

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gizem DAĞÇOBANI

***Streptococcus thermophilus*'un MELAS BESİ ORTAMINDA
BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Streptococcus thermophilus*'un MELAS BESİ ORTAMINDA
BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gizem DAĞÇOBANI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / / 2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
ÜYE

Dr.Öğ. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No: 8771

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2017-8771

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Streptococcus thermophilus*'un MELAS BESİ ORTAMINDA BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gizem DAĞÇOBANI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Yıl: 2019, Sayfa: 47
Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Dr. Öğr. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada, *Streptococcus thermophilus*'un şeker fabrikası atık maddesi olan melasta geliştirilip biyosüpfektan üretimi incelenmiştir. Elde edilen biyosüpfektanın *Escherichi acoli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkileri belirlenmiş ve bu patojenler üzerine adezyonu engelleme özellikleri araştırılmıştır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre; melasta geliştirilen *Streptococcus thermophilus*'tan elde edilen biyosüpfektan madde miktarı 2 paralel örnekte sırasıyla 1220 mg/L, 1190 mg/L, kontrol deney amaçlı MRS broth ortamında geliştirilen *Streptococcus thermophilus*'tan elde edilen biyosüpfektan madde miktarı ise 1180 mg/Lolarak hesaplanmıştır. Melasta ortalama 1205 mg/Lbiyosüpfektan üretimi gerçekleşmiştir. Emülsifikasyon indeksi değeri, 1 saat sonunda %48,75oranında bulunmuş, bu değeri 1 hafta sonunda %32,5 'a düşmüştür. Yüzey gerilim ölçümü ise paralel örnek ölçümLerine göre en düşük %41,2 oranında bulunmuştur. Antimikrobiyel aktivite ölçüm sonuçlarında, *Eshierichia coli* üzerine minimum inhibasyon konsantrasyonu (MİK) değeri 10 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*üzerine 2,5 mg/mL ve 5mg/mL konsantrasyon değeriinde MİK değeriine ulaşılmıştır.*Staphylococcus aureus* üzerine yapılan denemelerde *Streptococcus thermophilus* örneği ile 10 mg/mLminimum letal konsantrasyon (MLK) değeriine ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, besiyeri ortamı olarak değerlendirilen melasta, *Streptococcus thermophilus*'tanelde edilen biyosüpfektanların yüzey gerilimini düşürdüğü ve gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel ve antiadezyon etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

AnahtarKelimeler: Biyosüpfektan, *Streptococcus thermophilus*, Melas Antibakteriyel, Adezyon

ABSTRACT

MSc. THESIS

DETERMINATION OF THE PRODUCTION PROPERTIES OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* IN THE MOLASSES ENVIRONMENT

Gizem DAĞÇOBANI

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2019, Pages: 47
Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Asst. Prof. Dr. Emel TURHAN

In this study, the production of biosurfactant in molasses, *Streptococcus thermophilus*, was investigated. The antibacterial effects of the obtained biosurfactant on pathogenic bacteria such as *Echerichiacoli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aruginosa* were determined and their inhibition properties were investigated.

According to the results obtained from the research; The amount of biosurfactant obtained from *Streptococcus thermophilus* developed in molasses was 1220 mg / l, 1190 mg / l respectively in parallel samples, and the amount of biosurfactant obtained from *Streptococcus thermophilus* developed for control experimental purposes was 1180 mg / l.

Approximately 1205 mg / l biosurfactant was produced in molasses.

Emulsification index value was found to be 48.75% at the end of 1 hour and decreased to 32.5% at the end of 1 week. Surface tension measurement was the lowest 41.2% compared to parallel sample measurements. In antimicrobial activity measurement results, MİK value on *Esherichia coli* was 10 mg / mL. MICs of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were obtained at a concentration of 2.5 mg / mL and 5mg / mL. In the experiments on *Staphylococcus aureus*, 10 mg / mL MLK was reached with *Streptococcus thermophilus* sample.

As a result, it was determined that biosurfactants obtained from *Streptococcus thermophilus* reduce the surface tension and have antimicrobial and antiadhesion effects against food pathogens.

Key words: Biosurfactant, *Streptococcus thermophilus*, Molasses, Antibacterial, Adhesion

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Süpfektanlar, yüzey gerilimini düşüren ve emülsiyon oluşturabilen bileşiklerdir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosüpfektanlar ise, biyolojik orijinli olup, iç yüzey gerilimini azaltabilen antibakteriyel, antifungal ve antiviral özellikler gösterebilen amfilik bileşiklerdir. Biyosüpfektanlar farklı ortamlarda bakteri, maya ve küfler tarafından sentezlenmektedir.

Biyosüpfektanların, kimyasal süpfektanlara göre sahip oldukları birçok avantajlı özellikleri vardır. Bu avantajlar; biyolojik olarak parçalanabilme, düşük toksisite gösterme, yenilenebilir maddelerden elde edilebilme, ekstrem sıcaklık, pH ve tuzlulukta stabilitesini koruma gibi özellikler göstermeleridir. Biyosüpfektanlar gıda sanayi, sağlık, kozmetik, çevre korunması, petrol/petrokimya, ilaç üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Biyosüpfektanların gıda endüstrisinde özellikle emülsifiyer, köpürtme, ıslatma, çözücü, adezyonu engelleyici ve antimikrobiyel ajan olarak kullanılmaları yaygındır.

Daha önce yapılan çalışmalarda farklı mikroorganizmalar kullanılarak besi ortamı olarak melastan yararlanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada besi ortamı olarak melas olarak değerlendirilmiş ve *Streptococcus thermophilus* geliştirilmiştir. Elde edilen biyosüpfektanın, bazı patojenler üzerine antimikrobiyel etkileri ve adezyonu engelleyici özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, melaspepton ve yeast agar ilavesi ile besiyeri haline getirilmiş ve bakteri kültürü (*Streptococcus thermophilus*) inoküle edilmiştir. Üretim sonunda yağ yayma tekniği ile ortamda biyosüpfektan varlığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, ksilene karşı emülsifikasyon değeri belirlenmiş ve Ring metodu ile yüzey gerilimi değeri tespit edilmiştir. Daha sonra biyosüpfektan etil asetat ile çöktürme yöntemiyle kaba olarak elde edilmiştir. Elde edilen biyosüpfektan örnekleri ile gıda patojenleri olan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyel (MİK, MLK) ve antiadezyon (mikrotiter plak okuyucu) testleri uygulanmıştır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre; melasta ve paralel örnekte geliştirilen *Streptococcus thermophilus*'tan elde edilen biyosüpfektan madde miktarı sırasıyla 1220 mg/l, 1190 mg/l, ortalama ise 1205 mg/L kontrol deney amaçlı MRS broth ta geliştirilen *Streptococcus thermophilus*'tan elde edilen biyosüpfektan madde miktarı ise 1180 mg/l olarak hesaplanmıştır. Yağ yayma tekniğı sonuçları değerlendirildiğinde ortalama açılan zon çapları melasta ve paralel örnekte sırasıyla; 3,4 cm ile '++++', 3,2 cm ile '++++', mrs brothta ise 4,6 cm ile '++++' olarak ölçülmüştür.

Emülsifikasyon indeks değeri, 1 saat sonunda %48,75 oranında bulunmuş, bu değeri 1 hafta sonunda %32,5'a düşmüştür. Yüzey gerilim ölçümü ise melasta yapılan paralel örnek ölçümlerine göre en düşük %41,2 oranında bulunmuştur. Tüm örnekler incelendiğinde emülsifikasyon stabilitesinin 1 hafta süreyle korunabildiğı gözlemlenmiştir. Sadece su ve ksilen kullanılarak yapılan negatif kontrol örneğinde beklenildiğı gibi hiçbir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlara göre melas besiyerinin *Streptococcus thermophilus*'tan biyosüpfektan eldesi için oldukça uygun olabileceğı kanıtlanmıştır.

Antimikrobiyel aktivite ölçüm sonuçlarında, *Escherichia coli* üzerine Minimum inhibasyon konsantrasyon (MIK) değeri 10 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyon değerinde minimum inhibasyon konsantrasyon değerine (MIK) ulaşılmıştır. *Staphylococcus aureus* üzerine yapılan denemelerde *Streptococcus thermophilus* örneğı ile 10 mg/mL minimum letal konsantrasyon (MLK) değerine ulaşılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli yardım ve katkılarını, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA' ya, değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Hüseyin ERTEN ve Dr. Öğr. üyesi Emel ÜNAL TURHAN hocalarıma, değerli Ar. Gör. Gözde KONURAY'a, tezime katkı sağlayan arkadaşlarım ZERRİN ASLAN, ÖZGE AKGÜL, ONUR SEVİNDİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçteki en büyük destekçim sevgili annem NALAN DAĞÇOBANI'na ve burda ismini belirtmediğim bütün arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na, Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e, maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: FYL-2017-8771) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİÇALIŞMALAR	5
2.1. Biyosürefektanların Genel Özellikleri.....	5
2.2. Biyosürefektanların Sınıflandırılması.....	6
2.3. Gıda Atıklarının Biyosürefektan Üretiminde Kullanımı	8
2.4. Biyosürefektanların Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	9
2.5. Biyosürefektanların Antiadezyon Ajan Olarak Kullanımı	10
2.6. Biyosürefektanların Antimikrobiyel Aktivitesi	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Mikroorganizmalar	15
3.1.2. Besiyerleri.....	15
3.1.3. Melas.....	15
3.2. Metod.....	15
3.2.1. Mikroorganizma Kültürlerinin Geliştirilmesi ve Saklanması.....	15
3.2.2. Melasın Hazırlanması	16
3.2.2.1. Melasta Toplam Şeker Tayini	17
3.2.3. Biyosürefektan Üretimi	18
3.2.4. Biyosürefektan Madde Miktarının Belirlenmesi ve Ekstraksiyonu....	18

