

**BAKTERİYEL KONSORSİYUMLA BİYOSÜRFEKTAN  
ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION  
BY BACTERIAL CONSORTIUM**

**KAAN SOYUER**

**PROF. DR. İŞİL SEYİS BİLKAY**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.



# ÖZET

## BAKTERİYEL KONSORSİYUMLA BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

**Kaan SOYUER**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY**

**Mayıs 2024, 142 sayfa**

Bu çalışmada, atık kullanılarak modifiye edilen besiyerinde *Bacillus* konsorsiyumu kullanılarak düşük maliyetli ve verimli biyosürfektan üretimi, üretim sürecini etkileyen koşulların araştırılması ve üretilen biyosürfektanın özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda, biyosürfektan üretimine uygun konsorsiyumun *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1 suşlarından oluştuğu, daralma-yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  yöntemlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla belirlendi. Melas, şilempe ve peynir altı suyu atıkları arasından biyosürfektan üretimine uygun olan atığın 0,141 g/50 mL biyosürfektan üretim verimliliğiyle şilempe olduğu saptandı. Bu noktada, şilempenin %10 (v/v) konsantrasyonda besiyeri içeriğinde kullanılmasının ortama ilave edilmesi gereken ilave azot kaynağı ihtiyacını ortadan kaldırdığı ortaya kondu. Böylece, glukoz ve maya özütü gibi maliyeti yükselten ilavelerin besiyeri içeriğinden çıkartılmasıyla oluşturulan şilempe-modifiye BH besiyerindeki biyosürfektan üretim miktarı 0,188 g/50 mL'ye çıkartıldı. Biyosürfektan üretim verimliliğinin artırılması hedefi doğrultusunda %1 (v/v) iz element içeren şilempe-modifiye BH besiyerinde 0,75 mL *B. subtilis* ATCC 6633 ve 1,25 mL *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarının %4 (v/v) ekimi yapıldığında, üretilen biyosürfektan miktarının 0,203 g/50

mL'ye çıktığı saptandı. Bunlara ek olarak, biyosüpfektan üretimi açısından uygun fizyolojik koşulların pH 7, 30 °C, 150 rpm ve 10 günlük inkübasyon süresi olduğu saptandı. Böylece, çalışma başında 0,098 g/50 mL biyosüpfektan ürettiği belirlenen konsorsiyumun, çalışma kapsamında yapılan çalışmalarla 0,290 g/50 mL biyosüpfektan ürettiği belirlendi. Bununla birlikte, çalışılan çeşitli fizyolojik koşullarda biyosüpfektan üretimindeki düşüşün az olduğu, üç günlük inkübasyon da bile biyosüpfektan üretiminin yaklaşık olarak 0,2 g/50 mL olduğu belirlendi. Çalışmamızda üretilen biyosüpfektanın, ince-tabaka kromatografi (TLC) yöntemi ile lipopeptit yapıda olduğu belirlendi. Ek olarak nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizlerinde üretilen biyosüpfektanın lipopeptit yapıda olduğu görüldü. Düşük maliyetli şilempe-modifiye besiyerinde yüksek verimde üretilen biyosüpfektanın 4-12 pH aralığında, %5-25 arasında değişen NaCl konsantrasyonlarında, 4-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda ve 10-50 dakika aralığında değişen UV'ye maruz sürelerinde büyük oranda kararlılığını koruduğu saptandı. Bu durum, üretilen biyosüpfektanın kozmetik, sağlık ve deterjan gibi endüstrilerde kullanılabilirliği açısından önemli bir avantajdır. Çalışma sonunda, önerilen konsorsiyum ile şilempe-modifiye besiyerinde biyosüpfektan üretiminin düşük maliyet ve yüksek verim ile sağlanabileceği gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosüpfektan, Şilempe, Melas, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus*-konsorsiyum, lipopeptit

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION BY BACTERIAL CONSORTIUM**

**Kaan SOYUER**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Işıl SEYİS BILKAY**

**May 2024, 142 pages**

In this study, it was aimed to produce low-cost and efficient biosurfactants using a *Bacillus* consortium in a medium modified with waste, to investigate the conditions affecting the production process, and to determine the properties of the produced biosurfactant. In this context, it was determined that the suitable consortium for biosurfactant production consisted of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1 strains, based on the comparison of results obtained from drop-collapse, oil spreading, and  $E_{24}$  methods. Among molasses, vinasse, and curd whey waste, it was found that vinasse was the most suitable waste for biosurfactant production, with yield of 0.141 g/50 mL. At this point, it was demonstrated that using vinasse at a 10% (v/v) concentration in the medium eliminated the need for additional nitrogen sources. Consequently, by removing cost-increasing additives such as glucose and yeast extract from the medium, the biosurfactant production in the vinasse-modified BH medium increased to 0.188 g/50 mL. Aiming to further increase biosurfactant production efficiency, it was observed that when 0.75 mL of *B. subtilis* ATCC 6633 and 1.25 mL of *B. halotolerans* NR\_115063.1 strains were inoculated at 4% (v/v) in the vinasse-modified

BH medium containing 1‰ (v/v) trace elements, the produced biosurfactant yield increased to 0.203 g/50 mL. Additionally, the optimal physiological conditions for biosurfactant production were determined to be pH 7, 30 °C, 150 rpm, and a 10-day incubation period. Thus, the consortium, which initially produced 0.098 g/50 mL of biosurfactant, achieved a production of 0.290 g/50 mL under the conditions developed in this study. Furthermore, even with a reduced incubation period of three days under the studied physiological conditions, the production was approximately 0.2 g/50 mL, indicating minimal decline in biosurfactant yield. The biosurfactant produced in our study was identified as a lipopeptide structure using thin-layer chromatography (TLC). Additionally, nuclear magnetic resonance (NMR) and fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses confirmed that the produced biosurfactant had a lipopeptide structure. The biosurfactant produced in the low-cost vinasse-modified medium maintained its stability to large extent across a pH range of 4-12, NaCl concentrations varying between 5-25%, temperatures ranging from 4 to 80 °C, and UV exposure times between 10-50 minutes. This stability represents a significant advantage for the applicability of the produced biosurfactant in industries such as cosmetics, healthcare, and detergents. In conclusion, it was demonstrated that biosurfactant production in the vinasse-modified medium with the proposed consortium could be achieved at low cost and high efficiency.

Keywords: Biosurfactant, Vinasse, Molasses, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus* consortium, Lipopeptide

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde bilgi birikimiyle yanımda olan ve çalışmalarına katkı sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a ve her daim ufkumuzu genişleten Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e,

Yedi yıl boyunca her daim varlığını hissettiren, yardımları ve bilgisi ile bana destek olan Dr. Sezen BİLEN ÖZYÜREK'e,

Yüksek enerjileri ve ekipleriyle her daim ilham kaynağım olan Doç. Dr. Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ'ne, Doç. Dr. Neslihan İDİL'e, Doç. Dr. Yusuf Doruk ARACAGÖK'e, Dr. Nermin Hande AVCIOĞLU'na, Dr. Gülcan ŞAHAL'a ve Dr. Sinem DİKEN GÜR'E,

Tez çalışmamın farklı aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Arda ÜSTÜNDAĞ, Fatih Mahir SALTALI, Furkan İNCESU ve Arda CULHA'ya, oda arkadaşlarım Melike SAYIN GÜR ve Tuğçe ERDOĞAN'a,

Tez çalışmalarımın bunalduğumda yalnız olmadığımı hissettiren dostlarım Sıla EKMEN, Bora GÖKER, Melisa ÇELİK, Tunç EMRUL, Ayşegül TAŞBAKAN, Ömer ŞENEL, Çağrı ERTÜRK, Can MİRZA, Gizem TÜRKER, Süleyman KODAL ve Emrullah YILMAZ'a,

Yaşadığım zorlu süreçlerde yılmadan devam edebilmemi sağlayan, her düştüğümde elimi tutmaya hazır olan, değerli ailem Süreyya SOYUER'e, Mahmut SOYUER'e ve tezimle boğuşurken ilgilenemediğim için bana sıklıkla küsen canım kedim Meta'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Kaan SOYUER

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Biyosürfektan.....	4
2.2. Biyosürfektanların Genel Yapısı .....	4
2.3. Biyosürfektanların Genel Özellikleri .....	5
2.3.1. Substratlarda Seçicilik ve Yapısal Çeşitlilik .....	5
2.3.2. Kritik Misel Konsantrasyonu ve Kendiliğinden Oluşma.....	5
2.3.3. Düşük Toksikite .....	6
2.3.4. Hidrofobik Gruplarla Etkileşimi .....	6
2.3.5. Yüzeğe Yapışma ve Yapışmanın Giderilmesi.....	7
2.4. Biyosürfektanlar ve Sentetik Sürfektanlar .....	7
2.5. Biyosürfektan Çalışmalarına Tarihsel Perspektiften Bakış .....	9
2.6. Biyosürfektanların Varlığının Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler .....	10
2.6.1. Yüzeğe Geriliminin Ölçülmesi.....	10
2.6.2. Yağ Yayılma Yöntemi .....	11
2.6.3. Daralma-Yayılma Yöntemi .....	12
2.6.4. Hemolitik Aktivite Yöntemi .....	13
2.6.5. Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi Yöntemi.....	14
2.7. Biyosürfektanların Sınıflandırılması .....	15
2.7.1. Lipopeptitler .....	17



2.7.2. Glikolipitler.....	18
2.7.3. Polimerik Biyosürefektanlar.....	18
2.8. Biyosürefektanların Biyoekonomisi.....	18
2.9. Biyosürefektanların Kullanım Alanları.....	22
2.9.1. Sağlık Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	22
2.9.2. Petrol ve Madencilik Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	23
2.9.3. Tarım Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	23
2.9.4. Deterjan Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	24
2.9.5. Kozmetik Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	25
2.9.6. Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	26
2.10. Çalışmada Kullanılan Atıklar.....	26
2.10.1. Şilempe.....	26
2.10.2. Melas.....	28
2.10.3. PAS.....	28
2.11. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	32
3.2. Çalışmada Kullanılan <i>Bacillus</i> Suşları ve Saklanmaları.....	33
3.3. <i>Bacillus</i> Suşlarının Biyosürefektan Üretim Besiyerine Ekimi ve Üretim Koşulları.....	34
3.3.1. Biyosürefektan Üretiminde Kullanılan Modifiye Besiyerinin Hazırlanması.....	34
3.3.2. <i>Bacillus</i> Suşlarının Biyosürefektan Üretim Besiyerine Ekimi ve Üretimi.....	35
3.4. Biyosürefektan Varlığının Araştırılması.....	36
3.4.1. Biyosürefektan Varlığının Daralma Yayılma Yöntemiyle Araştırılması.....	36
3.4.2. Biyosürefektan Varlığının Yağ Yayılma Yöntemiyle Araştırılması.....	37
3.4.3. Biyosürefektan Varlığının Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi ( $E_{24}$ ) Yöntemiyle Araştırılması.....	38
3.5. Biyosürefektan Ekstraksiyonu ve Gravimetrik Ölçümü.....	39
3.6. Biyosürefektan Üretimine Uygun <i>Bacillus</i> Suşlarının Seçimi.....	42
3.7. <i>Bacillus</i> Konsorsiyumlarının Oluşturulması.....	42
3.8. Biyosürefektan Üretimine Uygun <i>Bacillus</i> Konsorsiyumunun Belirlenmesi.....	43

3.9. Biyosürefektan Üretiminde Atıkların Kullanımının Araştırılması .....	43
3.9.1. Biyosürefektan Üretiminde Uygun Atık Karbon Kaynağının Araştırılması ...	43
3.9.2. Biyosürefektan Üretiminde İlave Azot Kaynağı Şilempe Konsantrasyonunun Araştırılması.....	43
3.10. Biyosürefektan Üretimine Uygun Konsorsiyum Koşullarının Araştırılması .....	44
3.10.1. Konsorsiyumda Bulunan Farklı <i>Bacillus</i> Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	44
3.10.2. Hazırlanan Konsorsiyumun Farklı Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	44
3.11. İz Element Konsantrasyonunun Biyosürefektan Üretimine Etkisinin Araştırılması	45
3.12. Biyosürefektan Üretimini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Araştırılması .....	45
3.12.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	45
3.12.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması.....	46
3.12.3. Farklı Sıcaklıkların Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması.....	46
3.12.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması.....	46
3.13. Biyosürefektanın Saflaştırılması .....	46
3.13.1. Silika Jel Kromatografisinde Kolonun Hazırlanması .....	47
3.13.2. Biyosürefektanın Silika Jel Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	47
3.14. Biyosürefektan Karakterizasyonu .....	48
3.14.1. Biyosürefektan Yapısının TLC Yöntemiyle Belirlenmesi .....	48
3.14.2. Biyosürefektan Yapısının FT-IR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	49
3.14.3. Biyosürefektan Yapısının 1H NMR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	49
3.15. Biyosürefektanın Kararlılığının belirlenmesi .....	50
3.15.1. Farklı pH Değerlerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	50
3.15.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	50
3.15.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	50

3.15.4. UV'ye Maruz Kalma Sürelerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması .....	50
3.16. İstatistiksel Analiz .....	51
3.17. Çalışmada Kullanılan Fotoğraflar.....	51
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	52
4.1. Biyosürefektan Varlığının Araştırılması .....	53
4.1.1. Biyosürefektan Varlığının Daralma Yayılma Yöntemiyle Araştırılması .....	54
4.1.2. Biyosürefektan Varlığının Yağ Yayılma Yöntemiyle Araştırılması.....	56
4.1.3. Biyosürefektan Varlığının Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi ( $E_{24}$ ) Yöntemiyle Araştırılması .....	60
4.2. Biyosürefektan Üretimine Uygun <i>Bacillus</i> Suşlarının Seçimi .....	63
4.3. Biyosürefektan Üretimine Uygun <i>Bacillus</i> Konsorsiyumunun Belirlenmesi .....	64
4.4. Biyosürefektan Üretiminde Atıkların Kullanımının Araştırılması .....	68
4.4.1. Biyosürefektan Üretiminde Uygun Atık Karbon Kaynağının Araştırılması ...	68
4.4.2. Biyosürefektan Üretiminde İlave Azot Kaynağı Şilempe Konsantrasyonunun Araştırılması .....	74
4.5. Biyosürefektan Üretimine Uygun Konsorsiyum Koşullarının Araştırılması.....	76
4.5.1. Konsorsiyumda Bulunan Farklı <i>Bacillus</i> Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	76
4.5.2. Hazırlanan Konsorsiyumun Farklı Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	78
4.6. İz Element Konsantrasyonunun Biyosürefektan Üretimine Etkisinin Araştırılması .....	79
4.7. Biyosürefektan Üretimini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Araştırılması .....	80
4.7.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	81
4.7.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	83
4.7.3. Farklı Sıcaklıklarının Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması.....	84
4.7.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması .....	86
4.8. Biyosürefektanın Saflaştırılması.....	87

4.9. Biyosürefektan Karakterizasyonu .....	88
4.9.1. Biyosürefektan Yapısının TLC Yöntemiyle Belirlenmesi .....	88
4.9.2. Biyosürefektan Yapısının FT-IR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	90
4.9.3. Biyosürefektan Yapısının NMR Yöntemiyle Belirlenmesi .....	92
4.10. Biyosürefektanın Kararlılığının Belirlenmesi.....	94
4.10.1. Farklı pH Değerlerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	94
4.10.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	95
4.10.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	95
4.10.4. UV'ye Maruz Kalma Sürelerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması.....	96
5. YORUM .....	98
6. KAYNAKLAR .....	106
EKLER.....	131
EK 1 – <i>Bacillus</i> suşlarının biyosürefektan üretim miktarları.....	131
EK 2 – Konsorsiyumların biyosürefektan üretim miktarları.....	132
EK 3 – Atık karbon kaynaklarıyla biyosürefektan üretim miktarları .....	133
EK 4 – Farklı şilempe konsantrasyonlarında biyosürefektan üretim miktarları .....	134
EK 5 – Farklı <i>Bacillus</i> oranlarıyla biyosürefektan üretim miktarları .....	135
EK 6 – Farklı iz element konsantrasyonlarında biyosürefektan üretim miktarları .....	136
EK 7 – Farklı pH değerlerinde biyosürefektan üretim miktarları.....	137
EK 8 – Farklı çalkalama hızlarında biyosürefektan üretim miktarları .....	138
EK 9 – Farklı sıcaklıklarda biyosürefektan üretim miktarları .....	139
EK 10 – Farklı inkübasyon sürelerinde biyosürefektan üretim miktarları.....	140
ÖZGEÇMİŞ.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosürfektan yapısının şematik gösterimi. ....	4
Şekil 2.2. Biyosürfektan kritik misel konsantrasyonu oluşturması . ....	6
Şekil 2.3. Biyosürfektan ve sentetik sürfektanların karşılaştırılması. ....	8
Şekil 2.4. Yıllara göre yayımlanan biyosürfektan çalışmaları ....	10
Şekil 2.5. HUNİTEK'e ait temas açısı ölçüm cihazı ....	11
Şekil 2.6. Yağ yayılma sonucunda biyosürfektan pozitif durum. ....	12
Şekil 2.7. Daralma-yayılma testinin iki farklı modifikasyonla sonuçları. ....	13
Şekil 2.8. Pozitif biyosürfektan varlığında hemolitik aktivite sonucu. ....	14
Şekil 2.9. Biyosürfektan pozitif bir ortamda meydana gelen emülsifiye tabaka. ....	15
Şekil 2.10. Düşük maliyetli biyosürfektan üretiminde kullanılan çeşitli stratejiler. ....	20
Şekil 2.11. Biyosürfektan kullanılarak yara iyileşmesi ....	22
Şekil 2.12. Lekelerin biyosürfektan kullanılan deterjan ile giderimi. ....	24
Şekil 2.13. Diş macunu uygulaması. ....	25
Şekil 2.14. Farklı biyosürfektan konsantrasyonlarıyla üretilen kekler ....	26
Şekil 2.15. 100 x büyütme altında <i>Bacillus</i> suşlarının mikroskopik görüntüsü. ....	29
Şekil 2.16. <i>Bacillus</i> suşları ile yayımlanan çalışmalar. ....	30
Şekil 2.17. 2001-2023 yıllarında yayımlanan biyosürfektan çalışmalarının dağılımı. ...	31
Şekil 2.18. Çalışmada kullanılan <i>Bacillus</i> suşları. ....	31
Şekil 3.1. Biyosürfektan varlığının daralma yayılma yöntemi ile belirlenmesi. ....	37
Şekil 3.2. Biyosürfektan varlığının yayılma yöntemi ile belirlenmesi. ....	38
Şekil 3.3. Biyosürfektan varlığının $E_{24}$ yöntemi ile belirlenmesi. ....	39
Şekil 3.4. Aşırı asitleştirilen HKS'de biyosürfektan çökmesi. ....	40

Şekil 3.5. Kloroform/Metanol yöntemiyle biyosürefektan ekstraksiyonu. ....	41
Şekil 3.6. Ekstraksiyon sonunda kül fırınından kurutulan biyosürefektan. ....	41
Şekil 3.7. Silika jel kolon kromatografisinde yürüyen biyosürefektan. ....	48
Şekil 3.8. Biyosürefektan fraksiyonlarının TLC plakasında yürütülmesi. ....	49
Şekil 4.1. Biyosürefektan varlığının yağ yayılma yöntemiyle araştırılması. ....	59
Şekil 4.2. Biyosürefektan varlığının $E_{24}$ yöntemiyle araştırılması. ....	62
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> suşlarının biyosürefektan üretimleri. ....	64
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> konsorsiyumlarının biyosürefektan üretimleri. ....	66
Şekil 4.5. Atık-modifiye ortamda üretilen biyosürefektan varlığının yağ yayılma yöntemiyle araştırılması. ....	71
Şekil 4.6. Atık-modifiye ortamda üretilen biyosürefektan varlığının $E_{24}$ yöntemiyle araştırılması. ....	72
Şekil 4.7. Üretim ortamında kullanılan atıklar ile biyosürefektan üretimi. ....	73
Şekil 4.8. Farklı şilempe konsantrasyonlarında biyosürefektan üretimi. ....	76
Şekil 4.9. Farklı <i>Bacillus</i> oranlarının biyosürefektan üretimine etkileri. ....	77
Şekil 4.10. Konsorsiyum ekim oranlarının biyosürefektan üretimine etkileri. ....	78
Şekil 4.11. İz element konsantrasyonunun biyosürefektan üretimine etkisi. ....	80
Şekil 4.12. Farklı başlangıç değerlerinin biyosürefektan üretimine etkileri. ....	82
Şekil 4.13. Farklı inkübasyon koşullarının biyosürefektan üretimine etkileri. ....	84
Şekil 4.14. Farklı sıcaklıkların biyosürefektan üretimine etkileri. ....	85
Şekil 4.15. Farklı inkübasyon sürelerinin biyosürefektan üretimine etkileri. ....	87
Şekil 4.16. Biyosürefektanın silika jel kromatografisiyle saflaştırılma basamakları. ....	88
Şekil 4.17. Biyosürefektan fraksiyonlarının TLC plakasında gözlenmesi. ....	89
Şekil 4.18. Biyosürefektanın FT-IR pikleri. ....	91
Şekil 4.19. Biyosürefektanın NMR pikleri. ....	93

<b>Şekil 4.20.</b> Değişen pH değerlerindeki biyosüpfektan kararlılığı.....	94
<b>Şekil 4.21.</b> Değişen sıcaklıklarda biyosüpfektan kararlılığı. ....	95
<b>Şekil 4.22.</b> Değişen NaCl konsantrasyonlarında biyosüpfektan kararlılığı. ....	96
<b>Şekil 4.23.</b> Farklı UV'ye maruz kalma sürelerinde biyosüpfektan kararlılığı. ....	97

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biosürefektan sınıfları ve üretici mikroorganizmaları. ....	16
Çizelge 2.2. Biosürefektan üreten şirketler. ....	19
Çizelge 2.3. Çeşitli atıklar kullanılarak biosürefektan üretimi. ....	21
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan pancar şilempesi içeriği. ....	27
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan melas içeriği. ....	28
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar ve çözücüler. ....	32
Çizelge 3.2. Biosürefektan üretiminde kullanılan modifiye BH besiyeri içeriği. ....	34
Çizelge 3.3. Modifiye BH besiyerinde kullanılan iz element içeriği. ....	35
Çizelge 3.4. Biosürefektan üretimi için oluşturulan konsorsiyumlar ve ekim oranları. ....	42
Çizelge 3.5. Konsorsiyumdaki <i>Bacillus</i> suşlarının konsantrasyonları. ....	44
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> suşlarında biosürefektan varlığının daralma yayılma yöntemiyle araştırılması. ....	56
Çizelge 4.2. Seçilen <i>Bacillus</i> suşlarıyla oluşturulan konsorsiyumlar. ....	65
Çizelge 4.3. Üretim ortamında kullanılan atık karbon kaynağının biosürefektan üretimine etkisinin daralma-yayılma yöntemi ile araştırılması. ....	70



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat derece
mg	miligram
L	Litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre
cm	Santimetre
Mm	Milimolar
M	Molar
g	Gram
‰	Binde
%	Yüzde
H <sub>2</sub> O	Su
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür

## Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
PAS	Peynir Altı Suyu
NB	Nutrient Broth
NA	Nutrient Agar
BH	Bushnell Haas
PBS	Phosphate-Buffered Saline
HKS	Hücre içermeyen kültür süpernatantı
FT-IR	Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
TLC	Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
UV	Ultraviolet (Ultraviyole)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler İçin İstatistiksel Paket)
$R_f$	Retention Factor (Tutma Faktörü)
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)

# 1. GİRİŞ

Biyosümfektanlar, kimyasal yapıları sayesinde yağ-su arayüzeyindeki yüzey gerilimini düşüren ve böylece suyla karışmayan maddelerin çözünürlüğünü artıran amfipatik moleküller olarak tanımlanır (Maikudi Usman ve ark., 2016; Singh, Patil ve Rale, 2019). Biyosümfektanlar karbonhidrat, aminoasit grupları, peptit grupları veya fosfat gruplarıyla suda çözünebilen hidrofilik baş kısmı ve çeşitli yağ asitleriyle suda çözünemeyen hidrofobik kuyruk kısımlarından oluşur (Rahman ve Gakpe, 2008).

Günümüzde biyosümfektan olarak adlandırılan biyoteknolojik ürünlere yönelik ilk çalışma 1949 yılında yayımlanmıştır (Jarvis ve Johnson, 1949). Yapılan bu çalışmada yapısı ve işlevi tam olarak belirlenemeyen maddeye “lipit türevi yüzey aktif madde” ismi verilmiştir. Aradan geçen yıllarda yapılan çalışmalarla kimyasal yapısı ve çeşitli özellikleri keşfedilen biyosümfektanlar 21. yüzyılın ekonomik açıdan en çok aranan biyoteknolojik ürünlerinden biri olmuştur (Singh, Patil ve Rale, 2019). Biyosümfektanların pazar açısından bu kadar önemli olması petrol endüstrisi, sağlık endüstrisi, çevre kirliliğini azaltmaya yönelik çalışmalar, kozmetik, yiyecek ve içecek endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılabilir bir hammadde olmasından kaynaklanmaktadır (Cameotra ve Singh, 2008; Adu ve ark., 2020; Ribeiro, Guerra ve Sarubbo, 2020b; Bjerck ve ark., 2021; Inès ve ark., 2023; Sharma ve ark., 2023; Silva ve ark., 2024).

Çeşitli mikroorganizmalar ve bitkilerden elde edilen biyosümfektanlar (Jimoh ve Lin, 2019; Rani ve ark., 2020; Tucker ve ark., 2021; Bezerra ve ark., 2021), sentetik sümfektanların aksine ekstrem ortamlarda işlevini sürdürebilmesi, üretim süreçlerinde toksik maddelerin meydana gelmemesi, biyoremediyasyona yönelik biyoteknolojik hizmetlerde kullanıldıklarında biyoçözünürlüklerinin yüksek olması sayesinde doğal ortamlarda kolayca yok olabilmeleri gibi avantajlara sahiptir (Nagtode ve ark., 2023; de Souza ve ark., 2024). Bunlara ek olarak, biyosümfektan üretim ortamlarında bulunması gereken karbon ve azot ihtiyaçlarının çeşitli atıklar kullanılarak karşılanması, atıkların ekonomiye geri kazandırılmasına ek olarak çevre kirliliklerinin önüne geçilmesi içinde

önemli bir avantajdır (Rahman ve ark., 2002; e Silva ve ark., 2014; Ebadipour ve ark., 2016; da Rocha Junior ve ark., 2019; Soares da Silva ve ark., 2019; Soyuer ve ark., 2023). Bununla birlikte, endüstriyel üreticiler, biyosülfektanların bu avantajlarına rağmen artan ürün ihtiyacını karşılamak adına ucuz ancak toksik etkisi bulunan sentetik sülfektanları kullanmayı tercih etmektedir (de Souza ve ark., 2024). Bu bağlamda, biyosülfektanların endüstriyel kullanım ölçeğinin artırılması için üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve üretim verimliliğinin artırılması gerekmektedir (Sundaram ve ark., 2024). Biyosülfektan üretiminde besiyeri içeriğinin, üretim şartlarının ve üretici kültürünün belirlenmesi üretim maliyetlerini ve üretim verimliliğini etkileyen önemli faktörlerdir (de Souza ve ark., 2024; Sundaram ve ark., 2024).

Bu çalışmada, biyosülfektan üretimi için *Bacillus* suşları araştırılarak yeni bir alternatif konsorsiyum oluşturulması ve oluşturulan bu konsorsiyum ile maliyeti azaltılan besiyerinde verimli biyosülfektan üretimi amaçlandı. Bu bağlamda, öncelikle biyosülfektan ürettiği bilinen *Bacillus* suşları arasından verimli biyosülfektan üretimi gerçekleştirilen suşlar belirlenerek konsorsiyum oluşturulması ardından da besiyeri ve üretim şartlarının optimize edilmesiyle düşük maliyetli ve verimli biyosülfektan üretimini gerçekleştirilmesi hedeflendi. Bu sayede, tek bir mikroorganizmayla elde edilecek biyosülfektan üretim miktarı konsorsiyumun sinerjik etkisiyle artırıldı. Buna ek olarak, üretim maliyetini düşürme hedefimize yönelik yürütülen çalışmalarla, besiyerinde karbon ve ilave azot kaynağı olarak kullanılacak atıkların belirlenmesinde ülkemizdeki tarım ve gıda faaliyetlerinin saptanması amaçlandı. Bu bağlamda, melas, şilempe ve lor peynirden elde edilen peynir altı suyunun düşük maliyetli besiyerinde kullanılarak ekonomiye kazandırılmasının yanı sıra çevre kirliliğinin de önünde geçilmesine yönelik bir çözüm sunulması hedeflendi. Düşük maliyetli biyosülfektan üretimi için en uygun atık-modifiye besiyeri hedefimize yönelik çalışmaların tamamlanmasından sonra üretim verimliliğini arttırmak amacıyla üretim verimliliğini doğrudan etkileyen önemli bir faktör olan üretici konsorsiyum şartlarının saptanması hedeflendi. Bu hedeflerimizin ardından üretim düşük maliyetli modifiye besiyerinde biyosülfektan üretim verimini arttırmak amacıyla eklenmesi gereken iz element konsantrasyonunun belirlenmesi hedeflendi. Değişik üretim ortamlarında oluşturulan konsorsiyumun biyosülfektan üretiminin belirlenmesi amacıyla farklı fizyolojik koşulların biyosülfektan üretim verimliliği araştırıldı. Bu doğrultuda, farklı fizyolojik koşullardaki biyosülfektan üretimi incelenmesi için

başlangıç pH değeri, sıcaklık, inkübasyon süresi ve statik-çalkalama inkübasyon koşullu gibi çeşitli parametrelerde konsorsiyumun biyosürefektan üretimi incelenerek, endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılabilirliği açısından da değerlendirilmesi hedeflendi.

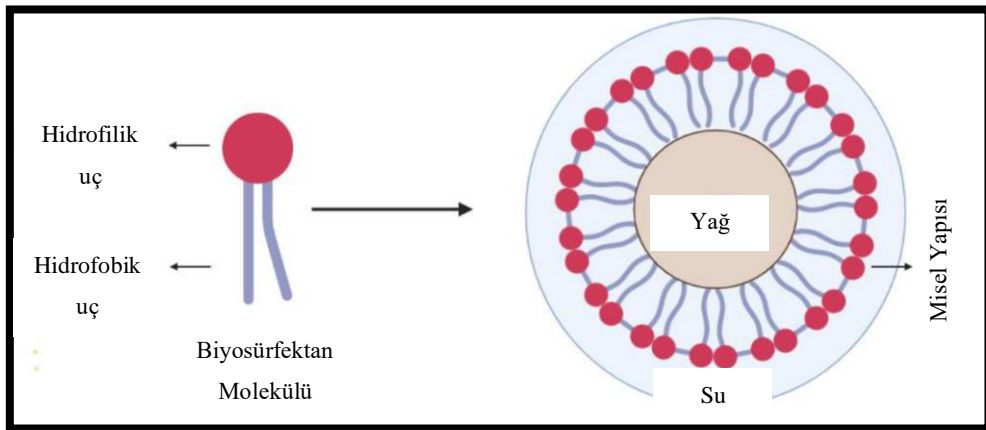
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyosürefektan

Biyosürefektan, İngilizce *biological* kelimesinin kısaltması olan “Bio” ile yüzey aktif madde anlamında kullanılan *surfactant* kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Farklı yapıları bulunan bu biyolojik yüzey aktif maddeler (Sobrinho ve ark., 2013), biyolojik olarak bitkiler, hayvanlar, bakteriler, mayalar ve filamentli mantarlar tarafından üretilen metabolitlerdir (Araujo ve ark., 2018; Jahan ve ark., 2020). Söz konusu bu canlılar biyosürefektanları, doğal ıslatıcı, emülsifiye edici, köpürtücü, dağıtıcı ve yüzey değiştirme reaktifleri olarak kullanım amacıyla üretirler (Liu ve ark., 2020).

### 2.2. Biyosürefektanların Genel Yapısı

Biyosürefektanlar, Şekil 2.1.'de görüldüğü üzere hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki uçtan oluşur. Hidrofilik baş kısmı suda çözünme özelliğine sahiptir ve karbonhidrat, amino asit, peptit, fosfat veya alkol içerebilir (Sharma, Lavania ve Lal, 2022). Hidrofobik kuyruk kısmı uzun zincirli yağ asitleri, hidroksil yağ asitleri veya  $\alpha$ -alkil- $\beta$ -hidroksi yağ asitlerinden oluşan hidrokarbonlardan oluşur (Rahman ve Gakpe, 2008). Yüzey aktif maddelerin amfifilik kısmı hem arayüzde hem de yüzeyde bireysel moleküller arasındaki yüzey ve arayüzey gerilimini azaltmada etkilidir (Maikudi ve ark., 2016).



Şekil 2.1. Biyosürefektan yapısının şematik gösterimi (Sharma, Lavania ve Lal, 2022).

### **2.3. Biosurfektanların Genel Özellikleri**

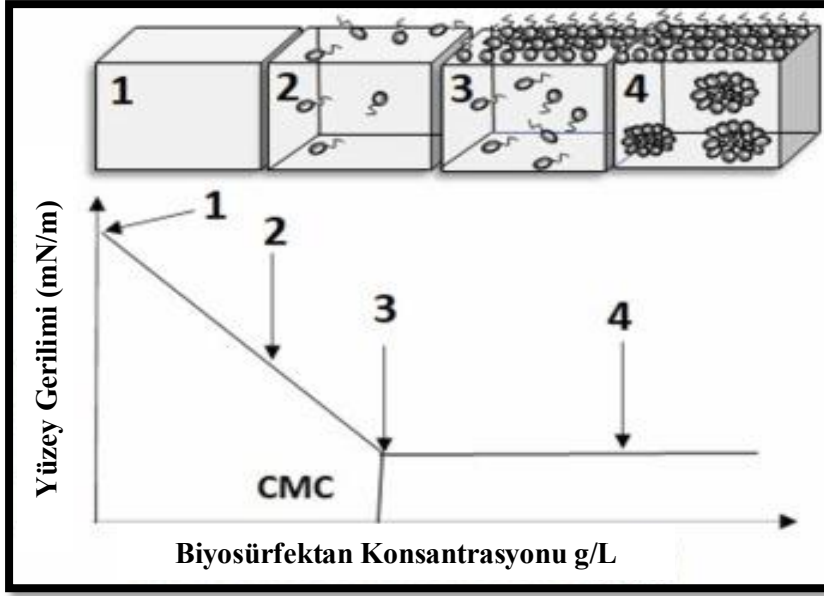
Biosurfektanlar moleküler yapıları sayesinde birçok özelliğe sahiptir (Kashif ve ark., 2022). Bu özelliklerin tespit edilmesi kullanım alanlarının ve kullanım sınırlarının çizilmesi açısından önemlidir (Drakontis ve Amin, 2020).

#### **2.3.1. Substratlarda Seçicilik ve Yapısal Çeşitlilik**

Biosurfektanların kendi kendine bir araya gelme ve miseller oluşturma yeteneği farklı yapılarda morfolojileri özgül olmalarını sağlar (Drakontis ve Amin, 2020). Glikolipit, lipopeptit ve polimerik yapıda olmak üzere pek çok biosurfektan türü bulunmaktadır. Bu yapısal çeşitlilikten gelen moleküler yapı farkları biosurfektanların substratlara karşı spesifik özellik göstermelerini sağlamaktadır (Kashif ve ark., 2022). Bu sayede, farklı kirleticilerin detoksifikasyonu veya spesifik ilaç uygulamaları gibi alanlarda kullanılabilir olmasını sağlamaktadır (Karnwal ve ark., 2023).

#### **2.3.2. Kritik Misel Konsantrasyonu ve Kendiliğinden Oluşma**

Kritik misel konsantrasyonu (CMC) biosurfektan misellerinin oluşmaya başladığı ve yüzey geriliminin en düşük değere ulaştığı konsantrasyon (Şekil 2.2.) olarak tanımlanmaktadır (Bjerk ve ark., 2021; Zargar ve ark., 2022). Bu konsantrasyondaki misel yapısı hidrofilik başlığın solvante doğru yöneldiği, hidrofobik kuyruğun ise çekirdeğin içinde tutulduğu koloidal bir çözelti içinde dağılan supramoleküler bir yapı olarak tanımlanır (Lee ve Woo, 1995; Soberón-Chávez ve Maier, 2011). Düşük CMC değeri, özellikle kozmetik endüstrisinde kullanılan biosurfektanlar açısından önemlidir. Bu alanda kullanılan ürünlerin temizleme ve köpüklenme özelliği biosurfektanların yüzey aktiviteleriyle doğrudan ilişkili olan önemli özellikleridir (Drakontis ve ark., 2020). Kozmetik ürünlerinin ciltlerde yarattığı sorunlar yüzey aktif maddelerin monomer veya misel formlarına ve konsantrasyonlarından kaynaklanır (Alghamdi ve ark., 2021; González-Penagos ve ark., 2022).



Şekil 2.2. Biosürfektan kritik misel konsantrasyonu oluşturması (Sarubbo ve ark., 2022).

### 2.3.3. Düşük Toksikite

Özellikle gıda, sağlık ve tarım uygulamalarında kullanılan biosürfektanların çevre ve canlılar üzerinde düşük toksisite göstermesi önemli bir avantajdır (Campos, Stamford ve Sarubbo, 2019). Biosürfektanların düşük toksisitesi hızlı biyoyıkımlarından kaynaklanır (Puyol McKenna ve ark., 2024). Yapılan çalışmalarla biosürfektanların çeşitli bitkiler üzerinde toksik etki yaratmaması (Das ve Kumar, 2016; Habib ve ark., 2023) tarım uygulamalarında sentetik pestisitler yerine kullanılabilmesini sağlamaktadır. Diğer yandan, fibroblast büyümlerinde bir engele sebep olamaması (Moldes ve ark., 2021) ve diğer sitotoksikite testlerinde kayda değer bir etkisinin gözlenmemesi (Voulgaridou ve ark., 2021) sebebiyle gelecekte birçok ilaç taşınımı veya doğrudan kullanılabilir ilaç olması beklenmektedir (Rana ve ark., 2021).

### 2.3.4. Hidrofobik Gruplarla Etkileşimi

Mikroorganizmalar ürettikleri biosürfektanlar sayesinde hidrofobik bileşikleri parçalayarak karbon kaynağı olarak kullanabilir (Markande, Patel ve Varjani, 2021). Araştırmacılar biosürfektanların hidrokarbon yıkımındaki önemi üzerine yaptıkları çalışmalarla, mikrobiyal gelişmiş yağ geri kazanımında biosürfektanların bu özelliğinden yararlanabileceğini ortaya koydular (Varjani ve ark., 2015; Satpute ve ark.,



2016). Buna ek olarak, biyosüpfektanlar bu özellikleri sayesinde sağlık (Calabrese ve ark., 2017) ve diğerkirleticilerin temizlendiği biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılmaktadır (Karlapudi ve ark., 2018).

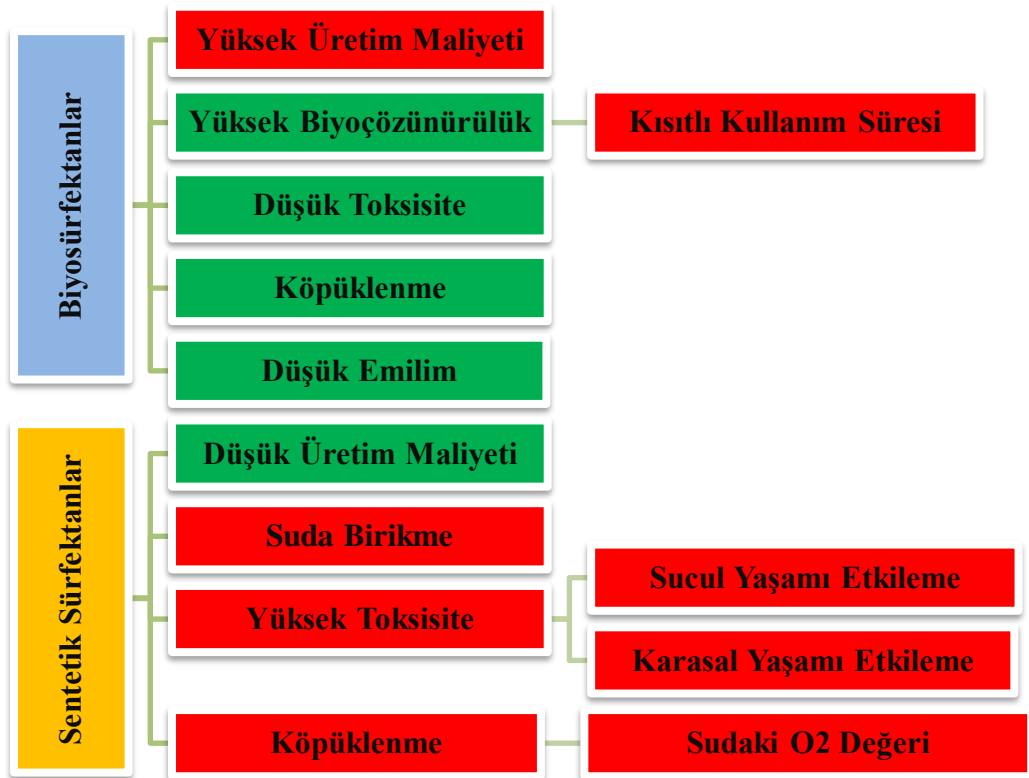
### **2.3.5. Yüzeye Yapışma ve Yapışmanın Giderilmesi**

Mikroorganizmaların temel stratejisi yaşamlarını devam ettirmek için buldukları ortama yerleşmektir. Biyosüpfektanların amfipatik doğası sayesinde mikroorganizmalar hem polar hem de nonpolar yüzeylere tutunabilmektedir (Markande and Nerurkar, 2019). Ayrıca, mikroorganizmalar, ürettikleri biyosüpfektanlarla yüzeyin özelliklerini değiştirerek diğerkirleticilerin yüzeye tutunmasını engelleyebilirler (Neu, 1996; Markande and Nerurkar, 2019). Bunlara ek olarak, biyosüpfektanların antimikrobiyal özellik gösterdiği de bilinmektedir (Sana ve ark., 2018).

### **2.4. Biyosüpfektanlar ve Sentetik Süpfektanlar**

Sentetik süpfektanlar ve biyosüpfektanlar geniş kullanım alanları sebebiyle evlerde ve endüstrilerde günlük olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Johnson ve ark., 2021). Üretim maliyetlerindeki avantaj sebebiyle ürünlerde sentetik süpfektanların kullanılması çeşitli sorunlara sebep olur (Banat ve ark., 2014; Johnson ve ark., 2021; Fernandes ve ark., 2023a). Bazı sentetik süpfektanların kullanımı ile dermatitin ilerlemesi ve göz tahrişinin bağlantılı olduğu kozmetik veya farmasötik ürünlerde, olumsuz etkileri olduğu veya ürünlerle düşük uyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir (Fernandes ve ark., 2023b). Ayrıca diş macunu (Resende ve ark., 2019), kozmetik (Chen ve ark., 2019) ve deterjan endüstrisinde (Yangxin, Jin ve Bayly, 2008) sentetik süpfektan içeren ürünlerin kullanımından sonra atıkların çevreye salınması nedeniyle olumsuz çevresel etkilere neden olur (Johnson ve ark., 2021). Bu noktada, suda biriken sentetik süpfektanların organik kirleticiler olduğu rapor edilmiş ve yüzey sularında tespit edilmiştir (Stuart ve ark., 2012). Endüstriyel, evsel ve tıbbi atık sudaki sentetik süpfektanların moleküler özelliklerinden dolayı su arıtma tesislerinde uzaklaştırılması zorlaşır, bu da artık yüzey aktif madde içeriğinin arıtmadan sonra bile kalmasına neden olur. Ayrıca yüzey aktif maddeler, ağır metaller gibi farklı kirleticilerin yayılmasını da artırarak ekosistem için ekstra sorunlara neden olabilir (Johnson ve ark., 2021). Bu doğrultuda, biyosüpfektanlar, lipitler, şekerler ve proteinler gibi doğal moleküllerden oluşan ve çeşitli canlılar

tarafından üretilen (Johnson ve ark., 2021) biyosürfektanlar sentetik sürfektanlara önemli çevre dostu bir alternatiftir (Jahan ve ark., 2020; Gayathiri ve ark., 2022; Inès ve ark., 2023). Bu eşsiz bileşim onlara daha iyi biyolojik parçalanabilirlik ve daha düşük toksisite gibi tercih edilen özellikler kazandırır. Sentetik yüzey aktif maddeler gibi yüzey özelliklerini de koruyabilmektedirler (Fernandes ve ark., 2023a), bu da kabul edilebilirliklerini arttırmaktadır; genellikle ekolojik bir tehdit oluşturmazlar. Evlerde ve endüstrilerde kullanılan deterjan, sabun ve şampuan gibi maddelerde köpürmeyi sağlayan sentetik sürfektanlar sülfat, sülfonat, fosfat ve karboksilat tuzlarından oluşur (Moldes ve ark., 2021). Sentetik sürfektanların yukarıda bahsedilen dezavantajlarına rağmen kozmetik dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmaya devam edilmesinin (Moldes, 2021) ana sebebi üretim maliyetlerinin düşük ve üretim sürelerinin kısa olmasıdır (de Souza ve ark., 2024). Şekil 2.3.'de biyosürfektanlar, sentetik sürfektanlar ile karşılaştırılarak genel bir avantaj-dezavantaj tablosu verilmiştir. Şekil incelendiğinde, çevre dostu özelliğiyle sentetik sürfektanlara bir alternatif olan biyosürfektanların sınırlı sayıda dezavantajlarının yürütülen çalışmalarla kullanımlarının arattırılması hedeflenmektedir.

