

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



GIDA KAYNAKLI MAYALAR İLE BİYOSÜRFEKTANLARIN
ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

KÜBRA ERYAŞAR ÖRER

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN

BOLU, ARALIK - 2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

KÜBRA ERYAŞAR ÖRER tarafından hazırlanan “**GIDA KAYNAKLI MAYALAR İLE BİYOSÜRFEKTANLARIN ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir. 28/12/2022

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Ayşe AVCI
Sakarya Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR
Sakarya Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Elif Berna OLUTAŞ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 04/01/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 3 olarak tespit edilmiştir.

.....
KÜBRA ERYAŞAR ÖRER

ÖZET

GIDA KAYNAKLI MAYALAR İLE BİYOSÜRFEKTANLARIN ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

KÜBRA ERYAŞAR ÖRER

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SEDA KARASU YALÇIN)

BOLU, ARALIK - 2022

(XIX + 166)

Bu çalışmada ilk olarak gıda kaynaklı yerli 142 adet maya suşunun biyosüर्फektan üretimi kapasiteleri araştırılmıştır. Bu aşamada ön tarama testlerinin yanı sıra başlıca yüzey geriliminin düşürülmesi parametresi esas alınarak *Cyberlindnera fabianii* MİAU-1 suşu biyosüर्फektan üreticisi suş olarak seçilmiştir. Bu suşun biyosüर्फektan üretimi üzerine farklı karbon ve azot kaynakları türünün ve derişiminin etkilerinin araştırıldığı deneylerde glukoz (%10), ayçiçek yağı (%10), maya özütü (3 g/L) ve ürenin (3 g/L) bir arada kullanıldığı koşullarda ortam yüzey geriliminin 28.25 mN/m olarak optimum düzeyde düşürüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca gıda endüstrisi artıklarından (zeytin karasuyu, %20 ve artık kızartma yağı, %10) yararlanılarak hazırlanan besiyerinde üretilen biyosüर्फektan aracılığıyla, ortam yüzey geriliminde en yüksek 24.46 mN/m düzeyinde azalma sağlamıştır. Biyosüर्फektan üretiminin optimum tanımlı ve artık bazlı ortamlar kullanılarak fermentör koşullarında gerçekleştirildiği çalışmalarda sırasıyla 37.32 ve 6.26 g/L ham biyosüर्फektanın üretildiği bulunmuştur. Maya kaynaklı ham ve saflaştırılan biyosüर्फektanların biyokimyasal karakterizasyonu amacıyla FT-IR ve NMR yöntemlerinden yararlanılarak bu biyosüर्फektanların soforolipit yapısı taşıdıkları ortaya konmuştur. Tanımlı ve artık bazlı besiyerlerinde üretilen ham biyosüर्फektanların kritik misel derişimleri sırasıyla 42.68 ve 423.99 mg/L; saf biyosüर्फektanların ise 1290.27 ve 1813.80 mg/L olarak bulunmuştur. Tanımlı ortamda üretilen ham biyosüर्फektanın fonksiyonel özellikleri incelendiğinde ise öncelikle bu biyosüर्फektanın farklı ortam (pH, tuz derişimi ve sıcaklık) koşulları altında suyun yüzey gerilimini düşürme stabilitelerini genel olarak koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca üretilen biyosüर्फektan, *Listeria monocytogenes* (%89.23-92.03), *Salmonella* Enteritidis (%62.23-76.66) ve *Escherichia coli* (%45.83-58.34) patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite; *Staphylococcus aureus* ve *L. monocytogenes* kaynaklı biyofilm oluşumlarının sırasıyla en yüksek yaklaşık %67 ve %55.50 oranlarında önlenmesi için anti adezyon etki göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Biyosüर्फektan, *Cyberlindnera fabianii*, Fermentör, Soforolipit, Fonksiyonel özellikler

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS BY FOODBORNE YEASTS AND INVESTIGATION OF THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

PHD THESIS

KÜBRA ERYAŞAR ÖRER

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. SEDA KARASU YALÇIN)

BOLU, DECEMBER 2022

(XIX + 166)

In this study, firstly the biosurfactant production capacities of 142 food originated indigenous yeast strains were investigated. At this stage, *Cyberlindnera fabianii* MIAU-1 strain was selected as the biosurfactant producer strain based on the reducing of the surface tension parameter as well as the preliminary screening tests. In experiments searching the effects of different types and concentrations of carbon and nitrogen sources on the biosurfactant production of this strain, the surface tension of the medium was reduced to 28.25 mN/m at the optimum level when glucose (10%), sunflower oil (10%), yeast extract (3 g/L) and urea (3 g/L) were used together. In addition, the highest reduction in the surface tension of medium was achieved to be 24.46 mN/m by the biosurfactant produced in the medium prepared by using the food industrial wastes (olive mill wastewater, 20% and waste frying oil, 10%). In studies where biosurfactant production was carried out under bioreactor conditions using optimum defined and waste-based media, it was found that 37.3235 and 6.262 g/L crude biosurfactant were produced, respectively. For the biochemical characterization of the crude and also purified biosurfactants from the yeast, FT-IR and NMR methods were used and it was determined that these biosurfactants had a sophorolipid structure. The critical micelle concentrations of the crude biosurfactants produced in defined and waste-based media were found to be 42.68 and 423.99 mg/L and also these concentrations of the purified biosurfactants were 1290.27 and 1813.80 mg/L, respectively. When the functional properties of the crude biosurfactant produced in a defined medium were examined, it was determined that this biosurfactant generally maintained its stability by reducing the surface tension of water under different ambient (pH, salt concentration and temperature) conditions. In addition, the produced biosurfactant had antibacterial activity against the pathogens of *Listeria monocytogenes* (89.23-92.03), *Salmonella* Enteritidis (62.23-76.66%) and *Escherichia coli* (45.83-58.34); and also anti adhesion effect to prevent biofilm formations of *Staphylococcus aureus* and *L. monocytogenes* by the highest rates of approximately 67% and 55.50%, respectively.

KEYWORDS: Biosurfactant, *Cyberlindnera fabianii*, Bioreactor, Sophorolipid, Functional properties

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xvii
TEŞEKKÜR	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Biyosüpfektanların Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	4
2.2 Bakteriler Tarafından Biyosüpfektan Üretimi.....	7
2.3 Mayalar Tarafından Biyosüpfektan Üretimi	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1 Materyal	35
3.1.1 Maya Kùltürleri	35
3.1.2 Bakteri Kùltürleri.....	35
3.1.3 Küf Kùltürleri	36
3.1.4 Tanımlı Fermantasyon Ortamlarında Kullanılan Karbon Kaynağı Bileşenleri	36
3.1.5 Tanımlı Fermantasyon Ortamlarında Kullanılan Azot Kaynağı Bileşenleri	36
3.1.6 Doğal Fermantasyon Ortamı Hazırlığında Hammadde Olarak Kullanılan Gıda Artıkları	37
3.1.6.1 Portakal ve Limon Kabukları	37
3.1.6.2 Balkabağı Kabuğı	37
3.1.6.3 Elma ve Havuç	37
3.1.6.4 Zeytin Karasuyu	37
3.1.6.5 Artık Kızartma Yağı.....	37
3.1.7 Süpfektanlar	37
3.1.8 Biyosüpfektan Üretiminin İncelendiğı Deney Düzenegi	38
3.2 Metot.....	38
3.2.1 Maya Suşlarının Biyosüpfektan Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi	38
3.2.1.1 Tween 80 Agar Testi.....	38
3.2.1.2 Hidrokarbon Agar Testi	38
3.2.2 Maya Suşlarının Biyosüpfektan Üretimlerinin Fermantasyon Ortamında İncelenmesi	39

3.2.2.1	Fermantasyon Ortamına Aşıl原因an Kùltürün Hazırlanması	39
3.2.2.2	Yağ Yayma Testi.....	39
3.2.2.3	Yüzey Gerilimi Analizi	39
3.2.2.4	Maya Kuru Ağırlığının Belirlenmesi	40
3.2.2.5	Maya Sayısının Belirlenmesi	41
3.2.3	Fermantasyon Ortamı İçin Karbon Kaynağı Bileşenlerinin Belirlenmesi	41
3.2.4	Fermantasyon Ortamında Azot Kaynağı Bileşenlerinin Belirlenmesi	42
3.2.5	Deney Tasarımının Oluşturulması, Yanıtın Modellenmesi ve Besiyerinde Yer Alan Bileşenlerin Optimum Derişimlerinin Belirlenmesi	43
3.2.5.1	Deney Tasarımı	43
3.2.5.2	Yüzey Gerilimindeki Azalmanın Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi	44
3.2.5.3	Optimizasyon	44
3.2.6	Gıda Artıklarından Fermantasyon Ortamlarının Hazırlanmaları.....	45
3.2.6.1	Artık Kızartma Yağı İçeren Fermantasyon Ortamı.....	45
3.2.6.2	Portakal ve Limon Kabuğı Ekstraktları İçeren Fermantasyon Ortamı	46
3.2.6.3	Balkabağı Kabuğı Ekstraktı İçeren Fermantasyon Ortamı	46
3.2.6.4	Elma ve Havuç Artığı Ekstraktları İçeren Fermantasyon Ortamı	46
3.2.6.5	Zeytin Karasuyu İçeren Fermantasyon Ortamı	47
3.2.6.6	Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Sakkaroz, Fruktoz ve Glukoz Analizleri	47
3.2.6.7	Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Kalıntı Yağ Miktarı Analizi	47
3.2.7	Biyosürefektan Üretiminin Fermentör Koşullarında Gerçekleştirilmesi	47
3.2.8	Biyosürefektan Ekstraksiyonu.....	48
3.2.9	Biyosürefektan Saflaştırılması	48
3.2.10	Biyosürefektanların Biyokimyasal Karakterizasyonu	49
3.2.11	Kritik Misel Derişimi Değerlerinin Belirlenmesi	49
3.2.11.1	Biyosürefektanların Kritik Misel Derişimlerinin Belirlenmesi	49
3.2.11.2	Sürefektanların Kritik Misel Derişimlerinin Belirlenmesi	50
3.2.12	Biyosürefektanın Çeşitli Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması	50
3.2.12.1	Farklı Ortam Koşullarında Biyosürefektanın Suyun Yüzey Gerilimini Düşürmesi Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	50
3.2.12.2	Biyosürefektanın Antimikrobiyel Aktivitesinin Belirlenmesi ..	51
3.2.12.3	Biyosürefektanın Anti Adezyon Aktivitesinin Belirlenmesi	52
3.2.12.4	Biyosürefektanın Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi	53
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	54
4.1	Biyosürefektan Üreticisi Suşun Seçimi	54
4.1.1	Tween 80 ve Hidrokarbon Agar Kullanılarak Yapılan Suş Taraması	54
4.1.2	Yağ Yayma Testi ve Yüzey Gerilimi Analizlerine Ait Sonuçlar	57
4.2	Fermantasyon Ortamı Bileşenlerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar	65
4.2.1	Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi.....	65
4.2.1.1	Karbon Kaynağı Olarak Glukoz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler	65
4.2.1.2	Karbon Kaynağı Olarak Fruktoz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler	68

4.2.1.3	Karbon Kaynağı Olarak Sakkaroz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler	71
4.2.1.4	Karbon Kaynağı Olarak Gliserol ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler	75
4.2.1.5	Karbon Kaynağı Olarak Gliserol ve Farklı Şekerler ile Glukoz ve Ayçiçek Yağının Kullanıldığı Deneyler.....	77
4.2.1.6	Besiyeri Bileşiminde Tek Başına Glukoz ve Ayçiçek Yağının Kullanıldığı Deneyler.....	78
4.2.1.7	Karbon Kaynağının Belirlenmesine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirmesi	80
4.2.2	Azot Kaynaklarının Belirlenmesi	81
4.2.2.1	Azot Kaynağının Belirlenmesine Yönelik Olarak Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirilmesi.....	84
4.3	Fermantasyon Ortamı Bileşiminin Belirlenmesi İçin Deney Tasarımı, Yanıtın Modellenmesi ve Optimizasyonu	85
4.3.1	Bağımsız Değişkenlerin Yüzey Gerilimindeki Azalma Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi	89
4.3.2	Fermantasyon Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu	96
4.3.3	Fermantasyon ortamı bileşimi derişimlerinin belirlenmesi çalışmalarının genel değerlendirmesi	97
4.4	Çeşitli Gıda Artıkları Kullanılarak Hazırlanan Besiyerlerinin <i>Cyb. fabianii</i> MIAU-1 Suşu ile Biyosüpfektan Üretiminde Değerlendirilmesi	98
4.4.1	Zeytin Karasuyu ve Artık Kızartma Yağı İçeren Besiyerlerinin Biyosüpfektan Üretimi İçin Kullanımı.....	98
4.4.2	Bazı Meyve ve Sebze Artıkları ile Artık Kızartma Yağı İçeren Besiyerlerinin Biyosüpfektan Üretimi İçin Kullanımı	102
4.4.3	Bazı Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirmesi.....	107
4.5	Biyosüpfektan Üretimine Fermentörde Gerçekleştirilmesi	111
4.6	Tanımlı ve Gıda Artığı Bazlı Besiyerleri Kullanılarak Üretilen Biyosüpfektanların Ekstraksiyonu ve Miktarlarının Belirlenmesi.....	113
4.6.1	Tanımlı ve Gıda Artığı Bazlı Besiyerleri Kullanılarak Üretilen Biyosüpfektan Miktarlarının Genel Değerlendirilmesi.....	116
4.7	Tanımlı ve Gıda Artığı İçeren Besiyerlerinde Üretilen Biyosüpfektanların Karakterizasyonu	118
4.7.1	Biyosüpfektanların FT-IR ile Karakterizasyonu	118
4.7.2	Biyosüpfektanların NMR ile Karakterizasyonu	122
4.8	Biyosüpfektanların Kritik Misel Derişimleri ve Süpfektanların Kritik Misel Derişimleri ile Karşılaştırılması	127
4.8.1	Biyosüpfektanların Kritik Misel Derişimleri	127
4.8.2	Süpfektanların Kritik Misel Derişimleri ve Biyosüpfektanlar ile Karşılaştırılması	132
4.9	Biyosüpfektanın Çeşitli Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması	134
4.9.1	Farklı Ortam Koşulları Altında Biyosüpfektanın Yüzey Gerilimini Düşürme Stabilesinin Değerlendirilmesi.....	134
4.9.2	Biyosüpfektanın Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	136
4.9.3	Biyosüpfektanın Anti Adezyon Aktivitesinin Belirlenmesi.....	141
4.9.4	Biyosüpfektanın Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	143
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	144
6.	KAYNAKLAR.....	149

7. EKLER.....	163
EK 1 Biyosüpfektan Üretimi Amacıyla Taranan Maya Suşları.....	163
EK 2 <i>Cyb. fabianii</i> MIAU-1 Suşunun Absorbans-Yaş Ağırlık ve Kuru Ağırlık- Yaş Ağırlık Çalışma Doğruları.....	165
EK 3 İstenen Hedefe Ulaşma Fonksiyonu ile Yapılan Nümerik Optimizasyonda Elde Edilen Çözümler	166



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Glukoz ve yağ asiti içeren bir fermantasyon ortamında soforolipit üretimi sırasında gerçekleşen birincil ve ikincil metabolik iz yolları (121)	21
Şekil 4.1. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, glukoz (%10) ve yağ (%10) içeren fermantasyon ortamlarında maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	69
Şekil 4.2. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, fruktoz (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	72
Şekil 4.3. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, sakkaroz (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	74
Şekil 4.4. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, gliserol (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	77
Şekil 4.5. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, gliserole (%10) ek olarak glukoz (%10), fruktoz (%10) ve sakkaroz (%10) ve ayrıca tek başına %20 oranında gliserol içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	78
Şekil 4.6. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, tek başına %20 oranında glukoz ve ayçiçek yağı içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	79
Şekil 4.7. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerlerinde azot kaynağı olarak maya özütü, pepton, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat bulunan ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri	83
Şekil 4.8. Yüzey gerilimindeki azalma miktarı (Y) için deneysel değere karşı modele ait tahminsel değere ($R^2 = 0.958$)	89
Şekil 4.9. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve ayçiçek yağı derişiminin etkileri ($X_3 = 2$ g/L; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)	92
Şekil 4.10. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve üre derişiminin etkileri ($X_2 = \%6$; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)	92
Şekil 4.11. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_2 = \%6$; $X_3 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)	93
Şekil 4.12. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine ayçiçek yağı derişimi ve üre derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)	94
Şekil 4.13. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine ayçiçek yağı derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_3 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)	95
Şekil 4.14. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine üre derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_2 = \%6$; YG yüzey gerilimi)	95

Şekil 4.15. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, zeytin karasuyu (%10-90) ve artık kızartma yağı (%10) içeren ortamlarda maya sayılarının zamanla değişimleri.....	101
Şekil 4.16. <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu için, farklı meyve ve sebze artıkları ile hazırlanan ekstraktlara ek olarak veya tek başına artık kızartma yağının (%10) içeren ortamlarda maya sayılarının zamanla değişimleri..	106
Şekil 4.17. Tanımlı optimum bileşimdeki besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen ham ve saflaştırılan biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (HBS: Ham biyosüpfektan; SBS: Saf biyosüpfektan).....	119
Şekil 4.18. Gıda artığı içeren (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen ham ve saflaştırılan biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosüpfektan; ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan).....	120
Şekil 4.19. Tanımlı ve gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (HBS: Ham biyosüpfektan; ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosüpfektan).....	121
Şekil 4.20. Tanımlı ve gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen saf biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (SBS: Saf biyosüpfektan; ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan).....	122
Şekil 4.21. Tanımlı besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanın NMR spektrumu	123
Şekil 4.22. Tanımlı besiyerinde üretilen saf biyosüpfektanın NMR spektrumu (SBS: Saf biyosüpfektan).....	124
Şekil 4.23. Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanların NMR spektrumu (ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosüpfektan)	125
Şekil 4.24. Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen saf biyosüpfektanların NMR spektrumu (ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan)	126
Şekil 4.25. Tanımlı besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen ham biyosüpfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik	128
Şekil 4.26. Tanımlı besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen saf biyosüpfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik	128
Şekil 4.27. Gıda artığı bazlı besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen ham biyosüpfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik	129
Şekil 4.28. Gıda artığı bazlı besiyerinde <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile üretilen saf biyosüpfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik	129
Şekil 4.29. Tween 80 süpfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik	133
Şekil 4.30. Triton x-100 süpfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik.....	133
Şekil 4.31. Sodyum lauril sülfat süpfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik.....	134

Şekil 4.32.	Biyosüpfektanın farklı pH (a), tuz derişimleri (b), sıcaklık (c) ve 121°C’de süre (d) koşulları altında suyun yüzey gerilimini düşürme stabiliteleri.....	137
Şekil 4.33.	Ham biyosüpfektanın 0.019-50 mg/mL derişimlerinin <i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694, <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 türlerine karşı antibakteriyel etkileri.....	138
Şekil 4.34.	Biyosüpfektanın 0.19-1.562 mg/mL (a) ve 3.125-50 mg/mL (b) derişimlerinin <i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694 suşuna, 0.19-3.125 mg/mL (c) ve 6.25-50 mg/mL (d) derişimlerinin <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888 suşuna karşı antibakteriyel etkileri.....	139
Şekil 4.35.	Ham biyosüpfektanın 0.019-10 mg/mL derişimlerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 türlerine karşı anti adezyon etkisi	142
Şekil 7.1.	<i>Cyb. fabianii</i> MIAU-1 suşu için, absorbans - yaş ağırlık çalışma doğrusu ($\lambda = 660$ nm; $y = 1.02751x - 0.05347$; $R^2 = 0.981$)	165
Şekil 7.2.	<i>Cyb. fabianii</i> MIAU-1 suşu için, kuru ağırlık - yaş ağırlık çalışma doğrusu ($y = 0.17626x + 0.000199135$; $R^2 = 0.992$)	165
Şekil 7.3.	Design Expert® 9.0.6 programında nümerik optimizasyonda elde edilen çözümlere ait görüntü.....	166

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bakteri kaynaklı çeşitli biyosüpfektan üretimi çalışmalarında kullanılan ortam bileşimleri ve elde edilen bazı bulgular	11
Tablo 2.2. Maya kaynaklı çeşitli biyosüpfektanların üretim çalışmalarında kullanılan ortamlar ve elde edilen bazı bulgular	23
Tablo 2.2. Devam ediyor	24
Tablo 3.1. Karbon kaynağının seçilmesine yönelik olarak denemeye alınan besiyeri bileşimleri	42
Tablo 3.2. Merkezi karma tasarımda kullanılan bağımsız değişkenler	44
Tablo 4.1. Taranan 142 adet maya arasından biyosüpfektan üretim potansiyeline sahip olan maya suşları	55
Tablo 4.2. Biyosüpfektan üretim potansiyeli düşük olarak belirlenen maya suşları ile elde edilen yağ yayma çapları ve en yüksek çapın görüldüğü saatler	58
Tablo 4.3. Yağ yayma testi sonucunda, 1 cm ve üstünde yağ yayma çapı oluşturan maya suşları ve elde edilen çap değerlerinin (cm) zamanla değişimleri	59
Tablo 4.4. Biyosüpfektan üreticisi maya suşlarına ait en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	63
Tablo 4.5. Karbon kaynağı olarak glukoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	66
Tablo 4.6. Karbon kaynağı olarak glukoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	67
Tablo 4.7. Karbon kaynağı olarak fruktoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	70
Tablo 4.8. Karbon kaynağı olarak fruktoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	71
Tablo 4.9. Karbon kaynağı olarak sakkaroz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	72
Tablo 4.10. Karbon kaynağı olarak sakkaroz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki	

maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	73
Tablo 4.11. Karbon kaynağı olarak gliserol (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	76
Tablo 4.12. Karbon kaynağı olarak gliserol (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	76
Tablo 4.13. Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler	82
Tablo 4.14. Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılan besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri ve yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ile bu azalmanın görüldüğü saatler	82
Tablo 4.15. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri	86
Tablo 4.16. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri	87
Tablo 4.17. Deneylerde hesaplanan yüzey geriliminde azalma miktarları	88
Tablo 4.18. Glukoz derişimi (X_1), ayçiçek yağı derişimi (X_2), üre derişimi (X_3) ve maya özütü derişiminin (X_4) yüzey geriliminde azalma miktarı (Y) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları	91
Tablo 4.19. Biyosürefektan üretimi optimizasyonunda kullanılan değişkenler, belirlenen hedefler ve değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri	96
Tablo 4.20. Biyosürefektan üretimi için belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için getirilen yaklaşımlar	97
Tablo 4.21. Artık kızartma yağı (%10) ve farklı derişimlerde (%10-90) zeytin karasuyu içeren besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	100
Tablo 4.22. Zeytin karasuyu (%10-90) ve artık kızartma yağından (%10) oluşan besiyerlerinde kalan yağ miktarları	102
Tablo 4.23. Artık kızartma yağı (%10) ve çeşitli gıda artıkları kullanılarak hazırlanan besiyerleri ile artık kızartma yağı (%10 ve 20) ve distile su içeren besiyerlerinde, <i>Cyb. fabianii</i> suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler	104
Tablo 4.24. Meyve ve sebze ekstraktı bazlı besiyerlerinin başlangıç ve fermantasyon sonunda besiyerlerinde kalan şeker derişimleri	106
Tablo 4.25. Meyve ve sebze ekstraktı bazlı ve yalnızca artık kızartma yağından oluşan besiyerlerinde kalan yağ derişimleri	107
Tablo 7.1. Biyosürefektan üretimi amacıyla taranan maya suşları	163

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

- Fotoğraf 4.1.** *C. famata* M22 suşunun tween 80 agar besiyerindeki gelişimine ait görüntü 56
- Fotoğraf 4.2.** *W. anomalous* MFİAHb-4 suşunun Hidrokarbon agar besiyerindeki gelişimine ait görüntü..... 56
- Fotoğraf 4.3.** *G. silvicola* M15 (a; 3.7 cm), *W. anomalous* MFİAD-1 (b; 2.5 cm), *G. silvicola* M6 (c; 5 cm), *D. hansenii* 31/1 (d; -) ve *W. anomalous* MFKBHb-2 (e; 1.7 cm) suşlarına ait yağ yayma testi sonuçları.... 61
- Fotoğraf 4.4.** Fermentör ortamında *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretiminde fermantasyon sonuna (48 saat) ait örnek bir görüntü. 112
- Fotoğraf 4.5.** Tanımlı bileşimde besiyerinde *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile üretilen ham formdaki biyosüpfektana ait bir görüntü 114
- Fotoğraf 4.6.** Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık kızartma yağı, %10) besiyerinde *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile üretilen ham formdaki biyosüpfektana ait bir görüntü 114

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Kısaltmalar

AKY	: Artık Kızartma Yağı
AY	: Ayçiçek Yağı
BKE	: Balkabağı Kabuğu Ekstraktı
BS	: Biyosüpfektan
F	: Fruktoz
FT-IR	: Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)
FY	: Fındık Yağı
GLİ	: Gliserol
GLU	: Glukoz
HBS	: Ham Biyosüpfektan
KEPE	: Kabuklu Elma Posası Ekstraktı
KHPE	: Kabuklu Havuç Posası Ekstraktı
KMD	: Kritik Misel Derişimi
KY	: Kanola Yağı
LKE	: Limon Kabuğu Ekstraktı
MY	: Mısır Yağı
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)
PDA	: Potato Dextrose Agar
PKE	: Portakal Kabuğu Ekstraktı
PY	: Pamuk Yağı
S	: Sakkaroz
SBS	: Saf Biyosüpfektan
SL	: Soforolipit
TSB	: Tryptic Soy Broth
YG	: Yüzey Gerilimi
YG_a	: Yüzey Gerilimindeki Maksimum Azalma Miktarı
ZHBS	: Zeytin Karasuyu İçeren Ortamda Üretilen Ham Biyosüpfektan
ZKS	: Zeytin Karasuyu
ZSBS	: Zeytin Karasuyu İçeren Ortamda Üretilen Saf Biyosüpfektan
ZY	: Zeytinyağı

Semboller

k	: Bağımsız Değişken Katsayısı
No	: Biyosürefektan İçermeyen Kuyucuktaki Bakteri Sayısı
Nc	: Biyosürefektan İçeren Kuyucuktaki Bakteri Sayısı
OD₀	: Bakteri İçeren Kuyucuktaki Optik Yoğunluğu
OD₁	: Biyosürefektan ve Bakteri İçeren Kuyucuktaki Bakteri Sayısı
OD₂	: Biyosürefektan İçeren Kuyucuktaki Bakteri Sayısı
R²	: Belirleme Katsayısı
X₁	: Glukoz Derişimi
X₂	: Ayçiçek Yağı Derişimi
X₃	: Üre Derişimi
X₄	: Maya Özütü Derişimi
X₁X₂	: Glukoz ve Ayçiçek Yağı Derişimlerinin Etkileşimi
X₁X₃	: Glukoz ve Üre Derişimlerinin Etkileşimi
X₁X₄	: Glukoz ve Maya Özütü Derişimlerinin Etkileşimi
X₂X₃	: Ayçiçek Yağı ve Üre Derişimlerinin Etkileşimi
X₂X₄	: Ayçiçek Yağı ve Maya Özütü Derişimlerinin Etkileşimi
X₃X₄	: Üre ve Maya Özütü Derişimlerinin Etkileşimi
X₃X₄	: Üre ve Maya Özütü Derişimlerinin Etkileşimi
Y	: Yanıt Değeri

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgileri ile beni yönlendiren, lisansüstü eğitimim boyunca yakın ilgisi ile bana her konuda destek ve yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a,

Çalışmalarımın bir bölümünü laboratuvarında gerçekleştirdiğim ve bu çalışmalar sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Üniversitemiz Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Berna OLUTAŞ'a,

Tez izleme komitesi jürimde değerli görüş ve önerileri ile tezime katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR ve Sayın Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya,

Tez çalışmamı “Yerel *Cyberlindnera fabianii* Suşu ile Biyosüpfektan Üretimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı ve 1200484 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Çalışmamda, laboratuvarlarında bulunan bazı cihazlardan yararlanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Üniversitemiz Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erkan YALÇIN'a ve Üniversitemiz Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Erhan BUDAK'a,

Araştırmada kullanılan küf kültürlerinin sağlanmasıdaki desteklerinden dolayı Üniversitemiz Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Göksel ÖZER'e, bazı maya kültürlerini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ'a, bakteri kültürlerinin sağlanmasıdaki yardımları için Gıda Yüksek Mühendisi F. Havva ARI YILDIZ'a, zeytin karasuyunu sağlayan Eriklice Kooperatifi Zeytinyağı işletmesine, artık kızartma yağının sağlanmasıdaki destekleri için BEYPİLİÇ'e, bazı analizler için hizmet alımı yaptığım Üniversitemiz Yenilikçi Gıda Teknolojileri Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (YENİGİDAM) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (ARUM),

Tez çalışmam süresince verdikleri destekten dolayı değerli çalışma arkadaşlarıma, Bölümümüz Biyoteknoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında bir arada çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili laboratuvar arkadaşlarıma ve

Sevgili Aileme ve Eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Süpfektanlar, hidrofilik ve hidrofobik molekül yapılarını bir arada bulundurmalarından dolayı suyun yüzey gerilimini etkin bir şekilde düşüren ve şampuan, deterjan ve diş macunu gibi ürünlerde sıklıkla kullanılan yüzey aktif maddelerdir. Üretimleri petrol bazlı kaynaklardan sağlanan süpfektanların küresel ölçekte satış tutarının 2024 yılına kadar 40 milyar Dolara ulaşması beklenmektedir. Mikrobiyel süpfektan veya biyosüpfektanlar ise bakteri ve mayalar aracılığıyla yenilenebilir ve sürdürülebilir şekilde üretilen yüzey aktif maddeler sınıfındadır. Genel olarak 2020 yılında yaklaşık 460 bin ton üretilen biyosüpfektanların küresel pazarının ise 2022 yılında 5.5 milyar Dolar olması öngörölmüşür (1,2).

Biyosüpfektanlar, yüzey gerilimi düşürme ve emülsiyon oluşturma fonksiyonlarının yanı sıra antimikrobiyel ve anti adezyon aktiviteye sahip olmaları dolayısıyla çoklu fonksiyonel bir bileşen olarak ön plana çıkmaktadır (3). Literatür genel olarak incelendiğinde bakterilerden yararlanılarak biyosüpfektan üretiminin bakteri türü çeşitliliği, kimyasal tanımlı ortam ve atık/artık bileşenlerinden oluşan fermentasyon ortamları, yüzey aktif özellikleri, biyokimyasal karakterizasyonu, antimikrobiyel ve anti adezyon aktiviteleri ve başlıca çevre ve gıda alanlarında kullanım potansiyelleri bakımından kapsamlı olarak incelendiği oldukça fazla sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (4,5). Bununla beraber, mayalar aracılığıyla gerçekleştirilen ve sayıca daha az olan biyosüpfektan üretimi çalışmalarında, potansiyel biyosüpfektan üreticisi maya suşlarının belirlenmesi, uygun fermentasyon ortamlarının seçilmesi ve biyosüpfektanların biyokimyasal karakterizasyonuna yönelik uygulamaların ağırlık kazandığı görölmektedir. Maya kaynaklı biyosüpfektanların üretimi amacıyla hidrofilik veya hidrofobik özellik gösteren çeşitli tanımlı substratlar, gıda endüstrisi artıkları veya bu iki bileşenin karışımlarını içeren fermentasyon ortamlarından yararlanılan ve bu ortamlarda biyosüpfektan üretim miktarlarının araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır (6–8). Biyosüpfektanların biyokimyasal yapılarının glukolipit ve soforolipit olarak belirlendiği aktarılmaktadır (9,10). Mayalar aracılığıyla üretilen biyosüpfektanların fonksiyonel özelliklerine yönelik çalışmaların ise, bakteriyel biyosüpfektanların fonksiyonel özelliklerinin araştırıldığı çalışmalara göre daha sınırlı düzeyde olduğu görölmektedir (11–13).

Literatürde yer alan çalışmalarda kullanılan bakteri ve mayaların izolasyon kaynakları büyük bir çoğunlukla toprak ve su gibi çevre örneklerinden oluşmaktadır. Bununla beraber, son yıllarda yapılan bir çalışmada (14) biyosüpfektan üretimi amacıyla gıda kaynaklı bir *Wickerhamomyces anomalus* suşundan yararlanılması, Archana ve ark. (9) tarafından farklı kaynaklardan izole edilen birçok maya arasında gıda kaynaklı bir suşun seçilmiş olması ve ayrıca Derguine-Mecheri ve ark. (15) tarafından yürütülen bir çalışmada izolasyon kaynağı farklı pek çok gıda ve bazı gıda artıkları olan suşların biyosüpfektan üreticisi bir suшта bulunması gereken bazı özelliklere sahip olduğunun belirlenmesi dikkat çekmiştir.

Bu tez çalışmasının ana hipotezi; laboratuvarımızda bulunan gıda kaynaklı yerli maya izolatları arasında biyosüpfektan üreten türlerin tespit edileceğine yönelik beklenti olmuştur. Yapılan suş taraması amacıyla gerçekleştirilen çeşitli deneylerde ön plana çıkan *Cyberlindnera fabianii* türüne literatürde henüz biyosüpfektan üretimi çalışmalarında rastlanmamış ve ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır. Bu türün *Candida fabianii* türünün telemorfu olduğu ve askospor oluşturarak ürettiği bilinmektedir. Ayrıca *Cyberlindnera* cinsi mayaların özellikle endüstriyel artıklarda kontaminant olarak bulundukları belirtilmektedir (16). Literatürü destekleyen şekilde tez çalışmasında biyosüpfektan üreticisi mikroorganizma olarak belirlenen *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşunun izolasyon kaynağı makarna endüstrisi artığı olan irmik altı unudur.

Literatürde *Cyb. fabianii* mayasından, enzim üretimi ve alkol fermantasyonunda aroma geliştirilmesinin yanı sıra atık su arıtımı prosesi ve ağır metallerin uzaklaştırılmasında yararlanıldığı bildirilmektedir (17–20). Bununla beraber, Balan ve ark. (11) tarafından izolasyon kaynağı deniz sedimenti olan *Cyb. saturnus* mayası ile üretilmiş olan yeni bir biyosüpfektanın bazı fonksiyonel özelliklere sahip olduğunun rapor edilmiş olması bu çalışmada üretilecek biyosüpfektanın da bu anlamda bir potansiyel taşıdığı fikrini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında biyosüpfektan üretimi deneyleri gıda kaynaklı, yerli ve yeni bir tür kullanılarak hem tanımlı hem de bazı gıda endüstrisi artıklarından hazırlanan fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Biyosüpfektan üretiminin en yüksek düzeyde sağlandığı optimum tanımlı ve artık bazlı ortam bileşimlerinin belirlenmesinin ardından, bu ortamlarda *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen biyosüpfektanların biyokimyasal yapılarının tanımlanması ve

yüzey aktif özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca tanımlı optimum fermantasyon ortamında üretilen ham formda biyosüpfektanın antibakteriyel ve antifungal etkilerinin ve ayrıca biyofilm oluşumunun engellenmesine yönelik anti adezyon aktivitelerini kapsayan fonksiyonel özellikleri araştırılmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Biyosürfektanların Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Sürfektanlar başlıca yüzey gerilimi düşürme ve emülsiyon oluşturma fonksiyonel özelliklerine sahip olan yüzey aktif bileşiklerdir (1,21). Sürfektanlar oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olup deterjan, temizlik, kişisel bakım ve kozmetik ürünlerinin bileşiminde aktif bileşen olarak yer almakta ve petrol, eczacılık, tarım ve gıda alanlarını da kapsayan birçok sektörün çeşitli alanlarında kullanılmaktadırlar (14,22,23). Her yıl dünya çapında yaklaşık olarak 15 milyon ton sürfektan üretimi gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Bununla beraber, petrokimyasal kaynaklardan elde edilen kimyasal sürfektanların yüksek toksisite ve zayıf biyodegradasyon özelliği göstererek çevresel tehlikelere yol açma potansiyeli dikkate alındığında, yenilenebilir ve sürdürülebilir doğa dostu bir üretim olarak değerlendirilen biyolojik kaynaklı sürfektan üretimi ile ilgili olarak yapılan çalışmaların ilgi çekici oldukları görülmektedir. Geleneksel üretim teknolojilerine ‘temiz alternatif’ olarak ön plana çıkan biyosürfektanların dünya genelindeki Pazar payının yıllık %5.5 büyüme hızı ile 2025 yılına kadar 4.8 milyar Avroya yükseleceği öngörülmektedir (14,24). Küresel ölçekte biyosürfektan pazar hacminin 2020 yılı itibarıyla yaklaşık 461 bin ton olduğu ifade edilmektedir (25).

Mikrobiyel sürfektan veya biyosürfektanlar, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen yüzey aktif maddeler sınıfındadır. Hidrofilik ve hidrofobik molekül yapılarını bir arada bulundurmalarından dolayı amfifilik bir bileşen olarak bilinen biyosürfektanlar karbonhidrat, peptit, karboksilik asit, aminoasit, alkol ve fosfat bileşenlerini hidrofilik; yağ asitleri ve türevlerini ise hidrofobik molekül olarak taşımaktadır (26). Biyosürfektanlar hidrofobik bileşen içeren besiyerlerinin (bitkisel yağ, hidrokarbon vb.) yanı sıra; karbonhidrat, şeker ve gliserol gibi bileşenler içeren hidrofilik besiyerleri kullanılarak mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir (27).

Biyosürfektanların ağırlıklı olarak lipopeptit, lipoprotein ve glukolipit yapısına sahip oldukları bilinmektedir (23). Yaygın olarak *Bacillus subtilis* aracılığıyla üretilen biyosürfektanlar olmak üzere, diğer *Bacillus* sp. aracılığıyla üretilen biyosürfektanların lipoprotein yapıda oldukları ifade edilmektedir (5,28,29). Lipopeptitlerin aminoasit bileşimi ve yağ asidi zinciri uzunluğuna göre

sınıflandırıldığı ve özellikle surfaktinlerin sıklıkla çalışıldığı belirtilmektedir. Literatürde *Streptomyces* sp. (30), *Pontibacter korlensis* (4) ve *Brevibacterium luteolum* (31) gibi farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfektanların lipopeptit olarak karakterize edildiği çalışmalara da rastlanmaktadır.

Glukolipit yapıdaki biyosürfektanlar içerisinde genel olarak ramnolipitler ve soforolipitlerin (SL) yanı sıra trehaloz lipitler, mannosil eritritol lipitler, sellobiyoz lipitler, monogliserit, lipomannosil-mannitoller, lipoarabinomannanlar ve lipomannanlar gibi pek çok alt türü yer almaktadır (22). Üretimi sıklıkla çalışılan biyosürfektanlardan biri olan ramnolipitler yaygın olarak *Pseudomonas aeruginosa* aracılığıyla üretilmektedir (32,33). Literatürde yer alan farklı çalışmalarda *Wickerhamomyces anomalus* (14) ve *Cyberlindnera saturnus* (11) mayaları ve ayrıca diğer bazı bakteriler (34–36) tarafından üretilen biyosürfektanların glukolipit yapıya sahip oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, mayaların kullanıldığı çalışmalarda sıklıkla yer alan ve soforolipit olarak belirtilen glukolipit yapıda biyosürfektanların üretimi *Starmerella bombicola*, *Candida bombicola* türünün yanı sıra bazı *Candida* cinsi mayalar ve diğer maya türleri ile gerçekleştirilmektedir (6,9,37–40).

Mikrobiyel olarak elde edilen fosfolipitler ve yağ asitlerinin de biyosürfektan olarak değerlendirildiği belirtilmektedir. Bir diğer biyosürfektan türü olan polimerik sürfektanların kimyasal yapılarında ise lipoheteropolisakkarit, heteropolisakkarit veya protein-şeker-lipit kompleksi içeren çeşitli moleküller bulunmaktadır (41). Biyosürfektan üreticisi olarak *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus paracasei*'nin kullanıldığı çalışmalarda elde edilen biyosürfektanların glukolipopeptit yapısında oldukları rapor edilmiştir (42,43).

Gıda endüstrisi de dahil petrol, tarım, eczacılık, deterjan, tekstil ve boya olmak üzere diğer birçok endüstride geniş uygulama alanı bulunan biyosürfektanlar, yüzey gerilimi düşürme, emülsiyon oluşturma ve stabilizasyonu fonksiyonlarının yanı sıra antimikrobiyel ve anti adezyon aktiviteye sahip olmaları nedeniyle çoklu fonksiyonel bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Ayrıca biyosürfektanların temizleme ve ıslatma kapasitesinin yanı sıra emülsiyon ve köpük oluşturma gibi bazı fonksiyonel özellikleri dolayısıyla şampuan, diş macunu, nemlendirici ve diğer birçok cilt bakımı ve sağlık bakım ürünleri bileşimlerinde aktif bir bileşen olarak yer aldıkları belirtilmektedir (3,44).

Biyosüpfektanların emülsifiye edici bir bileşen olarak kullanıldığı yaygın alanlardan biri gıda endüstrisidir (45). Genel olarak yüksek molekül ağırlıklı polimerik biyosüpfektanların emülsiyon oluşumu ve kararlılığında daha etkin oldukları, düşük molekül ağırlıklı süpfektanların ise etkin bir şekilde yüzey gerilimini düşürdükleri ifade edilmektedir (21,41). Biyosüpfektanların gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımları üzerine yapılan çalışmalarda son yıllarda bir artış olduğu görülmektedir (46–50). Mnif ve ark. (46) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ekmek üretiminde tekstürel özelliklerin geliştirilerek bayatlamının geciktirilmesinde biyosüpfektan katkısının soya lesitinine kıyasla daha başarılı bulunduğu belirtilmiştir. Benzer bir çalışmada kurabiye bileşimine eklenen *B. subtilis* kaynaklı biyosüpfektanın hamurun tekstür özelliklerinin geliştirilmesinde gliserol monostearata göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (49). Campos ve ark. (47) tarafından yapılan bir çalışmada *Candida utilis*’ten izole edilen biyosüpfektanın stabil bir emülsiyon oluşturmada yetersiz kalmakla birlikte stabilizör olarak guar gam ile desteklendiğinde mayonez üretiminde kullanılabildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada ise, kurabiye hamuru bileşiminde yer alan yumurta sarısının *C. utilis* kaynaklı bir biyosüpfektan ile ikame edilmesi sonucunda yumuşak ve süngerimsi bir tekstürün elde edildiği ve ayrıca ürüne antioksidan etki kazandırıldığı belirtilmiştir (50).

Literatürde yer alan çalışmalarda biyosüpfektanların ağırlıklı olarak çevre ile ilgili alanlarda kullanım potansiyellerinin araştırıldığı görülmektedir. Bu çalışmalar genel olarak toprak ve atık su gibi çevresel örneklerden ağır metallerin uzaklaştırılması ile beraber çevre ortamlarından kontaminantların giderildiği iyileştirme uygulamalarını kapsamaktadır. Çevre ortamından ağır metallerin gideriminde organik ve inorganik asitler, metal şelatlama ajanları ve kimyasal süpfektanlar aracılığıyla yıkama gibi geleneksel proseslerin çevreye olan olumsuz etkileri göz önüne alındığında iyileştirme amacıyla biyosüpfektanlardan yararlanılması çevre dostu bir uygulama olarak görülmektedir (3,51,52). Biyosüpfektan çözeltisiyle muamele edilerek kontamine topraklardan ağır metal giderimi mekanizması; toprak yüzeyinde adsorbe olan ağır metallerin toprak ara yüzeyinden biyosüpfektanların sorpsiyonu ile ayrılması ve absorbe edilen metallerin elektrostatik etkileşimler yoluyla biyosüpfektan miselleri içerisinde tutulması olarak açıklanmaktadır (3).

Literatürde, biyosürefektanların çeşitli hidrokarbon kaynaklarıyla kontamine olan çevresel örneklerde bulunan hidrofobik organik bileşenlerin çözünürlük ve akışkanlığının geliştirilerek desorpsiyonun kolaylaştırılması ve bu sayede ilgili ortamlardan uzaklaştırılması aşamasında aktif rol oynadığı rapor edilmiştir (53). Ayrıca biyosürefektanların misel oluşumuyla, topraktaki polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) desorbsiyonu ve ardından degradasyonunu sağlayarak çözünürlük özelliğini geliştirmenin yanı sıra, kontaminant matriksi ve etkileşimde bulundukları hücre yüzeylerinin modifikasyonu yoluyla PAH giderimi üzerine etki gösterdikleri ifade edilmektedir (3,54). Biyosürefektanların bir diğer yaygın kullanım potansiyelinin, petrol endüstrisinde mikrobiyel destekli petrol geri kazanımı olduğu ifade edilmekte ve petrol hidrokarbonlarıyla yüzey arasındaki etkileşimin artırılmasıyla beraber ara yüzey geriliminin azaltılarak, petrol geri kazanımına katkı sağlandığı bilinmektedir (3).

2.2 Bakteriler Tarafından Biyosürefektan Üretimi

Bakteriyel biyosürefektanların üretimi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar genel olarak mikroorganizma izolasyonu, suş taraması ve fermantasyon ortamının belirlenmesi aşamalarının bir veya birkaçının ardından, biyosürefektan ekstraksiyonu ve saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu, yüzey aktif özellikleri ile birlikte antimikrobiyel ve anti adezyon aktiviteleri gibi diğer fonksiyonel özelliklerinin analizlerini kapsamaktadır. Biyosürefektan üreticisi bakterilerin başlıca izolasyon kaynağı olarak petrol sahası atık suyu (32) ve petrol, PAH ve pestisit ile kontamine toprak (28,55), aktif çamur (56) gibi çevresel örneklerin kullanıldığı çalışmalar literatürde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca izolasyon kaynağı bazı gıda ve gıda artıkları olan bakterilerin biyosürefektan üretiminde yer aldığı az sayıda araştırmaya da rastlanmaktadır (57–59). Çalışmaların bir kısmında suş taraması amacıyla yağ yayma ve/veya damla düzleşmesi testlerinden yararlanılarak biyosürefektan üretimi olup olmadığının belirlenmesi sonucunda emülsifikasyon indeksi (E_{24}) değeri ve yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmektedir (60). Yağ yayma testi sonucunda, biyosürefektan çözeltisinin su yüzeyine aktarılmış olan yağda oluşturduğu temiz zonun çapının biyosürefektan üretimi hakkında yarı kantitatif bir sonuç sağladığı ve oluşan zon çapı ile biyosürefektan miktarı arasında bir korelasyonun olduğu belirtilmektedir (5,26,60). Ayrıca, hidrofobik bir yüzeye damlatılan biyosürefektanın yüzey ve ara

yüzey gerilimine göre değişkenlik göstererek farklı oranlarda yayılması damla düzleşmesi testinin pozitif sonuç verdiğini göstermektedir (61). Biyosüpfektan çözeltilisinin herhangi bir hidrokarbon kaynağıyla oluşturmuş olduğu emülsiyon tabakasının yüksekliği ile ilgili bir ölçüm değeri olan emülsifikasyon indeksi ise bu ölçümün 24 saatin sonunda gerçekleştirilmesi dolayısıyla E₂₄ olarak ifade edilmektedir (45).

Sharma ve ark. (62) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada farklı morfolojik karakterlerdeki kırk iki adet bakteri izolatına uygulanan yağ yayma ve damla düzleşmesi testlerinin yanı sıra emülsiyon aktivitesi sonuçları doğrultusunda potansiyel biyosüpfektan üreticisi oldukları belirlenen suşlar arasından maksimum yağ yayma değerine sahip olan iki adet *Bacillus* sp. izolatının biyosüpfektan üretiminde kullanıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca ilgili çalışma kapsamında E₂₄ değeri yüksek olan bazı izolatların yağ yayma ve damla düzleşmesi testi sonuçlarının negatif olması dolayısıyla bütün emülsifiyer bileşenlerin biyosüpfektan olarak değerlendirilemeyeceği belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda ise öncelikle, suş taramasında yararlanılan diğer yöntemler olan hidrokarbon testi ve tween 80 içeren besiyeri ortamında gerçekleştirilen testler ile potansiyel biyosüpfektan üretim potansiyeli taşıyan suşların tespit edilebildiği belirtilmektedir. Bu besiyerlerinde zon oluşturarak kaydedilen üreme şekli ile biyosüpfektan üretimi arasında yüksek bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (26,63).

Biyosüpfektan üretiminde şeker ve bitkisel yağları kapsayan farklı tanımlı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamların (6,8,9,60,64–68) yanı sıra, tarımsal ve endüstriyel artık ve gıda artığı kapsamında yer alan artık kızartma yağı (30,32,69–72), rafineri yan ürünü yağı (73), artık hayvansal yağ (74) zeytin karasuyu (33,75), şarap üretimi artıkları (75), şeker kamışı küspesi (76), peynir altı suyu ve şilempe (43), melas (77,78), çeşitli meyve ve sebzelerin kabuk, posa ve sularının (58,76–80) ve biracılık artıkları (81,82) içeren fermantasyon ortamlarının biyosüpfektan üretiminde değerlendirildikleri çalışmalar rapor edilmiştir.

Biyosüpfektan üretimi amacıyla hidrokarbon substrat kaynağı olarak ham petrol, dizel ve atık motor yağının ve ayrıca mısır özü yağı, zeytinyağı ve artık kızartma yağının yer aldığı bir çalışmada, bitkisel yağ kullanıldığı koşullarda bakteriyel gelişim, biyosüpfektan derişimi, yüzey geriliminin düşürülmesi ve yağ yayma testi sonuçları bakımından daha yüksek sonuçların elde edildiği ve bu

durumun hidrokarbonların kompleks molekül yapıları dolayısıyla mikroorganizmalar tarafından kullanılma potansiyellerinin zayıf olması ile açıklanabildiği rapor edilmiştir (5). Chen ve ark. (32) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise yüzey gerilimi, emülsifikasyon indeksi ve biyosüpfektan miktarı sonuçlarına göre kolza tohumu yağı, gliserol, glukoz ve melasa kıyaslandığında mutfak artık yağının fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı koşullarda daha yüksek sonuçların elde edildiği ve bu durumun artık yağda bulunan farklı besin elementlerinin mikroorganizma gelişimini desteklemesinden kaynaklanabildiği belirtilmiştir. Farklı tarımsal ve endüstriyel artıkların substrat kaynağı olarak kullanım potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışmada şeker içeriği yüksek olan mısır ve patates kabuğu tozları ile şeker pancarı küspesinin biyosüpfektan üretimini desteklediği bildirilmiştir (55).

Biyosüpfektan üreticisi bir mikroorganizmanın etkinliğinin değerlendirilmesinde yararlanılan en önemli parametrelerden biri suyun yüzey gerilimini düşürme fonksiyonu olup, biyosüpfektan kullanımıyla yüzey geriliminin ideal koşullarda en az 30-40 mN/m düzeyine düşürülmesi beklenmektedir (5). Biyosüpfektan üreticisi mikroorganizma olarak bakterilerin yer aldığı çalışmalarda suyun yüzey geriliminin maksimum düzeyde ve 20.24 mN/m'ye kadar düşürüldüğü bir çalışmaya rastlanmıştır (62). Ayrıca, biyosüpfektan üretimi çalışmalarında yaygın olarak, fermentasyon ortamına ait yüzey geriliminin en yüksek düzeyde düşürüldüğü koşullar göz önüne alınmaktadır (34,60,83,84)

Yüzey gerilimi değerlerine bağlı olarak önem taşıyan bir diğer kritik parametre ise; suyun yüzey gerilimini maksimum düzeyde azaltmak amacıyla misel oluşumunun başlatılmasında gerekli olan en düşük biyosüpfektan derişimi olarak tanımlanan kritik misel derişimi (KMD; mg/L) olarak ifade edilmektedir. Hazırlanan farklı biyosüpfektan derişimi değerlerinin her bir derişim için elde edilen yüzey gerilimi sonuçlarının bir fonksiyonu olarak yer aldığı grafiklerden yola çıkılarak, grafiğe ait eğimin belirgin bir şekilde değişime uğradığı nokta kritik misel derişimi olarak belirlenmektedir. Bakteri kaynaklı biyosüpfektan üretimi çalışmalarında hesaplanan kritik misel derişimi değerlerinin, 12.50-6000 mg/L olmak üzere oldukça geniş bir aralıkta değişim gösterebildiği belirtilmektedir (4,29,85). Biyosüpfektanın yüzey aktif fonksiyonunun, molekülün zincir uzunluğu, doymamışlık derecesi, yükü ve dallanma yapısı gibi pek çok faktöre bağlı olduğu ifade edilmiştir (65). Kritik misel derişimi değerlerinin

biyosüpfektanın saflık düzeyine bağlı değişimlerinin incelendiği bir çalışmada ise *Bacillus* sp. kaynaklı biyosüpfektanın ham ve saf formlarının kritik misel derişimi değerleri sırasıyla 250 mg/L ve 50 mg/L olarak rapor edilmiştir (5).

Biyosüpfektanların fermantasyon ortamından ekstraksiyonu ve üretim miktarlarının belirlenmesi amacıyla yaygın olarak; asit çözeltisinden yararlanılarak gerçekleştirilen presipitasyonun ardından organik bir çözücü veya karışımları aracılığıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmaktadır (86). Biyosüpfektan üretimi amacıyla gerçekleştirilen saflaştırma basamağı için ağırlıklı olarak silika jel kolon olmak üzere diğer kromatografik yöntemlerin yanı sıra (29,61,86), ultrafiltrasyon membran (87) ve diyaliz (55) uygulamalarından yararlanılan çalışmalara da rastlanmaktadır. Yapılan alışmalar incelendiğinde, biyosüpfektanların karakterizasyonu amacıyla, öncelikle ince tabaka kromatografisinden yararlanılarak sahip oldukları şeker, aminoasit ve/veya lipit molekülleri kompozisyonunun açığa çıkarıldığı ve ardından kromatografik yöntemler aracılığıyla biyosüpfektan yapılarının kapsamlı olarak analiz edildiği görölmektedir.

Yaygın olarak kullanılan yöntemlerden olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fourier Transform Infrared, FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) spektrometresi yardımıyla kimyasal bağ yapıları ve fonksiyonel grupları belirlenen biyosüpfektanların glukolipit, glukopeptit veya lipopeptit olarak tanımlanmalarının ardından GC-MS ve HPLC kullanılarak sırasıyla yağ asidi ve aminoasit kompozisyonları ayrıca LC-MS ve matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI TOF-MS) aracılığıyla kütle ve yük oranlarından yola çıkılarak molekül dizilimleri ve varsa homolog yapıları ortaya çıkarılmaktadır (4,5,61).

Bakteriyel biyosüpfektan üretimi çalışmalarında kullanılan ortam bileşimleri ve biyosüpfektanların bazı özellikleri (biyokimyasal yapısı, verimi, kritik misel derişimi ve yüzey gerilimi değerleri) Tablo 2.1.'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. Bakteri kaynaklı çeşitli biyosüpfektan üretimi çalışmalarında kullanılan ortam bileşimleri ve elde edilen bazı bulgular

Bakteri	Biyokimyasal yapısı	Karbon kaynağı	Azot kaynağı	Üretim miktarı (g/L)	KMD (mg/L)	Yüzey gerilimi (mN/n)	Referans
<i>Achromobacter</i> sp. BP(1)5	-	Pirinç sapı hidrolizatı Mısır koçanı hidrolizatı	-	0.074 0.095	6000 6000	56.2* 58.8*	(85)
<i>Achromobacter</i> sp. TMB1	Glukolipit	Glukoz	Maya özütü NH ₄ NO ₃	1.5	81	30.7	(36)
<i>P. korlensis</i> SBK-47	Lipopeptit	Glukoz	NH ₄ NO ₃	2.34	25	25	(4)
<i>P. aeruginosa</i> MTCC 424	Ramnolipit	Pirinç kepeğı yağı	NaNO ₃	6.20	120	28.5*	(88)
<i>P. aeruginosa</i> S5	Glukolipit	Glukoz	Maya özütü (NH ₄) ₂ SO ₄	1.8	96.5	29.6	(89)
<i>P. aeruginosa</i> PG1	-	Fırıncılık artıkları	KNO ₃	11.56	100	25.8*	(90)
<i>Pseudomonas</i> sp. S2WE	Ramnolipit	Gliserol	Üre	0.41	-	33.05*	(91)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Surfaktin	Glukoz şurubu	Maya özütü	5.5	-	30*	(92)
<i>Bacillus stratosphericus</i> FLU5	Lipopeptit	Artık kızartma yağı	NH ₄ Cl	1.88	50	36*- 28	(5)
<i>Bacillus haynesii</i> E1	Lipopeptit	Portakal kabuğı	-	3.7	50	33.04*	(93)
<i>B. subtilis</i> LAMI005	Surfaktin	Kaju meyvesi suyu	-	-	12.5	31.8	(29)
<i>B. subtilis</i> LMA-ICF-PC 001	Surfaktin	Glukoz ve Ananas Kabuğı	-	1.47	-	30.32	(94)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Lipopeptit	Balık artığı	Balık artığı peptonu	0.274	-	29.4*	(95)
<i>B. subtilis</i> ZNI5	Lipopeptit	Hurma unu	Maya özütü	-	400	27.8*	(96)
<i>B. subtilis</i> N3-1P	-	Biracılık artığı	NH ₄ NO ₃	0.66	107	27.31*	(82)
<i>B. cereus</i> UCP 1615	Lipopeptit	Şeker kamışı melası	Mısır ıslatma suyu	2.05	900	26.2*	(97)

Tablo 2.2. Devam ediyor

Bakteri	Biyokimyasal yapısı	Karbon kaynağı	Azot kaynağı	Üretim miktarı (g/L)	KMD (mg/L)	Yüzey gerilimi (mN/n)	Referans
<i>Halomonas venusta</i>	Lipopeptit	Gliserol	-	1.37	125	32.5*	(67)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glukolipoprotein	Mango meyvesi suyu	-	4.22	-	36.6*	(58)
<i>Pediococcus dextrinicus</i> SHU1593	Lipoprotein	Besiyeri (MRS-Laktoz)	-	0.7	-	45.28*	(78)
	Lipoprotein	Melas	-	0.7	-	45.13*	
	Lipoprotein	Hurma şurubu	-	0.7	2700	46.66* - 39.01	
<i>Paenibacillus sp.</i> D9	-	Artık kızartma yağı (kanola)	KNO ₃	5.31	-	31.2*	(69)
<i>Acinetobacter sp.</i> V2	Lipopeptit	Artık kızartma yağı (hindistan cevizi)	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.97	-	33.4*	(70)
<i>Halobacteriaceae archaeon</i> AS65	Lipopeptit	Muz kabuğu	Monosodyum glutamat	5.30	10	25.5	(98)
<i>Thermoanaerobacter sp.</i> CM-CNRG TB177	Ramnolipit	Melas	Maya özütü	0.0188	-	29.67	(99)
<i>Rhodococcus opacus</i> R7	Hidrofobik peptit	Naftalen	-	-	20	48*	(100)
<i>Shewanella algae</i> B12	Glukolipit	Yapay deniz suyu ve ham petrol	NaNO ₃ , NH ₄ Cl Pepton	-	250	31* - 43	(34)
<i>Bacillus sp.</i> IITD106	Glukolipit (Saponin)	Sakkaroz	Maya özütü	6.9	200	27.29* - 26	(83)
<i>Pseudomonas sp.</i> LM19	Glukolipit	Palm çekirdeği yağı rafineri yan ürünü	Maya özütü NaNO ₃	1.6	28	27.7	(73)
<i>P. aeruginosa</i> PBS29	Ramnolipit	Pirinç işleme artık suyu	Glutamik asit	9.35	-	-	(101)
<i>P. aeruginosa</i> KVD-HM52	Ramnolipit	Melas	-	5.26	120	33.03	(102)

(KMD: Kritik Misel Derişimi, * besiyerinin en düşük yüzey gerilimi, * işaretli olmayan suyun en düşük yüzey gerilimi)

Bu çalışmalara ek olarak, biyosüpfektan üretimi amacıyla kullanılan karbon ve azot kaynağı bileşimlerinin biyosüpfektanların biyokimyasal yapısı, kritik misel derişimi ve yüzey gerilimi özelliklerine etkilerinin değerlendirildiğı bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gudiña ve ark. (33) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada melas ve mısır ıslatma şurubu içeren fermantasyon ortamının %25 oranında zeytin karasuyu ile desteklenmesi durumunda en düşük kritik misel derişimi ve yüzey gerilimi değerlerinin sırasıyla 13 mg/L ve 29.20 mN/m olarak elde edilmesinin yanı sıra en yüksek biyosüpfektan derişimine ulaşıldığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında yer alan kültür ortamlarındaki farklılıklar dolayısıyla karakterize edilen biyosüpfektanlarda görülen hidrofilik ve hidrofobik molekül büyüklükleri, zincir uzunlukları ve bağ yapılarının biyosüpfektanların yüzey aktif özelliklerini değıştirdikleri ve genel olarak hidrofobik oranın yüksek olduğu ramnolipitlerin yüzey geriliminin düşürülmesinde daha etkin oldukları ifade edilmiştir.

