektir (Jagriti S. vd., 2014).

Kesikli sistem maliyetlerinin bir kısmı, esnekliği ile dengelenebilir. Kesikli biyoreaktörler, istenen ürünü tutarlı bir şekilde üretebilir. Aynı ekipmanla birkaç çeşit ürün üretebilme veya aynı tip ürünü farklı ekipmanlarla üretebilme yeteneğine de sahiptirler.

Kesikli işlemdede, sterilizasyondan sonra steril kültür ortamı mikroorganizmalarla aşılır. Bu reaksiyon periyodu sırasında, besin tuzları, vitaminler ve ürünlerin konsantrasyonları dahil hücreler ve substratlar zamanla değişir. Fermantasyonun önceden belirlenmiş bir süre boyunca çalışmasına izin verilir ve sonunda ürün hasat edilir. Aerobik ekimi teşvik etmek için ortam, sürekli bir oksijen akışı sağlamak üzere havalandırılır. CO₂ gibi gazlı yan ürünler uzaklaştırılır; havalandırma ve gaz giderme işlemleri yarı-kesikli olarak gerçekleşir (Williams J.A., 2002).

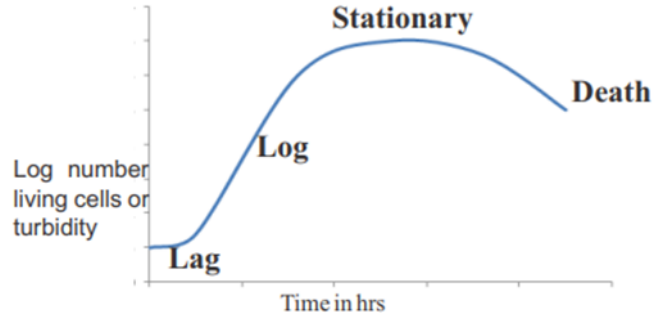
Kesikli fermantasyon modunda mikroorganizma 4 aşamadan geçer (Şekil 2.2).

Gecikme aşaması (lag phase): Mikrobiyal popülasyonun büyümesi, taze bir besiyeri ile aşılandığında gecikme aşaması olarak adlandırılan belirli bir süreden sonra başlar.

Üstel faz (log or exponential phase): Bu fazda, mikrobiyal hücre sayıları birim zaman periyodu başına iki katına çıkar. Böyle bir reaksiyondan elde edilen hücre sayısı, geçen zamanın bir fonksiyonu olarak logaritmik bir ölçekte çizildiğinde, sürekli artan bir eğime sahip bir eğri elde edilir.

Sabit faz (stationary phase): Sabit fazda hücre sayısında net bir artış veya azalma olmaz. Enerji metabolizması ve bazı biyosentetik işlemler gibi hücre fonksiyonları devam eder.

Ölüm fazı (death phase): Bakteri popülasyonu durağan faza ulaştıktan sonra inkübasyona devam edilirse hücreler ölmeye başlayabilir. Hücreler, büyüme fazından çok daha yavaş bir süreç olan hücre parçalanması nedeniyle ölebilir (Jagriti S. vd., 2014).



Şekil 2.2. Büyüme Eğrisi (Nanda S, 2008).

Kesikli biyoreaktörler, bir dizi reaksiyon gerçekleştirebilen ve kullanımı kolay tek tanktan oluşur. Tank, reaktanları entegre ısıtma ve soğutma sistemi ile karıştırmak için bir karıştırıcı (karıştırmalı tank reaktörü – STR) ile donatılmıştır. Reaktantın pH'ını kontrol etmek için tampon solüsyonu veya pH kontrolörü kullanılır. Sıvılar ve katılar genellikle reaktörün üst kapağındaki girişler yoluyla doldurulur. Buharlar ve gazlar da üstteki bağlantılardan boşalır. Genellikle sıvılar alttan çıkarılır. STR'ler genellikle buharla ısıtma veya soğutma gereksinimleri için kılıflıdır ve havalandırma için bölmeler ve yuvarlak spargerler ile donatılmıştır.

STR'lerdeki karıştırıcı, karıştırma sistemini çalıştıran harici bir motora bağlıdır. Conta dahil karıştırıcı tertibatı bir kontaminasyon yoludur ve bu nedenle shaftın bir dizi aseptik conta yoluyla biyoreaktöre geçmesi gerekir.

Karıştırma ve kütle aktarım hızlarını etkileyen önemli değişkenler, karıştırıcı sayısı ve türü, karıştırıcı hızı ve kullanılan gazın akış hızıdır. Karıştırıcı kanatlarının tasarımı, çalkalama hızı ve sıvının derinliği, çalkalamanın etkinliğini belirler. Karıştırma ve kütle aktarım hızlarını etkileyen önemli değişkenler, karıştırıcı sayısı ve türü, karıştırıcı hızı ve kullanılan gazın akış hızıdır (Enes Kadic and Theodore J. Heindel, 2014).

2.4.1.1.2. Sürekli fermantasyon (Continuous fermentation)

Gaz, sıvı veya çözünür katı substratlar kullanan reaksiyonlar için yüksek hacimli üretimde sürekli işlem sıklıkla kullanılır. Tipik nihai ürünler arasında sirke, ekmek mayası ve arıtılmış atık su bulunur (Jagriti S. vd., 2014).

Sürekli biyoreaktörler, onları kesikli biyoreaktörlerden ayıran birçok özgün özelliğe sahiptir. En büyük ayırım, substrat ve ürünün sürekli olarak biyoreaktöre girip çıkmasıdır. Çıktı spesifikasyonları karşılamıyorsa, ortaya çıkan ürün ya atılmalı ya da ayrılarak biyoreaktöre geri dönüştürülmelidir. Her iki seçenek de atılan ürün ve ilgili girdiler nedeniyle değişken maliyetleri artırarak olumsuz bir ekonomik etki yaratır (Williams, 2002).

Homojen bir ürün sağlamak için prosesin kararlı durumda olduğu varsayılır ve biyoreaktör içindeki koşulların tipik olarak zamandan bağımsız olduğu varsayılır (Williams, 2002). Bu nedenle, sürekli biyoreaktörler mekanik olarak ve/veya gaz enjeksiyonu ile çalkalanır. Doğrusal olmadığı için sürekli üretimi kontrol etmek de daha zor hale gelir. Birkaç kontrol mekanizması mevcuttur, ancak çoğu, sıcaklık veya pH gibi dolaylı verilere dayanarak substrat veya bakteri konsantrasyonlarını değiştirme ve birinci dereceden bir yanıt varsayma hatasına düşer (Enes Kadic and Theodore J. Heindel, 2014).

Operatörler ayrıca belirli bir gaz veya sıvı giriş aralığı ile sınırlandırılabilir. Bakteriler, uygun büyüme için belirli bir miktarda gaz gerektirir ve düşük bir gaz akış hızı, bakterileri boğabilir veya biyoreaktör üretkenliğini azaltan düşmanca bir ortam yaratabilir. Öte yandan, çok fazla gaz, optimal olmayan koşullar yaratabilir ve bakteriyel büyüme veya biyoreaktör hidrodinamiği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir.

2.4.1.1.3. Yarı-kesikli fermantasyon (Fed-batch fermentation)

Yarı-kesikli fermantasyon modunda, fermantasyon işlemi sırasında substratın sabit zaman aralıklarında eklendiği kesikli ve sürekli modların her iki işlem modu da bulunur (Betts JI and Baganz F, 2006).

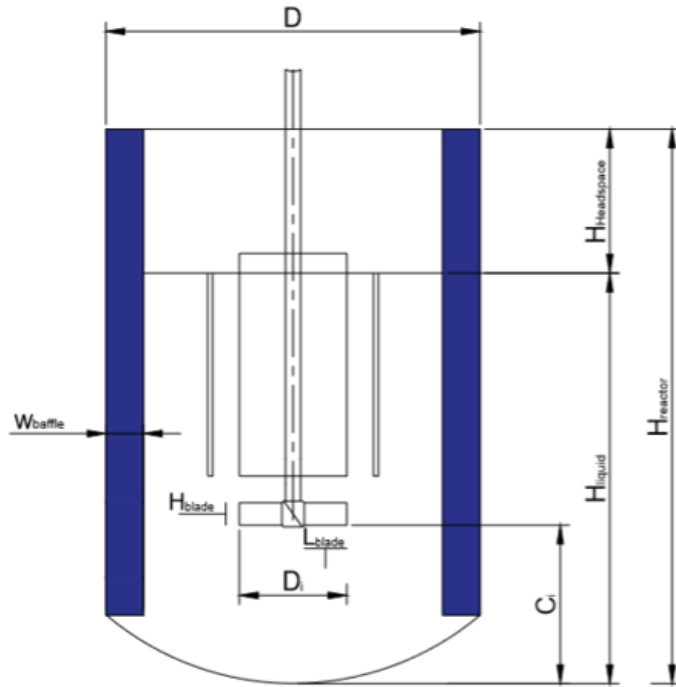
Bu işlemde, daha iyi verim ve daha yüksek seçicilik ile birlikte reaksiyon sıcaklığının kontrol edilmesi için biyoreaksiyonlar devam ederken ilave besinler reaktöre aşamalı olarak eklenir. Ürünler, kesikli biyoreaktörde olduğu gibi üretim döngüsünün sonunda hasat edilir (Abbott M.S.R vd., 2013).

Kesikli ve yarı-kesikli yetiştirme sistemleri, biyoreaktör çalışmasının durdurulduğu ve biyoreaktörün boşaltıldığı aynı temizleme ve sterilizasyon sürecini paylaşır.

Yarı-kesikli yetiştirme sistemi, değişken hacimli bir süreç oluşturarak süreç kontrolünü daha zor hale getirir. Bu nedenle herhangi bir kontrol mekanizması çok daha fazla emek veya yatırım gerektirir (Tsuneo Yamanė, Shoichi Shimizu, 1984).

2.4.1.2. Biyoreaktör Tasarımı

Yapılacak biyoreaktörün ölçeklendirilmesi gerekir. Biyoreaktör apı, yüksekliği ve karıştırıcı çapı formüller dahilinde tasarlanmaktadır (şekil 2.3). Karıştırıcı tank biyoreaktörü geniş bir hacim aralığına sahiptir. 10.000 litreye kadar üretim yapılabilmektedir. İstenen biyoreaktör hacmi belirlendikten sonra tüm veriler formüllerle hesaplanır.



şekil 2.3. Ölçekli olmayan basit bir karıştırmalı tank biyoreaktör tasarımı.

Tablo 2.2. Biyoreaktörü hesaplamak için kullanılan formüller gösterilmiştir (Lane ve Koh, 1997).

	Formüller
Reaktör çapı= D	$V = m^3$ $H_{liquid}/D = 1.25$
Sıvının yüksekliği= H_{liquid}	$V = m^3$ $H_{liquid}/D = 1.25$
Üst boşluk yüksekliği= $H_{Headspace}$	$H_{Headspace} = H_{liquid}/3$
Reaktörün yüksekliği= $H_{reactor}$	$H_{reactor} = H_{Headspace} + H_{liquid}$
Karıştırıcının çapı= D_i	$D_i = D/3$
Karıştırıcı açıklığı = C_i	$C_i = 1/3 D$
Baffle genişliği = W_{Baffle}	$W_{Baffle} = 1/10 D$

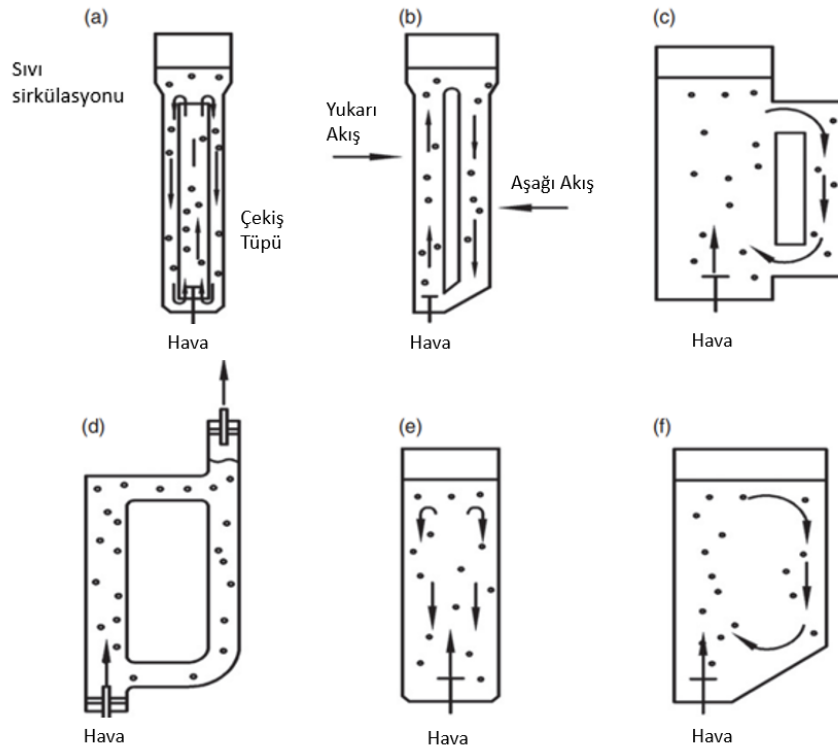
2.4.2. Hava Kaldırmalı Biyoreaktörler (Airlift Bioreactor) (ALB)

Kabarcık kolonu (bubble column) ve hava kaldırmalı biyoreaktörler pnömatik olarak çalkalanır ve genellikle gaz-sıvı temasının önemli olduğu biyoproseslerde kullanılır. Gazın rolü, absorpsiyon gibi kütle transfer işlemleri için sıvı ile temas sağlamak ve sıvı karıştırma için gaz genişmesi veya kabarcık kaldırma kuvveti yoluyla enerji sağlamaktır. Bu iki pnömatik olarak çalkalanan reaktörde, gaz genellikle alttan yayılır ve yükselen gaz kabarcıklarının kaldırma kuvveti karıştırmaya neden olur. Bu iki reaktör arasındaki temel fark, akış özelliklerindedir. Hava kaldırmalı biyoreaktörlerindeki akış, yukarıdan aşağıya doğru bir döngüde olduğu gibi döngüsel bir düzendedir. Kabarcık kolonu, akışı oldukça karmaşık hale getiren herhangi bir kesiti olmayan basit bir kaptır (Mendoza Martinez AM, & Escamilla Silv EM, 2013).

Hava kaldırmalı biyoreaktör, karıştırma için sıkıştırılmış gazın genişmesini kullanır. ALB'ler hem serbest hem de hareketsiz hücreler için kullanılabilir ve bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvan hücresi için uygundur. Akışkan hacmi, sirkülasyon ve oksijen transferini iyileştirmek ve reaktördeki kesme kuvvetlerini eşitlemek için bir iç çekiş tüpü (draft tube) ile bölünür (Veera U.P & Joshi J.B, 1999).

İki tür hava kaldırmalı biyoreaktör vardır. Dış döngü reaktörleri, gazların ve sıvıların dolaşımı için farklı ve ayrı kanallara sahiptir. İç döngülü reaktörler, özelleştirilmiş gaz/sıvı akış hızlarının oluşturulması yoluyla biyoreaktör içindeki gaz ve sıvı sirkülasyon modellerinin daha iyi kontrol edilmesini sağlar. Reaktör içerisindeki akış rejimi; karıştırma, enerji transferi ve kütle transferi açısından büyük önem taşır.

Hava kaldırmalı reaktörlerde riser ve downcomer olarak iki farklı akış bölgesi oluşur. Riser, akışkanların yukarı doğru hareket ettiği bölgedir. Bu bölgede genellikle gazların akışı sıvı akışından hızlıdır ve akışkanlar arasındaki hız farkına bağlı olarak churn-turbulent akış rejimi oluşur (Mashhadani M vd., 2015). Şekil 2.4'te farklı akış rejimleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Hava kaldırmalı ve kabarcık kolonlu biyoreaktörler. (a) Dahili döngülü hava kaldırmalı reaktör; (b–d) harici döngülü hava kaldırmalı reaktör; (e) kabarcık kolonu; (f) eğik tabanlı kabarcık kolonu (Zhong, JJ, 2011).

Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde akışın homojen rejimde sağlanması için kabarcıklar mikro boyutta olmalıdır. Homojen kabarcık akışı iyi karıştırma ve bu sayede verimli bir ısı ve kütle transferi sunar.

2.4.2.1. Hava Kaldırmalı Biyoreaktörlerin Avantajları

Geleneksel karıştırmalı biyoreaktörlerde mekanik karıştırmaya bağlı oluşan ve canlı hücrelere/mikroorganizmalara zarar verebilen kesme kuvveti hava kaldırmalı reaktörlerde oluşmaz.

Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin şaftsız basit yapısı bağlantı noktaları ve karıştırıcıdan gelebilecek kontaminasyon riskini ortadan kaldırır.

Hava kaldırmalı reaktörlerin, ısı transfer oranları yüksektir ve düzgün kesme dağılımına sahiptir.

Üretim boyunca harcanan enerji miktarında ciddi tasarruf sağlar.

Oksijen transferi çok yüksek verimle gerçekleşir.

Hava kaldırmalı sistemler farklı reaktör geometrilerine ve çok sayıda reaktöre adapte edilebilir.

2.5. Optimizasyon

Matematiksel optimizasyon, bazı kriterlere göre, mevcut bazı alternatifler kümesinden en iyi elemanın seçilmesidir. Süreç optimizasyonu, belirli bir parametre kümesini optimize etmek için bir süreci ayarlama disiplini.

Biyolojik reaktörlerin çalışmasının optimizasyonu, çözümü potansiyel ekonomik fayda sağlayan ilginç bir doğrusal olmayan problemdir. Maksimum biyokütle üretim hızına yaklaşmak için bir tepe arama yöntemidir (H.H. Wang vd., 1999).

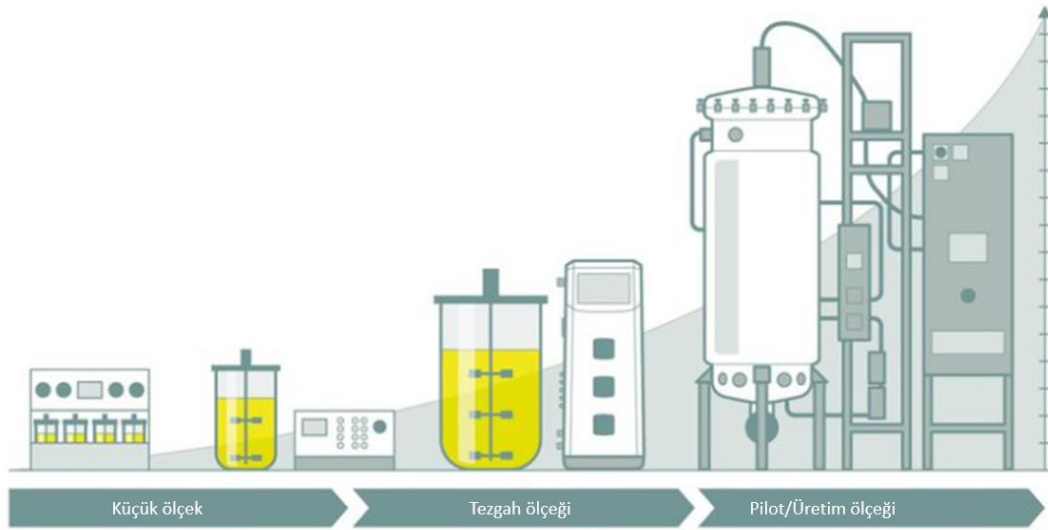
Parametre tanımlamasından sonra sunulan birleşik model, cihaz yapısının parametrelerinin optimizasyonu için kullanılır.