3.2.5. Biyosüpfektan Ekstraksiyonu	19
3.2.6. Yağ Yayma Tekniğı ile Biyosüpfektan Varlığının Saptanması.....	19
3.2.7. Biyosüpfektanın Emülsifikasyon İndeks ve Yüzey Gerilimi Ölçümü	20
3.2.8. Patojen Bakteri Kùltürlerinin Geliştirilmesi ve Biyosüpfektanların Antibakteriyel Özelliğinin Belirlenmesi	21
3.2.9. Mikrotiter Plak Kullanılarak Adezyon Kinetiğinin Belirlenmesi ...	22
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	25
4.1. Melas Ortamının İçeriğı.....	25
4.2. Yağ Yayma Tekniğı ile Biyosüpfektan Varlığının Tespiti.....	26
4.3. Biyosüpfektanların Emülsifikasyon İndeks Değerleri ve Yüzey Gerilimi Ölçümleri	27
4.4. Biyosüpfektan Madde Miktarının Belirlenmesi	30
4.5. Biyosüpfektanların Antibakteriyel Özelliğinin Belirlenmesi	31
4.6. Mikrotiter Plak Kullanarak Adezyon Kinetiğinin Belirlenmesi	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Zon Çaplarının Değerlendirilme Aralıkları	20
Çizelge 4.1. Yağ yayma tekniği ile biyosüpfektan varlığının saptanması	26
Çizelge 4.2. <i>Streptococcusthermophilus</i> elde edilen biyosüpfektanların yağ yayma sonuçları (cm)	26
Çizelge 4.3. <i>Streptococcus thermophilus</i> için emülsifikasyon indeks değerleri (%).....	28
Çizelge 4.4. Emülsifikasyon değeri istatistiksel ortalama	28
Çizelge 4.5. Biyosüpfektanların Ring Metoduna göre yüzey gerilimi değerleri.....	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Rotary evaporatör ile biyosüpfektan ekstraksiyonu	19
Şekil 3.2.	Optik Temas Açısı/Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (Td1-Clauda) İle Ring Metodu.....	21
Şekil 3.3.	ELİSA mikrotiter plak okuyucu ile adezyon kinetiğı analizi	22
Şekil.4.1.	Melas ve MRS broth ortamında yağ yayma analizi	26
Şekil.4.2.	Biyosüpfektan örneklerinin emülsifikasyon indeks analizi	28
Şekil.4.3.	Melasta <i>Streptococcus thermophilus</i> 'tan elde edilen biyosüpfektan örneğinin mikrotiter plakta hazırlanması.....	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
atm	: Atmosfer
BS	: Biyosürefektan
E	: Emülsifikasyon indeksi
EI	: Emülsifikasyon indeksi
g	: Dakikada devirsayısı
mN/m	: Milli Newton permeter
KMK	: Kritik misel konsantrasyonu
MIK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MLK	: Minimum letal konsantrasyonu
OD	: Optik Dansite
rpm	: Dakikada devirsayısı
sp.	: Species (tür, tekil)
spp.	: Species (tür, çoğul)
h/h	: Hacim/Hacim(volume/volume)
a/h	: Ağırlık/Hacim(weight/volume)
a/a	: Ağırlık/Ağırlık(weight/weight)



1. GİRİŞ

Gıda üretimi ve işlenmesi sırasında çok miktarda atık madde ortaya çıkmaktadır. Bu atıklar direkt olarak çevreye verildiğinde çevre kirliliğine neden olmaktadır. Biyokütle ve besinlerin kaybının önüne geçebilmek, enerjinin idareli kullanılması, ekonomik kayıpları en aza indirme, biyodönüşümü sağlamak gibi nedenlerden dolayı, atıkların işlenmesi her geçen yıl önem kazanmaktadır. Çevre kirliliği ve ekonomik kayıplar, gıda atıklarının değerlendirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur.

Atık maddelerin besiyortamı karbon kaynağı olarak kullanılması yoluyla biyoteknolojik yöntemlerle üretilen bileşiklerden biri de biyosüpfektanlardır (Wong ve ark., 2004). Mikroorganizmaları kullanarak hem atık maddeleri değerlendirip çevreye vereceği zararı en aza indirmek hem de insanların yaşamı için yararlı ürünler elde etmek amaçlı ‘biyosüpfektan’ madde elde edilmesi atık maddelerin üretimini yapan fabrikalarda tekrar değerlendirilmesi ve çevre kirlilik yükünün azaltılması açısından oldukça önemlidir (Kahyaoğlu ve Konar, 2006).

Son yıllarda bu atık maddelerden en yaygın olarak şeker fabrikası atığı melas biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Atık maddelerin biyoteknolojik olarak değerlendirilmesinde, mikroorganizmalar, hem sahip oldukları yüzey aktif özellikler hem de atık maddelerdeki karbon kaynağı gibi yararlı maddeleri kullanarak iyi ürünlere dönüştürebilmeleri önemli rol oynamaktadır.

Süpfektanlar, sıvılar, katılar ve gazlar arasındaki arayüzlerde yüzey ve arayüzey gerilimini azaltabilen, böylece suda veya diğer sıvılardaki emülsiyonlar olarak kolayca karışmasını veya dağılmasını sağlayan yüzey aktif bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle çevre için toksiktir ve biyolojik olarak çözünmez. Üretim süreçlerindeki biyobirikim ve yan ürünleri çevresel olarak tehlikeli olabilir (Banat ve ark., 2000).

Biyosürfektanlar; mikroorganizmalar tarafından üretilen sürfektanlar olup, hidrofilik ve hidrofobik kısım içeren (hidrofobik kısımları yağ asitleri içerirken hidrofilik kısımları fosfat, karboksilat, karbonhidrat, aminoasit, siklik peptit veya alkol içeren), moleküller arasında yüzey ve iç yüzey gerilimini azaltabilen amfilik bileşiklerdir (Banat ve ark., 2000; Makkar ve ark., 2002; Dyke ve ark., 1991).

Biyosürfektanlar, doğada bakteri, maya ve küflerde, özellikle suyla karışmayan bir substrat üzerinde büyüyen ve gıda kaynağı olarak kullanılan bakterilerde bulunurlar. Bu bakteriler, bakterilerin su ile karışmayan malzemeyi adsorbe etmesine, emülsifleştirmesine, ıslatmasına, dağıtmasına veya çözünmesine yardımcı olan bir yüzey aktif ürünü üreterek ve kullanarak bu substratlar üzerinde beslenmeye adapte olmuşlardır (Healy ve ark., 1996).

Biyosürfektanlar, kimyasal sürfektanlarla aynı mekanizmaları kullanarak yüzey ve yüzeyler arası gerilimi azaltan karakteristik özelliklere sahiptirler. Biyosürfektanlar, kimyasal sürfektanlara göre sahip oldukları birçok avantajlı özellikleri nedeniyle endüstriyel alanda daha çok tercih edilmektedirler. Bu avantajlar; biyolojik olarak parçalanabilme, düşük toksisite gösterme, yenilenebilir maddelerden elde edilebilme, yüksek miktarda ve düşük maliyetle üretilebilir olma, yüksek özgünlük, ekstrem sıcaklık, pH ve tuzlulukta yüksek aktivite göstermeleridir (Yalçın ve ark., 2009). Yapısal farklılıkları (glidikolipidler, lipopeptidler, yağ asitleri gibi), düşük toksisiteleri, biyolojik olarak parçalanabilmelerinden dolayı bu moleküller yaygın bir şekilde kozmetik, ilaç, gıda sanayinde emülsifiyer, ıslatıcı-nemlendirici, koruyucu madde ve deterjan olarak kullanılmaktadırlar (Yılmaz ve ark., 2010).

Melas, peyniraltı suyu, kesilmiş süt, bitkisel yağlar gibi endüstriyel atıkların biyosürfektan üretiminde kullanılabileceği belirtilmektedir (Sıdal, 1997; Mata-Sandoval ve ark., 1999; Nitschke ve ark., 2004; Maneerat, 2005; Rashedi ve ark., 2005; Guo-liang ve ark., 2005; Kahyaoğlu ve Konar, 2006; Thaniyavarn ve ark., 2006; Raza ve ark., 2007).

Melas, şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür ve diğer şeker kaynaklarına

kiyasla düşük fiyatı ve sükrozun yanı sıra fermentasyon süreci için değerli olan mineraller, organik bileşikler ve vitaminleri içerdiği için iyi bir besi ortamı oluşturmaktadır (Makkar ve Cameotra,1997; Patel ve Desai, 1997).Melas şeker pancarından şeker üretiminin son aşaması olan kristallendirmede, kristalleşmeyen koyu kahve renkli şurup şeklindeki süzütüdür. Her 100 kg şeker pancarından yaklaşık olarak 4 kg kadar melas açığa çıkmaktadır. Bileşiminde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, koyu renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik maddeler ile malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler bulunur. Genel olarak melasta % 48-50 sukroz içerikli şeker, % 9-12 şeker olmayan organik madde, % 2-4 protein, % 1,5-5 potasyum, % 0,4-0,8 kalsiyum, % 0,06 magnezyum, % 0,6-2 fosfor, 1-3 mg/kg biyotin, 15-55 mg/kg pantotenik asit, 2500-6000 mg/kg inositol ve 1,8 mg/kg tiyamin bulunur (Makkar ve Cameotra, 1997; Kahyaoğlu, 1999).

Streptococcus thermophilus genelde yoğurt starter bakterileri olarak kullanılan ve yoğurt üretiminden sorumlu olan laktik asit bakterisidir (Yılmaz ve Temiz, 2003).Laktik asit bakterileri gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Laktik asit bakterileri gıdalarda bazı patojenlerin gelişimini inhibe edebilme özelliklerinden dolayı da insan sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptirler (Schleifer ve ark., 1995). Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri *Firmicutes* filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. *Streptococcus thermophilus* spor oluşturmeyen ve katalaz negatif olan laktik asit bakterilerinin önemli cinsleri arasında yer almaktadır (Dinçer ve ark., 2009).

Laktik asit bakterilerinin farklı metabolik yollarla şekeri fermente etme ve diasetil, asetoin, bakteriyosin, biyosüpfektan gibi diğer ürünleri oluşturma becerisi vardır. Glikoz yerine karbon kaynağı olarak sakkaroz ya da laktoz kullanmak hücrelerin bir diğer metabolik yol kullanmalarına neden olur ve böylece üretilen biyosüpfektan topluluğu çeşitlenmiş olur. (Rodriguez ve ark., 2006b).

Laktik asit bakterilerinin bazı türlerinin biyosüpfektan üretici suşlar olduğu ve biyosüpfektanlar için bilinen en önemli rollerden birinin bunların diğer

mikrobiyel türler üzerindeki negatif etkileri olduğu bildirilmiştir (Uehara ve ark., 2006).

Gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla da biyosüpfektanların antimikrobiyel özelliklerinden faydalanılabilmektedir. Süpfaktin aracılığıyla gıdakaynaklı *Bacillus cereus* sporlarının yüzey yapılarına zarar vererek parçalanması (Huang ve ark., 2007), iturin ile kombine antifungal olarak kullanılması başarılı sonuçlar vermiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda besi ortamı olarak melas kullanılarak *Streptococcus thermophilus*'dan biyosüpfektan üretilmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle, bu araştırmada besi ortamı olarak şeker fabrikası atığı melas ve MRS besiyeri ortamları kullanılmıştır.

Bu çalışmada, gıda atık maddesi olan melasın besiyeri haline dönüştürülerek biyoteknolojik fayda sağlamak amacıyla kullanılması, melasta biyosüpfektan üretimi gerçekleştirerek antimikrobiyel ve patojenler üzerine adezyon önleyici etkisinin belirlenmesi, bu amaç doğrultusunda belirli gıda patojenlerinin (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) yüzeye yapışmasının engellenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyosürfektanların Genel Özellikleri

Sürfektanlar ve emülgatörler, petrol, ilaç, kozmetik ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır. Bu bileşiklerin çoğu kimyasal olarak sentezlenir ve sadece son birkaç on yılda biyolojik kökenli yüzey aktif moleküllerin tanınlanması söz konusudur. Şu anda, biyo yüzey aktif maddeler, yüksek üretim maliyetlerinden dolayı kimyasal yüzey aktif maddeler ile rekabet edememektedir. Biyo-yüzey aktif maddeler kolayca biyolojik olarak parçalanabildiğinden ve yenilenebilir ve daha ucuz alt tabakalardan üretildiklerinden, kimyasal olarak sentezlenmiş karşı kısımlarını değiştirebilirler (Patel ve Desai, 1997).

Biyosürfektanlar genelde karbonhidrat, yağ veya hidrokarbonlu ortamda aerobik mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Genel olarak nötr veya anyonik yapıda bileşiklerdir (Mulligan, 2005).

Hidrofilik kısımları genellikle şekerler, aminoasitler, karboksilik asit grupları gibi polar fonksiyonel gruplardan oluşmaktadır. Hidrofobik kısım ise tipik olarak β -hidroksi yağ asitlerinin hidrokarbon zinciridir (Uyar ve Yalçın, 2013).

