



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***Yarrowia lipolytica* TARAFINDAN ÜRETİLEN
BİYOSÜRFİKTANIN OPTİMİZASYONU VE
Salmonella BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Burçin DURUSEL

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***Yarrowia lipolytica* TARAFINDAN ÜRETİLEN
BİYOSÜRFAKTANIN OPTİMİZASYONU VE
Salmonella BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİ**

Burçin DURUSEL

Danışman : Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN

Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı

İZMİR
2019

Burçin DURUSEL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Yarrowia lipolytica* Tarafından Üretilen Biyosüpfaktanın Optimizasyonu ve *Salmonella* Biyofilm Oluşumuna Etkisi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.08.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç.Dr. H. Tansel YALÇIN

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Mustafa OSKAY

.....

Üye : Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “***Yarrowia lipolytica* Tarafından Üretilen Biyosüpfaktanın Optimizasyonu ve *Salmonella* Biyofilm Oluşumuna Etkisi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05/08/2019

İmzası

Burçin DURUSEL

ÖZET***Yarrowia lipolytica* TARAFINDAN ÜRETİLEN
BİYOSÜRFİLMİN OPTİMİZASYONU VE *Salmonella*
BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİ**

Burçin DURUSEL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN

Ağustos 2019, 113 sayfa

Biyosümfaktanlar, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen, hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlara sahip amfifilik bileşiklerdir. Bu özelliklerinden dolayı, gıda, biyomedikal ve ilaç endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde biyofilm oluşumunu engellemek için sentetik sümfaktanların yerine kullanılacak potansiyele sahiptirler. Bu tez çalışmasında, *Yarrowia lipolytica* tarafından üretilen biyosümfaktanın *Salmonella typhimurium* biyofilmi üzerindeki etkisi çeşitli parametreler optimize edilerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, optimum biyosümfaktan üretimi; karbon kaynağı olarak glikoz ve soya yağı kullanılarak, 7 gün 27°C’de pH 7’de %4 inokulum miktarı ve %0,01 tuz konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Optimum biyofilm oluşumu ise, tuzsuz LB ortamında, 230 µl ve 100 µl ortama sırasıyla 20 µl ve 50 µl organizma süspansiyonları 96 kuyucuklu mikropilaka içerisine eklenmiş ve 27°C’de 48 saat inkübe edilerek elde edilmiştir. Biyosümfaktan süpernatantının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi farklı miktarlarda incelenmiş ve 10 µl ile 50 µl süpernatant miktarlarının inhibisyon yüzdeleri sırasıyla %34 ve %63 olarak belirlenmiştir. Ham biyosümfaktanın etkisi ise 50 mg/ml konsantrasyonunda 10 µl eklendiğinde %67 olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Biyosümfaktan, biyofilm, optimizasyon, anti-adhesiv etki, *Yarrowia lipolytica*, *Salmonella typhimurium*



ABSTRACT**OPTIMIZATION OF BIOSURFACTANT PRODUCED BY
Yarrowia lipolytica AND EFFECT ON *Salmonella* BIOFILM
FORMATION**

DURUSEL, Burçin

MSc in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. YALÇIN, H. Tansel

August 2019, 113 pages

Biosurfactants are amphiphilic compounds, containing both hydrophilic and hydrophobic moieties, that are produced by various microorganisms. The characteristics of biosurfactants can be employed to replace their synthetic counterparts in wide range of applications food, biomedical and pharmaceutical industries. Recently, the application of biosurfactants as antibiofilm agents have been investigated as well. This study determined the effect of different parameters on biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. After which, the effect of biosurfactants on *Salmonella typhimurium* biofilms was investigated. Optimum biosurfactant production was recorded when flasks containing MSM supplemented with glucose and soybean oil, and 0.01% NaCl were inoculated with 4% (v/v) seed culture and incubated at 27°C for 7 days. Maximum biofilm formation was recorded when 230 and 100 µl LB without NaCl medium, dispensed in 96-well microtiter plates, were inoculated with 20 µl and 50 µl bacterial suspension and incubated at 27°C for 48 hours. The coincubation of different amounts of biosurfactant containing free cell supernatant (10 to 50 µl) with bacterial cells and medium inhibited biofilm formation by 34% and 63%, respectively. On the other hand, higher biofilm inhibition, equivalent to by 67% , was recorded when 10 µl of crude biosurfactant (50 mg/ml) was applied.

Key words: Biosurfactant, biofilm, optimization, anti-adhesive effect, *Yarrowia lipolytica*, *Salmonella typhimurium*

ÖNSÖZ

Biyosümfaktanlar, hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlara sahip amfifilik bileşiklerdir. Mikroorganizmalardan elde edilen sümfaktanın biosentezi, biyolojik olarak bozunabilirliği, düşük toksisitesi, ekolojik uygunluğu, yenilenebilir ve ucuz substratların kullanımı, geniş sıcaklık ve pH aralığında etkinlik, yüksek tuzlulukta stabilite ve çeşitli alanlarda geniş uygulama yelpazesi nedeniyle kimyasal sümfaktanlara kıyasla oldukça dikkat çekicidir. *Yarrowia lipolytica*, birçok biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan önemli bir mikroorganizmadır. Biyoteknolojik ve endüstriyel işlemlerde sitrik ve izositrik asitler ve enzimler (asit veya alkalın proteazlar, lipazlar ve ribonükleaz) gibi çeşitli ürünlerin elde edilmesinde, biyoremediyasyonda ve biyosümfaktan üretiminde kullanılır. Biyofilmler hem endüstriye, hem de sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle oldukça önemlidir. *Salmonella* gibi türlerin oluşturduğu biyofilmler; aletlerin üzerinde verdikleri hasarlar, enerji kayıpları, ürün kontaminasyonları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıklar ile maddi açıdan kayıplar oluşturmaktadır. Bu çalışmada, karbon kaynağı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, inokülüm miktarı ve tuz konsantrasyonu parametreleri değiştirilerek *Yarrowia lipolytica* tarafından biyosümfaktan üretiminin optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen biyosümfaktan süpernatantından ekstraksiyon işlemi ile ham biyosümfaktan elde edilmiştir. *Salmonella typhimurium*'un oluşturduğu biyofilm de farklı besiyeri, inkübasyon süresi, sıcaklık, inokülüm miktarı değiştirilerek optimize edilmiştir. Süpernatant ve ham biyosümfaktanın biyofilm üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen tüm veriler, biyosümfaktanların giderek artan pazar potansiyeli ve çeşitli kullanım alanları sayesinde, antibiyofilm etkileri göz önüne alındığında, potansiyel olarak etkili bir antibiyofilm ajanının seri üretilmesi için büyük bir rol oynamaktadır.

İZMİR

05/08/2019

Burçin DURUSEL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Biosürfaktanlar	4
2.1.1 Biosürfaktanların Sınıflandırılması	6
2.1.1.1 Glikolipidler	8
2.1.1.2 Lipopeptidler ve lipoproteinler	10
2.1.1.3 Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral lipidler	11
2.1.1.4 Polimerik biosürfaktanlar	12
2.1.2 Biosürfaktanların kimyasal sürfaktanlara kıyasla avantajları	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.2.1. Yüzey/Arayüzey gerilimini düşürebilme.....	13
2.1.2.2. Düşük toksisite	15
2.1.2.3. Biyoparçalanabilirlik	15
2.1.2.4. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı.....	16
2.1.3 Biyosümfaktan üretimini etkileyen faktörler	16
2.1.5 Biyosümfaktanların endüstriyel açıdan önemi	18
2.2 <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
2.2.1 Genel özellikleri	20
2.2.2 Biyoteknolojik önemi	22
2.2.3 Biyosümfaktan üretimi	23
2.3 Biyofilm.....	25
2.3.1 Biyofilm ve yapısı	25
2.3.2 Biyofilm oluşum sebepleri.....	27
2.3.3 Biyofilm oluşum basamakları.....	28
2.3.4 Biyoteknolojik alanda biyofilm	31
2.4 <i>Salmonella</i> Biyofilmleri	32

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5 Biosümfaktanların Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkileri	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1 Gereç	36
3.1.1 Kullanılan örnekler.....	36
3.1.2 Kullanılan besiyerleri	36
3.1.2.1 Yeast Mould agar/broth (YMA/B).....	36
3.1.2.2 Minimal salt medium (MSM)	37
3.1.2.3 Tryptic soy agar (TSA)	38
3.1.2.4 Tryptic soy broth (TSB)	38
3.1.2.5 Seyreltilmiş TSB (1/20 TSB)	38
3.1.2.6 Luria-Bertani (LB) broth.....	39
3.1.2.7 NaCl'siz Luria-Bertani (LB) broth.....	39
3.1.3 Çözelti, tampon ve boyalar.....	40
3.1.3.1. Fizyolojik tuzlu su	40
3.1.3.2 DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler	40
3.1.3.3 26S rDNA analizinde kullanılan materyaller	42

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.3.4. pH tamponları	43
3.1.3.5 Kristal viole	44
3.1.4 Kullanılan başlıca cihazlar.....	44
3.2 Yöntem	45
3.2.2 Biosümfaktan aktivitesi gösteren izolatin tanılanması.....	45
3.2.2.1 DNA izolasyonu	45
3.2.2.3. 26S rDNA-PCR	46
3.2.2.4 26S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi	47
3.2.2.5 26S rDNA D1/D2 domaininin sekans analizi.....	49
3.2.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın büyüme koşulları.....	49
3.2.4 Üretilen biosümfaktanın optimizasyonu	50
3.2.5 Biosümfaktan üretiminin taranması	50
3.2.5.1 Oil spreading (yağ yer değiştirme) testi	50
3.2.5.2 Emülsifikasyon aktivite testi (%E ₂₄)	51
3.2.5.3. Koloni sayımı ve hücre büyümesi	51
3.2.6 Biosümfaktanın ekstraksiyonu	52

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.7 <i>Salmonella typhimurium</i> biyofilminin uygun koşullarının sağlanması	52
3.2.8 Biosürfaktanın biyofilm üzerindeki anti-adhesiv etkisi	54
4. BULGULAR	57
4.1 Biosürfaktan üreticisi izolatın 26S rDNA-PCR sekans sonuçları	57
4.2 Biosürfaktan Üretimine Optimizasyonu	59
4.2.1 Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi	59
4.2.2 Sıcaklık	63
4.2.3 pH	66
4.2.4 İnokülasyon miktarı	69
4.2.5 Tuz konsantrasyonu	72
4.3 Biosürfaktanın Ekstraksiyonu	75
4.4 Biyofilm Çalışmaları	76
4.4.1 <i>Salmonella</i> biyofilminin uygun koşullarının sağlanması	76
4.4.2 Biosürfaktan içeren süpernatantının biyofilm üzerindeki etkisi	79
4.4.3 Kısmi saflaştırılan biosürfaktanın biyofilm üzerinde etkisi	82
5. TARTIŞMA	85

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	97
TEŞEKKÜR	112
ÖZGEÇMİŞ.....	113



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Bilinen bazı biyosümfaktanların kimyasal yapıları	8
2.2 Biyosümfaktanlar tarafından oluşturulan agregat türleri.....	13
2.3 Biyosümfaktan konsantrasyonu ile misel oluşumu, yüzeyarayüzey gerilimi ve çözünürlük arasındaki ilişki	14
2.4 (a) <i>Y. lipolytica</i> DSM3286'nın YPDA (maya özü-pepton-dekstroz agar) ortamı üzerindeki kolonisi (b) <i>Y. lipolytica</i> strain E122'nin morfolojisi	22
2.5 Biyofilmin genel yapısı.....	26
2.6 Biyofilm oluşum aşamaları.....	29
2.7 Biyosümfaktanların biyofilmin yüzeye yapışmasını engellemesinin şematik görüntüsü	35
3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> TEM BD 35'in katı ve sıvı besiyerindeki görünümü.....	49
3.2 Biyofilm oluşumunun uygun koşullarının sağlanması için belirlenen parametrelerin şematik gösterimi	54
3.3 Biyosümfaktan içeren süpernatantın biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi incelenirken yapılan uygulamanın şematik gösterimi	55
4.1 Tanısı yapılan <i>Y. lipolytica</i> TEM BD 35 ile tip türlerin 26S rDNA bölgesi sekansları kullanılarak Neighbor-Joining metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağaç	58
4.2 <i>Yarrowia lipolytica</i> TEM BD 35 26S rDNA bölgelerinin elektroforez sonucu	58

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.3a Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi optimizasyonunda 7. günde biyosüpfaktan üretiminin Oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları	60
4.3b Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi optimizasyonunda 7. günde biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları	60
4.4 Biyosüpfaktan üretiminde inkübasyon süresi ve karbon kaynağı parametrelerinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk ($OD_{600\text{ nm}}$), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (% E_{24}) sonuçları.....	62
4.5a Sıcaklık optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları.....	63
4.5b Sıcaklık optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları	63
4.6 Biyosüpfaktan üretiminde sıcaklık parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk ($OD_{600\text{ nm}}$), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (% E_{24}) sonuçları.....	65
4.7a pH optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları.....	66
4.7b pH optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları	66
4.8 Biyosüpfaktan üretiminde pH parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk ($OD_{600\text{ nm}}$), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (% E_{24}) sonuçları	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9a İnokülasyon miktarı optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları.....	69
4.9b İnokülasyon miktarı optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E ₂₄) sonuçları.....	69
4.10 Biyosüpfaktan üretiminde inokülasyon miktarı parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD _{600 nm}), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E ₂₄) sonuçları	71
4.11a Tuz konsantrasyonu optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları.....	72
4.11b Tuz konsantrasyonu optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E ₂₄) sonuçları	72
4.12 Biyosüpfaktan üretiminde tuz konsantrasyonu parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD _{600 nm}), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E ₂₄) sonuçları	74
4.13 Ekstraksiyon, evaporasyon işlemleri ve elde edilen ham biyosüpfaktan görüntüsü	75
4.14 <i>S. typhimurium</i> biyofilminin tuzsuz LB ortamında 27 °C’de 48 saat inkübasyon sonrasında mikropalakateki görüntüleri.....	76
4.15 Farklı parametreler kullanılarak <i>Salmonella typhimurium</i> biyofilminin optimizasyonu.....	78
4.16a Farklı miktarlardaki biyosüpfaktan içeren süpernatantın <i>S. typhimurium</i> biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.16b** Farklı miktarlardaki biyosürfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm'de ölçülen optik yoğunlukları81
- 4.16c** Farklı miktarlardaki biyosürfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin inhibisyon yüzdeleri.....82
- 4.17a** Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biyosürfaktanın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm'de optik yoğunluğu (OD_{590nm}).....83
- 4.17b** Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biyosürfaktanın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin inhibisyon yüzdesi84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Mikrobiyal sürfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar	7
2.2 Çeşitli uygulamalarda faydalı olan biyosürfaktan karakteristikleri.....	20
4.1 Biyosürfaktan üretiminde inkübasyon süresi ve karbon kaynağı parametrelerinin optimizasyon sonuçları.....	61
4.2 Biyosürfaktan üretiminde sıcaklık parametresinin optimizasyonu	64
4.3 Biyosürfaktan üretiminde pH parametresinin optimizasyonu	67
4.4 Biyosürfaktan üretiminde inokülasyon miktarı parametresinin optimizasyonu	70
4.5 Biyosürfaktan üretiminin tuz konsantrasyonuna göre değişimi	73
4.6 <i>Salmonella typhimurium</i> biyofilminin uygun koşullarının sağlanması için farklı parametreler kullanılarak elde edilen sonuçlar	77
4.7a Farklı miktarlardaki biyosürfaktan içeren süpernatantın <i>S. typhimurium</i> biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları ve inhibisyon yüzdesi	79
4.7b Farklı miktarlardaki biyosürfaktan içeren süpernatantın <i>S. typhimurium</i> biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları ve inhibisyon yüzdesi	80
4.8 Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biyosürfaktanın <i>S. typhimurium</i> biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisi	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**KISALTMALAR**

EPS	Ekzopolisakkarit
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
MSM	Minimal Salt Medium
YMA	Yeast Mould Agar
LB	Luria-Bertani
GRAS	Generally Regarded As Safe
KMK	Kritik misel konsantrasyonu
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
OD	Optik yoğunluk
E ₂₄	Emülsifikasyon aktivite testi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**SİMGELER**

°C	Celcius
bp	Baz çifti
µl	Mikrolitre
OD	Optik Yoğunluk
kob	Koloni oluşturan birim
ml	Mililitre
g	Gram
L	Litre
mN/m	Milnewton / metre

1. GİRİŞ

Sümfaktan terimi, "yüzey aktif ajan" ifadesinden türetilmiştir ve bu amfifilik moleküllerin gaz, sıvı ve katı gibi farklı fazlar arasındaki arayüzey aktivitesini açıklamaktadır. Mikrobiyal sümfaktanlar ise bakteri, mantar ve maya gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir. Biyosümfaktanlar, mikrobiyal hücre yüzeylerinde veya sıvı fazlar arasında birikebilen hidrofobik ve hidrofilik kısımlardan oluşan ve hücre dışına salgılanan amfifilik bileşiklerdir; bu nedenle yüzey ve arayüzey arasındaki gerilimi azaltmaktadır (Fakruddin, 2012). Sümfaktanlar deterjanlar, ıslatıcı ajanlar, emülgatörler, dağıtıcılar ve köpükendirme ajanları olarak görev yapabilmektedir ve şampuanlardan kişisel bakım ürünlerine, farmasötiklerden boyalara kadar birçok ürün formülasyonunun ana bileşenlerini oluşturmaktadır (Marchant and Banat, 2012; Arutchelvi and Doble, 2010).

Son zamanlarda kimyasal sümfaktanların toksisite ve çevrede oluşturdukları sorunların neden olduğu çevresel etkilere büyük önem verilmiştir. Çevresel endişelerin artması, biyoteknolojideki ilerleme ve daha katı yasaların ortaya çıkması, biyosümfaktanların piyasada mevcut olan kimyasal sümfaktanlara potansiyel bir alternatif oluşturmasına neden olmuştur. Her ne kadar biyosümfaktanlar biyoremediasyon gibi işlemlerde ümit verici kullanımlara sahip olsalar da, yüksek hammadde maliyetleri, yüksek işlem maliyetleri ve düşük üretim verimi nedeniyle büyük ölçekte üretimlerini gerçekleştirmek oldukça zordur. Bundan dolayı, mevcut araştırmalar, verimi artırmak ve hammadde maliyetlerini azaltmak üzerine yapılmaktadır (Reis et al., 2013).

Fiziksel ve kimyasal özellikler, yüzey geriliminin azaltılması ve oluşan emülsiyonun kararlılığı biyosümfaktanların sayısız biyolojik uygulamada kullanılmasını mümkün kılan önemli özelliklerdir. Biyosümfaktan uygulamaları üzerine yapılan çalışmaların çoğu çeşitliliği, çevre dostu yapısı, büyük ölçekli üretime uygunluğu ve seçiciliği nedeniyle çevre uygulamalarında kullanımına odaklanmıştır. Biyosümfaktanlar düşük toksisite, yüksek biyolojik bozunabilirlik

ve aşırı sıcaklıklarda veya pH değerlerinde etkinlik gibi kimyasal sürfaktanlara göre çeşitli avantajlara sahiptir. Biyosürfaktanlar için düşünülen potansiyel uygulamaların birçoğu ekonomik olarak üretilip üretilmemesine bağlıdır. Ayrıca, proses optimizasyonunda, mühendislik ve biyolojik seviyelerde çok fazla çaba harcanmaktadır. Potansiyel ve biyolojik kökenlerine rağmen, biyomedikal alanla ilgili uygulamalar üzerine sadece birkaç çalışma yapılmıştır. Bazı biyosürfaktanlar sentetik ilaçlar ve antimikrobiyal maddelere uygun alternatiflerdir, ayrıca güvenli ve etkili terapötik maddeler olarak kullanılabilirler (Rufino et al., 2012).

Yarrowia lipolytica, aerobik bir mayadır ve çeşitli metabolik aktiviteler göstermektedir. Patojenik olmadığı kabul edilmektedir ve Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından “Generally Regarded As Safe (GRAS)” (genellikle güvenli kabul edilen) olarak sınıflandırılmıştır. Bazı türler, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar dahil çeşitli organik bileşikler için parçalama kabiliyetine sahiptir ve bu özelliğe sıklıkla biyosürfaktan üretim özelliği eşlik eder. Bu moleküller ağırlıklı olarak glikolipidlerdir, ancak farklı substratlar kullanılarak başka tipte yapılar da rapor edilmiştir (Fontes et al., 2010).

Biyofilm, salgılanan polimerleriyle birlikte organik veya inorganik bir yapının yüzeyine yapışan ince bir mikroorganizma tabakasıdır. Biyofilmler, patojenik veya çevresel olsun, doğal ortamlarında hemen hemen tüm bakterilerin baskın fenotipidir. Biyofilm ortamındaki bakteriler, planktonik bakterilere göre antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dayanıklı olabilmektedir. Bir araya gelme (Co-aggregation) ve yapışma (co-adhesion), biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülen iki fiziksel etkileşim şeklidir (Gomaa, 2013). *Salmonella*, 2500'den fazla serovarda sınıflandırılmış, çeşitli konakçıları enfekte eden hücre içi gram negatif bir patojendir. İnsan enfeksiyonlarıyla en sık ilişkili olan *S. enteritidis*, *S. typhimurium* gibi birçok serovarin geniş bir konakçı aralığı vardır. *Salmonella* genellikle sadece planktonik hücreler olarak değil aynı zamanda yüzeylere bağlı biyofilmler gibi sapsız, çok hücreli formlar halinde de bulunur. Biyofilm oluşumu *Salmonella*'nın yayılması için önemlidir, çünkü biyofilmdeki bakteriler dezenfektanlara ve kimyasal, fiziksel ve mekanik streslere karşı dirençlidir. Biyofilm oluşumu *Salmonella* virülansına da katkıda bulunur, çünkü

biyofilmdeki bakteriler antibiyotiklere ve konakçı bağışıklık sistemine daha dirençlidir, bu da kronik enfeksiyon ve *Salmonella* taşıyıcı durumunun gelişmesi ile sonuçlanır (Peng, 2016).

Son yıllarda, biyosümfaktanların biyofilmleri kontrol etmek için alternatif olarak kullanımı kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Biyosümfaktanların bakteri hücrelerinin yüzey özelliklerini değiştirdiği ve yapışkan özelliklerini azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak bakterilerin ürettiği biyosümfaktanın, biyofilm gelişimini ve hücreden hücreye iletişimi engellediği gösterilmiştir. Biyosümfaktanların patojenik organizmaların katı yüzeylerde (örn. kistik fibroz gibi birçok hastalığa neden olan) biyofilm oluşumunu ve enfeksiyon bölgelerine yapışmasını engellediği bulunmuştur. Bu nedenle, biyosümfaktanların katı yüzeylere önceden yapışması, patojenik mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumu ile kolonizasyonla mücadelede yeni ve etkili bir yol oluşturmaktadır. Vinil üretral kateterlerin ortam ile inkübe edilmeden önce, içlerinden bir sümfaktin çözeltisi geçirilerek *S. typhimurium*, *S. enterica*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis* tarafından oluşturulan biyofilm miktarını azalttığı görülmüştür (Rufino et al., 2012; Sambanthamoorthy, 2014).

Yapılan bu tez çalışmasında hidrokarbonlar tarafından kontamine edilmiş habitatdan izole edilen biyosümfaktan üreticisi mikroorganizmanın moleküler tanılaması, üretilen biyosümfaktanın etkinliğinin belirlenmesi, en yüksek biyosümfaktan üretim koşullarının saptanması ve *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biosümfaktanlar

Sümfaktanlar hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlara sahip amfifilik bileşiklerdir. İki karışmayan sıvı arasındaki ara yüzeyde birikip, emülsiyonları dengeleyerek veya sulu ortamda hidrofobik ya da çözünmeyen organik bileşiklerin çözünürlüğünü arttırarak yüzey ve ara yüzey gerilimlerini azaltabilirler. Sümfaktanlar veya yüzey aktif maddeler, sentetik sümfaktanlar ve mikrobiyal sümfaktanlar (biosümfaktanlar) olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir. Sentetik sümfaktanlar, organik kimyasal reaksiyonlarla üretilirken, biosümfaktanlar bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından hücre dışı salgılama gibi biyolojik işlemlerle üretilir (Amaral et al., 2010).

Sümfaktanlar önemli bir etkiye sahiptir, çünkü günlük hayatta kullanılan ürünlerin çoğunda önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Birçoğu düz veya dalı zincirli alkil sülfatlar veya sülfonatlar olan, petrokimyasal veya oleokimyasal kaynaklardan elde edilen bu kimyasal sümfaktanlar, çamaşır deterjanı, yüzey temizleme maddeleri, konsantre katkı maddeleri, kozmetik ve farmasötiklerin bileşenleri olarak bulunabildikleri gibi, tarımsal gıda işleme ve petrol endüstrisinde de kullanılabilirler (Marchant and Banat, 2012). Sümfaktanlar, hava ile su ara yüzeyinde konsantre olma özelliğiyle sabun ve deterjanlarda bulunur ve genellikle, hava-su ve su-yağ ara yüzeylerinde yüzey ya da ara yüzey gerilimini azaltarak sulu olmayan faz sıvılarının çözünürlüğünü arttırabildikleri için yağlı maddeleri ortamdaki ayırmada kullanılırlar (Fakruddin, 2012). Mikrobiyal sümfaktanlar, sentetik sümfaktanlarla aynı özellikleri gösteren ve halihazırda sentetik sümfaktanları kullanan geniş bir potansiyel endüstriyel uygulama yelpazesinde faydalı olduğu kanıtlanmış ikincil metabolit sınıfı oluşturur. Mikrobiyal yollardan üretilen biosümfaktanların ilgi ve araştırma faaliyetleri, temel olarak petrol geri kazanımı ve çevresel biyo-iyileştirme alanındaki potansiyel uygulamaları nedeniyle yakın zamanda artmıştır (Amaral et al., 2010).

Biyosümfaktanlar, organizmalar tarafından hücre yüzeylerinde üretilir veya ekstrasellüler olarak ortama salınır. *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Myroides*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Halomonas*, *Corynebacteria* ve *Lactobacillus* gibi bakteriler; *Aspergillus*, ve *Penicillium* gibi funguslar; *Pichia anomala* ve *Candida* gibi mayalar ve *Nocardia erythropolis* gibi aktinomisetlerin biyosümfaktan ürettiği bilinmektedir (Vanavil et al., 2013).

Biyosümfaktan üretiminde maya kullanmanın en büyük avantajı, *Y. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces lactis* gibi türlerin çoğunun içerisinde bulunduğu GRAS statüsüdür. GRAS statüsündeki organizmalar, toksik veya patojen değildirler ve ürünlerinin gıda ile ilaç endüstrisinde uygulanmasına izin verilmektedir (Amaral et al., 2010).

Üretici hücrede biyosümfaktanın işlevselliği tam olarak bilinmemektedir. Buna rağmen suda çözünmeyen substratların emülsifikasyonunda biyosümfaktanların işlevleri hakkında bazı varsayımlarda bulunulmuştur. Mikroorganizmalar yağ bulunan ortamda kültüre edildiğinde, biyosümfaktanlar üretim ortamında sürekli birikmektedir. Bu biriken maddeler (biyosümfaktanlar), yağ bazlı substratların emülsifikasyonunda işlev görerek ara yüzey alanını genişletir ve hücre yüzeyinde kütle transferini hızlandırır. Su-yağ ara yüzeyi sınırlayıcı bir faktör olabildiği için biyosümfaktanlar ile emülsifikasyon, mikroorganizmanın substratı emmesi için avantaj sağlayan doğal bir işlem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, patojenler bitkileri veya hayvanları enfekte ettiğinde, biyosümfaktanların bir dağıtıcı madde olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Öte yandan, mikrobiyal sümfaktanlar, hücrelerin arayüzelere yapışması için önemlidir. Fizyolojik olarak, biyosümfaktanlar hücre sel metabolizmanın, hareketin ve savunmanın bileşenleri olarak kabul edilmektedir. Biyosümfaktanlar bakterilerde, biyofilm ve quorum-sensing mekanizmaları için gerekli bir molekül olarak, zayıf çözünür substratların alımını teşvik ettiği için ise, kayganlaştırıcılarda, immün modülatörlerde, ikincil metabolitlerde ve bilinen antimikrobiyal maddelerde tanımlanmışlardır. Biyosümfaktanlar, aynı zamanda, özellikle yağ parçalayıcı mikroorganizmalar için, yağ moleküllerinin çözünmesinde önemli rollere sahiptir (Sharma, 2016).

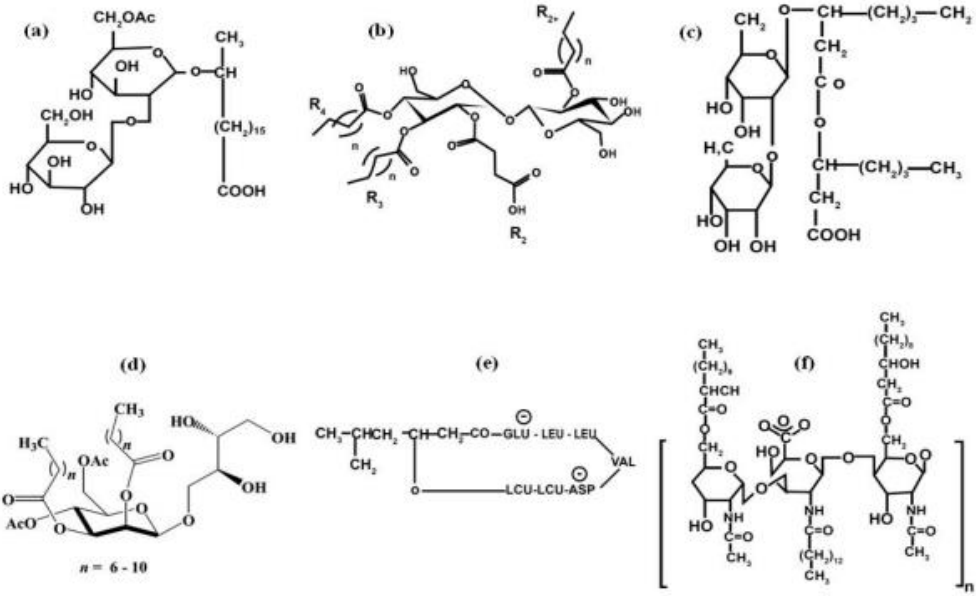
2.1.1 Biyosümfaktanların Sınıflandırılması

Mikrobiyal sümfaktanlar, en az bir hidrofilik ve bir hidrofobik kısım içerdiğinden dolayı amfifilik özellik göstermektedir. Hidrofobik kısım genellikle doymuş/doymamış yağ asitleri, yağ alkoller ve 8-18 karbon zincirli hidroksil yağ asitleri içermektedir. Biyosümfaktanların hidrofilik kısımları ester, fosfat, karboksil, hidroksil grup ve mono-, oligo-, ya da polisakkaritler gibi karbohidratlar ve aynı zamanda peptidler ile proteinler içerebilir (Sharma, 2016).

Kimyasal olarak sentezlenmiş sümfaktanlar genel olarak sudaki ayrışma düzenlerine göre sınıflandırılır, biyosümfaktanlar ise kimyasal bileşimleri, etki mekanizmaları, moleküler ağırlıkları, fizikokimyasal özellikleri ve mikrobiyal orijinleri ile sınıflandırılmaktadır (Fakruddin, 2012; Campos et al., 2013). Bu yüzey aktif bileşikler, peptidler, lipopeptitler, glikolipidler (ramnolipidler, sorfolipidler, trehalolipidler), glikopeptidler, yağ asitleri ve fosfolipidler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler ve hem polisakkaritleri hem de proteinleri içeren polianyonik heteropolisakkaritler, lipoproteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olarak ikiye ayrılır (Vanavil et al, 2013).

