

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Vitreoscilla* HEMOGLOBİN (VHb) GENİ (*vgb*) AKTARILMIŞ *Pseudomonas*
aeruginosa'NİN FARKLI KOŞULLARDA RAMNOLİPİT ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AYLİN ÇOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
MAYIS 2012

Tezin Başlığı: *Vitreoscilla* Hemogloblin (VHb) Geni (*vgb*) Aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa*'nın Farklı Koşullarda Ramnolipit Üretiminin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Aylin ÇOLAK

Sınav Tarihi: 04.05.2012

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ
(Moleküler Biyoloji ABD. Bşk.)

(İnönü Üniv.) _____

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
(Genel Biyoloji ABD. Bşk.)

(İnönü Üniv.) _____

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN (Danışman)

(İnönü Üniv.) _____

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum " *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Geni (*vgh*) Aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa*'nın Farklı Koşullarda Ramnolipit Üretiminin Araştırılması" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Aylin ÇOLAK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Vitreoscilla* HEMOGLOBİN (VHb) GENİ (*vgb*) AKTARILMIŞ *Pseudomonas aeruginosa*'NİN FARKLI KOŞULLARDA RAMNOLİPİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aylin ÇOLAK

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

81 + x sayfa

2012

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

Küresel endüstrileşme ve teknolojiadaki hızlı gelişmelere bağlı olarak klasik endüstri yöntemleri yerini biyoteknolojik yöntemlere bırakmaktadır. Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar, mikroorganizmalar yardımıyla atık maddelerin parçalanması ve yeni ürünlerin elde edilmesine odaklanmıştır. Bu tezde, *Pseudomonas aeruginosa* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) geni (*vgb*) aktarılmış rekombinantının ramnolipit üretimi çeşitli koşullarda test edilmiştir.

Sonuçlar, VHb'nin rekombinant bakteriye süktroz ve gliserol bulunan minimal besi ortamlarında ramnolipit üretimi açısından avantaj sağladığını göstermiştir. Glukoz bulunan minimal besi ortamında ise, glukozun *vgb* genine yaptığı baskılama, yabancı suşun rekombinantına göre daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmesine neden olmuştur. Diğer yandan, rekombinant bakteri, peynir altı suyu ve zeytinyağı atık suyu gibi doğal ortamlarda yabancı tipe göre daha iyi ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Ramnolipit, *Pseudomonas aeruginosa*, atık su, *Vitreoscilla* hemoglobini

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION THE RHAMNOLIPID PRODUCTION OF *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN (VHb) GENE (*vgb*) TRANSFERRED *Pseudomonas aeruginosa* UNDER VARIOUS CONDITION

Aylin ÇOLAK

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Institute of Natural Sciences

81 + x pp

2012

Supervisor: Hüseyin KAHRAMAN, Assist. Professor

The biotechnology methods have been replacing the classical industrial methods because of developments in global industrialisation and technology. In the last decades, research in biotechnology is focused on degradation of waste materials and production of new products by using microorganisms. In this thesis, rhamnolipid production of *Pseudomonas aeruginosa* and its *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene (*vgb*) transferred recombinant was tested under various conditions.

The results showed that VHb gives the recombinant bacterium an advantage in production of rhamnolipid in the minimal media containing sucrose and glycerol. Due to glucose depressed effect on *vgb*, increased rhamnolipid production was observed in wild type compared to the recombinant bacterium in the media containing glucose. On the other hand, the recombinant bacteria achieved a better rhamnolipid production in comparison to the wild type in the natural media such as whey and olive oil mill wastewaters.

KEY WORDS: Rhamnolipid, *Pseudomonas aeruginosa*, waste water, *Vitreoscilla* hemoglobin

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a;

Yüksek lisansa başladığımdan itibaren her türlü yardımını, desteğini ve anlayışını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Aslı GİRAY KURT ve Emel AYTAN'a;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bana maddi ve manevi açıdan destekleyen eşime, Arş. Grv. Yusuf Ziya ÇOLAK'a ve bugüne gelmemi sağlayan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosürefektanlar.....	1
1.1.1. Biyosürefektan Sentezleyen Mikroorganizmalar ve Yapısal Özellikleri.....	3
1.1.2. Biyosürefektanların Antimikrobiyal Özellikleri	4
1.1.3. Biyosürefektanların Yüzeye Tutunmayı Engelleme Özellikleri ve Diğer Uygulama Alanları.....	5
1.2. Biyosürefektanların Sınıflandırılması	6
1.2.1. Ramnolipitler	8
1.2.1.1. Ramnolipitlerin Yapısı ve Özellikleri	10
1.3. Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu.....	11
1.4. Peyniraltı Suyu Atığı	13
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Tarihçesi	14
1.5.2. Morfolojik Özellikleri	14
1.5.3. Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri	15
1.5.4. Çeşitli Ajanlara Karşı Dirençlilik	16
1.6. Bakterilerde Yeterli Çoğunluk Algılaması.....	16
1.7. Bakteriyel (<i>Vitreoscilla</i>) Hemoglobin (VHb)	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	25
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Bakteriler	25
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kültür Ortamları.....	26
3.1.3.1. LB (Luria-Bertani) Kültür Ortamı	26
3.1.3.2. Minimal (MM) Ortam	26

3.1.3.3.	Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu.....	26
3.1.3.4.	Peyniraltı Suyu Atığı.....	26
3.1.4.	Çalışmada Kullanılan Karbon Kaynakları	27
3.2.	Yöntem	27
3.2.1.	Ramnolipit Ekstraksiyonu	27
3.2.2.	Ramnolipit Miktarının Belirlenmesi.....	27
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1.	Pa ve PaJC'ın Farklı Miktarlarda Glikoz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	29
4.1.1.	30 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	29
4.1.2.	30 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	31
4.1.3.	37 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	33
4.1.4.	37 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	35
4.2.	Pa ve PaJC'ın Farklı Miktarlarda Sükroz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	37
4.2.1.	30 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	37
4.2.2.	30 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	39
4.2.3.	37 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	41
4.2.4.	37 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	43
4.3.	Pa ve PaJC'ın Farklı Miktarlarda Gliserol İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	45
4.3.1.	30 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	45
4.3.2.	30 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	47
4.3.3.	37 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	49
4.3.4.	37 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	51
4.4.	Pa ve PaJC'ın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	53
4.4.1.	30 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	53
4.4.2.	30 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	54
4.4.3.	37 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	55
4.4.4.	37 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	56
4.5.	Pa ve PaJC'ın Peyniraltı Suyu (PAS) Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	57
4.5.1.	30 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm'de Ramnolipit Üretimi	57
4.5.2.	30 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm'de Ramnolipit Üretimi	58

4.5.3.	37 °C Sıcaklıkta ve 100 rpm’de Ramnolipit Üretimi	59
4.5.4.	37 °C Sıcaklıkta ve 200 rpm’de Ramnolipit Üretimi	60
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	61
5.1.	30 °C’de Farklı Karbon Kaynakları (Glikoz, Sükroz, Gliserol) İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	62
5.1.1.	Glikoz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	62
5.1.2.	Sükroz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	63
5.1.3.	Gliserol İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	64
5.2.	37 °C’de Farklı Karbon Kaynakları (Glikoz, Sükroz, Gliserol) İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	65
5.2.1.	Glikoz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	65
5.2.2.	Sükroz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	65
5.2.3.	Gliserol İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	66
5.3.	30 °C’de Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	67
5.4.	37 °C’de Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	67
5.5.	30 °C’de Peyniraltı Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	68
5.6.	37 °C’de Peyniraltı Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi.....	68
6.	KAYNAKLAR	73
	ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Geri Dönüşümlü Monomer-Misel Termodinamik Denge Şematik Gösterimi.....	2
Şekil 1.2	Biyosürefektanların Kimyasal Yapısı	8
Şekil 1.3	Glikoz Varlığında Yetişen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Bakterisinin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüsü	9
Şekil 1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Ramnolipitlerin Biyosentezi	10
Şekil 1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakterisinin Elektron Mikroskop Görüntüsü ...	15
Şekil 1.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tarafından Oluşturulan Biyofilm Şeması.....	17
Şekil 1.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tarafından Oluşturulan Biyofilmin Mikroskopik Görünümü.....	17
Şekil 3.1	pUT- miniTn5:vgb-Cm Transpozaz Sistemi	25
Şekil 4.1	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Glikoz İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	30
Şekil 4.2.	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Glikoz İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	32
Şekil 4.3	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Glikoz İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	34
Şekil 4.4	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Glikoz İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	36
Şekil 4.5	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Sükroz İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	38
Şekil 4.6	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Sükroz İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	40
Şekil 4.7	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Sükroz İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	42
Şekil 4.8	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Sükroz İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	44
Şekil 4.9	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Gliserol İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	46

Şekil 4.10	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Gliserol İçeren Besiyerlerinde 30 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	48
Şekil 4.11	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Gliserol İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	50
Şekil 4.12	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 Gliserol İçeren Besiyerlerinde 37 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	52
Şekil 4.13	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Besiyerinde 30 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	53
Şekil 4.14	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Besiyerinde 30 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	54
Şekil 4.15	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Besiyerinde 37 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	55
Şekil 4.16	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Besiyerinde 37 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	56
Şekil 4.17	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Peyniraltı Suyu Besiyerinde 30 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	57
Şekil 4.18	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Peyniraltı Suyu Besiyerinde 30 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	58
Şekil 4.19	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Peyniraltı Suyu Besiyerinde 37 °C'de ve 100 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	59
Şekil 4.20	Pa (o) ve PaJC (♦)'ın Peyniraltı Suyu Besiyerinde 37 °C'de ve 200 rpm'de Ramnolipit Düzeyleri.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Biyosürefektanların Kullanım Alanları ve Etkisi	6
Çizelge 1.2	Önemli Bazı Biyosürefektanlar ve Mikrobiyal Kaynakları	7
Çizelge 1.3	Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Kimyasal Bileşimi.....	12
Çizelge 1.4	Peyniraltı Suyunun İçeriği.....	14

SİMGELER VE KISALTMALAR

Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Yabanıl Tip)
PaJC	Kromozomunda bakteriyel hemoglobin geni taşıyan rekombinant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
vgb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini sentezleyen gen
mM	Milimolar
g	Gram
µl	Mikrolitre
rpm	Dakıkada dönme hızı
mg	Miligram
kg	Kilogram
L	Litre
kD	Kilodalton
ml	Mililitre
atm	Atmosfer
nm	Nanometre
m	Metre
µm	Mikrometre
Dyne/cm ²	Yüzey gerilimi birimi
mmol	milimol
OD	Optik dansitite
EPS	Ekzopolisakkarit
KMK	Kritik misel konsantrasyonu
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
PAS	Peyniraltı suyu
ZYFA	Zeytinyağı fabrikası atık suyu
LB	Luria-Bertani zengin besi ortamı
MM	Minimal Ortam
BMSM	Basal Mineral Salt Medium (Sıvı Besi Ortamı)
DNA	Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
°C	Santigrad derece

1. GİRİŞ

Küresel endüstrileşme ve teknolojiadaki hızlı gelişmelere bağlı olarak klasik endüstri yöntemleri yerini biyoteknolojik yöntemlere bırakmaktadır. Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımıyla atık maddelerin parçalanması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılacak hem de insanların yaşamı için yararlı ürünler elde edilmesi sağlanmış olacaktır [1].

Atık maddelerin geri kazanımı çevre dostu teknolojilerin temel hedefi durumuna gelmiştir. Böylece hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntem ile geri kazanılarak tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek, hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda ekonomik olarak değerlendirilmesi mümkün olacaktır [2].

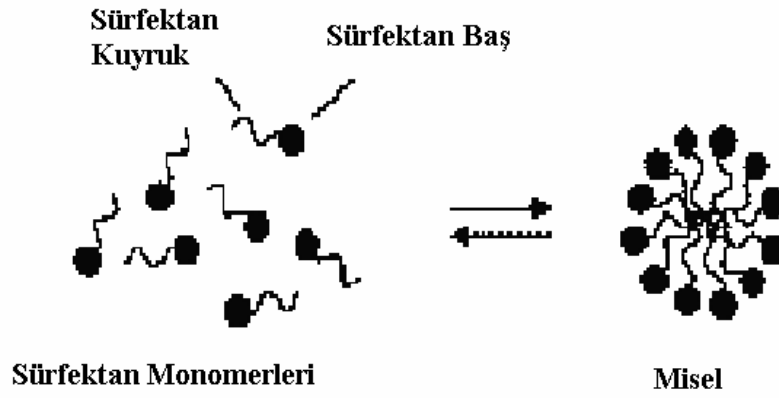
Atık maddelerin biyoteknolojik olarak değerlendirilmesinde mikroorganizmaların, hem sahip oldukları yüzey aktif özellikler hem de atık maddeleri kullanarak daha yararlı ürünlere dönüştürebilmeleri önemli rol oynamaktadır. Böylece günümüz dünyasının en önemli problemlerinden olan atık maddelerin oluşturduğu sorunlar ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir [3].

Atık maddelerin biyoteknolojik yöntemlerle ve mikroorganizmalar tarafından besi ortamı olarak kullanılması sonucunda üretilen bileşiklerden biri de biyosüpfektanlardır.

1.1. Biyosüpfektanlar

Süpfektan maddeler en basit tanımı ile bir sıvının yüzey gerilimini azaltan maddelerdir [4].

Hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruktan oluşan süpfektan molekülleri, hava ile suyun birleştiği yerde yoğunlaşırlar (Şekil 1.1). Suyun içinde bu moleküllerin hidrofobik kısımları hava kabarcığı tarafından çekilir ve sonuçta hava kabarcığının etrafını sararlar. Suyun dışında ise bunun tam tersi olur. Saf suyun yüzey gerilimi yüksek olduğu için su içerisindeki bir hava kabarcığı yüzeye gelince hemen patlar. Süpfektan maddeler ise yüzey gerilimini düşürdükleri için oluşan hava kabarcıkları yüzeye çıktığında uzun süre patlamadan kalırlar [5].



şekil 1.1. Monomer-misel dönüşümünün şematik gösterimi [6]

Süpfektan maddelerin bu özelliği sonucu elbiselerimizin deterjan ile temizlenmesi sağlanmış olur. Süpfektan molekülünün hidrofobik kısmı kumaş üzerindeki yağ tarafından çekilir ve yağın etrafı hidrofilik kısım ile kaplanır. Böylece yağ molekülü yuvarlanarak atılır. Deterjanlar ve sabunlar suni olarak imal edilen süpfektan maddelerdir. Tabiatta ise çürümüş bitki artıklarının parçalanma ürünleri olarak, birçok doğal süpfektan suya salınır. Bu süpfektanlara en iyi örnek humik asittir. Bir şelalede gördüğümüz köpüklenme bu tabii süpfektanlar sayesinde [5].

Süpfektanlar kimyasal ya da mikrobiyal olarak sentezlenebilirler. Kimyasal yöntemlerle üretilen süpfektanlar sentetik süpfektanlar, mikrobiyolojik olarak birçok farklı mikroorganizma tarafından özellikle oksijenli ortamda sentezlenenler ise biyosüpfektanlar olarak adlandırılır [7].

Sentetik süpfektanların, düşük ayrışabilirlikleri nedeniyle biyolojik arıtmaya karşı dirençli yapıda olması, bazılarının biosit özellik göstermesi ve arıtma tesislerinde mikroorganizma aktivitesini engellemesi, sucul ortamda yaşayan çeşitli canlılar üzerinde akut ve/veya kronik toksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir [8-11]. Bu durum ekosistemi büyük ölçüde etkilemektedir.

Biyosüpfektanların sentetik süpfektanlara birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyosüpfektanların sahip olduğu avantajlar arasında düşük toksik etkili olmaları, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, yenilenebilir karbon kaynakları kullanılarak üretilabilir olmaları, ekstrem çevre koşullarında etkiliklerinin yüksek olması gibi özellikler sayılabilir [12]. Ancak biyosüpfektanlar, henüz sentetik süpfektanlarla rekabet edebilecek durumda değildir [13]. Biyosüpfektanların sentetik süpfektanlarla rekabet edebilmesi için üretim maliyetinin düşürülmesi gerekir [12].

Biyosüurfektanlar; mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrofilik ve hidrofobik kısım içeren mikrobiyal hücre yüzeylerinde bulunan veya hücre dışına salınan, katı, sıvı ve gaz moleküller arasında yüzey ve iç yüzey gerilimini azaltabilen amfilik bileşiklerdir. Biyosüurfektanların hidrofobik kısımları uzun zincirli yağ asitleri, hidroksi yağ asitleri veya α -alkil β -hidroksi yağ asitleri içerirken hidrofilik kısımlarında fosfat, karboksilat, karbonhidrat, amino asit, siklik peptit veya alkol bulunmaktadır [14-17].

Birçok bakteri, maya ve fungus farklı yapıda ve moleküler ağırlıkta biyosüurfektan sentezlemektedir. Düşük molekül ağırlıklı biyosüurfektanlar glikolipit yapısında bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı biyosüurfektanlar kovalent bağlarla bağlanmış hidrofobik zincirler içermektedir [16].

Biyosüurfektanlar karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler [18]. Yapısal farklılıkları (glikolipitler, lipopeptitler, yağ asitleri gibi), düşük toksisiteleri, biyolojik olarak parçalanabilmelerinden dolayı bu moleküller yaygın bir şekilde kozmetik, ilaç, gıda sanayinde emülsifier, ıslatıcı-nemlendirici, koruyucu madde ve deterjan olarak kullanılmaktadırlar. Biyosüurfektanlar ekonomik olarak çeşitli substratlardan başta bitkisel yağlar, içki ve süt sanayi atıkları gibi yenilenebilir kaynaklardan da üretilirler [15]. Özellikle fermantasyon teknolojisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyosüurfektanlar, metallerle kompleks oluşturma eğilimindedirler [19]. Bunun yanında biyosüurfektanlar probiyotik madde olarak, patojen mikroorganizmaların yüzeylere yapışmasını engellemesinde, birçok hastalığın iyileştirilmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı biyosüurfektanların antibakteriyel, antifungal, antiviral aktiviteye sahip olduğu da bilinmektedir [14-17].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosüurfektanlar bileşiklerin parçalanması ve emülsifikasyonu artırmaya yardım eder. Biyoemülsifierler ticari olarak petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunda, petrol iyileşimini artırmaya yönelik, petrolle kirli boruların temizlenmesi için kullanılan klorlu çözücülerin yerine kullanılabilir [20].

1.1.1. Biyosüurfektan sentezleyen mikroorganizmalar ve yapısal özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus subtilis* ve *Candida bombicola*'nın sentezlediği ramnolipitler, sürfaktinler ve soforolipitler biyosüurfektanlara örnek olarak verilebilir. Bazı mikroorganizmalar biyosüurfektan sentezleyerek hücre duvarının yapısını değiştirmektedir. Örneğin maya olan *Candida lipolytica* ve *Candida tropicalis*

hücre duvarında lipopolisakkarit yapısında biyosüpfektanlar sentezlemektedir. Bunun yanında bazı mikroorganizmalar hidrokarbon gibi suda çözünmeyen substratlara diffüze olmak için bazı mikroorganizmalar, substratlardaki hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etmek için biyosüpfektan sentezlemektedir [21].

1.1.2. Biyosüpfektanların antimikrobiyal özellikleri

Biyosüpfektanların antimikrobiyal özellikleri ilk kez *B. subtilis* türleri tarafından sentezlenen lipopeptit yapısındaki iturin A bileşiklerinde tespit edilmiştir. İturin A; maya hücre zarında bulunan elektrolitleri serbest bırakarak fosfolipitlerin ayrışmasına ve sitoplazma yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca iturin A, por oluşumunda lipopeptitleri uyarıp zarların elektriksel iletimini artırarak patojenlere karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. [22-26].

Paenibacillus türlerinde iturin benzeri bileşikler sentezlediği ve fungal hastalıklara karşı etkili olduğu ayrıca iturin veya iturin benzeri biyosüpfektanların sağlık alanında antifungal madde olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [27].

Benincasa ve arkadaşları (2004); *P. aeruginosa* tarafından sentezlenen ramnolipitlerin *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocadium virens* ve *Chaetium globosum* funguslarına karşı antifungal, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* ve *Streptococcus faecalis* bakterilerine karşı antibakteriyel etkisinin olduğunu belirtmişlerdir [28].

Yapılan başka bir çalışmada, *P. aeruginosa* tarafından sentezlenen ramnolipit biyosüpfektanlarının *Botrytis cinerea* ve *Rhizotecnia solani* funguslarına karşı antifungal etkisinin olduğu bildirilmiştir [29].

Haferburg ve arkadaşları (1987) tarafından yapılan bir çalışmada; ramnolipit biyosüpfektanlarının tütün mozaik virüsü ve patates X virüsü ile enfekte edilmiş *Nicotiana glutinosa* (tütün) yapraklarında biyolojik kontrol için kullanılabileceğini bildirmişlerdir [30].

Benjamas ve arkadaşları (2005); süt fabrikasının atığından izole edilen *P. aeruginosa* B189'dan elde edilen ramnolipit biyosüpfektanlarının meme kanserine karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir [31].

1.1.3. Biyosüpfektanların yüzeye tutunmayı engelleme özellikleri ve diğer uygulama alanları

Bakterilerin; enfeksiyon, biyofilm ve koloni oluşturmada yüzeye tutunma özelliğı anahtar bir öneme sahiptir. Biyosüpfektanların enfeksiyonlu bölgelerde veya katı yüzeylerde patojenik mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını engellediğı bildirilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* tarafından sentezlenen biyosüpfektanların *Listeria monocytogenes* LO 28'in politetrafluroetilen yüzeye tutunmasını engellediğı, süpfektin biyosüpfektanlarının ise *Proteus miribalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* gibi patojenlerin polivinilklorit yüzeylerde biyofilm oluşturmada engellediğı bildirilmiştir. Biyosüpfektanların patojenik mikroorganizmaların katı yüzeylere koloni oluşturmada engellemeye karşı yeni ve oldukça etkili bileşikler olduğı bildirilmiştir [32,33].

Biyosüpfektanların; karışımlardaki mineral madde ve vitaminlerin serbest bırakılmasında, homeostatik besleyici madde olarak, probiyotik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen doğal ürünlerin ve onların organik asit ve de enzimler gibi yan ürünlerinin korunmasında kullanılabileceğı belirtilmiştir. Biyosüpfektanlar yeterince sindirilmeyen mineral madde ve vitaminlerin absorpsiyonunu artırmaktadır. Bu nedenle besin endüstrisinin biyosüpfektanların en önemli uygulama alanlarından bir tanesi olabileceğı belirtilmektedir [34]. Çizelge 1.1.'de biyosüpfektanların kullanım alanları gösterilmiştir [12].