İki fazlı bir gaz-sıvı sistemi için kütle transferi, havalandırma ve karıştırma işlemlerinin matematiksel modelleri geliştirilir. Modeller, yapının parametresi ile biyoreaktördeki incelenen süreçler arasında bir bağlantı sağlar. Modeller başarıyla ölçek büyütme için kullanılabilir.

Temelde amaç, maliyeti en aza indirmek ve verimi veya verimliliği en üst düzeye çıkarmaktır.

2.6. Biyoreaktörlerde Ölçek Büyütme

Bir fermantasyon süreci geliştirme genellikle bir laboratuvar ölçekli biyoreaktör (1–50 L), çalkalama şişeleri (100–1000 mL) veya mikrobiyal hücreler (birkaç mL) ile başlar. Optimizasyon, bir biyoprosesin uygulanabilir olduğunu gösterdikten sonra, optimum çalışma koşullarını oluşturmak için pilot ölçekli bir proses (50–10.000 L) tasarlanır ve uygulanır. Başarılı laboratuvar ölçekli ve pilot ölçekli çalışmalardan sonra, biyoproses ticari üretimler için bir tesis ölçeğinde (> 10.000 L) uygulanır. Bu nedenle, küçük ölçekten büyük ölçeğe doğru bir biyoproses kurma adımına ölçek büyütme denir. Ölçek büyütmenin amacı, küçük ölçekli biyoreaktörlerde elde edilen optimal koşulları büyük ölçekli biyoreaktöre aktarmaktır (Abraham E vd., 2017).



Şekil 2.5. Küçükten büyüğe reaktör ölçek boyutları (Xia J vd., 2016).

Ölçek büyütme çalışmaları, herhangi bir fermantasyon sürecinin geliştirilmesi için vazgeçilmezdir, böylece mikroorganizmaların kinetik davranışına ve dolayısıyla işlem performansına zarar vermeden ölçeği değiştirmek için uygun bir kriter oluşturulabilir. Ancak mikroorganizmaların kinetik davranışı, besin konsantrasyonu,

pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen vb. çevre koşullarından etkilenir. Mikroorganizmaların bu çevresel değişkenlere büyük ölçekte daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Ölçek büyütme tekniklerinin önemli hale geldiği yer burasıdır. Bunun için biyoprosesi etkileyen çevresel koşullar kontrol edilmelidir. Bu, fiziksel, biyokimyasal ve biyoproses faktörleri dikkate alınarak yapılır. Son olarak, ön kültür koşulları, sterilizasyon kalitesi ve aşılama oranı gibi süreç faktörleri de ölçek büyütmenin ne kadar başarılı uygulanacağını belirler (Mahdinia, E vd., 2019).

Tablo 2.3. Farklı seviyelerde ölçek büyütme faktörlerinin genel etkileri (A.R. Moreira and K.K. Wallace, 1996).

Kriterler	Laboratuvar ölçek (1-50 L)	Pilot ölçek (50-10000 L)	Ticari (>10000 L)
Yeniden üretilebilirlik	Değişken, iyi olabilir.	Makul, iyi olabilir.	Çok iyi değil.
<u>Sterilite</u> (Uygun buhar contaları, ceketler vb. gerektirir.)	Biraz zor	Az zor	Az zor
Isı transferi	Kolayca kontrol edilir.	İyi kontrollü.	Çoğu zaman sınırlıdır.
Havalandırma/güç girişi	Kolayca kontrol edilir.	Oldukça kolay kontrol edilir.	Kompresör kapasitesi sınırlı olabilir.
Ajıtasyon (viskozite ve plastisiteye bağlı olarak)	Oldukça düzgün.	Düzgün.	Düzgün olmayan.
Proses kontrol yanıt süresi	Az	Az	Geniş, düzgün değil.
Örnekleme hataları	Küçük, hacmi etkileyebilir.	Küçük	Kayda değer, düzgün değil.
<u>Risk tolere</u>	Yüksek	Orta	Düşük

Bir fermentasyon işleminin ölçeğini büyütme için geleneksel yöntem, laboratuvar ölçekli biyoreaktörün deneysel sonuçlarına dayanarak büyük ölçekli biyoreaktörün reaktör geometrisini, karıştırıcı hızını ve havalandırma oranını belirlemeyi içerir. Ölçek büyütmenin en yaygın yöntemi, biyoreaktörlerin geometrik benzerliğini korumaya dayanmaktadır. Büyük ölçekli biyoreaktörün hacmi seçildikten sonra, tank yüksekliği, tank çapı ve karıştırıcı boyutu gibi geometrik parametreleri tahmin edilebilir. Karıştırıcı hızını ve havalandırma oranını belirlemeye yönelik tipik yöntemler, ölçekteki değişikliklerle ilgili parametreleri sabit tutmak için ampirik korelasyonlara bağlıdır. Pervane hızı, birim hacim, hacimsel oksijen kütle transfer

katsayısı (k_{La}) veya karıştırıcı uç hızı başına ajitasyon gücü girişi (P/V) sabit tutulur. Havalandırma hızı, belirli gaz akış hızı veya gaz akış numarası gibi kriterler kullanılarak tahminler yapılır. Mühendisler, ölçek büyütme yoluyla genellikle bir veya birkaç parametreyi sabit tutar ve stratejilerini bunun etrafında oluşturur (Baltz RH vd., 2010).

"İdeal" ölçek büyütme kriteri, geometrik olarak benzer biyoreaktörlerin hacimleri büyüdükçe aynı sayısal değere sahip olan parametredir. Ölçek büyütme sırasında sabit tutulması önerilen süreç özellikleri şunları içerir (Ju, L.K., & Chase, G.G., 1992):

- *Reaktör geometrisi;*
- *Hacimsel oksijen transfer katsayısı, k_{La} ;*
- *Maksimum kesme;*
- *Birim sıvı hacmi başına güç girişi, P_g/V ;*
- *Birim sıvı hacmi başına hacimsel gaz akış hızı, Q/V veya vvm;*
- *Yüzeysel gaz hızı, v_s ;*
- *Karıştırma süresi;*
- *Karıştırıcı Reynolds numarası, $Re_i = \rho N D_i^2 / \mu$;*
- *Momentum faktörü.*

Genel olarak, ölçek büyütme kriteri seçimi iki hususa bağlıdır:

- Mikroorganizmanın fermentasyonunun doğası ve morfolojisi.
 - Aerobik
 - Anaerobik
 - Mantarlar
 - Tek hücreli mikroorganizmalar
 - Memeli hücreleri
 - Bitki hücreleri
 - Viskoz veya viskoz olmayan fermentasyon suyu
 - Newton veya Newton olmayan broth
- Ölçek büyütme sırasında, optimize etmek (maksimize etmek) istediğimiz fermentasyonun objektif parametresini belirlemek.
 - Ürün veya biyokütle verimi
 - Hücre konsantrasyonu

- Ürün konsantrasyonu
- Ürün etkinliği
- Hacimsel biyoreaktör üretkenliği

2.6.1. Fiziksel Özellikleri

Karıştırma koşulları (veya akış davranışı) ile kütle ve ısı transferi, ölçek büyütme stratejilerini etkileyen fiziksel özelliklerdir. Örneğin, çoğu fermantasyon prosesinde, katabolizma tarafından üretilen ısı, büyük ölçekli biyoproseslerde ısı transfer oranları ile hesaba katılır. Ayrıca, özellikle oksijenin sınırlı olduğu aerobik fermentasyonlarda oksijen alım hızlarını (oxygen uptake rates (OUR)) kontrol eden oksijen transfer hızı (oxygen transfer rate (OTR)), ölçek büyütmede önemli bir faktördür.

2.6.1.1. Havalandırma ve Karıştırma

Bir fermantasyon sürecinde oksijen alım hızı (OUR) şu şekilde ifade edilir:

$$OUR = q_{O_2} \cdot x = k_L a (C_L^* - C_L) \quad \text{Denklem 1}$$

Denklem 1’de; x = biyokütle konsantrasyonu (g/L), q_{O_2} = spesifik oksijen alım oranı (gmol O_2 /g. h), $k_L a$ = volümetrik oksijen transfer katsayısı (h^{-1}), C_L^* = verilen koşullar altında doymuş oksijen çözünürlüğü, C_L = verilen zamanda oksijen konsantrasyonu olarak ifade edilir.

Havalandırmanın kritik olduğu durumlarda, ölçek büyütme boyunca sabit bir oksijen transfer hızının (OTR) izlenmesi ve dikkate alınması en yaygın yöntemdir (Islam RS vd., 2008).

Daha yüksek bir çözünmüş oksijen seviyesine ihtiyaç duyulduğunda, mühendisler ya daha güçlü bir karıştırma motoru ya da daha küçük bir çalışma hacmi seçerler. Böyle bir model, ölçek büyütme stratejisini basitleştirir; bununla birlikte, gerekli güç girişinin bir tahminine hala ihtiyaç vardır. Benzer bir gazsız fermentör için güç girdisini belirlemek ve daha sonra bunu ampirik olarak havalandırılmış kaba

aktarmak genellikle daha kolaydır. Bu amaçla aşağıdaki gibi ampirik bir denklem kullanılır:

$$P_g = K \left(\frac{P_u^2 N d^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}$$

Denklem 2

- K = bir sabit
- P_u = gazsız kaptaki gereken güç
- d = karıştırıcı(lar)ın çapı
- N = çalkalama hızı (rpm)
- Q = kaptaki sıvının hacmi başına dakikada sağlanan havanın hacmi (vvm)

Bu ampirik korelasyonlar, oksijen alım oranlarının ölçek büyütmeden nasıl etkilendiğine dair adil tahminler verse de bunlar sadece tahminlerdir. Newtonian veya non-Newtonian sistemlerin birçok durumu için, bu korelasyonlar, viskozitedeki değişikliklerden kaynaklanan önemli etkilerle başa çıkamaz. Bu tür etkiler için böyle tahminler yapmak kolay değildir (He C vd., 2018).

Ölçek büyütme için diğer bir yaygın parametre, hacim başına karıştırıcı güç tüketimidir (P/V). Bu strateji, belki de penicilin üretiminin yirminci yüzyılın başlarında devrim yaratmasından bu yana kullanılan en eski ölçek büyütme stratejisidir. Genellikle 1.0:2.0 (KW/m³) oranı basitçe korunur. Bununla birlikte, büyük ölçekli operasyonlarda bu tür basitleştirmeler, önemli enerji verimsizliğine yol açar. Bu nedenle, daha karmaşık değişiklikler ortaya çıkar. Örneğin, sabit bir P/V oranı yerine, güç sayısı (N_p) tanımlanır, ölçülür ve sabit tutulur.

$$N_p = \frac{2\pi (M - M_d)}{\rho N^2 d^5}$$

Denklem 3

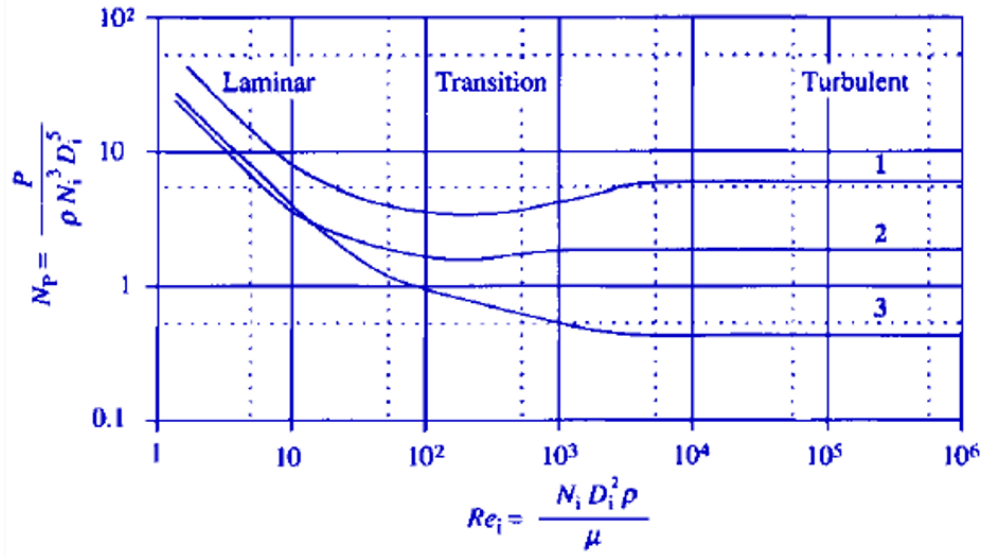
$$P/V = \frac{N_p \rho N^3 d^5}{V}$$

Denklem 4

- M = torktur (deiyonize suyun tam çalışma hacmi ile) (N·m)
- M_d = torktur (boş kap) (N·m)
- ρ = sıvının yoğunluğu
- N = çalkalama hızı (rpm)
- d = karıştırıcı çapı

Bu stratejinin tek şartı, torkun dikkatli bir şekilde ölçülmesi gerektiğidir. Bazı durumlarda sabit bir güç sayısı büyütme stratejisinin, sabit güç tüketimi stratejisinden daha fazla enerji verimi sağladığı kanıtlanabilir.

Akış rejimleri Reynolds sayısı ile değiştikçe, güç sayısı da farklı karıştırıcı geometrileri için ampirik olarak değişir. Şekil 2.6, en yaygın karıştırıcılara sahip model biyoreaktörlerdeki güç sayısının bağımlılığını gösterir. Böyle bir grafik, mühendislerin Reynolds sayısına dayalı olarak büyük ölçekli fermentörde ihtiyaç duyulan güç girdisini tahmin etmeleri için kullanışlıdır.



Şekil 2.6. Bir model biyoreaktörde güç sayısı ile Reynolds sayısı (Bates RL vd., 1963).

2.6.1.2. Kesme hızı (Shear Rate)

Bir fermentördeki kesme gerilimi, sıvının fermentasyon işlemi sırasında sıvı viskozitesi için tanımlanan reolojik özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler, pervane geometrisi ve pervane dönme hızının bir fonksiyonu olan kesme hızıdır. Newton akışkanları için bunlar şu şekilde tanımlanır:

$$\tau_{ave} = \mu v_{ave} \quad \text{Denklem 5}$$

$$v_{ave} = \kappa N \quad \text{Denklem 6}$$

- τ_{ave} = karıştırıcı kanatları ile fermentör iç duvarı arasındaki ortalama kesme gerilimi (N. m⁻²)
- μ = dinamik viskozite (N. s. m⁻²)
- v_{ave} = karıştırıcı kanatları ile fermentör iç duvarı arasındaki ortalama kesme hızı (s⁻¹)
- κ = yalnızca Newton akışkanları için sistem geometrisine bağlı bir sabit
- N = karıştırıcı dönüş hızıdır (rpm)

Bu denklemler artık suya benzer viskozitelere ve mükemmel Newton davranışlarına sahip çalkalanmış sistemlerdeki kesme hızlarını tahmin edebilir.

Filamentli büyüme ve memeli hücrelerinden kaynaklanan küf türlerinin çoğu, kesme hızlarına karşı çok hassastır. Düşük eşik değerlerine sahiptirler. Daha yüksek kesme hızları sadece ölümcüldür veya ürün verimini düşürür. Bu durumlarda, karıştırıcı uç hızına ve dolayısıyla karıştırıcı hızına bağlı olarak, mümkün olan en yüksek kesme hızı hesaplanır ve sabit tutulur. Fermentasyonda, özellikle aerobik

ve/veya viskoz koşullarda çalkalama kritik olduğu için, karıştırıcı çapının veya karıştırıcı sayısının artırılması, aşırı gerilim oluşturmada sağlam çalkalama sağlayabilir (Silva-Santisteban Boy and Maugeri Filho, 2005).

2.6.1.3. Karıştırma Süresi

Oldukça viskoz, Newton tipi olmayan sıvı ortamları için geleneksel denklemler geçerli değildir. Bu durumlarda, güçlü karıştırma asıl hedef haline gelir.

Daha büyük bir karıştırıcı veya daha fazla sayıda karıştırıcı ile karıştırmayı sağlamak daha kolaydır. Buna rağmen enerji açısından daha az verimlidir. Alternatif olarak, sağlamlık için karıştırıcı çapının artması gerekmediği daha uzun bir fermentör tercih edilebilir; ancak, derin bir sıvı ortamı için kesinlikle daha zahmetli olacaktır. Örneğin, sparger yakınındaki derin fermentasyon cihazının alt kısmındaki oksijen çözünürlüğü, yüzeyden önemli ölçüde daha yüksek olacaktır. Bu kaçınılmaz olarak yalnızca istenmeyen bir oksijen gradyanı oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda gaz güç girişini ($P/V \propto d^3$) önemli ölçüde artırır ve bu nedenle büyük ölçekli fermentörlerde güç gereksinimlerini engelleyici hale gelir (Bonvillani vd., 2006).

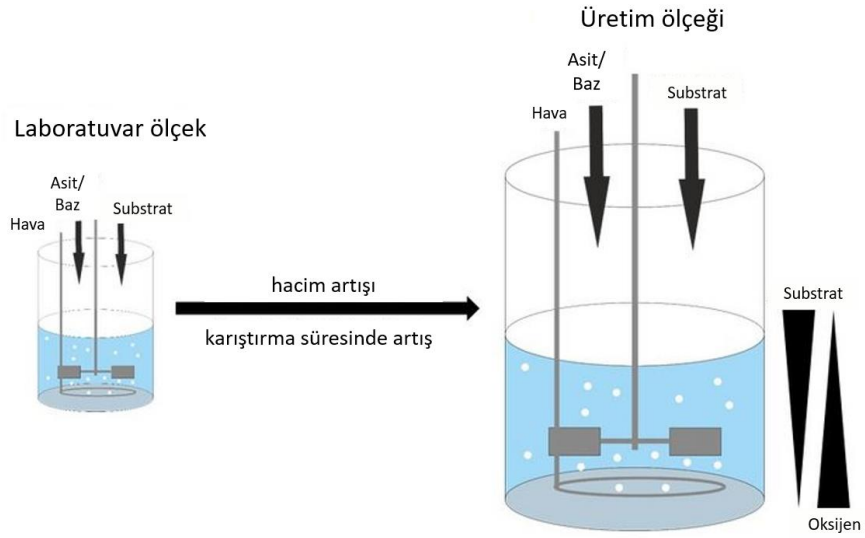
Bu durumlarda, bir takas söz konusu olmaktadır. Mühendisler homojen karıştırma veya karıştırma süresine göre ölçeği büyütmeyi seçebilirler.

Karıştırma süresi şu şekilde tanımlanabilir:

$$t_m = \frac{V}{Nd^3}$$

Denklem 7

$V = \text{çalışma hacmi (m}^3\text{)}$
$N = \text{karıştırıcı dönme hızı (rpm)}$
$d = \text{karıştırıcı çapı (m)}$



Şekil 2.7. Ölçek büyütme. Sabit karıştırıcı sayısında hacim arttıkça karıştırma hızı artmaktadır.

2.6.2. Biyokimyasal Faktörler

Endüstriyel üretim için kullanılan ortam bileşimleri, neredeyse saf veya laboratuvar kalitesinde olmayan bileşenleri içerir. Ekonomi, mühendislerin birinci önceliğidir ve bu nedenle düşük dereceli bol ve doğal kaynaklar kullanılır.

