

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ
BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ PROJE

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

SECOND SPRING

PROJE ADI

**Sürdürülebilir Gelecek İçin, Yenilikçi, Çevre Dostu, Umut Verici
Bir Alternatif Protein Kaynağı: Su Yumurtaları (*Wolffia*)**

BAŞVURU ID

335669

1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI)

Bir su bitkisi olan *Wolffia* (köksüz su mercimeği), dünyanın en küçük çiçekli bitkisidir. Suda yüzen yeşil yumurtalara benzeyen *Wolffia*, Uzak Doğu'nun bazı bölgelerinde gıda olarak tüketilir. Nutrasötik olarak önemli bileşenler içeren su yumurtaları "water eggs", ne yazık ki ülkemizde tanınmamakta ve diyetlerimizde kullanılmamaktadır. Yüksek protein içeriğinden dolayı "su yumurtaları" olarak adlandırılır. Henüz piyasamızda bulunmayan köksüz su mercimeği ürünleri, dünyada nutrasötik olarak kullanılan mikroalglerden daha kolay üretilip hasat edilebilir, hiçbir atık bırakmadan ürüne dönüştürülebilir, çevre dostu ve sürdürülebilirdir. Ayrıca, vejetaryen ve veganlar için süper bir protein kaynağıdır.

Çalışmada, Yeşilirmak Deltası'ndan toplanan ve kontrollü laboratuvar koşullarında floresan ışık ve farklı dalga boylu LED ışıklandırma altında çoğaltılacak olan *Wolffia*'nın fitokimyasal bileşenleri, sekonder metabolitleri, fotosentetik pigmentleri (klorofiller ve karotenoidler) ve protein içeriğinin belirleneceği çalışmada, bitki ekstraktının in vitro antioksidan kapasitesi de çeşitli yöntemlerle analiz edilecektir. Çalışmada, *Wolffia*'nın besleyici bir gıda ve protein kaynağı olarak kullanılabilmesi ve ülkemiz ekonomisine katkı sunması için, bitki tabanlı beslenmede kullanılabilecek ürünler hazırlanması (protein tabletleri, protein tozları gibi) planlanmıştır.

Hedef, uygulanacak abiyotik stres faktörlerinin, *Wolffia* tarafından üretilecek yeni **sekonder metabolitleri** sayesinde modifiye, fonksiyonel besleyici ürün (protein tabletleri, nutrient tozları, içecek türevleri) eldesidir.

Amaç, besleyici su yumurtalarının yüksek protein içeriğinin yanı sıra polifenoller, diyet lifleri, mineraller (biyoyararlı demir ve çinko dahil), A vitamini, B vitamini kompleksince zengin, anti-kanserojen ve yaşlanma karşıtı özellikleriyle öne çıkan mucizevi bitkiden elde edilecek sayısız faydayı ülkemiz insanına tanıtmak, faydalandırmak ve ülke ekonomisine katkı sağlamaktır.

Teknofest'in bu amaç için en doğru **milli araç** olacağı kanaatindeyiz.

2. PROBLEM/SORUN

Dünyamızdaki en büyük sorunların başında nüfus artışı, enerji, gıda, su ve çevre gelmektedir. Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 10 milyara ulaşacak olması (OECD, 2012) göz önüne alınırsa, nüfusa bağlı artan gıda talebini hem nicelik hemde nitelik olarak karşılamak için sağlanacak gıda arzı doğal kaynakların aşırı kullanılmasına (toprak, su, fosil yakıtlar gibi) ve tükenmesine yol açacaktır. Küresel Açlık İndeksi (GHI) sonuçları, özellikle Afrika ve Güneydoğu Asya'da birçok ülkede açlığın %30'ların üzerinde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle geleceğe yönelik besin ve protein yetersizliği kaygıları bulunmaktadır (GHI, 2020).

Son yıllarda etkisini oldukça fazla hissettiren küresel iklim değişikliği de gıda krizinde etkili olacaktır. Verimli tarım alanlarının azalması ve ülkemiz gibi yarı-kurak iklimlerde yaşanan tatlı su yetersizliği ve su kirliliği, konvansiyonel tarım ürünlerinin üretimini de kısıtlamaktadır. Ortalama olarak 1 kg kanatlı eti üretimi için 2 kg yem ve 3918 m³/ton su, 1 kg kırmızı et için 7 kg yem ve 15500 m³/ton su gerekmektedir. Bu oranlar geleneksel hayvancılığın verimlilik oranının düşük olduğunu göstermektedir (Datar ve Betti, 2010). Ayrıca su tüketimi de fazladır. Hem endüstride hem de insan gıdası olarak kullanılan ürünlerin hayvan yemi olarak da kullanılması, tarımsal ürün arzında sorunlar (zaman ve miktar olarak) yaşanmasına yol açmaktadır. Daha hızlı ve daha fazla ürün elde etmek için kullanılan sentetik gübreler ve

pestisitler ise dünyamızın makro sorunlarına eklenirken, ekosistem ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır.

İnsanların protein ihtiyacını karşılamak için, hayvan yetiştiriciliği, özellikle metan salımı ve aşırı su kullanımını nedeniyle, küresel iklim değişikliği sorununa katkı sağlamaktadır. Hayvansal gıdalar, gıda kaynaklı proteinin ve kalorinin sırasıyla %37'sini ve %18'ini sağlarken, orantısız olarak tarımsal alan işgalinin %83'ünden ve gıdayla ilişkili sera gazı emisyonlarının %58'inden sorumludur (Poore ve Nemecek 2018, Tamburino *vd.*, 2020). Görüldüğü üzere, **hayvansal ürünlerin “karbon ayak izi” ve “su ayak izi” oldukça yüksektir.** Artan nüfusla birlikte yaşam alanlarının genişlemesi ve nüfusu besleyebilmek için tarım ve hayvancılığın artması sera gazı salımını daha da artırmaktadır (Ritchie, 2019; Raiten *vd.*, 2020). Gıda sektörü küresel sera gazı üretiminin %26'sını oluşturmaktadır. Bunun yaklaşık %31'i hayvancılık sektöründen kaynaklanmaktadır (Poore ve Nemecek, 2018). Ekilebilir arazilerin ise %33'ü hayvan yemi üretmek ve %26'sı otlama için kullanılmaktadır. Hayvancılık için kullanılan arazi tüm karasal alanın %30'unu kapsamaktadır (Steinfeld *vd.*, 2006). Tüm bu durumlar hayvancılık sektörünün çevreye zarar verdiğini ve sürdürülebilir beslenme açısından değişime ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. WHO verilerine göre, dünya nüfusunun %60'ından fazlası yeterince yemek yemiyor, yani yiyeceklerden yeterince protein almıyor. Nüfus artışına bağlı olarak kaynak talebindeki artış sebebiyle (et tüketimi), sürdürülebilir “et” yani “alternatif protein” üretimine yönelik yeni bakış açıları oluşmuştur. Örneğin; “bitki bazlı”, “böcek bazlı” ve “laboratuvar ortamı” (yapay et) alternatif protein kaynaklarıdır. Laboratuvar ortamında in vitro şartlarda et üretimi oldukça maliyetlidir (~325bin\$) (Fountain, 2013). Üretiminde ileri laboratuvarların gerekmesi, maliyetin yüksek olması, üretim hacminin azlığı ve lezzet kriterlerinin tam sağlanamaması nedeniyle yaygın bir yapay et tüketimi ön görülmemektedir. Dolayısıyla, yapay et geleneksel hayvancılığa karşı güçlü bir alternatif olarak gözükmemektedir (Muslu, 2021).