Endüstriyel artık ve sebze özütlerinden hazırlanarak azot kaynaklarıyla desteklenen fermantasyon ortamı bileşimlerinin biyosüpfektan üretimi ve yapısal karakterizasyonu üzerine etkilerinin değerlendirildiğı bir başka çalışmada en yüksek surfaktin miktarlarına maya özütü ve pepton içeren havuç kabuğı özütlerinin kullanıldığı koşullarda ulaşıldığı rapor edilmiştir (79). Vecino ve ark. (42) tarafından *L. paracasei* suşu aracılığıyla gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi amacıyla bir hemiselüozik hidrolizatın karbon kaynağı olarak değerlendirildiğı koşullarda 1.26-1.35 mg/mL kritik misel derişimi değerlerine sahip olan ve suyun yüzey gerilimini 20.90-25.10 mN/m düzeyinde düşüren biyosüpfektanların glukolipopeptit olarak karakterize edildiğı, bununla beraber besiyeri olarak laktozun kullanılması durumunda elde edilen glukoprotein yapıdaki biyosüpfektanların sırasıyla 1.18-1.52 mg/mL ve 24.8-27.3 mN/m olarak kritik misel derişimi ve yüzey gerilimi değerlerine sahip olduğu ifade edilmiştir.

Biyosüpfektanın üretimi amacıyla karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan peynir altı suyu, şilempe, sakkaroz ve maya özütü derişimlerinin optimizasyonu çalışmasında, peynir altı suyunun derişiminin artmasıyla beraber yüzey gerilimi değerlerinde 17.50-18.60 mN/m olarak maksimum düzeyde azalmanın sağlandığı ancak azot bakımından zengin olan şilempenin yüksek oranlarda kullanılmasının üretimi olumsuz yönde etkilediğı bildirilmiştir (43). Bu çalışmanın sonucunu destekleyen şekilde, fermantasyon ortamı bileşimlerinde yer alan azot

kaynaklarının protoplazma ve hücre yapısal materyallerinin sentezi için kritik önem taşıyarak hücre gelişimi ve biyosüpfektan metabolizmasında görev aldıkları ve genel olarak azot kaynağının sınırlı düzeyde tutulduğu koşullarda bakteriyel lizinin gerçekleşerek biyosüpfektan biriktirilmesinin desteklendiği ifade edilmektedir (32).

Bakteriyel biyosüpfektanların fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi kapsamında; hidrokarbon ve diğer yağları içeren oldukça farklı ortamlarda E_{24} değerlerinin hesaplanmasıyla ölçüldükleri bilinen emülsiyon oluşturma kapasiteleri de araştırılmaktadır. Goswami ve Deka (86) tarafından yapılan ve emülsifikasyon indeksinin başlıca kullanılan hidrokarbonların zincir uzunlukları, molekül ağırlığı ve yapılarına bağlı olarak değişim gösterdiklerinin ifade edildiği bir çalışmada lipopeptit yapıdaki biyosüpfektanın kerosende %12.70 ve ham petrolde %95.80 olmak üzere farklı E_{24} değerlerine sahip oldukları bulunmuştur. Çalışmaya benzer bir şekilde dizelin uzun zincirli ve yüksek molekül ağırlıklı hidrokarbonların bir karışımı olması dolayısıyla en yüksek E_{24} ve emülsiyon stabilitesi değerlerinin elde edildiği rapor edilmiştir (29). Sharma ve ark. (62) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise bakteriyel biyosüpfektanların emülsiyon oluşturma kapasitelerinin sodyum dodesil sülfat (SDS) ve tween 80 süpfektanlarına göre daha yüksek oldukları ve maksimum E_{24} değerinin heksadekan hidrokarbonu içeren ortamda sağlandığı belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada soya yağı içeren ortamda E_{24} değerinin maksimum düzeyde olması dolayısıyla üretilen biyosüpfektanın gıda alanının çeşitli uygulamalarında kullanılma potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir (103).

Genel olarak yüzey gerilimini düşürme ve emülsiyon oluşturma stabiliteilerinin ortam pH'ı, tuz derişimi ve sıcaklık parametrelerinden etkilendikleri bilinmektedir. *B. subtilis*'den izole edilen bir biyosüpfektanın emülsiyon oluşturmalarını sağlayan elektrostatik kuvvetlerin düşük pH değerlerinde değişime uğrayarak presipitasyona yol açmaları dolayısıyla pH 6'dan daha düşük değerlerde biyosüpfektan stabilitesinin korunamadığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada %0-20 aralığındaki tuz derişiminin stabilizasyon üzerine etkisi değerlendirilerek iyonik tuz molekülleri ve gaz fazı arasındaki iyon dipol etkileşimlerinin daha zayıf olması nedeniyle %10'un üzerindeki tuz miktarlarıyla çalışılan koşullarda yüzey gerilimi değerlerinin arttığı rapor edilmiştir (29). Biyosüpfektan stabilitesinin sağlandığı optimum pH aralığının 4-10 olarak

belirlendiği bir çalışmada ise 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denaturasyon gerçekleştiği bildirilmiştir (4). Bununla beraber farklı bakteri tür ve suşlarının kullanıldığı ve biyosüpfektan stabilitesini belirlemeye yönelik çalışmaların bir kısmında daha düşük ve daha yüksek pH aralığı, %20'ye kadar tuz derişimi ve 121°C sıcaklığa kadar stabilite değerlerinin korunarak, biyolojik iyileştirme, gıda ve eczacılık endüstrilerinin çok çeşitli uygulama alanlarında biyosüpfektanın yer alabildiği belirtilmektedir (5,32).

Literatür genel olarak değerlendirildiğinde biyosüpfektanların antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antioksidan aktivitelerinden gıda, eczacılık ve biyomedikal endüstrilerinde yararlanma potansiyelleri ve anti adezyon etki oluşturmaları dolayısıyla biyofilm kontrolünün sağlanmasına yönelik uygulamaların araştırıldığı çalışmalara rastlanmaktadır (12,104–106).

Biyosüpfektanlar antibakteriyel etkinliğini; moleküler yapılarının birbirleriyle etkileşimlerden kaynaklanan yüzey aktif etkileri dolayısıyla hücre yüzey geriliminin düşürülmesi, plazma membranının hasar görmesi ve hücre sel içeriğin sızması sonucu membran geçirgenliğinin stabilitesinin bozulması yoluyla göstermektedir (37,107). Biyosüpfektanların antimikrobiyel aktivitesini değerlendiren bir çalışmada ramnolipidin gıda kaynaklı patojenler olan *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a kuvvetli bir inhibisyon etki sağladığı, *Salmonella enterica* ve *Escherichia coli* O157:H7 suşlarının ise biyosüpfektan uygulamasına direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada genel olarak Gram negatif bakterilerin biyosüpfektan direncinin, bu mikroorganizmalarda bulunan dış membran yapısının koruma ve seçiciliği artırma fonksiyonlarından kaynaklandığı rapor edilmektedir (107).

Kourmentza ve ark. (108) tarafından *Bacillus* sp. aracılığıyla üretilen farklı bileşimlerdeki lipopeptit yapıda biyosüpfektanların gıda kaynaklı patojenler ve gıdalarda bozulmaya yol açan bazı bakterilerin (*P. aeruginosa* NCTC 10332, *S. enterica* NCTC 5188, *E. coli* K-12, *B. cereus* MR59, *L. monocytogenes* 10403S, *Carnobacterium divergens* NCFB 2763, *Leuconostoc mesenteroides* NCIMB 08023 ve *Brochothrix thermosphacta* NCDO 1676) inhibisyonunda genel olarak etkili olmadığı ancak gıdaları bozucu bazı mayaların (*Candida krusei*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Debaryomyces hansenii*) ve özellikle küflerin (*Rhizopus stolonifer*, *Paecilomyces variotii*, *Byssocchlamys fulva*) inhibe edildiği ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Bacillus methylotrophicus* OB9 kaynaklı

biyosüpfektanın *Salmonella* serotipleri (*Salmonella enterica* serotip Typhimurium, *S. enterica* I:Rough-O:e,h:e,n., *S. enterica* serotip Agona, *S. enterica* serotip Newport ve *S. enterica* serotip Hartford), *E. coli* ve bir bitki patojeni olan *Xanthomonas campestris* bakterilerinin inhibisyonunu iyi düzeyde sağladıkları belirtilmiştir (109).

Goswami ve Deka (86) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise bazı fitopatogenlere karşı antifungal etki sağladıkları bildirilen *Bacillus* sp. kaynaklı bir biyosüpfektanın etki mekanizmasını membran geçirgenliği ve bütünlüğünü değıştirmesi yoluyla gösterdiği ifade edilmiştir. *P. aeruginosa* aracılığıyla üretilen biyosüpfektanın ise klinik bakteri izolatlarından *S. aureus*, *B. cereus* ve *E. coli*'nin yanı sıra bitkilerde hastalık etmeni olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* üzerine bir süpfektandan daha yüksek oranda antimikrobiyel aktivite sağlandığı bildirilmiştir (87).

Laktik asit bakterileri aracılığıyla üretilen biyosüpfektanlarla gıda kaynaklı patojen bakterilerin belirli düzeylerde inhibe edildiğı ancak bazı maya ve küflere herhangi bir etkisinin olmadığı raporlanmıştır (110). Aynı çalışma kapsamında 0.5 g/L derişimdeki biyosüpfektanın kolon kanser hücrelerinin %95'inden fazlasını etkisiz hale getirdiğı ve diğerk taraftan Hepatit A virüsüne karşı oldukça zayıf bir antiviral etki sağladığı ifade edilmiştir. Ayrıca bir başka biyosüpfektan aracılığıyla melanom hücrelerinin gelişiminin engellendiğı ve yara iyileşmesine önemli ölçüde katkının sağlandığı Cheffi ve ark. (67) tarafından aktarılmıştır.

Biyosüpfektan kullanılarak biyofilmlerin uzaklaştırılmasındaki başlıca mekanizma biyosüpfektanın biyofilm matriksine iletilerek biyofilmin tutunduğı materyalle biyofilm arasındaki ara yüzey geriliminin düşürölmesi olarak açıklanmaktadır. Ayrıca biyosüpfektanların mikroorganizma adezyonunun önüne geçerek biyofilm oluşumunun engellenmesine etki gösterdikleri ifade edilmektedir (41). de Araujo ve ark. (111) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada gıda endüstrisinde kullanılan paslanmaz çelik ve polistiren yüzeylerde *L. monocytogenes* ATCC 7644 kaynaklı biyofilm oluşumunun ramnolipit aracılığıyla sırasıyla %83.4 ve % 74.1 olarak en yüksek düzeyde azaltıldığı ve ayrıca bu bakterinin yüzeylere adezyonunun birbirine yakın ölçüde engellendiğı rapor edilmiştir. Benzer şekilde *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin oluşturduğu biyofilmin ramnolipit kullanımı ile her iki yüzeyde %72.4-74.2 arasında değışen miktarlarda azaldığı, polistiren yüzeye adezyonun önlenmesinde

ise surfaktinin daha etkili olduğu aktarılmıştır (111). Başka bir çalışmada 4 mg/mL bakteriyel biyosüpfektan kullanılarak kaplanan medikal titanyum disklerde *Candida albicans* ve *S. aureus* kaynaklı karışık biyofilmin oluşumunun yaklaşık %90 oranında azaldığı bildirilmiştir (112). Cheffi ve ark. (67) tarafından yürütölen bir çalışma kapsamında ise biyosüpfektan aracılığıyla bakteri ve maya kaynaklı biyofilmlerin uzaklaştırılma kapasitesinin, anti adezyon etkisiyle biyofilm oluşumunu önleme gücünden genel anlamda daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada polistiren yüzeylerde ve silikon tüp içerisinde biyofilm oluşturan *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *C. albicans* mikroorganizmalarının anti adezyonunda 25 mg/mL derişimde biyosüpfektan çözeltisinin oldukça iyi düzeylerde etkili olduğu bildirilmiştir (61). Yapılan bir başka çalışmada bakteri suşu aracılığıyla üretilen bir biyosüpfektanın 1-2 mg/mL derişimdeki çözeltileri kullanılarak *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella* Typhi ve *V. cholerae* adezyonunun %99 düzeyinde azaltıldığı ayrıca tıbbi ekipmanların üzerinde kolonize olarak biyofilm oluşturma potansiyeline sahip olan diğerk bakterilerin adezyonunun değışen oranlarda (%57-93) engellendiğı ve bu kapsamda biyosüpfektandan biyomedikal uygulamalarda yararlanılabileceğı rapor edilmiştir (4). Singh ve Sharma (113) tarafından gerçekleştirilen çalışmada polistiren, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. Typhi* ve *Salmonella* Typhimurium suşları ile oluşturulan biyofilmlerin tamamına yakınının uzaklaştırılmasında 4 mg/mL derişimde bakteriyel bir biyosüpfektanın yeterli olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *Salmonella enterica* serotip Enteritidis, *E. coli* ve *Campylobacter jejuni* kaynaklı biyofilm oluşumunun önlenmesinde ve biyofilmlerin uzaklaştırılmasında, biyosüpfektanın sitrik asit ve malik asitten daha etkin olduğu veya birbirlerine yakın aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (114).

Klinik kaynaklı *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *C. albicans* mikroorganizmalarından bir bakteri ve maya birleşimi olacak şekilde oluşturulan biyofilmlerin polistiren yüzeyden uzaklaştırılması ayrıca medikal silikon disklerine biyofilm adezyonunun önlenmesinde ise bakteriyel biyosüpfektanların maya kaynaklı bir biyosüpfektana göre daha üstün olduğu ifade edilmiştir (115).

2.3 Mayalar Tarafından Biyosüpfektan Üretimi

Literatürde biyosüpfektan üretimi çalışmalarında sıklıkla *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerine ait veya diğer bakterilerin yer aldıkları görülmektedir. Ancak bazı bakterilerin patojenik karaktere sahip olmaları, bu bakteriler kullanılarak üretilen biyosüpfektanların özellikle gıdalarda kullanılabilirliğinin kısıtlanmasına neden olmaktadır. Bu kapsamda biyosüpfektan üretimi üzerine yapılan araştırmalarda bakterilerin yanı sıra genel olarak güvenli kabul edilen mikroorganizmalar sınıfında yer alan mayalardan yararlanılma potansiyelinin değerlendirildiği çalışmalara bir yönelim olduğu ifade edilmektedir (27).

Biyosüpfektan üretimi potansiyeline sahip olan mayaları belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda genel olarak yağ yayma testi, yüzey geriliminin düşürülmesi ve E₂₄ sonuçları göz önüne alınarak *Candida*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Wickerhamomyces* ve *Yarrowia* cinslerine ait maya türleri ön plana çıkmaktadır (8,20,25,45,102-106). Bu mayaların izolasyon kaynakları arasında su ve toprak gibi çevresel örneklerin yanı sıra gıda ve gıda endüstrisi kökenli artıklar yer almaktadır.

Derguine-Mecheri ve ark. (15) tarafından gerçekleştirilen ve maya izolasyonu kaynağı olarak farklı meyveler ve süt işleme fabrikalarından toplanan örneklerin yanı sıra rafine ham petrol ve hidrokarbonlarla kontamine çevresel örneklerin kullanıldığı bir çalışmada elde edilen maya izolatlarından yaklaşık olarak yarısının emülsifikasyon indeksi, damla düzleşmesi ve yağ yayma testi değerleri açısından pozitif sonuçlar verdikleri, daha yüksek E₂₄ ve yağ yayma çaplarına sahip olmaları dolayısıyla ön plana çıkan dört adet mayadan ise izolasyon kaynağı çamur olan bir *Cryptococcus* sp. suşunun yüksek düzeyde biyosüpfektan üretim potansiyeli taşıdığı rapor edilmiştir. İlgili çalışma, biyosüpfektan üretimi amacıyla gıda kaynaklı mayalardan yararlanılması açısından değerlendirildiğinde ise, ahududu ve kavundan izole edilen iki maya suşunun ortalama iyi düzeyde yağ yayma aktivitesine sahip oldukları belirtilmiştir. Aynı çalışmada, izolasyon kaynağı zeytin karasuyu olan bir suşun da oldukça yüksek yağ yayma ve E₂₄ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Archana ve ark. (9) tarafından yürütölen bir çalışmada ise yağ yayma çapları esas alınarak 107 adet maya suşu arasında süt işletmesi artık suyu, papaya rizosferi, şeker kamışı küspesi

ve meyve artığı kaynaklı dört mayanın biyosüpfektan üretimi potansiyeli taşıdıkları ve meyve artığından izole edilen *Candida* sp. AH62 suşu ile daha yüksek miktarda biyosüpfektan üretildiği ifade edilmiştir.

Eldin ve ark. (26) tarafından emülsifikasyon indeksi, yüzey gerilimi ölçümü ve yağ yayma testleri sonucunda sırasıyla %47.37-59.65, 51.63-62.40 mN/m ve 1.89-2.25 cm aralığında değişen değerlere sahip olan *Geotrichum candidum*, *Galactomyces pseudocandidum* ve *Candida tropicalis* suşlarının biyosüpfektan üretim potansiyeli taşıdıkları rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada, biyosüpfektan üretim potansiyeli taşıdıkları belirlenen *Candida*, *Yarrowia*, *Apiotrichum*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* ve *Cystobasidium* türlerine ait maya suşları arasında yüzey gerilimini düşürme ve E₂₄ değerleri bakımından *Yarrowia lipolytica* TEMGS33 ve *Apiotrichum loubieri* TEMOS16 suşlarının üstünlük sağladığı bildirilmiştir (116).

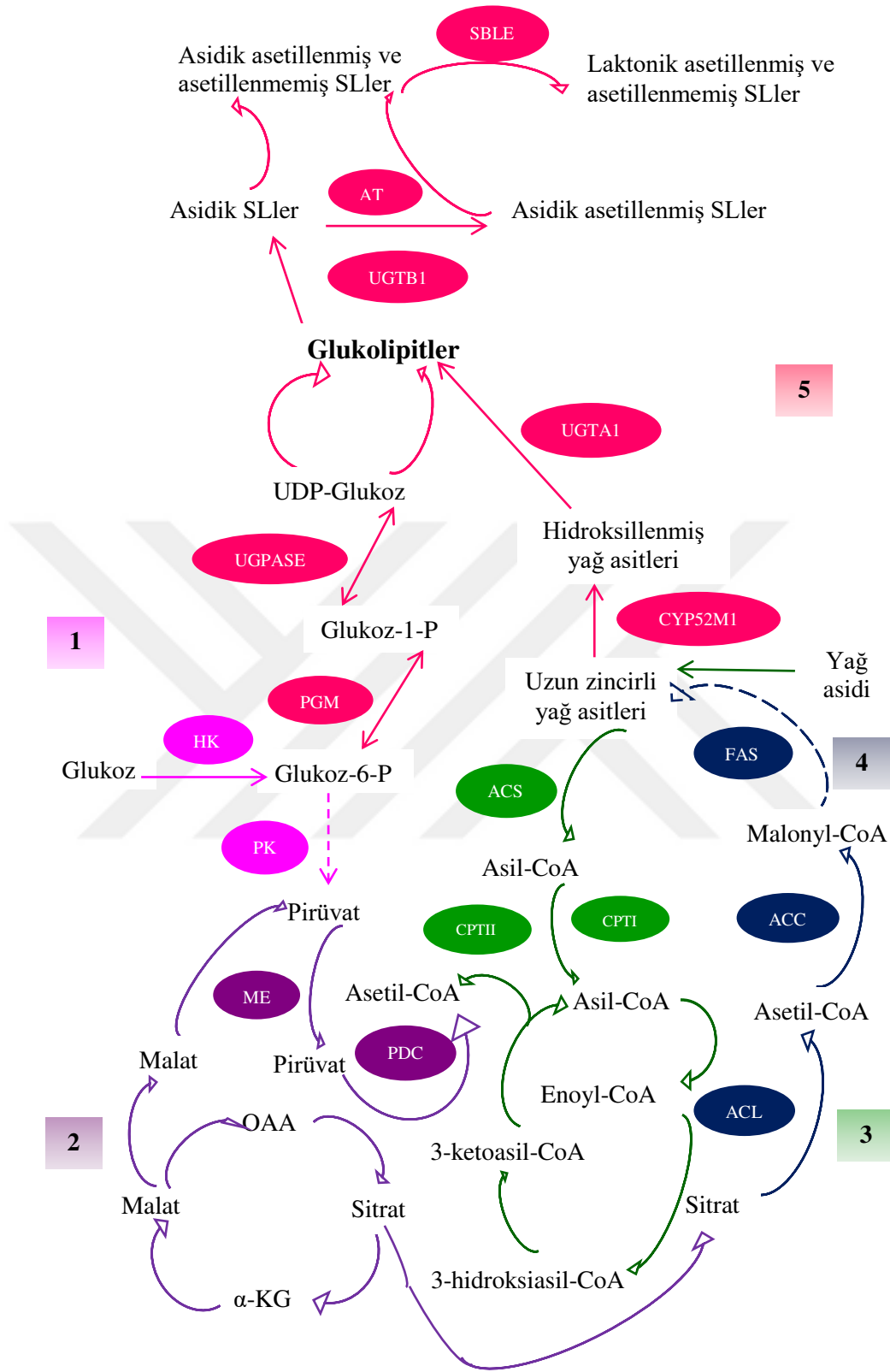
Marcelino ve ark. (10) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada biyosüpfektan üretimleri incelenen farklı türlere ait 27 adet maya arasından *Cutaneotrichosporon mucoides* suşunun biyosüpfektan üreticisi mikroorganizma olarak seçildiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus luteolus*, *Metschnikowia koreensis* ve *Meyerozyma guilliermondii* suşları arasında *M. guilliermondii* mayasının en yüksek E₂₄ değerine sahip olduğu belirtilmiştir (51). Balan ve ark. (11) tarafından 136 farklı maya suşunun biyosüpfektan üretimi potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada yalnızca üç suşun hem emülsifikasyon indeksi hem yağ yayma çapı açısından olumlu sonuç verdiği ve *Cyb. saturnus* mayasının kullanıldığı deneyde daha yüksek düzeylere ulaşıldığı ifade edilmiştir. Suş seçimine yönelik olarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada *W. anomalus* suşu kullanılarak besiyeri yüzey geriliminde maksimum azalmanın sağlandığı rapor edilmiştir (27).

Yapılan farklı araştırmalarda mayalar tarafından üretilen biyosüpfektanların genel olarak glukolipit (soforolipit) yapıya sahip oldukları gösterilmiştir (11,119). Mira Debnath (120) tarafından petrol atıklarını yüksek derişimde içeren ortamlara adapte edilen *C. tropicalis* MTCC230 suşu ile üretilen biyosüpfektanın ise diğerlerinden farklı olarak surfaktine benzeyen nitelikte lipoprotein yapı taşıdığı rapor edilmiştir. Son yıllarda yürütölen bir çalışmada *Candida batistae* kaynaklı bir biyosüpfektanın ise tamamıyla ω -hidroksi yağ asitlerinden oluştuğı raporlanmıştır (6).

Genel olarak hidrofilik ve hidrofobik bileşenlerin fermantasyon ortamında bir arada bulunduğu koşulların mayalar aracılığıyla biyosüpfektan üretimini desteklediği ifade edilmektedir (6–8,14,66,121–123). Şekil 2.1.'de, referans substrat olarak glukoz ve yağ asiti içeren bir fermantasyon ortamında maya kaynaklı soforolipit üretimi sırasında gerçekleşen birincil ve ikincil metabolik iz yolları görülmektedir (121). Şekilde glikoliz iz yolunda verilen kısaltmalardan HK hegzokinaz, PK pirüvat kinaz; Krebs döngüsünde PDC pirüvat dehidrojenaz kompleksi, ME malik enzim; yağ asidi oksidasyonunda ACS asetil-CoA sentetaz CPT I ve CPT II: karnitin-palmitoil transferaz I ve II; yağ asidi sentezinde ACL ATP-sitrat liyaz, ACC asetil-CoA karboksilaz, FAS yağ asidi sentaz ve soforolipit sentezi iz yolunda PGM fosfoglukomutaz, UGPASE üridin difosfat-glukoz pirofosforilaz, CYP52M1 sitokrom P450 mono oksijenaz, UGTA1 ve UGTB1 UDP üridin difosfat-glukoz glukoziltransferaz I ve II; AT asetiltransferaz, SBLE lakton esteraz enzimlerini göstermektedir (Şekil 2.1.).

Hidrofilik substrat olarak indirgen şekerler, melas, peynir altı suyu, gliserol ve lignoselülozik bileşenler kullanıldığında, bu bileşenler glikoliz yoluyla piruvata parçalanmaktadır. Ardından, pirüvatın pirüvat dehidrojenaz ile oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla Krebs döngüsü için asetil-CoA'ya dönüşümü sonucunda enerji ve mikrobiyel gelişme ile ara metabolitlerin üretimi sağlanmaktadır. Bu esnada, glukozun bir kısmı soforolipitlerin bileşimine katılacak olan glikojen ve diğer kompleks karbonhidratların üretimi için fosfoglukomutaz (PGM) ve UDP-glukoz pirofosforilaz (UGPASE) enzimleri ile UDP (üridin difosfat) - glukoz dönüşürmektedir.

Hidrofobik substratların (hidrokarbonlar, uzun zincirli alkoller, aldehitler, yağlar, esterifiye yağlar, yağ asitleri ve yağ asidi esterler vb.) kullanıldığı koşullarda ise bu bileşenler aldehit dehidrojenaz ve uzun zincirli alkol oksidaz enzimleri aracılığıyla yağ asitlerine dönüşürmekte ve soforolipit biyoüretimi iz yoluna katılmaktadır. Soforolipitlerde 16-18 karbon atomlu yağ asidi bulunmaktadır. Ortamda yağ asidi bulunmaması durumunda ise glikoliz aşamasında üretilen asetil-CoA *de novo* sentezi yoluyla yağ asitlerine dönüşürmektedir. Diğer yandan ortamda hidrofobik substratların tek başına bulunduğu koşullarda yağ asitleri, hücre gelişimi için β -oksidasyon yoluyla asetil Co-A molekülüne dönüşürmektedir.



1 glikoliz, 2 Krebs döngüsü, 3 yağ asidi oksidasyonu, 4 yağ asidi sentezi, 5 SL sentezi

Şekil 2.1. Glukoz ve yağ asiti içeren bir fermantasyon ortamında sfingolipit üretimi sırasında gerçekleşen birincil ve ikincil metabolik iz yolları (121)

Fermantasyon ortamında iki temel bileşen olan glukoz ve yağ asitlerinin bir arada bulunması durumunda yağ asitleri sitokrom P450 mono oksijenaz katalitik reaksiyonu altında hidroksillenmiş ω -/ ω -1 hidroksillenmiş yağ asitlerine dönüşmektedir. Ardından UDP-glukozun C1' karbonuna yağ asidinin hidroksil grubunun bağlanması sonucunda glukoziltransferaz I aracılığıyla glukolipit molekülü üretilmektedir.

Bir sonraki aşamada, glukoziltransferaz II enzimi varlığında ikinci bir UDP-glukozun, ilk glukoz molekülünün C2' karbonuna bağlanması sonucunda asetillenmemiş asidik soforolipitler oluşmaktadır. Ardından, asetiltransferaz enzimi varlığında asetillenmiş asidik soforolipitler üretilmektedir. Soforolipit gen kümesinde, soforolipit üretimi için gerekli enzimleri kodlayan genlerin yanı sıra soforolipit transport proteinini kodlayan bir gen yer almaktadır. Asidik asetillenmiş ve asetillenmemiş soforolipitler hücre dışına transfer edilmekte ve lakton esteraz enzimi ile yağ asidinin karboksilik grubu ve soforoz (di-glukoz) arasında gerçekleşen interesterifikasyon sonucunda laktonik soforolipitlere katalizlenmektedir (7,70,121–125).

Biyosüpfektan üretimi amacıyla mayalardan yararlanılan bazı çalışmalarda yer alan maya türü, biyosüpfektanın yapısı, biyosüpfektan üretiminde kullanılan karbon ve azot kaynakları, biyosüpfektan verimi, biyosüpfektanın kritik misel derişimi ve yüzey gerilimi düşürme miktarları sonuçları Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Literatürde izolasyon kaynağı gıda ve toprak olan bazı mayaların biyosüpfektan üretim potansiyellerinin incelendiğı bir çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz ve gliserol bir arada yer aldığınday *Y. lipolytica* CCMA 0357 ve *W. anomalous* CCMA 0358 suşları aracılığıyla fermantasyonun sırasıyla 120. ve 72. saatlerinde fermantasyon ortamının yüzey geriliminde yaklaşık olarak 10 mN/m düzeyinde bir azalma sağlandığı, bununla beraber zeytinyağı içeren bir ortamın *W. anomalous* suşuna ait yüzey gerilimi değeriinin 16 mN/m olarak daha yüksek miktarda ve 24 saat sonunda düşürölmesine katkı sağladığı bildirilmiştir. Aynı çalışma kapsamında, *W. anomalous* suşundan yararlanılarak üretilen 0.9 mg/mL kritik misel derişimi değeriine sahip biyosüpfektan aracılığıyla suyun yüzey geriliminin 31 mN/m'ye kadar düşürölldüğü rapor edilmiştir (27).

Tablo 2.3. Maya kaynaklı çeşitli biyosüpfektanların üretim çalışmalarında kullanılan ortamlar ve elde edilen bazı bulgular

Maya	Biyokimyasal yapısı	Karbon kaynağı	Azot kaynağı	Üretim miktarı (g/L)	KMD (mg/L)	Yüzey gerilimi (mN/n)	Referans
<i>Candida bombicola</i>	Glukolipit	Şeker kamışı melası Artık kızartma yağı	Mısır ıslatma şurubu	19.80	-	31*	(126)
<i>Candida tropicalis</i> MTCC230	Lipopeptit	Glukoz Hidrokarbon	Maya özütü NH ₄ Cl	-	32.5	32	(120)
<i>Candida tropicalis</i>	Glukolipit	Şeker kamışı melası Artık kızartma yağı	Mısır ıslatma şurubu	4.11	-	25.6- 30.4*	(127)
<i>Candida utilis</i>	Karbonhidrat - protein - lipit	Glukoz Kanola kızartma yağı	Maya özütü NH ₄ NO ₃	12.52	-	44.89	(48)
<i>Candida</i> sp. AH62	Soforolipit	Glukoz Oleik asit	Maya özütü (NH ₄) ₂ SO ₄	4.23	-	31.4	(9)
<i>Cryptococcus</i> sp. YLF	Glukolipit	Hurma şurubu	Maya özütü	7.75		40	(15)
<i>Candida sphaerica</i>	-	Yerfıstığı yağı rafineri artığı	Mısır ıslatma şurubu	21.49	-	27.48	(45)
<i>Aureobasidium thailandense</i> LB01	Glukolipit	Glukoz ve zeytin karasuyu	Maya özütü	-	550	31.2-32*	(128)
<i>Cyberlindnera saturnus</i> SBPN-27	Glukolipit	Glukoz	NH ₄ NO ₃	2.13	30	28	(11)
<i>Starmerella bombicola</i>	Glukolipit (Soforolipit)	Glukoz Oleik asit	Maya özütü	69.83	65	34	(37)
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Glukolipit (Soforolipit)	Mısır bazlı substrat Pirinç bazlı substrat	- -	19.27 17.81	120 110	34-36.6 * 37-36.9 *	(38)
<i>R. babjevae</i> YS3	Glukolipit (Soforolipit)	Glukoz	-	19	130	35- 32.6*	(119)

Tablo 2.4. Devam ediyor

Maya	Biyokimyasal yapısı	Karbon kaynağı	Azot kaynağı	Üretim miktarı (g/L)	KMD (mg/L)	Yüzey gerilimi (mN/n)	Referans
<i>Rhodotorula</i> sp. YBR	Glukolipoprotein	Zeytin karasuyu	-	10.08	180	30.16 -35*	(13)
<i>Rhodotorula</i> sp.CC01	Glukolipit	Zeytinyağı	Çöp sızıntı suyu	1.36	70	27.66* -33.39	(60)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SKF2	Soforolipit	Ham petrol	-	6.20	-	25.2*	(56)
<i>Yarrowia lipolytica</i> MTCC9520	Lipoprotein	Tavuk don yağı	Maya özütü	4.40	-	37*	(84)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glukolipit (Soforolipit)	Glukoz ve fırıncılık artık yağı	Maya özütü	67.80	-	-	(7)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SP6	Ramnolipit	Meyve çekirdeği tozu	-	-	-	26.10*	(64)
<i>Debaryomyces hansenii</i> MK9	Soforolipit					31.40*	
<i>Issatchenkia orientalis</i> UCP 1603	-	Manyok artık suyu Kızartma soya yağı	Mısır ıslatma şurubu	-	-	29.9*	(129)
<i>Naganishia adellienses</i> L95	Glukolipit	Şeker kamışı sapı hemiselülozik hidrolizatı (Ksiloz bazlı)	-	4.27	-	-	(130)
<i>Starmerella riodocensis</i> GT-SL1R sp. nov.	Soforolipit	Glukoz Palm yağı	Maya özütü Üre	45.70	-	-	(131)

(KMD: Kritik Misel Derişimi, *besiyerinin en düşük yüzey gerilimi, * işaretli olmayan suyun en düşük yüzey gerilimi)

Bir çalışmada, 50 g/L glukoz bulunan besiyerinde üretilen biyosüpfektan miktarının, aynı derişimde fruktoz, sakkaroz, ksiloz, laktoz ve gliserol bileşenlerini ayrı ayrı içeren diğer ortamlara göre daha yüksek düzeyde olduğu; ürün oluşumu, substrat tüketimi ve maya üremesi bakımından en düşük sonuçların ise laktoz içeren ortamda alındığı bildirilmiştir (6). Aynı çalışma kapsamında, glukozun ayrı ayrı 50 g/L kolza yağı, soya yağı, hindistan cevizi yağı, mısır yağı ve zeytinyağı ile desteklendiğı tüm deneylerde biyosüpfektan üretiminin önemli düzeyde arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca özellikle kolza ve soya yağlarını içeren ortamlarda birbirlerine oldukça yakın ve en yüksek düzeyde üretimlerin sağlandığı ifade edilen ilgili çalışmada sırasıyla yaklaşık 30 ve 35 g/L kolza ve soya yağının ortamlarda tüketilmeden kaldığı ancak mayanın glukozun tamamına yakınına kullandığı Kim ve ark. (6) tarafından bildirilmiştir (6). Hirata ve ark. (66) tarafından bileşimleri glukozun yanı sıra ayrı ayrı palm olein ve oleik asitten oluşan fermantasyon ortamlarında sırasıyla 28.7 ve 2.1 g/L biyosüpfektan üretildiğı, ancak bu iki lipofilik bileşenin 75:25 ve 50:50 oranlarında karıştırılması sonucunda biyosüpfektan üretiminin önemli ölçülerde desteklendiğı ve sırasıyla 57.90 ve 67.60 g/L biyosüpfektan üretiminin gerçekleştirildiğı rapor edilmiştir. Ayrıca palm olein ve oleik asidin 75:25 ve 50:50 oranında karıştırıldığı deneyde sırasıyla 63.80 ve 40 g/L olarak belirlenen kalıntı yağ miktarının, bu iki bileşenin ayrı ayrı kullanıldığı koşullarda yaklaşık 82-87 g/L aralığında değişim göstermesi dolayısıyla palm olein ve oleik asidin karışım olarak kullanılması önerilmiştir (66).

Literatürde ayrıca substrat olarak hidrofilik ve hidrofobik bileşenlerin tek başına kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır (11,66,84,118,119,132). Sen ve ark. (119) tarafından glukoz içeren bir besiyerinde *Rhodotorula babjevae* mayası ile üretilen biyosüpfektan aracılığıyla besiyeri yüzey geriliminde sağlanan azalma miktarı 37.40 mN/m olarak belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise *C. albicans* ve *Candida glabrata* mayaları yardımıyla glukoz içeren fermantasyon ortamında üretilen biyosüpfektanların besiyeri yüzey gerilimlerini sırasıyla 42 ve 55 mN/m'ye düşürdükleri bildirilmiştir (132). Derguine-Mecheri ve ark. (15) tarafından glukoz, fruktoz, sakkaroz ve nişastanın yanı sıra mısırozü yağı ve zeytinyağını kapsayan farklı yağların karbon kaynağı olarak ayrı ayrı kullanıldığı deneylerde ise en yüksek E₂₄ değerine sakkaroz içeren besiyerinde ulaşıldığı rapor edilmiştir. Hirata ve ark. (66) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise karbon

kaynağı olarak 50 g/L pirinç kepeği yağı ve palm yağının kullanıldığı koşullarda yaklaşık 40 g/L biyosüpfektanın üretildiği, hindistan cevizi yağı içeren ortamda ise üretimin yaklaşık 5 g/L olarak oldukça düşük bir miktarda kaldığı ifade edilmiştir.

Literatürde mayalar aracılığıyla gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimleri için kullanılan besiyeri bileşimlerinin optimizasyonuna yönelik bazı çalışmalar yer almaktadır. Ho To ve ark (7) tarafından *S. bombicola* ile biyosüpfektan üretimi için karbon kaynağı olarak artık yağın değerlendirildiği çalışmada, en yüksek düzeyde üretimin 60 g/L yağ ve 100 g/L glukoz içeren ortamda gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Glukoz ve kanola yağının 30-120 g/L aralığındaki derişimlerinin biyosüpfektan üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada 68.80 g/L olarak en yüksek miktarda biyosüpfektanın 90 g/L glukoz ve 90 g/L yağ içeren besiyerinde üretildiği bildirilmiştir (8).

Bazı inorganik ve organik azot kaynaklarının kimyasal tanımlı bir fermantasyon ortamında *Cryptococcus* sp. suşu ile biyosüpfektan üretimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, maya özütünün kullanıldığı koşullarda amonyum sülfat, pepton ve ürenin ayrı ayrı incelendiği diğer deneylere göre daha yüksek E₂₄ değerine ulaşıldığı bildirilmiştir (15). Azot kaynağı olarak maya özütünün seçildiği başka bir çalışmada amonyum nitrat ve peptonun kullanıldığı koşullarda biyosüpfektan üretiminin sağlanamadığı belirlenmiştir (7). Kim ve ark. (6) tarafından yürütölen bir çalışmada ise azot bileşenlerinin seçimi ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında glukoz ve yağ içeren besiyerine 5 g/L derişimdeki maya özütü ve pepton tek başına ve ayrıca 0.5 g/L maya özütü ile zenginleştirilen amonyum nitrat ve üre ayrı ayrı eklenmiştir. Ardından azot kaynağı olarak seçilen amonyum nitrat 0.1-5 g/L aralığında değişen derişimlerde maya özütü ile desteklenmiş, 5 g/L amonyum nitrat ve 5 g/L maya özütü içeren koşullarda biyosüpfektan üretiminin maya özütünün 0.1 g/L düzeyinde kullanıldığı ortama göre yaklaşık üç kat arttırıldığı raporlanmıştır (6).

Teixeira Souza ve ark. (14) tarafından gerçekleştirilen başka bir araştırmada 4.64 g/L maya özütü ve 4.22 g/L amonyum sülfat içeren ortam kullanılarak üretilen biyosüpfektanın besiyeri yüzey gerilimini maksimum düzeyde düşürdüğü ifade edilmiştir. Ayrıca özellikle azot kaynaklarının daha düşük ve yüksek derişimlerinin yüzey gerilimi sonuçlarını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (14). Bazı çalışmalarda ise fermantasyon ortamlarında azot miktarının sınırlı düzeyde tutulmasıyla hücre gelişiminin yavaşlatıldığı ve

biyosüpfektan üretiminin desteklendiğı ifade edilmektedir (7,43,133,134). Ho To ve ark. (7) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise 2.5 g/L maya özütü içeren fermantasyon ortamında oldukça yüksek miktarda biyosüpfektan üretilmesine rağmen 5 g/L maya özütünün üretimi hemen hemen yarıya düşürdüğü, maya özütünün 10 g/L olarak kullanıldığı deneyde ise üretimin gerçekleşmediğı rapor edilmiştir.

Biyosüpfektan üretimi çalışmalarında substrat olarak kimyasal tanımlı besiyerlerinin yanı sıra bazı gıda ve tarım endüstrisi artıklarının sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Kimyasal tanımlı bir besiyeri ortamında yer alan glukoz ve zeytinyağı yerine sırasıyla şeker kamışı melası ve zeytin karasuyunun kullanıldığı deneylerde besiyeri yüzey gerilimlerinde *Aureobasidium thailandense* LB01 aracılığıyla 17 mN/m ve 18.50 mN/m seviyesinde azalma sağlandığı ve bu değerlerin tanımlı fermantasyon ortamında elde edilen yüzey gerilimini düşürme miktarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir (128). Aynı çalışmada glukoz ve zeytinyağı ile beraber mısır ıslatma şurubunu içeren bir ortamda ise, besiyeri yüzey geriliminde azalma miktarının yaklaşık 12 mN/m olarak daha düşük bir düzeyde kaldığı belirtilmiştir. Ayrıca melas, zeytin karasuyu ve mısır ıslatma şurubunu bir arada içeren besiyerinde ise yüzey geriliminin 16 mN/m seviyesinde düşürüldüğü ve genel olarak tüm besiyerlerinde ulaşılan en düşük yüzey gerilimi değerlerinin 32-43 mN/m aralığında değişim gösterdiği ve 550 mg/L kritik misel derişimi değerine sahip olduğu belirtilen bu biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini 31.2 mN/m'ye düşürdüğü rapor edilmiştir (128).

Biyosüpfektan üretimi için zeytin karasuyunun değerlendirildiğı bir çalışmada %50, 80 ve 100 oranında karasudan oluşan besiyerlerinde elde edilen en düşük yüzey gerilimlerinin birbirine yakın ve yaklaşık 40 mN/m düzeyinde olduğu rapor edilmiştir. Diğer yandan aynı çalışmada mısır ıslatma şurubu, melas ve peynir altı suyunun ayrı ayrı besiyeri olarak kullanıldığı koşullarda da, en düşük yüzey gerilimi değerlerinin yaklaşık 50 mN/m olarak birbirlerine yakın olduğu bildirilmiştir (15). Bir başka çalışmada, glukoz ve maya özütüne ek olarak zeytin karasuyu içeren fermantasyon ortamında biyosüpfektan üretimi gerçekleştirilemediğı, zeytinyağı kullanıldığında ise tüm maya suşları ile besiyeri yüzey gerilimlerinde en yüksek düzeyde azalmaların sağlandığı belirtilmiştir (27). Biyosüpfektan üretimi için besiyeri olarak mısır ıslatma şurubu, melas, peynir altı suyu, hurma şurubu ve zeytin karasuyunun ayrı ayrı kullanıldığı ve fermentör

ortamında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, hurma şurubu içeren besiyerinin yüksek miktarda biyosüpfektan üretimi için en uygun ortam olduğu rapor edilmiştir (15). Kaur ve ark. (135) tarafından yürütölen bir diğör çalışmada restoran ve fırıncılık artıklarından ve tekstil artığından hazırlanan besiyerlerinden yararlanılmış ve *S. bombicola* ile en yüksek miktarda biyosüpfektan üretiminin restoran atığı içeren ortamda sağlandığı bildirilmiştir.

Sen ve ark. (38) tarafından etil alkol üretiminde yan ürün olarak açığa çıkan mısır ve pirinç bazlı substratların biyosüpfektan üretiminde karbon kaynağı olarak değörlendirildiğı bir çalışmada, besiyeri yüzey gerilimlerinin en düşük değörleri sırasıyla 36.60 ve 36.90 mN/m ve ayrıca her iki besiyerinin yüzey gerilimlerinde sağlanan maksimum azalma miktarlarının ise 13.90 ve 13.80 mN/m olarak birbirlerine oldukça yakın düzeyde bulundukları rapor edilmiştir. Aynı çalışmada bu ortamlarda *R. babjevae* suşu kullanılarak üretilen ve sırasıyla 120 ve 110 mg/L kritik misel derişimi değörlüne sahip olan biyosüpfektanların, suyun yüzey gerilimlerini 34 ve 37 mN/m'ye düşürdükleri bildirilmiştir.

Lipofilik substrat kaynaklarının %10 oranında glukoz ilave edilerek fermantasyon ortamı olarak değörlendirildiğı bir çalışmada ayçiçek yağı rafinasyon artığının *S. bombicola* aracılığıyla biyosüpfektan üretimini desteklediğı ve ayçiçek yağı içeren ortam ile kıyaslandığında 51.50 g/L derişimde ve oldukça yüksek miktarda biyosüpfektan elde edildiğı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, ayçiçek yağı ve rafinasyon artığını içeren ortamlarda ayrı ayrı üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla suyun yüzey geriliminin birbirlerine yakın düzeylerde ve yaklaşık 35.50 mN/m'ye düşüröldüğü rapor edilmiştir (136). *Candida lipolytica* mayasından yararlanılarak, endüstriyel artıklar olan hayvansal yağ ve mısır ıslatma şurubunu sırasıyla %5 ve %2.5 oranlarında içeren besiyerinde üretilen biyosüpfektanın besiyeri yüzey gerilimini 25 mN/m'ye kadar düşürdöğü bildirilmiştir (137). Belirli bir oranda yer fıstığı yağı rafineri artığı ve mısır ıslatma şurubu içeren fermantasyon ortamının *Candida sphaerica* için substrat kaynağı olarak değörlendirildiğı bir araştırmada ise suyun yüzey gerilimi 27.48 mN/m olarak belirlenmiştir (45).

Literatürde ayrıca besiyeri olarak artık yağ ve kızartma yağlarından yararlanılan çalışmalara rastlanmaktadır (12,50,66,72,138,139). Bileşiminde artık soya yağı ve mısır ıslatma şurubu içeren bir fermantasyon ortamında *S. cerevisiae* ile üretilen biyosüpfektan aracılığıyla besiyeri yüzey geriliminde meydana gelen

azalma miktarı 31.11 mN/m olarak bildirilmiştir (139). Biyosüpfektan üretimi için *S. cerevisiae* mayasının kullanıldığı başka bir çalışmada ise, kimyasal tanımlı bir besiyeri ve artık kızartma yağı ile birlikte mısır ıslatma şurubu içeren besiyerinin yüzey gerilimlerinde sırasıyla 26.65 ve 19.51 mN/m düzeylerinde azalma sağlandığı bildirilmiştir (138). Biyosüpfektan üretimi amacıyla glukozun ayrı ayrı zeytinyağı, artık yağ ve palm yağı ile bir arada kullanıldığı deneylerde besiyerlerinin en düşük yüzey gerilimleri sırasıyla 31.80, 29.80 ve 27.36 mN/m olarak raporlanmıştır (12). Artık bitkisel yağ ve rafine kolza yağının besiyeri olarak değerlendirildiği bir çalışmada artık yağlarda bulunan bazı maddelerin inhibisyon etkisinden dolayı, rafine yağda daha fazla biyosüpfektan üretildiği ifade edilmiştir (72). Benzer şekilde karbon kaynağı olarak glukozun yanı sıra palm olein ve artık kızartma yağının ayrı ayrı kullanıldığı bir başka çalışmada ise palm oleinin biyosüpfektan üretimini 2.25 kat desteklediği ve 93 g/L biyosüpfektan üretildiği Hirata ve ark. (66) tarafından bildirilmiştir (66). Ayrıca ilgili artık yağın yer aldığı deneyde kalıntı yağ miktarının palm oleine göre oldukça yüksek miktarda olması dolayısıyla tercih edilir olmadığı belirtilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmaların bir kısmında ise erlen ve fermentör koşullarında gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneyleri birbirleri ile karşılaştırılarak incelenmekte veya farklı hacimlerde fermentör kullanımının biyosüpfektan üretimine etkileri araştırılmaktadır. Teixeira Souza ve ark. (14) tarafından kimyasal tanımlı bir besiyeri kullanılarak çalkalamalı erlen ve fermentörde gerçekleştirilen deneylerde, 49 mN/m olan başlangıç yüzey geriliminin sırasıyla 17.6 ve 19.7 mN/m düzeyinde azaltıldığı bildirilmiştir. Besiyeri olarak ayçiçek yağı rafinasyon artığının değerlendirildiği bir çalışma kapsamında sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve havalandırma gibi üretim parametrelerinin kontrol altında tutulmasına bağlı olarak fermentörde gerçekleştirilen deneylerde, çalkalamalı erlen ile karşılaştırıldığında biyosüpfektan miktarlarının yaklaşık 10 g/L daha yüksek olduğu bildirilmiştir (136).

Kim ve ark. (72) tarafından glukoz ve artık yağ kullanılarak kesikli beslemeli fermentör ortamında 315.60 g/L düzeyinde üretilen biyosüpfektanın erlen ve fermentör koşullarında rafineri artıkları içeren bir besiyerinde *C. sphaerica* ile üretilen biyosüpfektan miktarları sırasıyla 8 ve 21.49 g/L olarak rapor edilmiştir (45). Dong ve ark. (8) tarafından yürütülen bir

çalışmada erlen düzeyinde 68.80 g/L, üretimin bir fermentör ortamında gerçekleştirildiği koşullarda ise 131.20 g/L biyosüpfektan üretildiği ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada karbon kaynağı olarak glukozu ek olarak palm olein ve oleik asidin bir karışım halinde kullanıldığı deneylerde, erlen koşullarında 67.6 g/L biyosüpfektan üretildiği ancak kalıntı lipofilik substrat miktarının 40 g/L olduğu, fermentör ortamında ise üretimin 118 g/L olarak çok daha yüksek miktarda gerçekleştiği ve toplam 100 g/L lipofilik substratın tamamına yakının *S. bombicola* tarafından kullanıldığı ayrıca her iki koşulda glukozun tamamen tüketildiği ifade edilmiştir (66).

Bir başka çalışmada ise erlen koşullarında üretilen 24.1 g/L biyosüpfektanın, 5 ve 50 L hacimlerindeki fermentörlerde kesikli beslemeli sistemin kullanılması sonucu sırasıyla 28.6 ve 53.2 g/L olarak daha yüksek miktarlarda üretildiği ifade edilmiştir (6). Santos ve ark. (137) tarafından iki farklı hacimde fermentör kullanılarak yürütölen bir çalışmada ise, yüksek hacimli fermentörde üretilen biyosüpfektan miktarının üç kat daha fazla olduğu ve besiyeri yüzey geriliminin bir miktar daha yüksek düzeyde düşüröldüğü bildirilmiştir. Santos ve ark. (140) tarafından *C. lipolytica* kullanılarak fermentör ortamında gerçekleştirilen bir çalışmada karıştırma hızının düşük olduğu ve havalandırma uygulanmayan koşullarda yüzey geriliminin daha düşük, üretim miktarının ise yüksek olduğu, ancak biyokötle miktarının bir miktar düşük kaldığı bildirilmiştir. Biyosüpfektan üretimi amacıyla bir *W. anomalus* suşundan yararlanılan bir çalışmada ise, sabit bir havalandırma hızında karıştırma hızının 250-500 rpm aralığında artmasına bağılı olarak daha düşük yüzey gerilimi sonuçlarına ulaşıldığı ancak maya üremesinin azaldığı belirtilmiştir (14).

Biyosüpfektan üretimi için mayalardan yararlanılan çalışmalarda suyun yüzey geriliminin 25 mN/m'e kadar düşüröldüğü ve ayrıca elde edilen kritik misel derişimi değeri lerinin ise 30-900 mg/L olmak üzere geniş bir aralıkta değ işim gösterdiği bildirilmiştir (11,27,45). Diğ er taraftan biyosüpfektanların bir diğ er fonksiyonel özelliğı olarak emölsiyon oluşturma kapasitelerinin araştırıldığı çeş itli çalışmalar gerçekleştirilmekte ve bu sayede biyosüpfektanların potansiyel kullanım alanları hakkında ö ngörü sahibi olunmaktadır. Yürütölen bir çalışmada iki farklı besiyerinde üretilen maya kaynaklı bir biyosüpfektanın, alifatik ve aromatik hidrokarbonlardan oluş an ham petrol ve motor yağı ile %75-100 arasında değ iş en değ erlerde E₂₄ oluşturma sı dolayısıyla petrokimya sektöründe

kullanılabilir olduğu, ayrıca ayçiçek yağında en yüksek %56.60 düzeyinde E₂₄ değerine sahip olduğu için gıda, eczacılık ve kozmetik sektörlerinin çeşitli uygulama alanlarında yer alabileceği ifade edilmiştir (38).

Biyosüpfektanların sıcaklık, pH ve tuz derişimi gibi değişen ortam koşulları altında yüzey aktif ve emülsiyon oluşturma stabiliteilerinin araştırılmasının da potansiyel uygulama alanlarındaki etkinliklerinin saptanması açısından önem taşıdığı bilinmektedir. Maya kaynaklı bir biyosüpfektanın pH 3-9 arasında yüzey gerilimi düşürme aktivitesini koruduğı, pH 11 ve 12’de görülen kaybın ise denatürasyondan kaynaklandığı rapor edilmiştir (11). *Candida utilis* ile üretilen bir biyosüpfektanın ise 120°C’de 15-180 dakika süresince uygulanan ısıl işlem karşısında yüzey gerilimi stabilitesini koruması dolayısıyla pastörizasyon ve sterilizasyon uygulanan gıdalarda kullanılabilir olduğu Campos ve ark. (48) tarafından raporlanmıştır.

Sen ve ark. (38) tarafından yürütölen bir çalışmada ise iki farklı besiyerinde üretilen biyosüpfektanın belirli ortam koşulları altındaki yüzey gerilimi kapasiteleri arasındaki farklılıklar ortaya konmuş ve pirinç bazlı bir substrattan oluşun besiyerinde üretilen biyosüpfektanın 120°C’de 120 dakikaya kadar uygulanan ısıl işlem karşısında yüzey gerilimi değerlerini koruduğı ancak mısır bazlı bir ortamda üretilen biyosüpfektan için ısıl işlemin 40 dakika sonrasında yüzey geriliminde önemli düzeyde bir artış göröldüğü bildirilmiştir. Bununla beraber mısır bazlı besiyerinden elde edilen biyosüpfektanın yüksek tuz derişimlerinde stabilitesini koruduğı, pirinç bazlı biyosüpfektanda ise %4 tuzdan sonra yüzey geriliminin önemli düzeyde arttığı rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada yüzey gerilimi ve E₂₄ değerlerinin pH, sıcaklık ve tuz derişiminin sırasıyla 2-12, 30-90°C ve %2-10 olarak geniş aralıkta kullanıldığı koşullardan düşük düzeyde etkilendiğı ve bu kapsamda üretilen biyosüpfektandan petrol geri kazanımı uygulamalarında yararlanılabileceğı bildirilmiştir (120). Gaur ve ark. (132) tarafından yürütölen bir çalışmada iki farklı maya türü kullanılarak üretilen biyosüpfektanların emülsiyon stabiliteilerini pH 2-10, 4-120°C sıcaklık ve %2-14 tuz derişimi aralığında koruduğı bildirilmiştir. Maya kaynaklı bir başka biyosüpfektanın mısır yağı ve ayçiçek yağı içeren ortamlarda pH değerinin en yüksek olduğı koşulda maksimum E₂₄ değerine sırasıyla %66.70 ve 73.30 olarak ulaşıldığı, bu değerlerin pH 2’de ise her iki ortam için yaklaşık %26.5 düzeyinde

oldukça düşük olduğu ve yüksek pH değerlerinin emülsiyon oluşturan bileşenlerin yapılarını etkilemiş olabileceği ifade edilmiştir (48).

Bakteriler aracılığıyla üretilen biyosüpfektanlarla benzer şekilde maya kaynaklı biyosüpfektanların antimikrobiyel aktivite gösterdiğine ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada klinik suşlar olan *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio parahemolyticus*, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerinin 200 µg/mL olarak oldukça düşük derişimde bir biyosüpfektan aracılığıyla inhibisyona uğratıldığı; *Salmonella Paratyphi*, *Klebsiella oxytoca*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus*, *S. Typhi*, *Proteus mirabilis* ve *Streptococcus pneumoniae* bakterilerine karşı %36-86 aralığında değışen oranlarda antimikrobiyel aktivite sağlandığı ifade edilmiştir (11). *S. bombicola* kaynaklı bir biyosüpfektanın kanatlı hayvanlarda yaygın olarak bulunan patojenler olan *Clostridium perfringens* ve *C. jejuni* bakterilerine karşı antimikrobiyel etki sağladığı ve bu nedenle kanatlı endüstrisinde sanitasyon uygulamaları için yararlı olabileceği Silveira ve ark. (37) tarafından bildirilmiştir.

Akgül ve ark. (138) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *S. cerevisiae* aracılığıyla üretilen biyosüpfektanın *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin inhibisyonuna etkisinin *Y. lipolytica* ve *Rhodotorula glutinis* kaynaklı biyosüpfektanlara göre daha yüksek olduğu ve diğer yandan tüm biyosüpfektanların *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyel aktivitesinin eşit düzeyde olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerinin inhibisyonunda *D. hansenii* kaynaklı biyosüpfektanın *Rhodotorula mucilaginosa* aracılığıyla üretilen biyosüpfektana göre daha etkili olduğu ifade edilmiştir (64).