Biyosürfektanlar, kimyasal süfektanlarla aynı mekanizmaları kullanarak yüzey ve yüzeyler arası gerilimi azaltan karakteristik özelliklere sahiptirler. Biyosürfektanların, kimyasal süfektanlara göre birçok avantajlı özellikleri vardır. Bu avantajlar; biyolojik olarak parçalanabilme, düşük toksisite gösterme, yenilenebilir maddelerden elde edilebilme, yüksek miktarda ve düşük maliyetle üretilbilir olma, yüksek özgünlük, ekstrem sıcaklık, pH ve tuzlulukta yüksek aktivite gibi özelliklerdir (Yalçın ve ark., 2009).

Biyosürfektanlar, patojen mikroorganizmaların yüzeylere yapışmasını engellemenin yanı sıra, bazı biyosürfektanların antibakteriyel, antifungal, antiviral aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Kahyaoğlu, 2008).

2.2. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması

Biyosüpfektanlar, kimyasal yapıları ele alındığında 5 sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

1. Glikolipidler
2. Lipopeptidler ve Lipoproteinler
3. Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler
4. Polimerik Biyosüpfektanlar
5. Partiküler Biyosüpfektanlar

Glikolipitler, lipopeptitler ve lipoproteinler, yağ asitleri, nötral yağlar, fosfolipitler, polimerik ve partikül lipidler gibi kimyasal yapılarla doğada bulunurlar (Makkar ve Cameotra, 2002).

Moleküler ağırlıklarına göre; glikolipitler, fosfolipitler ve lipopeptitleri içeren düşük moleküler ağırlıklı biyosüpfektanlar ile amfipatik polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ya da bu polimerlerin kompleks karışımlarını içeren yüksek moleküler ağırlıklı biyosüpfektan/biyoemülsifiyer olarak iki sınıfa ayrılırlar (Guo-liang, Yue-ting, Xin-ping ve Qin, 2005). Düşük moleküler ağırlıklı biyosüpfektanlar yüzey ve arayüzey gerilimini düşürerek etki ederken, yüksek moleküler ağırlıklı biyosüpfektanlar sudaki yağ emülsiyonunu stabilize etmede etkilidir (Herman ve ark., 2001).

Glikolipitler; Glikolipitler, en iyi bilinen biyosüpfektan grubudur (Kahyaoğlu, 1999). Uzun zincirli alifatik asit ya da hidroksialifatik asit kombinasyonundan oluşan karbonhidratlardır. Glikolipitler arasında en iyi bilinen biyosüpfektanlar ramnolipitler, trehalolipitler, soforolipitler ve mannosileritritol lipidlerdir (Kaya ve ark., 2006). Ramnolipitler, bir ya da iki ramnoz molekülünün β -hidroksidekanoik asit molekülüne bağlanmasıyla oluşan glikolipitlerdir. Ramnozlu glikolipit üretimi ilk olarak *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmıştır (Kosaric, 2001).

Lipopeptit ve lipoproteinler; *Bacillus brevis* ve *Bacillus polymyxa* tarafından üretilen dekapeptit (gramisidin) ve lipopeptit (polimiksin) antibiyotikler yüzey aktif özelliklere birçok biyosürfektan üretmektedir (Mata-Sandoval ve ark., 1999). *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen sürfektan BL-86, suyun yüzey gerilimini 27 mN/m' ye, su ve n-hekzadekan arasındaki arayüzey gerilimi ise 0.36 mN/m' ye düşürebilmektedir.

Yağ asitleri, fosfolipitler ve nötral lipitler; Birçok bakteri ve maya, n-alkanlardaki gelişimLeri esnasında büyük miktarlarda yağ asitleri ve fosfolipit yapıdaki sürfektanları üretmektedirler. *Acinetobacter sp.* HO1-N suşu suda alkan mikroemülsiyonlarını oluşturan fosfatidilethanomin üretmektedir. Fosfolipitlerin kantitatif üretimi bazı *Aspergillus spp.* ve *Thiobacillus thiooxidans* türlerinde belirlenmiştir (Ochoa ve ark., 2001).

Polimerik biyosürfektanlar; En fazla çalışılan polimerik biyosürfektanlar; emülsan, alasan, biyodispersan, liposan ve mannoprotein diğer polisakkarit-protein kompleksleridir. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, emülsan olarak adlandırılan polianiyonik amfifilik heteropolisakkarit biyoemülsifiyer üretmektedir. Heteropolisakkarit omurga; Nasetil-D-galaktozaminin tekrarlı trisakkaritleri, Nasetilgalaktozamin üronik asit ve tanımlanmamış N-asetil amino şekerinden oluşmaktadır (Mulligan ve ark., 1999).

Partikül biyosürfektanlar; Hidrokarbonları parçalayan hücre dışı membran kesecikleri, alkanda önemli rol oynayan mikroemülsiyonları oluşturmaktadırlar. *Acinetobacter sp.* HO1-N suşunun keseciği, 20-50 nm çapında ve 1.158 g/cm³ batmayan yoğunlukta olup protein, fosfolipit ve lipopolisakkaritten oluşmaktadır (Nielsen ve ark., 2000).

Fiziksel yapılarına göre, kimyasal yollarla elde edilen sürfektanlar genellikle yapılarında bulunan polar gruplara göre ise,

1. Hidrofilik grup,
2. Anyonik sürfektanlar,

3. Katyonik sürfektanlar,
4. Zwitteriyonik sürfektanlar (amfoterik),
5. Noniyonik sürfektanlar,
6. Kombinasyon halinde biyosürfektanlar olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3. Gıda Atıklarının Biyosürfektan Üretiminde Kullanımı

Dünyada hemen her yıl milyonlarca ton atık madde çevreye atılmaktadır. Tarımsal ürünler örneğin tahıl ürünlerinin % 60'ı, yağlı tohum ürünlerinin %85'i, şeker ürünlerinin %90'nı kullanılmayan atık madde olarak çevreye bırakılmaktadır. Bu atık maddelerin yok edilmesi çeşitli endüstri kollarına büyük yükler getirmektedir; Mikrobiyal transformasyonla bu atık maddelerin ham madde olarak çeşitli ürünlerin elde edilmesinde kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Telefoncu, 1995).

Atık maddeler çevreye bırakıldıkları zaman birikerek toksik, kanserojenik veya mutajenik etki yapmaktadır (Miller, 1995).

Melas, peyniraltı suyu, kesilmiş süt, bitkisel yağlar gibi endüstriyel atıkların biyosürfektan üretiminde kullanılabileceği belirtilmektedir (Sıdal, 1997; Mata-Sandoval ve ark., 1999; Nitschke ve ark., 2004; Maneerat, 2005; Rashedi ve ark., 2005; Guo-liang ve ark., 2005; Kahyaoğlu ve Konar, 2006; Thaniyavarn ve ark., 2006; Raza ve ark., 2007).

Melasın bileşiminde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, koyu renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik maddeler ile malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler bulunur. Genel olarak melasta % 48-50 sukroz içerikli şeker, % 9-12 şeker olmayan organik madde, % 2-4 protein, % 1,5-5 potasyum, % 0,4-0,8 kalsiyum, % 0,06 magnezyum, % 0,6-2 fosfor, 1-3 mg/kg biyotin, 15-55 mg/kg pantotenik asit, 2500-6000 mg/kg inositol ve 1,8 mg/kg tiyamin bulunur (Makkar ve Cameotra, 1997; Kahyaoğlu, 1999).

Patel ve Desai (1997); tarafından yapılan çalışmada şeker fabrikası atık maddesi olan melas besi ortamında çoğalabilen *Pseudomonas aeruginosa* GS3

kültürlerinden 0,24 g/l ramnolipit biyosüpfektanı elde edildiğini bildirmişlerdir

Biyosüpfektan üretimi üzerine yapılan bir çalışmada şeker fabrikası atık maddelerinden melas'ın substrat olarak kullanılabileceği, melas içeriğinde; % 48-56 şeker,% 9-12 şeker olmayan organik maddeler, % 2,5 protein, % 1,5-5 potasyum, % 0,4-0,8 kalsiyum, % 0,06 magnezyum, % 0,06-0,2 fosfor, 1-3 mg/kg biotin, 15-55 mg/kg pantotenik asit, 2,5-6 mg/kg inositol ve 1,8 mg/kg tiamin bulunduğu ve melas'ın sükröz yanında diğer bileşikler yönünden de zengin bir bileşik olduğu ve diğer şeker kaynakları ile karşılaştırıldığında maliyetinin daha düşük olduğu ve ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir(Makar ve Cameotra,2002)

2.4. Biyosüpfektanların Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Biyosüpfektanların gıda endüstrisinde özellikle emülsifiyer, köpürtme, ıslatma ve çözücü, adezyonu engelleyici ve antimikrobiyel madde olarak kullanılmaları yaygındır (Desai ve Desai, 1993). Günümüzde emülsifiye ediciler olarak gıda endüstrisinde dünya genelinde kullanılmaktadır. *Candida utilis*'ten elde edilen bir biyoemülsifiyer salata sosunda kullanılmaktadır (Amaral ve ark., 2010).

Ramnani ve ark (2005), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* tarafından üretilen biyosüpfektanın yüzey gerilimi ölçümü için Ring metodunu kullanmış ve yüzey gerilimini %41 olarak ölçmüşlerdir.

Amaral ve ark (2006) tarafından emülsifikasyon aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ50682 izole edilip karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmış elde edilen emülsifiyere yansan ismi verilmiştir ve farklı pH değerlerinde emülsifikasyonu ölçülmüştür. Emülsifikasyon aktivitesi pH 3.0-9.0 gibi geniş bir aralıkta stabilitesini korumuştur.

Fernandes ve ark (2007), *Bacillus subtilis* R14 biyosüpfektanının yüzey gerilim ölçümünü Wilhelmy plate metod kullanarak KSV SİGMA 70 tensiyometre ile ölçmüşlerdir. Kültür ortamının yüzey geriliminin 20 saat inkübasyondan sonra 54 mN/m'den 30 mN/m'ye düştüğünü belirlemişlerdir.

Biyosüpfektanlar, yağ globüllerinin aglamerasyonunu kontrol etmede, havalandırılan sistemlerin kontrolünde, nişasta içerkli gıdaların stabilizasyonu ve raf ömrü kontrolünde ve ürün yapısının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Buğday hamurunun reolojik özelliklerinin modifiyesi, ve yağ bazlı ürünlerin tekstür ve tutarlılığının geliştirilmesinde tercih edilmektedir. Dondurma fırıncılık ürünlerinde stabilizasyonun kontrolü, aroma yağlarının çözünürlüğünün ve bayatlamının geciktirilmesinde rol oynamaktadır. Hamur stabilizasyonunun, tekstür ve hacminin kontrolü ramnolipid biyosüpfektanı kullanılarak sağlanabilmektedir. Ayrıca, birçok çalışmada tereyağ kremasının, dondurulmuş ürünlerin özelliklerinin geliştirilmesinde de ramnolipidlerin etkili olabileceğini belirtmiştir. Son zamanlarda *Enterobacter cloacae*'dan elde edilen biyoemülsifiyerin potansiyel viskozite artırıcı özelliğe sahip olduğu açıklanmış ve özellikle sitrik veya asetik asitli ortamlarda bu etkinin daha arttığı bildirilmiştir. L-Ramnoz'un aromada öncü olduğudüşünülmektedir. Bununendüstridefuraneolgidaimayüksekkalitede aroma verici bileşen olarak kullanılmaktadır. L-Ramnoz'un kaynağında ramnoz lipidlerin büyük bir ilgisi vardır (Nitschke ve Costa, 2007).