Çeşitli besin değerlerine sahip, yüksek nitelikli, lezzetli geleneksel ürünler oldukça pahalıdır ve gelecekte bu ürünlere erişim daha da zor olacaktır. Bu sebeple, hayvansal yağ içeriği sakıncalarından uzak, makro, mikro, iz elementler, vitamin ve mineraller içeren, karbonhidrat ve protein değerleri yüksek, besleyici, sağlıklı, maliyeti ucuz, çevre dostu ve sürdürülebilir bitkisel gıda kaynaklarına ihtiyaç vardır. Hayvansal ürünlerin aşırı tüketimi sınırlandırılarak bitki bazlı proteinlerle beslenme insan diyetine yerleştirilmeli ve bu konuda köklü değişikliklere gidilmelidir. Ülkemiz insanı, alışkanlıklarından ve ürün çeşitliliğinin fazlalığından dolayı bitki bazlı (tahıl/bakliyat) beslenmeye daha yatkındır. Bitkisel alternatif proteinler olarak dünyada **“alg (yosun) bazlı” proteinler** kullanılmakta iken hem algler hem de su mercimekleri gibi protein içeriği yüksek olan su bitkileri ülkemiz diyetlerinde ne yazık ki yer almıyor. Sorun sadece gıda (protein) eksiliği de değildir. İki yılı aşkın süredir COVID-19 pandemisinin yaşandığı dünyamızda, insanların daha sağlıklı olması için bağışıklık sistemlerinin kuvvetli olması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Kanser, önemli bir sağlık sorunudur. Yine, Parkinson, Alzheimer, diyabet, obezite gibi rahatsızlıkların toplumda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bundan dolayı diyetlerimizde kullandığımız ürünlerin hem nutrasötik hem de farmasötik içeriği, özellikle antioksidan kapasitesi yüksek olmalıdır. İşte tam da bu sorunları karşılamada, su mercimeklerinin en minik üyesi **süper gıda *Wolfia***, içerdiği 200 çeşit polifenol (Yaskolka Meir *vd.*, 2021) ile günümüz ve gelecek nesiller için sağlıklı, güvenilir, sürdürülebilir, çevre dostu ve umut verici bir gıda kaynağıdır (Şekil 1). Ancak, biyoteknoloji ürünü olarak büyük

potansiyeline rağmen, *Wolffia* ile ilgili temel araştırmalar henüz Dünya’da emekleme aşamasında, Türkiye’de ise hiç bilinmemektedir.



Şekil 1. *Wolffia arhiza*'nın genel görünüşü ve kullanım alanları

3. ÇÖZÜM

Artan gıda talebini, özellikle protein ihtiyacını karşılamada çözüm, hayvansal protein kaynağı yerine alternatif bitki bazlı, protein içeriği yüksek, besleyici ve sağlıklı ürün çeşitliliğini artırmaktır. Su mercimeği, alternatif protein kaynağı olarak kullanılabilir potansiyeli olan, bazı Güneydoğu Asya ülkelerinde uzun yıllardır diyetlerde sebze olarak tüketilen önemli bir üründür (Bhanthumnavin ve McGarry, 1971). Son yıllarda su mercimeğine olan ilgi artmaya başlamıştır. Bu bitkilerin, gelecekteki gıda ürünleri için bitki bazlı bir bileşen ve hayvan etini daha sağlıklı ve daha uygun fiyatlı proteinle değiştirme potansiyeline sahip sürdürülebilir alternatif bir protein kaynağı olarak düşünülebileceği belirtilmektedir (Appenroth *vd.*, 2018; Sree *vd.*, 2019). Genel olarak, su mercimeği kuru ağırlığının yaklaşık %20-35'i kadar protein içerir (Appenroth *vd.*, 2018; Herawati *vd.*, 2020; Yahaya *vd.*, 2022). İçeriğindeki doymuş yağ asidi, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi miktarları insan beslenmesinde besin değerini artırabilir (Yan *vd.*, 2013). Yapılan araştırmalarda bu bitkilerin toksikolojik ve yan etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (Kaplan *vd.*, 2019). Su mercimeği türlerinden özellikle *Wolffia* türlerinin insan beslenmesi için daha uygun olduğu bildirilmiştir (Appenroth *vd.*, 2017). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA; European Food Safety Authority), üçüncü bir ülkeden geleneksel gıda olarak *W. arrhiza* ve *W. globosa*'nın taze sebze olarak **AB pazarında yer alabileceği ve güvenlik endişesi yaratmadığı** konusunda bir teknik rapor yayımlamıştır (EFSA, 2021). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2019) hayvancılık sektörünün zararlarının azaltılabilmesi ve sürdürülebilir beslenmenin desteklenmesi açısından 5 pratik öneri bildirmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. FAO'nun düşük karbonlu hayvancılığa yönelik beş pratik eylem önerisi

- 1 *Hayvancılık üretiminin ve kaynak kullanımının verimliliğini artırmak*
- 2 *Döngüsel bir biyoekonomi için geri dönüşüm çabalarını yoğunlaştırmak ve kayıpları en aza indirmek*
- 3 *Karbon dengelemelerini artırmak için doğa temelli çözümlerden yararlanmak*
- 4 *Sağlıklı, sürdürülebilir diyetler için çabalamak ve protein alternatiflerini hesaba katmak*
- 5 *Değişimi teşvik etmek için politika önlemleri geliştirmek*

Bu tablodaki eylemler (hayvancılık üretimi hariç) projemiz hedeflerinden olup, üretilecek ürün “su yumurtaları” doğa temelli, çevreci, sürdürülebilir, sağlıklı ve ekonomiye katma değeri yüksek ürünlerle katkı sağlayabilir niteliktedir. Yüksek protein içeriğine sahip olan *Wolffia*, hidroponik sistemlerde kolayca üreyebilen, hasadı kolay ve yıl boyu havuz sistemlerinde sürekli üretilip, ürüne dönüştürülebilir potansiyele sahiptir. Yüksek değerlikli ve fazla miktarda

ürün elde etmek için, çok büyük arazilere ihtiyaç duyulmaz, klasik tarım ürünleri ve **hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan sudan çok daha az suya ihtiyaç duyulur, atık madde üretmez, fotosentezde kullanılan CO₂ küresel iklim değişikliğinin azalmasında etkilidir.**

Protein olarak kullanılacak hayvansal gıda üretimi, bitki bazlı ürünlerin üretimiyle kıyaslandığında, daha fazla sera gazı salımına sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, günümüzde çevreye duyarlı insanlar diyetlerini değiştirmektedir. *Wolffia* üretimi için fosil yakıt kullanılmaz. Yenilenebilir enerji sistemlerinden sağlanacak (örneğin güneş ve rüzgâr) enerji ile havuzlarda yıl boyu üretim yapılırken, sıfır karbon salımı iklim değişikliğini azaltmada katkı sağlar. Büyük tarım alanlarında, tarım ürünleri yetiştirmede kullanılan **zararlı kimyasalların ve kimyasal gübrelerin kullanımına ihtiyaç duyulmaz.** Bu nedenle bitki çevre dostudur. “Fitoremediasyon” sistemleri için de uygun olan bu bitkiden elde edilecek biyokütle “biyoyakıt” üretiminde ve hayvan yemi olarak değerlendirilebilir. Görüldüğü gibi bitki çevre kirliliğini azaltırken, hasatla elde edilen ürün çok çeşitli alanlarda hiçbir atık ürün meydana getirmeden değerlendirilebilir. 2050 yılına kadar tarımsal verimde %10-25 düşüş beklendiği öngörüldüğünde, yenilikçi, yüksek katma değerli, daha sağlıklı ve daha besleyici alternatif ürünler üretmeye ihtiyaç vardır. Mikroalg yetiştiriciliğinden daha avantajlı yönleri olan köksüz su mercimeği, verimli fotosentez kapasitesi, yüksek büyüme hızı, ılıman iklim bölgelerinde tatlı sulara adapte olmuş, dolayısıyla hidroponik sistemlerde verimli tarım topraklarına ihtiyaç duyulmadan sürekli üretilebilir niteliktedir. Dolayısıyla, sürdürülebilir bir gelecek için çevre dostu, iyi bir ürün, iyi bir üretim, daha iyi bir beslenme ve daha iyi sağlık için “su yumurtaları” kilit bir rol oynayacaktır. Alternatif protein olarak kullanılacak kaynağın maliyet, bulunabilirlik/yaygınlık, yeni ürünlere dahil edilmeye uygunluk ve fonksiyonel özellikleri gibi faktörlerini değerlendirdiğimizde, dünyamızın makro sorunlarına mikro çözümler olarak “*Wolffia*” yüksek bir katkı sağlama potansiyele sahiptir. Market Analysis Report (2022)’a göre, küresel protein takviyeleri pazar büyüklüğü 2021’de 20.47 milyar\$ değerindedir ve 2021’den 2030’a kadar %8.5’lik bir bileşik yıllık büyüme oranında genişlemesi bekleniyor. Dünya çapında sağlık bilincine sahip tüketicilerin ve fitness merkezlerinin sayısının artması nedeniyle pazar ivme kazanıyor. Y kuşağı arasında da protein takviyelerinin popülaritesi artmaktadır. Dolayısıyla, gıda takviyelere olan güvenin artması, önümüz yıllarda protein takviyeleri için ek talep yaratacaktır. Rapora göre, hayvan bazlı protein takviyeleri, 2021’de %65’in üzerinde bir gelir payı ile pazara öncülük etmiştir. Protein tozu, %60’ın üzerinde bir gelir payıyla pazara hakimdir. Hayvan bazlı proteinlerin fiyatlarının artması, üreticileri daha ucuz alternatifler aramaya itiyor. Bitki bazlı proteinler daha popüler hale geliyor, ancak geleneksel bitkiler gıda, yem, yağ, enerji vb. çeşitli alanlarda ihtiyaç duyulan temel hammaddelerdir. Dolayısıyla, çeşitli şirketler yeni fırsatlar aramaktadır. Bu durumda, su mercimeği önemli bir alternatif kaynak olarak değerlendirilebilir. Vejetaryen/vegan beslenen insanlar için bitki bazlı protein kaynağı olarak *Wolffia* “su yumurtaları” çok değerli, mucizevi bir gıdadır. *Wolffia*’nın kuru ağırlığının %40’ı protein, dinlenme fazı olan turionun yaklaşık %40’ı nişastadır (Fujita ve ark., 1999; Czerpak ve Szamrej, 2003). Güncel bir çalışmada, *Wolffia*’nın protein içeriğinin %50.89 olduğu belirlenmiştir (Hu vd., 2022). *Wolffia*, baklagiller gibi metionin hariç tüm temel aminoasitleri yüksek seviyede içermesinin yanı sıra, diyet mineralleri ve Ca, Mg, Zn gibi eser elementler ve B₁₂ vitamini ile lif içerir (Czerpak ve Szamrej, 2003). Kırmızı et tüketiminin birçok sağlık problemiyle pozitif ilişkili olduğu bilindiğinden, protein kaynağı olarak *Wolffia* kullanan insanlar yüksek kaliteli besin alırken daha sağlıklı bir bünyeye de sahip olacaklardır. Proteinin