Çizelge 1.1. Biyosüpfektanların kullanım alanları ve etkisi [12]

<u>Süpfektanların Kullanım Alanları</u>	<u>Süpfektanların Etkisi</u>
Metal sanayinde	-Yağlamada, ıslatmada, emülsifikasyonda vs.
Döküm endüstrisinde	-Katkılı kalıpların serbest bırakılmasında -Elektrolit temizlenmesinde
Kâğıt sanayinde	-Reçine giderme, yıkamada -Islatıcı ve düzeltici; kaplama ve renklendirici olarak
Boya ve koruyucu vernik imalatında	-Pigmentlerin ayrılması ve çökelmenin geciktirilmesi pigmentlerin dağılımı ve emülsiyonunda
Parlatmada kullanılan madde ve balmumlarında	-Emülsüfiye balmumları, emülsiyonların kararlılığında
Petrol üretimi ve ürünlerinde	-Yağ emülsiyonu, katıların dağılımında
Akışkan işleme çalışmalarında	-Ham petrolün de-emülsiyonunda
Deri sanayinde	-Yağ gidermede emülsifer ve deterjan olarak
Tekstil ürünlerinde ve sanayinde	-Ham yün sağlamada emülsifer ve deterjan olarak
Tarımsal endüstrisinde	-Pestisit solüsyonlarının emülsifikasyonunda
İnşaat alanında	-Kum ve çakıl ile asfaltın bağlanmasını arttırmada
Elastik ve plastik sanayinde	-Monomerlerin emülsifikasyonu ve çözünebilmesinde
Besin ve içecek sanayinde	-Dezenfektan temizlemelerinde -Pestisitlerin gideriminin arttırılmasında
Endüstriyel temizlikte	-Deterjan ve dezenfektanlarda

1.2. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması

Birçok mikroorganizma farklı kimyasal özellikte ve moleküler ağırlıkta biyosüpfektanlar üretmektedirler. Biyosüpfektanların sınıflandırılması farklı şekillerde yapılmaktadır. Çoğunlukla kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre sınıflandırılır. Genelde yapılarında peptit veya amino asitlerin oluşturduğu yarı hidrofilik mono, di veya polisakkaritler; doymuş veya doymamış yağ asitlerinden oluşan yarı hidrofobik bileşiklerdir [35]. Bazı durumlarda biyosüpfektanlar düşük molekül ağırlıklı moleküller ve yüksek moleküler ağırlıklı polimerler şeklinde de sınıflandırılmaktadırlar. Düşük molekül ağırlıklı biyosüpfektanlar genelde glikolipit veya lipopeptit yapısındadır. Yüksek molekül ağırlıklı biyosüpfektanlar ise amfipatik polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler veya biyopolimerlerin

kompleks karışımlardır [4,14,35]. Biyosüpfektanların etkinliğinin içerdiği yapıların farklılığına bağı olarak değıştiğı belirtilmektedir [36].

Biyosüpfektanlar;

1- Glikolipitler: En çok bilinen biyosüpfektanlar glikolipitlerdir. Uzun zincirli alifatik asitler ya da hidroksialifatik asitlerle kombinasyon kurmuş karbonhidratlardır. Glikolipitlere örnek olarak ramnolipitler, trehalolipitler ve soforozlipitler sayılabilir. Glikolipitler içinde en iyi bilinen biyosüpfektan ise ramnolipittir.

2- Lipopolisakkaritler: Yüksek molekül ağırlıklı hidrokarbonları parçalayabilen ve *Acinetobacter calcoaceticus* gibi bakteriler tarafından üretilen suda çözünebilen hücre dışı biyosüpfektanlardır.

3- Fosfolipitler: Bütün mikroorganizmalarda olmasına rağmen genellikle *Corynebacterium lepus* tarafından üretilen biyosüpfektanlardır.

4- Lipopeptitler: *B. subtilis* tarafından üretilen ornitolipit ve süpfaktin gibi biyosüpfektanlardır.

5- Nötral lipitler ve Yağ asitler: Ustilaj asit, korineomikolik asit, lipoteikoik asit ve hidrofobik proteinler gibi biyosüpfektanlar [4] şeklinde sınıflandırılırlar. Çizelge 1.2’de önemli bazı biyosüpfektan çeşitleri ve hangi organizmalardan elde edildikleri gösterilmiştir.

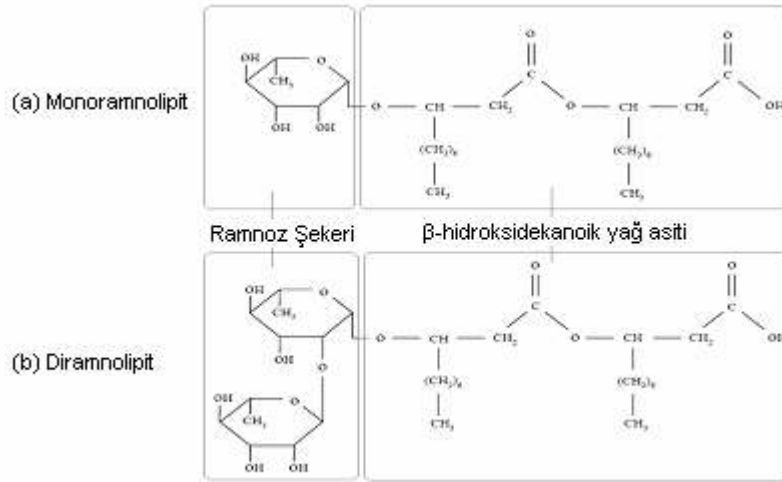
Çizelge 1.2. Önemli bazı biyosüpfektanlar ve mikrobiyal kaynakları [4]

Biyosüpfektan	Organizma
Glikolipitler	
Ramnolipitler	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Trehalolipitler	<i>R. erythropolis</i> <i>N. erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Soforolipitler	<i>C. bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i>
Sellobiyolipitler	<i>U. zeae, U. maydis</i>
Lipopeptitler ve Lipoproteinler	
Peptid-lipit	<i>B. licheniformis</i>
Serravettin	<i>S. marcescens</i>
Viskosin	<i>P. fluorescens</i>
Süpfaktin	<i>B. subtilis</i>
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>
Gramisidin	<i>B. brevis</i>
Polimiksin	<i>B. polymyxa</i>
Yağ Asitleri, Nötral Lipitler ve Fosfolipitler	
Yağ asitleri	<i>C. lepus</i>
Nötral lipitler	<i>N. erythropolis</i>
Fosfolipitler	<i>T. thiooxidans</i>

1.2.1. Ramnolipitler

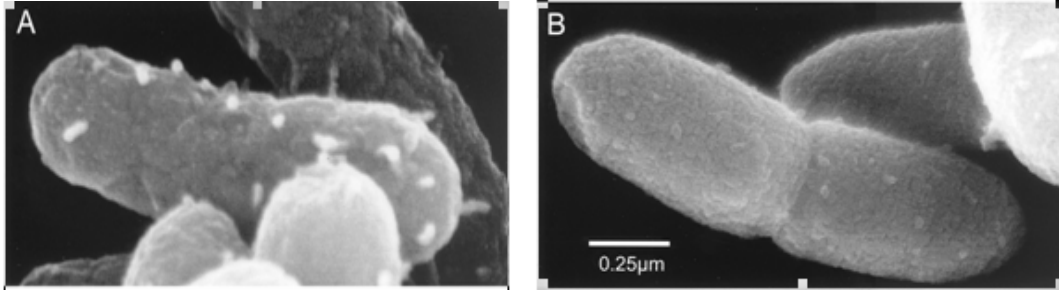
Ramnolipit ilk olarak Bergström ve arkadaşları (1946), daha sonra da Jarvis ve Johnson (1949) tarafından *P. aeruginosa* kültürlerinden elde edilen bir biyosüpfektandır [37].

Biyosüpfektanların en fazla çalışılan ve en iyi bilinen çeşidi, *P. aeruginosa* türleri tarafından üretilen glikolipit yapısındaki ramnolipit biyosüpfektanıdır. Ramnolipitler, genellikle yapısında ramnoz şekeri ve β -hidroksidekanoik yağ asitleri içeren biyosüpfektanlar şeklinde tanımlanmıştır. Şekil 1.2’de gösterildiği gibi bir ramnolipitin yapısında bir beş karbonlu ramnoz şekeri ile yağ asidi bulunduran biyosüpfektanlar monoramnolipit (Şekil 1.2 a), iki ramnoz şekeri ile yağ asidi bulunan biyosüpfektanlar diramnolipit (Şekil 1.2 b) şeklinde isimlendirilmektedir [37]. Ramnolipitlerde bulunan ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken, yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliği arttırmaktadır. Bu özellikler ramnolipitlerin sağlamlığını ve hidrofobik bileşikler çözme kapasitesini etkilemektedir [37].



Şekil 1.2. a) Monoramnolipit RRL veya R1 (α -L-Ramnopiranosil + β -hidroksidekanoil- β -hidroksidekanot), b) Diramnolipit RRL veya R1 (2-O- α -L-Ramnopiranosil- α -L-Ramnopiranosil- β -hidroksidekanoil- β -hidroksidekanot) biyosüpfektanlarının kimyasal yapısı [37].

Ramnolipitler de ekzopolisakkaritler (EPS) gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen ve üreticilerine çeşitli avantajlar sağlayan şeker içerikli polimerlerdir [38-40]. Ramnolipitlerin mikrobiyal üremenin logaritmik artış, durağan ve litik fazlarında sentezlendiği belirtilmektedir (Şekil 1.3) [41].



Şekil 1.3. Glikoz içeren ortamda 8 saat üretilen *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü. A) Rhamnolipit yokluğunda ve B) 6 mM rhamnolipit varlığında. (% 1 Renyum tetroksit kullanılarak sabit hücreler gösterilmiştir) [42]

Rhamnolipit biyosüpfektanları, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenici maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendisini yenilenmesinde doğal ve en avantajlı bileşiklerdir [43]. Ayrıca organik bileşiklerle kirlenmiş topraklarda rhamnolipit biyosüpfektanların eklenmesinin biyolojik parçalanmayı arttırması ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır [20,44].

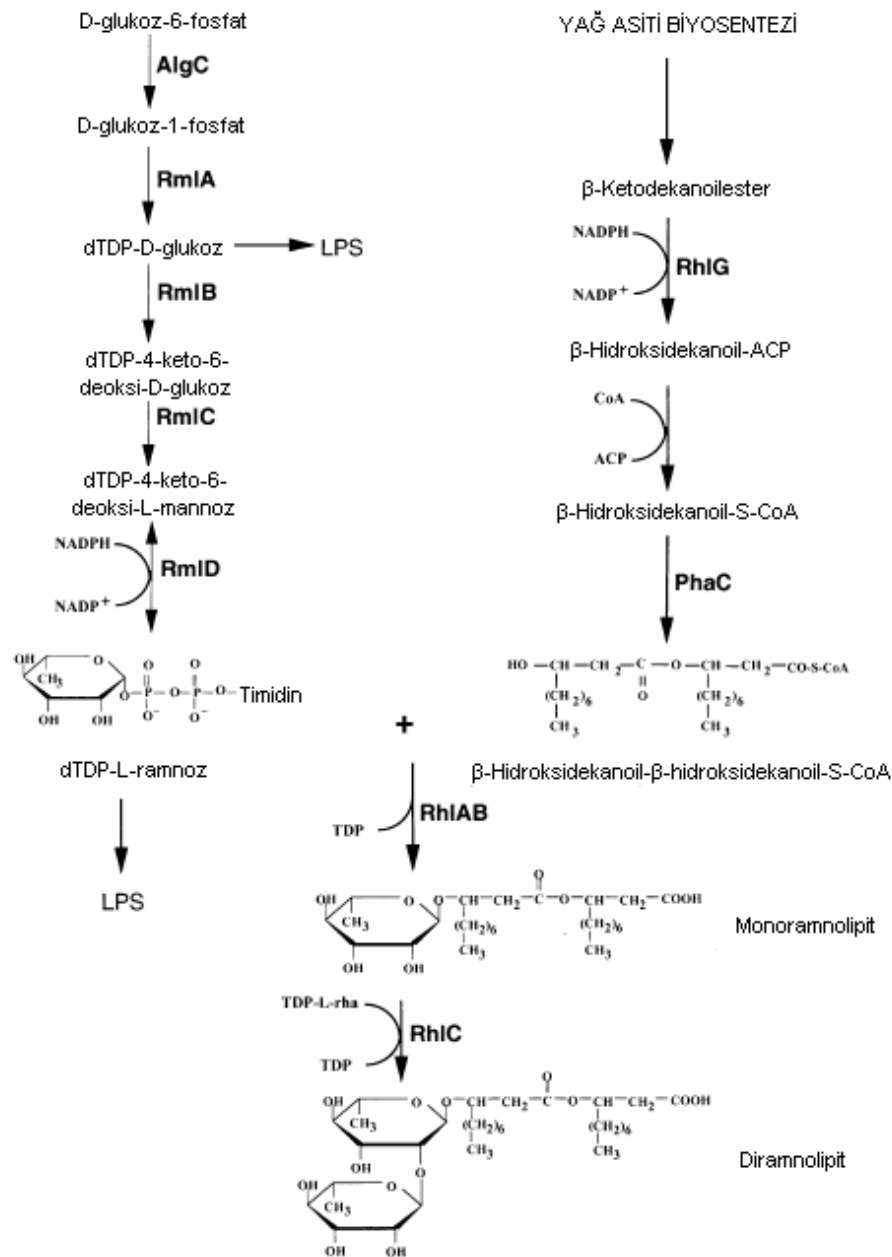
Rhamnolipitin 4 tipi vardır. Bunlardan tip I ve tip II ağır metal giderimi ve toprağın arındırılması için, tip III kağıt ve kağıt hamuru sanayinde, metal sanayinde, deri sanayinde ve yağlayıcı alanlarında kullanılmaktadır. Tip 4 ise genellikle tekstil sanayide, temizlik alanında, besin sanayi, boya sanayi, mürekkeplerde, kişisel bakım ürünlerinde, zirai uygulamalarda ve suyun işlenmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır [45].

Rhamnolipit biyosüpfektanları, hücre duvarının yapısında bulunduklarında hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırırken, hücre dışına salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özelliklerine sahip olan bileşiklerdir. Biyosüpfektan sentezinde hücre zarında veya sitoplazmada bulunan spesifik ramnozil transferaz enzimleri önemli rol oynarlar [46,47].

Bakterilerin hücre duvarındaki hidrofobik bileşiklerle ortamdaki hidrokarbonlu bileşiklere bağlanmaları arasında sıkı bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Zhang ve Miller (1995) ile Rahman ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmalarının sonuçlarına göre, hidrokarbonlu bileşiklerin rhamnolipitlerce tutulabileceğini ve tekrar kullanılabilirliğini belirtmişlerdir [44,48]. Petrol ve hidrokarbon biyolojik yıkımında önemli bir rol oynayan biyosüpfektanların, biyoremediasyon uygulamaları içinde potansiyel bir madde olduğu bildirilmiştir [9,40,49-54].

1.2.1.1. Ramnolipitlerin yapısı ve özellikleri

Glikolipit yapısındaki ramnolipit biyosürfektanları mikroorganizmaların büyüme ve durağan dönemlerinde üretilmekte ve hücreden kolaylıkla izole edilmektedir. dTDP (deoksi tiamin difosfat) şekerlerini aktifleştiren ekzoenzimler, merkezi metabolik yoldaki yağ asitleri tarafından sentezlenmektedir [37]. Şekil 1.4'te ramnolipitlerin biyosentez aşamaları gösterilmiştir [47].



Şekil 1.4. *P. aeruginosa*'da ramnolipitlerin biyosentezi [47]

Yapılan biyolojik parçalanma testlerinde ramnolipitlerin kolay ve çabuk parçalandığı belirtilmiştir. Ramnolipitlerin omurgasız canlılar üzerinde yapılan testlerde toksik etkisinin çok düşük olduğu gösterilmiştir [37].

Ramnolipit biyosüpfektanları düşük moleküler ağırlığa sahiptirler. Örneğin, *P. aeruginosa* BOP 100 kültürleri tarafından sentezlenen ramnolipit biyosüpfektanlarının moleköl ağırlığı pH 7,35' de 38 kD. ve pH 8,5' de 7 kD. olduğu bildirilmiştir [37].

Ramnolipitler;

- ✓ Düşük yüzey gerilimine,
- ✓ Yüksek emülsiyon aktivitesine,
- ✓ Düşük kritik misel konsantrasyonuna (KMK),
- ✓ Hidrofobik moleküllere karşı yüksek ilgiye sahip bileşiklerdir.

Bu özellikler kirlenmiş topraklarda kirleticilerin tutulmasında ve ortadan kaldırılmasında yararlı özellikler olarak sayılmaktadır [37].

P. aeruginosa tarafından üretilen ramnolipit biyosüpfektanının özelliklerinden bir diğeri ise, biyofilmlerin oluşturulmasında rol almasıdır. Ayrıca ramnolipitlerin, biyofilm oluşumunun yanında kültür ortamında başlangıç mikrokolonilerinin oluşturulmasında, yüzeyle ilişkili bakteriyel hareketlerin ve dolayısıyla mantar görünümlü şekillerin oluşturulmasında, mantar şekilli yapıların arasında boşluklarda koloni oluşumunu önlenmesinde ve oluşturulan biyofilmin yayılmasında rol oynadığı bildirilmiştir [37].

1.3. Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu

Atık maddeler, çevreye bırakıldıkları zaman bulundukları ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle veya organizmalarla sıkı bağlar kurmakta ve çevreye zarar vermektedir. Özellikle canlı yapısında birikerek toksik, kanserojenik veya mutajenik etki yapmaktadır [55].

Genel olarak Akdeniz ülkelerinde zeytinyağı fabrikası atık sularının (ZYFA) tarımsal endüstrinin en önemli kirleticilerinden biri olduğu bilinmektedir. Rakamsal olarak ifade etmek gerekirse, bu fabrikalar yılda ortalama olarak 2,5-3 milyon ton atık meydana getirirler. Zeytinyağı fabrikası atık suyu, zeytinyağı işleme prosesinde kullanılan su ve olgun zeytinlerin suda çözünen fraksiyonunu içeren siyah bir likördür. Bu atık su yüksek mineral içeriğine sahiptir ve kullanılan zeytinyağı ekstraksiyon işlemine bağlı olarak 25.000 - 100.000 mg/L kimyasal oksijen ihtiyacı (K.O.I.) gösterir [56].

Zeytinyağı fabrikası atık suyu polifenoller gibi toksik maddeler içerdiği gibi, şekerler, azotlu bileşikler, organik asitler ve atık yağ gibi ticari öneme sahip organik maddeler de içerir [57,58]. Bu nedenle günümüz fermantasyon teknolojisi içinde zeytinyağı fabrikası atık suyu önemli bir hammadde olma özelliğini sürdürmektedir. Özellikle, tek hücre proteini üretimi, pektik enzimlerin biyosentezi ve anaerobik koşullarda enerji eldesi gibi fermantasyon prosesleri bu teknolojinin en önemli uygulamalarıdır [59-61]. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun kimyasal bileşimi Çizelge 1.3’de gösterilmiştir [62].

Çizelge 1.3. Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyunun Kimyasal Bileşimi [62]

Nicelik	Değer	Nicelik	Değer
pH	5.0	Kül, mg/L	15,9
Renk, A ₃₉₅	51	Fe ⁺² , mg/L	100
KOİ, g/L	90	Mn ⁺² , mg/L	320
Toplam Şeker, g/L	41,4	Zn ⁺² , mg/L	60
Şeker Azaltılması, g/L	28,9	NO ₃ ⁻ , mg/L	1330
Toplam Katı Madde, g/L	64,6	NH ₄ ⁺ , mg/L	6,0
Askıda Katı Madde, g/L	7,2	Cl ⁻ , mmol/L	88
Uçucu Katı Madde, g/L	48,7	PO ₄ ⁻³ , mg/L	1430

Zeytin yetiştiriciliği ve zeytinyağı üretimi açısından önde gelen Akdeniz ülkelerinden olan İspanya’da karasuyun (zeytinyağı fabrikası sıvı atığının) gübre, kompost ve toprak ıslah edici olarak kullanıldığı biriket yapımı ve yakacak olarak değerlendirilmesi, biyolojik olarak metan gazı elde edilmek suretiyle biyogaz olarak kullanılışı araştırılmış ve çalışma sonucunda tam ekonomik analizi yapılamamakla beraber karasuyun yukarıda belirtilen çeşitli alanlarda kullanılabileceği 1984 yılında yapılan bir araştırma da ortaya konulmuştur. Yine, karasuyun çok yüksek miktarda kimyasal ve biyokimyasal oksijen ihtiyacı göstermesi nedeniyle kirletici potansiyele sahip olduğunu 1986’da İspanya’da yapılan bir çalışmada belirlenmiştir [63].

1.4. Peyniraltı Suyu Atığı

Peyniraltı suyu (PAS), süt endüstrisinin en önemli yan ürünüdür. PAS, kazeini çöktürülmüş sütün sıvı kısmı olarak tanımlanabilmekle beraber, aslında peynir yapımı sırasında elde edilen bir yan üründür [64]. İngilizce terminolojide ‘whey’ olarak adlandırılan bu ürünün dilimizdeki karşılığı ‘süt serumu’ veya ‘peynir altı suyu’dur. PAS’nun liyofilize edilerek toz haline getirilmiş şekli (peynir altı suyu tozu-PAST) gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [65].

PAS'nun atılması veya değerlendirilmesi uzun yıllardan beri bütün dünyada süt endüstrisinin karşı karşıya olduğu hemen hemen en önemli problemlerden biridir. Herhangi bir işlem görmeden çevreye atılan PAS, çok yüksek oranlarda organik madde içeriği nedeniyle evre kirliliğine neden olduğu gibi, içerdiği yüksek değerli besin unsurlarının da kaybına yol açmaktadır. Eskiden sadece hayvan yemi veya gübre olarak sıvı halde değerlendirilebilen PAS, günümüzde çeşitli amaçlara yönelik olarak birçok alanda değerlendirilebilmektedir [66]. Peynir altı suyundan ekmekçilikte, pastacılıkta, bisküvi, çikolata, şekerleme ürünlerinde, ilaç sanayiinde, çeşitli meşrubat ve meyve sularında, kimya endüstrisinde, peynir, yoğurt ve dondurma yapımında yaygın olarak yararlanılmaktadır [67].