Çizelge 2.1 Mikrobiyal sürfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar (Uyar ve Yalçın, 2013)

Biyosürfaktan sınıfı		Mikroorganizma
Glikolipidler	Ramnolipidler	<i>Serratia rubidea</i> <i>Pseudomonas</i> sp. (<i>P. aeruginosa</i>) <i>Burkholderia</i> sp.
	Trehalolipidler	<i>Nocardia</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp. (<i>R. erythropolis</i>) <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium</i> sp.
	Soforolipidler	<i>Candida lipolytica</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Candida (Torulopsis) apicola</i> <i>Candida bogorienses</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
	Sellobiyolipidler	<i>Ustilago maydis</i> <i>Ustilago zae</i>
Lipopeptidler ve Lipoproteinler	Likenisin A/B Sürfaktin, Subtilisin, İturin Serrawettin Gramisidin Viskosin Polimiksin	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
	Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler	Mikolik asit Korinomikolik asit Fosfatidiletanolamin
Polimerik Biyosürfaktanlar	Alasan Emülsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Mannoprotein Liposan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida lipolytica</i>
Partiküler Biyosürfaktanlar	Mikrobiyal hücre	<i>Yarrowia</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.
	Vezikül ve fimbria	<i>Serratia</i> sp. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>



Şekil 2.1 Bilinen bazı biosümfaktanların kimyasal yapıları (a)Ramnolipid, (b)Trehalolipid, (c)Sforolipid, (d) Mannozeletritol lipid, (e)Sümfaktin, (f)Emülsan. (Uyar ve Yalçın, 2013)

2.1.1.1 Glikolipidler

En çok çalışılan mikrobiyal sümfaktanlar glikolipidlerdir. Glikolipidler, bir ester veya eter grubu ile bağılı hidroksil yağ asitleri veya uzun zincirli yağ asitleri ile birleşen karbonhidratları oluşturur. Ramnolipidler, trehalolipidler ve soforolipidler en çok araştırılan glikolipidlerdir. Glikolipidler genellikle lipid kısımlara bağılı olan mono- veya oligosakkaritlerden oluşan düşük molekül ağırlıklı yüzey aktif ajanlardır. Şeker kısmı genellikle glukoz, galaktoz, ksiloz veya ramnoz kısımlar içerir. Lipid kısım ise ya doymuş ya da doymamış yağ asitlerinden veya hidroksil yağ asitlerinden oluşmaktadır (Sharma, 2016).

Glikolipid sekonder metabolit biosentezi temel olarak azot açlığı veya yüksek bir C/N oranı koşulları altında ortaya çıkar. Birincil metabolizma genleri genom boyunca dağılırken, ikincil metabolitlerin sentezine katılan genler ise genellikle birarada bulunurlar. Bu sayede genlerin aktivasyonu ve düzenlemesi

kolaylaşmaktadır. Maya glikolipidlerinin biyosentezine katılan genler bu durumun mükemmel örneklerindedir (Jeziarska et al., 2017).

Ramnoflipidler

Ramnoflipidler, β -hidroksidekanoik aside bağlanan ramnoz şeker molekülleri içerir. Glikosidik bağ, yağ asitlerinin (hidroksidekanoik asit) OH grupları arasında meydana gelir ve sonra ramnoz şekerinin indirgeyici ucuna eklenerek başka bir hidroksidekanoik asidin serbest OH grubu ester bağ oluşumunda sarmal oluşturur. Jarvis and Jhonson (1949), ramnoflipid üretimini ilk olarak *Pseudomonas aeruginosa*'da raporlamıştır. Ramnoflipidler çoğunlukla bir veya iki α -L-ramnoz şekerden elde edilir ve bir veya iki hidroksil yağ asit kısımlarıyla O-glikosidik bağ ile bağlanır. Hidroksil yağ asitlerinin zincir uzunluğu 8 ile 16 karbon atomu arasında çeşitlilik göstermektedir. *Burkholderia* türlerinin ayrıca, asıl yağ asidi olarak hidroksil tetradekanoik asit içerdiği, ramnoflipid üretimi rapor edilmiştir. Üç hidroksil yağ asidi kısmı içeren *B. plantarii* tarafından üretilen çok nadir bir ramnoflipid türü bildirilmiştir (Sharma, 2016).

Trehalolipidler

Trehaloz, α - α -1,1-glikosidik bağ ile bağlanmış iki monomerik glikoz biriminden oluşan bir tür indirgeyici şekerdir. *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., and *Rhodococcus* sp. gibi çeşitli mikroorganizmalar trehaloz şeker kısımları içeren bir tür glikolipid üretir ancak *R. erythropolis*'ten elde edilen trehaloz lipidler daha çok tanımlanmıştır. Çeşitli trehaloz lipid yapıları meydana gelmektedir. Diğer glikolipidlerden farklı olarak hidrofobik kısım, değişik uzunluktaki hidroksillenmiş dallanmış zincirli yağ asitlerini (mikolik asitler) ile alifatik asitler içerecek şekilde çeşitlilik göstermektedir. *R. erythropolis*, hücreye bağlı biyosümfaktanların kompleks karışımını üretmektedir. C-6 ve C-6' pozisyonlarından mikolik aside bağlı olan disakkarit trehaloz *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium*'un birçok türü ile ilişkilendirilmiştir. Başlıca bileşenleri trehaloz mikolatlarıdır. Trehalolipidler, yüzey ve arayüzey gerilimini düşürme potansiyeli olan ve sonuçta hidrofobik karışımların çözünürlüğüne sahip

çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamalarına daha fazla ilgi gösterilmiştir (Uyar ve Yalçın, 2013; Sharma, 2016).

Soforolipidler

Soforolipidler, patojenik olmayan maya suşları tarafından üretilen glikolipid türleridir. Gorin et al. (1961), ilk kez sophorolipidleri mikrobiyal yüzey aktif maddeler olarak rapor etmişlerdir. Artan çevresel duyarlılıktan dolayı soforolipidler, biyolojik olarak parçalanabilirliği, daha düşük toksisite ve çeşitli çevresel faktörlere karşı kararlılıkları nedeniyle potansiyel yüzey aktif maddeler olarak geliştirilmektedir. Soforolipidler, uzun zincirli bir hidroksil yağ asidine kovalent olarak bağlanan soforoz şekerinden oluşmaktadır. Ağırlıklı olarak *Candida torulopsis* ve *C. bombicola* olan çeşitli maya türlerinin, etkili soforolipidlere sahip oldukları bildirilmiştir. Mayalardaki soforolipidlerin fonksiyonel rolü belirsizdir, ancak karbon depolanmasına yardımcı olduğu ve aynı zamanda rakip mikroorganizmalara karşı bir direnç gösterdiği de bilinmektedir. Soforolipidler, kozmetik formülasyonlarda antibiyotik ajanlar olarak ve antifungal ile spermidal aktivitelerde özel olarak kullanılır. Her ne kadar soforolipidler yüzey ve arayüzey gerilimini azaltsa da etkili emülsifiye edici ajanlar değildirler. Soforolipidler, disakarit soforozdan iki farklı formda, laktonik ve asit formunda oluşur (Sharma, 2016).

Soforolipidler, Ecover ve Saraya gibi firmalar tarafından üretilen sert yüzey temizleme ürünleri gibi birçok üründe kullanılmaktadır. 400 g/L'ye kadar verimli soforolipid üretimi ile bilinen *Starmerella bombicola*, şu ana kadar en iyi çalışılmış üreticidir (Geys et al., 2014).

2.1.1.2 Lipopeptidler ve lipoproteinler

Bacillus cinsine üye bakteri türleri tarafından üretilen biyosüpfaktanların bu sınıfı; fengisin, iturin, sürfaktin ve son yıllarda keşfedilen kurstakinler olmak üzere 4 sınıfta incelenmektedirler. Lipopeptid ve lipoprotein tipindeki biyosüpfaktanlar, genellikle bir yağ asidine bağlı yüksek miktarda siklik

lipopeptidlerden oluşur. Antibiyotik benzeri bileşikler, özellikle de siklik lipopeptid, yani *B. subtilis*'ten türetilen sürfaktin üreten çeşitli bakteriler bilinmektedir. Sürfaktin, çok düşük konsantrasyonlarda bile yüzey gerilimini 72,8 mN/m (milinewton/metre)'den 27,9 mN/m'ye düşürmektedir. *B. subtilis*'den üretilen lipopeptidler antibakteriyel, antifungal, antimikoplazmal ve antiviral gibi çeşitli antimikrobiyal aktivitelere sahiptir. Lipopeptidler, açillenmiş bir yağ asidi molekülü ile bağlanmış siklik peptidlerdir. Lipopeptidler, üretim ortamında ekstrasellüler olarak *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. ve bazı aktinomisetler gibi çok sayıda mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Lipopeptitler sadece yüzey gerilimini azaltmakla kalmaz aynı zamanda önemli bir antibiyotik etkide göstermektedir. (Uyar ve Yalçın, 2013; Sharma, 2016).

Bacillus subtilis'den elde edilen sürfaktin, yedi amino asit ve farklı 3-hidroksil yağ asitleri içeren siklik bir lipopeptittir. Ana bileşen, 3-hidroksil-13-metil-miristin asididir. Sürfaktin ayrıca antibakteriyel özelliklere sahip çok iyi bir yüzey aktif maddedir. Sürfaktinler lineer, ribozomal olmayan sürfaktin sentaz enzimi tarafından üretilir. Ayrıca, *B. subtilis*'in iki farklı lipopeptid olan itürin ve fengisini de ürettiği bildirilmiştir (Hausmann and Syldatk, 2015; Sharma, 2016).

2.1.1.3 Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral lipidler

Çeşitli fungus, maya ve bakteriler yüksek miktarlarda yağ asitleri üreten alkanlar, fosfolipidler ve besin maddelerinin alımını sağlayan nötral lipidler gibi hidrofobik besinler üzerinde büyüebilmektedirler. Biyosürfaktan çeşitlerinin üretimi için *Acinetobacter* sp.'nin çeşitli suşları ve *Aspergillus* sp. farklı kaynaklarda rapor edilmiştir. Ek olarak, düz zincirli asit mikroorganizmaları, OH fonksiyonel gruplarından bileşik yağ asitleri ve korinomukolik asitler gibi alkil dalları salgırlar. Fosfolipitler, mikrobiyal hücre zarlarının ana bileşenleri olarak tanımlanır. Hidrokarbon parçalayabilme potansiyeli olan çeşitli mikroorganizmalar hidrofobik substratlar üzerinde büyütüldüğünde, fosfolipid miktarı önemli ölçüde artmaktadır (Sharma, 2016).

2.1.1.4 Polimerik biyosümfaktanlar

Polimerik mikrobiyal yüzey aktif ajanlar çeşitli bileşenlere sahiptir. Çok çeşitli polimerik biyosümfaktan listesi mevcuttur, ancak en iyi çalışılan mikrobiyal yüzey aktif ajanları liposan, manoprotein, emülsan ve çeşitli polisakarit-protein kompleksleridir. *Acinetobacter calcoaceticus*, yağ asitlerinin kovalent olarak bağlandığı heteropolisakarit içeren polimerik biyosümfaktanları üreten en iyi çalışılmış mikroorganizmadır. Cirigliano ve Carman'a (1985) göre, *Y. Lipolytica*, %83 karbonhidrat ve %17 proteinden oluşan bir karbonhidrat-protein karışımı sentezler. Manoprotein, genellikle gıda emülsifikasyonunda kullanılan biyospersan ve alasan gibi, ilave polimerik mikrobiyal sümfaktan olarak görülmektedir (Desai and Banat, 1997; Sharma, 2016).

2.1.2 Biyosümfaktanların kimyasal sümfaktanlara kıyasla avantajları

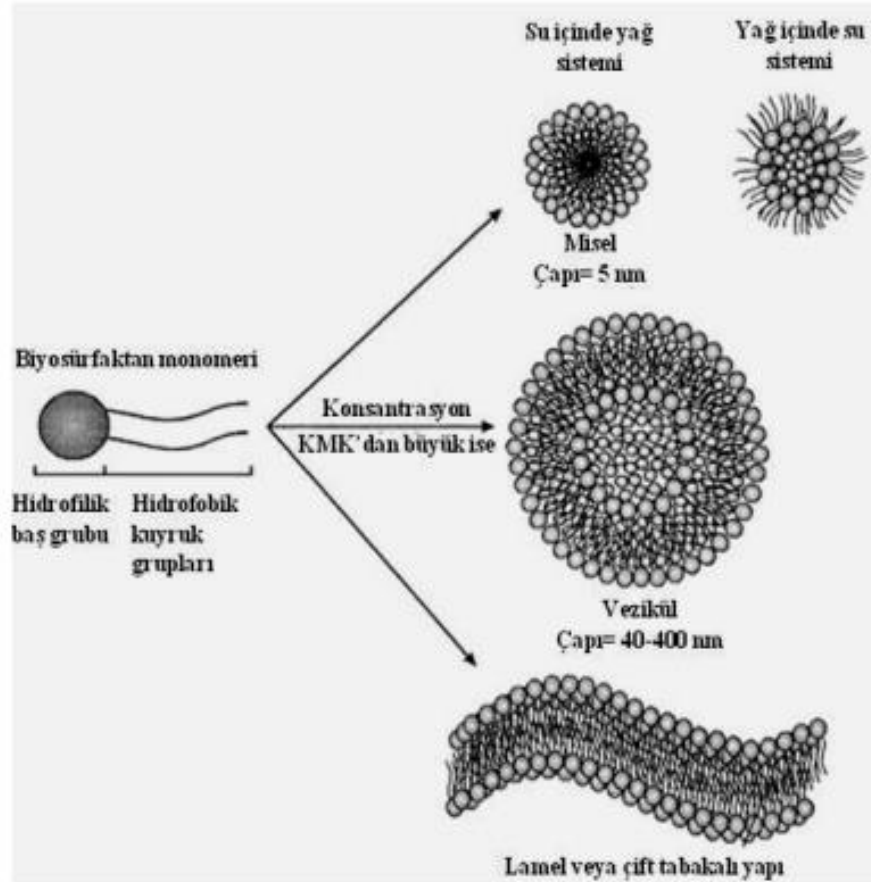
Endüstriyel ve çevresel işlemler genellikle aşırı sıcaklık, pH ve iyonik güç koşullarıyla ilişkilidir. Bu nedenle, bu koşullar altında stabilite çalışmaları, bazı biyosümfaktanların olası kullanımının uygunluğunu belirlemek için önemlidir (Campos et al., 2013).

Son yıllarda, mikroorganizmalardan elde edilen sümfaktanların biyosentezi, biyolojik olarak bozunabilirliği, düşük toksisitesi, ekolojik uygunluğu, yenilenebilir ve ucuz substratların kullanımı, geniş sıcaklık ve pH aralığında etkinlik göstermesi, yüksek tuzlulukta stabilite ve çeşitli alanlarda geniş uygulama yelpazesi nedeniyle kimyasal sümfaktanlara kıyasla oldukça dikkat çekmektedir (Vanavil et al., 2013).

Biyosümfaktanların kimyasal bileşimi ve özelliklerinde çeşitlilik olmasına rağmen, birçok ortak özellik sergilerler ve geleneksel yüzey aktiflere göre yüzey/arayüzey gerilimini düşürebilme, düşük toksisite, düşük maliyet gibi avantajlar sunmaktadırlar (Campos et al., 2013).

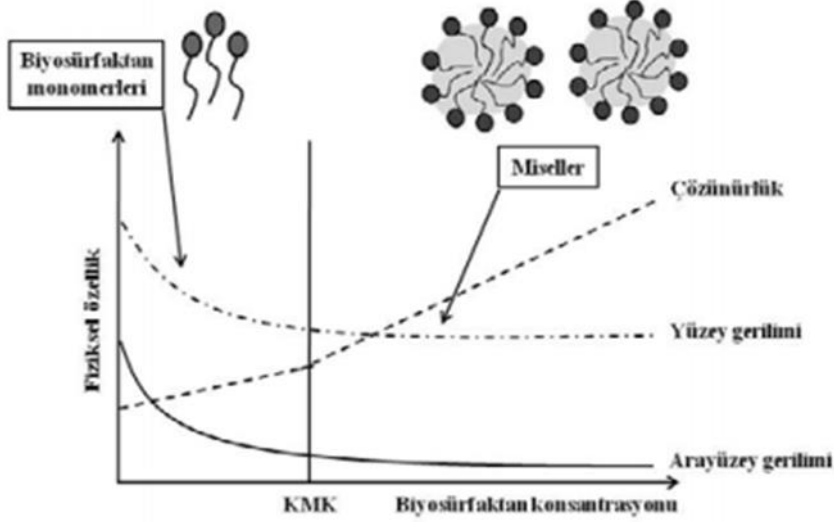
2.1.2.1. Yüzev/Aravüzev gerilimini düşürebilme

Biyosüurfaktanlar, amfifilik özelliğe sahip oldukları için, iki karışmaz sıvı arasındaki ara yüzeylerde gerilimi düşürebilir ve daha kolay karışmasına izin verebilirler. Bir yüzey aktif molekül, birbiri ile karışmayan iki fazlı bir sisteme eklendiğinde, ara yüzdeki moleküllerin yerine geçmektedir. Hidrofobik kısım solüsyon için az afiniteye sahiptir ve yüzeyde yoğunlaşmaktadır, buna karşın hidrofilik kısım yoğun ortama yönlendirilmektedir. Kritik düzeyde yüzey, süurfaktan molekülleri ile doymuştur ve amfifilik moleküller, solüsyonu çevreleyen misel, vezikül ve çift tabaka yapıları oluşturmaya eğilimlidirler. Çözeltinin polaritesine bağlı olarak iç kısım hidrofobik, dış kısım ise hidrofilik olabilir (sulu bir solüsyonda) veya diğer bir deyişle, (lipofilik solüsyonda) kutup başları miselin göbeğinde birleştirildiğinde kuyruklar dışa doğru yönelebilir (Nitschke and Costa, 2007; Sharma, 2016).



Şekil 2.2 Biyosüurfaktanlar tarafından oluşturulan agregat türleri (Uyar ve Yalçın, 2013)

Süpfaktanların etkinliği için önemli bir parametre olan yüzey gerilimi, sıvı ortamdaki süpfaktan konsantrasyonu arttırıldığında ve misel oluşması durumunda önemli ölçüde azalan sıvı molekülleri arasındaki çekim kuvvetini ölçmektedir. Ortamın su veya yağ olmasına göre iki tip misel oluşumu gözlenmektedir. Ortamda su varken misellerin hidrofilik baş kısmı suya doğru, ortamda yağ bulunduğunda ise hidrofobik kuyruk kısımları yağa doğru yönelmektedir. Kritik misel konsantrasyonu (KMK), maksimum derecede yüzey gerilimini düşürmek için gereken minimum yüzey aktif madde konsantrasyonudur. Yüzey gerilimini düşürmek için gereken süpfaktan miktarından fazla olmasının bir etkisi yoktur. KMK'ye ulaşıldığında, bir miktar misel oluşmaktadır. KMK, yüzey aktif madde aktivitesinin değerlendirilmesi için en sık kullanılan ölçüdür ve ayrıca bir yüzey aktif maddenin sulu fazdaki çözünürlüğü olarak da tanımlanabilir. Verimlilik ve etkinlik, iyi bir süpfaktanın belirlenmesinde temel özelliklerdir; birincisi genellikle KMK tarafından belirlenir, ikincisi ise yüzey ve arayüzey gerilimleri ile ilgilidir (Campos et al., 2013).



Şekil 2.3 Biyosüpfaktan konsantrasyonu ile misel oluşumu, yüzeyarayüzey gerilimi ve çözünürlük arasındaki ilişki. KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu (Uyar ve Yalçın, 2013)

Biyosümfaktanlar iki karışmayan çözeltilinin ara yüzey ve yüzey gerilimini düşürmeye yardımcı olurlar. İyi bir biyosümfaktan, suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 35 mN/m'ye düşürür ve ayrıca su-heksadekan süspansiyonunda 1 ile 40 mN/M arası ara yüzey gerilimini azaltabilir. Yüzey ve ara yüzey geriliminin azaltılması, kozmetik ve farmasötik formülasyonlar ile fonksiyonel gıda katkılarında biyosümfaktanların uygulanmasına izin verir. Genel olarak, biyosümfaktanlar oldukça etkili ve yeterlidir. KMK, kimyasal sentezlenmiş sümfaktanlardan birkaç kat daha düşüktür; böylece daha az miktarda sümfaktana ihtiyaç duymaktadır (Sharma, 2016).

2.1.2.2. Düşük toksisite

Mikrobiyal sümfaktanların toksisitesi ile ilgili az sayıda rapor olmasına rağmen, bunlar çoğunlukla düşük veya toksik olmayan bileşikler olarak kabul edilir ve gıda işleme, farmasötik formülasyonlar ve kozmetikler için uygundur. Probiyotik laktik asit bakterilerinden üretilen biyosümfaktanlar, fare fibroblast hücrelerinde toksisite testi yapıldığında toksik olmadığı bildirilmiştir. *P. aeruginosa*'dan elde edilen biyosümfaktan, yüksek toksisite gösteren ve endüstriyel formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan sentetik bir sümfaktan (Marlon A-350) ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir; bununla birlikte, *P. aeruginosa*'dan elde edilen mikrobiyal sümfaktanların toksik ve mutajenik olmadığı bulunmuştur. *C. bombicola*'dan üretilen soforolipidler, gösterdiği düşük toksisite sayesinde gıda sektöründe kullanılmaktadır (Nitschke and Costa, 2007; Sharma, 2016).

2.1.2.3. Biyoparçalanabilirlik

Biyosümfaktanlar, mikroorganizmalar tarafından kolayca ayrıştırılırlar. Biyoparçalanabilirlik, biyolojik aktiviteler veya enzimler tarafından bozunabilme kabiliyeti olan biyosümfaktanların su ve topraktaki bakteriler ve diğer mikroorganizmalar tarafından kolayca bozunduğunu göstermektedir ve bu molekülleri bioremediasyon işlemleri ile atık arıtma için özellikle uygun hale getirmektedir. Byosümfaktanlar sentetik sümfaktanlardan farklı olarak, doğal ekosistemde bulunan mikroorganizmalar tarafından doğrudan bozulmaktadır.

Kimyasal olarak sentezlenmiş yüzey aktif maddelerle ilişkili artan çevresel endişe, mikrobiyal sürfaktanlar gibi alternatif molekülleri keşfetmeye zorlamaktadır. Sentetik sürfaktanlar çevreye zarar vermektedir ve bu nedenle daha az toksik, kararlı, biyolojik olarak parçalanabilen biyosürfaktanlar endüstriyel ve çevresel uygulamalar için ilgi çekici hale gelmektedir (Fakruddin, 2012; Campos et al., 2013; Sharma, 2016).

2.1.2.4. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı

Birçok biyolojik yüzey aktif madde ve yüzey aktivitesi sıcaklık ve pH gibi çevresel koşullardan etkilenmez. *B. subtilis* LB5a tarafından üretilen bir lipopeptit, otoklavdan (121°C/20 dakika) sonra ve 6 ay -18°C'de bırakıldıktan sonra bile stabil kalmıştır ve yüzey aktivitesi pH 5-11 aralığında, NaCl konsantrasyonları ise %20'ye kadar değişmemiştir. Endüstriyel işlemler çoğunlukla aşırı sıcaklık, basınç, pH ve iyonik kuvvetlere maruz kalmayı içerir, bu nedenle bu koşullar altında çalışabilecek yeni mikrop türevli ürünleri izole etmek için sürekli bir ihtiyaç vardır. *B. licheniformis* suşu tarafından üretilen likenisin, 50°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarından, 4-5-9.0 pH aralığından, 50g/L tuz konsantrasyonu ve 25g/L kalsiyum konsantrasyonundan etkilenmediği rapor edilmiştir (Nitschke and Costa, 2007; Fakruddin, 2012; Sharma, 2016).

2.1.3 Biyosürfaktan üretimini etkileyen faktörler

Biyosürfaktanın yapısı ve emülsifiye edici aktivitesi sadece üretici suşa bağlı değil, aynı zamanda kültür koşullarına, dolayısıyla karbon kaynağı, azot kaynağı, karbon-azot (C:N) oranına, besinsel yetersizliğine bağlıdır. Ayrıca, sadece biyosürfaktan miktarını değil, üretilen polimer tipini de etkileyen sıcaklık, havalandırma, divalent katyonlar ve pH gibi kimyasal ve fiziksel parametrelere de bağlıdır. İz elementler ayrıca biyosürfaktan üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Amaral et al., 2010; Khire, 2010; Fakruddin, 2012).

Karbon kaynağı: Farklı karbon kaynaklarının kullanılması, üretilen biyo-yüzey aktif maddenin yapısını ve sonuç olarak özelliklerini değiştirir. Belirli bir uygulama için bazı özellikler araştırıldığında, bu değişiklikler ile karşılaşılabılır. Biyosüpfaktan üretiminde fizikokimyasal özelliklerinin optimizasyonunu içeren çok sayıda çalışma vardır. Pareilleux (1979), *C. lipolytica*'nın büyüme ortamında, karbon kaynağı olarak n-alkan kullanarak yüzey aktif bileşikler izole etmiştir, ancak bu maya, karbon kaynağı olarak glikoz ile yetiştirildiğinde, hiçbir biyolojik emülsiyon üretilmemiştir. Cirigliano ve Carman (1985), *Y. lipolytica* suşunun, en iyisi olarak tanımlanan heksadekan ile hekzadekan, parafin, soya fasulyesi yağı, zeytin yağı, mısır yağı ve pamuk tohumu yağı gibi farklı karbon kaynakları vasıtasıyla biyosüpfaktan ürettiğini göstermişlerdir. Hidrofilik substratlar öncelikle enerji gereksinimleri nedeniyle mikroorganizma tarafından metabolize edilir, ayrıca bu tür substratlar, biyosüpfaktanın polar bölümünün sentezinde de kullanılır. Öte yandan, hidrofobik substratlar, sadece, biyosüpfaktanın apolar kısmının üretimi için kullanılmaktadır. *Candida* türlerinin, yağ asitlerini doğrudan biyosüpfaktan üretimine dahil etme özellikleri görülmektedir (Amaral et al., 2010).

Azot kaynağı: Biyosüpfaktan üretim ortamında azot oldukça önemlidir, çünkü mikrobiyal büyüme için protein ve enzim sentezleri buna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Farklı azot bileşikleri üre, pepton, maya özütü, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, et özü ve malt özü vb. gibi biyosüpfaktanların üretimi için kullanılmıştır. Maya ekstresi, biyosüpfaktan üretimi için en çok kullanılan azot kaynağıdır, ancak konsantrasyonu mikroorganizmaya ve kültür ortamına bağlıdır. *Y. lipolytica* tarafından biyoemülsifiyer üretiminde, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat, üre ve sodyum nitrat gibi farklı azot kaynakları kullanılarak da değerlendirilmiş ve sonuçlar, amonyum sülfat ve amonyum klorürün emülgatör üretimi için en iyi azot kaynakları olduğunu göstermiştir. Amonyum nitrat ve üre kullanıldığında emülsifiye edici aktivite yarıya düşürülmüş ve kültür ortamında sodyum nitratlı hiçbir emülsifiye edici aktivite tespit edilmemiştir. (Amaral et al., 2010; Fakruddin, 2012).

Çevresel faktörler: Sıcaklık, pH, tuzluluk, havalandırma ve çalkalama gibi çevresel faktörler, üretilen biyosüfaktanın verim ve özelliklerinde son derece önemlidir. Zinjarde and Pant (2002) tarafından yapılan çalışmada pH'ın, üretilen biyosüfaktan üzerindeki etkisi için en iyi üretimin, deniz suyunun doğal pH'ı olan 8.0 olduğu zaman meydana geldiğini bildirmişlerdir. Havalandırma ve çalkalama, her ikisi de gaz fazından sulu faza oksijen transferini kolaylaştırdığından, biyosüfaktan üretimini etkileyen önemli faktörlerdir. Adamczak and Bednarsk (2000), havalandırmanın *C. antarctica* tarafından yapılan biyosüfaktan sentezindeki etkisini değerlendirmiş ve en iyi üretimin (45,5 g/L), hava akış hızı 1 vvm olduğunda ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunun doygunluğu %50'sinde tutulduğu gözlemlenmiştir. Casas and Ochoa (1999), *C. bombicola*'nın kültür ortamında elde edilen sophorolipidlerin miktarının, 25°C veya 30°C sıcaklıkta benzer olduğunu göstermiştir (Amaral et al., 2010; Fakruddin, 2012; Randhawa, 2015).

2.1.5 Biyosüfaktanların endüstriyel açıdan önemi

Biyosüfaktanlar yağlama, ıslatma, yumuşatma, boya sabitleme, emülsiyon yapma, dispersiyonları stabilize etme, köpükleme, köpüklenmeyi önleme ve ayrıca gıda, biyomedikal, ilaç endüstrisi ile organik veya inorganik kontamine bölgelerin biyoremediasyonu gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde sentetik süfaktanların yerine kullanılacak potansiyele sahiptirler. Glikolipidler ve lipopeptitler, ticari amaç için kullanılan en önemli biyosüfaktanlardır. Tespit yöntemlerinin çevre ile ilgili endişelerin artmasıyla birlikte iyileştirilmesi araştırmacıları ve politikacıları atık yönetimi için daha çevre dostu çözümler ve biyolojik olarak çözünmeyen maddeler için değiştirmeler yönünde zorlamaktadır. Tespit yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte, çevresel sorunlarla ilgili endişe de artmaktadır; bu da araştırmacıları ve politikacıları atık yönetiminde ve biyolojik olarak parçalanamayan maddeler yerine çevre dostu çözümler bulmaya itmektedir. Organik sıvı atıklar (örn. pestisitler), yağlar (örn. petrol bazlı) ve organik çamurlar veya katı maddeler (örn. boyadan türetilmiş) yaygın çevresel organik kimyasal tehlikelerdir ve normal olarak uzaklaştırılması zor olan toprak ve su kirliliği kaynaklarıdır. Yaygın olarak bulunan bir diğer çevresel tehlike de, modern

toplumumuzun faaliyetleri ile bağlantılı olan kurşun, civa, krom, demir, kadmiyum ve bakır gibi ağır metallerdir (Reis et al., 2013).

Biyosümfaktanlar tarım endüstrisinde çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tarımsal alanlarda toprağın iyileştirilmesi ve zenginleştirilmesi, sürdürülebilir tarım için oldukça önemlidir. Biyoremediasyon, besin maddeleri veya mikroorganizmalar kullanılarak kirletici maddelerle kirlenmiş ortamların iyileştirilmesi ve güçlendirilmesidir. Biyoremediasyon verimi, kullanılan organizmanın desorpsiyon, difüzyon ve çözünme gibi faktörler açısından toprağa uyumu ile belirlenmektedir. Biyosümfaktanlar, bu organizmaların kirletici maddeleri absorbe etmesini kolaylaştırdığı için biyoremediasyon verimi artmaktadır (Khan et al., 2015).

Biyosümfaktanlar birçok gıda işlemede uygulanabilir olsa da, anti-adhesiv ajanlar olarak kullanımları da oldukça önemlidir. Gıda üretim yüzeylerinde bulunan bakteriyel biyofilmler, olası gıda kirliliğine ve hastalığın bulaşmasına neden olabilecek kontaminasyon kaynaklarıdır. Gıda işlemcilerinin *Salmonella* gibi patojenlere ve ayrıca *Listeria monocytogenes* için sıfır tolerans seviyelerine sahip olmaları nedeniyle, tek bir yapışkan hücre, iyi gelişmiş bir biyofilm kadar önemli olabilir; bu nedenle mikroorganizmaların gıdayla temas eden yüzeylere yapışmasını kontrol etmek önemli bir adımdır. Bundan dolayı biyosümfaktanların mikrobiyal yapışma ve yüzeylerden ayrılma işlemlerine katılımı araştırılmaktadır (Nitschke and Costa, 2007).