Biyosüpfektanlar gıda sanayinde katkı olarak birçok uygulamada kullanılmaktadır. Lesitin ve türevleri, gliserol içeren yağ asidi esterleri, sorbitol veya etilen glikol ve etiloksilat gıda sanayinde şu anda kullanılan emulsifiye edici maddelerdir. Biyosüpfektanlarla ilgili diğer uygulamalar ise fırın ve et ürünleridir. Termofilik bir mikroorganizma olan *Streptococcus* sp.'nin pastörizatör ısı değıştirici plakalarında kirlilik yaratan mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemeye yardımcı olduğunu belirtmişlerdir (Shekdar ve ark., 2015).

2.5. Biyosüpfektanların Antiadezyon Ajan Olarak Kullanımı

Gıda endüstrisinde kontaminasyonlara yol açıp gıda güvenliğini tehlikeye girdirmemek içinmikroorganizmaların yüzeye yapışmasını önleyici faaliyetler yapılmalıdır.

Surfaktin biyosüpfektanı *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enterica*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis*'e karşı PVC ve vinil üretral kateterlerde biofilm oluşumunu azalttığı bilinmektedir (Mireles ve ark., 2001).

Rodrigues ve ark., (2004) biyosüpfektanların katı yüzeylerde ya da enfeksiyon alanlarında patojen mikroorganizmaların yapışmasını engellediğini bulmuştur. Bu çalışmada bir miktar saflaştırılmış süpfaktin dökülerek kaplanan vinil üretral kateter ortamı *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* tarafından oluşturulan adezyon miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Dahası bu biyosüpfektanın protezler üzerinde mikrobiyel sayıyı azalttığı gösterilmiştir.

Meylheuc ve ark. (2006), *Lactobacillus helveticus* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinden elde ettikleri biyosüpfektanlar ile *Listeria monocytogenes*'in gelişim üzerine etkisi paslanmaz çelik yüzeylerde antiadezyon testi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucu biyosüpfektanların katı yüzeylerde listerial adezyonu engellediği bulunmuştur.

Gudina ve ark. (2010), *L. paracasei* ile yaptıkları çalışmada üretilen biyosüpfektanın 4 farklı konsantrasyonda % mikrobiyel inhibisyon sonuçlarının incelemişlerdir. 3,12 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL ve 25 mg/mL konsantrasyonlarında yapılan denemelerde en iyi sonucu en yüksek konsantrasyonda elde etmiş ve antiadezyon aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu belirtmişlerdir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılan antiadezyon aktivitesi testinde en iyi sonucu 25 mg/mL konsantrasyonunda *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılan denemede elde etmişler ve biyosüpfektan örneğinin % 70' e kadar adezyonu engellediğini belirlemişlerdir.

Araujo ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada polisitren yüzeylerde *Listeria monocytogenes*'in adezyonunun biyosüpfektanla önlenmesi araştırılmıştır. Çalışmada süpfaktin ve ramnolipid kullanılmıştır. 15 hücrenin adezyon profilleri incelenmiş ve bu bakteriler oldukça güçlü adezyon özelliğine

sahip olarak sınıflandırılmıştır. İki biyosüpfektan da adezyonu azaltmıştır. En umut verici sonuç ATCC7644 suşu için elde edilmiş olup, surfaktin için %84 yapışma azalması olmuştur (30 saatlik büyüme periyodu). Rhamnolipidler adezyonu %82 oranında düşürmüştür. ATCC19112 adezyonu surfaktin ve rhamnolipid için %53 azaltmıştır. Sodyum dodecyl-sülfat biyosüpfektanlardan daha az etkili olduğu bulunmuştur. En fazla adezyonu %23 oranında engellemiştir. Sonuç olarak süpfektanların *Listeria monocytogenes* adezyonunu kontrol etmek için potansiyel ajan olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bakteri adezyonunu önlemek için yüzeylerin biyosüpfektanla kaplanması bir alternatif yöntem olarak bilinmektedir. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen surfaktin ve *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen rhamnolipid biyosüpfektanların farklı konsantrasyonları gıda kaynaklı patojen bakterilerin yüzeylere yapışmasını engellediği belirtilmiştir.

Genellikle biyosüpfektan miktarındaki artış ve yüzeyde bekletilme süresindeki artış adezyon yapısının uzaklaşma yüzdesini arttırdığı belirlenmiştir (Gomes ve Nitschke, 2012).

Tahmourespour ve ark. (2011), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 bakteri suşundan biyosüpfektan madde elde edildiğini ifade etmişlerdir. Elde edilen biyosüpfektanın, *Streptococcus mutans*'ın diş yüzeylerinde adezyon oluşturma ve gen açığa çıkarma gibi yeteneklerini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *Lactobacillus acidophilus*'un cam yüzeylere yapışarak burada *Streptococcus mutans* üremesini ve adezyon oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda bu biyosüpfektanların paslanmaz çelik yüzeylerde aynı zamanda iyi bir korozyon önleyici olabileceği de belirtilmiştir.

2.6. Biyosüpfektanların Antimikrobiyel Aktivitesi

Biyosüpfektanların antimikrobiyel özellikleri ilk kez *Bacillus subtilis* türleri tarafından sentezlenen lipopeptit yapısında iturin A bileşiklerinde tespit edilmiştir. İturin A, maya hücre zarında bulunan elektrolitleri serbest bırakarak fosfolipitlerin ayrışmasına ve sitoplazma yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca iturin

A, por oluşumunda lipopeptidleri uyarıp zarların elektriksel iletimini artırarak patojenlere karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir.(Kahyaoğlu,2008).

Sürfaktin aracılığıyla gıda kaynaklı *Bacillus cereus* sporlarının yüzey yapılarına zarar vererek parçalanması (Huang ve ark., 2007), iturin ile kombine edilen sürfaktinin etlerdeki *Salmonella enteritidis*'in sterilizasyonu (Huang ve ark., 2009) ve *Penicillium notatum*'a karşı antifungal olarak kullanılması başarılı sonuçlar vermiştir (Huang ve ark., 2010).

Kitamoto ve ark. (1993), *Candida antartica* tarafından sentezlenen mannosileritroritol (glikolipid yapısında bir biyosürfektan) lipitlerin (Mel A ve Mel B) Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Fernandes ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* R14 den elde edilen biyosürfektanın 29 bakteri suşuna karşı antimikrobiyel aktivitesini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, lipopeptid yapısındaki biyosürfektanların ilaca dirençli suşlara karşı antimikrobiyel etkilerinin geniş spektrumLarda olduğunu göstermektedir.

Rufino ve ark. (2011), *Candida lipolytica*'dan, fındık yağı atık maddeleri kullanılarak Rufisan biyosürfektanı elde etmişlerdir. Bu biyosürfektan biyomedikal alanda polisitren yüzeylerde antimikrobiyel madde olarak kullanılmış ve adezyonu engelleme konusunda oldukça başarılı bulunmuştur. Özellikle gıda patojeni olan *Staphylococcus aureus*, üzerine yapılan denemelerde 12 mg/Lbiyosürfektan kullanımı ile %98 oranında adezyon engellenmiş ve bu bakterinin gelişimini %15.1 oranında inhibe ettiği de belirlenmiştir. Aynı çalışmada *Escherichia coli*'nin, 12 mg/Lbiyosürfektan kullanımı ile gelişimi %5 oranında, adezyonu ise % 25 oranında engellenmiştir.Ramnolipidler potansiyel mikrobiyel aktiviteye sahiptirler. Biyosürfektanlar bakteriyostatik ajan olarak gıda ile ilgili en önemLi patojenlerden *Listeria monosytogenes*'e karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda nisinle kombine edildiğinde sinerjistik etkisi artmıştır. Sürfaktin ise polisitren yüzeylerde kimyasal sürfektan olan sodyum dodesil sülfata göre daha etkin bir şekilde bakteriyel yapışmayı azaltabildiği gösterilmiştir. Ayrıca saflaştırılmış ramnolipidin *Listeria monocytogenes* hücrelerinin güçlü yapışmasını %100 oranında engellemiştir (Reis ve ark., 2013).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada biyosüpfektan eldesinde, *Streptococcus thermophilus* NCC 2290 (Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü), üretilen biyosüpfektanların antimikrobiyel etkisini belirlemek amacıyla ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* (Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve *Escherichia coli* K12 kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan *Streptococcus thermophilus* gelişimi için MRS agar/broth kullanılmıştır.

Antibakteriyel etkiyi belirlemek amacıyla, Trypticase Soy Broth (TSB)/Agar (TSA) (Merck-Almanya), Trypticase Soy Yeast Extract (TSYE) (Merck-Almanya) besiyerleri kullanılmıştır (Gomes ve Nitschke, 2012).

Biyosüpfektanın antibakteriyel özelliğinin belirlenmesi amacıyla uygulanan MİK testinde Mueller-Hinton Broth (Biomark-Hindistan) besiyeri kullanılmıştır.

3.1.3. Melas

Çalışmada kullanılan melas, Eskişehir Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir.

3.2. Metod

Çalışmada, tüm analizler 2 tekrürlü olarak yapılmıştır.

3.2.1. Mikroorganizma Kùltürlerinin Geliştirilmesi ve Saklanması

Besiyerinde gelişen farklı kolonilerden öze yardımıyla alınarak her biri ayrı ayrı 10 mL'lik MRS broth besiyerine inoküle edilmiştir. Daha sonra tüm bakteri

kültürleri 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen bakteri kültürleri 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant dökülmüştür. 5 mL’ lik eppendorf tüpleri içerisine 1 mL MRS broth, 1 mL laktik asit bakteri kültürleri 1 mL steril gliserin ilave edilerek bu tüpler -18 °C’de saklanmıştır.

Antibakteriyel etki üzerine yapılacak denemelerde kullanılacak patojen özellikteki bakteriler, stok kültürden öze yardımı ile alınarak 6 g/L maya ekstraktı (TSYE) ile zenginleştirilmiş Trypticase Soy Agar besiyerine sürme ekim yapılmıştır. Daha sonra 35°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra her bir kültür üzerine 9 mL distile su ilave edilerek bakteri sayıları 10⁸ kob/mL olacak şekilde ayarlanarak adezyon testi için kullanılmıştır (Gomez ve ark.,2012).

3.2.2. Melasın Hazırlanması

Toplam şeker miktarı belirlenen melaslar 20 g/L sakkaroz konsantrasyonuna seyreltilip, 3 g/L maya ekstraktı, 5 g/L pepton takviye edilmiştir (Rodrigues ve ark., 2006).

Melas konsantrasyonu;

$$d=m/V$$

eşitliğinden hesaplanır.

Şeker konsantrasyonundaki değişim;

$$d = (d_1 V_1 + d_2 V_2) / (V_1 + V_2) \text{ eşitliğinden hesaplanır}$$

Besiortamının pH’ sı 6,8’e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilerek kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2005).