Son yirmi yıl içerisinde PAS'nun kullanım alanında uluslararası düzeyde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Eskiden, PAS'nun sadece sıvı halde kullanımı veya kk aile işletmelerinde sadece geleneksel yöntemlerle değerlendirilmesi söz konusu iken; gelişen teknolojik imkanlar sayesinde, kurutma, konsantre etme veya fermentasyon gibi işlemlerle PAS bileşenlerinin her birinin tek tek izole edilmesi, değişik alan ve amaçlarla kullanılabilir olması onun önemini daha da artırmıştır [68-74].

Peynir altı suyu, peynir üretiminde bir yan ürün olarak ortaya ıkısa da peynir altı suyunun besin değeri çok yüksektir. Peynir altı suyunun % 92-94’ sudur. Bunun yanı sıra kuru madde de % 70-75 oranında laktoz, % 11-13 oranında azotlu maddeler ve % 7-12 kadar da mineral maddeler yer almaktadır [75,76]. Çizelge 1.4’te PAS’nun içeriği verilmiştir [77].

Çizelge 1.4. Peyniraltı suyunun içeriği [77]

Parametreler	Değerler/Birim
pH	5.4
KOİ	47.02 mg/L
Askıda Katı Madde	5748 mg/L
Kalsiyum	429,56 mg/kg
Potasyum	986,08 mg/kg
Magnezyum	39,23 mg/kg
Sodyum	431,53 mg/kg
Alüminyum	1,0037 mg/kg

1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

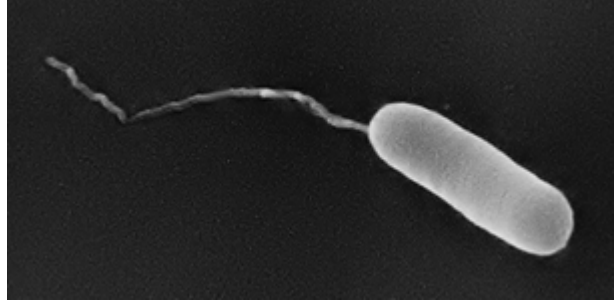
1.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Tarihçesi

P. aeruginosa, ilk kez 1850'de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. İlk olarak *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Ancak bu organizma, Gessard'ın klasik çalışmaları ile 1882'de saf kültür halinde izole edilmiştir. 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında California Üniversitesi'ndeki Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. 1966'da Buchanon, Holt ve Lessel *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine göre sınıflamışlardır. Daha sonra DNA hibridizasyon çalışmaları başlamıştır. 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları, nükleik asit hibridizasyon çalışmalarını genişleterek *Pseudomonas*'ları rRNA homolojilerine göre 5 gruba ayırmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu cinsin sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir [78].

1.5.2. Morfolojik özellikleri

Uzunlukları çok değişik olmakla beraber *P. aeruginosa* 1,5-3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde aerob bakteridir (Şekil 1.5). Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Kolay boyanırlar ve Gram-negatifler. Uzun süre beklemiş

kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları ile R (kenarları pürüzlü hücre kolonileri) tipinde üreyenlerin bulunduğu bildirilmiştir [79-81].



Şekil 1.5. *P. aeruginosa* bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü [82].

1.5.3. Kültürel ve biyokimyasal özellikleri

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alırlar. *Pseudomonas* cinsi bakterilerinin çoğu doğada, toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazıları bitkiler, hayvanlar ve insanlar için hastalık yapıcıdır. Katalaz ve oksidaz pozitif ve şekerleri oksidasyon yoluyla parçalayan fakat fermantasyon yapmayan bakterilerdir [83].

Doğada yaygın olarak bulunabilen bir bakteri olduğu için, organik maddeler içinde, sularda uzun süre canlı kalabilirler. Ayrıca insan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunur. Yüksek ısı ve kuruluğa dirençsizdirler [83].

P. aeruginosa uygun besiyerinde optimum 30-37 °C'lerde ve hafif alkali ortamlarda gelişir. 41 °C'de üreyebilme yeteneği *P. aeruginosa* için önemli bir özellik olup arka arkaya 3 pasajda 42 °C'de üreyebilmesi *P. fluorescens* 'den ayırt edici bir özelliğidir. Aerob olmakla beraber denitrifikasyon özelliğinde olduğundan anaerob üreyen türlerine de rastlanabilir. Sıvı besiyerinde yüzeyde zar yapmak üzere yoğun ve homojen bir üreme gösterirler ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti ayırt edilir. Uzun süre beklemiş kültür ortamları zamanla alkali duruma geldiğinden bakteriler litik fermentlerle erir ve sıvı besiyerini berraklaştırır. Peptonlu suda aynı şekilde ürerler.

P. aeruginosa 'nın bazı biyokimyasal özellikleri şöyledir;

- Kanlı agarda hemoliz yaparlar. Kanlı agarda üreyen klinik izolatlar sıklıkla beta hemolitiklerdir.
- Jelatin ve koagüle plazmayı eriterek parçalarlar.
- Glikozu oksidatif yolla parçalayıp asit yaparlar (glukonat yapar). Laktozu kullanamazlar.

- Oksidaz pozitif olmaları ile *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar.
- Asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar.
- Nişastaya etki etmezler.
- Katalaz ve sitrat reksiyonları pozitifdir.
- L-arjinin dihidrolaz oluştururken, lisin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar.
- İndol ve H₂S oluşturmazlar.
- Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer negatifdir.
- Nitratı nitrite redükte ederler.
- Tetrazolium tuzlarını ve seleniti redükte ederler.
- KCN'ye dirençlidirler.
- *P. aeruginosa*, metilen mavisinin ve prontosilin rengini giderir [78-81,83-85].

1.5.4. Çeşitli Ajanlara Karşı Dirençlilik

Pseudomonas 'lar ısıya dirençsiz bakterilerdir. 55 °C'de 1 saat ve 60 °C'de 15 dakikada ölürler. Çevre sıcaklığı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Steril saf su içinde bile oda sıcaklığında üreyebilirler. Diğer patojenlere göre kimyasal dezenfektanlara daha dirençlidirler. Uygun nem koşulları temin edildiği zaman çeşitli ortam koşullarında üreyebilirler [78,86].

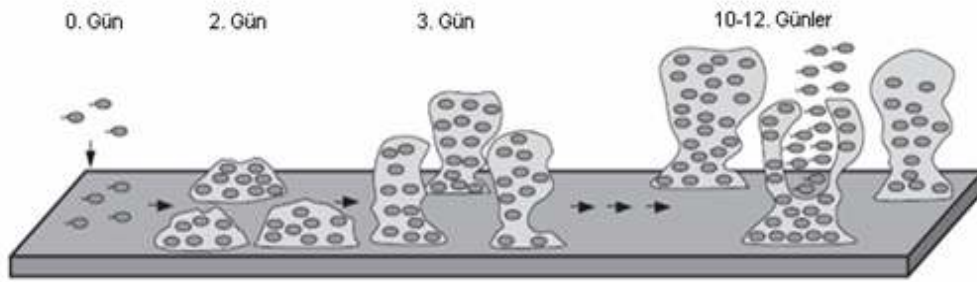
1.6. Bakterilerde Yeterli Çoğunluk Algılaması

Son zamanlara kadar bakterilerin ayrı ayrı yaşayan ve sosyal davranışlar göstermeyen asosyal canlılar oldukları biliniyordu. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ile, bakterilerde bazı iletişim sistemleri bulunduğunu ve bu sayede çevreleri ile iletişim kurdukları gösterilmiştir. Yeterli Çoğunluk Algılaması adı verilen bakterilerdeki iletişim sistemlerinin, bakterilerin hücre yoğunluğuna bağlı toplu bir davranış biçimi olduğu belirlenmiştir [87-90].

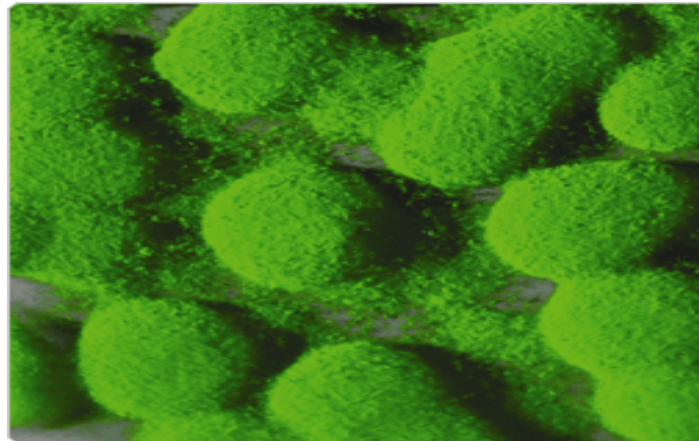
Gram-negatif bakterilerde görülen Yeterli Çoğunluk Algılaması sistemlerinin: biyoluminesens, biyofilm oluşumu, virülens, antibiyotik üretimi, ekzoenzim salgılanması, hareketlilik, bazı pigmentlerin üretimi, nodül oluşumu vb. davranış biçimlerini belirlemede rol oynadığı belirlenmiştir [90-94].

Biyosürefektan üretimi, molekül sinyallerinin ya da atık maddelerin birikimi ve bir veya birçok metabolik substratın azalmasıyla düzenlenebilir. RhlAB genleri hücre yoğunluğuna bağlı yeterli çoğunluk algılanması tarafından düzenlenir. Üretimin düzeyini açil-homoserin lakton molekülünün konsantrasyonu belirler. Bu ya da diğer sinyaller, biyofilm yapısının merkezinde birikebilir. Besin eksikliği gibi başlıca hayati tehdit durumunda, bu özellik yoğun bakteri popülasyonlarının sabitlenmesinde büyük avantaj sağlamaktadır (Şekil 1.6) [95].

Doğada yerleşmiş bir olgu olarak bakteriler, öncelikle biyofilm adı verilen yüzeyde yerleşik olarak bulunurlar. Bu yapı formu, yüzeye hücrelerin sıralı olarak olgun biyofilme eklenmesi ile oluşur ve bakterilerin ortama yayılmasına kadar devam eder. Gelişimi boyunca *P. aeruginosa* organik bir bileşik olan cis-2-dekonoik asit üretir. Bu bileşik sabitlenmiş biyofilmden bakterilerin ortama dağılmasını teşvik ederek biyofilm gelişimini durdurur [96]. Şekil 1.7’de *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmin mikroskopik görünümü verilmiştir.



Şekil 1.6. *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm şeması [95]



Şekil 1.7. *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmin mikroskopik görünümü [97]

Biyofilm bakteriyi fagositozdan koruduğu ve biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli oldukları için, biyofilm üretimi bakterinin konaktaki srekliinde kritik rol oynar [98].

1.7. Bakteriyel (*Vitreoscilla*) Hemoglobin (VHb)

Bakteri Hemoglobini (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 1986 yılında Dr. Webster tarafından keşfedilmiştir. *Vitreoscilla*, zorunlu aerob fakat oksijence fakir ortamlarda yaşıyan, flamentöz, Gram-negatif bir bakteridir ve *Beggiatoa* familya mensuplarına benzerliğinden dolayı da başlangıçta bu familya içine yerleştirilmiştir. Daha sonraki alışmalar, *Vitreoscilla*'nın mor-fotosentetik bakteri grubunun bir alt grubuna ait olduğunu göstermiştir. Bu bakteriler, hipoksik koşullarda oksijen bağlayıcı protein olan hemoglobini sentezlemekte ve sentezlenen bu protein de CO fark spektrasıyla 419 nm'de pik vermektedir. Bakteri hemoglobini oksijenin sınırlı olduğu durumlarda hücrelerin oksijen açığını ortadan kaldırmaktadır. Hipoksik koşullara cevap olarak üretilmiş olan ve her bir monomeri 146 amino asitten meydana gelen dimerik yapıdaki bu proteinin yapısında iki protohem IX vardır ve ortalama molekl ağırlığı 15.775' dir. Diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında kayda değer bir benzerlik göstermektedir (rneğın kök hemoglobiniyle % 24; *B. subtilis* flavo hemoglobiliniyle % 56). VHb muhtemelen evrimsel olarak yüksek organizasyonla canlılardaki hemoglobinlerle ortak bir atadan gelmesine rağmen bunu kabul ya da reddetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [99].

Hemoglobinin evrimi hakkında iki Őey söylenebilir; ya anaerobik organizma kendisi için hassasiyet temsil eden durumlarda oksijene duyarlı hücre komponentlerini korumak için bir korunma mekanizması geliştirmiştir ya da hücrel hemoglobin konsantrasyonunun yüksek olması veya daha düşük oksijen basıncına maruz kalması sonucu bundan kurtulmak için etkili bir mekanizma geliştirmiştir [99].

Organizma oksijeni tutarak, depo ederek ve oksijenin kısıtlı olduğu ortamlarda da hücreye oksijen sağlayarak hayatsal faaliyetlerini devam ettireceğinden ikinci ihtimalin olması çok daha yüksektir. Son yıllarda yapılan kök hemoglobinlerin yapısal analizi, bitki ve hayvan hemoglobinlerinin ortak bir orjinden köken aldığını göstermektedir. Vertebrate hemoglobininin alfa zincirinin bir miyoglobin geninin duplikasyonundan türediği genel olarak kabul edilmektedir. *Vitreoscilla* hemoglobininde de 146 amino asit vardır. Bu, 153 amino asit taşıyan sarı acı bakla

(*Lupinus luteus*) kök hemoglobiniyle karşılaştırıldığında 35 amino asidin yerleri aynıdır. Yani % 24 benzerlik ihtiva etmektedir. *B. subtilis*'in flavohemoglobini ve mayanın buna benzer proteinleri de *Vitreoscilla* hemoglobiniyle % 56 benzerlik göstermektedir [99].

Diğer taraftan yine *Vitreoscilla* hemoglobini fil hemoglobiniyle karşılaştırıldığında her ikisinin de E7 pozisyonunda Glutamin (Gln) ve B10 pozisyonunda ise aromatik amino asit taşıdığı belirlenmiştir. B10 pozisyonundaki bu aromatik amino asit; *Vitreoscilla* hemoglobininde tirozin (Tyr), fil hemoglobininde ise fenilalanin (Phe) dir. Başlangıçta E7 pozisyonundaki Gln'nin proteine olağan dışı bir kinetik özellik kazandırdığı düşünülmüş fakat kristalleştirme çalışması bu amino asidin oksijen bağlanması için elverişli olmadığını ortaya koymuştur. Bu *Vitreoscilla* hemoglobini üzerinde yapılan mutasyonla doğrulanmıştır. Evrimsel süreç içerisinde hücreler kendi yaşamları için gerekli olan proteinleri günümüze kadar taşımışlar ve böylece yaşamlarının devamını sağlamışlardır. Oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda yaşayan (su birikintileri gibi) *Vitreoscilla*, belki de günümüze kadar oksijen bağlayan bir protein olarak sentezlediği hemoglobin molekülüne ulaşmıştır [99].

Evrimsel süresince bütün hemoglobinlerde, hem demirine bağlı proksimal histidin (F8) muhafaza edilirken (VHb dahil) çoğu hemoglobinlerde distal histidin (E7) de muhafaza edilmiştir. VHb proteini iki benzer alt ünitelerden oluşan bir hem proteindir. Oksijen asosiasyonu için hız sabitesi, at miyoglobininin kısmen daha büyükken oksijen disasosiasyon sabitesi ise 500 kat daha büyüktür. Buradan *Vitreoscilla* hemoglobininin diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında bağlı oksijeni çok daha kolay serbest bıraktığı anlaşılmaktadır [99].

Diğer hemoglobine göre VHb, oksijene karşı düşük affiniteye sahiptir. VHb diğer birçok globinin ayrışma sabitesinden daha büyüktür. Böylece oksijenin VHb'den ayrışma sabitesi oldukça yüksek olup bu durumun önemi oksijenin hızlı salıverilmesinin bir gereklilik olduğu hipoksik şartlarda ortaya çıkmaktadır. Bir hipoteze göre VHb'nin bulunduğu hücreler çevrelerine göre daha oksijene formda bulunurlar [100].

Vitreoscilla hemoglobin geninin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan birçok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb'nin hem solunumu hem de büyümeyi artırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren biyoremediasyondan rekombinant protein üretimine

kadar bütün biyoproseslerde, uygulama alanı bulmaktadır. “VHb teknolojisi”nin kullanılması ile toksik aromatik bileşiklerin mikrobiyal oksidatif yıkımlarının arttığı rapor edilmiştir [100].

Yapılan bazı çalışmalarda VHb’nin *Pseudomonas*’larda biyoremediasyonu arttırmada önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi de yabancı türlere oranla VHb aktarılan türlerin daha yüksek oksijen alımına sebep olmasıdır [100].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Her ne kadar bazı özellikleriyle insanoğlu için faydalı olsa da karşılaştığımız birçok çevresel sorunun, çeşitli hastalık ve ölümcül durumların kaynağı da yine bakterilerdir. Dolayısıyla, bilimsel çalışmalar, bu canlıların yararlı özelliklerini arttırmaya, zararlı özelliklerini engellenmeye yönelik araştırmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Çeşitli maya, fungus ve bakteri türleri tarafından üretilen biyosüpfektanlar da gıda, kozmetik, eczacılık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojileri gibi alanlarda kullanılarak faydalı hale getirilmektedir.

Mikrobiyal yollarla üretilen biyosüpfektanların en çok çalışılan ve en iyi bilineni, *P. aeruginosa* tarafından üretilen ve ramnolipit adı verilen yüzey aktif bileşiklerdir [36,46].

Ramnolipitler; özellikle makine sanayi, çevre teknolojisi, petrol endüstrisi, tarım, tıp ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır [37].

Yapılan biyolojik parçalanma testlerinde, ramnolipitlerin kolay ve çabuk parçalandığı belirtilmiştir. Ramnolipitlerin omurgasız canlılara toksik etkisinin çok düşük olduğu gösterilmiştir [37].

Ramnolipit biyosüpfektanların, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirletici maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşikler olduğu belirtilmektedir [43]. Ayrıca organik bileşiklerle kirlenmiş topraklarda, ramnolipit biyosüpfektanların eklenmesinin biyolojik parçalanmayı artırması ile ilgili de çalışmalar bulunmaktadır [20,44].

Atık maddeler çevreye bırakıldıkları zaman bulundukları ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle ve organizmalarla sıkı bağlar kurmakta ve çevreye zarar vermektedirler. Özellikle canlı yapısında birikerek toksik, kanserojenik veya mutajenik etki yapmaktadır [55]. Atıkları substrat olarak kullanmamız hem maliyeti düşürmemizi ve hem de atıkların çevreye olan kirlilik yüklerinin azaltılmasını sağlar.

Mercada ve arkadaşları (1993) tarafından yapılan çalışmalarda; zeytinyağı fabrikası atık suyunda *Pseudomonas sp* JAMM'nın ramnolipit sentezlediğini ve zeytinyağı fabrikası atık suyunun ramnolipit üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [56].

Dubey ve Juwarkar (2001), yağlardan izole ettikleri *P. aeruginosa* BS2 kültürlerinin, sentetik ortamda 0,97 g/L ramnolipit ürettiğini, peynir altı suyunda ise

0,92 g/L ramnolipit ürettiğini ve peynir altı suyunun ramnolipit üretiminde uygun bir substrat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [101].

Abolos ve arkadaşları (2001); *P. aeruginosa* AT110 kültürleri ile soya yağı atığı ortamında 96 saatte 9,5 g/L ramnolipit elde edildiğini ve soya yağı atığının ramnolipit üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [29].

Patel ve Desai (1997) tarafından yapılan çalışmada, şeker fabrikası atık maddesi olan melas besi ortamında çoğalabilen *P. aeruginosa* GS3 kültürlerinden 0,24 g/L ramnolipit biyosüpfektanı elde edildiğini bildirmişlerdir [40].

Farklı karbon kaynaklarının ramnolipit sentezi üzerine etkili olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur. Robert ve arkadaşları (1989) tarafından yapılan çalışmalarda; gliserol, glikoz, mannitol ve etanol gibi karbon kaynaklarının *Pseudomonas* sp. tarafından biyosüpfektan üretiminde kullanılabildiğini belirtmişlerdir. Ancak, n-alkanlar ve zeytinyağı gibi bileşiklerin ise, biyosüpfektan üretiminde ikinci derece önemle, bakteri tarafından kullanıldığını bildirmişlerdir. Sylatk ve arkadaşlarının (1985a) yaptığı çalışmada, *Pseudomonas* sp. tarafından üretilen biyosüpfektan üzerine, glükolipitlerdeki yağ asidi zincir uzunluğunun etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Diğer taraftan, Neidleman ve Geigert (1984), *Acinetobacter* sp. glikoz bulunan ortamda yetişirken ortama heksadekan katılmasıyla biyosüpfektan veriminde önemli bir artış olduğu, heksadekanın biyosüpfektan salınımını kolaylaştırdığını tespit etmişlerdir. Banat ve arkadaşları (1991 ve 1995), karbon kaynaklarına hücreler kolayca ulaştıkları zaman biyosüpfektan üretiminin az olduğunu gözlemlediler. Sadece bütün karbon kaynakları tükendiğinde ve suda çözünmeyen hidrokarbon kullanılabılır olduğunda, biyosüpfektan üretiminin tetiklendiğini belirtmişlerdir. Biyosüpfektan üretiminde ulaşılabilir karbon kaynağı ve özellikle kullanılan karbonhidrat büyük rol oynar [102].

Yapılan çalışmada bazı petrol hidrokarbanlarını (benzin, BTX ve benzen) kullanabilen *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saat) en yüksek ramnolipit üretiminin benzinde *P. putida* B15 (52 mg/L), benzende *P. fluorescens* B5 (1,5 mg/L), BTX' de *P. aeruginosa* B3 (0,5 mg/L) suşları tarafından ve 72. saatte gerçekleştiği (bakteriyal gelişimin durgun fazında) tespit edilmiştir. Tuleva ve ark. (2002) da, *P. putida* 21BN suşunun heksadekanda geliştiğinde, ikincil bir metabolit olan biyosüpfektanları durgun fazda maksimum üretime ulaştığını (1,2 g/L) bildirmişlerdir [103].