Biyosümfaktanların emülsiyonlaştırıcı işlevleri, muhtemelen kozmetik formülasyonundaki en önemli özelliğidir, çünkü emülsiyonların diğer ilaç türlerine göre önemli avantajları vardır. Bu nedenle, uygulanmaları kolaydır, nispeten ucuzdur ve aynı anda yağda ve suda çözülebilir maddelerin kullanımına izin verirler. Düşük moleküler ağırlıklı biyosümfaktanların hava/su ve yağ/su ara yüzeylerindeki yüzey gerilimini düşürdüğünü, yüksek moleküler ağırlıktaki biyosümfaktanların ise yağ/su emülsiyonlarını stabilize etmede daha etkili olduğunu bildirilmiştir. Kozmetik formülasyonlarında kimyasal bazlı sümfaktanların kullanımıyla ilgili sorunlardan birinin, cilt tahrişlerine ve alerjik

reaksiyonlara neden olma potansiyelleri olduğu araştırılmıştır. Kimyasal sürfaktanlar proteinlerle etkileşime girebilir, bu lipidlerin hücreler arası yapısını düzene sokarak epidermal yüzeyden lipidleri çıkarabilir ve ayrıca ciltteki canlı hücreleri de etkiler. Bu zararlı etkiler biyosürfaktanlar kullanılarak potansiyel olarak önenebilir veya azaltılabilir.

Çizelge 2.2 Çeşitli uygulamalarda faydalı olan biyosürfaktan karakteristikleri (Khan et al., 2015'den değiştirilmiş)

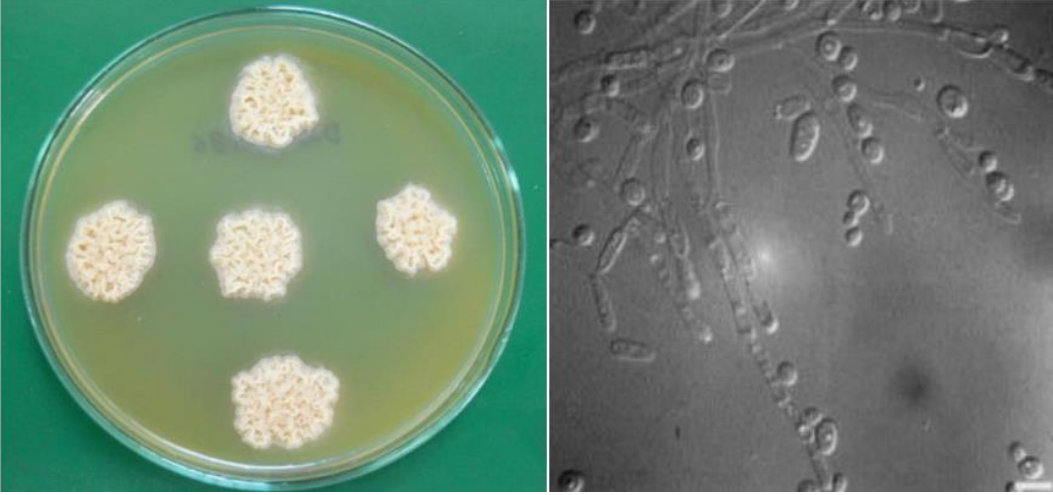
Uygulama Alanları	Karakteristik
Deterjan	Düşük KMK Ekstrem tuz ve pH sabitliği Biyoparçalanabilirlik
Emülsifikasyon	Özel HBL Çevresel güvenlik
Çevresel remediasyon	Kimyasal sabitlik Yüzey adsorbsiyonu
Yağlama	Düşük toksisite Biyoparçalanabilirlik Çevreye duyarlılık
Mineral flotasyonu (yüzdürme) Petrol geri dönüşümü	Özel madenlerde adsorbsiyon Yağ içeren oluşumlarda ıslanma Mikroemülsiyon oluşumu ve stabilizasyon Geri kazanım sonrası emülsiyon bozma kolaylığı
Farmasötik	Biyouyumluluk Düşük toksisite

2.2 *Yarrowia lipolytica*

2.2.1 Genel özellikleri

Yarrowia genusu, Hemiascomycetes sınıfında bulunan, çok ilgi çekici non-konvansiyonel bir mayadır. İlk olarak 1928'de Harrison bu genusu izole etmiş ve tanımlamıştır. Bu genus, önceden *Candida*, *Monilla*, *Endomycopsis*, *Torula*, *Protomyces*, *Azymoprocandida*, *Mycotorula*, *Pseudomonilia*, *Torulopsis* veya *Saccharomycopsis* olarak biliniyordu. David Yarrow, 1972 yılında, bu genusu Delft Mikrobiyoloji laboratuvarında tekrardan sınıflandırmıştır. Genus adı 'Yarrowia', 1980 yılında van der Walt ve von Arx tarafından Yarrow'un çalışmalarını takdir etmek için önerilmiştir. Bu genus, iyi bilinen *Y. lipolytica*'yı içermektedir. Tür ismi '*lipolytica*', lipidlerin hidrolizinde bu mayanın dikkat

çekici lipolitik aktivesinden kaynaklanmaktadır. 18S ve 26S rRNA gen sekans analizlerine göre, *Y. lipolytica* taksonomik olarak, Hemiascomycetes sınıfında, Saccharomycetales takımında, Dipodascaceae ailesinde sınıflandırılmıştır. *Y. lipolytica*, doğada oldukça yaygındır, ayrıca lipofilik ve oleofilik maya olduğundan dolayı maya suşları, yağlı gıdalar ve petrol bulunan alanlar gibi lipid ve hidrokarbon bileşikleri içeren farklı kaynaklardan kolaylıkla izole edilmektedir. *Y. lipolytica* suşları peynirlerden ve diğer günlük ürünlerden (Gardini et al., 2006; Lopandic et al., 2006; Vasdinyei and Deak, 2003), sosislerden (Gardini et al., 2001; Encinas et al., 2000), kümes hayvanlarından (Deak et al., 2000), karides ve et içeren salatalardan (Barth and Gaillardin, 1996), et ve et ürünlerinden (Sanz et al., 2005; Andrade et al., 2006; Mirbagheri et al., 2012), tarımsal sanayi atıksuyundan (Mafakher et al., 2010) ve kirli petrol ve denizel ortamdan (Chi et al., 2007; Hassanshahian et al., 2012) izole edilmiştir. Çoğu *Yarrowia* suşlarının büyüme sıcaklığı maksimum 32-34°C arasındadır, bu da insan patojeni olmadığını göz önüne sermektedir. *Y. lipolytica*, FDA tarafından “GRAS” olarak sınıflandırılmıştır. Barth ve Gaillardin’e göre (1997) *Y. lipolytica* suşunun koloni morfolojisi genetik temeline, ortam bileşenlerine ve karbon ve azot kaynağı, havalandırma, pH gibi büyüme koşullarına göre çeşitlilik göstermektedir. Koloni morfolojisi, pürüzsüz ve parlak olandan yoğun kıvrımlı ve mat olana kadar değişebilir. *Y. lipolytica*’nın hücre duvarı galaktomannas içerir. Maya hücreleri küresel, elipsoidaldır veya çoğu zaman tek bir merkezi mikropor ve psödohif ile septa gerçek hif oluşturmak için uzamaktadır. *Y. lipolytica* dimorfik bir mayadır ve ortama, büyüme fazına bağlı olarak gerçek bir maya-hif (YH) geçişine maruz kalabilir (Coelho et al., 2010; Nicaud, 2012; Harzevili, 2014).



Şekil 2.4 (a) *Y. lipolytica* DSM3286'nin YPDA (maya özü-pepton-dekstrozu agar) ortamı üzerindeki kolonisi (b) *Y. lipolytica* strain E122'nin morfolojisi (Harzevili et al., 2014; Hurtado and Rachubinski, 2002)

2.2.2 Biyoteknolojik önemi

Yarrowia lipolytica, birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılan mükemmel bir mikroorganizma örneğidir. Bu non-konvasyonel, aerobik, dimorfik maya, genellikle alkanlar ve yağlar bakımından zengin, hidrofobik substratlar içeren ortamlarda bulunabilir. Peynir, yoğurt, kefir, soya sosu, et ve karides salatalarından izole edilebilir. Biyoteknolojik ve endüstriyel işlemlerde sitrik ve izositrik asitler ve enzimler (asit veya alkalın proteazlar, lipazlar ve RNaz) gibi çeşitli ürünlerin elde edilmesinde, biyoremediasyonda ve biyosümfaktan üretiminde kullanılır. *Y. lipolytica* ayrıca, metil reçinolatın dönüştürülmesiyle elde edilen, büyük endüstriyel öneme sahip bir bileşik olan γ -dekalakton üretme kabiliyetine sahiptir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen metabolitler arasında en önemlilerinden biri, gıda, ilaç ve deterjan üretim alanlarındaki geniş teknolojik uygulamaları nedeniyle bilim adamlarının ilgisini çeken bir enzim olan lipazdır. Bununla birlikte, bu maya türünün en büyük endüstriyel uygulaması, tek hücreli protein olarak kullanılacak biyokütle üretiminde görülmektedir. Günümüzde, *Y. lipolytica*'nın, biyo-yakıt üretiminde kullanılabilecek lipidleri üretme ve saklama kabiliyetine ya da farmasötik ve gıda endüstrilerinde geniş bir kullanıma sahip olan esansiyel yağ asitleriyle zenginleştirilmiş yağların üretimine büyük bir ilgi

vardır. Bu özellikler *Y. lipolytica*'nın biyodizel üretimi için umut vaat eden mikroorganizmalar arasında durmasını sağlamaktadır. Bitkisel yağ yerine mikrobiyal yağ kullanılması; artan ölçeklere ulaşma kolaylığı, üretim için daha küçük bir alan gerektiren ve aynı zamanda mevsimsellikten bağımsızlık gibi birçok avantaj sunmaktadır. *Y. lipolytica*, maya dimorfizmi üzerine yapılan çalışmalar için uygun bir model olarak kabul edilmiştir, çünkü nitrojenle sınırlı koşullarda psödohif filamentleri üretmektedir. Kazein, maya veya et özütleriyle karbon kaynağı olarak yağ asitlerinde büyümesi, sistein veya indirgenmiş glutatyon seviyelerinin varlığı ile magnezyum sülfat ve ferrik klorürün eksikliği ile inhibe edilen hif oluşumunu indükler. Bu mayanın alkanlarda büyümesi ve hücre dışı karbon kaynağı olarak kullanılan trigliseritleri ve yağ asitlerini hidrolize edebilmesi, yağ asitlerinin metabolizmasını incelemek için ilginç bir maya modeli haline getirmiştir. *Y. lipolytica*, bu substratların karbon kaynakları olarak verimli kullanımı için mekanizmalar geliştirmiştir; etanol üretmez ancak %3'e kadar konsantrasyonlarda karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlarda, etanol maya için toksik hale gelmektedir. Endüstriyel öneme sahip, hücreler tarafından salgılanan çeşitli hücre içi metabolitlerin üretimi için büyük potansiyele sahiptir. *Y. lipolytica*'nın büyümesi ve metabolitlerin salgılanması, karbon, azot, mineral (ve bunların nispi miktarları), büyüme ortamının pH'ı, inkübasyon sıcaklığı, inokulum miktarı ve oksijenizasyon yoğunluğundan etkilenmektedir (Gonçalves et al., 2014; Harzevili, 2014).

2.2.3 Biyosüpfaktan üretimi

Mikroorganizmalar, iki tip yüzey aktif bileşiğı olan biyosüpfaktan ve biyoemülsifyerler üretmektedir. Biyosüpfaktanlar su-hava arasındaki yüzey gerilimini düşürürken, biyoemülsifyerler ise karışmaz iki sıvı arasındaki veya katı-sıvı ara yüzeyindeki gerilimi azaltırlar. Biyosüpfaktanlar genellikle emülsifye edici özellik gösterir, ancak biyoemülsifyerler yüzey gerilimini zorunlu olarak azaltmazlar (Batista et al., 2006).

Literatürde tarif edilen biyosüpfaktanların çoğı bakteri kökenlidir ve en çok üretici olarak rapor edilen türler *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp.

ve *Pseudomonas* sp.'dir. Bununla birlikte, bu tür üretici organizmaların patojenik yapıları nedeniyle, gıda endüstrisinde kullanımları sınırlandırılmıştır. *Candida* sp., *Yarrowia* sp ve *Pseudozyma* sp. gibi mayalar, esas olarak biyosüpfaktan üretiminin araştırılması için önem kazanmaktadır. Mayaların biyosüpfaktan üretiminde kullanılmasının en büyük avantajı, *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* ve *Kluyveromyces lactis* gibi pek çok türün mevcut olduğu GRAS statüsüdür (Amaral et al., 2010).

Yarrowia genusu, hidrofobik substratların biyoremediasyonunda ve biyodegradasyonunda önemli faktör olan çeşitli emülsifiyerler üretmektedir, ayrıca gıda işleme, kozmetik formülasyonlar, tekstil, deri işleme, yağ geri kazanımını artırma ve ham petrol sondajına da uygulanabilirler. *Y. lipolytica* ATCC 8662, suyla karışmayan bir karbon substratı üzerinde büyütüldüğü zaman, indüklenebilir bir hücre dışı biyo-emülsiyonlaştırıcı olarak liposan üretmektedir. Heksadekan eklenmiş kültürlerde, emülsifikasyon aktivitesi ilk olarak 36 saat büyümeden sonra tespit edilmiştir ve maksimum üretimi 130 saat sonra gerçekleştirmiştir. Maksimum emülsifikasyon aktivitesi pH 2-5 arasında elde edilmiştir. Liposan, ısıya dayanıklı bir biyoemülsiyonlaştırıcıdır, ayrıca 1 saat 100°C'de ısıtıldıktan sonra %60 oranında aktivitesini kaybetmiştir. *Y. lipolytica* NCIM 3589 suşu, başlangıç pH'ı 8.0 ve NaCl konsantrasyonu %2-3 (342-513 mM) olan alkan içeren bir ortamda emülgatör üretmiştir (Harzavili, 2014).

Amaral et al. (2006), karbonhidrat olarak glikoz içeren Yeast ekstrakt-pepton-dekstrozu (YPD) ortamında bir biyolojik emülsiyonlaştırıcı üretmek için *Y. lipolytica* IMUFRJ50682'yi kullanmıştır. Bu biyoemülsiyonlaştırıcı Yansan olarak adlandırılmıştır ve 3.0-9.0 pH aralığında yüksek emülsifikasyon aktivitesi ve stabilite sunmuş, ayrıca birkaç alifatik ve aromatik hidrokarbon ile su içinde yağ emülsiyonlarını stabilize edebilmiştir. Vance-Harrop et al. (2003), *Y. lipolytica* IA 1055, babassu yağı ve D-glikozu karbon kaynakları olarak kullanarak fermantasyon yoluyla emülsiyonlaştırma aktivitesine sahip hücre dışı biyosüpfaktan üretmiştir. Üre, amonyum sülfat ve fosfat ile eklenmiş %50 oranında seyreltilmiş doğal deniz suyu kullanılmıştır. En iyi sonuçlar, %5

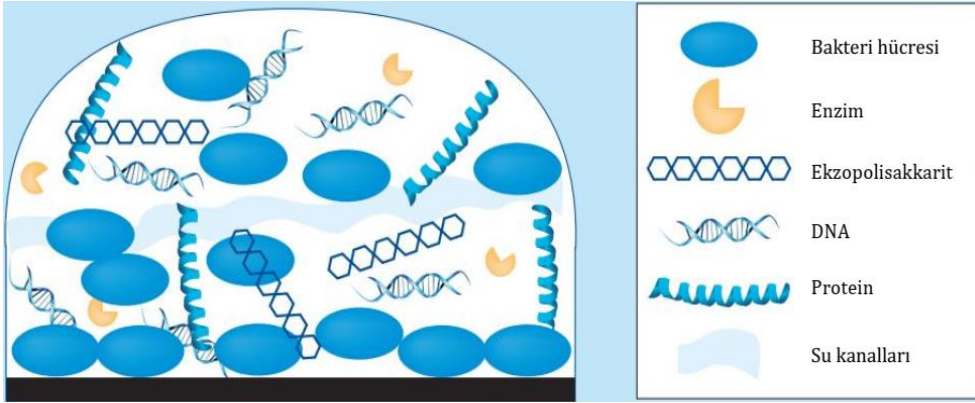
oranında babassu yağıyla 1 saat fed-bath fermentasyonu altında elde edilmiştir (Harzavili, 2014).

Sarubbo et al. (2007), *Y. lipolytica* UCP 0988 tarafından kanola yağı ve glikozun bir kombinasyonunu kullanarak biyosüpfaktan üretmiştir. Verim 8.0 g/L olarak belirlenmiş ve biyosüpfaktan yüzey gerilimini 30 mN/m'ye düşürmüştür. Rufino et al. (2007), bir bitkisel yağ rafineri kalıntısı üzerinde biyosüpfaktan üretmiştir. İzole edilen biyosüpfaktan 4,5 g/L verime karşılık gelmekte ve suyun yüzey gerilimi 71'den 32 mN/m'ye düşürmektedir. Rufino et al. (2008), *Y. lipolytica* UCP 0988 ile biyosüpfaktan üretim aşamalarını optimize etmek için soya yağı rafineri kalıntısı kullanmış, soya artıklarının %6 ve glutamatın %1 konsantrasyonu ile en iyi verim elde edilmiş ve yüzey gerilimi 25.29 mN/m'ye ulaşmıştır (Harzavili, 2014).

2.3 Biyofilm

2.3.1 Biyofilm ve yapısı

Biyofilmler, başlıca polisakkaritler, proteinler ve DNA olmak üzere ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan ve organik ya da inorganik bir yapının yüzeyine yapışan ince bir mikroorganizma tabakasıdır. Biyofilmdeki kanallar yoluyla su, hava ve besinlerin yapının tüm kısımlarına ulaşması sağlanmaktadır. Bakteriyel ve fungal patojenlerin oluşturduğu biyofilmler, dış etkenlere karşı organizmaya direnç kazandırmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal enfeksiyonların %80'inin biyofilm ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Biyofilm oluşturan bakteri veya fungusların antibiyotiklere karşı planktonik olanlardan 1000 kat daha dirençli oldukları gösterilmiştir. Biyofilmlerin doğal antibiyotiklere karşı dirençli olmaları, bakteriyel biyofilmleri hedef alan tedavilerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu durum, bakterisidal aktivite göstermeyen ancak anitibiyofilm özellik gösteren ajanların keşfedilme ihtiyacını arttırmaktadır (Bakkiyaraj et al., 2013; Gomaa, 2013; Brackman and Coenye, 2015).



Şekil 2.5 Biyofilmin genel yapısı (Rabin et al., 2015'den değiştirilerek)

Hücre dışı veya hücre içi olarak sentezlenen ekzopolisakaritler (EPS), dış ortama salınarak karbohidratların, proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin tutunması için iskele görevi görür. EPS bileşenleri, yapıları ve özellikleri birbirinden farklıdır. Nelson et al., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* biyofilmlerinden EPS matriksinin bileşenlerini ve bağlantılarını analiz etmiştir. Mannoz, galaktoz ve glukoz en bol miktarda bulunan karbohidrattır, bunu N-asetil-glukozamin, galakturonik asit, arabinoz, fukoz, ramnoz ve ksiloz izler. EPS çoğu biyofilm için spesifik değildir, ancak *E. coli*'deki kolanik asit üretimi ve *P. aeruginosa*'daki aljinat sentezi gibi stres tepkisi sonucu üretimi artmaktadır. Hücre dışı proteinler, başka bir ana EPS matris bileşenidir. Bazı proteinler, biyofilm oluşumuna ve stabilizasyonuna yardımcı olmak için hücre yüzeylerine ve polisakaritlere bağlanmaktadır. *Streptococcus mutans* biyofilminde, bakterileri ve EPS'yi birbirine bağlayarak biyofilm yapısının korunmasında önemli rol oynayan glukon bağlayıcı proteinler (GBPs) bu duruma örnek olarak verilebilir (Rabin et al., 2015).

Bazı enzimler, biyofilm degradasyonunda rol oynamaktadır. Bu enzimler biyopolimerleri parçalamakta ve özellikle besin yetersizliğinde biyofilm hücrelerine karbon ve enerji kaynakları sağlamaktadır. Biyofilmin yüzeyden ayrılması ve parçalanması da enzimatik fonksiyonlar gerektirmektedir. EPS matrisinin enzimler tarafından bozulması, biyofilm hücrelerini serbest bırakarak yeni bir biyofilm yaşam döngüsünü başlatır. Örneğin, DspB proteini

Actinobacillus pleuropneumoniae biyofilmlerinin yüzeyden ayrılmasından sorumludur. Ekstraselüler DNA'lar (eDNA'lar) daha önce, liziz hücrelerden kalanlar olarak kabul edilmiştir, ancak Mattick ve arkadaşları deoksiribonükleaz I (DNaz I)'in *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu önleyebildiğini bulmuştur. eDNA'nın biyofilm olgunlaşmasında ve sürekliliği hakkındaki bilgiler sınırlıdır ve biyofilm gelişimindeki rolüne ışık tutması konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Rabin et al., 2015).

2.3.2 Biyofilm oluşum sebepleri

Birçok bakteri planktonik form ile biyofilm formu arasında geçiş yapabilir. Planktonik bakterilerin hücre büyüme hacmi ve üreme hızı yüksektir. Bakteriyel bir biyofilm durumuna ihtiyaç duyulmasının birkaç nedeni olabilir. İlk olarak biyofilm, bakterilerin zorlu çevre koşullarına toleransını artırabilir. Bakteriler, sadece bir yüzeye veya dokuya bağlanarak su veya kan akışı ile uzaklaştırılmaktan kaçınabilir. İkincisi, EPS matrisi daha derin katmanlarda bakteri hücrelerini antimikrobiyal maddelere karşı muhtemelen bu ajanların difüzyonunu sınırlandırarak korur. Biyofilm, bakteriyel hareketliliği sınırlandırır ve hücre yoğunluğunu artırır; bu, bir kısmı antibiyotik direnci için kodlanan eDNA (plazmit) değişimi için en uygun ortamı sağlar (Rabin et al., 2015).

Biyofilm içindeki mikroorganizmalar besin yetersizliğine, pH değişikliklerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı planktonik organizmalardan daha iyi dayanabilmektedir. Biyofilmler ayrıca fagositoza karşı da dirençlidir ve biyofilm üzerinde bir saldırı girişiminde bulunan fagositler aslında çevre dokulara biyofilmden daha fazla zarar verebilmektedir. Biyofilm direncini güçlendiren diğer bir önemli özellik, DNA ve diğer polimerleri içeren ancak genel olarak baskın olarak EPS'den oluşan yapışkan matristir (Jefferson, 2004).

Stres tepkisi düzenleyicilerinin biyofilm oluşumuna katılması, biyofilm oluşumunun arkasındaki motivasyonun savunma olduğu hipotezini desteklemektedir ancak, bu düzenleyicilerin katkısı belirsizdir. Biyofilm

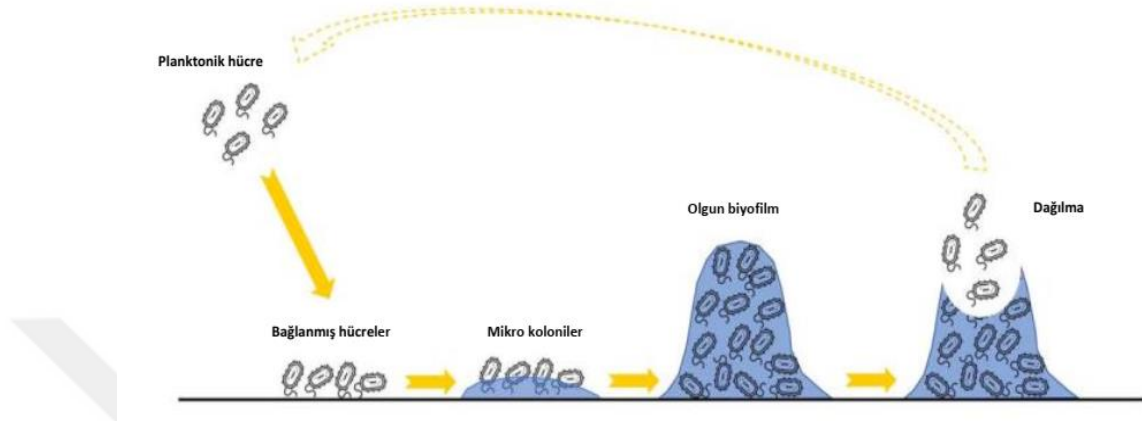
oluşumunda, *S. mutans*, *S. aureus* ve *E. coli*'nin sırasıyla stres yanıt düzenleyicileri Dgk, σ^B ve RpoS ile ilgili çalışmalar mevcuttur. *P. aeruginosa*'da RpoS ekspresyonu biyofilmlerde azalmakta, ancak durağan faz ve stres ile bağlantılı bir sigma faktörü olan RpoH ekspresyonu artmaktadır. Stres tepkisi düzenleyicilerinin rolü, biyofilm oluşumunun tetiklendiği koşullara veya bakteriyel hücrenin genetik arka planına bağlı olabilir (Jefferson, 2004).

2.3.3 Biyofilm oluşum basamakları

Biyofilm oluşum süreci, bir dizi aşamadan oluşur ve makromoleküllerin (proteinler, polisakaritler, nükleik asitler ve hümik asitler) ve daha küçük moleküllerin (yağ asitleri, lipitler ve poliakromatik hidrokarbonlar ve poliklorlu bifeniller gibi kirleticiler) yüzeye adsorpsiyonu ile başlar. Bu adsorbe edilmiş moleküller, yüzeyin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek, mikroorganizmalar için konsantre bir besin kaynağı olarak hareket etmek, yüzeyden toksik metal iyonlarının salınımını bastırmak veya arttırmak ile inhibe edici maddelerin adsorpsiyonu, gerekli besin maddelerinin ve iz elementlerin temin edilmesi ve biyofilm çökmesinin tetiklenmesi yardımıyla yığın çözeltisini detoksifiye etmek gibi birçok etkiye sahip olan filmler oluşturur. Bir koşullandırma filminin özellikleri, yüzeye temas eden suyun kalitesine bağlıdır ve yüzey özelliklerini büyük ölçüde etkileyebilir. Örneğin, 1976'da Loeb and Neihof, organik madde tükenmiş deniz suyunda askıda bırakılan platin partiküllerinin daldırmadan önce elektropozitif olduğunu ve doğal suya daldırmada elektronegatif hale geldiklerini elektroforetik çalışmalarla göstermiştir. Koşullandırma filminin mikrobiyal kolonizasyonu etkilediğine dair hiçbir şüphe olmasa da, bu etkiyi değerlendirmek zordur, çünkü koşullandırma filmi, daldırmadan hemen sonra yüzeyler üzerinde oluşur ve sonuç olarak, suya batırılmış bir film gibi bir yüzey yoktur (Lewandowski and Beyenal, 2007).

Bir bakteri hücresinin ilk yüzeyinden olgun bir biyofilm içerisinde gelişimine kadar, bakteriler tarafından yüzey kolonizasyonu dinamik bir işlem olarak kabul edilebilir. Gıda işleme ortamlarında oluşan biyofilm, gıda bozulmasına veya hastalıkların bulaşmasına neden olabilecek kronik mikrobiyal

kontaminasyon kaynağı olarak etki etmesi nedeniyle özel bir öneme sahiptir. Biyofilm içerisindeki bakteriler, temizleme ve sanitasyon işlemine karşı çok fazla direnç gösterirler (Stepanovic et al., 2004).



Şekil 2.6 Biyofilm oluşum aşamaları (Yuan and Olivier, 2019'den değiştirilmiştir)

Biyofilm oluşumunun önemli şartlarından birisi bakterilerin bir yüzeye oldukça yakın olmasıdır. Bakteriler bir yüzeye yaklaştıkça hem çekici hem de itici güçler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bakterilerde biyofilm oluşumunun başlaması besinlerin var olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda, patojen veya bozulma etmeni olan birçok mikroorganizmanın paslanmaz çelik, teflon, cam, ahşap, alüminyum ve plastik materyaller üzerinde biyofilm oluşturdukları belirlenmiştir (Gün ve Ekinçi, 2009; Akan ve Kınık, 2014; Merino et al., 2017).

Biyofilm oluşumu bağlanma, olgunlaşma ve dispersiyon olmak üzere üç aşamada tanımlanabilir. Bağlanma basamağı dönüşümlü bağlanma ve geri dönüşümsüz bağlanma olarak iki aşamalı bir süreç olarak sınıflandırılabilir. Geri dönüşümsüz bağlanmada, daha güçlü fiziksel veya kimyasal kesme kuvvetler tolere edilebilir. Başlangıçtaki bağlanmada, flagella ve tip IV pili aracılığıyla yapılan hareketler önemlidir. Flagella, hücreler ve yüzey arasındaki başlangıçtaki etkileşimler için kritik öneme sahiptir. Tip IV pili aracılığıyla çekme hareketleri, eklenen hücrelerin toplanmasını ve mikrokoloni oluşturmasını sağlamaktadır. (Rabin et al., 2015).

Bağlanma: Bir bakteri hücresi bir yüzeye yakın durumda olduğunda, yüzeye geri dönüşümlü bir bağlantı yapar. Biyofilm oluşumu için, katı-sıvı arayüzey sistemi (örn. kan, su), mikroorganizmanın bağlanması ve büyümesi için ideal bir ortam sağlayabilir. Çoğu sık bağlantı ve biyofilm oluşumu için pürüzlü, hidrofilik ve kaplanmış yüzeyler daha iyi bir ortam sağlamaktadır. Artan bağlanma akış hızı, su sıcaklığı veya besin konsantrasyonlarındaki kritik seviyenin artmasından da kaynaklanabilir. Flagel, pili, fimbrialar, proteinler veya polisakaritler gibi hücre yüzeylerinde yapıların varlığı da önemlidir ve karışık topluluklar olduğunda biyofilm oluşumunda bir avantaj sağlayabilirler (Jamal et al., 2015).

Mikrokoloni oluşumu: Mikrokoloni gelişimi bakteri hücrelerinin mikroorganizmaların gelişmesi, yüzeyde birikmesi ve EPS üretimiyle gerçekleşmektedir. EPS bakteri ve alt katmanı arasında bağ oluşumuna katkı sağlamakta ve koloniyi her türlü çevresel strese karşı stabil hale getirmektedir. Bu sistemde bakterilerin yüzeyde toplanma işlemi planktonik hücrelerin sinyal molekülleriyle etkileşip bir araya gelmesiyle gerçekleşir. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Akan ve Kınık, 2014).

Olgun biyofilm oluşumu: Biyofilmin ilk katmanı oluşturduktan sonra, aynı türün veya başka türlerin hücreleri, yığın sıvısından biyofilme yönelmektedir. Biyofilm, ince tabakadan mantar veya kule yapısına kadar büyür. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır. Biyofilm olgunlaştıkça proteinler, DNA, polisakaritler gibi biyofilm iskeletleri, tutulan bakteriler tarafından biyofilm içine salgılanır (Akan ve Kınık, 2014; Rabin et al., 2015).

Biyofilmin dağılması: Biyofilm olgunlaşmasından sonra, yaşam döngüsü için de kritik nokta olan dağılım adımı takip eder. Biyofilm besin eksikliği, yoğun rekabet, gelişmiş popülasyon gibi faktörler nedeniyle dağılmaktadır. Dağılma, tüm biyofilmde veya bunun bir kısmında oluşabilir. Planktonik bakteri salınımı diğer bölgelerde yeni biyofilmlerin başlatılmasını teşvik etmektedir (Rabin et al., 2015).

2.3.4 Biyoteknolojik alanda biyofilm

Biyofilm büyümesi görüntüleme yöntemleri günümüzde sürekli olarak geliştirilmektedir. Araştırma sorusuna bağlı olarak, biyofilm içindeki ana bileşenleri konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM), Raman Mikroskopisi (RM) gibi yöntemler ile görselleştirme metodları üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Hidrodinamik koşulların etkileşimi, kütle biyofilm arayüzünde kütle transferi ve biyofilm içerisinde kütle taşınması büyük önem taşımaktadır. Bunun için bazı çalışmalarda, hem biyofilmlerin hem de biyofilm yapısının üzerindeki akış alanını görselleştirmek için manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanılmıştır. Bu görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi, ileride yapılacak uygulamalar ve geliştirilecek ürünler için büyük önem taşımaktadır. Biyofilm görüntülemenin yanı sıra, biyofilmler içindeki çözünen konsantrasyonların belirlenmesi, süreçleri anlamak için çok önemlidir ve bunun için çeşitli mikrosensörler geliştirilmektedir. Bu teknolojinin geliştirilmesinin önündeki en büyük engel ise mikrosensörlerin kısıtlı parametrelerle çalışmasıdır. Günümüzde oksijen, pH ve iyon sensörleri sıklıkla kullanılmaktadır (Edel et al., 2019).