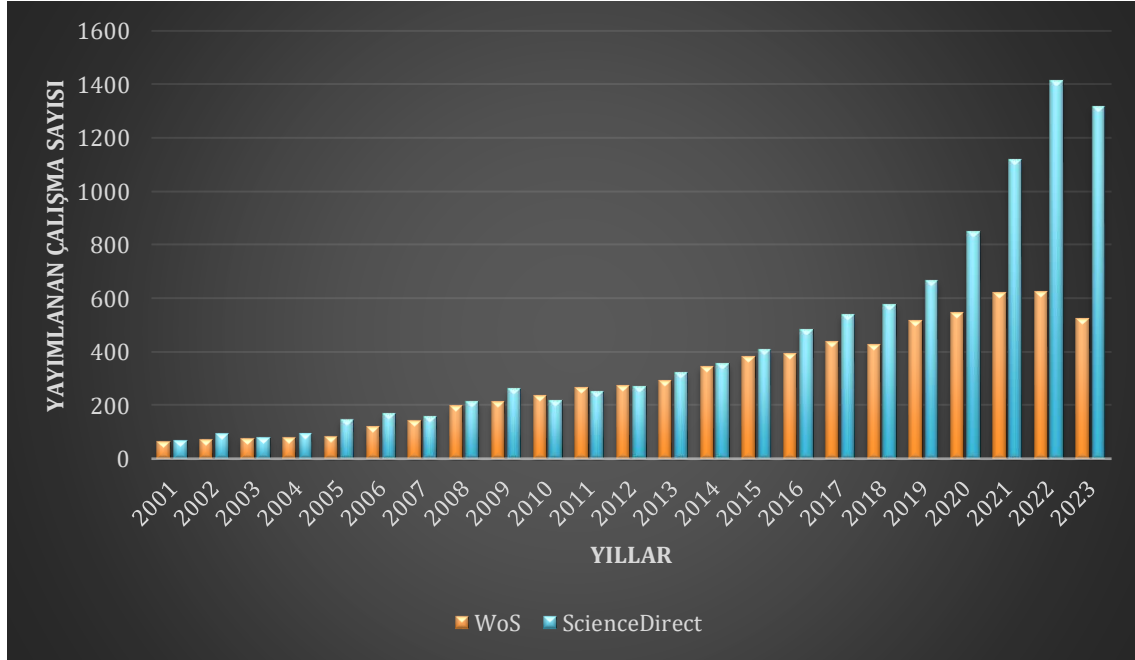


Şekil 2.3. Biyosürfektan ve sentetik sürfektanların karşılaştırılması.

## 2.5. Biosüurfektan alışmalarına Tarihsel Perspektiften Bakış

1949 yılında Jarvis ve Johnson isimli iki bilim insanı tarafından yayımlanan çalışmada (Jarvis ve Johnson, 1949) *Pseudomonas aeruginosa* türü bakteri tarafından üretilen glikolipit türevi bir molekülden bahsedilmektedir. Günümüzde ramnolipid grubu olarak bilinen bu biosüurfektan, literatürde bilinen ilk çalışmadır. Takip eden yıllarda *Ustilago maydis* türü mantarın nitrojen stresi yaşadığı durumlarda ürettiği ustilagic asit 1951 yılında yayımlanan çalışmada (Haskins ve Thorn, 1951) ortaya konmuştur. Günümüzde bu bileşiğın glikolipit olduğu bilinmektedir. 1968 yılında Tulloch isimli bilim insanı ve çalışma arkadaşları *Starmerella bombicola* türü maya üzerine yürüttükleri çalışmada (Tulloch, Spencer ve Deinema, 1968) soforolipit isimli yüzey aktif maddeyi keşfederek literatürdeki ilk biosüurfektan çalışmalarından birini yayımlamıştır. Diğer yandan Arime ve çalışma arkadaşları 1968 yılında yayımladıkları çalışmada (Arima, Kakinuma ve Tamura, 1968) literatürde bir biosüurfektanın ilk defa saflaştırılıp karakterize edilmesiyle çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır. İlerleyen yıllarda kullanılan teknolojilerin ilerlemesiyle paralel olarak geliştirilen cihazlar ve analiz yöntemleriyle söz konusu bu moleküller daha anlaşılır hale gelmeye başlamışlardır. Bu sayede, biosüurfektanlar üzerine yürütölen çalışmalarda bu moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri keşfedilmeye başlanmıştır. Yapılan alışmalar doğrultusunda biosüurfektanların patentlenme yarışı başlanmıştır. Bu bağlamda *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid üretimi üzerine Kaeppli and Guerra-Santos tarafından 1984 yılında ilk patent başvurusu yapılmıştır (Sekhon Randhawa ve Rahman, 2014). 1985 yılında Wagner ve arkadaşları *Pseudomonas* sp'nin biyoteknolojik ramnolipid üzerine ikinci patent başvurusunu yapmıştır (Sekhon Randhawa ve Rahman, 2014). Bu noktada, *Google Patents* arama motorunda “*biosurfactant*” kelimesi aratıldığında günümüze kadar 20 binden fazla biosüurfektan patenti alındığı görölmektedir. Farklı kullanım alanları bulunan biosüurfektanların tarım uygulamalarına yönelik 70, petrol endüstrisinde kullanımına yönelik 179, sağlık endüstrisinde kullanımına yönelik 1794 patent son altı yıl içinde alınmakla birlikte biosüurfektanların en çok patentlendiği alanın 2311 patent ile kozmetik sektörü olduğu görölmektedir (de Oliveira ve ark., 2023). Biosüurfektan sadece endüstrinin değil araştırmacıların da ilgisini çekmektedir. Web of Science (WoS) ve *ScienceDirect* veri tabanlarında “*biosurfactant*” anahtar kelimesi kullanılarak yıllara göre tarama yapıldığında bu molekül üzerine yürütölen çalışmaların her geçen yıl arttığı görölmektedir (şekil 2.4). Özellikle 20. yüzyılın ilk çeyreğinin sonuna gelindiğinde

yayımlanan çalışma sayısında bir sıçrama olduğu göze çarpmaktadır. Bu noktada, son yıllarda endüstriler ve kullanıcılar arasında tercih edilen yeşil üretim teknolojilerinin bu durumun sebeplerinden biri olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 2.4. Yıllara göre yayımlanan biyosümfektan çalışmaları (Tarama Tarihi: 15.05.2024)

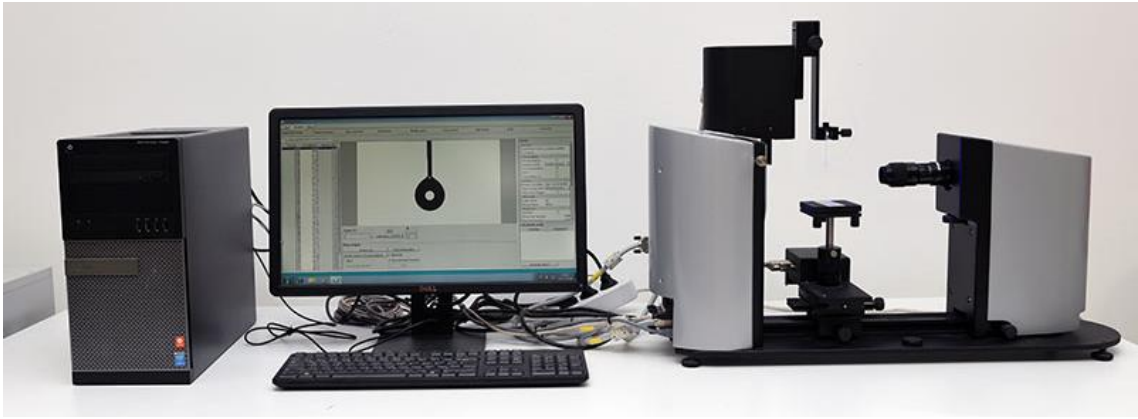
## 2.6. Biyosümfektanların Varlığının Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Biyosümfektan üretimini konu alan çalışmalarda öncelikle çeşitli yöntemler kullanılarak mikroorganizmanın biyosümfektan üretimi incelenir. Bu testler çoğunlukla glikolipitler, lipopeptitler, lipoproteinler, lipopolisakaritler veya fosfolipidler gibi çok çeşitli biyomoleküllerden oluşan biyosümfektanların bu fiziksel özelliklerini hedef olarak tasarlanmıştır (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Araştırmacılar, ilgilendikleri soruna çözüm olarak sunacakları biyosümfektan grubunu incelemek için bu testlerden uygun olanları seçerek çalışmaya başlar.

### 2.6.1. Yüzey Geriliminin Ölçülmesi

Biyosümfektan üretiminin araştırılmasında doğrudan sonuç veren bu yöntem (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010) kültür süpernatantının arayüzey ve yüzey aktivitesinin ölçümüyle yapılır (Youssef ve ark., 2004). Ancak biyosümfektan üretim çalışmalarında

sadece yüzey geriliminin ölçülmesi yeterli değildir. Ortamda bulunan biyosümfektan moleküller arttıkça kritik misel konsantrasyonuna (CMC) eşiğı aşılr ve yüzey geriliminde düşüş görülür (Jahan ve ark., 2020). Bu durum farklı miktarlarda biyosümfektan üreten mikroorganizmaların aslında yüzey gerilimini aynı oranda düşürdüğü algısı yaratır (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Bu soruna ek olarak ölçümler biyosümfektanın iyonik yükü ve kültür süpernatantının pH değeri gibi şartlardan da olumsuz etkilenirler (Satpute ve ark., 2010; Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Ayrıca, bu ölçümün yapılabilmesi için temas açısı ölçüm ekipmanlarına (Şekil 2.5.) gereksinim duyulması maliyeti yükseltmektedir.



**Şekil 2.5.** HUNİTEK'e ait temas açısı ölçüm cihazı (hunitek.hacettepe.edu.tr)

### 2.6.2. Yağ Yayılma Yöntemi

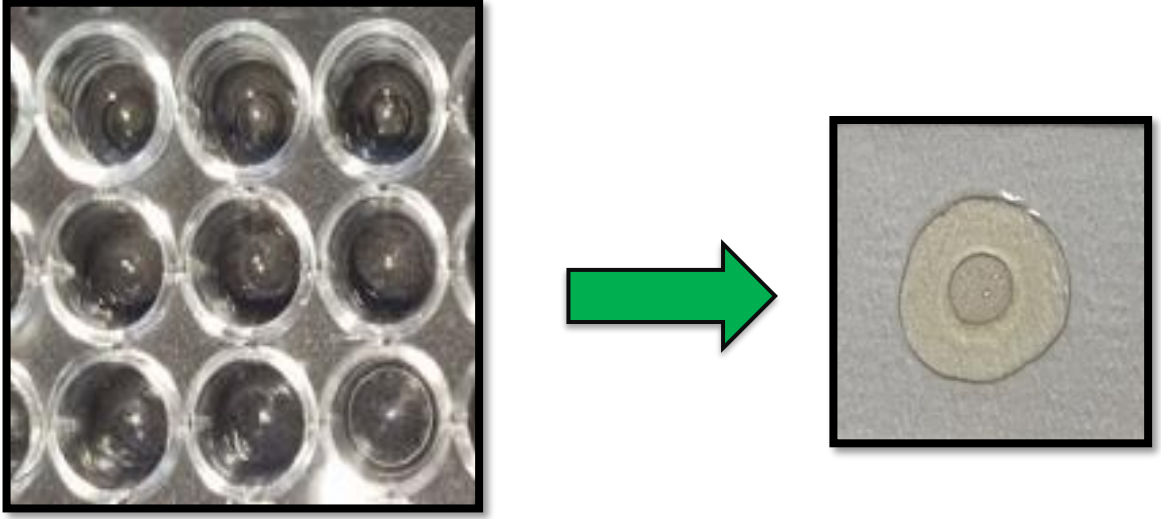
Morikawa ve arkadaşları tarafından 2000 yılında önerilen yağ yayılma yönteminin (Morikawa, Hirata ve Imanaka, 2020) özel bir laboratuvar ekipmanına ihtiyaç olmaması ve hızlı sonuç vermesi (Plaza, Zjawiony ve Banat, 2006) bu yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntem haline getirmiştir (Maneerat ve Phetrong, 2007; Jaysree ve ark., 2011; Zhou ve ark., 2015; Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023; Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023). Buna ek olarak, literatürde en güvenilir metotlardan biri olarak geçen (Youssef ve ark., 2004; Plaza, Zjawiony ve Banat, 2006; Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010) bu yöntemde petri kabında bulunan distile su yüzeyine az miktarda yağ damlatılır. Yağ yüzeyine kültür süpernatantının damlatılmasıyla yağ yüzeyinde yayılma meydana gelmesi (Şekil 2.6.) biyosümfektan varlığını gösterir. Ayrıca, yağ yüzeyinde açılan zonun çapı yağın yer değiştirme aktivitesi olarak da adlandırılan yüzey aktif madde aktivitesiyle ilişkilidir (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010).



**Şekil 2.6.** Yağ yayılma sonucunda biosürfektan pozitif durum.

### **2.6.3. Daralma-Yayılma Yöntemi**

Daralma-yayılma yöntemi 1991 yılında Jain ve arkadaşları tarafından biosürfektan varlığının arayüzey aktivitesine dayanan bir ölçüm olarak geliştirilmiştir (Jain ve ark., 1991). Daha sonra pek çok araştırmacı bu metodu modifiye ederek çeşitlendirmiştir (Bodour ve Miller, 1998; Satpute ve ark., 2008; Mishra ve ark., 2021; Zargar ve ark., 2022). Bu testin çalışma prensibi, kültür süpernatının yağın meydana getirdiği yüzey gerilimi üzerine damlatılarak incelenmesine dayanır (Zargar ve ark., 2022). Damlatılan kültür süpernatantı yüzey aktif madde olan biosürfektan içeriyorsa hidrofobik yüzey arasındaki kuvvet veya arayüzey gerilimi azaldığı için damlada çökme meydana gelir (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Bu yöntemde düşük miktarda kültür süpernatının kullanılarak maliyetsiz ve özel laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duyulmadan yapılması önemli bir tercih sebebidir (Waghmode ve ark., 2016). Bununla birlikte, bu yöntemde 96 kuyucuklu mikrolatelerin kullanılmasına (Şekil 2.7.) bağlı olarak gözlem hataları meydana gelmesi yüzey geriliminin görülememesiyle sonuçlanmaktadır. Bu bağlamda, Zargar ve arkadaşları, daralma-yayılma testinin çalışma prensibine bağlı olarak testin küçük kuyucuklarda değil cam lamalar üzerinde yapılmasını önermiştir (Zargar ve ark., 2022).



Şekil 2.7. Daralma-yayımla testinin iki farklı modifikasyonla sonuçları.

#### 2.6.4. Hemolitik Aktivite Yöntemi

Biyosürefektanların hemolitik aktivite gösterdiği ilk defa 1970 yılında belirlenmiştir (Bernheimer ve Avigad, 1970). Bu bağlamda, 1984 yılında geliştirilen yöntemle de biyosürefektan varlığının araştırılacağı keşfedilmiştir (Mulligan, Cooper ve Neufeld, 1984). Literatürde kanlı agar testi olarak da geçen (Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023) bu yöntemde bazı biyosürefektanların eritrositleri parçalama özelliğinden yararlanır (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Kanlı agar yüzeyine ekimi yapılan taze suşun 37 °C’de 24-48 inkübasyonu sonunda (Zaragoza ve ark., 2010) yüzeyde açılma meydana gelmesi kültürün biyosürefektan ürettiğini göstermektedir (Şekil 2.8.). Ancak kullanılan bu yöntemin bazı biyosürefektanlar üzerinde hatalı sonuç verdiği tespit edilmiştir (Schulz ve ark., 1991). Dolayısıyla, hemolitik aktivite testinin biyosürefektan varlığının araştırıldığı diğer yöntemleri desteklemek amacıyla kullanılması önerilmektedir (Mulligan, Cooper ve Neufeld, 1984; Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010).

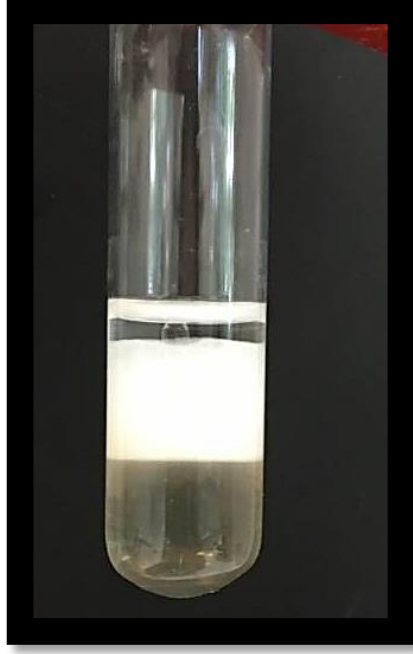


**Şekil 2.8.** Pozitif biyosürefektan varlığında hemolitik aktivite sonucu.

### **2.6.5. Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi Yöntemi**

Kültür süpernatantında biyosürefektan varlığının araştırılması için Cooper ve Goldenberg tarafından 1987 yılında geliştirilen bu metot (Cooper ve Goldenberg, 1987) biyosürefektanın varlığına ek olarak emülsifikasyon yeteneğini (Şekil 2.9.) de ölçmeye yarayan bir tekniktir. Düşük maliyetli olması sebebiyle araştırmacılar tarafından da sıklıkla tercih edilir (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Bu yöntemde yağ maddesi bulunan deney tüpüne eşit hacimde kültür süpernatantı eklendikten sonra karıştırılıp 24 saat beklenir (Saikia ve ark., 2012). Bu sayede kültür süpernatantında biyosürefektan olduğu durumda bir emülsifiye tabaka meydana gelir (Ismail ve ark., 2013). Bu yöntemin çalışma prensibi normal şartlarda birbirine karışmayacak yağ ve su gibi iki sıvının biyosürefektanın yüzey aktif özelliği sayesinde meydana gelen emülsifiye tabakanın ölçümüne dayanır (Sumiardi, Soetarto ve Susilaningih, 2018). Emülsifikasyon yönteminde biyosürefektan varlığının yanı sıra üretilen biyosürefektanın etkinliğinin belirlenmesi açısından diğer yöntemlerden ayıran bir özelliktir. Bu sayede, üretilen biyosürefektanın kullanılabilceği alanlara dair ilk fikirde elde edilmiş olur (Fracchia ve ark., 2012; Sarubbo ve ark., 2022).





**Şekil 2.9.** Biosürfektan pozitif bir ortamda meydana gelen emülsifiye tabaka.

### **2.7. Biosürfektanların Sınıflandırılması**

Biosürfektanların sınıflandırılmasında kimyasal ve biyolojik özellikleri dikkate alınır (Gürkök ve Özdal, 2021). Bu bağlamda biosürfektanlar düşük molekül ağırlık ve yüksek molekül ağırlıklı biosürfektanlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Kashif ve ark., 2022). Düşük molekül ağırlıklı biosürfektanlar, birbirine karışmayan iki sıvı faz arasındaki yüzey gerilimini azaltma yeteneğiyle öne çıkan (Santos ve ark., 2023) glikolipitler, fosfolipitler ve lipoproteinleri içerirken (Kashif ve ark., 2022); yüksek molekül ağırlık biosürfektanlar, sıvı-yağ fazlarında emülsifiye tabakalar meydana getirme yeteneğiyle öne çıkan (Santos ve ark., 2023) lipopolisakkaritler ve polimerik biosürfektanları içerir (Kashif ve ark., 2022). Çizelge 2.1.'de çeşitli mikroorganizma gruplarınca üretilen biosürfektan sınıfları ve türleri verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Biyosümfektan sınıfları ve üretici mikroorganizmaları (Çizelge devam ediyor.).

Grup	Biyosümfektan	Mikroorganizma	Referans
Lipopeptit	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> MG847158.1	Soyuer ve Bilen Özyurek, 2023
	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> CC9	Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023
	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	Zhao, Yang ve Mu, 2012
	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i>	Abdel-Mawgoud, Aboulwafa ve Hassouna, 2008
	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> RB14	Ohno, Ano ve Shoda, 1995
	Sümfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Wu, Zhi ve Xu, 2019
	Sümfaktin	<i>Bacillus safensis</i>	Saggese ve ark., 2018
	İturin	<i>Bacillus subtilis</i> RB14	Rahman, Ano ve Shoda, 2006
	İturin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yu ve ark., 2002
	İturin	<i>Bacillus methyltrophicus</i> TEB1	Kalai-Grami ve ark., 2016
	İturin	<i>Bacillus subtilis</i> NB22	Ohno, Ano ve Shoda, 1993
	Lichenysins	<i>Bacillus licheniformis</i> IM 1307	Grangemard ve ark., 1999
	Lichenysins	<i>Streptomyces</i> sp.	Castaldi ve ark., 2024
	Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0015	Villegas-Escobar ve ark., 2013
	Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i>	Steller ve ark., 1999
	Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i>	Yassen ve ark., 2018
	Pumilacidin	<i>Bacillus mojanensis</i>	Ben Ayed ve ark., 2014a
	Pumilacidin	<i>Bacillus pumilus</i>	Saggese ve ark., 2018

	Esperin	<i>Bacillus megaterium</i>	Ma ve ark., 2018
	Bacillomycin	<i>Bacillus subtilis</i>	Gong ve ark., 2014
	Plipastatin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Gong ve ark., 2015
	Kurstakin	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Béchet ve ark., 2012
	Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>	Clements, Ndlovu ve Khan, 2019
	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Alsohim ve ark., 2014
<b>Glikolipitler</b>	Ramnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reis ve ark., 2011
	Ramnolipid	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Kourmentza ve ark., 2018
	Ramnolipid	<i>Planococcus</i> sp.	Gaur ve ark., 2020
	Ramnolipid	<i>Serratia rubidaea</i>	Nalini ve Parthasarathi, 2013
	Sophorolipid	<i>Starmerella bombicola</i>	Kim ve ark., 2020
	Sophorolipid	<i>Candida bombicola</i>	Elshafie ve ark., 2015
	Sophorolipid	<i>Candida batistae</i>	Kim ve ark., 2021
	Cellobiose lipid	<i>Ustilago maydis</i>	Teichmann ve ark., 2007
	Trehalose lipid	<i>Rhodococcus</i> sp.	White, Hird ve Ali, 2013
<b>Polimerik Biyosümfektanlar</b>	Liposan	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Cirigliano ve Carman 1985; Amaral ve ark., 2006
	Emulsan	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Su, Chen ve Lin, 2009
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Choi ve ark., 1996
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Navon-Venezia ve ark., 1995

### 2.7.1. Lipopeptitler

Peptit amfifilleri olarak da bilinen lipopeptitlerin yapılarında bir ya da iki hidrokarbon zinciri hidrofobik kuyruk kısmını oluştururken; Halkasal veya lineer peptit dizileri

hidrofilik başı meydana getirir (Hamley, 2011). Lipopeptitleri diğer tüm biyosümfektan ailelerinden ayıran en önemli özellik bu hidrofilik baş kısmın en az 1 yüklü amino asit kalıntısı içermesi sebebiyle belirgin biyolojik fonksiyonlara sahip olmasıdır (Liu ve ark., 2020). Bu nedenle, lipopeptit yapıdaki biyosümfektanların biyoteknolojik önemi yüksektir. Örneğin, çoğu lipopeptit türevi sentetik sümfektanlar, sümfaktin ile kıyaslandığında yüzey aktivitelerinin düşük olduğu görülmektedir (Kiran, Thomas ve Selvin, 2010; Liu ve ark., 2020). Sümfaktin (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023), iturin (Wu, Zhi ve Wu, 2019) ve fengisin (Yaseen ve ark., 2018) en bilinen lipoprotein yapıdaki biyosümfektanlardır.

### **2.7.2. Glikolipitler**

Üzerinde çalışma yürütölen en yaygın biyosümfektan grubu glikolipitlerdir (Patel ve ark., 2023). Glikolipitler, yapısal olarak incelendiğinde, bir ya da birden fazla karbonhidrat, bir veya daha fazla yağ asidi, hidroksi yağ asidi veya yağ alkolünden meydana geldiği görülmektedir (Kashif ve ark., 2022). En bilinen glikolipit türevi biyosümfektanlar ramnolipidler (Reis ve ark., 2011), soforolipidler (Elshafie ve ark., 2015), trehaloz lipidler yer alır (White ve ark., 2013). Yüksek yüzey aktivitesi sebebiyle araştırmacılar tarafından endüstriyel uygulamalar için sentetik glikolipit türevleri tasarlamıştır (Liu ve ark., 2020).

### **2.7.3. Polimerik Biyosümfektanlar**

Üzerinde en çok çalışılmış polimerik biyosümfektanlar emulsan ve lipoasandır (Hatha Edward ve Rahman, 2007). Birbirlerinden oldukça farklı yapılarda bulunan bu grup içerisindeki emulsan uzun yağ zincirlerinden meydana gelirken; liposan karbon hidrat ve yağ içeriğinden oluşmaktadır (Hatha Edward ve Rahman, 2007).

## **2.8. Biyosümfektanların Biyoekonomisi**

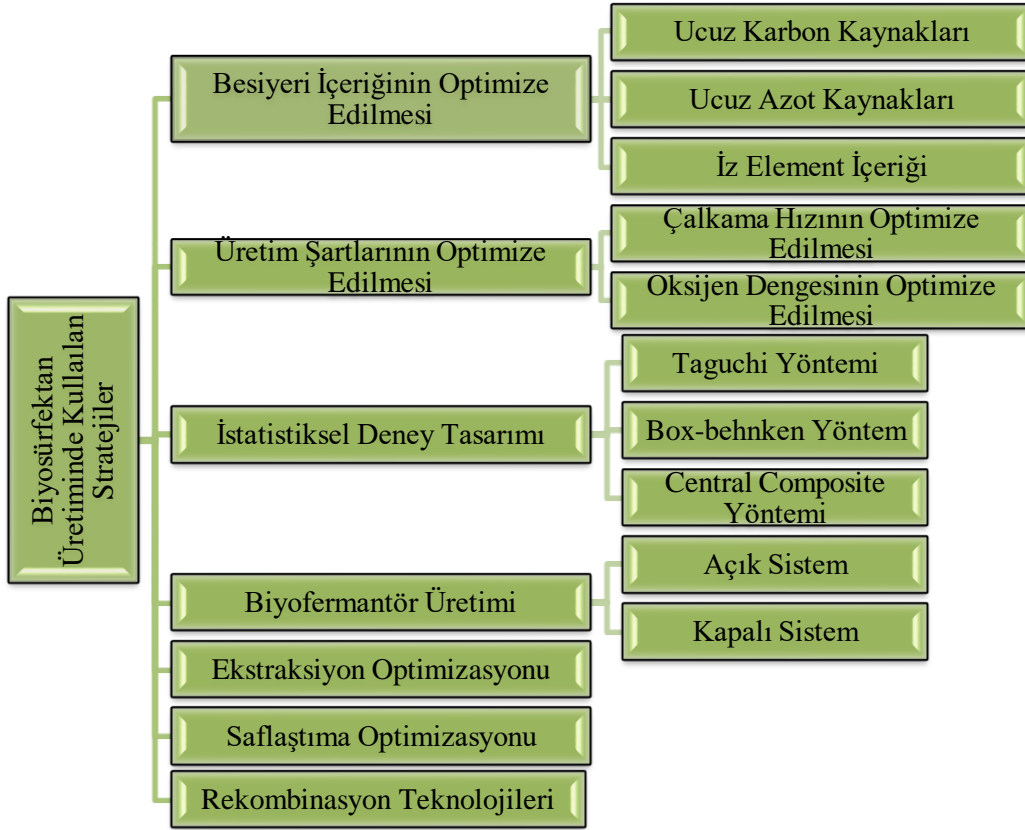
Kullanım çeşitliliği ve çevre dostu bir ürün olması sebebiyle ilgi çeken biyosümfektanların üretimi üzerine farklı ölkelerde kurulmuş özel şirketler bulunmaktadır (Çizelge 2.2.). Türkiye’de TÜBİTAK tarafından 1512 kapsamında kurulmuş bir şirkette bulunmaktadır. Ürünün kullanım alanının çeşitliliği büyük bir pazar hacmi yaratmaktadır. Bu bağlamda, 2019 yılında 39 milyon Amerikan doları tutarındaki pazar hacminin 2025 yılına kadar 52 milyon dolara ulaşması beklenmektedir (Johnson ve ark., 2021).

**Çizelge 2.2.** Biyosüpfektan üreten şirketler.

Ürün	Şirket	Ülke
Sophorolipid	Holiferm	İngiltere
Biyosüpfektan	Locus Fermentation	ABD
Biyosüpfektan	Unilever	Hollanda
Biyosüpfektan	Dispersa	Kanada
Sopholipid	AmphiStar Biosurfactants	Belçika
Ramrolipid	Jeneil	ABD
Biyosüpfektan	AGAE Technologies	ABD
Biyosüpfektan	BASF	Almanya
Ramrolipid	Biotensidon	Almanya
Glycolipid	Frahofer IGB	Almanya
Sophorolipid	Evonik	Almanya
Biyosüpfektan	Hnekel AG & Co. KGaA	Almanya
Sophorolipid	Groupe Soliance	Fransa
Surfactin	Kaneka Co.	Japonya
Biyosüpfektan	UniqueBiotech	Türkiye
Sophorolipid	Evonik Fermas s.r.o	Slovenya
Sophorolipid	MG Intobio Co. Ltd.	Güney Kore
Ramrolipid	Biotensidon GmbH	İsviçre

Bioekonomi, bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve biyolojik atıklar gibi biyolojik kaynaklardan elde edilen ürün ve hizmetlerin etkin ve sürdürülebilir bir şekilde yönetilmesiyle ekonomik büyümenin sağlanabilmesini amaçlar (Aguilar, Twardowski ve

Wohlgemuth, 2019). Çeşitli alanlarda kullanılan yüzey aktif maddeler sentetik ve biyolojik sürfektanlar olarak ayrıldığında biyoekonomi ikinci grup ile ilişkilendirilir. Daha önce verildiği gibi biosürfektanların birçok avantajına rağmen, üretim maliyetleri sebebiyle kullanım ölçeği oldukça sınırlıdır. Bu sebeple, araştırmacılar Şekil 2.10.'da verilen yöntemleri kullanarak üretim maliyetlerini uygun şartlara getirmeyi hedeflenmektedir.



**Şekil 2.10.** Düşük maliyetli biyosürfektan üretiminde kullanılan çeşitli stratejiler.

Bu çeşitli stratejiler arasında biyosürfektanların üretiminde atıkların kullanılması biyoekonominin sürdürülebilirlik ilkesine uymakla birlikte, atıkların ekonomiye değerli ürünler olarak kazandırılmasını da sağlamaktadır (Makkar ve Caeorta, 2002). Bu bağlamda Çizelge 2.3.'te çeşitli atıklar kullanılarak üretilen biyosürfektanlara yer verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Çeşitli atıklar kullanılarak biyosüpfektan üretimi.

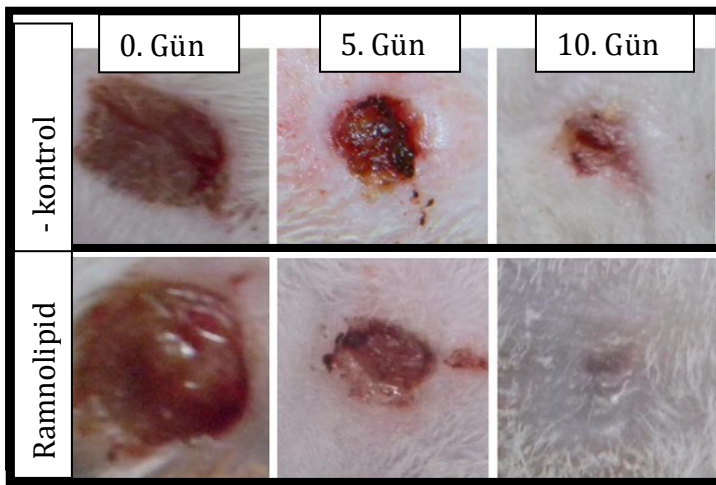
Biyosüpfektan	Üretim (g/L)	Atık Kaynak	Mikroorganizma	Referans
Süpfaktin	0.95	Petrol	<i>Bacillus subtilis</i>	(Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023)
Süpfaktin	0,92	Şeker kamışı küspesi	<i>Bacillus safensis</i>	(Das ve Kumar, 2019)
Lipopeptit	12,34	Melas	<i>Bacillus subtilis</i>	(Verma, ve ark., 2020)
Lipopeptit	0,513	Melas	<i>Bacillus subtilis</i>	(Rane ve ark., 2017)
Lipopeptit	2,43	Melas	<i>L. delbrueckii</i>	(Mouafo, Mbawala ve Ndjouenkeu, 2018)
Lipopeptit	2,29	Hurma melası	<i>Bacillus subtilis</i>	(Al-Bahry ve ark., 2023)
Sophorolipid	115,2	Restoran atıkları	<i>Starmerella bombicola</i>	(Kaur ve ark., 2019)
Lipoprotein	1,9	Atık soya yağı	<i>Streptomyces sp</i>	(Santos ve ark., 2019)
Biyosüpfektan	27.7	Şilempe	<i>Bacillus pumilus</i>	(Oliveira ve Garcia-Cruz, 2013)
Ramnolipid	2,7	Şilempe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Naspolini ve ark., 2017)
Ramnolipid	0,92	PAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Dubey ve Juwarkar, 2001)

## 2.9. Biosümfektanların Kullanım Alanları

### 2.9.1. Sağlık Endüstrisinde Kullanım Alanları

Biosümfektanlar, gen ve ilaç taşınımı, antiviral ajan ve immünobiyolojik alanlarda kullanılabilir (Drakontis ve Amin, 2020). Bu alanlarda biosümfektanların, antimikrobiyal, anti-adhesive özellik göstererek biyofilm yapısını bozma gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır (Gri ve ark., 2019). Sümfektin ve itürin gibi lipopeptit yapıdaki biosümfektanların spesifik toksin ve enzim inhibitörlerini hedef alarak antibiyotik, antiviral ve antitümör ajanı ve immün sistem düzenleyicisi gibi davranabildiği bilinmektedir (Shah ve ark., 2005). *Bacillus* cinsi bir bakteriden elde edilen sümfektinin *K. pneumoniae*'nin biyofilm oluşumunu %95-100 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Soyuer ve Bilen Özyürek 2023).

Son yıllarda biosümfektanlar üzerine yürütülen çalışmalar biosümfektanların yara iyileşmesinde de kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır (Percival ve ark., 2018). Bu noktada, biosümfektanların antimikrobiyal özellik göstermesinin yara iyileşmesi (Şekil 2.11.) gibi özel durumlarda önemli bir avantaj olduğu düşünülmektedir (Sana ve ark., 2018). Lipopeptit yapıda biosümfektan üreten *Acinetobacter junii* suşunun sağlık alanındaki uygulama alanlarını konu alan çalışmada üretilen biosümfektanın kanser geliştiren hücrelere normalden daha fazla toksik etki göstermesiyle hücre büyümesini engellediği ortaya konmuştur (Ohadi ve ark., 2020).



Şekil 2.11. Biosümfektan kullanılarak yara iyileşmesi (Sana ve ark., 2018).



Yapılan bazı çalışmalar özellikle lipopeptit yapıdaki sürfektinin yüksek antiviral özellik gösterdiği belirlenmiştir (Saimmai ve ark., 2020). Biyosürfektanların antiviral özelliklerine yönelik çalışmalar özellikle 2019 yılının sonunda başlayarak tüm dünyayı saran Covid-19 pandemisi sırasında dikkat çekmiştir. İleride tekrar bir viral pandemi yaşanması durumunda, salgınla mücadelede biyosürfektanların kullanılabilirliğini araştıran bir çalışmada *Lactobacillus* ve *Rhodopseudomonas* kültürlerinden elde edilen biyosürfektanın SARS-CoV-2 Delta varyantını %99,9 ve %99,6 inhibe ettiği ortaya konmuştur (Kok ve Nyotohadi, 2024). Biyosürfektanların amfifilik özelliğiyle lipit türevlerini parçalama yeteneğinden yola çıkarak ileride benzer bir pandemi yaşanması durumunda geniş yüzey alanlarının patojenlerden temizlenmesi amacıyla dronlar kullanılarak biyosürfektan püskürtmesi yapılması önerilmektedir (Çelik ve ark., 2021).

### **2.9.2. Petrol ve Madencilik Endüstrisinde Kullanım Alanları**

Petrol endüstrisinde kullanılan biyosürfektanların köpürme özelliklerinden yararlanarak tankların temizliği (Sharma, Lavania ve Lal, 2023), petrol sızıntılarında yüzey temizliği (Saeki ve ark., 2023) ve petrol geri kazanımı (Pereira ve ark.,2013) gibi işlemlerde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, maden endüstrisinde, maden geri kazanımında da kullanıldığı bilinmektedir (Augustyn, Pott ve Radie, 2021). Ayrıca, nanopartikül sentezlerinde sentetik stabilite ajanları yerine biyosürfektanların kullanılması üretim maliyetleri ve ürün kalitesi açısından da avantaj yaratmaktadır (Kumar ve ark., 2010; Rajaboopathi ve Thambidurai, 2019).

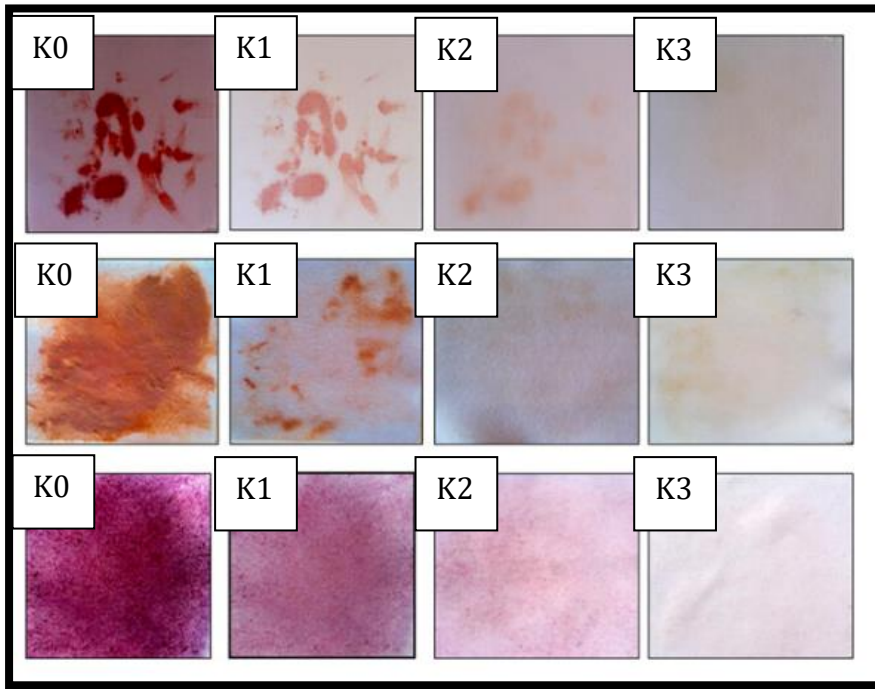
### **2.9.3. Tarım Endüstrisinde Kullanım Alanları**

Biyosürfektan çeşitli özellikleri sebebiyle tarım faaliyetlerinde kullanılan sentetik ürünlere çevre dostu bir alternatif sunmaktadır. Tarım alanlarında mahsulleri korumak amacıyla kullanılan pestisitler toprak ile etkileşime girerek toprak kirliliğine bağlı toprak yapısının değişimi ve yer altı sularında kontaminasyona sebep olma gibi sorunlar meydana getirmektedir (Pérez-Lucas ve ark., 2019). Bu noktada, pestisitlerin aşırı kullanımına bağlı kirlenmelerde, biyosürfektanlar toprakla bağlı bulunan pestisitleri serbest bırakarak mikrobiyal parçalama için uygun hale getirir (Raj, Kumar ve Dames, 2021). Buna ek olarak, biyosürfektanların doğrudan biyo-pestisit olarak kullanılmasına

yönelik çalışmalarda bulunmaktadır (Edosa ve ark., 2018; Halecký ve Kozliak, 2020; Karamchandani ve ark., 2022).

#### 2.9.4. Deterjan Endüstrisinde Kullanım Alanları

Günlük hayatımızda sıklıkla kullandığımız çamaşır deterjanlarının içerisindeki yüzey aktif maddelerin neredeyse tamamı sentetiktir (Fakruddin, 2012). Bu bağlamda, biyosüfektanların düşük toksisiteleri ve ciltte tahriş meydana getirmemeleri (Fei ve ark., 2020) sayesinde deterjan formülasyonlarında kullanımı önerilmektedir (Bouassida ve ark., 2018). Özellikle *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen lipopeptit yapıdaki biyosüfektanların değişen sıcaklık ve pH gibi durumlarda kararlılığını sürdürmesi deterjan endüstrisinde kullanımı açısından oldukça önemlidir (Mukherjee, 2007). Şekil 2.12.'de verilen çalışmada, kan, pancar suyu ve çikolata gibi zor çıkan lekeler üzerinde yapılan çalışmayla formülasyonlarda biyosüfektan kullanıldığı durumlarda (K3) lekelerin diğer gruplara kıyasla daha çok giderildiği görülmektedir.

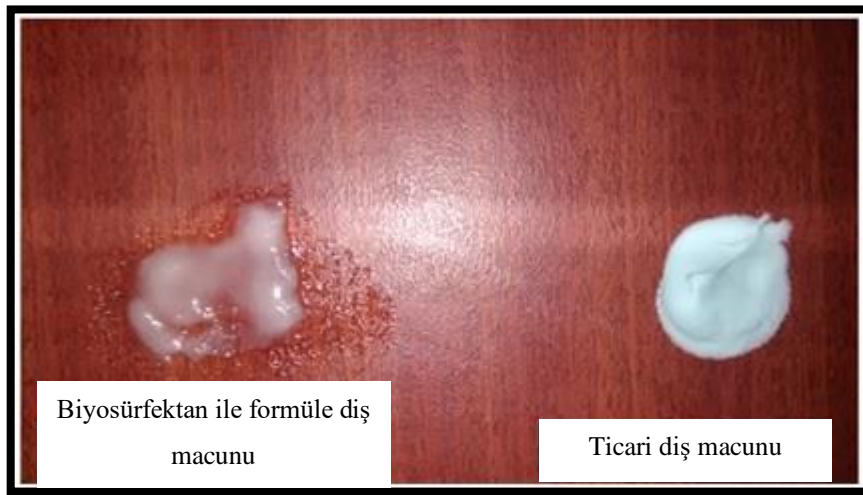


Şekil 2.12. Lekelerin biyosüfektan kullanılan deterjan ile giderimi (Bhange, Chaturvedi ve Bhatt, 2016).

K0: İşlem görmemiş lekeli kumaş; K1: Suda yıkanmış lekeli kumaş K2: SDS ile yıkanmış kumaş K3: biyosüfektan kullanılan formülasyonla yıkanan kumaş.

### 2.9.5. Kozmetik Endüstrisinde Kullanım Alanları

Kozmetik endüstrisi, biyosülfektanların en çok kullanıldığı alanların başında gelmektedir (Moldes ve ark., 2021). Kozmetik endüstrisinde üretilen ürünlerin yapıları müşteriler açısından önemlidir. Dolayısıyla firmalar, ürünlerinin viskozitesini ve su tutma kapasitesini biyosülfektanların, emülsifikasyon, köpürme, ıslatma gibi özelliklerini kullanarak ayarlayabilirler (Ambaye ve ark., 2021). Bu özelliklerine ek olarak, kozmetik ürünlere bağlı cilt tahrişlerinin ana sebebi olan sülfektanlar yerine yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip biyosülfektanların kullanılabilir olması özellikle bazı durumlarda değerlidir (Kashif ve ark., 2022). Diş macunu formülasyonu (Şekil 2.13.), yüz temizleme ürünleri, şampuan, sabun, lens solüsyonları, bakım ürünleri ve tıraş sonrası losyonlar biyosülfektanların en sık kullanıldığı alanlar arasındadır (Ambaye ve ark., 2021; Kashif ve ark., 2022)



Şekil 2.13. Diş macunu uygulaması (Das, Ambust ve Kumar, 2018).