Yapılan bir çalışmada 2,4-D herbisitini kullanabilen *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saat) en yüksek ramnolipit biyosüpfektan üretimi *P. aeruginosa* B1 (45 mg/L) suşu tarafından 72. saatte olduğu tespit edilmiştir.

Bu suşun 2,4-D herbisitindeki bakteri üremesi ve biyosüpfektan sentezi paralellik göstermektedir [104].

Pseudomonas spp. suşlarının biyosüpfektan (ramnolipit) üretimi üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipit sentezinin ikincil metabolizma ile ilişkili olduğunu ve ikincil metabolitlerin sentezinin üremenin durgunluk fazına erişmesi ile arttığını göstermektedir. Ramnolipit eldesi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra, yüksek ramnolipit sentezine üretimin 24, 90 ve 120 saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır [56,105-107].

Diğer bir çalışmada, suşların kültür ortamlarında damla çapları ölçülerek ramnolipit üretim zamanının belirlenmesi sırasında bu suşların durgunluk fazına girmeden önce ramnolipit üretmeye başladığı ve ramnolipit üretimine paralel olarak yüzey geriliminin de düştüğü belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada düşük sıcaklıklarda her iki suş tarafından üretilen ramnolipitin, BMSM besiortamında, 5 °C’de suyun yüzey gerilimi nispeten yüksek iken, sıcaklık artışı ile birlikte aynı su-ramnolipit karışımının yüzey geriliminin düştüğü görülmüştür. pH değişiminin yüzey gerilimine etkisi incelendiğinde ise asidik pH değerlerinin yüzey gerilimini arttırdığı, bazik pH değerlerinin ise yüzey gerilimini belirgin bir şekilde etkilemediği tespit edilmiştir. Ramnolipitlerin ekstraksiyonunda da asidifikasyon aşaması bulunmaktadır. Dolayısıyla, ramolipitlerin asidik pH değerinde etkinliklerinin düşük olmasının normal olduğu düşünülmektedir [37].

Raza ve ark. (2006), farklı hidrokarbon içeren ortamlarda *P. aeruginosa* EBN-8 mutantının biyosüpfektan üretimini araştırmışlardır. Bu amaçla minimal besiyeri içine karbon kaynağı olarak n-hekzan, parfin yağı ve kerosen yağı ilave etmişlerdir. 37 °C’ de 100 rpm’ de 10 gün boyunca 24 saatte bir örnekler almışlardır. Bu mutantın, n-hekzadekan ve parafin yağında geliştiği zaman inkübasyonun 3. ve 4. gününden sonra maksimum ramnolipit ürettiğini, n-hekzadekan ve parafin yağında ramnolipit üretiminin ise sırasıyla 4,1 g/L ve 6,3 g/L olduğunu tespit etmişlerdir [104].

Guerra Santos ve ark (1986) tarafından yapılan çalışmalarda; besi ortamında çok az miktarda Mg, Ca, K, Na, Fe iyonları ve iz elementleri bulunduğunda, *P.aeruginosa* DSM 2659’nın sentezlediği ramnolipit miktarının arttığı bildirilmiştir [40].

Haba ve arkadaşları (2000), *P. aeruginosa* 47 T2 NCBIM 40044 kültürleri tarafından sentezlenen ramnolipit biyosüpfektanlarının antimikrobiyal etkisi üzerine yaptığı çalışmalarda; ramnolipitlerin en fazla antimikrobiyal etkiyi *Klebsilla pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Serratia marcescens* gibi gram-negatif bakterilerde gösterdiğini, *Micrococcucs luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis gibi gram-pozitif bakterilerde ve *Fusarium solani* ve *Glicadium virens* gibi funguslara çok az etki gösterdiğini, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalarda ise her hangi bir antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir [108].

Bizim yaptığımız çalışmada doğal ve sentetik ortamlarda *P. aeruginosa* ve rekombinantı kullanılarak, VHb/vgb sisteminin ramnolipit üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu sistemin ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve yaşlı hücrelerin daha iyi solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlaması, bu amaç için önemli bir avantajdır. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız karbon kaynakları değişik konsantrasyonlarda (% 0,1 ve % 1) kullanılarak biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada doğal ve sentetik ortamlarda Pa ve PaJC'ın ürettiği ramnolipit üretim miktarları karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

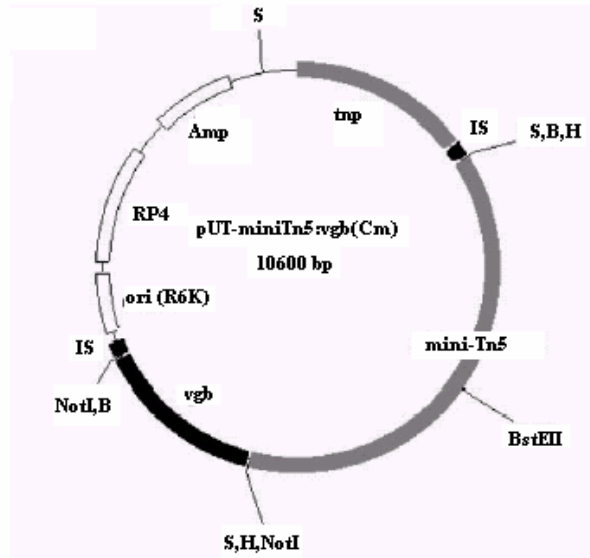
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflık derecesinde olup; K_2HPO_4 , $NaNO_3$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaHCO_3$, H_2SO_4 , HCl (% 37 lik 2 N) ve fenol Carlo Erba şirketinden; Na_2HPO_4 ve $FeSO_4$ Merck şirketinden; $CaCl_2$, $NaCl$, glikoz, süktroz, gliserol ve agar Sigma şirketinden; etil asetat Labkim şirketinden; pepton ve maya özütü Mast Group şirketinden temin edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada kullanılan bakteriler

Çalışmada, *P. aeruginosa* ATCC 10145 (NRRL B- 771) ve kromozomuna homolog rekombinasyon ile tek kopya halinde *vgb* entegre edilmiş rekombinant *P. aeruginosa* (Şekil 3.1) kullanılmıştır [109].

Bu bakterilerin devamlılığını sağlamak için, *P. aeruginosa* ve PaJC ana stok olarak $-20\text{ }^{\circ}C$ 'de gliserolde saklanmıştır. Araştırmalarımız için kullandığımız *P. aeruginosa*, her 20 günde bir LB plaklarına öze ile pasaj yapılarak gece boyu üretilmiş ve ertesi gün parafilmle etrafı sarılıp $4\text{ }^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Deneyler esnasında bu stoklar kullanılmıştır.



Şekil 3.1. pUT- miniTn5:vgb-Cm transpozaz sistemi [109]

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kültür Ortamları

3.1.3.1. LB (Luria-Bertani) kültür ortamı

Bakteriler için zengin bir besiyeri olan LB besi ortamının hazırlanmasında 1 litre için; 10 gr pepton, 10 gr NaCl ve 5 gr maya özütü kullanılmıştır. Stoklar, pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra 150 ml'lik erlenlere 50 ml eklenerek, otoklavda (121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dakika) steril edilmiştir.

3.1.3.2. Minimal (MM) ortam

Bakteriler için besinsel açıdan fakir minimal ortamın hazırlanmasında 1 litre için; 0,7 gr K_2HPO_4 , 0,9 gr Na_2HPO_4 , 0,1 gr $CaCl_2$, 0,001 gr $FeSO_4$, 2 gr $NaNO_3$ ve 0,4 gr $MgSO_4.7H_2O$ kullanılmıştır. pH 7.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 150 ml'lik erlenlere 50 ml konulduktan sonra otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3.3. Zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA)

Balıkesir mevkiinde bir zeytinyağı fabrikasından alınan atık suyunun çalışmada kullanıma hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar sonucunda; 1 litre için; 300 ml atık su (kaba partikülleri ayrıştırmak için süzgeçten geçirilmiştir) 700 ml distile su ile sulandırılarak çalışma yapılmıştır. Daha sonra bu karışımın pH'sı 7.0'ye ayarlanarak 150 ml'lik erlenlere 50 ml bu karışım eklendikten sonra yukarıda verildiği şekilde otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3.4. Peyniraltı suyu (PAS)

Malatya mevkiinde bir süt fabrikasından alınan peyniraltı suyu çalışmamızda kullanılmıştır. Peyniraltı suyunun çalışmada kullanıma hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar sonucunda; 1 litre için; 500 ml atık su (kaba partikülleri ayrıştırmak için süzgeçten geçirilmiştir) 500 ml steril distile su ile sulandırılarak çalışma yapılmıştır. Daha sonra bu karışımın pH'sı 7.0'ye ayarlanarak 150 ml'lik erlenlere 50 ml bu karışım eklendikten sonra yukarıda verildiği şekilde otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada kullanılan karbon kaynakları

Minimal ortamlarda stok karbon kaynağı olarak glikoz, sükroz ve gliserol kullanılmıştır. Steril koşullar altında daha önce hazırlanmış olan minimal besi ortamına stok karbon kaynaklarından % 0,1 ve % 1 lik olacak şekilde ekleme yapılmıştır.

3.2. Yöntem

Öze ile tek koloniden alınan hücreler; 20 ml LB besi ortamı içeren 100 ml'lik erlenlere konulmuştur. Yüksek çalkalama için 200 rpm ve düşük çalkalama için 100 rpm tercih edilirken, sıcaklık olarak 30 °C ve 37 °C kullanılmıştır. Yaklaşık 17 saat sonra gece kültürü erlenlerinden alınan 250 µl kültürün, 50 ml/150 ml bulunan erlenlere ekimi yapılmıştır. 24 saat aralıkla 96. saate kadar deneyler sürdürülmüştür. Kültür ortamı olarak yukarıda özellikleri verilen MM, ZYFA ve PAS kullanılmıştır.

3.2.1. Ramnolipit Ekstraksiyonu

Üretilen kültürlerden 3 ml alınıp 10.000 rpm 10 dk ve 4 °C santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni tüplere alındı. 2 N HCl ile pH 7.0 ye ayarlandı. Üzerlerine 2 kat etil asetat eklendi. Vortex yapıldı. Tüpteki solvent buharlaştırıldı. Tüpe 1 ml 0,05 M NaHCO₃ eklendi [40,110]. Vortexlendi. Buradan alınan örneklerle fenol sülfürik asit yöntemi uygulandı [111]. Bu yönteme göre; bir tanesi kontrol tüpü olmak üzere 25 adet cam tüp kullanıldı. Cam tüplere 250 µl örnek ve 250 µl fenol eklenip vortekslendi. Üzerine 1,25 ml H₂SO₄ eklenip vortekslendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk beklendikten sonra 490 nm'de absorbansları köre karşı okundu (SHIMADZU UV-1201V Spektrofotometre ile absorbans okumaları yapılmıştır).

3.2.2. Ramnolipit Miktarının Belirlenmesi

Ramnoz miktarı ramnoz standardı kullanılarak, kolorimetrik metot ile ölçümü yapıldı. Ramnolipit içeriği, ramnoz konsantrasyonunun 3 ile (monoramnolipit (1 ramnoz şeker içeren) ya da diramnolipit (2 ramnoz şeker içeren) ayrımının yapılamamasından dolayı toplam ramnoz şeker sayısı (3) hesaplamada baz alınmıştır) çarpılmasıyla hesaplandı [37]. Bu faktör, ramnozun kalibrasyon eğrisi kullanılarak

hesaplanmıştır (ramnolipit/ramnoz) [112,113]. Ramnoz miktarı, süpernatant içinde mg/L olarak fenol sülfürik asit metodu ile saptandı [114].

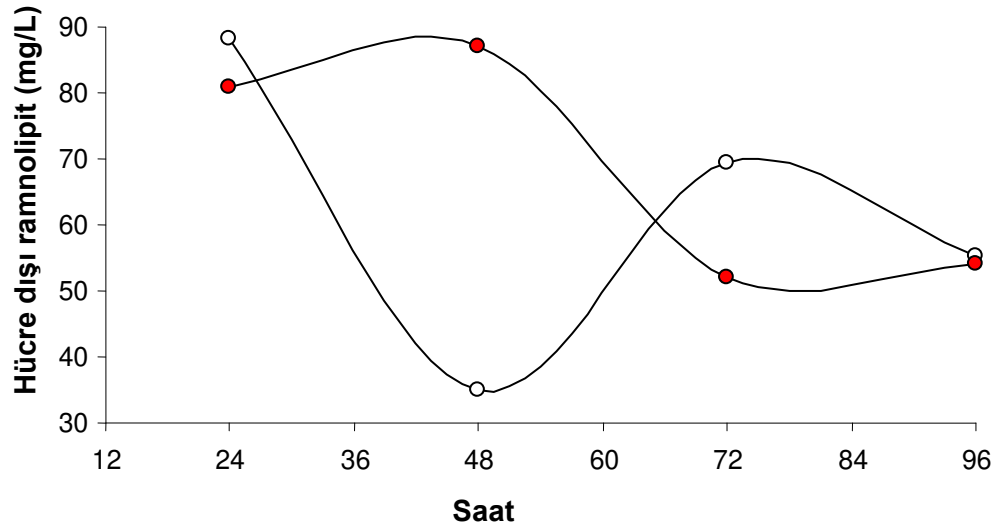
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Pa ve PaJC'nın Farklı Miktarlarda Glikoz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi

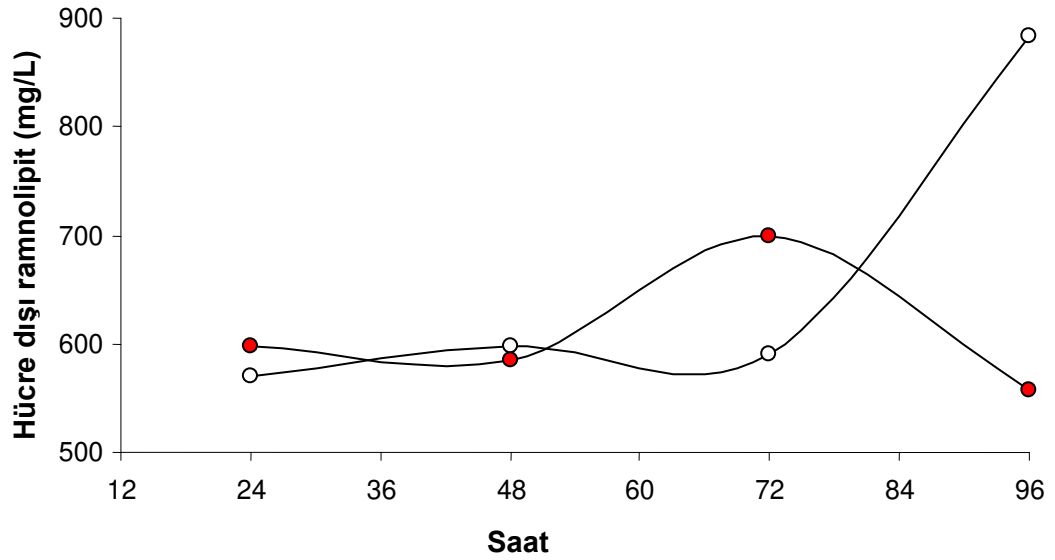
4.1.1. 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 glikoz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 glikoz bulunan minimal besi ortamında; Pa 24. saatte 88,29 mg/L ile en yüksek değerinde iken, 48. saatte 34,96 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 48. saatte 87,18 mg/L ile en yüksek değerde iken, 72. saatte 51,96 mg/L ile en düşük değeredir. PaJC sadece 48. saatte Pa'dan 2,49 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.1 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 glikoz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa, 24. saatte 569,56 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, özellikle 72. saatten sonra bir artış göstererek 96. saatte 882,89 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 72. saatte 698,44 mg/L ile en yüksek ve 96. saatte 557,33 mg/L ile en düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Böylece 72. saatte PaJC, Pa'dan 1,18 kat avantajlı durumdayken, Pa 96. saatte PaJC dan 1,58 kat daha avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.1 b).

(a)



(b)

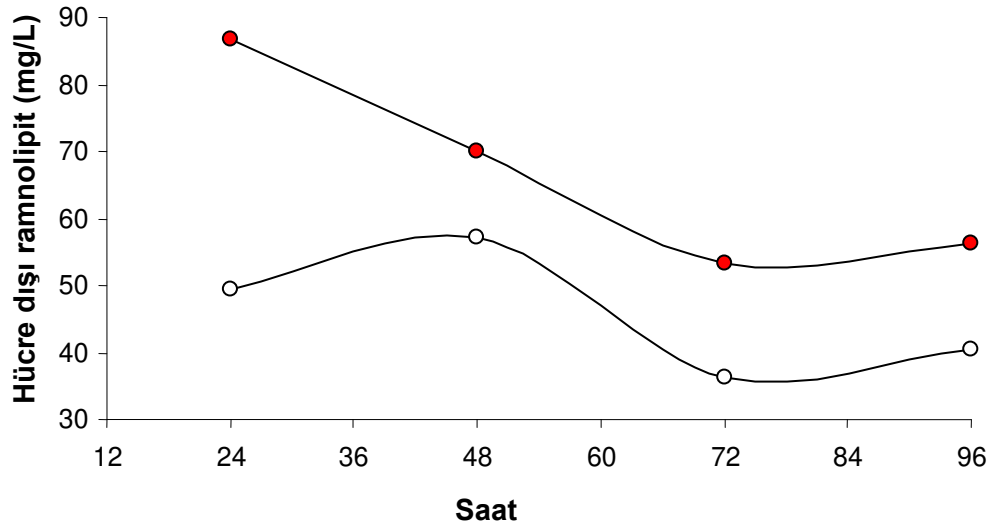


Şekil 4.1. Pa (o) ve PaJC (♦)'in (a) % 0,1 ve (b) % 1 glikoz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

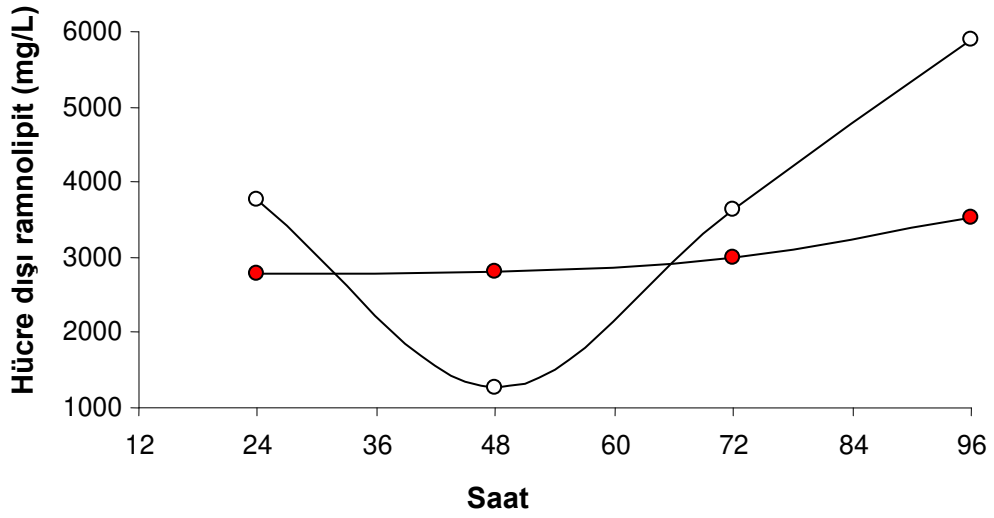
4.1.2. 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 glikoz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 glikoz bulunan minimal besi ortamında; Pa 48. saate kadar artış gösterirken 72. saate kadar azalış, bu saatten sonra tekrar artış göstermiştir. Pa 48. saatte 57,07 mg/L ile en yüksek değerinde iken, 72. saatte 36,29 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. Ramnolipit üretimi açısından PaJC ise, 24. saatte 86,62 mg/L kadar yüksek değerde iken, 72. saatte 53,18 mg/L ile en düşük değeredir. Sonuçta; PaJC 24. saatte Pa’dan 1,76 kat avantajlı durumdayken, Pa’nın ramnolipit üretimi ise PaJC’a paralel fakat daha düşük miktarlarda olduğu görülmektedir (Şekil 4.2 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 glikoz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte azalış göstererek 48. saatte 1258,89 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretimi gerçekleştirirken bu saatten sonra sürekli bir artış göstermiştir ve 96. saatte 5881,11 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC’da ise 96. saate kadar ramnolipit üretimi açısından önemli bir değişim gözlenmemiştir. PaJC 24. saatte 2770 mg/L en düşük değerde iken 96. saatte 3536,67 mg/L en yüksek değere ulaşmıştır. Böylece Pa 24., 72. ve 96. saatlerde PaJC’a göre avantajlı durumdayken, sadece 48. saatte PaJC, Pa’dan 2,24 kat daha avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.2 b).