Böyle bir durumla başa çıkmanın en iyi yolu, kesin endüstriyel ölçek bileşimini kullanarak bazı laboratuvar deneyleri yapmak ve böylece koşulları tekrarlamaktır. Ancak bu doğal kaynakların bileşimi, saflığı ve fiziksel özellikleri seriden seriye veya zamanla değişebileceğinden bu bile yeterli olmayabilir. Kaynaklarda küçük miktarda toksik veya engelleyici bileşenin ortaya çıkması, süreci durdurabilir veya saflıkta değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle mühendisler, endüstriyel üretime başladığında bile bu tür değişiklikleri izlemek ve bunlarla mücadele etmek için laboratuvar ölçekli fermantasyon çalışmalarına devam etmelidirler. Gelen besin saflığı ve bileşimi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya gaz kromatografisi (GC) gibi analitik kimya teknikleri kullanılarak izlenir ve fermantasyon sürecini pürüzsüz tutmak için çalışma ortamının bileşimindeki değişiklikler buna göre uygulanır (Najafpour, 2007).

3. MATERYAL-METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Çalışmalarda, ‘Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonu’ndan alınan *Lactobacillus plantarum* BG24 suşu kullanılmıştır. Mikroorganizma Man Rogosa, Sharp (MRS) broth ortamında 37° C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonunda +4 °C’de stoklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Besin Ortamları

Man Rogosa, Sharp (MRS) Broth (Difco™ Lactobacilli MRS Broth):

Çalışmada *L. plantarum* suşunun çoğaltılıp depolanması, inokülüm ortamının hazırlanması ve biyoreaktörlerde üretim ortamlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. İçeriğinde 10 g/L proteoz pepton, 10 g/L sığır özü (beef extract), 5 g/L maya özü (yeast extract), 20 g/L dekstroze, 1 g/L polisorbata 80, 2 g/L amonyum sitrat, 5 g/L sodyum asetat, 0.1 g/L magnezyum sülfat, 0.05 g/L mangan sülfat ve 2 g/L dipotasyum fosfat bulunmaktadır. Laboratuvar kullanımlarında nihai pH’ı 6.5±0.2dir. 55 g/L MRS Broth distile suya karıştırılarak hazırlanmaktadır.

MRS-Agar (Merck):

Çalışmalarda toplam canlı sayımı için *L. plantarum* suşunun büyütülmesinde kullanılmıştır. Hazırlanış oranı, 1 litre distile suya 66,2 g MRS-Agar şeklindedir.

3.1.3. Dilüsyon Çözeltisi

Toplam canlı sayımı öncesinde üretimden alınan örneği seyreltmek için kullanılmıştır. Distile suya %0,1 pepton (Bacto™ Peptone) karıştırılarak hazırlanmıştır (Z. Erginkaya vd., 2019).

3.1.4. Kullanılan Köpük Kırıcı

Köpük kırıcı (Sigma (Antifoam Y-30 Emulsion)) üretim için kullanılan MRS Broth ortamlarına 1 ml/L oranında eklenmiştir.

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (HMC Hirayama): MRS ortamlarının, dilüsyon tüplerinin ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerin sterilizasyon işleminde kullanılmıştır.

Santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 420R): Kuru kütle tayini için biyokütle ve ortamın ayrılmasında kullanılmıştır.

İnkübatör (37 °C) (Sanyo Cooled Incubator MIR-153): Aşı kültürü ve petrilere gerçekleşen üretim işleminde kullanılmıştır.

İnkübatör (60 °C) (Nüve FN055 Dry Heat Sterilizer): Kuru kütle tayini için falkon tüplerin ve biyokütlenin kurutulmasında kullanılmıştır.

Spektrofotometre (Amersham Biosciences (Ultraspec 1100 pro)): Optik yoğunluğu ölçmek için kullanılmıştır.

pHmetre (Mettler Toledo): Üretim ortamının pH değerini ayarlama da kullanılmıştır.

5 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktör: Derin kültür fermantasyonu ile biyokütle üretimi için kullanılmıştır.

10 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktör: Derin kültür fermantasyonu ile biyokütle üretimi için kullanılmıştır.

100 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktör: Derin kültür fermantasyonu ile biyokütle üretimi için kullanılmıştır.

Hava Kaldırılmalı Biyoreaktör: Derin kültür fermantasyonu ile biyokütle üretimi için kullanılmıştır.

Hava kompresörü: Üretimler esnasında karıştırılmalı tank biyoreaktör içerisine hava beslemesinde kullanılmıştır.

Sirkülasyon pompası (Sartorius Stedim (Frigomix 1000)): Tank biyoreaktörde sıcaklığın sabit kalması için reaktör ceketine su sirkülasyonunun yapılması sağlanmıştır.

Buhar Jeneratörü (Akkaya Aş. (Blowtherm)): 100 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktör üretimleri esnasında üretim ortamının ve biyoreaktörün sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Hassas Terazı (Precisa (HB 220A)): Üretim ve aşı ortamlarının ölçülmesinde kullanılmıştır. Aynı zamanda kuru kütle tayini hassas terazi ile gerçekleştirilmiştir.

Manyetik ısıtıcı ve karıştırıcı (Heidolph (Mr standard)): Çalışma esnasında kullanılan çözeltilerin ve ortamların karıştırılmasında kullanılmıştır.

Vorteks (Scilogex (MXS)): Optik yoğunluk ölçümü öncesinde kullanılmıştır.

Desikatör: Kuru kütle tayini öncesinde falkon tüplerin darasını alabilmek için kullanılmıştır.

Sonik Su Banyosu (Lab Companion (Ultrasonic cleaner UC-10)): Köpük kırıcının homojen hale getirilmesinde kullanılmıştır.

Viskozimetre (Brookfield Engineering Labs, INC): Üretimin torkunu ve viskozitesini ölçmek için kullanılmıştır.

Biyogüvenlik Kabini (Esco Class 2 BSC): Alınan örneklerin analizlere hazırlanmasında kullanılmıştır.

Buzdolabı: Stok kültürün ve örneklerin +4°C'de depolanmasında kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Aşı Kültürünün Hazırlanması (*L. plantarum* BG24 suşunun geliştirilmesi)

Fermentasyon ortamı olarak MRS Broth, 55 g/L olacak şekilde kullanılmıştır. Tartılan MRS Broth, distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür (Şekil 3.1). Ortam otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Aşının 1. aktivasyonu için, 1 ml *L. plantarum* BG24 suşu, 9 ml MRS Broth’a aktarılmış, 37°C’ de 24 saat, statik koşullarda, inkübe edilmiştir. Aşının 2. aktivasyonu için inkübasyonu tamamlanan kültürden 1 ml alınarak 9 ml MRS Broth’a ekim yapılmıştır ve 37°C’ de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sabit oranlar kullanılarak farklı aşı miktarları için 250’lik erlenlerde kültürler hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler biyoreaktör aşılamaında kullanılmış ve biyokütle üretimine başlanmıştır.



Şekil 3.1. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilen MRS Broth aşı ortamı.

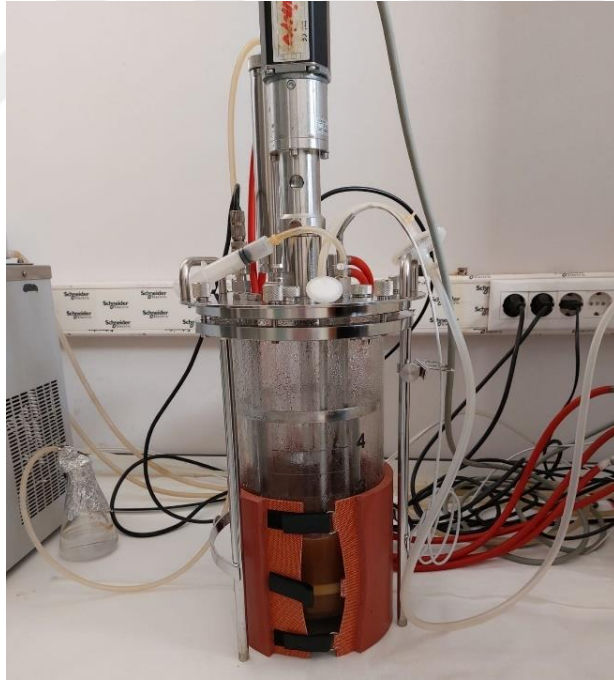
3.2.2. 5 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları

Çalışma kapsamında 5 L çalışma ortamı kapasitesine sahip karıştırılmalı tank biyoreaktörü kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu biyoreaktör, karıştırma için, 2 adet Rushton türbine sahiptir. ‘Cold finger’ dan geçen su sirkülasyonu ve seyyar ceket sayesinde

ortam sıcaklığı ayarlanır. Steril hava biyoreaktörün altında bulunan hava simidi (sparger) sayesinde ortama beslenir. Hava çıkışı su sirkülatörü ile soğutularak ortam kaybı engellenir. Oksijen, sıcaklık ve pH probu biyoreaktöre bağlıdır. Probelerin ve su sirkülatörünün bağlı olduğu yazılım programıyla sıcaklık, pH, oksijen, karıştırma ve havalandırma anlık olarak gözlemlenir.

Üretimler esnasında 2 L çalışma hacminde çalışılmıştır. Hazırlanan MRS Broth ortamı reaktöre eklenmiştir. Köpük kırıcı ortama ilave edilmiştir. Biyoreaktör hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’de 30 dk sterilize edilmiştir. Biyoreaktör bağlandıktan sonra vakum etkisinin önüne geçilebilmesi ve kontaminasyon riskini minimuma indirmek için steril hava basılmıştır. Su sirkülasyonu ile sıcaklık düşürüldükten sonra, sıcaklık 37°C’de sabit tutulmuştur. Aşı kültürü biyoreaktörün üstünde bulunan aşı kapağından ortama eklenmiştir.

Örnekler, örnek alım hattından steril bir şırınga ile alınmış ve steril falkon tüplerde saklanmıştır.



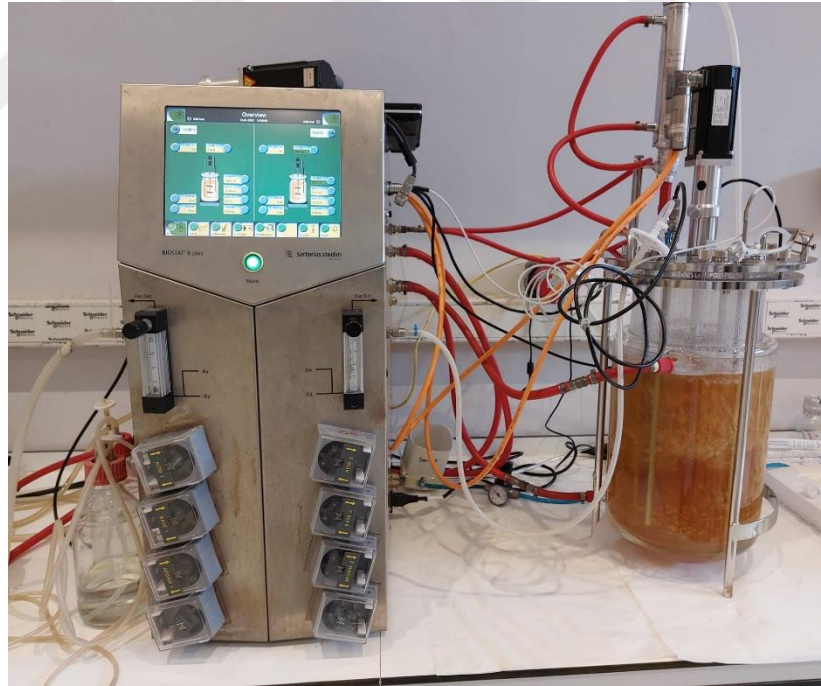
Şekil 3.2. 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörü.

3.2.3. 10 Litrelik Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları

10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü cam yapıdadır. Karıştırma için 2 adet Rushton türbin biyoreaktörde bulunmaktadır. Havalandırma için hava simidi biyoreaktörün alt tabanındadır. Bu biyoreaktör sabit cam cekete sahiptir, bu nedenle sıcaklık ayarı su sirkülatörü ile yalnızca ceketten sağlanmaktadır. Oksijen, pH ve sıcaklık problemleri biyoreaktöre bağlıdır. Yan ekrandan bütün parametreler anlık olarak gözlemlenmektedir (Şekil 3.3).

Çalışmalarda 8 litre üretim hacmi kullanılmıştır. Ortam olarak MRS Broth köpük kırıcıyla birlikte hazırlanmıştır. Sterilizasyon için hazırlanan biyoreaktör 121°C’de 30 dakika otoklavlanmıştır. Su sirkülatörü ile ceket doldurularak ortam sıcaklığı 37°C’ye düşürülmüştür.

Aşı kültürü biyoreaktörün üstündeki aşı kapağından ortama eklenmiş ve bek alevi yardımıyla steril şırıngayla örnek alınmıştır.



Şekil 3.3. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü.

3.2.4. Pilot Ölçekli Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Koşulları

Ölçek büyütme çalışmalarında 100 litrelik pilot ölçekli karıştırılmalı tank reaktör kullanılmıştır (Şekil 3.4). Karıştırma için 2 adet Rushton türbine sahip olan bu biyoreaktörde havalandırma, hava kompresörü sayesinde hava simidinden sağlanmaktadır. Parametreleri gözlemlemek için oksijen, pH ve sıcaklık probeları kullanılmıştır.

Çalışma hacmi olarak 35 litre belirlenmiştir. Hazırlanan MRS Broth ortamı biyoreaktöre doldurulduktan sonra hava ile ceket suyu boşaltılmıştır. Buhar jeneratörü ile 135°C'lik kızgın buhar cekete verilmiş, bu sayede ceket ve çıkış filtresi sterilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonrasında giriş filtresinin ve biyoreaktör ortamının tam sterilizasyonu kızgın buharla gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun, ceketin ısıtılarak gerçekleştirilmesi ortamın kızgın buharla temasını önlemiş ve kontaminasyon veya yoğunlaşma sonucu ortam hacminin değişmesi risklerini ortadan kaldırmıştır. Ceket önce hava sonra su ile soğutulmuştur. Suyla doldurulan ceketin sıcaklık ayarı yapılmıştır. Ortam sıcaklığı 37°C'de sabit tutulmuştur.

Aşı kültürü reaktörün üzerinde bulunan aşı kapağından ortama eklenmiştir. Her örnek alımı öncesinde ve sonrasında örnek alım hattı kızgın buharla sterilize edilmiştir.



Şekil 3.4. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörü.

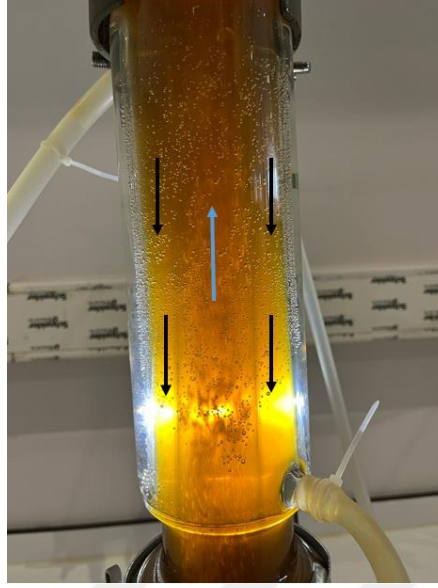
3.2.5. Hava Kaldırmalı Biyoreaktörde Üretim Koşulları

Kullandığımız hava kaldırmalı biyoreaktör 1,1 litre çalışma hacmine sahiptir (Şekil 3.5). Biyoreaktörün dışında bulunan cam ceket su sirkülasyonu sayesinde sıcaklığı dengelemektedir. Hava beslemesi, hava kompresörüyle reaktörün altından gerçekleşmektedir.



Şekil 3.5. Hava kaldırmalı biyoreaktör.

Biyoreaktörün ortasında sirkülasyonun ve oksijen transferinin verimini arttırmak için çekiş tüpü bulunmaktadır. Kullandığımız biyoreaktör iç döngülü bir hava kaldırmalı biyoreaktördür. ‘Riser’ ve ‘downcorner’ akış bölgeleri net olarak görülmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hava kaldırmalı biyoreaktörde mavi ok çekiş tüpünün içindeki yukarı akış (riser) bölgesini, siyah oklar aşağı akış (downcorner) bölgelerini göstermektedir.

Üretim sırasında MRS Broth ortamı kullanılmıştır. Reaktörün üst girişleri pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Sterilizasyon için biyoreaktör 15 dakika 121°C’de otoklavlanmıştır. Biyoreaktör hava ve su sirkülasyonu ile 37°C’ye soğutulduktan sonra aşı kültürü ortama eklenmiştir. Örnek alımı steril cam pipetlerle gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Biyoreaktör Üretimleri Deney Tasarımı

5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe derin kültür fermantasyonunda gerçekleştirilecek üretiminin sabit, bağımsız ve bağımlı değişkenleri aşağıda verilmiş olup deney tasarımı Design Expert 7.0 programı üzerinde planlanmıştır.

Sabit Değişkenler:

- Sıcaklık: Sabit (37 °C)
- pH: sabit (6.50)

Bağımsız Değişkenler:

- Aşı miktarı (%1-10 (v/v))
- Havalandırma (0-1 vvm) ve karıştırma hızı (0-500 rpm)

- Süre (2-24 saat)

Bağımlı değişken:

- *L. plantarum* BG24 suşu için biyokütle (g/L)

Tablo 3.1. Design expert 7.0 Box-Behnken deney tasarımı.

			Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Std	Run	Block	A:havalandırma (vvm)	B:karıştırma (rpm)	C:aşı oranı (%)	D:süre (saat)
6	1	Block 1	0.50	250.00	10.00	2.00
26	2	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00
3	3	Block 1	0.00	500.00	5.50	13.00
9	4	Block 1	0.00	250.00	5.50	2.00
18	5	Block 1	1.00	250.00	1.00	13.00
5	6	Block 1	0.50	250.00	1.00	2.00
2	7	Block 1	1.00	0.00	5.50	13.00
10	8	Block 1	1.00	250.00	5.50	2.00
15	9	Block 1	0.50	0.00	10.00	13.00
12	10	Block 1	1.00	250.00	5.50	24.00
11	11	Block 1	0.00	250.00	5.50	24.00
20	12	Block 1	1.00	250.00	10.00	13.00
22	13	Block 1	0.50	500.00	5.50	2.00
8	14	Block 1	0.50	250.00	10.00	24.00
7	15	Block 1	0.50	250.00	1.00	24.00
14	16	Block 1	0.50	500.00	1.00	13.00
19	17	Block 1	0.00	250.00	10.00	13.00
23	18	Block 1	0.50	0.00	5.50	24.00
1	19	Block 1	0.00	0.00	5.50	13.00
4	20	Block 1	1.00	500.00	5.50	13.00
27	21	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00
21	22	Block 1	0.50	0.00	5.50	2.00
16	23	Block 1	0.50	500.00	10.00	13.00
25	24	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00
24	25	Block 1	0.50	500.00	5.50	24.00
17	26	Block 1	0.00	250.00	1.00	13.00
13	27	Block 1	0.50	0.00	1.00	13.00

3.2.7. Ölçek Büyütme Çalışmaları

Ölçek büyütme çalışmalarında iki ayrı yöntem denendi. Karıştırıcı çaplarının geometrik oranı ile karıştırma hızlarının belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{d_1}{d_2} = \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Denklem 8}$$

d_1 = İlk biyoreaktörün karıştırıcı çapı

d_2 = İkinci biyoreaktörün karıştırıcı çapı

N_1 = İlk biyoreaktörün karıştırma hızı

N_2 = İkinci biyoreaktörün karıştırma hızı

İkinci yöntemde optimizasyonu yapılan biyoreaktör üzerinden Reynolds sayısı (Re_i) ve güç sayısı (N_p) hesaplanmıştır. Hacim başına güç tüketimi (P/V) ile farklı hacimli biyoreaktörler arasında oranlama yapılmıştır. Bu aşamada kullanılan formüller gösterilmiştir:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu} \quad \text{Denklem 9}$$

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5} \quad \text{Denklem 10}$$

$$\left(\frac{P_1}{V_1}\right) = \left(\frac{P_2}{V_2}\right) \quad \text{Denklem 11}$$

D_i = karıştırıcı çapı,

ρ = yoğunluk (öz kütle),

μ = viskozite,

N_i = karıştırıcı hızı,

V = çalışma hacmi,

P = güç birimi.