Biyofilm oluşumunda rol oynayan quorum sensing mekanizmasını inhibe etmeye veya indüklemeye yönelik son yıllarda birçok biyoteknolojik çalışma yapılmıştır. Bakteriyal biyofilmler, birçok biyolojik sistemde olduğu gibi çok fonksiyonlu, çevrelerine karşı duyarlı, canlı ve canlı olmayan birçok bileşenin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Biyolojik sistemlerin ortama uyum sağlaması, kendini yenilemesi, büyümesi ve değişmesi gibi yaşamsal fonksiyonları, sentetik hiçbir malzemenin elde edemeyeceği bir başarı ve kullanım alanı sunmaktadır. Bu

nedenle bilim adamları ve mühendisler uzun süredir, hem canlı olmayan bileşenleri hem de canlı hücreleri içeren dinamik, çevreye duyarlı ve uyarlanabilir "yaşayan fonksiyonel malzemeler" oluşturmak için bu özelliklerden faydalanmayı öngörmektedirler. Biyofilm üreten üyeler arasındaki işbirliği, multispesifik asidofilik biyofilmleri biyoteknolojik uygulamalar için çekici kılmaktadır. Örneğin, demir/kükürt oksitleyici bakterilerin piritli minerallere, heterotrofik asidofiller tarafından oluşturulan biyofilmler ile bağlanmasının baskılanmasına dayanarak reaktif mayın atıklarının güvenliğini sağlama tekniği olan "bioshrouding" yönteminde kullanılmaktadır. Bunun yanında biyoteknolojik olarak manipüle edilmiş metal/sülfuroksidize edici mikroorganizmalardan oluşan biyofilmler aktif olarak biyo-maden işlemlerine katılmaktadır (Hujislova et al., 2019).

2.4 *Salmonella* Biyofilmleri

Salmonella'nın keşfi, Amerikalı veteriner patolog Daniel Elmer Salmon ve asistanı Theobald Smith'in ortak domuz kolera nedenini araştırdığı 1885'e dayanmaktadır. *Salmonella* dünya çapındaki önemli patojenlerdendir ve çok sayıda insanda enfeksiyona sebep olmaktadır. Suşların, hücrelerin toplanması ile karakterize edilen, çok hücreli bir davranış olan biyofilm oluşturma kabiliyetinin arttırılmış kalıcılığı ve hayatta kalması için korunmuş bir strateji olduğu tahmin edilmektedir. Biyofilm oluşumu ve suşların çoklu konakçı türlerin bağırsaklarında kolonileşme ve çoğalma yetenekleri arasında bir korelasyon vardır. Bu suşlar ağırlıklı olarak insanlarda lokalize gastroenterit enfeksiyonlara neden olmaktadır. Buna karşılık, birkaç seçkin konakçı türünde sistemik, yayılmış enfeksiyonlara neden olan suşlar bulunmaktadır. Bu "istilacı" suşlar daralmış bir konakçı aralığına sahiptir ve çoğu biyofilm oluşturmamaktadır (Fàbreg and Vila, 2013; Peng, 2016).

Salmonella biyofilminin hücre dışı matrisi büyük ölçüde curli (amiloid fimbria), selüloz, biyofilm ile ilişkili protein olan Bap, O-antijen kapsülü ve hücre dışı DNA'dan oluşmaktadır (Peng, 2016). Curli ilk olarak 1980'lerin sonlarında sığır mastitine neden olan *E. coli* suşları üzerinde keşfedilmiştir ve esas olarak

yüzeyle yapışma, hücre toplanması ve biyofilm oluşumuna katılmaktadırlar. Curli ayrıca konakçı hücre yapışmasına ve istilasına aracılık eder ve bunlar konakçı enflamatuvar yanıtının güçlü indükleyicileridir (Barnhart and Chapman, 2006). Curli, Enterobacteriaceae familyasından birçok bakterinin dış zarından çıkıntı yapan amiloid lifleri oluşturmak için polimerize olabilen saç benzeri filamentlerdir (Zogaj et al., 2003). Curli proteini, farklı şekilde ifadesi gerçekleştirilen csgBAC (agfBAC) ve csgDEFG (agfDEFG) operonları tarafından kodlanmaktadır (Romling et al., 1998).

Selüloz, *Salmonella* biyofilmlerinde sentezlenen önemli bir EPS olan β (1 \rightarrow 4) bağlı D-glikoz birimlerinden oluşan bir polisakarittir. Selüloz ve curlinin *Salmonella* tarafından üretilmesi, hidrofobik bir ağ içinde kaplanmış sıkıca paketlenmiş hücrelerin matrisine yol açmaktadır (Peng, 2016). Selüloz biyosentezi için gerekli operonlar ise, bcsABZD ve bcsEFG'dir (Solano et al., 2002).

Biyofilm oluşumu için gerekli olan, çok sayıda tekrarlanan sekans içeren büyük bir hücre yüzeyi proteini olan BapA, *Salmonella*'da büyük ölçüde korunmuş bir gen olan *bapA* tarafından kodlanmaktadır. Biyofilm oluşturan hücrelerin kuvvetine ve bütünlüğüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu proteinin ifadesinin gerçekleşmesi, curli ve selülozu kodlayan operonlardaki genler ile koordine edilmektedir (Peng, 2016; MacKenzie et al., 2017).

Salmonella biyofilmi üretilirken son olarak, fimbria ve selülozla ilişkili hücre dışı matrisle çekirdeklenmiş bir O-antijen kapsülü üretir. Her ne kadar O-antijen kapsülü hücre davranışı için önemli görünmese de, biyofilmin bağlanma ve çevresel kalıcılığında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Barak et al., 2007).

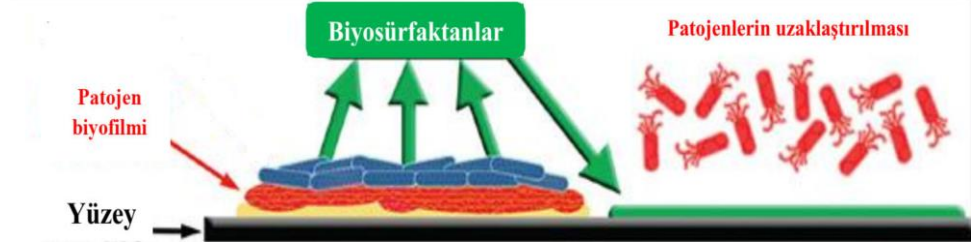
2.5 Biosümfaktanların Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Sentetik sümfaktanlar ve biosümfaktanlar, biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılabilir alternatiflerdir. Sümfaktanların biyofilmlerin uzaklaştırılmasında etkili olabilmesi için, katı substrat ile biyofilm arasındaki ara yüze nüfuz etmeleri gerekir, böylece ara yüzde adsorbe edilip arayüzey gerilimi azaltılabilir. Bazı biyofilm bakterileri bir yüzeyden dağılmak için kendi yüzey aktif maddelerini üretmektedir (Merino et al., 2017).

Mevcut mikrobiyal inhibisyon stratejileri, biyofilm topluluklarının büyümesinde sınırlı etkili olduğu bilinen planktonik bakteriyel fizyolojiye dayanmaktadır. Bu problem gittikçe dirençli klinik suşların ortaya çıkması ile daha da artmaktadır. Biyofilm ölçümü, izleme, dağıtma, kontrol ve inhibisyonun tüm yönleri, önemi artmakta olan konular haline gelmektedir. Biosümfaktanlar diğer birçok avantaja ek olarak, mikrobiyal biyofilmleri dağıtabilme potansiyelleri nedeniyle hem klinik hem de hijyenik sektörlere olan ilgiyi yeniden artırmıştır (Banat et al., 2014).

Bakterilerin gıda işleme ortamlarında bulunan malzeme yüzeylerinde yapışabileceğini ve biyofilm oluşturabildiğini, bunun da önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğunu gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Gıdyla temas eden yüzeylerde bulunan mikroorganizmaları azaltmak veya ortadan kaldırmak için, fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanarak temizleme ve dezenfeksiyon prosedürleri yıllar içinde yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Yüzeylere bağlı mikroorganizmaların serbest yaşayanlara kıyasla sanitasyona daha dirençli oldukları tespit edilmiştir, ayrıca mikrobiyal türler dezenfektanlara karşı zaman içerisinde direnç göstererek, yüzeylerin uygun şekilde temizlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, mikroorganizmaların yüzeylere tutunma durumlarının kontrolü, gıda güvenliği güvencesini sağlamak ve gıda endüstrisine alternatifler sunmak için sürekli iyileştirilmesi gereken yeni yapışma kontrol stratejileri geliştirmeye doğru giden önemli bir adımdır. Bu stratejilerden biri, mikrobiyal sümfaktanlar olarak da bilinen mikrobiyal yüzey aktif bileşikler kullanılarak yüzeylere ön muamele yapılmasıdır. İlk olarak biosümfaktanlar,

hidrokarbon parçalayıcı maddeler olarak dikkat çekmiş, ancak son beş yılda bu moleküllere olan ilgi, özellikle gıda, ilaç ve petrol endüstrisinde kimyasal yüzey aktif madde alternatifleri olarak önemli ölçüde artmıştır (Nitschke et al., 2007).



Şekil 2.7 Biyosümfaktanların biyofilmin yüzeye yapışmasını engellemesinin şematik görüntüsü (Anonim)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Kullanılan örnekler

Biyosümfaktan üretimi için petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş topraktan daha önce izolasyonu yapılmış fakat tanısı yapılmamış olan organizmaların biyosümfaktan tarama yöntemleriyle (oil spreading ve emülsifikasyon) aktivitelerine bakılmıştır. Bu maya izolatları içerisinde en yüksek biyosümfaktan üreticisi izolat optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir. Biyosümfaktan aktivitesi gösteren organizmanın izolasyonu için karbon kaynağı olarak glikoz ve hidrofobik karbon kaynağı olan Soya Fasulyesi Yağı (Abalıoğlu Yağ Sanayi ve Ticaret A.Ş.) tercih edilmiştir. Ayrıca, biyofilm denemeleri için *S. typhimurium* kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

3.1.2.1 Yeast Mould agar/broth (YMA/B)

Malt ekstrakt	3 g
Yeast ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Glukoz	10 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml

(Rufino et al., 2012; Santos et al., 2014).

İçerik distile suda çözülerek 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri *Y. lipolytica* saf kültürün stoklanması ve testlerde kullanılmak üzere taze kültürün elde edilmesinde kullanılmıştır.

3.1.2.2 Minimal salt medium (MSM)

K_2PO_4	1,8 g
KH_2PO_4	1,2 g
NH_4Cl	4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
Karbon kaynağı (Glikoz)	10 g
Distile su	1000 ml

(Zajic et al., 1982)

İçerik distile suda çözülerek 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Hidrofobik karbon kaynağı olarak ‘Soya fasulyesi yağı’ kullanılmıştır. Bu besiyeri biyosümfaktan üretimi için kullanılmıştır.

3.1.2.3 Tryptic soy agar (TSA)

TSA (Merck)	40 g
Distile su	1000 ml

Dehidre besiyeri, 40 g/L olacak şekilde distile su içinde çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. *S. typhimurium* taze kültürün elde edilmesinde ve saf kültürün stoklanmasında kullanılmıştır.

3.1.2.4 Tryptic soy broth (TSB)

TSB (Merck)	30 g
Distile su	1000 ml

Dehidre besiyeri, 30 g/L olacak şekilde distile su içinde çözülerek tüplere paylaştırılmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. *S. typhimurium*'un canlandırılmasında ve biyofilm oluşumunun optimizasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.5 Seyreltilmiş TSB (1/20 TSB)

TSB (Merck)	5 ml
Distile su	95 ml

Dehidre besiyeri 30 g/L olacak şekilde çözüldükten sonra 1/20 oranında seyreltme yapılmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Biyofilm oluşumunun optimizasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.6 Luria-Bertani (LB) broth

Trypton	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
NaCl	10 g
Distile su	1000 ml

(Janek et al., 2012)

İçerik distile su içerisinde çözülerek tüplere paylaştırılmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Biyofilm oluşumunun optimizasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.7 NaCl'siz Luria-Bertani (LB) broth

Trypton	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
Distile su	1000 ml

İçerik distile su içerisinde çözülerek tüplere paylaştırılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Biyofilm oluşumunun optimizasyonunda kullanılmıştır.

3.1.3 Çözelti, tampon ve boyalar

3.1.3.1. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum Klorür (NaCl) 8 g

Distile su 1000 ml

8 g NaCl 1000 ml distile suda iyice çözülerek 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilerek örneklerin dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2 DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

- **Lizis tamponu**

Tris-HCl 400 mM (6,3 g)

EDTA 60 mM (2,35g)

NaCl 150 mM (0,9g)

SDS % 1

pH 8,0

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Potasyum-asetat solüsyonu**

Potasyum-asetat (5M)	30 ml
Glisial asetik asit	5,75 ml
Distile Su	14,25 ml

Bu solüsyon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE) (10x/L)**

Tris	121,10 g
Borik asit	61,83 g
EDTA (susuz)	5,84 ml
dH ₂ O	1000 ml

Bütün içerikler 1000 mL'lik beher içerisine eklenmiştir. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak pH 8'e ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

- **TEA tamponu (Tris, asetik asit, EDTA, 10x pH:8)**

Tris base	48,4 g
Glacial asetik asit	11,42 ml
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	7,44 g

dH₂O 1000 ml

Bütün içerikler 1000 mL'lik beher içerisine eklenmiştir. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşmıca kadar manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak pH 8'e ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

- Soğuk izopropil alkol
- %70'lik soğuk etanol

3.1.3.3 26S rDNA analizinde kullanılan materyaller

dNTP karışımı (Fermentas; 100 mM)

Primerler (Fermentas)

NL1 – 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3'

NL4 – 5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG – 3'

Taq DNA Polimeraz (Fermentas 500 U)

Marker DNA (Fermentas; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

Agaroz (Prona)

Gel Red(Nükleik asit jel boyası)

3.1.3.4. pH tamponları

Biyosümfaktan üretimde pH optimizasyonunda tampon kullanılmıştır. pH 4 – 7 arasında hazırlanacak tamponlar için Sitrat – Fosfat tamponu, pH 8 ve 9 için ise Tris tamponu kullanılmıştır (Temizkan vd., 2008).

- Sitrat-Fosfat tamponu

A: 0,2 M sitrik asit çözeltisi (19,21 g)

B: 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi (53,65 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ veya 71,7 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)

x ml A çözeltisi ile y ml B çözeltisi karıştırılır, son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

x	y	pH
30,7	19,3	4.0
24,3	25,7	5.0
17,0	32,1	6.0
6,5	43,6	7.0

- Tris [Tris (Hidroksimetil)-Aminometan] tamponu

A: 0,2 M Tris (Trizma base) çözeltisi (24,2 g/L)

B: 0,2 M HCl

50 ml A, x ml B ile karıştırılır, son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.

X	pH
26,8	8.0
5,0	9.0

3.1.3.5 Kristal viole

Kristal viole	2 g
%95'lik etil alkol	20 ml
Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80 ml

20 ml etanolde 2 g kristal viole çözülür. 0,8 g amonyum oksalat 80 ml distile su içerisinde çözülür ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyoleye ilave edilir.

3.1.4 Kullanılan başlıca cihazlar

- Spektrofotometre (VARIAN)
- Santrifüj (Hettich ROTINA 35R)
- Mikro santriüj (14.000g) (Hettich EBA 12R)
- PCR cihazı (Palm Cyclor, Corbett)
- Yatay elektroforez (Consart HU 13)
- Otoklav (HIRAYAMA)
- İnkübatörler (SANYO, BINDER)
- Çalkamalı inkübatör (İNNOVA 4340)
- Otomatik pipetler (Thermo)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- Terazi
- pH ölçüm cihazı (WTW)
- Vorteks (VWR INTERNATIONAL)
- Buzdolabı (REGAL-BOSCH)
- Evaporatör(Heidolph)
- Mikro plaka ölçüm cihazı (Thermo – Varioskan Flash)

3.2 Yöntem

3.2.2 Biyosümfaktan aktivitesi gösteren izolatın tanılanması

3.2.2.1 DNA izolasyonu

Petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş topraktan daha önce izolasyonu yapılmış fakat tanısı yapılmamış olan organizmaların biyosümfaktan tarama yöntemleriyle yüksek biyosümfaktan aktivitesi gösteren izolatın 26S rDNA-PCR tiplendirilmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

İşlemler aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

1. Yeast Mould Broth'da maya hücreleri 27°C'de 1 gün inkübe edilir.
2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültür steril bir ependorf tüpüne aktarılır ve 7000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılır.
3. Pellet üzerine 500 µl liziz tamponu ilave edilir ve karışım homojen olana kadar karıştırılır.
4. 65°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 150 µl potasyum-asetat ilave edilir ve karışım homojen olana dek karıştırılır.
5. Karışım 12000 rpm'de, 4°C'de, 5 dakika santrifüjlenir, süpernatant yeni ve steril bir ependorf tüpüne aktarılır.
6. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilir ve homojen karışım sağlana dek karıştırılır.
7. Karışım 11000 rpm'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.

8. Daha sonra 300 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir ve 10000 rpm'de, 4°C'de, 1 dakika santrifüjlenir , sonrasında ise etanol uçana kadar beklenir.

9. Etanol uçtuktan sonra örnekler 50 µl ultra saf suda tekrar süspanse edilir ve kullanılabilece kadar -30°C'de muhafaza edilir (Liu et al., 2000).

3.2.2.3. 26S rDNA-PCR

D1/D2 bölgesinin amplifikasyonu için NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3') ve NL4 (5' – GGTCCTGTGTTTCAAGACGG – 3') primerleri kullanılmıştır. Fernandez et al. (2000), Chen et al. (2000) ve Petersen et al. (2001) tarafından önerilen koşullar ve malzeme miktarlarından yararlanılarak, 26S rDNA PCR amplifikasyon koşulları ve amplifikasyonda kullanılacak malzemelerin miktarları belirlenmiştir.

DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

Bileşenler	Miktarı
Ultra saf su	10,65 µl
PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl
MgCl ₂	3,6 µl
dNTP karışımı	1,0 µl
Primer NL 1	1,0 µl
Primer NL4 4	1,0 µl
Taq Polimeraz	0,25 µl
Kalıp DNA	5,0 µl (20–50 ng DNA)

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

26S rDNA amplifikasyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

- İlk denatürasyon 95°C'de 5 dakika
- 35 dögü, her dögüde;

Denatürasyon: 95°C'de 1 dakika

Bağlanma: 58°C'de 1 dakika

Uzama: 72°C'de 2 dakika

- PCR tüpleri son dögüden sonra 72°C'de 10 dakika inkübe edilmişlerdir.
- Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C'de saklanmıştır (Petersen et al., 2001).

3.2.2.4 26S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde 90 volta 1 saat 15 dakika süre ile yürütölmüştür. Elektroforezde tampon olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) kullanılmış ve elektroforez %1'lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 100 ml'de 5µl olacak şekilde 10000X GelRed (Biotium) nükleik asit boyası ilave edilmiştir (Fernandez et al., 2000; Petersen et al., 2001).

Elektroforez için 2 µl PCR ürünü ve 3 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklele beraber DNA markerı da (100 bp DNA marker, Fermentas) jelde yürütölmüştür.

PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Elektroforez cihazının tepsisi iyice temizlenerek açık uçları bir otoklav bandı ile kapatılır.

2. Cihazın tankları Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) ile uygun seviyeye kadar doldurulur.

3. 250 ml'lik temiz bir erlen içerisine 100 ml Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) konular ve 1g agaroz TBE'de süspanse edilir.

4. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşınca kadar mikrodalga fırında ısıtılarak, agarozun erimesi sağlanır.

5. Solüsyon 60°C'a kadar soğutulur ve 100 ml'de 5µl olacak şekilde 10000X GelRed (Biotium) nükleik asit boyası ilave edilmiştir.

6. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek yükseklikleri 0,5-1mm olacak şekilde ayarlanır.

7. 60°C'a soğutulan agaroz solüsyonu jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde tepsiye dökülür.

8. Jel oda sıcaklığında tamamen donduktan sonra (60-90 dakika) bantlar ve taraklar dikkatlice çıkarılır.

9. Tanka jelin yüzeyini yaklaşık 1 mm kaplayacak şekilde TBE ilave edilir.

10. PCR ürünleri ve Marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılır.

12. UV translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek polaroid bir kamerayla jel incelenerek fotoğrafı çekilir.

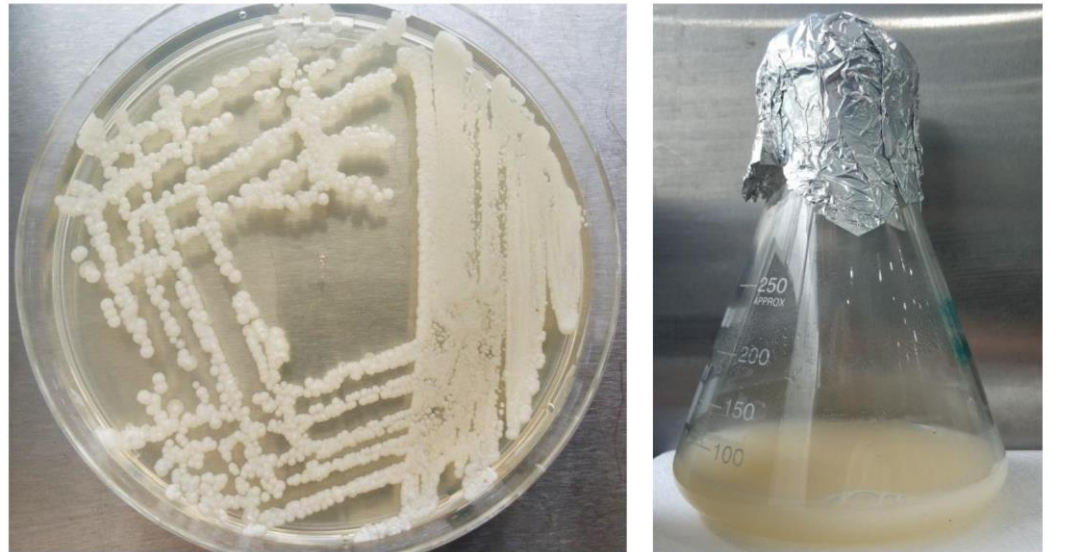
3.2.2.5 26S rDNA D1/D2 domaininin sekans analizi

Amplifiye edilen 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin sekans analizleri hizmet alımı yapılarak Sanger yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekans analizlerinde elde edilen sekanslar, GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen diziler ile NCBI gen bankasından alınan referans diziler MEGA7.0 phylogenetic software kullanarak önce pairwise & multiple alignment yapılmıştır. Yine aynı software içinde Neighbor-joining ile filogenetik ağaç çizilmiştir.

3.2.3 *Yarrowia lipolytica*'nın büyüme koşulları

Yarrowia lipolytica, canlılığını korumak için her ay yatık YMA'ya aktarılmıştır. Taze kültür elde edebilmek için yatık agardan katı besiyeri YMA'ya aktarılarak 27°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 50 ml YMB ortamına aktarılarak 48 saat 27°C' de çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır (Sarubbo et al., 2007).



Şekil 3.1 *Yarrowia lipolytica* TEM BD 35'in katı ve sıvı besiyerindeki görünümü

3.2.4 Üretilen biyosüfaktanın optimizasyonu

YMB ortamında inkübe edilen *Y. lipolytica*, 600 nm'de OD \approx 1 olacak şekilde ayarlanmıştır. 50 ml MSM ortamına %1'lik organizma süspansiyonu ve hidrofobik karbon kaynağı olarak kullanılan soya yağı 0,5 ml aktarılarak inkübasyona bırakılmıştır. (Sarubbo et al., 2007).

Biyosüfaktan üretiminin optimizasyonunda karbon kaynağı, inkübasyon süresi, inokülasyon miktarı, sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu parametreleri incelenmiştir. Hücre büyümesi optik yoğunluk (OD_{600nm}) ve koloni sayımı ile yapılırken, biyosüfaktan üretim taraması oil spreading (yağ yer değiştirme) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E₂₄) ile belirlenmiştir.

3.2.5 Biyosüfaktan üretiminin taraması

3.2.5.1 Oil spreading (yağ yer değiştirme) testi

Bu yöntem, bir yağ-su ara fazı üzerinde bir süfaktan içeren çözeltiyi damlattıktan sonra oluşan şeffaf zonun çapını ölçmek için kullanılmıştır. İnce bir yağ tabakası oluşturmak için 40 ml distile su içeren 15 cm'lik petri kabının yüzeyine 3 ml soya yağı eklenmiştir. Ardından, *Y. lipolytica* tarafından üretilen biyosüfaktanın 500 µl'lik hücresiz süpernatantı yağ tabakasının merkezine nazikçe yerleştirilmiştir. Yağ, yer değiştirdiğinde ve yüzey üzerinde bir şeffaf zon oluştuğunda, test pozitif kabul edilmiştir ve oluşan zonun çapı mm cinsinden ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak ise %1'lik SDS kullanılmıştır (Youssef et al., 2004; Satpute et al., 2008).

3.2.5.2 Emülsifikasyon aktivite testi (%E₂₄)

Emülsifikasyon aktivite testi, 2 ml hücresiz süpernatanın bir test tüpüne aynı miktardaki kerosen ilave edilmesiyle biyosürfaktanın aktivitesini kantitatif olarak ölçmek için kullanılmıştır. 2 dakika yüksek hızda vorteks uyguladıktan sonra test tüpleri 24 saat bekletilmiştir. Emülsifikasyon aktivite yüzdesi, aşağıdaki denklem kullanılarak 24 saat sonra hesaplanmıştır:

$$%E_{24} = \frac{\text{Oluşan emülsiyonun yüksekliği (cm)} \times 100}{\text{Toplam çözüm yüksekliği (cm)}}$$

En iyi emülsifiye edici substrat en yüksek %E₂₄ göstermektedir (Cooper and Goldenberg, 1987). Pozitif kontrol olarak %1'lik SDS, negatif kontrol olarak ise su kullanılmıştır.

3.2.5.3. Koloni sayımı ve hücre büyümesi

MSM ortamında biyosürfaktan üretimi için aktarılan organizmanın inkübasyonundan sonra 1 ml alınarak FTS içerisine aktarılmıştır. 10⁻⁶'ya kadar seyreltme yapılmış ve her seyreltmeden dökme plaka yöntemi ile 1 ml petrilere aktarılmıştır. 27°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve sonrasında koloni sayımı yapılmıştır.

Koloni sayısı (kob/ml) = (Koloni Sayısı x Seyreltme Faktörü) / Dilüsyon tüpünden Petri kutusuna aktarılan hacim

Hücre büyümesi, organizma süspansiyonun OD_{600nm}'de izlenerek belirlenmiştir (Daverey and Pakshirajan, 2010).

3.2.6 Biosüpfaktanın ekstraksiyonu

50 ml'lik fermantasyon sıvısı, 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant pelletten ayrılmıştır. Süpernatant 250 mL'lik bir ayırma hunisinin içine yerleştirilen 0,25 µm çapındaki filtreden geçirilmiştir. Süpernatantın pH'ı 6M HCl ile 2'ye düşürülmüş ve 24 saat 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra süpernatantla eşit hacimde kloroform:metanol (2:1) eklenerek ayırıcı huni içerisinde iyice çalkalanmış ve faz oluşumundan sonra aşağıda kalan organik faz ayrılmıştır. Bu aşama 3 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen organik faz, Na₂SO₄ (Sodyum sülfat) konulan filtre kağıdından geçirilmiş ve buharlaştırıcıda (rotary evaporator) 40-45°C'de 200 rpm'de kimyasalların buharlaşması sağlanmış ve biosüpfaktan kısmi olarak saflaştırılmıştır (Thampayak et al., 2008; Dusane et al., 2011; Gomaa, 2013; Hassan and Mohammad, 2015).

3.2.7 *Salmonella typhimurium* biyofilminin uygun koşullarının sağlanması

Salmonella typhimurium tarafından oluşturulacak biyofilm, 96 kuyucuklu mikrolaka içinde sıcaklık (27 ve 37°C), besiyeri (TSB, 1/20 TSB, LB ve tuzsuz LB), inkübasyon süresi (24 ve 48 saat) ve inokülasyon miktarı (100 µl besiyeri + 30 µl organizma süspansiyonu, 100 µl besiyeri + 50 µl organizma süspansiyonu, 230 µl besiyeri + 20 µl organizma süspansiyonu, 10⁻¹ ve 10⁻² seyreltmelerden 100 µl) değiştirilerek biyofilm oluşumları test edilmiştir (Mireles II et al., 2001; Stepanovic et al., 2004; Trentin et al., 2011; Bakkiyaraj et al., 2013; Barges et al., 2018; Silva et al., 2018). Biyofilm oluşumu kristal viyole yöntemi ile değerlendirilmiştir. İnkübasyonun ardından, büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler steril distile suyla üç kez yıkanmıştır. Bunun ardından, mikrolaka 30 dakika 80°C'de ters bir şekilde kurumaya bırakılmış, daha sonra inokülasyon miktarına eşit miktarda kristal viyole (% 1) ile 20 dakika boyanmış ve oda sıcaklığında bırakılmıştır. Mikrolaka, fazla boyayı çıkarmak için üç kez daha steril distile suyla yıkanmış, ardından 65°C'de 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Mikrolaka çeperine yapışan hücreler etanol (%99) ile çözülerek mikrolaka okuyucuda her kuyucuğun absorbansı 590 nm'de ölçülmüştür.

Stepanovic et al. (2000) tarafından önerilen şekilde, uygun koşulların sağlanması için elde edilen OD'ler, “cut off” (sınır) değerlerinin dönüşümleri de esas alınarak, biyofilm üretimleri açısından “üretici olmayan”, “zayıf”, “orta” ve “güçlü” olmak üzere değerlendirilmiştir. Sınır değerleri, mikropilaya ölçüm esasına dayalı yöntemlerde negatif test gruplarından gelen ölçüm sonuçlarının istatistikî sapma değerlerini ifade eden bir değerdir. *S. typhimurium* biyofilm üretim kapasiteleri aşağıda ifade edilen sınır değerlerin dönüşümleriyle ifade edilmiştir. Bu değerlendirme, OD_c 'nin sınır (cut off) yoğunluğunun, negatif kontrolün ortalama OD'sinin üstünde 3 standart sapma olarak tanımlanmıştır.

Negatif kontrolün $OD_c = \text{negatif kontrolün } OD_{av} + (3 \times \text{negatif kontrolün } OD\text{'lerin standart sapması})$

Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri:

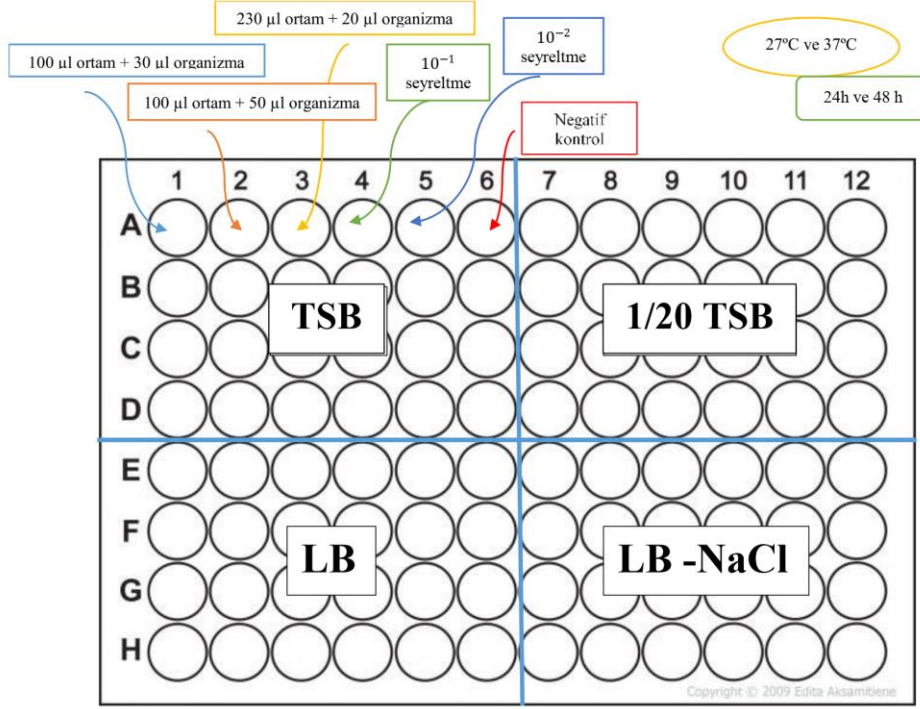
$OD \leq OD_c$: Biyofilm üretmiyor;

$OD_c < OD \leq 2OD_c$: Zayıf biyofilm üreticisi;

$2OD_c < OD \leq 4OD_c$: Orta düzey biyofilm üreticisi;

$4OD_c < OD$: Güçlü biyofilm üreticisi şeklindedir.