Antimikrobiyal özelliğine sahip kitosan ve biyosülfektan kullanılarak üretilen diş macunu formülasyonu çeşit diş sorunlarının sebebi olan *S. mutans* üzerinde inhibisyon meydana getirerek etkili ve toksik olmayan çevre dostu bir üretim sağlandığı belirtilmiştir (Resende ve ark., 2019). Ayrıca yürütülen başka bir çalışmayla lipopeptit yapıda biyosülfektan kullanılarak üretilen diş macununun, yüksek köpürme özelliğine ek olarak önemli sağlık sorunlarına sebep olan *Salmonella typhimurium* üzerinde antimikrobiyal özellik gösterdiği saptanmıştır (Bouassida ve ark., 2017).

## 2.9.6. Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Biyosürefektanlar çeşitli özellikleri sayesinde gıda endüstrilerinde kullanılabilir. Örneğin mayonez ve salata sosu gibi ürünlerde kıvam artırıcı olarak kullanıldığında ürünlerde 1 aylık depolamadan sonra bile yoğun kıvamda olduğu saptanmıştır (Campos, Stamford ve Sarubbo, 2019). Şekil 2.14.'te verilen çalışmada bitkisel yağlar kullanılarak üretilen kek formülasyonunda bitkisel yağlar yerine sadece biyosürefektan kullanıldığı durumda son üründe bir fark meydana gelmediği belirlenmiştir (Silva ve ark., 2020). Buna ek olarak, *Bacillus subtilis* tarafından üretilen lipopeptit yapıdaki biyosürefektanın ekmek formülasyonunda kullanılması, ekmeğin yapısında görsel iyileşme sağlanmasının yanı sıra bozulma süresinin de arttırıldığı bilinmektedir (Ribeiro, Guerra ve Sarubbo, 2020a). Ayrıca, biyosürefektanların gıda korunumu (Sharma ve ark., 2018) ve raf ömrü uzatma (Mnif ve ark., 2012) gibi kullanım alanları da bulunmaktadır.



Şekil 2.14. Farklı biyosürefektan konsantrasyonlarıyla üretilen kekler (Silva ve ark., 2020).

## 2.10. Çalışmada Kullanılan Atıklar

### 2.10.1. Şilempe

Şilempe, pancar ve şeker kamışı gibi şeker bitkilerinden; Mısır, buğday ve pirinç gibi nişasta bitkilerinden veya artık hasat ürünleri, kereste gibi selülozik materyallerden etanol üretimi işlemlerinde meydana gelen son yan üründür (Christofolletti ve ark., 2013). Farklı materyallerden elde edilen şilempenin içeriği değişkenlik gösterebilmektedir (Stemme ve ark., 2005). Çalışmamızda kullanılan pancar şilempesinin içeriği Çizelge 2.4'te

verilmiştir. Buna ek olarak şilempenin içeriğinde 1,98 g/L glukoz ve 1,97 g/L fruktoz olmak üzere düşük konsantrasyonlarda monosakkaritler içerdiği de bilinmektedir (Reis ve ark., 2020). Ayrıca, içeriğinde lizin, histidin, serine, alanin, valin, lösin ve prolin gibi çeşitli amino asitlerce zengin bir içeriğe sahiptir (Fernandes, Messias ve ark., 2017). Yürütülen bir çalışmayla, herhangi bir işlem uygulanmamış şilempe içeriğindeki şeker bileşenlerinin daha yüksek olduğu ortaya koymuştur (Ferreira ve ark., 2011). Çalışmalarda kullanılacak atık kaynağının doğru seçilmesi önemlidir. Örneğin elde edildikleri kaynaklara göre içeriği farklılık gösteren şilempenin, soya fasulyesinden elde edildiği durumda içeriğinde glukoz, sukroz ve fruktoz içermediği ancak yüksek miktarda raffinöz içerdiği bildirilmiştir (Karp, Soccol ve Tholozan, 2009). Biyoteknolojik süreçlerde biyoyakıt eldesi (Parsaee, Kiani ve Karimi, 2019), biyopolimer üretimi (Ventorino ve ark., 2019) ve biyosüpfektan üretiminde (de Lima ve de Souzaa, 2014) atık kaynak olarak kullanılmaktadır.

**Çizelge 2.4.** Çalışmada kullanılan pancar şilempesi içeriği.

<b>İçerik</b>	<b>Oran (%)</b>
<b>pH</b>	6,50
<b>Kalsiyum</b>	1,02
<b>Sodyum</b>	3,28
<b>Potasyum</b>	5-5,5
<b>Azot</b>	3-3,5
<b>Protein</b>	19-22
<b>Klor</b>	10
<b>Kül</b>	25-30

### 2.10.2. Melas

Şeker endüstrisinin diğer bir yan ürünü olan melasın, koyu bir rengi ve yoğun şeker içeriği vardır (Jamir ve ark., 2021; Adbhai ve ark., 2022). Şeker kamışı veya şeker pancarından elde edilmesine göre içeriği değişebilen (Palmonari ve ark., 2020) melas çeşitli vitaminler ve amino asitler içerir (Stemme ve ark., 2005). Çalışmamızda kullandığımız şeker kamışı melasının içeriği Çizelge 2.5'te verilmiştir. Buna ek olarak melasın 3,88 g/L glukoz ve 5,29 g/L fruktoz olmak üzere yüksek konsantrasyonlarda monosakkaritler içerdiği bilinmektedir (Reis ve ark., 2020). Melas, etanol üretimi (Reddy ve ark., 2005), biyopolimer üretimi (Thomsen ve ark., 2005) ve biyosülfektan üretiminde (Solaiman ve ark., 2004) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan melas içeriği.

İçerik	Oran (%)
pH	6,1
Sukroz	49,8
İnvert şeker	52,88
Kalsiyum	0,15-0,7
Nitrojen	0,2-2,8
Kül	4-10
Potasyum	2,2-4,5
Kükürt	0-0,0007

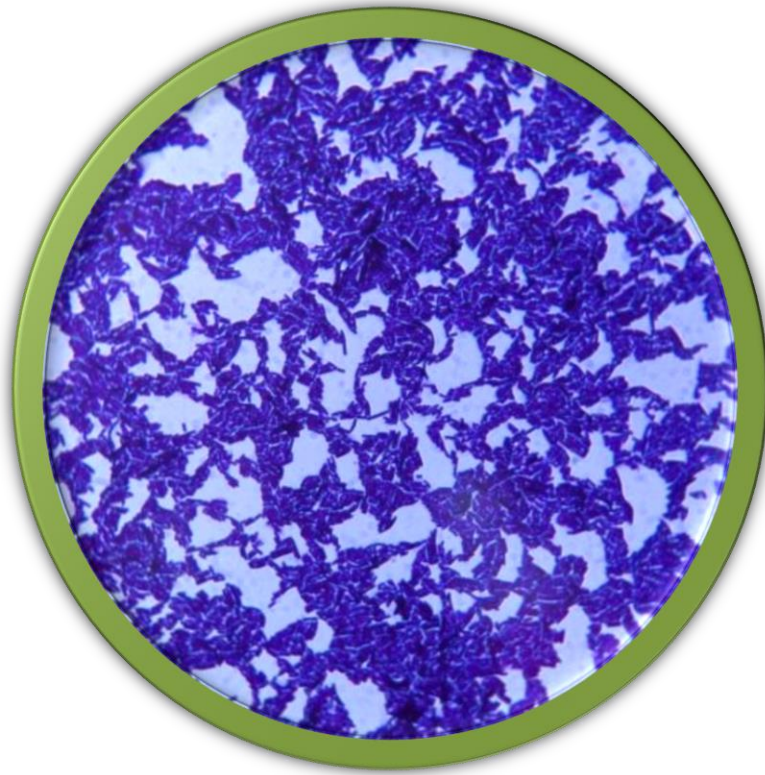
### 2.10.3. PAS

Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında ortaya çıkan bir yan üründür (Mollea, Marmo ve Bosco, 2013). Peynir altı suyu içeriği elde edildiği süt türüne göre farklılık gösterebilir (Smithers, 2008). Bununla birlikte, genelde %4.5-5.0 laktoz, %0.6-0.8 protein ve %0.5-1.0 yağ bulunurken (De Wit, 2001); kalsiyum ve fosfor gibi mineraller açısından

zengindir (Jelen, 2011). Biyoteknolojik üretim süreçlerinde biyoplastik üretiminde (Pescuma, de Valdez ve Mozzi, 2015) ve biyosülfektan üretiminde (Maneerat, 2015) peynir altı suyu kullanıldığı bilinmektedir.

### 2.11. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Her ortama adapte olabilen *Bacillus* türleri çubuk şeklinde, endospor oluşturan aerobik veya fakültatif anaerobik, Gram-pozitif bakterilerdir (Şekil 2.15.) (Turnbull, Kramer ve Melling, 1996).

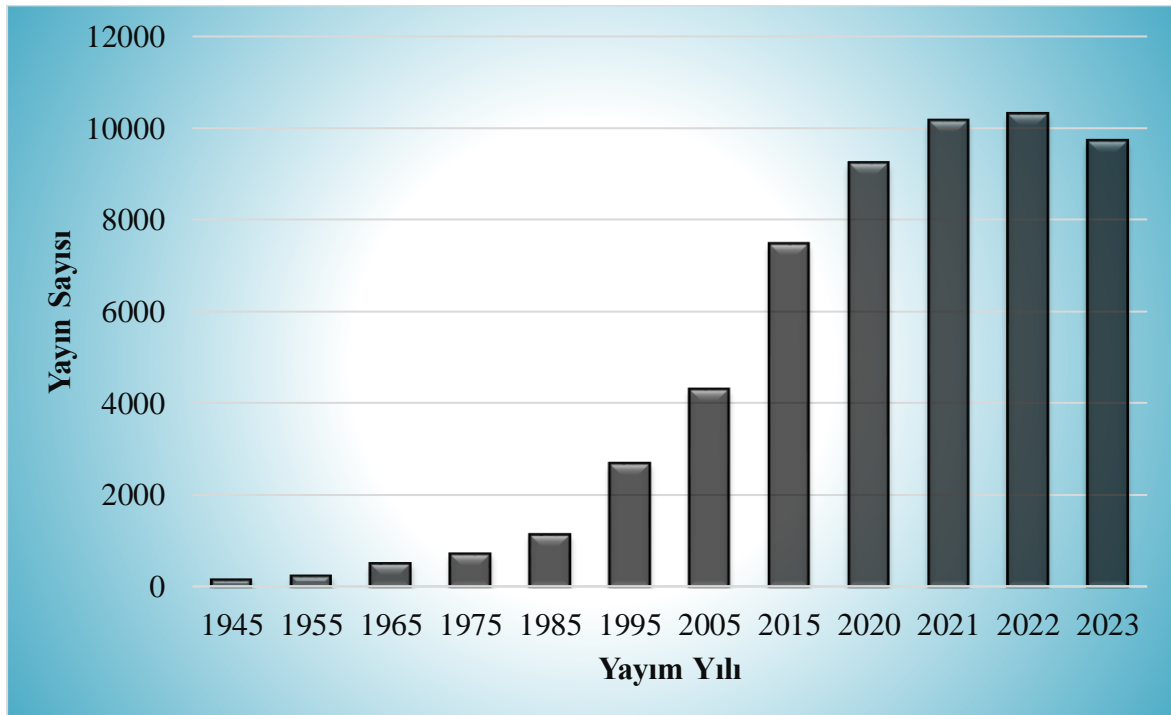


**Şekil 2.15.** 100 x büyütme altında *Bacillus* suşlarının mikroskopik görüntüsü (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).

*Bacillales* takımına bağlı *Bacillaceae* ailesinin üyelerinin ısıya, radyasyona, kimyasallara ve kuraklık gibi yüksek strese sebep olan çevre şartlarına karşı oluşturdukları endospor yapıları, bu aileye ait bakterilerin olumsuz koşullarda uzun süre hayatta kalmalarını sağlar. Günümüze kadar yürütülen çalışmalara göre petrol sahaları (Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023) tortul kayaçlar (Sass ve ark., 2008) ve derin deniz (Bilen Özyürek, 2024)



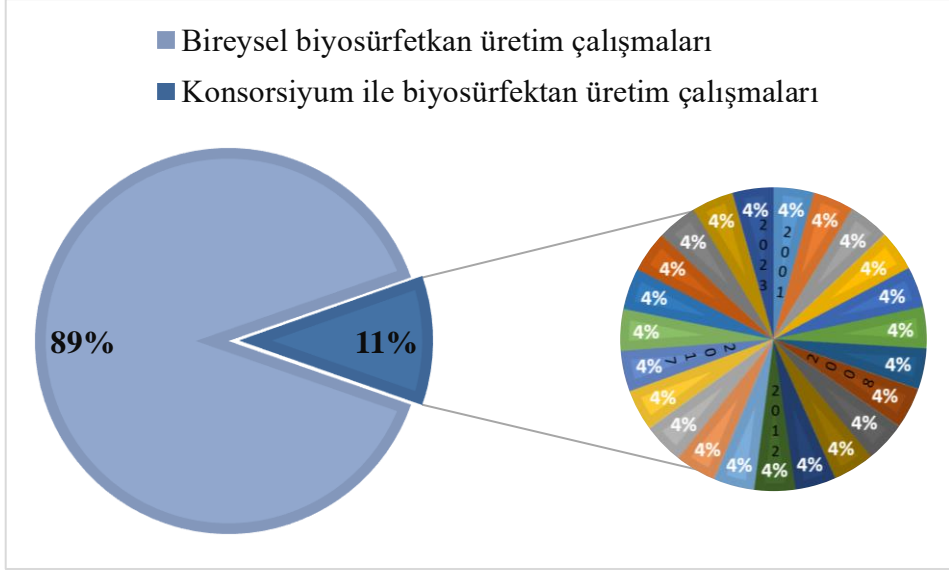
gibi çeşitli ekosistemlerden izole edilmelerinin yanı sıra Kennedy Uzay Merkezi'ndeki kontaminasyondan arındırılmış odalardan (Vaishampayan ve ark., 2010), aşı üreten şirketlerin temiz odalarından (Seiler, Wenning ve Scherer, 2013) ve insan kanı (Bottone, 2010) gibi alışılmışın dışında ortamlardan da izole edildikleri literatürde bildirilmiştir. Çeşitli ortamlarda hayatta kalabilme özellikleri sayesinde *Bacillaceae* ailesinin üyeleri biyoteknolojik açıdan oldukça değerlidir. Bu noktada, *Bacillus* türleri ile yürütülen çalışmaların yıllara göre dağılımı Şekil 2.16.'da verilmiştir.



Şekil 2.16. *Bacillus* suşları ile yayımlanan çalışmalar.

Lipopeptit yapıda biyosüpfektan üretimi içinde çeşitli *Bacillus* suşları kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1997; Chen ve ark., 2017; Geissler ve ark., 2019). ScienceDirect ve WoS arama motorlarından elde edilen verilere göre 2001-2023 yılları arasında yürütülen biyosüpfektan çalışmalarının %89'u bireysel *Bacillus* üretimleri ile yapılırken sadece %11'i konsorsiyumlar ile üretimi hedeflemiştir (Şekil 2.17.).





şekil 2.17. 2001-2023 yıllarında yayımlanan biyosüpfetkan çalışmalarının dağılımlı.

Bizim çalışmamızda konsorsiyum ile biyosüpfetkan üretimi hedefimiz doğrultusunda *Bacillus subtilis* ve *Bacillus halotolerans* suşları (şekil 2.18.) kullanılmıştır.



şekil 2.18. Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşları.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Bu çalışma kapsamında yürütülen deneylerde kullanılan kimyasallar ve besiyerleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar ve çözücüler (Çizelge devam ediyor.).

	Madde	Marka	Üretici Ülke
Besiyerleri	Nutrient Agar Besiyeri	Condalab	İspanya
	Nutrient Broth Besiyeri	Condalab	İspanya
	Bushnell Haas Broth Besiyeri	Condalab	İspanya
	Beyin-Kalp İnfüzyon Besiyeri	Sigma-Aldrich	ABD
Takviyeler	Peynir Altı Suyu (PAS)	Markasız	Türkiye
	Şilempe	Markasız	Türkiye
	Maya Özütü	Condalab	İspanya
	Melas	Markasız	Türkiye
	Glukoz	Isolab	Almanya
İz Element	Çinko Sülfat	Merck	Almanya
	Demir (II) Amonyum Sülfat Hekzahidrat	Merck	Almanya
	Bakır (II) Sülfat Pentahidrat	Merck	Almanya
	Mangan (II) Sülfat Monohidrat	Merck	Almanya
	Borik Asit	Merck	Almanya
	Fosforil Molybdenum Oksit Hidrat	Merck	Almanya
	Sitrik Asit	Isolab	Almanya

Çözücüler	Dimetil Sülfoksit	Merck	Almanya
	Hekzan	Merck	Almanya
	Kloroform	Merck	Almanya
	Metanol	Merck	Almanya
Tamponlar	PBS	Sigma-Aldrich	ABD
	Sodyum Hidroksit	Supelco	ABD
	Hidroklorik Asit	Isolab	Almanya
Boyalar	Anthron Reaktifi	CDH	Hindistan
	İyot	CDH	Hindistan
	Ninhidrin Reaktifi	CDH	Hindistan
Diğer	Triton X:100	Sigma-Aldrich	ABD
	Parafin	Merck	Almanya
	<i>n</i> -heptan	Merck	Almanya
	Gliserol	Sigma-Aldrich	ABD

### 3.2. Çalışmada Kullanılan *Bacillus* Suşları ve Saklanmaları

Bu çalışma kapsamında, daha önce çeşitli çalışmalarda izole edilip tanımlanan ve Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda -20 °C'de stoklanan *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ON012959.1 ve *Bacillus velezensis* MT649755.1 suşları kullanıldı. Bu suşların -20 °C'deki stoklarından 50 µL alınarak canlandırma amacıyla hazırlanan %1 (w/v) glukoz (Isolab) içeren Nutrient Broth (NB) (Condalab) besiyerine ekimleri yapıldı. Kültürler, 48 saat boyunca 37 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde (Miprolab MCI1205) üretildi.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra *Bacillus* kültürlerinden 50 µL alınarak %1 (w/v) glukoz içeren Nutrient Agar (NA) (Condalab) besiyerine tek koloni ekimleri yapıldı. 37

°C’de statik inkübatörde (Memert UNB100) 24 saatte üretilen bakteriyel suşlara ait petrilere alınan tek koloniler Gram boyama ile mikroskopik (Olympus BX51) olarak incelenirken koloni mikroskopuyla (Leica EZ4) koloni morfolojileri kontrol edildi. Suşların canlılığının korunması ve olası kontaminasyonları da önlemek amacıyla iki hafta arayla %1 (w/v) glukoz içeren NA besiyerine pasajlama işlemi gerçekleştirilen kültürler 4 °C’de buz dolabında (Bosh KDV52X00NE) saklandı. Buna ek olarak suşların uzun süre saklanması amacıyla %10 (v/v) gliserol (Sigma-Aldrich) içeren Beyin-Kalp İnfüzyon (BHI- Brain Heart Infusion) (Sigma-Aldrich) besiyerinde 37 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde üretilen suşlar 4 gün süren inkübasyon sonunda -24 °C’de derin dondurucuda (Vestel CD6001 E) saklandı.

### **3.3. *Bacillus* Suşlarının Biyosümfektan Üretim Besiyerine Ekimi ve Üretim Koşulları**

#### **3.3.1. Biyosümfektan Üretiminde Araştırılmasında Kullanılan Modifiye Besiyerinin Hazırlanması**

Biyosümfektan üretim ortamı için ticari Bushnell Haas (BH) dehidre besiyeri (g/L: MgSO<sub>4</sub> 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.02, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0, FeCl<sub>3</sub> 0.05), %2 glukoz (w/v), %1 maya özütü (w/v) ve %0.1 (v/v) iz element ile Çizelge 3.2’de belirtildiği şekilde modifiye edilerek hazırlandı. Modifiye BH besiyerine ilave edilen iz element içeriği ise Çizelge 3.3’te açıklandı. 250 mL hacimli Erlenmeyerlerde 50 mL hacimde hazırlanan modifiye besiyerinin pH değeri 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH tamponları kullanılarak pH 7.0±0.3 olacak şekilde ayarlandı (Hanna Instruments HI 2210) ve 110 °C sıcaklıkta 25 dakikada steril edildi (ALP CLG-32L).

**Çizelge 3.2.** Biyosümfektan üretiminde kullanılan modifiye BH besiyeri içeriği.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Ticari Dehidre Bushnell Haas Broth Besiyeri	3.27 g/L
Maya Özütü	%1 (w/v)
Glukoz	%2 (w/v)
İz Element	%0.1 (v/v)

**Çizelge 3.3.** Modifiye BH besiyerinde kullanılan iz element içeriği.

Kimyasal Adı	Kimyasal Formülü	Miktar (g/L)
Çinko Sülfat	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25g
Demir (II) Amonyum Sülfat Hekzahidrat	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5g
Bakır (II) Sülfat Pentahidrat	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.25g
Mangan (II) Sülfat Monohidrat	MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	0.25g
Borik Asit	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.25g
Fosforil Molybdenum Oksit Hidrat	H <sub>3</sub> P(Mo <sub>3</sub> O <sub>10</sub> ).H <sub>2</sub> O	0.25g
Sitrik Asit	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	25g

### 3.3.2. *Bacillus* Suşlarının Biyosümfektan Üretim Besiyerine Ekimi ve Üretimi

4 °C'deki stoklarından alınan *Bacillus* suşları %1 (w/v) glukoz içeren NB besiyerine ekilerek 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde gece boyu üretime bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüm kültürler 3082 x g ve 4 °C'ye ayarlanmış santrifüjde (Eppendorf 5810R) 10 dakika çöktürüldü. Bu sayede, pelet ve süpernatant fazlarına ayrılan kültürlerin süpernatantları atıldı ve hücre peletleri 10 mM pH 7.0±0.3 steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline) (PBS) ile iki kez yıkanarak çeşitli kalıntıların uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla bakteriyel suşların bulanıklıkları 1.1±0.2 OD'de 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL (colony forming unit-koloni oluşturan birim) olacak şekilde, 600 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700), kör tüp olarak belirlenen PBS'e karşı okundu. Üreme bulanıklarının eşitlenmesinde pH 7.0 ±0.3 olarak ayarlanmış steril PBS kullanıldı.

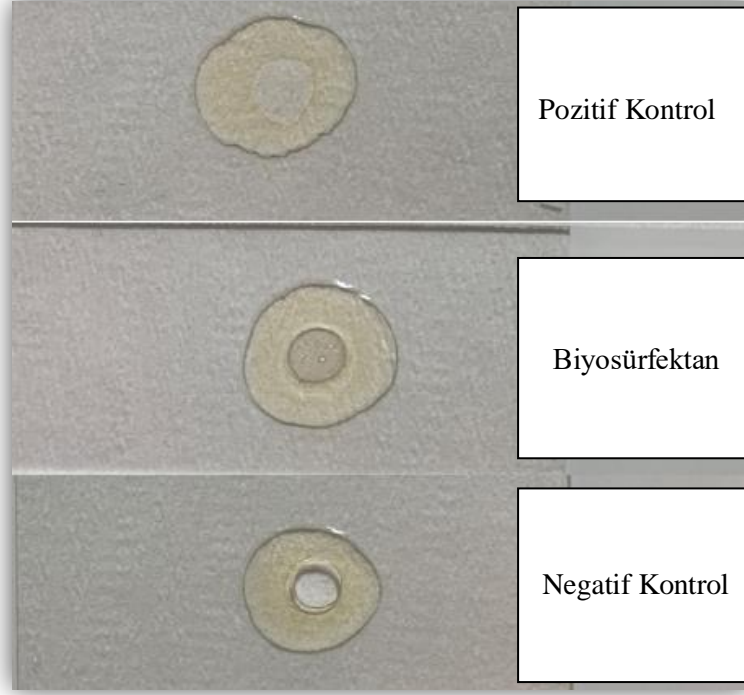
Üreme bulanıkları eşitlenen *Bacillus* suşları, ayrı ayrı %4 (v/v) oranında alınarak bölüm 3.3.1.'de belirtilen şekilde hazırlanan steril modifiye BH besiyerine ekildi. Biyosümfektan üretimi 7 gün boyunca 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde gerçekleştirildi.

### **3.4. Biosurfektan Varlığının Araştırılması**

Biosurfektan varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen 7 günlük üretimin ardından, Erlenmeyerlerde bulunan kültürler 50 mL hacimli steril santrifüj tüplerine alınarak 3082 x g ve 4 °C'ye ayarlanan santrifüjde 60 dakikada çöktürüldü. Bu sayede elde edilen kültür süpernatantları steril beherlere alındı. Elde edilen hücre içermeyen kültür süpernatantlarında (HKS), biosurfektan varlığının araştırılmasında literatüre paralel olarak seçilen daralma yayılma, yağ yayılma ve emülsifikasyon indeksi aktivitesi ( $E_{24}$ ) yöntemleri kullanıldı. Biosurfektan varlığının araştırıldığı tüm basamaklarda Triton X:100 sentetik pozitif kontrol olarak kullanırken biyolojik kontrol olarak *Bacillus subtilis* MG847158.1 tarafından üretilerek karakterize edilen surfaktin isimli biosurfektan (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023) kullanıldı; distile su ve steril modifiye BH besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm çalışmalar 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirildi.

#### **3.4.1. Biosurfektan Varlığının Daralma Yayılma Yöntemiyle Araştırılması**

Zargar ve arkadaşları tarafından önerilen (Zargar ve ark., 2022) daralma-yayılma yöntemine uygun olarak farklı lamlara damlatılan 50 µL parafin, zeytin yağı ve ayçiçek yağı üzerine 50 µL HKS damlatıldı. Bu doğrultuda, damlada 1 dakikadan daha kısa sürede çökme meydana gelmesi dört artı (++++), 1-3 dakika arasında meydana gelen çökmeler üç artı (+++), 3-5 dakika arasında meydana gelen çökme iki artı (++) ve 5 dakikadan fazla sürede meydana gelen çökmeler bir artı (+) olarak değerlendirildi.



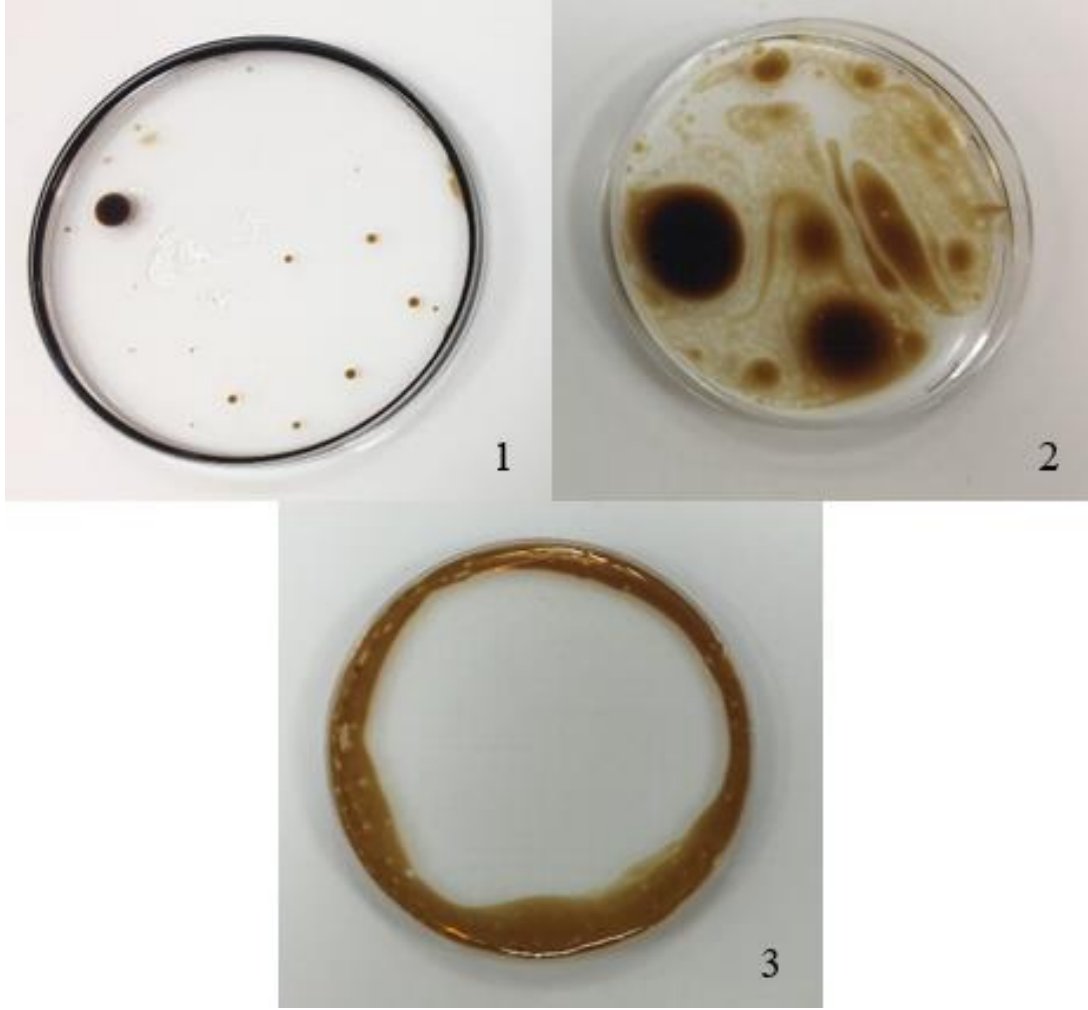
**Şekil 3.1.** Biyosürfektan varlığının daralma yayılma yöntemi ile belirlenmesi.

Üstten aşağıya sırasıyla: Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X:100, biyosürfektan içeren HKS ve negatif kontrol olarak kullanılan distile su.

### 3.4.2. Biyosürfektan Varlığının Yağ Yayılma Yöntemiyle Araştırılması

Kumar ve arkadaşları tarafından önerilen (Kumar, Dubey ve Maheshwari, 2016) yağ yayılma yöntemine (Şekil 3.2.) paralel olarak, 30 mL distile su bulunan petrilerin yüzeylerine iki farklı sondaj kaynağından elde edilen petrol, ayçiçek yağı ve zeytin yağı 0.5 mL olacak şekilde bırakıldı. Ardından yağ damlasının yüzeyine damlatılan 0.5 mL HKS'nin meydana getirdiği yayılma zonları cetvel yardımıyla ölçüldü. Ölçümler aşağıda verilen formül kullanılarak değerlendirildi:

$$\text{HKS'nin Yağ Yayma Etkisi (\%)} = \frac{\text{HKS Etkisiyle Meydana Gelen Zon Çapı}}{\text{İlk Zon Çapı}} \times 100$$



**Şekil 3.2.** Biosüurfektan varlığının yayılma yöntemi ile belirlenmesi.

1. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X:100; 2. negatif kontrol olarak kullanılan distile su;
3. biosüurfektan içeren HKS.

### **3.4.3. Biosüurfektan Varlığının Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi ( $E_{24}$ ) Yöntemiyle Araştırılması**

Emülsifikasyon indeksi aktivitesi yöntemi, iki sıvı fazın emülsifiye edici bir ajan tarafından dağılması yeteneğinin ölçüldüğü bir deney basamağıdır (Şekil 3.3.). Emülsifikasyon aktivitesi yöntemiyle biosüurfektan varlığı Płaza ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle araştırıldı (Płaza, Zjawiony ve Banat, 2006). Bu doğrultuda, içinde biosüurfektan olduğu düşünölen HKS'nin emülsifiye aktivitesinin belirlenmesi için 2 mL HKS ve 2 mL hidrokarbon kaynağı 1:1 (v/v) oranında 10 mL hacimli cam deney tüplerine alınarak 2 dakika boyunca vorteks (IkA Vortex Genius 3) yardımıyla



karıştırıldı. Bu işlemin ardından deney tüplerinin ağzı tampon ile kapatılarak 30 °C sıcaklığa ayarlanmış statik inkübatörde 24 saat boyunca tutuldu. 24 saat sonunda meydana gelen emülsifiye tabakalar cetvel yardımıyla nicel olarak ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak emülsifikasyon indeksi aktivitesi tespit edildi:

$$E_{24} (\%) = \frac{\text{Emülsifiye Olmuş Tabakının Yüksekliği}}{\text{Toplam Sıvı Yüksekliği}} \times 100$$

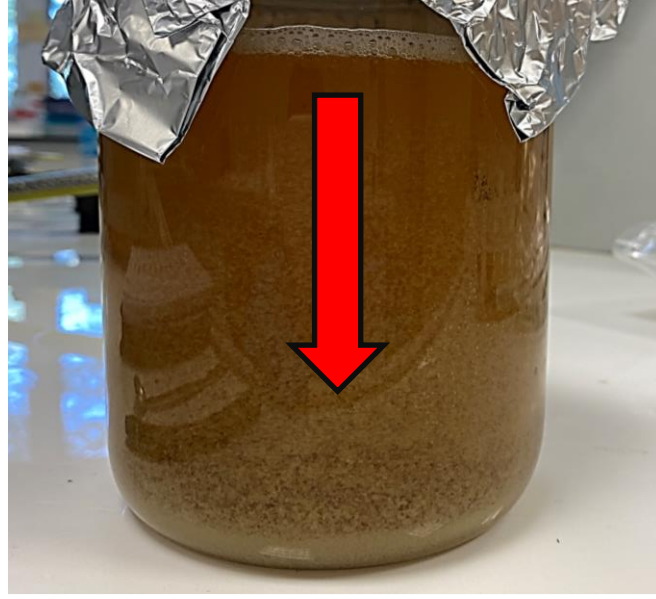


**Şekil 3.3.** Biyosümfektan varlığının  $E_{24}$  yöntemi ile belirlenmesi.

Soldan sağa sırasıyla: Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X:100, negatif kontrol olarak kullanılan distile su ve biyosümfektan içeren HKS.

### 3.5. Biyosümfektan Ekstraksiyonu ve Gravimetrik Ölçümü

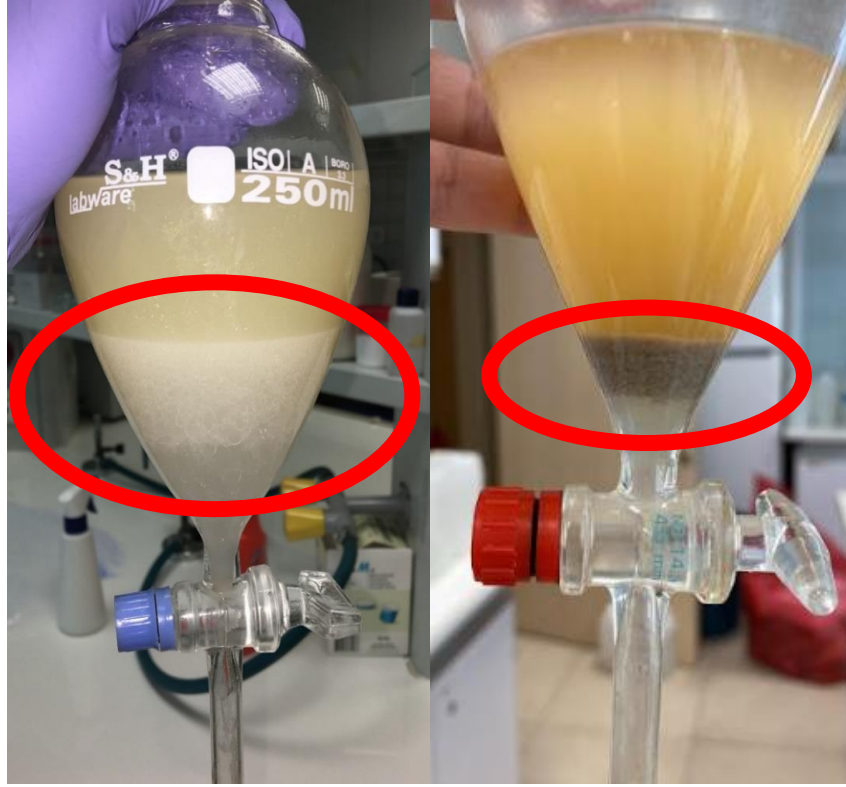
Çalışmanın bu kısmında bölüm 3.4'te açıklanan yöntemlerle biyosümfektan varlığı tespit edilen HKS'lerdeki biyosümfektan miktarının belirlenmesinde ekstraksiyon ve gravimetrik ölçüm yöntemleri (Patowary ve ark, 2017) kullanıldı. Bu doğrultuda, bölüm 3.4.'de verilen santrifüjleme yöntemiyle elde edilen HKS'ler 6 M HCl tamponu ile pH 2.0 olacak şekilde ayarlanarak gece boyu 4 °C'de buzdolabında bekletildi (Anaukwu, Ogbukagu ve Ekwealor, 2020). HKS içinde bulunan biyosümfektanın aşırı asidik ortamda dibe çökmesiyle (Şekil 3.4) yeni bir süpernatant pelet fazı meydana getirildi. Dibe çöken biyosümfektanın süpernatant fazından ayrıştırılması amacıyla 3082 x g dönme hızına ayarlanmış santrifüjden (NUVE NF1200) yararlanıldı. Bu bağlamda, 50 mL hacimli santrifüj tüplerine alınan asidik HKS'ler 10 dakika süreyle 3082 x g 'de çöktürüldü (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).



**Şekil 3.4.** Aşırı asitleştirilen HKS’de biyosüpfektan çökmesi.

Elde edilen peletlerden biyosüpfektan ekstraksiyonu Kloroform/Metanol yöntemi ile gerçekleştirildi (Anaukwu, Ogbukagu ve Ekwealor, 2020). Bu yöntemde, 2:1 (v/v) oranında hazırlanan Kloroform/Metanol çözücüler, biyosüpfektan peletleri üzerine 1:1 (v/v) oranında eşit hacimde eklendi. Çözücü-pelet karışımı, ayırma hunisi içerisinde biraz çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletilerek fazlara ayrılması sağlandı. Şekil 3.5.’te ayrıntılı olarak verilen fazlardan ortadaki faz biyosüpfektan olarak ayırma hunisi yardımıyla kuru ağırlığı tartılmış cam petri içerisinde alındı. Bu sayede elde edilen ıslak biyosüpfektan 1 saat boyunca 60 °C’ye ayarlanmış kül fırınında (Miprolab MFK-107) kurumaya bırakıldı (Şekil 3.6.). *Bacillus* suşları tarafından üretilen biyosüpfektan miktarı gravimetrik yöntemle belirlendi. Hassas terazi (Get Avary V/W Analytical Balances) gravimetrik ölçümlerde kullanılırken; elde edilen sayısal sonuçlar aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{Biyosüpfektan Miktarı} = \text{Ekstrakte edilen biyosüpfektanı içeren petri ağırlığı} - \text{Boş petri ağırlığı}$$



**Şekil 3.5.** Kloroform/Metanol yöntemiyle biyosümfektan ekstraksiyonu.

(Solda) 15 dakika sonra oluşan tabaka; (Sağda) Kırmızı işaretle gösterilen bölge biyosümfektan birikmesi.



**Şekil 3.6.** Ekstraksiyon sonunda kül fırınından kurutulan biyosümfektan.

### 3.6. Biyosürefektan Üretimine Uygun *Bacillus* Suşlarının Seçimi

Çalışmada kullanılan tüm *Bacillus* suşları biyosürefektan varlığının araştırılması amacı ile modifiye BH besiyerine ekildi ve biyosürefektan üretimi 30°C’de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda bölüm 3.4.’te anlatılan şekilde elde edilen HKS’lerde biyosürefektan varlığı; daralma yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  yöntemleriyle araştırıldı. Etkili biyosürefektan varlığı belirlenen suşlara ait HKS’lerdeki biyosürefektan miktarları belirlenmesinde ekstraksiyon ve gravimetrik ölçümlerden yararlandı. Elde edilen tüm sonuçların karşılaştırılmasıyla biyosürefektan üretiminde etkili *Bacillus* suşları tespit edildi.

### 3.7. *Bacillus* Konsorsiyumlarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında kullanılan *Bacillus* suşlarından yüksek miktarda biyosürefektan ürettiği belirlenen suşlar, ikili ve üçlü kombinasyonlarda bir araya getirilerek bakteriyel konsorsiyumlar Çizelge 3.4.’te verilen şekilde oluşturuldu.

Çizelge 3.4. Biyosürefektan üretimi için oluşturulan konsorsiyumlar ve ekim oranları.

Konsorsiyumlar	<i>Bacillus</i> Türleri	Ekim Oranları
<b>İki <i>Bacillus</i> Türü İçeren Konsorsiyumlar</b>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	1 mL (v/v)
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	
	<i>B. halotolerans</i> NR_115063.1	
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
<b>Üç <i>Bacillus</i> Türü İçeren Konsorsiyum</b>	<i>B. halotolerans</i> NR_115063.1	0.66 mL (v/v)
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	0.66 mL (v/v)
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.66 mL (v/v)

### **3.8. Biyosüpfektan Üretimine Uygun *Bacillus* Konsorsiyumunun Belirlenmesi**

Bölüm 3.7’de verilen şekilde oluşturulan konsorsiyumlar biyosüpfektan üretim verimliliklerinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.3.2.’de anlatıldığı gibi modifiye BH besiyerlerine ekildi. Biyosüpfektan üretimi 7 gün boyunca 30°C’de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda elde edilen HKS’lerdeki biyosüpfektan miktarları, bölüm 3.5.’de açıklanan biyosüpfektan ekstraksiyonu ve ardından gravimetrik ölçüm yöntemleriyle belirlendi. Elde edilen sonuçların karşılaştırılmasının ardından biyosüpfektan üretimine uygun *Bacillus* konsorsiyumu tespit edildi. Bu bağlamda, uygun konsorsiyumun belirlenmesiyle biyosüpfektan üretim ortamı olarak hazırlanan modifiye BH besiyeri içeriğinin uygun hale getirilmesine yönelik çalışmalara devam edildi.

### **3.9. Biyosüpfektan Üretiminde Atıkların Kullanımının Araştırılması**

#### **3.9.1. Biyosüpfektan Üretiminde Uygun Atık Karbon Kaynağının Araştırılması**

Modifiye BH besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan %2 (v/v) glukoz yerine, melas, şilempe ve lor peynirinden elde edilen peynir altı suyunun (PAS), atık karbon kaynağı olarak kullanıldığı atık-modifiye BH besiyerleri oluşturuldu. Bu modifiye BH besiyerine *B. subtilis* ve *B. halotolerans* ile oluşturulan konsorsiyumun ekimleri yapıldı. Biyosüpfektan üretimi, 30°C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından elde edilen HKS’lerde biyosüpfektan varlığı daralma yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  yöntemleriyle gerçekleştirilirken üretilen biyosüpfektan miktarı bölüm 3.5.’de verilen gravimetrik yöntemle belirlendi.

#### **3.9.2. Biyosüpfektan Üretiminde İlave Azot Kaynağı Şilempe Konsantrasyonunun Araştırılması**

Şilempe konsantrasyonunun biyosüpfektan üretimindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, %2-%30 arasında değişen farklı konsantrasyonlarda şilempe içeren modifiye BH besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan şilempe-modifiye besiyerlerine konsorsiyumun ekimleri yapıldı. Biyosüpfektan üretimi 30°C’de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### 3.10. Biyosümfektan Üretimine Uygun Konsorsiyum Koşullarının Araştırılması

#### 3.10.1. Konsorsiyumda Bulunan Farklı *Bacillus* Konsantrasyonlarının Biyosümfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

*B. subtilis* ve *B. halotolerans* suşlarından oluşturulan konsorsiyumdaki oranlarının belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.5.'de verilen şekilde hazırlanan konsorsiyumlar, karbon ve azot kaynağı şilempenin eklenmesiyle optimize edilen şilempe-modifiye BH besiyerlerine %4 (v/v) oranında ekildi. Biyosümfektan üretimi, 30°C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosümfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

Çizelge 3.5. Konsorsiyumdaki *Bacillus* suşlarının konsantrasyonları.

Konsorsiyum Numarası	<i>B. subtilis</i> Konsantrasyonu	<i>B. halotolerans</i> Konsantrasyonu
1	0,25 mL	1,75 mL
2	0,5 mL	1,50 mL
3	0,75 mL	1,25 mL
4	1 mL	1 mL
5	1,25 mL	0,75 mL
6	1,50 mL	0,5 mL
7	1,75 mL	0,25 mL

#### 3.10.2. Hazırlanan Konsorsiyumun Farklı Konsantrasyonlarının Biyosümfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Konsorsiyum konsantrasyonunun biyosümfektan üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* ile belirlenen oranlarda hazırlanan konsorsiyum, optimize edilmiş şilempe-modifiye BH besiyerlerine %2, %4, %6, %8 ve %10 oranında ekildi. Biyosümfektan üretimi, 30°C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7

günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosülfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.11. İz Element Konsantrasyonunun Biyosülfektan Üretimine Etkisinin Araştırılması**

Besiyerinde bulunan iz element miktarının biyosülfektan üretimine etkilerinin araştırılması amacıyla %0, %0,5, %1, %2, %3, %4 ve %5 oranlarında Çizelge 3.3.'te verilen iz element içeriği, hazırlanan şilempe-modifiye BH besiyerlerine eklendi. 110 °C'de 25 dakikada steril edilen besiyerine oluşturulan konsorsiyumun ekimleri yapıldı. Biyosülfektan üretimi, 30°C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosülfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.12. Biyosülfektan Üretimini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Araştırılması**

*B. subtilis* ve *B. halotolerans* ile oluşturulan konsorsiyumun biyosülfektan üretimini etkileyen farklı fizyolojik koşullar araştırıldı. Bu doğrultuda, farklı başlangıç pH değeri, inkübasyon koşulu, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresinin biyosülfektan üretimindeki etkisi incelenerek biyosülfektan üretimindeki uygun fizyolojik şartlar tespit edildi.