Mendes ve ark. (141) tarafından yürütölen bir çalışmada *S. bombicola* CBS 6009 kaynaklı bir soforolipidin saflaştırılan laktonik diasetillenmiş C18:0 ve C18:1 formlarının *S. aureus* üzerine antibakteriyel etkisinin, bu iki formun karışımına ve ayrıca asidik deasetillenmiş C18:1 formuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ticari soforolipit ve maya kaynaklı soforolipitlerin antibakteriyel özelliklerinin araştırıldığı bir çalışma kapsamında, maya soforolipitleri ile ticari ürüne benzer veya genel olarak daha iyi sonuçların alındığı ancak yalnızca biyosüpfektanın inhibisyon etkisinin yeterli olmadığı *B. cereus*, *S. aureus* ve *S. Typhimurium* patojenlerine karşı ticari ürünün daha etkin olduğu raporlanmıştır (38).

Literatürde ayrıca maya kaynaklı biyosüpfektanların antifungal etkilerinin araştırıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır. Kumari ve ark. (39) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada maya kaynaklı bir biyosüpfektanın mikotoksin üretme potansiyeline sahip ve patojen *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum* ve *Colletotrichum gloeosporioides* küflerinin inhibisyonunda etkin olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada *Rhodotorula* cinsi mayalar ile üretilen biyosüpfektanların bitki ve insan patojenleri olan *C. gloeosporioides*, *F. verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *Corynespora cassicola*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum fulvum*, *Trichophyton ajelloi* ve *Trichophyton mentagrophytes* küf türlerine karşı 0.062-1 mg/mL aralığında değişen minimum inhibisyon derişimlerinde antifungal etki sağladığı ve bu biyosüpfektanların antifungal kapasitesinin ticari bir soforolipide yakın düzeyde olduğu ifade edilmiştir (119).

Başka bir çalışmada, *D. hansenii* ve *Rhodotorula mucilaginosa* kaynaklı iki biyosüpfektanın 0.5 ve 1 g/L olarak düşük derişimlerinin *A. niger* üzerinde antifungal etki oluşturmadığı, biyosüpfektanların daha yüksek derişimlerinde ise sınırlı düzeyde bir inhibisyonun sağlandığı belirtilmiştir (64). Yılmaz ve ark. (142) tarafından yürütölen bir çalışmada ise *Fusarium* cinsi bazı bitki patojeni küflerin inhibisyonunda, *Y. lipolytica* aracılığıyla üretilen biyosüpfektana göre bakteriyel biyosüpfektanların daha etkin oldukları bildirilmiştir.

Biyosüpfektanların antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin besiyeri bileşimlerinden büyük ölçüde etkilendiğı ifade edilmektedir. Sen ve ark. (38) tarafından *R. babjevae* aracılığıyla mısır ve pirinç bazlı substratlar içeren besiyerlerinde üretilen biyosüpfektanların sırasıyla 0.062-0.5 mg/mL ve 0.125-0.5 mg/mL aralığında değişen minimum inhibisyon derişimlerinde *S. typhimurium* MTCC 3224, *Micrococcus luteus* MTCC 7950, *Proteus vulgaris* MTCC 744, *K. pneumoniae* MTCC 618, *B. subtilis* MTCC 1134 patojenlerini inhibe ettiğı ve bu iki biyosüpfektanın başta *K. pneumoniae* olmak üzere diğör bazı patojenlere karşı genel olarak farklı düzeylerde antibakteriyel aktivite sağladığı rapor edilmiştir. Benzer bir şekilde glukozun yanı sıra artık yağ içeren ortamda üretilen biyosüpfektanın *E. coli* EPEC 055, *Salmonella* Enteritidis ATCC 564 ve *S. aureus* ATCC 8702 patojen bakterilerine; üretimi için glukoz ve palm yağının kullanıldığı biyosüpfektanın ise *B. cereus* ATCC 14579 bakterisine karşı sağladıkları antimikrobiyel etkilerinin daha üstün olduğu bildirilmiştir (12). Bu

çalışmada bir gıda artığından hazırlanan besiyerinin deneylerde kullanıldığı koşullarda genel olarak daha iyi antimikrobiyel aktivite sonuçlarının alınmış olduğu, ancak bileşimlerinde glukozun yanı sıra zeytinyağı, artık yağ ve palm yağını ayrı ayrı bulunduran besiyerlerinde üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla gıda kaynaklı *A. flavus* LAPS 155, *A. niger* LAPS 182, *Cercospora sorghi* LAPS122, *Colletotrichum truncatum* LAPS 457 ve *F. solani* LAPS 167 küflerinin birbirine yakın düzeylerde inhibisyona uğratıldığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada *Fusarium verticillioides* LAPS 355 küf için ise, artık yağ ve zeytinyağı içeren ortamlarda üretilen iki farklı biyosüpfektanın sırasıyla yaklaşık %55 ve 70 olarak farklı düzeylerde antifungal etki gösterdiği aktarılmıştır (12).

Mayalar aracılığıyla üretimleri sağlanan bazı biyosüpfektanların biyofilm oluşumuna etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise *E. coli* adezyonunun herhangi bir şekilde engellenemediği, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilm oluşumunun belirli düzeylerde önlenmesinde ise sırasıyla *Y. lipolytica* ve *R. glutinis* mayaları ile üretilen biyosüpfektanların daha etkili olduğu bildirilmiştir (138). Bir başka çalışmada ise *S. enterica* serotip Enteritidis kaynaklı biyofilm oluşumunu *Y. lipolytica* TEM OS12 ve TY24 biyosüpfektanlarının sırasıyla %89.42 ve 88.09 düzeyinde önlediği ifade edilmiştir (143).

Ceresa ve ark. (144) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *Candida bombicola* aracılığıyla üretilen bir biyosüpfektanın medikal silikon disk ortamında oluşturulan *C. albicans*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilmleri yaklaşık %70-80 oranında uzaklaştırdığı aktarılmıştır. Aynı çalışma kapsamında hem biyosüpfektan ve patojenlerin bir arada inkübe edildiği hem diskin biyosüpfektan ile önceden kaplandığı koşullarda biyosüpfektanın *C. albicans* ve *S. aureus* patojenlerinin silikon diske adezyonunu önemli ölçülerde engellediği raporlanmıştır. Başka bir çalışmada ise medikal silikon yüzeyinde *S. aureus* biyofilmi oluşumunun, soforolipidin asidik ve laktonik karışımları ve yalnızca laktonik karışımı ile silikonun kaplanması sonucu sırasıyla %90 ve %98 düzeylerinde engellendiği bildirilmiştir (141).

Nguyen ve ark. (145) tarafından bazı kimyasal süpfektanların *P. aeruginosa* PAO1 biyofilminin uzaklaştırılmasına yönelik etkilerinin maya kaynaklı biyosüpfektan ile karşılaştırıldığı bir çalışmada biyosüpfektanın daha üstün olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Maya Kùltürleri

Çalışmada yer alan maya kùltürleri, kızılıık tarhanası üretimini çeşitli aşamalarından, baldan, Mihaliç ve Erzincan tulum peynirleri ve Keş peynirinden izole edilmiş olan suşlardır. Kızılıık tarhanası ve Keş peyniri kaynaklı suşlar, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu oluşturulan kùltür koleksiyonundan temin edilmiştir. İzolasyon kaynağı Mihaliç ve Erzincan tulum peynirleri ile bal olan maya suşları ise, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Tüm maya suşları MALDI-TOF MS Biotyper yöntemiyle tanımlanmıştır. İncelenen 142 adet maya arasında tür düzeyinde tanımlanan *Hanseniaspora uvarum* (16 adet), *Saccharomyces cerevisiae* (17 adet), *Torulaspora delbrueckii* (18 adet), *Metschnikowia pulcherrima* (23 adet), *Wickerhamomyces anomalus* (3 adet), *Cyberlindnera fabianii* (2 adet), *Trichosporon asahii* (1 adet), *Pichia kluyveri* (2 adet), *Geotrichum silvicola* (2 adet), *Debaryomyces hansenii* (1 adet), *Candida inconspicua* (1 adet), *Candida lusitanae* (11 adet), *Candida krusei* (18 adet), *Candida kefir* (2 adet), *Candida parapsilosis* (1 adet), *Candida guilliermondii* (1 adet), *Candida valida* (2 adet), *Candida catenulata* (3 adet), *Candida zeylanoides* (1 adet), *Candida famata* (13 adet), *Candida tropicalis* (3 adet) ve *Candida lipolytica* (1 adet) suşları bulunmaktadır (EK 1).

3.1.2 Bakteri Kùltürleri

Biyosüpfektanın antibakteriyel ve anti adezyon aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis NCTC 12694, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşları Bolu Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Bakteriler Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde 18-24 saat süre ile aktifleştirilmiştir. Kùltürler 4°C buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Küf Kültürleri

Biyosüpfektanın antifungal aktivitesinin araştırılması amacıyla kullanılan *Fusarium oxysporum* 38-4 ve *Penicillium expansum* 11F suşları Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Moleküler Patoloji Laboratuvarı Fungal İzolat Koleksiyonundan temin edilmiştir. *P. expansum* izolatının moleküler tür tanımlaması ITS ve RPB2 gen bölgeleri ve *F. oxysporum* izolatının ise Tef1 gen bölgesi sekansına dayandırılmıştır. Bu izolatların NCBI GenBank nükleotid veri bankasına dahil edildiği bilinmektedir. *P. expansum* küfünün ITS ve RPB2 gen bölgeleri için sırasıyla OP327059 ve OP437560 ve *F. oxysporum* küfünün Tef1 gen bölgesi için OP341618 olarak verilen erişim numaraları GenBank tarafından sağlanmıştır. Bu küfler Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde 25°C’de 7 gün süre ile aktifleştirilmiştir. Denemeler süresince kültürler 4°C buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.1.4 Tanımlı Fermantasyon Ortamlarında Kullanılan Karbon Kaynağı Bileşenleri

Fermantasyon ortamı bileşimlerinde hidrofilik karbon kaynağı olarak glukoz (Isolab, Türkiye), fruktoz (Takita Online, Egepak Gıda ve Ambalaj San. A.Ş., Türkiye), sakkaroz (Isolab, Türkiye) ve gliserol (Isolab, Türkiye) kullanılmıştır. Besiyerlerinde hidrofobik karbon kaynağı olarak yer alan bitkisel yağlardan ayçiçek yağı (Salat, Bunge-Türkiye), fındık yağı (Çotanak, Türkiye), mısır yağı (Salat, Bunge-Türkiye) ve zeytinyağı (Zeo, Türkiye) Bolu ilinde bulunan marketlerden satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan kanola ve pamuk yağları ise Orkide Yağ (İzmir, Türkiye) işletmesinden sağlanmıştır.

3.1.5 Tanımlı Fermantasyon Ortamlarında Kullanılan Azot Kaynağı Bileşenleri

Besiyeri bileşimlerinde azot kaynağı olarak maya özütü (Merck, Almanya), pepton (Merck, Almanya), üre (Merck, Almanya), amonyum klorür (Sigma-Aldrich, Almanya), amonyum sülfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve sodyum nitrat (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.6 Doğal Fermantasyon Ortamı Hazırlığında Hammadde Olarak Kullanılan Gıda Artıkları

3.1.6.1 Portakal ve Limon Kabukları

Portakal ve limon kabukları F(x) Food (Antalya, Türkiye) işletmesinden toz formunda satın alınmıştır.

3.1.6.2 Balkabağı Kabuğu

Balkabağı kabukları Mert Kuru Gıda (Sakarya, Türkiye) işletmesinden kurutulmuş balkabağı tozu üretim prosesi artığı olarak sağlanmıştır. Balkabağı kabukları deneylere kadar -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.6.3 Elma ve Havuç

Besiyeri hazırlığında kullanılan elma ve havuç, Bolu ilinde yerel bir marketten satın alınmıştır. Elma ve havuçların laboratuvar ortamında hazırlanan kabuklu posaları -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.6.4 Zeytin Karasuyu

Zeytin karasuyu üç fazlı üretim sisteminin kullanıldığı Eriklice Sulama Kooperatifi Zeytinyağı Fabrikası’ndan (Tekirdağ, Türkiye) temin edilmiştir. Çalışma boyunca aynı bileşimdeki zeytin karasuyu ile çalışılabilmesi için, sezonunda temin edilen karasu, küçük hacimli parçalar halinde -18°C’deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.1.6.5 Artık Kızartma Yağı

Tez çalışmasında kullanılan doğal besiyeri bileşimlerinde yer alan artık kızartma yağı, Beypi Beypazarı Tarımsal Üretim Pazarlama Sanayi ve Tic. A.Ş. (Bolu, Türkiye) işletmesinden temin edilmiştir. Bu yağın ileri işlenmiş ürünlerin üretiminin kızartma prosesi sonunda artık olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir.

3.1.7 Sürfektanlar

Çalışma kapsamında tween 80 (Isolab, Türkiye), triton x-100 (Bio Basic, Kanada) ve sodyum lauril sülfat (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.8 Biyosüpfektan Üretiminin İncelendiği Deney Düzenegi

Biyosüpfektan üretimlerinin erlenlerde incelendiği deneyler, kesikli sistemde, sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST-402, Türkiye) yürütölmüştür. Deneyler, 300 mL'lik erlenlerde 100 mL çalışma hacmi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyosüpfektan üretimi çalışmaları ayrıca 3 L hacimli fermentörde (Minifors 2, Infors, İsviçre) yürütölmüştür.

3.2 Metot

3.2.1 Maya Suşlarının Biyosüpfektan Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.2.1.1 Tween 80 Agar Testi

Tween 80 agar besiyerinin bileşiminde pepton (10 g/L), NaCl (5 g/L), CaCl₂ (0.1 g/L), agar (15 g/L) ve tween 80 (5 mL/L) yer almaktadır. Öncelikle; YM broth besiyerinde 28°C'de 24-48 saat süre ile geliştirilen maya kültürlerinden, ilgili besiyerine sürme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Tween 80 testi için, 28°C'de, 3-5 gün olarak uygulanan inkübasyonun ardından, maya kolonilerinin etrafında presipitasyon zonu olup olmadığı incelenmiştir. Tween 80 besiyerinde, tween hidrolizasyonu ile açığa çıkan yağ asitleri, besiyerindeki kalsiyumla birleşerek koloni etrafında çözünmez kristal yapılarının (beyaz presipitat) oluşumunu sağlamaktadır (26,146).

3.2.1.2 Hidrokarbon Agar Testi

Hidrokarbon agar besiyeri, Eldin ve ark. (26) tarafından kullanılan besiyeri bileşiminin kısmen modifikasyonu ile oluşturulmuştur. Besiyeri MgSO₄ (0.5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), FeSO₄ (0.01 g/L), NaNO₃ (1.5 g/L), CaCl₂ (0.002 g/L), agar (15 g/L) ve ayçiçek yağı (%1) içermekte olup hazırlanan besiyeri yüzeyine 50 µL steril ayçiçek yağı yayılmıştır. Hidrokarbon agar testi için, maya kültürlerinden besiyerine sürme yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiş ve 28°C'de, 7-10 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Hidrokarbon agar besiyerinde kolonilerin etrafında bulanık zon oluşumu, lipolitik aktiviteyi ve aynı zamanda suşun potansiyel biyosüpfektan üreticisi olduğunu göstermektedir (26,63).

3.2.2 Maya Suşlarının Biyosüpfektan Üretimlerinin Fermantasyon Ortamında İncelenmesi

Tween 80 ve hidrokarbon agar besiyerlerinde presipitat ve zon oluşturarak gelişen 44 adet maya suşunun, fermantasyon ortamında biyosüpfektan üretimleri araştırılmıştır. Bu amaçla; bileşiminde maya özütü (4 g/L), üre (1 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), NaCl (0.1 g/L), %10 glukoz ve %10 ayçiçek yağı yer alan tanımlı fermantasyon ortamı kullanılmıştır (136). Deneyler, 30°C’de ve 120 vuru/dak çalkalama hızında yürütölmüştür.

3.2.2.1 Fermantasyon Ortamına Aşıl原因an Kültürün Hazırlanması

Biyosüpfektan üretimlerinin incelendiğı tüm deneylerde maya kültürleri, bileşimi Yeast Extract Malt Extract (YM) broth besiyerinde 28°C’de 24 saat süre ile geliştirilmişlerdir. Hazırlanan kültürler, fermantasyon ortamlarına %5 oranında, yaklaşık 6.5 log (kob/mL) olacak şekilde aşıl原因mıştır.

3.2.2.2 Yağ Yayma Testi

Yağ yayma testi için, 90 mm çapındaki Petri kutusu içerisindeki 20 mL distile suyun üzerine 100 µL motor yağı damlatılmış ve bu yağ tabakası yüzeyinin merkezine 200 µL biyosüpfektan çözeltisi aktarılmıştır. Petri kutusunda iki dakika sonra oluşan zon çapı (cm) ölçölerek sonuçlar kaydedilmiş ve negatif kontrol örneğı olarak distile su kullanılmıştır (5).

3.2.2.3 Yüzey Gerilimi Analizi

Yüzey gerilimleri; Du-Noüy Ring yöntemine göre, 1.9 cm platin halka kullanılan bir tensiyometre (Sigma 702-Sigma 703D, Finlandiya) yardımıyla ölçölmüştür. Yüzey gerilimi ölçömleri için, fermantasyon ortamlarından yaklaşık olarak 24 saatte bir aseptik koşullarda alınan örnekler 5000 rpm’de 25 dakika santrifüjlenmişlerdir. Süpernatantın heterojen ve süspanse bir yapıya sahip olmasından dolayı örnekler analize alınmadan önce 0.45 µm şırınga ucu filtre kullanılarak süzülmüş ve analize kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edilmişlerdir (58).

Yüzey gerilimi ölçömleri örneklerin oda sıcaklığında yaklaşık olarak 30 dakika bekletilmelerinin ardından 50 mL hacmindeki cam beherlerde yaklaşık 10 mL örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yüzey gerilimindeki azalma

miktarlarının belirlenmesi amacıyla negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmış ve başlangıç yüzey gerilimi değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Analiz edilen her bir örnek için, halka sırasıyla hekzan ve aseton içerisinde yaklaşık olarak 1 dakika boyunca bekletilmiş ve çözücülerin uzaklaşması amacıyla halka alev yardımıyla 10-15 saniye kurutulmuştur. Tüm yüzey gerilimi ölçümleri üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4 Maya Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Tanımlı ortamlarda *Cyberlindnera fabianii* MIAU-1 suşu ile gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneylerinde maya derişimleri kuru ağırlık cinsinden hesaplanmıştır. Bu amaçla, öncelikle bu suş için 660 nm dalga boyunda okunan absorbans-yaş ağırlık (x_y) ve yaş ağırlık (x_y)-kuru ağırlık (x) çalışma doğruları oluşturulmuştur. Bütün grafiklerin oluşturulmasında Origin Pro 8 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılmıştır.

Absorbans-yaş ağırlık çalışma doğrusunun oluşturulması için, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu, biyosüpfektan üretimi deneylerinde kullanılan ve yağ haricinde diğer tüm bileşenleri içeren besiyerine (glukoz, %10; maya özütü, 4 g/L; üre, 1 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 1 g/L; NaCl, 0.1 g/L) %10 oranında aşılantı ve 30°C’de 72 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 5000 rpm’de 25 dakika santrifüjlenmişlerdir (Nüve NF 200, Türkiye). Santrifüjlenen örneklerin çökeltilerinden belirli miktarlarda tartılarak, 100 mL distile su içerisinde süspansiyon haline getirilmişler ve spektrofotometrede (UV 1800 Shimadzu, Japonya) 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu doğrultuda, maya suşu için absorbans-yaş ağırlık çalışma doğrusu oluşturulmuştur (EK 2).

Yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusunun oluşturulması amacı ile ise, yukarıda belirtilen şekilde alınan örneklerin santrifüjlenmesi ile elde edilen çökeltilerden belirli miktarlar tartılmıştır. Tartılan örnekler, etüvde 80°C’de yaklaşık iki saat süre ile sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuşlardır. Kurutulan örnekler tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra, maya suşu için yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu hazırlanmıştır (EK 2).

Deneyler süresince, mikroorganizma derişiminin kuru ağırlık olarak belirlenebilmesi için biyosüpfektan üretimi deneylerinde, belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamlarından 3-5 mL hacminde örnekler alınmış ve

5000 rpm'de 25 dakika süre ile santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjlenen örneklerin çökeltileri mikroorganizma derişiminin (g/L) spektrofotometrik olarak, kuru ağırlık cinsinden hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.2.2.5 Maya Sayısının Belirlenmesi

Gıda artıklarından hazırlanan fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneylerinde maya sayısının takip edilmesi amacıyla YM agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiş ve uygun dilüsyondan sayım yapılarak sonuçlar log (kob/mL) olarak ifade edilmiştir.

3.2.3 Fermantasyon Ortamı İçin Karbon Kaynağı Bileşenlerinin Belirlenmesi

Biyosüpfektan üretiminde kullanılacak olan fermantasyon ortamı bileşimlerini belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen deneylerde; *Cyberlindnera fabianii* MIAU-1 suşundan yararlanılmıştır. Fermantasyon ortamında yağ ile beraber bulunacak olan karbon kaynağının seçiminde, *Cyb. fabianii* türünün substrat kullanım profilleri göz önüne alınmıştır (147). Bu doğrultuda, bu türün glukoz ve sakkaroz kullanımları bakımından pozitif oldukları belirtilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, glukoz ve sakkarozun yanı sıra fruktozun da kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla Jadhav ve ark. (2019) tarafından önerilen ve maya suşunun seçilmesi amacıyla ilgili deneylerde kullanılan besiyeri bileşiminde %10 derişimde yer alan glukoz (GLU) aynı derişimde fruktoz (F) ve sakkaroz (S) ile; yağ bileşeni olarak %10 derişimde bulunan ayçiçek yağı (AY) ise, mısır yağı (MY), zeytinyağı (ZY), fındık yağı (FY), pamuk yağı (PY) ve kanola yağı (KY) ile değiştirilerek toplam 18 farklı kombinasyon oluşturulmuştur.

Diğer yandan, biyosüpfektan üretimi amacıyla kullanılan bir substrat olarak belirtilen gliserol (GLİ) %10 derişimde olacak şekilde, yukarıda verilen kombinasyonlarda yer alan şeker ve yağ bileşenleri ile ayrı ayrı ve %10 oranlarında desteklenerek kullanılmış ve bu kapsamda 9 adet deney yapılmıştır.

Ayrıca, hem gliserol hem daha önceki deneylerde en iyi sonucu verdikleri belirlenen glukoz ve ayçiçek yağı kombinasyonunda yer alan bileşenler fermantasyon ortamında ayrı ayrı %20 oranında kullanılmıştır. Fermantasyon ortamında kullanılacak olan karbon kaynağının seçilmesine yönelik olarak

gerçekleştirilen 30 deney ve bu deneyde yer alan bileşenler Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Karbon kaynağının seçilmesine yönelik olarak denemeye alınan besiyeri bileşimleri

Besiyeri bileşimleri	
Glukoz içeren besiyeri	GLU (%10)+AY (%10); GLU (%10)+FY (%10); GLU (%10)+KY (%10); GLU (%10)+MY (%10); GLU (%10)+PY (%10); GLU (%10)+ZY (%10)
Fruktoz içeren besiyeri	F (%10)+AY (%10); F (%10)+FY (%10); F (%10)+KY (%10); F (%10)+MY (%10); F (%10)+PY (%10); F (%10)+ZY (%10)
Sakkaroz içeren besiyeri	S (%10)+AY (%10); S (%10)+FY (%10); S (%10)+KY (%10); S (%10)+MY (%10); S (%10)+PY (%10); S (%10)+ZY (%10)
Gliserol içeren besiyeri	GLİ (%10)+AY (%10); GLİ (%10)+FY (%10); GLİ (%10)+KY (%10); GLİ (%10)+MY (%10); GLİ (%10)+PY (%10); GLİ (%10)+ZY (%10); GLİ (%20); GLİ (%10)+GLU (%10); GLİ (%10)+F (%10); GLİ (%10)+S (%10)
Diğer besiyerleri	GLU (%20) AY (%20)

3.2.4 Fermantasyon Ortamında Azot Kaynağı Bileşenlerinin Belirlenmesi

Karbon kaynağı olarak glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyeri bileşiminde yer alan azotlu bileşenler (maya özütü, 4 g/L; üre, 1 g/L); ayrı ayrı organik (pepton, üre, maya özütü) ve inorganik (amonyum klorür, amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynakları ile yer değiştirerek kullanılmıştır. Bu deneylerde, azot kaynağı derişimleri 5 g/L olarak sabit tutulmuştur. Azot kaynağının seçilmesine yönelik deneylerde yüzey gerilimi analizleri gerçekleştirilmiş ve hücre kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.5 Deney Tasarımının Oluşturulması, Yanıtın Modellenmesi ve Besiyerinde Yer Alan Bileşenlerin Optimum Derişimlerinin Belirlenmesi

3.2.5.1 Deney Tasarımı

Cyb. fabianii suşu ile biyosürefektan üretimi sonucunda besiyeri yüzey geriliminde azalma sağlayan en uygun koşulların belirlenmesi için, besiyeri bileşiminde yer alan karbon ve azot kaynakları derişimlerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu hedeflenmiştir. Bu kapsamda, glukoz derişimi (X_1), ayçiçek yağı derişimi (X_2), üre derişimi (X_3) ve maya özütü derişimi (X_4) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir.

Bağımsız değişkenlerin etkilerinin belirlenebilmesi için, Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılarak, merkezi karma tasarım (central composite design) yöntemi ile bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Deney tasarımı -1.2, -1, 0, 1, 1.2 olarak kodlanmış 5 düzeyde yapılmış, merkez noktasında 6 tekrar kullanılmıştır. Tasarımda deney sayısı, Eşitlik (1) temelinde, aynı program yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte k , bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 6 \quad (1)$$

Deney tasarımıdaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ise, Eşitlik (2) yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte; x_i kodlanmış değeri, X_i bağımsız değişkenin gerçek değerini, X_0 bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değerini ve ΔX ise, düzeyler arasındaki farkı ifade etmektedir.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (2)$$

Deney tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler ile minimum ve maksimum değerleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Merkezi karma tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler

Bağımsız değişken	Simge (birim)	Minimum değer	Maksimum değer
Glukoz derişimi	X_1 (%)	2.1	12.9
Ayçiçek yağı derişimi	X_2 (%)	1.2	10.8
Üre derişimi	X_3 (g/L)	0.8	3.2
Maya özütü derişimi	X_4 (g/L)	0.8	3.2

3.2.5.2 Yüzey Gerilimindeki Azalmanın Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

Yüzey geriliminde azalma miktarı olarak belirlenen yanıt değerinin glukoz derişimi, ayçiçek yağı derişimi, üre derişimi ve maya özütü derişimi ile değişimlerini gösteren model eşitlik Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı yardımıyla oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında yüzey geriliminde azalma miktarının modellenmesinde, etkileşim terimlerini de içeren lineer model (2FI modeli) kullanılmıştır. Eşitlik (3) ile gösterilen lineer modelde, y ; yanıt, X_i ve X_j bağımsız değişkenler, β_0 ; sabit katsayı, β_j ve β_{ij} ise sırasıyla; lineer ve iki terimli etkileşim katsayılarını ifade etmektedir.

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

Program tarafından verilen model için, aynı program kullanılarak varyans analizi yapılmış; modelin, bağımsız değişkenlerin ve bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimlerin önemlilik düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca; bağımsız değişkenlerin birbirleriyle etkileşimlerini gösteren yanıt yüzey grafikleri oluşturulmuş ve değerlendirilmiştir.

3.2.5.3 Optimizasyon

Çalışmada, fermantasyon ortamı bileşiminde yer alan karbon ve azot kaynaklarının optimum derişimlerinin belirlenmesi hedeflenerek nümerik optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda “istenen hedefe ulaşma

fonksiyonu” kullanılmış ve belirlenen hedefler doğrultusunda optimizasyon, Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır.

Optimizasyonda, yüzey geriliminde azalma miktarının maksimum olması hedeflenmiştir. Bağımsız değişkenlerin birbirleriyle etkileşimlerinin yanıt üzerine etkilerini gösteren yüzey grafiklerinin değerlendirilmesi sonucunda, bağımsız değişkenler için de hedefler belirlenmesine karar verilmiştir. Bu kapsamda glukoz derişiminin %8-10, ayçiçek yağı derişiminin %6-10, üre ve maya özütünün ise 1-3 g/L arasında olması hedeflenmiştir.

Hedeflerin belirlenmesinin ardından, sistemin önermiş olduğu optimum koşullar arasından, yanıt değerinin mümkün olduğunca yüksek olması esas alınarak ve ayrıca istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun 1’e yakın olmasına dikkat edilerek, en uygun olan kombinasyon seçilmiştir (EK 3).

Seçilen optimum koşulların doğrulanmasına yönelik olarak bu koşulların birlikte kullanıldığı bir deney yürütülmüş ve deney sonucunun %95 güven aralığında doğrulanır olup olmadığının kontrolü, ilgili programın “doğrulama” menüsü aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Gıda Artıklarından Fermantasyon Ortamlarının Hazırlanmaları

Cyb. fabianii mayasının karbon asimilasyon profili doğrultusunda bu mayanın glukoz, fruktoz ve sakkaroz şekerlerini kullanabildiği bilinmektedir. Bu nedenle; biyosürefektan üretimi için artık ve artıkların değerlendirilmesi amacıyla zeytin karasuyu ve artık kızartma yağının yanı sıra, substrat kullanım profiline uygun olmaları bakımından (glukoz, fruktoz ve sakkarozu kullanabilmesi) çeşitli meyve artıklarından hazırlanan doğal fermantasyon ortamları kullanılmıştır.

3.2.6.1 Artık Kızartma Yağı İçeren Fermantasyon Ortamı

Artık kızartma yağı, meyve kabukları, kabuklu meyve posaları ve zeytin karasuyunun besiyeri hazırlığı amacıyla değerlendirildiği tüm çalışmalarda bir bileşen olarak yer almıştır. Artık yağın tek başına kullanıldığı bir besiyeri de hazırlanmıştır. Artık yağ işletmeden temin edildiği haliyle kullanılmış ve yağa herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır.

3.2.6.2 Portakal ve Limon Kabuğu Ekstraktları İçeren Fermantasyon Ortamı

Carota ve ark. (148) tarafınca önerilen doğal besiyeri hazırlama yöntemi esas alınarak, üretici işletmeden satın alınmış olan portakal ve limon kabuklarının 10:100 (kabuk: distile su; w/v) olacak şekilde karışımları hazırlanmış ve iyice karışmaları için bir manyetik karıştırıcıda orta hızda 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından bu karışımlar 90°C'deki bir su banyosunda 1 saat süre ile tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulan kabuk ekstraktları temiz bir tülbent bezi yardımıyla süzülerek kabuk parçacıkları mümkün olduğunca uzaklaştırılmış ve elde edilen süzüntüler 9000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmiştir (148). Santrifüjleme işlemi sonrasında hazırlanmış olan ekstrakta artık kızartma yağı (%10), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 g/L) ve KH_2PO_4 (1 g/L) eklenmiş ve besiyerinin pH'sı 6.5'e ayarlanmıştır. Bu besiyeri sterilizasyon amacıyla otoklavda 121°C'de 15 dakika tutulmuştur.

3.2.6.3 Balkabağı Kabuğu Ekstraktı İçeren Fermantasyon Ortamı

İşletmeden yaş formda ve küçük parçalara ayrılmış halde temin edilmiş olan balkabağı kabuklarının sulu karışımı (80:100, w/v) hazırlanmış ve manyetik karıştırıcıda 15 dakika bekletilen bu karışım 90°C'deki su banyosunda 1 saat süresince tutulmuştur. Gerekli süzme ve santrifüjleme işlemlerine tabi tutulan balkabağı ekstraktı besiyeri bileşiminde yer almıştır. Balkabağı kabuğu ekstraktından oluşan besiyerine artık kızartma yağı (%10), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 g/L) ve KH_2PO_4 (1 g/L) eklenerek besiyeri pH'sı 5 N NaOH çözeltisi ile 6.5'e ayarlanmıştır. Bu besiyeri otoklavda uygun koşullarda sterilize edilmiştir.

3.2.6.4 Elma ve Havuç Artığı Ekstraktları İçeren Fermantasyon Ortamı

Marketten satın alınan elma ve havuçlar yıkandıktan sonra ev tipi bir katı meyve sıkacağında (Philips HR 1854) sıkılmış ve kabuklu meyve posalarının eldesi sağlanmıştır. Elma ve havuçların kabuklu posaları distile su ile 80:100 (w/v) oranında karıştırılmış ve "Balkabağı Kabuğu Ekstraktı" bölümünde verildiği şekilde elma ve havuç ekstraktları hazırlanmıştır.

3.2.6.5 Zeytin Karasuyu İçeren Fermantasyon Ortamı

Zeytin karasuyu işletmeden temin edildiği haliyle fermantasyon ortamı hazırlığında değerlendirilmiş ve karasuya herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Zeytin karasuyu uygun miktarlarda distile su kullanılarak %10-80 arasında seyreltilmiş ve ayrıca %90 oranında zeytin karasuyu seyreltilmeden kullanılmıştır. Tüm zeytin karasularına artık kızartma yağı (%10), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 g/L) ve KH_2PO_4 (1 g/L) eklenmiştir. Karasu içeren besiyerlerinin pH'sı 6.5'e ayarlanarak uygun koşullarda sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.6.6 Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Sakkaroz, Fruktoz ve Glukoz Analizleri

Bazı gıda endüstrisi artıklarından yararlanılarak hazırlanan besiyerlerindeki başlangıç ve biyosüpfektan üretimi sonunda ortamda kalan sakkaroz, fruktoz ve glukoz derişimleri sakkaroz, D-fruktoz ve D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, İrlanda) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.6.7 Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Kalıntı Yağ Miktarı Analizi

Bazı gıda endüstrisi artığı bazlı besiyerlerindeki kalıntı yağ miktarının belirlenmesi için Kim ve ark. (72) tarafından önerilen yöntem kısmen modifiye edilmiştir. Bu kapsamda 1:1 hacimde biyosüpfektan çözeltisi ve petrol eteri manyetik karıştırıcıda 15 dakika süresince orta hızda karıştırılmıştır. Bir ayırma hunisine aktarılan karışımda faz ayrımının gerçekleşmesi beklenmiş, petrol eteri ve yağdan oluşan üst faz ayrılmıştır. Bir vakum buharlaştırıcı yardımıyla yaklaşık 35°C'de petrol eteri uzaklaştırılarak kalan yağ miktarı (mL) belirlenmiştir.

3.2.7 Biyosüpfektan Üretiminin Fermentör Koşullarında Gerçekleştirilmesi

Biyosüpfektan üretimi çalışmaları, 3 L toplam hacime ve 2 L maksimum çalışma hacmine sahip bir fermentörde (Minifors 2, Infors, İsviçre) 1 L çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamı olarak optimum tanımlı besiyeri (glukoz, %10; ayçiçek yağı, %10; maya özütü, 3 g/L; üre, 3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 1 g/L) ve gıda artıklarından yararlanılarak hazırlanan bir besiyeri (zeytin karasuyu, %20, artık kızartma yağı, %10,

MgSO₄.7H₂O, 5 g/L; KH₂PO₄, 1 g/L) kullanılmıştır. Aktif *Cyb. fabianii* kültürü besiyerine %5 oranında aşılanmıştır. Fermantasyon deneyleri 30°C’de gerçekleştirilmiş ve sıcaklık kontrolü ısıtıcı blok ve su banyosu yardımıyla sağlanmıştır.

Fermentör koşullarında yürütülen ön çalışmaların sonuçları esas alınarak, fermentör deneylerinde 600 rpm karıştırma hızı ve 0.5 L/dak havalandırma hızında çalışılmıştır. Besiyeri pH’ı yaklaşık 30 saat için 4’e sabitlenmiş ve daha sonra 4.8’e yükseltilmiştir. Besiyeri pH’ının ayarlanması için %20 H₃PO₄ ve 1 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır.

3.2.8 Biyosüpfektan Ekstraksiyonu

Fermentör koşullarında hem kimyasal tanımlı besiyeri hem gıda artığı bazlı besiyerleri kullanılarak üretilen biyosüpfektanların ekstraksiyonu için Balan ve ark. (11) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Fermantasyon sonunda alınan örnekler 5000 rpm’de 30 dakika santrifüjlenmiş ve biyosüpfektan çözeltisi elde edilmiştir. Biyosüpfektan ekstraksiyonu amacıyla, ayırma hunisi içerisinde hacimsel olarak 1:1 oranında bulunan biyosüpfektan çözeltisi ve diklorometan en az on kez alt üst edilerek karıştırılmış ve ayırma hunisinde iki fazın ayrılması için yeterli süre beklenmiştir. Biyosüpfektanın diklorometan ekstraktından, diklorometanın ayrılması için ekstrakt 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj işlemi üç kez tekrarlanmış ve biyosüpfektan elde edilmiştir. Üretilen her iki biyosüpfektanın miktarı (g/L) bulunmuş ve ardından biyosüpfektanlar liyofilize edilmiştir. Liyofilize biyosüpfektanların miktarı da belirlenmiş ve daha sonraki analizler için buzdolabı koşullarda saklanmıştır.

3.2.9 Biyosüpfektan Saflaştırılması

Optimum kimyasal tanımlı ve gıda artığı bazlı besiyerlerinde üretilen ham biyosüpfektanların saflaştırılması amacıyla Marcelino ve ark. (10) tarafından önerilen yöntem esas alınarak silika jel C18 katı faz ekstraksiyonu kartuşu (Sigma Aldrich, Supelclean ENVI-18 5 g/20 mL; partikül boyutu 45 µm, gözenek boyutu 60 Å, yüzey alanı 475 m²/g) kullanılmıştır.

Bu amaçla öncelikle, ham biyosüpfektanların etil asetat karışımları hazırlanmış ve bu heterojen karışımlar bir manyetik karıştırıcıda orta hızda

yaklaşık 20 dakika süresince karıştırılmıştır. Etil asetat geçirilerek şartlandırılan kartuşa yüklenen karışımlar, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya Laboratuvarında bulunan vakumlu süzme düzeneğinden yararlanılarak kartuştan geçirilmiştir. Bu uygulama sonucunda ham biyosürefektandaki polar olmayan safsızlıkların kartuş içerisinde tutundurulması sağlanmış ve saflaştırılmış biyosürefektan örnekleri elde edilmiştir. Saf biyosürefektan örneklerinde kalan iz miktardaki çözücünün uzaklaştırılması amacıyla ise, aynı laboratuvarında yer alan vakum altında kurutma düzeneği kullanılmıştır. Saf biyosürefektan örnekleri daha sonraki analizler için buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

3.2.10 Biyosürefektanların Biyokimyasal Karakterizasyonu

Optimum tanımlı ve gıda artığı bazlı besiyeri kullanılarak üretilen ham ve saf biyosürefektan örneklerinin biyokimyasal yapısının belirlenmesi amacıyla Fourier Transform Infrared (FT-IR) ve Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır.

FT-IR tanımlanması için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Laboratuvarında yer alan FT-IR (Perkin Elmer Spectrum Two, USA) cihazından yararlanılmıştır. Biyosürefektan örneklerinin $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında spektrumları alınarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır. NMR ile tanımlama aşamasında ise Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) laboratuvarında yer alan ve katı NMR probu ile ölçüm yapabilen NMR (Jeol-Ecs 400 MHz, Japonya) cihazı hizmet alımı yoluyla kullanılmış ve NMR cihazının katı probu yardımıyla biyosürefektan örneklerinin Karbon-13 spektrumları alınarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.11 Kritik Misel Derişimi Değerlerinin Belirlenmesi

3.2.11.1 Biyosürefektanların Kritik Misel Derişimlerinin Belirlenmesi

Optimum tanımlı besiyerinde üretilen ham ve saf biyosürefektanın sırasıyla 1-300 mg/L ve 62.5-2000 mg/L; zeytin karasuyu ve artık kızartma yağı içeren ortamda üretilen ham ve saf biyosürefektanın ise sırasıyla 100-1000 mg/L ve 62.5-2250 mg/L derişiminde çözeltileri distile su içerisinde hazırlanmıştır. Bu aşamada

çözelti derişimlerinin alt ve üst limitleri ön çalışmaların sonuçlarına göre belirlenmiştir. Ancak, her iki ortamda üretilen ham ve saf biyosürefektanların suda çözünürlüğünün çok zayıf olmasından dolayı hazırlanan karışımların homojen bir yapıda olmaması nedeniyle, bu aşamada ana stok karışımları öncelikle yaklaşık 70°C’de yaklaşık 30 dakika süresince ısıtılarak homojen hale getirilmiştir (149). Daha sonra ana stok çözeltilerinden gerekli seyreltmeler yapılarak gerekli derişimde çözeltiler hazırlanmıştır.

Her bir biyosürefektanın farklı derişimleri için yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 3.2.2.3). Fermantasyon sırasında alınan biyosürefektan örneklerinden farklı olarak, bu örnekler filtre edilmemiştir. Bu çözeltilerin suyun yüzey gerilimini düşürmesi değerleri bir grafiğe aktararak grafikteki eğimin keskin bir şekilde azaldığı noktadan, misel oluşumunun başlangıç noktası olarak bilinen kritik misel derişimleri (mg/L) hesaplanmıştır.

3.2.11.2 Süfektanların Kritik Misel Derişimlerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında üretilen biyosürefektanların kritik misel derişimleri bazı süfektanların (tween 80, triton x-100 ve sodyum lauril sülfat) kritik misel derişimleri ile karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda tween 80 ve triton x-100 için 1-300 mg/L, sodyum lauril sülfat için ise 100-3000 mg/L derişimdeki çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm süfektan çözeltilerinin alt ve üst derişim limitleri literatürden faydalanılarak yapılan ön çalışmaların sonuçlarına göre belirlenmiş ve hazırlanan ana stok çözeltilerinden gerekli seyreltmeler yapılarak gerekli derişimdeki çözeltiler hazırlanmıştır. Süfektanların kritik misel derişimleri Bölüm 3.2.11.1’de verilen şekilde belirlenmiştir. Biyosürefektan örneklerinden farklı olarak, bu örneklere herhangi bir ısıtma işlemi uygulanmamıştır.

3.2.12 Biyosürefektanın Çeşitli Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması

3.2.12.1 Farklı Ortam Koşullarında Biyosürefektanın Suyun Yüzey Gerilimini Düşürmesi Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Kimyasal tanımlı optimum bileşimdeki besiyerinde üretilen biyosürefektanın 100 mg/L derişimde çözeltisi hazırlanmış ve bu koşulda biyosürefektanın suyun yüzey gerilimini düşürme kapasitesi ölçülmüştür. Daha

sonra bu biyosüpfektan çözeltilisinin farklı pH ve tuz derişimleri ve sıcaklık koşulları altında suyun yüzey gerilimini düşürme stabilitesi araştırılmıştır. Bu amaçla pH ve tuz için sırasıyla 2-12 ve %2-12 (w/v) aralığındaki değerler uygulanmış ve ardından örneklerin yüzey gerilimleri ölçülmüştür. Çözeltilerin pH'ının ayarlanmasında %20 H₃PO₄ ve 1 N NaOH çözeltilerinden yararlanılmıştır.

Biyosüpfektan stabilitesi üzerine sıcaklığın (4-121°C) etkisini değerlendirmek için; 4, 25, 45 ve 70°C'de 18 saat, 100°C'de 1 saat ve 121°C'de otoklav içerisinde 10, 20 ve 30 dakika bekletilip oda sıcaklığına getirilen örneklerde yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (5,86).

3.2.12.2 Biyosüpfektanın Antimikrobiyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Kimyasal tanımlı besiyerinde üretilen biyosüpfektanın, *S. enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis NCTC 12694, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşlarına karşı antimikrobiyel etkisi araştırılmıştır. Bu amaç için, literatürde yaygın olarak kullanılan (11,150) ve mikropilaka kuyucuklarındaki optik yoğunluğun okunması esasına dayanan yöntem kısmen modifiye edilerek kullanılmıştır. Biyosüpfektan çözeltilisinin sahip olduğu doğal bulanıklık ve bakteri kaynaklı bulanıklığın birbirinden ayırt edilmesinde karşılaşılabilecek problem nedeniyle, ilgili yöntemin modifikasyonuna ihtiyaç duyulmuştur.

Antimikrobiyel aktivite testi için, 200 µL çift kuvvet TSB ve 200 µL biyosüpfektan çözeltilisi (100 mg/mL) 96 kuyucuklu mikropilakanın 1 numaralı kuyucuğına eklenmiştir. Daha sonra 1. kuyucuktaki karışımın 200 µL'si 2. kuyucuğına aktarılmış ve yerine 200 µL steril tek kuvvette TSB eklenmiştir. Aynı işlem 2-9 numaralı kuyucuklardaki biyosüpfektan derişimi 25-0.19 mg/mL aralığında olacak şekilde devam ettirilmiştir. Ardından her bir kuyucuğına TSB broth ortamında 37°C'de 18-24 saat süresince gelişen patojen bakteri kültüründen (Başlangıç aşısı derişimi: yaklaşık 10⁹ kob/mL) 2.5 µL aktarılmıştır. Bu aşamada 200 µL TSB ve 2.5 µL bakteri kültürü içeren 10. kuyucuk ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Mikropilaka, 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında her bir kuyucuk için Nutrient agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile 2 paralelli ekimler gerçekleştirilmiş ve uygun dilüsyonlardan

sayımlar yapılmıştır. Çalışılan farklı derişimlerdeki her bir biyosürefektan çözeltisinin, her bir patojen bakterinin inhibisyonuna etkileri aşağıda verilen Eşitlik (4) aracılığıyla yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Inhibisyon (\%)} = \left[1 - \frac{(N_c)}{(N_o)} \right] \times 100 \quad (4)$$

Bu eşitlikte, N_c belirli bir derişimde biyosürefektan içeren kuyucuktaki bakteri sayısını (kob/mL), N_o ise biyosürefektan içermeyen kuyucuktaki bakteri sayısını (kob/mL) göstermektedir.

3.2.12.3 Biyosürefektanın Anti Adezyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Tanımlı besiyeri kullanılarak üretilen biyosürefektanın anti adezyon etkisi, biyofilm oluşumuna neden olduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 türlerine karşı araştırılmıştır. Bu amaç için Vecino ve ark. (150) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

Öncelikle 96 kuyucuklu mikropalkanın kuyucukları 200 µL biyosürefektan çözeltisi (0.019-10 mg/mL) ile doldurulmuş ve plaka 4°C’de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda iki defa fosfat tampon çözeltisi ile yıkanan kuyucuklarda bulunan biyosürefektanın doğal bir bulanıklığa sahip olması nedeniyle farklı derişimlerde biyosürefektan içeren kuyucuklardan bir kısmına bakteri süspansiyonunun negatif kontrolü olarak 200 µL fosfat tampon çözeltisi (10 mM KH_2PO_4) eklenmiştir. Ayrıca fosfat tampon çözeltisi ile yıkanan 200 µL bakteri süspansiyonu (Başlangıç derişimi: yaklaşık 10^9 kob/mL) içerisinde biyosürefektan çözeltisi bulunan ve ayrıca pozitif kontrol olarak biyosürefektan içermeyen kuyucuklara ayrıca eklenerek 4°C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra tüm kuyucuklar iki defa fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmış ve bakteri içeren kuyucuklar için tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Tutunan bakterilerin ise, 200 µL %99’luk metanol yardımıyla 15 dakika süresince fiksasyonu sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklar tamamen boşaltılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Her bir kuyucuğun 200 µL kristal viyole çözeltisi (%1) ile 5 dakika süresince boyanması sağlanmıştır. Plaka, musluk suyu altında tutularak fazla boyanın giderilmesi sağlanmış ve plaka

kurutulmuştur. Ardından kuyucuklarda tutunan bakterilere bağlanan boya, 200 µL glasiyel asetik asit çözeltisi (%33, v/v) yardımıyla çözündürülmüş ve mikropilaka okuyucuda (Allsheng AMR-100T, Çin Halk Cumhuriyeti) 595 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Bu yöntemde fiksasyon, boyama ve boyanın uzaklaştırılması aşamaları sadece biyosüpfektan içeren kuyucuklar için de uygulanmıştır.

Çalışma kapsamında yer alan her iki patojen bakteri kültürü ve farklı derişimlerdeki biyosüpfektan çözeltileri için 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Kullanılan biyosüpfektan derişimlerinin patojen bakterilerin inhibisyon yüzdesi üzerine olan etkileri Eşitlik (5) yardımıyla değerlendirilmiştir.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left[1 - \frac{(OD_1 - (OD_2))}{(OD_0)} \right] \times 100 \quad (5)$$

Bu eşitlikte, OD₁ belirli bir derişimde biyosüpfektan ve bakteri karışımı, OD₂ ise sadece biyosüpfektan içeren kuyucuklara ait optik yoğunluk değerlerini, OD₀ ise sadece bakteri içeren kuyucuklardaki optik yoğunluğu göstermektedir.

3.2.12.4 Biyosüpfektanın Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyosüpfektanın antifungal aktivitesinin araştırılması amacıyla *Fusarium oxysporum* 38-4 ve *Penicillium expansum* 11F suşları kullanılmıştır.

Bu amaçla 28°C’de 5-7 gün süresince PDA besiyerinde aktifleştirilen küfler, steril distile su yardımıyla yıkanmış ve basit filtre kağıdından süzülerek spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu küf süspansiyonlarının optik yoğunluğu 1’e ayarlanmış ve her bir küf için 30 µL süspansiyon PDA besiyeri yüzeyine yayılarak ekim gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika boyunca kurumaya bırakılan besiyerinin yüzeyine 0.2-10 mg/mL derişimlerinde hazırlanan her bir biyosüpfektan çözeltisinden 10 µL olacak şekilde aktarılmıştır.

Kontrol grubu olarak ise, hazırlanan küf süspansiyonlarından besiyerlerine ekim yapılmıştır. Tüm örnekler 28°C’de 7 gün süresince bekletilmiş ve inkübasyon süresi sonunda zon oluşumları kontrol edilmiştir (151).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Biyosüpfektan Üreticisi Suşun Seçimi

Biyosüpfektan üreticisi maya suşu seçimi için gıda kaynaklı toplam 142 suşa (EK 1) öncelikle tween 80 ve hidrokarbon agar testleri uygulanmıştır. Bu testler doğrultusunda, biyosüpfektan üretim potansiyeli taşıdığı belirlenen 44 suşa ise yağ yayma testi uygulanmış ve diğer suşlardan daha geniş yağ yayma çapı oluşturan 6 suşun besiyeri yüzey gerilimini düşürme kapasiteleri ölçülerek suş taramasının aşamaları tamamlanmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda en yüksek düzeyde biyosüpfektan üreten suşun *Cyb. fabianii* MIAU-1 olduğu ortaya konmuştur.

4.1.1 Tween 80 ve Hidrokarbon Agar Kullanılarak Yapılan Suş Taraması

Suş taraması amacıyla kullanılan tween 80 ve hidrokarbon agar besiyerlerinde presipitat ve zon oluşturarak kaydedilen üreme şekli ile biyosüpfektan üretimi arasında yüksek bir korelasyon olduğu belirtilmektedir (26,63). Yapılan tarama çalışmalarının sonucunda; kullanılan besiyerlerinden herhangi birinde tipik üremenin görüldüğü maya suşu, potansiyel suş olarak kaydedilmiştir. Biyosüpfektan üretme potansiyeline sahip olan suşlar, Tablo 4.1.'de verilmiştir. Buna göre, 11 adet suş tween 80 testinde, 44 adet suş ise hidrokarbon agar testinde pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca tween 80 testinde pozitif olduğu belirlenen tüm suşların aynı zamanda hidrokarbon agarda pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Bu kapsamda; *M. pulcherrima* (11), *W. anomalus* (3), *Cyb. fabianii* (2), *C. parapsilosis* (1), *C. lusitaniae* (5), *C. valida* (1), *C. kefir* (1), *C. tropicalis* (3), *C. famata* (6), *C. zeylanoides* (1), *C. guilliermondii* (1), *C. lipolytica* (1), *D. hansenii* (1), *T. delbrueckii* (1), *S. cerevisiae* (3), *T. asahii* (1) ve *G. silvicola* (2) türlerine ait 44 adet maya suşunun biyosüpfektan üretme potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir.

Bu testler açısından, pozitif oldukları belirlenen bazı maya suşlarının tween 80 agar ve hidrokarbon agar besiyerlerinde oluşturduğu tipik görüntülere ait fotoğraflar Fotoğraf 4.1. ve 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Taranan 142 adet maya arasından biyosüpfektan üretim potansiyeline sahip olan maya suşları

Maya suşu	İzolasyon kaynağı	BS Üretim Potansiyeli	
		Tween 80 agar	Hidrokarbon agar
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MKD-3	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKHa-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFAHc-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFAD-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFAS-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MKBD-3	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKBD-4	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKBS-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFİAHb-3	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MİAD-3	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFİAS-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> MFKBHb-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> MFİAHb-4	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> MFİAD-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Cyberlindnera fabianii</i> LİAU-6	Kızılıcık tarhanası	+	+
<i>Cyberlindnera fabianii</i> MİAU-1	Kızılıcık tarhanası	+	+
<i>Candida parapsilosis</i> LFİAHb-8	Kızılıcık tarhanası	+	+
<i>Candida lusitanae</i> MFKH-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida lusitanae</i> LFAHb-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida lusitanae</i> LFAS-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida lusitanae</i> LFKBHb-4	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida lusitanae</i> LFKBHc-2	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida valida</i> MFİAH-8	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Candida kefyr</i> LFAH-6	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i> MİAS-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LKBD-7	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LFKBD-1	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MFKBD-3	Kızılıcık tarhanası	-	+
<i>Trichosporon asahii</i> M1	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida tropicalis</i> M2	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida tropicalis</i> M43	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida tropicalis</i> M55	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida famata</i> M4	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida famata</i> M22	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida famata</i> M32	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida famata</i> M63	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida famata</i> M51	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida famata</i> M92	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida zeylanoides</i> M16	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Candida guilliermondii</i> M54	Mihaliç peyniri	-	+
<i>Geotrichum silvicola</i> M6	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Geotrichum silvicola</i> M15	Mihaliç peyniri	+	+
<i>Candida lipolytica</i> K1	Keş peyniri	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> 31/1	Bal	-	+



Fotoğraf 4.1. *C. famata* M22 suşunun tween 80 agar besiyerindeki gelişimine ait görüntü



Fotoğraf 4.2. *W. anomalus* MFIAHb-4 suşunun Hidrokarbon agar besiyerindeki gelişimine ait görüntü

4.1.2 Yağ Yayma Testi ve Yüzey Gerilimi Analizlerine Ait Sonuçlar

Bu aşamada ilk olarak, belirlenen 44 adet maya suşunun biyosüpfektan üretimleri, fermentasyon çalışmaları yürütölerek araştırılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda kullanılan farklı karbon kaynağı derişimleri göz önüne alınarak, farklı türler arasından rastgele seçilen üç adet maya suşu ile, hem %5 glukoz ve %5 ayçiçek yağı hem de %10 glukoz ve %10 ayçiçek yağı içeren fermentasyon ortamlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyondan sonra hazırlanan besiyerlerinin pH değeri ölçölmiş ve pH değeri maya gelişimi ve biyosüpfektan üretimi için uygun bir düzeyde (6.2-6.5) olması dolayısıyla, besiyerlerine herhangi bir pH ayarlama işlemi uygulanmamıştır.

Çalışma kapsamında, karbon kaynağı derişimlerinin (%5-10) biyosüpfektan üretimi üzerine etkisini değeriendirmek amacıyla, *W. anomalus* MFİAHb-4, *C. tropicalis* M43 ve *T. asahii* M1 suşları ile fermentasyon deneyleri gerçekleştirilmiş ve yağ yayma çapı sonuçları alınmıştır. Yağ yayma testinin, biyosüpfektan üretimi ile ilgili olarak yarı kantitatif bir sonuç sağladığı, ve oluşan zon çapı ile biyosüpfektan miktarı arasında korelasyon olduğu ifade edilmektedir (5,26). Bu suşlar arasında, özellikle iyi düzeyde sonuç verdiği belirlenen *W. anomalus* MFİAHb-4 için, %5 glukoz ve %5 ayçiçek yağı ile %10 glukoz ve %10 ayçiçek yağı içeren ortamlarda 144. saatte elde edilen maksimum çap değeri sırasıyla 3.5 ve 5.5 cm olarak belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada sırasıyla %5 ve %10 oranlarında karbon kaynaklarının kullanılması durumunda, sonuçların 72. saatte sırasıyla 1 ve 1.5 cm, 120. saatte ise sırasıyla 1.5 ve 3 cm olarak belirlenmesi nedeniyle suş taraması çalışmasına, %10 glukoz ve %10 ayçiçek yağı içeren kimyasal tanımlı fermentasyon ortamında devam edilmesine karar verilmiştir. Bu kapsamda değeriendirilen *C. tropicalis* M43 ve *T. asahii* M1 suşları için de benzer bir durum geçerli olmakla beraber, genel olarak çok daha düşük çap değerileri tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 14 adet maya suşunun yağ yayma çapı oluşturmadığı ve bu nedenle biyosüpfektan üretmediği tespit edilmiştir. Bu suşlar, *M. pulcherrima* türüne ait MFAD-2, MFAS-2, MKBD-3, MFİAHb-3, MİAD-3 ve MFİAS-2 suşları, *C. lusitaniae* MFKH-1, *C. valida* MFİAH-8, *C. kefir* LFAH-6, *T. delbrueckii* MİAS-1, *S. cerevisiae* LKBD-7, *C. tropicalis* M2, *C. famata* M22 ve *D. hansenii* 31/1 suşlarıdır. Bu suşlar

kullanılarak biyosüpfektan üretilememesine rağmen, maya sayılarında en az 1.5 logaritmik birim artış sağlanmıştır.