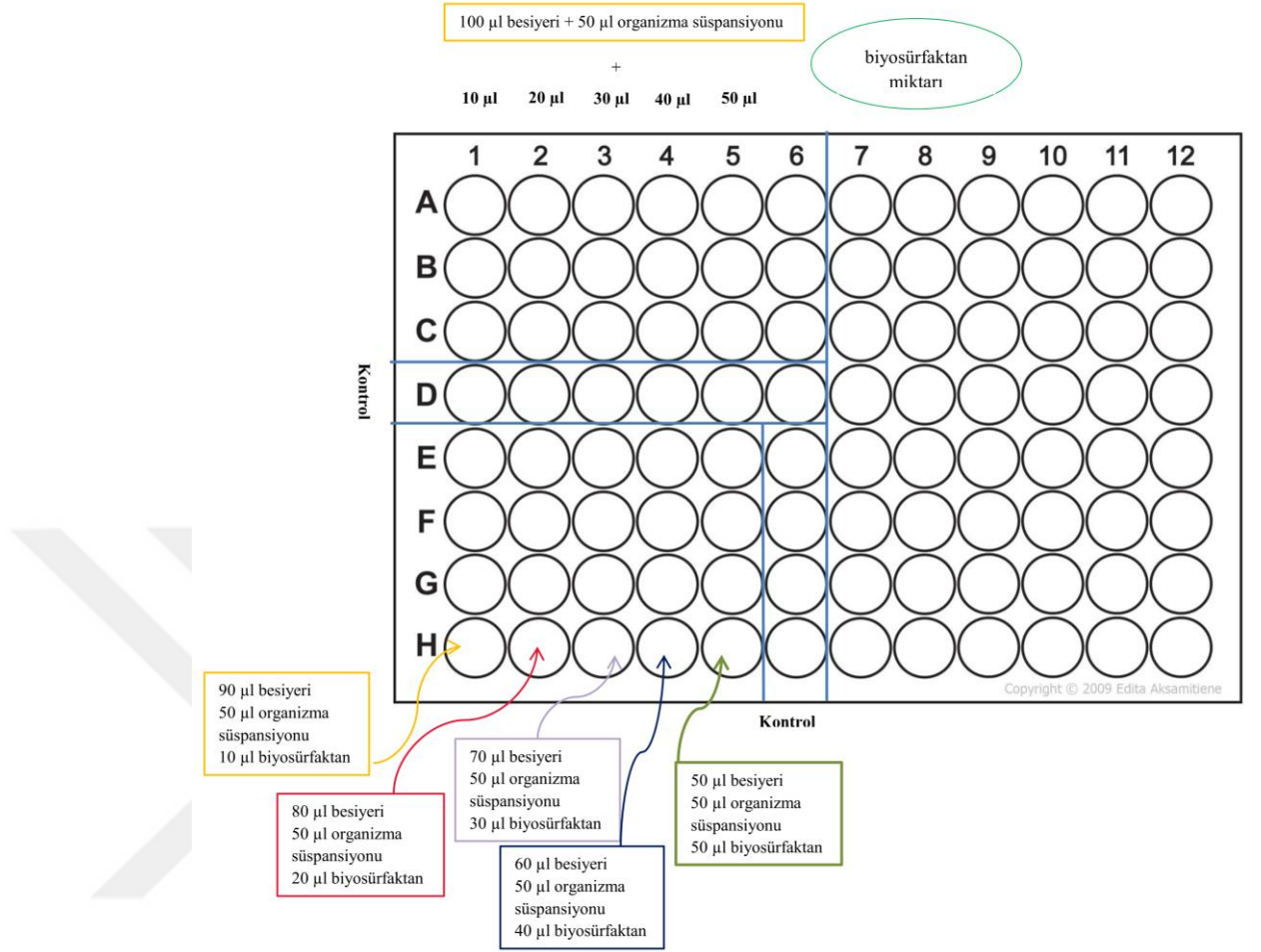
Hesaplanan ortalama ve standart sapmalar, her bir deneyde sekiz kuyucukta tekrarlanmış en az iki ayrı denemenin sonucunda bulunmuştur.



Şekil 3.2 Biyofilm oluşumunun uygun koşullarının sağlanması için belirlenen parametrelerin şematik gösterimi

3.2.8 Biosüpfaktanın biyofilm üzerindeki anti-adhesiv etkisi

Literatürde karşılaşılan iki farklı uygulama kullanılmıştır; ilki toplam besiyeri ve organizma süspansiyonu üzerine biosüpfaktan eklenmesi (100 µl besiyeri+50 µl organizma süspansiyonu+10-50 µl biosüpfaktan içeren süpernatant), ikincisi ise biosüpfaktan eklenerek toplam hacime (50-90 µl besiyeri+50 µl organizma süspansiyonu+10-50 µl biosüpfaktan içeren süpernatant) ulaşılmasıdır.



Şekil 3.3 Biyosülfaktan içeren süpernatantın biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi incelenirken yapılan uygulamanın şematik gösterimi

Anti-adhesiv ajan olarak biyosülfaktanın etkisi incelenirken, ko-inkübasyon denemeleri iki farklı şekilde uygulanmıştır. Uygulamalardan birinde farklı süpernatant miktarları (10, 20, 30, 40 ve 50 µl), diğerinde ise kısmi saflaştırılan biyosülfaktan farklı konsantrasyonlar (6,25, 12,5, 25 ve 50 mg/ml) hazırlanarak anti-adhesiv etkisi incelenmiştir. En uygun koşulda biyofilm oluşturan hücre süspansiyonları (100+50 µl ve 230+20 µl) ve 10-50 µl arasında farklı süpernatant, 96 kuyucuklu mikropilaya kuyucuklarına eklenmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kısmi saflaştırılmış biyosülfaktan hücre süspansiyonları üzerine 10 µl eklenerek inkübe edilmiştir (Khiralla et al., 2015; Sharma and Saharan, 2016). Biyofilm oluşumu üzerindeki biyosülfaktanın etkisi,

kristal viole testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Her kuyucuğun absorbansu 590 nm'de ölçölmüştür.

Biyosüurfaktanın neden olduğu inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formöl kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Mikrobiyal İnhibisyon} = \frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \times 100$$

A_0 : Kontrol kuyucukların 590 nm'deki absorbansu

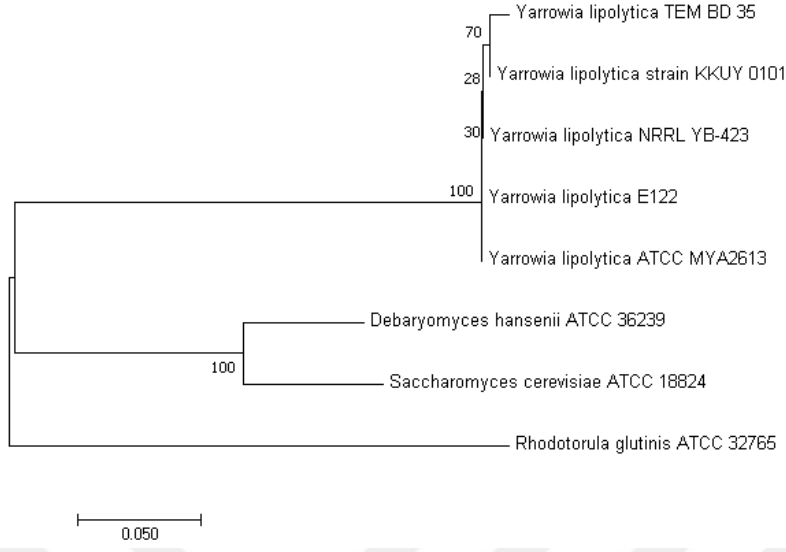
A_c : Biyosüurfaktan bulunan kuyucukların 590 nm'deki absorbansu

Kontrol kuyucuklarına biyosüurfaktan ilave edilmemiştir.

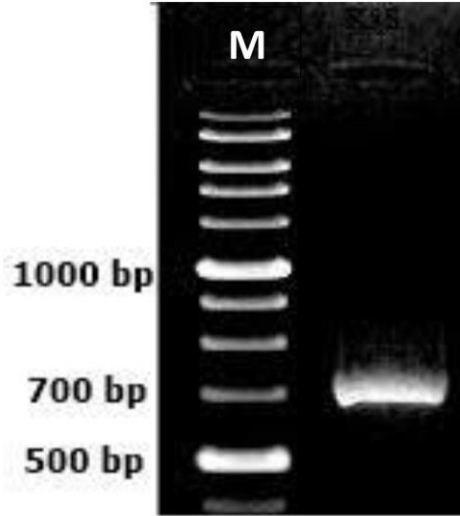
4. BULGULAR

4.1 Biyosüpfaktan üreticisi izolatın 26S rDNA-PCR sekans sonuçları

Yüksek biyosüpfaktan aktivitesi gösteren izolatın 26S rDNA-PCR ile tanısı yapılmıştır. DNA'ları izole edilen izolatın 26S rDNA ile yapılan çalışmalar sonucunda 26S rDNA-PCR ile amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Amplifikasyon sonucu elektroforez görüntüleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir. PCR ürününün boyutu 700 bp olduğu görülmüştür. PCR ile amplifiye edildikten sonra, PCR ürününün sekans analizi için hizmet alımı olarak Sanger yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Devamında Geneious 10.0.01 programı kullanılarak diziler temizlenmiş ve sonra NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilerek izolatların genus ve tür düzeylerinde tanılanması yapılmıştır. Tanılama sonucunda TEM BD 35 numaralı suş %99 oranında *Y. lipolytica*'ya benzerlik göstermiştir. Sekans sonucu elde edilen dizi ile tip tür olarak kabul gören maya türlerinin referans dizileri MEGA7.0 phylogenetic software kullanarak önce pairwise & multiple alignment yapılmıştır. Yine aynı software içinde Neighbor-joining ile filogenetik ağaç çizilmiştir. Bunların sonuçları Şekil 4.1'de filogenetik ağaçta gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Tanısı yapılan *Y. lipolytica* TEM BD 35 ile tip türlerin 26S rDNA bölgesi sekansları kullanılarak Neighbor-Joining metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağaç



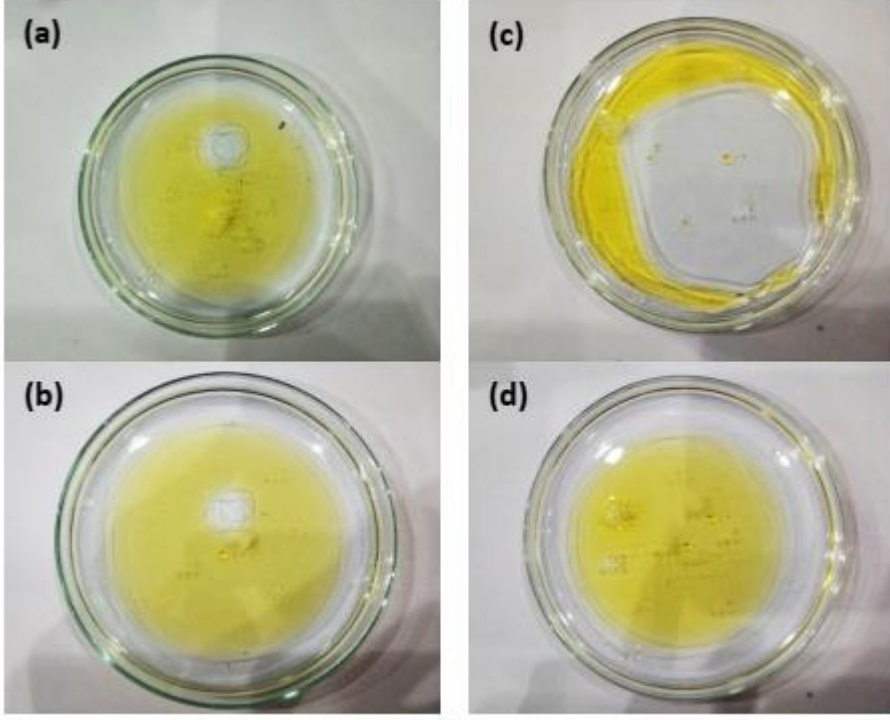
Şekil 4.2 *Yarrowia lipolytica* TEM BD 35 26S rDNA bölgelerinin elektroforez sonucu M: Marker, (Fermentas) 100 bp DNA ladder

4.2 Biyosüpfaktan Üretimnin Optimizasyonu

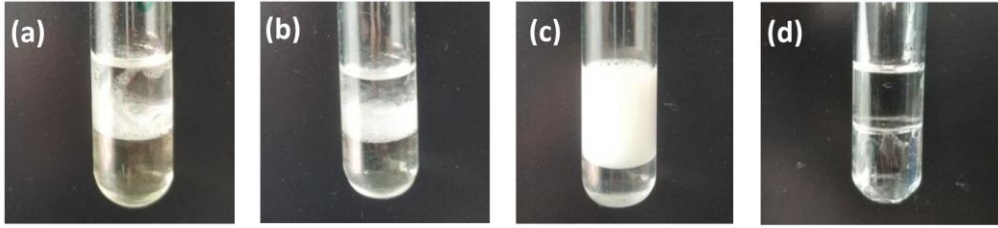
Yarrowia lipolytica TEM BD 35 tarafından üretilen biyosüpfaktanın optimizasyonunda karbon kaynağı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, inokülasyon miktarı ve tuz konsantrasyonu parametreleri incelenmiştir.

4.2.1 Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi

Yarrowia lipolytica TEM BD 35 tarafından üretilen biyosüpfaktan, farklı karbon kaynakları ve inkübasyon sürelerinden etkilenmektedir. Hidrofilik, hidrofobik ve hidrofilik-hidrofobik karbon kaynağı kombinasyonu olarak sırasıyla glikoz, soya yağı ve glikoz-soya yağı kombinasyonu kullanılarak 4 - 8 gün inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynağı ve inkübasyon süresinin sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. En iyi biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesi ve oil spreading (yağ yer değıştirme) sonuçları Şekil 4.3a ve Şekil 4.3b'de verilmiştir. En iyi inkübasyon süresi, %17 emülsifikasyon aktivitesi ve 20 mm çapında oil spreading (yağ yer değıştirme) sonuçları ile 7. gün olarak seçilirken, karbon kaynağı olarak seçilen glikoz-soya yağında ve soya yağında sonuçlar benzerlik göstermiştir, bu yüzden bir sonraki adımda karbon kaynağı olarak glikoz-soya yağı ve soya yağı kullanılarak devam edilmiştir.



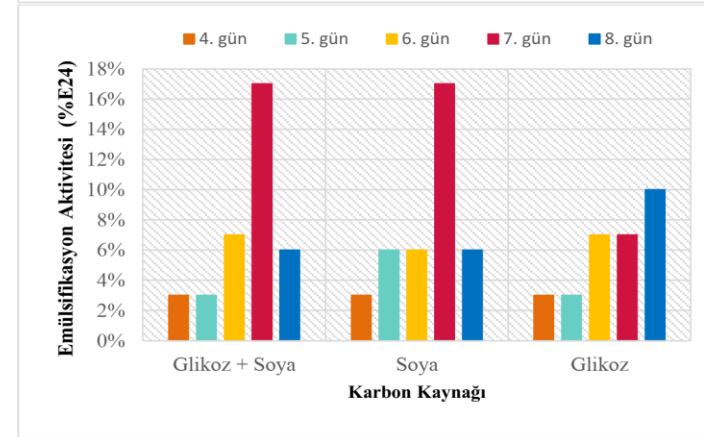
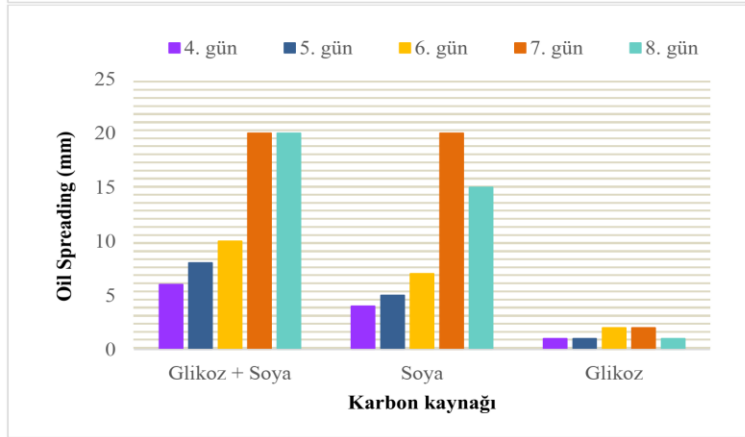
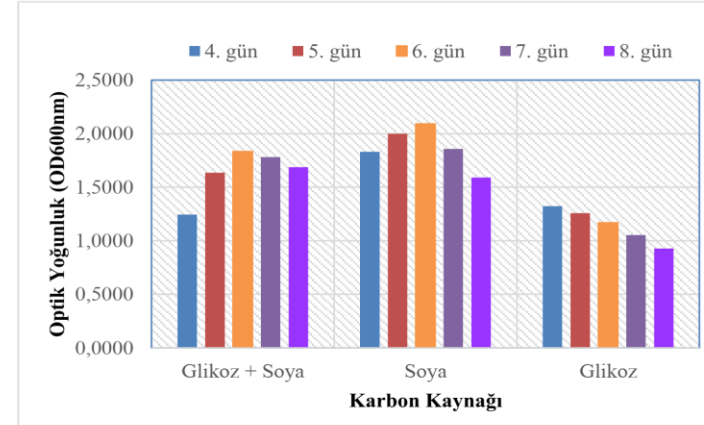
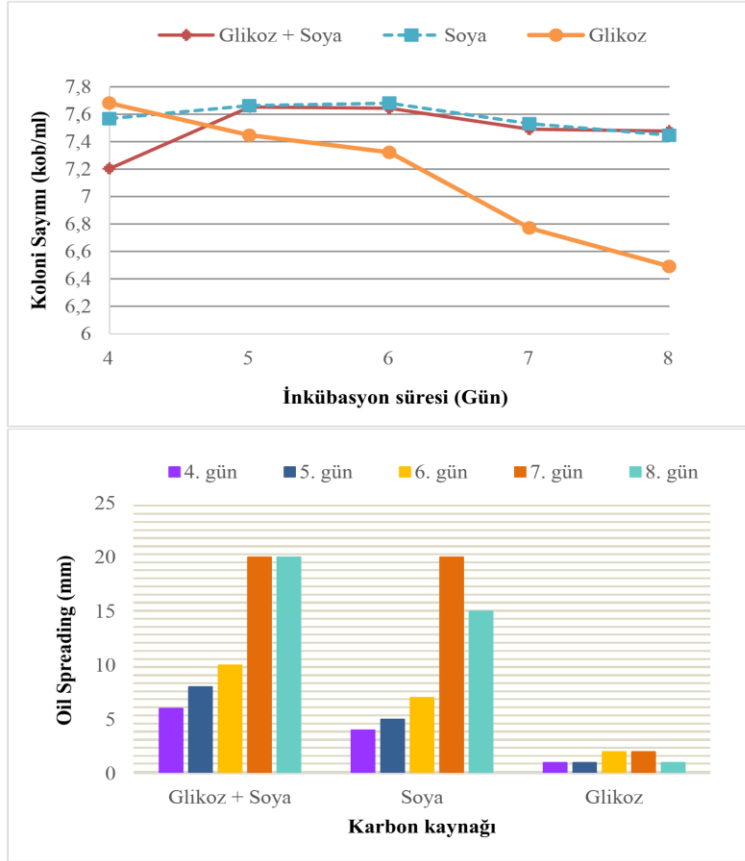
Şekil 4.3a Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi optimizasyonunda 7. günde biyosümfaktan üretiminin Oil spreading (yağ yer değıştirme) sonuçları (a) biyosümfaktan içeren süpernatant (glikoz ve soya yağı) (b) biyosümfaktan içeren süpernatant (soya yağı) (c) SDS (d) su



Şekil 4.3b Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi optimizasyonunda 7. günde biyosümfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları (a) glikoz ve soya yağı (b) soya yağı (c) SDS (d) su

Çizelge 4.1 Biosürlfaktan üretiminde inkübasyon süresi ve karbon kaynağı parametrelerinin optimizasyon sonuçları (OD₆₀₀: optik yoğunluk, koloni sayımı (kob/ml) %E₂₄: emülsifikasyon aktivitesi, Oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm))

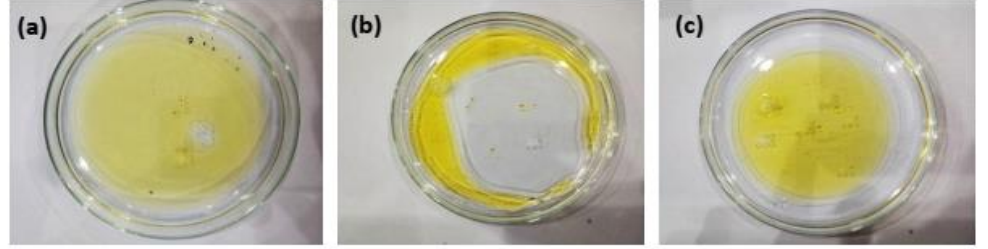
İnkübasyon süresi (gün)	Karbon kaynağı											
	Glikoz + Soya yağı				Soya yağı				Glikoz			
	OD _{600nm} (10 ⁰)	Koloni sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)
4	1.2444	1,6×10 ⁷	%3	6 mm	1.8301	3,7×10 ⁷	%3	4 mm	1.3230	4,8×10 ⁷	%3	1 mm
5	1.6357	4,5×10 ⁷	%3	8 mm	2.0003	4,6×10 ⁷	%6	5 mm	1.2589	2,8×10 ⁷	%3	1 mm
6	1.8336	4,4×10 ⁷	%7	10 mm	2.0916	4,8×10 ⁷	%6	7 mm	1.1684	2,1×10 ⁷	%7	2 mm
7	1.7821	3,1×10 ⁷	%17	20 mm	1.8566	3,4×10 ⁷	%17	20 mm	1.0543	5,9×10 ⁶	%7	2 mm
8	1.6865	3,0×10 ⁷	%6	20 mm	1.5913	2,8×10 ⁷	%6	15 mm	0.9277	3,1×10 ⁶	%10	1 mm



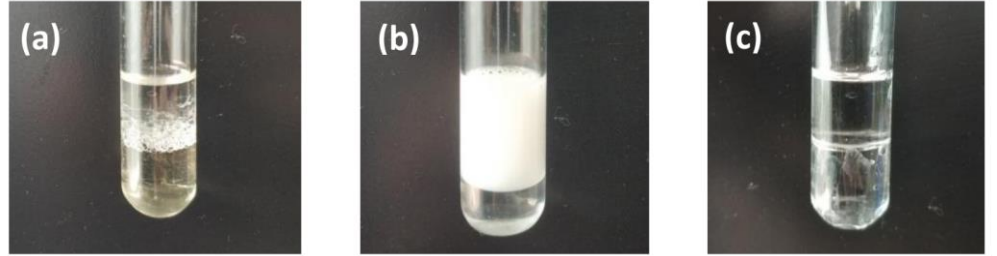
Şekil 4.4 Biyosü尔夫aktan üretiminde inkübasyon süresi ve karbon kaynağı parametrelerinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD_{600 nm}), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E24) sonuçları (koloni sayımılog₁₀ olarak hesaplanmıştır)

4.2.2 Sıcaklık

Sıcaklık, biosümfaktan üretimi için önemli bir parametredir. Bir önceki adımda seçilen karbon kaynakları ve inkübasyon süresine ek olarak 25, 27, 28 ve 30°C sıcaklıkları denenmiştir ve deneme sonuçları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. En iyi biosümfaktan üretiminin sonuçları ise Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b'de gösterilmiştir. En iyi biosümfaktan üretimi, %20 emülsifikasyon aktivitesi ve 15 mm çapındaki oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları ile glikoz-soya yağında 27°C'de izlenmiştir.



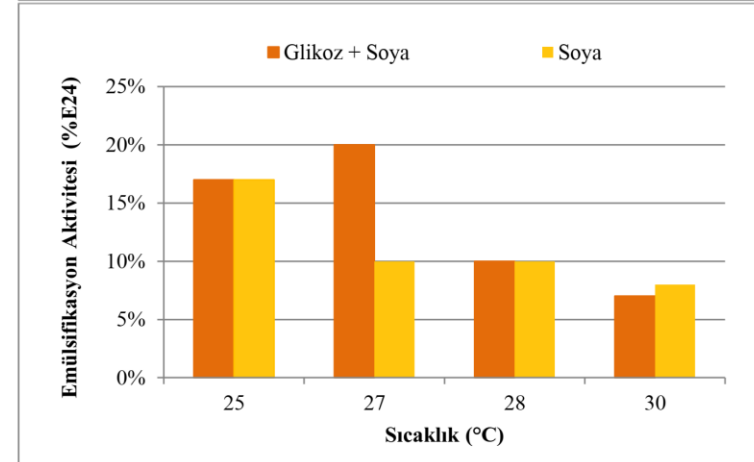
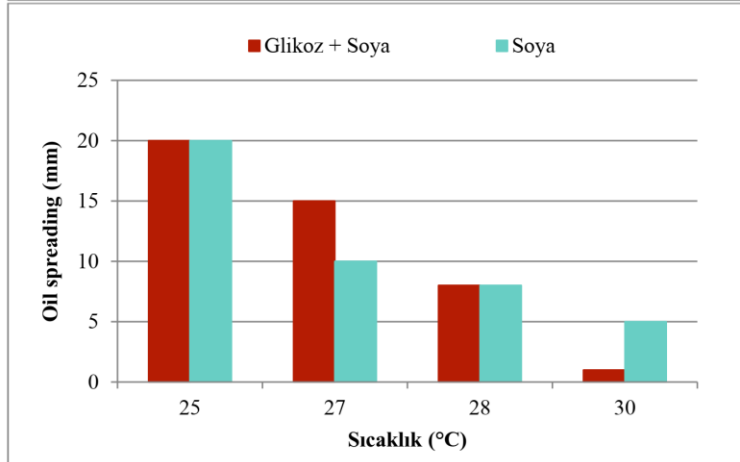
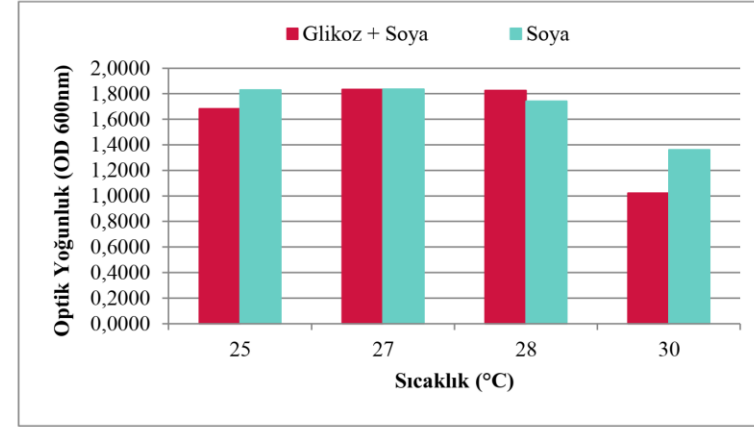
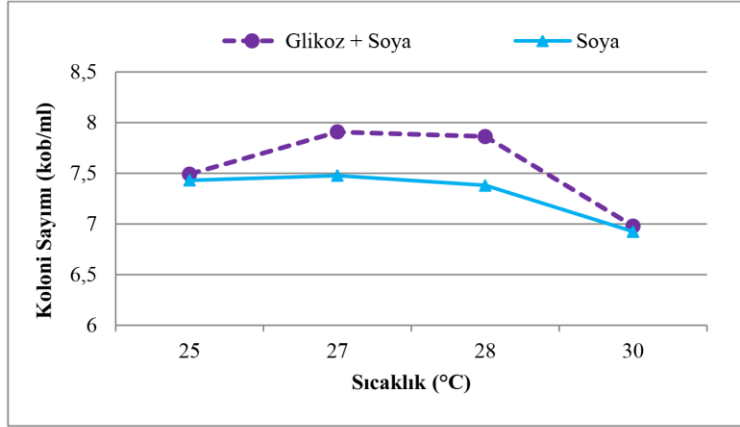
Şekil 4.5a Sıcaklık optimizasyonunda biosümfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları (a) biosümfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su



Şekil 4.5b Sıcaklık optimizasyonunda biosümfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları (a) biosümfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su

Çizelge 4.2 Biosüpfaktan üretiminde sıcaklık parametresinin optimizasyonu (OD₆₀₀: optik yoğunluk, koloni sayımı (kob/ml) %E₂₄: emülsifikasyon aktivitesi, oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm))

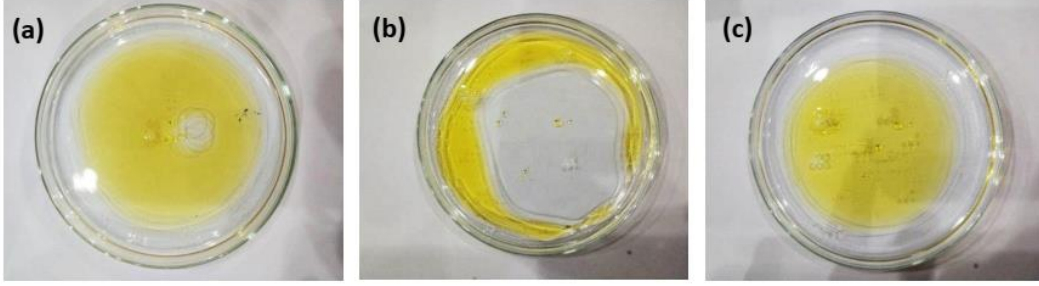
Sıcaklık (°C)	Karbon Kaynağı							
	Glikoz + Soya yağı				Soya yağı			
	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)
25	1.6821	3,1×10 ⁷	%17	20 mm	1.8301	2,7×10 ⁷	%17	20 mm
27	1.8338	8,1×10 ⁷	%20	15 mm	1.8351	3,0×10 ⁷	%10	10 mm
28	1.8244	7,3×10 ⁷	%10	8 mm	1.7408	2,4×10 ⁷	%10	8 mm
30	1.0221	9,5×10 ⁶	%7	1 mm	1.3617	8,4×10 ⁶	%8	5 mm



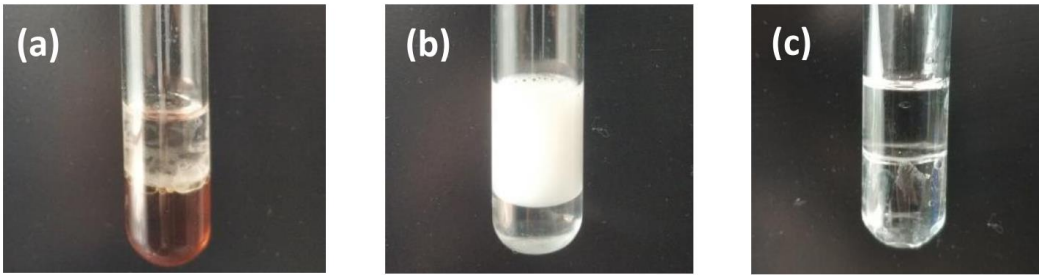
Şekil 4.6 Biyosürfaktan üretiminde sıcaklık parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD600nm), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E24) sonuçları (koloni sayımı log₁₀ olarak hesaplanmıştır)

4.2.3 pH

Biyosüpfaktan üretimi, 4-9 arasında farklı pH aralıklarında, önceki adımlarda belirlenen parametrelere uygun olarak, glikoz-soya yağında 27°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8’de verilmiştir ve en iyi biyosüpfaktan üretimin sonuçları Şekil 4.7a ve 4.7b’de gösterilmiştir. En iyi biyosüpfaktan üretiminin gerçekleştiği pH aralığı, %23 emülsifikasyon aktivitesi ve 13 mm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçlarıyla 7 olarak belirlenmiştir.