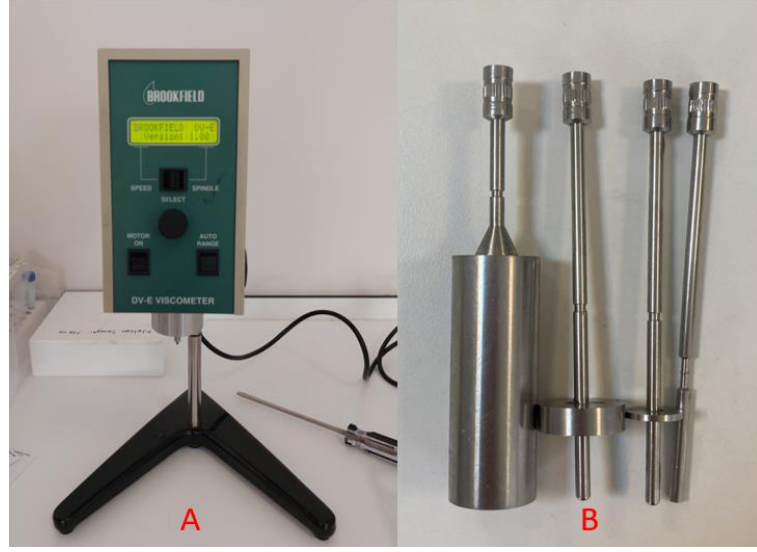
3.2.7.1. Ölçek Büyütme Çalışmaları İçin Yoğunluk Tayini

Yoğunluk tayini için optimizasyon sonrası 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim yapılmıştır. Yapılan üretimin süresi göz önüne alınmıştır. Üretimin başlangıcında, ortasında ve sonunda biyoreaktörden 10 ml'lik steril örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin tartımı için steril falkon tüpler kullanılmıştır. Falkon tüpler 60 °C'de 24 saat inkübatörde kurutulduktan sonra 30 dk desikatörde nemi alınmıştır. Falkon tüplerin darası alındıktan sonra tartıma kadar desikatörde saklanmıştır. Darası alınan tüplerle 3 örnekte ayrı ayrı tartılmıştır. Bulunan değerler ortamın viskoz olmaması nedeniyle birbirine yakındır. Değerlerin kg/L cinsinden ortalaması alınmıştır.

3.2.7.2. Ölçek Büyütme Çalışmaları İçin Viskozite Tayini

Viskozite tayini için optimizasyon sonrası 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim yapılmıştır. Yapılan üretimin süresi göz önüne alınmıştır. Üretimin başlangıcında, ortasında ve sonunda biyoreaktörden 40 ml'lik steril örnekler alınmıştır.

Viskozimetre, ayak (askı), sabitleme aparatı, cihaz ve uç kısmından oluşan bir cihazdır (Şekil 3.7). Ayak konduktan sonra sabitleme aparatı ve cihaz yerleştirilmiştir. Cihazın üstündeki su terazisine göre ayaklar dengelenmiştir. Üretim ortamı ve örnekler arasında fark olmaması için örnekler 37°C'de ölçülmüştür. 4 farklı ucu bulunan cihazda 62 numaralı uç en iyi sonucu vermiştir. 3 farklı saatte alınan örnekler cihazda ölçülmüş ve viskozite değerlerinin ortalamaları alınmıştır.



Şekil 3.7. A) Viskozitemetre cihazı ve B) kullanılan uçlar gösterilmiştir.

3.2.8. Üretim Sonrası Tayinler

Lactobacillus plantarum BG24 suşu belirli aşı oranlarında, 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü içerisinde, 2 litrelik çalışma hacminde 37°C’de geliştirilmiştir. Belirli saat aralıklarında biyokütle, optik yoğunluk ve toplam canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla örnekler alınmıştır.

3.2.8.1. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi

Optik yoğunluk takibi, 600nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir. Kör için 55 g/L MRS Broth ortamı distile su ile manyetik karıştırıcıyla karıştırılmış ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Optik yoğunluk öncesi örnekler kör ortamla 0,2-0,8 aralığına seyreltilmiştir. Bulunan sonuçlar seyreltme katsayısı ile çarpılmıştır.

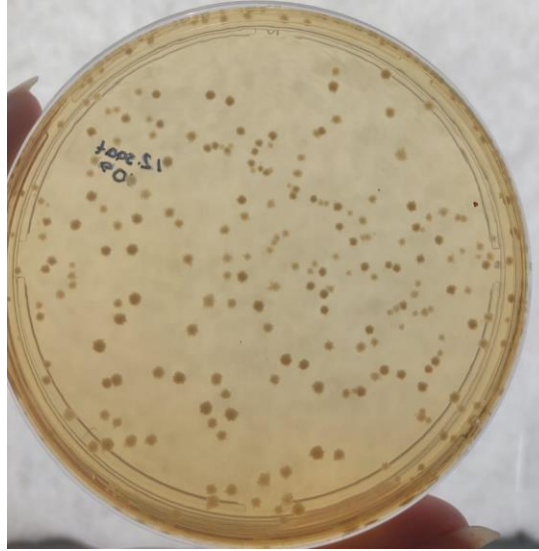
3.2.8.2. Biyokütlenin Belirlenmesi

Biyokütle tayini için 15 ml’lik falkon tüpleri 60°C’lik inkübatörde 24 saat tutulduktan sonra desikatörde 30 dakika bekletilmiştir. Desikatörden alınan falkon

tüplerin hassas tartıda darası alınmıştır. Falkonlar örnek alımına kadar desikatörde bekletilmiştir. Üretimde alınan 2 ml örnek 15 ml'lik falkon tüpe konulmuş ve 7500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım ayrılmıştır. Kalan yaş hücre peletleri 60°C'de 24 saat sabit tartıma gelene kadar kurumaya bırakılmıştır, sonrasında hassas tartıda tartım yapılmıştır.

3.2.8.3. Toplam Canlı Sayımı

Toplam canlı hücre sayımı, dökme plak yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Cam tüplere 9'ar ml %0,1 oranında pepton içeren distile su seyreltme için hazırlanmıştır. Hazırlanan cam tüplerin pamuk ve alüminyum folyo ile ağızları kapatılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına hazırlanan MRS Agar dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Reaktörden alınan örnekten 1 ml, peptonlu tüpe aktararak seyreltme yapılmıştır. Gerekli seyreltmelerden alınan 1 ml örnekler steril petri kaplarında bulunan MRS agar besiyerine eklenmiştir. 48 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde tutulan petrilerden gerekli sayımlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8).



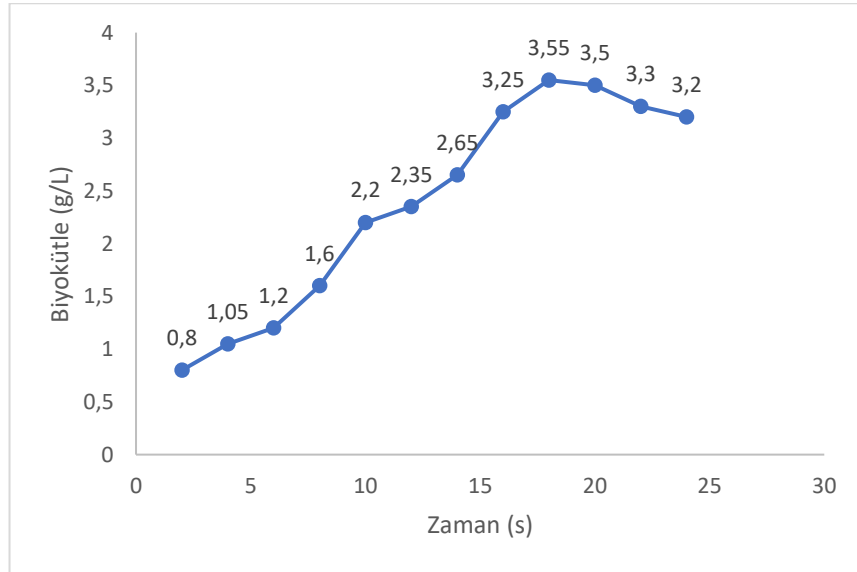
Şekil 3.8. Sayım öncesi petri kaplarının görüntüsü.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Deneme Üretimi

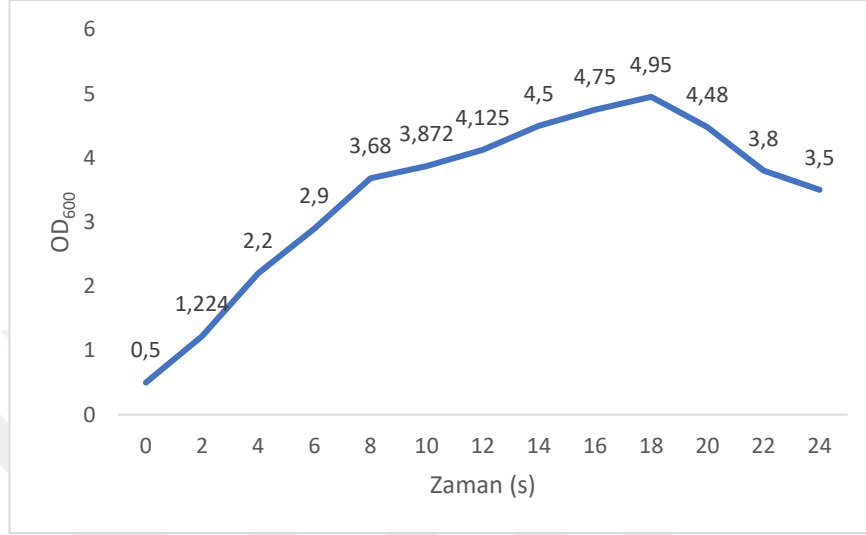
Deneme üretiminde, deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenlerin ortalama değerleri kullanılmıştır. Aşı miktarı %5,5 olarak belirlenmiştir. Aşı kültürü olarak 55 g/L MRS Broth ortamında hazırlanan 110 ml'lik kültür kullanılmıştır. 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktöründe 2 litre hacim ile çalışılmıştır. Fermantasyon ortamı 55 g/L MRS Broth olacak şekilde saf su içinde çözdürülmüştür. Reaktöre konulan fermantasyon ortamı otoklavda 121 °C'de 30 dk sterilize edilmiştir. Biyoreaktör soğuduktan sonra üretim koşulları ayarlanmış ve biyokütle üretimini başlatmak için aşılama yapılmıştır (Üretim koşulları: 250 rpm, 0.5 vvm, 37 °C.). 24 saat boyunca, 2 saatlik aralıklarla, biyoreaktörden örnek alınmıştır. Biyokütle ve optik yoğunluk analizleri 2 saatte bir, toplam canlı sayımı analizi 4 saatte bir gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizler neticesinde elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan grafik Şekil 4.1' de paylaşılmıştır. Verilere göre en yüksek biyokütle miktarı 3,55 g/L olarak, 18.saatte elde edilmiştir.



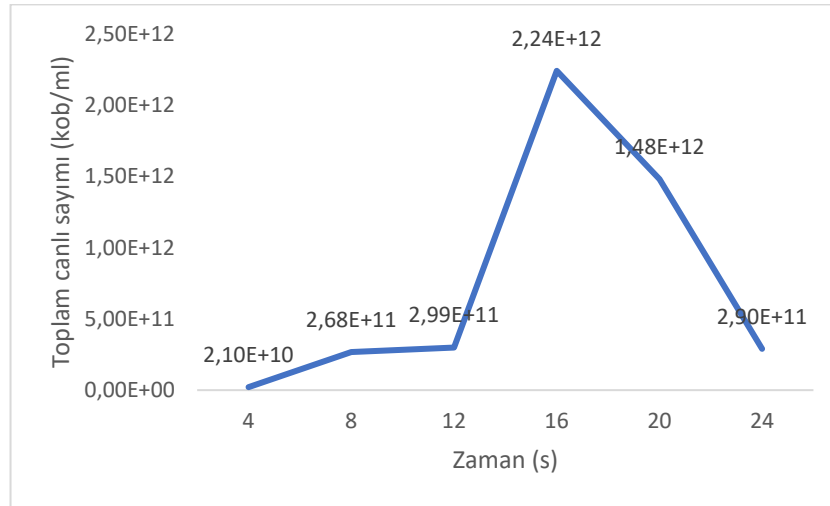
Şekil 4.1. *Lactobacillus plantarum* BG24 suşuna ait biyokütleye karşı zaman grafiği.

Optik yoğunluk takibi, 600 nm dalga boyunda 24 saat boyunca, iki saat aralıklarla spektrofotometrik ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen en yüksek OD₆₀₀ değeri 18. Saatte 4,95 olarak ölçülmüştür. Zamana bağlı optik yoğunluk grafiği Şekil 4.2’ de paylaşılmıştır.



Şekil 4.2. *Lactobacillus plantarum* BG24 suşuna ait optik yoğunluğa karşı zaman grafiği.

Yapılan analiz neticesinde elde edilen toplam canlı hücre sayımı sonuçları Şekil 4.3’te gösterilmiştir. 16. saatte toplam canlı hücre sayımı $2,24 \times 10^{12}$ kob/ml olarak en yüksek seviyede elde edilmiştir.



Şekil 4.3. *Lactobacillus plantarum* BG24 suşuna ait canlı hücre sayısına karşı zaman grafiği.

4.2. Deney Tasarımı Üretim Sonuçları

Design expert 7.0 programının sunduğu deney tasarımı üzerinden üretimler gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonun gerçekleştirilmesi için Tablo 4.1’de bulunan bütün üretimler yapılmıştır.

Tablo 4.1. Design expert 7.0 deney tasarım sonuçları.

Std	Run	Block	A:havalandırma (vvm)	B:karıştırma (rpm)	C:aşı oranı (%)	D:süre (saat)	biyokütle (g/L)
6	1	Block 1	0.50	250.00	10.00	2.00	1.1
26	2	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00	2.3
3	3	Block 1	0.00	500.00	5.50	13.00	3.8
9	4	Block 1	0.00	250.00	5.50	2.00	1.3
18	5	Block 1	1.00	250.00	1.00	13.00	3
5	6	Block 1	0.50	250.00	1.00	2.00	0.8
2	7	Block 1	1.00	0.00	5.50	13.00	3.9
10	8	Block 1	1.00	250.00	5.50	2.00	0.9
15	9	Block 1	0.50	0.00	10.00	13.00	3.9
12	10	Block 1	1.00	250.00	5.50	24.00	2.6
11	11	Block 1	0.00	250.00	5.50	24.00	3.7
20	12	Block 1	1.00	250.00	10.00	13.00	2.75
22	13	Block 1	0.50	500.00	5.50	2.00	0.75
8	14	Block 1	0.50	250.00	10.00	24.00	2.8
7	15	Block 1	0.50	250.00	1.00	24.00	2.9
14	16	Block 1	0.50	500.00	1.00	13.00	3.1
19	17	Block 1	0.00	250.00	10.00	13.00	3.5
23	18	Block 1	0.50	0.00	5.50	24.00	3.5
1	19	Block 1	0.00	0.00	5.50	13.00	4
4	20	Block 1	1.00	500.00	5.50	13.00	2.5
27	21	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00	2.2
21	22	Block 1	0.50	0.00	5.50	2.00	1.2
16	23	Block 1	0.50	500.00	10.00	13.00	2.55
25	24	Block 1	0.50	250.00	5.50	13.00	2.25
24	25	Block 1	0.50	500.00	5.50	24.00	2.9
17	26	Block 1	0.00	250.00	1.00	13.00	3.3
13	27	Block 1	0.50	0.00	1.00	44595	3.2

Programın önerdiği deney tasarımları uygulanmıştır. Response olarak biyokütle seçilmiş ve bütün üretimlerdeki biyokütle sonuçları g/L biriminde hesaplanıp programa girilmiştir. Deney tasarım sonuçlarına göre optimizasyon basamakları gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Analiz Sonuçları

Deney tasarımı oluşturup üretim sonuçları girildikten sonra program üzerinde analiz yapılmıştır. Bu analiz basamağı, deney sonuçlarının optimizasyona uygun olup olmadığını göstermiştir. İlk olarak modelin anlamlı olup olmadığını anlamak için ANOVA'ya bakılmıştır. Model değeri <0.0001 çıkmış ve “significant” olarak tanımlanmıştır. Bu sonuç, deney modelimizin anlamlı olduğunu göstermiştir.

Bir diğer önemli noktaysa Lack of Fit değerinin “not significant” tanımlanmış olmasıdır. Lack of fit değerinin anlamsız (non significant) olması ise yapılan deneylerin sonucunda elde edilen modelde hataya neden olacak sapmaların olmadığını göstermiştir. ANOVA sonuçları, deney tasarımının optimizasyona uygun olduğunu göstermiştir. ANOVA sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

ANOVA testinin sonucunda p-value değerinin 0.05’ten küçük olduğu değerlerde modelin anlamlı (significant) olduğu görülmüştür. İncelenen değerlerde C, AC, BD ve CD interaksiyonlarının p-value değerlerinin 0.05’ten büyük olduğu görülmüştür. Bu interaksiyonların sonuç üzerinde önemli bir etkiye sebep olmadıkları görülmüştür. Aşı oranı etkisiz bir parametre olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Deney tasarım üretimlerinin ANOVA sonuçları.

Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin Ortalaması	F-değeri	P-değeri	
Model	26.75	14	1.91	122.99	< 0.0001	anlamlı
A-Havalandırma	1.30	1	1.30	83.68	< 0.0001	
B-Karıştırma	1.40	1	1.40	90.15	< 0.0001	
C-Aşı Oranı	7.500E-003	1	7.500E-003	0.48	0.5004	
D-Süre	12.71	1	12.71	818.00	<0.0001	
AB	0.36	1	0.36	23.17	0.0004	
AC	0.051	1	0.051	3.26	0.0962	
AD	0.12	1	0.12	7.88	0.0158	
BC	0.39	1	0.39	25.14	0.0003	
BD	5.625E-003	1	5.625E-003	0.36	0.5586	
CD	0.040	1	0.040	2.57	0.1346	
A ²	2.03	1	2.03	130.53	< 0.0001	
B ²	2.07	1	2.07	133.19	< 0.0001	
C ²	0.56	1	0.56	35.79	< 0.0001	
D ²	2.87	1	2.87	184.59	< 0.0001	
Residual	0.19	12	0.016			

Uyumsuzluk Testi	0.18	10	0.018	7.26	0.1271	anlamsız
Saf Hata	5.000E-003	2	2.500E-003			
Cor Total	26.94	26				

Tablo 4.3. Deneysel tasarıma ait standart sapma ve R^2 değerleri.