yanı sıra su mercimekleri polifenoller, diyet lifleri, mineraller (biyoyararlı Fe ve Zn dahil), omega 3, folik asit, A vitamini, B vitamini kompleksi ve B₁₂ vitamini bakımından da yüksektir. *Wolffia*'nın inşa diyetlerine katılması **diyabet, obezite, kanser, kardiyovasküler sorunlar** gibi birçok hastalığın tedavisine **umut** olacaktır. COVID-19 salgını, bağışıklık sistemini güçlendirmek için protein takviyesi alımının artmasına neden olmuştur. Glanbia şirketinin, pandemi sürecinde ABD'deki tüketicilerin gıda ve beslenme ürünlerine yaptığı harcamalar üzerindeki etkisini izlemek için Nisan 2020'de yaptığı iki haftalık bir anket çalışmasında sağlıklı kalmak ve bağışıklığı artırmak için **protein bar** tüketen katılımcıların yüzdesi 1. haftada %21'den 2. haftada %23'e yükselmiştir. İçmeye **hazır protein içecekleri** tüketimi de pandemi sırasında önemli ölçüde artmıştır. Süper gıda *Wolffia* ile yapılabilecek protein takviyeli ürünler, küresel beslenme ürünleri arasında yer alabilir. Özetleyecek olursak;

Sorun: Ekonomik protein kaynaklarına erişim sorunu

Çözüm: **Ekonomik proteine kolay erişim (Ctrl + Tıklayın)**

Sorun: Tarımsal faaliyetlerde (bitkisel ve hayvansal protein üretimi) sera gazı salımının küresel iklim değişikliği kapsamında oluşturduğu sorunlar ve aşırı tatlısu kullanımı

Çözüm: **Küresel çevre sorunlarına çözüm (Ctrl + Tıklayın)**

Sorun: Açlık, diyabet, kanser, obezite gibi hastalıkların dünya çapında hızla artması

Çözüm: **Nutrasötik ve farmosötik etkileri olan fitokimyasallar içermesi (Ctrl + Tıklayın)**

Sorun: Geleneksel protein üretim süreçleri için aşırı tatlısu kullanımı

Çözüm: **Büyük su tasarrufu (Ctrl + Tıklayın)**

4. YÖNTEM

Çalışma Teknofest yarışma başvurusu yapıldığında **Teknoloji Hazırlık Seviyeleri (THS)** sıralamasında **THS 2** seviyesindeydi. Ağustos ayındaki TEKNOFEST 2022'de ürünün operasyonel (gerçek) sahada gösterimi yapıldıktan sonra **THS 7** seviyesindeki teknik gerekleri yerine getirmiş olacaktır. Projenin gelecek vizyonu uygulanabilirlik başlığı altında ayrıca tartışılmıştır.

4.1 Bitki Materyali

Suda serbest yüzen, dünyanın en küçük spermatofiti olan köksüz su mercimeği *Wolffia*; Terme'de (Samsun) lokal bir sulak alandan toplandı. Bitki Taş ve Topaldemir (2021) tarafından incelenmiş ve tanımlanmıştır. Bir mm civarında, yuvarlağımsı, ovat şekilde, şişkin yapısı havyarların içindeki yumurtalara benzer. İçi su dolu yeşil kürecikler şeklinde görünürler (Şekil 1). Projede, yapılan/yapılması planlanan analizlerle *Wolffia*'nın fitokimyasal özellikleri, biyolojik aktiviteleri ve potansiyel kullanılabilirliği ortaya konulacaktır.

4.1.1 Sterilizasyon ve Ön Kültür Çalışmaları

Kullanılacak tüm kaplar ve iklim dolabı 3-5 dakika boyunca %1'lik NaClO (çamaşır suyu) ile dezenfekte edildi. Distile su (dH₂O) ile durulanan cam kaplar etüvde kurutuldu. Araziden toplanan *W. arrhiza* örnekleri ODÜ Hidrobiyoloji Laboratuvarı'nda yabancı materyallerinden ayıklanıp önce musluk suyu ardından dH₂O ile bolca yıkandı (Şekil 2). Kültür öncesi bitkiler %50'lik etanolde çok kısa bir süre (30-40 saniye) sterilizasyon işlemine tabi tutulup, tekrar üç kez dH₂O ile yıkandı. Büyüme ortamı olarak **N-medium** hazırlandı (Appenroth vd., 1996). Bu sentetik ortam 4 stok ortamın karışımından oluşur: **Stok 1:** 4.083 g/L KH₂PO₄; **Stok 2:** 47.23

g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; **Stok 3:** 161.8 g/L KNO_3 , 61.8 mg/L H_3BO_3 , 514.5 mg/L $\text{MnCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 9.4 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 49.30 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; **Stok 4:** 1.835 g/L FeNaEDTA . Bir litre besin ortamı hazırlamak için her stok solüsyondan 5 mL kullanılır. pH 5.5'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dak. otoklavda steril edilir. Soğuduktan sonra +4°C'de muhafaza edilir.

W. arrhiza'nın, iklim kabininde (Grotech/GR08, Unitroniks® Vision350™) floresan ışıkta, 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyotta, 24±1°C'de 14 gün boyunca hidroponik (akuaponik) sistemde ön kültürü yapıldı. Sağlıklı gelişen bitkiler hasat edilip dH₂O ile yıkandı ve yeni bir steril küvette N-medium ortamına aktarılarak haftalık alt kültürleri yetiştirildi. Daha sonra farklı raflarda, floresan ışık ve beyaz LED ışık altında, aynı iklimlendirme koşullarında yetiştirilen *W. arrhiza* bir hafta sonunda hasat edilip ön çalışmalarındaki bazı analizler için kullanıldı.

https://youtu.be/Qc8uMdjsL_0 (Çalışmaya ait video içeriği)

4.1.2 Bitki Büyüme Performansının İncelenmesi

W. arrhiza'nın bağıl üyümesi (RG) $RG = (N_t - N_0)/N_0$ eşitliğine göre hesaplandı (Ensley vd., 1994). Burada N_t , t gününde bitki yaş ağırlığı ve N_0 , deneyin başlangıcındaki yaş ağırlığıdır.