3.2.2.1. Melasta Toplam Şeker Tayini

Melas, sakkaroz ve indirgen şekerler içermektedir. Bu çalışmada bir titrasyon yöntemi olan Lane eynon metodu kullanılmıştır.(<http://www-unix.oit.umass.edu>,2006)

Çalışmada 5 gr melas tartılmış, saf su ile 250 mL' ye seyreltilerek %2' lik şeker çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra bu şeker çözeltisinden 25 mL örnek alınarak tekrar saf su ile 100 mL' ye seyreltilmiş %0.5' lik şeker çözeltisi elde edilmiştir. Erlene ise, 12,5 mL Fehling A ve 12,5 mL Fehling B çözeltisi alınıp, üzerine %0.5' lik şeker çözeltisinden 10 mL ilave edilerek ısıtılmaya başlanmıştır.

Fehling A çözeltisi hazırlanırken, 69,28 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 lt. distile suda çözülür, Fehling B çözeltisi hazırlanırken ise, 346 gr 'Rochelle' tuzu($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve 120 gr NaOH 1 L distile suyla tamamlanır.

Bu çalışmadan sonra sakkaroz miktarının tayini için inversiyon yapılmıştır. Erlene 25 mL %2' lik şeker çözeltisi koyulup, üzerine 1 N HCl çözeltisinden 15 mL ilave edilmiş ve kaynatılmıştır. Daha sonra renk pembeye dönene kadar %10' luk NaOH ilave edilmiştir. Erlene , 12,5 mL Fehling A ve 12,5 mL Fehling B çözeltileri koyulmuş ve ısıtılmaya başlanmıştır. Kaynama başlayınca 3-4 damla metilen mavisi eklenerek mavi renk kaybolup çökelti oluşana kadar titrasyon yapılmıştır. Buradan toplam şeker miktarı hesaplanmıştır.

Toplam şeker miktarı = (invert şeker değeri *100) / çözelti sarfıyatı ile hesaplanır. Buna göre,

$$\text{Melastaki toplam şeker konsantrasyonu} = (\text{toplam şeker miktarı} / 0,5) * 100$$

Melastaki gerçek şeker konsantrasyonu, hesaplanan toplam şeker konsantrasyonunun %95' i olarak kabul edilmektedir.

Bu durumda; Gerçek şeker konsantrasyonu = toplam şeker konsantrasyonu*0,95 olarak hesaplanır.

3.2.3. Biyosüpfektan Üretimi

Biyosüpfektan üretimi için kullanılacak olan *Streptococcus thermophilus* bakteri örneği 9 mL’lik MRS broth besiyerine aktarılarak 37 °C’de 18 saat 150 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha önceden kültür ortamı olarak hazırlanan melastan 600 mL erlenmayere aktarıldıktan sonra, üzerine 15 mL önceden hazırlanmış olan *Streptococcus thermophilus* bakteri kültürü (18 saat inkübe edilmiş kültür) ilave edilerek 37°C’de 48 saat 150 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda kültür sıvısından bakteri hücreleri, 6500xg, 4 °C’de 20 dakika santrifüj edilerek (süpernatant ve pellet) ayrılmıştır. Hücre içermeyen süpernatant, biyosüpfektan analizlerinde kullanılmak üzere +4 °C’de saklanmıştır (Rodrigues ve ark., 2006a; Rodrigues ve ark., 2006b; Gudina ve ark., 2010; Augustin ve Hippolyte, 2012).

Kıyaslama amacıyla 600 mL MRS broth kültür ortamı ile aynı şekilde üretimler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu kültür ortamına 15 mL önceden hazırlanan bakteri kültürü (18 saat inkübe edilmiş) inoküle edilerek 37°C’de 48 saat 150 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Sonrasında tüm analizler aynı şekilde gerçekleştirilerek sonuçlar kıyaslanmıştır (Rodrigues ve ark., 2006a; Rodrigues ve ark, 2006b; Gudina ve ark, 2010).

3.2.4. Biyosüpfektan Madde Miktarının Belirlenmesi ve Ekstraksiyonu

Çalışmada fenol sülfirik asit metodu ile biyosüpfektan madde miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla kültürler 6500 rpm de 20 dakika santrifüjlenmiştir. 1 mL oluşan filtrattan, 1 mL fenol (%5) ve 3 mL sülfirik asit (%98) çözeltileri vorteks yardımıyla homojen karıştırılmıştır. Oluşan renkli bileşik 480 nm’de spektrometrik olarak ölçülerek biyosüpfektan madde miktarı tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark.,2010).

3.2.5. Biyosüpfektan Ekstraksiyonu

Biyosüpfektan ekstraksiyonu amacıyla ise belirlenen inkübasyon süresi sonunda hücreler 6500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen berrak kısmın pH’sı 6 M HCl ile 2.0’ a ayarlanıp ve ayırma hunisine alınarak üzerine eşit miktarda etil asetat eklenmiştir. Karışım birkaç dakika faz ayırımı gerçekleşinceye kadar çalkalanmıştır. Organik faz uzaklaştırılıp işlem tekrar edilmiştir. Daha sonra organik kısımLar birleştirilerek suyun uzaklaştırılması amacıyla susuz sodyum sülfat ile muamele edilmiştir. Su uzaklaştırıldıktan sonra 40 °C’de rotary evaporatörde konsantre edilerek kaba biyosüpfektan ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen kaba biyosüpfektan+4 °C’de saklanmıştır (Yin ve ark., 2009).



Şekil 3.1. Rotary evaporatör ile biyosüpfektan ekstraksiyonu

3.2.6.Yağ Yayma Tekniği ile Biyosüpfektan Varlığının Saptanması

Yağ yayma tekniğinde plastik petriye (çapı 9 cm) 25 mL saf su konulduktan sonra petrinin tam ortasına plastik pipet yardımı ile 1 damLa ham petrol damLatılmıştır.Suyun yüzeyinde dağılan petrolün ortasına da 20 µL biyosüpfektan örneğinden konularak oluşan zon çapı ölçülmüştür. Pozitif kontrol örneği olarak zon çapları tween-80 ile yapılan denemedeki zon çapı ile kıyaslanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. Zon Çaplarının Değerlendirilme Aralıkları

Şeffaf Bölgenin Zon Çapı (cm)	Yağ Yayma Aktivitesi
0.5 – 0.9	(+)
1.0 – 1.5	(++)
1.5 - 2.1	(+++)
> 2.1	(++++)

Yağ yayma tekniğinde oluşan şeffaf bölgenin çapı 0,5-0,9 cm ise '+', 1-1,5 cm ise '++', 1,5- 2,1 aralığında ise '+++', 2,1 cm'den büyük ise '++++' olarak değerlendirilmiştir (Youssef ve ark., 2004; Karthik ve ark., 2010; Sarin ve ark., 2011).

3.2.7. Biyosüpfektanın Emülsifikasyon İndeks ve Yüzey Gerilimi Ölçümü

Biyosüpfektan emülsifikasyon indeks ölçümü için, ksilen, n-heptan, mazot, ayçiçeği yağı gibi hidrokarbonlar kullanılabilir (Ramnani ve ark., 2005; Nitschke ve Pastore, 2006; Abouseoud ve ark., 2008; Santos ve ark., 2013). Su, ksilen ve bakteri hücrelerinden arındırılmış kültür sıvısı 20:30:10 oranında ölçü silindirinde karıştırılmıştır.Çözücü tabakasının ölçü silindirindeki yüksekliği okunmuş daha sonra karışım vorteks ile karıştırılmıştır. Emülsiyon tabakasının yüksekliği 1 saat, 24 saat ve 1 hafta sonunda okunup aşağıdaki denklemden emülsifikasyon indeks değeri hesaplanmıştır (Ramnani ve ark., 2005).

$$(\%) EI = \frac{[(\text{emülsiyon tabakasının yüksekliği})/(\text{yağın yüksekliği} + \text{emülsiyon tabakası})] \times 100}{}$$

Elde edilen sonuçlar pozitif kontrol (su:ksilen: biyosüpfektan= 25:30:5) ve negatif kontrol (su: ksilen=30:30) ile kıyaslanmıştır.

Biyosüpfektanın yüzey gerilimi ölçümü, Optik Temas Açısı/Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (TD1C-LAUDA) ile Ring metodu (Accorsini ve ark, 2012) kullanılarak, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakterioloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil3.2.).



Şekil 3.2. Optik Temas Açısı/Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (TD1-CLAUDA) ile Ring metodu

3.2.8. Patojen Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi ve Biyosüpfektanların Antibakteriyel Özelliğinin Belirlenmesi

Streptococcus thermophilus'dan farklı ortamLarda elde edilen biyosüpfektanların antimikrobiyel etkileri MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) testi ile belirlenmiştir.

MİK yönteminde, Mueller-Hinton Broth besiyerinde biyosüpfektan maddenin 2 ve 10 katlı dilüsyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta biyosüpfektan içeren dilüsyonlar elde edilmiştir. Üzerine 24-48 saatlik aktif patojen kültürden 0,1 mL aktarılıp, 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Tüplerdeki gelişme bulanıklık değerlendirilerek gözle yapılmıştır, bulanıklığın olmadığı son dilüsyon, MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Bu dilüsyondan alınacak 0,1 mL inokulum 10 mL besiyerine ekilerek inkübe edilmiş ve tüpte gelişmenin olmaması Minimum Letal Konsantrasyonu (MLK) değerini vermiştir (Koçan,2007).

3.2.9. Mikrotiter Plak Kullanılarak Adezyon Kinetiğinin Belirlenmesi

96'lık mikrotiter plak, farklı konsantrasyonlardaki biyosüpfektan örneklerinden 200 µL ile kontrol örnekleri de 200 µL distile su ile doldurularak yapışmayı sağlamak amacıyla 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, hücreler dikkatli bir şekilde 200 µL distile su ile 3 defayıkannmıştır.

Önceden biyosüpfektan ile kaplanmış olan mikrotiter plak 180 µL TSYE ile doldurulmuştur. Sonra patojen bakterilerin süspansiyonundan (10⁹ kob/mL) 20 µL ilave edilip 35 °C'de, 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde, mikrotiter plak gözenekleri su ile yıkanmış, 15 dakika 200 µL metanol çözeltisiyle ardından 15 dakika da kristal viyole (%1 g/L) ile bekletilmiştir. Daha sonra % 33 (h/h) lük 200 µL asetik asit ile doldurulmuştur. Son olarak ELİSA mikrotiter plak okuyucuda 600 nm'de optik yoğunluk belirlenmiştir (Şekil3.3.).

Elde edilen absorbans değeri aşağıdaki formülde yerine konularak % mikrobiyel inhibisyon elde edilmiştir. (Gomes ve Nitschke, 2012; Mehdi ve Giti, 2008).

% Mikrobiyel İnhibisyon = $(1 - A_c/A_o) \times 100$ A_c : Biyosüpfektanlı hücrelerin absorbans değeri A_o : Kontrol hücrelerinin absorbans değeri



Şekil 3.3. ELİSA mikrotiter plak okuyucu ile adezyon kinetiği analizi

3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

İstatiksel analizler “Windows SPSS 15.0 software” İstatistik paket programı (SPSS Inc., Chiago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır. Tek yönlüvaryansanalizi(ANOVA) denemeler arasında önemLi farklılıkların karşılaştırılmasında, Duncan çoklu karşılaştırma testi gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında kullanılmıştır ($p<0.05$) (Bek ve Efe, 1988).