Standart Sapma	0,12
Ortalama	2,62
R^2	0,9931
Ayarlanmış R^2	0,9850
Beklenen R^2	0,9608
Yeterli Hassasiyet	34,330

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen modelin R^2 değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir. Deneyin başarılı olarak yorumlanabilmesi için R^2 değerinin 1'e yakın olması gerekmektedir. Yapılan ANOVA testi sonucunda R^2 değerinin 0.9931 çıktığı görülmüştür. R^2 değerinin 1'e yakın olması değişimin lineer bir değişime yakın olduğunu göstermiştir. Ayrıca R^2 değerinin 1'e yakın olması ile oluşturulan modelin başarılı olduğu yorumlanmıştır.

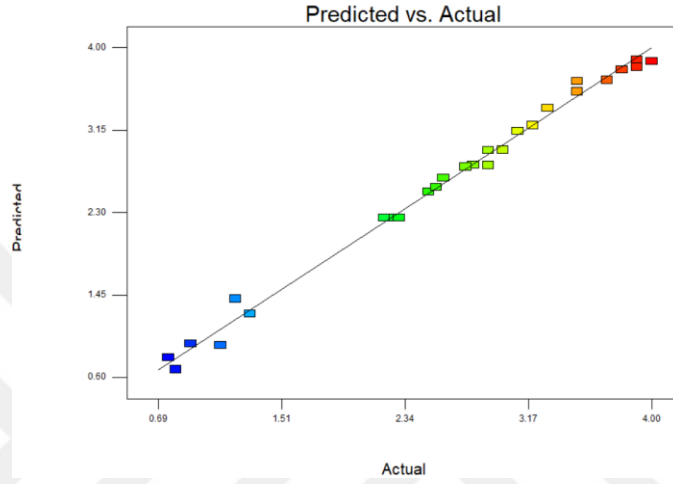
Kodlanmış faktörler açısından son denklem:

$$\begin{aligned}
 \text{biyokütle} = & +2.25 \\
 & -0.33 * A \\
 & -0.34 * B \\
 & +0.025 * C \\
 & +1.03 * D \\
 & -0.30 * A * B \\
 & -0.11 * A * C \\
 & -0.17 * A * D \\
 & -0.31 * B * C \\
 & -0.038 * B * D \\
 & -0.10 * C * D \\
 & +0.62 * A^2 \\
 & +0.62 * B^2
 \end{aligned}$$

$$+0.32 * C^2$$

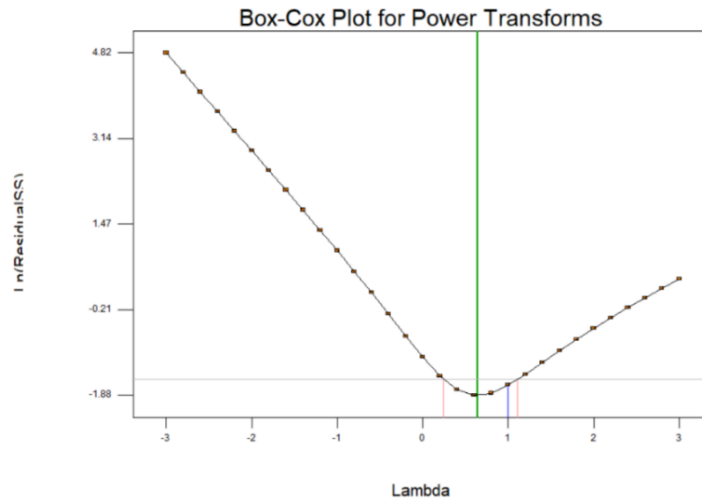
$$-0.73 * D^2$$

ANOVA basamadığından sonra “Diagnostic” kısmındaki grafik incelemeleri yapılmıştır. İlk olarak “predicted-actual” grafiğine bakılmıştır. Bu grafik programın tahmin ettiği değerlerle, üretim sonuçlarının bir karşılaştırmasını yapmıştır. Değerlerde büyük bir sapma olmadığı Şekil 4.4’te görülmektedir.



Şekil 4.4. Predicted vs. Actual analiz grafiği.

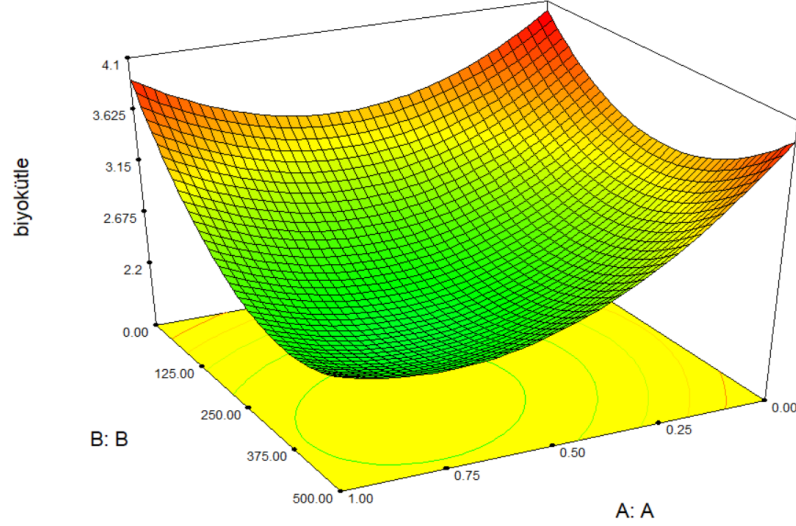
Analiz kısmında güç dönüşümleri için “Box-Cox” grafiğine bakılmıştır. Şekil 4.5’te lambda değerinin programın verdiği aralıkta kaldığı görülmektedir.



Şekil 4.5. Box-Cox grafiği.

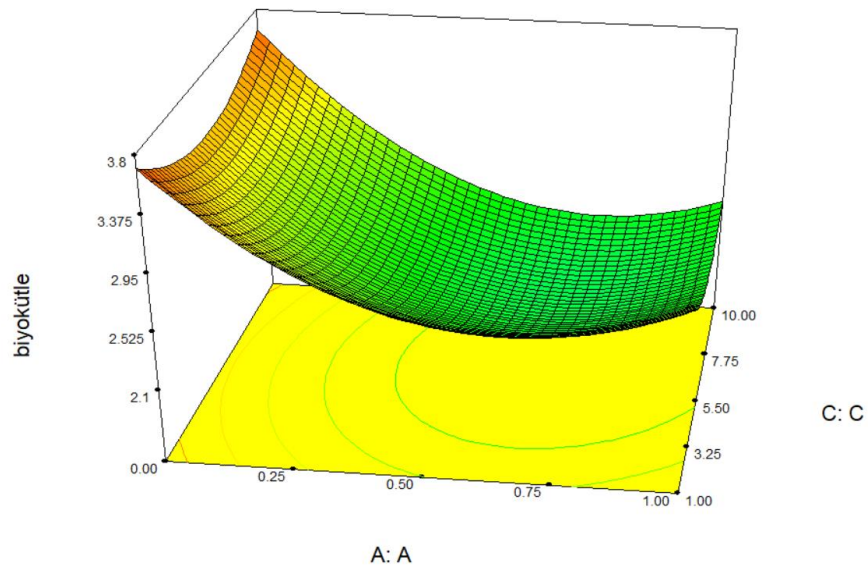
Son olarak model grafikleri 3 boyutlu olarak incelenmiştir. 3 boyutlu grafikte optimuma yaklaşan değerlerin havalandırma ve karıştırmanın olmadığı;

havalandırmanın olup karıştırmanın olmadığı ve karıştırmanın olup havalandırmanın olmadığı noktalarda olduğu görülmüştür. Havalandırma-Karıştırma interaksiyon grafiği Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



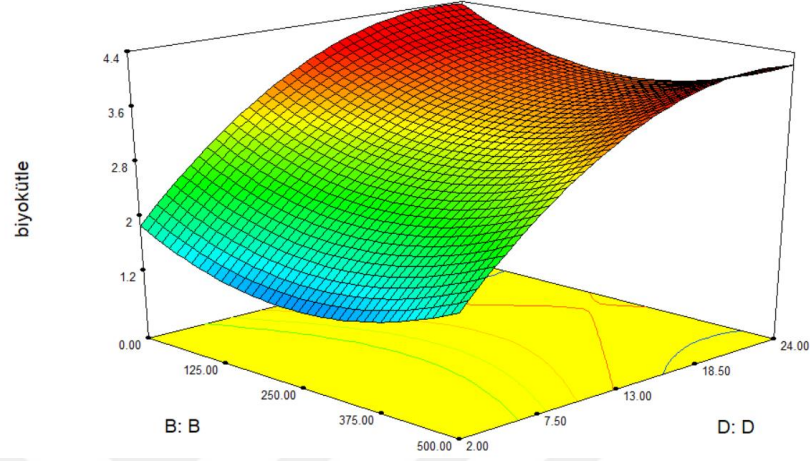
Şekil 4.6. 3 boyutlu model grafiği (A: Havalandırma, B: Karıştırma) (Aşı oranı:5.50, Süre:13).

Şekil 4.7’de havalandırma-aşı oranı interaksiyon grafiği gösterilmiştir. Parametrelerde karıştırma (250 rpm) ve süre (13 saat) ortalama değerlerinde sabitlenmiştir. 3 boyutlu interaksiyon grafiğinde aşı oranının üretim üzerindeki etkisinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Aşı miktarı etkisiz bir eleman olarak ele alınmıştır.

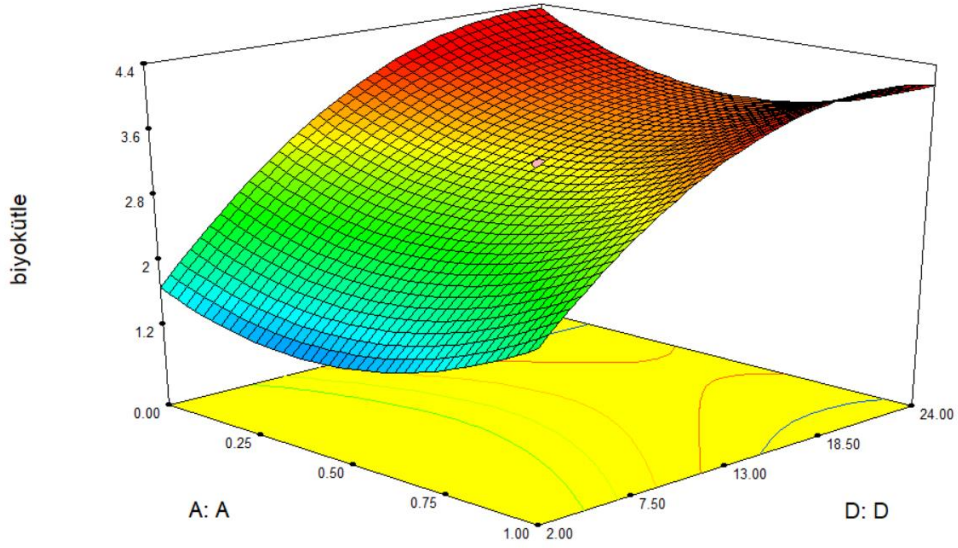


Şekil 4.7. 3 boyutlu model grafiği (A: Havalandırma, C: Aşı oranı) (Karıştırma:250, Süre:13).

Modelleme parametrelerinden biri üretim süresidir. Aşağıda belirtilen grafiklerde, karıştırma ve havalandırma ile üretim süresinin etkileşimi incelenmiştir. 3 boyutlu model grafikleri birbirine benzer olup, üretim süresinin 18-19. saatinden itibaren biyokütlede artış olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. 3 boyutlu model grafiği (B:Karıştırma, D:Süre) (Aşı oranı:5.50, Havalandırma:0).



Şekil 4.9. 3 boyutlu model grafiği (A:Havalandırma, D:Süre) (Aşı oranı:5.50, Karıştırma:0).

4.2.2. Optimizasyon

Optimizasyon kriterleri belirlenirken bütün parametreler aralık içinde tutulmuş ve biyokütle maksimize edilmiştir. Program seçilebilecek 30 tane kontrol deneyi

sunmuştur. Elimizdeki veriler göz önüne alındığında yalnızca karıştırmanın ya da havalandırmanın olduğu deneyler incelenmiştir. 3 boyutlu model grafik incelemelerinde üretim süresinin 18.saatinden itibaren biyokütle artışının durduğu görülmüştür. Aynı zamanda, deneme üretiminde toplam canlılığın 18. saatten sonra düştüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle süreyi 19 saatten fazla veren kontrol deneyleri elenmiştir. Aşı oranının etkisinin yok sayılabilecek kadar az olduğu bilindiğinden aşı oranını düşük seçmenin daha avantajlı olacağına karar verilmiştir. Bu bilgiler ışığında Tablo 4.4'te gösterilen 1 numaralı deney kontrol için seçilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol deneyleri tablosu.

Solutions							
Number	A	B	C	D	biyokütle	Desirability	
1	<u>0.05</u>	<u>478.75</u>	<u>2.98</u>	<u>17.48</u>	<u>4.0775</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	0.05	19.78	9.04	15.15	4.3715	1.000	
3	0.99	4.37	5.66	19.45	4.01404	1.000	
4	0.10	135.41	10.00	23.87	4.02147	1.000	
5	0.01	414.14	1.61	23.99	4.21664	1.000	
6	0.01	86.00	7.42	23.06	4.12999	1.000	
7	0.52	7.42	9.96	20.10	4.11844	1.000	
8	0.97	1.24	1.49	18.08	4.0744	1.000	
9	0.00	499.18	6.05	18.07	4.11614	1.000	
10	0.02	9.27	3.28	23.54	4.19701	1.000	
11	0.06	8.93	1.40	21.61	4.12039	1.000	
12	0.06	10.21	7.29	17.70	4.25518	1.000	
13	0.09	27.37	1.23	21.56	4.00277	1.000	
14	0.01	68.55	5.25	23.55	4.01796	1.000	
15	0.00	249.07	9.94	18.34	4.00732	1.000	
16	0.04	6.94	4.97	16.84	4.01439	1.000	
17	0.02	478.14	7.58	21.15	4.00826	1.000	
18	0.05	117.49	9.45	16.86	4.06177	1.000	
19	0.41	0.91	9.08	20.41	4.07148	1.000	
20	0.03	14.37	8.96	23.27	4.66555	1.000	
21	0.99	2.51	4.29	19.28	4.0032	1.000	
22	0.03	91.43	7.68	21.49	4.08494	1.000	
23	0.03	467.89	9.34	19.94	4.01883	1.000	
24	0.07	21.99	7.92	15.19	4.10741	1.000	
25	0.01	42.84	3.85	22.48	4.07018	1.000	
26	0.33	8.96	8.54	19.57	4.00473	1.000	
27	0.03	475.97	9.63	23.57	4.0244	1.000	

4.2.2.1. Kontrol Deneyi

Kontrol deneyi, 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktöründe derin kültür fermentasyonunda MRS ortamında (55 g/L) gerçekleştirilmiştir. Üretim 2 L hacimle yapılmıştır. Belirlenen kontrol deneyindeki parametreler yuvarlanarak uygulanmıştır. Üretim öncesinde ortama 1 ml/L köpük kırıcı eklenmiştir. Kontrol deneyinin biyokütle sonuçlarının olması gerektiği aralık 3.86-4.30 g/L verilmiştir. Üretim sonuçları Tablo 4.5'te görülmektedir, biyokütle sonucu oldukça yakın çıkmıştır. Kontrol deneyi başarılı olmuştur.

Tablo 4.5. Kontrol deneyi sonuçları.

Karıştırma (rpm)	Havalandırma (vvm)	Aşı oranı (%)	Süre (saat)	Response-1 OD ₆₀₀	Response-2 Biyokütle (g/L)	Response-3 Toplam canlı sayımı (kob/ml)
479	0	3	18	9,6	3,84	7,6E+11

Yapılan araştırmalarda *L. plantarum* için optik yoğunluk sonuçlarına tek bir çalışmada rastlanmıştır. Heeseop ve diğerleri(Heeseop vd., 2018) statik koşullarda MRS Broth ortamında gerçekleştirdikleri üretimde optik yoğunluğu 1.905 bulmuşlardır. Gerçekleştirilen üretimlerde hem karıştırılmalı hem de statik koşullarda çok daha yüksek bir değer elde edilmiştir. Biyokütle üretimi, Krishnan ve diğerleri(Krishnan vd., 1998) tarafından elde edilenden 2,5 g/L maksimum hücre yoğunluğu değerinden çok daha yüksektir. Fu ve Mathews(Fu ve Mathews, 1999), 5 ila 6 arasında değişen pH kontrolü ile yürütülen anaerobik deneylerde 10 g/L *L. plantarum* biyokütle üretimini bildirmişlerdir. Fu ve Mathews'in çalışmasında kullandığı daha düşük pH ve daha uzun süren üretimden dolayı biyokütle farkı oluşmuştur. İncelenen diğer çalışmalarda, 40-48 saatlik üretim sonuçlarında, toplam canlı sayımları 10^7 - 10^{10} arasında değişmektedir (Smita vd.,2008; Noori vd., 2016). Bu çalışmalarda 40-120 rpm arasında değişen düşük karıştırma hızları uygulanmıştır. Çalışmaların grafikleri incelendiğinde yalnızca biyokütle veya laktik asit üretimine odaklandıkları ve üretimi sabit fazda (stationary phase) durdurmadıkları görülmüştür.

4.3. Ölçek Büyütme Çalışmaları

4.3.1. Geometrik Oranla Karıştırıcı Ucu Hızı Hesaplama

Ölçek büyütme için 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe 8 litre hacimle çalışılmıştır. Yalnızca karıştırma kullanılacağı için ölçek büyütme öncesinde 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörün geometrik oranlarıyla 10 litrelik biyoreaktöre göre yeni karıştırıcı ucu hızı hesaplanmıştır.

$$\frac{d_1}{d_2} = \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Denklem 8}$$

d_1 = İlk biyoreaktörün karıştırıcı çapı

d_2 = İkinci biyoreaktörün karıştırıcı çapı

N_1 = İlk biyoreaktörün karıştırma hızı

N_2 = İkinci biyoreaktörün karıştırma hızı

$$\frac{6}{7} = \frac{N_2}{479} \rightarrow N_2 = 410,57 \text{ rpm}$$

5 litrelik biyoreaktörün karıştırıcı çapı: 6 cm

10 litrelik biyoreaktörün karıştırıcı çapı: 7 cm

5 litrelik reaktörün karıştırma hızı: 479 rpm

Bu hesaplama göre 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörün karıştırma hızı 410 rpm olarak belirlenmiştir.

4.3.1.1. Geometrik Oranla Ölçek Büyütme Üretimi

10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe ortam olarak MRS Broth kullanılmıştır. 1 ml/L köpük kırıcı sterilizasyon öncesinde ortama eklenmiştir. Karıştırma hızı dışında bütün parametreler 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörle aynı tutulmuştur (havalandırma:0 vvm, aşı oranı: %3, süre:18 saat). Üretim sonuçlarında ölçek büyütmeden dolayı bir kayıp olması beklenmesine rağmen kayıp

öngörülenin altında çıkmıştır. Ölçek büyütme deneyi sonuçları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Geometrik oranla ölçek büyütme deneyi sonuçları.