Bununla beraber, 1 cm'den daha düşük değerde yağ yayma çapı oluşturan 17 adet suş düşük düzeyde biyosüpfektan üreticisi suş olarak değerlendirilmiştir. Bu maya suşları ve en yüksek çapın görüldüğü saatler Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Biyosüpfektan üretim potansiyeli düşük olarak belirlenen maya suşları ile elde edilen yağ yayma çapları ve en yüksek çapın görüldüğü saatler

Maya türü	En geniş çap (cm)	Zaman (saat)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MKD-3	0.9	48
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKHa-1	0.6	144
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKBS-1	0.4	24
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MFKBD-4	0.4	120
<i>Candida lusitaniae</i> LFAHb-1	0.3	168
<i>Candida lusitaniae</i> LFAS-2	0.6	72
<i>Candida lusitaniae</i> LFKBHa-4	0.3	48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LFKBD-1	0.9	144
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MFKBD-3	0.8	120
<i>Trichosporon asahii</i> M1	0.5	72
<i>Candida tropicalis</i> M43	0.8	72
<i>Candida famata</i> M4	0.9	144
<i>Candida famata</i> M63	0.8	120
<i>Candida famata</i> M51	0.9	120
<i>Candida famata</i> M92	0.9	96
<i>Candida guilliermondii</i> M54	0.4	48
<i>Candida zeylanoides</i> M16	0.9	72

M. pulcherrima MKD-3 suşu fermantasyonun 48. saatinde 0.9 cm yağ yayma çapı oluşturduğundan, 17 maya suşu arasında en uygun suş olarak değerlendirilebilir. *C. lusitaniae* LFAHb-1 ve *C. lusitaniae* LFKBHa-4 suşları ise sırasıyla 168. ve 48. saatlerde 0.3 cm çap oluşturarak, diğer maya suşlarına göre potansiyeli zayıf suşlar olarak belirlenmiştir. Genel olarak, Tablo 4.2.'de yer alan tüm maya suşlarının sayıları fermantasyon ortamında en az 1.5 logaritmik birim artış gösterirken, yalnızca *C. guilliermondii* M54 sayısının yaklaşık 1 logaritmik birim arttığı tespit edilmiştir.

Genel olarak, yağ yayma çapı 1 cm ve üzerinde olan 13 adet maya suşu, iyi düzeyde biyosüpfektan üreten suşlar olarak değerdendirilmiştir. Bu suşlar arasında; *W. anomalus* (MFKBHb-2, MFİAHb-4, MFİAD-1), *G. silvicola* (M6, M15), *Cyb. fabianii* (MİAU-1, LİAU-6), *M. pulcherrima* MFAHc-1, *C. lipolytica* K1, *C. famata* M32, *C. tropicalis* M55, *C. parapsilosis* LFİAHb-8 ve *C. lusitaniae* LFKBHc-2 suşları yer almaktadır (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Yağ yayma testi sonucunda, 1 cm ve üstünde yağ yayma çapı oluşturan maya suşları ve elde edilen çap değerdlerinin (cm) zamanla değışimleri

Maya suşları	Zaman (sa)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>W. anomalus</i> MFKBHb-2*	1.7	1.5	1	1	1.4	t.e.	t.e.
<i>W. anomalus</i> MFİAHb-4*	1	1	1.5	1.2	3	5.5	-
<i>W. anomalus</i> MFİAD-1*	2.5	2.4	2.5	3.5	3.3	3.8	3.1
<i>Cyb. fabianii</i> MİAU-1*	5.5	6	6	-	7	6	6
<i>G. silvicola</i> M6*	5	4	4.5	4.4	4.1	4.4	4.3
<i>G. silvicola</i> M15*	3.7	6	5.5	-	5.3	5.5	5.5
<i>M. pulcherrima</i> MFAHc-1	t.e.	t.e.	0.2	0.2	0.2	7	0.2
<i>Cyb. fabianii</i> LİAU-6	0.5	1	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
<i>C. lipolytica</i> K1	t.e.	0.3	0.2	-	0.3	0.3	2.5
<i>C. famata</i> M32	t.e.	t.e.	t.e.	-	2.1	0.9	t.e.
<i>C. tropicalis</i> M55	t.e.	t.e.	0.3	1.1	0.8	0.8	t.e.
<i>C. parapsilosis</i> LFİAHb-8	t.e.	t.e.	1	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
<i>C. lusitaniae</i> LFKBHc-2	t.e.	t.e.	1	t.e.	-	t.e.	-

t.e.: Tespit edilemedi; -: Analiz yapılmadı

*: Geniş çap değeri veren maya suşları

Tabloda yer alan sonuçlar incelendiğinde, *W. anomalus* MFKBHb-2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, en yüksek çapa (1.7 cm) 24. saatte ulaşıldığı, 120. saatte 1.4 cm çap kaydedildiği ve daha sonra örnek alınan saatlerde herhangi bir yağ yayma çapı tespit edilemediği görülmektedir. Bu suş için, fermantasyonun başlangıç anında tespit edilen maya sayısı 6.6 log (kob/mL) olup, 24 saat sonrasında maya sayısında yaklaşık 1.5 logaritmik birim düzeyinde bir artış gerçekleşmiştir. Bir diğerd *W. anomalus* suşu olan MFİAHb-4

kullanıldığında ise, daha yüksek bir yağ yayma çapına (5.5 cm) 144. saatte ulaşarak, 72. ve 120. saatlerde ise sırasıyla 1.5 ve 3 cm düzeyinde sonuçlar elde edilmiştir. *W. anomalus* MFİAHb-4 suşu için, fermantasyon süresince maya sayısında 48 saat sonunda yaklaşık 2 logaritmik birim artış belirlenmiş, ancak maksimum çapın görüldüğü 144. saatte maya sayısının zamanla bir miktar azaldığı tespit edilmiştir. Biyosüpfektan üretimi amacıyla *W. anomalus* MFİAD-1 suşunun kullanıldığı çalışmada, yağ yayma çapı 24. saatte 2.5 cm olarak kaydedilmiş ve 144 saat sonrasında çap değerinin en yüksek 3.8 cm'ye yükseldiği görülmüştür. Bu suş için maya sayısı başlangıç sayısına göre yaklaşık 1.5 logaritmik birim artarak 8 log (kob/mL) düzeyine ulaşmıştır.

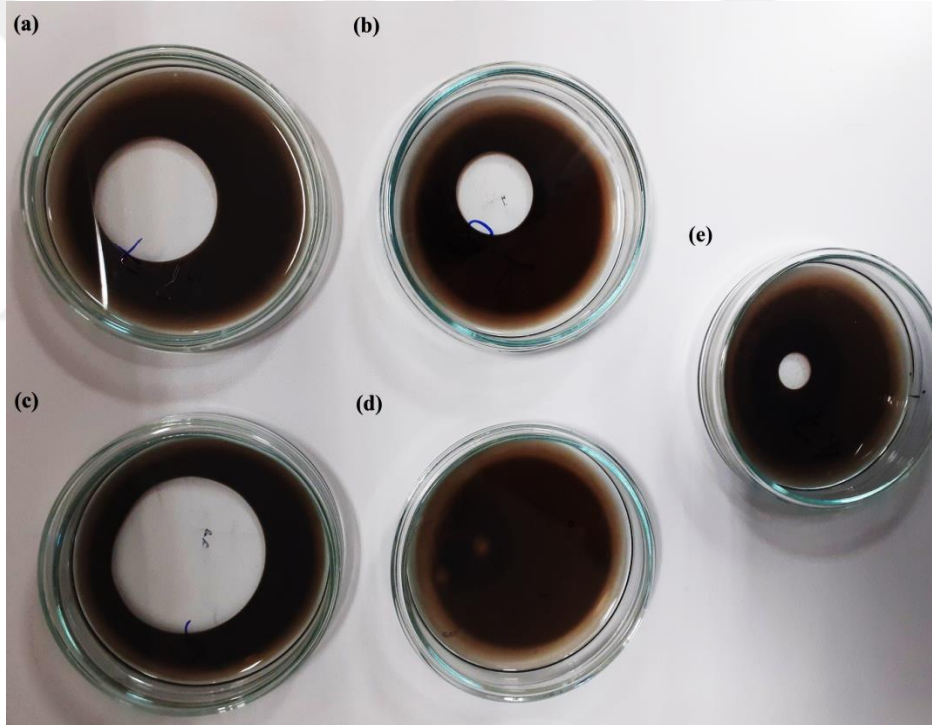
W. anomalus türüne ait üç suş aracılığıyla gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimleri genel olarak değerlendirildiğinde, en geniş yağ yayma çapının *W. anomalus* MFİAHb-4 suşu kullanılarak ve 144. saatte elde edilmesi, bununla beraber MFKBHb-2 suşu ile çalışıldığında diğer iki suş ile kıyaslandığında çok daha düşük olmak üzere, maksimum çap değerine (1.7 cm) 24. saatte ulaşılmış olması, suşların biyosüpfektan üretim profillerinin oldukça farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Biyosüpfektan üretimi araştırılan bir başka suş olan *Cyberlindnera fabianii* MİAU-1 suşuna ait yağ yayma çapı değerleri değerlendirildiğinde, *W. anomalus* MFİAHb-4 suşu aracılığıyla 144. saatte elde edilen 5.5 cm çapa, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşunun kullanılmasıyla 24 saat sonunda ulaşıldığı belirlenmiştir. Tablo 4.3.'te görüldüğü üzere, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşunun kullanıldığı çalışmada kaydedilen en yüksek çap değeri 7 cm olup, bu sonuca 120. saatte ve diğer suşlara benzer şekilde maya sayısının yaklaşık 1.5 logaritmik birim arttığı koşullarda ulaşılmıştır. Ayrıca, fermantasyonun 144. ve 168. saatlerinde 6 cm çapında yağ yayma tespit edilmiş olup, bu durumun ortamda üretilen biyosüpfektan miktarının fermantasyon süresince genel olarak yüksek ve birbirine yakın olması ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Yağ yayma testi sonuçları değerlendirildiğinde, biyosüpfektan üretimi açısından potansiyel taşıdıkları düşünülen bir diğer maya ise *G. silvicola* türüne ait M6 ve M15 suşlarıdır (Tablo 4.3.). Çalışma kapsamında, *G. silvicola* M6 suşu kullanılarak 24. saatte 5 cm olarak belirlenen en geniş yağ yayma çapı elde edilmiş ve maya sayısının başlangıç sayısına göre yaklaşık 1 logaritmik birim düzeyinde arttığı belirlenmiştir. Bir diğer suş olan *G. silvicola* M15 suşunun

kullanıldığı koşullarda ise, en yüksek çap olan 6 cm, 48. saatte kaydedilmiş ve ayrıca, 72. saatte 5.5 cm olarak belirlenen çap değeri genel olarak 168. saate kadar sürekliliğini korumuştur. Her iki suş aracılığıyla elde edilen maksimum çap değerleri ve zamanların genel olarak birbirlerine yakın olması dolayısıyla, *G. silvicola* suşlarından biyosüpfektan üreticisi suş olarak yararlanılabileceği belirlenmiştir.

Fotoğraf 4.3.'te, sırasıyla *G. silvicola* M15, *W. anomalus* MFİAD-1, *G. silvicola* M6, *D. hansenii* 31/1 ve *W. anomalus* MFKBHb-2 suşlarının 24. saatteki yağ yayma çapı sonuçlarına ait, örnek bir görüntü sunulmuştur. Fotoğrafta yer alan bu suşlar arasında yalnızca, bal kaynaklı bir izolat olan *D. hansenii* 31/1 ile biyosüpfektan üretimi sağlanamamıştır.



Fotoğraf 4.3. *G. silvicola* M15 (a; 3.7 cm), *W. anomalus* MFİAD-1 (b; 2.5 cm), *G. silvicola* M6 (c; 5 cm), *D. hansenii* 31/1 (d; -) ve *W. anomalus* MFKBHb-2 (e; 1.7 cm) suşlarına ait yağ yayma testi sonuçları

Tablo 4.3.'te yer alan suşlardan biri olan *M. pulcherrima* MFAHc-1 suşunun yağ yayma çapı profili değerlendirildiğinde, 144. saatte görülen 7 cm çapın ardından 168. saatte sıfıra yakın bir sonuç elde edilmesinin dikkat çekici olduğu ve yağ yayma testi açısından sürekliliğin sağlanamadığı görülmektedir.

Benzer şekilde, *C. lipolytica* K1, *C. famata* M32, *C. tropicalis* M55 ve *C. lusitaniae* LFKBHc-2 suşları aracılığıyla sırasıyla 168, 120, 96 ve 72. saatlerde; 2.5, 2.1, 1.1 ve 1 cm değerlerinde ve özellikle bazı maya suşlarına göre daha düşük yağ yayma çapları bulunmuştur. Bununla beraber yüksek düzeyde sonuç veren diğer maya suşlarında genel olarak 24. saatte görülen belirli bir yağ yayma çapının ardından, farklı miktarlarda artış görülmekle beraber; özellikle *C. lipolytica* K1 suşuna ait en yüksek çap değeri oldukça geç bir saatte elde edilmiştir.

Genel anlamda, elde edilen tüm sonuçlar göz önüne alınarak, biyosüpfektan üretimi çalışmalarında fermantasyonun herhangi bir saatinde 1 cm ve üstünde yağ yayma çapı oluşturan 13 adet maya suşu, iyi düzeyde biyosüpfektan üreten suşlar olarak değerlendirilmiştir. Bu suşlardan 7 adedi; üretimin çok yavaş olması ve yağ yayma çaplarının daha düşük olması nedeniyle, çalışmaların devamında incelenecek olan suşlar içerisine alınmamıştır. Bununla beraber 6 adet suş ise, yağ yayma çaplarının büyüklüğü ve üretim süreleri esas alınarak, biyosüpfektan üretimi çalışmalarında en iyi sonuçları veren suşlar olarak seçilmişlerdir. Bu suşlar; *W. anomalus* türüne ait maya suşları (MFKBHb-2, MFİAHb-4, MFİAD-1), *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ve *G. silvicola* M6 ve M15 suşlarıdır.

Bu suşların ortak özelliği 24. saatten itibaren kayda değer bir yağ yayma çapı oluşturmaları ve genel olarak 120. saat sonuna kadar artış göstermiş olmalarıdır. Yalnızca, *W. anomalus* MFKBHb-2 suşu 24. saatte maksimum çap değerine ulaşmıştır. Ayrıca, 24. saatten itibaren 5.5 cm olarak belirlenen ve fermantasyon süresince 6-7 cm aralığında değişim gösteren yağ yayma çapı değerlerine sahip *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşunun, diğer suşlara göre yağ yayma çapı anlamında daha üstün olduğu görülmüştür.

Yağ yayma testinde en iyi sonucu veren 6 adet suş için, ikinci bir fermantasyon çalışması yürütülmüş ve fermantasyon ortamlarının yüzey gerilimleri ölçülmüştür. Yüksek düzeyde biyosüpfektan ürettiği belirlenen suşlara ait en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler Tablo 4.4'te sunulmuştur. Çalışmada, besiyerinin başlangıç yüzey gerilimi değeri 64.73 ± 0.01 mN/m olarak ölçülmüştür. Fermantasyon deneylerinde belirlenen en düşük yüzey gerilimi sonuçlarının 38.12-48.89 mN/m aralığında değişim gösterdikleri bulunmuştur. Bununla beraber, yüzey

gerilimindeki azalma miktarlarının 15.84-26.61 mN/m aralığında değiştiği g r lm şt r.

Tablo 4.4. Biyosürfektan  reticisi maya suşlarına ait en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler

Maya suşları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
<i>W. anomalus</i> MFKBHb-2	24	1.6	120	48.89±0.37
<i>W. anomalus</i> MF�AHb-4	120	5.5	120	42.11±0.24
<i>W. anomalus</i> MF�AD-1	144	3.5	120	43.73±0.33
<i>Cyb. fabianii</i> M�AU-1	120	6.8	120	38.12±0.06
<i>G. silvicola</i> M6	72	4.7	72	43.36±0.20
<i>G. silvicola</i> M15	48	6	96	42.11±0.62

Biyosürfektan  reticisi maya olarak incelenen *W. anomalus* MFKBHb-2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon çalışmasında 120. saatte ölçülen yüzey geriliminin 48.89 mN/m olarak belirlenmesi ve bu suşun ortamın yüzey geriliminde 15.84 mN/m düzeyinde bir azalmaya neden olması dolayısıyla, diğer suşlara göre daha düşük bir yüzey gerilimi düşürme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Bununla beraber, diğer iki *W. anomalus* suşu ve *G. silvicola* M6 ve M15 suşlarının birbirlerine oldukça yakın (42.11-43.73 mN/m) düzeyde yüzey gerilimine sahip oldukları saptanmıştır. Ancak, bu suşlar için en düşük yüzey gerilimi değerlerinin görüldüğü zamanlar farklılık göstermiş olup; bu saatler *W. anomalus* suşları için 120, *G. silvicola* suşları için ise 72 ve 96 olarak kaydedilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde yağ yayma çaplarının bu suşlar için 3.5-6 cm aralığında değişkenlik göstermelerine rağmen, yüzey gerilimi değerlerinin birbirlerine oldukça yakın olması dikkat çekmiştir.

Gerçekleştirilen  l  m sonuçları doğrultusunda, en yüksek düzeyde biyosürfektan üreten suşlar arasından hem yağ yayma çapı hem yüzey gerilimindeki azalma miktarı açısından en yüksek değerlerin elde edildiği *Cyb. fabianii* M AU-1 suşunun seçilmesine karar verilmiştir. Bu suş kullanılarak, 120.

saatte 38.12 ± 0.06 mN/m yüzey gerilimi ölçülmüş ve başlangıçta 64.73 ± 0.01 mN/m olarak belirlenen fermantasyon ortamı yüzey geriliminde, en yüksek 26.61 mN/m düzeyinde azalma sağlanmıştır. Bununla beraber, bu suş için 24 saat sonunda 38.58 ± 0.05 mN/m olarak ölçülen yüzey gerilimi, 24. saatten itibaren maksimuma oldukça yakın bir düzeyde yüzey gerilimi azalması göstermesi açısından önemli bulunmuştur.

Gıda kaynaklı maya suşlarının biyosüpfektan üretim potansiyellerinin tarandığı bu çalışmada öncelikle Eldin ve ark. (26) ve Vigneshwaran ve ark. (63) tarafından rapor edilen suş taraması sonuçlarına benzer şekilde tween 80 ve hidrokarbon agar testlerinde olumlu sonuç veren her bir potansiyel suş fermantasyon deneyleri kapsamına alınmıştır. Suş taraması amacıyla yaygın olarak kullanılan yağ yayma testi ve yüzey gerilimi analiz yöntemlerinden yararlanılmış ve literatürde bildirilen biyosüpfektan üreticisi maya türlerinden farklı olarak tez çalışmasında *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile en yüksek düzeyde üretimin sağlandığı bulunmuştur (9–11,15).

Archana ve ark. (9) tarafından bazı gıda ve gıda endüstrisi atık ve artıklarının yanı sıra kontamine toprak örneğinden izole edilen 107 maya suşunun biyosüpfektan üretim potansiyelleri yağ yayma testi ve yüzey gerilimi ölçümleri kullanılarak ortaya konmuştur. Bu çalışmada öncelikle daha geniş yağ yayma çapı oluşturan gıda kaynaklı dört maya izolatu saptanmış ve ardından bu suşlar arasında en yüksek 8.1 cm yağ yayma çapı oluşturan ve ayrıca fermantasyon ortamı yüzey gerilimini en düşük 31.45 mN/m düzeyine düşüren *Candida* sp. AH62 maya suşu biyosüpfektan üreticisi suş olarak rapor edilmiştir (9). Bu çalışma literatürde özellikle gıda kaynaklı maya suşlarının biyosüpfektan üretimi amacıyla tarandığı sınırlı sayıda çalışmalara bir örnek oluşturması ve ayrıca suş taraması aşamalarının tez çalışmasına benzerlik göstermesi bakımından önemli bulunmuştur. Bununla beraber, izolasyon kaynağı çevresel örneklerin yanı sıra gıda ve gıda artıkları olan maya suşlarının biyosüpfektan üretimlerinin araştırıldığı bir çalışmada, gıda kaynaklı bazı suşların da üretimde kullanım potansiyeli taşıdığı ancak ham petrolden izole edilen bir *Cryptococcus* YLF suşunun bu anlamda çok daha üstün olması dolayısıyla bu suşun seçildiği aktarılmıştır (15).

Balan ve ark. (11) tarafından yürütölen bir çalışmada ise; suş taraması deneylerinde izolasyon kaynağı çevresel bir örnek olan *Cyb. saturnus* SBPN-27 maya suşunun maksimum 6.4 cm yağ yayma çapı oluşturarak ön plana çıktığı

aktarılmış olup ilgili çalışma en yüksek düzeyde biyosüpfektan üretiminin 6.8 cm çap oluşturan *Cyb. fabianii* mayası kullanılarak sağlandığı tez çalışmasına suşların izolasyon kaynakları haricinde oldukça benzer bulunmuştur. Başka bir çalışmada kahve işleme artıklarından izole edilen bir *W. anomalous* suşunun yüzey geriliminde sağladığı azalmanın diğer mayalardan daha yüksek olması nedeniyle biyosüpfektan üretimi çalışmaları için bu suşun seçildiği bildirilmiştir (27). Bu araştırmaya benzer şekilde, bu tez çalışmasında da, genel olarak daha geniş yağ yayma çapları oluşturan toplam altı suşun üçünün *W. anomalous* türüne ait olduğu bulunmuştur.

4.2 Fermantasyon Ortamı Bileşenlerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar

4.2.1 Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında öncelikle *Cyb. fabianii* mayasının karbon asimilasyon profili araştırılmıştır. Bu mayanın, glukoz, fruktoz ve sakkaroz şekerlerini kullanabildiği, ancak laktoz ve galaktozu kullanamadığı belirtilmektedir (147).

Biyosüpfektan üretimi çalışmalarında karbon kaynağı olarak kullanılan bileşenlerin besiyerlerinin yüzey gerilimlerini düşürme kapasitelerinin araştırılması amacıyla, şeker (glukoz, fruktoz, sakkaroz) ve ayrıca gliserol, bazı bitkisel yağlar (ayçiçek yağı, mısır yağı, zeytinyağı, fındık yağı, pamuk yağı ve kanola yağı) ile birer kombinasyon şeklinde kullanılmıştır. Ayrıca gliserol tek başına ve glukoz, sakkaroz ve fruktoz ile birlikte, glukoz ve ayçiçek yağları ise her biri tek başına kullanılarak, denemeye alınan toplam 30 farklı bileşim arasında yüzey geriliminin en yüksek düzeyde düşürülmesini sağlayan bileşimin belirlenmesi hedeflenmiştir.

4.2.1.1 Karbon Kaynağı Olarak Glukoz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler

Cyb. fabianii MIAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının kullanıldığı deneylerde en düşük (5.3 cm) ve en yüksek (7 cm) yağ yayma çapı değerlerine sırasıyla fındık yağı ve ayçiçek yağı içeren fermantasyon ortamlarından 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerde ulaşılmıştır. Bununla beraber,

diğer besiyeri bileşimleri için genel olarak birbirlerine yakın değerlerdeki yağ yayma çapları (6.2-6.9 cm) ise 48. saatte kaydedilmişlerdir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Karbon kaynağı olarak glukoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler

Karbon kaynakları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
GLU + AY	72	7	72	37.04±0.05
GLU + FY	48	5.3	120	36.73±0.10
GLU + KY	48	6.2	96	38.23±0.05
GLU + MY	48	6.9	120	36.94±0.10
GLU + PY	48	6.7	72	35.06±0.11
GLU + ZY	48	6.4	48	36.71±0.10

(GLU: Glukoz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

Yukarıda verilen besiyeri bileşimlerinde elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin genel olarak birbirlerine yakın oldukları ve 35.06-38.23 mN/m aralığında değişim gösterdikleri görülmektedir. En düşük yüzey gerilimi olan 35.06 mN/m, glukoz ve pamuk yağı içeren ortamda 72. saatte ölçülmüştür. Bununla beraber zeytinyağı içeren ortamda en düşük yüzey gerilimi değeri (36.71 mN/m) 48 saat sonrasında ölçülürken, mısır yağı içeren besiyerinde yüzey gerilimi için minimum değerler 120. saatte kaydedilmiştir. Tablo 4.5. incelendiğinde sırasıyla en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerlerinin ölçüldüğü zaman aralıklarının birbirinden farklı oldukları ve genel olarak minimum yüzey gerilimi değerlerine daha geç saatlerde ulaşıldığı görülmektedir.

Ayrıca en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi sonuçları beraber değerlendirildiğinde sırasıyla, yağ yayma çapındaki artış ve yüzey gerilimlerindeki azalış miktarlarının birbirlerine bağlı olarak doğrudan bir değişim göstermedikleri saptanmıştır. Bu duruma bir örnek olarak, glukozun yanı sıra sırasıyla fındık yağı ve zeytinyağı içeren besiyerlerinde en düşük yüzey

gerilimlerinin 36.73 ve 36.71 mN/m olarak ölçülmelerine rağmen bu ortamlardaki yağ yayma çaplarının 5.3 ve 6.4 cm şeklinde kaydedilmesi verilebilir.

Karbon kaynağı olarak glukoz ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının yer aldığı besiyerlerinin başlangıç (t=0) yüzey gerilimi değerleri ve bu ortamların yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarları Tablo 4.6.'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Karbon kaynağı olarak glukoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

	GLU+AY	GLU+FY	GLU+KY	GLU+MY	GLU+PY	GLU+ZY
Zaman (saat)	Yüzey gerilimleri (mN/m)					
0	63.31±0.06	63.30±0.16	61.60±0.13	63.15±0.04	54.50±0.00	60.66±0.10
24	41.87±0.04	50.45±0.11	45.24±0.10	46.57±0.04	46.26±0.06	50.87±0.09
48	37.54±0.00	45.98±0.00	38.66±0.01	38.51±0.06	46.69±0.05	36.71±0.10
72	37.04±0.05	37.15±0.04	40.02±0.02	37.34±0.07	35.06±0.11	37.75±0.06
96	38.27±0.02	38.97±0.08	38.23±0.05	38.72±0.07	37.28±0.08	37.72±0.00
120	38.16±0.05	36.73±0.10	38.69±0.08	36.94±0.10	38.34±0.02	37.69±0.04
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a ; mN/m)						
	26.27	26.57	23.37	26.21	19.44	23.95
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)						
	41.49	41.97	37.94	41.50	35.67	39.48

(GLU: Glukoz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)
Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

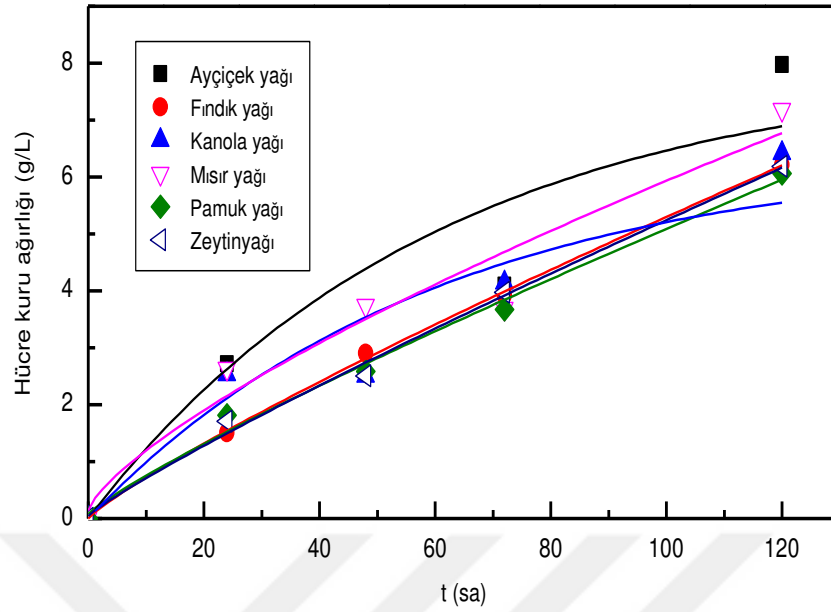
En düşük başlangıç yüzey gerilimi 54.50 mN/m olarak pamuk yağı içeren besiyerinde ölçülürken, diğer ortamlarda genel olarak birbirlerine yakın değerlerde ölçülen başlangıç yüzey gerilimlerinin 60.66-63.31 mN/m aralığında değişim gösterdikleri belirlenmiştir. Bununla beraber besiyeri bileşimlerine bağlı olarak yüzey gerilimlerinde 19.44-26.57 mN/m düzeyinde azalmalar gerçekleşmiştir. Glukoz ve fındık yağı içeren besiyeri için yüzey geriliminde maksimum düzeyde azalma gerçekleşirken, ayçiçek yağı ve mısır yağı içeren ortamlarda da sırasıyla 26.27 ve 26.21 mN/m olmak üzere maksimuma yakın bir azalma sağlanmıştır. Glukoz ve yağ içeren ortamlarda gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi sonucunda, besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma yüzdeleri ise %35.67-41.97 olarak belirlenmiştir.

Bu aşamada ayrıca hem en düşük yüzey gerilimi hem de yüzey gerilimi miktarında gerçekleşen en düşük azalma değeri ve yüzdesinin pamuk yağında görüldüğü bir profil ortaya çıkmıştır. Bu durum, bu ortamın başlangıç yüzey geriliminin zaten düşük olmasından kaynaklanmıştır. Bu nedenle, yüzey gerilimi ile ilgili sonuçların değerlendirilmesi aşamasında yüzey gerilimindeki azalma miktarları esas alınmıştır.

Bu deneylerde mikroorganizma kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. Glukoz ve yağ içeren besiyerlerinde elde edilen maksimum hücre kuru ağırlığı değeri 5.53-6.87 g/L aralığında değışim gösterdiği görülmüştür. Hücre kuru ağırlığının en yüksek ve en düşük kuru ağırlık değeri sırasıyla kanola yağı ve ayçiçek yağı içeren besiyerlerinde ulaşılmıştır. Bu ortamlarda en düşük yüzey gerilimlerinin elde edildiği zaman aralıklarında, mayanın genel olarak logaritmik üreme evresinde olduğu görülmektedir. Bununla beraber ayçiçek ve kanola yağlarını içeren besiyerlerinde, maya logaritmik evrenin sonlarında iken en düşük yüzey gerilimlerine ulaşılmıştır (Tablo 4.6., Şekil 4.1.).

4.2.1.2 Karbon Kaynağı Olarak Fruktoz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler

Fermantasyon ortamı bileşimi olarak fruktoz ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının kullanıldığı deneylerde ulaşılan maksimum yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi sonuçları Tablo 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, glukoz (%10) ve yağ (%10) içeren fermantasyon ortamlarında maya kuru ağırlık değişimlerinin zamanla değişimleri

Tablo 4.7.'de verilen bu deneylerde, 72 ve 120. saat aralığında değişen zamanlarda birbirine oldukça yakın (6.7-7.1 cm) yağ yayma çapı sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca ayçiçek yağının karbon kaynağı olarak yer aldığı deneyde en düşük yüzey gerilimi 24. saatte 38.09 mN/m olarak ölçülmüştür. Diğer deneylerde ise 33.47-35.14 mN/m aralığında değişen birbirine daha yakın yüzey gerilimi sonuçları 48. saatte elde edilmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde en düşük yüzey gerilimi sonuçlarına maksimum yağ yayma çapının görüldüğü saatlere göre daha kısa sürede ulaşıldığı görülmektedir.

Karbon kaynağı olarak fruktoz ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının yer aldığı besiyerlerinin başlangıç yüzey gerilimi değerleri ve bu ortamların yüzey gerilimlerindeki azalma miktarları Tablo 4.8.'de sunulmuştur. En düşük ve en yüksek başlangıç yüzey gerilimleri sırasıyla 48.69 ve 58.87 mN/m olmak üzere zeytinyağı ve pamuk yağı içeren fermantasyon ortamlarında ölçülmüştür. Biyosüpfektan üretimi deneylerinde kullanılan bu besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde 15.22-23.73 mN/m düzeyinde bir azalma gerçekleştiği belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak fruktoz ve pamuk yağının kullanıldığı koşullarda yüzey gerilimi en yüksek miktarda (23.73 mN/m) düşürülürken, fruktoz ve mısır yağı içeren besiyerinin yüzey geriliminde ise 21.23

mN/m olarak maksimuma yakın bir azalma sağlanmıştır. Besiyeri bileşiminde zeytinyağı ve fındık yağının yer alması durumunda ise sırasıyla 15.22 ve 15.91 mN/m olmak üzere birbirine oldukça yakın miktarlarda yüzey gerilimi azalması belirlenmiştir. Ancak, sonuçlar yalnızca en düşük yüzey gerilimi değerleri açısından değerlendirildiğinde bu iki besiyeri diğerlerine göre daha üstün iken, ortam yüzey geriliminin düşürülmesinde fruktoz ve pamuk yağı içeren besiyerinin öne çıktığı görülmektedir. Fruktoz ve yağ içeren ortamların başlangıç yüzey gerilimlerinde azalma yüzdelerinin %31.26-40.31 arasında değişim gösterdiği bulunmuştur.

Tablo 4.7. Karbon kaynağı olarak fruktoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler

Karbon kaynakları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
F + AY	120	6.8	24	38.09±0.01
F + FY	72	6.9	48	34.23±0.06
F + KY	96	7	48	33.96±0.05
F + MY	72	7	48	34.75±0.01
F + PY	96	6.7	48	35.14±0.09
F + ZY	72	7.1	48	33.47±0.06

(F: Fruktoz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

Besiyeri bileşiminde fruktoz ve yağların kullanıldığı deneylerde elde edilen hücre kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.2.'de görülmektedir. Fruktoz ve yağ içeren besiyerlerinde en düşük (3.99 g/L) ve en yüksek (5.85 g/L) maya kuru ağırlıkları sırasıyla fındık yağı ve pamuk yağı içeren besiyerlerinde bulunmuştur. Tablo 4.8. ve Şekil 4.2.'de görüldüğü üzere bu besiyerlerinde en düşük yüzey gerilimlerine ulaşılan zaman aralıklarında (24-48 saat) maya logaritmik üreme evresindedir.

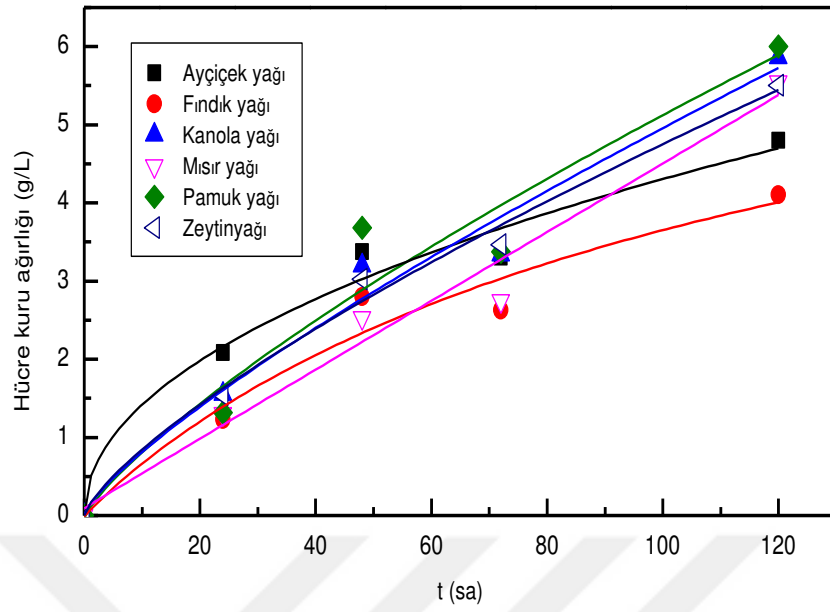
Tablo 4.8. Karbon kaynağı olarak fruktoz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

	F+AY	F+FY	F+KY	F+MY	F+PY	F+ZY
Zaman (saat)	Yüzey gerilimleri (mN/m)					
0	57.89±0.08	50.14±0.08	50.22±0.05	55.98±0.16	58.87±0.05	48.69±0.10
24	38.09±0.01	49.55±0.02	44.51±0.07	48.46±0.02	44.22±0.02	33.85±0.08
48	45.08±0.07	34.23±0.06	33.96±0.05	34.75±0.01	35.14±0.09	33.47±0.06
72	45.22±0.08	40.08±0.07	34.93±0.08	37.77±0.05	38.88±0.05	41.16±0.01
96	47.08±0.03	38.83±0.11	38.26±0.01	37.91±0.03	37.90±0.01	41.94±0.01
120	40.84±0.06	39.74±0.07	40.36±0.05	38.68±0.05	40.71±0.02	40.78±0.01
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a ; mN/m)						
	19.80	15.91	16.26	21.23	23.73	15.22
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)						
	34.20	31.73	32.38	37.92	40.31	31.26

(F: Fruktoz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)
Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

4.2.1.3 Karbon Kaynağı Olarak Sakkaroz ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler

Biyosürfektan üretimi amacıyla karbon kaynağı olarak sakkaroz ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının kullanıldığı deneylerde ulaşılan en düşük yüzey gerilimi sonuçları Tablo 4.9.'da gösterilmiştir. Bu koşullarda 33.62-37.84 mN/m aralığında değişen ölçümler gerçekleştirilmiş olup bu değerler fruktoz ve yağ bileşenlerinin kullanıldığı deneylerde ulaşılan en düşük yüzey gerilimi sonuçları (33.47-38.09 mN/m) ile büyük ölçüde benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.2. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, fruktoz (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri

Tablo 4.9. Karbon kaynağı olarak sakkaroz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değeri ve bu değeri elde edildiği saatler

Karbon kaynakları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
S + AY	72	6.4	48	36.12±0.10
S + FY	120	7	48	33.62±0.02
S + KY	120	6.8	48	34.88±0.03
S + MY	120	7.1	48	34.81±0.04
S + PY	120	5.9	120	37.84±0.02
S + ZY	120	7.1	48	34.33±0.01

(S: Sakkaroz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

Bununla beraber fruktoz ve sakkaroz kullanılarak gerçekleştirilen her iki deney için en düşük yüzey geriliminin elde edildiği bileşimler farklı olup, sırasıyla fruktoz ve zeytinyağı ile sakkaroz ve fındık yağının kullanıldığı koşullarda yüzey gerilimleri yaklaşık olarak 33.50 mN/m ölçülmüştür. Ayrıca fruktoz içeren ortama benzer şekilde genel olarak en düşük yüzey gerilimi sonuçlarına maksimum yağ yayma çaplarından daha önce ulaşılmıştır (Tablo 4.9.).

Besiyeri bileşimi olarak sakkaroz ve yağların kullanıldığı deneylerde yüzey gerilimindeki azalma miktarlarının 13.26-26.55 mN/m aralığında değiştikleri görülmüştür (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. Karbon kaynağı olarak sakkaroz (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

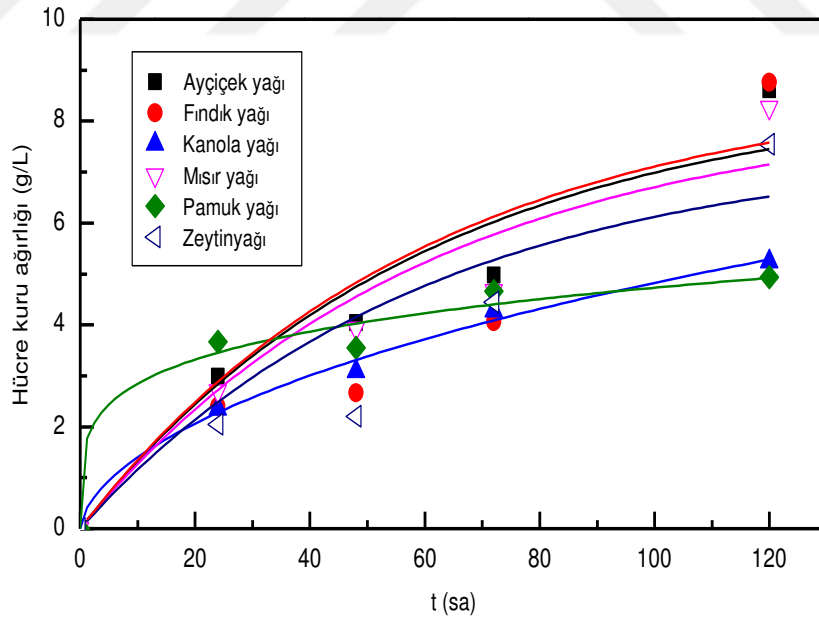
	S+AY	S+FY	S+KY	S+MY	S+PY	S+ZY
Zaman (saat)	Yüzey gerilimleri (mN/m)					
0	54.69±0.12	60.17±0.02	53.48±0.08	48.07±0.06	55.44±0.01	51.19±0.04
24	39.25±0.02	39.81±0.05	36.38±0.08	47.71±0.03	45.33±0.01	34.38±0.06
48	36.12±0.10	33.62±0.02	34.88±0.03	34.81±0.04	48.16±0.01	34.33±0.01
72	36.58±0.05	46.91±0.10	35.59±0.02	37.05±0.03	41.64±0.06	37.12±0.07
96	39.72±0.06	43.45±0.09	37.74±0.08	40.41±0.02	38.95±0.04	41.87±0.03
120	40.12±0.00	40.19±0.01	36.02±0.05	40.05±0.09	37.84±0.02	38.34±0.05
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a ; mN/m)						
	18.57	26.55	18.60	13.26	17.60	16.86
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)						
	33.95	44.12	34.78	27.58	31.75	32.94

(S: Sakkaroz; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

Tablo 4.10.'da sakkaroz ve fındık yağının bir arada bulunduğu besiyerinde *Cyb. fabianii* ile üretilen biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme açısından daha üstün olduğu belirlenmiş ve başlangıç yüzey gerilimi değeri 60.17 mN/m olarak belirlenen bu ortamın yüzey gerilimi 48 saat sonrasında 33.62 mN/m'ye düşürülmüştür. Karbon kaynağı olarak sakkarozun yanı sıra ayçiçek ve kanola yağı içeren ortamların yüzey gerilimlerinde ise sırasıyla 18.57 ve 18.60 mN/m düzeyinde birbirlerine oldukça yakın bir azalma görülmüştür. Diğer yandan sakkaroz ve mısır yağı içeren besiyerinin kullanıldığı deney sonucunda da minimuma yakın bir yüzey gerilimi ölçülmesine rağmen bu besiyerinin diğerlerine göre düşük bir başlangıç yüzey gerilimine sahip olması dolayısıyla, bu ortamda yüzey geriliminin düşürülmesi açısından 13.26 mN/m düzeyinde en düşük sonuç elde edilmiştir. Sakkaroz ve yağ içeren ortamların başlangıç yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma yüzdeleri %27.58-44.12 olarak belirlenmiştir.

Sakkaroz (%10) ve %10 oranında yağ (ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağı) kullanılan deneylerde elde edilen hücre kuru ağırlık değişimlerinin zamanla değişimleri ise Şekil 4.3.'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu için, sakkaroz (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık değişimlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde maksimum maya kuru ağırlıkları 4.90-7.55 g/L aralığında değişim göstermiştir. Maksimum hücre kuru ağırlığının en düşük ve en yüksek

değerleri sırasıyla pamuk yağı ve fındık yağı içeren besiyerlerinde belirlenmiştir. Sakkaroz ve pamuk yağı haricindeki diğer yağları içeren besiyerlerinde en düşük yüzey gerilimlerinin ölçüldüğü 48. saatte mayanın logaritmik evresinde ürettiği, pamuk yağı içeren ortamda ise mayanın yaklaşık 24 saatten sonra durgun faza girdiği ve en düşük yüzey gerilimi sonucuna da durgun fazda ulaşıldığı belirlenmiştir (Tablo 4.10., Şekil 4.3.).

4.2.1.4 Karbon Kaynağı Olarak Gliserol ve Farklı Yağların Kullanıldığı Deneyler

Biyosüpfektan üretimi amacıyla fermentasyon ortamında yer alacak olan karbon kaynaklarının belirlenmesi çalışmalarında gliserol ve sırasıyla ayçiçek, fındık, kanola, mısır, pamuk yağları ve zeytinyağının kullanıldığı deneylerde kaydedilen en düşük yüzey gerilimi sonuçları Tablo 4.11.'de sunulmuştur. Bu koşullarda gliserol ve fındık yağı içeren ortamda en düşük yüzey gerilimi 38.93 mN/m olarak ölçülürken, pamuk yağı kullanıldığında ortam yüzey gerilimi için 48.03 mN/m düzeyinde bir sonuç elde edilmiştir. Bununla beraber ayçiçek, mısır ve kanola yağlarının kullanıldığı deneylerde ise 39.74-41.49 mN/m aralığında değişim gösteren değerler ölçülmüştür. Bu deneylerde görülen birbirlerine yakın maksimum yağ yayma çaplarına (6.5-6.9 cm) rağmen, ölçülen en düşük yüzey gerilimi sonuçlarında yaklaşık olarak 9 mN/m düzeyinde bir fark ortaya çıkmıştır. Gliserol ve yağ içeren ortamların başlangıç yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma yüzdelерinin %15.02-34.34 olarak geniş bir aralıkta değişim gösterdiği bulunmuştur.

Besiyeri bileşimi olarak gliserol ve yukarıda belirtilen yağların kullanıldığı deneylerde yüzey gerilimlerinde meydana gelen azalma miktarları Tablo 4.12.'de verilmiştir. Bu deneylerde en yüksek ve birbirine yakın yüzey gerilimi azalma miktarları 20.36 ve 20.08 mN/m olarak sırasıyla fındık yağı ve kanola yağı içeren ortamlarda elde edilmiş ve her iki ortam için de bu değerlere 96 saat sonra ulaşılmıştır. Gliserol ve yağ içeren ortamların başlangıç yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma yüzdeleri %15.02-34.34 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.11. Karbon kaynağı olarak gliserol (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler

Karbon kaynakları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
GLİ + AY	24	6.7	120	41.49± 0.06
GLİ + FY	96	6.9	96	38.93± 0.05
GLİ + KY	24	6.9	96	40.22± 0.01
GLİ + MY	48	6.7	48	39.74± 0.08
GLİ + PY	120	6.5	120	48.03± 0.09
GLİ + ZY	48	6.8	72	35.32±0.03

(GLİ: Gliserol; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

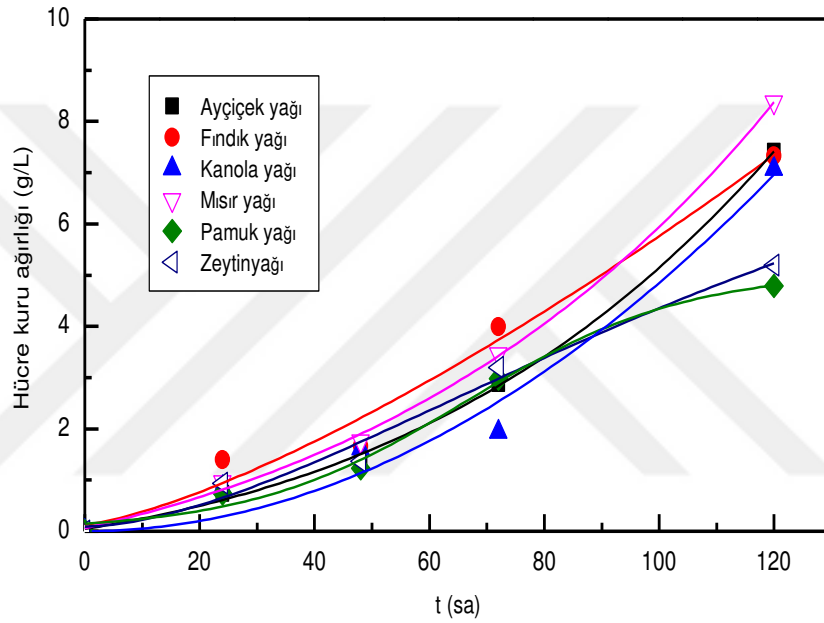
Tablo 4.12. Karbon kaynağı olarak gliserol (%10) ve yağ (%10) kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

	GLİ+AY	GLİ +FY	GLİ +KY	GLİ +MY	GLİ +PY	GLİ +ZY
Zaman (saat)	Yüzey gerilimleri (mN/m)					
0	60.04±0.05	59.29±0.06	60.30±0.00	52.11±0.03	56.52±0.08	49.82±0.07
24	58.68±0.02	54.07±0.03	55.60±0.03	50.24±0.06	54.12±0.08	38.07±0.10
48	51.53±0.04	48.38±0.04	42.77±0.02	39.74±0.08	53.35±0.04	36.91±0.12
72	51.93±0.01	56.07±0.08	56.18±0.02	45.10±0.06	54.17±0.07	35.32±0.03
96	41.51±0.03	38.93±0.05	40.22±0.01	51.49±0.03	49.66±0.05	40.39±0.08
120	41.49±0.06	50.48±0.00	55.51±0.07	45.40±0.10	48.03±0.09	39.56±0.01
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a ; mN/m)						
	18.55	20.36	20.08	12.37	8.49	14.50
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)						
	30.90	34.34	33.30	23.74	15.02	29.10

(GLİ: Gliserol; AY: Ayçiçek yağı; FY: Fındık yağı; KY: Kanola yağı; MY: Mısır yağı; PY: Pamuk yağı; ZY: Zeytinyağı)

Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

Gliserol ve yağ içeren besiyerlerinin kullanıldığı deneylerde elde edilen hücre kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri ise Şekil 4.4.'te verilmiştir. Gliserol ve yağ içeren besiyerlerinde en düşük (4.78 g/L) ve en yüksek (8.21 g/L) kuru ağırlık değerlerine sırasıyla pamuk yağı ve mısır yağı içeren besiyerinde ulaşılmıştır. Ayrıca, ayçiçek ve fındık yağı içeren besiyerlerinde aynı miktarda maksimum hücre kuru ağırlığı 7.26 g/L olarak belirlenmiştir. Gliserol ve yağları içeren besiyerlerinde en düşük yüzey gerilimlerine ulaşılan zaman aralıklarında maya logaritmik üreme evresindedir (Tablo 4.12., Şekil 4.4.).

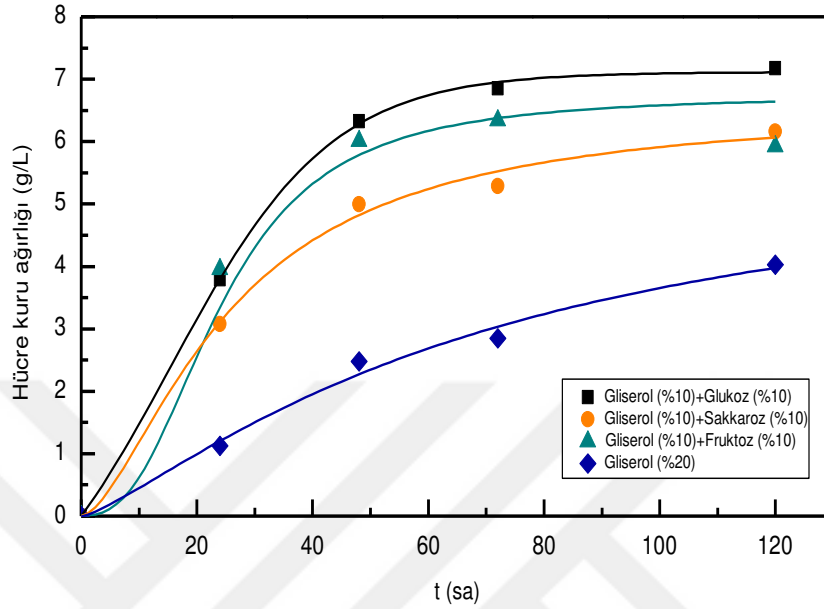


Şekil 4.4. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, gliserol (%10) ve yağ (%10) içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri

4.2.1.5 Karbon Kaynağı Olarak Gliserol ve Farklı Şekerler ile Glukoz ve Ayçiçek Yağının Kullanıldığı Deneyler

Besiyeri bileşiminde gliserole ek olarak ayrı ayrı glukoz, fruktoz ve sakkarozun kullanıldığı deneyler sırasında belirli aralıklarla gerçekleştirilen yağ yayma testleri esas alınarak, bu besiyerlerinde biyosüpfektan üretiminin gerçekleşmediği saptanmıştır. Ayrıca literatürde yer alması dolayısıyla bileşiminde tek başına gliserol (%20) içeren bir besiyeri kullanılarak bir deney daha yürütölmüş ve bu çalışmada da benzer şekilde yağ yayma çapı oluşmadığı görölmüştür. Çalışma kapsamında %10 derişimdeki gliserole ek olarak glukoz (%10), fruktoz (%10) ve sakkarozun (%10) kullanıldığı ayrıca gliserol (%20)

içeren besiyerlerinde biyosüpfektan üretimi gerçekleşmemiş olmakla beraber, bu ortamlarda hücre kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, gliserole (%10) ek olarak glukoz (%10), fruktoz (%10) ve sakkaroz (%10) ve ayrıca tek başına %20 oranında gliserol içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değişimleri

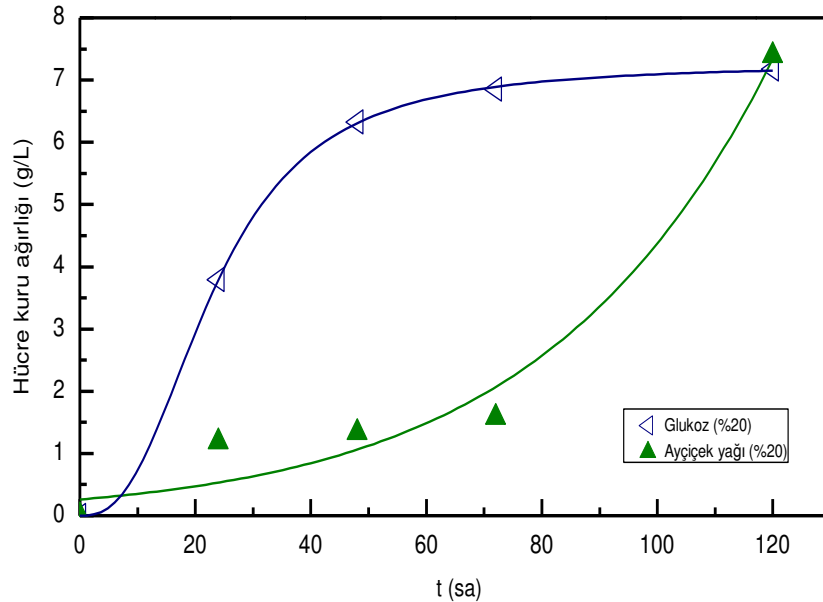
4.2.1.6 Besiyeri Bileşiminde Tek Başına Glukoz ve Ayçiçek Yağının Kullanıldığı Deneyler

Karbon kaynaklarının seçilmesine yönelik olarak gerçekleştirilen deneyler göz önüne alındığında genel olarak, fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak glukoz ve sakkarozun ayrı ayrı fındık yağı ile bir kombinasyon halinde yer aldığı koşullarda *Cyb. fabianii* suşu kullanılarak yüzey gerilimlerinin sırasıyla 26.57 ve 26.55 mN/m olarak maksimum düzeyde düşürüldüğü sonucuna varılmıştır. Sırasıyla glukoz ve sakkarozun fındık yağı ile birlikte kullanıldığı deneylerde yüzey gerilimlerinin 120 ve 48 saat sonrasında maksimum düzeyde düşürüldükleri belirlenmiştir (Tablo 4.5., Tablo 4.9.). Ayrıca glukozun ayçiçek yağı ve mısır yağı ile kullanıldığı ortamların yüzey gerilimi miktarlarında sırasıyla 26.27 mN/m (72 saat) ve 26.21 mN/m (120 saat) olmak üzere maksimuma yakın azalma gerçekleşmiştir (Tablo 4.5).

Bu aşamada birbirine oldukça yakın olan bu ortamların seçimi söz konusu olduğunda, hem yüzey geriliminde maksimum azalmanın görüldüğü zaman

aralıkları hem besiyeri bileşiminde yer alacak olan substratların ekonomik ve kolay bulunabilir olması faktörleri göz önüne alınmış ve glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerinde çalışılmaya devam edilmesine karar verilmiştir. Bu kapsamda glukoz ve ayçiçek yağının her birinin fermantasyon ortamında tek başına %20 derişiminde kullanıldığı deneyler gerçekleştirilmiştir. Biyosürefektan üretimi amacıyla %20 oranında ayçiçek yağı içeren fermantasyon ortamının kullanıldığı bir deneyde, başlangıç yüzey gerilimi 49.82 ± 0.07 mN/m olarak belirlenen besiyerinde 14.5 mN/m olarak %29.10 düzeyinde bir azalma yaklaşık 72 saat sonunda gerçekleşmiş olup, en düşük yüzey gerilimi 35.32 ± 0.10 mN/m olarak ölçülmüştür. Ancak %20 oranında glukoz içeren bir besiyerinde gerçekleştirilen çalışmada biyosürefektan üretimi gerçekleşmediğinden yağ yayma çapı oluşmamıştır.

Çalışma kapsamında biyosürefektan üretimi amacıyla kullanılan glukoz (%20) ve ayçiçek yağının (%20) ayrı ayrı içeren ortamlardaki maya gelişim profilleri Şekil 4.6.'da gösterilmektedir. Ayçiçek yağı içeren besiyerinde yaklaşık 72 saat sonunda en düşük yüzey gerilimine ulaşılmış olup maya üremesi de bu saatte logaritmik fazın başında olup, bu saatten sonra belirgin bir artış göstermiştir.



Şekil 4.6. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, tek başına %20 oranında glukoz ve ayçiçek yağı içeren ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla derişimleri

4.2.1.7 Karbon Kaynağının Belirlenmesine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirmesi

Cyb. fabianii MİAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi çalışmaları kapsamında besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve ayçiçek yağının bir arada kullanıldığı koşullarda besiyeri yüzey geriliminde 26.27 mN/m olarak en yüksek düzeyde azalma sağlandığı bulunmuştur. Bununla beraber, glukozun tek başına kullanıldığı deneyde biyosüpfektan üretimi gerçekleşmemiş, ayçiçek yağı tek başına kullanıldığında ise yüzey geriliminde en fazla 14.5 mN/m miktarında bir azalma sağlanmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda öncelikle fermantasyon ortamı bileşimlerinde mutlaka bir yağ kaynağının yer alması gerektiği ve ayrıca hidrofilik ve hidrofobik substrat kaynaklarının bir arada kullanımının biyosüpfektan üretimini desteklediği ortaya konmuştur.

Tez çalışmasında sadece glukoz içeren besiyerlerinde biyosüpfektan üretilmemesine rağmen, literatürde farklı bakteri ve maya türleri aracılığıyla biyosüpfektanların üretimi amacıyla hidrofilik karbon kaynaklarının tek başına kullanıldığı pek çok çalışma bildirilmiştir (8,38,90,101). Bununla beraber literatürde hidrofobik karbon kaynaklarının tek başlarına kullanıldığı çalışmalara (70,73,84) benzer şekilde, bu çalışmada sadece ayçiçek yağı içeren ortamda *Cyb. fabianii* mayası ile biyosüpfektan üretilmiştir. Ayrıca literatürde hidrofilik ve hidrofobik substratların bir arada kullanımı öneren çalışmalara (6–8,66) uyum sağlayacak şekilde, tez çalışmasında glukoz ve ayçiçek yağının bir arada kullanıldığı ortamlarda yüzey gerilimlerinin daha fazla düşürüldüğü saptanmıştır. Genel olarak örneğin, karbon kaynağı olarak sadece glukoz kullanıldığında maya kaynaklı biyosüpfektanın yağ asidi zincirinin glukozdan enzimler aracılığıyla sentezlendiği ancak, ortamda herhangi bir yağın da bulunduğu koşullarda yağ asidi zincirinin doğrudan yağın hidrolize edilmesi ile oluşturulduğu bildirilmektedir (8).