(a)



(b)

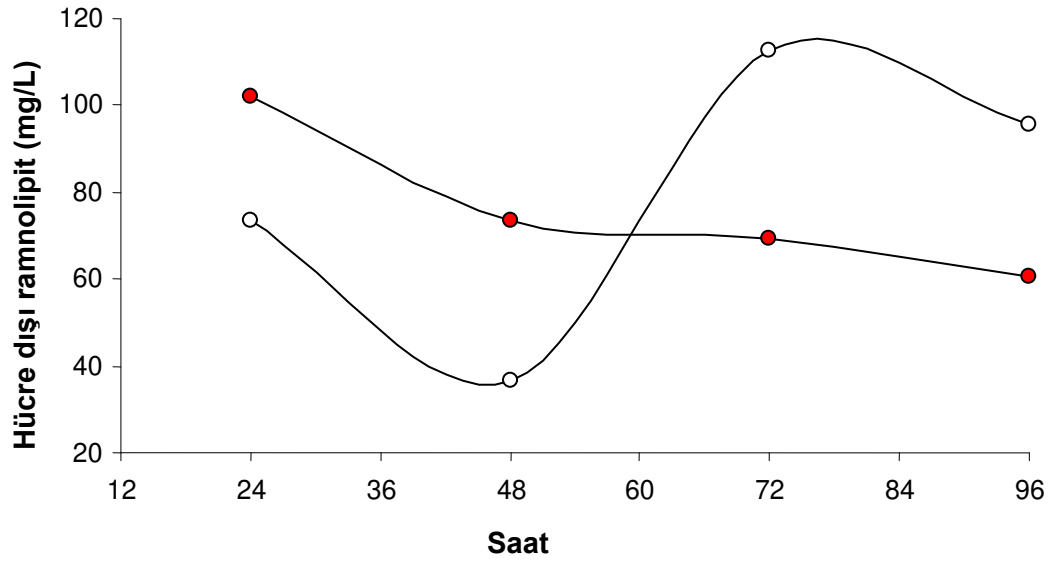


Şekil 4.2. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 glikoz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

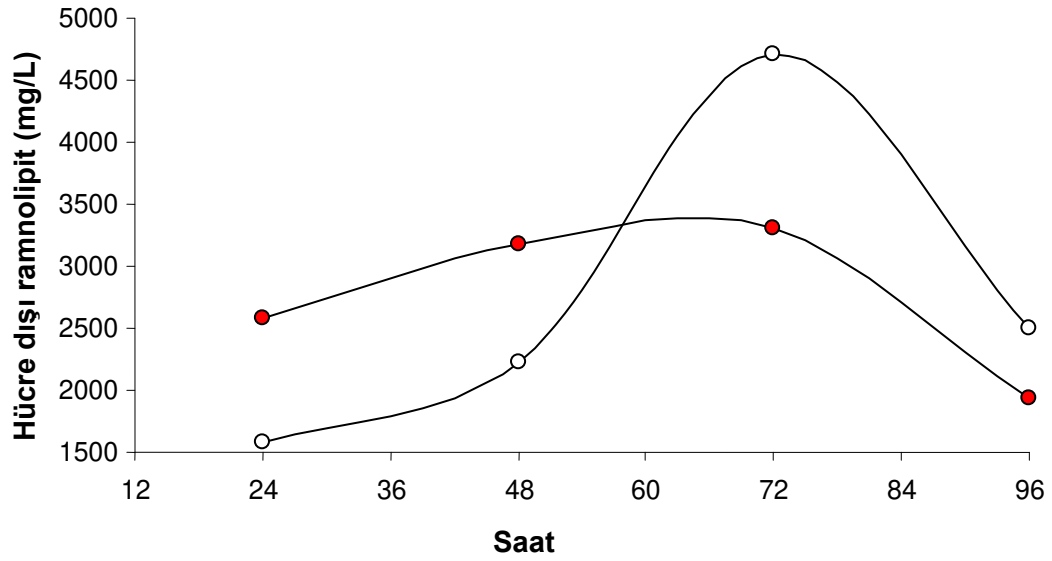
4.1.3. 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 glikoz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 glikoz bulunan minimal besi ortamında; Pa’nın 48. saatte 36,62 mg/L ile en düşük değerde iken, 72. saatte 112,84 mg/L ile en yüksek değerinde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 24. saatten sonra sürekli bir azalış göstermiştir. PaJC, 24. saatte 101,84 mg/L iken, 96. saatte 60,62 mg/L ile en düşük değerdedir. Böylece PaJC 48. saatte Pa’dan 2,01 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçmiştir. Başlangıçta PaJC, Pa’ya göre daha fazla miktarda ramnolipit üretirken, 72. ve 96. saatlerde Pa, PaJC’dan daha fazla ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.3 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 glikoz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte 1575,56 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, 72. saatte 4708,89 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC, Pa gibi 72. saate kadar yükseliş gösterirken bu saatten sonra ramnolipit üretimi düşmüştür. PaJC, 72. saatte 3314,44 mg/L ile en yüksek değerde iken 96. saatte 1931,11 mg/L ile en düşük değerdedir. Başlangıçta 24. saatte PaJC, Pa’dan daha 1,63 kat daha fazla ramnolipit üretirken, 72. saatte Pa, PaJC dan 1,42 kat daha fazla ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.3 b).

(a)



(b)

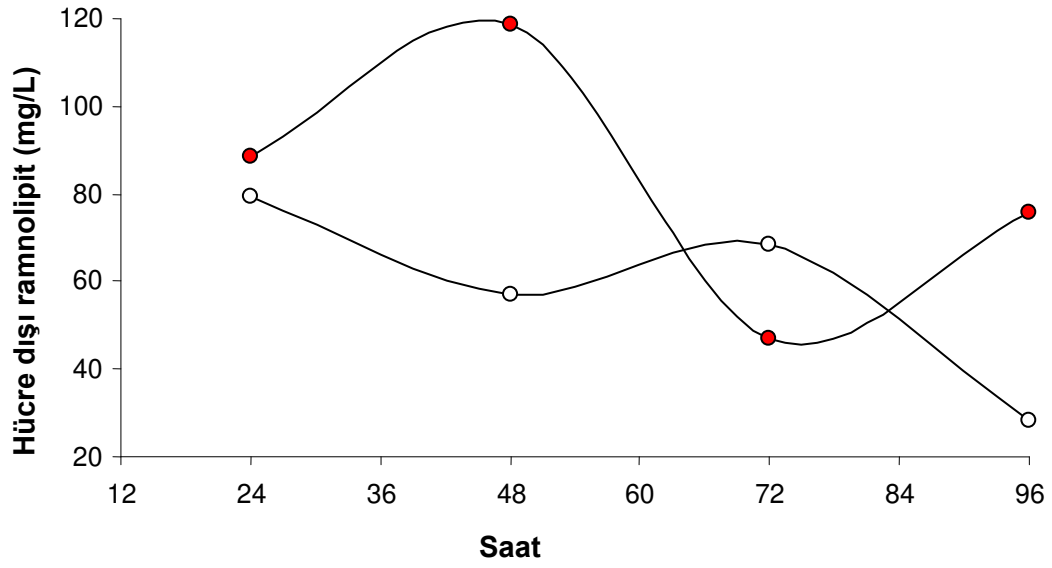


Şekil 4.3. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 glikoz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

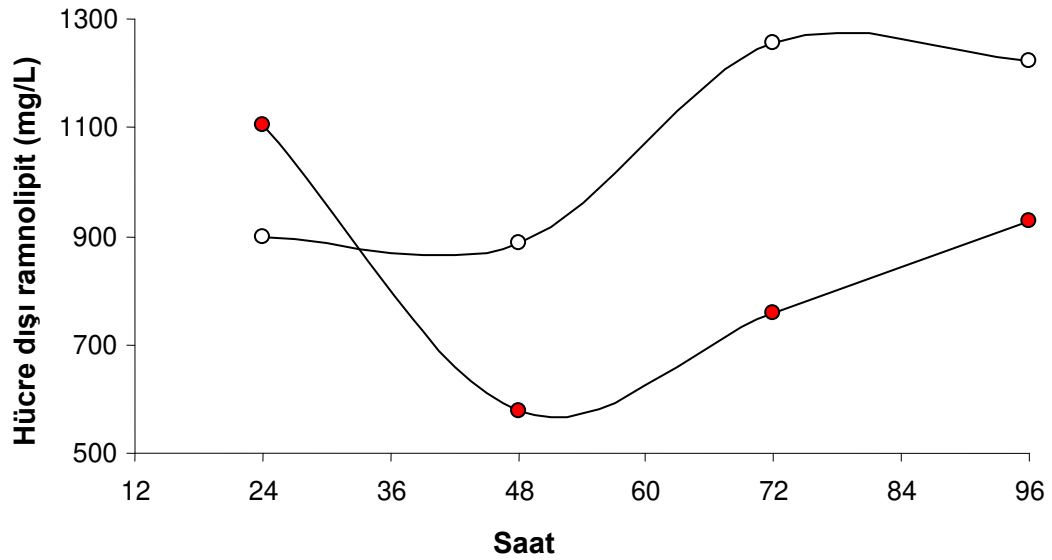
4.1.4. 37 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 glikoz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 glikoz bulunan minimal besi ortamında; Pa 24. saatte 79,51 mg/L ile en yüksek değerde iken, 96. saatte 28,07 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, Pa’nın azalış gösterdiği saatlerde (48. ve 96. saatlerde) artış, artış gösterdiği saatlerde (24. ve 72. saatlerde) ise azalış göstermiştir. PaJC, 48. saatte 118,84 mg/L en yüksek değerde iken, 72. saatte 46,96 mg/L ile en düşük değeredir. Böylece PaJC 96. saatte Pa’dan 2,70 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir. Pa sadece 72. saatte PaJC’dan daha fazla miktarda ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.4 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 glikoz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 72. saate kadar artış gösterirken bu saatten sonra azalış göstermiştir. Pa 48. saatte 888,44 mg/L en düşük değerde iken, 72. saatte 1254 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise ramnolipit üretimi açısından 48. saatten sonra giderek artış göstermiştir. PaJC, 24. saatte 1106,22 mg/L en yüksek ve 48. saatte 577,33 mg/L ile en düşük değeredir. Başlangıçta 24. saatte PaJC, Pa’dan 1,23 kat daha fazla ramnolipit üretirken, 48. saatten itibaren Pa daha fazla üretim gerçekleştirmiştir. 72. saatte Pa, PaJC dan 1,66 kat daha fazla ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.4 b).

(a)



(b)



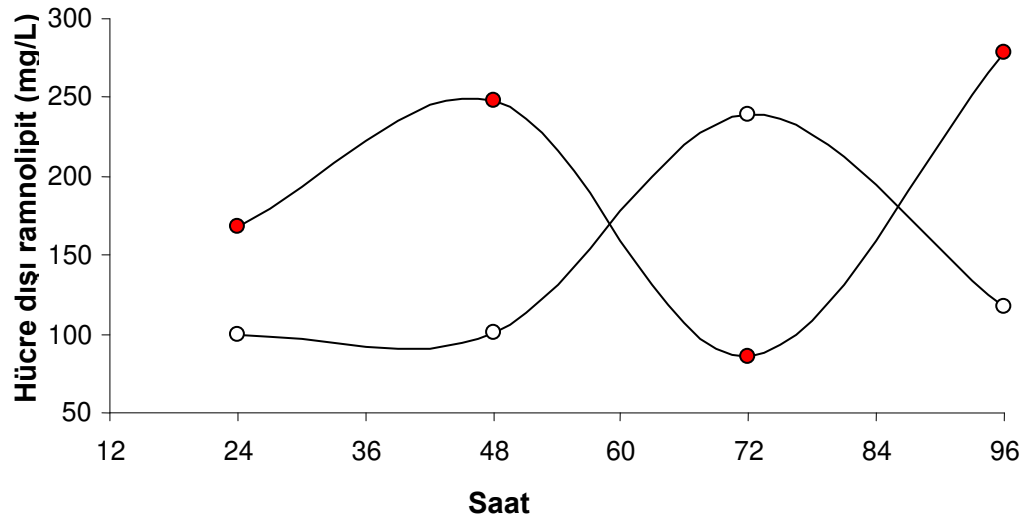
Şekil 4.4. Pa (o) ve PaJC (♦)'in (a) % 0,1 ve (b) % 1 glikoz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.2. Pa ve PaJC'nın Farklı Miktarlarda Sükroz İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi

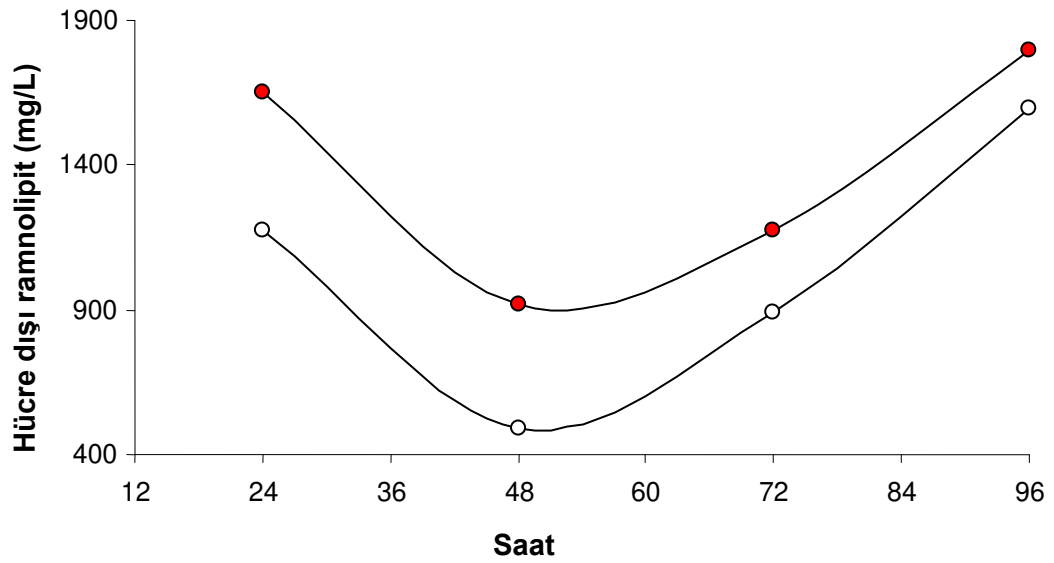
4.2.1. 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 sükroz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 sükroz bulunan minimal besi ortamında; Pa 24. saatte 99,22 mg/L ile en düşük değerinde iken, 72. saatte 238,67 mg/L ile en yüksek değerde olduğu görülmüştür. PaJC'nın ramnolipit üretiminde özellikle 72. saatten itibaren belirgin bir artış görülmüştür. PaJC, 72. saatte 85,33 mg/L ile en düşük değerde iken, 96. saatte 278,67 mg/L ile en yüksek değeredir. Sonuçta; PaJC, 24., 48. ve 96. saatlerde Pa'ya göre avantajlı olmasına rağmen Pa 72. saatte PaJC'dan 2,80 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.5 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 sükroz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 48. saatte 490,56 mg/L ile en düşük değerde iken, 96. saatte 1596,11 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 918,33 mg/L ile en düşük değerde iken 96. saatte 1798,89 mg/L en yüksek değere ulaşmıştır. Böylece 48. saatte PaJC, Pa'dan daha 1,87 kat daha fazla ramnolipit üretirken, Pa'nın ramnolipit miktarı ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarlarda gerçekleşmiştir (Şekil 4.5 b).

(a)



(b)

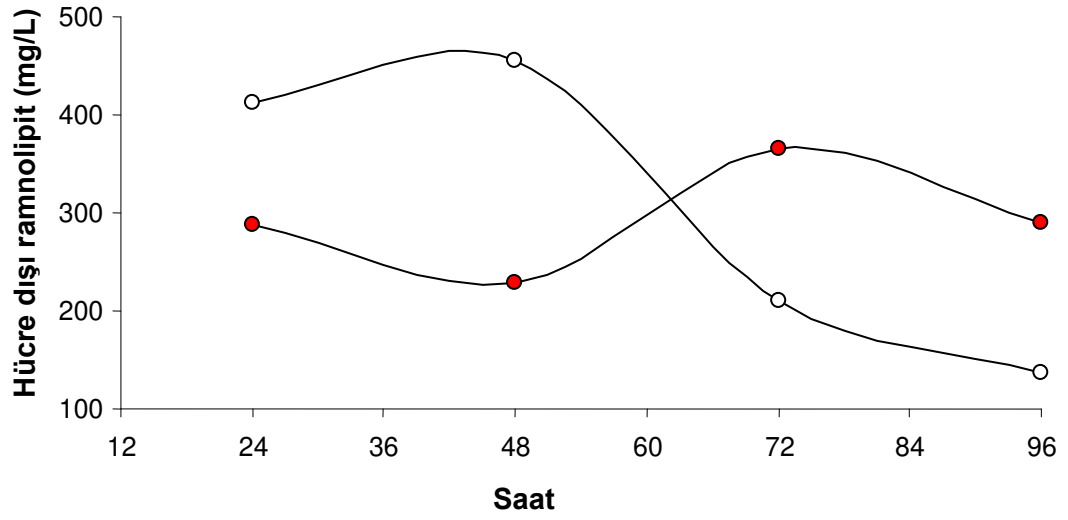


Şekil 4.5. Pa (o) ve PaJC (•)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 sükröz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

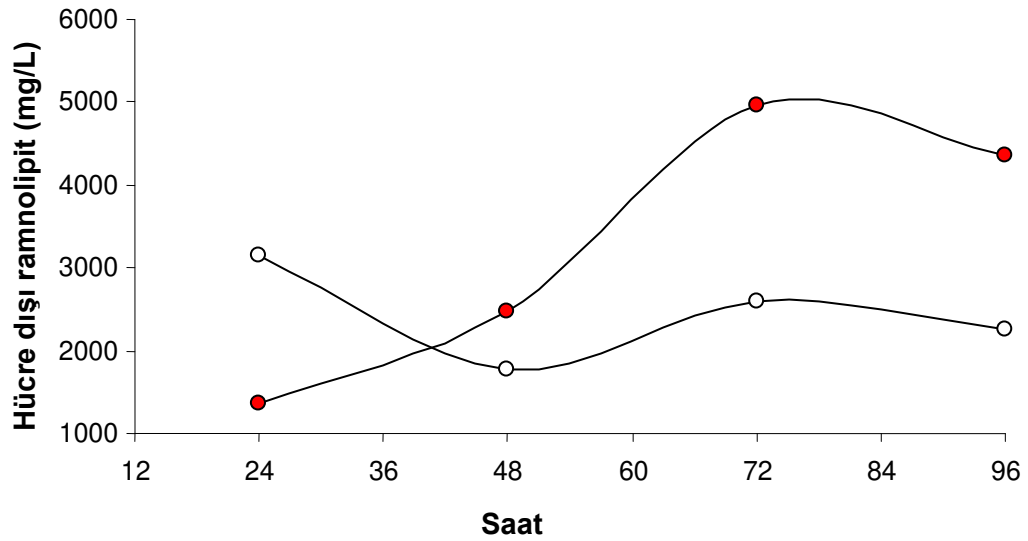
4.2.2. 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 süktroz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 süktroz bulunan minimal besi ortamında; Pa 48. saatte 455,33 mg/L ile en yüksek değerde iken, 96. saatte 137 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 48. saatte 228,11 mg/L ile en düşük değerde iken, 72. saatte 364,78 mg/L ile en yüksek değeredir. Sonuçta; Pa, ramnolipit üretimi açısından 24. ve 48. saatlerde PaJC’a göre avantajlı olmasına rağmen 72. ve 96. saatlerde, PaJC daha fazla ramnolipit üretmiştir. En yüksek avantajı PaJC, 96. saatte Pa’dan 2,11 kat daha fazla ramnolipit üreterek sağlamıştır (Şekil 4.6 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 süktroz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte 3153,33 mg/L en yüksek değerde ramnolipit üretirken, 48. saatte 1770 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC’da ise, 72. saate kadar belirgin bir artışın ardından düşüş yaşanmıştır. PaJC, 24. saatte 1364,44 mg/L ile en düşük ve 72. saatte 4964,44 mg/L ile en yüksek değerde olduğu görülmüştür. Böylece sadece 24. saatte Pa, PaJC'dan 2,31 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, PaJC’ın ramnolipit miktarı ise 48., 72. ve 96. saatlerde Pa’dan daha fazla miktarlarda gerçekleşmiştir (Şekil 4.6 b).

(a)



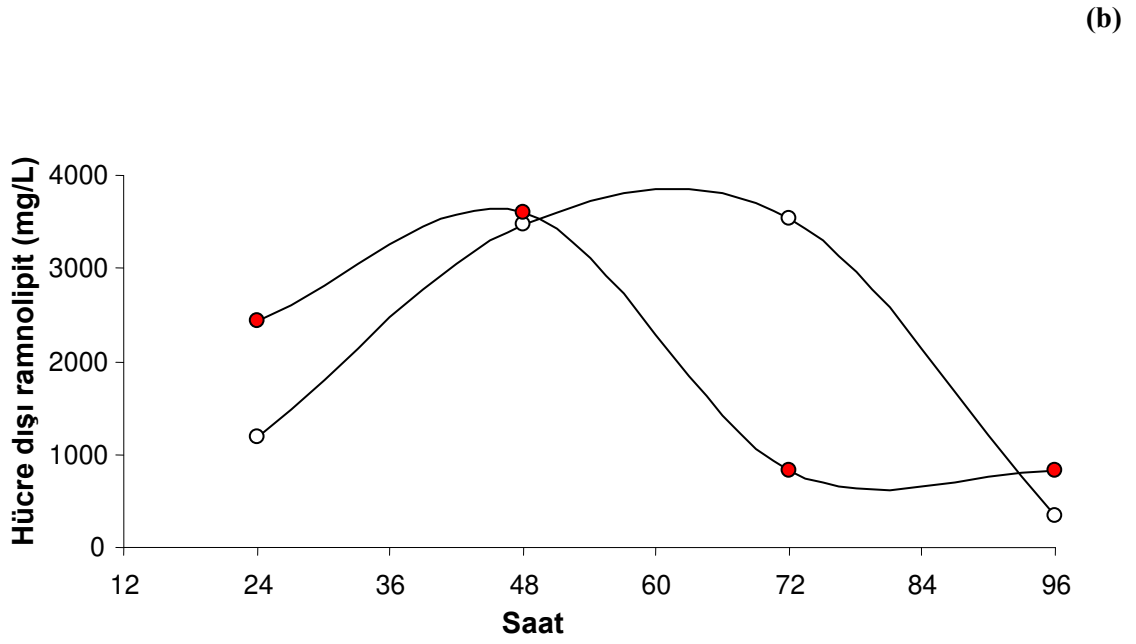
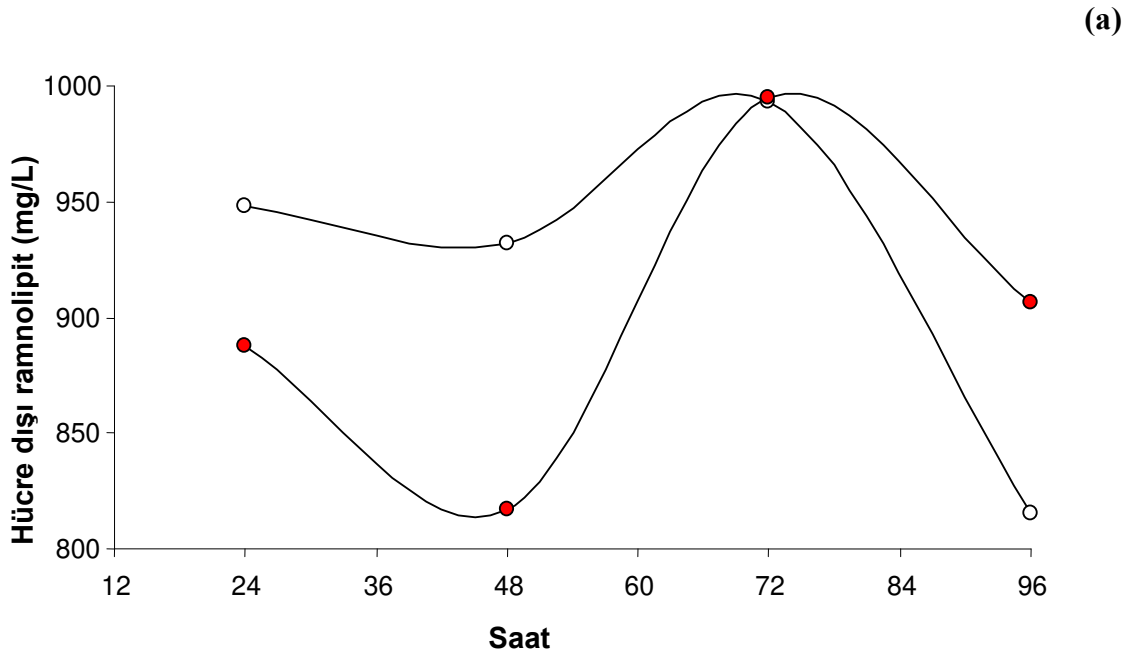
(b)



Şekil 4.6. Pa (o) ve PaJC (•)'in (a) % 0,1 ve (b) % 1 süzkroz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.2.3. 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 sükroz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 sükroz bulunan minimal besi ortamında; Pa 72. saatte 992,89 mg/L ile en yüksek değerinde iken, 96. saatte 815,11 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 48. saatte 817,33 mg/L iken, 72. saatte 995,11 mg/L ile en yüksek değerdedir. Bu sonuçlara göre; ramnolipit üretimi açısından Pa, 24. ve 48. saatlerde PaJC’a göre avantajlı olmasına rağmen 72. ve 96. saatlerde, PaJC, Pa’ya göre daha avantajlı duruma geçmiştir. Pa, 72. saatte PaJC’dan 1,14 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.7 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 sükroz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 72. saatte 3535 mg/L en yüksek değerde ramnolipit üretirken, 96. saatte 340,56 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 3593,33 mg/L en yüksek değerde iken 72. saatte 823,89 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. Böylece sadece 72. saatte Pa, PaJC'dan 4,29 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, PaJC’ın ramnolipit miktarı ise 24., 48. ve 96. saatlerde Pa’dan daha fazla miktarlarda olduğu görülmektedir (Şekil 4.7 b).