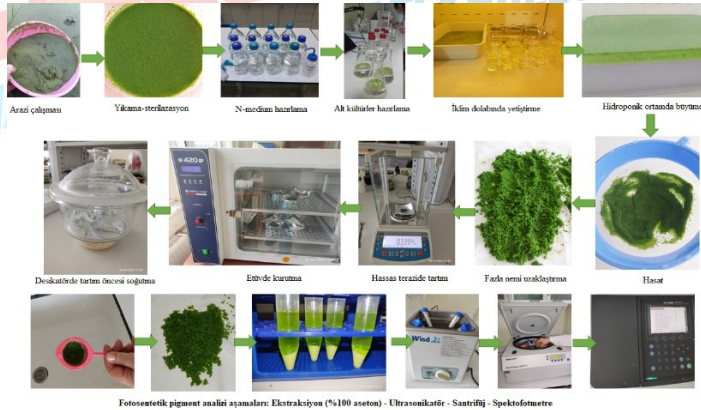
4.1.3 Nem Tayini, Kuru Madde Analizi ve Kül Analizi

W. arrhiza'nın % nem oranı ve % toplam kuru madde miktarı etüvde kurutularak standart metodlarla analiz edildi (AOAC, 2000). Deney başlangıcında (t_0), kâğıt havluda nemi alınan bitki örneklerinin hassas terazide (Radwag AS 220.R2) tartım işlemi yapıldıktan sonra (TA, g) alüminyum folyoya sarılıp 105°C'de etüvde 1 gece boyunca kurutuldu. Kurutma işleminden sonra desikatöre alınıp oda sıcaklığına kadar soğutulularak KA (g) ölçüldü (Ziegler vd., 2015), aşağıdaki formüllere göre hesaplamalar yapıldı.

$$\%Nem (Su) (g/100 g) = [(TA - KA) / TA] \times 100$$

$$\%Toplam\ kuru\ madde\ miktarı\ (g/100\ g) = 100 - \%Nem\ miktarı\ ya\ da$$

$$\%Toplam\ kuru\ madde\ miktarı\ (g/100\ g) = [KA (g) / TA (g)] \times 100$$



Şekil 2. Laboratuvar ortamında kültür hazırlıkları ve bazı analizlerin yapıışı

Ham kül analizi AOAC (1990) metoduna göre yapılır. Kurutulup öğütülmüş numuneler porselen krozeler içinde hassas terazide tartılıp (1 g) 550°C'ye ayarlı yakma fırınına yerleştirilir, gümüş gri bir renk alıncaya kadar numuneler 3–5 saat yakılır. Süre sonunda numuneler desikatöre alınıp soğutulduktan sonra hassas terazide tartım yapılır ve % kül miktarı hesaplanır.

$$\%Kül\ miktarı = (Son\ ağırlık - Dara) \times 100 / [(Dara + Numune) - Dara]$$

4.1.4 Fotosentetik Pigment Analizi

W. arrhiza'nın klorofil a (kl a), klorofil b (kl b), toplam klorofil (kl a+b), ve toplam karotenoid ($Kx+c$; Karotenoid=ksantofil+β karoten) içeriği Lichtenthaler ve Buschman (2001) yöntemine

göre modifiye edilerek analiz edildi (Şekil 2). Taze bitki (200 mg) ekstraksiyonu için %100'lük aseton (5 mL) ve feofitin oluşumunu engellemek için MgCO₃ (100 mg) kullanıldı. Ekstraktlar 30 dak. ultrasonik banyoda tutulduktan sonra santrifüj yapıldı, ardından süpernatantlar pipetle kuvars küvetlere alınıp spektrofotometrede (SHIMADZU UV-1800) absorbans (A) değerleri kaydedildi. Hesaplamalar Lichtenthaler (1987)'e göre yapıldı:

$$Kl\ a = [(11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8})]$$

$$Kl\ b = [(20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6})]$$

$$Kl\ a+b = [(7.05 \times A_{661.6}) + (18.09 \times A_{644.8})]$$

$$Kx+c = [(1000 \times A_{470}) - (1.90 \times Kl-a) - (63.14 \times Kl-b)/214]$$

Bu hesaplama sonuçları birimi µg/mL'dir.

4.1.5 Toplam Azot ve Protein Analizi

Toplam azot ve protein tayini Kjeldahl metoduna göre yapılacaktır (Kacar ve İnal, 2010).

4.2 Köksüz Su Mercimeğinin Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi

W. arrhiza'nın biyoaktif etkilerini belirlemek için in vitro çalışmalar yapılacaktır. Farklı çözücülerle (su, etanol, metanol) hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri kapsamlı olarak incelenecektir.

4.2.1 Ekstraksiyon İşlemleri

Etüvde 40°C'de sabit ağırlığa kadar kurutulup toz haline getirilen numuneler hassas terazide tartılıp, 250 mL'lik erlenlerde 1/5 oranında çözücü ilave edilerek ekstraksiyon işlemine tabi tutulur. Hazırlanan numuneler dijital orbital çalkalayıcıda (SHO-2D, DAIHAN) 120 rpm'de çalkalanır. Bitki hücrelerinin parçalanarak hücre özlerinin çözücüye daha iyi karışması için numuneler ultrasonik su banyosunda (Daihan WiseClean® WUC-A02H) 30 dak. tutulur. Numuneler filtre kâğıdından süzülüp, darası alınan cam balonun içindeki çözücü döner buharlaştırıcıda 40°C'de uçurulur (<https://youtube.com/shorts/Pp6eIT79aQM?feature=share>).

Kalan miktar hassas terazide tartılır. Analize kadar numuneler buzdolabında +4°C'de muhafaza edilir. Yapılan/yapılacak olan analizlerin prosedürleri aşağıda açıklanmıştır.

4.2.2 GC-MS ile Biyoaktif Bileşenlerin Analizi

Farklı çözücülerle hazırlanan *Wolffia* ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerinin analizi Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS-QP2010 Ultra, SHIMADZU) kullanılarak belirlenecektir. Proje kabul gördüğünde, sağlanacak maddi destekle hizmet satın alınıp analizler yapılacaktır.

4.2.3 In vitro Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Prosedür: In vitro antimikrobiyal aktivite analizleri için Gram-pozitif bakteri (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis*, Gram-negatif bakteri (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*), küf mantarı (*Aspergillus niger*) ve maya mantarı (*Candida albicans*) suşları kullanılır. Ampicillin, cephazolin ve nystatin antimikrobiyal duyarlılık test diskleri kontrol için kullanılır. Mikrobiyal analizler için bakterilerde Mueller Hinton Agar (MHA), mantarlarda ise Sabouraud dekstroz agar hazırlanır. Antimikrobiyal aktivite testleri disk difüzyon yöntemi ile yapılır (Ertürk, 2006). McFarland ile ayarlaması yapılan bakteri-su karışımı steril eküvyon çubuklarla yayma ekimi ile petrilere yayıldıktan sonra üzerine aseptik koşullarda steril antibiyogram blankları yerleştirilir. Disklerin üzerine 30 µL bitki ekstrelerinden eklendikten sonra petri

kapları 37°C'de 24 saat, mantar ekili petripler ise 30°C'de 48 saat etüvde inkübe edilir. Süre sonunda oluşan inhibisyon zonları kumpas yardımı ile ölçülerek kaydedilir.

4.2.4 In vitro Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

4.2.4.1 Toplam Fenolik Bileşik Analizi

Bitki ekstraktının fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlenir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu yöntem, fenolik maddelerin Folin-Ciocalteu (FCR) reaktifinin içerdiği fosfomolibdik-fosfotungstik çözeltisini indirgeyerek mavi bir kompleks oluşturmaları ve bu mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanır (Abdulkasım vd., 2007). Numunelerin toplam fenolik madde içerikleri gallik asit (GA) kullanılarak hazırlanan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak GA eşdeğeri olarak (mg GAE/g kuru ekstrakt) belirlenir. Hazırlanan numunelerin absoransı spektrofotometrede 760 nm'de suya karşı okunur. Aynı işlem ekstraktlar için de gerçekleştirilir. Kalibrasyon eğrisinin grafik denkleminde yararlanılarak ekstraktların fenolik madde içeriği mg GAE/g kuru ekstrakt şeklinde hesaplanır.

4.2.4.2 Toplam Flavonoid Madde Analizi

Bitki ekstraktının toplam flavonoid içeriği kuersetin eşdeğeri (QTE) olarak Arvouet-Grand vd. (1994)'nin yöntemine göre analiz edilir. Bu yöntemde göre, metanolde hazırlanmış %2'lik AlCl₃ çözeltisinin 1 mL'si 1 mL ekstrakt ya da standartla karıştırılır. Hazırlanan numunelerin 415 nm'deki absoransları 20 dak. sonra hazırlanan köre karşı spektrofotometrede ölçülür. Farklı kuersetin (QT) konsantrasyonlarına karşılık gelen absorans değerleri ile QT standart grafiği çizilir. Grafiğin doğru denklemi sayesinde ekstraktların flavonoid madde içerikleri mg QTE/g kuru ekstrakt şeklinde belirlenir.