#### **3.12.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Biyosülfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

Başlangıç pH değerinin biyosülfektan üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, 1M HCl ve 1M NaOH tamponları kullanılarak pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 ve pH 10'a ayarlanan optimize şilempe-modifiye BH besiyerlerine belirlenen oranlarda hazırlanan konsorsiyumun ekimleri yapıldı. Biyosülfektan üretimi, 30°C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosülfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.12.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

İnkübasyon koşullarının biyosüpfektan üretimindeki etkisinin araştırılması amacıyla, optimize edilen şilempe-modifiye BH besiyerlerine oluşturulan konsorsiyumun ekimleri yapıldı. Biyosüpfektan üretimi 30°C’de, 7 günde statik, 100 rpm, 125 rpm, 150 rpm, 175 rpm ve 200 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.12.3. Farklı Sıcaklıkların Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

İnkübasyon sıcaklığının biyosüpfektan üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* ile oluşturulan konsorsiyum belirlenen şilempe-modifiye BH besiyerlerine ekilerek 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C sıcaklarına ayarlanan inkübatörde, belirlenen şartlarda 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.12.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

İnkübasyon süresinin biyosüpfektan üretimine etkisinin araştırılması amacıyla oluşturulan konsorsiyum şilempe-modifiye BH besiyerlerine ekilerek belirlenen şartlarda 3, 5, 7, 10 ve 14 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.13. Biyosüpfektanın Saflaştırılması**

Bölüm 3.9.’da anlatılan şekilde, biyosüpfektan üretimine uygun hale getirilen şilempe-modifiye besiyeri ve üretim şartlarında *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 konsorsiyumu tarafından üretilen ve bölüm 3.5.’te verilen yöntemle ekstrakte edilen biyosüpfektan, karakterizasyon analizlerinin yapılmasına yönelik saflaştırma basamağında Silika Jel Kolon Kromatografisi yöntemi kullanıldı (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).

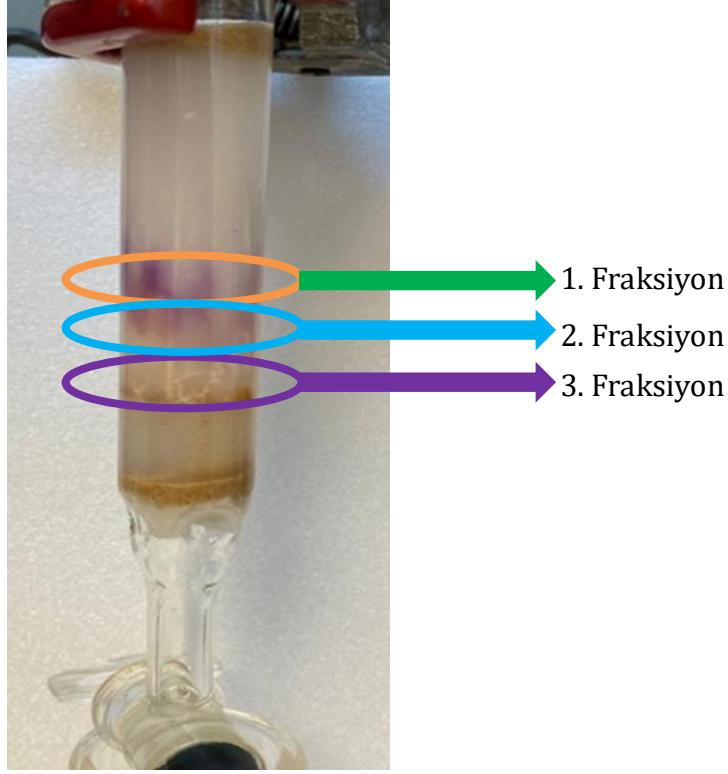


### **3.13.1. Silika Jel Kromatografisinde Kolonun Hazırlanması**

10 cm boyunda ve 3 cm çapında olan kolun sisteminin hazırlanmasında bir parça hidrofobik pamuk kolonun en altına konularak üzerinden %80 hekzan üzerinden geçirildi. Islanan pamuk cam baget yardımıyla yerine oturtuldu. Pamuk üzerine 1.5-2 cm olacak şekilde deniz kumu temiz bir spatül yardımıyla eklendi. Hekzan geçirme işlemi tekrarlandıktan sonra cam baget yardımıyla deniz kumu düzeltildi. %80 hekzan içerisinde çözülen silika jel yavaş yavaş kolon içerisine eklenerek silikanın katılaşması sağlandı. Saflaştırılacak biyosürefektanın kolonda yürütülmesi için hareketli faz olarak belirlenen Metanol/Kloroform 95:5 (v/v) oranında hazırlandı.

### **3.13.2. Biyosürefektanın Silika Jel Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması**

Ekstraksiyonu yapılan biyosürefektanın saflaştırılması amacıyla 1M NaOH tamponu kullanılarak pH:8.0'a ayarlanarak 4000 rpm ve 4 °C'ye ayarlanmış santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant atılarak pelet üzerine 2:1 oranında Kloroform/Metanol çözücüleri alınarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla çeker ocakta (Hedlab X-Pro En 14175) 2 saat bırakılarak çözücü konsantrasyonunun azalması sağlandı. Konsantre hale gelen biyosürefektan, donanan silika jel üzerine eklendikten sonra üzerine 1.5-2 cm boyunda olacak şekilde deniz kumu eklemesi yapıldı. Hareketli fazın eklenmesiyle kolon çalıştırıldı (Şekil 3.7.). Kolon kromatografisinde meydana gelen fraksiyonlar toplanarak 2 saat çeker ocakta bırakılarak konsantre hale gelmeleri sağlandı. Konsantre fraksiyonlar, biyosürefektan karakterizasyonunda kullanılmak üzere 4 °C'de buz dolabında saklandı.



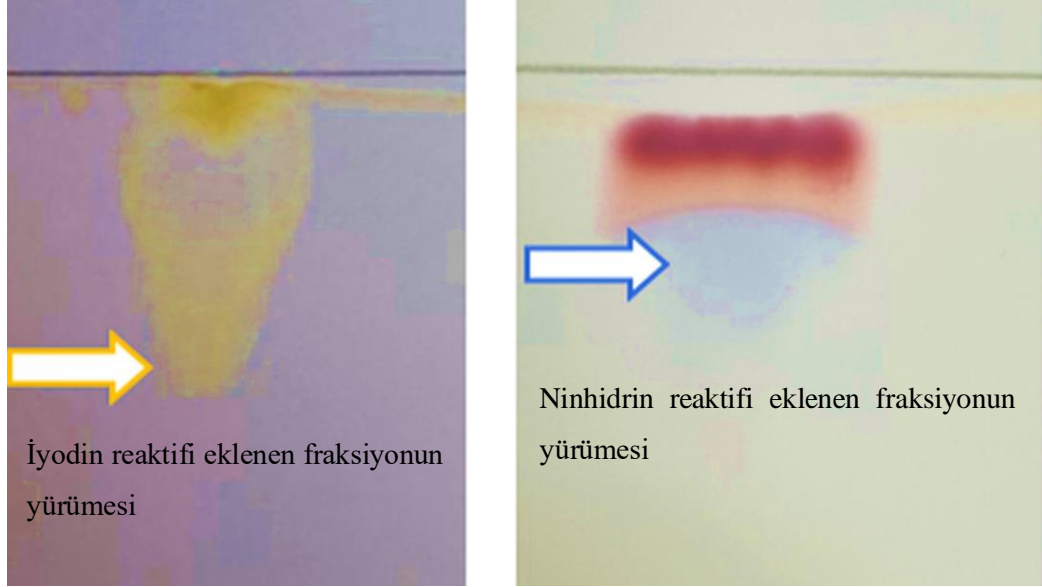
**Şekil 3.7.** Silika jel kolon kromatografisinde yürüyen biyosürefektan (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).

### **3.14. Biyosürefektan Karakterizasyonu**

#### **3.14.1. Biyosürefektan Yapısının TLC Yöntemiyle Belirlenmesi**

TLC yönteminde hareketli faz olarak kullanılacak çözücüler 65:25:4 konsantrasyonunda kloroform/metanol/su olacak şekilde hazırlandı. Saflaştırılarak konsantre hale getirilmiş fraksiyonların her birinden 10 µl TLC plakalarına yüklendi ve 30 dakika süreyle hareketli faz kullanılarak ayrıldı. Ayırma işlemi TLC plakasının cam bir beher içinde dik sabitlenmesi ve beherin ağzının kapalı olduğu şartlarda gerçekleştirildi. Yükleme yapılan plaka kurutulması amacıyla 30 dakika çeker ocakta bırakıldı. Yükleme noktalarında peptitlerin tespiti ninhidrin reaktifi ve lipit tespitinde ise iyot kullanıldı. Reaktiflerin yürümleri amacıyla TLC plakası 80 °C sıcaklığa ayarlanmış kül fırınında ısıtıldı. Ardından plaka üzerinde meydana gelen yürümlerin (Şekil 3.8.) ölçülmesi cetvel kullanılarak yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak peptit, lipit ve karbonhidrat noktalarının  $R_f$  değerleri hesaplandı:

$$Rf = \frac{\text{Bileşğin uygulama noktasından başlayarak aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}}$$



**Şekil 3.8.** Biyosümfektan fraksiyonlarının TLC plakasında yürütülmesi (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).

### 3.14.2. Biyosümfektan Yapısının FT-IR Yöntemiyle Belirlenmesi

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak üretilen biyosümfektanın mevcut fonksiyonel grupları ve bağ türleri bulunması için yürütülen analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü FT-IR laboratuvarında hizmet alım ile yapıldı.

### 3.14.3. Biyosümfektan Yapısının <sup>1</sup>H NMR Yöntemiyle Belirlenmesi

Biyosümfektanın atom bağlarının tespit edilmesi amacıyla yapılan <sup>1</sup>H NMR analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü NMR laboratuvarında hizmet alım ile yapıldı.

### **3.15. Biyosüpfektanın Kararlılığının belirlenmesi**

#### **3.15.1. Farklı pH Değerlerinin Biyosüpfektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması**

Farklı pH değerlerinin biyosüpfektan kararlılığına etkilerinin araştırılması için HKS'ler 1M HCl ve 1M NaOH kullanılarak pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 olacak şekilde ayarlandı. 24 saat sonunda HKS'lerdeki biyosüpfektan kararlılığı Ahmed ve arkadaşları tarafından uygulanan  $E_{24}$  yöntemiyle (Ali ve ark., 2021) belirlendi.

#### **3.15.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Biyosüpfektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması**

Farklı sıcaklık değerlerinin biyosüpfektan kararlılığına etkilerinin araştırılması için HKS'ler 4, 20, 30, 40, 60 ve 80 °C'ye ayarlanan buz dolabı, inkübatör ve su banyosunda 1 saat boyunca bekletildi. Ardından, oda sıcaklığına getirilen biyosüpfektanın kararlılığı  $E_{24}$  testiyle belirlendi (Ali ve ark., 2021).

#### **3.15.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Biyosüpfektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması**

Farklı tuz konsantrasyonlarının biyosüpfektan kararlılığı üzerindeki etkisinin tespit edilmesi amacıyla HKS'lere %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 (w/v) konsantrasyonlarında NaCl eklendi. 24 saat sonunda biyosüpfektanın kararlılığı  $E_{24}$  testiyle belirlendi (Ali ve ark., 2021).

#### **3.15.4. UV'ye Maruz Kalma Sürelerinin Biyosüpfektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması**

UV'ye maruz kalma süresinin biyosüpfektan kararlılığı üzerindeki etkisinin tespit edilmesi amacıyla HKS'ler 10, 20, 30, 40 ve 50 dakika boyunca UV'ye maruz bırakıldı (Kendro Laboratory Products Hera Safe). Biyosüpfektanın kararlılığı  $E_{24}$  testiyle belirlendi (Ali ve ark., 2021).

### **3.16. İstatistiksel Analiz**

Bu çalışmadan elde edilen tüm deneysel verilerin istatistiksel analizleri, SPSS (The Statistical Package for The Social Sciences) 27 programıyla değerlendirildi. ANOVA ve Kruskal-Wallis H testleri kullanılarak araştırma yapıldı ve gruplar arasında fark çıktığı durumda çoklu karşılaştırma yapıldı. Sonuçlar %5 ( $p<0.05$ ) anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

### **3.17. Çalışmada Kullanılan Fotoğraflar**

Bu tez çalışmasında referans verilmeyen tüm fotoğraflar, Apple marka Iphone 11 ile Kaan SOYUER tarafından çekildi.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Küreselleşen dünyada, endüstriyel ürünlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu noktada da endüstriyel üreticiler, ucuz sentetik maddeleri ürünlerinde kullanma yoluna gitmektedir. Bununla birlikte, günümüzde sentetikleri kullanılan bu maddelerin biyoteknolojik olarak üretilen çevre dostu muadilleri karşımıza çıkmaktadır. Yeşil sentez akımının, günümüzde desteklenmeye başlamasıyla endüstrilerde bu biyoteknolojik ürünlerin kullanıldığı alanlar ve kullanım ölçeklerinde de artış görülmektedir. Özellikle birçok endüstrinin ortak hammaddesi olarak karşımıza çıkan ürünlerin biyoteknolojik yollarla üretilmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu noktada, birçok endüstriyel alanda kullanılabilen biosüperfektanlara yönelik son beş yılda ScienceDirect veri tabanında yayımlanan çalışma sayısı 5 bin 370'tir<sup>1</sup>. Deterjan endüstrisi (Inès ve ark., 2023), kozmetik endüstrisi (Adu ve ark., 2020), petrol endüstrisi (Sharma, Lavania ve Lal, 2023), gıda endüstrisi (Ribeiro, Guerra ve Sarubbo, 2020b), sağlık endüstrisi (Bjerk ve ark., 2021) ve tarım endüstrisi (Silva ve ark., 2024) gibi farklı alanlarda kullanılabilen biosüperfektanlar, hücre dışı olarak veya hücre zarının bir parçası olarak çeşitli bakteri, maya ve mantarlar tarafından şekerler, yağlar ve atıklar dahil olmak üzere çeşitli hammaddelerden üretilen sekonder metabolitlerdir (de Souza ve ark., 2024). Sentetik süperfektanlarla kıyaslandığında çevresel toksisitesinin düşük olması, kolay köpüklenme özelliği, yüksek biyoçözünürlük, aşırı sıcaklıklarda aktivite göstermesi, yüksek pH değerlerinde stabilitesini koruması, seçiciliğinin yüksek olması, üretim süreçlerinde oluşan yan ürünlerin toksik olmaması gibi avantajları (Nagtode ve ark., 2023; de Souza ve ark., 2024) bulunmasına rağmen kullanım ölçeğinin düşük olmasının sebebi üretim maliyetlerinin yüksek olmasıdır (Jahan ve ark., 2020; Begum, Saha ve Mandal, 2023). Biosüperfektan çalışmalarının başladığı 1949 yılından bu yana araştırmacılar biosüperfektan üretim maliyetlerini düşürmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapmaktadır. Bu doğrultuda, deneysel tasarım metotları (Kumari ve ark., 2023), konsorsiyum ile biosüperfektan üretimi (Darvishi ve ark., 2011), üretim ortamında karbon ve azot kaynağı olarak çeşitli atıkların kullanılması (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023) ve üretim şartlarının optimizasyonu gibi teknikler verimli üretim ve üretim maliyetinin düşürülmesini

---

<sup>1</sup> Veri tabanında "*biosurfactant*" anahtar kelimesi kullanıldığında, 2019-2023 yılları arasında yayımlanan yayınların sayısı.

hedefleyen metotlardır. Konsorsiyum ile biyosümfektan üretimi, tek bir mikroorganizmayla üretim yerine sinerjik etki yaratılmasıyla üretimi arttırmayı hedeflerken, üretim ortamında karbon ve azot kaynağı olarak çeşitli atıkların kullanılması, besiyerinin maliyetinin düşürülmesiyle üretim maliyetinin düşürülmesini hedefler.

Bu doğrultuda çalışmada öncelikle, etkili ve yüksek miktarda biyosümfektan üreten *Bacillus* suşlarının belirlenmesi ve bu suşlardan oluşturulan konsorsiyumlar ile biyosümfektan üretimi için verimli, yeni alternatif konsorsiyum eldesi hedeflendi.

#### **4.1. Biyosümfektan Varlığının Araştırılması**

Literatürde yürütölen biyosümfektan üretim çalışmaları, farklı mikrobiyal cinsleri içermektedir. Örneğın, *Pseudomonas* sp. (Kaskatepe ve ark., 2015), *Stenotrophomonas maltophilia* (Hemlata, Selvin ve Tukaram, 2015), *Klebsiella* sp. (Ahmad ve ark., 2021) suşlarının ramnolipid türü biyosümfektan ürettiğı belirlenirken, *Bacillus megaterium* (Rangarajan, Dhanarajan ve Sen, 2015), *Bacillus subtilis* (Paraszkiewicz ve ark., 2018) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (Kumar ve ark., 2017) suşlarının Iturin türü biyosümfektan, *Bacillus licheniformis* suşunun lichenysin türü biyosümfektan ürettiğı belirlenmiştir (Coronel-Leon ve ark., 2015). Sümfektin grubu biyosümfektan ise *Alcaligenes aquatilis* (Yalaoui-Guellal ve ark., 2021), *Bacillus subtilis* (Datta, Tiwari ve Pandey, 2018), *Bacillus atrophaeus* (Routhu ve ark., 2019) ve *Micromonospora marina* (Ramalingam ve ark., 2019) suşları tarafından üretilmektedir.

Literatür incelendiğinde biyoteknolojik süreçlerde üretici kültür olarak *Bacillus* suşlarının sıklıkla tercih edildiğı görölmektedir (Ghojavand ve ark., 2008; Al-Wahaibi ve ark., 2014; Thirumurugan ve ark., 2023; Soyuer ve Bilen Özyürek 2023; Yin ve ark., 2023). Bu bağlamda, sporlu yapıları sayesinde değışen şartlara karşı dayanıklı olmalarına (Martinez-Ortiz ve ark., 2024) ek olarak farklı özelliklere sahip biyosümfektan grupları üretebilmeleri biyosümfektan üretim süreçlerinde *Bacillus* kültürlerini diğeri gruplardan ayırmaktadır. Bu bağlamda, *Bacillus* suşlarının ürettiğı biyosümfektan çeşitliliğı göz önünde bulundurulduğunda çalışma kapsamında 6 farklı *Bacillus* suşunun biyosümfektan üretimi araştırıldı.

Bu bağlamda, çalışma kapsamında *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ON012959.1 ve *Bacillus velezensis* MT649755.1 suşlarının biyosüpfektan üretimi modifiye BH besiyerlerinde 150 rpm ve 30 °C’de 7 günlük inkübasyon ile gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası *Bacillus* suşlarının ürettiği biyosüpfektanın varlığı daralma-yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  testleriyle araştırıldı.

#### 4.1.1. Biyosüpfektan Varlığının Daralma Yayılma Yöntemiyle Araştırılması

Biyosüpfektan varlığının araştırıldığı daralma-yayılma yöntemi, damlatılan yağların meydana getirdiği yüzey gerilimi üzerinde yüzey aktif bir biyolojik madde olan biyosüpfektanın etkisinin değerlendirilmesiyle yapılır. Bu yöntemde, kullanılan yağın oluşturduğu yüzey gerilimi HKS’nin damlatılmasıyla kısa sürede bozularak çökmesi biyosüpfektan varlığını gösterir (Bodour ve Miller-Maier, 1998; Waghmode ve ark., 2016; Parthipan ve ark., 2017). Literatürde biyosüpfektan varlığının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda (Bodour ve Miller-Maier, 1998; Parthipan ve ark., 2017; Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023; Soyuer ve Bilen Özyürek 2023) sıklıkla kullanılan daralma yayılma yöntemi, hızlı sonuç vermesi ve maliyetinin ucuz olması gibi avantajlara sahiptir (Youssef ve ark., 2004). Bununla birlikte, bu yöntemin 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasında yürütülmesinden kaynaklanan bazı sorunlar meydana gelmektedir. Örneğin, çökmenin tam görülmemesi, maddelerin yüzey gerilimine bağlı gözlem hatalarına sebep olması, kuyucuk sayısının fazla olmasına bağlı olarak gözlemci hataları gibi dezavantajlar karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla, bahsedilen bu sorunları önlemek adına çalışmamızda, Zargar ve arkadaşları tarafından önerilen (Zargar ve ark., 2022) şekilde cam lamlar üzerinde çalışıldı. Bu doğrultuda, parafin, zeytin yağı ve ayçiçek yağı bulunan lamlara, HKS damlatılmasıyla HKS’nin 3 farklı yağ üzerinde meydana getirdiği çökmenin görsel olarak incelendiği daralma-yayılma yönteminden elde edilen veriler toplandı. Elde edilen verilerin değerlendirmesi bölüm 3.4.1.’de verilen yöntemle yapıldı.

*Bacillus* suşları ile Parafin, zeytin ve ayçiçek yağlarında meydana gelen çökme sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.1) *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433 suşunun parafinde meydana getirdiği çökmenin 1-3 dakika aralığında olduğu belirlendi. *B. velezensis* MT649755.1 suşununsa zeytin yağında 1-3 dakika arasında çökme meydana getirdiği bulunurken parafin ve ayçiçek yağında meydana gelen çökmenin 5 dakikadan fazla



sürede gerçekleştiği belirlendi. Çalışmada kullanılan diğer tüm suşların parafin, zeytin ve ayçiçek yağlarında 1 dakikadan kısa sürede çökme meydana getirdiği saptandı. Bu sayede, söz konusu bu suşların biyosüpfektan üretimine uygun olduğu belirlendi.

2018 yılında yayımlanan çalışmanın sonuçlarına göre *Bacillus subtilis* ANSKLAB03 suşu damlada 1 dakikadan kısa sürede, *Staphylococcus* suşu 1-3 dakika arasında damlada çökme meydana getirir (Nayariseri, Singh ve Singh, 2018). 2005 yılında farklı *Bacillus* suşları üzerine yapılan bir çalışmada (Sarwar ve ark., 2018), *Bacillus amyliquelificans* FZB42 ve *Bacillus subtilis* NH-100 çökme “mükemmel” olarak, *Bacillus* sp. NH-217 suşundan elde edilen biyosüpfektanların yarattığı çökme “iyi” olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, aynı çalışmada *Bacillus atrophaeus* 176s ve *Bacillus subtilis* 168 suşlarından elde edilen biyosüpfektanın damlada çökme meydana getirmediği ortaya konmuştur. 2023 yılında yayımlanan iki çalışmada *Bacillus subtilis* CC9 (Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023) ve *Bacillus subtilis* MG847158.1 (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023) suşlarından elde edilen biyosüpfektanların damlada 1 dakikadan kısa sürede çökme gösterdiği belirlenmiştir.

Bu bağlamda sonuçlar literatüre göre değerlendirildiğinde, HKS içerisinde biyosüpfektan varlığının olduğu durumlarda damlada çökme meydana gelmesinin 1 dakikadan kısa sürmesi biyosüpfektan varlığını göstermesinin yanı sıra etkili bir biyosüpfektan olduğunu da göstermektedir (Bodour ve Miller-Maier, 1998; Parthipan ve ark., 2017). Bu durumda, *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC 19433 ve *B. velezensis* MT649755.1 suşlarının ürettiği biyosüpfektan varlığının daralma-yayılma yöntemiyle düşük olduğu saptandı.

**Çizelge 4.1.** *Bacillus* suşlarında biyosümfektan varlığının daralma yayılma yöntemiyle araştırılması.

Bakteriyel Suş	Parafin	Zeytin Yağı	Ayçiçek Yağı
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	++++	++++	++++
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	++++	++++	++++
<i>B. halotolerans</i> NR_115063.1	++++	++++	++++
<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i> ATCC 19433	+++	++++	++++
<i>B. subtilis</i> ON012959.1	++++	++++	++++
<i>B. velezensis</i> MT649755.1	+	+++	+
Pozitif Kontrol-1 (TritonX-100)	++++	++++	++++
Pozitif Kontrol-2 (Sümfaktin)	++++	++++	++++
Negatif Kontrol-1 (Steril besiyeri)	-	-	-
Negatif Kontrol-2 (Steril distile su)	-	-	-

Biyosümfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

*Damlada 1 dakikadan daha kısa sürede çökme (++++), 1-3 dakika arasında çökme (+++), 3-5 dakika arasında çökme (++) ve 5 dakikadan fazla sürede çökme (+) olarak değerlendirildi.*

#### 4.1.2. Biyosümfektan Varlığının Yağ Yayılma Yöntemiyle Araştırılması

Altı farklı *Bacillus* suşunun daralma-yayılma sonuçlarından elde edilen bulguların teyit edilmesi ve sonuçların güvenilirliğinin artırılması adına literatürde de sıklıkla biyosümfektan varlığının araştırılmasında kullanılan yöntemlerden olan yağ yayılma yöntemi uygulandı. Bu bağlamda, distile su ve çeşitli yağlar içeren petri kaplarına HKS damlatıldığında, yağlarda meydana gelen yayılmanın nicel olarak ölçülmesiyle biyosümfektan varlığı araştırıldı. Yapılan yağ yayılma çalışmasında parafin maddesinin petri üzerindeki suda yayılma göstermemesi sebebiyle 2 farklı sondaj kaynağından elde edilen petrol, zeytin yağı ve ayçiçek yağı, distile su içeren petri üzerine damlatıldı ve meydana gelen yayılmaların zon çapları cetvel ile ölçüldü. Ölçümler sonucunda (Şekil 4.1) yayılmaların zeytin yağı ve ayçiçek yağında daha geniş zonlar oluşturduğu görülürken her iki petrolde de yayılmaların sınırlı kaldığı görüldü. Bu durumun sebebi zeytin yağı, ayçiçek yağı ve petrol karşılaştırıldığında petrolün viskozitesinin yüksek

olması ve buna ek olarak petrolün yapısında bulunan hidrokarbonların daha kompleks olmasıdır (Bilen Özyürek, 2023). Literatürde, yağ yayılma yönteminde petrol kullanan araştırmacılar etkili biyosüpfektanın petrolün dağılmasıyla doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Bilen Özyürek, 2023; Degang ve ark., 2023; Sharma, Lavania ve Lal, 2023).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, *Bacillus amyliquesfaciens* FZB42, *Bacillus subtilis* NH-100 ve *Bacillus* sp. NH-217 suşlarının elde edilen biyosüpfektanların yağda meydana getirdikleri yayılma zonunun sırasıyla 2.7 cm, 2.9 cm ve 1.6 cm olduğu ortaya konarken; *B. atrophaeus* 176s ve *B. subtilis* 168 suşlarının yayılma zonu göstermediği belirlenmiştir (Sarwar ve ark., 2018). *Bacillus subtilis* MG847158.1 suşunun, yağ kaynağı olarak petrol kullanıldığı durumda 7.7 cm yayılma zonu oluşturulduğu ortaya konmuştur (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023).

*B. halotolerans* NR\_115063.1 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarından elde edilen HKS'lerin dört farklı yağda meydana getirdiği yayılma zonlarına göre iki farklı sondaj kaynağından elde edilen petrolde 7.0-8-3 cm yayılma zonu belirlenirken zeytin ve ayçiçek yağlarında meydana getirdiği yayılma zonu 11 cm olduğu saptandı. *B. cereus* ATCC 14579 suşunsa her iki petrolde 4.0-7.8 cm yayılma zonu meydana getirdiği görülürken diğer yağlarda 11 cm yayılma zonu olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Bununla birlikte, diğer *Bacillus* suşları tarafından üretilen biyosüpfektanın yağlarda meydana getirdiği yayılma zonlarının 5 cm altında kalmasıyla, varlığının düşük olduğu saptandı.

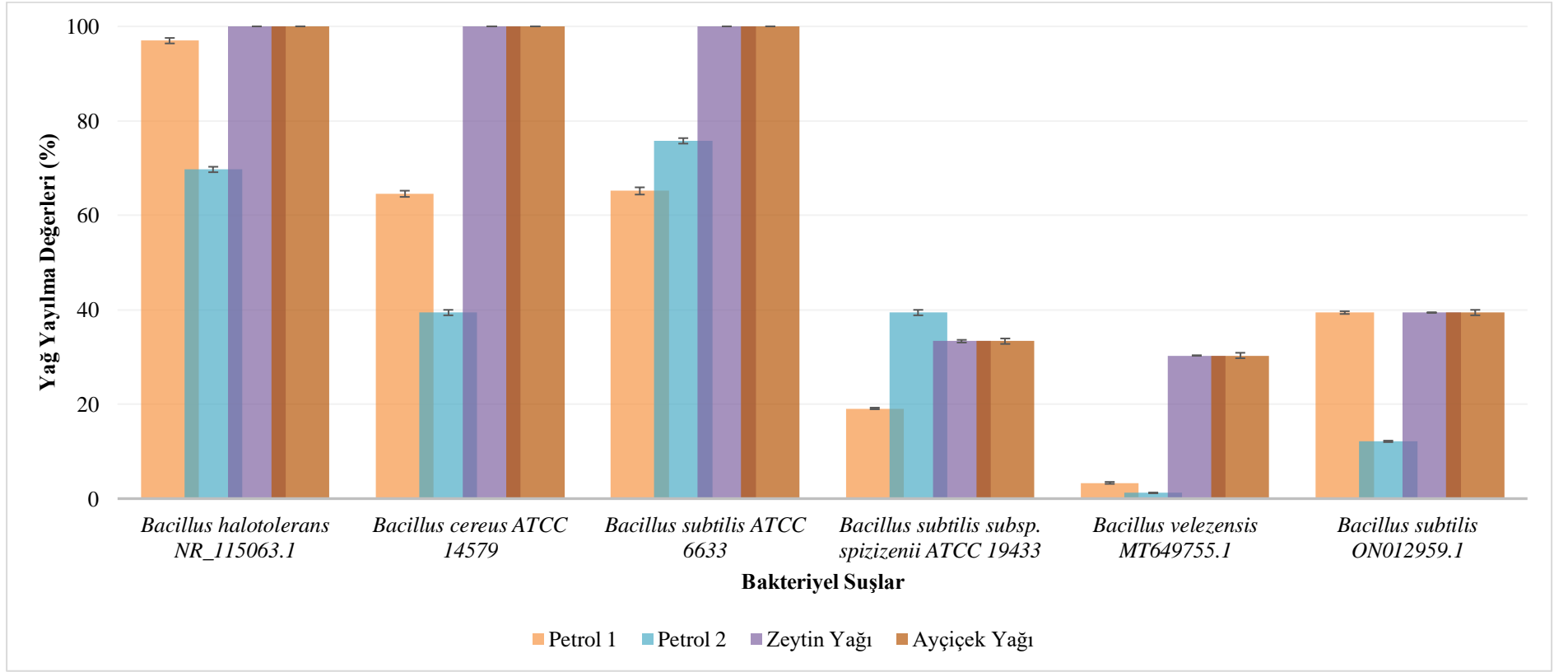
Bu noktada, literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sonuçların sadece cetvelle ölçüm sonuçlarının verildiği görülmüştür (Sarwar ve ark., 2018; Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023). Dolayısıyla, çalışmamızın sonuçlarının literatürle karşılaştırılmasını kolaylaştırmak adına ölçümleri cm olarak verdik. Ancak, yapılan yağ yayılma çalışmalarında petri boyunun verilmediği, başlangıçta damlatılan yağ zonunun belirtilmediği ve bir formül ile değerlendirilmediği görüldü. Bu durumda, yağ yayılma çalışmalarına ait sonuçların matematiksel bir formüle oturtulması ihtiyacı dikkat çekti. Bu sebeple, literatürde  $E_{24}$  testinin sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan matematiksel formüle (Płaza, Zjawiony ve Banat, 2006) benzer olarak oluşturulan formül kullanılarak yağ yayılma sonuçlarının yüzdesel sonuçlarının bulunması hedeflenmiştir

(Şekil 4.1.). Bu noktada kullanılan formülün bileşenleri, HKS damlatıldıktan sonra meydana gelen zonun, yağ damlatılınca oluşan başlangıç zonuna bölünmesiyle bulundu. Bu sayede, HKS'lerin meydana getirdiği zonunun etki düzeyinin anlaşılmasını zorlaştıran petri çapı ve başlangıç zonu gibi değişkenlerin ortaya çıkarttığı sorunlar ortadan kaldırıldı.

Bu bağlamda, *B. halotolerans* NR\_115063.1, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. cereus* ATCC 14579 suşlarından elde edilen HKS'lerde yüksek biyosürefektan varlığı tüm yağlarda %40-%100 yayılma zonu meydana getirirken diğer suşların %1-40 arasında yayılma zonları gösterdiği saptandı. Söz konusu bu 3 suştan elde edilen biyosürefektanların, viskoziteleri ve yapıları farklı dört yağda da %40-%100 arasında yayılma zonu meydana getirmesi oldukça önemlidir. Bu sayede, ileri de yürütülecek çeşitli çalışmalarda bu suşlardan elde edilecek biyosürefektanların kullanılması mümkün olacaktır.

Sonuç olarak yağ yayılma çalışmasıyla altı farklı *Bacillus* suşunun dört farklı yağda meydana getirdiği yayılma zonunun belirlenmesinin yanı sıra literatürde sıklıkla kullanılan bu yöntem için bir formül modifiye edilerek literatüre kazandırıldı. Buna ek olarak, farklı sondaj kaynaklarından elde edilen petrolerin kullanılması sayesinde biyosürefektan üretimine uygun *Bacillus* suşlarının seçimi için toplanan bulgular arttırıldı.

Daralma-yayılma ve yağ yayılma testlerinden sonra HKS'lere uygulanan bir diğer yöntem olan  $E_{24}$  testiyle, biyosürefektan varlığının yanı sıra emülsifiye etme özellikleri de araştırılmasına devam edildi.



**Şekil 4.1.** Biyosümfektan varlığının yağ yayılma yöntemiyle araştırılması.

Biyosümfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır

### 4.1.3. Biyosürefektan Varlığının Emülsifikasyon İndeksi Aktivitesi ( $E_{24}$ ) Yöntemiyle Araştırılması

Daralma-yayılma ve yağ yayılma sonuçlarından elde edilen bulgular ışığında biyosürefektan varlığının araştırılmasına ek olarak üretilen biyosürefektanın emülsifiye edici özelliğinin belirlenmesini sağlayan emülsifikasyon indeksi aktivitesi yöntemi ( $E_{24}$ ) seçilerek altı farklı *Bacillus* suşundan elde edilen HKS'lerdeki biyosürefektan varlığı ve emülsifiye etme kapasiteleri araştırıldı.  $E_{24}$  yöntemiyle biyosürefektan varlığının araştırılmasında, ilk yöntemde kullanılan petrol kaynaklarının yerine parafin ve *n*-Heptan kullanıldı. Daralma-yayılma ve yağ yayılma yöntemlerinde kullanılan petrolün bu noktada çıkartılmasının sebebi, deney tüpü içerisinde petrolün bulanıklık yaratarak ölçüm sonuçlarını olumsuz etkilemesidir. HKS'lerin meydana getirdiği emülsifiye tabakanın ölçümleri cetvel ile yapıldı.

Biyosürefektanın varlığının ve emülsifiye edici özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Bacillus cereus* suşunun, yağda %67 emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Nor ve ark., 2023). Başka bir çalışmada ise, *Bacillus subtilis* MG847158.1 suşunun yağda %50.1 emülsifiye aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023). 2024 yılında yayımlanan geniş kapsamlı bir biyosürefektan çalışmasında (Biktasheva ve ark., 2024) *Bacillus* sp. 2gt<sup>2</sup> suşunun karbon kaynağı olarak gliserol kullanılan besiyerinde üretildiğinde emülsifiye tabaka oluşturmazken, patates atığı ve kızartma yağı atığı kullanılan besiyerinde üretildiğinde sırasıyla %7± ve %5±0 emülsifiye tabaka meydana getirdiği ortaya konmuştur. Aynı yayında (Biktasheva ve ark., 2024) *Bacillus* sp. 1os suşunun gliserol ve atık kızartma yağı kullanılan besiyerinde üretildiğinde %50 üzerinde emülsifiye tabaka oluştururken patates atığında %29±5 emülsifiye tabaka oluşturduğu ortaya konmuştur. Buna ek olarak, *Bacillus* sp. 4mo suşunun üretilen hiçbir ortamda emülsifiye aktivite göstermediği durumlarda bulunmaktadır (Biktasheva ve ark., 2024).

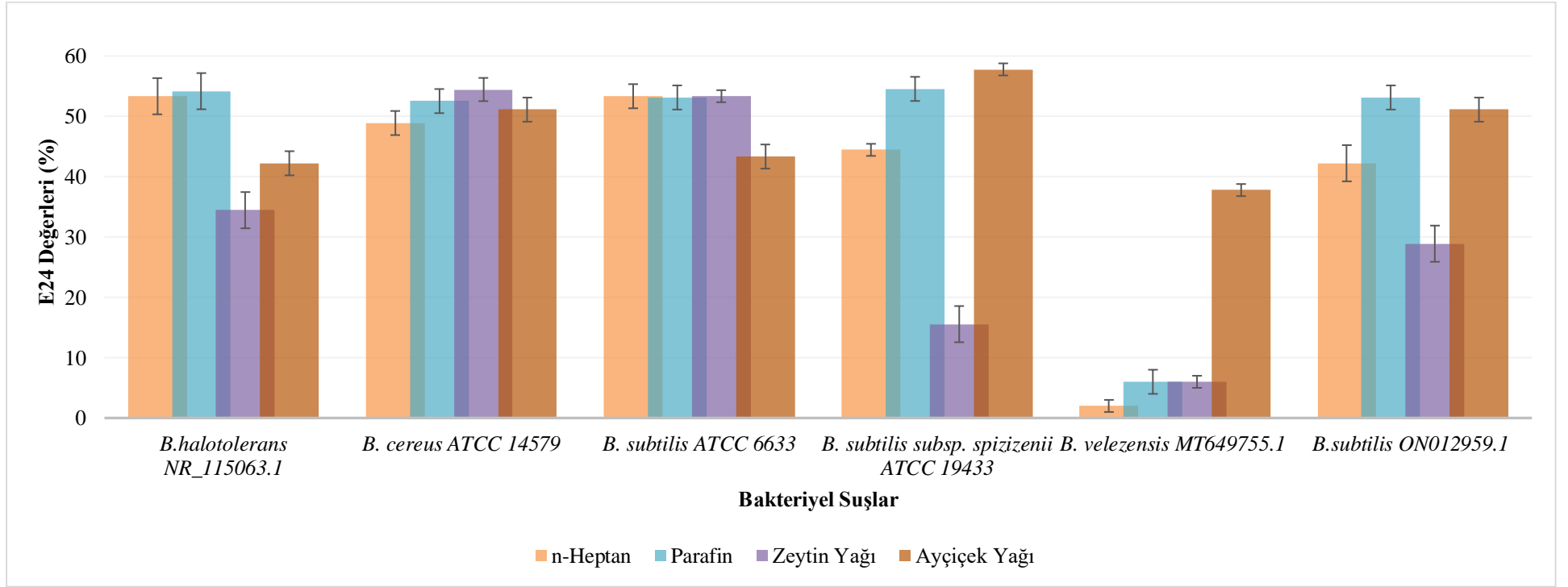
Üretilen biyosürefektanın emülsifiye edici özelliğine ek olarak HKS'deki varlığının da araştırıldığı son test olan  $E_{24}$  yönteminin sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.2.), *B. velezensis* MT649755.1 suşu hariç diğer tüm suşların *n*-Heptan, parafin ve ayçiçek

---

<sup>2</sup> Araştırmacılar, suşları izole ettikleri yerlere göre bir kodlandırma sistemi geliştirmiştir. *gt* (Geares Trap), *os* (oil contaminated soil) ve *mo* (motor oil).

yağında meydana getirdikleri emülsifiye tabakanın %30-60 arasında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, daha önce yapılan daralma-yayılma ve yağ yayılma sonuçlarına paralel olarak *B. velezensis* MT649755.1 suşunun biyosüpfektan ürettiği belirlenmekle birlikte, emülsifiye özelliğinin düşük olduğu saptandı. Buna ek olarak, *B. subtilis* ON012959.1 suşunun da biyosüpfektan ürettiği bulunurken *n*-Heptan, parafin ve zeytin yağında %10 altında emülsifiye tabaka meydana getirmesi üretilen biyosüpfektanın emülsifiye özelliğinin ve varlığının düşük olduğunu göstermektedir.

Bu bağlamda, elde edilen deneysel sonuçların literatürle karşılaştırılmasıyla altı *Bacillus* suşu arasından, *B. halotolerans* NR\_115063.1, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433 suşlarının daralma yayılma, yağ yayılma ve *E*<sub>24</sub> sonuçlarına göre iyi biyosüpfektan üreticileri olmalarına ek olarak üretilen biyosüpfektanın emülsifiye edici özelliklerinin de %50 üzerinde olduğu ortaya kondu. Bu durumda, biyosüpfektan üretimi için uygun suşların seçilmesi ve ardından uygun konsorsiyumun belirlenmesi amacıyla söz konusu bu dört suşun ürettiği biyosüpfektan miktarının bulunması için biyosüpfektan ekstraksiyonu ve gravimetrik ölçümden yararlanıldı.



**Şekil 4.2.** Biyosürfektan varlığının  $E_{24}$  yöntemiyle araştırılması.

Biyosürfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

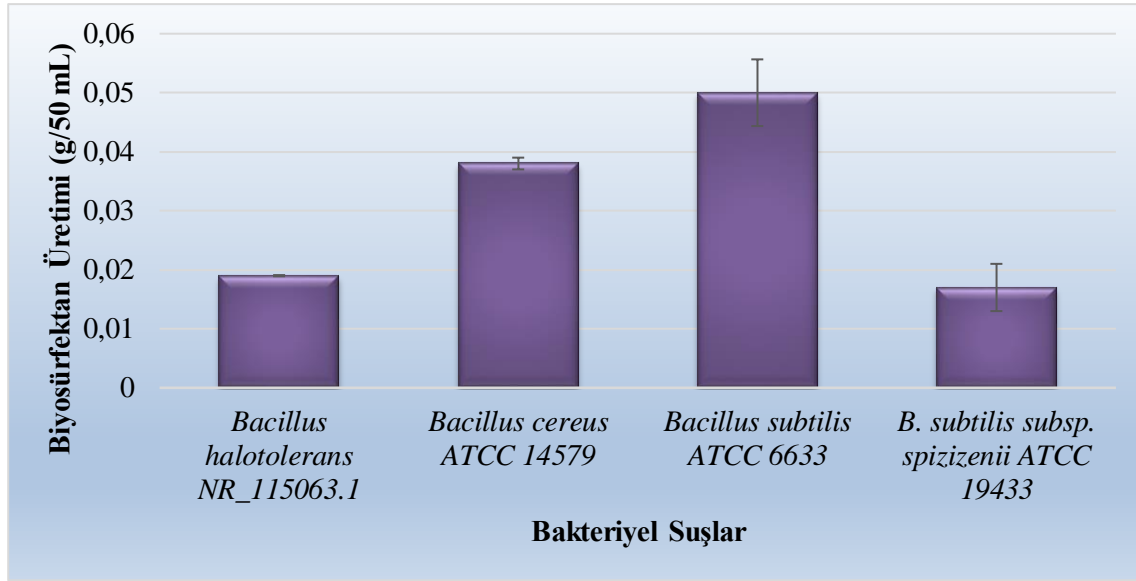


#### 4.2. Biyosürefektan Üretimine Uygun *Bacillus* Suşlarının Seçimi

Biyosürefektan üreten mikroorganizmaların belirlenmesi için yapılan daralma-yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  testleri literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (Bodour ve Miller-Maier, 1998; Płaza, Zjawiony ve Banat, 2006; Sharma, Lavania ve Lal, 2023). Ancak, biyosürefektan üretimine uygun suşların seçilmesinde bu yöntemlere ek olarak üretim miktarının da belirlenmesi gerekmektedir (Begum, Saha ve Mandal, 2023). Bu noktada, HKS içindeki biyosürefektan miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon işlemi uygulanarak gravimetrik ölçümler yapılır.