Dong ve ark. (8) tarafından, *C. bombicola* suşu aracılığıyla biyosüpfektan üretimi için öncelikle glukoz, fruktoz, sakkaroz, ksiloz ve laktoz içeren ortamların etkileri incelendiğinde glukozun kullanılmasıyla en yüksek düzeyde üretimin ve maya gelişiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada glukoz ve kolza yağının beraber kullanıldığı deneyde ise ayrı ayrı mısır, ayçiçek, soya ve yer fıstığı yağlarına göre daha fazla miktarda biyosüpfektanın üretildiği ve ayrıca genel olarak tüm bu ortamlarda sadece glukozun bulunduğu koşullara göre daha

yüksek miktarlarda üretimin sağlandığı ifade edilmiştir (8). Kim ve ark. (6) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada glukoz ve kolza yağının bir arada kullanılması durumunda daha yüksek miktarda biyosüpfektan üretildiği rapor edilmiştir. Tüm bu çalışmalar kapsamında belirlenen karbon kaynağı bileşimleri, tez çalışmasında öne çıkan karbon kaynakları ile uyum içerisinde. Bununla beraber, tez çalışmasında karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında Moshtag ve ark. (71) tarafından da belirtildiği üzere biyosüpfektan üretimi açısından en olumsuz koşulların olduğu bulunmuştur. Tez çalışmasından farklı olarak ise, genel olarak sonuçları karşılaştırılan bu biyosüpfektan üretimi çalışmalarında, karbon kaynaklarının seçimi aşamasında yüzey gerilimi ölçümleri yerine üretim miktarları esas alınmış olup, literatürde bulunan bazı çalışmalarda ise karbon kaynaklarının yüzey gerilimi sonuçları doğrultusunda belirlendiği rapor edilmektedir (27,63,69,97). Bu çalışmalarda belirlenen karbon kaynakları kullanıldığında besiyeri yüzey gerilimleri 32.10-36.40 mN/m aralığına düşürülmüş olup bu değerler tezde glukoz ve ayçiçek yağı içeren ortamda 37.04 mN/m olarak belirlenen yüzey gerilimi sonucuna yakın bulunmuştur.

4.2.2 Azot Kaynaklarının Belirlenmesi

Besiyeri bileşiminde yer alan farklı organik (pepton, maya özütü, üre) ve inorganik (amonyum klorür, amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynaklarının glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerlerinin yüzey geriliminin düşürülmesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu deneylerde, yağ yayma çapları ise, yüzey gerilimi miktarları ile uyum içerisinde olmaksızın 3.30-6.90 cm aralığında değişim göstermiştir (Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.). Deneyler sonucunda, besiyerinde üre kullanılması durumunda en düşük yüzey gerilimi değeri 37.10 mN/m olarak ölçülmüş ve yüzey geriliminde azalma miktarının (25.34 mN/m) maksimum düzeyde olduğu bulunmuştur. Besiyeri bileşiminde amonyum sülfat, sodyum nitrat ve peptonun yer aldığı deneylerde ise yüzey gerilimlerinde sırasıyla 20.65, 20.53 ve 19.70 mN/m olarak ortalama 20 mN/m düzeyinde azalmalar sağlanmıştır. Azot kaynağı olarak maya özütünün kullanıldığı deneyde ise besiyeri yüzey geriliminde 18.56 mN/m düzeyinde bir azalma gerçekleşmiştir. Ayrıca yüzey geriliminin düşürülmesi açısından en olumsuz sonuç ise amonyum klorür içeren ortamda alınmıştır.

Tablo 4.13. Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile elde edilen en geniş yağ yayma çapı ve en düşük yüzey gerilimi değerleri ve bu değerlerin elde edildiği saatler

Azot kaynakları	Zaman (sa)	En geniş yağ yayma çapı (cm)	Zaman (sa)	En düşük yüzey gerilimi (mN/m)
Maya özütü	96	5.9	24	37.11±0.02
Pepton	120	6.4	72	36.40±0.01
Üre	72	5.9	96	37.10±0.08
Amonyum klorür	120	3.3	120	46.71±0.05
Amonyum sülfat	120	5	120	37.25±0.03
Sodyum nitrat	72	6.9	72	42.12±0.02

Tablo 4.14. Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılan besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri ve yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ile bu azalmanın görüldüğü saatler

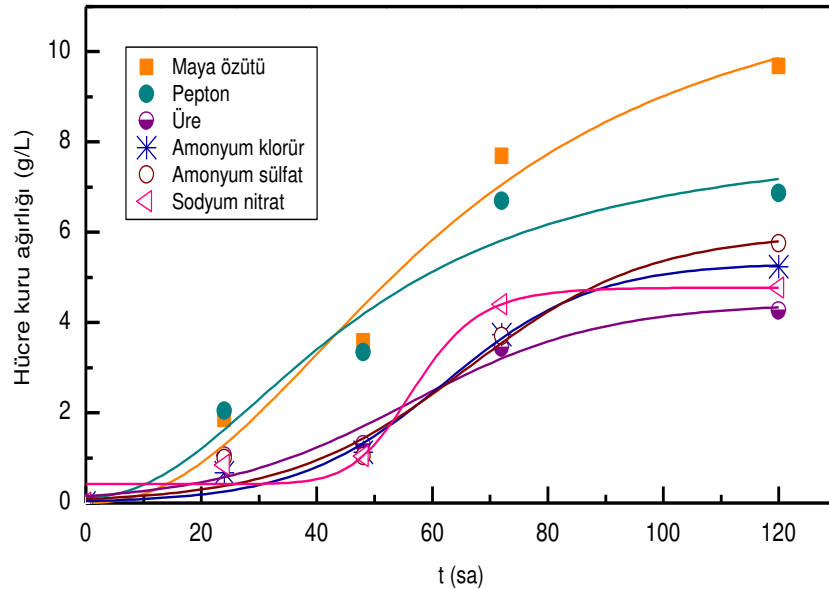
	M	P	Ü	AK	AS	SN
Zaman (saat)	Yüzey gerilimleri (mN/m)					
0	55.67±0.06	56.10±0.10	62.45±0.05	58.75±0.02	57.90±0.01	62.65±0.06
24	37.11±0.02	39.41±0.04	56.48±0.06	54.59±0.03	50.98±0.08	58.43±0.01
48	39.84±0.03	38.00±0.04	55.76±0.15	53.68±0.05	39.22±0.05	48.35±0.02
72	39.31±0.00	36.40±0.01	39.01±0.08	49.68±0.03	40.78±0.01	42.12±0.02
96	38.68±0.07	37.15±0.05	37.10±0.08	48.19±0.06	39.51±0.08	46.63±0.07
120	38.04±0.04	38.08±0.03	39.78±0.04	46.71±0.05	37.25±0.03	49.19±0.02
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a ; mN/m)						
	18.56	19.70	25.34	12.04	20.65	20.53
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)						
	35.12	33.34	40.58	20.49	35.66	32.77

(M: Maya özütü; P: Pepton; Ü: Üre; AK: Amonyum klorür; AS: Amonyum sülfat; SN: Sodyum nitrat)

Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

Glukoz ve ayçiçek yağı ile beraber farklı azot kaynaklarını içeren ortamların başlangıç yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma yüzdeleri ise %20.49-40.58 olarak belirlenmiştir. Azot kaynağının seçimine yönelik olarak gerçekleştirilen tüm deneyler genel olarak değerlendirildiğinde, üre içeren besiyerinde yüzey geriliminin 25.34 mN/m olarak maksimum düzeyde düşürüldüğü ortaya konmuştur (Tablo 4.14). Daha önce besiyeri bileşiminde maya özütü (4 g/L) ve ürenin (1 g/L) bir arada kullanıldığı deneyde ise; besiyeri yüzey geriliminin 26.27 mN/m düzeyinde düşürüldüğü belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.6.). Ancak maya özütünün tek başına kullanıldığı koşullarda, yaklaşık 18.56 mN/m olarak daha düşük bir sonuç alınması dikkat çekmiştir. Bu nedenle, tez çalışmasının devamında kullanılacak olan besiyerlerinde maya özütü ve ürenin bir arada yer almasına karar verilmiştir.

Glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerlerinde farklı azot kaynaklarının (maya özütü, pepton, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat) kullanıldığı biyosüpfektan üretimi deneylerinde elde edilen hücre kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Bu koşullarda en düşük (4.32 g/L) ve en yüksek (9.77 g/L) kuru ağırlık değeriyle sırasıyla üre ve maya özütü içeren besiyerinde ulaşılmıştır.



Şekil 4.7. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerlerinde azot kaynağı olarak maya özütü, pepton, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat bulunan ortamlarda maya kuru ağırlık derişimlerinin zamanla değışimleri

Tablo 4.14. ve Şekil 4.7. beraber değerlendirildiğinde, besiyeri yüzey geriliminin düşürülmesine etkisi en yüksek olan biyosüpfektanın üre içeren besiyerinde üretildiği ancak bu ortamda maya üremesinin en düşük düzeyde gerçekleştiği bir profil ortaya çıkmıştır. Benzer bir durum maya özütü içeren besiyeri için de geçerli olup bu besiyerinde maya üremesi en yüksek düzeyde gerçekleşmesine rağmen besiyeri yüzey gerilimini düşürme kapasitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Azot kaynağı olarak maya özütü ve pepton içeren besiyerlerinde en düşük yüzey gerilimlerinin ölçüldüğü zaman aralıklarında mayanın logaritmik üreme evresinde olduğu, bununla beraber besiyerinde üre, amonyum sülfat ve sodyum nitratın yer aldığı koşullarda en düşük yüzey gerilimi değerlerine durgun evrenin başlangıç aşamalarında ulaşıldığı belirlenmiştir. Ayrıca amonyum klorür içeren besiyerinde ise en düşük yüzey geriliminin görüldüğü 120. saatte maya durgun evresindedir (Tablo 4.13. ve Şekil 4.7.). Karbon kaynağının belirlenmesi deneyleri ile benzerlik gösterecek şekilde, kullanılan azot kaynağına göre bu fermantasyon ortamlarında üretilen biyosüpfektanlar primer veya sekonder metabolit olarak ifade edilebilir.

4.2.2.1 Azot Kaynağının Belirlenmesine Yönelik Olarak Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirilmesi

Cyb. fabianii mayası aracılığıyla biyosüpfektan üretimi için fermantasyon ortamı bileşiminde azot kaynağı olarak tek başına ürenin 5 g/L derişiminde kullanıldığı deneyde yüzey geriliminin maksimum 25.34 mN/m, maya özütü (4 g/L) ve üre (1 g/L) bir arada kullanıldığında ise 26.27 mN/m miktarında düşürülmesi nedeniyle azot kaynağı olarak bu iki bileşenden yararlanılmıştır.

Literatürde bulunan çalışmalarda (7,8,83,84) besiyeri bileşimlerinde maya özütünün tek başına sıklıkla kullanıldığı görülmeye rağmen, tez çalışmasında maya özütü kullanımı ile genel olarak daha düşük sonuçlar alınmıştır. Bununla beraber farklı bakteri ve mayalar ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda (91,152) üre kullanımının biyosüpfektan üretimini desteklediği, bir kısmında (6,8) ise bu koşulda en düşük sonuçlara ulaşıldığı aktarılmaktadır. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu aracılığıyla biyosüpfektan üretiminin gerçekleştirildiği tez çalışmasında ise azot kaynağı olarak ürenin tek başına veya maya özütüne destek olarak mutlaka kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde ise,

Alfian ve ark. (131) ve Hirata ve ark. (66) tarafından biyosüpfektan üretimi amacıyla maya özütü ve ürenin bir arada kullanıldığı bildirilmiştir.

Kim ve ark. (6) tarafından yürütölen bir çalışmada ise maya özütünün tek başına kullanıldığı deneyde *C. batistae* mayası aracılığıyla biyosüpfektan üretiminin olumsuz etkilendiğı ancak amonyum nitratin maya özütü ile desteklenerek kullanıldığı koşullarda yüksek miktarda biyosüpfektan üretildiğı rapor edilmiştir. Bu çalışma iki farklı azot kaynağının beraber kullanılması ve maya özütünde daha düşük sonuçların alınması bakımından tez çalışmasına benzer nitelikte olmakla beraber, tezde azot kaynağı seçiminin yüzey geriliminin düşürölmesi esasına göre yapılmış olması bir farklılık olarak görölmüştür. Bununla beraber literatürde bulunan bazı çalışmalarda ise, farklı azot kaynaklarının seçimi aşamasında yüzey gerilimi sonuçlarının kullanıldığı rapor edilmektedir (63,69,97). Bu çalışmalarda besiyeri yüzey gerilimlerinin 32.80-34.20 mN/m olarak minimum düzeylere düşürölmesini sağlayan azot kaynakları belirlenmiş olup, tezde seçilmiş olan maya özütü ve ürenin kullanıldığı koşullarda ise yüzey gerilimleri yukarıda verilen değerlerden bir miktar daha yüksek olacak şekilde yaklaşık 37 mN/m düzeyine düşürölümüştür. Diğer taraftan biyosüpfektan verimi esasına göre optimize edilmiş bir fermantasyon ortamında, bu tez çalışmasına benzer şekilde maya kaynaklı bir biyosüpfektan aracılığıyla yüzey geriliminin 37 mN/m'ye düşüröldüğü bildirilmiştir (84).

4.3 Fermantasyon Ortamı Bileşiminin Belirlenmesi İçin Deney Tasarımı, Yanıtın Modellenmesi ve Optimizasyonu

Cyb. fabianii suşu ile gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneylerinde besiyeri bileşiminde yer alan karbon ve azot kaynakları derişimlerinin, besiyerlerinin yüzey gerilimini düşürme düzeyine etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda, bağımsız değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi ve optimizasyonu amacıyla merkezi karma tasarım metoduna göre yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlere ait gerçek değerler Tablo 4.15.'te, bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ise Tablo 4.16.'da verilmiştir. Tasarımda, 30 farklı deney kombinasyonu elde edilmiştir.

Tablo 4.15. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney no.	X ₁ : Glukoz (%)	X ₂ : Ayçiçek yağı (%)	X ₃ : Üre (g/L)	X ₄ : Maya özütü (g/L)
1	3	2	3	1
2	12	2	1	3
3	12	2	1	1
4	7.5	6	2	2
5	12	10	3	1
6	7.5	10.8	2	2
7	7.5	6	2	2
8	7.5	6	2	3.2
9	12	10	3	3
10	3	10	1	1
11	7.5	1.2	2	2
12	7.5	6	0.8	2
13	3	10	3	1
14	3	2	1	3
15	7.5	6	2	0.8
16	3	2	3	3
17	12	2	3	3
18	7.5	6	2	2
19	12	2	3	1
20	7.5	6	2	2
21	7.5	6	3.2	2
22	3	10	3	3
23	3	2	1	1
24	7.5	6	2	2
25	3	10	1	3
26	12	10	1	1
27	12	10	1	3
28	12.9	6	2	2
29	2.1	6	2	2
30	7.5	6	2	2

Tablo 4.16. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

Deney no.	X ₁ : Glukoz (%)	X ₂ : Ayçiçek yağı (%)	X ₃ : Üre (g/L)	X ₄ : Maya özütü (g/L)
1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	1
3	1	-1	-1	-1
4	0	0	0	0
5	1	1	1	-1
6	0	1.2	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	1.2
9	1	1	1	1
10	-1	1	-1	-1
11	0	-1.2	0	0
12	0	0	-1.2	0
13	-1	1	1	-1
14	-1	-1	-1	1
15	0	0	0	-1.2
16	-1	-1	1	1
17	1	-1	1	1
18	0	0	0	0
19	1	-1	1	-1
20	0	0	0	0
21	0	0	1.2	0
22	-1	1	1	1
23	-1	-1	-1	-1
24	0	0	0	0
25	-1	1	-1	1
26	1	1	-1	-1
27	1	1	-1	1
28	1.2	0	0	0
29	-1.2	0	0	0
30	0	0	0	0

Deney tasarımında yer alan deneyler gerçekleştirilerek yüzey gerilimlerinde sağlanan azalma miktarları belirlenmiştir (Tablo 4.17.). Deneylerde yüzey gerilimi azalma miktarları 17.31-29.31 mN/m aralığında değişim göstermiştir.

Tablo 4.17. Deneylerde hesaplanan yüzey geriliminde azalma miktarları

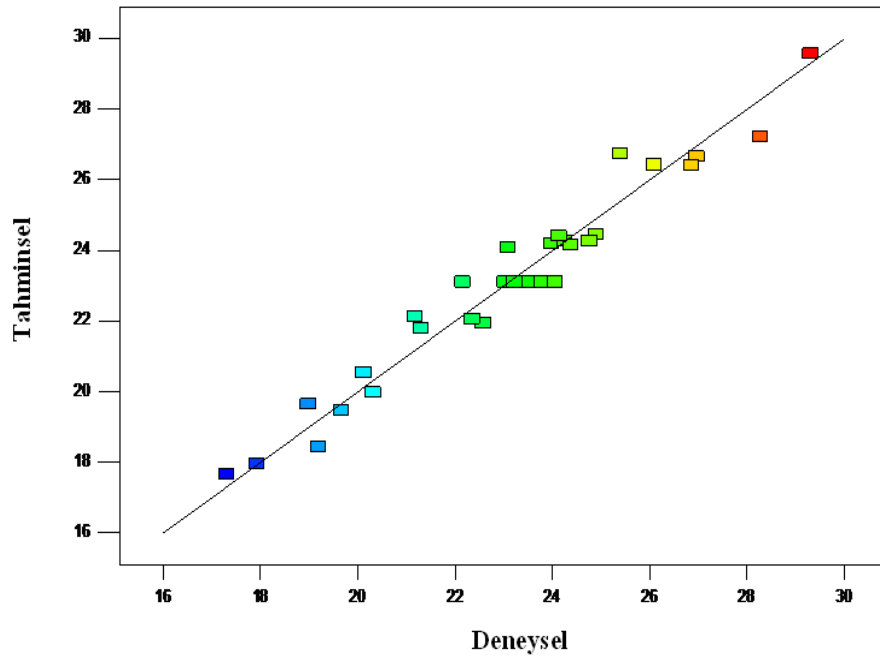
Deney no.	Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı (mN/m)
1	17.93
2	26.97
3	24.90
4	23.47
5	28.28
6	24.76
7	24.06
8	24.14
9	29.31
10	19.19
11	22.58
12	22.35
13	21.18
14	18.99
15	21.30
16	20.32
17	26.09
18	23.22
19	23.98
20	23.03
21	24.38
22	24.26
23	17.31
24	23.75
25	20.12
26	23.09
27	26.86
28	25.40
29	19.66
30	22.16

4.3.1 Bağımsız Değişkenlerin Yüzey Gerilimindeki Azalma Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı (Y) üzerine; glukoz (X_1), ayçiçek yağı (X_2), üre (X_3) ve maya özütü (X_4) derişimlerinin etkileri, Eşitlik (6) ile gösterilen 2FI model ile açıklanmıştır.

$$Y = +23.10 + 3.02X_1 + 0.98X_2 + 0.87X_3 + 1.08X_4 - 0.29X_1X_2 - 0.14X_1X_3 + 0.056X_1X_4 + 0.85X_2X_3 + 0.035X_2X_4 + 0.010X_3X_4 \quad (6)$$

Bu modelin varyans analizi sonuçları Tablo 4.18’de sunulmuştur. Eşitliğe göre türetilen model çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuş, modelin belirtme katsayısı, $R^2 = 0.958$ olarak elde edilmiştir. Bununla beraber “uyum eksikliği F değeri”nin %39.29 olasılık düzeyinde modele uyum sağlaması dolayısıyla modelin uyum eksikliğinin önemsiz ($P > 0.05$) olduğu ifade edilmiştir. Türetilen modele ait, deneysel değerlere karşı tahminsel değerleri gösteren grafik Şekil 4.8.’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Yüzey gerilimindeki azalma miktarı (Y) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.958$)

Yanıt olarak belirlenen yüzey geriliminde azalma miktarı üzerine, bağımsız değişkenlerin (X_1 , X_2 , X_3 ve X_4) lineer etkileri ve ayrıca ayçiçek yağı (X_2) ve üre (X_3) derişimleri parametrelerinin birbirleriyle etkileşimleri çok önemli bulunmuştur. Bu bağımsız değişkenlerin diğer ikili etkileşimlerinin önemsiz oldukları ise Tablo 4.18.'den görülmektedir.

Design Expert programının sağladığı bilgiler doğrultusunda, modele ait “düzeltilmiş R^2 ” ve “tahmini R^2 ” değerleri arasındaki farkın en fazla 0.2 olması gerektiği bilinmektedir. Bu doğrultuda tez çalışmasında oluşturulmuş olan modelin sırasıyla 0.936 ve 0.832 olarak verilen düzeltilmiş ve tahmini R^2 değerleri uygun düzeydedir. Ayrıca deney dizaynında yer alan bir sinyalin gürültüye oranını ölçen “yeterli kesinlik” katsayısının en az 4 olması gerektiği ifade edilmektedir. Bu kapsamda 26.463 olarak verilen bu katsayının uygun olduğu ifade edilebilir.

Şekil 4.9. - 4.14.'te yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri verilmiştir. Oluşturulan grafiklerde yer alan parametreler dışındaki bağımsız değişkenler için merkez noktalarındaki değerler kullanılmıştır.

Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve ayçiçek yağı derişiminin etkilerini açıklayan yanıt yüzey grafiği Şekil 4.9.'da verilmiştir. Grafiğe göre, ayçiçek yağının herhangi bir derişimi için glukoz derişimlerinin artırılması yanıtı oldukça olumlu yönde etkilemekte ve yüzey geriliminde yaklaşık 6 mN/m düzeyinde daha fazla azalma meydana gelmektedir. Bununla beraber herhangi bir glukoz derişimi kullanıldığında yağ derişiminin artmasına bağlı olarak yanıt değerinde daha sınırlı düzeyde de olsa artışların olduğu görülmektedir.

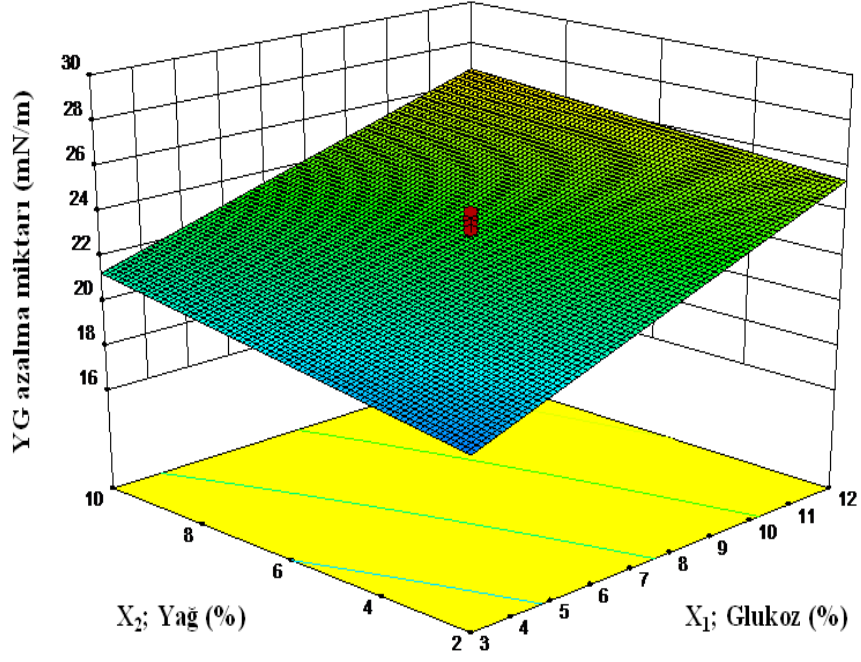
Glukoz ve üre derişimlerinin yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine etkisi Şekil 4.10.'daki grafikte verilmiştir. Genel olarak kullanılan herhangi bir üre derişimi için glukoz artırıldığında yüzey geriliminde daha fazla miktarda azalmanın sağlandığı, diğer bir deyişle yanıt değerinin iyi bir düzeyde arttığı görülmektedir. Özellikle ürenin daha düşük derişimlerinde bu artış daha belirgin şekilde gerçekleşmektedir. Ayrıca belirli bir glukoz derişiminde ürenin artırılmasıyla da yanıt değerinde yaklaşık 1.5-2 mN/m aralığında bir artış olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.18. Glukoz derişimi (X_1), ayçiçek yağı derişimi (X_2), üre derişimi (X_3) ve maya özütü derişiminin (X_4) yüzey geriliminde azalma miktarı (Y) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

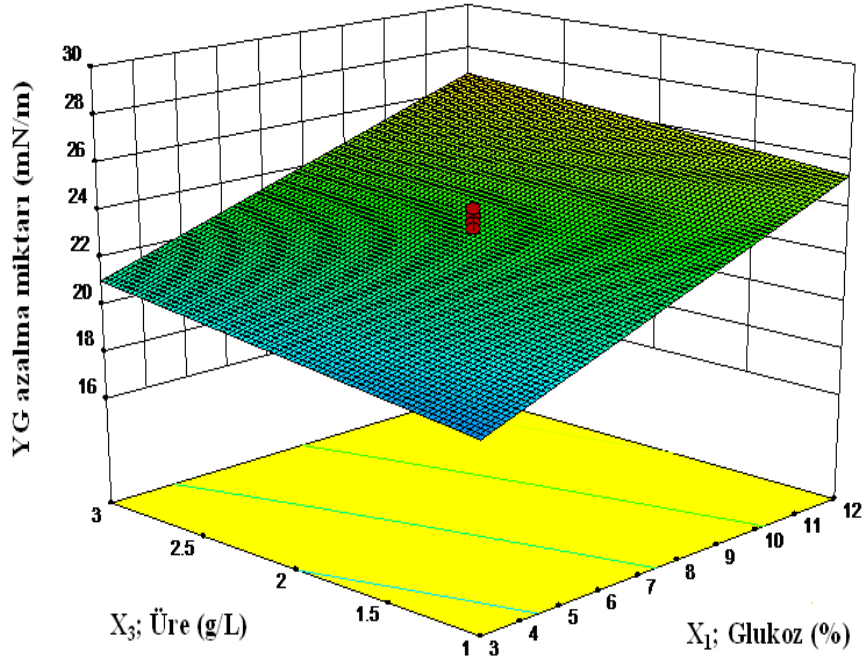
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model (Y)	240.12	10	24.01	43.56	< 0.0001	Önemli
X_1	172.50	1	172.50	312.93	< 0.0001	
X_2	17.96	1	17.96	32.59	< 0.0001	
X_3	14.17	1	14.17	25.70	< 0.0001	
X_4	22.19	1	22.19	40.25	< 0.0001	
X_1X_2	1.32	1	1.32	2.40	0.1379	
X_1X_3	0.31	1	0.31	0.57	0.4599	
X_1X_4	0.051	1	0.051	0.092	0.7651	
X_2X_3	11.59	1	11.59	21.03	0.0002	
X_2X_4	0.020	1	0.020	0.036	0.8524	
X_3X_4	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	2.903×10^{-3}	0.9576	
Artık	10.47	19	0.55			
Uyum eksikliği	8.29	14	0.59	1.35	0.3929	Önemli değil
Mutlak hata	2.19	5	0.44			
Cor Total	250.60	29				
Standart sapma		0.74		R^2		0.958
Ortalama		23.10		Düzeltilmiş R^2		0.936
Varyasyon katsayısı %		3.21		Tahmini R^2		0.832
*PRESS		42.10		Yeterli kesinlik		26.463

*Predicted Residual Sum of Squares (Tahmini Artık Kareler Toplamı)

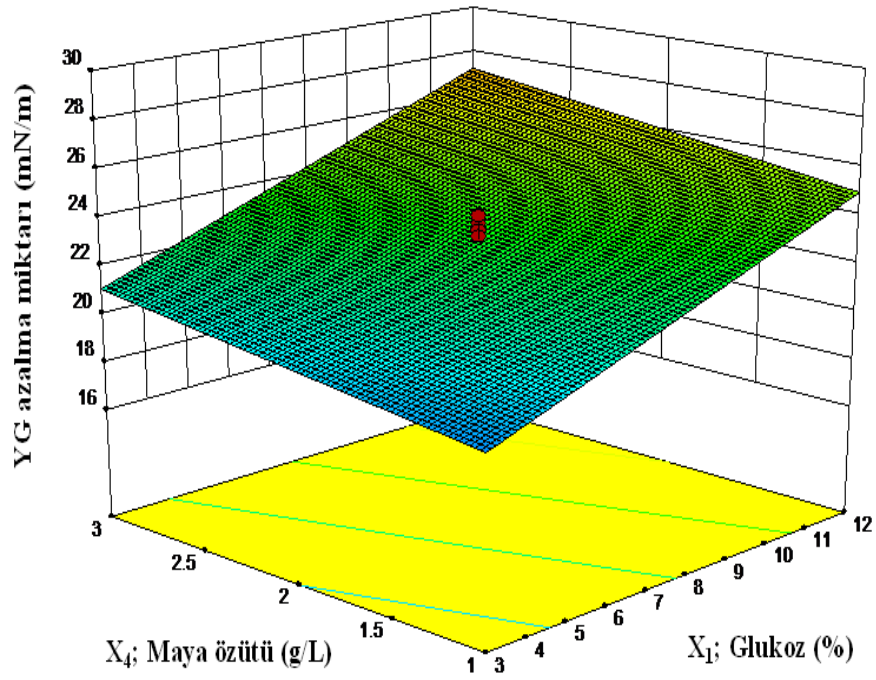
Glukoz ve maya özütü derişimlerinin yanıt değerine olan etkileri ise Şekil 4.11.'de sunulmuştur. Bu grafik genel olarak glukoz ve üre derişiminin birbiriyle etkileşimini gösteren grafik ile çok büyük ölçüde benzeşmektedir. Glukoz ve maya özütünün en yüksek derişimlerinin kullanıldığı koşullarda en iyi sonuçlara ulaşılmıştır. Glukozun herhangi bir derişiminde maya özütü derişiminin artırılmasıyla ise yüzey geriliminde yaklaşık 2 mN/m olarak daha yüksek miktarda azalma sağlandığı Şekil 4.11. üzerinden görülmektedir.



Şekil 4.9. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve ayçiçek yağı derişiminin etkileri ($X_3 = 2$ g/L; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)

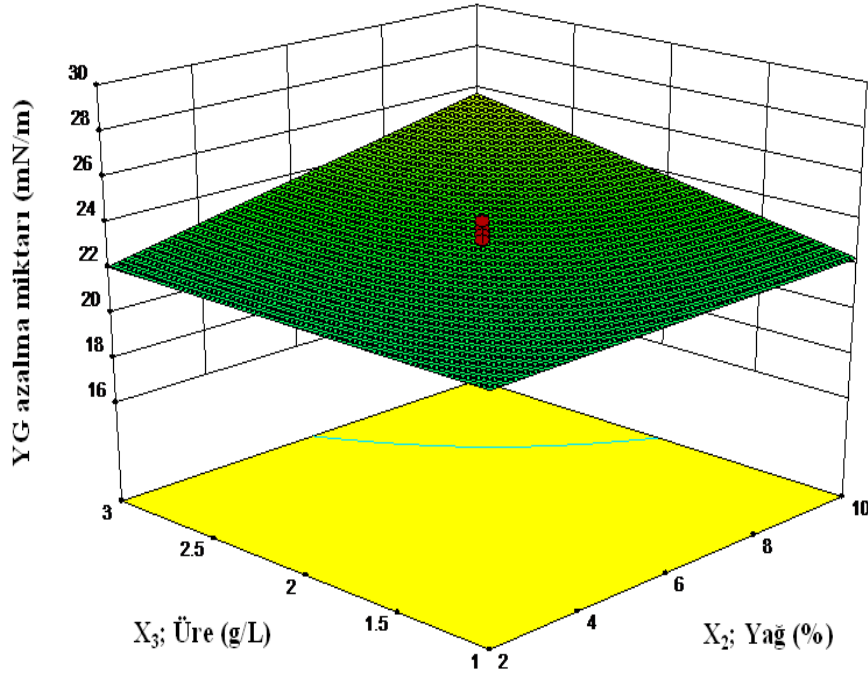


Şekil 4.10. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve üre derişiminin etkileri ($X_2 = \%6$; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)



Şekil 4.11. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine glukoz derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_2 = \%6$; $X_3 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)

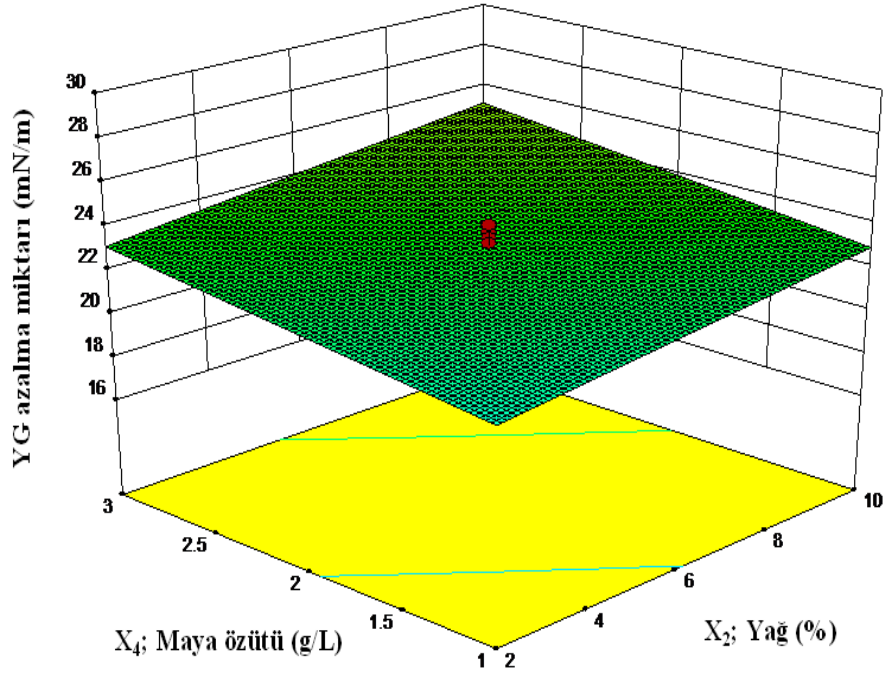
Ayçiçek yağı derişimi ve üre derişiminin yüzey geriliminde maksimum azalma miktarına etkileri Şekil 4.12.'de görölmektedir. Bu deneylerde 1 g/L olarak en düşük derişimde ürenin kullanıldığı koşullarda yağ derişiminin artırılması ile beraber yanıtın neredeyse değişmediği görölmektedir. Benzer bir şekilde yanıt değeri özellikle en düşük derişimde yağın kullanılması durumunda üre derişimi artışından neredeyse etkilenmemektedir. Deneylerde kullanılan yağ ve üre derişimlerinin artmasına bağlı olarak ise yüzey geriliminde sağlanan azalma miktarlarının da arttığı Şekil 4.12. üzerinden anlaşılmaktadır. Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre yağ ve üre derişiminin birbirleriyle etkileşiminin çok önemli ($P < 0.01$) bulunması bu durumu doğrulamaktadır.



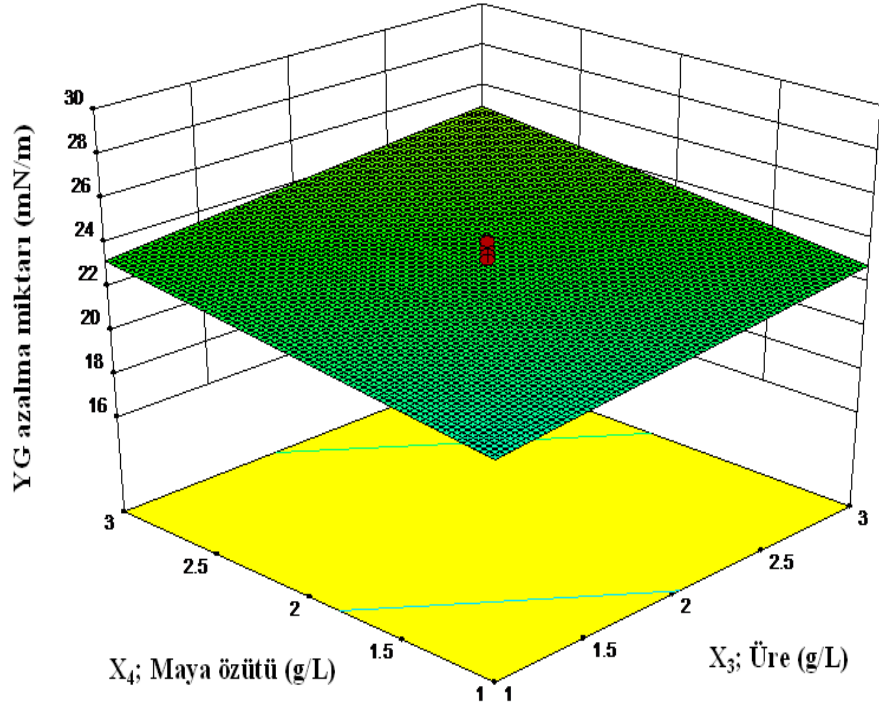
Şekil 4.12. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine ayçiçek yağı derişimi ve üre derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_4 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)

Ayçiçek yağı derişimi ve maya özütü derişiminin yanıt üzerine etkileri ise Şekil 4.13.'te gösterilmiştir. Çalışılan herhangi bir yağ derişimi için daha fazla maya özütü kullanılması, yüzey geriliminde azalma miktarının yaklaşık 2 mN/m düzeyinde artmasını sağlamıştır. Yanıt için en yüksek sonuçlara, yağ ve maya özütünün sırasıyla %10 ve 3 g/L olarak maksimum miktarlarda kullanıldığı koşullarda ulaşılmıştır.

Besiyeri bileşiminde yer alan azot kaynakları olan üre ve maya özütü derişimlerinin yüzey geriliminde maksimum azalma miktarına etkilerini gösteren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.14.'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan herhangi bir üre derişimi için maya özütünün 1 g/L artırılması yanıt değerinde de yaklaşık 1 mN/m düzeyinde bir artış olmasını sağlamıştır. Grafik incelendiğinde maya özütündeki artışın yüzey gerilimindeki azalmaya katkısının, üreye göre düşük bir miktar da olsa daha fazla olduğu ifade edilebilir. Genel olarak azot kaynaklarının derişimleri arttıkça yüzey gerilimi daha yüksek düzeylerde düşürülmüştür.



Şekil 4.13. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine ayçiçek yağı derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_3 = 2$ g/L; YG yüzey gerilimi)



Şekil 4.14. Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı üzerine üre derişimi ve maya özütü derişiminin etkileri ($X_1 = \%6$; $X_2 \%6$; YG yüzey gerilimi)

4.3.2 Fermantasyon Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu

Çalışma kapsamında kimyasal tanımlı fermantasyon ortamında yer alan bileşenler olan glukoz, ayçiçek yağı, üre ve maya özütünün optimum derişimlerinin belirlenebilmesi amacı ile nümerik optimizasyon yapılmış ve optimizasyon için “istenen hedefe ulaşma fonksiyonu” kullanılmıştır (EK 3).

Optimizasyon yapılırken yüzey geriliminde azalma miktarının maksimum olması hedeflenmiş ve ayrıca bağımsız değişkenler için de hedefler belirlenmiştir. Modelleme sırasında elde edilen veriler doğrultusunda glukoz derişimi %8-10, ayçiçek yağı derişimi %6-10, üre ve maya özütü derişimleri ise 1-3 g/L arasında kullanılmıştır. Yapılan optimizasyona ilişkin detaylar, Tablo 4.19’da sunulmuştur.

Tablo 4.19. Biyosüpfektan üretimi optimizasyonunda kullanılan değişkenler, belirlenen hedefler ve değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri

Değişken	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Glukoz derişimi (X_1 ; %)	Çalışılan aralıkta	8	10
Ayçiçek yağı derişimi (X_2 ; %)	Çalışılan aralıkta	6	10
Üre derişimi (X_3 ; g/L)	Çalışılan aralıkta	1	3
Maya özütü derişimi (X_4 ; g/L)	Çalışılan aralıkta	1	3
Yüzey geriliminde maksimum azalma miktarı (Y ; mN/m)	Maksimum	17.31	29.31

Belirlenen hedefler doğrultusunda, elde edilen 15 optimizasyon önerisi arasından istenen hedefe ulaşma fonksiyonun mümkün olduğunca yüksek olması (0.924) esas alınarak; glukoz derişiminin %10, ayçiçek yağı derişiminin %10, üre derişiminin 2.999 g/L ve maya özütü derişiminin 3 g/L olduğu koşullar optimum koşullar olarak belirlenmiştir (Tablo 4.20.). Bu koşullarda yüzey geriliminde azalma miktarının 28.395 mN/m olması öngörülmüştür.

Program tarafından verilen optimum koşullar altında bir deney daha yürütülmüş ve optimum koşullarda başlangıç yüzey gerilimi 64.65 mN/m olarak belirlenen ortamın yüzey geriliminde sağlanan azalma miktarı 28.25 mN/m olarak

hesaplanmıştır. Buna göre yapılan optimizasyon sonucunda öngörülen yanıt değerine oldukça büyük ölçüde ulaşılabildiği belirlenmiştir.

Tablo 4.20. Biyosüpfektan üretimi için belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için getirilen yaklaşımlar

X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (g/L)	X ₄ (g/L)	Y (mN/m)
10	10	2.999	3	28.395

4.3.3 Fermantasyon ortamı bileşimi derişimlerinin belirlenmesi çalışmalarının genel değerdendirme

Tez çalışmasında *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu aracılığıyla biyosüpfektanın üretildiği tanımlı fermantasyon ortamının optimizasyonu amacıyla yürütölen çalışmalar kapsamında glukoz ve ayçiçek yağının %10; maya özütü ve ürenin ise 3 g/L derişimlerinde kullanıldığı koşullarda besiyerinin yüzey geriliminde en yüksek 28.25 mN/m düzeyinde azalma sağlanmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde, fermantasyon ortamı bileşenlerinin optimize edilmesi için 30-120 g/L glukoz, 30-120 g/L kolza yağı ve 1-4 g/L maya özütünün biyosüpfektan üretimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada glukoz ve yağın 90 g/L, maya özütünün ise 1 g/L olarak kullanıldığı deneyde en yüksek miktarda biyosüpfektanın üretildiği rapor edilmiştir (8). Bir başka benzer çalışmada ise fırıncılık artık yağı (20-100 g/L) ve glukozun (50-150 g/L) optimum derişimlerinin sırasıyla 60 ve 100 g/L, maya özütünün ise 2.5 g/L olarak belirlendiği besiyeri bileşiminde *S. bombicola* aracılığıyla maksimum düzeyde üretimin sağlandığını bildirmiştir (7). Tez çalışmasında karbon ve azot bileşenleri için belirlenen optimum derişimlerin, genel olarak bu çalışmalarda verilen optimum karbon ve azot kaynağı derişimlerine benzer oldukları görölmektedir.

Literatürde ayrıca optimizasyon deneylerini içermemesine rağmen, tezde kullanılan fermantasyon ortamı bileşimi ve bulunan optimum derişimlerine yakın olan biyosüpfektan üretimi çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında hidrofilik ve hidrofobik karbon kaynaklarının yanı sıra azot kaynaklarını içeren fermantasyon ortamlarının bileşiminde 100 g/L glukoz, %10 yağ, 5 g/L maya özütü, 0.7 g/L pepton (72); 50 g/L glukoz, 50 g/L yağ, 5 g/L maya özütü, 5 g/L

amonyum nitrat (6); 100 g/L glukoz, 100 g/L yağ, 2.5 g/L maya özütü, 1 g/L üre (66); 100 g/L glukoz, 100 g/L palm yağı, 10 g/L maya özütü, 1 g/L üre (131); 77.50 g/L glukoz, 75 g/L tavuk yağı, 2.50 g/L maya özütü (74) kullanıldığı raporlanmıştır. Bazı çalışmalarda ise tezden farklı olarak fermantasyon ortamlarında sadece hidrofilik veya hidrofobik karbon kaynakları kullanılmış ve bu çalışmalarda optimum %2 palm yağı rafineri artığı (73); 46 g/L tavuk donyağı, 7 g/L maya özütü (84); %20 pirinç işleme artık suyu, %1.18 glutamik asit (101); 50 g/L sakkaroz, 5 g/L maya özütü (83) derişimleri önerilmiş olup bu çalışmalarda bulunan optimum sonuçların tezde elde edilen bulgulardan daha farklı olmaları söz konusudur.

Yukarıda verilen tüm bu çalışmalarda optimizasyon amacıyla biyosürefektan üretim miktarları esas alınmasına rağmen, tezde optimizasyon parametresi olarak yüzey geriliminin düşürülmesi sonuçları kullanılmıştır. Bununla beraber tez çalışmasına benzer nitelikte bazı çalışmalarda yüzey geriliminin düşürülmesi parametresi esas alınarak %6 hurma unu, %0.5 maya özütü (96); %10 portakal kabuğu ekstraktı (93) ve %7 biracılık artığı, 6.22 g/L amonyum nitratın (82) kullanıldığı koşullarda optimum düzeyde biyosürefektan üretiminin sağlandığı rapor edilmiştir.

4.4 Çeşitli Gıda Artıkları Kullanılarak Hazırlanan Besiyerlerinin *Cyb. fabianii* MIAU-1 Suşu ile Biyosürefektan Üretiminde Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında gıda artıklarından yararlanılarak hazırlanan bazı doğal fermantasyon ortamlarının *Cyb. fabianii* ile biyosürefektan üretimi amacıyla değerlendirilme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu kapsamda biyosürefektan üretimi deneyleri, zeytin karasuyu ve artık kızartma yağının yanı sıra *Cyb. fabianii* mayasının substrat kullanım profiline uygun olmaları bakımından (glukoz, fruktoz ve sakkarozu kullanabilmesi) çeşitli meyve ve sebze kabuklarından hazırlanan doğal besiyerleri kullanılarak yürütülmüştür.

4.4.1 Zeytin Karasuyu ve Artık Kızartma Yağı İçeren Besiyerlerinin Biyosürefektan Üretimi İçin Kullanımı

Tez çalışması kapsamında, zeytin karasuyundan yararlanılarak hazırlanan doğal besiyerleri *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile biyosürefektan üretimi için kullanılmıştır. Kimyasal tanımlı fermantasyon ortamlarında yürütülen deneyler

doğrultusunda besiyerlerinde karbon kaynağı olarak mutlaka bir yağ bulunması gerektiğinden, zeytin karasuyu bir başka gıda endüstrisi artığı olan artık kızartma yağı ile desteklenmiştir. Besiyerinde zeytin karasuyunun derişimi gerekli miktarlarda distile su ile seyreltilerek %10-90 aralığına ayarlanmış ve her bir besiyerine artık kızartma yağı (%10) eklenmiştir. Bu deneylerde elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerleri ve besiyerlerinin yüzey gerilimlerindeki maksimum azalma miktarları ve yüzdeleri Tablo 4.21.'de sunulmuştur.

Zeytin karasuyunun %10-70 derişimlerinde kullanıldığı deneylerde en düşük yüzey gerilimleri 33.03-35.03 mN/m aralığında değişen düzeylerde birbirlerine yakın bulunmuştur. Besiyerlerinin bileşiminde karasuyun daha yüksek derişimlerinin (%80-90) yer aldığı deneylerde ise yüzey gerilimlerinin bir miktar arttığı ve bu besiyerlerinde üretilen biyosüpfektanların sırasıyla 36.87 ve 37.88 mN/m düzeyinde en düşük yüzey gerilimlerine sahip oldukları görülmüştür. Yürütülen tüm deneylerde, genel olarak 48-72 saat süren fermentasyonun ardından en düşük yüzey gerilimi değerlerine ulaşılmıştır.

Tablo 4.21.'e göre, bu besiyerlerinde üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla yüzey gerilimlerinde 15.77-24.46 mN/m aralığında değişen maksimum düzeyde azalmalar sağlanmış ve en uygun besiyerinin seçilmesi aşamasında bu miktarlar esas alınmıştır. Bileşimlerinde %20-70 aralığındaki derişimlerde zeytin karasuyu bulunan besiyerlerinin yüzey gerilimindeki azalma miktarları 21.79-24.46 mN/m ve azalma yüzdeleri ise %38.35-42.21 olarak birbirlerine yakın bulunmuşlardır.

Fermentasyon ortamı olarak zeytin karasuyundan yararlanılan tüm üretim çalışmalarında en iyi sonuca %20 karasuyu ve %10 artık yağ içeren besiyerinde ulaşıldığı belirlenmiştir. Besiyeri bileşimlerinde %10, %80 ve %90 oranlarında karasuyun yer aldığı deneylerde ise, yüzey gerilimlerinin 15.77-17.48 mN/m olarak birbirlerine yakın ancak daha az miktarlarda ve yaklaşık %30-32 oranında düşürüldüğü belirlenmiştir. Genel olarak karasu derişiminin daha yüksek (%80-90) veya %10 olarak daha düşük bir düzeyde kullanılmasının yüzey geriliminde azalma miktarlarını bir miktar olumsuz etkilediği, %20-70 derişiminde karasu ve artık kızartma yağı (%10) bileşiminden oluşan besiyerlerinin ise *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi için etkin bir şekilde kullanılabildiği görülmüştür (Tablo 4.21.).

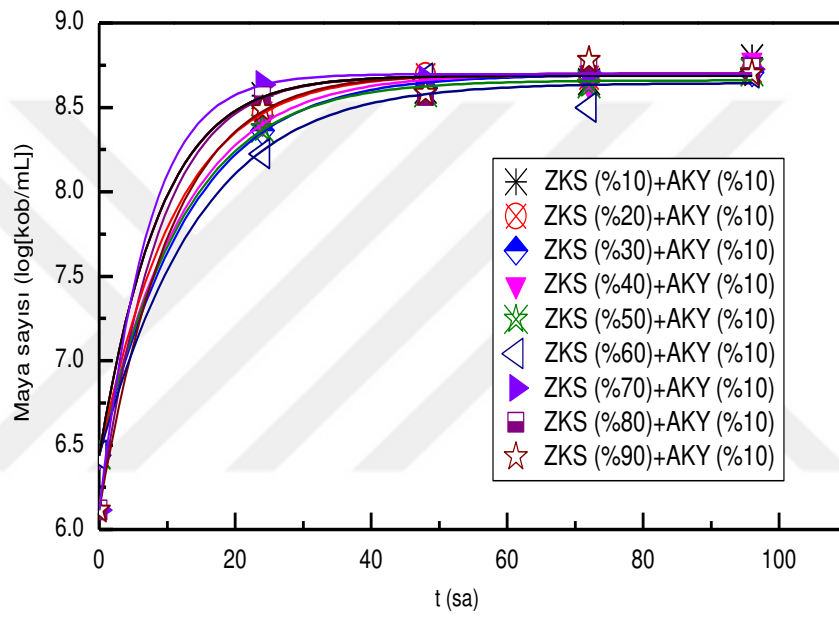
Tablo 4.21. Artık kızartma yağı (%10) ve farklı derişimlerde (%10-90) zeytin karasuyu içeren besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değışimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

Zaman (saat)	ZKS (%) + AKY (%)								
	10+10	20+10	30+10	40+10	50+10	60+10	70+10	80+10	90+10
	Yüzey gerilimleri (mN/m)								
0	48.88±0.02	57.95±0.03	57.02±0.08	56.82±0.04	56.23±0.05	56.88±0.06	56.40±0.04	54.35±0.00	54.40±0.06
24	34.98±0.06	38.89±0.00	37.60±0.01	38.52±0.06	35.69±0.00	36.67±0.06	37.37±0.01	38.56±0.12	40.19±0.01
48	33.11±0.02	33.49±0.03	33.57±0.01	46.46±0.09	33.91±0.05	44.45±0.04	38.46±0.01	36.87±0.04	37.88±0.04
72	42.69±0.02	34.88±0.07	52.87±0.00	35.03±0.04	48.41±0.06	33.84±0.01	33.03±0.04	39.89±0.05	38.38±0.01
96	39.71±0.04	38.45±0.04	46.41±0.07	51.85±0.06	52.68±0.03	52.49±0.09	49.19±0.06	50.92±0.14	51.43±0.08
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a , mN/m)									
	15.77	24.46	23.45	21.79	22.32	23.05	23.37	17.48	16.52
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)									
	32.26	42.21	41.13	38.35	39.69	40.52	41.44	32.16	30.37

(ZKS: Zeytin karasuyu; AKY: Artık kızartma yağı)

Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

Zeytin karasuyu (%10-90) ve artık yağ (%10) içeren besiyerlerinde maya sayılarının zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.15.'te verilmiştir. Çalışılan tüm besiyerlerinde maya sayısının yaklaşık 2.5 logaritmik birim düzeyinde arttığı belirlenmiştir. Genel olarak yüzey gerilimlerindeki azalma miktarının maksimum düzeyde olduğu zaman aralığında mayanın durgun üreme evresinde bulunduğu Şekil 4.15.'te görülmektedir. Bu doğrultuda bu ortamlarda üretilen biyosüpfektanların sekonder bir metabolit olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.15. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, zeytin karasuyu (%10-90) ve artık kızartma yağı (%10) içeren ortamlarda maya sayılarının zamanla değişimleri (ZKS zeytin karasuyu; AKY artık kızartma yağı)

Tez çalışması kapsamında *Cyb. fabianii* ile biyosüpfektan üretimi için zeytin karasuyunun artık kızartma yağı ile desteklenerek kullanıldığı besiyerlerinde yağın tamamen tüketilmediği görüldüğünden fermentasyon sonunda besiyerlerinde kalan yağ derişimleri belirlenmiştir (Tablo 4.22.). Genel olarak besiyeri bileşiminde kullanılan artık yağın yarısına yakını veya daha fazlasının tüketilmemesine rağmen karasu bazlı ortamlarda üretilen biyosüpfektanların yüzey gerilimlerini düşürme kapasitesi 15.77-24.46 mN/m aralığında değişen şekilde iyi düzeyde bulunmuştur. Teze benzer şekilde,

biyosüpfektan üretimi amacıyla artık kızartma yağı ve glukozun kullanıldığı bir çalışmada fermentasyon sonunda oldukça yüksek miktarda kalıntı yağın tespit edildiğı aktarılmıştır (66).

Tablo 4.22. Zeytin karasuyu (%10-90) ve artık kızartma yağından (%10) oluşan besiyerlerinde kalan yağ miktarları

Besiyeri	Kalan AKY miktarı (mL)
ZKS (%10)	5.85
ZKS (%20)	6.15
ZKS (%30)	4.73
ZKS (%40)	5.85
ZKS (%50)	4.78
ZKS (%60)	5.80
ZKS (%70)	5.70
ZKS (%80)	6.68
ZKS (%90)	6.35

(ZKS: Zeytin karasuyu; AKY: Artık kızartma yağı)

4.4.2 Bazı Meyve ve Sebze Artıkları ile Artık Kızartma Yağı İçeren Besiyerlerinin Biyosüpfektan Üretimi İçin Kullanımı

Tez çalışması kapsamında balkabağı, portakal ve limon kabukları ile kabuklu elma ve havucun kabuklu posaları ayrı ayrı kullanılarak ekstraktlar hazırlanmış ve artık kızartma yağı ile zenginleştirilen bu ekstraktların biyosüpfektan üretimi deneylerinde doğal fermentasyon ortamı olarak değerlendirilme kapasiteleri ortaya konmuştur. *Cyb. fabianii* MIAU-1 aracılığıyla biyosüpfektan üretiminde karbon kaynağı olarak mutlaka bir yağın kullanılması gerektiğinden ve bu kapsamda endüstriyel bir artıktan faydalanılması amacıyla her bir besiyerinde %10 oranında artık kızartma yağı kullanılmıştır. Ayrıca tez çalışması kapsamında besiyeri bileşiminde yalnızca rafine ayçiçek yağının kullanıldığı deneylerde biyosüpfektan üretimi gerçekleştirildiğinden, rafine yağ yerine artık kızartma yağından (%10 ve %20) tek başına yararlanılarak hazırlanan

besiyerlerinde de biyosüpfektan üretimleri incelenmiştir. Bu doğrultuda yürütölen deneylerin sonuçları, ekstrakt ve artık yağ birleşiminden oluşın fermentasyon ortamlarında yürütölen biyosüpfektan üretimi çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

Meyve ve sebze ekstraktı bazlı besiyerlerinde biyosüpfektan üretimi deneylerinde elde edilen en düşük yüzey gerilimi değeri ve besiyerlerinin yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarları ve yüzdeleri Tablo 4.23.'te sunulmuştur. Fermentasyon ortamı bileşeni olarak artık yağın yanı sıra ayrı ayrı balkabağı kabuğı ekstraktı (BKE), kabuklu elma posası ekstraktı (KEPE), kabuklu havuç posası ekstraktı (KHPE), limon kabuğı ekstraktı (LKE) ve portakal kabuğı ekstraktının (PKE) kullanıldığı tüm deneylerde belirlenen en düşük yüzey gerilimi değeri 28.55-31.85 mN/m aralığında değışim gösteren şekilde birbirlerine yakındır. Biyosüpfektan üretimi deneylerinde genel olarak yaklaşık 72 saat sürenin ardından, besiyerlerinin en düşük yüzey gerilimlerine ulaşılmış, ancak yalnızca kabuklu elma posası ekstraktı bazlı ortam için bu süre 96 saate kadar uzamıştır. Karbon kaynağı olarak artık yağın tek başına kullanıldığı çalışmalarda ise 24 saat sürenin ardından en düşük yüzey gerilimleri yaklaşık 32.5 mN/m olarak bulunmuştur.

Besiyerlerinin yüzey gerilimindeki azalma miktarları esas alındığında ise, kabuklu elma posası ve limon kabuğı ekstraktı bazlı ortamlarda üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla yüzey gerilimlerinin 20.09-20.99 mN/m olarak birbirine yakın ve maksimum miktarlarda ve % 39.57-39.78 oranında düşürüldüğü bulunmuştur. Ayrıca balkabağı kabuğı, kabuklu havuç posası ve portakal kabuğı ekstraktlarını içeren besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde 15.72-16.94 mN/m aralığında değışen düzeylerde ve %34.32-37.10 oranında azalmalar sağlanmıştır.

Tablo 4.23.'te verildiğı üzere tek başına %10 ve 20 oranında artık kızartma yağı bulunan besiyerlerinde gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi çalışmalarda, besiyeri yüzey gerilimleri sırasıyla 24.75 ve 23.16 mN/m olarak maksimum düzeyde ve %43.25-41.60 oranında düşürölmüştür. Tüm deneyler bir arada değeriendirildiğinde yüzey gerilimlerinin maksimum düzeylerde düşürölmesi bakımından, tek başına artık yağ içeren ortamların daha üstün olduğı ve ardından kabuklu elma posası ve limon kabuğı ekstraktlarının iyi sonuçlar vermiş olduğı görölmüştür.