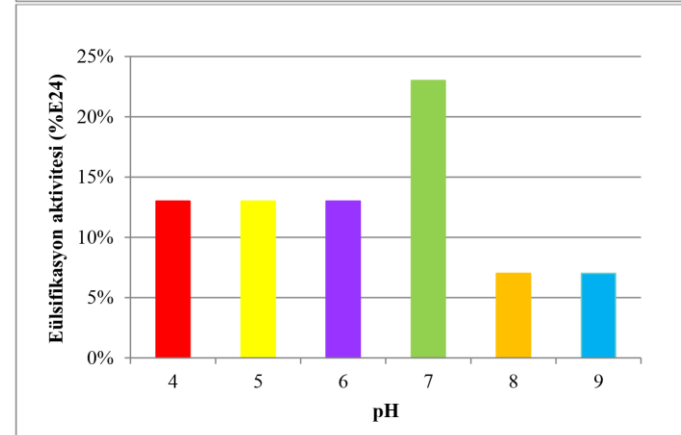
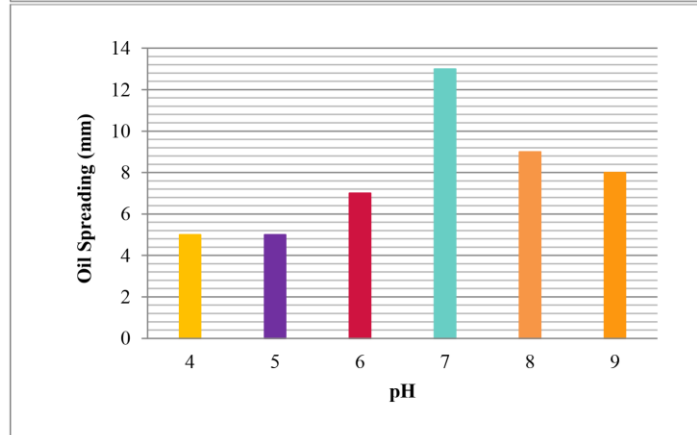
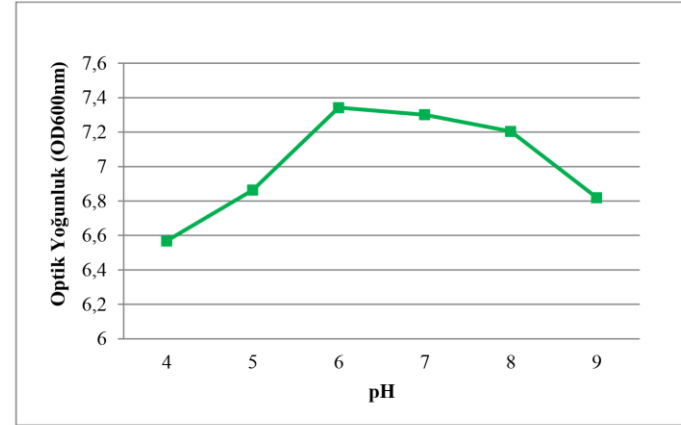
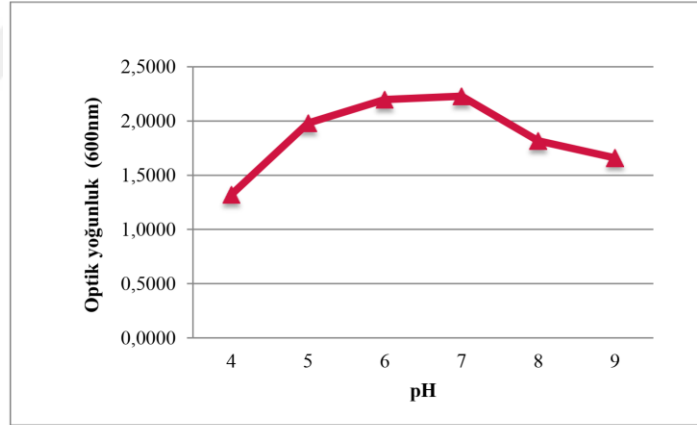
Şekil 4.7a pH optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları (a) biyosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su



Şekil 4.7b pH optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları (a) biyosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su

Çizelge 4.3 Biosümfaktan üretiminde pH parametresinin optimizasyonu (OD₆₀₀: optik yoğunluk, koloni sayımı (kob/ml) %E₂₄: emülsifikasyon aktivitesi, oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm))

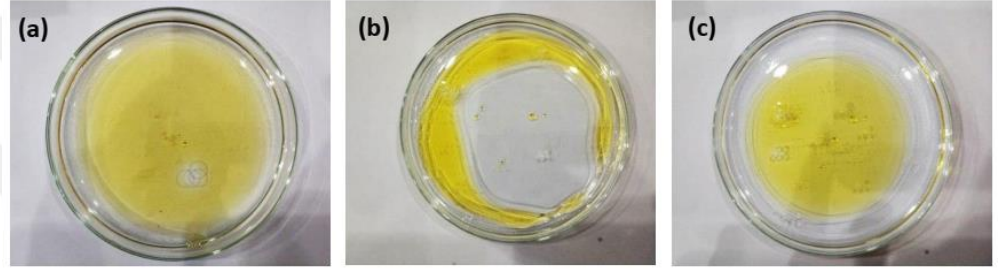
pH değeri	Karbon Kaynağı			
	Glikoz +Soya yağı			
	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)
4	1.3207	3,7×10 ⁶	%13	5 mm
5	1.9806	7,3×10 ⁶	%13	5 mm
6	2.1984	2,2×10 ⁷	%13	7 mm
7	2.2297	2,0×10 ⁷	%23	13 mm
8	1.8178	1,6×10 ⁷	%7	9 mm
9	1.6598	6,6×10 ⁶	%7	8 mm



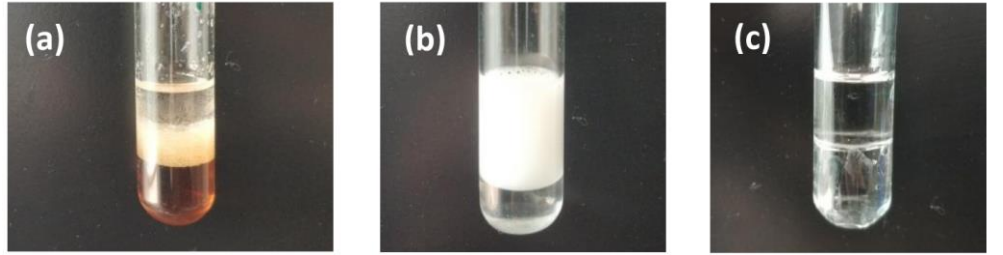
Şekil 4.8 Biosürfaktan üretiminde pH parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD_{600nm}), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E₂₄) sonuçları (koloni sayımı log₁₀ olarak hesaplanmıştır)

4.2.4 İnokülasyon miktarı

Önceki optimizasyon adımlarında belirlenen parametrelerle birlikte farklı inokülüm miktarlarının (%2, 4, 6, 8 ve 10) biyosüpfaktan üretimindeki etkisi incelenmiştir. İnokülasyon miktarının *Y. lipolytica*'dan biyosüpfaktan üretiminin üzerindeki etkisi Çizelge 4.4 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. En iyi biyosüpfaktan üretiminin gözlemlendiği %27 emülsifikasyon aktivitesi ve 10 mm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları ile %4 inokülüm miktarı olup, sonuçları Şekil 4.9a ve Şekil 4.9b'de gösterilmiştir.



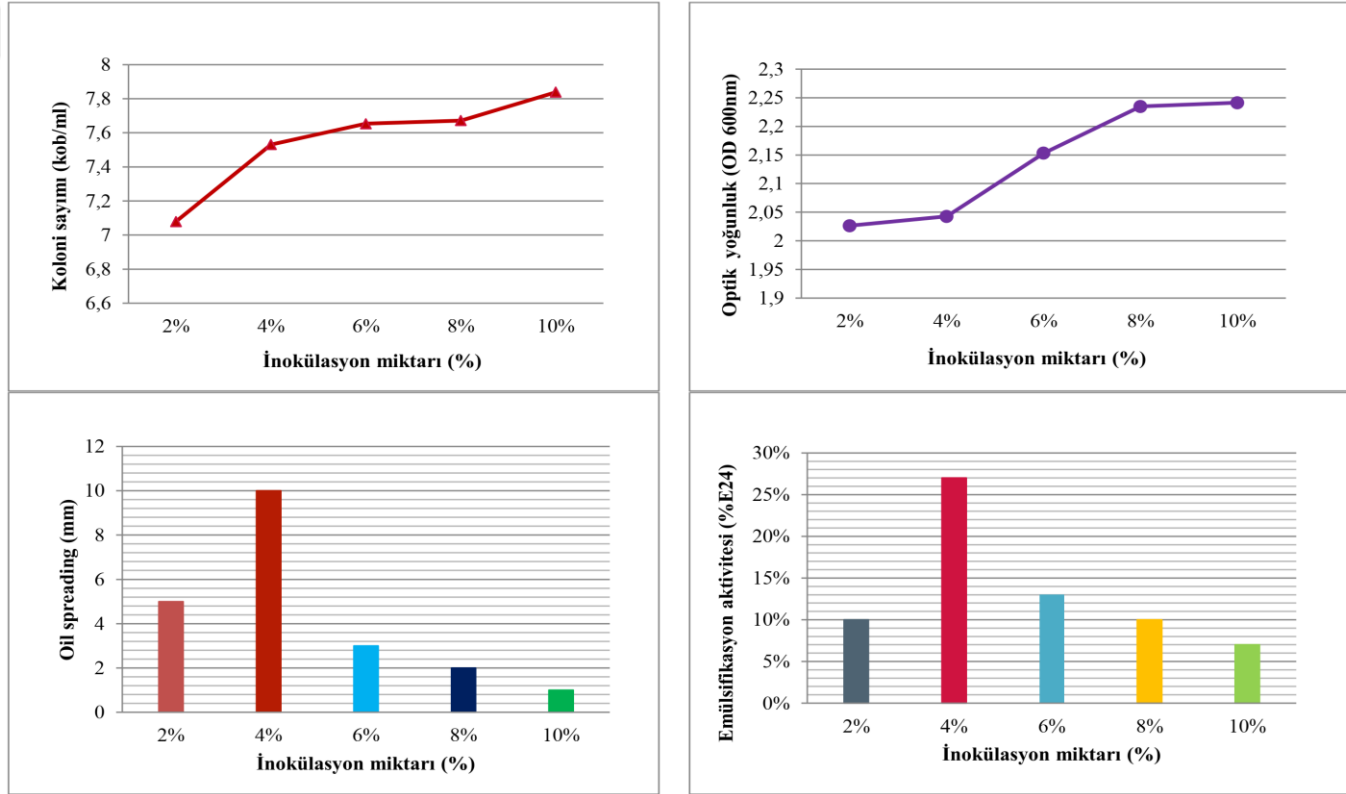
Şekil 4.9a İnokülasyon miktarı optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları (a) biyosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su



Şekil 4.9b İnokülasyon miktarı optimizasyonunda biyosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E_{24}) sonuçları (a) biyosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su

Çizelge 4.4 Biyosüpfaktan üretiminde inokülasyon miktarı parametresinin optimizasyonu (OD₆₀₀: optik yoğunluk, koloni sayımı (kob/ml) %E₂₄: emülsifikasyon aktivitesi, oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm))

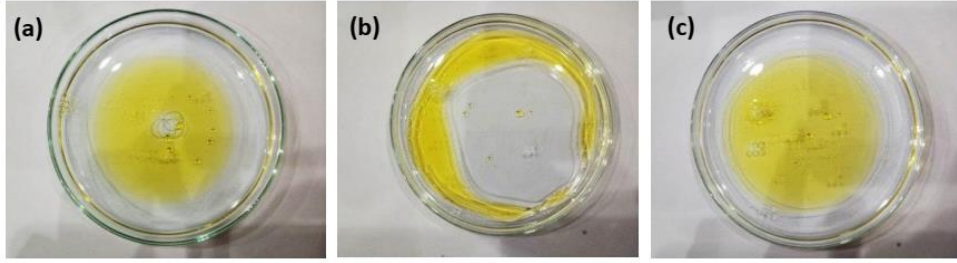
İnokülasyon miktarı (%)	Karbon Kaynağı			
	Glikoz +Soya yağı			
	OD _{600nm} (10 ⁰)	Canlı sayım	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)
2	2.0265	1,2×10 ⁷	%10	5 mm
4	2.0426	3,4×10 ⁷	%27	10 mm
6	2.1533	4,5×10 ⁷	%13	3 mm
8	2.2349	4,7×10 ⁷	%10	2 mm
10	2.2414	6,9×10 ⁷	%7	1 mm



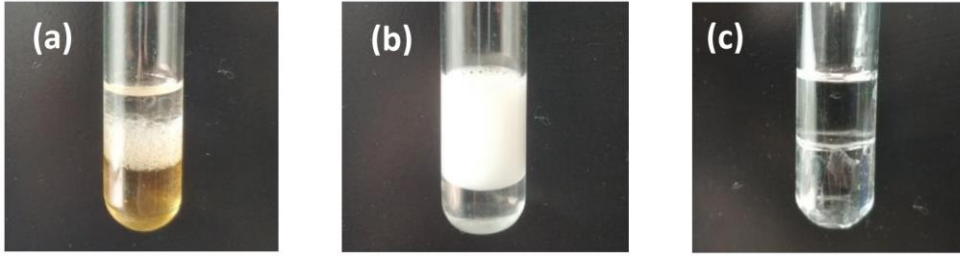
Şekil 4.10 Biyosüpfaktan üretiminde inokülasyon miktarı parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk (OD_{600nm}), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi (%E₂₄) sonuçları (koloni sayımı log₁₀ olarak hesaplanmıştır)

4.2.5 Tuz konsantrasyonu

Üretilen biosüpfaktanın optimizasyonun son adım olan %0-10 arasında geniş tuz konsantrasyon aralığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tuz konsantrasyonunun *Y. lipolytica* tarafından üretilen biosüpfaktanın üretiminde etkili bir parametre olmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.12’de gösterilmektedir. Bu doğrultuda optimizasyonun en başından beri kullanılan tuz konsantrasyonu olan %0,01 (0,1 g/L) ile devam edilmiştir (Şekil 4.11a ve Şekil 4.11b).



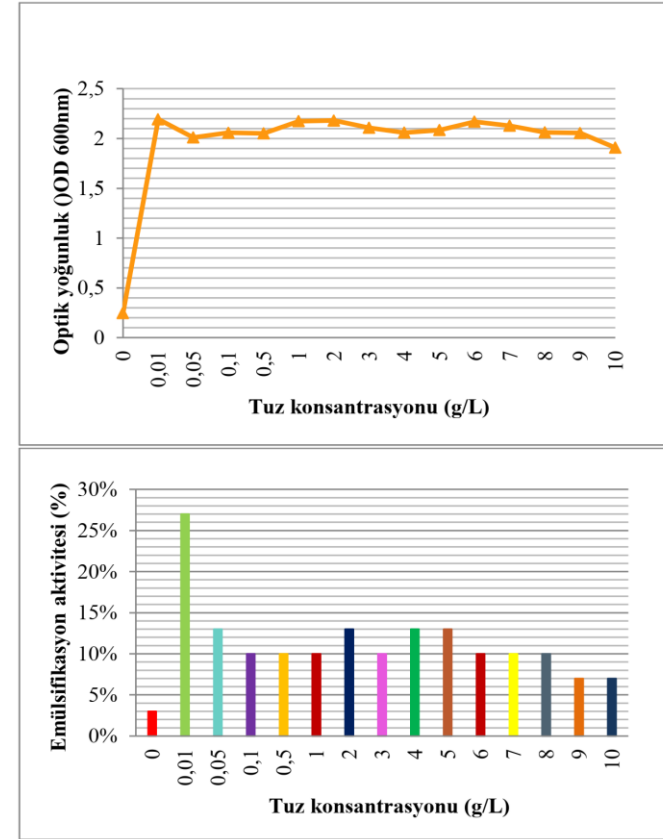
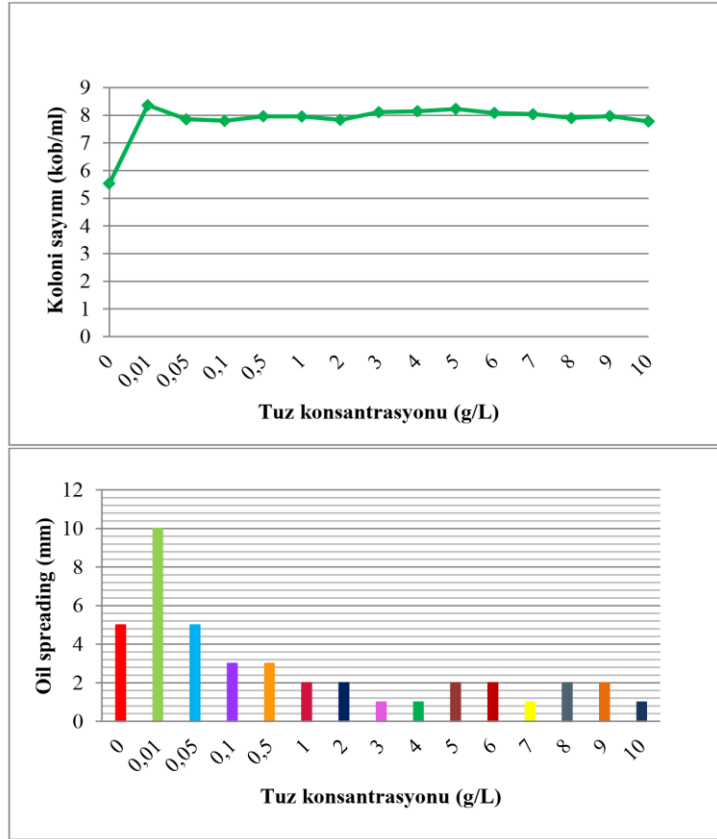
Şekil 4.11a Tuz konsantrasyonu optimizasyonunda biosüpfaktan üretiminin oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları (a) biosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su



Şekil 4.11b Tuz konsantrasyonu optimizasyonunda biosüpfaktan üretiminin emülsifikasyon aktivitesinin (E24) sonuçları (a) biosüpfaktan içeren süpernatant (b) SDS (c) su

Çizelge 4.5 Biyosümfaktan üretiminin tuz konsantrasyonuna göre değişimi (OD₆₀₀: optik yoğunluk, koloni sayımı (kob/ml) %E₂₄: emülsifikasyon aktivitesi, oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm))

Tuz konsantrasyonu (%)	Karbon Kaynağı			
	Glikoz + Soya yağı			
	OD _{600nm} (10 ⁰)	Koloni sayımı	%E ₂₄	Oil spreading (yağ yer değiştirme)
0	0.2475	3,4×10 ⁵	%3	5 mm
0,01	2.1942	2,3×10 ⁸	%27	10 mm
0,05	2.0108	7,2×10 ⁷	%13	5 mm
0,1	2.0580	6,3×10 ⁷	%10	3 mm
0,5	2.0518	9,2×10 ⁷	%10	3 mm
1	2.1747	9,1×10 ⁷	%10	2 mm
2	2.1804	6,8×10 ⁷	%13	2 mm
3	2.1084	1,3×10 ⁸	%10	1 mm
4	2.0596	1,4×10 ⁸	%13	1 mm
5	2.0850	1,7×10 ⁸	%13	2 mm
6	2.1701	1,2×10 ⁸	%10	2 mm
7	2.1285	1,1×10 ⁸	%10	1 mm
8	2.0623	8,0×10 ⁷	%10	2 mm
9	2.0554	9,3×10 ⁷	%7	2 mm
10	1.9086	6,0×10 ⁷	%7	1 mm



Şekil 4.12 Biyosürfaktan üretiminde tuz konsantrasyonu parametresinin optimizasyon sonuçlarının koloni sayımı (kob/ml), optik yoğunluk ($OD_{600\text{ nm}}$), oil spreading (yağ yer değiştirme) (mm) ve emülsifikasyon aktivite testi ($\%E_{24}$) sonuçları (koloni sayımı \log_{10} olarak hesaplanmıştır)

4.3 Biosurfaktanın Ekstraksiyonu

Üretilen biosurfaktan 4°C’de 2000 rpm’de 25 dakika santrifüj yapıp pellet uzaklaştırılmıştır ve elde edilen süpernatant 0,22 µm çapındaki filtreden geçirilmiştir. 1 L organik fazdan yaklaşık olarak 0,08 g kuru biosurfaktan elde edilmiştir. Elde edilen biosurfaktan farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25 ve 50 mg/ml) hazırlanarak biyofilm denemeleri için hazırlanmıştır.



Şekil 4.13 Ekstraksiyon, evaporasyon işlemleri ve elde edilen ham biosurfaktan görüntüsü

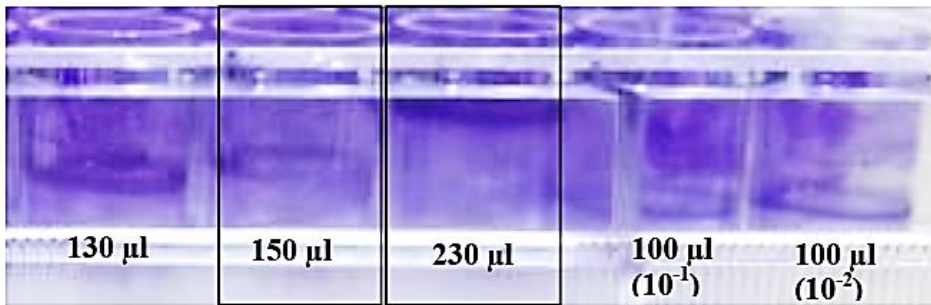
4.4 Biyofilm Çalışmaları

Gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde elde edilen kısmi saflaştırılan biyosümfaktan, FTS içerisinde çözündürülmüş ve farklı konsantrasyonlarda (6,25, 12,5, 25 ve 50 mg/ml) hazırlanarak biyofilm denemeleri için kullanılır hale getirilmiştir.

Salmonella typhimurium, biyofilm oluşturması için mikroplakaya aktarılmadan önce 10 ml TSB içerisinde 37°C’de 18 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır ve OD_{600 nm}’de (optik yoğunluk) 1,1 ile 1,3 arası olması beklenmiştir.

4.4.1 *Salmonella* biyofilminin uygun koşullarının sağlanması

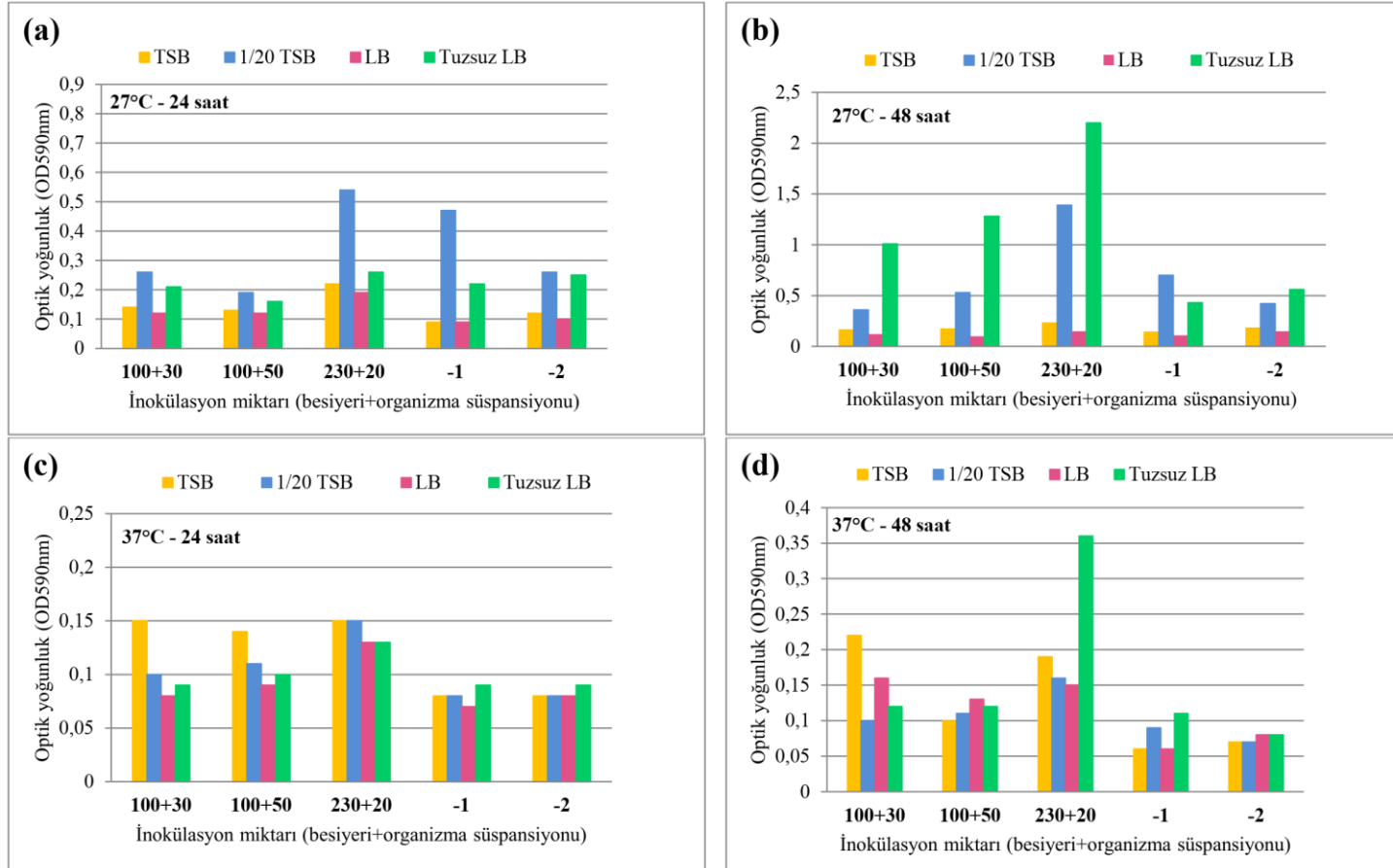
Farklı sıcaklık (27 ve 37°C), besiyeri (TSB, seyreltilmiş TSB, LB ve NaCl’siz LB), inkübasyon süresi (24 ve 48 saat) ve inokülasyon miktarlarına göre *S. typhimurium* biyofilm oluşumunun uygun koşulları sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.15’de verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda en iyi inkübasyon süresi 48 saat, sıcaklık 27°C, besiyeri LB-tuzsuz, inokülasyon miktarı 100 µl besiyeri içerisine 50 µl organizma süspansiyonu, ayrıca 230 µl besiyeri içerisine 20 µl organizma süspansiyonu olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçların görüntüsü Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14 *S. typhimurium* biyofilminin tuzsuz LB ortamında 27 °C’de 48 saat inkübasyon sonrasında mikrolakateki görüntüleri

Çizelge 4.6 *Salmonella typhimurium* biyofilminin uygun koşullarının sağlanması için farklı parametreler kullanılarak elde edilen sonuçlar (100+30 µl: 100 µl besiyeri + 30 µl organizma süspansiyonu; 100+50 µl: 100 µl besiyeri + 50 µl organizma süspansiyonu; 250 µl besiyeri + 20 µl organizma süspansiyonu; 10⁻¹ ve 10⁻² seyreltmeler)

Besiyeri	Sıcaklık	İnkübasyon süresi	İnokülasyon miktarı				
			100+30 µl	100+50 µl	230+20 µl	10 ⁻¹	10 ⁻²
TSB	27°C	24 saat	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,003	0,12 ± 0,02
		48 saat	0,16 ± 0,007	0,17 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,14 ± 0,07	0,18 ± 0,1
	37°C	24 saat	0,15 ± 0,005	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,08 ± 0,006	0,08 ± 0,009
		48 saat	0,22 ± 0,02	0,10 ± 0,003	0,19 ± 0,04	0,06 ± 0,003	0,07 ± 0,001
Seyreltilmiş TSB (1/20 TSB)	27°C	24 saat	0,26 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,26 ± 0,03
		48 saat	0,36 ± 0,06	0,53 ± 0,03	1,39 ± 0,1	0,7 ± 0,03	0,42 ± 0,03
	37°C	24 saat	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,001	0,15 ± 0,009	0,08 ± 0,002	0,08 ± 0,003
		48 saat	0,10 ± 0,009	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,005	0,09 ± 0,007	0,07 ± 0,009
LB	27°C	24 saat	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,002	0,10 ± 0,002
		48 saat	0,12 ± 0,004	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,004	0,15 ± 0,01
	37°C	24 saat	0,08 ± 0,004	0,09 ± 0,1	0,13 ± 0,007	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,0007
		48 saat	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,06 ± 0,005	0,08 ± 0,006
Tuzsuz LB	27°C	24 saat	0,21 ± 0,02	0,16 ± 0,009	0,26 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,02
		48 saat	1,01 ± 0,09	1,28 ± 0,09	2,20 ± 0,1	0,43 ± 0,03	0,56 ± 0,04
	37°C	24 saat	0,09 ± 0,009	0,10 ± 0,009	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01
		48 saat	0,12 ± 0,007	0,12 ± 0,004	0,36 ± 0,03	0,11 ± 0,002	0,08 ± 0,005



Şekil 4.15 Farklı parametreler kullanılarak *Salmonella typhimurium* biyofilminin optimizasyonu (a. 27°C'de 24 saat; b. 27°C'de 48 saat; c. 37°C'de 24 saat; 37°C'de 48 saat inkübasyon)

4.4.2 Biyosüpfaktan içeren süpernatantının biyofilm üzerindeki etkisi

Biyosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* tarafından oluşturulan biyofilme karşı etkisi araştırılmıştır. Literatürde karşılaşılan iki farklı uygulama da kullanılmıştır; ilki toplam besiyeri ve organizma süspansiyonu üzerine biyosüpfaktan eklenmesi (100 µl besiyeri+50 µl organizma süspansiyonu+10-50 µl biyosüpfaktan içeren süpernatant), ikincisi ise biyosüpfaktan eklenerek toplam hacime (50-90 µl besiyeri+50 µl organizma süspansiyonu+10-50 µl biyosüpfaktan içeren süpernatant) ulaşılmasıdır. En uygun biyofilm oluşum koşullarında (48 saat, 27°C, LB-tuzsuz ortamı) uygulama yapılmış ve bu koşullarda farklı miktarlardaki (10, 20, 30, 40 ve 50 µl) biyosüpfaktan süpernatantının etkisi araştırılmıştır. Yapılan denemelerin sonuçları Çizelge 4.7a ve 4.7b’de ayrıca Şekil 4.16a, 4.16b ve 4.16c’de gösterilmiştir. En iyi sonuç, biyosüpfaktan eklenerek toplam hacime ulaşıldığında %63 inhibisyon oranı ile 50 µl biyosüpfaktan eklendiğinde görülmüştür.