4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada besi ortamı olarak gıda atığı olan melas değerlendirilmiş, melasın toplam şeker miktarı belirlenmiş, pepton ve yeast ekstrakt ilavesi ile besiyeri haline dönüştürülmüş ve *Streptococcus thermophilus*'tan biyosüpfektan üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen biyosüpfektanların yağ yayma tekniği ile varlıkları tespit edilmiştir. Fenol sülfirik asit metodu ile üretilen biyosüpfektanın madde miktar tayini yapılmıştır. Üretilen biyosüpfektanların ekstraksiyonu sağlandıktan sonra emüsifikasyon indeks değerleri ve yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve bazı gıda patojenleri (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerine antibakteriyel etkileri MİK testiyle belirlenip, mikrotiter plaklar kullanılarak adezyonu engelleme özellikleri belirlenmiştir.

4.1. Melas Ortamının İçeriği

Bu çalışmada kullanılan melasın bileşiminde %60 oranında toplam şeker, %57 oranında sakkaroz bulunmaktadır. Bu değer, literatür çalışmalarında bahsedilen değerlere yakındır.

Şeker pancarından elde edilen melas şeker kamışından elde edilene göre farklıdır. Ara kademelerde elde edilmez, son kristalizasyon prosesinden sonra elde edilir. Yaklaşık %50 oranında şeker içerir. Bu şeker büyük oranda sakkarozdur <http://en.wikipedia.org/wiki/Molasses>,2006.

Bir başka çalışmada ise melasta % 48-50 sakkaroz içerikli şeker bulunduğu belirtilmiştir (Makkar ve Cameotra, 1997; Kahyaoğlu, 1999).

Bir çalışmada ise melasta % 48-50 sukroz içerikli şeker, % 9-12 şeker olmayan organik madde, bulunduğunu belirtilmiştir. (Makkar ve Cameotra, 1997; Kahyaoğlu, 1999).

4.2. Yağ Yayma Tekniği ile Biyosüpfektan Varlığının Tespiti

Yağ yayma tekniği ile biyosüpfektan varlığının saptanmasına ait ölçüm sonuçları Çizelge 4.1 de belirtilmiştir. Çizelge 4.2 de istatistiksel ortalama alınmıştır.

Çizelge 4.1. Yağ yayma tekniği ile biyosüpfektan varlığının saptanması

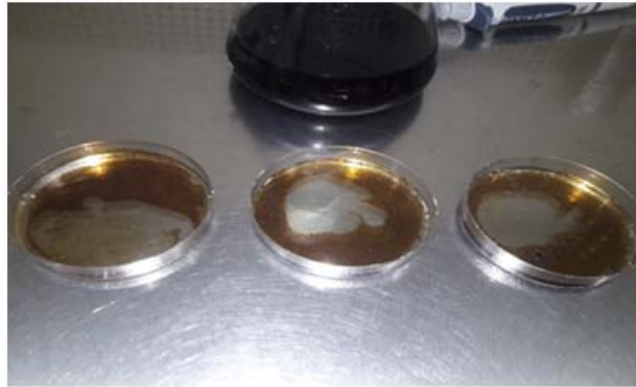
BİYOSÜPFETAN ÖRNEĞİ	ÖLÇÜM SONUÇLARI	YAĞ YAYMA YETENEĞİ
MRS _S	4,6 cm	++++
MELAS _S	3,4 cm	++++
MELAS _P	3,2 cm	++++

Ortamlar: MRS_S: Mrs broth MELAS_S: Melas 1. ortam MELAS_P: Melas paralel ortam

Çizelge 4.2. *Streptococcus thermophilus* elde edilen biyosüpfektanların yağ yayma sonuçları (cm)

Örnek	Yağ yayma testi sonucu
Melas	3.3±0.14
MRS broth	4.6±0.28

Ortalamlar arasında önemli farklılık bulunmamaktadır ($p < 0.05$)



Şekil.4.1. Melas ve MRS broth ortamında yağ yayma analizi

Yapılan yağ yayma analizi sonuçlarına göre; saflaştırılmış biyosüpfektanların yağ yayma özelliklerinin varlığı belirlenmiş olup üretim için kullanılan melas ve MRS broth ortamları arasında ve ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Sonuçlar kimyasal süpfektan olan tween-80 ile yapılan deneme sonuçları ile kıyaslanmıştır. Tween-80 ile yapılan denemede şeffaf bölgenin zon çapı 7,5 cm olarak bulunmuş ve ‘++++’ olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 4.1., Şekil 4.2.).

Youssef ve ark (2004), biyosüpfektan üreticisi olarak belirledikleri 16 suşun yağ yayma tekniğı ile biyosüpfektan varlığını araştırmışlardır. İki suşun negatif olduğunu ve diğer suşların ise 0,5-3 cm aralığında farklı çaplarda yağ yayma özelliğıne sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Kaur ve ark. (2015), tarafından yapılan bir çalışmada toplamda 19 laktik asit bakteri izolatının, yağ-yayma ve damla-çöküşü metotlarıyla süpfektan üretimi gözlenmiştir. Damla-çöküşü metodunda, saf su için hiçbir aktivasyona rastlanmamış; fakat 14 (%73) izolatın süpernatantlarından elde edilen damlacıklar, yüzey aktivasyonunu azaltmış ve dolayısıyla pozitif biyosüpfektan üretiminin belirttiğı gözlenmiştir. Seçilen 14 izolat yağ-yayma testi ile kontrol edilmiş ve 0,2 ile 1,5 cm arasında değerler gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; hem MRS broth besiyerinde hem de melasta gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen biyosüpfektan örneklerinin yağ yayma kapasiteleri oldukça yüksek bulunmuştur.

4.3. Biyosüpfektanların Emülsifikasyon İndeks Değerleri ve Yüzey Gerilimi Ölçümleri

Biyosüpfektan örneklerinin emülsifikasyon indeks değerleri Çizelge 4.3.’ te gösterildiğı gibi bulunmuştur. Laktik asit bakterilerinden elde edilen biyosüpfektan örnekleri ile yapılan emülsifikasyon indeks denemelerinde emülsifikasyon stabilitesinin 1 hafta süreyle korunduğı gözlemlenmektedir.

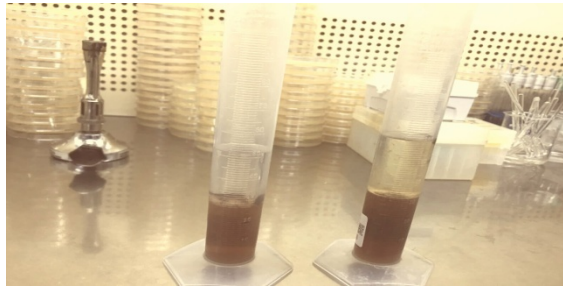
Çizelge 4.3. *Streptococcus thermophilus* için emülsifikasyon indeks değerleri (%)

Biyosüpfektan örneği	İnkübaskon süresi	Emülsifikasyon indeksi (%)
MELAS	1. SAAT	48,75
	24. SAAT	41,75
	1. HAFTA	32,5
Biyosüpfektan örneği	İnkübaskon süresi	Emülsifikasyon indeksi (%)
MRS BROTH	1. SAAT	50,5
	24. SAAT	44,75
	1. HAFTA	33,25

Çizelge 4.4. Emülsifikasyon değeri istatistiksel ortalama

Emülsifikasyon	sonuç
1sa	49.63±1.24 ^a
24sa	43.25±2.12 ^b
1hafta	32.88±0.53 ^c

^{a,b,c}Farklı üstel harflerle gösterilen veriler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.



Şekil.4.2. Biyosüpfektan örneklerinin emülsifikasyon indeks analizi

Elde edilen sonuçlara göre; melasta emülsifikasyon indeks değeri, 1 saat sonunda %48,75 oranında bulunmuş, bu değer 1 hafta sonunda %32,5'a düşmüştür. Yüzey gerilim ölçümü ise melasta yapılan paralel örnek ölçümlerine göre en düşük %41,2 oranında gelmiştir. Örnekler incelendiğinde emülsifikasyon stabilitesinin 1 hafta süreyle korunabildiği gözlemlenmiştir. Sadece su ve ksilen kullanılarak yapılan negatif kontrol örneğinde sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlara göre melas besiyerinde *Streptococcus thermophilus*'tan biyosüpfektan eldesi için oldukça uygun olabileceği kanıtlanmıştır.

Ramnani ve ark. (2005), *Bacillus licheniformis* RG1 suşu tarafından üretilen biyosüpfektanın emülsifikasyon indeks ölçümü analizi ile çeşitli hidrokarbonların yüzey gerilimini azalttığını bulmuşlardır. 24 saat inkübasyondan sonra en yüksek EI- 24 (%) değerinin %80 ile benzende olduğunu en az EI-24 (%) değerinin ise %10 ile heksadekanda olduğunu saptamış olup diğer hidrokarbonların EI-24 (%) değerine bakıldığında ise sırasıyla ksilende %60, heksanda %75, heptanda %61, kerosende %65 olduğunu bulmuşlardır (su: hidrokarbon: biyosüpfektan karışımı / 20 :30 :10). Yukardaki emülsiyonların hepsinin 7 güne kadar stabil kaldığını görmüşlerdir.

Bu alanda yapılacak çalışmalarda emülsifikasyon yeteneklerinin çeşitli hidrokarbonlara karşı da denenmesi araştırmaya katkı sağlaması açısından önemli olacaktır.

Biyosüpfektanın yüzey gerilimi ölçümü, Optik Temas Açısı/Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı (TD1C-LAUDA) ile Ring metodu (Accorsini ve ark., 2012) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Biyosüpfektanların Ring Metoduna göre yüzey gerilimi değeri (mN/m)

Örnek	yüzeygerilim ring testisonucu
Melas	41.63±0.35
MRS broth	41.75±0.57

Ortalamlar arasında önemLi farklılık bulunmamaktadır (p<0,05)

Fox ve Bala (2000), *Bacillus subtilis* 21332 suşunun ürettiği biyosüpfektanın yüzey gerilimini pendant drop metodu ile belirlemişlerdir. Dört farklı besiyerinde inkübe edilen *Bacillus subtilis* suşunun yüzey gerilimlerinin 36 mN/m altına düştüğünü belirlemişlerdir.

Youssef ve ark (2004), çevreden izole ettikleri suşların biyosüpfektan üretimini araştırmışlardır. 16 suşun biyosüpfektan üretimi sonucunda meydana getirdiği yüzey gerilimi Du Nouy Ring metodu ile ölçülmüş ve 35-70,5 mN/m aralığında yüzey gerilimine sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş, sonuçlar belirtilen bakteri örnekleri ile paralellik göstermiştir.

4.4. Biyosüpfektan Madde Miktarının Belirlenmesi

Melas besiyeri ve paralel örnekte biyosüpfektan madde miktarı sırasıyla, 1220 mg/L ve 1190 mg/L olarak gerçekleşmiştir. MRS broth selektif besiyerinde yapılan üretimde ise 1180 mg/L olarak gerçekleşmiştir. Ortamlar arasında önemLi fark bulunmaması, *Streptococcus thermophilus* bakterisinin uygun ortamlarda, biyosüpfektan üretim miktarı açısından iyi sonuçlar verdiğini kanıtlamaktadır.

Patel ve Desai, 1997; tarafından yapılan çalışmada şeker fabrikası atık maddesi olan melas besi ortamında çoğalabilen *Pseudomonas aeruginosa* GS3 kültürlerinden 0,24 g/L ramnolipit biyosüpfektanı elde edildiğini bildirmişlerdir .