4.2.4.3 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Süpürücü Antioksidan Aktivite Analizi

DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) serbest radikal süpürme aktivitesi tayini Sanchez-Moreno vd. (1998) tarafından bildirilen yöntemde göre yapılır.

4.2.4.4 FRAP (Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç) Analizi

Bitki ekstraktlarındaki antioksidanların Fe(III) iyonunu Fe(II) iyonuna indirgeyebilme gücü Oyaizu (1986)'nin yöntemi kullanılarak belirlenir.

4.2.4.5 Enzimatik Antioksidatif Aktivite Analizleri

Farklı ışık kaynakları altında yetiştirilen *Wolffia*'nın **antioksidatif enzim miktarlarının değişeceği hipoteziyle**, bitkinin enzimatik antioksidatif aktivitelerini belirlemek için SOD, CAT ve GPX aktivitesi analiz edilecektir. SOD aktivitesi, nitromavisitetrazozolyumun (NBT) indirgenmesine dayanan Beauchamp ve Fridovich (1971) yöntemine göre, CAT aktivitesi, Keyhani ve Keyhani (2012)'nin yöntemine göre, GPX aktivitesi, Childs ve Bardsley (1975)'e göre analiz edilecektir. **Bu analizler için gerekli olan enzim, proje desteği sağlandığında satın alınacaktır.**

ARAŞTIRMA BULGULARI

Laboratuvarımızda kontrollü koşullarda yetiştirdiğimiz *W. arrhiza* ile yaptığımız çalışmalarda bitkinin bazı biyolojik ve kimyasal analizlerin ön sonuçları başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

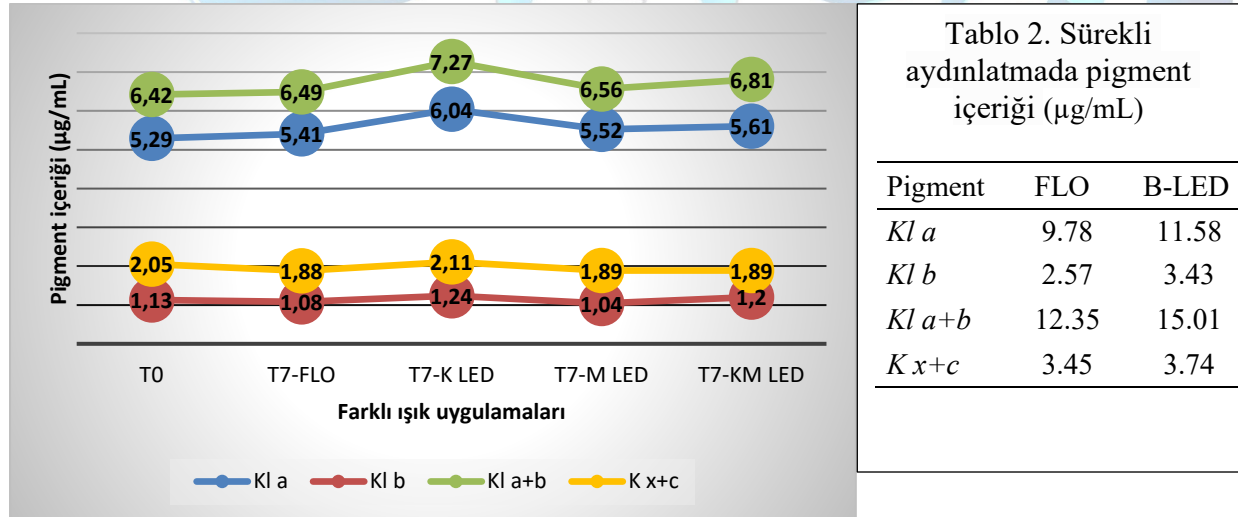
Farklı Işıklar (LED) Altında Bitki Bağlı Büyümesi

Ön çalışmada, beyaz floresan (FLO) ve LED ışıkların (K: kırmızı, M: mavi, KM: kırmızı+mavi) bitkinin büyüme performansı üzerine etkisi 7 günlük bir deneme ile incelendi. Nispi büyüme

(RG) en yüksek kırmızı LED ışıkta görüldü. RG sonuçları şu şekildedir: K-LED (0.28) > FLO (0.23) > KM-LED (0.17) > M-LED (0.14). Işık yayan diyotlar (LED'ler), doğal gün ışığı olan veya olmayan seralarda, dikey tarım ve yetiştirme kabinlerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Demotes-Mainard *vd.*, 2016; Kalaitzoglou *vd.*, 2019). Güneş ışığının aksine, LED'ler gibi yapay ışık kaynakları genellikle kızıl ötesinden yoksundur (Kalaitzoglou *vd.*, 2019). Mavi renkli bir protein pigmenti olan fitokrom, kırmızı dalga boyundaki ışıkta aktif, kızılötesi ışınlarda ise inaktif formda bulunur. Dolayısıyla, *Wolffia*'nın sebze olarak üretimi hedefleniyorsa, hidroponik sistemlerde kırmızı LED ve beyaz floresan denenebilir. Farklı kombinasyonların ve farklı ışık şiddeti denemelerinin de mutlaka yapılması gerekir.

Fotosentetik Pigment Analizi

Wolffia'nın bir haftalık hasat sonucunda fotosentetik pigment içeriği analiz edildi. Farklı ışıklar altında, 18/6 saat fotoperiyotta yetiştirilen su yumurtalarının kl a, kl b, toplam klorofil (kl a+b) ve toplam karotenoid (Kx+c) miktarları hesaplandığında klorofil ve karotenoid konsantrasyonu en yüksek kırmızı LED ışıkta yetiştirilen ortamda oldu (Şekil 3). Bir hafta sonunda (T7) başlangıç konsantrasyonuna göre (T0) tüm ışık gruplarında pigment artışı gözlemlendi.



Tablo 2. Sürekli aydınlatmada pigment içeriği (µg/mL)

Pigment	FLO	B-LED
Kl a	9.78	11.58
Kl b	2.57	3.43
Kl a+b	12.35	15.01
Kx+c	3.45	3.74

Şekil 3. Floresan ve LED ışıkta *W. arrhiza*'nın pigment içerikleri

Beyaz floresan ve beyaz LED ışığın etkisini sürekli aydınlatma (24 saat) uygulayarak izlediğimiz başka bir çalışmada, LED ışığın fotosentetik pigment içeriğini artırdığı tespit edildi (Tablo 2). Sürekli aydınlatma uygulaması da pigment içeriğini yükseltmiştir. Klorofiller, karotenoidler, flavonoidler gibi doğal bitki pigmentleri sentetik renklendiriciler gibi toksik etkilerinin olmaması nedeniyle (Hu *vd.*, 2018) gıda, tıp, eczacılık, akuakültür, kozmetik vs. birçok endüstri dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Halkın zihninde daha güvenli, işlevsel beslenme ve sağlık yararları nedeniyle bitki özleri de dahil sentetik ürünleri doğal ürünlerle değiştirmeye yönelik artan bir talep vardır (Viuda-Martos *vd.*, 2012). Günümüzde gıda firmaları tarafından, karotenoidleri (E160) sadece sentetik renklendiricilere alternatif olarak değil, aynı zamanda sağlığa olan faydaları nedeniyle gıdalarda renklendirici ajan olarak kullanmak için önemli girişimlerde bulunulmuştur (Scotter, 2011). Karotenoidler gibi doğal olarak oluşan antioksidanların kanser ve diğer kronik hastalık riskini azaltma potansiyelleri vardır. Birçok doğal bileşik antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkileri de dahil olmak üzere dikkate değer özelliklere sahiptir (Biehler *vd.*, 2010; Kumar *vd.*, 2010; Loizzo *vd.*, 2016; Shakeri *vd.*, 2016). *Wolffia*'nın da değerli pigment içeriğiyle değerlendirilmesi gereken önemli bir bitki

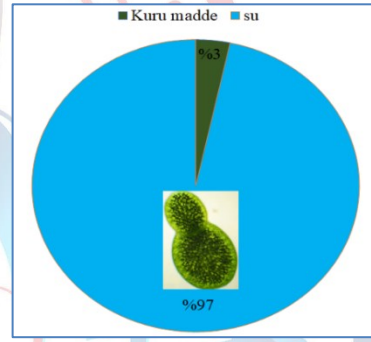
olduğunu söyleyebiliriz. Bu faydalı pigmentlerin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini belirlemek için çalışmamızda in vitro analizler planlanmıştır.