Karıştırma (rpm)	Havalandırma (vvm)	Aşı oranı (%)	Süre (saat)	Response-1 OD ₆₀₀	Response-2 Biyokütle (g/L)	Response-3 Toplam canlı sayımı (kob/ml)
410	0	3	18	8	3,7	4,8E+11

4.3.2. Güç Sayısına (N_p) Göre Ölçek Büyütme

Güç sayısına göre hesaplama yalnızca mekanik karıştırma bulunan sistemlerde kullanılmaktadır. Reaktörde hava beslemesi bulunmamalıdır. Aynı zamanda güç sayısı hesabı viskoz olmayan Newton tipi akışkanlarda kullanılır. Yapılan ölçümlerde viskozite $7,5 \times 10^{-3}$ Pa.s bulunmuştur. Mengi ve diğerleri(Mengi vd., 2020) MRS ortamında ölçtükleri viskoziteyi $1,4 \times 10^{-3}$ Pa.s bulmuşlardır. MRS Broth ortamı oldukça akışkandır ve düşük viskoziteye sahip olduğu görülmüştür. Bu üretim güç sayısı ile ölçek büyütme gerçekleştirmek için uygundur. Aşağıda uygun formüller kullanılarak hesaplamalar gösterilmiştir:

$$Re_i = \text{Reynolds sayısı}$$

$$N_p = \text{Güç sayısı}$$

$$(P/V) = \text{Hacim başına güç tüketimi}$$

$$5 \text{ L için karıştırıcı çapı, } D_i = 6 \text{ cm} = 0,06 \text{ m}$$

$$10 \text{ L için karıştırıcı çapı, } D_i = 7 \text{ cm} = 0,07 \text{ m}$$

$$\text{Yoğunluk (öz kütle), } \rho = 1,04 \text{ kg/L} = 1,04 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$$

$$\text{Viskozite, } \mu = 7,5 \times 10^{-3} \text{ kg/m.s} = \text{kg.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = \text{Pa.s}$$

$$5 \text{ L için karıştırıcı hızı, } N_i = 480 \text{ rpm} = 7,97 \text{ 1/s} \quad (85,5 \text{ rpm} = 1,42 \text{ 1/s})$$

$$5 \text{ L için çalışma hacmi, } V = 2 \text{ L}$$

$$10 \text{ L için çalışma hacmi, } V = 8 \text{ L}$$

$$\text{Güç birimi, } P = \text{kg.m}^2/\text{s}^3$$

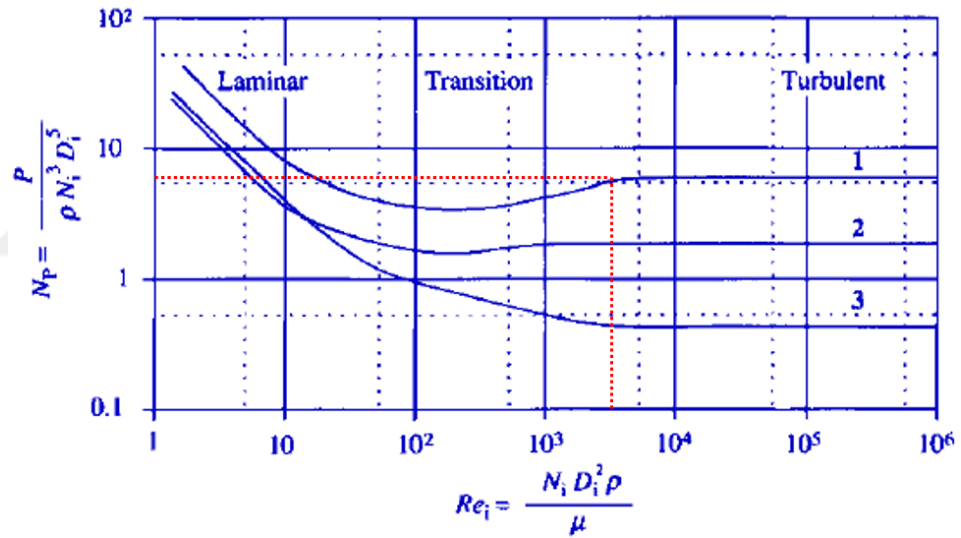
5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktör için Reynolds hesabı aşağıda verilmiştir:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu}$$

$$Re_i = \frac{(7,97) \cdot (0,06)^2 \cdot (1,04) \cdot 10^3}{(7,5) \cdot 10^{-3}}$$

$$Re_i = (3,978) \cdot 10^3$$

Hesaplanan Reynolds sayısına göre grafik üzerinde üzerinden güç sayısı (N_p) bulunmuştur (Şekil 4.10). Grafikte bulunan 1 numaralı eğri Rushton türbin karıştırıcılar içindir. Bulunan Reynolds değeri 1 numaralı eğri ile birleştirilmiş ve kesişme noktaları y eksenine çekilmiştir. Y ekseninden güç sayısı cetvel yardımıyla hesaplanmıştır. Grafiğe göre hesaplanan güç sayısı (N_p) 7,5'tur.



Şekil 4.10. 5 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.

Bulunan güç sayısı Denklem10'da yerine konmuştur. Denklemden güç tüketimi (P) çekilmiş ve hesaplanmıştır.

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5}$$

$$7,5 = \frac{P}{(1,04) \cdot 10^3 \cdot (7,97)^3 \cdot (0,06)^5}$$

$$P = 3,0706 \text{ kg.m}^2/\text{s}^3$$

Hacim başına güç tüketimi formülü ile 5 litrelik tank reaktörü için bulunan güç tüketimi, 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöre uyarlanmıştır. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörü için güç hesabı aşağıda verilmiştir:

$$\left(\frac{P_1}{V_1}\right) = \left(\frac{P_2}{V_2}\right)$$

$$\frac{3,0706}{2 \text{ L}} = \frac{P}{8 \text{ L}}$$

$$P = 12,282 \text{ kg.m}^2/\text{s}^2$$

Bulunan güç sayısı, güç sayısı formülünde yerine konmuştur. 10 litrelik tank biyoreaktöre gerekli karıştırıcı hızını hesaplamak için N_i denklemin karşı tarafına atılmış ve hesaplanmıştır.

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5}$$

$$7,5 = \frac{12,282}{(1,04) \cdot 10^3 \cdot (N_i)^3 \cdot (0,07)^5}$$

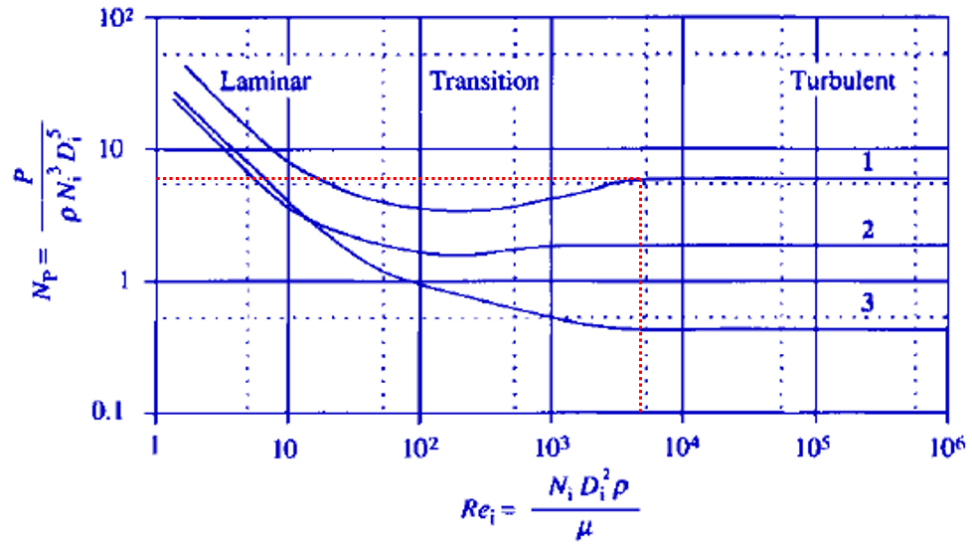
$$N_i = 9,781 \text{ 1/s} = \mathbf{589 \text{ rpm}}$$

10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktör için karıştırma hızı 589 rpm olarak hesaplanmıştır. Bu hesabın doğruluğu için karıştırma hızının, Reynolds sayısı hesabına göre, güç tüketimini değiştirmemesi istenmiştir. Hesabın sağlaması için yeni karıştırma hızıyla Reynolds sayısı hesaplanmış ve grafikte güç sayısı bulunmuştur (Şekil 4.11).

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu}$$

$$Re_i = \frac{(9,781) \cdot (0,07)^2 \cdot (1,04) \cdot 10^3}{(7,5) \cdot 10^{-3}}$$

$$Re_i = (6,65) \cdot 10^3$$



Şekil 4.11. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.

Yeni Reynolds sayısı da türbülanslı akış rejimi içinde bulunmuştur. Güç sayısı 7,5 değerinde sabit kalmıştır.

4.3.2.1. Güç Sayısına Göre Deneme Üretimi

10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktöründe ortam olarak MRS Broth kullanılmıştır. 1 ml/L köpük kırıcı sterilizasyon öncesinde ortama eklenmiştir. Karıştırma hızı 589 rpm olarak belirlenmiştir. Kalan parametreler optimizasyon üretimiyle aynı bırakılmıştır (havalandırma:0 vvm, aşı oranı: %3, süre:18 saat). Ölçek büyütme deneyi sonuçları Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörde, güç sayısına göre ölçek büyütme sonuçları.

Karıştırma (rpm)	Havalandırma (vvm)	Aşı oranı (%)	Süre (saat)	Response-1 OD ₆₀₀	Response-2 Biyokütle (g/L)	Response-3 Toplam canlı sayımı (kob/ml)
589	0	3	8	5,54	2,9	6,2E+10
589	0	3	18	8,735	4	1,7E+12

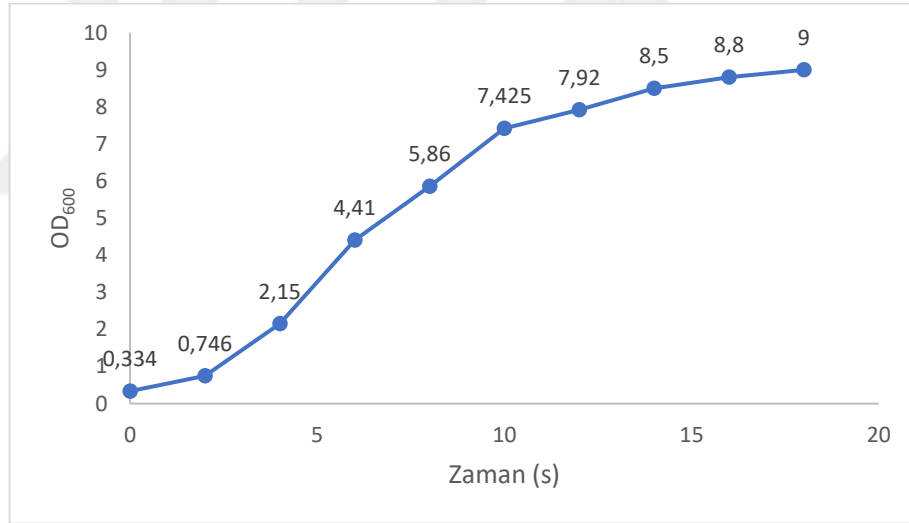
Güç sayısına göre yapılan üretim geometrik orana göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Optik yoğunluk 8’den 8,735’e çıkmıştır. Biyokütle tayin sonucu 3,7 g/L yerine 4 g/L olarak gözlemlenmiştir. Toplam canlı sayım sonuçları 4,8*10¹¹ kob/ml’den 1,7*10¹² kob/ml’ye yükselmiştir.

4.3.3. Ölçek Büyütme Üretimi

Sonuçlar karşılaştırıldıktan sonra güç sayısına göre yapılan ölçek büyütme çalışmalarının sonuçlarının geometrik orana kıyasla daha yüksek çıktığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle ölçek büyütme basamakları güç sayısı hesabına göre yapılmıştır.

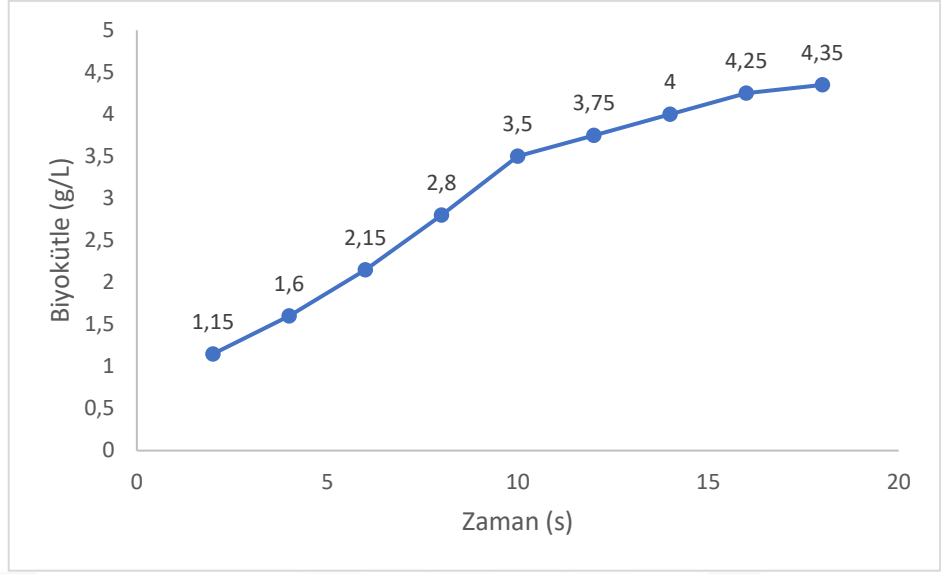
10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde 8 litre hacimle çalışılmış ve MRS Broth ortamı kullanılmıştır. Yapılan üretim sırasında karıştırma hızı 589 rpm, aşı oranı %3 ve üretim süresi 18 saat olarak belirlenmiştir.

Her 2 saatte üretimden alınan örneklerin optik yoğunluk analiz sonuçları Şekil 4.12’de gösterilmiştir. En yüksek değer 18. saate 9 olarak belirlenmiştir. 16. saatten itibaren artışın büyük ölçüde azaldığı ve mikroorganizmanın sabit faza geçmek üzere olduğu görülmektedir.



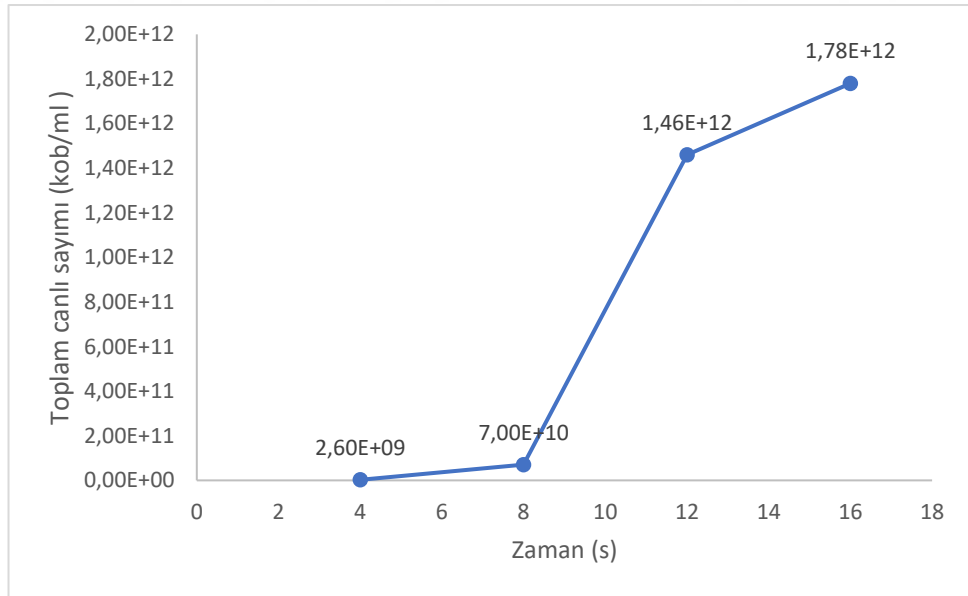
Şekil 4.12. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe optik yoğunluk- zaman grafiği.

Analiz sonuçları incelendiğinde, üretimin en yüksek biyokütleyle 18. saatte ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.13). Maksimum değer 4,35 g/L’dir. Biyokütle ve optik yoğunluk benzer bir grafik çizmiştir. Bu istenen bir durumdur. Artan mikroorganizma miktarı hem optik yoğunluğu hem de biyokütleyi lineer bir şekilde etkilemelidir.



Şekil 4.13. 10 litrelik karıştırırmalı tank biyoreaktöründe biyokütle- zaman grafiği.

Biyokütle ve optik yoğunluk tayinleri üretimdeki mikroorganizma miktarını gösterse bile, canlılığı hakkında ipucu vermez. Bunun için 4 saatte bir toplam canlı sayımı yapılmıştır. Sonuçlarda en yüksek değer 16.saatte $1,78 \cdot 10^{12}$ kob/ml olmuştur. Şekil 4.14'te toplam canlı sayımı grafiği görülmektedir.



Şekil 4.14. 10 litrelik karıştırırmalı tank biyoreaktörde toplam canlı- zaman grafiği.