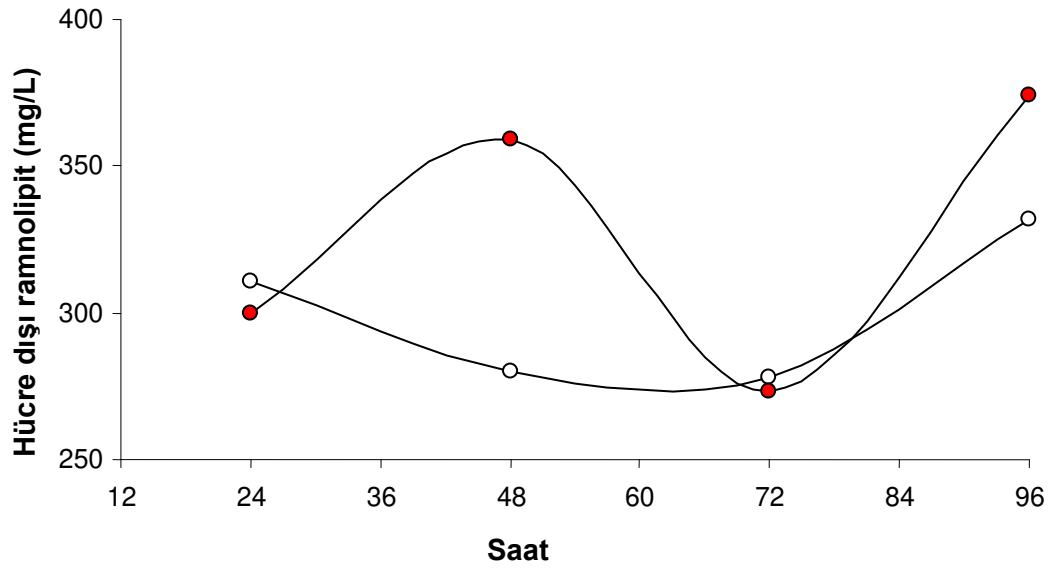


Şekil 4.7. Pa (o) ve PaJC (•)'in (a) % 0,1 ve (b) % 1 sükröz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

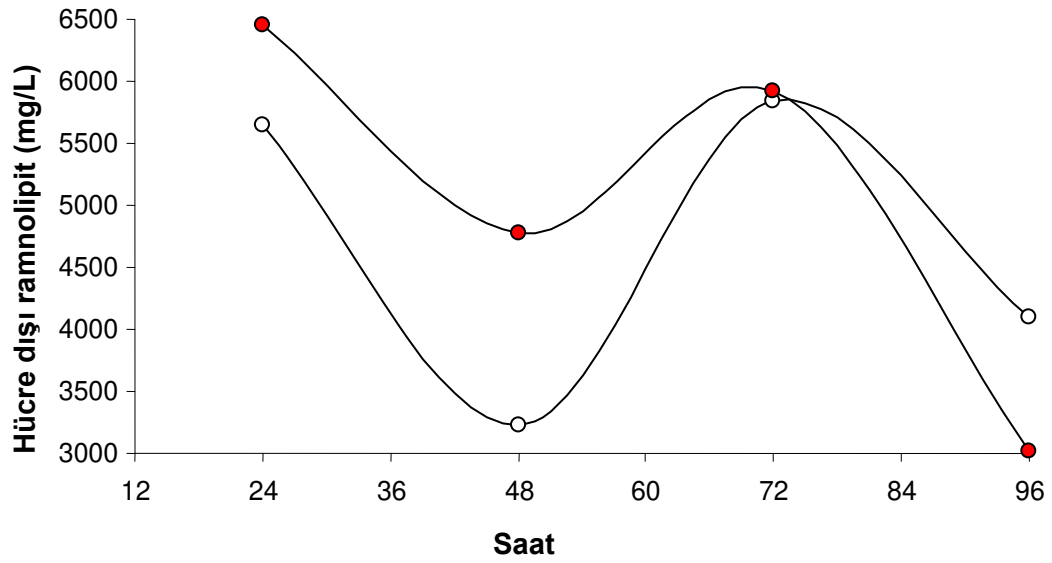
4.2.4. 37 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 süktroz bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 süktroz bulunan minimal besi ortamında; Pa 72. saatte 278,11 mg/L ile en düşük değerde iken, 96. saatte 332 mg/L ile en yüksek değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, özellikle 72. saatten itibaren ise belirgin bir artış göstermiştir. PaJC 72. saatte 273,11 mg/L ile en düşük değerde iken, 96. saatte 374,22 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; Pa, 24. ve 72. saatlerde PaJC’a göre avantajlı iken 48. ve 96. saatlerde PaJC, Pa’ya göre ramnolipit üretimi bakımından daha avantajlı duruma geçmiştir. En yüksek avantajı PaJC, 48. saatte Pa’dan 1,28 kat daha fazla ramnolipit üreterek sağlamıştır (Şekil 4.8 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 süktroz bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 48. saatte 3225,56 mg/L en düşük değerde ramnolipit üretirken, 72. saatte 5836,67 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 24. saatte 6458,89 mg/L en yüksek ramnolipit üretirken 96. saatte 3020 mg/L ile en düşük ramnolipit üretimi görülmüştür. Böylece sadece 96. saatte Pa, PaJC’dan avantajlı duruma geçerken, PaJC’ın ramnolipit üretimi ise 24., 48. ve 72. saatlerde Pa’dan daha fazla miktarlarda olduğu ve en fazla farkın da 48. saatte 1,48 kat olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8 b).

(a)



(b)



Şekil 4.8. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 sükröz içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

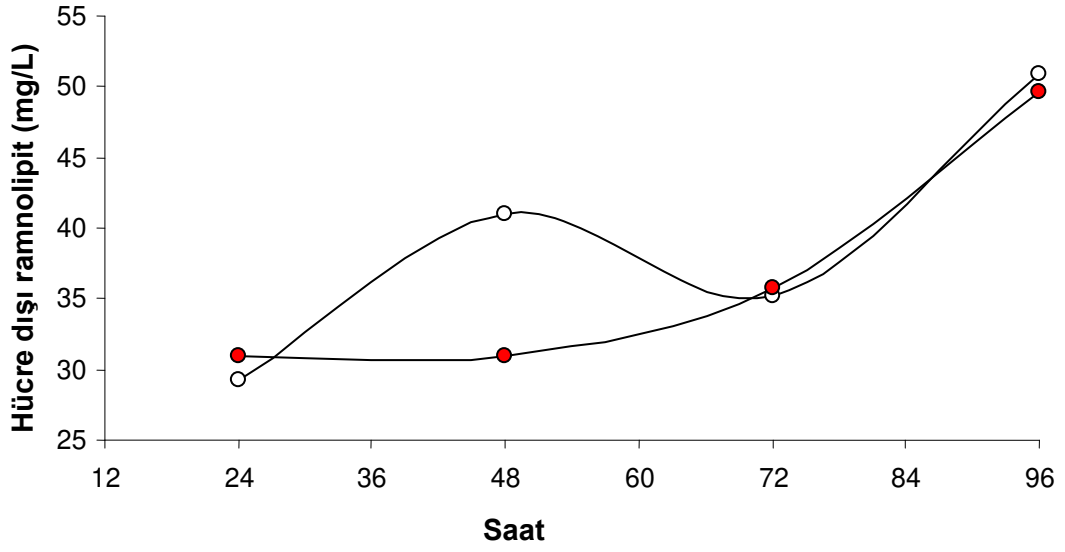
4.3. Pa ve PaJC'ın Farklı Miktarlarda Gliserol İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi

4.3.1. 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de ramnolipit üretimi

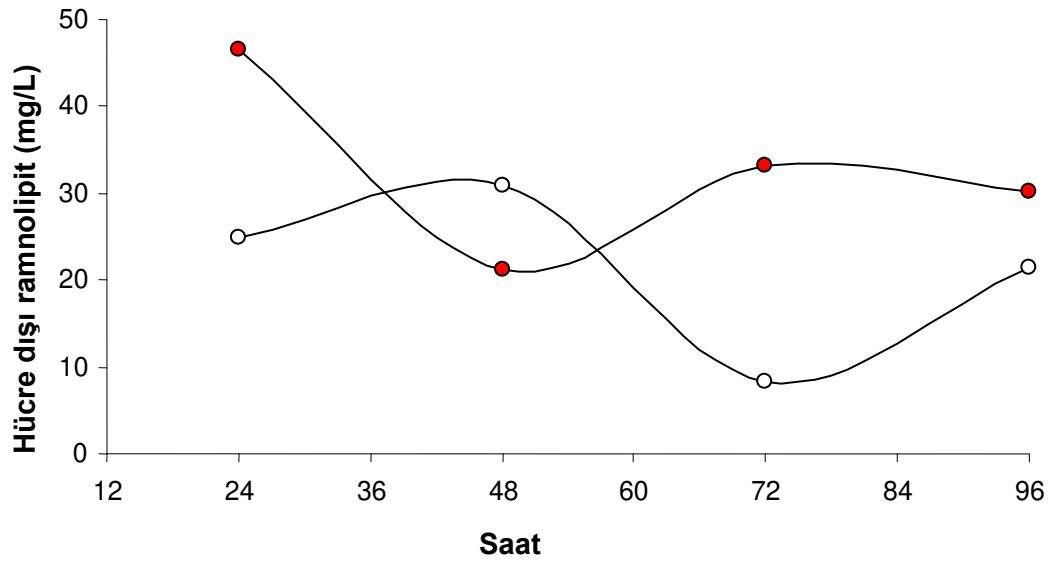
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 gliserol bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 gliserol bulunan minimal besi ortamında; Pa 24. saatte 29,29 mg/L ile en düşük değerinde iken, 96. saatte 50,96 mg/L ile en yüksek değerde olduğu görülmüştür. PaJC'ın ise, 24. saatten itibaren sürekli artış gösterdiği görülmüştür. PaJC, 24. ve 48. saatlerde 30,96 mg/L ile en düşük değerde iken, 96. saatte 49,62 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; Pa ve PaJC'ın ramnolipit üretim miktarları birbirine çok yakın seyrederken 48. saatte Pa 1,32 kat farkla PaJC'dan daha avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.9 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 gliserol bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 48. saatte 30,96 mg/L en yüksek değerde ramnolipit üretirken, 72. saatte 8,29 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC ise, 24. saatte 46,62 mg/L ile en yüksek değerde ve 48. saatte 21,29 mg/L ile en değere ulaşmıştır. Böylece 48. saatte PaJC, Pa'dan 4,02 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirirken, Pa sadece 48. saatte PaJC'ı 1,45 kat farkla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.9 b).

Sonuçta, ortalama ramnolipit üretimi açısından bakıldığında Pa ve PaJC'ın, % 1 ve % 0,1 gliserol bulunan ortam arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür.

(a)



(b)

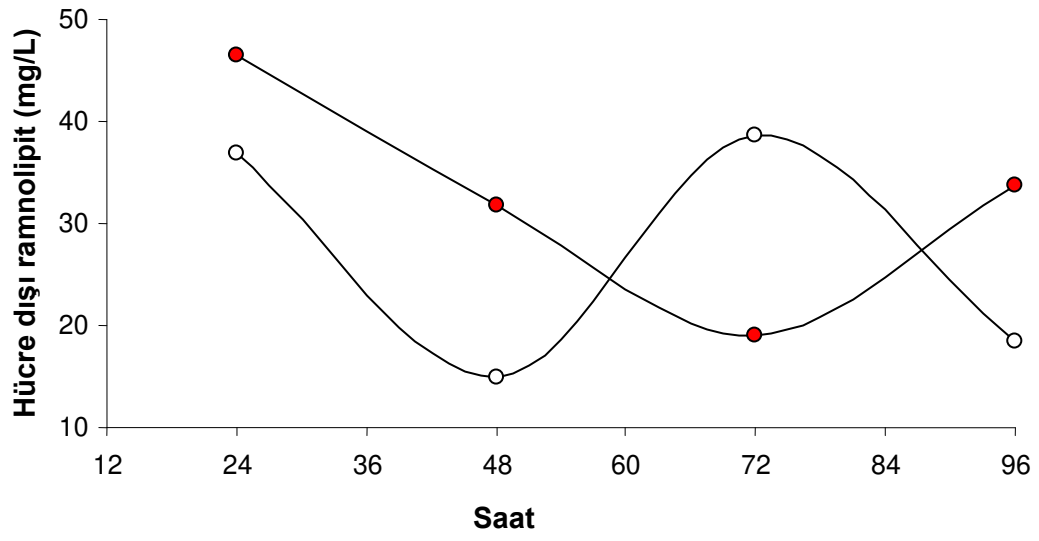


Şekil 4.9. Pa (o) ve PaJC (•)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 gliserol içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

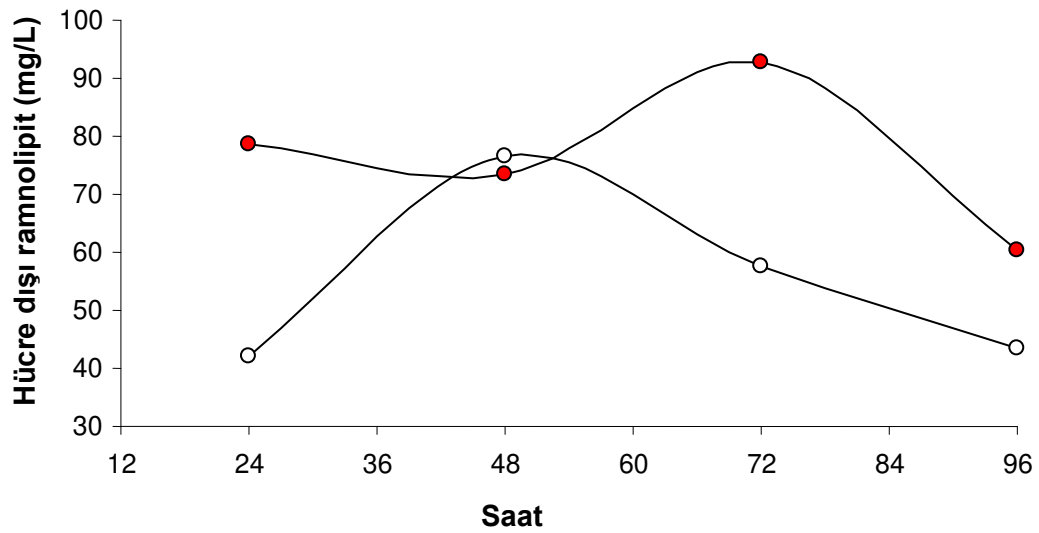
4.3.2. 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 gliserol bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 gliserol bulunan minimal besi ortamında; Pa 48. saatte 14,84 mg/L ile en düşük değerinde iken, 72. saatte 38,62 mg/L ile en yüksek değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 24. saatte 46,40 mg/L ile en yüksek değerde iken, 72. saatte 19,07 mg/L ile en düşük değerdedir. Sonuçta; 48. saatte PaJC, Pa'dan 2,15 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, Pa sadece 72. saatte PaJC'dan 2,03 kat avantajla daha fazla ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.10 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 gliserol bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte 41,96 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, 48. saatte 76,4 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 72. saatte 92,84 mg/L ile en yüksek değerde ve 96. saatte 60,51 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. Böylece 24. saatte PaJC, Pa'dan 1,88 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştiren, Pa sadece 48. saatte 1,04 kat üretim gerçekleştirmiştir (Şekil 4.10 b).

(a)



(b)

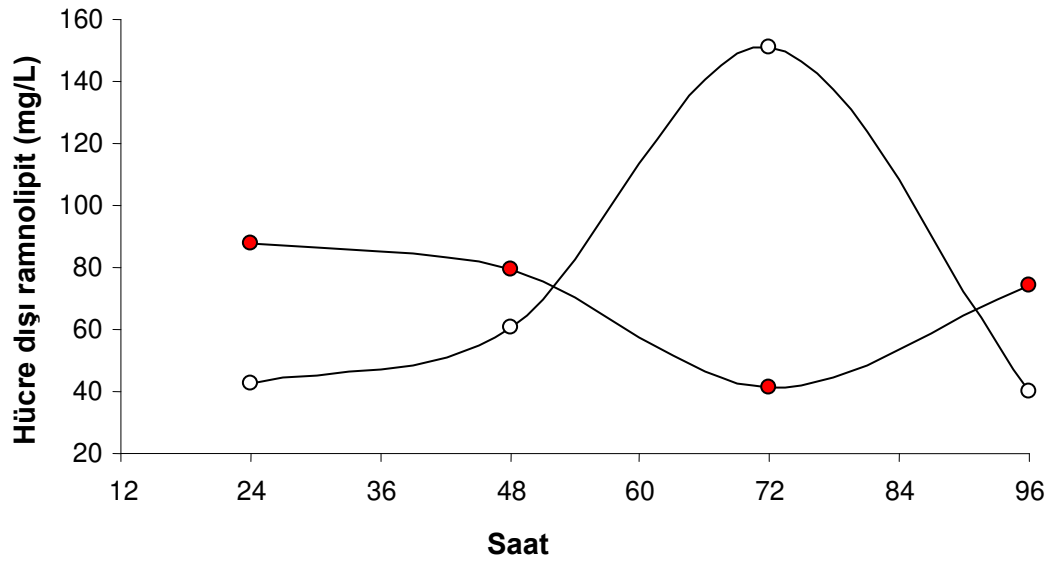


Şekil 4.10. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 gliserol içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

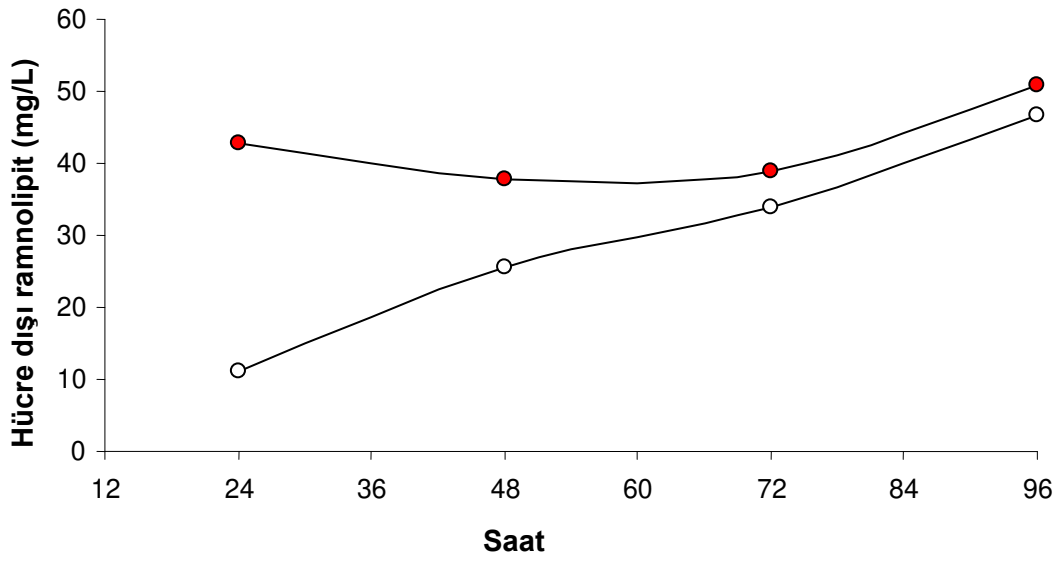
4.3.3. 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 gliserol bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 gliserol bulunan minimal besi ortamında; Pa 72. saatte 151,18 mg/L ile en yüksek değerinde iken, 96. saatte 39,84 mg/L ile en düşük değerde olduğu görülmüştür. PaJC ise, 24. saatte 87,62 mg/L en yüksek değerde iken, 72. saatte 41,29 mg/L ile en düşük değeredir. Sonuçta; sadece 72. saatte Pa, PaJC'dan 3,66 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, 24., 48. ve 96. saatlerde PaJC'ın Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği gözlenmiştir (Şekil 4.11 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 gliserol bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte 11,18 mg/L en düşük değerde ramnolipit üretirken, 96. saatte 46,73 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 37,84 mg/L ile en düşük ve 96. saatte 50,96 mg/L ile en yüksek değere ulaşılmıştır. Böylece 24. saatte PaJC, Pa'dan 3,82 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirirken, Pa'nın ürettiği ramnolipit miktarı ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarlarda seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.11 b).