Nem (Su) İçeriği, Kuru Madde ve Kül Analizi

Etüvde kurutma yöntemiyle sabit ağırlığa kadar kurutulan *W. arrhiza*'nın su içeriğinin oldukça yüksek (%96.56 g/100 g), toplam kuru madde miktarının ise az olduğu (%3.44 g/100 g) görülmektedir (Tablo 3, Şekil 4). Su mercimekleri yüksek oranda su içerdiği için kuru madde verimi düşüktür, ancak bu durum yüksek büyüme oranı ile telafi edilmektedir. Çünkü su mercimeği biyomasının iki katına çıkma süreleri oldukça kısadır (Sree vd., 2015). *W. arrhiza* ile yapılan bir çalışmada, bitkinin gri su ortamında yetiştiği, N ve P gibi su kalitesini bozan önemli nutrientleri uzaklaştırma potansiyeline sahip olduğu (fitoremediasyon) bildirilmiştir. Bitkinin su içeriğinin %95'ten fazla olduğu, yüksek su içeriğine sahip olması nedeniyle *Wolffia*'nın **uzay çalışmalarında** mürettebatın hem gıda hem de metabolik su ihtiyacını karşılamada destek olabileceği belirtilmiştir (Arslan Günel ve Taş, 2022).

Tablo 3. Kuru madde analizi

Numune	TA (g)	KA (g)
1	10.06	0.34
2	10.03	0.33
3	10.01	0.34
4	10.05	0.34
5	10.05	0.34
6	10.00	0.34
7	10.06	0.34
Ort.	10.03	0.34



Şekil 4. *W. arrhiza* kuru madde ve su içeriği

Azot ve Protein İçeriği

60°C'de kurutulan, hassas terazide tartılarak kapaklı numune kaplarına yerleştirilen örnekler analize kadar buzdolabında muhafaza edilmektedir. Birimimizdeki Kjeldahl cihazının bakım/onarım süreci tamamlanınca hemen analizler yapılacaktır.

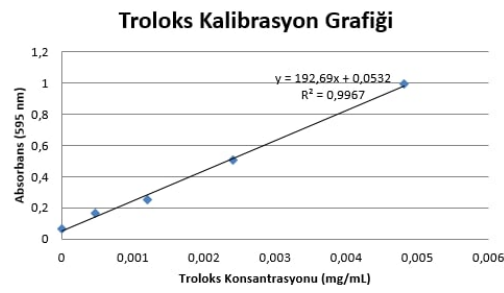
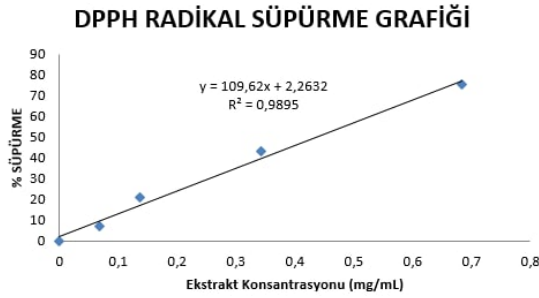
In Vitro Antimikrobiyal Aktivite

Yapılan ön çalışmada, *W. arrhiza*'nın etanol, metanol ve su ekstratlarının antibakteriyel aktivitesi test edildi. 100 µL Mcfarland ayarlı organizma 20 mL MHA üzerine inoküle edilip disklerle 30 µL ekstrakt yüklendi. Patojen bakterilere karşı uygulanan antimikrobiyal test sonuçlarına göre, özellikle etanol ve metanol ekstratlarının Gram-pozitif bakteri *Listeria monocytogenes* (zon çapı 22 mm) ve Gram-negatif bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (zon çapı 14 mm) türlerine karşı etkili olduğu görüldü. Su ekstraktının ise herhangi etkisi gözlenmedi. Birçok bakteri ve mantar türü insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde enfeksiyonlara neden olmaktadır. Antibakteriyel ve antifungal ilaçların aşırı kullanımı mikrobiyal suşlar arasında antibiyotik direncinin gelişmesine yol açar. Mikroplara karşı şifalı bitkilerin kullanılması, bu tür enfeksiyonları tedavi etmek için daha ucuz ve zararsız bir alternatif sağlar (Ahmad vd., 2018). Bu nedenle, daha sonra yapılacak modifiye ekstraksiyon metodlarıyla *W. arrhiza*'nın antimikrobiyal etkisi tekrar kapsamlı olarak analiz edilecektir.

In vitro Antioksidan Aktivite

Ön çalışmamızda, iklim dolabında floresan ışık ve kırmızı+mavi (KM) LED ışıkta yetiştirdiğimiz *Wolffia* ile doğal ortamdan toplanan *Wolffia*'nın etanol ekstratlarının fenolik

madde, flavonoid madde, DPPH ve FRAP analizleri yapıldı.



Toplam fenolik madde (GAE/g ekstrakt) en yüksek doğal ortamdaki numunede (23.08), sonra sırasıyla floresan ışıkta (23.08) ve KM LED ışıkta (19.96) belirlendi. *Wolffia*'nın toplam flavonoid madde içeriği (mg KTE/g ekstrakt) en yüksek floresan ışıkta (30.37), sonra doğal ortamdaki numunede (29.09) ve KM LED ışıkta (20.53) ölçüldü. DPPH radikal süpürme aktivitesi en yüksek floresan ışıkta yetiştirilen *Wolffia*'da kaydedildi (0.44 mg/mL). FRAP analizi sonucu (mg TXE/g ekstrakt) en yüksek değer doğal (29.15) ve floresan (29.03) ışığındaki numunelerde kaydedildi. KM LED ışıkta FRAP değeri 19.96 mg TXE/g'dır. Fenolik maddelerin insan sağlığı için gerekli olduğu, ek gıda ve ilaç olarak kabul edildiği (Ghasemzadeh ve Ghasemzadeh, 2011), flavonoidlerin, anti-diyabetik, anti-inflamatuar, anksiyolitik, anti-spazmodik, anti-mutajenik ve hepatoproteksiyon etkileri olduğu belirtilmektedir (Courts ve Williamson, 2015). *Wolffia*'nın içinde bulunduğu Wolffioideae alt familyasının Lemnoideae türlerine göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve insan tüketimi için daha uygun olduğu güncel bir çalışma ile bildirilmiştir (Pagliuso vd., 2020). Mevcut ön çalışma sonuçlarımız da *W. arrhiza*'nın antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak daha kapsamlı çalışmalar yapmaya ihtiyaç vardır. Proje desteği sağlandığında, özellikle enzimatik antioksidan analizleriyle değerlendirme yapılacaktır.

SONUÇ; *Wolffia*'nın protein ve aminoasit kompozisyonu zenginliğine ilave olarak diğer besin maddeleri ve **sekonder metabolitler açısından da önemli bir gıda maddesi** olduğu sonucuna varılmıştır (Hu vd., 2022). Diğer sebzelerle karşılaştırıldığında, bu türün toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin daha yüksek olduğu, bu nedenle daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu besin değerleri özellikle *W. arrhiza* için önemlidir. Yapılan bir başka çalışmada, bu gıda ürününün herhangi bir **toksik etkisinin olmadığı**, sebze olarak tüketilebileceği sonucuna varılmıştır (Mes vd., 2022).