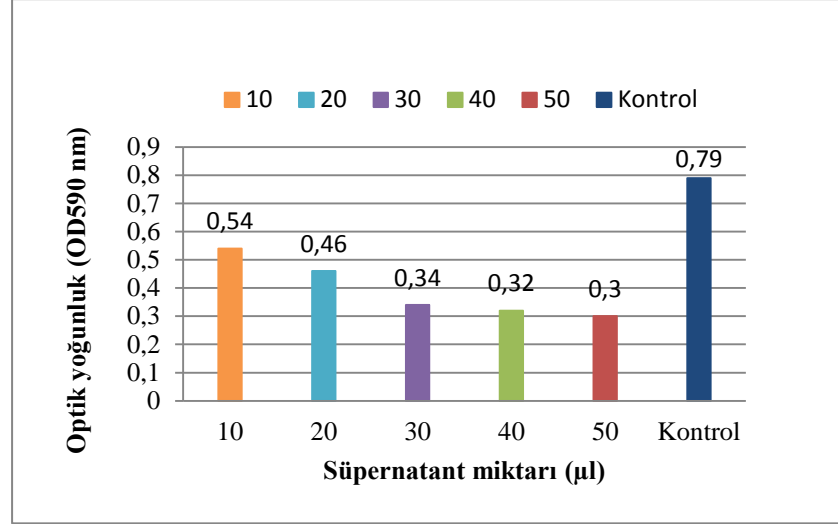
Çizelge 4.7a Farklı miktarlardaki biyosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları ve inhibisyon yüzdesi (50-90µL + 50µL + 10-50 µL)

Süpernatant miktarları

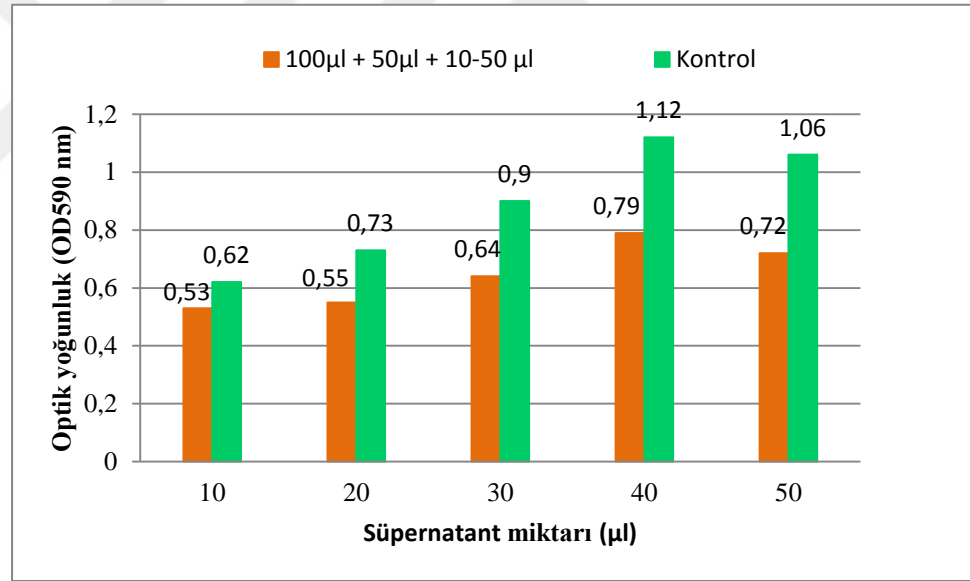
	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl	Kontrol
OD_{590 nm} (50-90µl + 50µl + 10-50 µl)	0,54±0,04	0,46±0,06	0,34±0,04	0,32±0,05	0,30±0,04	0,79±0,05
İnhibisyon yüzdesi	34%	42%	58%	60%	63%	-

Çizelge 4.7b Farklı miktarlardaki biosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları ve inhibisyon yüzdesi (100µL + 50µL + 10-50 µL)

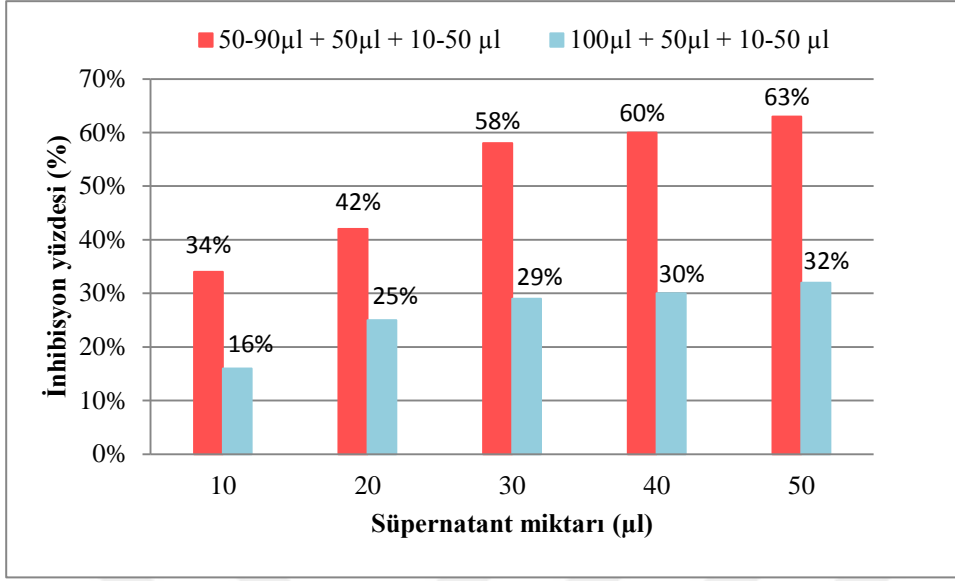
Süpernatant miktarları					
	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl
OD_{590 nm} (100 µl + 50µl + 10-50 µl)	0,53±0,04	0,55±0,03	0,64±0,15	0,79±0,10	0,72±0,17
Kontrol	0,62±0,02	0,73±0,04	0,9±0,02	1,2±0,26	1,06±0,05
İnhibisyon yüzdesi	%16	%25	%29	%30	%32



Şekil 4.16a Farklı miktarlardaki biyosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları (50-90µl besiyeri + 50µl organizma süspansiyonu+ 10-50 µl biyosüpfaktan içeren süpernatant)



Şekil 4.16b Farklı miktarlardaki biyosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm’de ölçülen optik yoğunlukları (100 µl besiyeri + 50µl organizma süspansiyonu+ 10-50 µl biyosüpfaktan içeren süpernatant)



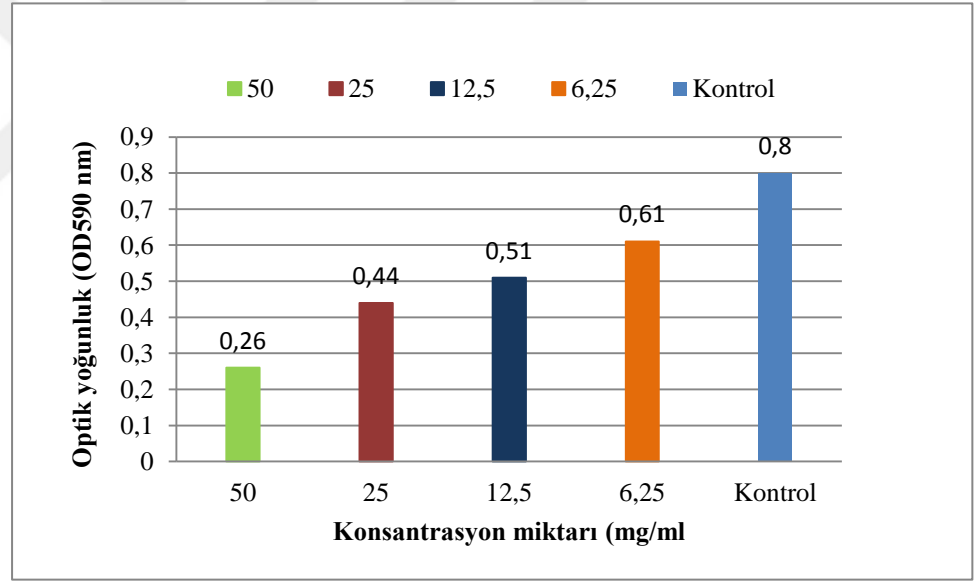
Şekil 4.16c Farklı miktarlardaki biosüpfaktan içeren süpernatantın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin inhibisyon yüzdeleri

4.3.3 Kısmi saflaştırılan biosüpfaktanın biyofilm üzerinde etkisi

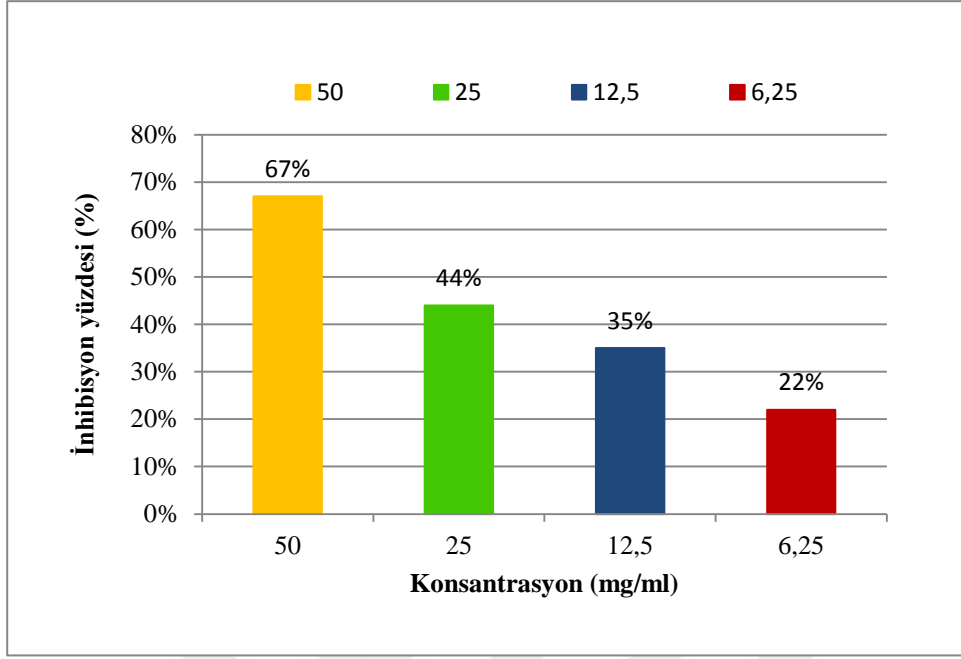
Kısmi saflaştırılan biosüpfaktan FTS içerisinde 6,25, 12,5, 25 ve 50 mg/ml konsantrasyonlarında ayarlanmıştır. 90 µl besiyeri içerisine eklenen 50 µl organizma ve 10 µl kısmi saflaştırılan biosüpfaktan konsantrasyonları 27°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kristal viyole yöntemi uygulanmış ve mikropilaka okuyucuda optik yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, en iyi biyofilm inhibisyon yüzdesi 50 mg/ml konsantrasyonundaki kısmi saflaştırılan biosüpfaktan ile elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.8'de, ayrıca Şekil 4.17a ve 4.17b'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biyosürafaktanın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisi

	Konsantrasyonlar				Kontrol
	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	6.25 mg/ml	100µl+50µl
OD_{590 nm}	0,26±0,01	0,44±0,01	0,51±0,004	0,61±0,10	0,8±0,03
İnhibisyon yüzdesi (%)	%67	%44	%35	%22	



Şekil 4.17a Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biyosürafaktanın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin 590 nm'de optik yoğunluğu (OD_{590nm})



Şekil 4.17b Farklı konsantrasyonlardaki kısmi saflaştırılan biosürfaktanın *S. typhimurium* biyofilmi üzerindeki anti-adhesiv etkisinin inhibisyon yüzdesi

5. TARTIŞMA

Biyosümfaktanlar yüzey ve arayüzey gerilimini azaltan, mikroorganizmalar tarafından üretilen heterojen bir amfifilik bileşik grubudur. Son yıllarda, mikroorganizmalardan elde edilen biyosümfaktanların biyosentezi, düşük toksisite, ekolojik kabul edilebilirliği, biyolojik olarak parçalanabilirliği, yenilenebilir ve daha ucuz substratların kullanımı, geniş sıcaklık ve pH aralığında etkinliği, yüksek tuzlulukta kararlılığı ve çeşitli alanlarda geniş uygulama yelpazesi nedeniyle oldukça dikkat çekicidir. Literatürde biyosümfaktanların çoğunluğu, bakteriyal kaynaklı olarak bildirilmiştir ve biyosümfaktan üreten cins olarak en çok *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. görülmektedir. Ancak, organizmaların patojenik özellikleri dolayısıyla bu bileşenlerin uygulaması kısıtlanmıştır ve gıda endüstrisinde kullanıma uygun bulunmamıştır. *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae* gibi türler GRAS statüsüne sahip organizmalardır. Bu organizmalar toksik ya da patojenik değildir bu yüzden, ilaç ve yiyecek endüstrisindeki uygulamalarda kullanımlarına izin verilmektedir (Barth et al., 1997 ; Amaral et al., 2010; Franzetti, 2010).

Taksonomide kullanılan geleneksel yöntemlerin, mikroorganizmaların morfoloji, fizyoloji ve üreme gibi fenotipik özelliklerini belirlemeye dayandığı bilinmektedir. Moleküler taksonomi alanında yapılan ilk çalışmaların ardından tanımlamada; ribozomal RNA (rRNA) veya tamamlayıcı molekülü olan ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli tekniklerin geliştirildikleri ve günümüzde de sıklıkla kullanıldıkları bilinmektedir (Martini, 2003; Yalçın vd., 2010). rDNA gen kümesinin, hem çekirdek, hem de mitokondride bulunduğu ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana geldiği bilinmektedir. Ribosomal DNA'nın avantajı, bütün yaşayan organizmalarda bulunması ve çoklu kopyalar halinde ortak bir evrimsel orijine sahip olmasıdır. Yüksek derecede korunmuş olan rDNA, bir türe ait olan bütün strainler arasında hem farklılıkları göstermek hem de daha yüksek taksonları betimlemek için kullanılmaktadır (Kurtzman, 2006). Hem taksonomik amaç hem de filogenetik ilişkileri oluşturmak için rDNA bölgesini hedef alan yöntemler tercih edilmektedir. Bu bölgelerden biri ribozomun büyük alt biriminin yaklaşık

600 nükleotid uzunluğunda olan D1/D2 domainidir. Kurtzman and Robnett (1995, 1998 ve 2003), bütün bilinen askomisetik mayaların D1/D2 domaininin sekansını saptamışlar ve neredeyse bütün askomisetik mayaların ayrımı için bu domainin yeterli olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Sadece birkaç çok yakın ilişki içerisinde olan türün ayrımında D1/D2 domainin yeterli olmadığını belirtilmiştir ancak %1'den daha fazla sekans farklılığı gösteren strainlerin farklı türler olabileceğini ortaya koymuşlardır. Bu tez çalışmasında petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş topraktan önceden izolasyonu yapılmış fakat tanısı yapılmamış olan organizmaların oil spreading (yağ yer değiştirme) ve emülsifikasyon aktivitelerine bakılarak biyosüpfaktan üretip üretmediği belirlenmiştir ve en iyi sonuç aldığımız izolat seçilmiştir. Elde edilen 26S rDNA-PCR sekans sonuçlarına göre PCR ürününün boyutu 700 bp arasında olduğu, NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilerek izolatın genus ve tür düzeylerinde tanılanması yapılmıştır ve TEM BD 35 numaralı suş %99 oranında *Y. lipolytica*'ya benzerlik göstermiştir.

Biyosüpfaktanlar her ne kadar biyoremediyasyon gibi işlemlerde ümit verici kullanımlara sahip olsalar da, yüksek işlem ve hammadde maliyetleri ile düşük üretim verimi nedeniyle büyük ölçekte üretimlerini gerçekleştirmek oldukça zordur (Reis et al., 2013). Bundan dolayı bu tez çalışmasında biyosüpfaktan üretiminin optimizasyonu yapılarak düşük maliyette yüksek verimde üretim gerçekleştirmek amaçlanmıştır. Bu yüzden de farklı koşullar sağlanarak daha verimli biyosüpfaktan üretimi gerçekleştirilmiştir.

Biyosüpfaktanlara olan ilgi, biyosüpfaktan üreten türlerin taranması ve çok sayıda yöntemin geliştirilmesine neden olmuştur. Her yöntemin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır, bu yüzden tarama yaparken farklı yöntemlerin kombinasyonunu kullanmak en doğrusudur. Biyosüpfaktan üreticisi *Y. lipolytica* TEMBD35 izolatının biyosüpfaktan üretim optimizasyonu için karbon kaynağı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, inokülüm miktarı ve tuz konsantrasyonu parametreleri en iyi verim elde edebilmek için incelenmiştir. Bu parametreler incelenirken hücre büyümesi optik yoğunluk ve koloni sayımı ile belirlenirken,

biyosümfaktan verimi oil spreading (yağ yer değiştirme) ve emülsifikasyon aktivitesi ile ölçülmüştür.

Lang and Philp (1998)'e göre, hidrofobik substrat kullanıldığında, üretilen biyosümfaktanın sadece küçük bir kısmı hücre dışına salınmaktadır. Bu durum, biyosümfaktanların *Y. lipolytica*'nın hücre duvarı ile olan ilişkisine bağlanabilir. Ciapina et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Rhodococcus erythropolis* tarafından üretilen biyosümfaktanların hücre duvar yapısıyla bağlantılı olduğunun gösterilmesi bu ilişkiyi desteklemektedir. Fizyolojik olarak, biyosümfaktan üretimi, hidrofobik substratların asimile edici mekanizması ile ilişkilidir. Bu mekanizma, emülsifikasyonun az olduğu veya hiç olmadığı kadar büyük yağ damlacıkları bulunan hücrelerin doğrudan temasından veya emülsiyonlaştırma ile sonuçlanan ince yağ damlacıklarının temasından meydana gelmektedir. İlk olarak, biyosümfaktan dış hücre yüzeyinde tutulur, hidrofobik bileşiklerin hücreye bağlanmasını ve daha sonra taşınmasını kolaylaştırır. İkinci durumda, kültür ortamında serbest bırakılan biyosümfaktan, substratları psödosolübilize eden (yalancı olarak çözüdüren) ve dolayısıyla hücreye uygunluğu artıran bir hidrokarbon-sümfaktan kompleksi oluşturmaktadır (Beal and Betts, 2000). Bazı raporlar ise, bitkisel yağların, *P. aeruginosa* tarafından biyosümfaktan üretiminde, glikoz, gliserol ve hidrokarbonlara kıyasla daha verimli substratlar olduğunu göstermiştir (Maier and Chavez, 2000; Mata-Sandoval et al., 2001).

Fontes et al. (2010), yaptıkları çalışmada *Y. lipolytica*'nın biyosümfaktan üretimini optimize etmişlerdir. Gliserol, zeytin yağı, hegzadekan ve glikozu karbon kaynağı olarak denemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda *Y. lipolytica* hidrofobik substrat (zeytin yağı ve hegzadekan) içerisinde kültüre edildiğinde biyosümfaktan üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Sudha et al. (2010), en fazla soforolipid verimi için çeşitli kültürel koşullarla karşılaştırıldığında optimum kuluçka süresinin 7 gün olduğunu gözlemlemiştir. Mahdy et al. (2012), elde ettikleri sonuçlarda 8 günlük inkübasyon süresinin test edilmiş üç *Candida* genusu üyesi tarafından biyosümfaktan üretmek için anlamlı ve optimum olduğunu göstermiştir. Maksimum biyosümfaktan üretimi, sırasıyla, *C. famata* No. 11, *C. albicans* No. 13 ve *C. albicans* No. 25 için 38, 41 ve 36 mm oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçları ile göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada, hidrofilik,

hidrofobik ve hidrofilik-hidrofobik karbon kaynağı kombinasyonu olarak sırasıyla glikoz, soya yağı ve glikoz-soya yağı kombinasyonu kullanılmış, 4-8 gün arasındaki inkübasyon sürelerinin denemeleri aynı anda gerçekleştirilmiştir ve biyosüpfaktan üretimi oil spreading (yağ yer değiştirme) testi ve emülsifikasyon aktivitesi ile desteklenmiştir. Oil spreading (yağ yer değiştirme) testinde 20 mm zon çapı ve %17 inkübasyon süresi olarak en iyi sonuç 7. günde elde edilmiş, ayrıca 7. gün inkübasyonunda karbon kaynağı olarak glikoz-soya yağı kombinasyonu ve soya yağında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sekonder metabolitlerin üretimi ve hücre büyümesi gibi biyolojik aktiviteler üzerinde sıcaklık ve pH önemli rol oynayan iki çevresel faktördür. Sıcaklık ve pH'daki değişkenliğin, biyosüpfaktan üretiminde kalitatif ve kantitatif değişiklikler meydana getirmesi muhtemeldir (Yakimov et al., 1995; Adamczak and Bednarski, 2000). Maussa et al. (2014), yaptıkları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* TMN tarafından üretilen biyosüpfaktanın 4-8 arasında pH etkisini ve 25-45°C arasında sıcaklık etkisini incelemişler ve en yüksek üretimi pH 7'de 37°C'de elde etmişlerdir. Qazi et al. (2014), *Fusarium* sp. BS-8'den elde ettikleri biyosüpfaktanın üretimini optimize etmişlerdir ve biyosüpfaktan verimini drop collapse (damla düşürme deneyi), oil spreading (yağ yer değiştirme) ve emülsifikasyon aktivite testi ile desteklemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, 3-11 arasında pH etkisini ve 25-45°C arasında sıcaklık etkisini incelemişler ve en yüksek biyosüpfaktan üretimini pH 7'de 30°C'de elde etmişlerdir. Hu et al. (2015), yaptıkları çalışmada *Vibrio* sp. 3B-2 tarafından ürettikleri biyosüpfaktanın optimizasyonunu yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda biyosüpfaktan üretiminin sıcaklık 25°C'den 28°C'e yükselirken arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, optimum üretimi 28°C'de elde etmişlerdir. Mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda büyüme ve diğer önemli fizyolojik süreçlerin yalnızca gerekli olan az miktarda protein sentezlediği öne sürülmüştür (Gawande and Kamat, 1999). Jagtap et al. (2010), pH 6, 8 ve 9'da az miktarda aktivite olmasına rağmen maksimum biyolojik emülsiyonlaştırıcı üretiminin pH 7'de olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, verilerimiz, pH 7'nin, biyosüpfaktan üretimi için en uygun olduğunu göstermektedir.

Mahdy et al. (2012), yaptıkları çalışmada *Candida famata* No.11, *Candida albicans* No.13 ve *Candida albicans* No.15'in ürettiği biyosüfaktanı optimize etmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre pH 7'de oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçlarını sırasıyla 35, 42 ve 32 olarak bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada 4-9 pH aralığı seçilmiş ve biyosüfaktan üretimindeki etkisi test edilmiştir. Oil spreading (yağ yer değiştirme) testinde 13 mm zon çapı ve %23 emülsifikasyon aktivitesi ile en iyi biyosüfaktan üretimi pH 7'de elde edilmiştir. Ayrıca, optimum sıcaklığın çoğunlukla 20°C olduğunu göstermiştir. *C. famata* No.11 ve *C. albicans* No.13, sırasıyla 28 ve 30 mm oil spreading (yağ yer değiştirme) ve 33.8 ve 28.2 mN/m yüzey gerilimi göstermiştir. Ayrıca oil spreading (yağ yer değiştirme) ters orantılı olduğu ve doğrudan sıcaklık ile orantılı yüzey gerilimi olduğu da gözlemlenmiştir. İnkübasyon sıcaklıkları ile yağ yer değiştirmesinin her biri ve yüzey gerilimi arasında oldukça anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada Sudha et al. (2010), *C. tropicalis*'ten sophorolipid üretimi için 30°C sıcaklığının optimum olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, Jagtap et al. (2010), biyolojik emülsiyonlaştırıcı üretimi için optimum sıcaklığın 37°C olduğunu bulmuştur.

Bu çalışmada farklı sıcaklıkların biyosüfaktan üretimine etkisi incelenmiştir. 25, 27, 28 ve 30°C sıcaklıklarında üretim gerçekleşmiştir. Bir önceki adımda iki karbon kaynağı seçilmiş ancak bu adımda 27°C'de en iyi biyosüfaktan üretimi oil spreading (yağ yer değiştirme) testinde 15 mm zon çapı ile %20 emülsifikasyon aktivitesi sonuçlarıyla en uygun sıcaklık 27°C'de ve glikoz-soya yağı kombinasyonu olarak belirlenmiştir. 25°C'de glikoz-soya ve soya arasında gözle görülür bir fark bulunamamıştır ancak sıcaklık 27°C'ye yükseltilip substrat olarak glikoz-soya kullanıldığında emülsifikasyon aktivitesinde soyaya göre artış gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda sıcaklık değişimlerinin farklı substratlar içerisinde (hidrofilik, hidrofobik) farklı biyosüfaktan salınım miktarı gösterdiği belirlenmiştir.

İnokülasyon miktarı, gecikme (lag) fazının süresini, spesifik büyüme oranını, biyokütle verimini ve son ürünün miktarını etkilemiş olabilir. Çünkü biyosüfaktanlar değerli ürünlerdir ve deney koşullarından gözle görülür biçimde etkilenirler, bu nedenle ürünün elde edilmesi için en uygun zamanın belirlenmesi

ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Qazi et al., 2014). Brasileiro et al. (2015) yaptıkları çalışmada, *C. guilliermondii*'nin ürettiği biyosüpfaktanı, %4 inokülasyon miktarı ve 132 saat inkübasyon süresi ile optimize etmişlerdir. Çalışmamızda farklı inokülasyon miktarlarının biyosüpfaktan üretimine etkisi incelenmiştir ve %4 miktarındaki inokülasyon miktarının biyosüpfaktan üretimini arttırdığı oil spreading (yağ yer değiştirme) testindeki 10 mm zon çapı ve %27 emülsifikasyon aktivitesi ile görülmüştür.

Kültür ortamının ozmotik basıncı, ortamdaki NaCl konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde artar (Greenway and Osmond, 1972). Mikroorganizmalar genellikle izotonik çözeltilerde iyi büyür. Hipotonik koşullar altında, çözeltildeki çok sayıda su molekülü, mikrobiyal hücrelere nüfuz eder, bu da şişmeye ve patlamaya yol açar; hipertonic koşullarda, hücreler plazmolize uğrar (Marquis, 1968). Hu et al. (2015) yaptıkları çalışmada, NaCl'nin yokluğunda, *Vibrio* 3B-2 suşunun neredeyse hiç büyümediğini ve biyokütlesinin NaCl bulunan diğer gruplardakinden önemli ölçüde düşük olduğunu göstermişlerdir. Zayıf büyüme, bakteriden düşük bir biyosüpfaktan üretimine yol açmıştır. 30 g/L NaCl konsantrasyonunda, berrak zonun çapını sıfır olarak bulmuşlar ve yüksek tuz konsantrasyonunun, üretilen biyosüpfaktanın yüzey gerilimini olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Mahdy et al. (2012), yaptıkları çalışmada *Candida famata* No.11, *Candida albicans* No.13 ve *Candida albicans* No.15 türlerindeki biyosüpfaktan üretiminde tuz konsantrasyonu parametresini incelemişler ve ürettiği biyosüpfaktanın tuz konsantrasyonu %5'e kadar arttıkça maksimum seviyeye ulaştığını, %10 tuz konsantrasyonunda ise, biyosüpfaktan üretiminin azaldığını göstermişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında, standart MSM içeriğinde bulunan %0,01 (0,1 g/L) tuz konsantrasyonu, en yüksek biyosüpfaktan veriminin elde edildiği konsantrasyondur. %0,01 tuz konsantrasyonunun üzerindeki tuz konsantrasyonlarının biyosüpfaktan üretiminde bir etki göstermediği görülmüştür.

Yarrowia lipolytica TEMBD35 tarafından üretilen biyosüpfaktanın verimi her seferde bir faktöre dayanarak optimize edilmiş ve %4 organizma süspansiyonu eklenerek, glikoz ve soya yağı kullanılarak, 27°C'de pH 7'de ve %0,01 tuz konsantrasyonunda üretim gerçekleştirilmiştir.

Biyofilm oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden biri kültür ortamıdır (Stepanovic et al. 2004). Blana et al. (2017), *S. typhimurium*'un, zengin koşullara kıyasla, besin maddelerinin düşük olduğu koşullar altında biyofilm oluşturma yeteneğinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Birçok çalışmada *Salmonella*'nın adezyon yeteneğinin değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Fakat yine de birçok çalışmada *Salmonella*'nın daha fazla hidrofobik maddeye daha fazla tutunma yetenekleri ve besleyici yünden zayıf ortamda daha fazla biyofilm ürettiği gösterilmiştir (Oliveira et al. 2006). Stepanovic et al. (2004), seyretilmiş TSB (1/20 TSB) besiyerinin, *Salmonella* suşları tarafından biyofilm üretimini teşvik etmede en etkili besiyeri olduğunu gözlemlemişlerdir. Pande et al. (2016), *Salmonella enterica* 37°C'ye kıyasla 22°C'de daha yoğun biyofilmler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Fakat Castelijijn et al. (2012), *S. typhimurium* suşları tarafından üretilen biyofilmlerin 37°C'de 22°C'ye kıyasla daha zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Gerstel and Romling (2001) ve Stepanovic et al. (2003), 37 °C'de zayıf biyofilm üretiminin, oksijen gerilimi ve pH'daki değişikliklerle ilişkili olarak besinlerin hızlı bir şekilde tükenmesinin bir sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, daha yüksek sıcaklıklarda biyofilm oluşumundaki belirgin düşüş, sıcaklık arttıkça azalan ekzopolisakaritlerin viskozitesi üzerindeki sıcaklık etkisinin bir sonucu olarak, olgun biyofilmin ayrılmasından kaynaklanabilmektedir (Mortimatsu et al, 2012). Tang et al. (2012), *S. typhimurium* biyofilmlerinin, inkübasyon süresi uzatıldığında biyofilmlerin arttığını söylemişlerdir. Agarwal et al. (2011), *Salmonella*'nın biyofilm oluşumunun 48 saat inkübe edildiğinde optimum olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, en uygun *Salmonella typhimurium* biyofilmi oluşturmak için farklı sıcaklık, inkübasyon süresi, besiyeri ve inokülasyon miktarları araştırılmıştır. 100 µl tuzsuz LB besiyeri içerisinde 50 µl organizma süspansiyonu ve 230 µl tuzsuz LB besiyeri içerisinde 20 µl organizma süspansiyonu ilave edilerek 27°C'de, 48 saat inkübasyona bırakılan koşullarda en uygun biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir.

Biyosümfaktan, patojenlerin yapışma özelliklerini etkileyen orijinal yüzeyin ıslanabilirliğini değiştiren bir film oluşturur (Arutchelvi et al., 2008). Biyosümfaktanın bakteriyel yüzey etkileşimlerini manipüle ettiği varsayımı

olmuştur (Walencka et al., 2008). Biyosümfaktan, patojenlerin çoğuna karşı antibiyofilm aktivitesi göstermiştir, ancak aktivite spektrumu, farklı mikroorganizmalar için değişkenlik göstermiş ve aynı zamanda biyosümfaktanın konsantrasyonuna da bağlıdır (Sharma and Saharan, 2016). Mikrobiyal yapışma ve desorpsiyondaki biyosümfaktanın rolü geniş bir şekilde ele alınmıştır. Çeşitli mikroorganizmalardan üretilen biyosümfaktanın yüzeye uygulanması, biyomedikal ve gıda yüzeylerinde patojenik suşların kolonizasyonunun azaltılması ve bununla mücadelede önemli olabilmektedir. Yapılan bazı araştırmalar, belirli test koşulları altında, biyosümfaktanların birçok geleneksel biyofilm inhibisyonu stratejisinden daha etkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, biyofilm inhibisyonunda, kontrolde ve biyofilmlerin hastalığın yayılması için potansiyel rezervuarlar olarak ortaya çıkmasındaki hızlı ilerleme, biyofilm ölçümleri ve mikrobiyal biyofilmlere karşı potansiyel olarak etkili biyosümfaktanların teknik incelemesinin yapılmasını gerektirmiştir (Vanavil, 2013; Banat et al., 2014).

Biyofilm oluşumunu tespit etmek için birçok yöntem mevcuttur, ancak kristal viyole yöntemi en uygun teknik olarak kalmaya devam etmektedir. Hızlı, ucuz ve basit olmasının yanında çok sayıda bakteri suşu tarafından oluşturulan biyofilmlerin *in vitro* olarak ölçülmesini sağlayan güvenilir tekrarlanabilir sonuçlar sağlamaktadır. İnkübasyonun ardından, yıkama ve boyama adımları gereklidir. Bazik boya olan kristal viyole, hem canlı hem de ölü negatif yüklü tüm bakteri hücrelerinin yanı sıra polisakkaritleri de boyamaktadır. Yöntem, mikropilaka kuyucuklarının çeperlerine tutunmuş biyofilmlerin kristal viyole boyası ile işaretlenmesi, biyofilmin matrisine tutunan boyanın alkol çözeltisiyle çözdürülüp, mikropilaka okuyucuda ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Peeters et al., 2008; Pui et al., 2011; Tang et al., 2012; Pantanella et al., 2013; Metzler, 2016).