4.3.4. Pilot Ölçek Üretimi

Pilot ölçekli üretim için 100 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü kullanılmıştır. Ölçek büyütme için 10 litrelik karıştırılmalı tank reaktörüne yapılan hesaplamalar, 100 litrelik karıştırılmalı tank reaktörüne uyarlanmıştır. Aynı basamaklar izlenmiştir. Hacim başına güç tüketimi formülü ile 100 litrelik karıştırılmalı tank reaktörü için güç hesabı yapılmıştır. Bulunan güç değeri, güç sayısı formülünde yerine konduktan sonra karıştırma hızı hesaplanmıştır. Karıştırma hızının uygunluğunu teyit etmek için yeni bir Reynolds sayısı hesaplanmıştır. Bulunan Reynolds sayısı grafikte yerine konmuş ve güç sayısı bulunmuştur (Şekil 4.15). Güç sayısının, 7.5 değeri sabit kalmıştır. Karıştırma hızı uygun bulunmuştur.

$$100 \text{ L için karıştırıcı çapı, } D_i = 15 \text{ cm} = 0,15 \text{ m}$$

$$100 \text{ L için çalışma hacmi, } V = 35 \text{ L}$$

$$\left(\frac{P_1}{V_1}\right) = \left(\frac{P_2}{V_2}\right)$$

$$\left(\frac{3,0706}{2L}\right) = \left(\frac{P}{35L}\right)$$

$$P=53,7355 \text{ kg.m}^2/\text{s}^3$$

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5}$$

$$7,5 = \frac{53,7355}{(1,04) \cdot 10^3 \cdot (N_i)^3 \cdot (0,15)^5}$$

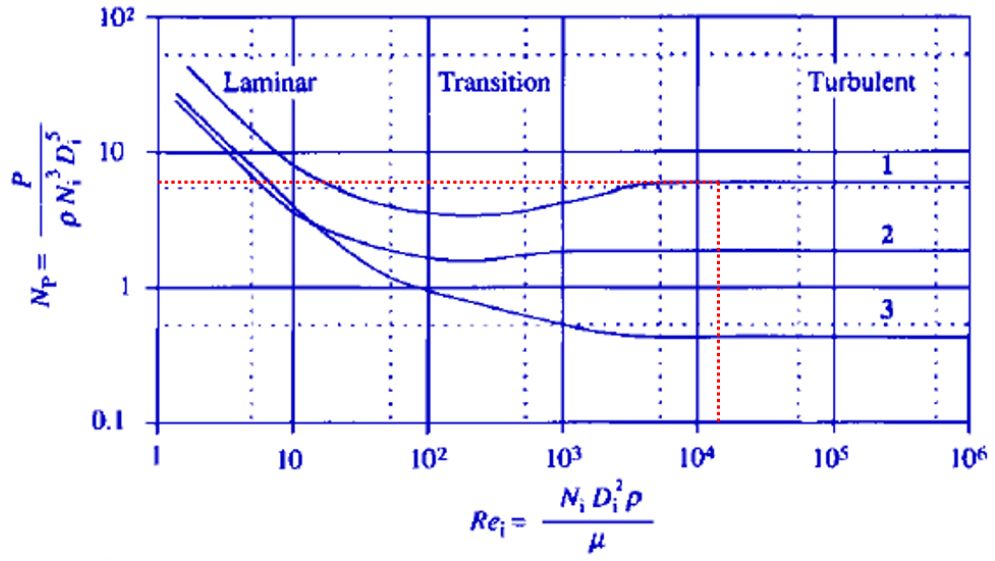
$$N_i = 4,4933 \text{ 1/s} = \mathbf{270 \text{ rpm}}$$

Sağlama:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu}$$

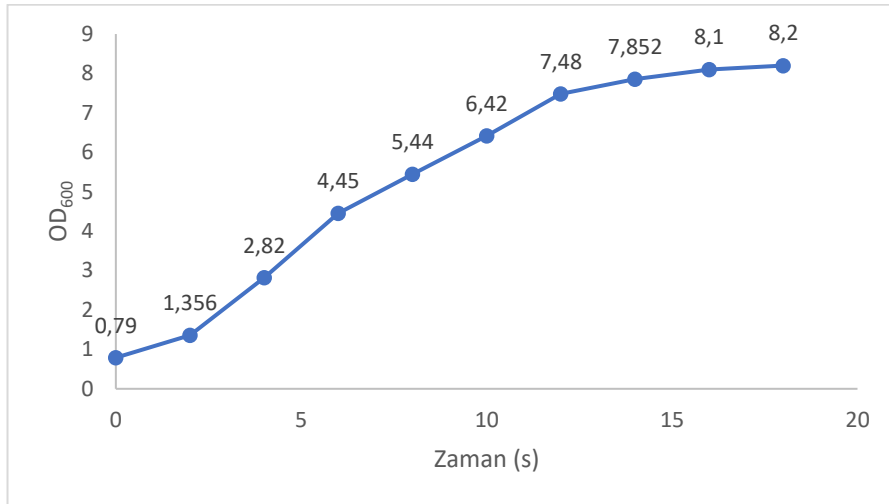
$$Re_i = \frac{(4,4933) \cdot (0,15)^2 \cdot (1,04) \cdot 10^3}{(7,5) \cdot 10^{-3}}$$

$$Re_i = (1,4) \cdot 10^4$$



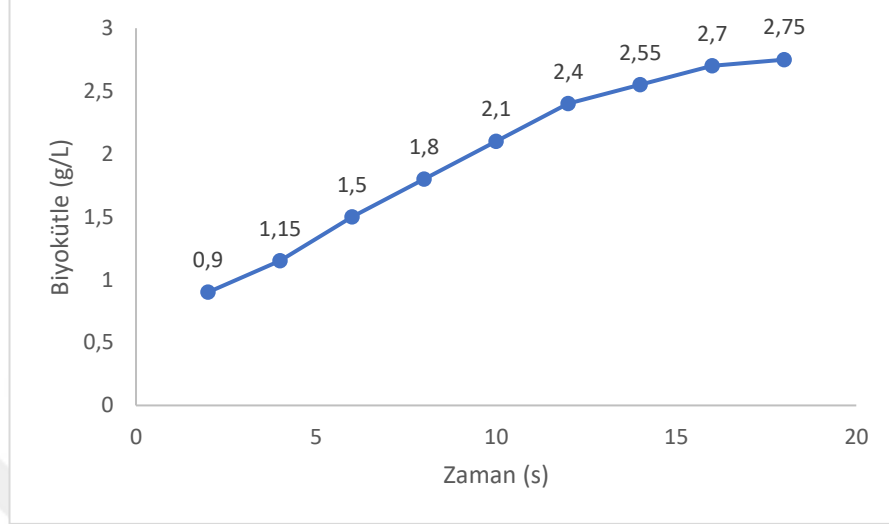
Şekil 4.15. 100 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörü için güç sayısı hesaplama.

Üretim hacmi 35 litre olarak belirlenmiştir. Üretim ortamı olarak MRS Broth, 1 ml/L köpük kırıcıyla karıştırılarak kullanılmıştır. Karıştırma hızı 270 rpm olarak seçilmiştir ve hava beslemesi yoktur. Aşı oranı %3 ve üretim süresi 18 saat olarak belirlenmiştir. Üretimden 2 saatte bir alınan örneklerle biyokütle ve optik yoğunluk tayinleri yapılmıştır. 4 saatte bir toplam canlı sayımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örneklerin optik yoğunluğuna bakıldığında en yüksek sonuç 18.saattedir (Şekil 4.16). Maksimum optik yoğunluk 8,2'dir.



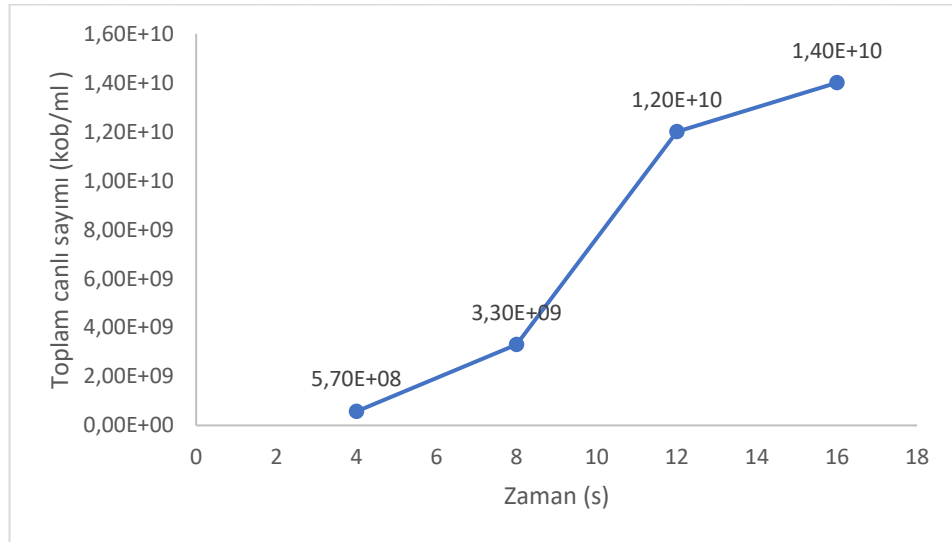
Şekil 4.16. Pilot ölçekli karıştırmalı tank biyoreaktörde optik yoğunluk- zaman grafiği.

Biyokütle sonuçları optik yoğunluk grafiğiyle lineer çıkmıştır. Özellikle 16.saatten sonra artış iyice yavaşlamıştır. En yüksek biyokütle değeri 18.saate 2,75 g/L'dir.



Şekil 4.17. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde biyokütle- zaman grafiği.

Toplam canlı sayımı en yüksek 18.saate görülmüştür. Üretimin 18.saatinde sayılan canlı sayısı $1,40 \cdot 10^{10}$ kob/ml olmuştur.



Şekil 4.18. Pilot ölçekli karıştırılmalı tank biyoreaktörde toplam canlı sayımı- zaman grafiği.

Her 4 saatte bir yapılan toplam canlı sayımı sonuçları tatmin edicidir. Özellikle endüstriyel probiyotik üretimlerinde canlılığın 10^9 kob/ml'nin altında kalmaması istenmektedir.

4.4. Hava Beslemeli Üretimler

Optimizasyon çalışmalarında, Design Expert 7.0 analiz sonuçları, yalnızca karıştırma veya yalnızca havalandırma kullanıldığında biyokütlenin maksimize olduğunu göstermiştir.

Havalandırmanın biyokütle üretimi üzerindeki olumlu etkisi diğer araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir. Fu ve Mathews(1999), anaerobiyozdaki hücre verimlerinin, aerobik yetiştirme altında elde edilenlerin yaklaşık %80'i olduğunu göstermiştir. Stevens ve ark. (2008), anaerobik kültürlerle karşılaştırıldığında aerobiyozda yaklaşık %25 daha yüksek hücre yoğunlukları elde etmişlerdir.

L. plantarum'un aerobik büyüme koşullarına ve karşılık gelen oksidatif streslere tepkileri, çeşitli endüstriyel işleme koşulları için önemlidir. Ayrıca, *Lactococcus lactis* dahil olmak üzere birçok laktik asit bakterisi için aerobik büyüme sırasında solunum yapma ve biyokütle verimini artırma potansiyeli gösterilmiştir (Brooijmans vd., 2007).

L. plantarum fakültatif bir bakteridir ve oksijeni hücre büyümesi ve ürün metabolizması için elektron alıcısı olarak kullanabilir. Havalandırma hızının biyokütle üretimi üzerindeki olumlu etkisi, aerobik ve anaerobik koşullar altında metabolik yollardaki farklılıklara bağlanabilir; özellikle, ilave adenosin trifosfat (ATP) üretimi, oksijen varlığında hücre büyümesine fayda sağlar (Brinques vd., 2009).

Karıştırmalı üretimler için yapılan ölçek büyütmenin ardından sadece havalandırmanın kullanıldığı üretimler de incelenmiştir.

4.4.1. Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Hava Beslemeli Deneme Üretimi

Çalışma için 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörü kullanılmıştır. 8 litre çalışma hacmi sabit tutulmuş ve ortam olarak MRS Broth kullanılmıştır. Ortama 1 ml/L köpük kırıcı eklenmiştir. Sterilize edilen ortama hava simidinden 1 vvm steril hava beslenmiştir. *L. plantarum* BG24 suşu, fakültatif anaerobiktir. Havalandırma, karıştırma etkisi için kullanılmıştır.

Mekanik karıştırma kullanılmamıştır. Ortamın başlangıç pH'ı 6,5'a ayarlanmıştır. Üretim sıcaklığı 37°C'dir. Aşı oranı %3 tür. Üretim süresi 18 saat olarak belirlenmiştir.

Üretim sırasında hava beslemesi, ortamın köpürme eğilimini arttırmıştır. Başlangıç miktarına ek olarak steril köpük kırıcı ortama konmuştur.

Tayin sonuçları Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Hava beslemeli üretiminde elde edilen bütün sonuçlar, güç sayısına göre yapılan deneme üretiminin altında kalmıştır. Optik yoğunluk; 8,735'ten 7,8'e, biyokütle; 4 g/L'den 3,4 g/L'ye ve toplam canlı sayımı; $1,7 \cdot 10^{12}$ kob/ml'den $5,4 \cdot 10^{11}$ kob/ml'ye düşmüştür.

Tablo 4.8. 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktörde, güç sayısına göre ölçek büyütme sonuçları.

Karıştırma (rpm)	Havalandırma (vvm)	Aşı oranı (%)	Süre (saat)	Response-1 OD ₆₀₀	Response-2 Biyokütle (g/L)	Response-3 Toplam canlı sayımı (kob/ml)
0	1	3	18	7,8	3,4	5,4E+11

İncelenen çalışmalara göre biyokütle daha düşük, toplam canlı sayısı daha yüksek bulunmuştur. Brinques ve ark.(2009), yüksek havalandırma (4,5 vvm), düşük pH (5.2), düşük sıcaklık (31°C) ve yüksek laktoz (140 g/L) kullanarak 14 g/L biyokütle bulmuşlardır. Laktoz, pepton konsantrasyonu ve havalandırma hızının biyokütle üretimi üzerinde olumlu etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde Fu ve Mathews(1999) MRS ortamına dayalı olarak modifiye edilmiş sentetik bir laktoz ortamında (40 g/L laktoz, pH:6) ve 0.5 ila 1 vvm arasında değişen hava akış hızlarında 12 g/L biyokütleyle ulaşmışlardır. Çalışmaların benzer ortamlara sahip oldukları göz

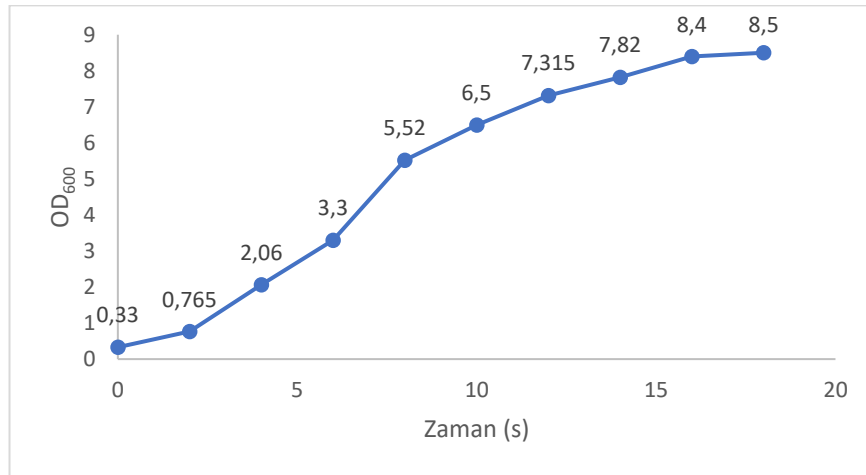
önüne alınarak, havalandırma hızının yetersiz olduğu ve daha yüksek havalandırmanın biyokütle üzerinde pozitif etki sağladığı düşünülebilir.

Çalışmada bulunan toplam canlı sayısı, Yoon ve ark.(2006) buldukları sonuçlardan daha yüksektir. Yoon vd. üç laktik asit bakterisini (*L. casei*, *L. plantarum* ve *L. delbrueckii*) laktik asit üretimi için incelemiştir. Çalışmalarında, 48 saatlik fermentasyondan sonra canlı hücre sayıları yaklaşık 10×10^8 kob/mL'ye ulaşmıştır. Yüksek üretim saatleri kullanmak canlılığın azalmasına ve mikroorganizmanın ölüm fazına gitmesine neden olmuştur.

4.4.2. Hava Kaldırmalı Biyoreaktör Üretimi

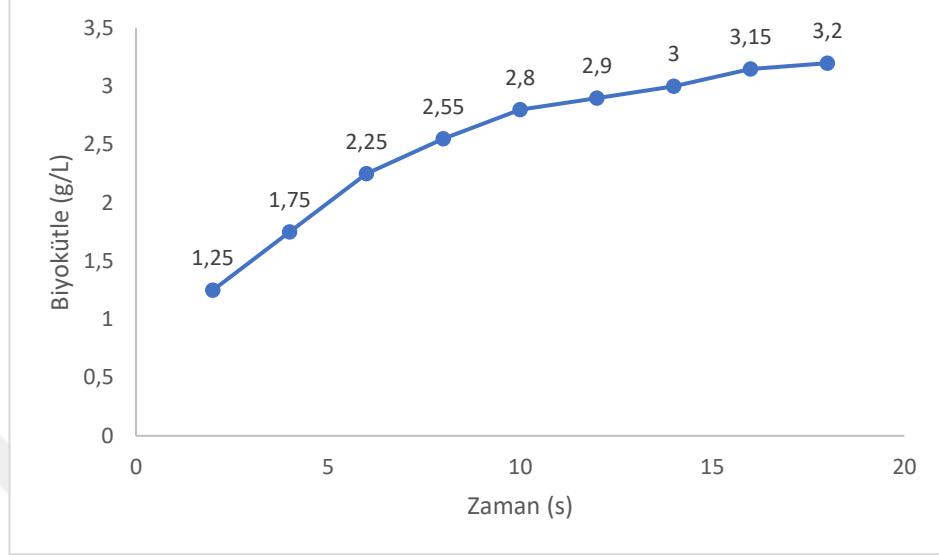
Yapılan çalışmada, 1,1 litre çalışma hacmine sahip hava kaldırmalı biyoreaktör kullanılmıştır. Üretimde ortamı MRS Broth hazırlanmış ve 1 ml/L köpük kırıcı eklenmiştir. Ortam sıcaklığı 37°C'ye sabitlenmiştir. Hava kompresörü ile 1 vvm hava biyoreaktöre verilmiştir. Aşı oranı %3 ve üretim süresi 18 saattir. Her 2 saat, üretimden örnekler alınmıştır.

Optik yoğunluk analizi, 2 saatte bir yapılmıştır. Şekil 4.20'de bulunan sonuçlara bakıldığında en yüksek değer 18.saatte 8,5 olarak gözlemlenmiştir. Optik yoğunluk sonucu, güç sayısına göre yapılan 10 litrelik karıştırılmalı tank biyoreaktör üretiminin (Şekil 4.13) ve optimizasyona göre 5 litrelik tank biyoreaktörde gerçekleştirilen kontrol deneyinin (Tablo 4.4) altında kalmıştır.



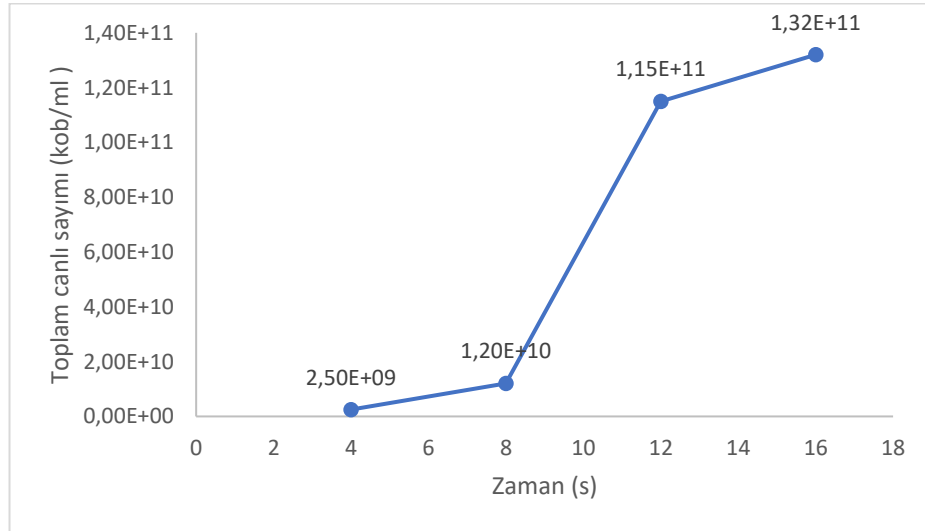
Şekil 4.19. Hava kaldırmalı biyoreaktörde optik yoğunluk- zaman grafiği.

Biyokütle tayini her 2 saatte yapılmıştır. En yüksek değer 18.saatte bulunmuştur (3,2 g/L). Bu sonuç mekanik karıştırmaya sahip gerçekleştirilen üretimlerden daha düşüktür.



Şekil 4.20. Hava kaldırmalı biyoreaktörde biyokütle- zaman grafiği.

Toplam canlı sayımı 4 saatte bir yapılmıştır. Bulunan en yüksek değer 18.saatte alınan örnektedir. Bu üretim için maksimum değer $1,32 \cdot 10^{11}$ kob/ml'dir.



Şekil 4.21. Hava kaldırmalı biyoreaktörde toplam canlı- zaman grafiği.