Kahyaoğlu ve Konar, 2006, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 suşundan %5 lik melas besi ortamında yaptıkları bir çalışmada 0,78 g/l ramnolipit

biyosüpfektanı elde etmişlerdir.

Rodrigues ve ark (2006a), *Lactobacillus pentosus* ile peyniraltı suyunu kullanarak 72 saatlik inkübasyon sonrasında 1.4 g/L maksimum biyosüpfektan elde etmiştir. Dubey ve Juwarkar (2001), biyosüpfektan üretmek için *Pseudomonas aeruginosa* BS2 suşu ile peyniraltı suyunu kullanmıştır. 48 saatlik inkübasyonda 0.92 g/L biyosüpfektan elde ettiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalara kıyasla yüksek miktarda biyosüpfektan eldesi gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi kullanılan melasın yüzde derişim oranı ve melastaki sakkaroz konsantrasyonun fazla olması, melas besiyortamına pepton ve yeast eklenmesi ve zengin içerikli besiyeri haline dönüştürülmesi olabilir. Farklı melas konsantrasyonlarında ve çeşitli oranlarda pepton-yeast ilavesiyle biyosüpfektan üretimi denenebilir.

4.5. Biyosüpfektanların Antibakteriyel Özelliğinin Belirlenmesi

Antimikrobiyel aktivite ölçüm sonuçlarında, *Escherichia coli* üzerine MİK değeri 10 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyon değerinde minimum inhibasyon konsantrasyonu (MİK) değerine ulaşılmıştır. *Staphylococcus aureus* üzerine yapılan denemelerde *Streptococcus thermophilus* örneğı ile 10 mg/mL minimum letal konsantrasyon (MLK) değerine ulaşılmıştır.

4.6. Mikrotiter Plak Kullanarak Adezyon Kinetiğinin Belirlenmesi

Melasta yapılan üretimlerde elde edilen örneklerin 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonunda başarılı antiadezyon aktivitesi gerçekleştirilemediğı anlaşılmaktadır. *Escherichia coli* üzerine yapılan denemede 10 mg/mL konsantrasyon düzeyinde sonuç vermiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antiadezyon aktivitesi üzerine 2,5 mg/mL 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda sonuç alınamamıştır.



Şekil.4.3. Melasta *Streptococcus thermophilus*'tan elde edilen biyosüpfektan örneğinin mikrotiter plakta hazırlanması

Gudina ve ark. (2010), *Lactobacillus paracasei* ile yaptıkları çalışmada üretilen biyosüpfektanın 4 farklı konsantrasyonda % mikrobiyal inhibisyon sonuçlarını incelemişlerdir. 3,12 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL ve 25 mg/mL konsantrasyonlarında yapılan denemelerde en iyi sonucu en yüksek konsantrasyonda elde etmiş ve antiadezyon aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu belirtmişlerdir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* patojenleri üzerinde yapılan antiadezyon aktivitesi testinde en iyi sonucu 25 mg/mL konsantrasyonunda *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılan denemede elde etmişler ve biyosüpfektan örneğinin %70' e kadar adezyonu engellediğini belirlemişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada biyosüpfektanlardan süpfektin ve ramnolipidlerin gıda patojenleri olan *Listeria monocytogenes*, *Cronobakter sakazakii* ve *Salmonella Enteritidis*'in paslanmaz çelik ve polipropilen yüzeylerdeki adhezyonu incelenmiştir. Süpfektin ile kaplanmış paslanmaz çelik yüzeylerde *E. sakazakii* ve *L. monocytogenes*'den yapışan hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. En etkili sonuç ise *L. monocytogenes*'in yapışan hücre sayısının 10^2 kob/cm² ye kadar düşmesi olmuştur. (Nitschke ve ark, 2008).

Önceki çalışmalar doğrultusunda konsantrasyondaki değişimin önemli bir farka yol açtığı düşünülebilir. Yüksek konsantrasyonlar denenerek sonuçlar araştırılmaya devam edilmelidir. Farklı gıda patojenleri üzerine biyosüpfektanların adezyon önleyici aktivitesi araştırılmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Streptococcus thermophilus*'tan pepton ve maya ilave edilmiş melasta biyosüpfektan üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, besi ortamı olarak gıda endüstrisi atığı olan melasın değerlendirilme olanaklarına bir alternatif getirilmiş ve bu besiyortamlarında biyosüpfektan üretiminin gerçekleştirilmesi sağlanarak melasın değerli biyokütle ve besin elementi kaybının önüne geçilmesi, daha değerli bir ürün haline getirilmesi sağlanmıştır. Üretilen biyosüpfektanların bazı gıda patojenleri (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerine antimikrobiyel etkilerinin araştırılması sağlanmıştır.

Sonuç olarak, bakterilerinin gelişmesi ve biyosüpfektan eldesi için kullanılan melasın uygun olduğu belirlenmiştir. Elde edilen biyosüpfektanların yüzey gerilimini düşürdüğü ve gıda patojenlerine karşı antibakteriyel etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Biyosüpfektanla ilgili yapılan çalışmalar gelecekte gıda endüstrisinin birçok alanında özellikle antiadezyon aktiviteleri nedeniyle gıda ile temas eden yüzeylerde kullanımının yaygınlaşacağı yönündedir. Emülsifiye edici, antiadezyon ve antimikrobiyel etkilerini kombinasyon halinde bünyesinde bulundurmalarından dolayı çok amaçlı katkı maddeleri olarak değerlendirilebileceklerdir. Fakat biyosüpfektanların kullanımını kısıtlayan faktörler bulunmaktadır. Bunların başında özellikle gıda endüstrisinde kullanımı konusunda insanlar üzerine herhangi bir toksik özelliğe sahip olma durumudur. Bunun üzerine çalışmaların çoğaltılması gerekmektedir. Diğer bir etken ise üretimin maliyetli olmasıdır. Yapılan bu çalışmada maliyetleri atık madde kullanımı ile biraz da olsa indirebilmiştir. Farklı atık maddeler, farklı konsantrasyonlarda, zenginleştirme yöntemleri kullanılarak biyosüpfektan üretimleri gerçekleştirilip, üretilen biyosüpfektanların madde miktarları kıyaslanmalı, en yüksek verimin alındığı örneklerin kullanılması ve yüzey gerilimini azaltma, emülsifikasyon yeteneği, antimikrobiyel özellikteki

değişiklikleri, antiadezyon aktivitesi gibi özellikleri incelenmelidir. En yüksek biyosüpfektan üretimi gerçekleştirecek çeşitli mikroorganizmalar denenmeli, bu mikroorganizmaların uygun ortamlardaki hücre sayısı hesaplanmalıdır. Gelecekteki çalışmalarda suşların biyosüpfektan üretimiyle üreme fazları arasındaki ilişki belirlenmek için suşların üreme eğrileri ile biyosüpfektan üretim zamanları belirlenebilir. Bu şekilde suşların ramnolipid üretimi için gerekli minimum süre tespit edilir. Biyosüpfektan örneklerinin kritik misel konsantrasyonu (KMK) hesaplanarak yüzey gerilimini en düşük değere düşürebilen minimum süpfektan/biyosüpfektan konsantrasyonu bulunabilir. Bu noktadan sonra sıvıların yüzey gerilimi değişmez sabit kalır. Ayrıca çeşitli ortam koşullarında (sıcaklık ve pH gibi parametrelerin değiştiği) üretimler yapılarak, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin biyosüpfektan varlığına etkisi araştırılabilir.

Biyosüpfektanların gıda endüstrisinde kullanımına dair ise toksik etki gösterip göstermeyeceği ve dezenfektan olarak kullanım olanakları araştırılarak alternatif yöntemler geliştirilmesi sağlanmalıdır. Bunun yanı sıra farklı ambalaj materyalleri ya da farklı türde gıda ile temas eden yüzeylerde antiadezyon denemelerinin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-mawgoud, A.M., Hausmann, R., Lepine, F., Muller, M.M., Deziel, E., 2011. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: Biosurfactants: From Genes to Applications (ed. Soberón-Chávez G).13-55. Springer, Berlin.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabı, A., 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*, Desalination, 223,143-151.
- Accorsini, F.R., Muttan, M.J.R., Lemas, E.G.M., Benincasa, M. 2012.Biosurfactant production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. Brazillian Journal of Microbiology, 2012,116-125.
- Allakera, R.P., and Douglasb, C.W.I. 2009. Novel antimicrobial therapies for dental plaque-related diseases. International Journal of Antimicrobial Agents 33: 8-13.
- Amaral, P.F.F., Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P. 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, 41, 1894-1898.
- Amaral P.F.F., Coelho MAZ, Marrucho IM, Coutinho JAP. 2010. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. In: Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology (ed. Sen R), pp. 236-249. Springer, New York.
- Anonymous, 1983. Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz YöntemLeri. Tarım Orman ve Köy işleri Bakanlığı, Gıda İşleri Genel Müdürlüğü, 65/62-105, Ankara.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA.
- Araujo, L.V., Abreu, F., Lins, U., Anna, L.M.M.S, Nitschke, M., Freire, D.M.G. 2011. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. Food Research International, 44, 481-488.

- Augustin M. and Hippolyte, M.T., 2012. Screening of biosurfactants properties of cell-free supernatant of cultures of *Lactobacillus* Spp. Isolated from a local fermented milk (pendidam) of Ngaoundere (Cameroon). International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA) ISSN: 2248-9622 Vol. 2, Issue 5, September-October 2012, 974-985.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S., 2000. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 53: 495-508 .
- Bek, Y. ve Efe, E., 1988. Araştırma ve Deneme Metodları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, Adana.
- Bodour AA, Maier RM. 2002. Biosurfactants: Types, Screening Methods, and Applications. In Encyclopedia of Environmental Microbiology (ed. Bitton G), pp. 750-770. John Wiley & Sons, New York.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2009. Substrate Dependent Production of Extracellular Biosurfactant by a Marine Bacterium. Bioresource Technology, 100, 1015–1019.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 61, 47-64.
- Desai, J.D. and Desai, A.J. 1993. Production of biosurfactants: production, properties, applications. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dinçer E., Kivanç M., Karaca H., 2009. Biyokoruyucu olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler.
- Dyke M.I., Lee H., Trevors J.T., 1991. Applications of Microbial Surfactants, Biotechnology, 9: 241-252.
- Ephraim E, Schultz R.D., Duster M, Warrack S, Spiegel CA and Safdar N., 2012. In-vitro evaluation of the antagonistic effects of the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* hnOO1 and florajen 3 against group B *Streptococci*. International Journal of Probiotics & Prebiotics 7(3/4): 113-120.

- Fernandes, P.A.V., Arruda, I.R., Santos A.F., Araújo, A., Maior, M.A., Ximenes, E.A., 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 704-709.
- Fox, S.L. and Bala, G.A., 2000. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, 75, 235-240.
- Gomes, M.Z. and Nitschke, M. 2012. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 25, 441-447.
- Gudina J. E., Teixeira A.J., Rodrigues R.L. 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76 (2010) 298–304.
- Guo-liang Z., Yue-ting W., Xin-ping Q., Qin M., 2005. “Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids”, *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(8):725-730 .
- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y. 2009. BiyofilmLer: Yüzeydeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34 (3), 165-173.
- Healy M. G., Devine C. M., Murphy R., 1996. “Microbial production of biosurfactants, *Resour. Conserv. Recy.*, 18, 41-57.
- Herman D. C., Artiola J. F., Miller R. M., 2001. “Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant”, *Environ. SCI Technology*, 29: 2280-2285 .
- Hofvendahl, K., and Hahn-hagerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 87-107.
- Hood, S.K., Zottola, E.A. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, 6, 9-18.