Khiralla et al. (2015), yaptıkları çalışmada *Lactobacillus*'dan elde ettikleri biyosümfaktan içeren süpernatantın *B. cereus* ve *P. aeruginosa* patojenlerine karşı anti-biyofilm özelliklerini incelemiştir. Farklı hacimlerde (10, 20, 30 ve 40 µl) süpernatantları ile 24 saatlik inkübasyonun ardından, antibiyofilm aktivitesini belirlemiştir. 96 kuyucuklu mikropilakada yaptıkları denemede süpernatant, 10 µl mikroorganizma süspansiyonu eklemişler ve toplam hacmini 250 µl'ye

tamamlamışlardır. 20 µl ve daha fazla süpernatant varlığında biyofilm oluşumunda belirgin bir azalma görülmüştür. Bu elde edilen antibiyofilm etkisinin, patojenik suşun mikropilaka yüzeyine yapışmasını inhibe ettiği, ancak patojenlerin büyümelerini inhibe etmediği düşünülmüştür. Ayrıca, çoklu algılama kavramına (QS) atıfta bulunabilir. Quorum sensing (QS)'nin çeşitli bakteri türlerinin biyofilmlerinde önemli bir düzenleyici mekanizması olduğu iyi bilinmektedir. Tek bir hücrenin bakteri sayısının yoğunluğunu algılamasını sağlayan ve böylece tüm bakteri popülasyonunun koordineli bir cevap vermesini sağlayan, çevreleyen ortamda sinyal moleküllerinin birikimini içerir (McDougald et al., 2011). Buna göre, birçok araştırma grubu, çoklu ilaca dirençli suşların patojenitesinin ve virülansının inhibe edilmesinde kullanılabilecek en uygun algılama inhibitörlerini (QSI) bulmaya odaklanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, farklı miktardaki biyosümfaktan içeren süpernatantın (10, 20, 30, 40 ve 50 µl) biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu adımda literatürde karşılaştığımız 2 farklı inokülasyon miktarları denenmiştir. İlk olarak biyosümfaktan içeren süpernatant miktarlarını ve organizma süspansiyonu eklenmiş ve besiyeri ekleyerek toplam hacime (150 µl) ulaşılmıştır. İkinci olarak ise, organizma süspansiyonunu ve besiyerini ekleyerek toplam hacmi oluşturduktan sonra üzerine farklı miktarlarda süpernatant eklenmiştir. *Salmonella* biyofilmi üzerindeki en iyi etki (%63 inhibisyon yüzdesi) 50 µl süpernatant, 50 µl organizma süspansiyonu ekleyerek ve 50 µl besiyeri ile toplam hacime (150 µl) ulaşıldığında elde edilmiştir.

Mireles et al. (2001), sümfaktinin *S. typhimurium*'un biyofilm oluşumunu engelleyebildiğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar sümfaktinin biyofilm oluşumunu engellemesini, hidrofobisitedeki değişiklik ve adsorbe edilen biyosümfaktan tarafından teşvik edilen itici kuvvetin artmasına bağlamışlardır. *L. monocytogenes* için, paslanmaz çeliğin sümfaktin ile önceden muamele edilmesi elektron donör bileşenini ya da yüzeyin temel karakterini değiştirmiştir. Van der Waals bileşeninin azaltılması, aynı zamanda bir hidrofobik yüzey yapısı gösteren yüzey ve mikroorganizma arasındaki hidrofobik etkileşimleri de azaltabilmektedir. Bununla birlikte, polipropilende, sümfaktinin ana etkisi, elektron

verici/alıcı bileşenlerinde azalma ve aynı zamanda bakteri yapışmasını azaltmada etkili olmuştur.

Sharma and Saharan (2016), yaptıkları çalışmada *L. helveticus* tarafından ürettikleri biyosüfaktanın biyofilm üzerindeki antiadhesiv etkisini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar farklı konsantrasyonlarda (25, 12,5, 6,25, 3,12 ve 1,56 mg/ml) kısmi saflaştırılmış biyosüfaktanın *B. cereus* (87%), *S. epidermidis* (85%), *L. monocytogenes* (84.3%), *S. aureus* (83.1%) ve *L. innocua* (82.1%) üzerinde yüksek anti-adhesiv etki gösterirken, *E. coli* (50.1%), *P. aeruginosa* (49.1%), *S. typhi* (56.1%) ve *S. flexneri* (40.1%)'e karşı düşük etki gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda, biyosüfaktan içeren süpernatanttan ekstraksiyon işlemiyle kısmi olarak saflaştırılan biyosüfaktan elde edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 12,5 ve 6,25 mg/ml) hazırlanmıştır. 50 µl organizma süspansiyonu ve 10 µl kısmi saflaştırdığımız biyosüfaktanı ekleyerek besiyeri ile toplam hacim (150 µl) elde edilmiştir. En iyi anti-adhesiv etki 50 mg/ml konsantrasyonda %67 olarak bulunmuştur. 50 µl süpernatant ilave edildiğinde biyofilm oluşumuna etkisi %63 olarak bulunurken, kısmi saflaştırılan biyosüfaktandan 10 µl ilave edildiğinde ise %67 inhibisyon etkisi gözlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, biyosüpfaktan üretimi için petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş topraktan izolasyonu yapılmış fakat tanısı yapılmamış olan organizmalardan yüksek biyosüpfaktan aktivitesi gösteren izolat seçilmiş ve tanılanması yapılmıştır. Sekans analizinden elde edilen verilerle oluşturulan filogenetik ağaçta TEMBD35 izolatının *Yarrowia lipolytica* ile %99 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. *Y. lipolytica* TEMBD35 tarafından üretilen biyosüpfaktanın karbon kaynağı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, inokülüm miktarı ve tuz konsantrasyonu parametrelerinde değişiklik yapılarak optimizasyonu sağlanmıştır. Karbon kaynağı ve inkübasyon süresi; optimizasyonunda elde edilen 20 mm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) ve %17 emülsifikasyon aktivitesi sonuçlarına göre glikoz ve soya yağı en iyi karbon kaynağı ve en iyi inkübasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir. Daha sonrasında farklı sıcaklık koşulları uygulanmış ve en iyi sıcaklık %20 emülsifikasyon aktivitesi ve 15 mm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) sonucu ile 27°C olarak belirlenmiştir. Farklı pH aralığında yapılan uygulamalar sonucunda en iyi biyosüpfaktan üretimi %23 emülsifikasyon aktivitesi ve 13 cm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçlarıyla pH=7’de elde edilmiştir. İnokülüm miktarı optimizasyonunda elde edilen %27 emülsifikasyon aktivitesi ve 10 mm çapında oil spreading (yağ yer değiştirme) sonuçlarıyla inokülüm miktarı %4 olarak belirlenmiştir. Ancak geniş bir tuz konsantrasyonu aralığında yapılan uygulamalar sonucunda tuz konsantrasyonunun *Y. lipolytica* TEMBD35 biyosüpfaktan üretimi üzerinde etkili olmadığı gözlemlenmiş ve başta besiyeri içerisinde bulunan %0,01 miktarındaki tuz konsantrasyonu ile biyosüpfaktan üretimi yapılmıştır. *Y. lipolytica*’dan elde edilen biyosüpfaktan içeren süpernatant eşit miktarlarda kloroform:metanol (2:1) ile çalkanarak ekstrakte edilmiş ve 45°C’de 200 rpm’de buharlaştırılarak ham biyosüpfaktan elde edilmiştir.

Salmonella typhimurium’un daha güçlü biyofilm oluşturması için farklı sıcaklık, besiyeri, inkübasyon süresi ve inokülasyon miktarlarında değişiklik yapılmıştır. 100 µl tuzsuz LB içerisine 50 µl organizma süspansiyonu eklenerek, 27°C’de 48 saat inkübasyon ile güçlü biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Süpernatant

ve ham biyosüpfaktanın optimum biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi kristal viyole yöntemi ile mikropkaka üzerinde uygulanmış ve elde edilen sonuçlara göre, 10 µl ile 50 µl süpernatant miktarlarının inhibiyon yüzdeleri sırasıyla %34 ve %63 olarak belirlenmiştir. Ham biyosüpfaktanın etkisi ise 50 mg/ml konsantrasyonunda 10 µl eklendiğinde %67 olarak bulunmuştur.

Mikrobiyal biyofilmlerin, klinik ortamdaki birçok dirençli hasta enfeksiyonunun, havadaki patojenlerin yayılmasının ve endüstriyel yüzeylerin kirlenmesinin merkezinde yer aldığı kabul edilmektedir. Bu problemler dirençli biyofilm popülasyonlarının artması ve alternatif yok etme çözümlerinin yetersizliği ile giderek daha da artmaktadır. Biyosüpfaktanlar, bu tür biyofilmleri etkili bir şekilde dağıtabilmek veya bozmak için kendiliğinden anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-viral özelliklere sahip olarak ortaya çıkan bir tedaviyi temsil etmektedirler. Dolayısıyla, kendi başlarına veya diğer antimikrobiyal tedavilere yardımcı maddeler olarak kullanılması, ileriki çalışmalarda biyofilmlerle mücadelede potansiyel olarak görülmektedir.

Salmonella, katater gibi tıbbi aletlerin yüzeylerinde biyofilm oluşturarak üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olabilen enterik bir patojendir. Ayrıca, antibiyotik direncini arttırarak kronikleşmekte ve şiddetli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca, gıda işleme sektöründe kullanılan abiyotik yüzeylerde çapraz kontaminasyona yol açarak gıda kaynaklı salgınlara öncülük etmektedir. Gıda endüstrisi ve sağlık sektöründeki mikrobiyal biyofilmlerin etkisi yeni anti-biyofilm ve anti-adhesiv girişimlerini geliştirme gereksinime neden olmuştur. Biyosüpfaktanların gösterdiği özellikler göz önüne alınarak gelecekteki kullanımlarını aynı anda emülsiyonlaştırıcı, anti-adhesiv ve antimikrobiyal aktiviteler sergileyen ve dolayısıyla birçok gıda uygulaması için uygun olan çok amaçlı bileşenler olarak kullanabileceği düşünülebilir. Bu çalışmada, *Salmonella typhimurium* biyofilmine karşı *Y. lipolytica*'dan elde edilen biyosüpfaktanın anti-adhesiv özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu biyosüpfaktanın, hastalıklar ve enfeksiyonlardan sorumlu olan mikroorganizmalara karşı olan uygulamalar için gıda ve tıbbi alanda alternatif bir antimikrobiyal ve anti-adhesiv madde olarak kullanılabileceği ve bunun geleneksel yöntemlere bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adamczak, M. and Bednarski, W.**, 2000, Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*, *Biotechnology Letter*, 22, 313–316 pp.
- Agarwal, R.K., Singh, S., Bhilegaonkar, K.N. and Singh, V.P.**, 2011, Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes, *International Food Research Journal*, 18: 1493- 1498 pp.
- Akan, E. ve Kınık, Ö.**, 2014, Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi, *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14, 42-51 ss.
- Amaral, P.F.F., Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M. and Coutinho, J.A.P.**, 2006, Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, 41, 1894–1898 pp.
- Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M.J., and Coutinho, J.A.P.**, 2010, Biosurfactant From Yeast: Characteristics, Production and Application, *Biosurfactants*, Sen, R. (Eds), Springer, New York, 261-274 pp.
- Andrade, M.J., Rodriguez, M., Sanchez, B., Aranda, E. and Cordoba, J.J.**, 2006, DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products, *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 48-58 pp.
- Arutchelvi, J.I., Bhaduri, S., Uppara, P.V. and Doble, M.**, 2008, Mannosylerythritol lipids: a review, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1559–1570 pp.
- Arutchelvi, J.I. and Doble, M.**, 2010, Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum contaminated soil, *Letters in Applied Microbiology*, 1, 75–82 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bakkiyaraj, D., Nandhini, J.R., Malathy, B. and Pandian, S.K.,** 2013, The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum L.*) extract against human bacterial and fungal pathogens, *Biofouling*, 29(8), 929–937 pp.
- Banat, I.M., De Rienzo, M.A.D. and Quinn, G.A.,** 2014, Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents, *Applied Microbiology Biotechnology*, 98, 9915–9929 pp.
- Barak, J.D., Jhan, C.E., Gibson, D.L. and Charkowski, A.O.,** 2007, The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(9), 1083-1091 pp.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R.,** 2006, Curli biogenesis and function, *Annual Review of Microbiology*, 60, 131-147 pp.
- Barth, G. and Gaillardin, C.,** 1996, *Yarrowia lipolytica*, Wolf, K. (Eds), Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Springer, Berlin, 313-388 pp.
- Barth, G. and Gaillard, C.,** 1997, Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS microbiol Review*, 19, 219-37 pp.
- Batista, S.B., Munteer, A.H., Amorim, F.R. and To'tola, M.R.,** 2006, Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites, *Bioresource Technology*, 97, 868–875 pp.
- Beal, R. and Betts, W.B.,** 2000, Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 158-168 pp.
- Blana, V., Georgomanou, A., Giaouris, E.,** 2017, Assessing biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Tyhimurium on abiotic substrata in the presence of quorum sensing signals produced by *Hafnia Alvei*, *Food Control*, 80: 83- 91 pp.
- Brackman, G. and Coenye, T.,** 2015, Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents, *Current Pharmaceutical Design*, 21, 5-11 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borges, K.A., Furian, T.Q., Souza, S.N., Menezes, R., Tondo, E.C., Salle, C.T.P., Morales, H.L.S. and Nascimento, V.P.,** 2018, Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38 (1): 71- 76 pp.
- Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Rufino, R.D. and Banat, I.M.,** 2013, Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries, *American Institute of Chemical Engineers Biotechnology*, 29(5): 1097-1108 pp.
- Casas, J. and Ochoa, F.G.,** 1999, Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 488-494 pp.
- Castelijn, G.A.A., Van der Veen, S., Zwietering, M.H., Moezelaar, R. and Abee, T.,** 2012, Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium, *Biofouling*, 27: 51-63 pp.
- Chen, Y.C., Eisner, J.D., Katar, M.M., Rassouljian -Barett, S.L., Lafe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P. and Cookson, B.T.,** 2000, Identification of medically important yeasts using PCR- based detection of DNA sequence polymorphisms in the rRNA genes, *Journal of Clinical Microbiology*, 2302-2310 pp.
- Chi, Z., Wang, F., Wang, L., Li, J. and Wang, X.,** 2007, Selection of *Yarrowia lipolytica* strains with high protein content from yeasts isolated from different marine environments, *Journal of Ocean University of China*, 6(4), 360-364 pp.
- Ciapina, E.M.P., Melo, W.C., Santa Anna, L.M.M., Santos, A.S., Freire, D.M.G. and Pereira Jr., N.,** 2006, Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 131(1-3), 880-886 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cirigliano, M.C. and Carman, G.M.**, 1985, Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 846-850 pp.
- Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F. and Belo, I.**, 2010, *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 930-944 pp.
- Cooper, D. and Goldenberg, B.**, 1987, Surface-active agents from 2 *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 224–229 pp.
- Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D. and Niazi, A.**, 2011, Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 292–300 pp.
- Daverey, A. and Pakshirajan, K.**, 2010, Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production purification and characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 246- 253 pp.
- Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R.**, 2000, Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry, *Applied Environmental Microbiology*, 66(10),4340-4344 pp.
- Desai, J.D. and Banat, I.M.**, 1997, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64 pp.
- Dusane, D.H., Pawar, V.S., Nancharaiah, Y.V. , Venugopalan, V.P., Kumar, A.R. and Zinjarde, S.S.**, 2011, Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*, *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(6), 645–654 pp.
- Edel, M., Horn, H. and Gescher, J.**, 2019, Biofilm systems as tools in biotechnological production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Encinas, J.P., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A. and Moreno, B.,** 2000, Yeast populations on Spanish fermented sausages, *Meat Science*, 54(3), 203-208 pp.
- Fabrega, A and Vila, J.,** 2013, *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation, *CMR Journal*, 308-341 pp.
- Fakruddin, Md.,** 2012, Biosurfactant: production and application, *Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3: 124 pp.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E.,** 2000, RFL Panalysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of floryeasts, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 87-97 pp.
- Fontes, G.C., Amaral, P.F.F., Nele, M. and Coelho, M.A.Z.,** 2010, Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-8 pp.
- Franzetti, A., Tamburini, E. and Banat, I.M.,** 2010, Applications of Biological Surface Active Compounds in Remediation Technologies, Biosurfactants Sen, R. (Eds), Springer, New York, 121-134 pp.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M. and Tofalo, R.,** 2001, A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy, *FEMS Yeast Research*, 1(2),161-167 pp.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E. and Lanciotti, R.,** 2006, Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese, *Food Microbiology*, 23(7),641-648 pp.
- Gerstel, U. and Romling, U.,** 2001, Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium, *Environmental Microbiology*, 3: 638-648 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geys, R., Soetaert, W. and Bogaert, I.V.**, 2014, Biotechnological opportunities in biosurfactant production, *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 66–72 pp.
- Gomaa, E.Z.**, 2013, Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 425–436 pp.
- Gonçalves, F.A.G., Colen, G. and Takahashi, J. A.**, 2014, *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry, *Hindawi Publishing Corporation the Scientific World Journal*, 1-14 pp.
- Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. and Tulloch, A.P.**, 1961, Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*, *Canadian Journal of Chemistry*, 39(4), 846-855 pp.
- Greenway, H. and Osmond, C.B.**, (1972). Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance, *Plant Physiology*, 49, 256–259 pp.
- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y.**, 2009, Biyofilmler: yüzeydeki mikrobiyal yaşam, *Gıda*, 34(3), 165-173 ss.
- Harzevili, F.D.**, 2014, Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica*, Springer, New York, 1-16 pp.
- Hassan, S.S. and Mohammad, F.R.**, 2015, Effect of biosurfactant extracted from *Bacillus* sp. on biofilm formation by some pathogenic bacteria, *World Journal of Experimental Biosciences*, 3(2), 139-145 pp.
- Hassanshahian, M., Tebyanian, H. and Cappello, S.**, 2012, Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf, *Marine Pollution Bulletin*, 64(7), 1386–1391pp.
- Hausmann, R. and Syldatk, C.**, 2015, Types and Classification of Microbial Surfactants, Kosaric, N. (Eds), CRC Press, Boca Raton, 3-17 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, X., Wang, C. and Wang, P.,** 2015, Optimization and characterization of biosurfactant production from marine *Vibrio* sp. strain 3B-2, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-13 pp.
- Hujšlova, M., Bystriansky, L., Benada, O. and Gryndler, M.,** 2019, Funfi, a neglected component of acidophilic biofilms: do they have a potential for biotechnology?, *Extremophiles*, 1-9 pp.
- Hurtado, C.A.R. and Rachubinski R.A.,** 2002, Isolation and characterization of YIBEM1, a gene required for cell polarization and differentiation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *American Society for Microbiology*, 1(4), 526–537 pp.
- Jagtap, S., Yavankar, S., Pardesi. K. and Chopade P.,** 2010, Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* species isolated from healthy human skin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 70-76 pp.
- Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T and Andleeb, S.,** 2015, Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections, *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 1-14 pp.
- Janek, T., Lukaszewicz, M. and Krasowska, A.,** 2012, Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5, *BMC Microbiology*, 12, 24p.
- Jarvis, F.G. and Johnson, M.J.,** 1949, A glycol-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of the American Chemical Society*, 71, 4124-4126 pp.
- Jefferson, K.K.,** 2004, What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163–173 pp.
- Jeziarska, S., Claus, S. and Bogaert, I.V.,** 2017, Yeast glycolipid biosurfactants, *FEBS Letter*, 592, 1312–1329 pp.
- Khan, M.S.A., Singh, B. and Cameotra, S.S.,** 2015, Biological Applications of Biosurfactants and Strategies to Potentiate Commercial Production, Kosaric, N. (Eds), CRC Press, Boca Raton, 269-294 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khiralla, G.M., Mohamed, E.A.H., Farag, A.G. and Elhariry, H.,** 2015, Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens, *Journal of Biotechnology Research*, 6, 86-95 pp.
- Khire, J.M.,** 2010, Bacterial Biosurfactants, and Their Role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), Biosurfactants, Sen, R. (Eds), Springer, New York, 146-157 pp.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.,** 2006, Yeast systematics and phylogeny-implications of molecular identification methods for studies in ecology, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Springer, Berlin, 11–30 pp.
- Lang, S. and Philp, J.C.,** 1998, Surface-active lipids in rhodococci, *Antonie van Leeuwenhoek*, 74(1–3) 59–70 pp.
- Lewandowski, Z. and Beyenal, H.,** 2007, Fundamentals of Biofilm Research, CRC Press, Boca Raton, 452 p.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J.,** 2000, Rapid Mini- Preparation of Fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 471 p.
- Lopandic, K., Zelger, S., Banzsky, L.K., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H.,** 2006, Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques, *Food Microbiology*, 23(4), 341-350 pp.
- MacKenzie, K.D., Palmer, M.B., Köster, W.L. and White, A.P.,** 2017, Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species, *Frontier in Veterinary Infectious Diseases*, 4(138), 1-19 pp.
- Mafakher, L., Mirbagheri, M., Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Emtiazi, G.,** 2010, Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater, *New Biotechnology*, 27(4), 337-340 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahdy, H.M., Fareid, M.A. and Mohamed, N.H.**, 2012, Production of Biosurfactant from Certain *Candida* strains Under Special Conditions, *Researcher*, 4(7), 39-55 pp.
- Maier, R.M. and Soberon-Chavez, G.**, 2000, *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 625-633 pp.
- Marchant, R., and Banat, I.M.**, 2012, Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation, *Trends in Biotechnology*, 30: 558-565 pp.
- Marquis, R.E.**, 1968, Salt-induced contraction of bacterial cell walls, *Journal of Bacteriology*, 95, 775–781 pp.
- Martini, A.V.**, 2003, Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine, *International Microbiology*, 175-182 pp.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J. and Torrents, A.**, 2001, Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. *Microbiological Research*, 155, 249 p.
- McDougald, D., Rice, C.A., Barraud, N., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S.**, 2011, Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal, *Nature Reviews Microbiology*, 10, 39-50 pp.
- Merino, L., Procura, F., Trejo, F.M., Bueno, D.J. and Golowczyc, M.A.**, 2017, Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: detection, control and eradication strategies, *Food Research International*, 1-11 pp.
- Metzler, A.**, 2016, Developing a Crystal Violet Assay to Quantify Biodilm Production Capabilities of *Staphylococcus aureus*, Honor Research Thesis, Department of Animal Sciences, The Ohio State University, USA. 15 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mirbagheri, M., Nahvi, I., Emtiazi, G., Mafakher, L. and Darvishi, F.,** 2012, Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(1), 346-351 pp.
- Mireles, J.R., Toguchi, A. and Harshey, R.M.,** 2001, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation, *Journal Of Bacteriology*, 5848-5854 pp.
- Morimatsu, K., Eguchi, K., Hamanaka, D., Tanaka, F. and Uchino, T.,** 2012, Effects of Temperature and Nutrient Conditions on biofilm formation of *Pseudomonas putida*, *Food Science and Technology Research*, 18: 879- 883 pp.
- Moussa, T.A.A., Mohamed, M.S. and Samak, N.,** 2014, Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(4), 867-880 pp.
- Mulligan, C.N.,** 2005, Environmental applications for biosurfactants, *Environmental Pollution*, 133: 183-198 pp.
- Nicaud, J.M.,** 2012, *Yarrowia lipolytica*, *Yeast*, 29, 409-418 pp.
- Nitschke M. and Costa S.G.V.A.O.,** 2007, Biosurfactants in food industry, *Trends in Food Science and Technology*, 18: 252-259 pp.
- Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Henriques, M., Oliviera, R.,** 2006, Comparison of the Adhesion Ability of Different *Salmonella* Enteriditis Serotypes to Materials Used in Kitchen, *Journal of Food Protection*, 69: 2352- 2356 pp.
- Pande, V.V., Mcwhorter, A.R. and Chousalkar, K.K.,** 2016, *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces, *Biofouling*, 32: 699- 710 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D. and Berlutti, F.,** 2013, Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use, *Annali di Igiene*, 25: 31-42 pp.
- Pareilleux, A.,** 1979, Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8, 91-101 pp.
- Peeters, E., Nelis, H.J. and Coenye, T.,** 2008, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates, *Journal of Microbiological Methods*, 72: 157-165 pp.
- Peng, D.,** 2016, Biofilm Formation of *Salmonella*, *Microbial Biofilms; Importance and Applications*, Dhanasekaran, D. and Thajuddin, N. (Eds), ExLi4EvA, 231-249 pp.
- Petersen, K.M., Moller, P.L. and Jespensen, L.,** 2001, DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strain and other yeasts related to surface ripened cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 11-24 pp.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Lee, H.Y., Tang, J.Y.H., Noorlis, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K. and Son, R.,** 2011, Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella typhimurium* on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit, *International Food Research Journal*, 18: 31- 38 pp.
- Qazi., M.A., Kanwal, T., Jadoon, M and Ahmed, S.,** 2014, Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil, *American Institute of Chemical Engineers*, 30(5), 1065-1075 pp.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Bonsu, E. and Sintim, H.O.,** 2015, Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents, *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reis, R.S., Pacheco, G.J., Pereira, A.G. and Freire, D.M.G.,** 2013, Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation: Life of Science, Chamy, R. and Rosenkranz, F. (Eds), InTech, Rijeka, 31-61 pp.
- Randhawa, K.K.S.,** 2015, Biosurfactants Produced by Genetically Manipulated Microorganisms: Challenges and Opportunities, Kosaric, N. (Eds), CRC Press, Boca Raton, 49-72 pp.
- Romling, U., Bian, Z.B., Hammer, M., Sierralta, W.D. and Normark, S.,** 1998, Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation, *Journal of Bacteriology*, 180(3), 722-731 pp.
- Rufino, R.D., Sarubbo, L.A. and Campos-Takaki, G.M.J.,** 2007, Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 23, 729-734 pp.
- Rufino, R.D. and Sarubbo, L.A.,** 2008, Experimental design for the production of tension active agent by *Candida lipolytica*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 907- 914 pp.
- Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Teixeira, J.A.C. and Campos-Takaki, G.M.,** 2012, Antimicrobial and Anti-Adhesive Potential of a Biosurfactants Produced by *Candida* Species, Andrade, A.O., Pereira, A.A., Naves, E.L.M. and Soares, A.B. (Eds), Copyright, 247-256 pp.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S. and Parnavitana, C.,** 2014, Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from against multi-drug-resistant pathogens, *BMC Microbiology*, 14, 197 p.
- Santos, D.K.F., Brandao, Y.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A.,** 2014, Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 48–57 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanz, A., Martin, R., Mayoral, M.B., Hernandez, P.E., Gonzalez, I. and Lacarra, T.G.**, 2005, Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham, *Meat Science*, 71(2), 230-237 pp.
- Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B. and Campos-Takaki, G.M.**, 2007, Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*, *Current Microbiology*, 54, 68-73 pp.
- Satpute S.K., Bhawsar, B.D., Dhakephalkar, P.K. and Chopade, B.A.**, 2008, Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria, *Indian Journal of Marine Sciences*, 37(3), 243-250 pp.
- Sharma, D.**, 2016, *Biosurfactants in Food*, Springer, Switzerland, 86 p.
- Sharma, D. and Saharana, B.S.**, 2016, Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*, *Biotechnology Reports*, 11, 27–35 pp.
- Silva, A.F., Santos, A.R., Trevisan, D.A.C., Ribeiro, A.B., Campanerut-Sá, P.A.Z., Kukolj, C., Souza, E.M., Cardoso, R.F., Svidzinski, T.I.E., Filho, B.A.A., Machinski Junior, M. and Mikcha, J.M.G.**, 2018, Cinnamaldehyde induces changes in the protein profile of *Salmonella typhimurium* biofilm, *Research in Microbiology*, 169, 33-43 pp.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C. and Lasa, I.**, 2002, Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose, *Molecular Microbiology*, 43(3), 793-808 pp.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V. and Svabic- Vlahovic, M.**, 2003, Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp, *Food Microbiology*, 20: 339- 343 pp.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M.**, 2004, Biofilm formation by *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes* on plastic surface, *Letters in Applied Microbiology*, 38: 428-432 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic- Vlahovic, M.,** 2000, A modified microtiter plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175- 179 pp.
- Sudha, S., Kumanan, R. and Muthusamy, K.,** 2010, Optimization of cultural conditions for the production of sophorolipids from *Candida tropicalis*, *Der Pharmacia Lettre*, 2(2): 155-158 pp.
- Tampayak, I., Cheeptham, N., Pathom-Aree, W., Leelapornpisid, P. and Lumyong, S.,** 2008, Isolation and identification of biosurfactant producing Actinomycetes from soil, *Research Journal of Microbiology*, 3(7), 499-507 pp.
- Tang, P.L., Pui C.F., Wong W. C., Noorlis A. and Son, R.,** 2012, Biofilm forming ability and time course study of growth of *Salmonella* Tphi on fresh produce surfaces, *International Food Research Journal*, 19: 71-76 pp.
- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal-Sarıkaya, A. ve Arda, N.,** 2008, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan, G. ve Arda, N. (Ed), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 338 s.
- Trentin, D.S., Gorziza, D.F., Abraham, W.R., Antunes, A.L.S., Lerner, C., Mothes, B., Termignoni, C. and Macedo, A.J.,** 2011, Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1329-1333 pp.
- Uyar, E. ve Yalçın, H.T.,** 2013, Mikrobiyal biyosümfaktanlar, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 93-102 ss.
- Vanavil, B., Perumalsamy, M., and Rao, A.S.,** 2013, Biosurfactant production from novel air isolate NITT6L: screening, characterization and optimization of media, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1229–1243 pp.
- Vance-Harrop, M.H., Gusmão, N.B, and Campos-Takaki, G.M.,** 2003, New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources, *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 120-123 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vasdinyei, R. and Deak, T.,** 2003, Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques, *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2),123-130 pp.
- Walencka, E., Rozalska, S., Sadowska, B. and Rozalska, B.,** 2008, The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation, *Folia Microbiologica*, 53, 61–66 pp.
- Yakimov, M.M, Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L.,** 1995, Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50, *Applied and Environmental Microbiology*, 1706-1713 pp.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M. and Macinerney, M.J.,** 2004, Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism, *Journal of Microbiological Methods*, 56, 339-347 pp.
- Yuan, Y. and Olivier, H.,** 2019, Biofilm research within irrigation water distribution systems: trends, knowledge gaps, and future perspectives, *Science of the Total Environment*, 673, 254–265 pp.
- Zajic, J.E., Gerson, D.F., Gerson, R.K. and Panchal, C.J.,** 1982, Microbiological production of novel biosurfactants, U.S. Patent No. 4,355,10. Washington, Dc: U.S. Patent and Trademark Office.
- Zinjarde, S.S. and Pant, A.,** 2002, Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, *Journal of Basic Microbiology*, 67-73 pp.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Romling, U.,** 2003, Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract, *Infection and Immunity*, 71: 4151-4158 pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde değerli bilgi birikimini, yardımlarını, tecrübelerini ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN'a,

Uygulamalarımnda ve yazım aşamalarımnda bana destek olan Hüseyin EVLAT ve Fatima SHATİLA'ya ayrıca, laboratuvar çalışmalarımnda bana destek olan tüm 147 Lab. ekibine,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve hep yanımda olan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

05/08/2019

Burçin DURUSEL

ÖZGEÇMİŞ**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Burçin DURUSEL

Uyruğu : T.C.

Doğum Yeri : Konak / İZMİR

Doğum Tarihi : 1990

e-mail : durusel90@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2016 - : Ege Üniversitesi; Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans

2009 - 2015: Ege Üniversitesi; Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Lisans

2004 - 2007: İzmir Nevvar Salih İşgören Lisesi

SERTİFİKALAR

GMP (İyi üretim uygulamaları), **GLP** (İyi laboratuvar uygulamaları), **ISO 17025: 2017** (Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği), **ISO 9001: 2015** (Kalite yönetim sistemi), **HPLC** (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi), **GC** (Gaz kromatografisi)