5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ

Güncel taksonomik revizyona göre (Bog vd., 2020), su mercimekleri 5 cins (*Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* ve *Wolffiella*) ve toplam 36 tür içerir. Bunların içinde en küçük ve en hızlı büyüyen tür olan *Wolffia*, küçük olması nedeniyle muhtemelen sucul ekosistem araştırmalarında gözden kaçmıştır. Dünyada bilimsel olarak su mercimeklerine olan ilgi son 20 yılda artmıştır. Ancak yayınlarda daha çok *Lemna* üzerine odaklanılmıştır ve bu tür üzerinde toplam 1559 bilimsel çalışma yayımlanmıştır. *Wolffia* ile ilgili yapılan yayınların sayısı ise 123 olup, *W. arrhiza*'nın incelendiği yayın sayısı sadece 62'dir (Web of Science, 27.02.2022 tarihi itibarıyla). Literatür sayısının çok az olması ve bu türün birimiz dışında Türkiye'de hiç çalışılmamış olması projenin özgün yönüdür. Dünyanın en küçük, fakat potansiyel ve fonksiyonel özellikleriyle büyük önem arz eden *Wolffia*'nın yenilikçi çalışma alanlarında kapsamlı olarak değerlendirilmesi gerekir. Çok yakın zamanda, *W. arrhiza*'nın kullanıldığı

Literatür taraması - Veri değerlendirmesi -THS 2										
Bitki toplama, incelenme, altyapı hazırlama										
Koloni saflığının sağlanması - Laboratuvarda uygulamalı araştırma -THS 3										
Sonuçların değerlendirilmesi - THS 3										
Laboratuvar ölçekli prototip - THS 4										
Ürün kapasitesi ve hacmini artırma denemeleri										
Prototip ürünün denenmesi -THS 5										
Proje raporu										
Ürün mikrobiyolojik uygunluk testleri- THS 6										

Projede Kullanılacak Malzeme Listesi

No	Malzemenin Cinsi	Ad	Birim	Birim Fiyat	Tutarı	Kullanım Gerekçesi
1	Etil Alkol (Absolute, %99.9), 2.5 L	1	adet	452	452	Bitki ekstraksiyonu
2	Metanol (%99.9), 2.5 L	1	adet	535	535	Bitki ekstraksiyonu
3	Aseton (%99.9), 2.5 L	1	adet	370	370	Bitki ekstraksiyonu
4	Nitrotetrazolium Blue Chloride, 1g	1	adet	5075	5075	SOD analizi
5	Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent,100 Ml	1	adet	615	615	Toplam fenolik analizi
6	Kurutma Kâğıdı	1	pk	300	300	Bitki kurutma
7	Alüminyum Folyo	2	adet	185	370	Numune ışıktan koruma
8	Eldiven, Mavi Renk, M	2	pk	100	200	Steril çalışma
9	Otoklav Bandı	1	adet	80	80	Otoklav kontrolü
10	Steril Falcon Tüp, 50 Ml, Vida Kapaklı	1	pk	117	117	Numune koyma
11	Steril Falcon Tüp, 15 Ml, Vida Kapaklı	1	pk	207	207	Santrifüj yapma
12	Plastik, Küvet No 5-1425 (45x35x16cm)	8	adet	110	920	Bitki yetiştirme
13	Gc-Ms Analizi, Kalitatif	6	defa	118	708	Fitokimyasal analizi
14	Liyofilizatör Kullanımı	10	gün	118	708	Kurutma
15	Otomatik Pipet Ucu(1000µl)(500ad)	1	pk	110	110	Numune alma
16	Otomatik Pipet Ucu(Sarı, 200µl)(1000ad)	1	pk	80	80	Numune alma
17	Mikrosantrifüj Tüpleri(Eppendorf)(1,5ml) 500 Ad	1	pk	240	240	Mikrosantrifüj
18	Mikrosantrifüj Tüpleri(Eppendorf)(0,5ml) 500 Ad	1	pk	130	130	Mikrosantrifüj
19	Osram Uvc Sterilizatör Ampülü	1	adet	175	350	Bitki yetiştirme
20	Philips UV-A Ve UV-B 9w	2	adet	150	300	Bitki yetiştirme
21	33 Amper 12 Volt Şerit Led Trafosu	1	adet	120	120	İklim dolabı
22	Mavi-Kırmızı-Yeşil-Beyaz Şerit Led(5m)	4x1	adet	50	200	İklim dolabı
23	Plastik Köşeli Küvet No 5-1425(45x35x16 cm)	8	adet	120	960	Yetiştirme ortamı
TOPLAM TUTAR % 18 KDV Dahil				13147 TL		-

8. PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ (KULLANICILAR):

Proje çalışmalarından elde edilecek alternatif protein kaynağı ürünler başta çocuklar olmak üzere 7'den 70'e her yaş grubundaki insana hitap ediyor olacaktır. Gelişim çağındaki bireylerin sağlıklı nitelikli beslenmeleri sağlanırken, ileri yaşlardaki bireylere, ek olarak antioksidan içeriğinden dolayı antikanserojen ve yaşlanma karşıtı özelliklerin kazandırılması sağlanabilecektir. Yine, "smoothie" formunda içecek eldesiyle, sporcuların suni olarak üretilmiş **protein tozları** yerine, doğrudan **taze (fresh)** nitelikte protein, vitamin, mineral takviyesi olarak kullanılabilir. Gastrointestinal sorunları olan, ağır entübe pozisyonundaki hastalarda ve yatağa bağlı hastalar için nazogastrik tüp uygulamasında nitelikli sıvı besin kaynağı olarak evde ya da hastanede hemşire, hasta bakıcıların kullanımına sunulabilir. Ayrıca, atıştırılabilir olarak kullanılan glukoz, fruktoz ve yağ oranı yüksek kalorili, işlenmiş ürünlerin yerine vitamin ve protein özellikleri öne çıkmış kraker, çerez ya da sütlü içecekler rağbet

görecektir. *Wolffia* ürünleri, vegan ve vejeteryenler için mükemmel bir ürün alternatifi olacaktır.

9. RİSKLER

Risk değerlendirilmede 5x5 matrisinden yararlanılmıştır. Risk matrisi, riskin olma olasılığı ve olduktan sonra yaratacağı etki gibi iki değişkeni analiz etmek için kullanılan değerlendirme aracıdır. Belirlenen risklerin her birine 1'den 5'e kadar bir etki değeri (soldan sağa) ve bir olasılık değeri (yukarıdan aşağıya) verilmiştir. Etki ve olasılık düzeyi en düşük için 1, en yüksek için 5 değeri kullanılmış. Risk sonucu hesaplaması **Olasılık x Etki** formülü kullanılarak risk skoru tabloda sunulmuştur.

Tablo 6. Proje Risk Yönetim Tablosu

No	RİSKLER	Olasılık	Etki	Risk Skoru
1	Toplanan <i>Wolffia</i> örneklerinin laboratuardaki yetiştirme havuzlarında siyanobakteri ve protozoan etkisi altında kalması	3	2	6
2	Analiz sonuçlarının literatürdeki beklenen değerlerin dışında çıkması	2	3	6
3	Ürün üretiminde aksaklıklar (Farklı Led ışık uygulamasına negatif reaksiyon geliştirme)	1	3	3
NO	RİSK YÖNETİMİ (B PLANI)	Tablo 6. Proje Risk yönetim tablosu		
1	Hidroponik ortamda kontaminasyon riskini azaltmak için, çalışma öncesinde hem iklim dolabı hem de kullanılan tüm malzemeler steril edilecektir. Hazırlanan N-medium her zaman otoklavda steril edildikten sonra kullanılmaktadır. Ortam değiştirme sırasında, laboratuvar koşullarının da hijyenik olmasına itina gösterilemekte, zemin çamaşır suyu ile silinmektedir. Ortam değiştirildiğinde, kullanılan kaplar tekrar steril edildikten sonra kullanılmaktadır.			
2	Beyaz floresan ışıktaki yetiştirilen <i>Wolffia</i> içeriğindeki bileşenlerin, fitokimyasal özelliklerinin ve biyolojik aktivitelerinin değişimini görmek açısından Farklı LED ışıkların etkisi de denenecektir. Uzay tarımında uygulanan kırmızı+mavi LED ışık uygulamaları bu çalışmada denenecek ve içerik analizi karşılaştırılacaktır.			
3	İklim dolabında beyaz floresan ışık altında <i>Wolffia</i> üretimi sürdürülürken, laboratuvarımızda mevcut olan ikinci bir iklim dolabında (4 raflı) farklı LED ışık uygulamalarında <i>Wolffia</i> yetiştirilebilecektir.			

Sonuç	Durum
R<6	Düşük Riskli
8<R<12	Orta Riskli
15<R<20	Yüksek Riskli

Risk sonuç değerlendirmesi yapıldığında, projemiz düşük kategorisinde değerlendirilmiştir.

10. KAYNAKLAR

Abdullakasim, P., Songchitsomboon, S., Techagumpuch, M., Balee, N., Swatsitang, P., & Sungpuag, P. (2007). Antioxidant capacity, total phenolics and sugar content of selected Thai health beverages. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(1), 77-85.

Ahmad, K., Ali, A., Afridi, W. A., Somayya, R., & Ullah, M. J. (2018). Antimicrobial, hemagglutination and phytotoxic activity of crude ethanolic and aqueous extracts of *Seriphidium kurramense*. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38(3), 433-438.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Association Official Analytical Chemists (AOAC), Washington, DC.