Biyosürefektan varlığının araştırıldığı daralma-yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  yöntemleriyle *B. subtilis* ON012959.1 ve *B. velezensis* MT649755.1 suşlarının ürettikleri biyosürefektanın varlığının düşük olduğu belirlenerek çalışma kapsamından çıkarıldı. Bununla birlikte, *B. halotolerans* NR\_115063.1, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433 suşlarının HKS'lerinde biyosürefektan varlığı yüksek olarak belirlendi. Bu suşların ürettiği biyosürefektan miktarının belirlenmesi için HKS'lerden biyosürefektan ekstraksiyonunda 2:1 (v/v) Kloroform/Metanol yöntemi kullanıldı (Faisal, Mahdi ve Alobaidi, 2023). Bu yöntemde meydana gelen üç fazdan ortadaki faz biyosürefektan olarak değerlendirildi.

Elde edilen gravimetrik ölçümlere göre (Şekil 4.3.) *B. cereus* ATCC 14579 suşunun 50 mL modifiye besiyerinde ürettiği biyosürefektan miktarının 0,038 g/50 mL; *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun ürettiği biyosürefektan miktarının 0,05 g/50 mL *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşunun ürettiği biyosürefektan miktarının 0,019 g/50 mL ve *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433 suşunun ürettiği biyosürefektan miktarınınsa 0,017 g/50 mL olduğu saptandı. Bu bağlamda, çalışmamızda yürütülen önceki deneysel çalışmalara paralel olarak *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarının üretim verimliliğinin yüksek olduğu belirlendi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-1).



**Şekil 4.3.** *Bacillus* suşlarının biyosümfektan üretimleri.

Biyosümfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

Literatürde *Bacillus* cinsi bakterilerin optimum şartlar altında elde edilen biyosümfektan miktarları incelendiğinde, *B. subtilis* CC9 0,95 g/L (Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023), *B. subtilis* MG847158.1 0,139 g/L (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023), *B. subtilis* SL 1,32 g/L (Wu ve ark., 2022), *Bacillus* sp. G6 3,79 g/L (Rawat ve ark., 2024) ve *B. amyloliquefaciens* A-1 0,38 g/L (Hu ve ark., 2024) değerleri görülmektedir. Çalışmamızda bu aşamaya kadar biyosümfektan üretimi için uygun üretim ortamı ve üretim şartlarının saptanmadığı göz önünde bulundurulduğunda, üretim verimliliğinin gerekli şartlar sağlanarak artırılması hedeflenmektedir.

Gravimetrik sonuçların anlamlılık düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinden sonra, elde edilen bulgular ışığında etkili ve verimli biyosümfektan üreten *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* suşlarından oluşan konsorsiyumların biyosümfektan üretimine uygunluğunun araştırılmasına karar verildi.

#### 4.3. Biyosümfektan Üretimine Uygun *Bacillus* Konsorsiyumunun Belirlenmesi

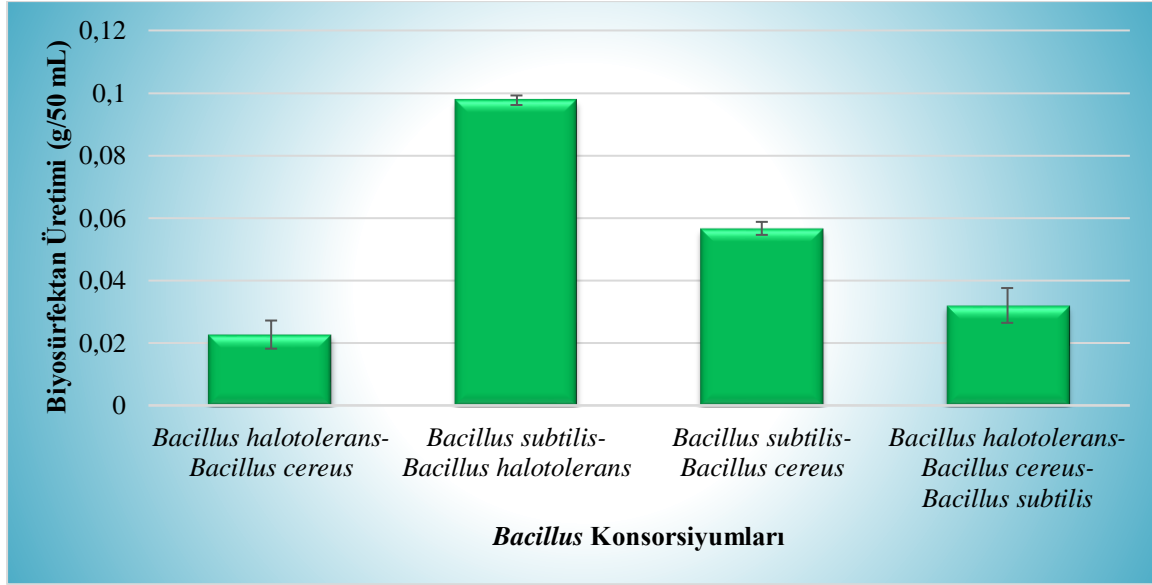
Bakteriyel suşların bireysel biyosümfektan ürettiği bilinirken, oluşturulacak konsorsiyumlar ile biyosümfektan üretim verimliliğinin sinerjik ve adisyonel etki

yaratılarak artırılması literatürde kullanılan bir yöntemdir (Darvishi ve ark., 2011). Bu bağlamda, *Bacillus* suşlarının bölüm 4.2.'de anlatılan şekilde biyosürefektan üretimleri araştırılarak etkili ve yüksek biyosürefektan ürettiği belirlenen *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* suşları, ikili ve üçlü kombinasyonlarda bir araya getirilerek konsorsiyumlar Çizelge 4.2.'deki şekilde oluşturuldu. Bu sayede, oluşturulan konsorsiyumlar ile suşların tek başlarına ürettiği biyosürefektan miktarının üzerine çıkılması hedeflendi.

**Çizelge 4.2.** Seçilen *Bacillus* suşlarıyla oluşturulan konsorsiyumlar.

Konsorsiyumlar	<i>Bacillus</i> Türleri
<b>İki <i>Bacillus</i> Türü İçeren Konsorsiyumlar</b>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
	<i>Bacillus halotolerans</i> NR_115063.1
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Bacillus halotolerans</i> NR_115063.1
<b>Üç <i>Bacillus</i> Türü İçeren Konsorsiyum</b>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Bacillus halotolerans</i> NR_115063.1

Etkili ve verimli biyosürefektan ürettiği belirlenerek, Çizelge 4.2.'de verilen *Bacillus* suşlarını içeren konsorsiyumlar, modifiye BH besiyerine Çizelge 3.4.'de verilen oranlarda ekildi. 150 rpm ve 30 °C'de gerçekleştirilen 7 günlük inkübasyon sonunda elde edilen HKS'lerde biyosürefektan miktarının bulunmasında ekstraksiyon ve gravimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar değerlendirilerek (Şekil 4.4.) biyosürefektan üretimine uygun *Bacillus* konsorsiyumu belirlendi.



Şekil 4.4. *Bacillus* konsorsiyumlarının biyosürfektan üretimleri.

Biyosürfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

*B. cereus* ATCC 14579 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarını içeren konsorsiyumun biyosürfektan üretim miktarı 0,057 g/50 mL olarak belirlenirken suşların bireysel biyosürfektan üretimleri incelendiğinde *B. subtilis* ATCC 6633 bireysel olarak 0,05 g/50 mL ve *B. cereus* ATCC 14579 0,038 g/50 mL biyosürfektan üretmişti. Bu bağlamda, üretim miktarı artmakla birlikte oluşturulan bu konsorsiyumda suşlar arasında bir antagonizm belirlendi. *B. subtilis* SC-8 suşunun *B. cereus* grupları üzerinde antagonistik özellik gösterdiği Yeo ve arkadaşlarının 2012 yayımladıkları çalışmada (Yeo, Lee ve Hahm, 2012) ortaya konmuştur. Buna ek olarak Lee ve arkadaşlarının 2010 yılında yayımladıkları bir çalışmada (Lee, Yeo ve Kang, 2010) *B. subtilis* SC-8 suşunun *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. amyloquefaciens* suşları üzerinde antagonistik bir etkisi olmadığı literatüre kazandırılmıştır.

*B. cereus* ATCC 14579 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarını içeren konsorsiyumun üretim miktarının 0,023 g/50 mL olduğu belirlendi. Konsorsiyumu oluşturan suşların bireysel biyosürfektan üretimleri incelendiğinde *B. halotolerans* NR\_115063.1’in biyosürfektan üretim miktarının 0,019 g/50 mL ve *B. cereus* ATCC 14579’un biyosürfektan üretim miktarının 0,038 g/50 mL olması konsorsiyum içerisinde bir

antagonizm etki olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşunun *B. cereus* ATCC 14579 üzerindeki doğrudan antagonistik etkisini içeren bir çalışma olmamakla birlikte kurşuni küf olarak bilinen *B. cinerea* (Wang ve ark., 2021; Wang ve ark., 2023), *F. oxysporum*, *F. commune*, *F. graminearum*, *F. brachygibbosum*, *R. solani* ve *S. solani* üzerinde antagonistik etki gösterdiği bilinmektedir (Wang ve ark., 2023).

*B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarını içeren konsorsiyum incelendiğinde elde edilen üretim miktarının 0,032 g/50 mL olduğu belirlendi. Konsorsiyumu oluşturan *B. halotolerans* NR\_115063.1'in biyosüpfektan üretim miktarının 0,019 g/50 mL, *B. cereus* ATCC 14579'un biyosüpfektan üretim miktarının 0,038 g/50 mL ve *B. subtilis* ATCC 6633'ün 0,05 g/50 mL biyosüpfektan ürettiği göz önünde bulundurulduğunda oluşturulan bu konsorsiyumdan elde edilen miktarın yetersiz kaldığı saptandı.

Bireysel üretimleri sırasıyla 0,05 g/50 mL ve 0,019 g/50 mL olarak belirlenen *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarının konsorsiyumdaki biyosüpfektan üretimlerinin 0,098 g/50 mL olduğu ortaya kondu. Bu bağlamda, yürütülen çalışmada elde edilen bulgularla etkili biyosüpfektanın yanı sıra verimli üretim açısından da uygun konsorsiyumun *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarından oluştuğu saptandı. Bu doğrultuda, biyosüpfektan üretiminin artırılmasına yönelik ilerleyecek çalışmalarda biyosüpfektan üretimine uygun konsorsiyum *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 olarak belirlenirken diğer konsorsiyumlar çalışma kapsamından çıkartıldı. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-2).

Çalışmamızın sonuçlarının literatürle karşılaştırılması için elde ettiğimiz 50 mL'deki sonuçlar litre için hesaplandığında, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* konsorsiyumunun 1,96 g/L; *B. cereus* ve *B. subtilis* konsorsiyumunun 1,14 g/L; *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. halotolerans* konsorsiyumunun 0,64 g/L; *B. cereus* ve *B. halotolerans* konsorsiyumunun 0,46 g/L biyosüpfektan ürettiği saptandı.

Literatürde *Bacillus* türleriyle oluşturulan konsorsiyumlar ile biyosüpfektan üretim çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, Darvishi ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yayımlanan çalışmada (Darvishi ve ark., 2011) *Enterobacter cloacae* ve *Pseudomonas* sp. ile oluşturulan konsorsiyum uygun şartlarda 1.74 g/L üretim gerçekleştirmiştir. Alves ve arkadaşlarının 2019 yılında yayımladıkları başka bir çalışmada (Alves, Sequeira ve Cunha, 2019) *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa* ve *Listeria innocua* ile oluşturulan konsorsiyumdan elde ettikleri biyosüpfektan miktarlarının bireysel üretimlere göre yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. 2024 yılında Wei ve arkadaşlarının yayımladığı bir çalışmada (Wei ve ark., 2024) *B. subtilis*, rekombinant *Corynebacterium glutamicum* ve *Yarrowia lipolytica* suşlarını içeren konsorsiyumdan optimum şartlar altında 2100 mg/L fengisin elde etmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışma kapsamında biyosüpfektan üretimine uygun konsorsiyum olarak belirlenen *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarını içeren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu bağlamda, etkili ve verimli biyosüpfektan üreten bu konsorsiyum ileride yürütülecek çalışmalara katkı sağlayacaktır.

#### **4.4. Biyosüpfektan Üretiminde Atıkların Kullanımının Araştırılması**

##### **4.4.1. Biyosüpfektan Üretiminde Uygun Atık Karbon Kaynağının Araştırılması**

Biyosüpfektan üretimi için kullanılan besiyerlerinin içeriğinin biyosüpfektan üretimini ve üretilen biyosüpfektanın özelliklerini doğrudan etkilediği bilinmektedir (Biktasheva ve ark., 2024). Özellikle besiyerinde bulunan karbon kaynağı, azot kaynağı, C:N oranı gibi faktörler (Banat ve ark., 2014) biyosüpfektan üretimini etkiler. Daha önce yapılan bir çalışmada *Ochrobactrum* sp. suşunun gliserol, patates atığı ve atık kızartma yağında üretildiğinde sadece gliserol içeren besiyerinden elde edilen biyosüpfektanın emülsifiye aktivitesinin %50±5 olarak belirlenirken, diğer besiyerlerinde %14±2'ye kadar düştüğü ortaya konmuştur (Biktasheva ve ark., 2024). Bu bağlamda, biyosüpfektan üretiminde kullanılacak karbon kaynağının belirlenmesi üretim için önemli bir faktördür (Onwosi ve Odibo, 2012). Üretim ortamlarında kullanılacak bu karbon kaynakları glukoz (Guerra-Santos, Käppeli ve Fiechter, 1984) ve maltoz (Jain ve ark., 2013) gibi karbonhidrat grubu olabileceği gibi çeşitli atıklarda karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Örneğin literatürde *Bacillus* cinsi bakterilerden biyosüpfektan üretilen çalışmalarda melas (Verma ve ark., 2023), patates yıkama suyu (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023), peynir altı suyu (PAS) (Chaudhary ve ark., 2023), hurma atığı (Charoentanaworakun ve ark., 2023) ve meyve

posaları (Kumar ve ark., 2023; Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023; Alara, Abdurahman ve Ali, 2024) gibi atıklar karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda, karbon kaynağı olarak kullanımı araştırılacak atıkların belirlenmesinde özellikle Türkiye’deki gıda atıkları incelendi. Türkiye’deki tarımsal faaliyetler ve gıda endüstrileri değerlendirildiğinde, atık karbon kaynağı olarak melas, şilempe ve lor peynirinden elde edilen PAS kullanıldı. Türkiye’de üretilen şeker pancarından etanol elde edilirken ortaya çıkan iki önemli yan ürün meydana gelmektedir (Dikmen ve Bozdağ, 2018). Bu yan ürünlerden ilki melas diğeri ise melasın fermantasyonu ve destilasyonu ile alkol gruplarının uzaklaştırılmasıyla meydana gelen şilempedir<sup>3</sup> (Ateş ve Namlı, 2021). Peynir üretimi sırasında ortaya çıkan PAS ise gıda endüstrisinin farklı bir dalından elde edilen atıktır (Dinçoğlu ve Ardıç, 2012). Bu bağlamda, atık karbon kaynağı olarak kullanılacak atıkların belirlenmesiyle atık geri dönüşümüyle ekonomiye katkı sağlanmasının yanı sıra yüksek üretim maliyetli biyosürefektanlara alternatif, verimli ve düşük maliyetli biyosürefektan üretimi hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda, modifiye BH besiyeri içerisindeki karbon kaynağı glukoz çıkartılarak yerine ayrı ayrı %2 mL (v/v) melas, şilempe ve PAS atıkları eklendi. Oluşturulan konsorsiyum bu atıkları içeren besiyerlerinde ekildi. İnkübasyon 7 gün boyunca 150 rpm ve 30 °C’de gerçekleştirildi. Biyosürefektan üretimi sonunda elde edilen HKS’lerde çeşitli atıkların biyosürefektan varlığı üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi için daralma-yayılma, yağ yayılma ve *E*<sub>24</sub> testleri tekrarlanırken, biyosürefektan üretim verimliliğinin değerlendirilmesi için ekstraksiyon ve gravimetrik ölçüm yöntemi kullanıldı. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile p<0,05 anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-3).

Benzer başka bir çalışmada, ise *Bacillus* sp. suşunun 1-2 dakika arasında çökme meydana getirdiği ortaya konmuştur (Gomaa ve ark., 2021). Buna ek olarak, daha önce yürütülen bir çalışmada patates yıkama suyu kullanılarak üretilen *Bacillus* sp. suşunun ürettiği biyosürefektanın 1 dakikadan kısa sürede çökme meydana getirirken kullanılarak üretilen biyosürefektanın meydana getirdiği çökmenin 1-3 dakika arasında olduğu bildirilmiştir (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023). Bu noktada çalışmamızın daralma-yayılma sonuçları değerlendirildiğinde (Çizelge 4.3.), besiyerinde karbon kaynağı olarak şilempe kullanılan besiyerlerinden elde edilen HKS’lerin tüm damlalarda 1 dakikadan kısa sürede çökme

---

<sup>3</sup>Şilempe, Türkçe literatürde, *vinas* olarak da geçmektedir.

meydana getirdiği belirlendi. Buna ek olarak, melas ve PAS kullanılan besiyerlerinde de biyosürefektan üretildiği damlalarda 1-3 dakika arasında çökme meydana gelmesiyle saptandı. Bu durumda, yapılan ilk çalışmadan elde edilen sonuçların literatürle de karşılaştırılmasıyla, biyosürefektan üretim maliyetini düşürmek için oluşturulacak besiyerinde şilempenin kullanılmasının uygun olacağı saptandı. Bu bulguyu desteklemek adına yağ yayılma testiyle devam edildi.

**Çizelge 4.3.** Üretim ortamında kullanılan atık karbon kaynağının biyosürefektan üretimine etkisinin daralma-yayılma yöntemi ile araştırılması.

	Melas	Şilempe	PAS
<b>Parafin</b>	+++	++++	+++
<b>Zeytinyağı</b>	+++	++++	+++
<b>Ayçiçek Yağı</b>	+++	++++	+++

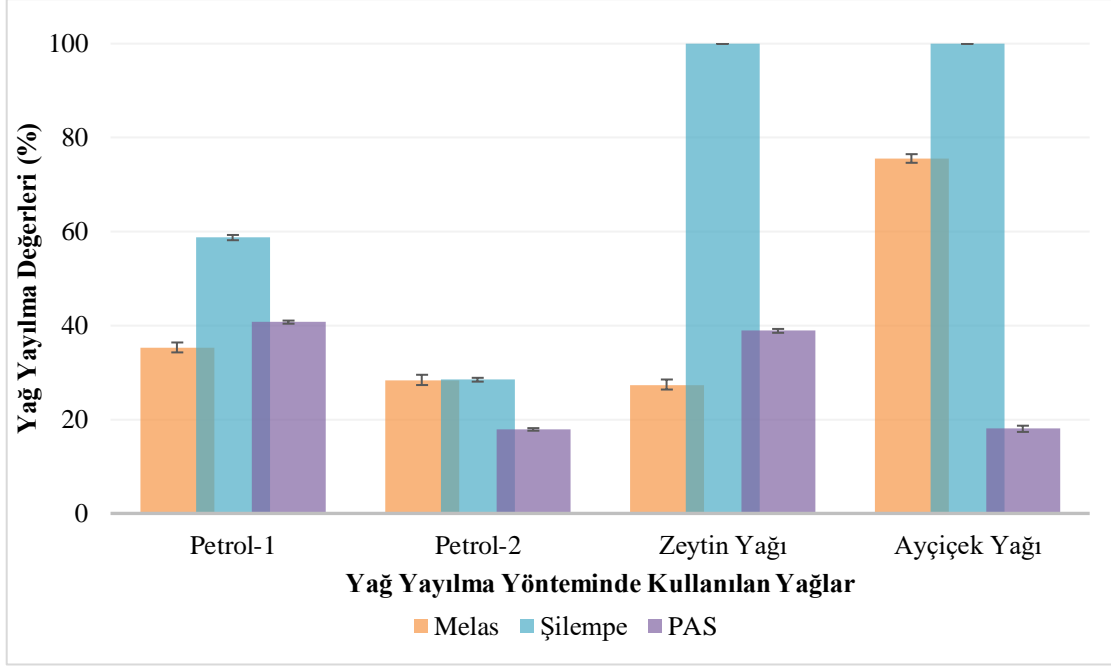
Biyosürefektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

*Damlada 1 dakikadan daha kısa sürede çökme (++++), 1-3 dakika arasında çökme (+++), 3-5 dakika arasında çökme (++) ve 5 dakikadan fazla sürede çökme (+) olarak değerlendirildi.*

Literatür incelendiğinde, *Bacillus* sp. suşunun yaklaşık 5-7 cm yayılma zonu meydana getirdiği ortaya konmuştur (Ghazal ve ark., 2017). Buna ek olarak, *Bacillus subtilis* CC9 suşunun petrol yüzeyinde 5 cm yayılma zonu meydana getirdiği bildirilmiştir (Bilen Özyürek ve Soyuer, 2023). Yapılan benzer bir çalışmada, atık kullanılarak üretilen *Bacillus* sp. suşunun petrol üzerinde 7.7 cm yayılma zonu oluşturduğu bildirilmiştir (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023), Bu bağlamda, çalışmamızda, yağ yayılma sonuçlarına göre de (Çizelge 4.5.) oluşturulan tüm besiyerlerinde biyosürefektan varlığı saptandı. Daralma-yayılma sonuçlarına paralel olarak şilempenin düşük maliyetli modifiye BH için uygun olduğu zeytinyağı ve ayçiçek yağlarında tam açılma sağlamasına ek olarak petrol kaynaklarında da diğer atıklarla elde edilen biyosürefektanlara göre daha yüksek açılma sağlanmasıyla belirlendi. Elde edilen bu iki bulguya ek olarak biyosürefektan varlığının araştırılacağı son basamak olan  $E_{24}$  yöntemine geçildi.





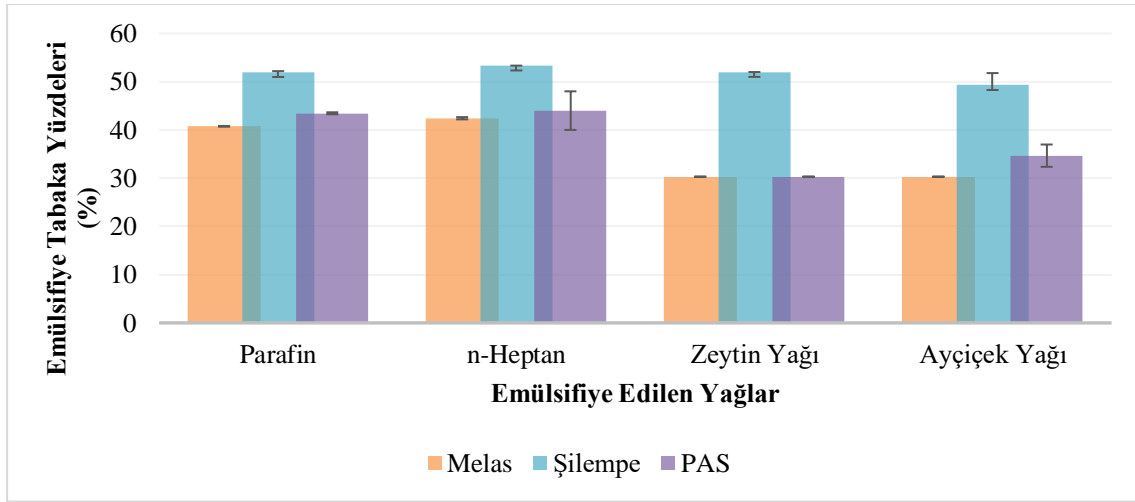
**Şekil 4.5.** Atık-modifiye ortamda üretilen biyosüpfektan varlığının yağ yayılma yöntemiyle araştırılması.

Biyosüpfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

Çalışmamızda daha önce yaptığımız sonuçlarla paralel olarak tüm besiyerlerinde biyosüpfektan varlığı  $E_{24}$  yöntemiyle saptandı (Şekil 4.6.). Şilempe kullanılan besiyerinde üretilen biyosüpfektanın tüm ortamlarda %48 üzerinde emülsifiye tabaka meydana getirdiği belirlendi. Bu durumda, biyosüpfektan varlığının araştırıldığı bu üç yöntemden elde edilen bulgular şilempenin biyosüpfektan üretimi için uygun olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın bu noktasında, kullanılan atıkların biyosüpfektan üretim verimliliği üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla gravimetrik ölçümle devam edildi.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, *Bacillus* sp. suşunun %50 emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği ortaya konmuştur (Gomaa ve ark., 2021). Benzer çalışmalarda atık kullanılarak üretilen biyosüpfektanların %50.1 (Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023) ve %70-80 (Kumar, Dubey ve Maheshwari, 2016) emülsifiye tabaka oluşturduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.6.** Atık-modifiye ortamda üretilen biyosümfektan varlığının  $E_{24}$  yöntemiyle araştırılması.

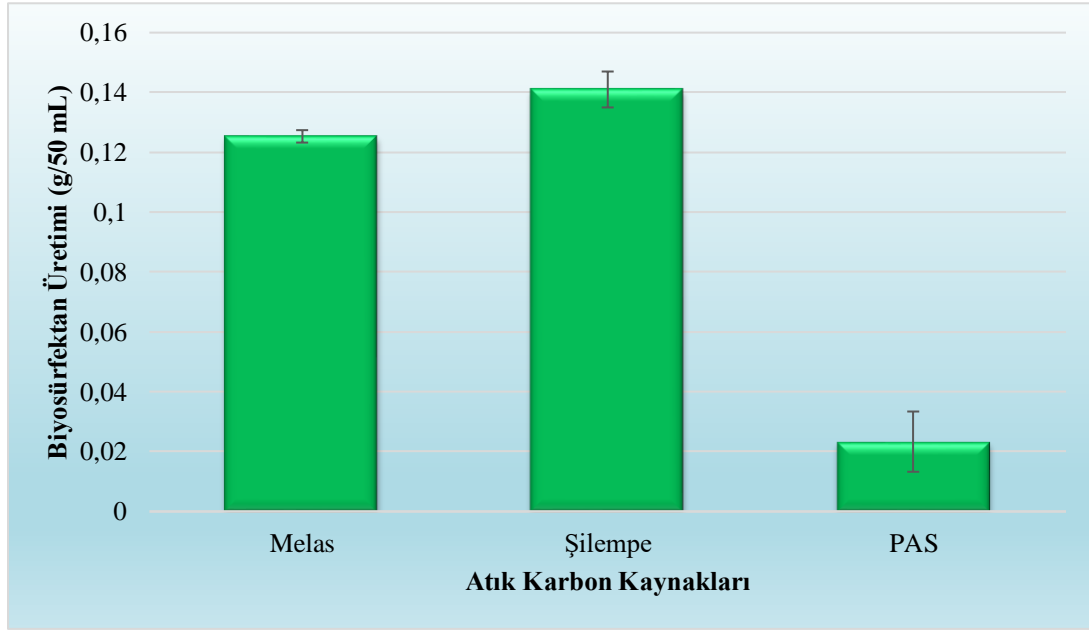
Biyosümfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

Elde edilen gravimetrik ölçümlere göre (Şekil 4.7.) atık kullanılarak modifiye edilen besiyerleri arasında biyosümfektan üretimine en uygun atık karbonunun 0,1410 g/50 mL’lik biyosümfektan üretimiyle şilempe olduğu belirlendi. Diğer üretimler incelendiğinde melas kullanılan besiyerinde üretimin şilempe kadar yüksek olmamakla birlikte, gerektiğinde kullanılabilceği saptanırken, lor peynirinden elde edilen PAS yerine farklı peynirlere ait PAS’ların kullanılmasının araştırılması veya ilave atık kaynağı olabileceği görüldü.

Şekil 4.4. ve Şekil 4.7. karşılaştırıldığında, modifiye BH besiyerinde glukoz kullanıldığı durumda konsorsiyumun ürettiği biyosümfektan miktarının 0,098 g/50 mL olduğu görülürken; Şilempe ve melas kullanılan besiyerlerinde üretim miktarlarının arttığı görülmektedir. Buna ek olarak, şilempe kullanılan besiyerinde üretilen biyosümfektan miktarının melas kullanılarak üretilen biyosümfektan miktarından yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Ancak karbon kaynağı olarak PAS içeren besiyerinden elde edilen biyosümfektanın daha düşük olması, konsorsiyumun PAS’ı etkili kullanmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, daha önce yapılan çalışmalarla *Bacillus subtilis* 168

suşunun laktoz, galaktoz ve ksiloz gibi şekerleri tek karbon kaynağı olarak kullanamadığı bilinmektedir. (Steinmetz, 1993).



**Şekil 4.7.** Üretim ortamında kullanılan atıklar ile biyosüpfektan üretimi.

Biyosüpfektan üretimi modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

Bu noktada, çalışmamızın sonuçlarının literatürle karşılaştırılması amacıyla, elde ettiğimiz 50 mL’deki üretim miktarları litre için hesaplandığında, melas içeren ortamda 2,5 g/L, şilempe içeren ortamda 2,82 g/L ve PAS içeren ortamda 0,46 g/L biyosüpfektan üretildiği belirlendi.

Besiyerinde karbon kaynağının melas olduğu en uygun koşulların belirlendiği bir çalışmada (Rahimi Kashkouli ve ark., 2011) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun 0,381 g/L biyosüpfektan ürettiği belirlenmiştir. Rahimi Kashkouli ve arkadaşları tarafından yayımlanan çalışmada kullanılan bakteriyel suşun, bu çalışma kapsamında oluşturulan konsorsiyuma dahil edilen bir bakteri olması önemlidir. 15 farklı atık karbon kaynağının biyosüpfektan üretim verimliliğine etkilerinin araştırıldığı çalışmada (Soyuer ve Bilen Özyürek 2023) *Bacillus subtilis* MG847158.1 suşu şilempe ve melas kullanılan besiyeri ortamında sırasıyla 0.110 g/L ve 0.040 g/L biyosüpfektan üretmiştir. Joshi ve arkadaşları

tarafından yayımlanan bir çalışmada (Joshi ve ark., 2016), *Bacillus licheniformis* W16 tarafından melaslı besiyerinde üretilen biyosülfektanın miktarının 0.52 g/L olduğu bulunmuştur. Substrat olarak melas kullanılan başka bir çalışmada üretilen biyosülfektanların etkinliğinin ve veriminin düştüğü ortaya konmuştur (Mouafo, Mbawala ve Ndjouenkeu, 2018). 2013 yılında Oliveira ve arkadaşları tarafından yayımlanan çalışmada (Oliveira ve Garcia-Cruz, 2013) biyosülfektan üretim ortamını atık şilempe ve kızartma yağıyla en uygun koşulların belirlenmesinden sonra sırasıyla 27,7 ve 5,7 g/L biyosülfektan elde etmişler. 2017 yılında Napolini ve arkadaşları tarafından yayımlanan (Napolini ve ark., 2017) çalışmada ramnolipid üretiminin şilempe kullanıldığında 2.7 g/L olduğu belirlenmiştir. Bu noktada, literatürdeki veriler değerlendirildiğinde bu çalışmadaki konsorsiyumun etkili ve yüksek miktarda biyosülfektan ürettiği görülmektedir. Literatürde, atık karbon kaynağı olarak melas ve PAS sıklıkla kullanılırken şilempenin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Bu durumda, çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar literatürle paralel olarak, düşük maliyetli ve verimli biyosülfektan üretiminde şilempenin de kullanılabileceği desteklenmektedir.

Bu durumda, daralma-yayılma, yağ yayılma ve  $E_{24}$  testlerine sonuçlarından yola çıkarak atık kullanılarak modifiye edilecek modifiye BH besiyerinde tek karbon kaynağının şilempe olmasının uygun olacağı belirlendi. Söz konusu bu veriler gravimetrik ölçümle de teyit edildi. Ardından üretim ortamında kullanılacak şilempenin uygun konsantrasyonun bulunmasına ve ilave azot kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalara devam edildi.

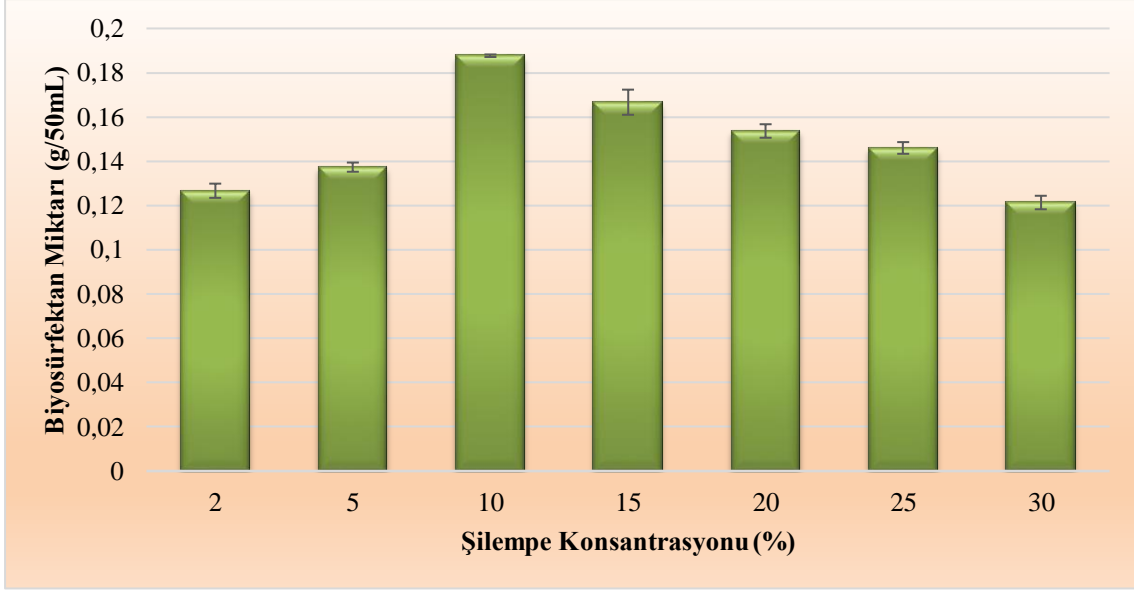
#### **4.4.2. Biyosülfektan Üretiminde İlave Azot Kaynağı Şilempe Konsantrasyonunun Araştırılması**

Besiyeri içeriğinde bulunan azot kaynağının biyosülfektan üretimini etkilediği ortaya daha önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (Abu-Ruwaida ve ark., 1991; Rahimi Kashkouli ve ark., 2011; Taowkrue ve ark., 2024). Ayrıca azot kaynağının kısıtlı kullanılmasının biyosülfektan üretimini arttıracığı belirtilmiştir (Abu-Ruwaida ve ark., 1991; Patel ve Desai, 1997). Ancak, bu çalışma kapsamında biyosülfektan üretim besiyeri olarak kullanılan BH besiyerinin içeriğinde bulunan amonyum nitrata ilave olarak %1 (w/v) maya özütü eklenmesi besiyeri maliyetini arttırarak önemli bir sorun teşkil

etmektedir. Bu noktada, atık karbon kaynağı olarak belirlenen şilempe içerisinde bulunan azot miktarının yüksek olması (Kahyaoğlu ve Kıvanç, 2007), şilempeyi bu çalışma kapsamında potansiyel bir azot kaynağı haline getirmektedir. Bu doğrultuda, ilave azot kaynağı olarak üretim maliyetini arttıran maya özütünün besiyeri içeriğinden çıkartılarak yerine şilempenin zengin azot kaynağı içeriğinden yararlanılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda, besiyerinde tek karbon kaynağı ve ilave azot kaynağı olarak kullanılacak şilempe konsantrasyonunun saptamasına yönelik çalışmalara devam edildi.

Bu bağlamda, %2 ve %30 (v/v) arasında değişen konsantrasyonlarla hazırlanan şilempe-modifiye BH besiyerleri oluşturuldu. Konsorsiyumun, 7 günlük inkübasyonu sonunda uygun şilempe konsantrasyonunun belirlenmesinde ekstraksiyon ve gravimetrik yöntem kullanıldı. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-4).

%2 (v/v) atık karbon kaynağı şilempe ve % 1 (w/v) ilave azot kaynağı maya özütü içeren modifiye BH besiyerinde biyosürefektan üretim miktarı 0,141 g/50 mL olarak belirlenmişti (Şekil 4.7.). Besiyerindeki ilave azot kaynağı maya özütünün çıkartılmasıyla hazırlanan %2 (v/v) şilempe içeren ortamda üretilen biyosürefektan miktarının düşerek 0,127 g elde edildiği belirlendi. Buna ek olarak, %5 (v/v) oranında şilempe içeren ortamda da benzer şekilde bir düşüş olduğu ve üretilen miktarın 0,137 g/50 mL olduğu belirlendi. Dolayısıyla ortamda maya özütü bulunmadığında %2 ve %5 oranlarında şilempenin biyosürefektan üretimi açısından yetersiz olduğu saptandı. Bununla birlikte şilempe-modifiye BH besiyerine %10 (v/v) şilempe eklendiğinde biyosürefektan üretim miktarının en verimli noktaya ulaştığı belirlenirken bu konsantrasyonun üzerinde biyosürefektan üretim miktarının düşmeye başladığı görüldü (Şekil 4.8.). Bu noktada, biyoteknolojik üretimlerde kullanılan besiyerinin C:N dengesinin önemli olduğu bilinmektedir (Abbot ve ark., 2022). Şilempe konsantrasyonunun %15 (v/v) ve üzerinde olduğu durumlarda BH besiyerindeki C:N dengesinin bozulmasına bağlı olduğu değerlendirildi.



**Şekil 4.8.** Farklı şilempe konsantrasyonlarında biyosümfektan üretimi.

Biyosümfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### 4.5. Biyosümfektan Üretimine Uygun Konsorsiyum Koşullarının Araştırılması

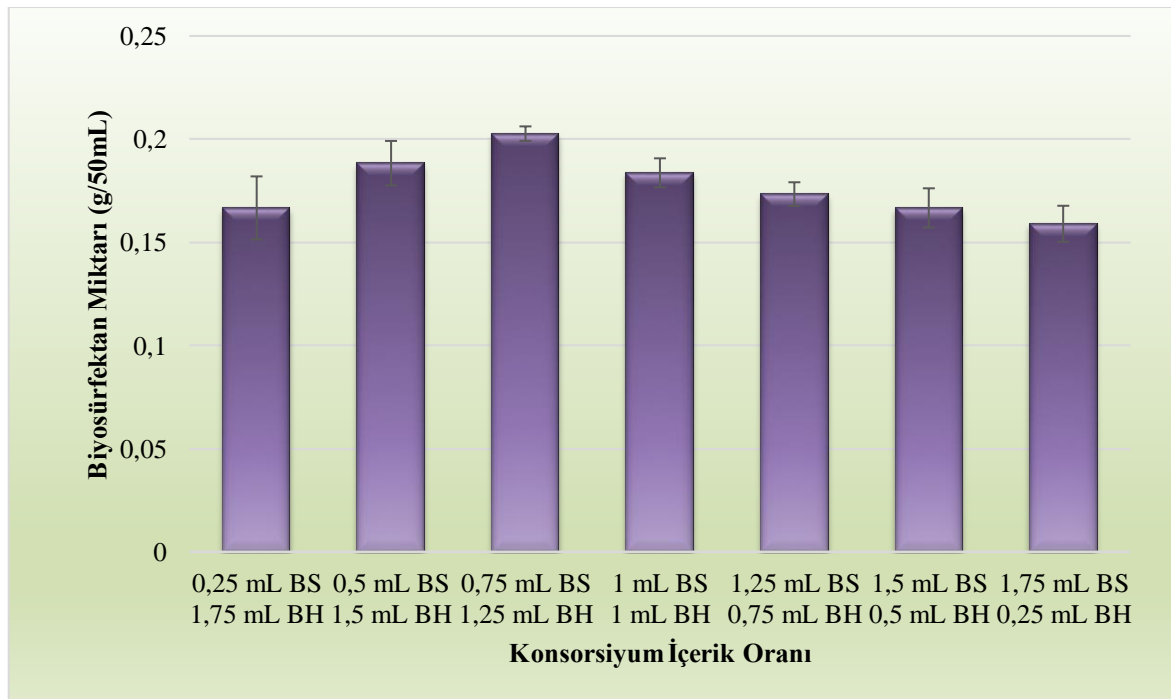
##### 4.5.1. Konsorsiyumda Bulunan Farklı *Bacillus* Konsantrasyonlarının Biyosümfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Endüstriyel üretim süreçlerinde uygun fizyolojik koşulların sağlanmasına ek olarak uygun üretici kültürün de belirlenmesi önem teşkil etmektedir. Çalışmamızın bu aşamasına kadar uygun *Bacillus* suşları ve bu suşlarla oluşturulan konsorsiyumlar arasından uygun konsorsiyum belirlendi ve ardından şilempe-modifiye BH besiyerinin biyosümfektan üretimi için uygun olduğuna karar verildi. Çalışmamızın bu aşamasında ise *Bacillus* konsorsiyumunu oluşturan suşların farklı konsantrasyonlarını deneyerek verimli biyosümfektan üretimine en uygun kültürün bulunması hedeflendi.

Bu hedef doğrultusunda, Çizelge 3.5.’de verilen şekilde hazırlanan 7 farklı konsorsiyum içeriği şilempe-modifiye BH besiyerlerine %4 (v/v) oranında ekildi. Biyosümfektan üretimi 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda konsorsiyumdaki uygun *Bacillus* konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla üretilen biyosümfektan miktarları gravimetrik ölçümlerle belirlendi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve

Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-5).

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.9.), konsorsiyumu oluşturan suşların farklı konsantrasyonlarının biyosüpfektan üretimini etkileyen önemli bir etken olduğu belirlendi. Bu noktada, verimli biyosüpfektan üretimine uygun konsorsiyum içeriğinin 0,75 mL *B. subtilis* ATCC 6633 ve 1,25 mL *B. halotolerans* NR\_115063.1 olduğu görülürken üretilen biyosüpfektan miktarının (sütun 3) 0,203 g/50 mL olduğu saptandı. Bu bağlamda, *B. subtilis* ATCC 6633 oranının *B. halotolerans* NR\_115063.1 oranına göre düşük kaldığı durumlarda biyosüpfektan üretimi giderek artarken, bu oranın eşitlendiği ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 oranının *B. subtilis* ATCC 6633 oranına göre düşük kaldığı durumlarda biyosüpfektan üretiminin düştüğü ortaya konuldu.



**Şekil 4.9.** Farklı *Bacillus* oranlarının biyosüpfektan üretimine etkileri.

Biyosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

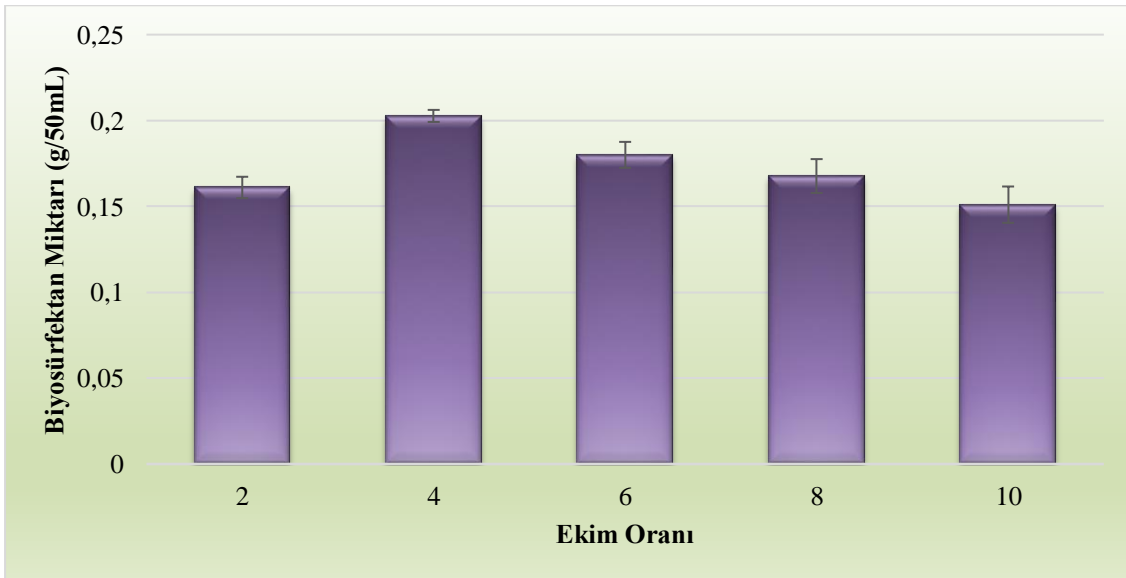
Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

BS: *Bacillus subtilis*; BH: *Bacillus halotolerans*

#### 4.5.2. Hazırlanan Konsorsiyumun Farklı Konsantrasyonlarının Biosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda belirtildiği gibi endüstriyel üretimlerde verimli üretimin gerçekleştirilebilmesi için kültür ekim oranları oldukça önemlidir. Bu bağlamda, konsorsiyumu oluşturan *B. subtilis* ve *B. halotolerans* oranlarının bulunmasından sonra besiyerinde bulunması gereken konsorsiyum konsantrasyonunun verimli biosüpfektan üretimine etkisi araştırıldı. Hazırlanan şilempe-modifiye BH besiyerlerine konsorsiyum %2, %4, %6, %8 ve %10 (v/v) oranlarında ekildi. Biosüpfektan üretimi, 30°C’de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda biosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-6).