- Huang, X., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Zhao, H., Yang, S., 2007. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(2):454-461.
- Huang X, Gao X, Zheng LY, Hao G. 2009. Optimization of sterilization of *Salmonella Enteritidis* in meat by surfactin and iturin using a response surface method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 15(1):61-67.
- Huang X, Wang Y, Cui Y, Hua X. 2010. Optimization of Antifungal Effect of Surfactin and Iturin to *Penicillium notatum* in Syrup of Peach by RSM. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 16(2):63-69.
- Ilori, M.O., Adebuseye, S.A., Ojo, A.C. 2008. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. *World J Microbiology Biotechnology*, 24, 2539- 2545.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. 2001. "Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers", *Int. J. Food Microbiology*, 64, 367-372.
- Kahyaoğlu M., 1999. "Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir .
- Kahyaoğlu, M. 2008. Biyosüpfektanların antimikrobiyel aktiviteleri ve uygulama alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1-2), 39- 51.
- Kahyaoğlu, M., ve Konar, V. 2006. Şeker fabrikası atık maddeleri kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan Ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesi. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimi Dergisi*, 18 (4), 493-498.

- Karthik, L., Kumar, G., Rao, K.V.B. 2010. Comparison of methods and screening of biosurfactant producing marine actinobacteria isolated from nicobar marine sediment. The IIOAB Journal, 1 (2), 34-38.
- Katamai, W. 2011. Biosurfactants from yeasts. Walailak Journal, 9(1), 1-8.
- Kaur, S., Amrita, Kaur, P., Nagpal, R. 2015. In vitro biosurfactant production and biofilm inhibition by lactic acid bacteria isolated from fermented food products. International Journal of Probiotics and Prebiotics 10, 1, 17-22.
- Kavas, G., ve Kavas, N. 2007. Biyosüpfaktanlar ve kullanım alanları. Dünya Gıda Dergisi. <http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=2213>
- Kaya K., Morrison L. F., Codd G. A., Metcalf J. S., Sano T., Takagi H., Kubo T., 2006. "A novel biosurfactant, 2-Acyloxyethylphosphonate, isolated from waterblooms of *Aphanizomenon flos-aquae*", *Molecules*, 11, 539-548 .
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C., Nakahara, T. 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosyerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. Journal of Biotechnology, 29, 91-96.
- Koçan, D. 2007. *Listeria monocytogenes* 'in belirlenmesinde minimum inhibisyon konsantrasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, ANKARA.
- Konar, V., ve Kahyaoğlu, M. 2006. Rhamnolipit biyosüpfaktanlarının üretiminde endüstriyel atık maddelerin kullanılması ve rhamnolipitlerin uygulama alanları. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology Biotechnology, 39 (4), 295–304.
- Kural, F.H., Gürsoy, R.N., 2011. Biyosüpfaktanlar. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 31 / Sayı 1 / pp.71-82.
- Makkar R.S., and Cameotra S.S., 1997. "Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions", *J. Am.*

OilChem. Soc., 74: 887-889.

- Makkar RS., Cameotra SS., 2002. An uptake on use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, applied microbiology and biotechnology, 58: 428-434.
- Maneerat S., 2005. "Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources", *Songklanakarin J. Sci. Technology*, 27(3) : 675-683 .
- Mata-Sandoval J. C., Karns J., Torrents A., 1999. "High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* ug2 on corn oil", *J. Chromatogr. A*, 864: 211-220 .
- Mehdi, H., Giti, E. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiterplate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 170-178.
- Meylheuc, T., Methivier, C., Renault, M., Herry, J.M., Pradier, C.M., Bellon-Fontaine, M.N., 2006. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactant produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and Surfaces B: Bio interface*, 4s 52, 128-137.
- Meylheuc, T., Van Oss, C.J., Bellon-Fontaine, M.N. 2001. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 822.
- Miller RM., 1995. Biosurfactant facilitated remediation of metal contaminated soils, *Environmental Health Perspectives*, 103:59-62.
- Mireles, J.R., Toguchi, A., Harshey, R.M. 2001. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 5848.
- Mulligan CN, 2005. Environmental applications for biosurfactants. 133(2):183-98.

- Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F., 1999. "On the use of the biosurfactants for the removal of heavy metals from oil contaminated soil", *EnvironmentalPrograme*, 18: 50-54 .
- Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F., 2001. "Heavy metal removal from sediments by biosurfactants", *J. Hazard. Mater.*, 30: 85 (1-2), 111-125.
- Nielsen T. H., Thrane C., Christophersen C., Anthoni U., Sørensen J., 2000. "Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578", *J. Appl. Microbiol.*, 89, 992-1001 .
- Nitschke, M., and Costa Sgvao., 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5):252-259.
- Nitschke M., Ferraz C., Pastore G. M., 2004. "Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes", *Braz. J. Microbiol.*, 35:81-85 .
- Nitschke, M., and Pastore, G.M. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 336-341.
- Nitschke, M., Araujo, L.V., Costa, S.G.V.A.O., Pires, R.C., Zeraik, A.E., Fernandes, A.C.L.B., Freire, D.M.G., Contiero, J. 2008. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 0266, 8254.
- Ochoa F. J. L., Artiola J. F., Maier RM., 2001. "Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant", *JournalEnvironmental Qual.*, 30 (2): 479-485.
- Oh, I.K., Perez, K., Kahli, N., Kara, V., Li, J., Min, Y., Castillo, A., Taylor, M., Jayaraman, A., Cisneros-Zavalos, L., Akbulut, M., 2015. Hydrophobically-modified silica aerogels: Novel food contact surfaces with bacterial anti-adhesion properties. *Food Control*, 52, 132-141.

- Okoliegbe, I.N., and Agarry, O.O., 2012. Application of microbial surfactant. *Scholarly Journals of Biotechnology*. 1(1), 15-23.
- Patel R.M., Desai A.J., 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses, *letter in applied microbiology*, 25: 91-94.
- Rahman, P.K.S.M. and Gakpe, E., 2008. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants. *Review. Biotechnology*, 7, 360-370.
- Ramnani, P., Kumar, S.S., Gupta, R., 2005. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry*, 40, 3352-3359.
- Rashedi H., Assadi M. M., Bonakdarpour B., Jamshidi E., 2005. "Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source", *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 2(1): 59-62 .
- Raza Z., Rehman A., Khan M., Khalid Z., 2007. "Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes", *Biodegradation*, 18(1): 115-121 .
- Reid, G., 2001. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal*. 10, 5-6, 415-419.
- Reis, R.S., Pacheco, G.J., Pereira, A.G., Freire, D.M.G. 2013. Biosurfactants: Production and Applications. *Intech*, Chapter 2, 33-61.
- Rodrigues L.R., van der Mei H.C., Teixeira J.A., Oliveira R., 2004. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis, *Application Environmental Microbiology* 70, 4408-4410.
- Rodrigues, L.R., Moldes, A., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006a. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 109-116.

- Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Mei, H.C., Oliveira, R., 2006b. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B* 49, 78–85.
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006c. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal* 32, 135–142.
- Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Teixeira J.A.C., Campos-Takaki, G.M., 2011. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 1-5.
- Sanket, K.G., and Yagnik, B.N., 2013. Current trend and potential for microbial biosurfactants. 4 (1):1-8.
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., luna, J.M., Santos, V.A., Salgueiro, A.A., Sarubbo, L.A., 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn step liquor. *Journal Petroleum Science and Engineering* 105, 43-50.
- Sarin, S., Khamsri, B., Sarin, C., 2011. Isolation of biosurfactant-producing bacteria with antimicrobial activity against pathogens. *EnviromentAsia*, 4(1), 1-5.
- Sarubbo, L. A., Luna, J. M., Campos-Takaki G.M., 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(4),400-406.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., 1995, Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, *Int.Dairy Journal*. 5,1081-1094.
- Shekhar, S., Sundaramenikam, A., Balasubramanian, T., 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review., *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45:14, 1522-1554.

- Sıdal U., 1997. “*Pseudomonas sp.* ile zeytin yağı fabrikası atığından biyosüpfektan eldesi”, Doktora Tezi, *Trakya Enstitüsü*, Edirne .
- Tahmourespour, A., Salehi, R., Kermanshahi, R.K., 2011. *Lactobacillus acidophilus* - derived biosurfactant effect on GTFB and GTFC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. Brazilian Journal of Microbiology. 42: 330-339 ISSN 1517-8382.
- Telefoncu A., 1995. Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, Bornova- İzmir
- Thaniyavarn J., Chongchin A., Wanitsuksombut N., Thaniyavarn S., Pinphanichakarn P., Leepipatpiboon N., Morikawa M., Kanaya S., 2006. “Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source” ,*The Journal of General and Applied Microbiology*, 52:4, 215-222 .
- Tiecco, M., Cardinali G., Roscini L., Germana R., Corte L., 2013. Biocidal and inhibitory activity screening of *de novo* synthesized surfactants against two eukaryotic and two prokaryotic microbial species. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 407–417.
- Transparency Market Research. Microbial biosurfactants market (rhamnolipids, sophorolipids, mannosylerythritol lipids (mel) and other) for household detergents, industrial & institutional cleaners, personal care, oilfield chemicals, agricultural chemicals, food processing, textile and other applications - global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast, 2014–2020.
<http://www.transparencymarketresearch.com/microbial-biosurfactants-market.html>
- Uehara, S., Mondena, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R. and Kumon, H. 2006. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. International Journal of Antimicrobial Agents 28S, S30-34.

- Uyar, E. ve Yalçın, H.T. 2013. Mikrobiyal Biyosüpfektanlar. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2), 93-102.
- Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P., 2006. Physiological aspects part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and Biotechnology. Biotechnology Advances 4, 604-620.
- Vedaraman, N., and Venkatesh, N. 2011. Production of Surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from Waste Frying Oil. Brazillian Journal of Chemichal Engineering, 28, 02, 175-180.
- Wong J. W. C., Fang M., Zhao Z., Xing B., 2004. "Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions", *J. Environ. Qual.*, 33:6, 2015-2025 .
- Yalçın E., Ergene A., Yılmaz F., 2009. Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosüpfektan Eldesi: Hemolitik ve Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. Fırat Üniv. Fen BilimLeri Dergisi, 21 (2), 109- 116.
- Yılmaz F., Ergene A., Yalçın E., 2010. Süt fabrikası atık suyundan elde edilen mikroorganizmalar ile biyosüpfektan üretimi: optimum koşulların araştırılması. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 08 (1), 20-30.
- Yılmaz R., Temiz A., 2003. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* 'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 01 ,03, 19-42.
- Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Oin, H., Zhang, N., He, B. 2009. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. Process Biochemistry, 44, 302-308.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., Mcinerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of microbiological methods, 56, 339-347.
- <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>, 2006

<http://en.wikipedia.org/wiki/Molasses>,2006.



ÖZGEÇMİŞ

8 Ocak 1990 yılında ADANA Seyhan’da doğdu. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2015 yılında mezun oldu. 2016’da Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimiyle beraber çeşitli gıda işletmelerinde çalışmış, şurada da Gıda Mühendisi olarak kalite kontrol alanında mesleğine devam etmektedir.