(a)



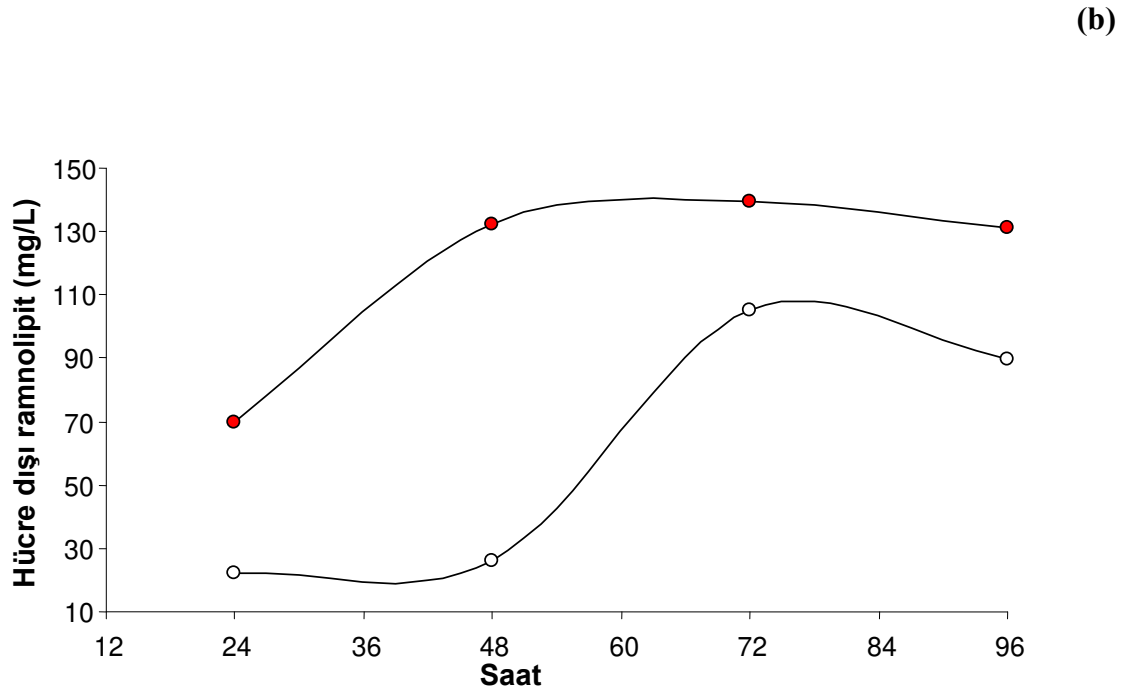
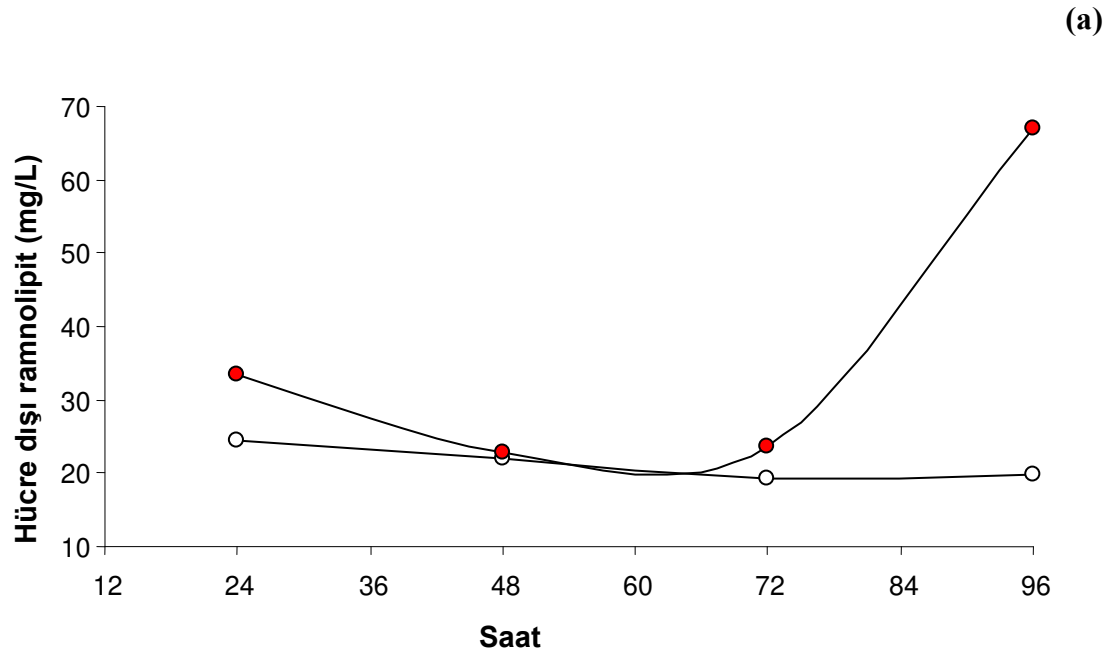
(b)



Şekil 4.11. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın (a) % 0,1 ve (b) % 1 gliserol içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.3.4. 37 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, % 0,1 ve % 1 gliserol bulunan minimal kültür ortamlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından % 0,1 gliserol bulunan minimal besi ortamında; Pa 24. saatte 24,40 mg/L ile en yüksek değerinde iken, 72. saatte 19,29 mg/L olduğu görülmüştür. PaJC ise, 48. saatte 22,73 mg/L ile en düşük değerinde iken, 96. saatte 66,96 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; PaJC ve Pa 48. ve 72. saatlerde birbirine yakın sonuçlar vermişse de PaJC, Pa’dan daha fazla miktarlarda ramnolipit üretmiştir. Ayrıca, 96. saatte PaJC’nın, Pa’dan 3,39 kat avantajlı duruma geçtiği gözlenmiştir (Şekil 4.12 a). Ramnolipit üretimi açısından % 1 gliserol bulunan minimal besi ortamında ise; Pa 24. saatte 22,40 mg/L ile en düşük değerinde ramnolipit üretirken, 72. saatte 105,07 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 24. saatte 69,96 mg/L ile en düşük ve 72. saatte 139,51 mg/L ile en yüksek değerine ulaşmıştır. Böylece 48. saatte PaJC, Pa’dan 5,11 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirirken, Pa’nın ürettiği ramnolipit miktarı ise PaJC’a paralel fakat daha düşük miktarlarda seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.12 b).

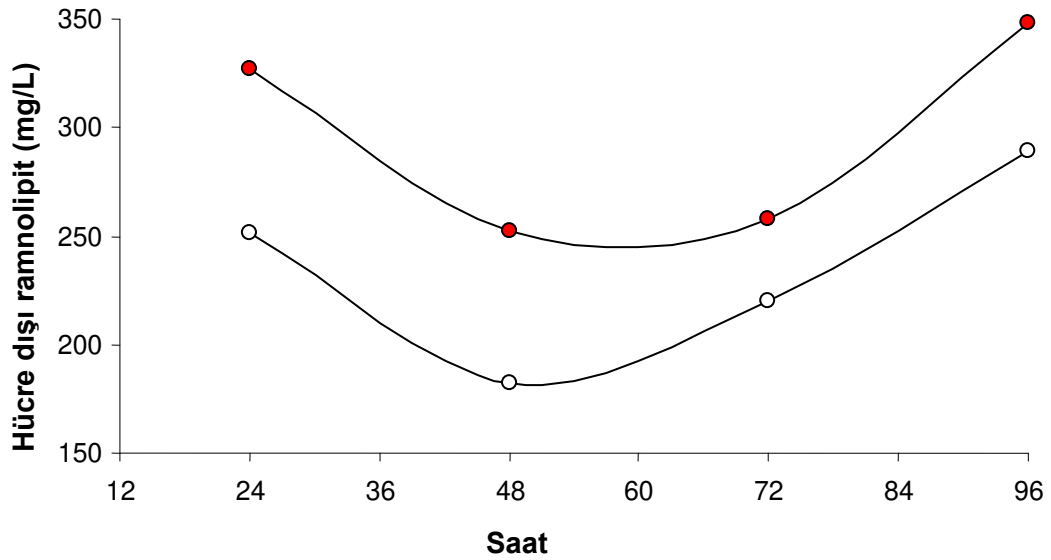


Şekil 4.12. Pa (o) ve PaJC (•)'in (a) % 0,1 ve (b) % 1 gliserol içeren besiyerlerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.4. Pa ve PaJC'nın Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi

4.4.1. 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de ramnolipit üretimi

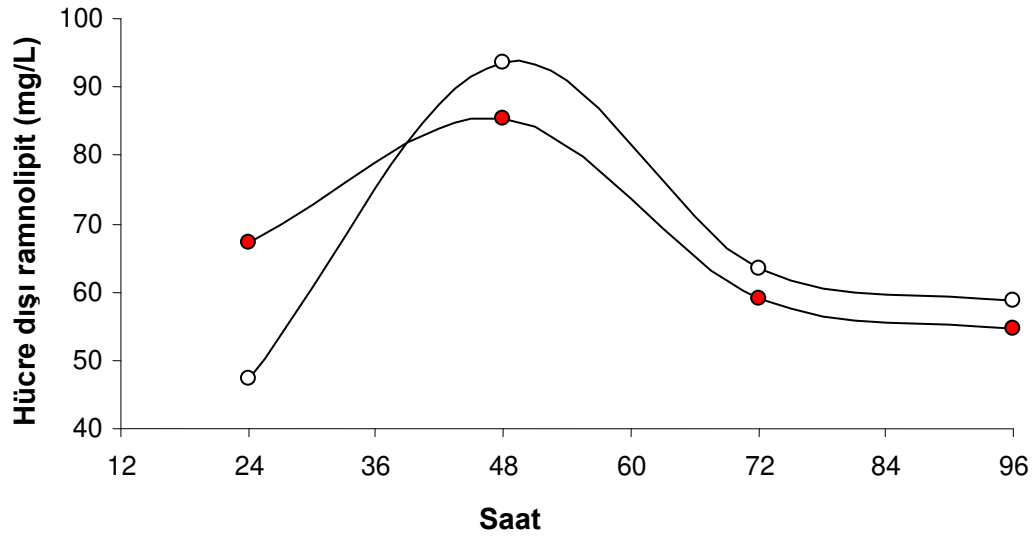
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa 48. saatte 182,11 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, 96. saatte 289,61 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 252,11 mg/L ile en düşük ve 96. saatte 347,94 mg/L ile en yüksek değerdedir. Böylece 48. saatte PaJC, Pa'dan 1,38 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, Pa'nın ramnolipit miktarı ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarlarda seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın zeytinyağı fabrikası atık suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.4.2. 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

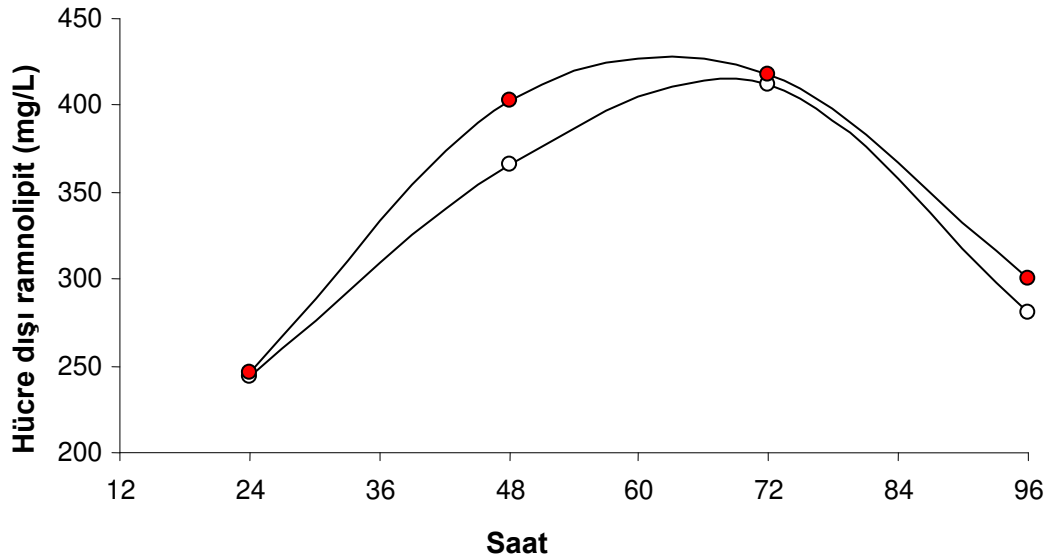
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 47,4 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, 48. saatte 93,62 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 85,29 mg/L ile en yüksek ve 96. saatte 54,62 mg/L ile en düşük değerdedir. Böylece 24. saatte PaJC, Pa’dan 1,42 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, Pa 48., 72. ve 96. saatlerde ramnolipit üretimi açısından PaJC’dan avantajlı duruma geçtiği gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın zeytinyağı fabrikası atık suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.4.3. 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm’de ramnolipit üretimi

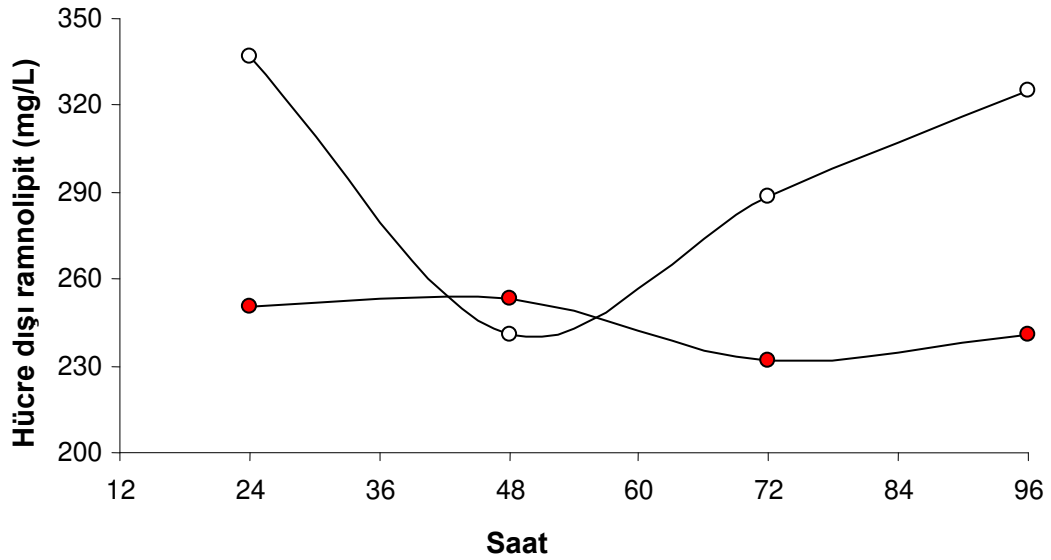
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 243,67 mg/L ile en düşük değerde ramnolipit üretirken, 72. saatte 411,44 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 24. saatte 246,44 mg/L ile en düşük ve 72. saatte 417,56 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; Pa ve PaJC’nin ramnolipit üretim değerleri birbirine çok yakın olduğu ve 48. saatte PaJC’nin, Pa’dan 1,10 kat farkla avantajlı duruma geçtiği gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Pa (o) ve PaJC (•)'in zeytinyağı fabrikası atık suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.4.4. 37 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 336,83 mg/L en yüksek değerde ramnolipit üretirken, 48. saatte 241 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 252,94 mg/L ile en yüksek ve 72. saatte 231,56 mg/L ile en düşük değerdedir. Sonuçta; PaJC’nin ramnolipit üretim miktarında belirgin farklar oluşmadığı görülmüştür. 96. saatte Pa, PaJC’dan 1,35 kat fazla ramnolipit üreterek avantajlı durumdayken, sadece 48. saatte PaJC’nin Pa’dan avantajlı duruma geçtiği gözlenmiştir (Şekil 4.16).

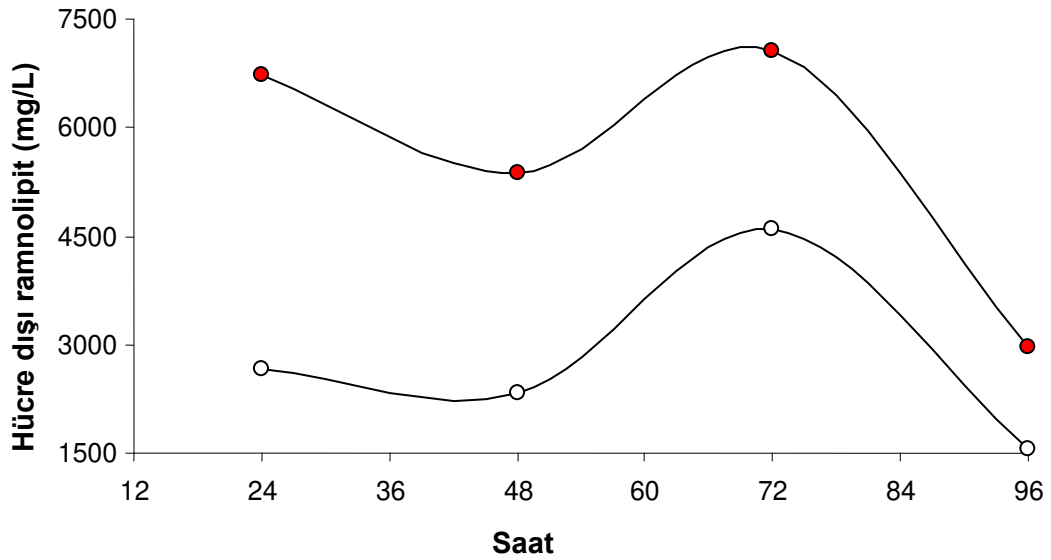


Şekil 4.16. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın zeytinyağı fabrikası atık suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.5. Pa ve PaJC'nın Peyniraltı Suyu (PAS) Ortamında Ramnolipit Üretimi

4.5.1. 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de ramnolipit üretimi

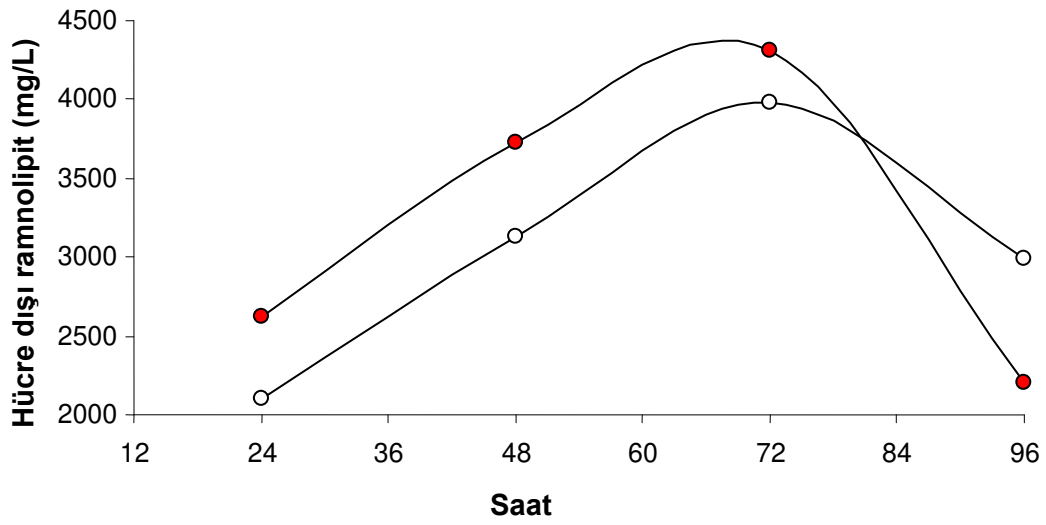
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, peyniraltı suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa 72. saatte 4608,89 mg/L ile en yüksek değerde iken, 96. saatte 1553,33 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC ise, 72. saatte 7064,44 mg/L ile en yüksek ve 96. saatte 2975,56 mg/L ile en düşük değerdedir. Böylece 24. saatte PaJC, Pa'dan 2,54 kat daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı duruma geçerken, Pa'nın ramnolipit miktarı ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarlarda seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Pa (o) ve PaJC (♦)'ın peyniraltı suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.5.2. 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

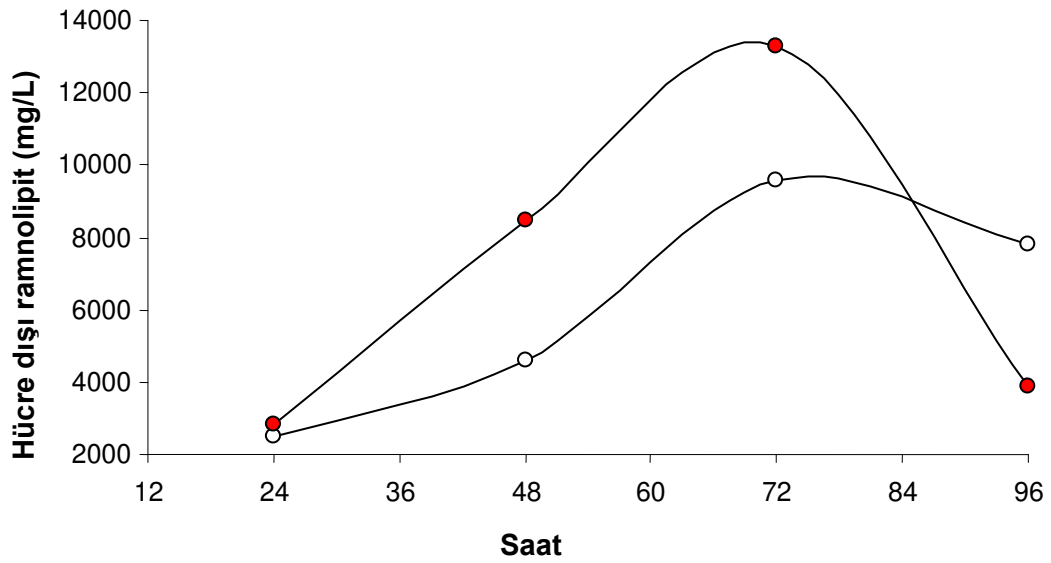
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, peyniraltı suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 2097,78 mg/L ile en düşük değerde iken, 72. saatte 3981,11 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 72. saatte 4303,33 mg/L ile en yüksek ve 96. saatte 2208,89 mg/L ile en düşük değerdedir. Sonuçta; PaJC, 24., 48. ve 72. saatlerde Pa’ya göre avantajlı durumda olmasına rağmen 96. saatte Pa 1,35 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Pa (o) ve PaJC (●)'in peyniraltı suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.5.3. 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm’de ramnolipit üretimi