Şilempe-modifiye BH besiyerinde biosüpfektan üretimine en uygun kültür konsantrasyonunun %4 (v/v) olduğu belirlenirken üretilen biosüpfektan miktarının 0,203 g/50 mL olduğu saptandı (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Konsorsiyum ekim oranlarının biosüpfektan üretimine etkileri.

Biosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.



#### 4.6. İz Element Konsantrasyonunun Biosümfektan Üretimine Etkisinin Araştırılması

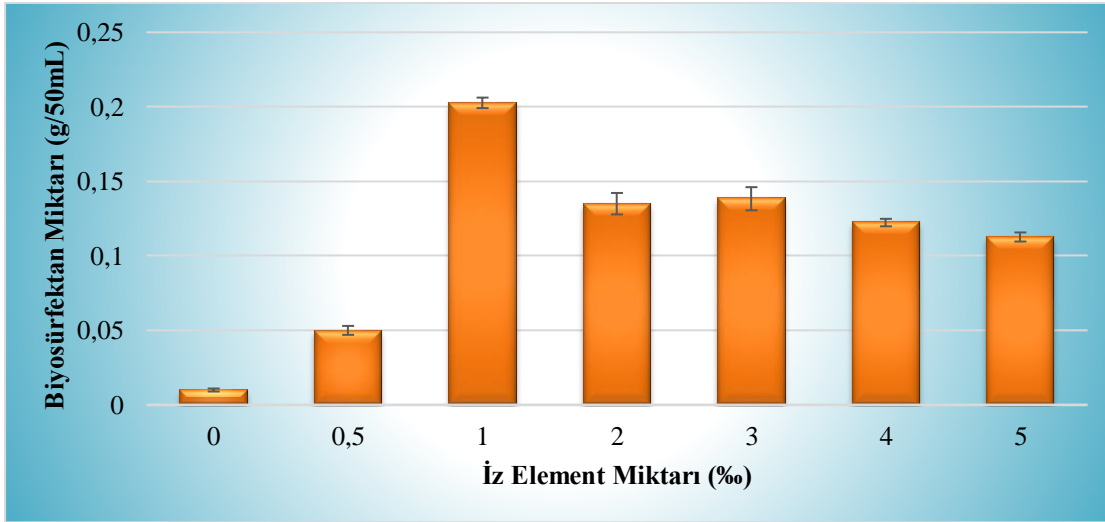
Besiyerine eklenecek iz element miktarının biosümfektan üretimini etkilediği belirlenmiştir (Nurfarahin, Mohamed ve Phang, 2018). İz elementler enzimlerin aktivasyonunu etkileyerek üretimlerin artmasını sağlar (Schobert, 1992). Gudiña ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımladıkları çalışmada (Gudiña ve ark., 2015), demir, manganez ve magnezyumun minerallerinin *B. subtilis* tarafından üretilen sümfektin sentezinde yer alan enzimlerin kofaktörleri olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte iz element miktarının fazla olması hücre içi dengenin bozulmasına yol açarak metabolit üretimlerini engeller. İz element miktarının sınırlayıcı etki göstererek biosümfektan üretimini arttırdığı da bilinmektedir (Nurfarahin, Mohamed ve Phang, 2018).

Literatürde biosümfektan üretiminde yeni bir alternatif olan *B. halotolerans* ve *B. subtilis* suşlarından oluşan konsorsiyum için modifiye BH besiyerinde kullanılacak iz element miktarının belirlenmesi de önemli bir kriterdir. Bu doğrultuda, Çizelge 3.3.'de verilen şekilde hazırlanan iz elementin %0-%5 arasında değişen oranları, şilempe-modifiye BH besiyerine eklendi. Biosümfektan üretimi 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda uygun iz element miktarının belirlenmesi amacıyla üretilen biosümfektan miktarları gravimetrik ölçümlerle yapıldı. Yürütölen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-7).

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.11.), modifiye BH besiyerine eklenen iz element miktarının artmasıyla üretilen biosümfektan miktarının azaldığı saptandı. Biosümfektan üretimi için şilempe-modifiye besiyerine %5 iz element konsantrasyonu eklendiğinde 0,113 g/50 mL olduğu görülürken, iz element konsantrasyonunun %1'e düşürölmesiyle üretim miktarının 0,203 g/50 mL'ye çıktığı belirlendi.

Nurfarahin ve arkadaşlarının belirttiği gibi (Nurfarahin, Mohamed ve Phang, 2018), biosümfektan üretim ortamında en az %1 (v/v) oranında iz element bulunmalıdır. Benzer şekilde Makkar ve Cameotra tarafından da, *B. subtilis* MTCC 2423 suşunun en verimli

biyosüpfektan üretimi için, besiyerinde 1 mL/L iz element konsantrasyonu içermesi gerektiği ortaya konmuştur (Makkar ve Cameotra, 2002b). Yapılan çalışmada (Makkar ve Cameotra, 2002b), 7 farklı iz element konsantrasyonu denenerek %1 (v/v) konsantrasyonunun altında veya üzerindeki konsantrasyonlarda biyosüpfektan üretiminin düştüğü ortaya konmuştur.



**Şekil 4.11.** İz element konsantrasyonunun biyosüpfektan üretimine etkisi.

Biyosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### **4.7. Biyosüpfektan Üretimini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Araştırılması**

Günümüzde deterjan endüstrisi (Inès ve ark., 2023), kozmetik endüstrisi (Adu ve ark., 2020), petrol endüstrisi (Sharma, Lavania ve Lal, 2023), gıda endüstrisi (Ribeiro, Guerra ve Sarubbo, 2020a), sağlık endüstrisi (Bjerk ve ark., 2021) ve tarım endüstrisi (Silva ve ark., 2024) gibi farklı alanlarda sentetik ve biyolojik süpfektanlar farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, endüstrilerde biyosüpfektan kullanım ölçeği sentetik süpfektanlara göre oldukça sınırlıdır (Jahan ve ark., 2020). Sentetik süpfektanlara göre birçok avantajı bulunan biyosüpfektanların endüstrilerde büyük yer edinmemesinin en önemli sebebi biyosüpfektan üretim maliyetlerinin yüksek olmasıdır (Jahan ve ark., 2020; Begum, Saha ve Mandal, 2023). Buna ilave olarak, üretilen biyosüpfektan miktarının yüksek olması da endüstriyel alanlarda kullanılabilirliği açısından gereklidir. Araştırmacılar da çeşitli yöntemler kullanarak biyosüpfektan üretim maliyetlerini

düşürmeyi ve üretim miktarını artırmayı hedeflemektedir (Darvishi ve ark., 2011; Kumari ve ark., 2023).

Bu doğrultuda, çalışmamızın bu aşamasına kadar uygun *Bacillus* suşlarıyla oluşturulan konsorsiyumlar arasından biyosüpfektan üretimine uygun olanın belirlenmesi, biyosüpfektan üretimi için şilempe-modifiye BH besiyeri belirlendi. Ardından verimli biyosüpfektan üretimine en uygun konsorsiyumunu oluşturan suşların farklı konsantrasyonları ile ekim oranları saptandı. Üretim ortamında bulunması gereken uygun iz element konsantrasyonunun da belirlenmesiyle çalışmamızın bu aşamasında, biyosüpfektan üretim maliyetinin düşürülmesine ek olarak üretim verimliliğinin de artırılması ve konsorsiyumun farklı fizyolojik koşullardaki biyosüpfektan üretimlerinin araştırılması hedeflendi

Bu bağlamda, biyosüpfektan üretimini etkileyen fizyolojik koşulların araştırılmasında farklı başlangıç pH değeri, inkübasyon koşulu, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi olmak üzere biyosüpfektan üretimini doğrudan etkileyen değişkenlerin belirlenmesine ek olarak farklı değerlerde biyosüpfektan üretiminin nasıl etkileneceğinin de saptanmasına yönelik çalışmalar yapıldı.

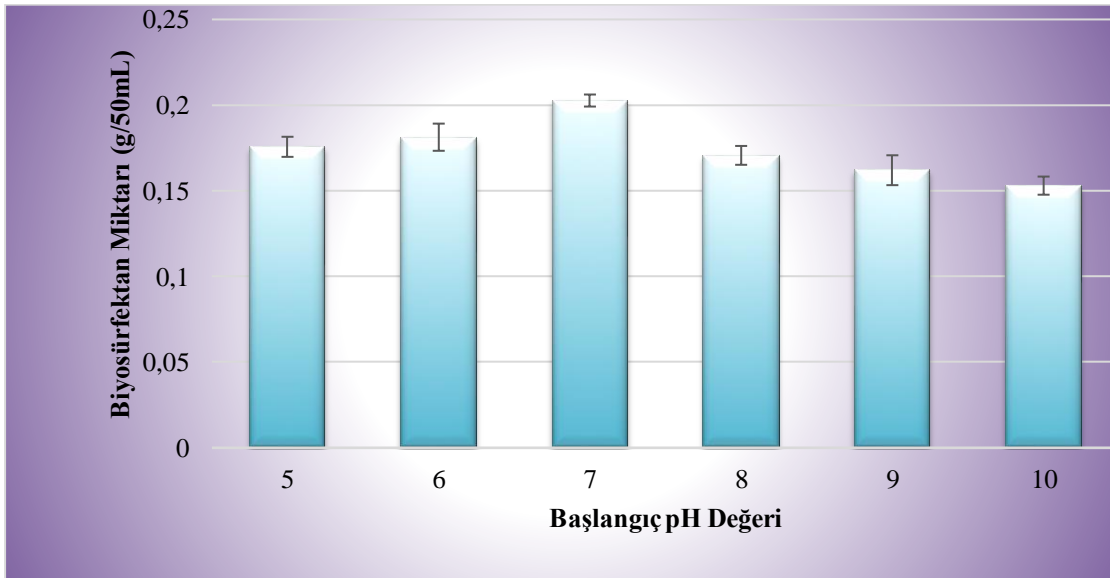
#### **4.7.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

Biyosüpfektan üretiminde kullanılan besiyerinin pH değeri önemli bir fizyolojik koşuldur (Najafi ark., 2010; Abbot ve ark., 2022). Bu bağlamda, oluşturulan konsorsiyumun verimli biyosüpfektan üretimi için uygun başlangıç pH değerinin bulunması amacıyla pH 5 ile pH 10 olmak üzere asidik, nötral, bazik ve aşırı bazik besiyerleri hazırlandı. Konsorsiyumunun 150 rpm, 30 °C ve 7 gün süren inkübasyon sonundaki biyosüpfektan üretimleri değerlendirildi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-8).

Biyosüpfektan üretiminde kullanılan bakteriler laktik asit bakterileri gibi özel bir gruba ait olmadıkları sürece nötral pH'ları, fungus türleri daha çok asidik ortamları tercih eder. Laktik asit bakterilerinin pH 3.00 (Venico Bello ve ark., 2012) ve pH 5.00 (Souza ve ark.,

2017) aralığında biyosüpfektan ürettiği bilinmektedir. Bununla birlikte çevresel izolatların nötral pH'larda biyosüpfektan üretim verimliliği daha yüksektir (Parthipan ve ark., 2017; Soyuer ve Bilen Özyürek, 2023). Parthipan ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yayımlanan çalışmada, *B. subtilis* A1 suşunun üretim ortamının optimizasyonu ile biyosüpfektan üretim çalışması yapılmıştır (Parthipan ve ark., 2017). Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre en yüksek biyosüpfektan üretimini ortam şartları pH 7.00 olduğunda elde etmiştir.

Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.12.) incelendiğinde, konsorsiyumun biyosüpfektan üretimine uygun başlangıç pH değerinin pH 7 olduğuna belirlendi. pH 5-10 arasındaki diğer pH değerlerinde de biyosüpfektan üretim miktarının önemli ölçüde değişmediği ve bu nedenle endüstriyel üretim süreçlerinde yaşanacak aksamaları tolere edilebilmesi açısından önemli bir avantajlı olduğuna saptandı. Bu durumda, endüstriyel üretim açısından ihtiyaç duyulması halinde biyosüpfektan üretimi sırasında diğer pH değerlerinden de yararlanılabilecek ve üretim aksamadan devam edecektir.



**Şekil 4.12.** Farklı başlangıç değerlerinin biyosüpfektan üretimine etkileri.

Biyosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

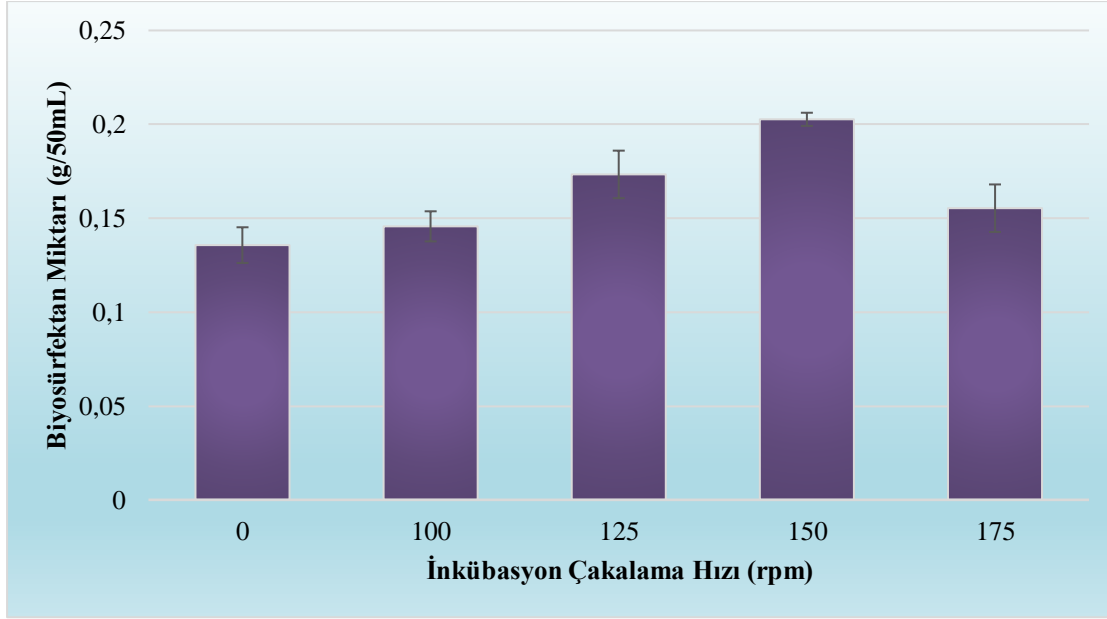
Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### 4.7.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Çalkalama hızının besiyerindeki oksijen dağılımını etkilemesi, biyosüpfektan üretiminin etkileyen bir faktördür (Joy ve ark., 2019; Abbot ve ark., 2022). Bu doğrultuda, farklı inkübasyon koşullarının biyosüpfektan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, şilempe-modifiye BH besiyerine konsorsiyumunun %4 ekimleri yapılarak statik, 100 rpm, 125 rpm, 150 rpm ve 175 rpm olmak üzere farklı çalkalama hızlarında gerçekleşen 7 günlük inkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-9).

*Achromobacter* sp. ile yürütülen biyosüpfektan üretim çalışmasında 120 rpm çalkalama hızında en yüksek biyosüpfektan üretimi 4.13 g/L (Joy ve ark., 2019) olarak saptanmış; *B. amyloliquefaciens* ile yürütülen bir başka çalışmada ise 150 rpm çalkalama hızında 4.7 g/L (Yao ve ark., 2015) olarak belirlenmiştir. *B. subtilis* ANSKLAB03 ile yürütülen diğer bir çalışmadaysa 0.324 g/L biyosüpfektan üretimi 150 rpm çalkalama hızında elde edilmiştir (Nayarisseri, Singh ve Singh, 2018).

Çalışmamızın sonuçlar incelendiğinde, biyosüpfektan üretimine en uygun çalkama hızının 150 rpm çalkalama hızı oldu görülmektedir. 150 rpm'de üretilen biyosüpfektan miktarının 0,203 g/50 mL olarak bulunurken diğer inkübasyon koşullarında da biyosüpfektan üretiminin devam ettiği saptandı (Şekil 4.13.). Bu bağlamda, üretimin statik koşullarda bile devam etmesi endüstriyel üretimlerde maliyeti düşürmek amacıyla tercih edilebilecek bir durumdur.



**Şekil 4.13.** Farklı inkübasyon koşullarının biyosüpfektan üretimine etkileri.

Biyosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C'ye ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

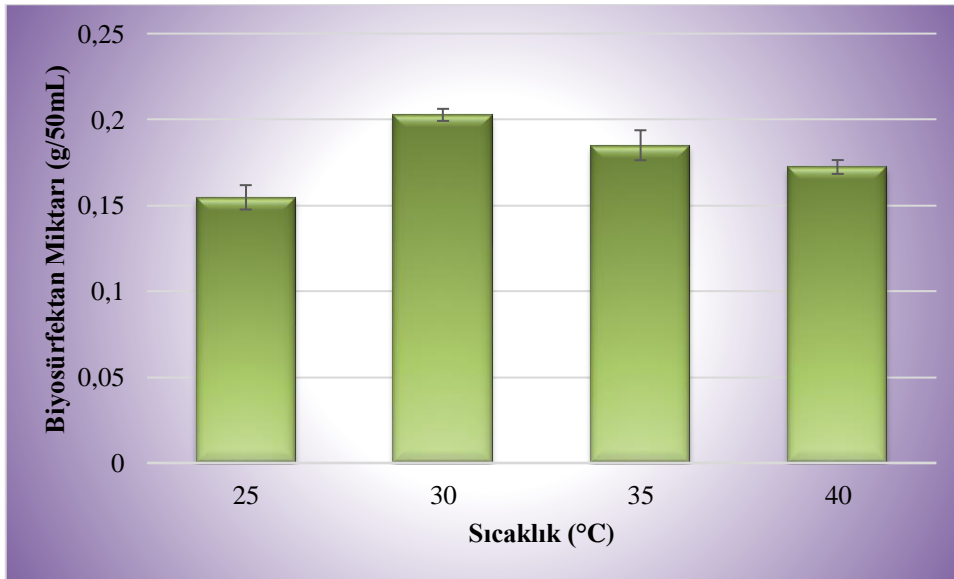
Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### 4.7.3. Farklı Sıcaklıklarının Biyosüpfektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

Sıcaklık, mikroorganizmaların metabolit üretimleri açısından önemli bir parametredir (Nayariseri, Singh ve Singh, 2018; Abbot ve ark., 2022). Farklı ortamlarda yaşamaya adapte olan mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosüpfektanlar 4 °C'den (Trudgeon ve ark., 2020) 60 °C'ye (Elazzazy, Abdelmoneim ve Almaghrabi, 2015) kadar değişen sıcaklıklarda biyosüpfektan üretimi yapılmaktadır. Çalışılan canlının gereksinim duyduğu sıcaklık değerleri farklılık göstermektedir. Çalışmamızda, oluşturulan konsorsiyumun biyosüpfektan üretiminde uygun sıcaklığın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, oluşturulan konsorsiyumun biyosüpfektan üretiminde uygun sıcaklığın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, biyosüpfektan üretimi için uygun şartlara getirilen şilempe-modifiye BH besiyerine %4 (v/v) oranında hazırlanan konsorsiyumunun ekimleri yapılarak 150 rpm çakalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 gün boyunca biyosüpfektan üretime bırakıldı. İnkübatör sıcaklıkları uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C sıcaklıklarına ayarlandı. İnkübasyon sonunda biyosüpfektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi.

Farklı sıcaklıkların biyosülfektan üretimine etkilerinin verildiği Şekil 4.14. incelendiğinde, konsorsiyumun biyosülfektan üretime en uygun sıcaklığın 0,203 g/50 mL biyosülfektan üretilen 30°C olduğu belirlendi. Çalışılan farklı sıcaklıklar arasındaki üretim farkının önemli ölçüde değişmediği saptandı. Bu bağlamda, geniş sıcaklık aralığında biyosülfektan üretiminin tespit edilmesi, endüstriyel üretimin yerine göre sıcaklık farkı ile maliyet hesabı yapılarak üretim için farklı sıcaklıkların tercih edilmesi mümkün olur.

Literatürde, bu çalışmayla paralel yürütülen çalışmalarda, biyosülfektan üretimi için uygun sıcaklığın *B. subtilis* için 40 °C (Nayarisseri, Singh ve Singh, 2018), *Bacillus* sp için 30 °C (Agarry ve ark., 2015), *Pseudomonas* sp için 40 °C (Agarry ve ark., 2015), *B. pumilus* için 30 °C (Marchut-Mikołajczyk ve ark., 2021) ve *P. balearica* için 30 °C (Motwali ve ark., 2021) olduğu ortaya konmuştur.



**Şekil 4.14.** Farklı sıcaklıkların biyosülfektan üretimine etkileri.

Biyosülfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### 4.7.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Biyosürefektan Üretimine Etkilerinin Araştırılması

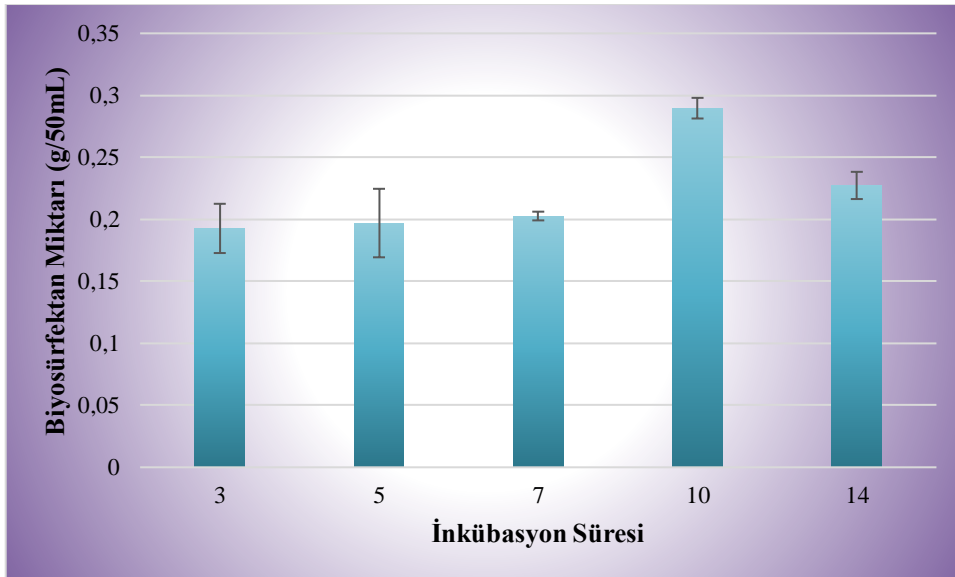
Değişen inkübasyon süreleri mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin miktarını etkileyen bir parametredir (Abdelghani, 2017; Abbot ve ark., 2022). Sekonder metabolitlerden olan biyosürefektanlar, erken üreme evrelerinde üretilir ve ölüm fazı olarak bilinen evreye kadar üretim ortamında tespit edilebilirler (Ibrahim ve ark., 2020). Log fazından önce hücreye bağlı olarak bulunan biyosürefektanın, bu evrede kültür sıvısına salınması ile konsantrasyonu artar (Chandran ve Das, 2010). Uzun inkübasyon süresi, üretim ortamındaki C:N dengesinin bozulması, biyosürefektan üretimine bağlı olarak başlangıç pH değerinin değişmesi ve zaman için besiyerinde meydana gelen çeşitli metabolitlerin mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal ya da bakteriyostatik etki yaratmaya başlaması suşların üretiminde de düşüş yaratarak biyosürefektan üretimini olumsuz etkiler. Buna bağlı olarak, inkübasyon sürecinin uzun tutulduğu durumda mikroorganizmaların ölüm fazına girmesiyle üretim ortamındaki biyosürefektan konsantrasyonu azalmaya başlar (Ibrahim ve ark., 2020).

Bu bağlamda, biyosürefektan üretiminde uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla konsorsiyumunun şilempe-modifiye BH besiyerinde biyosürefektan üretimi araştırıldı. Bu doğrultuda 3, 5, 7 10 ve 14 günlük inkübasyon süreleri sonunda biyosürefektan üretimleri gravimetrik yöntemle belirlendi. Yürütülen deneysel çalışmaların sonuçları arasındaki anlamlı farklılık ANOVA ve Kruskal Wallis-H Testi ile  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde bulunarak sonuçlar istatistiksel analiz ile desteklenmiştir (EK-10).

Sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.15), konsorsiyum için en yüksek biyosürefektan üretiminin 10 günlük inkübasyon sonunda elde edildiği belirlenirken 14 gün sonunda ortamda bulunan biyosürefektan konsantrasyonunun azaldığı saptandı. Sekonder metabolit ürün olan biyosürefektanın ortamda 3. günden itibaren tespit edilmesi endüstriyel açıdan başka bir avantaj yaratmaktadır. Gerekli durumlarda inkübasyon süresinin düşürülerek üretim sıklığının artırılması büyük ölçekli üretimlerde üretim maliyetini düşürecektir.



Literatür incelendiğinde biyosüpfektan konsantrasyonun inkübasyondan sonraki 3. günde artış göstermeye başladığı ortaya konmuştur (Sharma ve Pandey, 2020). Araştırmacılar hedefledikleri biyosüpfektan miktarına ulaşmak için farklı inkübasyon sürelerini araştırırlar. Bu sebeple, literatürde farklı inkübasyon süreleriyle üretilen biyosüpfektan çalışmaları bulunmaktadır. Literatürde bu çalışmaya paralel olarak yürütölen bir optimizasyon çalışmasında (Mouafi, Elsoud ve Moharam, 2016) *B. brevis* kullanılarak üretilen biyosüpfektan 10 günlük inkübasyon sonunda en yüksek miktara ulaşırken, *Bacillus subtilis*'in üretici kültür olarak kullanıldığı başka bir çalışmada atık patates suyuyla modifiye edilen BH besiyerindeki maksimum üretim miktarı 7 gün sonunda ulaşılmıştır (Soyuer Bilen Özyürek, 2023).



**Şekil 4.15.** Farklı inkübasyon sürelerinin biyosüpfektan üretimine etkileri.

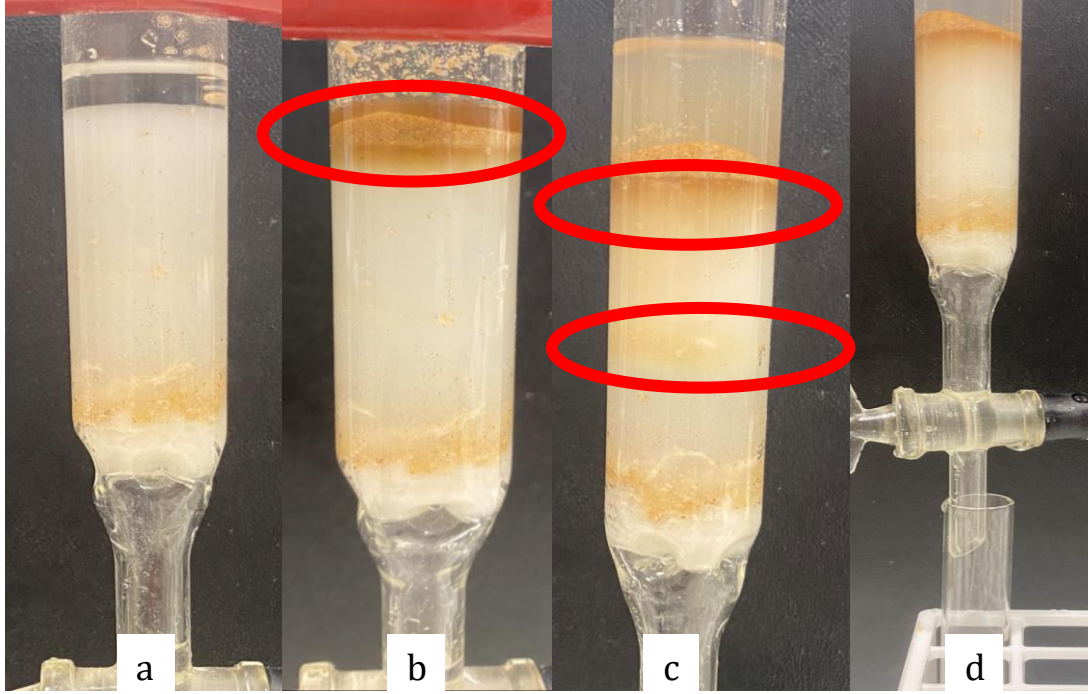
Biyosüpfektan üretimi şilempe-modifiye BH besiyerinde, 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan inkübatörde gerçekleştirildi.

Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır.

#### 4.8. Biyosüpfektanın Saflaştırılması

Biyosüpfektanın silika jel kromatografisiyle saflaştırılması amacıyla kolon bölüm 3.13.1’de verilen şekilde hazırlandı (Şekil 4.16-a). Saflaştırma için hazırlanan biyosüpfektandan 1 mL hacimde alınarak silika jele yakın yüzeyden yavaşça bırakıldı (Şekil 4.16-b). Hareketli faz olarak belirlenen Metanol/Kloroform çözücülerinin kolona eklenmesinden sonra kolon çalıştırılarak fraksiyonların akışı izlendi (Şekil 4.16.-c).

Fraksiyonlar cam deney tüplerinde toplanarak (Şekil 4.16.-d) TLC yönteminde kullanılmak için çeker ocakta 2 saat bekletildi.



Şekil 4.16. Biosürfektanın silika jel kromatografisiyle saflaştırılma basamakları.

(a: Kolon hazırlığı; b: Kolona örnek yüklenmesi; c: Örneğin kolonda yürütülmesi; d: Fraksiyonların toplanması)

## 4.9. Biosürfektan Karakterizasyonu

### 4.9.1. Biosürfektan Yapısının TLC Yöntemiyle Belirlenmesi

Elde edilen biosürfektan fraksiyonları TLC plakasında 3.14.1'de anlatılan şekilde yürütüldü. Çözücülerin kurutulması amacıyla beklendikten sonra UV ışığı altında fraksiyonlar gözlemlendi (Şekil 4.17.). Bu noktada, peptitlerin tespiti için ninhidrin reaktifi kullanılırken; Lipit yapısının belirlenmesinde iyodin kullanıldı. Meydana gelen yürümler cetvel yardımıyla ölçülerek  $R_f$  değerleri hesaplandı.



**Şekil 4.17.** Biosürfektan fraksiyonlarının TLC plakasında gözlenmesi.

Bu noktada, ürettiğimiz biosürfektanın peptit yapısı içerdiği ninhidrin reaktifindeki yürümenin  $R_f$  değerinin 0,53 olmasıyla saptanırken; Lipit içerdiği iyodin ile yürütülmesinden elde edilen  $R_f$  değerinin 0,72 olmasıyla belirlendi. Bu bağlamda, çalışmamızda üretilen biosürfektanın, lipopeptit ailesine ait olduğu saptandı. Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde, Balan ve arkadaşlarının lipopeptit yapıdaki biosürfektanda peptit yapı için  $R_f$  değerinin 0,53 ve lipit için  $R_f$  değerinin 0,65 olarak belirlemişlerdir (Balan, Kumar ve Jayalakshmi, 2016). Başka bir çalışmada *Bacillus nealsonii*'nin lipopeptit yapıda biosürfektan ürettiği 0.75  $R_f$  değeriyle saptanmıştır (Phulpoto ve ark., 2020). Genelde sürfaktin üretimiyle bilinen *Bacillus subtilis* suşunun sürfaktin üretimi 0.3  $R_f$  değeriyle belirlenirken itürin üretebildiği 0.7  $R_f$  değeriyle bulunmuştur (Ramyabharathi ve ark., 2018). Literatürde yer alan diğer lipopeptit yapıda biosürfektan üretim çalışmalarında da sürfaktin üretiminde  $R_f$  değerinin 0.3 ve itürin üretiminde  $R_f$  değerinin 0.7 olduğu bulunmuştur (Joy, Rahman ve Sharma, 2017; Yáñez-Mendizába ve ark., 2019).

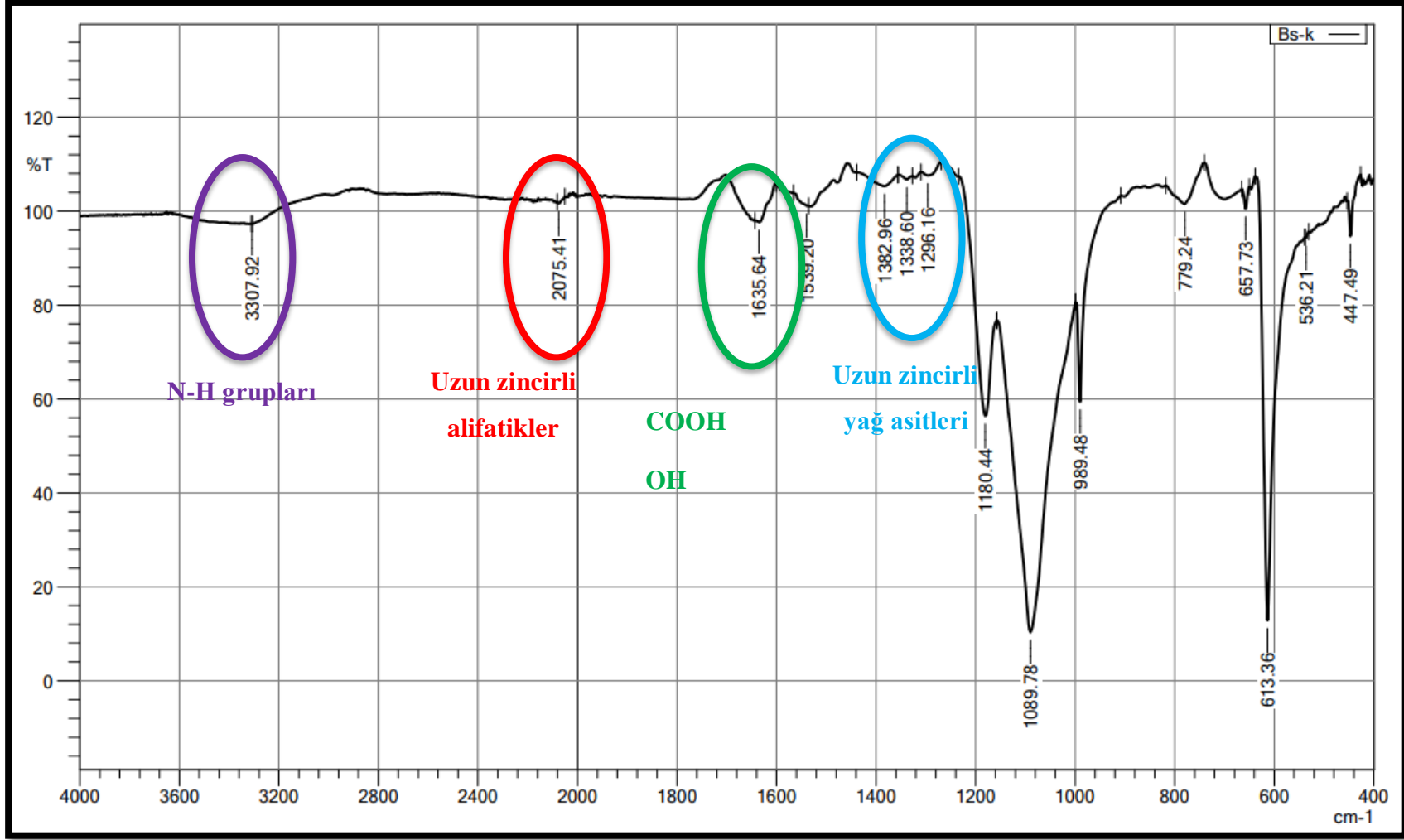
#### 4.9.2. Biyosürefektan Yapısının FT-IR Yöntemiyle Belirlenmesi

Saflaştırılan biyosürefektanın kimyasal bileşimi FT-IR analizi ile tespit edildi (Şekil 4.18).

FT-IR analizinden elde edilen sonuçlar aşağıda listelenmiştir:

- 3307.92 absorpsiyonu, N-H varlığını,
- 2075.41 absorpsiyonu, C-H uzun alifatik zincir varlığını,
- 1382.96 absorpsiyonu, uzun zincirli yağ asitlerinin varlığını,
- 1635.64 absorpsiyonu, COOH ve OH gruplarının varlığını göstermektedir.

Bu bağlamda, yapıda bulunan alifatik zincirlerin varlığı ve peptit yapıları üretilen biyosürefektanın lipopeptit yapıda olduğunu göstermektedir. Bu noktada, lipopeptit yapıdaki biyosürefektanlarda alifatik gruplar, yağ asitleri ve amino asitleri yapılarında barındırdığı bilinmektedir (Yakimov ve ark., 1995; Kalaimurugan ve ark., 2022).



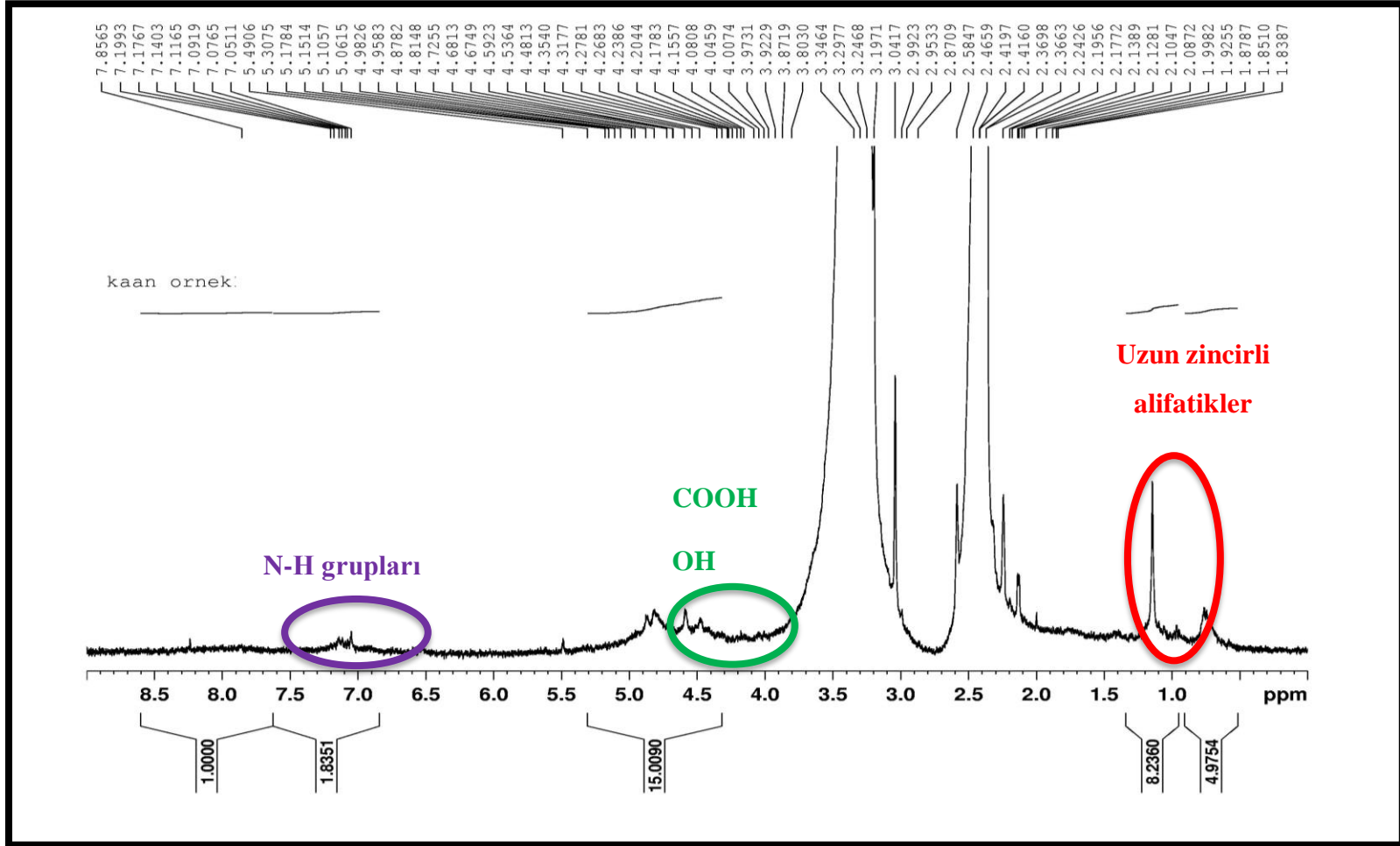
Şekil 4.18. Biosurfektanın FT-IR pikleri.

### 4.9.3. Biyosürefektan Yapısının NMR Yöntemiyle Belirlenmesi

FT-IR yönteminden elde edilen sonuçların desteklenmesi amacıyla yapılan NMR analizinden elde edilen sonuçlar (Şekil 4.19.) aşağıda listelenmiştir:

- 7.8-7.05 ppm civarında meydana gelen pik, N-H gruplarının varlığını,
- 4.00 ppm civarında meydana gelen pik, alifatik CH-OH bağının varlığını,
- 1.2 ppm civarında meydana gelen pik, alifatik CH<sub>2</sub> gruplarının varlığını göstermektedir.

Bu bağlamda yapıda FT-IR analiziyle paralel olarak alifatik zincirlerin varlığı ve peptit yapıları lipopeptit yapıda biyosürefektan üretimini desteklemektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürle de paralellik göstermektedir. Bu noktada, lipopeptit yapıdaki biyosürefektanlarda alifatik gruplar, yağ asitleri ve amino asitleri yapılarında barındırdığı bilinmektedir (Pemmaraju ve ark., 2012; Zompra ve ark., 2022).

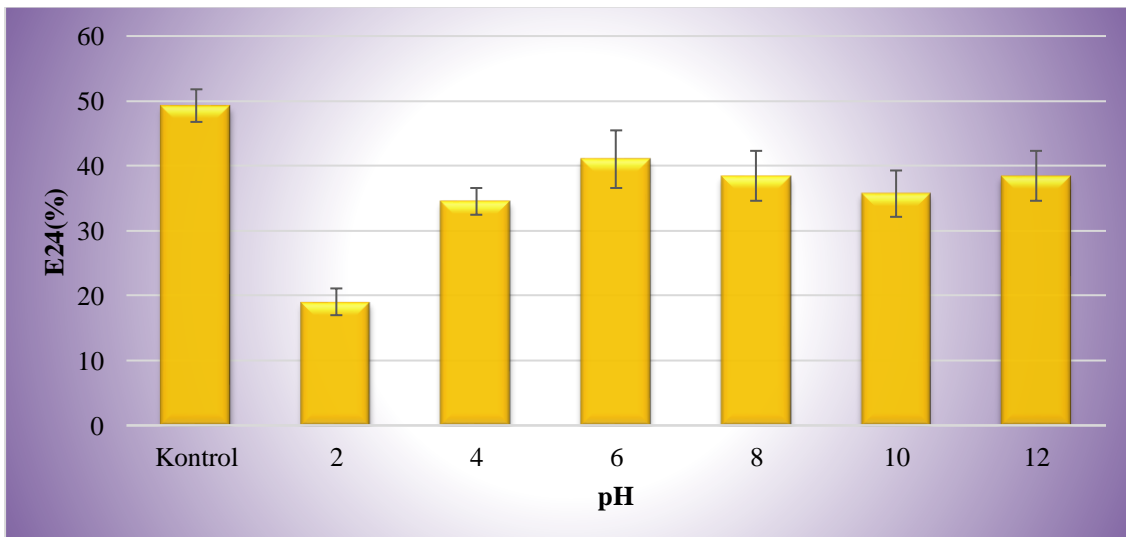


Şekil 4.19. Biosürfektanın NMR pikleri.

## 4.10. Biyosüpfektanın Kararlılığının Belirlenmesi

### 4.10.1. Farklı pH Değerlerinin Biyosüpfektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması

Farklı pH değerlerinin biyosüpfektan kararlılığına etkilerinin araştırılması için ayçiçek yağı kullanıldı. HKS'lerin farklı pH değerlerine ayarlandıktan sonra ayçiçek yağıyla meydana getirdikleri  $E_{24}$  sonuçları Şekil 4.20'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, üretilen biyosüpfektanın kararlılığını aşırı asidik ve aşırı bazik ortamlarda bile koruduğu görölmektedir. Buna ek olarak, işlem görmemiş HKS (Kontrol) baz alındığında üretilen biyosüpfektanın nötrale yakın asidik ve bazik ortamlarda yüksek kararlılık göstermesi sağlık, deri ve tarım uygulamaları gibi farklı pH değerlerine sahip uygulamalarda kullanılabilmesi için avantaj yaratmaktadır (Saimmai ve ark., 2020; Sachdev ve Cameotra, 2013; Fracchia ve ark., 2014). Literatür çalışmaları incelendiğinde, çalışmamıza paralel olarak, *Bacillus licheniformis* (Purwasena ve ark., 2019) ve *B. mojavensis* (Ben Ayed ve ark., 2014b) tarafından üretilen biyosüpfektanın farklı pH değerlerinde kararlılığını koruduğu görölmektedir. Bununla birlikte, biyosüpfektanların aşırı asidik ortamlarda çökme eğilimi sebebiyle kararlılık gösteremediği belirtilmektedir (Al-Wahaibi ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da pH 2 değerinde biyosüpfektan kararlılığında düşüş görölmektedir (Şekil 4.20.)