Tablo 4.23. Artık kızartma yağı (%10) ve çeşitli gıda artıkları kullanılarak hazırlanan besiyerleri ile artık kızartma yağı (%10 ve 20) ve distile su içeren besiyerlerinde, *Cyb. fabianii* suşu ile elde edilen yüzey gerilimi değerlerinin zamanla değişimleri, yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı ve yüzdeleri ile bu azalmanın görüldüğü saatler

	BKE + AKY (%10)	KEPE + AKY (%10)	KHPE + AKY (%10)	LKE + AKY (%10)	PKE + AKY (%10)	AKY (%10)	AKY (%20)
Zaman (saat)							
0	45.39± 0.05	52.77± 0.10	45.80± 0.02	50.77±0.04	48.79±0.00	57.23±0.01	55.67±0.01
24	30.44± 0.05	49.69± 0.08	35.83± 0.13	42.35±0.08	35.16±0.01	32.48±0.00	32.51±0.05
48	33.63±0.00	45.10± 0.04	34.73± 0.02	32.82±0.06	42.04±0.06	33.96±0.04	36.95±0.07
72	28.55± 0.01	36.62± 0.05	30.08± 0.01	30.68±0.01	31.85±0.00	34.34±0.05	36.06±0.05
96	32.25± 0.06	31.79± 0.13	31.60± 0.05	32.90±0.07	32.55±0.07	42.59±0.05	41.55±0.11
120	34.78±0.12	39.92±0.08	36.13±0.11	33.18±0.05	38.01±0.06	35.46±0.10	34.77±0.04
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma miktarı (YG _a , mN/m)							
	16.84	20.99	15.72	20.09	16.94	24.75	23.16
Yüzey gerilimindeki maksimum azalma yüzdesi (%)							
	37.10	39.78	34.32	39.57	34.72	43.25	41.60

(BKE: Balkabağı kabuğu ekstraktı; KEPE: Kabuklu elma posası ekstraktı; KHPE: Kabuklu havuç posası ekstraktı; LKE: Limon kabuğu ekstraktı; PKE: Portakal kabuğu ekstraktı; AKY: Artık kızartma yağı)

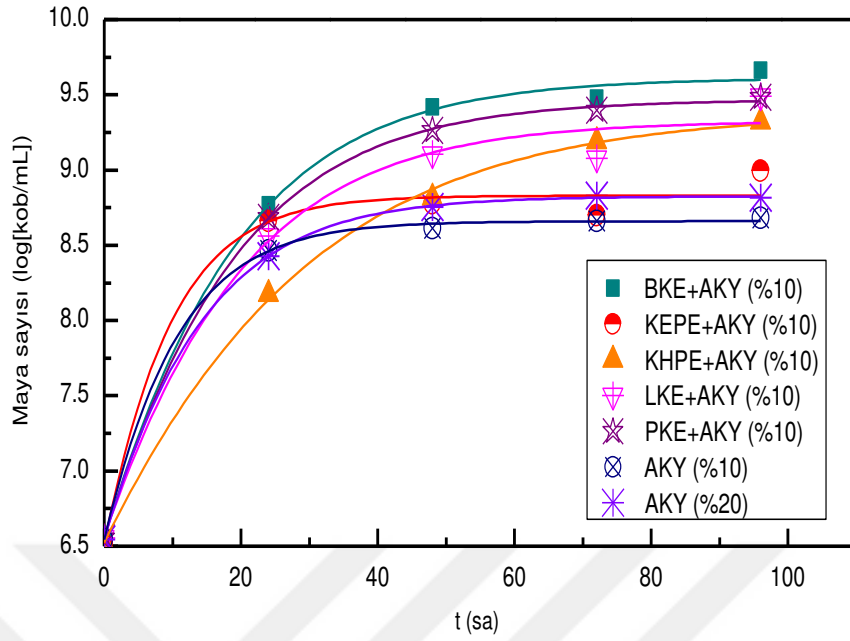
Koyu renk ile işaretli olanlar, besiyerlerine ait yüzey gerilimi değerlerini ve her bir besiyeri için elde edilen en düşük yüzey gerilimi değerlerini ifade etmektedir.

Bazı meyvelerden ve sebzeden hazırlanan ekstraktlar ile artık kızartma yağı içeren veya tek başına %10 ve 20 derişimlerinde artık yağdan oluşan besiyerlerinde maya sayılarının zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. Balkabağı kabuğu ekstraktı içeren fermantasyon ortamında maya sayısı yaklaşık 3 logaritmik birim artış göstermiş olup ayrıca portakal kabuğu, limon kabuğu ve kabuklu havuç posası ekstraktlarından oluşan ortamlarda maya sayısının maksimuma yakın düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bununla beraber kabuklu elma posası ekstraktı bazlı besiyerinde ve ayrıca tek başına artık kızartma yağı içeren besiyerlerinde maya sayısındaki artışın yaklaşık 2 logaritmik birim olarak daha düşük bir düzeyde kaldığı görülmektedir.

Gıda artıkları kullanılarak hazırlanan ekstrakt bazlı besiyerlerinde yüzey gerilimleri fermantasyonun 72-96 saat sonrasında maksimum düzeyde azaltılmış olup bu sürede maya durgun üreme evresindedir. Ayrıca bu artıklar içerisinde artık kızartma yağının tek başına kullanıldığı koşullarda, besiyerlerinin yüzey geriliminin maksimum düzeyde düşürüldüğü 24 saat süre içerisinde mayanın logaritmik üreme evresinin sonunda bulunduğu görülmüştür (bkz. Tablo 4.23.).

Biyosüpfektan üretimi için bazı meyve ve sebze ekstraktı (kabuk ve kabuklu posalar) bazlı besiyerlerinden yararlanılan çalışmalar kapsamında, besiyerlerindeki başlangıç sakkaroz, fruktoz ve glukoz derişimleri ve ayrıca bu şekerlerin fermantasyon sonunda besiyerlerinde kalan derişimleri belirlenmiştir (Tablo 4.24.). Tüm sonuçlar incelendiğinde kabuklu elma posası ekstraktının toplam şeker miktarı bakımından oldukça zengin olduğu görülmüş ve bu ekstraktın artık kızartma yağı (%10) ile bir arada kullanıldığı deneyde, yüzey gerilimi maksimum düzeyde düşürülerek en iyi sonuca ulaşılmıştır. Diğer yandan, örneğin balkabağı ve portakal kabuğu ekstraktlarında olduğu gibi başlangıçta farklı derişimlerde glukoz, fruktoz ve sakkaroz şekerlerini içeren besiyerlerinde üretilen biyosüpfektanların yüzey gerilimini düşürme kapasitelerinin birbirlerine yakın olduğu da tespit edilmiştir (bkz. Tablo 4.23.).

Bu çalışma kapsamında ayrıca, genel olarak meyve ve sebze ekstraktlarındaki sakkaroz, fruktoz ve glukozun tamamına yakınının *Cyb. fabianii* mayası tarafından kullanıldığı Tablo 4.24.te görülmektedir.



Şekil 4.16. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu için, farklı meyve ve sebze artıkları ile hazırlanan ekstraktlara ek olarak veya tek başına artık kızartma yağının (%10) içeren ortamlarda maya sayılarının zamanla değişimleri (BKE, balkabağı kabuğu ekstraktı; KEPE, kabuklu elma posası ekstraktı; KHPE, kabuklu havuç posası ekstraktı; LKE, limon kabuğu ekstraktı; PKE, portakal kabuğu ekstraktı; AKY, artık kızartma yağı)

Tablo 4.24. Meyve ve sebze ekstraktı bazlı besiyerlerinin başlangıç ve fermantasyon sonunda besiyerlerinde kalan şeker derişimleri

Besiyeri	Başlangıç sakkaroz - fruktoz - glukoz derişimleri (g/L)	Fermantasyon sonu sakkaroz - fruktoz - glukoz derişimleri (g/L)
BKE	8.81 - 4.68 - 4.22	0.06- 0.01 - 0.03
KEPE	52.86 - 44.30 - 22.45	0.02 - 0.02 - 0.03
KHPE	25.38 - 2.37 - 1.94	0.1 - 0.00 - 0.05
LKE	13.28 - 8.23 - 6.64	0.49 - 0.01 - 0.27
PKE	28.01 - 10.26 - 9.13	4.52 - 0.03 - 0.27

(BKE: Balkabağı kabuğu ekstraktı; KEPE: Kabuklu elma posası ekstraktı; KHPE: Kabuklu havuç posası ekstraktı; LKE: Limon kabuğu ekstraktı; PKE: Portakal kabuğu ekstraktı)

Deneyler sırasında artık bazlı besiyerlerinin bileşiminde %10 oranında yer alan ve ayrıca tek başına %10 ve 20 derişimde kullanılan artık kızartma yağının belirli bir kısmının kullanılmadığı görülmüştür. Bu nedenle besiyerlerindeki kalıntı yağ miktarları belirlenerek sonuçları Tablo 4.25.'te sunulmuştur.

Genel olarak meyve ve sebze ekstraktı bazlı besiyerlerinde fermentasyon sonunda kalan yağ miktarının, yalnızca artık yağ içeren ortamlardaki kalıntı yağa göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Buna rağmen artık yağ bazlı besiyerlerinde üretilen biyosüpfektan ile besiyerinin yüzey gerilimleri en yüksek düzeyde düşürülmüştür.

Tablo 4.25. Meyve ve sebze ekstraktı bazlı ve yalnızca artık kızartma yağından oluşan besiyerlerinde kalan yağ derişimleri

Besiyeri	Kalan AKY miktarı (mL)
BKE + %10 AKY	0.92
KEPE + %10 AKY	4.99
KHPE + %10 AKY	2.98
LKE + %10 AKY	1.45
PKE + %10 AKY	1.90
%10 AKY	6.35
%20 AKY	14.56

(BKE: Balkabağı kabuğı ekstraktı; KEPE: Kabuklu elma posası ekstraktı; KHPE: Kabuklu havuç posası ekstraktı; LKE: Limon kabuğı ekstraktı; PKE: Portakal kabuğı ekstraktı; AKY: Artık kızartma yağı)

4.4.3 Bazı Gıda Artıklarından Hazırlanan Besiyerlerinde Gerçekleştirilen Çalışmaların Genel Değerlendirmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında zeytin karasuyu, artık kızartma yağı, meyve ve sebze artıklarının (kabuk ve kabuklu posaları) biyosüpfektan üretimlerinde besiyeri olarak değerlendirilme potansiyelleri araştırılmıştır. Tanımlı fermentasyon ortamlarında yürütölen deneylerde elde edilen veriler

doğrultusunda tüm besiyeri bileşimlerinde mutlaka artık yağ kullanılmıştır. Ayrıca artık yağı tek başına içeren iki farklı besiyerinde de çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak yüzey geriliminin düşürülmesi bakımından en olumlu ve birbirine yakın sonuçlara, biyosüpfektan üretimi için %20 oranında zeytin karasuyu ve artık yağ (%10) bileşiminden oluşan ve ayrıca tek başına %10 artık yağ içeren besiyerlerinin kullanıldığı koşullarda ulaşılmıştır. Bu koşullarda iki farklı gıda artığının bir arada değerlendirilmesi açısından, biyosüpfektan üretimi çalışmalarına zeytin karasuyu ve artık yağ içeren ortamda devam edilmesi uygun bulunmuştur. Ancak genel olarak gıda endüstrisinde açığa çıkan bazı artıklardan hazırlanan tüm bu fermantasyon ortamları çevre dostu, ekonomik ve ayrıca genel anlamda kimyasal tanımlı ortamlara kuvvetli birer alternatif olarak ön plana çıkmışlardır.

Bu tez çalışmasında zeytin karasuyu içeren besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde 15.77-24.46 mN/m aralığında değişen miktarlarda azalmalar sağlanmıştır. Bu kapsamda sırasıyla %10 ve 20 oranlarında karasudan oluşan ortamlarda üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla besiyeri yüzey gerilimleri minimum (15.77 mN/m) ve maksimum (24.46 mN/m) düzeylerde düşürülmüştür. Ayrıca %30-70 karasu içeren ortamlarda üretilen biyosüpfektanlar aracılığıyla yüzey gerilimlerinin 21.79-23.45 mN/m aralığında maksimuma yakın şekilde düşürüldüğü bulunmuştur. Bu koşulların kimyasal tanımlı optimum fermantasyon ortamı yüzey geriliminin 28.25 mN/m düzeyinde azaltıldığı sonucuna daha yakın olması dolayısıyla, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi için zeytin karasuyu (%20-70) ve artık yağ (%10) bileşiminden başarıyla yararlanılabileceği ortaya konmuştur.

Literatürde zeytin karasuyu içeren fermantasyon ortamlarının biyosüpfektan üretimine etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (13,15,27,153). Derguine-Mecheri ve ark. (13) tarafından *Rhodotorula sp.* kaynaklı biyosüpfektan üretiminin %2 başlangıç karbonhidrat oranına seyreltilmiş zeytin karasuyunda gerçekleştirildiği çalışmada, bu biyosüpfektan aracılığıyla ortamın ve suyun yüzey gerilimlerinin sırasıyla 35 mN/m ve 30.16 mN/m düzeylerine düşürüldüğü rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise zeytin karasuyunun %50, 80 ve 100 olarak kullanıldığı tüm derişimlerinde *Cryptococcus* mayası aracılığıyla üretilen biyosüpfektanın bu ortamların yüzey gerilimini yaklaşık 40 mN/m'ye düşürdüğü bildirilmiştir (15). Bu çalışmalardan farklı olarak

ise tezde zeytin karasuyunun (%10-90) artık kızartma yağı (%10) yağı ile desteklenerek kullanılması ve bu koşullarda *Cyb. fabianii* suşu ile üretilen biyosüpfektanların, besiyeri yüzey gerilimlerini literatürden daha düşük olarak 33.03-37.88 mN/m aralığındaki değerlere düşürmesi söz konusudur. Ayrıca yüzey gerilimi parametresi yerine biyosüpfektan üretim miktarlarının esas alındığı bir çalışmada ise, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* suşlarının zeytin karasuyunun %2 ve 10 derişimlerinde kullanıldığı koşullarda sırasıyla en yüksek miktarlarda biyosüpfektanın üretildiğı aktarılmıştır (153). Başka bir çalışmada ise, çalışılan maya suşlarının ise zeytin karasuyu içeren ortamlarda biyosüpfektan üretmediğı bildirilmiştir (27).

Literatürde meyve ve sebze kabuklarını içeren bazı gıda endüstrisi artıklarından yararlanılarak oluşturulan fermantasyon ortamlarının biyosüpfektan üretimi amacıyla değerlendirildiğı çalışmalar bulunmaktadır (76,80,93,94,98). Genel olarak verilen tüm bu çalışmalarda biyosüpfektan üreticisi mikroorganizma olarak bakteriler kullanılmıştır. Tez çalışmasında ise; maya kaynaklı biyosüpfektanın üretimi için bu artıkların fermantasyon ortamı olarak değerlendirilmesi potansiyelleri araştırılmıştır. Bu tez kapsamında meyve ve sebze artıklarından hazırlanan besiyerlerinde yüzey gerilimleri 15.72-20.99 mN/m düzeylerinde düşürülmüştür.

Bakteri kaynaklı biyosüpfektanın üretimi çalışmasında farklı miktarlarda patates kabuğı tozu ve şeker pancarı küspesi tozunun ayrı ayrı kullanıldığı deneylerde yüzey gerilimleri sırasıyla 35.33-39.33 mN/m ve 31.66-37.77 mN/m düzeylerine düşürülmüştür. Aynı çalışmada bu iki tozun bir arada kullanımı ile yüzey geriliminin minimum 30.66 mN/m değerine düşürüldüğü bildirilmiştir (76). Benzer çalışmalarda %20 muz kabuğı tozu içeren fermantasyon ortamında üretilen bakteriyel bir biyosüpfektan kullanılarak besiyerinin yüzey geriliminin 30 mN/m düzeyine düşürüldüğü (98), ananas kabuğunun asit hidrolizatının besiyeri olarak kullanıldığı koşullarda ise bakteri kaynaklı bir biyosüpfektanın ortam yüzey gerilimini 45 mN/m'ye düşürdüğü (80) rapor edilmiştir. Ayrıca besiyeri olarak %6 yaş portakal kabuğı içeren ekstrakt kullanıldığında ortam yüzey geriliminin 33.04 mN/m düzeyine düşürüldüğü (93), ananas kabukları kullanılarak hazırlanan kabuk suyunun biyosüpfektan üretimi amacıyla değerlendirildiğı çalışmada ise %14.67 kabuk suyu içeren besiyerinin yüzey geriliminde en yüksek %57.74 oranında azalma sağlandığı bildirilmiştir (94).

Literatürde verilen çalışmalarda artıklardan çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanan karışım, hidrolizat veya ekstraktlardan tek başına karbon kaynağı olarak yararlanıldığı görülmektedir. Tez çalışmasında ise öncelikle literatürden farklı olarak portakal ve limon kabuğu tozları (%10), balkabağı kabuğu ve ayrıca elma ve havucun kabuklu posalarının (%80) sıcak su ekstraktları hazırlanmış olup tanımlı fermantasyon ortamlarında yürütülen deneyler kapsamında *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi için substrat olarak yağ kullanımının zorunluluğu daha önce belirlenmiş olduğundan, tüm bu ekstraktlar artık kızartma yağından (%10) yararlanılarak desteklenmiştir. Ayrıca bu artık bazlı ortamların bileşiminde farklı azot kaynaklarının da kullanıldığı bazı çalışmalar (76,98) bulunmasına rağmen, tez çalışmasında herhangi bir azot kaynağı takviyesi yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır. Bu çalışmada, artık bazlı ortamlarda üretilen maya kaynaklı biyosüpfektanların aracılığıyla besiyerlerinin yüzey gerilimleri 28.55-31.85 mN/m düzeylerine düşürülmüş olup bu sonuçların genel olarak literatürle oldukça uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında ayrıca %10 ve 20 artık yağı tek başına içeren besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde sırasıyla 24.75 ve 23.16 mN/m miktarlarında azalma sağlanmış olup bu değerlerin meyve ve sebze ekstraktı bazlı ortamlara göre genel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu artık yağ bazlı besiyerlerinde yüzey gerilimleri ise birbirlerine oldukça yakın şekilde yaklaşık 32.50 mN/m'ye düşürülmüştür. Bakteriyel biyosüpfektanların üretimi amacıyla artık kızartma yağlarının kullanıldığı çalışmalarda, tüm bu besiyerlerinin yüzey geriliminin birbirlerine yakın olarak yaklaşık 35 mN/m düzeyine düşürüldüğü rapor edilmiştir (69,70). Başka bir çalışmada maya kaynaklı bir biyosüpfektanın üretimi için kesimhane artığı olan tavuk don yağından yararlanılmış ve optimum 46 g/L yağ içeren ortamın yüzey gerilimi 37 mN/m'ye düşürülmüştür (84). Genel olarak tüm bu sonuçlar tez çalışmasında ulaşılan yüzey gerilimi değerleri ile benzerlik göstermektedir.

4.5 Biyosüpfektan Üretimnin Fermentörde Gerçekleştirilmesi

Fermentör ortamında biyosüpfektan üretimi için üretim parametrelerinin belirlenmesi amacıyla, literatürden yararlanılarak bazı ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir (8,66,135). Bu doğrultuda karıştırma hızı (400, 600 ve 800 rpm) ve havalandırma miktarı (0.5, 0.75 ve 1 L/dak) için kombinasyonlar oluşturulmuş ve besiyeri yüzey gerilimini maksimum düzeyde düşüren parametrelerin belirlenmesi planlanmıştır. Öncelikle, orta hızdaki bir karıştırma hızı ve en düşük havalandırma miktarının etkisini inceleyebilmek için sırasıyla 600 rpm ve 0.5 L/dak değerlerinin kullanıldığı bir deney kurulmuştur. Bu deneyde literatürden ve bilinen maya üremesi koşullarından faydalanılarak besiyeri pH'ı yaklaşık 30 saat için 4'e sabitlenmiş ve daha sonra 4.8'e yükseltilmiştir. Tüm bu koşulların biyosüpfektan üretimi üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi için, deney kapsamında yaklaşık 12 saat ara ile aseptik koşullarda alınan örnekler için maya üremesi belirlenmiş ve yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Fermentör koşullarında mayanın ürettiği ve biyosüpfektan üretiminin de gerçekleştiği görsel olarak belirlenmiş olmakla beraber, yüzey gerilimi sonuçları erlenlerde yürütülen daha önceki çalışmalara göre daha yüksek kalmıştır. Erlen boyutunda gerçekleştirilen çalışmalarda optimum koşullarda üretilen biyosüpfektan besiyeri yüzey gerilimini 36.50 mN/m'ye kadar düşürmüş (bkz. Bölüm 4.3.3.) ancak, yüzey gerilimi takibi için fermentör örnek alma ünitesinden alınan örneklerde yüzey gerilimleri 47-50 mN/m aralığında ölçülmüştür. Bu etkinin; fermentörün örnek alma düzeneğinin, örneği fermentör kabının dip kısmından alacak şekilde dizayn edilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Üretilen biyosüpfektan, yapısı gereği köpürme ve kabin çeperlerine tırmanma eğiliminde olduğundan, fermantasyon sırasında homojen şekilde örnek almak mümkün olmamıştır. Bu nedenle, fermentör deneylerinde yüzey gerilimi ölçümleri yerine, fermantasyon sonundaki biyosüpfektan veriminin belirlenmesinin daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır. Literatürde de fermentör ile yürütülen çalışmaların bir kısmında yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmeden sadece üretim veriminin hesaplandığı görülmektedir (6,135).

Yukarıda verilen üretim koşullarında, fermantasyonun 48. saati ve devamında fermentör kabının çeperlerinde yükselerek gerçekleşen yoğun üretimin devam ettiğinin gözlemlenmesi nedeniyle (Fotoğraf 4.4.), fermantasyon 48 saatte sonlandırılmış ve biyosüpfektanın ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu aşamada,

ekstraksiyonda deney sonuçlarının etkilenmesinin engellenmesi için herhangi bir köpük kırıcı yüzey aktif ajan da kullanılamamıştır. Çünkü köpük kırıcılar da sürfektan özellik göstermektedir. Bu koşullarda, daha yüksek karıştırma hızı ve havalandırma uygulanmasının üretim esnasında problemlere yol açabileceği düşünülmüştür.



Fotoğraf 4.4. Fermentör ortamında *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile biyosürfektan üretiminde fermantasyon sonuna (48 saat) ait örnek bir görüntü

Yürütülen bir başka deneyde ise, fermentördeki havalandırma miktarı sabit tutulmak kaydıyla biyosürfektan üretimi 400 rpm olarak daha düşük bir karıştırma hızında çalışılmış ve düşük karıştırma hızının biyosürfektan üretimini olumlu veya olumsuz yönde nasıl etkileyeceği araştırılmıştır. Ancak düşük bir karıştırma hızı ile çalışıldığında maya üremesinin fermantasyonun 18-24 saatinde gecikmesi veya durmasından dolayı fermentör içerisindeki havanın kullanılamadığı ve buna bağlı olarak fermentörde gaz basıncı artışı problemi yaşandığı tespit edilmiştir. Tüm bu nedenlerle biyosürfektan üretimlerinin tanımlı ve gıda artığı bazlı besiyerleri kullanılarak fermentörde yürütülmesi aşamalarında 600 rpm karıştırma hızı ve 0.5 L/dak havalandırma miktarı ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Literatürde biyosüpfektan üretiminin fermentör ortamında gerçekleştirildiği çalışmalar incelendiğinde karıştırma hızı ve havalandırma miktarı için sırasıyla 225 rpm, 1 L/dk (81); 250 rpm, 0.5-1.5 L/dk (92); 300 rpm, 0.5 L/dk (83); 400 rpm, 0.5 L/dk (66); 450 rpm, 1 L/dk (37); 550 rpm, 1 L/dk (136) ve 600 rpm, 1 L/dk (8) parametrelerinin kullanıldığı görülmekte olup bu değerler genel olarak tezde kullanılan karıştırma hızı (600 rpm) ve havalandırma miktarı (0.5 vvm) parametreleri ile uyum içerisinde. Bununla beraber tezdin farklı olarak, fermentördeki çözünmüş oksijen derişiminin %30 olması için karıştırma hızının 200-1000 rpm değiştirildiği (6) ve karıştırma hızının 120 rpm değerine sabitlenerek %50 çözünmüş oksijen derişiminin sağlandığı (95) bazı çalışmalar raporlanmıştır. Tezde ayrıca başka bir üretim parametresi olan pH yaklaşık 30 saat süresince 4'te tutulmuş ve ardından 4.8'e yükseltilmiştir. Literatürde ise fermentasyon ortamlarının pH değerinin 2 (6), 3.5 (37,72,136), 6 (8) ve 7 (81,83) olarak sabitlendiği ve ayrıca ortam başlangıç pH'ının 6.5 olarak ayarlanıp üretim süresince kontrol edilmediği (66) bazı çalışmaların yer aldığı görülmektedir. Tüm bu fermentasyon çalışmalarında üretimin 12 (12) ve 288 (37,72) saat olarak oldukça farklı sürelerde tamamlandığını aktaran çalışmalar bulunmakta olup, tezde fermentör ortamında biyosüpfektan üretimi Hu ve ark. (95) tarafından da bildirildiği üzere 48 saat süresince gerçekleştirilmiştir.

4.6 Tanımlı ve Gıda Artığı Bazlı Besiyerleri Kullanılarak Üretilen Biyosüpfektanların Ekstraksiyonu ve Miktarlarının Belirlenmesi

Fermentörde biyosüpfektan üretiminin gerçekleştirilmesinin ardından biyosüpfektan ekstraksiyonu çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle ekstraksiyon için literatürde yaygın olarak uygulanan biyosüpfektan çözeltisinin 6 N HCl çözeltisi ile pH 2'ye asitlendirilerek bir gece boyunca 4°C buzdolabı koşullarında bekletilmesi, diklorometan ile ayırma hunisinde ekstraksiyonu ve ekstraktın bir rotary evaporatör aracılığıyla çözücüsünden uzaklaştırılması ve kurutulması aşamaları denenmiştir (11,13). Ancak, tez çalışmasında üretilen biyosüpfektanların asitlendirme işlemi ile literatürde belirtildiği şekilde dibe çökmemiş olması nedeniyle bu basamağın ekstraksiyon sürecinden çıkarılmasına karar verilmiştir. Ayrıca ayırma hunisi aracılığıyla elde edilen biyosüpfektan ekstraktından diklorometanın uzaklaştırılmasında rotary evaporatör ile buharlaştırma işleminin

yetersiz olduğu ve ekstraktın fiziksel yapısına zarar verdiği görölmüş olduğundan bu basamağın da uygulanmamasına karar verilmiştir. Bu çalışmada ise biyosürefektan ekstraktındaki diklorometanın ve çözdüğu yağın uzaklaştırılması amacıyla santrifüjleme işlemi uygulanmış ve bu sayede ham biyosürefektanın ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Tezde tanımlı fermantasyon ortamından ve zeytin karasuyu ve artık yağ içeren ortamdan ekstrakte edilen ham biyosürefektanların örnek görüntüleri sırasıyla Fotoğraf 4.5. ve 4.6.'da sunulmuştur.



Fotoğraf 4.5. Tanımlı bileşimde besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham formdaki biyosürefektana ait bir görüntü



Fotoğraf 4.6. Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık kızartma yağı, %10) besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham formdaki biyosürefektana ait bir görüntü

Bölüm 4.5'te sunulan fermentör koşullarında tanımlı optimum besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu kullanılarak üretilen biyosüpfektan ekstraktı miktarı 39.850 g/L, liyofilize edilerek son ürün haline getirilen ürün ise 4.825 g/L olarak belirlenmiştir. Erlen düzeyinde yürütölen fermentasyonda ise ekstrakt ve liyofilize ürün verimi sırasıyla 37.3235 g/L ve 4.211 g/L olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, az bir farkla da olsa, fermentör koşullarında yürütölen üretimde verimin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, fermentör ve erlen koşullarında yürütölen biyosüpfektan üretimi çalışmalarında ekstraksiyonun sırasıyla 48 ve 72 saatte yapılmış olması dolayısıyla fermentör kullanımının daha kısa sürede ürün eldesini sağladığı belirlenmiştir. Her iki koşulda yapılacak ekstraksiyonun süresinin belirlenmesinde bazı faktörler göz önüne alınmıştır. Fermentör için yukarıda açıklanmış olan üretim profili esas alınarak fermentasyon 48 saat sonunda durdurulmuş ve ekstraksiyon yapılmıştır. Erlen düzeyinde yürütölen çalışmada ise, besiyerinde en düşük yüzey geriliminin 72. saatte ölçölmüş ve bu nedenle biyosüpfektan ekstraksiyonu 72 saat süren fermentasyonun ardından yapılmıştır (bkz. Tablo 4.6.).

Çalışma kapsamında biyosüpfektanın gıda artığı bazlı bir besiyerinde üretilmesi hedefi doğrultusunda, daha önce gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneylerinde besiyerinin yüzey geriliminin maksimum düzeyde düşüröldüğü zeytin karasuyu (%20) ve artık kızartma yağı (%10) bazlı besiyeri kullanılmıştır (bkz. Bölüm 4.4.3). Fermentör koşullarında gerçekleştirilen üretimde 6.262 g ekstrakt ve ekstraktın liyofilizasyonu sonucu 1.2395 g son ürün elde edilmiştir. Bu koşullarda artık bazlı (zeytin karasuyu ve artık kızartma yağı) besiyerinde üretilen biyosüpfektan veriminin daha düşük olduğu açığa çıkmıştır.

Tüm bu veriler değeriendirildiğinde, biyosüpfektan üretimi amacıyla kullanılan artık yağlarda bulunan bazı maddelerin inhibisyon etkisinden dolayı rafine yağ kullanımı ile daha fazla biyosüpfektan üretimi olabileceğı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, tanımlı besiyerinin glukoz ve ayçiçek yağından oluşmasına rağmen diğeri besiyerinde artık kızartma yağının yanında sadece şeker içeriğı oldukça düşük olan zeytin karasuyunun bulunmasının da, yaklaşık 6.5 kat daha düşük miktarda biyosüpfektan üretimine yol açan bir diğeri faktör olduğu düşünölmektedir.

4.6.1 Tanımlı ve Gıda Artığı Bazlı Besiyerleri Kullanılarak Üretilen Biyosüpfektan Miktarlarının Genel Değerlendirilmesi

Literatürde bakteri kaynaklı biyosüpfektanların tanımlı fermantasyon ortamlarında en yüksek 6.90 g/L (83), biyosüpfektan üretimi amacıyla gıda artığı bazlı ortamların kullanıldığı çalışmalarda ise 274-862 mg/L (71,82,95) ve 1.60-5.31 g/L (69,73,93,98) aralığında değişim gösteren miktarlarda üretildiği çalışmalar rapor edilmiştir. Biyosüpfektanların üretimi için mayalardan yararlanılan çalışmalarda ise tanımlı ortamların kullanılmasıyla erlende 1360 mg/L (60), 4.23 g/L (9), 19 g/L (119), 24.10 g/L (6), 45.70 g/L (131), 67.60 g/L (66) ve 78.80 g/L (8); fermentör koşullarında ise 28.60-53.20 g/L (6), 69.83 g/L (37), 88.20-131.20 g/L (8), 118 g/L (66) ve 365.80 g/L (72) düzeyinde üretimin gerçekleştirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Maya kaynaklı biyosüpfektanların üretimi amacıyla artık bazlı besiyerlerinin değerlendirildiği çalışmalarda ise erlende 4.40 g/L (84), 17.81-19.27 g/L (38), 41.60 g/L (136), 84.80 g/L (72); fermentör düzeyinde 10.08 g/L (13), 27.86 g/L (74), 51.50 g/L (136), 96.40 g/L (7), 142.80 g/L (66) ve 315.60 g/L (72) biyosüpfektan üretildiği bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalarda Sen ve ark. (38) tarafından da aktarıldığı gibi, maya kaynaklı biyosüpfektanların üretim miktarlarının bakteriyel süpfektanlara göre genel olarak çok daha yüksek olması söz konusudur.

Tez çalışmasında optimum tanımlı fermantasyon ortamı kullanılarak, Alfian ve ark. (131) tarafından yapılan çalışmaya oldukça yakın şekilde yaklaşık 40 g/L biyosüpfektan üretilmiştir. Literatürde fermentörde ve tanımlı ortamlarda üretilen maya kaynaklı biyosüpfektan miktarlarının oldukça geniş bir aralıkta (28.60 g/L-365.80 g/L) değişim göstermesi dolayısıyla, tezde genel olarak literatürü destekleyen düzeyde biyosüpfektan üretiminin sağlandığı bulunmuştur. Tez kapsamında artık bazlı ortamda çalışıldığında üretilen biyosüpfektanın miktarı ise 6.262 g olarak belirlendiğinden, bu miktarın literatürde maya kaynaklı fermentör düzeyinde biyosüpfektan üretimi amacıyla artık bazlı besiyerlerinin kullanıldığı koşullarda 10.08-315.60 g/L aralığında oldukça farklı düzeylerde biyosüpfektan üretildiğini raporlayan çalışmalara göre düşük kaldığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca tezde tanımlı ve artık bazlı fermantasyon ortamlarından ekstrakte edilen biyosüpfektanlara uygulanan liyofilizasyon işlemi sonucunda ise sırasıyla 4.211 ve 1.2395 g/L biyosüpfektan elde edilmiş olduğundan tanımlı

ortamda üretilen biyosüpfektan miktarının literatürde ekstraksiyonun ardından kurutma işlemi uygulanan biyosüpfektanlar için verilen 4.22-6.20 g/L (56,58) düzeyindeki sonuçlara yakın olduğu ancak artık bazlı ortam için 1.2395 g/L olarak üretilen miktarın literatüre göre daha düşük kaldığı belirlenmiştir.

Literatürde ayrıca tez çalışmasına benzer şekilde biyosüpfektan üretiminin hem erlen hem fermentör koşullarında yürütüldüğü çalışmalar yer almaktadır. *C. bombicola* aracılığıyla biyosüpfektanın üretimi için substrat olarak glukoz ve kolza yağının bir arada kullanıldığı çalışma kapsamında erlen koşullarında 192 saat boyunca yürütölen deneyde en yüksek 78.80 g/L, fermentörde 156 saat sonunda 88.20 g/L ve kesikli beslemeli fermentasyonda ise 192 saat sonunda 131.20 g/L biyosüpfektanın üretildiğı rapor edilmiştir (8). Bu çalışmada teze yakın olarak, fermentörün kullanımıyla erlen deneyine göre daha yüksek miktarda biyosüpfektan daha kısa sürede üretilmiştir. Ancak bu çalışmadan farklı olarak, tezde erlen ve fermentörde üretilen biyosüpfektanların miktarının (sırasıyla 37.3235 g/L, 72 sa; 39.850 g/L, 48 sa) birbirlerine oldukça yakın olması nedeniyle üretim miktarı açısından belirgin bir fark oluşmamış ve ayrıca genel olarak tezde kesikli beslemeli fermentasyon uygulanmamıştır. Maya kaynaklı bir biyosüpfektan üretimi amacıyla glukoz ve kolza yağının kullanıldığı başka bir çalışmada ise, erlende 24.10 g/L, kesikli beslemeli sistemde çalışılan 5 ve 50 litre hacme sahip fermentörlerde sırasıyla 28.60 ve 53.20 g/L biyosüpfektanın üretildiğı raporlanmıştır (6).

Biyosüpfektan üretimi amacıyla artık kızartma yağından yararlanıldığında erlen ölçeğinde 84.80 g/L, kesikli beslemeli fermentasyonda ise 315.60 g/L üretimin sağlandığı başka bir çalışma kapsamında ayrıca, artık yağ yerine kolza yağının kullanıldığı koşullarda ve kesikli beslemeli sistemde 365.80 g/L olarak daha yüksek düzeyde biyosüpfektanın üretildiğı rapor edilmiştir (72). Bu çalışma hem erlende, hem tezden farklı olarak kesikli beslemeli sistemin uygulandığı fermentörde tezden çok daha yüksek miktarlarda biyosüpfektanın üretilmesi açısından tez çalışmasından farklı, ancak tanımlı ortamda üretilen biyosüpfektan miktarının artık bazlı ortama göre daha yüksek bulunması nedeniyle ise tezi destekleyen niteliktedir. Bu çalışmada genel olarak artık yağların bileşiminde mikroorganizmaların gelişimi ve metabolizmalarını inhibe ederek bu yağlarda daha düşük miktarda biyosüpfektanın üretilmesine yol açan peroksitler, hidroperoksitler, düşük molekül ağırlıklı alkan, keton, aldehit ve asitlerin

bulunması dolayısıyla, rafine yağların kullanıldığı deneylerde yüksek düzeylerde üretimin gerçekleştiği rapor edilmiştir (72). Hirata ve ark. (66) tarafından yürütülen bir çalışmada palm olein ve oleik asit bileşenlerinin bir arada kullanılması durumunda erlende 67.60 g/L ve fermentörde 118 g/L, palm olein yerine artık kızartma yağının kullanıldığı koşullarda ise 142.80 g/L biyosüpfektanın üretildiği bildirilmiştir. Bir önceki çalışmadan (72) farklı olarak artık yağın asitliğinin yüksek olmasının biyosüpfektan üretimini olumlu etkilediğini ifade eden bu çalışma, hem üretim miktarının fazla olması hem artık yağ içeren ortamda daha yüksek sonuçların alınması açısından tezden farklı niteliktedir.

4.7 Tanımlı ve Gıda Artığı İçeren Besiyerlerinde Üretilen Biyosüpfektanların Karakterizasyonu

4.7.1 Biyosüpfektanların FT-IR ile Karakterizasyonu

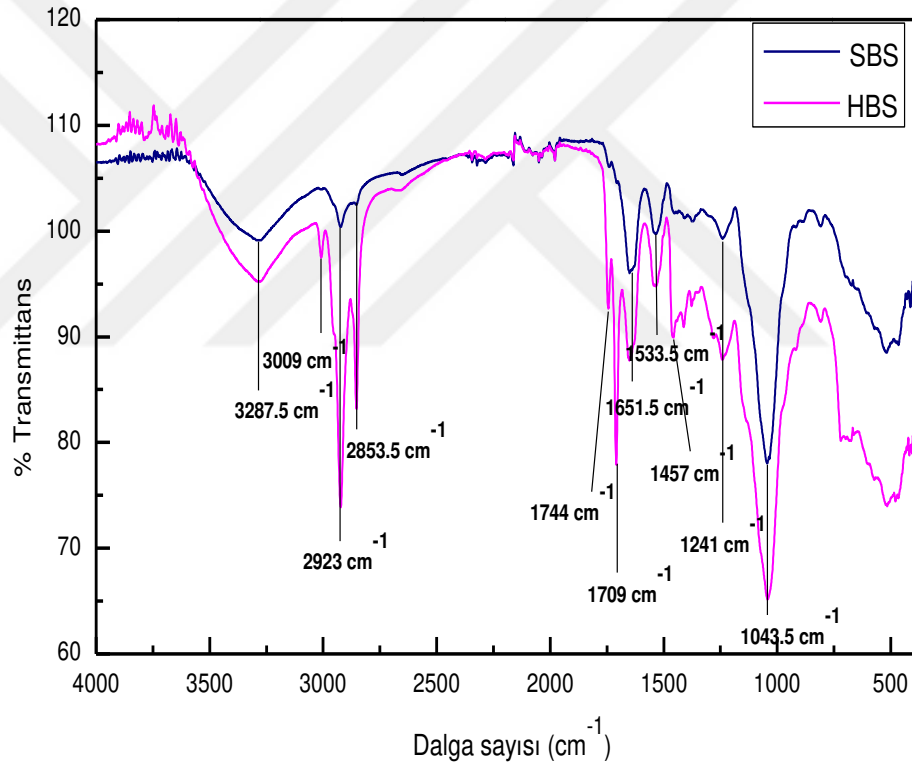
Çalışma kapsamında optimum tanımlı ve gıda artığı bazlı fermantasyon ortamlarında üretilen ham ve saf biyosüpfektanların FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.'de verilmiştir.

FT-IR spektrumunda ham ve saf biyosüpfektan için sırasıyla 3283 ve 3292 cm^{-1} dalga sayısındaki geniş pikler, biyosüpfektanların glukoz disakkaritlerinden oluşan kısımdaki hidroksil gruplarının (R-OH) gerilim titreşimini göstermektedir (10,64). Yalnızca ham biyosüpfektanda 3009 cm^{-1} dalga sayısında oluşan pik karbon atomları arasındaki doymamışlığı (H-C=C), diğer bir ifade ile biyosüpfektandaki doymamış yağ asitlerini ifade etmektedir (10,154).

Bu spektrumda ham biyosüpfektan için 2923 ve 2853 cm^{-1} ; saf biyosüpfektan için ise 2923 ve 2854 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler ise sırasıyla metilen ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) grubundaki C-H bağlarının asimetrik ve simetrik titreşimlerini ifade ettiğinden biyosüpfektanın hidrokarbon zinciri taşıdığı anlaşılmaktadır (64,149). Yalnızca, ham biyosüpfektan için 1744 cm^{-1} dalga sayısında karbonil (R-C=O) grubunun gerilimini ifade eden pik biyosüpfektanın glikozidik ve lipit kısımlarındaki esterleri (R-O-C(=O)-R), laktonları (siklik esterleri) ve karboksilik asitleri (R-C(=O)-OH); 1709 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise konjuge aldehit, karboksilik asit veya alifatik keton grubunun C=O gerilimini göstermektedir (10,64). Ayrıca 1457 cm^{-1} dalga sayısında yer alan pik ise, ham

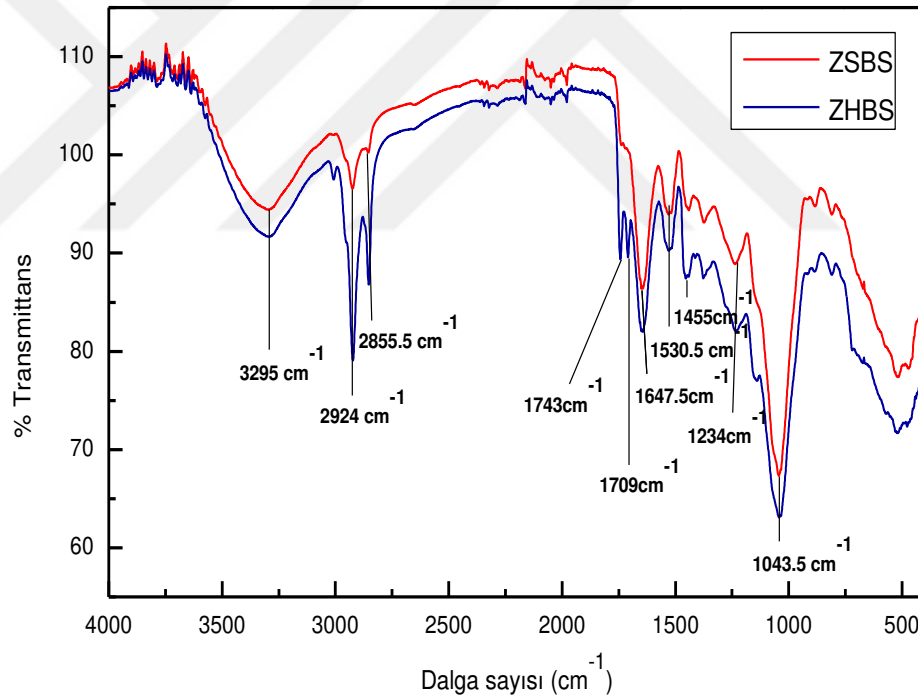
biyosürefektandaki alifatik uzun yağ asidi zincirinin deformasyonu sonucu oluşmuştur (4).

Biyosürefektanın ham ve saf formları için, spektrumda 1651.5 cm^{-1} dalga sayısında oluşan pik konjuge olmayan olefinleri ($\text{C}=\text{C}$), 1533.5 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise, $\text{C}=\text{O}$ gerilim titreşimini işaret etmektedir (64,67). Spektrumda ham ve saf biyosürefektan için sırasıyla 1242 ve 1240 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler, $\text{C}(\text{=O})\text{--O--C}$ ester gerilimini göstermektedir. Spektrumun 1043 ve 1044 cm^{-1} dalga sayısındaki pikleri ise biyosürefektanın glikozidik bağındaki eter (C--O--C) grubunun gerilim titreşiminden kaynaklanmaktadır (10,38,132).



Şekil 4.17. Tanımlı optimum bileşimdeki besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham ve saflaştırılan biyosürefektanların FT-IR spektrumları (HBS: Ham biyosürefektan; SBS: Saf biyosürefektan)

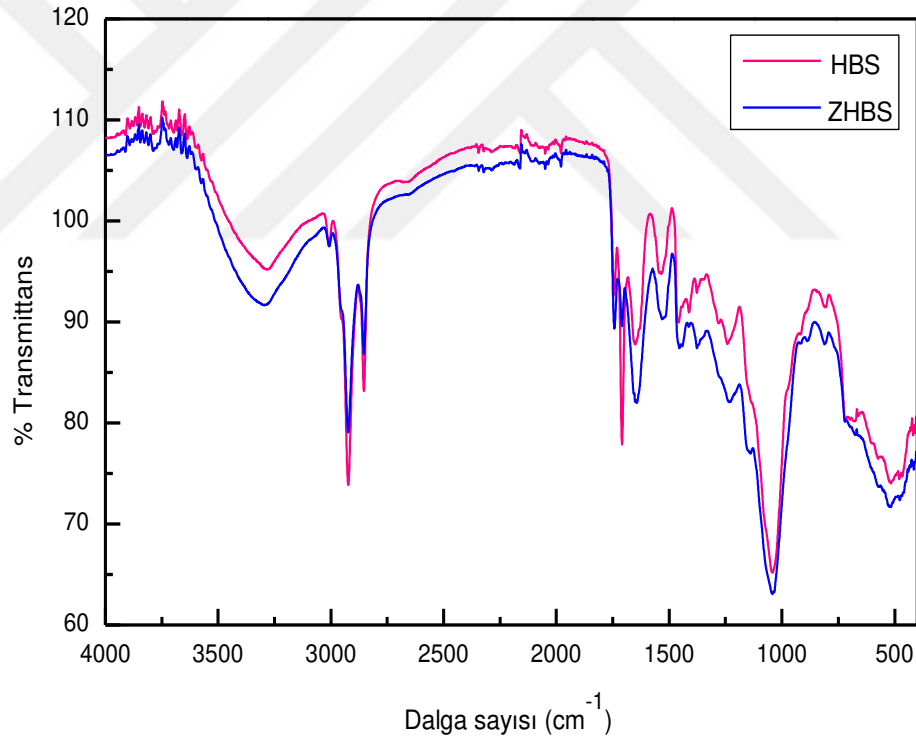
Tez çalışmasında elde edilen FT-IR spektrumları literatürde yer alan spektrumlar ile karşılaştırıldığında, biyosüpfektan üretimi amacıyla mayalardan yararlanılan çalışmalara benzer şekilde, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile tanımlı fermantasyon ortamında üretilen ham ve saf biyosüpfektanın soforolipit yapısı taşıdığı ortaya konmuştur (10,38,132). Uygulanan saflaştırma işlemi ile beraber ham biyosüpfektanın yapısındaki özellikle besiyeri kaynaklı kalıntı yağın uzaklaştırılmış olmasına bağlı olarak, yağ ile ilgili bazı piklerin (3009, 1744, 1709 ve 1457 cm^{-1}) saf biyosüpfektanın spektrumunda yer almadığı bulunmuştur. Ayrıca biyosüpfektan örneğinin her iki formu için 2923 cm^{-1} dalga sayısında çıkan pikler incelendiğinde, saflaştırma işleminin yağın uzaklaştırılması etkisi dolayısıyla, saf biyosüpfektana ait pik yüksekliğinin daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.16.).



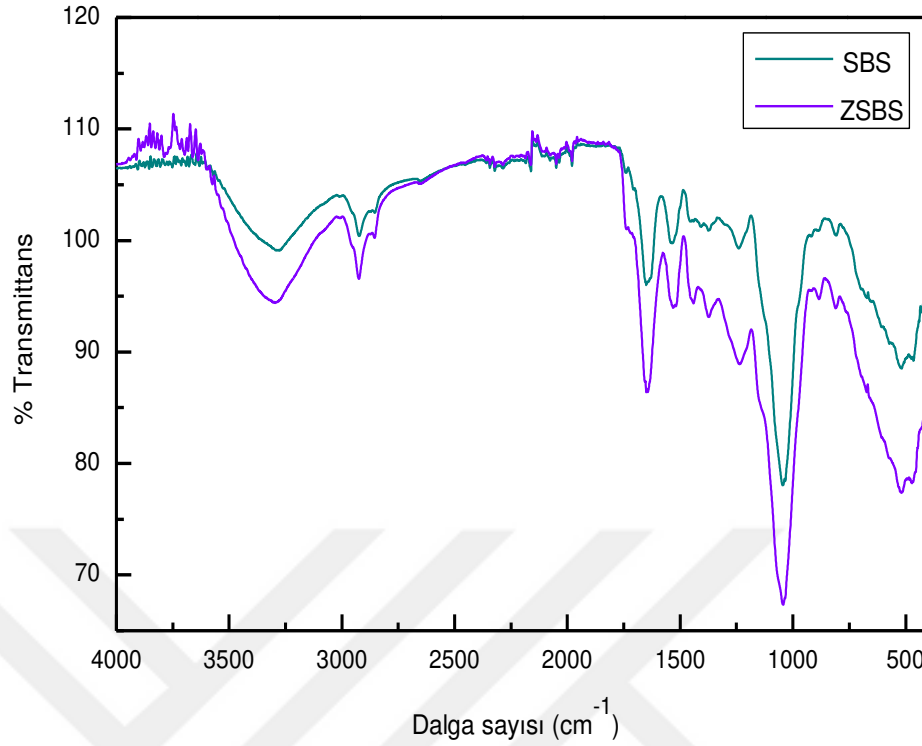
Şekil 4.18. Gıda artığı içeren (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham ve saflaştırılan biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosüpfektan; ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan)

Tez çalışmasında zeytin karasuyu ve artık yağ içeren besiyeri kullanılarak üretilen ham ve saf formdaki biyosüpfektanların Şekil 4.17.'de verilen FT-IR spektrumu, tanımlı besiyerinde üretilen soforolipit yapısındaki ham ve saflaştırılmış biyosüpfektanların spektrumu ile çok büyük ölçüde benzerlik taşımaktadır (Şekil 4.16.). Artık bazlı ortamda üretilen biyosüpfektana uygulanan saflaştırma işlemi sonucunda da, yağ ile ilgili bileşenlerin saf biyosüpfektanın spektrumunda yer almadığı görülmüştür.

Tanımlı ve gıda artığı bazlı besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanların spektrumu Şekil 4.19., saf biyosüpfektanların ise Şekil 4.20.'de verilmiştir. Bu spektrumlar incelendiğinde besiyeri bileşimlerinin etkisinden bağımsız olarak, biyosüpfektanların biyokimyasal yapılarının birbirlerine çok benzer profil oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Tanımlı ve gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (HBS: Ham biyosüpfektan; ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosüpfektan)



Şekil 4.20. Tanımlı ve gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen saf biyosüpfektanların FT-IR spektrumları (SBS: Saf biyosüpfektan; ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan)

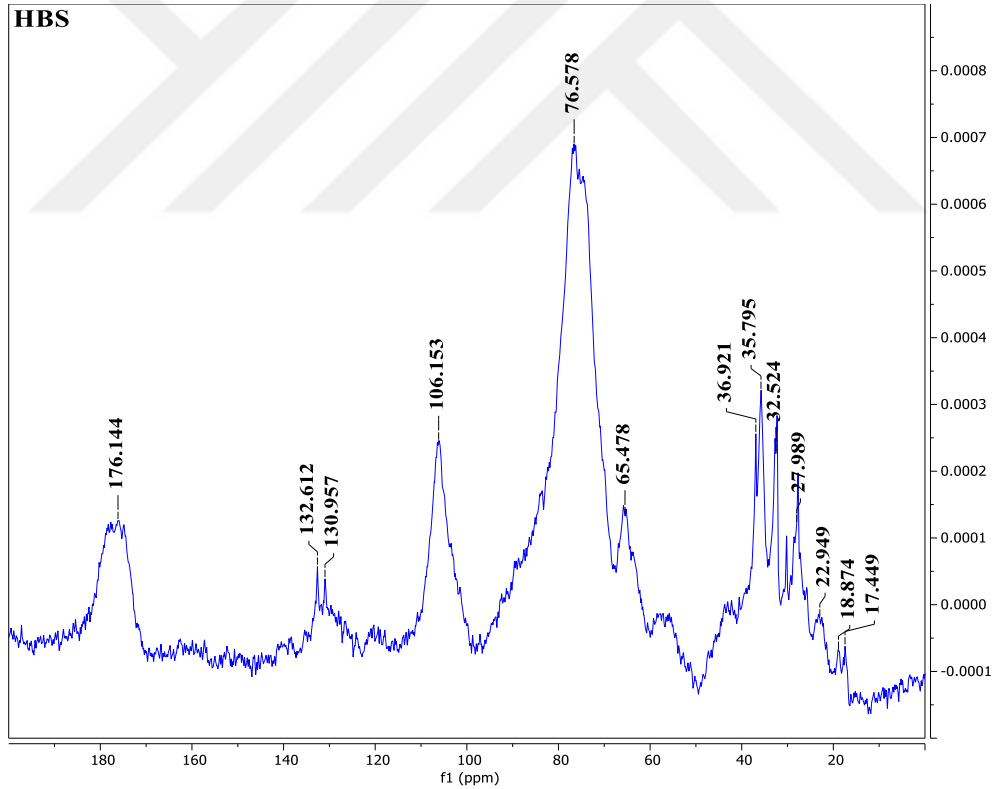
4.7.2 Biyosüpfektanların NMR ile Karakterizasyonu

Optimum tanımlı besiyerinde üretilen ham ve saf biyosüpfektanın karbon NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.'de sunulmuştur. Spektrumun genel olarak 17.5-37 ppm aralığı, her iki biyosüpfektanın lipid kısımlarındaki alifatik karbonların varlığına işaret etmektedir (84). Ham ve saf biyosüpfektanların spektrumları ayrı ayrı incelendiğinde, saf biyosüpfektanda yaklaşık 17-36 ppm aralığında oluşan piklerin ham biyosüpfektana göre daha zayıf olduğu anlaşılmaktadır. Spektrumun bu kısmından, uygulanan saflaştırma işleminin ham biyosüpfektan yapısındaki lipidin bir kısmının uzaklaştırılmasında etkin olduğu görülmektedir.

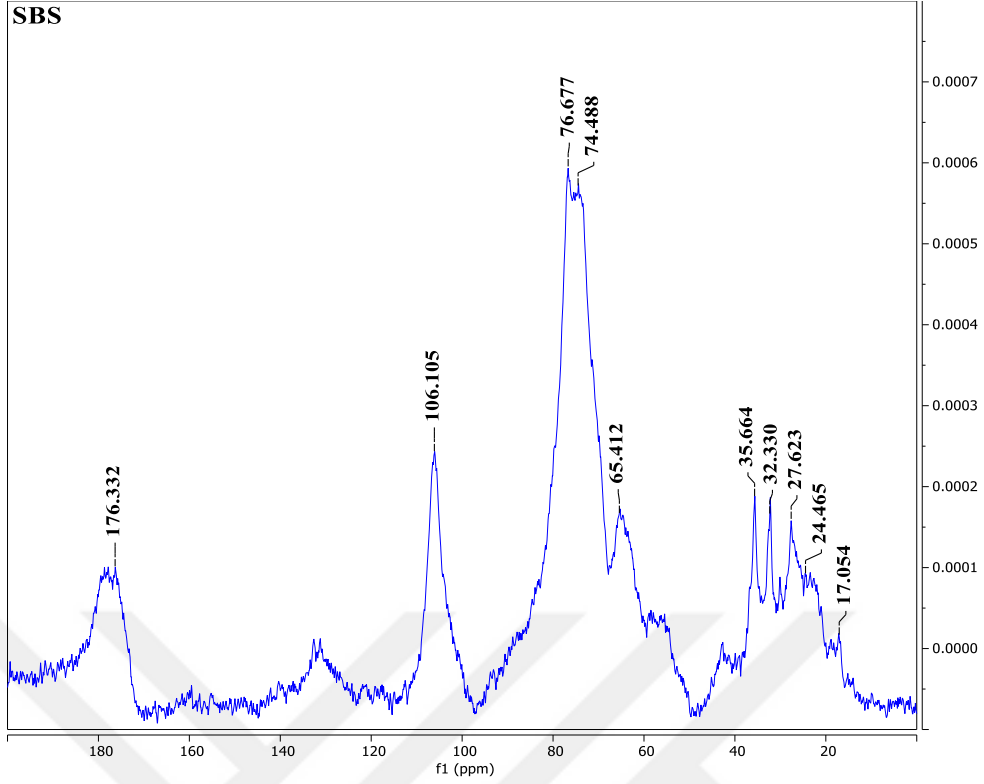
Her iki formdaki biyosüpfektan için, ester bağlarındaki karbonlardan gelen ve glukoz moleküllerinin C6 ve C6' pozisyonlarında yer alan karakteristik pik (yaklaşık 65 ppm) gözlemlenmiştir. Benzer şekilde her iki biyosüpfektan için

yaklaşık 73-77 ppm aralığı ve 105 ppm'deki pikler disakkarit β -D-glikopiranozil-(1,2)-D-glikopiranoz-soforozu oluşturan β -konformasyonuna ek olarak glukoz birimlerinin glikozidik bağlarında yer alan karbon varlığını gösterir. Ayrıca her iki biyosürefektan için yaklaşık 175 ppm'de oluşan pik biyosürefektan yapısında bulunan karbonil ester, lakton ve karboksilik asitlerden kaynaklanmıştır (10).

Tanımlı besiyerinde üretilen ham formdaki biyosürefektanın spektrumunda 106 ppm'de yer alan ve biyosürefektanın lipid kısmından gelen pikler karbon atomları arasındaki doymamışlığı ifade etmektedir (10). Saf biyosürefektanın spektrumunda ise bu iki pikin saflaştırmanın etkisi ile lipidin bir kısmının uzaklaştırılmış olmasına bağlı olarak görülmediği düşünülmüştür. Benzer olarak, FT-IR spektrumunda doymamış yağ asitlerini ifade eden 3009 cm^{-1} dalga sayısındaki pik sadece ham biyosürefektanda görülmüştür (bkz. Şekil 4.16.).