Hava kaldırmalı biyoreaktör üretiminin optik yoğunluk ve biyokütle sonuç grafiklerine bakıldığında diğer üretilere kıyasla 2. ve 4. saat analizlerinin grafik eğrisinde daha düşük kaldığı görülmektedir. En küçük ölçeğe sahip biyoreaktörün

analiz sonuçlarının 10 litrelik karıřtırılmalđ tank biyoreaktöründen düşük olmasının en büyük nedenlerinden biri ölü bölgelerde bakterinin birikmesidir. Bakterilerin ölü bölgeye toplanması, özellikle üretimin ilk 4 saatinde örneklerde biyokütle kaybına neden olmuştur. Kayba uğrayan bakterilerden dolayı üreme azalmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez kapsamında probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* BG24 suşundan derin kültür fermantasyonunda biyokütle üretimi yapılmıştır. Karıştırmalı tank biyoreaktöründe optimizasyon üretimleri yapıldıktan sonra ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aşı kültürü ve üretim ortamı olarak Man Rogosa, Sharp (MRS) Broth kullanılmıştır.

Çalışma esnasında 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen optimizasyon denemelerinde havalandırma, karıştırma hızı, aşı miktarı ve zaman parametreleri ele alınmıştır. Design Expert programında incelenen 3D model grafikleri neticesinde biyokütle miktarının; statik, yalnızca maksimum karıştırmanın olduğu veya yalnızca maksimum havalandırmanın olduğu üretimlerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aşı miktarının üretim üzerinde etkisi oldukça düşük olduğu görülmüştür. Deneme üretiminde yapılan toplam canlı sayımı tayini ise canlılığın 18.saatten sonra düştüğünü göstermiştir. Bu nedenle, programın sunduğu kontrol deneyleri arasında, 479 rpm karıştırma hızına, %3 aşı oranına ve 18 saat üretim süresine sahip olan deney seçilmiştir. 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe yapılan kontrol deneyi başarılı olmuştur ve optik yoğunluk 9,6; biyokütle 3,84 g/L; toplam canlı sayımı $7,6 \cdot 10^{11}$ kob/ml bulunmuştur. Biyokütle üretiminin verimliliği 0,214 bulunmuştur. Krishnan ve diğerleri (Krishnan vd., 1998) 0,104 ve Fu ve Mathews(Fu ve Mathews, 1999) 0,25 maksimum verimlilik elde etmişlerdir. Fu ve Mathews'in yaptığı çalışmada yüksek biyokütle farkı varmış gibi görünmesine rağmen saatlik biyokütle üretimi yakındır. Oluşan fark üretim süresinin uzunluğundan ve ortama eklenen yüksek oranlı laktozdan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda uzun üretim süresi kullanmaları toplam canlı sayısının düşmesine ve bakterilerin ölmesine neden olmuştur.

Ölçek büyütme çalışmaları için 2 yöntem seçilmiştir. İlk yöntemde karıştırıcıların geometrik oranı üzerinden karıştırma oranı hesaplanmıştır. Güç sayısı hesabı için optimizasyon üretiminde örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde yoğunluk ve viskozite değeri elde edilmiştir. İkinci yöntemde Reynolds sayısı hesaplanmış ve güç sayısı üzerinden hacim başına güç tüketimi bulunmuştur. Bu hesaplamalar ölçek büyütme için gerekli olan karıştırma hızını vermiştir. Yapılan her hesaplamanın Reynolds sayısı (Re_i)-Güç sayısı (N_p) grafiğinden sağlaması yapılmıştır. Geometrik

orana göre yapılan ölçek büyütme çalışmasında 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründen 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörüne geçiş sağlanmıştır. 10 litrelik biyoreaktör için hesaplanan karıştırma hızı 410 rpm'dir. Geometrik oranla gerçekleştirilen ölçek büyütme üretiminde optik yoğunluk 8; biyokütle 3,7 g/L; toplam canlı sayımı $4,8 \cdot 10^{11}$ kob/ml bulunmuştur. Güç sayısına göre belirlenen 589 rpm karıştırma hızı ile 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe deneme üretimi yapılmıştır. Bu üretimde 18.saatte optik yoğunluk 8,735; biyokütle 4 g/L; toplam canlı sayısı $1,7 \cdot 10^{12}$ kob/ml'dir. Bu sonuçlar üzerinden yapılan kıyaslama sonucunda ölçek büyütme için güç sayısı kullanılmıştır. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde güç sayısına göre, 589 rpm karıştırma hızında, saatlik üretim yapılmıştır. Optik yoğunluk, biyokütle ve toplam canlı sayımı tayin sonuçları grafik haline getirilmiştir. Bu grafikler, 5 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöründe gerçekleşen optimizasyon üretimi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu üretimde 18.saatte optik yoğunluk 9; biyokütle 4,35 g/L; toplam canlı sayısı $1,78 \cdot 10^{12}$ kob/ml'dir. Ölçek büyütmenin ısı ve karıştırma üzerindeki olumsuz etkisine rağmen sonuçlarda düşüş yaşanmamış ve grafikler aynı görüntüde ilerlemiştir. Fu ve Mathews(Fu ve Mathews, 1999) 0,25 maksimum verimlilikle incelenen çalışmalarda en yüksek değere sahiptir. Yapılan üretimde verimlilik 0,242 bulunmuştur. Fu ve Mathews'ın yaptığı çalışmada yüksek biyokütle farkı varmış gibi görünmesine rağmen saatlik biyokütle üretimi yakındır. Oluşan fark üretim süresinin uzunluğundan ve ortama eklenen yüksek oranlı laktozdan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda uzun üretim süresi kullanmaları toplam canlı sayısının düşmesine neden olmuştur.

Karıştırmalı tank reaktöründe pilot ölçekte gerçekleştirilen üretimde, karıştırma hızı 270 rpm olarak seçilmiştir ve hava beslemesi yoktur. Aşı oranı %3 ve üretim süresi 18 saat olarak belirlenmiştir. Üretimin 18. saatinde optik yoğunluk 8,2; biyokütle 2,75 g/L ve toplam canlı sayısı $1,40 \cdot 10^{10}$ kob/ml'dir. Optik yoğunluk ve biyokütle miktarında düşüş yaşanmasına rağmen canlılık istenilen değerin üstünde kalmıştır. Farklı boyutlardaki biyoreaktörlerin tasarımı benzer olsa bile, bir ölçekten diğerine aynı işlem performansı beklenemez. Ölçek büyüdükçe üretimin ısı transferi ve karışması zorlaşır. Risk toleransı azalır ve proses kontrol yanıt süresi artar. Büyük ölçekli biyoreaktörlerde, yetersiz karıştırma ve kütle transferi sınırlamaları nedeniyle çeşitli gradyanlar meydana gelebilir. Büyüme ve üretkenlik, laboratuvar ölçekli

biyoreaktörlere kıyasla daha düşük hücre ve ürün verimi ile sonuçlanabilecek şekilde etkilenebilir.

Tez kapsamında incelenen optimizasyon deneylerinin model grafiklerinde yalnızca yüksek havalandırmaya sahip üretimlerin biyokütle miktarının yüksek çıkmasından dolayı hava beslemeli üretimler denenmiştir. 10 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktöre 1 vvm hava verilmiştir. Üretimin 18.saatinde optik yoğunluk 7,8; biyokütle 3,4 g/L; toplam canlı $5,4 \cdot 10^{11}$ kob/ml bulunmuştur. Karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen hava beslemeli üretimin sonuçları mekanik karıştırmalı üretim sonuçlarının oldukça altında kalmıştır. Bir diğer yöntem olarak hava kaldırmalı biyoreaktörde 1 vvm hava beslemesi ile deneme üretimi yapılmıştır. Üretimin 18. saatinde optik yoğunluğun 8,5; biyokütlenin 3,2 g/L; toplam canlı sayısının $1,32 \cdot 10^{11}$ kob/ml olduğu gözlemlenmiştir. Hava kaldırmalı biyoreaktör en küçük ölçeğe sahip olmasına rağmen bulunan değerler karıştırmalı tank biyoreaktörlerden daha düşük çıkmıştır. Bunun en büyük sebeplerinden biri hava kaldırmalı biyoreaktörde bulunan ölü bölgelere bakterilerin birikmesi ve üretim veriminin düşmesidir. Bir diğer sebepse hava beslemesinin karıştırma için yeterince dinamik bir ortam sağlamaması olabilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- A. Cheikhoussef, N. Pogori, W. Chen, and H. Zhang.** (2008). “Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, no. 3, pp. 215–222.
- A.R. Moreira and K.K. Wallace.** (1996). Strategies For Bioreactor Scale-Up. Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering, *Kluwer Academic Publishers*, 125-142.
- Abbott M. S R, Harvey A. P, Perez G. V, Theodorou M. K.** (2013). Biological processing in oscillatory baffled reactors: operation, advantages and potential, Bioprocessing. *Biopharmaceutical Technology Centre*, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK; The Centre for Process Innovation, Redcar, UK.
- Abraham, E., Gupta, S., Jung, S., & McAfee, E.** (2017). Bioreactor for Scale-Up: Process Control. *Mesenchymal Stromal Cells*, 139–178.
- Andersson, H., Asp, N.-G., Bruce, A., Roos, A., Wadström, T., Wold, A.E.** (2001). Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Nutrition* 45, 58–75.
- Bağdathı, A., Kundakçı, A.** (2013). “Fermente et ürünlerinde probiyotik mikroorganizmaların kullanımı- Using Probiotic Microorganisms in Fermented Meat Products”. *C. B. Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 9(1): 31-37.
- Baltz RH, Demain AL, Davies JE.** (2010). Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*.
- Bates RL, Fondy PL, Corpstein RR.** (1963). Examination of some geometric parameters of impeller power. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*. 1963;2(4):310–4.
- Betts JI and Baganz F.** (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 43(3): 113-119.

Bonvillani, P., Ferrari, M. P., Ducrós, E. M., & Orejas, J. A. (2006). Theoretical and experimental study of the effects of scale-up on mixing time for a stirred-tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 1–7.

Botes, M., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 362–370.

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

Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z. (2009). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(2), 205–212.

Brooijmans, R. J. W., Poolman, B., Schuurman-Wolters, G. K., de Vos, W. M., & Hugenholtz, J. (2007). Generation of a Membrane Potential by *Lactococcus lactis* through Aerobic Electron Transport. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5203–5209.

De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018–1028.

Di Cerbo, A.; Palmieri, B. (2015). The market of probiotics. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2015, 28, 2199–2206.

Enes Kadic and Theodore J. Heindel. (2014). *An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer*, First Edition.

FAO/WHO. (2003). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Vol. 85., Rome-Italy.

Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. (2019). The Production and Delivery of Probiotics: *A Review of a Practical Approach. Microorganisms*, 7(3), 83.

Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163–170.

Fuller R. (1989). A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365–78.

Gene Bruno. (2022). Five Essential Steps of the Probiotic Manufacturing Process Explained. NutraScience Labs, A Subsidiary of Twinlab Consolidation Corporation (TCC), NY, USA. Last updated: March-24,2022.

Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., & Danova, S. (2009). “Growth Parameters of Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum*, Isolated from Traditional White Cheese”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 861–865.

Gibson, G.R. (2004). From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *J.of Food Science*, 69 (5), 2004, 141 - 143.

H.H. Wang, M. Krsticd And G. Bastin. (1999). Optimizing Bioreactors By Extremum Seeking. *Int. J. Adapt Control Signal Process.* 13, 651-669.

He, C., Ye, P., Wang, H., Liu, X., & Li, F. (2018). A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up. *Biochemical Engineering Journal*.

Heeseop Y., Insoo R., Sungsue R., and Sejong O. (2018). Optimizing Medium Components for the Maximum Growth of *Lactobacillus plantarum* JNU 2116 Using Response Surface Methodology. *Korean J. Food Sci. An.* 2018 April 38(2):240~250.

Holland, D.F. (1920). The families and genera of bacteria. *J. Bacteriol.* 1920, 5, 191.

Inderjeet Kaur and Arun Dev Sharma. (2021). “Bioreactor: Design, Functions and Fermentation innovations”. *Research & Reviews in Biotechnology & Biosciences*, Volume: 8, Issue: 2, 2021, 116-125.

Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. (2008). Scale-up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched kLa. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(5):1128–39.

J. A. Muller, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, C. Stanton. (2009). “Manufacture of Probiotic Bacteria”. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, pp 725-759.

Jagriti S., Nirmala K. & Soumitra B. (2014). “Bioreactors – Technology & Design Analysis”. *The Scitech Journal*, Vol. 01, Issue 06, June 2014.

Ju, L.K., & Chase, G.G. (1992). Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 8(1-2), 49–53.

Karahan, Z. C., Güvener, E. (1999). “Probiyotikler”, *Flora*, 4(3):156-162.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7.

King, S., Glanville, J., Sanders, M. E., Fitzgerald, A., & Varley, D. (2014). “Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis”, *British Journal of Nutrition*, 112(01), 41–54.

Konstantinos Flevaris, Nikiforos Misailidis, Rafael da Gama, and Demetri Petrides. (2021). Modeling and Evaluation with SuperPro Designer®. *Production of Probiotics*, INTELLIGEN, INC.

Krishnan, S., Prapulla, S. G., Rajalakshmi, D., Misra, M. C., & Karanth, N. G. (1998). Screening and selection of media components for lactic acid production using Plackett–Burman design. *Bioprocess Engineering*, 19(1), 61–65.

Lane, G. and Koh, P.T.L. (1997). "CFD Simulation of a Rushton Turbine in a Baffled Tank", Proc. Int. Conf. on Computational Fluid Dynamics in Mineral & Metal Processing and Power Generation, CSIRO, Melbourne, 3-4 July 1997, pp. 377-385.

Lode J. A. Nollet, Dora I. Pereira. (1999). Effect of a Probiotic Bile Salt Hydrolytic *Lactobacillus reuteri* on the Human Gastrointestinal Microbiota as Simulated in the SHIME Reactor System. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), 13–21.

M. Bermudez-Brito, J. Plaza-Díaz, S. Muñoz-Quezada, C. Gómez-Llorente, and A. Gil. (2012). "Probiotic mechanisms of action," *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 61, no. 2, pp. 160–174.

Mahdinia, E., Cekmecelioglu, D., and Demirci, A. (2019). Bioreactor Scale-Up. A. Berenjian (ed.), Essentials in Fermentation Technology, *Learning Materials in Biosciences*.

Mares, A., Neyts, K., Debevere, J. (1994). Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 24, 191–198.

Mashhadani M., Wilkinson S.J., Zimmerman W.B. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes, *Chemical Engineering Science* 137(243-253).

Mendoza Martinez, A. M., & Escamilla Silv, E. M. (2013). Airlift Bioreactors: Hydrodynamics and Rheology Application to Secondary Metabolites Production. Mass Transfer- Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling.

Mengi, B., Ikeda, S., Murayama, D., Bochimoto, H., Matsumoto, S., Kitazawa, H., ... Fukuda, K. (2020). Factors affecting decreasing viscosity of the culture medium during the stationary growth phase of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(3), 160–168.

Mitko Petrov, Tatjana Ilkova, Stoyan Tzonkov, Uldis Viesturs. (2004). Modelling, Optimization and Optimal Control of Small Scale Stirred Tank Bioreactors. *Bioautomation*, 2004, vol. 1, pp. 67-82.

Modak, J. M., & Lim, H. C. (1992). Optimal mode of operation of bioreactor for fermentation processes. *Chemical Engineering Science*, 47(15-16), 3869–3884.

Najafpour GD. (2007). Biochemical engineering and biotechnology. Amsterdam: Elsevier.

Nanda S. (2008). Reactors and Fundamentals of Reactors Design for Chemical Reaction.

Noori F., Tajabadi E. M. & Jafari P. (2016). Growth Optimization Of *Lactobacillus Plantarum* T5jq301796.1, An Iranian Indigenous Probiotic In Lab Scale Fermenter. *Applied Food Biotechnology*. 2016, Volume 3, Number 3; Page(s) 188-193.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria; Host: *Copenhagen*, 1919.

Pederson, C.S. (1957). Genus I. *Lactobacillus* Bejerinck. In Bergey's Manual of determinative Bacteriology,. 7th ed.; Breed, R.S.; Murray, E.G.D.; Smith N.R.; Eds.; Williams and Wilkins Co.: Baltimore, MD, 1957; 542.

Randazzo, C.L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G., Caggia, C. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Sci Technol Campinas*, 33(4): 652-659.

Razmjooei, M., Shad, E., Nejadmansouri, M., Safdarianghomsheh, R., Delvigne, F., & Khalesi, M. (2020). “Effect of metal support and different carbon sources on CLA production using *Lactobacillus plantarum*”, *Biochemical Engineering Journal*, 107715.

Remzi Cholakov, V. Yanakieva, Z. Denkova, E. Sotirova. (2014). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* BG24, isolated from naturally fermented cereal beverage.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). “Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties”, *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215.

Sanjogta Thapa Magar. (2021). Bioreactor- Definition, Design, Principle, Parts, Types, Applications, Limitations.

Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2010). Pilot-scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. *Nutrients*, 2(3), 330–339.

Segers, M.E., Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG- host interactions. *Microb Cell Fact*, 13(1):1-7.

Silva-Santisteban Boy, Maugeri Filho F. (2005). Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzym Microb Technol.* 36(5–6):717–24.

Singh, U.P., Tyagi, P., Upreti, S. (2007). Manganese complexes as models for manganese-containing pseudocatalase enzymes: Synthesis, structural and catalytic activity studies. *Polyhedron* 2007, 26, 3625–3632.

Smita H. P., Manas R. S., Shaktimay K., Ramesh C. R. & Dider M. (2008). Statistical optimization of alpha-amylase production by probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 in submerged fermentation. *Pol J Microbiol.* 2008; 57(2): 149-55.

Stevens, M. J. A., Wiersma, A., de Vos, W. M., Kuipers, O. P., Smid, E. J., Molenaar, D., & Kleerebezem, M. (2008). Improvement of *Lactobacillus plantarum* Aerobic Growth as Directed by Comprehensive Transcriptome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4776–4778.

T. A. Oelschlaeger. (2010). “Mechanisms of probiotic actions- A review,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, no. 1, pp. 57–62.

T.R. Klaenhammer. (2001). Food Microbiology: *Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC.

Taşdemir, A. (2017). “Probiotics, Prebiotics and Synviotics”, *Kastamonu Sağlık Akademisi*, volume:2, issue: 1.

Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2010). Lactobacillus Plantarum: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*, 26(3), 205–229.

Tsuneo Yamanè, Shoichi Shimizu. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes, *Advances in Biochem Eng. /Biotechnol*, vol. 30 pp 147-194.

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

Wang SJ and Zhong JJ. (1996). A novel centrifugal impeller bioreactor. I. Fluid circulation, mixing, and liquid velocity profiles. *Biotechnology and Bioengineering* 51: 511–519.

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

Xia J, Wang G, Lin J, Wang Y, Chu J, Zhuang Y and Zhang S. (2016). Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 152:137-51.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006). “Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria”, *Bioresource Technology*, 97(12), 1427–1430.

Z. Erginkaya, E. Sarıkodal, S.T. Özkütük, G. Konuray, E. Ünal Turhan. (2019). Probiyotik Bitter Çikolata Üretiminde Mikroenkapsüle Lactobacillus Rhamnosus Kullanımı. *Gıda*, 2019, 44 (2): 238-247.

Zhong, JJ. (2011). Bioreactor Engineering. *Comprehensive Biotechnology*, 165–177.



ÖZGEÇMİŞ

İlkokul ve lise yıllarını da İzmir’de geçirdikten sonra 2014 yılında Manisa Calal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’nde lisans eğitimine başladım. Lisans eğitimimi 2019 yılında tamamladıktan sonra 2020 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladım.