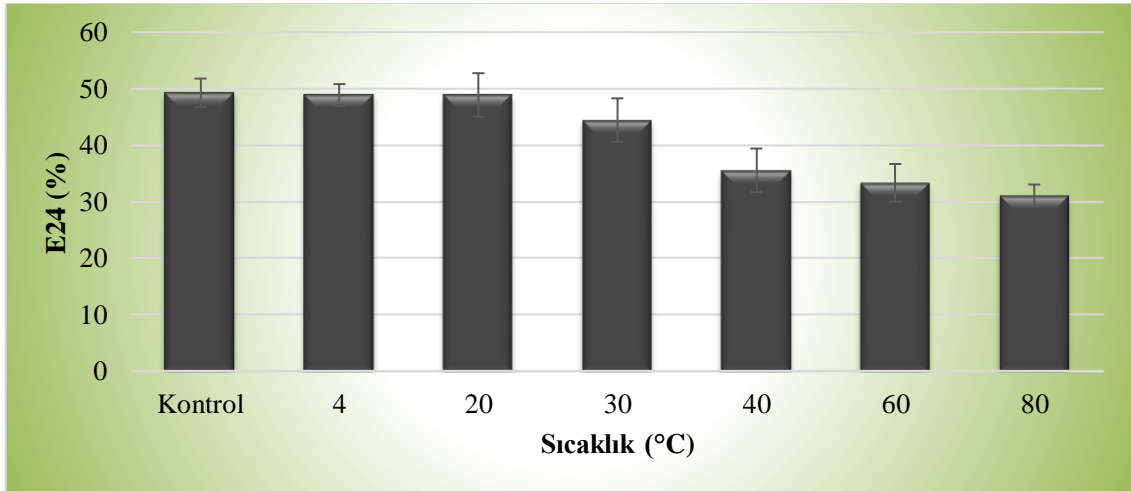


Şekil 4.20. Değerren pH değerlerindeki biyosüpfektan kararlılığı.



#### 4.10.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Biosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması

Üretilen biosürefektanın değişen sıcaklıklardaki kararlılığının belirlenmesi için HKS'ler, farklı sıcaklıklara maruz bırakıldı. Ardından, oda sıcaklığına getirilen HKS'lerin kararlılıkları ayçiçek yağının kullanıldığı  $E_{24}$  yöntemiyle saptandı. Sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.21.) üretilen biosürefektanın tüm sıcaklıklarda kararlılığını koruduğu görüldü. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, soğuk uygulamaları bulunan gıda endüstrisinde (Kiran ve ark., 2017) 4°C'de kararlılık gösteren biosürefektanın avantajlı olduğu saptandı. Buna ek olarak metal endüstrisi gibi ısı işlemlerin sıklıkla uygulandığı proseslerde yüksek sıcaklıklarda da biosürefektanın kararlılığını koruması önemlidir (da Rocha Junior ve ark., 2019). Lipopeptit yapıdaki biosürefektanın 40-160 °C'ye kadar kararlılığını sürdürdüğü bilinmektedir (Al-Wahaibi ve ark., 2014). Benzer şekilde yürütülen bir başka çalışmada da *Bacillus* suşu tarafından üretilen biosürefektanın 20-100 °C aralığında kararlılığını koruduğu ortaya konmuştur (Ben Ayed ve ark., 2014b).

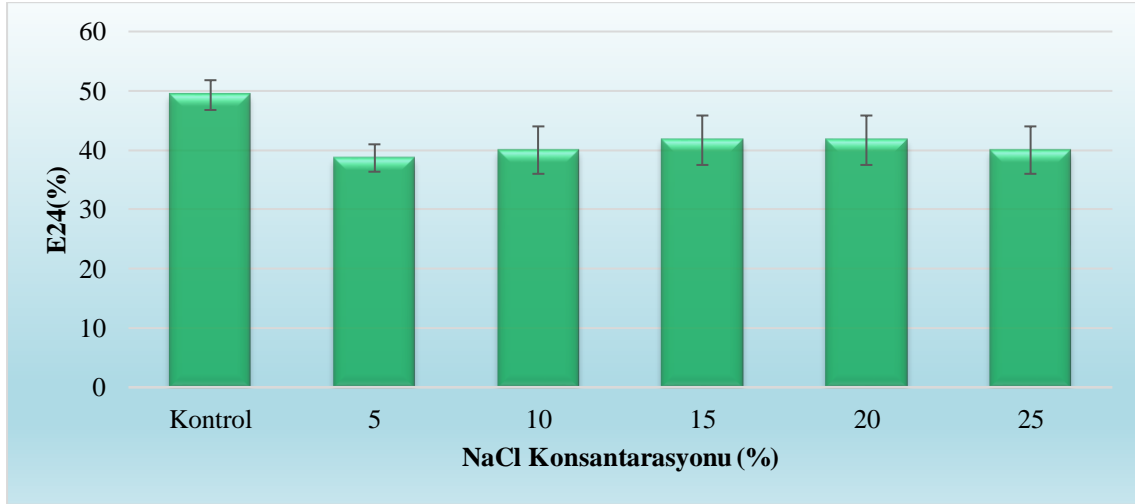


Şekil 4.21. Değişen sıcaklıklarda biosürefektan kararlılığı.

#### 4.10.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Biosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması

Farklı tuz konsantrasyonlarının biosürefektan kararlılığına etkilerinin araştırılması için HKS'lere farklı oranlarda NaCl eklendikten sonra farklı ayçiçek yağıyla meydana getirdikleri  $E_{24}$  değerleri hesaplandı. Bu bağlamda, ürettiğimiz biosürefektanın tüm tuz konsantrasyonlarında kararlılığına sürdürdüğü saptandı (Şekil 4.22.). Al-Wahaibi ve

arkadaşları tarafında yürütölen benzer bir çalışmada, üretilen biyosürefektanın %0-15 NaCl arasında kararlılığını koruduğu ortaya konmuştur (Al-Wahaibi ve ark., 2014). %1-9 NaCl arasında değişen konsantrasyonlarda biyosürefektan kararlılığını araştıran başka bir çalışmada (Khopade ve ark., 2012) da tüm tuz konsantrasyonlarında kararlılık tespit edildiği belirtilmektedir. Bu alışmada %25 Nacl oranına kadar çıkmamıza rağmen biyosürefektanın kararlılığını büyük oranda koruduğu saptandı (şekil 4.22.)

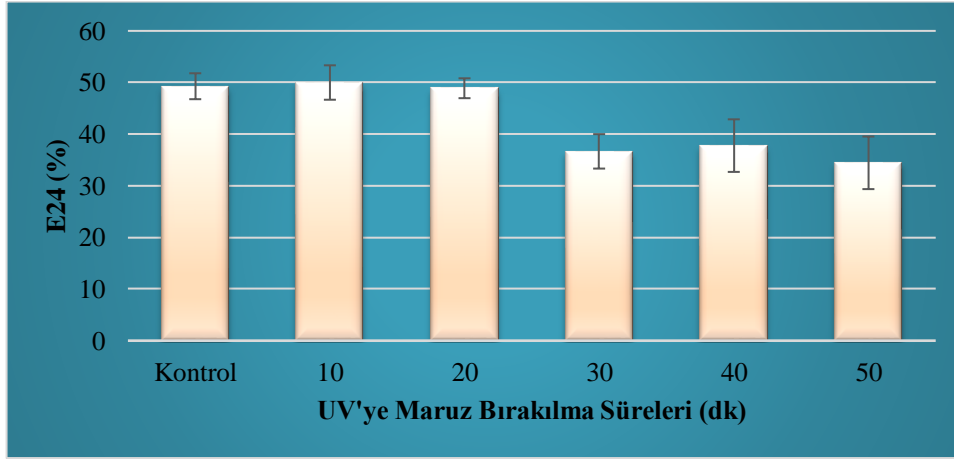


şekil 4.22. Değişen NaCl konsantrasyonlarında biyosürefektan kararlılığı.

#### 4.10.4. UV'ye Maruz Kalma Sürelerinin Biyosürefektan Kararlılığına Etkilerinin Araştırılması

Üretilen biyosürefektanın kararlılığında UV'nin meydana getireceği değişimlerin saptanması amacıyla, HKS'ler değişen sürelerde UV'ye maruz bırakıldı. Ardından işlem görmüş HKS'lerin ayçiçek yağıyla meydana getirdikleri E<sub>24</sub> değerleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde (şekil 4.23.) üretilen biyosürefektanın UV'ye maruz bırakıldığı tüm sürelerde kararlılığına devam ettiği saptandı. Kozmetik sektöründe kullanılan ürünlerin, UV dirençli olması hedeflenmektedir (Bom ve ark., 2019). Bu noktada, üretilen biyosürefektanın tüm UV'ye maruz bırakılma sürelerinde kararlılığını sürdürmesi kozmetik endüstrisi için bir avantaj yaratmaktadır. Buna ek olarak, UV sterilizasyonu gıda endüstrinde kullanılmaktadır (Chawla ve ark., 2021). Biyosürefektanların da gıda koruma ve raf ömrünü uzatma gibi özellikleriyle bu endüstride kullanılmaktadır (Sharma ve Sharma, 2021). Bu bağlamda, farklı UV'ye maruz kalma sürelerinde kararlılığını sürdürebilen bir biyosürefektan gıda endüstrisi için de avantaj

yaratmaktadır. Literatürde, biyosüpfektanların UV kararlılığını konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda, üretilen biyosüpfektanın UV kararlılığının saptanması literatür ve ileri araştırmalar için önem taşımaktadır.



**Şekil 4.23.** Farklı UV'ye maruz kalma sürelerinde biyosüpfektan kararlılığı.

Bu bağlamda, çalışmamız literatürde sıklıkla bireysel üretim şartları araştırılan biyosüpfektan üretimine, konsorsiyum tekniğiyle yaklaşım açısından oldukça önemlidir. Buna ek olarak, çalışma kapsamında oluşturulan modifiye besiyeri maliyetinin düşük olması endüstriyel üreticiler açısından da değerlidir. Oluşturduğumuz konsorsiyumun, farklı fizyolojik şartlar altında biyosüpfektan üretilebilmesi, gerekli durumlarda endüstriyel ölçekli üretimlerde meydana gelecek aksaklıkların meydana getireceği ekonomik kayıpların önüne geçilmesi açısından umut vericidir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, biyosüpfektan üretiminde kullanılmasını önerdiğimiz *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 konsorsiyumunun daha önceki çalışmalarda bir arada kullanılmamış olması biyosüpfektan üretimi çalışmalarına ek olarak farklı biyoteknolojik çalışmalara da katkı sağlayacaktır. Buna ek olarak, biyoteknolojik üretim süreçlerinde maliyetin düşürülmesini hedef alan çalışmalar için de çalışmamız kapsamında oluşturduğumuz şilempe-modifiye besiyerinin yürütülecek çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 5. YORUM

Biyosürefektanlar, çeşitli mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından üretilen biyolojik yüzey aktif bileşiklerdir (de Souza ve ark., 2024). Bu biyolojik moleküller, deterjan endüstrisi (Inès ve ark., 2023), kozmetik endüstrisi (Adu ve ark., 2020), petrol endüstrisi (Sharma, Lavania ve Lal, 2023), gıda endüstrisi (Ribeiro, Guerra ve Sarubbo, 2020a), sağlık endüstrisi (Bjerk ve ark., 2021) ve tarım endüstrisi (Silva ve ark., 2024) gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Geniş kullanım alanına sahip biyosürefektanlar, sentetik muadilleriyle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip oldukları dikkat çekmektedir. Düşük toksisite göstermesi, biyoçözünürlüğünün yüksek olması, yüksek sıcaklık, asidik pH, düşük basınç gibi ekstrem ortamlarda spesifik aktivite göstermesi, üretim süreçlerinde oluşan yan ürünlerin toksik olmaması gibi avantajlara sahiptir (Nagtode ve ark., 2023). Bununla birlikte, biyosürefektanların üretim maliyetlerinin yüksek olması sebebiyle bu alanlardaki kullanım ölçekleri sınırlıdır (Noll ve ark., 2024). Biyosürefektan üretim maliyetini arttıran etkenlerin başında üretim için harcanan enerji gelirken (Noll ve ark., 2024), üretim ortamı olarak tercih edilen besiyeri, karbon ve azot kaynakları bulunmaktadır (Azevedo ve ark., 2024; Noll ve ark., 2024). Bu bağlamda, biyosürefektan üretiminde kullanılan çeşitli stratejiler ile üretim maliyetinin düşürülmesi ve üretim verimliliğinin artırılması hedeflenmektedir (Kumar ve ark., 2023; Sharon ve ark., 2024; Sundaram ve ark., 2024).

Bu doğrultuda, çalışmamız kapsamında öncelikle *Bacillus* suşlarıyla oluşturulacak alternatif bir konsorsiyumla verimli biyosürefektan üretimi amaçlandı. Çalışmamızın devamında üretimini gerçekleştirdiğimiz biyosürefektanın endüstriyel ölçekli kullanılabilir olması için düşük maliyetli üretiminin araştırılması hedeflendi. Biyosürefektan üretiminde etkili mikroorganizmaların belirlenmesinin yanı sıra üretim ortamında kullanılacak besiyeri içeriklerinin seçimi ve üretim şartlarının uygun hale getirilmesi önemlidir. Üretim maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle endüstride kullanım ölçeği kısıtlı olan biyosürefektanların uygun şartlarda düşük maliyetle üretilmesi mümkün olacaktır. Bu bağlamda, bu hedeflerimizin gerçekleştirilmesi amacıyla, öncelikle konsorsiyum oluşturma, uygun koşullar ile biyosürefektan üretim veriminin

artırılması ve biyosüpfektan üretim maliyetinin düşürülmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapıldı.

Çalışmamız kapsamında *Bacillus* suşlarının değerlendirilmesinin sebebi, spor oluşturma özellikleri sayesinde dayanıklı olmaları (Martínez-Ortiz ve ark., 2024) ve endüstriyel üretimlerde sıklıkla tercih edilmeleridir (Ghojavand ve ark., 2008; Al-Wahaibi ve ark., 2014; Thirumurugan ve ark., 2023; Yin ve ark., 2023). Bunlara ek olarak *Bacillus* grubu mikroorganizmaların farklı özelliklere sahip biyosüpfektan grupları üretmeleri de önemli bir avantaj olarak görüldü. Bu sebeplerle, çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Kültür Koleksiyonu Laboratuvarında bulunan *Bacillus halotolerans* NR\_115063.1, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ON012959.1 ve *Bacillus velezensis* MT649755.1 suşlarının biyosüpfektan üretimleri araştırıldı.

Modifiye BH besiyerinde üretilen bu *Bacillus* cinsi bakteriyel suşların biyosüpfektan varlığının değerlendirilmesinde daralma-yayılma, yağ yayılma ve emülsifikasyon aktivitesi indeksi yöntemleri kullanıldı. Bu doğrultuda, biyosüpfektan ürettiği belirlenen dört *Bacillus* suşunun üretim verimliliğinin değerlendirilmesi amacıyla ekstraksiyon ve gravimetrik ölçümden yararlanıldı. Bu bağlamda, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. halotolerans* NR\_115063.1 suşlarının üretim verimliliği yüksek olarak belirlendi. Söz konusu bu üç *Bacillus* suşunun ikili ve üçlü kombinasyonlarıyla konsorsiyumlar oluşturularak biyosüpfektan üretim verimliliğinin artırılması hedeflendi. Bu sayede, çalışmanın hedefi olan verimli biyosüpfektan üretimi için söz konusu bu suşlardan oluşan konsorsiyumların biyosüpfektan üretimi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda biyosüpfektan üretimine uygun *Bacillus* konsorsiyumunun 0,098 g/50 mL üretim sağlayan *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 olduğu belirlenerek öncelikle modifiye besiyeri maliyetinin düşürülmesine yönelik çalışmalara başlandı.

Çalışmamızın bu aşamasında, modifiye BH besiyerinin maliyetinin düşürülmesi için, Türkiye'deki tarım endüstrisi ve gıda endüstrisi atıkları incelendi. Böylece, şilempe, melas ve PAS atıkları tek karbon kaynağı olarak modifiye BH besiyerinde kullanıldı. Bu bağlamda, besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz çıkarılarak bu atıklar ayrı

ayrı %2 (v/v) oranında kullanıldı. Konsorsiyumun çalışma başında 0,098 g/50 mL biyosüpfektan üretirken şilempe-modifiye besiyerinde 0,1410 g/50 mL biyosüpfektan üretmesi, şilempenin, glukoz kullanımına ve diğer atık gruplarına göre daha avantajlı olduğunu gösterdi. Buna ek olarak, melas içeren besiyerinde de biyosüpfektan üretiminin gerçekleşmesi bulgusu endüstriyel üreticilerin şilempeye ek olarak melası da üretimde kullanılabileceğini gösterdi. Bu sonuçlar, hazırladığımız konsorsiyum ile ileride farklı atıklardan da biyosüpfektan üretebilme olasılığı olduğunu ortaya koydu. Bununla birlikte, lor peynirinden elde edilen PAS'ın bu konsorsiyumun üretildiği besiyeri için uygun karbon kaynağı olmadığı belirlendi ancak farklı peynir kaynaklarına ait PAS'ların ilave karbon kaynaklarıyla kullanıldığında biyosüpfektan üretiminde kullanılabilmesine yönelik yeni araştırmalar yapılabileceği sonucuna ulaşıldı. Besiyerinde kullanılacak atık kaynağın şilempe olarak saptanmasından sonra aynı kaynağın ilave azot kaynağı olarak da kullanılabilirliğini araştırmak için uygun şilempe konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalara devam edildi.

Çalışmamızın bu noktasına kadar modifiye edilen BH besiyerinde ilave azot kaynağı olarak kullanılan maya özütü pahalı olması nedeniyle üretim maliyetlerini olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte, besiyerinde ilave azot kaynağı bulunmasının biyosüpfektan üretimini olumlu etkilediği de bilinmektedir (Taowkrue ve ark., 2024). Bu bağlamda, modifiye besiyerinde ilave azot kaynağı olarak kullanılan maya özütün çıkartılarak yerine içerisinde azot miktarı yüksek olan şilempenin (Kahyaoğlu ve Kıvanç, 2007) besiyerindeki konsantrasyonu artırılmasıyla ilave azot kaynağı olarak da değerlendirilmesi hedeflendi. %2-%30 aralığında değişen şilempe konsantrasyonlarıyla hazırlanan modifiye BH besiyerinde %10 (v/v) şilempe bulunduğunda üretilen biyosüpfektan miktarının 0,188 g/50 mL olduğu belirlendi. Bu durumda, modifiye besiyerinde şilempenin karbon kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra ilave azot kaynağı olarak da değerlendirilmesi, endüstriyel üretim süreçlerinde ilave azot kaynağı arayışının ortadan kaldırılmasına ek olarak üretim maliyetlerinin düşürülmesini sağlayacaktır. Ardından çalışmamıza, biyosüpfektan üretim verimliliğinin artırılması amacıyla şilempe-modifiye BH besiyerinde üretimi gerçekleştirecek konsorsiyumu oluşturan *Bacillus* suşlarının konsantrasyonunun ve ekim oranının belirlenmesine yönelik çalışmalara devam edildi.

Endüstriyel üretimlerde maliyeti ve verimliliği etkileyen kriterlerden biri kullanılacak üretici aşu kültürün saptanmasıdır. Bu bağlamda, çalışmamızın bu aşamasında elde edilen atıkların kullanıldığı üretim ortamında seçtiğimiz konsorsiyum içeriğinin uygun olarak hazırlanması ve uygun ekim oranının belirlenmesi hedeflendi. Çalışmamızda, önce konsorsiyumu oluşturan *Bacillus* suşlarının farklı konsantrasyonlarının belirlenmesiyle biyosürefektan üretiminin artırılması araştırıldı. Bu çalışmamızın sonucunda, konsorsiyum içerisinde bulunan kültür konsantrasyonlarının biyosürefektan üretimini etkileyen bir etken olduğu belirlendi. Biyosürefektan üretim veriminin artırılmasına yönelik uygun konsantrasyonunun 0,75 mL *B. subtilis* ve 1,25 mL *B. halotolerans* olduğu belirlendi. Bu konsantrasyonlar kullanıldığında 0,203 g/50 mL üretim elde edilirken diğer tüm konsantrasyonlarda da biyosürefektan üretildiği görüldü. Konsorsiyum içeriğinde bulunan *Bacillus* konsantrasyonlarının belirlenmesiyle modifiye BH besiyerinde bulunması gereken kültür konsantrasyonunun %4 (v/v) olması gerektiği belirlendi. Bu konsorsiyumla verimli biyosürefektan üretimi için kullanılması gereken konsorsiyum içeriği ve ekim oranları uygun olarak saptandı.

Biyosürefektan üretiminde konsorsiyumun en uygun içeriği ve ekim oranının belirlenmesinin ardından şilempe-modifiye BH besiyerinde bulunması gereken iz element konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Üretim ortamında iz element miktarının sınırlayıcı etki göstererek biyosürefektan üretimini arttırdığı da bilinmektedir (Nurfarahin, Mohamed ve Phang, 2018). İz elementin %0-%5 arasında değişen oranlarının eklenmesiyle hazırlanan modifiye BH besiyerlerinde üretilen biyosürefektan miktarlarına göre %1 iz element içeren besiyerinden elde edilen biyosürefektan miktarı 0,203 g/50 mL belirlendi. Bu sayede, daha önce çalışılmamış *B. halotolerans* ve *B. subtilis* konsorsiyumunun biyosürefektan üretim besiyerinde kullanılması gereken iz element miktarı saptandı.

Çalışmamızda, bu aşamaya kadar, altı farklı *Bacillus* suşu arasından biyosürefektan üretimine uygun olan suşlar ile oluşturulan konsorsiyum saptandı ve bu konsorsiyum konsantrasyonunun 0,75 mL *B. subtilis* ve 1,25 mL *B. halotolerans* içermesinin biyosürefektan üretim verimliliğini arttırdığı belirlendi. Üretim ortamı olarak kullanılan besiyerinde karbon kaynağı olarak %2 (w/v) glukoz ve ilave azot kaynağı olarak %1 (w/v) maya özütü kullanılması yerine %10 (v/v) oranında şilempenin tek karbon ve ilave azot

kaynağı olarak kullanılabilceğı saptandı. Bunlara ek olarak, şilempe-modifiye BH besiyerinde bu konsorsiyum ile verimli biyosürefektan üretimi için kullanılması gereken iz element konsantrasyonunun %1 (v/v) olduğı belirlendi.

Çalışmamızın devamında oluşturulan konsorsiyum ile farklı fizyolojik şartlarda biyosürefektan üretim verimliliğinin araştırılması hedeflendi. Bu bağlamda, başlangıç pH değerinin, farklı inkübasyon koşullarının, farklı sıcaklıkların ve farklı inkübasyon sürelerinin biyosürefektan üretimini, üretim maliyetini ve üretim verimliliğini doğrudan etkileyen değişkenlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı.

Üretim maliyetinin düşürülmesi ve üretim verimliliğinin arttırılmasına yönelik yürütülen ilk çalışma şilempe-modifiye BH besiyerinde konsorsiyumun üretime başlayacağı pH değerini bulmaya yönelik yapıldı. Bu bağlamda, pH 5-10 aralığında değişen ortamlarda konsorsiyumun biyosürefektan üretimi araştırıldı. Oluşturulan konsorsiyumun, tüm pH değerlerinde biyosürefektan ürettiğı gözlemlenirken, en verimli üretimin pH 7'ye ayarlanan şilempe-modifiye besiyerinde gerçekleştiğı belirlendi. Bu noktada, çalışma kapsamında konsorsiyumun şilempe-modifiye BH besiyerinin başlangıç pH değerinin 7 olması literatürle (Parthipan ve ark., 2017) örtüşmektedir. Bununla birlikte, söz konusu bu konsorsiyumun pH 5 ve pH 10 aralığında değişen tüm pH değerlerinde biyosürefektan ürettiğinin belirlenmesi önemli bir avantajdır. Konsorsiyumun değişen pH değerlerinin hepsinde biyosürefektan üretmesi farklı çevresel şartlarda üretilebilmelerine olanak sağlayacaktır. Ayrıca, endüstriyel ölçekli biyosürefektan üretimlerinde istenmeyen pH değişimlerinin meydana gelmesinde üretim miktarının azalma riski düşecektir. Buna ek olarak pH 7'nin altında da biyosürefektan üretiminin devam etmesi, ileride yapılacak çalışmalarla bu *Bacillus* konsorsiyumuna maya ya da küf gibi asidik pH'larda yaşayan mikroorganizmaların dahil edilebilmesine ve böylece biyosürefektan üretim verimliliğinin yaratılacak sinerjik etkiyle daha da attırılmasına olanak sağlayacağı başka bir avantaj yaratmaktadır.

Şilempe-modifiye BH besiyerinin başlangıç pH değerinin bulunmasından sonra değişen inkübasyon koşullarının biyosürefektan üretim verimliliğini ve üretim maliyetini nasıl etkileneceğı araştırıldı. Bu bağlamda, belirlenen şartlarda hazırlanan konsorsiyum şilempe-modifiye besiyerine ekilerek statik ve 100-175 rpm arasında çalkalamalı olmak



üzere farklı koşullardaki biyosüpfektan üretim verimliliği değerlendirildi. *B. subtilis* ve *B. halotolerans* konsorsiyumunun biyosüpfektan üretimi için uygun çalkalama hızının 150 rpm olduğunun belirlenmesinin yanı sıra statik ve 100 rpm çalkalama hızları arasında önemli bir fark olmadığı ve 150 rpm çalkama hızını üzerine çıkıldığında üretimin düştüğü saptandı. Oluşturulan konsorsiyum ile statik şartlarda bile biyosüpfektan üretilebilmesi ise bu konsorsiyumun endüstriyel biyosüpfektan üretiminde avantajlı olduğunu gösterdi. Buna ek olarak bu çalışmanın değerlendirilmesinde, ihtiyaç duyulacak durumlarda maliyeti düşürmek adına statik üretimin de tercih edilebileceği sonucuna varıldı.

Biyosüpfektan üretiminin farklı fizyolojik koşullarda araştırılmasında uygun inkübasyon koşulunun ve başlangıç pH değerinin belirlenmesinin ardından üretim sıcaklığının belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. Sıcaklığın mikroorganizmaların metabolit üretimleri açısından önemli bir çevresel etken olduğu bilinmektedir (Nayarisseri, Singh ve Singh, 2018). Özellikle biyosüpfektan üretimine yönelik yapılan çalışmalarda uygun sıcaklığın 4 °C'den (Trudgeon ve ark., 2020) 60 °C'ye (Elazzazy, Abdelmoneim ve Almaghrabi, 2015) kadar değişkenlik gösterdiği durumlarda kültür şartlarına göre biyosüpfektan üretiminin devam ettiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda kullanılan konsorsiyumun ise 30 °C'de 0,203 g/50 mL biyosüpfektan ürettiği belirlendi. Araştırılan diğer tüm sıcaklıklarda biyosüpfektan üretilmesi farklı çevresel şartlarda endüstriyel üretim için bir avantajdır. Bu bağlamda, endüstriyel ölçekli üretimlerde gerekli maliyet hesaplamaları yapıldıktan sonra üretim maliyetlerinin düşürülmesi adına farklı sıcaklıklarda da biyosüpfektan üretimi tercih edilebilir.

Biyosüpfektan üretiminde oluşturduğumuz konsorsiyum ile uygun inkübasyon koşulunun, başlangıç pH değerinin, sıcaklığın biyosüpfektan üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesinin ardından son çalışma olan inkübasyon süresinin belirlenmesine geçildi. Biyosüpfektanın sekonder metabolit olarak üretilmesi (Ibrahim ve ark., 2020) zaman almaktadır. Ancak bu inkübasyon süresinin kısaltılması düşük maliyetli ve yüksek miktarda biyosüpfektan üretim süreçleri açısından avantaj yaratacaktır. Bu bağlamda, inkübasyon süresi biyosüpfektan üretim çalışmalarında önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu doğrultuda, konsorsiyumunun 3-14 gün arasında gerçekleştirdiği biyosüpfektan üretimleri değerlendirildiğinde en uygun günün 10. gün olduğu belirlendi. 10 gün sonunda gravimetrik ölçümler sonucunda elde edilen

biyosüpfektan miktarının 0,290 g/50 mL olduğu bulunurken inkübasyon süresinin 14 güne çıkartılmasının biyosüpfektan miktarının azalmasına sebep olduğu ortaya kondu. 3-10 gün süren inkübasyon periyotlarının hepsinde biyosüpfektan üretimi gerçekleştirilmesi, endüstriyel üretim süreçlerinde zaman tasarrufuna ek olarak maliyetin düşürülmesi gibi avantajlara da sahip olacağından bu bulgunun önemli olduğu belirlendi. Bu sayede, endüstriyel üreticiler gerekli hesaplamaları yaparak 10 gün de elde edecekleri 0,290 g/50 mL üretim miktarı yerine 3 günlük periyotlarla aynı sürede yaklaşık olarak 0,60 g/50 mL biyosüpfektan üretimi elde edebilirler.

Üretilen biyosüpfektanın yapısal karakterizasyonu için önce kolon kromatografisiyle saflaştırma yapıldı. Ardından saf biyosüpfektanın lipopeptit biyosüpfektan ailesinde bulunduğu TLC yöntemiyle görüldü. Buna ek olarak, FT-IR ve NMR analizleriyle de üretilen biyosüpfektanın lipopeptit yapıda süpfaktin olduğu desteklendi.

Biyosüpfektan kararlılığını araştırdığımız çalışmanın son aşamasında, üretilen biyosüpfektanın tüm pH değerlerinde büyük oranda kararlılığını koruduğu belirlendi. Bu bağlamda, araştırılan pH değerlerinde ürettiğimiz biyosüpfektanın yüksek kararlılık göstermesi sağlık, deri ve tarım uygulamalarında kullanılabilmesi için avantajlıdır. Üretilen biyosüpfektanın, araştırılan sıcaklık değerlerinde de büyük oranda kararlılığını koruduğu belirlendi. Bu bağlamda, soğuk uygulamalar bulunan gıda endüstrisi ve sıcak uygulamalar bulunan metal endüstrisinde ürettiğimiz bu biyosüpfektanın yüksek sıcaklık stabilitesi farklı sıcaklıklarda kullanılabilirliğini arttıracaktır. Bunlara ek olarak, lipopeptit yapıdaki biyosüpfektanın tüm NaCl konsantrasyonlarında kararlılığını sürdürdüğu saptandı. Ayrıca, lipopeptit yapıdaki biyosüpfektanın UV'ye maruz bırakıldığında kararlılığında önemli bir değışiklik meydana gelmemesi özellikle kozmetik endüstrisi açısından bir avantaj yaratmaktadır.

Sonuç olarak, mayalar, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen biyosüpfektanların üretim maliyetinin yüksek olması sebebiyle çeşitli endüstrilerde sentetik süpfektanların yerine kullanılmadığı ve bu nedenle üretim maliyetlerinin düşürülmesinin gerektiği bilinmektedir (de Souza ve ark., 2024). Bu bağlamda, çalışmamızın amaçları doğrultusunda, öncelikle biyosüpfektan ürettiği belirlenen *Bacillus* suşları ile çeşitli konsorsiyumlar oluşturarak biyosüpfektan üretimine en uygun olanı seçildi.

Biyosürefektan üretimine uygun olduğu belirlenen konsorsiyumu oluşturan *B. subtilis* tek başına 0,05g/50 mL ve *B. halotolerans* tek başına 0,019 g/50 mL biyosürefektan ürettiği göz önüne alındığında konsorsiyumun 0,098 g/50 mL üretim verimliliği göstermesi üretimin neredeyse 2 katına çıkması açısından önemlidir. Böylece söz konusu *Bacillus* türlerinin bir arada kullanılmasının biyosürefektan üretimi açısından sinerjik etki gösterdiği ve biyosürefektan üretim süreçlerinde bu konsorsiyumun kullanılmasının avantajlı olabileceği belirlendi. *Bacillus* suşları ile oluşturduğumuz bu konsorsiyum ile literatürde biyosürefektan üretimine rastlanmadı. Bu bağlamda, çalışmamızın sonuçları biyosürefektan üretim çalışmalarına katkı sağlayacaktır. Biyosürefektan üretimimizde modifiye besiyerinde gıda endüstrisi atığı olan şilempenin, atık karbon kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra ilave azot kaynağı da olarak kullanılması hem glukoz hem de maya özütü gibi pahalı iki kaynağın besiyerinden çıkartılmasını sağladı. Besiyerinde kullanılacak atık ve atık konsantrasyonun belirlenmesinin ardından konsorsiyumun 0,75 mL *B. subtilis* ve 1,25 mL *B. halotolerans* oranlarını içeren %4 (v/v) ekim oranının üretim verimliliği açısından uygun oldu saptanarak fizyolojik koşulların üretim üzerindeki etkisinin araştırılmasına devam edildi. Fizyolojik koşullar üzerinden yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda biyosürefektan üretimi 0,290 g/50 mL'ye çıkartıldı. Bu noktada, yapılan çalışmalarla konsorsiyum üretim verimliliğinin glukoz ve maya özütü gibi pahalı kaynaklar yerine şilempe kullanılarak 3 katına çıkartılması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu bağlamda, biyosürefektan üretim verimini artırmak ve üretim maliyetini düşürmek için amaçladığımız hedeflere ulaşıldı. Bunlara ek olarak, çalışmamız kapsamında uygulanan tüm fizyolojik şartlara ait değişkenlerde biyosürefektan üretiminin gerçekleşmesinin endüstriyel olarak da üretilebilirliği için avantajlı olduğu sonucuna varıldı. Bunlara ek olarak, üretilen lipopeptit yapıdaki biyosürefektanın farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonları, pH ve UV'ye maruz kalma durumlarında kararlılığını koruması gıda, sağlık, petrol, kozmetik ve deterjan endüstrilerinde kullanılabileceğini ortaya koydu. Çalışma kapsamında biyosürefektan üretimi belirlenen *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. halotolerans* NR\_115063.1 konsorsiyumunun kullanıldığı benzer bir biyosürefektan üretimi çalışmasına rastlanmamıştır. Bu bağlamda, bu konsorsiyum ile elde edilen sonuçlar biyosürefektan üretimi çalışmalarına yeni bir alternatif sunarak ileride yürütülecek pek çok yeni çalışmaya katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Abbot, V., Paliwal, D., Sharma, A., Sharma, P., A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals, *Heliyon*, 8 (2022) 8.

Abdelghani, T., Production of antibacterial and antifungal metabolites by *S. albovinaceus* strain no. 10/2 and media optimization, *Am Int J Biol*, 5 (2017) 1.

Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., Hassouna, N. A. H., Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (2008) 150.

Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Khamis, A., Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (1991) 7.

Adbhai, A. R., Dewanjee, S., Patel, K. G., Karmakar, N., Sugar beet molasses production and utilization, in *Sugar Beet Cultivation, Management and Processing* (pp. 885-904), Springer Nature Singapore, Singapore, 2022.

Adu, S. A., Naughton, P. J., Marchant, R., Banat, I. M., Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 11.

Agarry, S. E., Salam, K. K., Arinkoola, A., Aremu, M. O., Biosurfactant production by indigeneous *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from auto-mechanic soil environment towards microbial enhanced oil recovery, *European Journal of Engineering and Technology*, 3 (2015) 6.

Aguilar, A., Twardowski, T., Wohlgemuth, R., Bioeconomy for sustainable development, *Biotechnology Journal*, 14 (2019) 8.

Ahmad, Z., Zhang, X., Imran, M., Zhong, H., Andleeb, S., Zulekha, R., Coulon, F., Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2021) 207.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ali, H. A., Biosurfactant production by utilizing waste products of the food industry, in *Industrial Applications of Biosurfactants and Microorganisms* (pp. 59-77), Academic Press, 2024.

Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S., Al-Sulaimani, H. S., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, *International Biodeterioration & Biodegradation*, (2013) 81.

- Alghamdi, Y. G., Rub, M. A., Kumar, D., Asiri, A. M., Effects of various media on micellization, adsorption and thermodynamic behaviour of imipramine hydrochloride and antimicrobial surfactant mixtures, *Royal Society Open Science*, 8 (2021) 12.
- Al-Hazmi, M. A., Moussa, T. A., Alhazmi, N. M., Statistical Optimization of Biosurfactant Production from *Aspergillus niger* SA1 Fermentation Process and Mathematical Modeling, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33 (2023) 9.
- Ali, F., Das, S., Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Zedny, S. A., Das, T., ..., Uddin, M. S., Production optimization, stability and oil emulsifying potential of biosurfactants from selected bacteria isolated from oil-contaminated sites. *Royal Society Open Science*, 8 (2021) 10.
- Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. A., Gallie, J., Zhang, X. X., Altamirano-Junqueira, A. E., Jackson, R. W., The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW 25 aids spreading motility and plant growth promotion, *Environmental Microbiology*, 16 (2014) 7.
- Alves, A. R., Sequeira, A. M., Cunha, A., Increase in bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 6 (2019) 1.
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2014) 114.
- Amaral, P. F. F., Da Silva, J. M., Lehocky, B. M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A. P., Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 8.
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Prasad, S., Rtimi, S., Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives, *Environmental Technology & Innovation*, (2021) 14.
- Anaukwu, C. G., Ogbukagu, C. M., Ekwealor, I. A., Optimized Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CGA1 Using Agro-Industrial Waste as Sole Carbon Source, *Advances in Microbiology*, (2020) 10.
- Araújo, J., Rocha, J., Oliveira Filho, M., Matias, S., Júnior, S. O., Padilha, C. Rhamnolipids Biosurfactants from *Pseudomonas Aeruginosa* A Review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15 (2018) 4.
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G., Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31 (1968) 3.
- Ateş, Ç., Namli, A., Şeker fabrikası atığı vinasın (şilempe) inkübasyon süresince toprağın bazı kimyasal ve biyokimyasal özellikleri üzerine etkileri, *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 9 (2021) 2.

- Augustyn, A. R., Pott, R. W., Tadie, M., The interactions of the biosurfactant surfactin in coal flotation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 627 (2021).
- Azevedo, M. A., Vieira-Neta, M. D. R., do Nascimento, L. P., da Silva, G. F., Vicente, J. G., Duarte, I. C., Potential brewer's spent grain as a carbon source alternative for biosurfactant production by *Rhodotorula mucilaginosa* (LBP4), *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12 (2024) 1.
- Balan, S. S., Kumar, C. G., Jayalakshmi, S., Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter koralensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation, *Process Biochemistry*, 51 (2016) 12.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., Nyayanit, N. V., Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production, *Frontiers in Microbiology*, (2014) 5.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., ... Jacques, P., Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (2012).
- Begum, W., Saha, B., Mandal, U., A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development, *RSC Advances*, 13 (2023) 36.
- Ben Ayed, H., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., Nasri, M., Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21, *Process Biochemistry*, 49 (2014a)10.
- Ben Ayed, H., Jridi, M., Maalej, H., Nasri, M., Hmidet, N., Characterization and stability of biosurfactant produced by *Bacillus mojavensis* A21 and its application in enhancing solubility of hydrocarbon, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89 (2014b) 7.
- Bernheimer, A. W., Avigad, L. S., Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, 61 (1970) 3.
- Bezerra, K. G., Silva, I. G., Almeida, F. C., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Plant-derived biosurfactants: Extraction, characteristics and properties for application in cosmetics, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (2021) 34.
- Bhange, K., Chaturvedi, V., Bhatt, R., Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste, *Biotechnology Reports*, (2016) 10.
- Biktasheva, L., Gordeev, A., Kirichenko, A., Kuryntseva, P., Selivanovskaya, S., Screening of Microorganisms from Wastes and Identification of the Optimal Substrate for Biosurfactant Production, *Microbiology Research*, 15 (2024) 1.

- Bilen Ozyurek, S. Enhanced petroleum removal with a novel biosurfactant producer consortium isolated from drilling cuttings of offshore Akçakoca-5 in the Black Sea. *Geoenergy Science and Engineering*, 231 (2023).
- Bilen Ozyurek, S., Soyuer, K., Enhanced Petroleum Removal by Potent Biosurfactant Producer *Bacillus subtilis* CC9 Strain Isolated from an Oil Field, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 51 (2023) 2.
- Bjerk, T. R., Severino, P., Jain, S., Marques, C., Silva, A. M., Pashirova, T., Souto, E. B. Biosurfactants: properties and applications in drug delivery, biotechnology and ecotoxicology. *Bioengineering*, 8 (2021) 8.
- Bodour, A. A., Miller-Maier, R. M., Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 32 (1998) 3.
- Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., Marto, J., A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review, *Journal of Cleaner Production*, (2019) 225.
- Bottone, E. J., *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen, *Clinical Microbiology Reviews*, (2010) 23.
- Bouassida, M., Fourati, N., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D., Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactants in laundry detergent formulations: compatibility study with detergent ingredients and washing performance, *Engineering in Life Sciences*, 18 (2018) 1.
- Bouassida, M., Fourati, N., Krichen, F., Zouari, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D., Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptides in toothpaste formulation, *Journal of Advanced Research*, 8 (2017) 4.
- Brown, W., Ralston, A., Shaw, K., Positive transcription control: The glucose effect, *Nature Education*, 1 (2008) 1.
- Calabrese, I., Gelardi, G., Merli, M., Liveri, M. L. T., Sciascia, L., Clay-biosurfactant materials as functional drug delivery systems: Slowing down effect in the in vitro release of cinnamic acid, *Applied Clay Science*, (2017) 135.
- Cameotra, S. S., Singh, P., Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62 (2008) 3.
- Campos, J. M., Stamford, T. L. M., Sarubbo, L. A., Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings, *Biodegradation*, (2019) 30.
- Castaldi, A., Truong, B. N., Vu, Q. T., Le, T. H. M., Marie, A., Le Pennec, G., ... Bourguet-Kondracki, M. L., Computational Methods Reveal a Series of Cyclic and Linear Lichenysins and Surfactins from the Vietnamese Marine Sediment-Derived *Streptomyces* Strain G222, *Molecules*, 29 (2024) 7.
- Chandran, P., Das, N., Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil, *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2 (2010) 12.

- Charoentanaworakun, C., Srisuriyachai, F., Assabumrungrat, S., Soottitantawat, A., performance and salinity tolerance of palm oil-derived anionic biosurfactant and synthetic surfactant for waxy oil recovery in sandstone reservoirs, *Energy & Fuels*, 37 (2023) 17.
- Chaudhary, V., Kajla, P., Luthra, A., Siwach, R., Whey: As a low-cost substrate for the production of biosurfactants, in whey valorization: innovations, technological advancements and sustainable exploitation (pp. 285-310), Springer Nature Singapore, Singapore, 2023.
- Chawla, A., Lobacz, A., Tarapata, J., Zulewska, J., UV light application as a mean for disinfection applied in the dairy industry, *Applied Sciences*, 11 (2021) 16.
- Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M., Wen, J., Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 144 (2019).
- Chen, Y., Liu, S. A., Mou, H., Ma, Y., Li, M., Hu, X., Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments, *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017).
- Choi, J. W., Choi, H. G., Lee, W. H., Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, *Journal of Biotechnology*, 45 (1996) 3.
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., Fontanetti, C. S., Sugarcane vinasse: environmental implications of its use, *Waste Management*, 33 (2013) 12.
- Cirigliano, M. C., Carman, G. M., Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (1985) 4.
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, W., Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains, *Microbiological Research*, 229 (2019).
- Cooper, D., Goldenberg, B., Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (1987) 2.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., Marqués, A. M., Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties, *Annals of Microbiology*, (2015) 65.
- Çelik, P. A., Manga, E. B., Çabuk, A., Banat, I. M., Biosurfactants' potential role in combating COVID-19 and similar future microbial threats, *Applied Sciences*, 11 (2021) 1.