Appenroth, K. J., Teller, S., & Horn, M. (1996). Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. *Biologia Plantarum*, 38(1), 95-106.

Appenroth, K. J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., & Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food chemistry*, 217, 266-273.

Arslan Günel, S., & Taş, B. (2022). Uzay çalışmalarında biyorejeneratif yaşam destek sistemleri için potansiyel bir tür: Dünyanın en küçük spermatofiti, köksüz su mercimeği (*Wolffia arrhiza*). International Scientific Research Congress Dedicated to the 30th Anniversary of Baku Eurasia University, April 28, 2022/Baku, Azerbaijan.

- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2010). Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 75(1), C55-C61.
- Bhanthumnavin, K. ve McGarry, MG. (1971). *Wolffia arrhiza* as a Possible Source of Inexpensive Protein. *Nature*. 232 (5311). 495-495.
- Bog, M., Sree, K. S., Fuchs, J., Hoang, P. T., Schubert, I., Kuever, J., ... & Appenroth, K. J. (2020). A taxonomic revision of Lemna sect. Uninerves (Lemnaceae). *Taxon*. 69(1). 56-66.
- Childs, R. E., & Bardsley, W. G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical journal*, 145(1), 93-103.
- Chriki, S., & Hocquette, J.-F. (2020). The myth of cultured meat: A review. *Frontiers in Nutrition*, 7: 7. doi: 10.3389/fnut.2020.00007
- Courts, F. L., & Williamson, G. (2015). The occurrence, fate and biological activities of C-glycosyl flavonoids in the human diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1352-1367.
- Czerpak, R. & Szamrej, I. K. (2003). The effect of β -estradiol and corticosteroids on chlorophylls and carotenoids content in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm (Lemnaceae) growing in municipal Bialystok tap water. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(6): 677-684.
- Datar, I., & Betti, M. (2010). Possibilities for an in vitro meat production system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(1). 13-22.
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierec, J., Pelleschi-Travier, S., ... & Sakr, S. (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 4-21.
- Dias, M. C., Pinto, D. C., Freitas, H., Santos, C., & Silva, A. M. (2020). The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. *Phytochemistry*, 170, 112199.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2021). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. *EFSA Journal*, 19(7), e06506.
- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61(3): 275-278.
- FAO (2019). Five practical actions towards lowcarbon livestock. FAO, Rome.
- Fountain, H. (2013). Building a \$325,000 Burger. *The New York Times*. (Erişim Tarihi: 27.04.2022). <https://www.nytimes.com/2013/05/14/science/engineering-the-325000-in-vitro-burger.html>
- Global Hunger Index. (2020). 2020 Global Hunger Index By Severity. Select a country to view trends in detail. (Erişim Tarihi: 02.05.2022) <https://www.globalhungerindex.org/ranking.html>
- Hu, Z., Fang, Y., Yi, Z., Tian, X., Li, J., Jin, Y., ... & Zhao, H. (2022). Su mercimeğinin (*Wolffia arrhiza*) besin değeri ve antioksidan kapasitesinin yapay koşullar altında belirlenmesi. *LWT*, 153, 112477.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, 36(1), 54-67.
- Herawati, V. E., Pinandoyo, P., Darmanto, Y., Rısmanningsih, N., & Radjasa, O. K. (2020). The effect of fermented duckweed (*Lemna minor*) in feed on growth and nutritional quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7).
- Kacar, B. & İnal, A. (2010). Bitki Analizleri, 2. Baskı, Nobel Yayın, 912 s.
- Kafarski, P. (2012). Rainbow code of biotechnology. *Chemik*. 66(8): 811-816.
- Kalaitzoglou, P., Van Ieperen, W., Harbinson, J., Van der Meer, M., Martinakos, S., Weerheim, K., ... & Marcelis, L. F. (2019). Effects of continuous or end-of-day far-red light on tomato plant growth, morphology, light absorption, and fruit production. *Frontiers in Plant Science*, 10, 322.
- Kaplan, A., Zelicha, H., Tsaban, G., Meir, A. Y., Rinott, E., Kovsan, J., (2019). Protein bioavailability of *Wolffia globosa* duckweed, a novel aquatic plant-A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2576-2582.
- Keyhani, J., & Keyhani, E. (2012). Anti-oxidative stress enzymes in golden chanterelle (*Cantharellus cibarius*). In *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges* (pp. 23-27).
- Kumar, R., Yu, W., Jiang, C., Shi, C., & Zhao, Y. (2010). Improvement of the isolation and purification of lutein from marigold flower (*Tagetes erecta* L.) and its antioxidant activity. *Journal of Food Process Engineering*, 33(6), 1065-1078.

- Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Extraction of photosynthetic tissues: Chlorophylls and carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, F4. 2.1-F4. 2.6.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*, (Vol. 148, pp. 350-382), Academic Press.
- Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta, M. C., Menichini, F., Xiao, J., & Tundis, R. (2016). Edible flowers: a rich source of phytochemicals with antioxidant and hypoglycemic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2467-2474.
- Market Analysis Report (2022). Protein Supplements Market Size. Share & Trends Analysis Report By Source (Animal-based. Plant-based). By Product (Protein Powder. Protein Bars). By Application. By Distribution Channel. By Region. And Segment Forecasts. 2021-2030.
- Muslu, M. (2021). Yapay et (sentetik-kültür eti), küresel protein gereksinimi için alternatif bir kaynak olabilir. In *4th International Health Sciences and Life Congress Full Text Book-1 içinde (339-348ss)*. Burdur, Türkiye.
- OECD (2012). OECD environmental outlook to 2050: the consequences of inaction. OECD Publishing. Paris.
- Poore, J., Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*. 360(6392): 987-992.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Raiten, D.J., Allen, L.H., Slavin, J.L., Mitloehner, F.M., Thoma, G.J., Haggerty, P.A., Finley, J. W. (2020). Understanding the intersection of climate/environmental change, health, agriculture and improved nutrition: a case study on micronutrient nutrition and animal source foods. *Curr Dev Nutr*. 4(7): 1-8.
- Ritchie, H. (2019). Food Production Is Responsible for One-Quarter of the World's Greenhouse Gas Emissions Our World in Data. (Erişim Tarihi: 30.04.2022). <https://ourworldindata.org/food-ghg-emissions>
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76(2). 270-276.
- Scotter, M. J. (2011). Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Additives and Contaminants*, 28(5), 527-596.
- Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Shaddel, R., & Asili, J. (2016). Volatile composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant evaluation of the essential oil from *Nepeta sintonensis* Bornm. *Industrial Crops and Products*, 84, 224-229.
- Sree, K. S., Dahse, H. M., Chandran, J. N., Jahreis, G., & Appenroth, K. J. (2019). Duckweed for human nutrition: no cytotoxic and no antiproliferative effects on human cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(2), 223-224.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 16(3). 144-158.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales and C. de Haan. 2006. *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Food and Agricultural Organization. Rome. Italy. p390.
- Tamburino, L., Bravo, G., Clough, Y., Nicholas, K. A. (2020). From population to production: 50 years of scientific literature on how to feed the world. *Global Food Security*. 24: 100346.
- Taş, B., Topaldemir, H. (2021). Assessment of aquatic plants in the Miliç Coastal Wetland (Terme, Samsun, Turkey). *Review of Hydrobiology*. 14(1-2): 1-23.
- United Nations (UN). Department of Economic and Social Affairs. Population Division. (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423)*. New York.
- Viuda-Martos, M., Ciro-Gómez, G. L., Ruiz-Navajas, Y., Zapata-Montoya, J. E., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2012). In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) Leaves and Seeds. *Journal of Food Safety*, 32(4), 399-406.
- Wei, H., Wang, M., & Jeong, B. R. (2020). Effect of supplementary lighting duration on growth and activity of antioxidant enzymes in grafted watermelon seedlings. *Agronomy*, 10(3), 337.
- Yahaya, N., Hamdan, N. H., Zabidi, A. R., Mohamad, A. M., Suhaimi, M. L. H., Johari, M. A. A. M., ... & Yahya, H. (2022). Duckweed as a future food: Evidence from metabolite profile, nutritional and microbial analyses. *Future Foods*, 5, 100128.
- Yaskolka Meir, A., Tuohy, K., von Bergen, M., Krajmalnik-Brown, R., Heinig, U., Zelicha, H., ... & Shai, I. (2021). The metabolomic-gut-clinical axis of mankai plant-derived dietary polyphenols. *Nutrients*, 13(6): 1866.
- Ziegler, P., Adelmann, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17, 33-41.