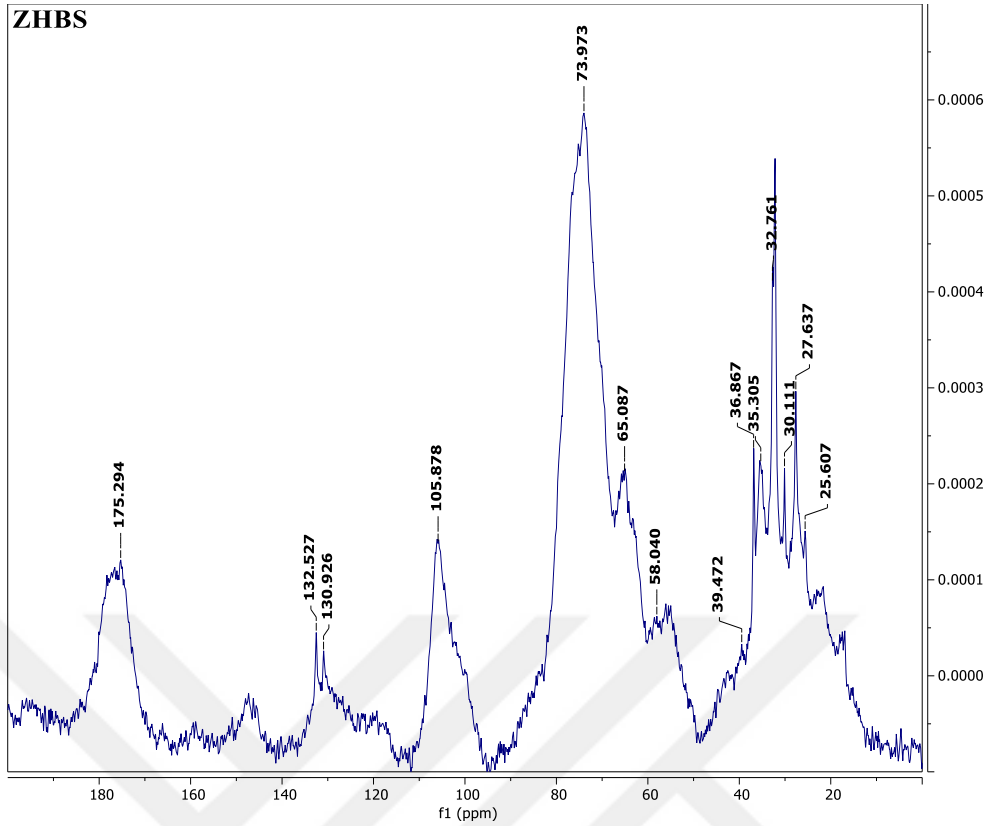


Şekil 4.21. Tanımlı besiyerinde üretilen ham biyosürefektanın NMR spektrumu (HBS: Ham biyosürefektan)



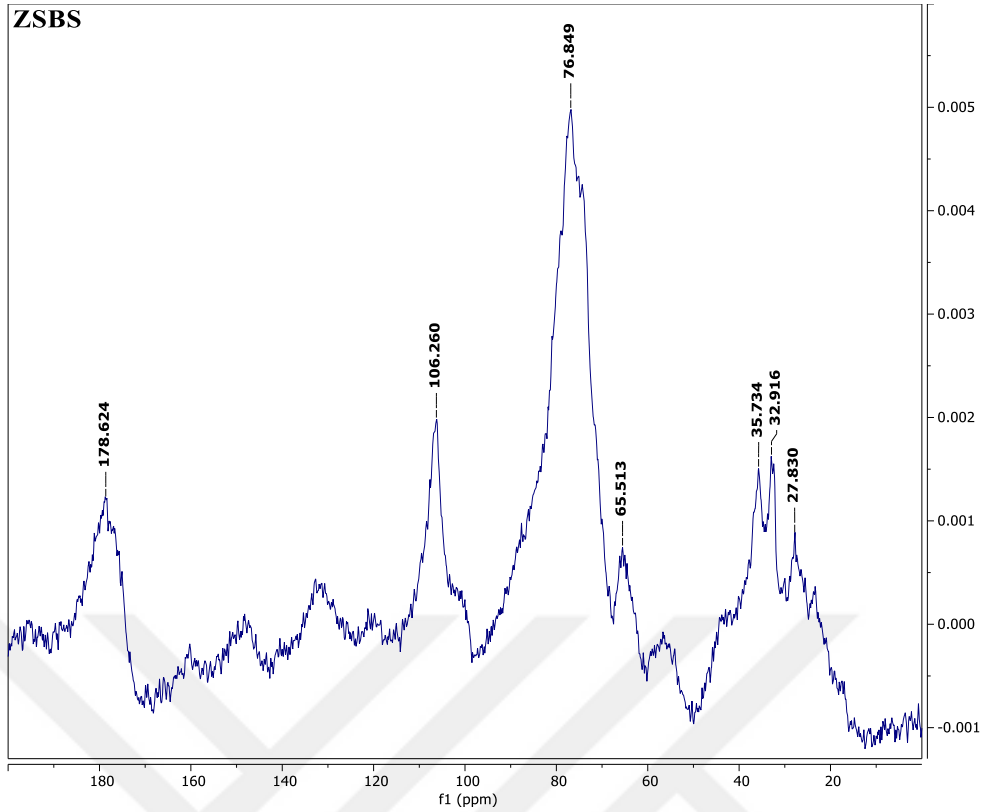
Şekil 4.22. Tanımlı besiyerinde üretilen saf biyosürfektanın NMR spektrumu (SBS: Saf biyosürfektan)

Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu ve artık kızartma yağı) besiyerinde üretilen ham ve saf biyosürfektanların karbon NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'te verilmiştir. Bu biyosürfektanlar için sırasıyla yaklaşık 17-37 ppm ve 28-36 ppm aralığındaki pikler biyosürfektanın lipit kısmı ile ilgilidir. Spektrumlar incelendiğinde, belirtilen aralık için saflaştırılma işlemine tabi tutulan biyosürfektana ait piklerin çok daha zayıf olduğu görülmektedir. Tanımlı besiyeri kullanılarak üretilen biyosürfektanlara benzer şekilde, artık bazlı ortamda üretilen biyosürfektanın ham ve saf formlarında genel olarak şeker ünitelerinden gelen karbon piklerinin yaklaşık 65-80 ppm aralığında ve 106 ppm'de bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine benzer olarak bu besiyerinde üretilen ham biyosürfektan için doymamış yağ asitlerini gösteren yaklaşık 130 ppm'de yer alan iki pikin, saflaştırma işleminin etkinliğine bağlı olarak saf biyosürfektanda bulunmadığı belirlenmiştir. Bu besiyerinde üretilen ham ve saf biyosürfektanlar için sırasıyla 175 ve 179 ppm'de oluşan pikler biyosürfektan yapısında bulunan karbonil ester, lakton ve karboksilik asitleri göstermektedir (10).



Şekil 4.23. Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen ham biyosürfektanların NMR spektrumu (ZHBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen ham biyosürfektan)

Literatürde FT-IR ve/veya NMR yöntemlerinden yararlanılarak veya bu yöntemlerden herhangi birinin yanı sıra diğer kromatografik yöntemler yoluyla kullanılarak tanımlandığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda teze benzer şekilde, *Candida* sp. (9), *C. batistae* (6), *C. mucoides* (10), *S. bombicola* (7,37,66,72,136), *S. riodocensis* (131), *R. babjevae* (38), *D. hansenii* (64) ve *Metschnikowia churdharensis* (39) mayaları tarafından üretilen biyosürfektanların soforolipit yapısında oldukları bildirilmiştir. Bununla beraber *Rhodotorula* sp. (60) ve *R. mucilaginosa* (64) mayaları kullanılarak üretilen biyosürfektanların ise ramnolipit yapısını taşıdıkları aktarılmıştır. Genel olarak hem soforolipit ve hem ramnolipit yapılarının glukolipit yapısının birer alt türü olması dolayısıyla tüm bu çalışmalarda üretilen biyosürfektanların glukolipit yapı taşıdıkları belirlenmiştir. Balan ve ark. (11) tarafından ise *Cyb. saturnus* maya suşu kullanılarak üretilen yeni bir glukolipit biyosürfektan yapısının trigalaktomargarat olarak ilk kez karakterize edildiği rapor edilmiştir.



Şekil 4.24. Gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu, %20; artık yağ, %10) besiyerinde üretilen saf biyosüpfektanların NMR spektrumu (ZSBS: Zeytin karasuyu içeren ortamda üretilen saf biyosüpfektan)

Tez çalışmasında *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile hem tanımlı hem gıda artığı bazlı besiyerinde üretilmiş olan biyosüpfektanların FT-IR ve NMR spektrumları bir arada değerlendirildiğinde bu iki spektrum sonuçlarının birbirleri ile uyum içerisinde olduğu ve bu biyosüpfektanların soforolipit yapıya sahip olduğu ortaya konmuştur. Ham biyosüpfektanlara uygulanan saflaştırma işleminin biyosüpfektanların biyokimyasal yapısını değıştirmedığı, ancak her iki besiyerinde üretilen biyosüpfektanların yapısındaki lipidlerin bir kısmının uzaklaştırılmasında etkili olduğu anlaşılmıştır. Literatür taramasında ham ve saf biyosüpfektanların yapısal tanımlamalarının bir arada yapıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bazı çalışmalarda doğrudan, ham (7,9,37) ve saflaştırılmış (10,11,38,39,136) biyosüpfektanların yapılarının çeşitli spektroskopik veya kromatografik yöntemlerden yararlanılarak tanımlandığı bildirilmiştir.

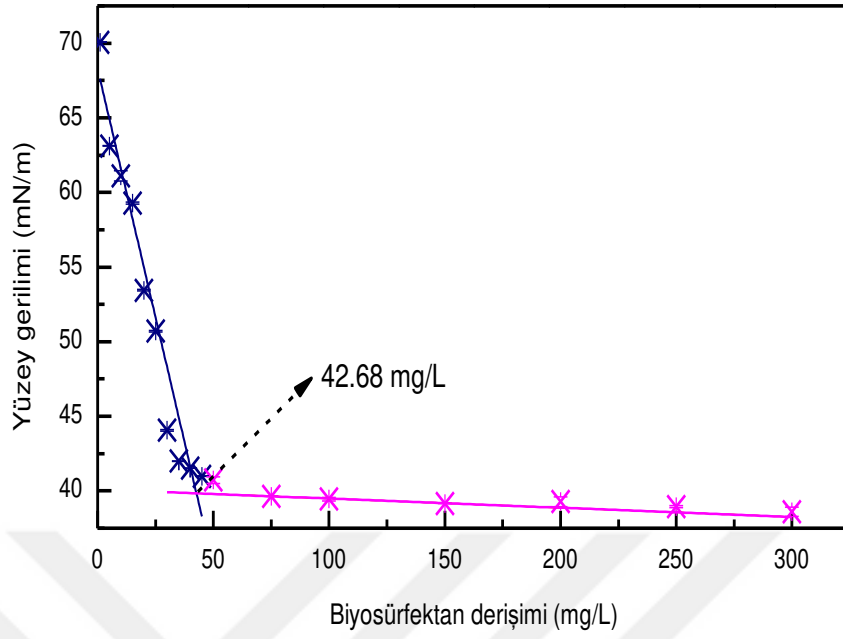
4.8 Biyosüpfektanların Kritik Misel Derişimleri ve Süpfektanların Kritik Misel Derişimleri ile Karşılaştırılması

4.8.1 Biyosüpfektanların Kritik Misel Derişimleri

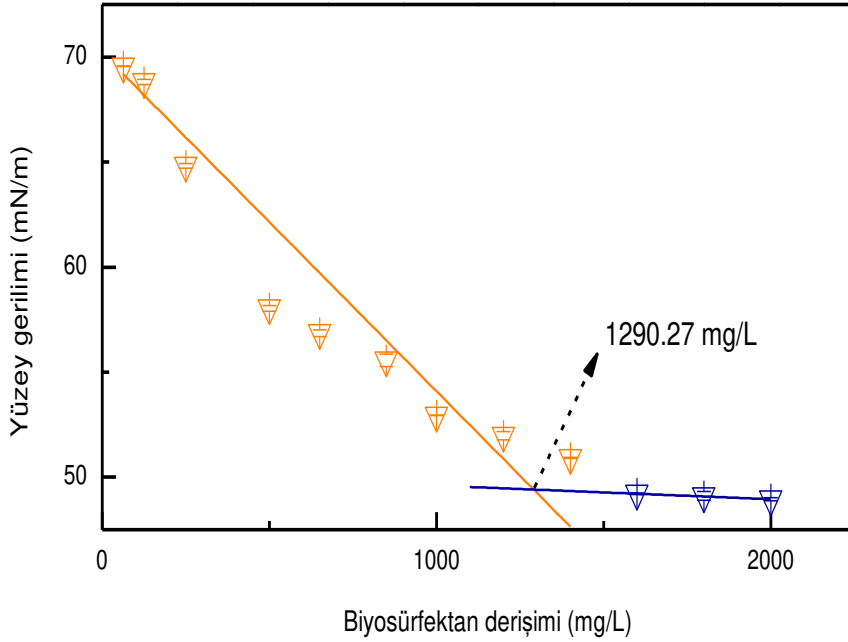
Tez çalışmasında optimum tanımlı ve gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu ve artık kızartma yağı) besiyerlerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu üretilen ham ve saflaştırılan formdaki biyosüpfektanların misel oluşumlarının başlangıcı olarak bilinen kritik misel derişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.25.-4.28.'de sunulmuştur.

Tanımlı besiyerinde üretilen ham ve saf biyosüpfektanların kritik misel derişimleri sırasıyla 42.68 ve 1290.27 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25. ve 4.26.). Bu derişimlerde, ham biyosüpfektan ile suyun yüzey gerilimi yaklaşık 40 mN/m, saf biyosüpfektan ile ise, yaklaşık 49.50 mN/m'ye düşürölmüştür. Biyosüpfektan üretimi çalışmalarının ekstraksiyonu aşamasında ortamda kalıntı olarak bulunan yağın bir miktarının biyosüpfektan ekstraktından ayrıştırılamaması sonucu ham biyosüpfektanın yapısında bulunan yağ bazlı bileşenlerin de yüzey gerilimini düşürmesi nedeniyle, ham biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme kapasitesinin daha yüksek bulunması söz konusudur. Ham biyosüpfektan ekstraktında bulunan kalıntı yağın uzaklaştırılması amacıyla ekstraktın etil asetat karışımının uygun bir kartuştan geçirilerek apolar maddelerin tutulmasını sağlayan saflaştırma işleminin etkisiyle ham biyosüpfektanın yapısındaki yağın uzaklaşmış olmasına bağılı olarak biyosüpfektanın suda daha fazla çözünmesiyle kritik misel derişimi de artmıştır.

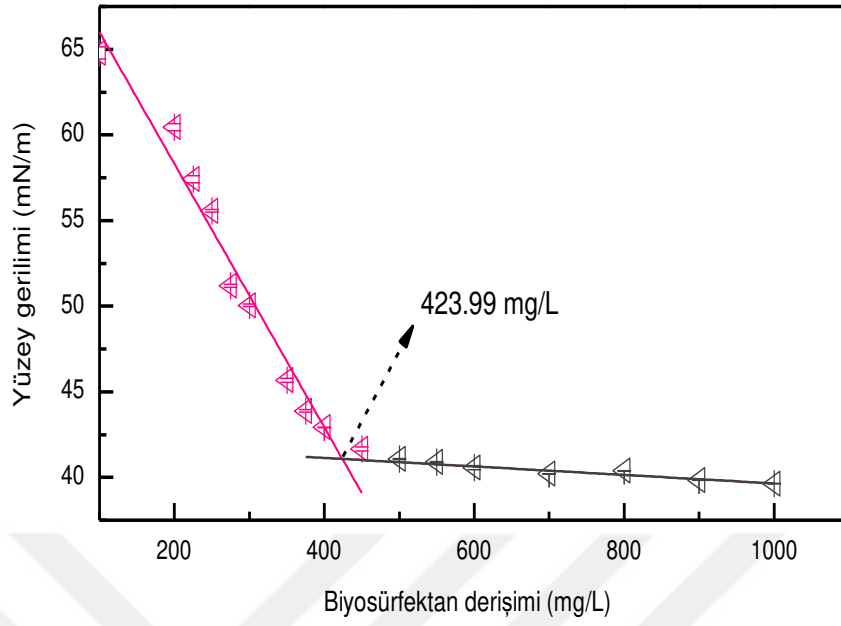
Gıda artığı bazlı besiyerinde üretilen ham ve saf biyosüpfektanın kritik misel derişimleri ise sırasıyla 423.99 ve 1813.80 mg/L olarak bulunmuş ve bu biyosüpfektanlar suyun yüzey gerilimini sırasıyla yaklaşık 41 ve 52.50 mN/m'ye düşürmüştür (Şekil 4.27. ve 4.28.). Benzer nedenlerden dolayı, saflaştırma işlemi biyosüpfektanın suda çözünürlüğünü arttırmış ancak artık bazlı ham biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur.



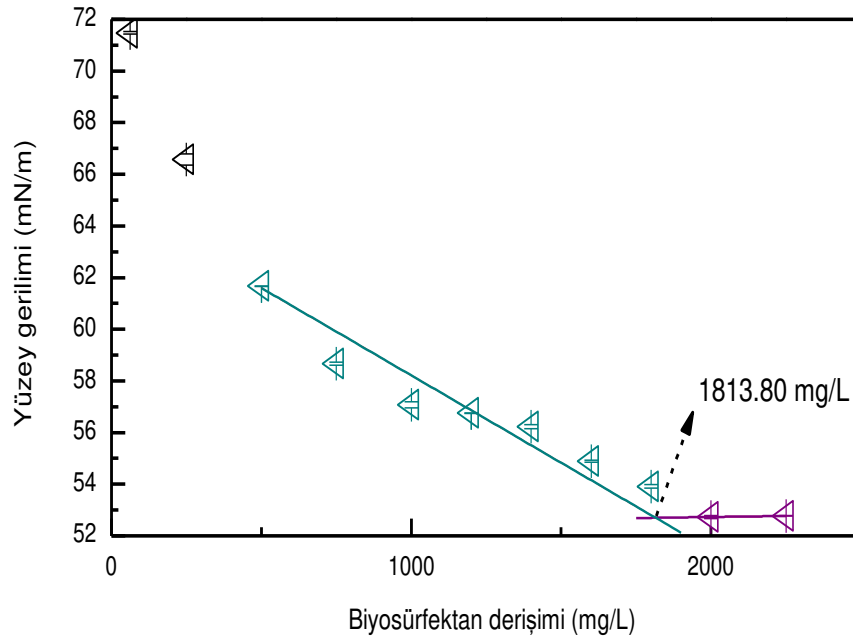
Şekil 4.25. Tanımlı besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham biyosürfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik



Şekil 4.26. Tanımlı besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen saf biyosürfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik



Şekil 4.27. Gıda artığı bazlı besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen ham biyosüfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik



Şekil 4.28. Gıda artığı bazlı besiyerinde *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile üretilen saf biyosüfektanın kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik

Tezde tanımlı ve gıda artığı bazlı ortamlarda üretilen ham biyosüpfektanların kritik misel derişimleri sırasıyla 42.68 ve 423.99 mg/L; saflaştırılmış biyosüpfektanların kritik misel derişimleri ise 1290.27 ve 1813.80 mg/L olarak bulunmuştur. Artık bazlı besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanın kritik misel derişimi, tanımlı ortamda üretilen biyosüpfektana göre daha yüksek olmasına rağmen, bu iki biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini birbirine yakın düzeylerde (yaklaşık 40 mN/m) düşürdüğü bulunmuştur. Benzer şekilde, her iki ortamda üretilen saf biyosüpfektanlar, suyun yüzey gerilimini 49.50 ve 52.50 mN/m olarak kısmen yakın düzeylerde düşürmüştür. Genel olarak ham biyosüpfektan ekstraktlarının yapısında bulunan yağın suyun yüzey gerilimini düşürme etkisi faktörü de ortadan kalktığında, saf biyosüpfektanların suyun yüzey gerilimini düşürme kapasitesinin ham biyosüpfektanlara göre daha düşük bulunması söz konusudur.

Literatür taramasında Hentati ve ark. (5) tarafından yürütölen çalışma haricinde ham ve saf biyosüpfektanların kritik misel derişimlerinin karşılaştırmalı olarak verildiğı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda tez çalışmasında ham veya saf biyosüpfektanların kritik misel derişimlerinin verildiğı tüm bu çalışmalardan farklı olarak, ham ve saf biyosüpfektanların kritik misel derişimleri ayrı ayrı belirlenerek birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Tez çalışmasında ham formdaki biyosüpfektanlara uygulanan saflaştırma işlemi sonucunda ham biyosüpfektanların suda çözünürlüğü arttırılmış ve daha yüksek kritik misel derişimi değerlerine ulaşılmış olmasına rağmen tezde elde edilen bu sonuç, bakteriyel bir biyosüpfektanın saflığı arttıkça kritik misel derişiminin düştüğünü ifade eden çalışmadan farklılık göstermektedir (5). Bu farklılığın tezde üretilen biyosüpfektana uygulanan saflaştırma işleminin biyosüpfektanın suda çözünürlüğünü arttırmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada ham biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini düşürme kapasitesinin saflaştırılan biyosüpfektana göre daha düşük olduğu belirlenmiş olmasına rağmen (5), tezde uygulanan saflaştırma basamağında ham formdaki biyosüpfektanların ekstraktında kalıntı olarak bulunan yağın suyun yüzey gerilimini düşürme etkisi ortadan kalktığından, saf biyosüpfektanların suyun yüzey gerilimini düşürme kapasitesi ham biyosüpfektanlara göre daha düşük bulunmuştur.

Literatürde biyosüpfektan üretimi amacıyla bakterilerin kullanıldığı çalışmalarda ham biyosüpfektanların kritik misel derişimleri ve bu derişimlerinde

ölçülen yüzey gerilimleri sırasıyla 10 mg/L, 25.50 mN/m (98); 28 mg/L, 27.70 mN/m (73); 125 mg/L, 32.70 mN/m (67); 156 mg/L, 32.40 mN/m (71); 0.25 mg/mL, 28.00 mN/m (34); 250 mg/L, 34 mN/m (5); 350 mg/L, 32 mN/m (155); 500 mg/L, 30.50 mN/m (76); 2.25 mg/mL, 40.20 mN/m (61); 2.70 mg/mL, 39.01 mN/m (78) ve saflaştırılan biyosüpfektanların ise 20 mg/L, 48 mN/m (100); 50 mg/L, 28 mN/m (5) ve 400 mg/L, 30 mN/m (96) olarak rapor edilmiştir. Ayrıca mayalar aracılığıyla üretilen ham biyosüpfektanların kritik misel derişimleri ve bu derişimlerde suyun yüzey gerilimleri sırasıyla 7 mg/L, 34 mN/m (8), 65 mg/L, 34 mN/m (37), 70 mg/L, 33.39 mN/m (60), 80.10-90.60 mg/L, 34.40-38.10 mN/m (136), 180 mg/L, 30.16 mN/m (13); saf biyosüpfektanların ise 110-120 mg/L, 34-37 mN/m (38), 130 mg/L, 35 mN/m (119) ve 5 mg/mL, 35 mN/m (39) olarak bildirilmiştir. Tezde tanımlı ve artık bazlı ortamlarda üretilen ham ve saf formlarda biyosüpfektanların kritik misel derişimleri 42.68-1813.80 mg/L olarak geniş bir aralıkta değişim göstermiş olup tüm bu derişimler literatürde 7 mg/L-5000 mg/L (8,39) şeklinde belirlenen kritik misel derişimleri aralığını kapsamaktadır. Ayrıca tezde ham ve saf biyosüpfektanların suyun yüzey gerilimini sırasıyla yaklaşık 40 mN/m ve 49.50-52.50 mN/m düzeylerine düşürmeleri açısından bu biyosüpfektanların yüzey gerilimleri Sharma ve ark. (61) ve Zampolli ve ark. (100) tarafından 40.20-48 mN/m olarak bildirilen sonuçlara yakınlık göstermektedir.

Literatürde biyosüpfektanların yüzey aktif fonksiyonunun molekülün zincir uzunluğu, dallanması, doymamışlık derecesi ve yükü gibi faktörlere bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir. Soforolipit yapıdaki biyosüpfektanların misel oluşturduğu kritik derişimlerinin ise ayrıca asidik ve laktonik soforolipit oranından ve ayrıca süpfektanın hidrofobik kısmının bileşiminden etkilendiği belirtilmiştir. Temel olarak laktonik soforolipit miktarının daha yüksek olduğu koşullarda düşük kritik misel derişimlerinin bulunduğu ve ayrıca biyosüpfektandaki hidrofobik zincirin uzunluğu arttıkça bu biyosüpfektanların misel oluşturması için daha uzun süre gerektiğinden kısa yağ asidi zincirli biyosüpfektanların daha düşük derişimlerde misel oluşturduğu aktarılmaktadır (8,65). Tüm bu literatür bilgileri doğrultusunda, tezde tanımlı (glukoz ve ayçiçek yağı) ve gıda artığı bazlı (zeytin kızartma yağı ve artık kızartma yağı) ortamlar kullanılarak asidik ve laktonik oranları farklı biyosüpfektanların üretilmesi ihtimali ve ayrıca bu iki yağın yağ asidi bileşimlerinin muhtemel farklılığı söz

konusu olduğundan, tezde bu ortamlarda ham ve saf formlarda biyosürfektanların kritik misel derişimlerinin ayrı ayrı birbirlerinden farklı olduğu çıkarımı yapılmıştır.

4.8.2 Sürfektanların Kritik Misel Derişimleri ve Biyosürfektanlar ile Karşılaştırılması

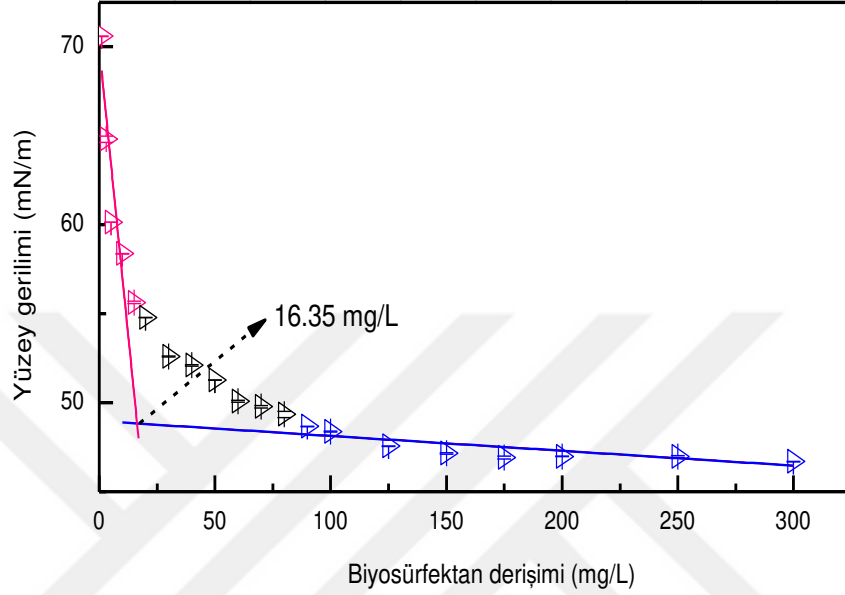
Tez çalışmasında üretilen biyosürfektanların kritik misel derişimleri ile yüzey gerilimi düşürme fonksiyonel özelliği, bazı süfektanların kritik misel derişimi ile karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda tween 80, triton x-100 ve sodyum lauril sülfat süfektanları kullanılmış ve her bir süfektanın kritik misel derişimleri belirlenerek Şekil 4.29.-4.31.'de verilmiştir.

Tween 80, triton x-100 ve sodyum lauril sülfat için kritik misel derişimleri sırasıyla 16.35, 133.74 ve 1955.89 mg/L olarak bulunmuştur. Bu süfektanlar sırasıyla suyun yüzey gerilimini yaklaşık olarak 49, 32 ve 31.50 mN/m düzeylerine düşürmüştür. Literatürde bu süfektanlar için verilen kritik misel derişimleri genel olarak tezde belirlenen değerleri destekleyen niteliktedir (8,155,156). Çalışmada, hem tanımlı hem gıda artığı bazlı besiyerinde *Cyb. fabianii* suşu ile üretilen ve sırasıyla 42.68 ve 423.99 mg/L kritik misel derişimine sahip olan ham formdaki biyosürfektanlar ile suyun yüzey gerilimi yaklaşık 40 mN/m'ye düşürülmüştür. Her iki ortamda üretilen biyosürfektanların saflaştırılan formlarının kritik misel derişimleri ise sırasıyla 1290.27 ve 1813.80 mg/L olarak belirlenmiş olup bu biyosürfektanlar ise suyun yüzey gerilimini yaklaşık 50 mN/m'ye düşürmüşlerdir.

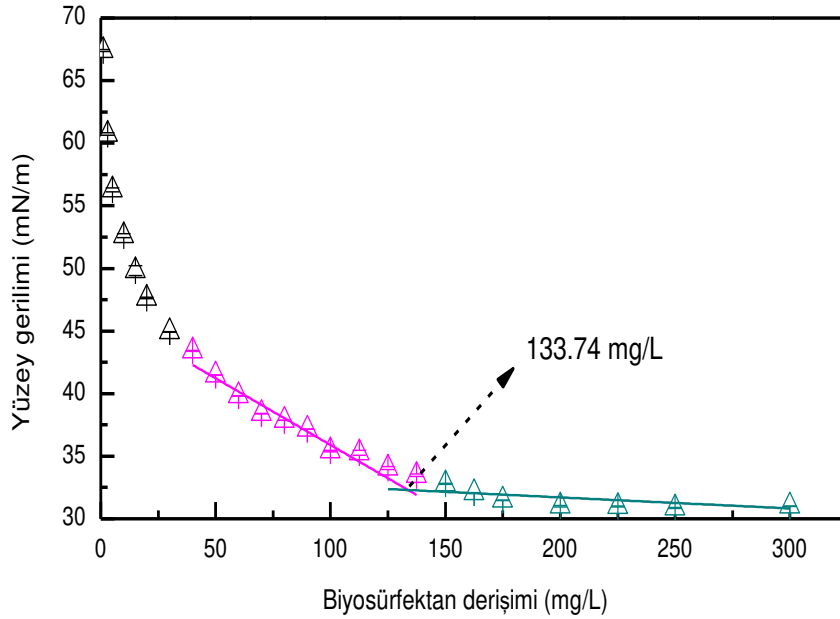
Tüm sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, saf biyosürfektanların kritik misel derişimi değerleri sodyum lauril sülfata, ham biyosürfektanların kritik misel derişimleri ise tween 80 ve triton x-100'e kısmen daha yakın bulunmuşlardır. Tezde üretilen saf biyosürfektanlar ve tween 80 kullanıldığında ise suyun yüzey gerilimi yaklaşık 50 mN/m düzeyine düşürülmüştür. Ham biyosürfektanlar ile ise yüzey gerilimi 40 mN/m düzeylerine düşürüldüğünden genel olarak bu fonksiyonel özelliklerinin triton x-100 (32 mN/m) ve sodyum lauril sülfata (31.50 mN/m) göre daha zayıf kaldığı belirlenmiştir.

Tezden farklı olarak biyosürfektanın kritik misel derişiminin 350 mg/L, yüzey geriliminin ise 32 mN/m olarak belirlendiği çalışmada, bu biyosürfektanın triton x-100 (200 mg/L, 32 mN/m) süfektanın etkinliğine benzer olduğu

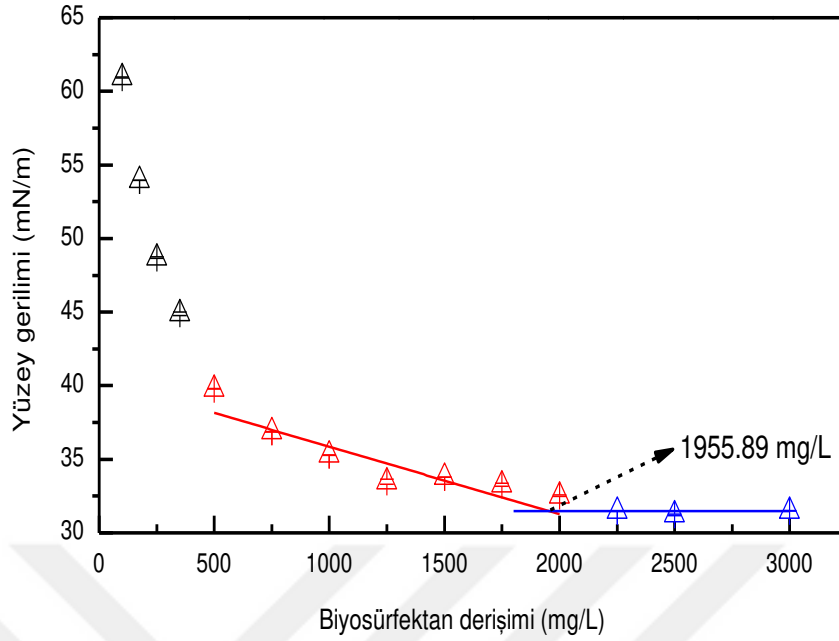
bildirilmiştir (155). Başka bir çalışmada ise biyosürfektanın 7 mg/L kritik misel derişiminin sodyum lauril sülfatın 2100 mg/L olarak belirtilen misel derişiminden oldukça düşük olması nedeniyle biyosürfektanın yüzey gerilimi düşürme fonksiyonunun daha üstün olduğu aktarılmıştır (8).



Şekil 4.29. Tween 80 sürfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik



Şekil 4.30. Triton x-100 sürfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik



Şekil 4.31. Sodyum lauril sülfat sürfektanının kritik misel derişiminin (mg/L) belirlenmesi için oluşturulan grafik

4.9 Biyosüpfektanın Çeşitli Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması

4.9.1 Farklı Ortam Koşulları Altında Biyosüpfektanın Yüzey Gerilimini Düşürme Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Tanımlı optimum besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanın farklı pH (a), tuz derişimleri (b) ve sıcaklık (c) ve 121°C’de süre (d) koşulları altında suyun yüzey gerilimini düşürme stabilitesini gösteren grafikler Şekil 4.32. (a-d)’da sunulmuştur.

Çalışmada biyosüpfektan normal ortam koşulları altında suyun yüzey gerilimini 39.83 mN/m düzeyine düşürmüştür. Biyosüpfektan çözeltisi pH’nın 2-6 ve 10 olarak kullanıldığı koşullarda genel olarak biyosüpfektanın yüzey gerilimi stabilitesini iyi düzeyde koruduğu belirlenmiştir. Biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme aktivitesi ortam pH’nın 8 ve 12 şeklinde değiştirildiği koşullarda ise suyun yüzey gerilimleri sırasıyla en düşük 34.82 mN/m ve en yüksek 48.66 mN/m olarak bulunmuştur (Şekil 4.32.a). Yürütölen bu deneyler kapsamında dikkat çekici bir veri olarak, biyosüpfektana %2-12 arasında uygulanan tuz derişimlerinin

suyun yüzey geriliminin düşürülmesini olumlu etkilediği ve tuz içermeyen ortamda yaklaşık 40 mN/m olarak belirlenen yüzey geriliminin 36.31-36.95 mN/m düzeyine düşürüldüğü bulunmuştur (Şekil 4.32.b). Şekil 4.32.c'den ise, biyosüpfektanın 4, 25 ve 45°C'de 18 sa ve 100°C'de 1 sa süre ile bekletilmesi sonucu genel olarak suyun yüzey geriliminin 39.45-40.60 mN arasında değiştiği ve biyosüpfektanın yüzey gerilimi düşürme stabilitesinin korunduğu belirlenmiştir. Aynı grafik üzerinden 70°C'de 18 sa süre ile uygulanan işlem sonunda ise biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini 43.76 mN/m'ye kadar düşürebilmesi nedeniyle, stabilitesinin belirli bir düzeyde azaldığı görülmüştür. Biyosüpfektanın 121°C otoklav içerisinde 10, 20 ve 30 dakika bekletildiği deneylerde ise, başlangıçta 39.83 mN/m olarak ölçülen yüzey geriliminin bir miktar artış gösterdiği ve sürenin uzamasına da bağlı olarak sırasıyla 42.05, 42.35 ve 42.83 mN/m düzeyinde bulunduğu Şekil 4.32.d üzerinden anlaşılmaktadır.

Literatürde bakteri ve maya kaynaklı biyosüpfektanların yüzey gerilimi düşürme özelliklerinin farklı pH, tuz derişimi ve sıcaklık koşullarında stabilitelelerini raporlayan pek çok çalışma bulunmaktadır (8,13,38,60,67,98,119). Lin ve ark. (60) tarafından biyosüpfektanın pH'ının 2-12, tuz derişiminin 0-100 g/L aralığında değiştirildiği koşullarda yüzey gerilimlerinin başlangıç ortam koşullarına göre daha yüksek düzeylerde düşürüldüğü bildirilen çalışma, bu tez çalışmasına oldukça yakın bulunmuştur. Aynı çalışmada genel olarak teze benzer şekilde, sıcaklığın 20-100°C arasında tutulduğu ortamlarda genel olarak biyosüpfektanın stabilitesini koruduğu belirtilmiştir (60). Başka bir çalışmada, biyosüpfektanın ortam pH'ının 8 olarak değiştirildiği koşulda suyun yüzey gerilimini yaklaşık 5 mN/m daha yüksek miktarda düşürmesi ve ayrıca 120°C'de 20-120 dakika süresince ısıtılma maruz bırakılan biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme stabilitesini koruması yönünden, bu çalışmanın tezde alınan sonuçları desteklediği bulunmuştur (38). Sen ve ark. (119) tarafından tuz derişiminin %2-10 ve pH'ın 2-10 olarak değiştirildiği tüm koşullarda ölçülen yüzey gerilimlerinin suyun başlangıç yüzey gerilimine göre daha düşük olduğunun raporlandığı çalışmada teze yakın sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak, aynı çalışmada 120°C'de 20-120 dakika boyunca uygulanan ısıtılma işlemin etkisiyle suyun yüzey gerilimlerinin daha yüksek miktarlarda düşürüldüğü bildirilmiştir.

Chooklin ve ark (98) tarafından yürütülen çalışma kapsamında ise biyosüpfektana 4-121°C'de uygulanan ısıtılma işlem sonucunda biyosüpfektanın yüzey

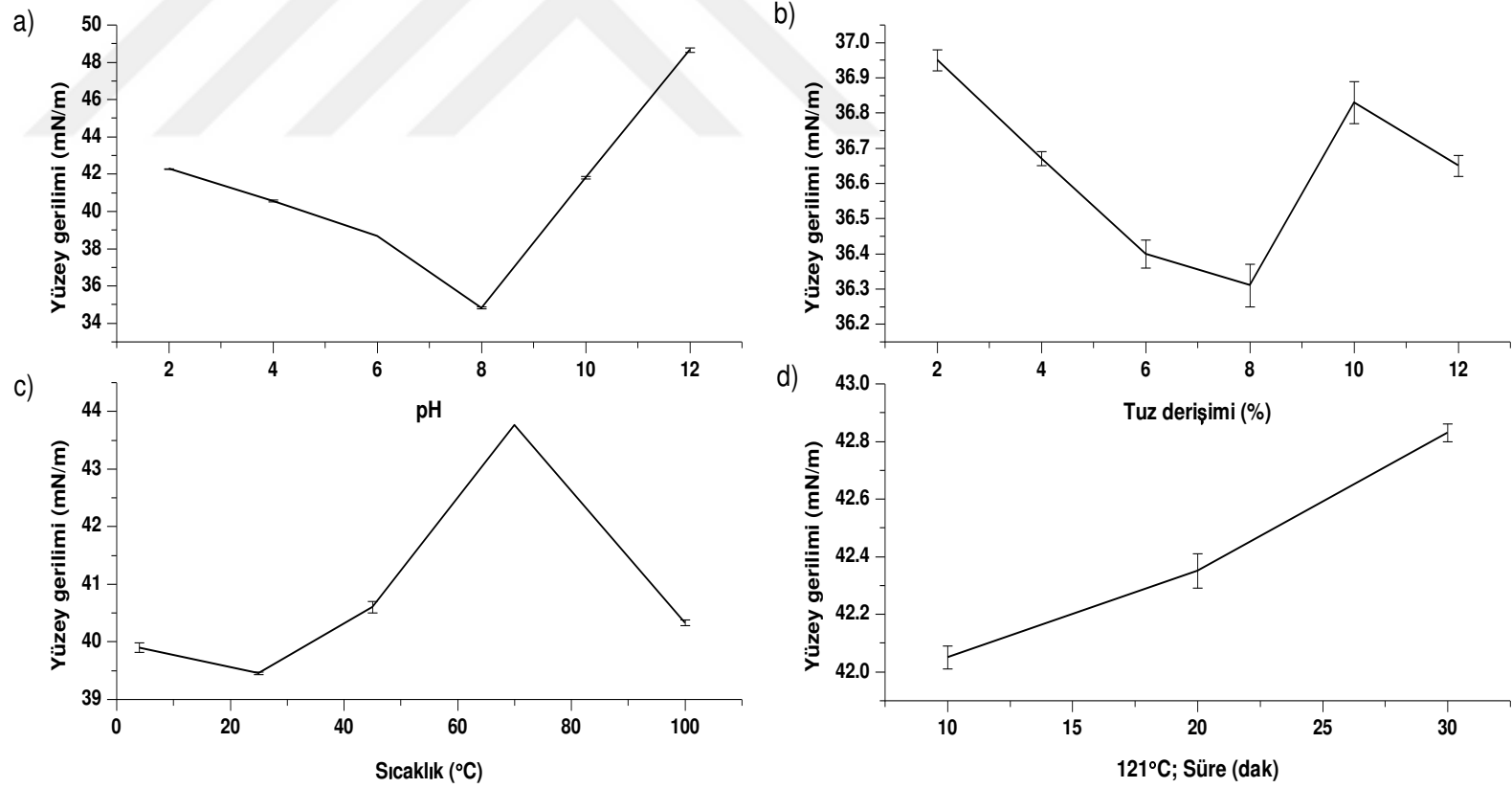
gerilimini düşürme stabilitesini genel olarak koruduğu ancak ortam pH'ının 2 ve 12, tuz derişiminin ise %12 ve üzerinde olacak şekilde değiştirildiği koşullardan biyosüpfektanın yüzey gerilimini düşürme kapasitesinin oldukça olumsuz etkilendiği aktarılmıştır. Genel olarak ortamın tuz derişimlerinin etkisiyle biyosüpfektanların misel büyüklüğü ve şeklinin değişmesinin biyosüpfektanların yüzey aktif stabilitelelerini de etkilemesi ve ayrıca asidik veya alkali pH koşullarında biyosüpfektanın presipitasyonuna bağlı olarak, tüm bu çalışmalarda verilen ortam koşulları için yüzey gerilimi sonuçlarının değişkenlik gösterebildiği ifade edilmektedir (67,98).

4.9.2 Biyosüpfektanın Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu çalışmada tanımlı besiyerinde üretilen ham biyosüpfektanın, *S. Enteritidis* NCTC 12694, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve biyosüpfektanın antibakteriyel etkisini gösteren grafikler Şekil 4.33.'te sunulmuştur.

Genel olarak, *S. Enteritidis* ve *E. coli* suşlarının biyosüpfektanın antibakteriyel etkilerine karşı daha fazla direnç gösterdiği ve bu nedenle bu iki bakterinin inhibisyon oranlarının *L. monocytogenes* suşuna göre düşük kaldığı saptanmıştır. Biyosüpfektanın 0.19-50 mg/mL aralığındaki tüm derişimleri *L. monocytogenes* ATCC 13932 inhibisyonunda yaklaşık %90 (%89.23-92.03) olarak en yüksek düzeyde etkili olmuştur. Bu derişimlerde biyosüpfektan kullanımı ile *S. Enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 suşları için ise sırasıyla %62.23-76.66 ve %45.83-58.34 düzeylerinde antibakteriyel etki sağlanmıştır (Şekil 4.34.).

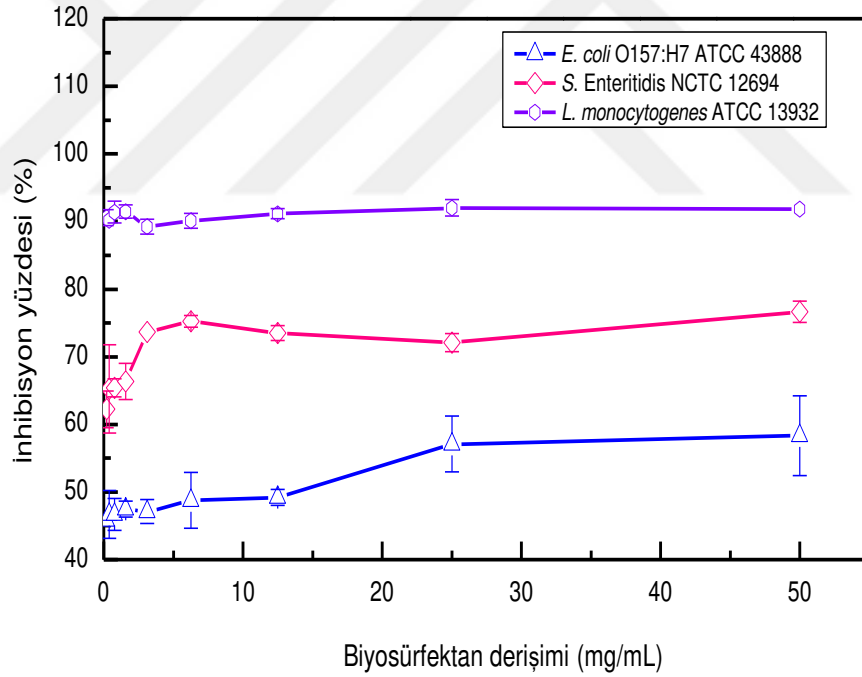
Ayrıca biyosüpfektanın sırasıyla 0.19-1.562 ve 3.125-50 mg/mL derişimlerinin *S. Enteritidis* suşuna antibakteriyel etkisini gösteren grafikler Şekil 4.34.a ve b'de, sırasıyla 0.19-3.125 ve 6.25-50 mg/mL derişimlerinin *E. coli* O157:H7 suşuna antibakteriyel etkisini gösteren grafikler ise Şekil 4.34.c ve d'de verilmiştir.



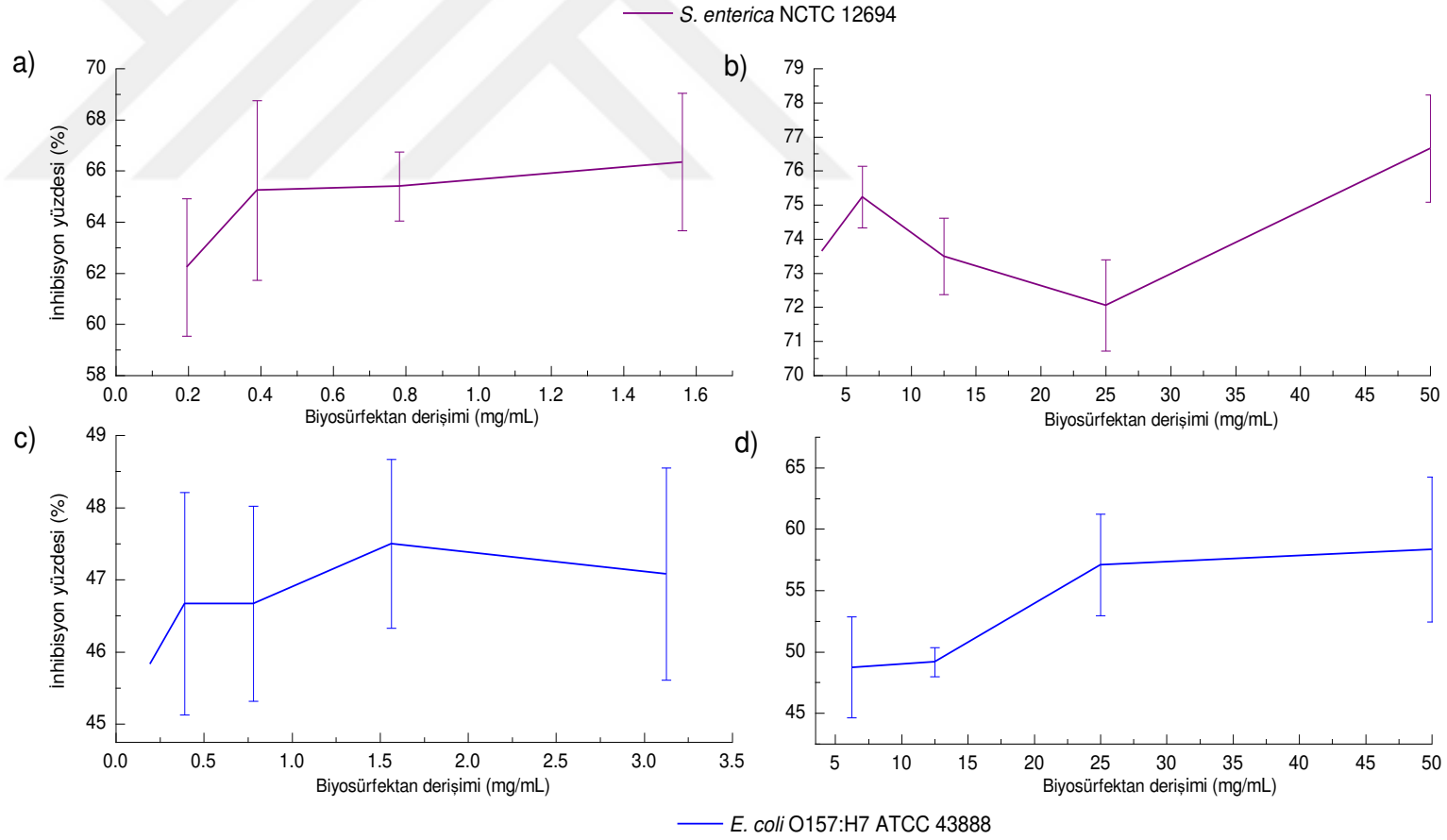
Şekil 4.32. Biyosürfektanın farklı pH (a), tuz derişimleri (b), sıcaklık (c) ve 121°C’de süre (d) koşulları altında suyun yüzey gerilimini düşürme stabiliteleeri

Biyosüpfektanın *S. Enteritidis* NCTC 12694 üzerine antibakteriyel etkisinin 0.19-1.562 mg/mL derişim aralığında % 62.23-66.35; 3.125-50 mg/mL derişimlerinde %72.06-76.66 düzeylerinde olduğu belirlenmiştir. Biyosüpfektanın *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 suşuna karşı antibakteriyel aktivitesinin ise daha zayıf olduğu görülmekte olup 0.19-3.125 mg/mL derişimleri için % 45.83-47.50; 6.25-50 mg/mL derişimlerinde ise %48.75-58.34 aralığında değışim gösteren düzeylerde inhibisyon sağlanmıştır.

Biyosüpfektanların antibakteriyel etkileri ile ilgili, literatürde *E. coli* MTCC 1687 ve *S. Typhimurium* NCTC 74 suşlarının minimum inhibisyonu için 12.5 mg/L (157), *E. coli* ATCC 29522 ve MTCC 1302 suşlarının minimum inhibisyonu için 2.60-4 mg/mL derişimlerinde biyosüpfektanların kullanıldığı çalışmalara rastlanmıştır (9,100).



Şekil 4.33. Ham biyosüpfektanın 0.019-50 mg/mL derişimlerinin *S. Enteritidis* NCTC 12694, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 türlerine karşı antibakteriyel etkileri



Şekil 4.34. Biyosüpfektanın 0.19-1.562 mg/mL (a) ve 3.125-50 mg/mL (b) derişimlerinin *S. Enteritidis* NCTC 12694 suşuna, 0.19-3.125 mg/mL (c) ve 6.25-50 mg/mL (d) derişimlerinin *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 suşuna karşı antibakteriyel etkileri

Teixeira Fernandes ve ark. (12) tarafından yürütülen bir çalışmada *S. Enteritidis* ATCC 564 ve *E. coli* EPEC 055 bakterilerinin sırasıyla yaklaşık %75-95 düzeylerinde inhibisyonu için %50 derişimde biyosürefektanın kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca 200 µg/mL derişiminde kullanılan bir biyosürefektanın *E. coli* suşunun gelişimini tamamıyla, *S. paratyphi* gelişimini %79 (11); başka bir biyosürefektanın ise 50 mg/mL derişiminin *E. coli* bakterisini %89 oranlarında inhibe ettiği (150) çalışmalar raporlanmıştır. Laktik asit bakterileri aracılığıyla üretilen biyosürefektanların antibakteriyel aktivitesinin inhibisyon zonu oluşumlarına göre belirlendiği çalışmada bu biyosürefektanların *E. coli* MTCC 723 ve *L. monocytogenes* MTCC 657 suşlarının inhibisyonu üzerine etkili olduğu Parvin ve ark. (158) tarafından rapor edilmiştir. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında tezde üretilen biyosürefektanın *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 ve *S. Enteritidis* NCTC 12694 suşlarına karşı sırasıyla %45.83-58.34 ve %62.23-76.66 olarak bulunan inhibisyon yüzdelerinin, yukarıda verilen antibakteriyel etki sonuçlarına göre daha düşük oranlarda kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, tezde *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşuna karşı yaklaşık %90 olarak en yüksek düzeyde antibakteriyel etki sağlanmış olmasına rağmen, literatürde bu suşun inhibisyon yüzdesinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanmadığından bu bakteri için bir literatür karşılaştırması yapılamamıştır.

Biyosürefektanlar antibakteriyel etkilerini genel olarak, bakterilerin hücre bütünlüğünü hasara uğratarak membranın hidrofobik karakteri ve geçirgenliğini değiştirmesi yoluyla, hücrenin elektrolitik ve fizyolojik dengesinin bozulması şeklinde göstermektedir (12). Genel olarak Gram pozitif bakterilerde sitoplazma membranının dışında kalın bir peptidoglukan tabakası bulunmasına rağmen, Gram negatif bakterilerin ince peptidoglukan ve dış membrandan oluşan yapısının, soforolipitlerin Gram negatif bakteri hücreleriyle etkileşimini kısıtladığı ifade edilmektedir. Ayrıca bakterilerin hücre yapılarındaki farklılığın etkisiyle Gram negatif bakterilerin negatif yükünün daha fazla olduğu ve bu bakterilerin daha düşük hidrofobik özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir (37).

Tez çalışmasında *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu aracılığıyla üretilen biyosürefektanın *L. monocytogenes* suşuna karşı gösterdiği antibakteriyel aktivitesinin *E. coli* ve *S. enterica* bakterilerine göre daha yüksek bulunmuş olması açısından tezde ulaşılan bu sonuçlar literatürü desteklemektedir. Silveira ve ark. (37) tarafından gerçekleştirilen çalışmada üretilen laktonik soforolipidin

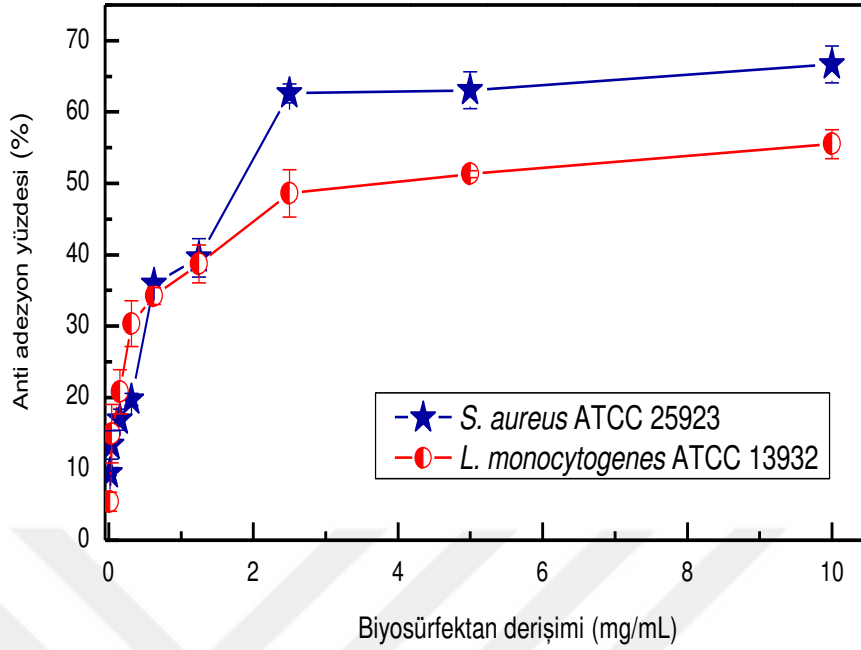
hidrofobik özelliğinin baskın olması dolayısıyla, Gram negatif bakterilerin soforolipitlerin oluşturduğu yüzey aktif özelliğinden daha düşük düzeyde etkilendikleri rapor edilmiştir. Bu sonuçları destekleyen başka bir çalışma kapsamında, *S. aureus* ve *B. subtilis* suşları için belirlenen minimum inhibisyon derişimleri, *K. pneumonia* ve *P. aeruginosa* suşlarının inhibisyon derişimlerinden daha düşük bulunmuştur (39).

4.9.3 Biyosürefektanın Anti Adezyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında tanımlı besiyerinde üretilen ham biyosürefektanın, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 türlerine karşı anti adezyon aktivitesi araştırılmıştır (Şekil 4.35.).

Şekil 4.35. incelendiğinde biyosürefektanın 0.019-10 mg/mL derişimlerinin, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* biyofilmi oluşumlarının önlenmesinde sırasıyla yaklaşık %9.50-67 ve %5.50-55.50 aralığında değişen düzeylerde etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca biyosürefektan derişimlerinin artması ile beraber genel olarak biyosürefektanın anti adezyon etkisinde artış sağlanmış ve biyosürefektanın 10 mg/mL olarak en yüksek derişiminde *S. aureus* biyofilmi üzerine anti adezyon etkisi en fazla %67 düzeyine ulaşmıştır. Biyosürefektanın *L. monocytogenes* biyofilmi oluşumunun engellenmesinde ise etkinliğinin genel olarak daha düşük olduğu ve 10 mg/mL biyosürefektanın %55.50 düzeyinde anti adezyon etkisi sağladığı belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında biyosürefektanın özellikle 2.50-10 mg/mL derişimlerinin kullanılmasıyla *S. aureus* kaynaklı biyofilmin oluşumu yaklaşık %62.50-67, *L. monocytogenes* biyofilmi ise yaklaşık %48.50-55.50 olarak daha yüksek düzeylerde önlenmiştir (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. Ham biyosüpfektanın 0.019-10 mg/mL derişimlerinin *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 türlerine karşı anti adezyon etkisi

Biyosüpfektanların anti adezyon (biyofilm oluşumunun önlenmesi) etkilerini hem tutundukları yüzeyin özelliğini hem biyofilm oluşumuna neden olan hücrelerin membran yükü ve iyon dengesini değiştirmesi yoluyla gösterdiği aktarılmaktadır. Başlıca herhangi bir yüzeye adsorbe olan biyosüpfektanlar hidrofilik ve hidrofobik bileşenleri bir arada taşıyan molekül yapıları sayesinde kaplandıkları yüzey ve biyofilm matriksi arasındaki yüzey geriliminin düşürülmesini sağlamaktadır (59,112). Ayrıca biyosüpfektanların anti adezyon etkilerini mikroorganizmaların ve biyosüpfektan kaplanmış yüzeylerin negatif yükünün birbirini itme kuvvetleri yoluyla sağladığı bildirilmiştir (59).