- da Rocha Junior, R. B., Meira, H. M., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes, *Biodegradation*, (2019) 30.
- Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., Niazi, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84 (2011) 2.
- Das, A. J., Ambust, S., Kumar, R. Development of biosurfactant based cosmetic formulation of toothpaste and exploring its efficacy. *Adv. Ind. Biotechnol*, 1 (2018) 5.
- Das, A. J., Kumar, R. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*, (2019) 16.
- Das, A. J., Kumar, R., Bioremediation of petroleum contaminated soil to combat toxicity on *Withania somnifera* through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of environmental management*, 174 (2016).
- Datta, P., Tiwari, P., Pandey, L. M. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, (2018) 270.
- de Lima, A. M., De Souzaa, R. R. Use of sugar cane vinasse as substrate for biosurfactant production using *Bacillus subtilis* PC. *Chem. Eng*, (2014) 37.
- de Oliveira, M. A., Silva, F. F., Tarabal, V. S., Livio, D. F., Meira, H. G. R., Gonçalves, P. F. R., Parreira, A. G., da Silva, J. A., Gonçalves, D. B., Granjeiro, P. A. Recent Patents on the Industrial Application of Biosurfactants. *Recent patents on biotechnology*, 17 (2023) 4.
- de Souza, A. C., Silva, M. S., Simões, L. A., Fernandes, N. A. T., Schwan, R. F., Dias, D. R. Advantages of biosurfactants over petroleum-based surfactants. In *Industrial Applications of Biosurfactants and Microorganisms*, Academic Press, Chapter 16, 2024.
- De Wit, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 84 (2001) 5.
- Degang, L., Auricchio, G., de Oliveira Schmidt, V. K., Della-Flora, I. K., Andrade, C. J. D. Oil displacement properties of surfactin: a comparative study. *Tenside Surfactants Detergents*, 60 (2023) 5.
- Diez, M. C., Llafquen, C., Fincheira, P., Lamilla, C., Briceño, G., Schalchli, H. Biosurfactant Production by *Bacillus amyloliquefaciens* C11 and *Streptomyces lavendulae* C27 Isolated from a Biopurification System for Environmental Applications. *Microorganisms*, 10 (2022) 10.
- Dikmen, F. H., Bozdağ, E. G. Türkiye’de kamu şeker fabrikaları için bir etkinlik analizi: 2003-2016. *İşletme Araştırmaları Dergisi*, 10 (2018) 3.

- Dinçoğlu, A. H., Ardiç, M., Peynir altı suyunun beslenmemizdeki önemi ve kullanım olanakları. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2012) 1.
- Drakontis, C. E., Amin, S., Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (2020) 48.
- Dubey, K., Juwarkar, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2001) 17.
- e Silva, N. M. P. R., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (2014) 2.
- Ebadipour, N., Lotfabad, T. B., Yaghmaei, S., RoostaAzad, R. Optimization of low-cost biosurfactant production from agricultural residues through response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46 (2016) 1.
- Edosa, T. T., Jo, Y. H., Keshavarz, M., Han, Y. S. Biosurfactants: production and potential application in insect pest management. *Trends Entomol*, 14 (2018) 79.
- Elazzazy, A. M., Abdelmoneim, T. S., Almaghrabi, O. A.. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (2015).
- Elshafie, A. E., Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bemani, A. S., Al-Bahry, S. N., Al-Maqbali, D. A., Banat, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *Frontiers in microbiology*, (2015) 6.
- Faisal, Z. G., Mahdi, M. S., Alobaidi, K. H. Optimization and chemical characterization of biosurfactant produced from a novel *Pseudomonas guguanensis* strain Iraqi ZG. KM. *International Journal of Microbiology*, (2023).
- Fakruddin Md, Biosurfactant: production and application. *J Pet Environ Biotechnol*, 3 (2012) 4.
- Fei, D., Zhou, G. W., Yu, Z. Q., Gang, H. Z., Liu, J. F., Yang, S. Z., ..., Mu, B. Z. Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23 (2020) 1.
- Fenandes, C. D., Barros, G. P., Bharagava, R. N., Kumar, A., Mulla, S. I., Azevedo, L. C. B., Ferreira, L. F. R. Microalgae and advanced oxidative processes as treatment approaches for agro-industrial effluents. In *Advances in chemical pollution, environmental management and protection Elsevier*. 2023.
- Fernandes, B. S., Messias, M. C. F., de Oliveira Carvalho, P., Zaiat, M., da Cruz Pradella, J. G. Data of added-value lipid production, Arachidonic acid, among other lipids by *Mortierella elongata*, using low cost simulated wastewater. *Data in brief*, 14 (2017).

- Fernandes, N. A. T., Simões, L. A., Dias, D. R. Comparison of biodegradability, and toxicity effect of biosurfactants with synthetic surfactants. In *Advancements in biosurfactants research*. Springer International Publishing, **2023a**.
- Fernandes, N. D. A. T., Simões, L. A., Dias, D. R. Biosurfactants produced by yeasts: fermentation, screening, recovery, purification, characterization, and applications. *Fermentation*, 9 (**2023b**) 3.
- Ferreira, L. F. R., Aguiar, M. M., Messias, T. G., Pompeu, G. B., Lopez, A. M. Q., Silva, D. P., Monteiro, R. T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74 (**2011**) 1.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Martinotti, M. G., Banat, I. M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications—present status and future potentials. *Biomedical science, engineering and technology*, 14 (**2012**) 1.
- Fracchia, L., Ceresa, C., Franzetti, A., Cavallo, M., Gandolfi, I., Van Hamme, J., ..., Banat, I. M. Industrial applications of biosurfactants. *Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics*, 159 (**2014**).
- Gaur, V. K., Tripathi, V., Gupta, P., Dhiman, N., Regar, R. K., Gautam, K., ..., Manickam, N. Rhamnolipids from *Planococcus* spp. and their mechanism of action against pathogenic bacteria. *Bioresource technology*, 307 (**2020**).
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M. K., Ravindran, B. Biosurfactants: potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental safety—a review. *Agronomy*, 12 (**2022**) 3.
- Geissler, M., Heravi, K. M., Henkel, M., Hausmann, R. Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. In *Biobased surfactants*, AOCS Press. **2019**.
- Ghazal M, Moussa L, Makboul H, Fayed S. Screening of Some Bacilli Strains for their Abilities to Produce Biosurfactants. *Der Pharma Chemica* 9 (**2017**) 8.
- Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Roayaei, E., Shahraki, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science*, 324 (**2008**) 1.
- Giri, S. S., Ryu, E., Sukumaran, V., Park, S. C., Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial pathogenesis*, 132 (**2019**).
- Gomaa, O. M., Selim, N., Fathy, R., Maghrawy, H. H., Gamal, M., Abd El Kareem, H., ..., Keshavarz, T. Characterization of a biosurfactant producing electroactive *Bacillus* sp. for enhanced microbial fuel cell dye decolourisation. *Enzyme and Microbial Technology*, 147 (**2021**).
- Gong, A. D., H. P. Li, Q. S. Yuan, X. S. Song, W. Yao, W. J. He, J. B. Zhang, and Y. C. Liao. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus*

*amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. PLoS One. 10 (2015) 2.

Gong, Q., Zhang, C., Lu, F., Zhao, H., Bie, X., Lu, Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. Food Control, 36 (2014) 1.

González-Penagos, C. E., Zamora-Briseño, J. A., Améndola-Pimenta, M., Pérez-Vega, J. A., Montero-Muñoz, J., Cañizares-Martínez, M. A., Rodríguez-Canul, R. The surfactant dioctyl sodium sulfosuccinate (DOSS) exposure causes adverse effects in embryos and adults of zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology, 443 (2022).

Grangemard, I., Bonmatin, J. M., Bernillon, J., Das, B. C., Peypoux, F. Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. The Journal of antibiotics, 52 (1999) 4.

Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. Frontiers in microbiology, 6 (2015).

Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Applied and environmental microbiology, 48 (1984) 2.

Gürkök, S., Özdal, M. Microbial biosurfactants: properties, types, and production. Anatolian Journal of Biology, 2 (2021) 2.

Habib, S., Ahmed, A., Haque, M. F. U., Ejaz, R., Efficacious use of potential biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria to combat petrol toxicity in *Zea mays* L. plants. Environmental Science and Pollution Research, 30 (2023) 18.

Halecký, M., Kozliak, E. Modern bioremediation approaches: use of biosurfactants, emulsifiers, enzymes, biopesticides, GMOs. Advanced nano-bio technologies for water and soil treatment, 2020.

Hamley, I. W. Self-assembly of amphiphilic peptides. Soft Matter, 7 (2011) 9.

Haskins, R. H., Thorn, J. A. Biochemistry of the ustilaginales: VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. Canadian Journal of Botany, 29 (1951) 6.

Hatha, A.A.M., Edward, G., Rahman, K.S.M.P. Microbial biosurfactants-review. J. Mar. Atmos. Res., 3 (2007).

Hemlata, B., Selvin, J., Tukaram, K. Optimization of iron chelating biosurfactant production by *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 4 (2015) 2.

<https://hunitek.hacettepe.edu.tr/temas-acisi-olcum-cihazı> (Erişim Tarihi: 05.05.2024).

Hu, Y., Yang, X., Tai, B., Wang, G., Zhang, X., Yin, Y., Xing, F. *Bacillus amyloliquefaciens* A-1 inhibiting fungal spoilage in agricultural products is improved by

metabolic engineering of enhancing surfactin yield. *Food Research International*, 175 (2024).

Ibrahim, S., Abdul Khalil, K., Zahri, K. N. M., Gomez-Fuentes, C., Convey, P., Zulkharnain, A., ... Ahmad, S. A. Biosurfactant production and growth kinetics studies of the waste canola oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* AQ5-07 from Antarctica. *Molecules*, 25 (2020) 17.

Inès, M., Mouna, B., Marwa, E., Dhouha, G. Biosurfactants as emerging substitutes of their synthetic counterpart in detergent formula: efficiency and environmental friendly. *Journal of Polymers and the Environment*, 31 (2023) 7.

Ismail, W., Al-Rowaihi, I. S., Al-Humam, A. A., Hamza, R. Y., El Nayal, A. M., Bououdina, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. 1-15. *International biodeterioration & biodegradation*, 84 (2013).

Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., Alexandridis, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275 (2020).

Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., Trevors, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13 (1991) 4.

Jain, R. M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., Jha, B. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108 (2013).

Jamir, L., Kumar, V., Kaur, J., Kumar, S., Singh, H. Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. *Environmental Technology Reviews*, 10 (2021) 1.

Jarvis, F. G., Johnson, M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 71 (1949) 12.

Jaysree, R. C., Basu, S., Singh, P. P., Ghosal, T., Patra, P. A., Keerthi, Y., Rajendran, N. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. *Pharmacology online*, 63 (2011) 63.

Jelen, P. Whey processing and utilization. *Dairy Processing and Quality Assurance*, 1 (2011).

Jimoh AA, Booyesen E, van Zyl L, Trindade M. Do biosurfactants as anti-biofilm agents have a future in industrial water systems. *Front Bioeng Biotechnol*.0 (2023).

Jimoh, A. A., Lin, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184 (2019).

Johnson, P., Trybala, A., Starov, V., Pinfield, V. J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Advances in colloid and interface science*, 288 (2021).

Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Al-Bahri, A., & Al-Mandhari, M. S. Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in Microbiology*, 7 (2016).

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource technology*, 99 (2008) 1.

Joy, S., Rahman, P. K., Khare, S. K., Sharma, S. Production and characterization of glycolipid biosurfactant from *Achromobacter* sp. (PS1) isolate using one-factor-at-a-time (OFAT) approach with feasible utilization of ammonia-soaked lignocellulosic pretreated residues. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42 (2019).

Joy, S., Rahman, P. K., Sharma, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317 (2017).

Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M. Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 17 (2007) 2.

Kalai-Grami, L., Karkouch, I., Naili, O., Slimene, I. B., Elkahoui, S., Zekri, R. B., ..., Limam, F. Production and identification of iturin A lipopeptide from *Bacillus methyltrophicus* TEB1 for control of *Phoma tracheiphila*. *Journal of basic microbiology*, 56 (2016) 8.

Kalaimurugan, D., Balamuralikrishnan, B., Govindarajan, R. K., Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Vadivalagan, C., ..., Khanongnuch, C. Production and characterization of a novel biosurfactant molecule from *Bacillus safensis* YKS2 and assessment of its efficiencies in wastewater treatment by a directed metagenomic approach. *Sustainability*, 14 (2022) 4.

Karamchandani, B. M., Pawar, A. A., Pawar, S. S., Syed, S., Mone, N. S., Dalvi, S. G., ..., Satpute, S. K. Biosurfactants' multifarious functional potential for sustainable agricultural practices. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10 (2022).

Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Ramu Dirisala, V., Kodali, V. P., Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4 (2018) 3.

Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Singh, R., Kumar, A., ..., Malik, T. Microbial biosurfactant as an alternate to chemical surfactants for application in cosmetics industries in personal and skin care products: a critical review. *BioMed Research International*, 2023.

Karp, S.G., Soccol, C.R., Tholozan, J.L. Production of L-lactic acid from the soybean vinasse, 2009.

- Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H. N. P., Jamal, A., ..., Choi, Y. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants—A critical review. *Advances in Colloid and Interface science*, 306 (2022).
- Kaskatepe, B., Yildiz, S., Gumustas, M., Ozkan, S. A. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* kefir and fish meal. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (2015).
- Kaur, G., Wang, H., To, M. H., Roelants, S. L., Soetaert, W., Lin, C. S. K. Efficient sophorolipids production using food waste. *Journal of Cleaner Production*, 232 (2019).
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis* sp. B4. *Desalination*, 285 (2012).
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Lee, C. H., Suh, H. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84 (1997) 1.
- Kim, J. H., Oh, Y. R., Han, S. W., Jang, Y. A., Hong, S. H., Ahn, J. H., Eom, G. T. Enhancement of sophorolipids production in *Candida batistae*, an unexplored sophorolipids producer, by fed-batch fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44 (2021) 1.
- Kiran GS, Thomas TA, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton AP: Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour Technol.*, 101 (2010).
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulouse, N., Selvin, J. Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Frontiers in microbiology*, 8 (2017).
- Kok, T., Nyotohadi, D. Biosurfactant potential and antiviral activity of multistrain probiotics. *Heliyon*, 10 (2024) 1.
- Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., Reis, M. A. M. *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresource technology*, 247 (2018).
- Kumar, C. G., Mamidyala, S. K., Das, B., Sridhar, B., Devi, G. S., Karuna, M. S. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20 (2010) 7.
- Kumar, P. N., Swapna, T. H., Khan, M. Y., Reddy, G., Hameeda, B. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. *Saudi journal of biological sciences*, 24 (2017) 7.

- Kumar, P. S., Mohanakrishna, G., Hemavathy, R. V., Rangasamy, G., Aminabhavi, T. M. Sustainable production of biosurfactants via valorisation of industrial wastes as alternate feedstocks. *Chemosphere*, 312 (2023).
- Kumar, S., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. Biosurfactant-mediated biocontrol of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot in *Vigna mungo* by a plant growth promoting *Enterococcus* sp. BS13. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7 (2016).
- Kumari, K., Behera, H. T., Nayak, P. P., Sinha, A., Nandi, A., Ghosh, A., ... Raina, V. Amelioration of lipopeptide biosurfactants for enhanced antibacterial and biocompatibility through molecular antioxidant property by methoxy and carboxyl moieties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161 (2023).
- Lee Y.S., Woo K.W. Micellization of Aqueous Cationic Surfactant Solutions at the Micellar Structure Transition Concentration—Based upon the Concept of the Pseudophase Separation. *J. Colloid Interface Sci.*, 1995.
- Lee, N. K., Yeo, I. C., Park, J. W., Kang, B. S., Hahm, Y. T. Isolation and characterization of a novel analyte from *Bacillus subtilis* SC-8 antagonistic to *Bacillus cereus*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110 (2010) 3.
- Liu, K., Sun, Y., Cao, M., Wang, J., Lu, J. R., Xu, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current opinion in colloid & interface science*, 45 (2020).
- Ma, Y. X., Q. Kong, C. Qin, Y. L. Chen, Y. J. Chen, R. H. Lv, G. H. Zhou. Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS. *AMB Express*, 2016.
- Maikudi Usman, M., Dadrasnia, A., Tzin Lim, K., Fahim Mahmud, A., Ismail, S. Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal. *AIMS Bioeng.*, 3 (2016).
- Makkar R.S., Cameotra S.S. Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. *J. Surfactants Deterg.* 5 (2002a).
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (2002b) 4.
- Maneerat, S., Phetrong, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J Sci Technol*, 29 (2007) 3.
- Maneerat, S., Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 27 (2005) 3.
- Marchut-Mikołajczyk, O., Drożdżyński, P., Polewczyk, A., Smulek, W., Antczak, T. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. *Microbial Cell Factories*, 20 (2021).



- Markande, A. R., Nerurkar, A. S. Microbial bioemulsifiers and their role in the natural environment. *Microbial Research: An Overview*. International Publishing House Pvt. Ltd., **2019**.
- Markande, A. R., Patel, D., Varjani, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330 (**2021**).
- Martínez-Ortiz, V. M., Trujillo-López, M. A., El-Kassis, E. G., Bautista-Rodríguez, E., Kirchmayr, M. R., Hernández-Carranza, P., Pérez-Armendáriz, B. *Bacillus mojavensis* isolated from aguamiel and its potential as a probiotic bacterium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 67 (**2024**).
- Mishra, N., Agsar, D., Deepthi, S. S., Kattagouda, U. M., Shetty, P. R., Pandey, V. Novel application of Nerium leaf and Image J software in drop collapse assay for rapid screening of biosurfactant producing microorganisms. *Indian Journal of Experimental Biology*, 59 (**2021**) 07.
- Mnif, I., Besbes, S., Ellouze, R., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis* biosurfactant addition. *Food science and biotechnology*, 21 (**2012**).
- Moldes, A. B., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., López-Prieto, A., Vecino, X., Cruz, J. M., Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (**2021**) 5.
- Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In *Food industry*. IntechOpen. **2013**.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488 (**2000**) 3.
- Motwali, E. A., Aly, M. M., Qari, H. A., Amasha, R. H., Zabermaawi, N. M., Effect of growth conditions on biosurfactant production by *Pseudomonas balearica* isolated from oil contaminated sea waters from Jeddah Saudi Arabia. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 14 (**2021**) 1.
- Mouafi, F. E., Elsoud, M. M. A., Moharam, M. E., Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9 (**2016**).
- Mouafo, T. H., Mbawala, A., Ndjouenkeu, R., Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed research international*, (**2018**).
- Mukherjee, A. K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Letters in Applied Microbiology*, 45 (**2007**) 3.

- Mulligan, C. N., Cooper, D. G., Neufeld, R. J. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of fermentation technology*, 62 (1984) 4.
- Nagtode, V. S., Cardoza, C., Yasin, H. K. A., Mali, S. N., Tambe, S. M., Roy, P., ..., Pratap, A. P., Green surfactants (biosurfactants): a petroleum-free substitute for Sustainability— Comparison, applications, market, and future prospects. *ACS omega*, 8 (2023) 13.
- Najafi, A. R., Rahimpour, M. R., Jahanmiri, A. H., Roostaazad, R., Arabian, D., Ghobadi, Z., Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 163 (2010) 3.
- Nalini, S., Parthasarathi, R., Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource technology*, 147 (2013).
- Naspolini, B. F., Machado, A. C. D. O., Cravo Junior, W. B., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C. Bioconversion of sugarcane vinasse into high-added value products and energy. *BioMed research international*, (2017).
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., & Rosenberg, E., Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and environmental microbiology*, 61 (1995) 9.
- Nayarisseri, A., Singh, P., Singh, S. K., Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, 14 (2018) 6.
- Neu, T. R., Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*, 60 (1996) 1.
- Nikolova, C., Gutierrez, T. Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: current state of knowledge and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9 (2021).
- Noll, P., Solarte-Toro, J. C., Restrepo-Serna, D. L., Treinen, C., Poveda-Giraldo, J. A., Henkel, M., ..., Hausmann, R. Limits for sustainable biosurfactant production: Techno-economic and environmental assessment of a rhamnolipid production process. *Bioresource Technology Reports*, 25 (2024).
- Nor, F. H. M., Abdullah, S., Ibrahim, Z., Nor, M. H. M., Osman, M. I., Al Farraj, D. A., ... Kamyab, H., Role of extremophilic *Bacillus cereus* KH1 and its lipopeptide in treatment of organic pollutant in wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, 46 (2023) 3.
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., Phang, L. Y., Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. *Molecules*, 23 (2018) 5.

- Ohadi, M., Forootanfar, H., Dehghannoudeh, G., Eslaminejad, T., Ameri, A., Shakibaie, M., Adeli-Sardou, M., Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *Microbial pathogenesis*, 138 (2020).
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (1995) 5.
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75 (1993) 1.
- Oliveira, J. G. D., Garcia-Cruz, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56 (2013).
- Onwosi, C. O., Odibo, F. J. C., Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (2012).
- Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., Fusaro, I., Biagi, G., Formigoni, A., Mammi, L., Short communication: Characterization of molasses chemical composition. *Journal of dairy science*, 103 (2020) 7.
- Paraszkiewicz, K., Bernat, P., Kuśmierska, A., Chojniak, J., Płaza, G., Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *Journal of environmental management*, 209 (2018).
- Parsaee, M., Kiani, M. K. D., Karimi, K., A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and bioenergy*, 122 (2019).
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K., Murugan, K., Rajasekar, A., Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in microbiology*, 8 (2017).
- Patel, P., Patel, H., Sharma, J., Shrimali, S., Sharma, S., Saraf, M., Microbial Biosurfactants: an overview of their uses, classification, types, properties, and biosynthesis. *ASMI*, 6 (2023).
- Patel, R. M., Desai, A. J., Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, 25 (1997) 2.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., Deka, S., Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in microbiology*, 8 (2017).
- Pemmaraju, S. C., Sharma, D., Singh, N., Panwar, R., Cameotra, S. S., Pruthi, V., Production of microbial surfactants from oily sludge-contaminated soil by *Bacillus subtilis* DSVP23. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167 (2012).

- Percival, S. L., Chen, R., Mayer, D., Salisbury, A. M. Mode of action of poloxamer-based surfactants in wound care and efficacy on biofilms. *International Wound Journal*, 15 (2018) 5.
- Pereira, J. F., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A., Rodrigues, L. R., Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111 (2013).
- Pérez-Lucas, G., Vela, N., El Aatik, A., Navarro, S. Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. *Pesticides-use and misuse and their impact in the environment*, 17 (2019).
- Pescuma, M., de Valdez, G. F., Mozzi, F., Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (2015).
- Phulpoto, I. A., Yu, Z., Hu, B., Wang, Y., Ndayisenga, F., Li, J., ... Qazi, M. A., Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial cell factories*, 19 (2020).
- Plaza G, Zjawiony I, Banat I, Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng.*, 50 (2006) 1.
- Purwasena, I. A., Astuti, D. I., Syukron, M., Amaniyah, M., Sugai, Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 183 (2019).
- Puyol McKenna, P., Naughton, P. J., Dooley, J. S., Ternan, N. G., Lemoine, P., Banat, I. M. Microbial Biosurfactants: Antimicrobial Activity and Potential Biomedical and Therapeutic Exploits. *Pharmaceuticals*, 17 (2024) 1.
- Rahimi Kashkouli, Y., Mogharei, A., Mousavian, S., Vahabzadeh, F., Performance of artificial neural network for predicting fermentation characteristics in biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using sugar cane molasses. *International Journal of Food Engineering*, 7 (2011) 6.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18 (2002) 6.
- Rahman, M. S., Ano, T., Shoda, M., Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*, 125 (2006) 4.
- Rahman, P. K., Gakpe, E., Production, characterisation and applications of biosurfactants-review. *Biotechnology* 7 (2008).
- Raj A, Kumar A, Dames JF. Tapping the Role of Microbial Biosurfactants in Pesticide Remediation: An Eco-Friendly Approach for Environmental Sustainability. *Front Microbiol.* 12 (2021).

- Rajaboopathi, S., Thambidurai, S. Synthesis of bio-surfactant based Ag/ZnO nanoparticles for better thermal, photocatalytic and antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 223 (2019).
- Ramalingam, V., Varunkumar, K., Ravikumar, V., Rajaram, R. Production and structure elucidation of anticancer potential surfactin from marine Actinomycete *Micromonospora marina*. *Process biochemistry*, 78 (2019).
- Ramyabharathi S, Meena KS, Rajendran L, Karthikeyan G, Jonathan E, Raguchander T. Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by *Bacillus subtilis* under protected cultivation. *Egypt J Biol Pest Co.*, 28 (2018).
- Rana, S., Singh, J., Wadhawan, A., Khanna, A., Singh, G., Chatterjee, M. Evaluation of in vivo toxicity of novel biosurfactant from *Candida parapsilosis* loaded in PLA-PEG polymeric nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110 (2021) 4.
- Rane, A. N., Baikar, V. V., Ravi Kumar, V., Deopurkar, R. L., Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017).
- Rangarajan, V., Dhanarajan, G., Sen, R., Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate *Bacillus megaterium*. *Biochemical engineering journal*, 99 (2015).
- Rani, M., Weadge, J. T., Jabaji, S. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil well batteries with antimicrobial activities against food-borne and plant pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11 (2020).
- Ravinder, P., Manasa, M., Roopa, D., Bukhari, N. A., Hatamleh, A. A., Khan, M. Y., ..., Sayyed, R. Z., Biosurfactant producing multifarious *Streptomyces puniceus* RHPR9 of *Coscinium fenestratum* rhizosphere promotes plant growth in chilli. *PLoS One*, 17 (2022) 3.
- Rawat, G., Kumar, V., Kumar, A., Naik, B., Saris, P. E. J., Khan, J. M., Kumar, V., Exploring the potential of novel *Bacillus* sp. G6: Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production from oil-contaminated soil. *Journal of Molecular Liquids*, 396 (2024).
- Reddy, B. V., Ramesh, S., Reddy, P. S., Ramaiah, B., Salimath, M., Kachapur, R. Sweet sorghum-a potential alternate raw material for bio-ethanol and bio-energy. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 46 (2005).
- Reis, C. E. R., Valle, G. F., Bento, H. B., Carvalho, A. K., Alves, T. M., de Castro, H. F., Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: Vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. *Fuel*, 277 (2020).
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., Freire, D. M., Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Bioresource technology*, 102 (2011) 11.

Resende, A. H. M., Farias, J. M., Silva, D. D., Rufino, R. D., Luna, J. M., Stamford, T. C. M., Sarubbo, L. A., Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 181 (2019).

Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., Sarubbo, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8 (2020a).

Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., Sarubbo, L. A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36 (2020b) 5.

Routhu, S. R., Chary, R. N., Shaik, A. B., Prabhakar, S., Kumar, C. G., Kamal, A., Induction of apoptosis in lung carcinoma cells by antiproliferative cyclic lipopeptides from marine algicolous isolate *Bacillus atrophaeus* strain AKLSR1. *Process biochemistry*, 79 (2019).

Sachdev, D. P., Cameotra, S. S., Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (2013).

Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., Matsuda, H., Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource technology*, 100 (2009) 2.

Saggese, A., R. Culurciello, A. Casillo, M. M. Corsaro, E. Ricca, L. Baccigalupi. A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs* 16 (2018) 6.

Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M., Banat, I. M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of microbiology*, 62, 753-763, (2012).

Saimmai A., Riansa-Ngawong W., Maneerat S., Dikit P., Application of biosurfactants in the medical field. *Walailak J Sci Technol*. 17 (2020).

Sana, S., Datta, S., Biswas, D., Auddy, B., Gupta, M., Chattopadhyay, H., Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. *Wound medicine*, 23 (2018).

Santos, B. L. P., Vieira, I. M. M., Ruzene, D. S., Silva, D. P. Unlocking the potential of biosurfactants: Production, applications, market challenges, and opportunities for agro-industrial waste valorization. *Environmental Research*, 2023.

Santos, E. F., Teixeira, M. F. S., Converti, A., Porto, A. L. F., Sarubbo, L. A., Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17 (2019).

Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., ..., Banat, I. M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181 (2022).

- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M. A., Sessitsch, A., Hafeez, F. Y. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PloS one*, 13 (2018) 6.
- Sass, A. M., McKew, B. A., Sass, H., Fichtel, J., Timmis, K. N., McGenity, T. J. Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline systems*, 4 (2008).
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., Chopade, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30 (2010) 2.
- Satpute, S. K., Bhawsar, B. D., Dhakephalkar, P. K., Chopade, B. A. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. (2008)
- Satpute, S.K., Kulkarni, G.R., Banpurkar, A.G., Banat, I.M., Mone, N.S., Patil, R.H., Cameotra, S.S., Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.*, 56, (2016).
- Schobert, B., The binding of a second divalent metal ion is necessary for the activation of ATP hydrolysis and its inhibition by tightly bound ADP in the ATPase from *Halobacterium saccharovorum*. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (1992) 15.
- Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., Gunkel, W., Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46 (1991) 3.
- Seiler, H., Wenning, M., Scherer, S., *Domibacillus robiginosus* gen. nov., sp. nov., isolated from a pharmaceutical clean room. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (2013) 6.
- Sekhona Randhawa, K. K., Rahman, P. K. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, 5 (2014).
- Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., ..., Gross, R., Sphorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 10.
- Sharma, D., Sharma, D., Industrial Applications of Biosurfactants. *Biosurfactants: Greener Surface Active Agents for Sustainable Future: Microbial Surfactants*, 2021.
- Sharma, J., Sundar, D., Srivastava, P., Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8 (2021).
- Sharma, N., Lavania, M., Lal, B., Biosurfactant: a next-generation tool for sustainable remediation of organic pollutants. *Frontiers in Microbiology*, 12 (2022).
- Sharma, N., Lavania, M., Lal, B., Biosurfactant: an emerging tool for the petroleum industries. *Frontiers in Microbiology*, 14 (2023).

Sharma, S., Pandey, L. M., Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology*, 307 (2020).

Sharma, V., Garg, M., Talukdar, D., Thakur, P., Henkel, M., Sharma, D., Kumar, G. Preservation of microbial spoilage of food by biosurfactant-based coating. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11 (2018) 2.

Sharon, A. B., Ahuekwe, E. F., Nzubechi, E. G., Oziegbe, O., Oniha, M., Statistical optimization strategies on waste substrates for solving high-cost challenges in biosurfactants production: a review. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* IOP Publishing, 2023.

Silva, I. A., Veras, B. O., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Guerra, J. M. C., Luna, J. M., Sarubbo, L. A. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ*, 8 (2020).

Silva, M. D. G. C., Medeiros, A. O., Converti, A., Almeida, F. C. G., Sarubbo, L. A. Biosurfactants: Promising Biomolecules for Agricultural Applications. *Sustainability*, 16 (2024) 1.

Singh, P., Patil, Y., Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of applied microbiology*, 126 (2019) 1.

Smithers, G. W. Whey and whey proteins. *International Dairy Journal*, 18 (2008) 7.

Soares da Silva, R. D. C. F., de Almeida, D. G., Brasileiro, P. P. F., Rufino, R. D., de Luna, J. M., Sarubbo, L. A., Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation*, 30 (2019).

Soberón-Chávez, G., Maier, R. M. Biosurfactants: a general overview. *Biosurfactants: from genes to applications*, 2011.

Sobrinho, H. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Porto, A. L. F., Sarubbo, L. A. Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. *Recent developments in biotechnology*, 11 (2013) 14.

Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Nuñez, A., Foglia, T. A., Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnology letters*, 26 (2004).

Souza, E. C., Azevedo, P. O. D. S. D., Domínguez, J. M., Converti, A., Oliveira, R. P. D. S. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA-Journal of Food*, 15 (2017) 4.

Soyuer, K., Bilen Ozyurek, S., An eco-friendly approach to biosurfactant production using low-cost wastes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 45 (2023) 8.

Steinmetz, M., Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics, 1993.



- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., ..., Vater, J. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chemistry & biology*, 6 (1999) 1.
- Stemme, K., Gerdes, B., Harms, A., Kamphues, J., Beet-vinasse (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs–nutritive value and limitations. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 89 (2005) 15.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A., Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, (2012).
- Su, W. T., Chen, W. J., Lin, Y. F. Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology. *Applied microbiology and biotechnology*, 84 (2009).
- Sumiardi, A., Soetarto, E. S., Susilaningih, D., Screening and characterization of biosurfactant produced by bacterial consortium in degrading polycyclic aromatic hydrocarbon compound. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2002, No. 1). AIP Publishing, 2018.
- Sundaram, T., Govindarajan, R. K., Vinayagam, S., Krishnan, V., Nagarajan, S., Gnanasekaran, G. R., ..., Rajamani Sekar, S. K. Advancements in biosurfactant production using agro-industrial waste for industrial and environmental applications. *Frontiers in Microbiology*, 15 (2024).
- Taowkrue, E., Songdech, P., Maneerat, S., Soontorngun, N., Enhanced production of yeast biosurfactant sophorolipids using yeast extract or the alternative nitrogen source soybean meal. *Industrial Crops and Products*, 210 (2024).
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A., Bölker, M. A., biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 66 (2007) 2.
- Thirumurugan, D., Kokila, D., Balaji, T., Rajamohan, R., AlSalhi, M. S., Devanesan, S., ..., Parthipan, P., Impact of biosurfactant produced by *Bacillus* spp. on biodegradation efficiency of crude oil and anthracene. *Chemosphere*, 344, (2023).
- Thomsen, A. B., Varga, E., Oleskovicz-Popiel, P., Lisiecki, P., Thomsen, M. H. Manure based bioethanol and biogas co-production. In *Baltic Biorefinery Symposium*, 41 (2005).
- Trudgeon, B., Dieser, M., Balasubramanian, N., Messmer, M., Foreman, C. M., Low-Temperature Biosurfactants from Polar Microbes. *Microorganisms*, 8 (2020) 8.
- Tucker, I. M., Burley, A., Petkova, R. E., Hosking, S. L., Penfold, J., Thomas, R. K., ..., Douth, J., Adsorption and self-assembly properties of the plant based biosurfactant, Glycyrrhizic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*, 598 (2021).
- Tulloch, A. P., Spencer, J. F. T., Deinema, M. H., A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 46 (1968) 3.

Vaishampayan P., Probst A., Krishnamurthi S., Ghosh S., Osman S., McDowall A., Ruckmani A., Mayilraj S., Venkateswaran K., *Bacillus horneckiae* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly clean room. *Int JSyst Evol Microbiol.*, 60 (2010).

Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S., Upasani, V.N., Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat. India. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 103 (2015).

Vecino Bello, X., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M., Moldes, A. B., Study of the synergistic effects of salinity, pH, and temperature on the surface-active properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (2012) 5.

Ventorino, V., Nicolaus, B., Di Donato, P., Pagliano, G., Poli, A., Robertiello, A., ..., Pepe, O., Bioprospecting of exopolysaccharide-producing bacteria from different natural ecosystems for biopolymer synthesis from vinasse. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6 (2019).

Verma, R., Sharma, S., Kundu, L. M., Maiti, S. K., Pandey, L. M., Enhanced production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL2 in semicontinuous bioreactor utilizing molasses as a sole substrate. *Journal of Biotechnology*, 362 (2023).

Verma, R., Sharma, S., Kundu, L. M., Pandey, L. M. Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. *Journal of Water Process Engineering*, 38 (2020).

Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., Romero-Tabarez, M. Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of natural products*, 76 (2013) 4.

Voulgaridou, G. P., Mantso, T., Anestopoulos, I., Klavaris, A., Katzastra, C., Kiouisi, D. E., ..., Pappa, A. Toxicity profiling of biosurfactants produced by novel marine bacterial strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2021) 5.

Waghmode, M. S., Patil, N. N., Gaikwad, P. S., Gunjal, A. B., Nawani, N. N., Kapadnis, B. P., Drop collapse assay on lotus leaf (*Nelumbo nucifera*): a simple and cost effective method for rapid detection of biosurfactants 2016.

Walter, V., Syldatk, C., Hausmann, R., Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 2010.

Wang, F., Xiao, J., Zhang, Y., Li, R., Liu, L., Deng, J., Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 174 (2021).

Wang, Y., Sun, Z., Zhao, Q., Yang, X., Li, Y., Zhou, H., ..., Zheng, H. Whole-genome analysis revealed the growth-promoting and biological control mechanism of the endophytic bacterial strain *Bacillus halotolerans* Q2H2, with strong antagonistic activity in potato plants. *Frontiers in Microbiology*, 14, (2023).

- Wei, S. Y., Gao, G. R., Ding, M. Z., Cao, C. Y., Hou, Z. J., Cheng, J. S., Yuan, Y. J., An engineered microbial consortium provides precursors for fengycin production by *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 87 (2024) 1.
- White, D. A., Hird, L. C., Ali, S. T., Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 744-755, (2013).
- Wu, B., Xiu, J., Yu, L., Huang, L., Yi, L., Ma, Y., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs. *Scientific Reports*, 12 (2022) 1.
- Wu, Q., Zhi, Y., Xu, Y. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic engineering*, 52 (2019).
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., Fredrickson, H. L., Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and environmental microbiology*, 61 (1995) 5.
- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Sahu, S. K., Irorere, V. U., Banat, I. M., Madani, K. The petroleum-degrading bacteria *Alcaligenes aquatilis* strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant. *Fuel*, 285 (2021).
- Yáñez-Mendizábal, V., Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., ..., Teixidó, N. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (2012).
- Yangxin, Y. U., Jin, Z. H. A. O., Bayly, A. E. Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16 (2008) 4.
- Yao, S., Zhao, S., Lu, Z., Gao, Y., Lv, F., Bie, X., Control of agitation and aeration rates in the production of surfactin in foam overflowing fed-batch culture with industrial fermentation. *Revista Argentina de microbiología*, 47 (2015) 4.
- Yaseen, Y., Diop, A., Gancel, F., Béchet, M., Jacques, P., Drider, D., Polynucleotide phosphorylase is involved in the control of lipopeptide fengycin production in *Bacillus subtilis*. *Archives of microbiology*, 200 (2018).
- Yeo, I. C., Lee, N. K., Hahm, Y. T., Genome sequencing of *Bacillus subtilis* SC-8, antagonistic to the *Bacillus cereus* group, isolated from traditional Korean fermented-soybean food, (2012).
- Yin, J., Wei, X., Hu, F., Cheng, C., Zhuang, X., Song, M., ..., Ma, A. Halotolerant *Bacillus velezensis* sustainably enhanced oil recovery of low permeability oil reservoirs by producing biosurfactant and modulating the oil microbiome. *Chemical Engineering Journal*, 453 (2023).
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., McInerney, M. J., Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56 (2004) 3.

Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., Bertagnolli, B. L., Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34 (2002) 7.

Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Teruel, J. A., Marqués, A., Manresa, A., Ortiz, A., Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir*, 26 (2010) 11.

Zargar, A. N., Mishra, S., Kumar, M., Srivastava, P., Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100. *Plos one*, 17 (2022) 4.

Zhao, Y., Yang, S. Z., Mu, B. Z., Quantitative analyses of the isoforms of surfactin produced by *Bacillus subtilis* HSO 121 using GC-MS. *Analytical Sciences*, 28 (2012) 8.

Zhou, H., Chen, J., Yang, Z., Qin, B., Li, Y., Kong, X., Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. *Annals of microbiology*, 65 (2015).

Zompra, A. A., Chasapi, S. A., Twigg, M. S., Salek, K., Anestopoulos, I., Galanis, A., ..., Spyroulias, G. A., Multi-method biophysical analysis in discovery, identification, and in-depth characterization of surface-active compounds. *Frontiers in Marine Science*, 9 (2022).

## EKLER

### EK 1 – *Bacillus* suşlarının biyosüpfektan üretim miktarları (g/50 mL)

Bakteriyel Suşlar	Ort±SS	Ortanca	Ort. Rank	KW sonucu*
<i>Bacillus halotolerans</i>	0,0191±0,0001	0,0190	4 <sup>a</sup>	$\chi^2=8,599$ <b>p=0,035</b>
<i>Bacillus cereus</i>	0,038±0,0005	0,038	9 <sup>b</sup>	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,05±0,0153	0,0504	10 <sup>c</sup>	
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,0173±0,0041	0,0160	3 <sup>d</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskall-Wallis testi sonucu.

## EK 2 – Konsorsiyumların biyosümfektan üretim miktarları (g/50mL)

Konsorsiyumlar	Ort±SS	Ortanca	Ort. Rank	KW sonucu*
<i>B. halotolerans-B. cereus</i>	0,023±0,005	0,023	2,17 <sup>a</sup>	$\chi^2=10,202$ <b>p=0,017</b>
<i>B. subtilis-B. halotolerans</i>	0,098±0,002	0,098	11,00 <sup>b</sup>	
<i>B. subtilis-B. cereus</i>	0,057±0,002	0,056	8,00 <sup>c</sup>	
<i>B. halotolerans-B. cereus-B. subtilis</i>	0,032±0,006	0,031	4,83 <sup>d</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskall-Wallis testi sonucu.

**EK 3 – Atık karbon kaynaklarıyla biyosülfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Atık Karbon Kaynağı</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
Melas	0,0125±0,002	0,126	5,00 <sup>a</sup>	$\chi^2=7,200$ <b>p=0,027</b>
Şilempe	0,141±0,006	0,141	8,00 <sup>b</sup>	
PAS	0,023±0,010	0,022	2,00 <sup>c</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

**EK 4 – Farklı şilempe konsantrasyonlarında biyosürefektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Şilempe Konsantrasyonu</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
%2	0,127±0,003	0,128	4,57 <sup>a</sup>	$\chi^2=19,511$ <b>p=0,003</b>
%5	0,137±0,002	0,138	8,00 <sup>b</sup>	
%10	0,188±0,001	0,188	20,00 <sup>c</sup>	
%15	0,167±0,006	0,165	17,00 <sup>d</sup>	
%20	0,154±0,003	0,153	14,00 <sup>e</sup>	
%25	0,146±0,003	0,147	11,00 <sup>f</sup>	
%30	0,121±0,003	0,122	2,33 <sup>g</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskall-Wallis testi sonucu.



**EK 5 – Farklı *Bacillus* oranlarıyla biyosüpfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği*</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu**</b>
0,25 mL BS ve 1,75 mL BH	0,167±0,015	0,17	3,17 <sup>a</sup>	$\chi^2=18,679$ <b>p=0,005</b>
0,50 mL BS ve 1,50 mL BH	0,188±0,011	0,193	15,83 <sup>b</sup>	
0,75 mL BS ve 1,25 mL BH	0,203±0,004	0,203	20,00 <sup>c</sup>	
1 mL BS ve 1 mL BH	0,184±0,007	0,183	15,00 <sup>d</sup>	
1,25 mL BS ve 0,75 mL BH	0,173±0,006	0,17	3,83 <sup>e</sup>	
1,50 mL BS ve 0,50 mL BH	0,167±0,010	0,167	10,50 <sup>f</sup>	
1,75 mL BS ve 0,25 mL BH	0,159±0,009	0,155	8,67 <sup>g</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* BS: *Bacillus subtilis* ve BH: *Bacillus halotolerans*

\*\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

**EK 6 – Farklı iz element konsantrasyonlarında biyosürfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
% 0	0,01±0,001	0,01	2,00 <sup>a</sup>	$\chi^2=19,303$ <b>p=0,004</b>
% 0,5	0,05±0,003	0,0515	5,00 <sup>b</sup>	
% 1	0,203±0,004	0,203	20,00 <sup>c</sup>	
% 2	0,135±0,007	0,137	15,33 <sup>d</sup>	
% 3	0,138±0,008	0,136	15,67 <sup>e</sup>	
% 4	0,122±0,003	0,122	11,00 <sup>f</sup>	
% 5	0,113±0,003	0,112	8,00 <sup>g</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\*\* Kruskall-Wallis testi sonucu.

**EK 7 – Farklı pH değerlerinde biyosüpfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
pH 5	0,176±0,006	0,178	11,33 <sup>a</sup>	$\chi^2=14,975$ <b>p=0,010</b>
pH 6	0,181±0,008	0,182	13,00 <sup>b</sup>	
pH 7	0,203±0,004	0,203	17,00 <sup>c</sup>	
pH 8	0,171±0,006	0,168	8,17 <sup>d</sup>	
pH 9	0,162±0,009	0,166	4,83 <sup>e</sup>	
pH 10	0,153±0,005	0,155	2,67 <sup>f</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

**EK 8 – Farklı çalkalama hızlarında biyosürefektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
Statik	0,136±0,010	0,136	2,83 <sup>a</sup>	$\chi^2=12,321$ <b>p=0,015</b>
100 rpm	0,146±0,008	0,145	5,50 <sup>b</sup>	
125 rpm	0,173±0,013	0,171	10,67 <sup>c</sup>	
150 rpm	0,203±0,004	0,203	14,00 <sup>d</sup>	
175 rpm	0,155±0,013	0,153	7,00 <sup>e</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

**EK 9 – Farklı sıcaklıklarda biyosüpfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
25°C	0,155±0,007	0,156	2,11 <sup>a</sup>	$\chi^2=6,667$ <b>p=0,083</b>
30°C	0,203±0,004	0,203	11,00 <sup>b</sup>	
35°C	0,185±0,009	0,189	7,67 <sup>c</sup>	
40°C	0,172±0,004	0,173	5,33 <sup>d</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

**EK 10 – Farklı inkübasyon sürelerinde biyosüpfektan üretim miktarları (g/50mL)**

<b>Konsorsiyum İçeriği</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ort. Rank</b>	<b>KW sonucu*</b>
3 gün	0,193±0,02	0,197	4,50 <sup>a</sup>	$\chi^2=10,427$ <b>p=0,034</b>
5 gün	0,197±0,028	0,194	4,83 <sup>b</sup>	
7 gün	0,203±0,004	0,203	6,00 <sup>c</sup>	
10 gün	0,290±0,008	0,287	14,00 <sup>d</sup>	
14 gün	0,227±0,011	0,231	10,67 <sup>e</sup>	

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma.

\* Kruskal-Wallis testi sonucu.