Tez çalışmasında maya aracılığıyla üretilen biyosüpfektanın *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşlarının anti adezyon etkileri, literatürde bakteri ve maya kaynaklı biyosüpfektanların anti adezyon fonksiyonlarının araştırıldığı bazı çalışmalarda ulaşılan sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda, biyosüpfektanların *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturmaya karşı gösterdikleri en yüksek anti adezyon yüzdeleri ve bu etkinin sağlandığı biyosüpfektan derişimleri sırasıyla %14-%70 (12); %65.90-

0.50 mg/mL (67); %73-25 mg/mL (150); %80-2000 ppm (59) ve %99-2 g/L (4) olarak rapor edilmiştir. Tüm bu çalışmalar kapsamında verilen hem biyosüpfektan derişimleri hem anti adezyon etkilerinin geniş bir aralıkta değişim göstermesi nedeniyle, tezde 10 mg/mL derişimde biyosüpfektanın kullanıldığı koşullarda, *S. aureus* ATCC 25923 kaynaklı biyofilmin oluşumuna karşı en yüksek %67 düzeyinde anti adezyon etkinin sağlanmış olmasının genel olarak literatürü desteklediği bulunmuştur. Biyosüpfektanların *L. monocytogenes* suşlarının oluşturduğu biyofilmlere karşı anti adezyon etkilerinin belirlendiği çalışmalarda, 1000 ppm derişiminde bir biyosüpfektanın kullanıldığı koşullarda biyofilm oluşumunun %91.64 (59); başka bir biyosüpfektanın %0.50 derişimi kullanıldığında ise %83.40 (111) oranlarında önlenendiği bildirilmiştir. Ancak tezde 10 mg/mL biyosüpfektanın kullanılmasıyla *L. monocytogenes* ATCC 13932 kaynaklı biyofilm oluşumunun en yüksek %55.50 düzeyinde önlenmesi nedeniyle, bu çalışmalarda üretilen biyosüpfektanların *L. monocytogenes* suşlarına karşı anti adezyon etkilerinin teze göre yüksek düzeylerde olduğu sonucuna ulaşılmıştır (59,111). Literatürde de ayrıca, biyosüpfektanların biyofilm matriksinin uzaklaştırılması üzerine etkileri araştırılmaktadır. Bu kapsamda yürütölen çalışmalarda, biyosüpfektanın 1000 ppm derişimde kullanılmasıyla *S. aureus* ve *L. monocytogenes* biyofilmlerinin sırasıyla %55.77 ve %59.44 (59) ve başka bir biyosüpfektanın 25 mg/mL derişiminde ise bu bakteriyel biyofilmlerin %83.10 ve %97.10 (61) olarak maksimum düzeylerde uzaklaştırıldığı bildirilmiştir.

4.9.4 Biyosüpfektanın Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında *Cyb. fabianii* suşu ile üretilen ham biyosüpfektanın kullanıldığı koşullarda *F. oxysporum* 38-4 ve *P. expansum* 11F suşlarının gelişiminin inhibe edilemediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, biyosüpfektanın *C. albicans*, *Penicillium* sp., *A. flavus* ve *A. niger* maya ve küflerine karşı antifungal etki sağlamadığı bildirilen bir çalışmaya rastlanmıştır (110). Bununla beraber maya kaynaklı bazı biyosüpfektanların *F. oxysporum*, *F. solani* ve *C. gloeosporioides* (39); *A. flavus*, *F. verticilliioides*, *C. truncatum*, *F. solani*, *A. niger* ve *C. sorghi* (12) ve *C. gloeosporioides*, *F. verticilliioides*, *F. oxysporum* f. sp. pisi, *C. cassicola* ve *T. rubrum* (119) küflerine karşı antifungal aktivitesinin raporlandığı çalışmalarda bulunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasının ilk aşamasında gıda kaynaklı yerli maya suşlarının biyosüpfektan üretim kapasiteleri araştırılmıştır. Tüm mayalar arasında, izolasyon kaynağı ırmık altı unu olan *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu biyosüpfektan üretimi ile ön plana çıkmıştır. Suş taramasının ardından, bu suş ile biyosüpfektan üretimi için uygun tanımlı besiyeri bileşiminin (karbon ve azot kaynakları) ve bu bileşenlerin optimum derişimlerinin belirlenmesine yönelik deneyler, besiyeri yüzey gerilimlerinin düşürülmesi parametresi esas alınarak çalkalamalı erlen koşullarında yürütölmüştür. Ayrıca biyosüpfektan üretimi amacıyla bazı gıda endüstrisi artıklarından yararlanılarak hazırlanan besiyerlerinin kullanım potansiyelleri ortaya konmuştur. Ardından hem optimum tanımlı hem artık bazlı besiyerlerinde *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi bir fermentör ortamında gerçekleştirilmiş ve biyosüpfektanların ekstraksiyonu, saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu ve kritik misel derişimlerinin belirlenmesi çalışmaları yürütölmüştür. Tez çalışmasında ayrıca optimum tanımlı besiyerinde üretilen ve ekstrakte edilen ham biyosüpfektanın bazı fonksiyonel özellikleri (farklı pH, tuz ve sıcaklık koşulları altında yüzey gerilimini düşürme stabiliteleri, antibakteriyel, anti adezyon ve antifungal aktiviteleri) araştırılmıştır.

1. Suş taraması çalışmaları kapsamında öncelikle tween 80 ve hidrokarbon agar testlerinde pozitif sonuç gösteren maya suşları kullanılarak fermentasyon deneyleri yürütölmüştür. Bu deneyler sonucunda genel olarak *W. anomalus* (MFKBHb-2, MFİAHb-4, MFİAD-1), *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu ve *G. silvicola* (M6 ve M15) suşları ön plana çıkmış ve en geniş yağ yayma çapı (6.8 cm) ve besiyerinde en düşük yüzey gerilimini (38.09 mN/m) oluşturan *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu biyosüpfektan üreticisi suş olarak seçilmiştir.
2. Biyosüpfektan üretimi amacıyla kullanılan tanımlı besiyeri bileşimindeki karbon kaynaklarının belirlenmesi çalışmaları sonucunda, hem besiyeri yüzey gerilimlerinin en yüksek düzeyde düşürölmesi hem substratların ekonomik olması esas alınarak glukoz ve ayçiçek yağının bir arada kullanılmasına karar verilmiştir. Bu besiyerinde *Cyb. fabianii* MİAU-1 ile üretilen biyosüpfektan, besiyerinin başlangıçta 63.31 mN/m olan yüzey gerilimini 37.04 mN/m'ye düşürmüştür. Ayrıca bu aşamada önemli bir

veri olarak, *Cyb. fabianii* MIAU-1 aracılığıyla biyosüpfektan üretimi için besiyeri bileşiminde mutlaka bir yağ kaynağının tek başına veya diğer bileşenler ile beraber bulunması zorunluluğu ortaya konmuştur.

3. Besiyeri bileşiminde bulunan azot kaynağının belirlenmesi için glukoz ve ayçiçek yağı içeren besiyerine ayrı ayrı 5 g/L oranında eklenen organik ve inorganik azot kaynaklarının biyosüpfektan üretimine etkileri değerlendirildiğinde, üre kullanımı ile besiyeri yüzey geriliminde 25.34 mN/m olarak maksimum düzeyde azalmanın sağlandığı belirlenmiştir. Ancak daha önceki biyosüpfektan üretimi deneylerinde, maya özütü (4 g/L) ve ürenin (1 g/L) bir arada kullanımı sonucu besiyeri yüzey geriliminin daha yüksek (26.27 mN/m) düzeyde düşürüldüğü bulunduğundan bu iki azot kaynağı bileşimde yer almıştır.
4. Tanımlı fermantasyon ortamında bulunan glukoz (%3-12), ayçiçek yağı (%2-10), maya özütü (1-3 g/L) ve üre (1-3 g/L) bileşenlerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimum derişimlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen biyosüpfektan üretimi deneylerinde, yüzey gerilimini maksimum 28.395 mN/m düzeyinde düşürmesi öngörülen besiyeri bileşimi (glukoz %10; ayçiçek yağı %10; maya özütü 3 g/L; üre 3 g/L) ortaya konmuştur. Bu optimum koşullar altında yürütülen doğrulama deneyinde ise, yüzey geriliminde azalma miktarı 28.25 mN/m olarak öngörülen yanıt değerine oldukça yakın bulunmuştur.
5. Tez çalışması kapsamında zeytin karasuyu, artık kızartma yağı, meyve ve sebze artıklarından (kabuk ve kabuklu posaları) yararlanılarak hazırlanan artık bazlı fermantasyon ortamlarının *Cyb. fabianii* ile biyosüpfektan üretiminde kullanım potansiyelleri açığa çıkarılmıştır. Bu kapsamda biyosüpfektan üretimi için %20 oranında zeytin karasuyu ve artık yağ (%10) bileşiminden oluşan ve tek başına %10 artık yağ içeren ortamların kullanıldığı koşullarda besiyeri yüzey gerilimlerinin en yüksek düzeyde ve sırasıyla 24.46 mN/m ve 24.75 mN/m olarak düşürüldüğü bulunmuştur. Bu artık bazlı ortamlardan yararlanılarak yürütülen biyosüpfektan üretimi deneylerinde ulaşılan yüzey gerilimlerinin, tanımlı optimum fermantasyon ortamı yüzey geriliminin 28.25 mN/m düzeyinde azaltıldığı sonucuna daha yakın olması dolayısıyla, *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu ile biyosüpfektan üretimi için hem zeytin karasuyu ve artık yağ bileşimi hem artık yağdan

başarıyla yararlanılabileceği ortaya konmuştur. Tüm bu deneylerde ayrıca diğer tüm artık bazlı besiyerlerinin yüzey gerilimlerinde belirli düzeylerde azalmalar sağlanmış ve tüm bu besiyerlerinin tanımlı fermantasyon ortamlarına ekonomik, çevre dostu ve genel olarak kuvvetli birer alternatif olarak ön plana çıktıkları sonucuna varılmıştır.

6. *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu aracılığıyla biyosüpfektanların üretimi hem optimum tanımlı hem gıda artığı bazlı (zeytin karasuyu %20, artık kızartma yağı %10) besiyerleri kullanılarak bir fermentör ortamında gerçekleştirilmiştir. Üretim sonrası yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucu bu iki besiyerinde sırasıyla 4.2110 ve 1.2395 g/L ham biyosüpfektan üretildiği bulunmuştur. Çalışmada ayrıca ham biyosüpfektan ekstraktlarında bulunan kalıntı yağların uzaklaştırılması amacıyla saflaştırma basamağı uygulanmış ve ardından her iki besiyerinde üretilen ham ve saf biyosüpfektanlar için biyokimyasal karakterizasyon ve kritik misel derişimlerinin belirlenmesi deneyleri yürütölmüştür.
7. Biyosüpfektanların yapısal karakterizasyonu çalışmaları FT-IR ve NMR spektrumu yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda biyosüpfektanların lipit kısmını oluşturan doymamış yağ asitleri, alifatik uzun yağ asidi ve hidrokarbon zincirlerini temsil eden molekül bağlarına; glukoz disakkaritlerinin varlığını gösteren hidroksil grubu ve glikozidik bağdaki eter molekülüne ve ayrıca her iki kısımdan gelen ester ve karboksilik asidi ifade eden karbonil gruplarına sahip oldukları belirlenmiştir. Tüm bu spektrum değerdendirmeleri ışığında, tez çalışması kapsamında üretilen biyosüpfektanların glikolipit (soforolipit) yapı taşıdıkları bulunmuştur. Bu çalışmalar kapsamında ayrıca ham ve saf biyosüpfektanların spektrumları birbirleriyle karşılaştırıldığında ham biyosüpfektana göre saf biyosüpfektanların spektrumunda lipit kısmının daha düşük yoğunlukta bulunduğunu gösteren piklerin yer alması veya bazı piklerin bulunmaması ise biyosüpfektanların etkin bir şekilde saflaştırıldığı sonucunu desteklemektedir.

8. Tez çalışmasında optimum tanımlı besiyerinde *Cyb. fabianii* ile üretilen ham ve saf biyosüpfektanın kritik misel derişimleri sırasıyla 42.68 ve 1290.27 mg/L; gıda artığı bazlı besiyerinde üretilen biyosüpfektanların kritik misel derişimleri ise sırasıyla 423.99 ve 1813.80 mg/L olarak bulunmuştur. Bu kapsamda ham biyosüpfektanlara uygulanan saflaştırma aşaması sonucunda, biyosüpfektanların suda çözünürlüğünün artmış olduğu düşünülmektedir. Bu kritik misel derişimlerinde, her iki besiyeri kullanılarak üretilen ham biyosüpfektanlar suyun yüzey gerilimini yaklaşık 40 mN/m'ye; saf biyosüpfektanlar ise yaklaşık 49.50 ve 52.50 mN/m'ye düşürmüşlerdir. Bu çalışmada ham biyosüpfektanlarda kalıntı olarak bulunan yağın da yüzey gerilimini düşürmesi etkilerinden dolayı ham biyosüpfektanların kullanıldığı koşullarda, suyun yüzey geriliminde daha yüksek miktarda azalma sağlandığı sonucuna varılmıştır.
9. Bu çalışmada tanımlı besiyeri kullanılarak üretilen ham biyosüpfektanın bazı ortam koşullarında yüzey gerilimi stabilitesinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Bu kapsamda pH'ı 8 olan ortamda ve ayrıca %2-12 tuz içeren tüm ortamlarda biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini sırasıyla 34.82 mN/m ve 36.31-36.95 mN/m düzeylerine düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır. Biyosüpfektanın suyun yüzey gerilimini normal ortam koşullarında 39 mN/m'ye düşürmesi dolayısıyla, yukarıda belirtilen koşullar altında biyosüpfektanın daha etkin bir yüzey gerilimi düşürme fonksiyonuna sahip olduğu açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmada ayrıca ortam pH'ının 12 olduğu koşulda biyosüpfektan aktivitesinin azalarak yüzey gerilimini 48.66 mN/m'ye düşürdüğü, kullanılan diğer tüm pH ve sıcaklık parametrelerinde ise genel olarak stabilitesinin korunduğu belirlenmiştir. Tüm bu nedenler ile, üretilen biyosüpfektanın aktif bir bileşen olarak herhangi bir uygulamada kullanımı söz konusu olduğunda bu ortam koşullarının yüzey gerilimi stabilitesine etkilerinin göz önünde bulundurulması önerilmektedir.
10. *Cyb. fabianii* kaynaklı biyosüpfektanın *S. enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis NCTC 12694, *E. coli* O157 ATCC 43888 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşlarının inhibisyonunda etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda 0.19-50 mg/mL derişimlerinde kullanılan biyosüpfektan *S. enterica* ve *E. coli* suşlarının gelişimlerini sırasıyla %62.23-76.66 ve

%45.83-58.34 oranlarında inhibe etmiştir. Çalışmada *S. enterica* suşuna yaklaşık %70, *E. coli* suşuna ise %50 şeklinde maksimuma yakın düzeylerde antibakteriyel aktivite sağlayan en düşük biyosüpfektan derişimleri sırasıyla 3.125 ve 6.25 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan tüm derişimlerde (0.19-50 mg/mL) *L. monocytogenes* gelişiminin yaklaşık %90 oranında önlenmesi nedeniyle, biyosüpfektanın özellikle bu suş üzerine antibakteriyel etkilerinden etkin bir şekilde yararlanılması önerilmektedir.

11. Çalışmada üretilen biyosüpfektanın, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşları için anti adezyon etki sağladığı ve bu bakterilerin biyofilm oluşturmalarını engellediği ortaya çıkarılmıştır. Bu biyosüpfektanın 10 mg/mL derişimde kullanıldığı koşullarda *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşlarının adezyonu sırasıyla maksimum %67 ve %55.50 oranlarında engellenmiştir. Bu çalışmada genel olarak 2.50-10 mg/mL derişimlerde biyosüpfektan kullanıldığında ise, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* biyofilmi oluşumları yaklaşık %63-67 ve %49-55.50 oranlarında engellendiğinden, her iki bakteri için en düşük 2.50 mg/mL derişimde biyosüpfektanın kullanılması önerilmektedir.
12. Bu çalışmada 0.2-10 mg/mL derişimlerinde kullanılan biyosüpfektanın *F. oxysporum* 38-4 ve *P. expansum* 11F küf suşlarının gelişimi üzerine etkileri araştırıldığında ise *Cyb. fabianii* kaynaklı bu biyosüpfektanın küfler için antifungal etki oluşturmadığı sonucuna ulaşılmıştır.
13. Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde öncelikle, *Cyb. fabianii* türünün biyosüpfektan üretiminde ilk kez kullanılmış olması, bu çalışmaya alanında rapor edilen çalışmalar arasında bir ilk olma niteliği kazandırmıştır. *Cyb. fabianii* MIAU-1 suşu kullanılarak tanımlı besiyeri ortamında üretilen ham biyosüpfektanın ortaya konan yüzey aktif özellikleri ve ayrıca antibakteriyel ve anti adezyon etkilerini kapsayan diğer fonksiyonel özelliklerinden faydalanılmasına yönelik çalışmaların daha da geliştirilebileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında özellikle zeytin karasuyu ve artık yağ olmak üzere, bazı artıkların biyosüpfektan üretiminde kullanılabileceğinin ortaya konmuş olması, proses ekonomisi ve sürdürülebilirlik açısından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.)

1. Kashif A, Rehman R, Fuwad A, Shahid MK, Dayarathne HNP, Jamal A, et al. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants—A critical review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2022;306:102718.
2. Varjani SJ, Upasani VN. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour Technol.* 2017;232:389–97.
3. Akbari S, Abdurahman NH, Yunus RM, Fayaz F, Alara OR. Biosurfactants – a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnol Res Innov.* 2018;2:81–90.
4. Balan SS, Kumar CG, Jayalakshmi S. Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochem.* 2016;51(12):2198–207.
5. Hentati D, Chebbi A, Hadrich F, Frikha I, Rabanal F, Sayadi S, et al. Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;167:441–9.
6. Kim JH, Oh YR, Han SW, Jang YA, Hong SH, Ahn JH, et al. Enhancement of sophorolipids production in *Candida batistae*, an unexplored sophorolipids producer, by fed-batch fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2021;44:831–9.
7. Ho To M, Wang H, Lam TN, Kaur G, Roelants SLKW, Sze C, et al. Influence of bioprocess parameters on sophorolipid production from bakery waste oil. *Chem Eng J.* 2022;429:132246.
8. Dong W, Qian X, Liu H, Li S, Xu L, Xu N, et al. Efficient production of acidic sophorolipid from rapeseed oil by *Candida bombicola*. *Biofuels, Bioprod Biorefining.* 2022;16(4):1050–61.
9. Archana K, Reddy KS, Parameshwar J, Bee H. Isolation and characterization of sophorolipid producing yeast from fruit waste for application as antibacterial agent. *Environ Sustain.* 2019;2:107–15.
10. Marcelino PRF, Peres GFD, Terán-Hilares R, Pagnocca FC, Rosa CA, Lacerda TM, et al. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Ind Crops Prod.* 2019;129:212–23.
11. Balan SS, Ganesh Kumar C, Jayalakshmi S. Physicochemical, structural and biological evaluation of Cybersan (trigalactomargarate), a new

glycolipid biosurfactant produced by a marine yeast, *Cyberlindnera saturnus* strain SBPN-27. *Process Biochem.* 2019;80:171–80.

12. Teixeira Fernandes de Andrade N, de Souza AC, Simões LA, Ferreira dos Reis GM, Souza KT, Schwan RF, et al. Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiol Res.* 2020;241:126571.
13. Derguine-Mecheri L, Kebbouche-Gana S, Djenane D. Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp.YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37:18.
14. Teixeira Souza KS, Gudiña EJ, Schwan RF, Rodrigues LR, Dias DR, Teixeira JA. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. *J Hazard Mater.* 2018;346:152–8.
15. Derguine-Mecheri L, Kebbouche-Gana S, Khemili-Talbi S, Djenane D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic *Cryptococcus* strain YLF isolated from crude oil. *J Pet Sci Eng.* 2018;162:712–24.
16. Al-Sweih N, Ahmad S, Khan S, Joseph L, Asadzadeh M, Khan Z. *Cyberlindnera fabianii* fungaemia outbreak in preterm neonates in Kuwait and literature review. *Mycoses.* 2019;62(1):51–61.
17. Cissé H, Kagambèga B, Sawadogo A, Tankoano A, Sangaré G, Traoré Y, et al. Molecular characterization of *Bacillus*, lactic acid bacteria and yeast as potential probiotic isolated from fermented food. *Sci African.* 2019;6:e00175.
18. Fernández PM, Viñarta SC, Bernal AR, Cruz EL, Figueroa LIC. Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere.* 2018;208:139–48.
19. Olajuyigbe FM, Adetuyi OY, Fatokun CO. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *Int J Biol Macromol.* 2019;125:856–64.
20. van Rijswijck IMH, Kruis AJ, Wolkers, Rooijackers JCM, Abee T, Smid EJ. Acetate-ester hydrolase activity for screening of the variation in acetate ester yield of *Cyberlindnera fabianii*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Sci Technol.* 2019;104:8–15.
21. Vieira IMM, Santos BLP, Ruzene DS, Silva DP. An overview of current research and developments in biosurfactants. *J Ind Eng Chem.* 2021;100:1–18.
22. Ribeiro BG, Guerra JMC, Sarubbo LA. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnol Prog.* 2020;36:e3030.
23. Shu Q, Lou H, Wei T, Liu X, Chen Q, Fricker G. Contributions of

- glycolipid biosurfactants and glycolipid-modified materials to antimicrobial atrategy: A Review. *Pharmaceutics*. 2021;13:227.
24. Liepins J, Balina K, Soloha R, Berzina I, Lukasa LK, Dace E. Glycolipid biosurfactant production from waste cooking oils by yeast: Review of substrates, producers and products. *Fermentation*. 2021;7:136.
 25. Varjani S, Rakholiya P, Ng Y, Taherzadeh MJ, Hao Ngo H, Chang J-S, et al. Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives. *Bioresour Technol*. 2021;319:124213.
 26. Eldin AM, Kamel Z, Hossam N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. *Microchem J*. 2019;146:309–14.
 27. Teixeira Souza KS, Gudiña EJ, Azevedo Z, de Freitas V, Schwan RF, Rodrigues LR, et al. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2017;154:373–82.
 28. Bezza FA, Chirwa EMN. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chem Eng J*. 2017;309:563–76.
 29. Nogueira Felix AK, Martins JJJ, Lima Almeida JG, Giro MEA, Cavalcante KF, Maciel Melo VM, et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2019;175:256–63.
 30. Santos EF, Teixeira MFS, Converti A, Porto ALF, Sarubbo LA. Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;17:142–50.
 31. Unás JH, de Alexandria Santos D, Azevedo EB, Nitschke M. *Brevibacterium luteolum* biosurfactant: Production and structural characterization. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;13:160–7.
 32. Chen C, Sun N, Li D, Long S, Tang X, Xiao G, et al. Optimization and characterization of biosurfactant production from kitchen waste oil using *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(15):14934–43.
 33. Gudiña EJ, Rodrigues AI, de Freitas V, Azevedo Z, Teixeira JA, Rodrigues LR. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresour Technol*. 2016;212:144–50.
 34. Gharaei S, Ohadi M, Hassanshahian M, Porsheikhali S, Forootanfar H. Isolation, optimization, and structural characterization of glycolipid biosurfactant produced by *Shewanella algae* marine isolate B12 and evaluation of its antimicrobial and anti-biofilm activity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022;194(4):1755–74.
 35. Hema T, Seghal Kiran G, Sajayyan A, Ravendran A, Gowtham Raj G,

- Selvin J. Response surface optimization of a glycolipid biosurfactant produced by a sponge associated marine bacterium *Planococcus* sp. MMD26. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;18:101071.
36. Haloi S, Medhi T. Optimization and characterization of a glycolipid produced by *Achromobacter* sp. to use in petroleum industries. *J Basic Microbiol*. 2019;59(3):238–48.
 37. Silveira VAI, Nishio EK, Freitas CAUQ, Amador IR, Kobayashi RKT, Caretta T, et al. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;21:101287.
 38. Sen S, Borah SN, Sarma H, Bora A, Deka S. Utilization of distillers dried grains with solubles as a cheaper substrate for sophorolipid production by *Rhodotorula babjevae* YS3. *J Environ Chem Eng*. 2021;9(4):105494.
 39. Kumari A, Kumari S, Prasad GS, Kumar Pinnaka A. Production of sophorolipid biosurfactant by insect derived novel yeast *Metschnikowia churdharensis* f.a., sp. nov., and its antifungal activity against plant and human pathogens. *Front Microbiol*. 2021;12:678668.
 40. Ganji Z, Beheshti-Maal K, Massah A, Emami-Karvani Z. A novel sophorolipid-producing *Candida keroseneae* GBME-IAUF-2 as a potential agent in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367(17):fnaa144.
 41. Nitschke M, Silva SS e. Recent food applications of microbial surfactants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(4):631–8.
 42. Vecino X, Rodríguez-López L, Gudiña EJ, Cruz JM, Moldes AB, Rodrigues LR. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *J Ind Eng Chem*. 2017;55:40–9.
 43. Vera ECS, de Azevedo PO de S, Domínguez JM, Oliveira RP de S. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. *Biochem Eng J*. 2018;133:168–78.
 44. Gaur VK, Sharma P, Sirohi R, Varjani S, Taherzadeh MJ, Chang JS, et al. Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresour Technol*. 2022;343:126059.
 45. Luna JM, Rufino RD, Jara AMAT, Brasileiro PPF, Sarubbo LA. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp*. 2015;480:413–8.
 46. Mnif I, Besbes S, Ellouze R, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi D. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis*

biosurfactant addition. Food Sci Biotechnol. 2012;21(4):1105–12.

47. Campos JM, Stamford TLM, Rufino RD, Luna JM, Stamford TCM, Sarubbo LA. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. Toxicol Reports. 2015;2:1164–70.
48. Campos JM, Stamford TLM, Sarubbo LA. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. Biodegradation. 2019;30(4):313–24.
49. Zouari R, Besbes S, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi-Aydi D. Cookies from composite wheat-sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. Food Chem. 2016;194:758–69.
50. Ribeiro BG, de Veras BO, dos Santos Aguiar J, Medeiros Campos Guerra J, Sarubbo LA. Biosurfactant produced by *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in cookie formulation. Electron J Biotechnol. 2020;46:14–21.
51. Camargo FP, de Menezes AJ, Tonello PS, Dos Santos ACA, Duarte ICS. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. FEMS Microbiol Lett. 2018;365(10):fny098.
52. Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. Process Saf Environ Prot. 2016;102:558–66.
53. Pele MA, Ribeaux DR, Vieira ER, Souza AF, Luna MAC, Rodríguez DM, et al. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. Electron J Biotechnol. 2019;38:40–8.
54. Mehetre GT, Dastager SG, Dharne MS. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. Sci Total Environ. 2019;679:52–60.
55. Jain RM, Mody K, Joshi N, Mishra A, Jha B. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. Int J Biol Macromol. 2013;62:52–8.
56. Kazemzadeh S, Emami-Karvani Z, Nafiseh |, Naghavi S, Emtiazi G. Production of surface-active sophorolipid biosurfactant and crude oil degradability by novel *Rhodotorula mucilaginosa* strain SKF2. J Surfactants Deterg. 2022;25:439–54.
57. Mohd Isa MH, Shamsudin NH, Al-Shorgani NKN, Alsharjabi FA, Kalil MS. Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. Food Biotechnol. 2020;34(1):1–24.
58. Sittisart P, Gasaluck P. Biosurfactant production by *Lactobacillus*

- plantarum* MGL- 8 from mango waste. J Appl Microbiol. 2022;132(4):2883–93.
59. Mendoza IC, Villavicencio-Vasquez M, Aguayo P, Montoya DC, Plaza L, Romero-Peña M, et al. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and application in cleaning out place system in a pilot sausages processing. Microorganisms. 2022;10:1518.
 60. Lin X, Zhou H, Zeng F, Jiang L, Okokon Atakpa E, Chen G, et al. A biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* sp.CC01 utilizing landfill leachate as nitrogen source and its broad degradation spectra of petroleum hydrocarbons. World J Microbiol Biotechnol. 2022;38:68.
 61. Sharma D, Saharan BS, Chauhan N, Procha S, Lal S. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. Springerplus. 2015;4:4.
 62. Sharma R, Singh J, Verma N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. Biocatal Agric Biotechnol. 2018;16:(132–9).
 63. Vigneshwaran C, Sivasubramanian V, Vasantharaj K, Krishnanand N, Jerold M. Potential of *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolated from crude oil contaminated soil for biosurfactant production and its optimization studies. J Environ Chem Eng. 2018;6(4):4347–56.
 64. Loeto D, Jongman M, Lekote L, Muzila M, Mokomane M, Motlhanka K, et al. Biosurfactant production by halophilic yeasts isolated from extreme environments in Botswana. FEMS Microbiol Lett. 2021;368:fnab146.
 65. Hirlekar S, Abhyankar I, Kane K, Trimukhe K, Prabhune A, Nisal A. Green antibacterial molecules: Sophorolipids with varying fatty acid chain. Trends in Biomater Artif Organs. 2021;35(5):431–7.
 66. Hirata Y, Igarashi K, Ueda A, Lelyn Quan G. Enhanced sophorolipid production and effective conversion of waste frying oil using dual lipophilic substrates. Biosci Biotechnol Biochem. 2021;85(7):1763–71.
 67. Cheffi M, Maalej A, Mahmoudi A, Hentati D, Marques AM, Sayadi S, et al. Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties. Bioorg Chem. 2021;109:104724.
 68. Solaiman DKY, Ashby RD, Crocker NV. High-titer production and strong antimicrobial activity of sophorolipids from *Rhodotorula bogoriensis*. Biotechnol Prog. 2015;31(4):867–74.
 69. Adekilekun Jimoh A, Lin J. Bioremediation of contaminated diesel and motor oil through the optimization of biosurfactant produced by *Paenibacillus* sp. D9 on waste canola oil. Bioremediat J. 2020;24(1):21–40.
 70. Prudence Ntshingila N, Adekilekun Jimoh A, Lin J. Production and

characterisation of a biosurfactant based on *Acinetobacter* sp. V2 and its potential use for environmental applications. *Int J Environ Stud*. 2021;79(6):1099–122.

71. Moshtagh B, Hawboldt K, Zhang B. Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. *Can J Chem Eng*. 2021;99(11):2386–97.
72. Kim J-H, Oh Y-R, Hwang J, Kang J, Kim H, Jang Y-A, et al. Valorization of waste-cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics. *Waste Manag*. 2021;124:195–202.
73. Wen Thio C, Huei Lim W, Kalsom Md Shah U, Phang L-Y. Palm kernel fatty acid distillate as substrate for rhamnolipids production using *Pseudomonas* sp. LM19. *Green Chem Lett Rev*. 2022;15(1):83–92.
74. da Fontoura ICC, Saikawa GIA, Silveira VAI, Pan NC, Amador IR, Baldo C, et al. Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2020;63:e20180568.
75. Chebbi A, Franzetti A, Duarte Castro F, Gomez Tovar FH, Tazzari M, et al. Potentials of winery and olive oil residues for the production of rhamnolipids and other biosurfactants: A step towards achieving a circular economy model. *Waste Biomass Valori*. 2021;12:4733–43.
76. Jyoti Das A, Kumar R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresour Technol J*. 2018;260:233–40.
77. Mohanty SS, Koul Y, Varjani S, Pandey A, Ngo HH, Chang JS, et al. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microb Cell Fact*. 2021;20:120.
78. Ghasemi A, Moosavi-Nasab M, Setoodeh P, Mesbahi G, Yousefi G. Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* shu1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Sci Rep*. 2019;9:5287.
79. Paraszkievicz K, Bernat P, Kuśmierska A, Chojniak J, Płaza G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *J Environ Manage*. 2018;209:65–70.
80. Gaur VK, Gupta P, Tripathi V, Thakur RS, Regar RK, Patel DK, et al. Valorization of agro-industrial waste for rhamnolipid production, its role in crude oil solubilization and resensitizing bacterial pathogens. *Environ Technol Innov*. 2022;25:102108.
81. Nazareth TC, Zanutto CP, Maass D, de Souza AAU, de Arruda Guelli

- Ulson de Souza SM. Bioconversion of low-cost brewery waste to biosurfactant: An improvement of surfactin production by culture medium optimization. *Biochem Eng J.* 2021;172:108058.
82. Moshtagh B, Hawboldt K, Zhang B. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environ Technol.* 2018;40(25):3371–80.
 83. Zargar AN, Lymperatou A, Skiadas I, Kumar M, Srivastava P. Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from *Bacillus* sp. IITD106. *J Hazard Mater.* 2022;423(Part B):127201.
 84. Radha P, Suhazsini P, Prabhu K, Jayakumar A, Kandasamy R. Chicken tallow, a renewable source for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* MTCC9520, and its application in silver nanoparticle synthesis. *J Surfactants Deterg.* 2019;23:119–35.
 85. Ni'matuzahroh, Sari SK, Trikurniadewi N, Ibrahim SNMM, Khiftiyah AM, Abidin AZ, et al. Bioconversion of agricultural waste hydrolysate from lignocellulolytic mold into biosurfactant by *Achromobacter* sp. BP(1)5. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;24:101534.
 86. Goswami M, Deka S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2019;178:285–96.
 87. Charles Oluwaseun A, Julius Kola O, Mishra P, Ravinder Singh J, Kumar Singh A, Singh Cameotra S, et al. Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. *Sustain Chem Pharm.* 2017;6:26–36.
 88. Mishra A, Sawood GM, Gautam SB, Trivedi RK. Optimization of process inputs for the synthesis of waste rice bran oil isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424 biosurfactant using response surface methodology for oil recovery applications. *Bioresour Technol Reports.* 2021;14:100653.
 89. Sun S, Wang Y, Zang T, Wei J, Wu H, Wei C, et al. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresour Technol.* 2019;281:421–8.
 90. Patowary K, Das M, Patowary R, Kalita MC, Deka S. Recycling of bakery waste as an alternative carbon source for rhamnolipid biosurfactant production. *J Surfactants Deterg.* 2019;22(2):373–84.
 91. Phulpoto IA, Wang Y, Qazi MA, Hu B, Ndayisenga F, Yu Z. Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading *Pseudomonas* sp. S2WE isolated from freshwater lake. *Bioresour Technol.* 2021;323:124601.
 92. Lima FA, Santos OS, Pomella AWW, Ribeiro EJ, de Resende MM. Culture medium evaluation using low-cost substrate for biosurfactants lipopeptides production by *Bacillus amyloliquefaciens* in pilot bioreactor. *J Surfactants*

Deterg. 2020;23:91–8.

93. Rastogi S, Tiwari S, Ratna S, Kumar R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its synergistic application in biosorption of Pb^{2+} . *Bioresour Technol Reports*. 2021;15:100706.
94. Maria Monteiro Vieira I, Lohanny Passos Santos B, Santos Silva L, Castor Ramos L, Rodrigues de Souza R, Santos Ruzene D, et al. Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28:68957–71.
95. Hu J, Luo J, Zhu Z, Chen B, Ye X, Zhu P, et al. Multi-scale biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using tuna fish waste as substrate. *Catalysts*. 2021;11(4):456.
96. Mnif I, Bouallegue A, Bouassida M, Ghribi D. Surface properties and heavy metals chelation of lipopeptides biosurfactants produced from date flour by *Bacillus subtilis* ZN15: optimized production for application in bioremediation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2022;45:31–44.
97. Ostendorf TA, Silva IA, Converti A, Sarubbo LA. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. *J Biotechnol*. 2019;295:71–9.
98. Chooklin CS, Maneerat S, Saimmai A. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(2):624–45.
99. Segovia V, Reyes A, Rivera G, Vázquez P, Velazquez G, Paz-González A, et al. Production of rhamnolipids by the *Thermoanaerobacter* sp. CM-CNRG TB177 strain isolated from an oil well in Mexico. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(14-15):5833–44.
100. Zampolli J, De Giani A, Di Canito A, Sello G, Di Gennaro P. Identification of a novel biosurfactant with antimicrobial activity produced by *Rhodococcus opacus* R7. *Microorganisms*. 2022;10(2):475.
101. Poonguzhali P, Rajan S, Parthasarathi R, Srinivasan R, Kannappan A. Optimization of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* using rice water and its competence in controlling *Fusarium* wilt of *Abelmoschus esculentus*. *South African J Bot*. 2021;In Press, Corrected Proof.
102. Deepika K V., Ramu Sridhar P, Bramhachari P V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2015;4(4):608–15.
103. Anjum F, Gautam G, Edgard G, Negi S. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresour Technol*. 2016;213:262–9.
104. Kumar A, Singh SK, Kant C, Verma H, Kumar D, Singh PP, et al.

- Microbial biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants*. 2021;10(9): 1472.
105. Markande AR, Patel D, Varjani S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresour Technol*. 2021;330:124963.
 106. Aytar Çelik P, Manga EB, Çabuk A, Banat IM. Biosurfactants' potential role in combating COVID-19 and similar future microbial threats. *Appl Sci*. 2021;11(1): 334.
 107. de Freitas Ferreira J, Vieira EA, Nitschke M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food Res Int*. 2019;116:737–44.
 108. Kourmentza K, Gromada X, Michael N, Degraeve C, Vanier G, Ravallec R, et al. Antimicrobial activity of lipopeptide biosurfactants against foodborne pathogen and food spoilage microorganisms and their cytotoxicity. *Front Microbiol*. 2021;11:561060.
 109. Rani M, Weadge JT, Jabaji S. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil well batteries with antimicrobial activities against food-borne and plant pathogens. *Front Microbiol*. 2020;11:64.
 110. Sakr EAE, Ahmed HAE, Abo Saif FAA. Characterization of low-cost glycolipoprotein biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* 60 FHE isolated from cheese samples using food wastes through response surface methodology and its potential as antimicrobial, antiviral, and anticancer activities. *Int J Biol Macromol*. 2021;170:94–106.
 111. de Araujo LV, Guimarães CR, Marquita RL da S, Santiago VMJ, de Souza MP, Nitschke M, et al. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*. 2016;63:171–8.
 112. Tambone E, Marchetti A, Ceresa C, Piccoli F, Anesi A, Nollo G, et al. Counter-acting *Candida albicans-Staphylococcus aureus* mixed biofilm on titanium implants using microbial biosurfactants. *Polymers*. 2021;13(15):2420.
 113. Singh AK, Sharma P. Disinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* strain SDS21. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2020;185:110514.
 114. Carvalho D, Menezes R, Chitolina GZ, Kunert-Filho HC, et al. Antibiofilm activity of the biosurfactant and organic acids against foodborne pathogens at different temperatures, times of contact, and concentrations. *Braz J Microbiol*. 2022;53(2):1051–64.
 115. Ceresa C, Fracchia L, Williams M, Banat IM, Díaz De Rienzo MA. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. *J Biotechnol*. 2020;309:34–43.

116. Yalçın HT, Ergin-Tepebaşı G, Uyar E. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *J Basic Microbiol.* 2018;58(9):782–92.
117. Sharma P, Sangwan S, Kaur H. Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. *Environ Monit Assess.* 2019;191(9): 531.
118. Kaur J, Kaur S, Kumar M, Krishnan P, Kaur J, Priya Minhas A. Studies on production, optimization and machine learning-based prediction of biosurfactant from *Debaryomyces hansenii* CBS767. *Int J Environ Sci Technol.* 2022;19:8465–78.
119. Sen S, Borah SN, Bora A, Deka S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb Cell Fact.* 2017;16:95.
120. Ashish, Das MD. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. *J Pet Sci Eng.* 2018;170:40–8.
121. Ma X, Meng L, Zhang H, Zhou L, Yue J, Zhu H, et al. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(1):77–100.
122. Jezierska S, Claus S, Van Bogaert I. Yeast glycolipid biosurfactants. *FEBS Lett.* 2018;592(8):1312–29.
123. Wang H, Roelants SLKW, To MH, Patria RD, Kaur G, Lau NS, et al. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream utilization. *J Chem Technol Biotechnol.* 2019;94(4): 999–1007.
124. Jiménez-Peñalver P, Rodríguez A, Daverey A, Font X, Gea T. Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: state of the art and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2019;18:413–35.
125. Yang L, Li Y, Zhang X, Liu T, Chen J, Wei L, et al. Metabolic profiling and flux distributions reveal a key role of acetyl-CoA in sophorolipid synthesis by *Candida bombicola*. *Biochem Eng J.* 2019;145:74–82.
126. Silveira Pinto MI, Medeiros J, Guerra C, Meira HM, Sarubbo LA, Moura De Luna J. A biosurfactant from *Candida bombicola*: Its synthesis, characterization, and its application as a food emulsions. *Foods.* 2022;11(4):561.
127. Germano Almeida D, de Cássia Freire Soares da Silva R, Morais Meira H, Pinto Ferreira Brasileiro P, José Silva E, Moura Luna J, et al. Production, characterization and commercial formulation of a biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP0996 and its application in decontamination of

petroleum pollutants. *Process*. 2021;9(5):885.

128. Meneses DP, Gudiña EJ, Fernandes F, Gonçalves LRB, Rodrigues LR, Rodrigues S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiol Res*. 2017;204:40–7.
129. Fonseca TC de S, Souza AF de, Santos PN dos, Silva PH da, Rodriguez DM, Costa LO, et al. Sustainable production of biosurfactant by *Issatchenkia orientalis* UCP 1603 using renewable substrates. *Res Soc Dev*. 2022;11(4):e16111427174.
130. da Silva Chaves F, Pereira Brumano L, Ricardo Franco Marcelino P, Silvério da Silva S, Durães Sette L, das Graças de Almeida Felipe M. Biosurfactant production by Antarctic-derived yeasts in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate. *Biomass Conv Bioref*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01578-8>.
131. Alfian AR, Watchaputi K, Sooklim C, Soontorngun N. Production of new antimicrobial palm oil-derived sophorolipids by the yeast *Starmerella riodocensis* sp. nov. against *Candida albicans* hyphal and biofilm formation. *Microb Cell Fact*. 2022;21:163.
132. Gaur VK, Regar RK, Dhiman N, Gautam K, Srivastava JK, Patnaik S, et al. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresour Technol*. 2019;285:121314.
133. Brumano LP, Antunes FAF, Souto SG, dos Santos JC, Venus J, Schneider R, et al. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. *Bioresour Technol*. 2017;243:264–72.
134. Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H, et al. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microb Pathog*. 2019;127:12–20.
135. Kaur G, Wang H, To MH, Roelants SLKW, Soetaert W, Lin CSK. Efficient sophorolipids production using food waste. *J Clean Prod*. 2019;232:1–11.
136. Jadhav JV., Pratap AP, Kale SB. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. *Process Biochem*. 2019;78:15–24.
137. Santos DKF, Meira HM, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochem*. 2017;54:20–7.
138. Akgul O, Erginkaya Z, Konuray G, Turhan EU. Antibacterial and anti-adhesive properties of biosurfactants produced by yeasts from food waste.

Fresenius Environ Bull. 2019;28(5):4283–92.

139. Ribeiro BG, Campos Guerra JM, Sarubbo LA. Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:434.
140. Santos DKF, Brandão YB, Rufino RD, Luna JM, Salgueiro AA, Santos VA, et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2014;3(3):48–57.
141. Mendes RM, Francisco AP, Carvalho FA, Dardouri M, Costa B, Bettencourt AF, et al. Fighting *S. aureus* catheter-related infections with sophorolipids: Electing an antiadhesive strategy or a release one? *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2021;208:112057.
142. Yılmaz F, Ergene A, Yalçın E. Süt fabrikası atık sularından izole edilen mikroorganizmalardan elde edilen biyosüpfektanların bitki patojeni *Fusarium* türleri üzerine antifungal etkilerinin araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2014;13(3):214–20.
143. Shatila F, Uyar E, Yalçın HT. Screening of biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica* strains and evaluation of their antibiofilm and anti-adhesive activities against *Salmonella enterica* ser. Enteritidis biofilms. *Microbiology.* 2021;90(6):839–47.
144. Ceresa C, Rinaldi M, Tessarolo F, Maniglio D, Fedeli E, Tambone E, Caciagli P, et al. Inhibitory effects of lipopeptides and glycolipids on *C. albicans-Staphylococcus* spp. dual-species biofilms. *Front Microbiol.* 2021; 11:545654.
145. Nguyen BVG, Nagakubo T, Toyofuku M, Nomura N, Utada AS. Synergy between sophorolipid biosurfactant and SDS increases the efficiency of *P. aeruginosa* biofilm disruption. 2020;36:6411–20.
146. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4626–8.
147. Mycology [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/yeast-like-fungi/cyberlindnera-fabianii>
148. Carota E, Petruccioli M, D’Annibale A, Gallo AM, Crognale S. Orange peel waste–based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104:4617–28.
149. Hussain SMS, Kamal MS, Solling T, Murtaza M, Fogang LT. Surface and thermal properties of synthesized cationic poly(ethylene oxide) gemini surfactants: the role of the spacer. *RSC Adv.* 2019; 9:30154–63.
150. Vecino X, Rodríguez-López L, Ferreira D, Cruz JM, Moldes AB, Rodrigues LR. Bioactivity of glycolipopeptide cell-bound biosurfactants against skin pathogens. *Int J Biol Macromol.* 2018;109:971–9.
151. Rodrigues AI, Gudiña EJ, Abrunhosa L, Malheiro AR, Fernandes R,

- Teixeira JA, et al. Rhamnolipids inhibit aflatoxins production in *Aspergillus flavus* by causing structural damages in the fungal hyphae and down-regulating the expression of their biosynthetic genes. *Int J Food Microbiol.* 2021;348:109207.
152. Kaur H, Sangwan S, Sharma P, Singh S. Biosurfactant production prospects of a Gram-negative bacterium-*Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* BK34. *Environ Monit Assess.* 2022; 194(5):374.
 153. Moya Ramírez I, Tsaousi K, Rudden M, Marchant R, Jurado Alameda E, García Román M, et al. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour Technol.* 2015;198:231–6.
 154. Mereghetti P, Corsetto PA, Cremona A, Rizzo AM, Doglia SM, Ami D. A Fourier transform infrared spectroscopy study of cell membrane domain modifications induced by docosahexaenoic acid. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj.* 2014;1840(10):3115–22.
 155. Mnif I, Rajhi H, Amir Bouallegue ·, Trabelsi N, Ghribi D. Characterization of lipopeptides biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus subtilis* ZNI5: Potential environmental application. *J Polym Environ.* 2022;30:2378–91.
 156. Bide Y, Fashapoyeh MA, Shokrollahzadeh S. Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination. *Sci Rep.* 2021;11:17068.
 157. Chauhan V, Dhiman VK, Kanwar SS. Purification and characterization of a novel bacterial lipopeptide(s) biosurfactant and determining its antimicrobial and cytotoxic properties. *Process Biochem.* 2022;120:114–25.
 158. Parvin A, Adhikary R, Guha S, Kumar Mitra P, Mandal V. Antibiofilm and antimicrobial activity of biosurfactants from two *Lactiplantibacillus pentosus* strains against food and topical pathogens. *J Food Process Preserv.* 2022;46(10):e16927.

7. EKLER

EK 1 Biyosüpfektan Üretimi Amacıyla Taranan Maya Suşları

Tez çalışmasında biyosüpfektan üretimi amacıyla taranan maya suşları, izolat numaraları ile birlikte Tablo 7.1.'de sunulmuştur.

Tablo 7.1. Biyosüpfektan üretimi amacıyla taranan maya suşları

Maya türü	İzolat numaraları
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MKD-3, MFKH-3, MFKHa-1, MFKHb-3, MFKS-3, MAD-4, MFAHc-1, MFAH-1, MFAHa-4, MFAHb-2, MFAD-2, MFAS-2, MKBD-3, MFKBH-3, MFKBHb-1, MFKBHc-1, MFKBD-2, MFKBD-4, MFKBS-1, MİAD-3, MİAHa-2, MİAHb-3, MİAS-2
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MP-2, MP-3, MKD-2, MAH-1, MFKBH-2-1, MFKBHc-2, MFKBD-1, MİAH-1, MİAH-3, MİAD-1, MİAH-5, MİAHa-1, MİAHb-1, MİAHc-1, MİAHc-2, MİAD-2
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	MKH-3, MKD-1, MFKS-1, MFKS-2, MAH-3, MAD-3, MFAHa-2, MFAS-1, MKBH-5, MKBD-1, MFKBH-1, MİAH-2, MİAD-2, MİAS-1, MİAS-4, MİAHa-4, MİAHb-2, MİAS-3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LP-6, LP-8, MKH-2, LFKHc-6, MAH-5, LFAD-5, LFAD-4, LKBH-6, LKBD-7, LFKBD-1, MFKBD-3, LFKBHc-1, LFKBH-7, LFKBHb-10, MİAH-5, MİAH-6, LİAHb-4
<i>Candida krusei</i>	LP-2, LP-11, LKH-1, LKD-1, LKD-5, LKD-6, LFKH-1, LFKHc-1, LFKD-2, LFKH-7, LFAHb-5, LFAD-6, LFKBH-8, LFKBHc-8, MFKBH-1, LİAHb-9, LİAH-4, *M57
<i>Candida lusitanae</i>	LKH-4, MFKH-1, LFKH-6, LAD-1, LFAHb-1, LFAD-7, LFAS-2, LFKBH-4, LFKBH-8, LFKBHc-2, MİAH-6
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	MFKBHb-2, MİAHb-4, MİAD-1
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	MİAU-1, LİAU-6
<i>Trichosporon asahii</i>	*M1

Tablo 7.2. Devam ediyor

<i>Pichia kluyveri</i>	MFAHa-3, MFAHb-1
<i>Geotrichum silvicola</i>	*M6, *M15
<i>Debaryomyces hansenii</i>	**31/1
<i>Candida inconspicua</i>	*M3
<i>Candida kefyr</i>	LFAH-6, LFKBH-9
<i>Candida parapsilosis</i>	LFİAHb-8
<i>Candida guilliermondii</i>	*M54
<i>Candida valida</i>	MFKBHa-2-2, MFİAH-8
<i>Candida catenulata</i>	*M25, *M73, *M77
<i>Candida zeylanoides</i>	*M16
<i>Candida famata</i>	*M4, *M8, *M18, *M22, *M32, *M41, *M51, *M63, *M83, *M92, *T7, *T52, *T169
<i>Candida tropicalis</i>	*M2, *M43, *M55
<i>Candida lipolytica</i>	*K1

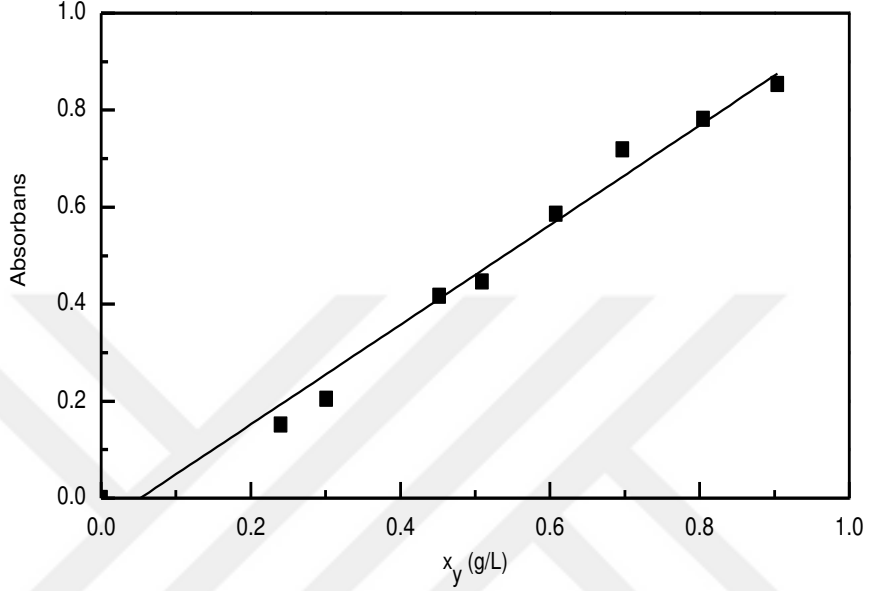
*işaretli olan maya suşlarının izolasyon kaynağı peynirdir (M, Mihaliç; T, Tulum; K, Keş peyniri).

**işaretli olan suşun izolasyon kaynağı baldır.

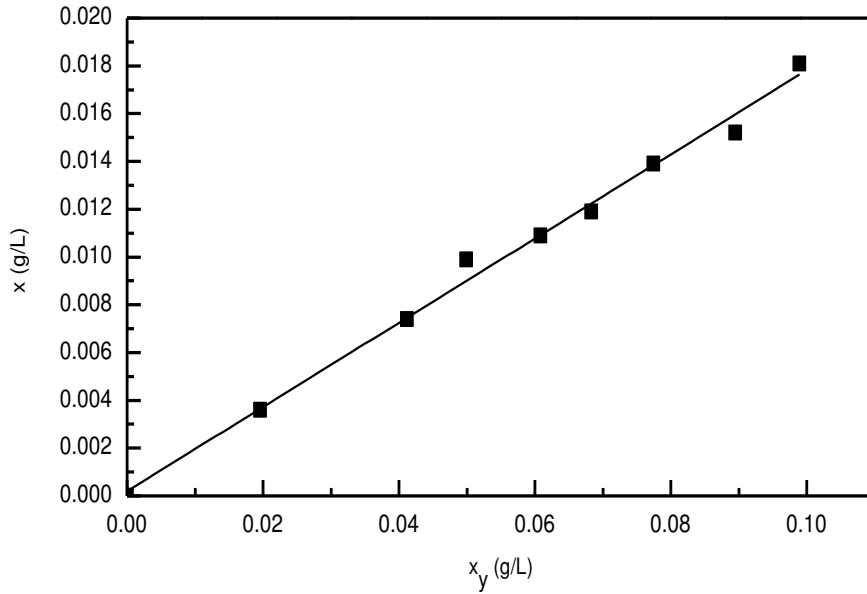
*işareti bulunmayan maya suşlarının izolasyon kaynağı kızılıcık tarhanasıdır.

EK 2 *Cyb. fabianii* MİAU-1 Suşunun Absorbans-Yaş Ağırlık ve Kuru Ağırlık-Yaş Ağırlık Çalışma Doğruları

Maya suşu için oluşturulan absorbans-yaş ağırlık ve kuru ağırlık-yaş ağırlık çalışma doğruları Şekil 7.1. ve 7.2.'de verilmiştir.



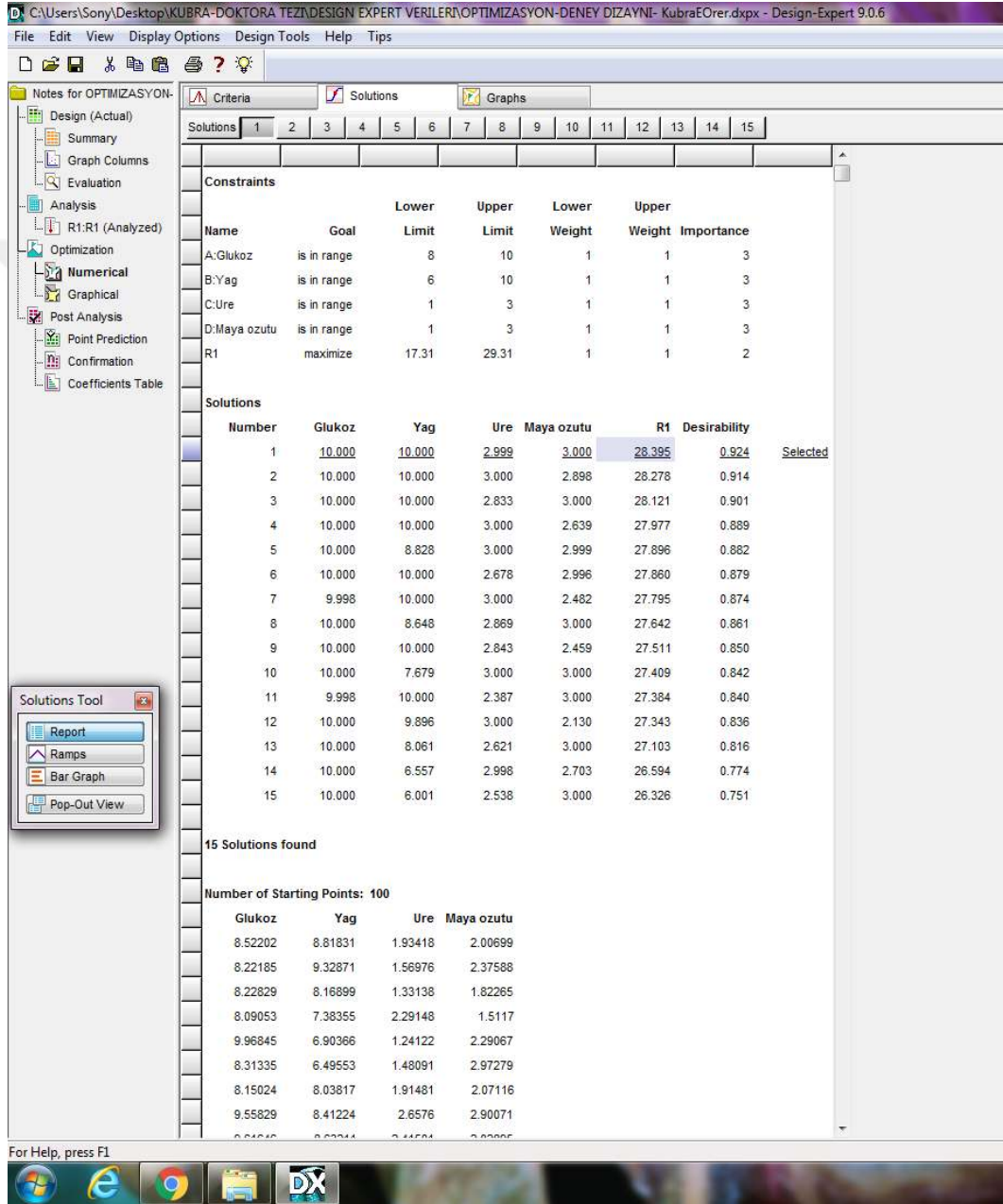
Şekil 7.1. *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu için, absorbans - yaş ağırlık çalışma doğrusu ($\lambda = 660$ nm; $y = 1.02751x - 0.05347$; $R^2 = 0.981$)



Şekil 7.2. *Cyb. fabianii* MİAU-1 suşu için, kuru ağırlık - yaş ağırlık çalışma doğrusu ($y = 0.17626x + 0.000199135$; $R^2 = 0.992$)

EK 3 İstenen Hedefe Ulaşma Fonksiyonu ile Yapılan Nümerik Optimizasyonda Elde Edilen Çözümler

İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu ile yapılan nümerik optimizasyonda elde edilen çözümler Şekil 7.3.'te verilmiştir.



Şekil 7.3. Design Expert® 9.0.6 programında nümerik optimizasyonda elde edilen çözümlere ait görüntü