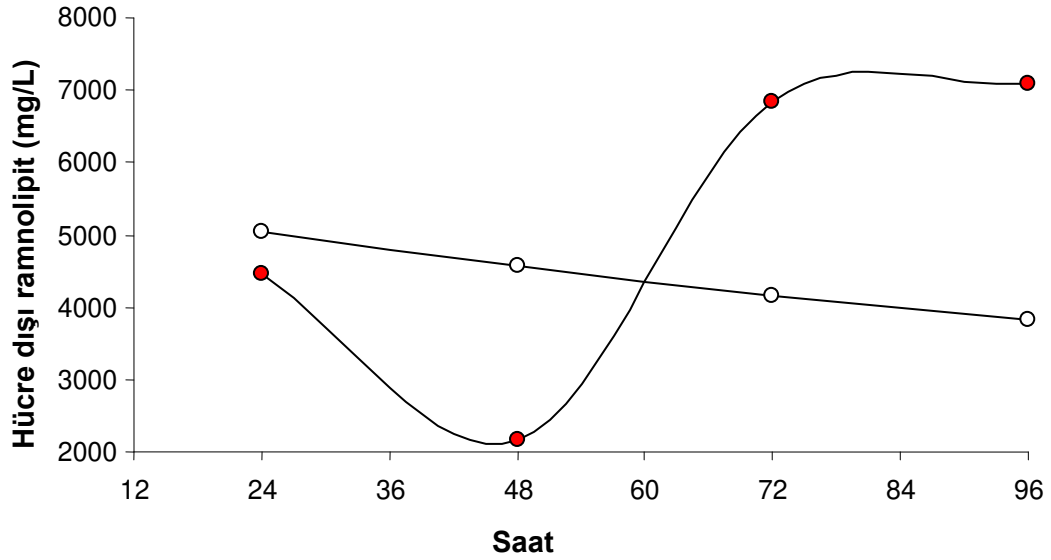
Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, peyniraltı suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 2480,56 mg/L ile en düşük değerde iken, 72. saatte 9577,78 mg/L ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise, 24. saatte 2841,67 mg/L ile en düşük ve 72. saatte 13300 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; PaJC, 24., 48. ve 72. saatlerde Pa’ya göre avantajlı durumda olmasına rağmen 96. saatte Pa, PaJC’dan 2 kat fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Pa (o) ve PaJC (●)'in peyniraltı suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 100 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

4.5.4. 37 °C sıcaklıkta ve 200 rpm’de ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin ramnolipit üretimi, peyniraltı suyu ortamında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde saptanmıştır. Ramnolipit üretimi açısından; Pa, 24. saatte 5047,78 mg/L ile en yüksek değerde iken, 96. saatte 3831,11 mg/L ile en düşük değere ulaşmıştır. PaJC ise, 48. saatte 2175,56 mg/L ile en düşük ve 96. saatte 7097,78 mg/L ile en yüksek değerdedir. Sonuçta; Pa, 24. ve 48. saatlerde PaJC’a göre daha fazla ramnolipit üretmesine rağmen 72. ve 96. saatte PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği gözlenmiştir. En yüksek fark 48. saatte Pa’nın PaJC’dan 2,10 kat daha fazla ramnolipit üretmesiyle gerçekleşmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Pa (o) ve PaJC (♦)'in peyniraltı suyu besiyerinde ramnolipit düzeyleri. Bakteriler, 50 ml minimal besiyeri/150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altında olduğu için verilmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *P. aeruginosa* ile onun *Vitreoscilla sp.*'den elde edilen *vgb* geni aktarılmış rekombinant suşunun ramnolipit oluşturma kapasiteleri, doğal ve sentetik ortamlarda incelenmiştir.

Ramnolipitler, bilinen en önemli biyosüpfektandır. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettiği sekonder bir metabolit olan biyosüpfektanlar, önemli birçok alanda (gıda sanayi, tıp, kozmetik, çevre teknolojileri, tarım gibi) kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosüpfektanlar, bileşiklerin parçalanmasını ve emülsifikasyonunu artırmaya yardımcı olur. Biyoemülsifiyerler, ticari olarak petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunda, petrol iyileşimini artırmaya yönelik ve petrolle kirlenen boruların temizlenmesi için kullanılan klorlu çözücülerin yerine kullanılabilir [20]. Ramnolipitler, bu yönüyle ülkemiz ekolojisi ve ekonomisi açısından vazgeçilmezdir.

Sızıntılar, yanlış dışa atım teknikleri gibi endüstriyel aktivitelerle birçok toprak ve yeraltı suları çeşitli organik bileşiklerle kirlenmektedir. Bu organik bileşikler hem çevreye hem de insan sağlığına zararlıdır. Çevreye verdikleri bu zararı en aza indirmek için biyolojik ve biyolojik olmayan birçok işlem yapılmaktadır. Biyolojik olarak yapılan temizleme çeşitli avantajlarından dolayı diğer yöntemlere göre tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı, mikrobiyal topluluğun yoğunluğu ve bileşimi, kirlilik yaratan organik bileşiklerin dönüşüm hızı, çevresel faktörler, substrat faktörleri ve mikrobiyal faktörlerden etkilenmesidir. Temel çevresel faktörler nem, havalandırma, sıcaklık, pH ve besin miktarıdır. Toksisite, derişim, çözünürlük, uçuculuk ve kimyasal yapısı ile ilgili substrat özellikleri de biyolojik dönüşümü etkilemektedir. Mikrobiyal faktörler ise o bileşiği parçalayabilecek mikroorganizmanın varlığı, mikrobiyal topluluğun alıştırılması ve ekolojik faktörlerdir [115]. Biz de araştırmalarımız sonucunda bakterimizin çevre koşullarından (sıcaklık, havalandırma, besin miktarı ve besinin kimyasal yapısı açısından) etkilendiğini gözlemledik.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa*'nın kromozomu üzerine *vgb* geninin aktarılması, transpozon/transpozaz sistemi yardımıyla yapılmıştır. Bu kromozal entegrasyon bu genin hücrelerin çoğalması sırasında hücreden hücreye aktarılmasında bir kaybın olmasını da engellemektedir. Çünkü, transpozaz enzimini kodlayan bölge entegrasyon sırasında kesilmekte ve entegre olan kısmın kromozomdan tekrar ayrılması söz konusu olmamaktadır [116].

Çalışmamızda *P. aeruginosa*'yı kullanmamızın nedeni bilinen en iyi ramnolipit üreten bakteri olmasıdır. Aynı zamanda, bu bakteri organik bileşikleri geniş oranda

besin kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine de sahiptir. Bu özelliğinden yola çıkılarak farklı karbon kaynakları (glikoz, sükroz, gliserol) içeren minimal kültür ortamları ve organik madde bakımından zengin olan fabrika atık suları (zeytinyağı atık suyu, peyniraltı suyu) besi ortamı olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızın başlıca konusu olan ramnolipit üretiminde, oksijenin sınırlayıcı rol oynaması sebebiyle, kullandığımız ve oldukça etkili bir oksijen alım sistemi olan VHb'inin bu bakteriye önemli avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. Ramnolipit üretimi üzerine VHb'inin etkisini görebilmek adına yabanıl suş Pa ve *vgb* geni aktarılmış rekombinant bakteri PaJC karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Ayrıca, farklı çalkalama düzeyleri (100 rpm ve 200 rpm) kullanılarak ortamı oksijenlendirmenin, VHb'nin oksijen yakalayıcı özelliği üzerine yarattığı etkinin ramnolipit üretiminde nasıl bir rol oynayacağı araştırılmıştır. Aynı zamanda farklı sıcaklıkların (30 °C ve 37 °C) ramnolipit üretimi üzerine etkisi karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır.

Çalışmamızın ilk kısmında, Pa ve PaJC'ın farklı karbon kaynakları içeren minimal ortamdaki (sentetik besiyerindeki) ramnolipit üretimleri zamana bağlı olarak belirlenmiş ve her iki bakterinin en yüksek ve en düşük ramnolipit üretim miktarlarına ulaştığı saat belirlenmiştir.

Çalışmanın bu kısmında, farklı oranlarda (% 0,1 ve % 1) karbon kaynakları içeren minimal ortamda, farklı sıcaklık ve farklı çalkalama koşulları uygulanarak kıyaslama yapılmıştır.

Çalışmamızın diğer kısmında, zeytinyağı atık suyu ve peyniraltı suyu ortamlarında (doğal besiyerinde) ramnolipit üretimleri zamana bağlı olarak belirlenmiş, farklı sıcaklık ve farklı çalkalama koşulları uygulanarak Pa ve PaJC bakterilerinin en yüksek ve en düşük ramnolipit üretim miktarlarına ulaştığı saat belirlenmiştir.

5.1. 30 °C'de Farklı Karbon Kaynakları (Glikoz, Sükroz, Gliserol) İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi

5.1.1. Glikoz içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 glikoz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm'de, PaJC'ın ramnolipit üretim miktarı açısından Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği sonucuna varılmıştır. (Şekil 4.1 a). 200 rpm'de ise; 100 rpm'e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm'de PaJC'ın Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği, Pa'nın ramnolipit miktarının ise PaJC'a paralel

fakat daha düşük miktarlarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 glikoz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; Pa ve PaJC arasında sadece 72. ve 96. saatlerde belirgin farklar oluşurken, 24. ve 48. saatlerde ise ramnolipit üretim miktarlarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Pa’nın, PaJC’a göre ramnolipit üretimi açısından önde olduğu görülmüştür (Şekil 4.1 b). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha yüksek miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. Bu durumda ortamı çalkalama hızı ile oksijenlendirmenin ramnolipit üretimini artırdığını söyleyebiliriz. 200 rpm’de, 100 rpm’de olduğu gibi Pa’nın, PaJC’a göre ramnolipit üretimi açısından önde olduğu görülmüştür (Şekil 4.2 b).

Sonuç olarak, % 1 glikoz içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 glikoz içeren ortamlara göre daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. Bu durumda artan substart miktarının ramnolipit üretimini olumlu yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesinin ramnolipit üretimini artırdığı % 1 glikoz içeren ortamda gözlenmesine rağmen, % 0,1 glikoz içeren ortamda ramnolipit üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda ya ortamdaki substrat tükenmiş ve atık madde miktarının da artmasından dolayı bakteri sayısı azalmış olabilir ya da bakterinin yaşadığı stres azalmış olabilir. Bu da sonuçta ramnolipit üretiminin azalmasına neden olmuştur.

5.1.2. Sükroz içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 sükroz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; en yüksek farkla Pa, 72. saatte 2,80 kat kadar gerçekleştirilmiş olsada, genel olarak PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.5 a). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha yüksek miktarlarda ramnolipit üretildiğini görülmektedir. 200 rpm’de 24. ve 48. saatlerde Pa daha fazla üretim gerçekleştirirken, 72. ve 96. saatlerde PaJC daha fazla ramnolipit üretmiştir. Sonuçta, PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.6 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 sükroz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; PaJC’ın Pa’ya göre daha fazla ramnolipit ürettiği, Pa’nın ramnolipit miktarının ise PaJC’a paralel fakat daha düşük miktarlarda olduğu gözlenmiştir. Genel olarak, PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.5 b). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha yüksek miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm’de en yüksek avantaj 24. saatte Pa’da görülürken,

48., 72. ve 96. saatlerde PaJC'in, Pa'dan avantajlı durumda olduğu gözlenmiştir. Genel olarak, PaJC'in Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.6 b).

Sonuç olarak, grafiklere baktığımızda % 1 sükroz içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 sükroz içeren ortamlara göre daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. Bu durumda artan substart miktarının ramnolipit üretimini olumlu yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini artırmıştır.

5.1.3. Gliserol içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 gliserol içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm'de; Pa ve PaJC'in ramnolipit üretim miktarları birbirlerine yakın olmakla birlikte sadece 48. saatte belirgin bir fark yaşanmıştır. Genel olarak, Pa'nın PaJC'dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.9 a). 200 rpm'de ise; 100 rpm'e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm'de, genel olarak PaJC'in Pa'dan daha fazla ramnolipit üreterek avantajlı durumda olduğu görülmektedir (Şekil 4.10 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 gliserol içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm'de; genel olarak, PaJC'in Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.9 b). 200 rpm'de ise; 100 rpm'e göre daha yüksek miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm'de, ramnolipit üretim miktarı bakımından PaJC'in Pa'dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirdiği görülmektedir (Şekil 4.10 b).

Sonuç olarak, grafiklere baktığımızda % 1 gliserol içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 gliserol içeren ortamlara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Sadece % 0,1 gliserol içeren 100 rpm ortamdaki ramnolipit üretim miktarı, % 1 gliserol içeren 100 rpm ortama göre daha fazla miktarda olduğu görülmektedir. Gliserol, kullandığımız diğer karbon kaynaklarına göre yapısındaki bağlardan dolayı daha zor parçalanmaktadır ve parçalanması için daha fazla oksijen ihtiyacı duyar. % 0,1 gliserol içeren 100 rpm ortamdaki bakteriler oksijen yetersizliğinden dolayı ortamdaki besini kullanamama stresini yaşayarak ramnolipit miktarını artırmış olabileceği kanısındayız. Aynı zamanda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesinin ramnolipit üretimini artırdığı % 1 gliserol içeren ortamlarda gözlenmesine rağmen % 0,1 gliserol içeren ortamlarda aynı durum gözlenmemiştir. Bu durumda gliserolün moleküler yapısı daha belirleyici rol oynayarak, ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi gliserolün

yıkımını artırmış olabileceğini düşündürmektedir.

5.2. 37 °C’de Farklı Karbon Kaynakları (Glikoz, Sükroz, Gliserol) İçeren Minimal Besi Ortamında Ramnolipit Üretimi

5.2.1. Glikoz içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 glikoz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; genel olarak, Pa’nın PaJC’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.3 a). 200 rpm’de ise; Pa, 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretimi gerçekleştirirken, PaJC’nın daha yüksek miktarlarda ramnolipit ürettiği görülmektedir. 200 rpm’de PaJC’nın Pa’dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirdiği görülmektedir (Şekil 4.4 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 glikoz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; Pa ve PaJC’nın ramnolipit üretim miktarlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.3 b). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiği görülmektedir. 200 rpm’de Pa, PaJC’dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.4 b).

Sonuç olarak, grafiklere baktığımızda % 1 glikoz içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 glikoz içeren ortamlara göre daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. Ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz etkilemiştir. Bu durumda ya ortamdaki substrat tükenmiş ve atık madde miktarının da artmasından dolayı bakteri sayısı azalmış olabilir ya da bakterinin yaşadığı stres azalmış olabilir. Bu da ramnolipit üretiminin azalmasına neden olmuştur.

5.2.2. Sükroz içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 sükroz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; Pa’nın PaJC’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.7 a). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiğini görülmektedir. 200 rpm’de PaJC, Pa’dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.8 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 sükroz içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; genel olarak, Pa’nın PaJC’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir. (Şekil 4.7 b). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha yüksek

miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. Genel olarak, PaJC'nın Pa'dan daha fazla ramnolipit üretmiş olduğu görülmektedir (Şekil 4.8 b).

Sonuç olarak, grafiklere baktığımızda % 1 sükroz içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 sükroz içeren ortamlara göre daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. % 0,1 sükroz içeren ortamda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Bunun nedenleri arasında ortamdaki oksijen miktarının artması, bakterinin sükrozu parçalamasını kolaylaştırmış olması ve bakteri yaşadığı stresi de azalttığından ramnolipit üretimini de azaltmış olabileceği sanılmaktadır.

5.2.3. Gliserol içeren minimal besi ortamında ramnolipit üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini % 0,1 gliserol içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm'de; Pa ve PaJC'nın ramnolipit üretim miktarları birbirine yakın olmakla birlikte Pa daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir. Pa, 72. saatte 3,66 kat daha fazla ramnolipit üretimi ile en yüksek düzeye çıkmıştır. Genel olarak, Pa'nın PaJC'dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.11 a). 200 rpm'de ise; 100 rpm'e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm'de PaJC'nın Pa'dan daha fazla ramnolipit üretmiş olduğu görülmektedir (Şekil 4.12 a).

Pa ve PaJC bakterilerini % 1 gliserol içeren ortamlarda ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm'de; PaJC'nın Pa'dan belirgin farkla fazla miktarda ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.11 b). Genel olarak 200 rpm'de ise; 100 rpm'e göre daha yüksek miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm'de PaJC'nın Pa'dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.12 b).

Sonuç olarak, % 1 gliserol içeren ortamlardaki ramnolipit üretim miktarı, % 0,1 gliserol içeren ortamlara göre daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. Sadece % 0,1 gliserol içeren 100 rpm ortamdaki ramnolipit üretim miktarı, % 1 gliserol içeren 100 rpm ortama göre daha fazla miktarda olduğu görülmektedir. Gliserol, kullandığımız diğer karbon kaynaklarına göre yapısındaki bağlardan dolayı daha zor parçalanmakta ve daha fazla oksijen ihtiyacı duymaktadır. % 0,1 gliserol içeren 100 rpm ortamdaki bakteriler oksijen yetersizliğinden dolayı ortamdaki besini kullanamama nedeniyle ramnolipit miktarını artırmış olabilir. Aynı zamanda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesinin ramnolipit üretimini artırdığı % 1 gliserol içeren ortamlarda gözlenmesine rağmen % 0,1 gliserol içeren ortamlarda bu durum gözlenmemiştir. Bu durumda gliserolün moleküler yapısı daha belirleyici rol alarak, ortamın çalkalama hızı

ile oksijenlendirilmesi gliserolün yıkımını artırmış olabilir. Bakteride stres azaldığından ramnolipit üretimini de azaltmış olacağını düşündürmektedir.

5.3. 30 °C’de Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; PaJC’ın Pa’dan belirgin farkla fazla miktarda ürettiği görülmektedir. Pa’nın ise, PaJC’a paralel fakat düşük miktarlarda olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiği görülmektedir. 200 rpm’de genel olarak farkın sadece 24. saatte olduğunu, 48., 72. ve 96. saatlerde ise, PaJC’ın ramnolipit üretim miktarında azalma ile birlikte Pa’ya paralel fakat düşük miktarlarda olduğu görülmektedir. Buna rağmen genel olarak, ramnolipit üretim miktarları bakımından PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirdiği görülmektedir (Şekil 4.14).

Sonuç olarak, grafikleri karşılaştırdığımızda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun kimyasal oksijen ihtiyacı çok yüksektir. Bu da, bakterinin ortamdaki organik bileşikler kullanmasını zorlaştırmış olabileceğini düşündürmektedir.

5.4. 37 °C’de Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini zeytinyağı fabrikası atık suyu ortamında ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; anlamlı bir farkın sadece 48. saatte olduğunu, 24., 72. ve 96. saatlerde ise, Pa’nın ramnolipit üretim miktarı PaJC’a paralel fakat düşük miktarlarda olduğu görülmektedir. Genel olarak, PaJC, Pa’dan daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.15). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiği görülmektedir. 200 rpm’de sadece 48. saatte PaJC, Pa’dan daha fazla ramnolipit üretmesine rağmen genel olarak Pa, PaJC’dan daha fazla ramnolipit üretmiştir (Şekil 4.16).

Sonuçta, grafikleri karşılaştırdığımızda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun kimyasal oksijen ihtiyacı çok yüksektir. Bu da, bakterinin ortamdaki organik bileşikler kullanmasını zorlaştırmış olabileceği kanısındayız.

5.5. 30 °C’de Peyniraltı Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini peyniraltı suyu ortamında ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; PaJC’ın Pa’dan belirgin farkla fazla miktarda ürettiği görülmektedir (Şekil 4.17). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre Pa, daha yüksek miktarda ramnolipit üretirken, PaJC’ın daha düşük miktarda ramnolipit ürettiği görülmektedir. 200 rpm’de genel olarak, PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.18).

Sonuç olarak, grafikleri karşılaştırdığımızda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Peyniraltı suyunun kimyasal oksijen ihtiyacı çok yüksektir. Bu da, bakterinin ortamdaki organik bileşiklerini kullanmasını zorlaştırmış olabileceği kanısındayız.

5.6. 37 °C’de Peyniraltı Suyu Ortamında Ramnolipit Üretimi

Pa ve PaJC bakterilerini peyniraltı suyu ortamında ramnolipit üretimlerini incelediğimizde; 100 rpm’de; PaJC’ın Pa’dan fazla miktarda ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.19). 200 rpm’de ise; 100 rpm’e göre daha düşük miktarlarda ramnolipit üretildiğini görmekteyiz. 200 rpm’de genel olarak, PaJC’ın Pa’dan daha fazla ramnolipit ürettiği görülmektedir (Şekil 4.20).

Sonuç olarak, grafikleri karşılaştırdığımızda ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Peyniraltı suyunun kimyasal oksijen ihtiyacı çok yüksektir. Bu da, bakterinin ortamdaki organik bileşiklerini kullanmasını zorlaştırmış olabileceği kanısındayız.

Sonuçlara genel olarak baktığımızda;

Sıcaklık bakımından ramnolipit üretimi; 37 °C’de 30 °C’ye göre daha fazla miktarda olmuştur. Bunun nedeni enzimlerin en iyi optimum 30 °C -35 °C sıcaklıkta çalışmasıdır. Daha düşük ve daha yüksek sıcaklıklar enzimlerin çalışma hızını azaltıcı etki yapmaktadır. 37 °C’de bakteri enziminin yeterli hızda çalışmamasından dolayı bakteri strese girerek daha fazla ramnolipit üretmiş olabilir. Sadece % 1 glikoz içeren besi ortamında 30 °C 200 rpm’de 37 °C’ye göre yaklaşık 3,49 kat daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleşmiştir.

Ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi bakımından sonuçlara bakıldığında ramnolipit üretimi bazen olumlu bazen olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Ortamın çalkalama hızı ile oksijenlendirilmesi genellikle Pa’yı olumlu yönde etkilerken, PaJC’ı

olumsuz yönde etkilemiştir. Bunun nedeni, VHB/vgb sisteminin oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda daha etkin çalışmasından kaynaklanmaktadır.

Besi ortamı bakımından bakıldığında ise en fazla ramnolipit üretiminin peyniraltı suyu (en düşük 96. saatte 1553,33 mg/L ve en yüksek 72. saatte 13300 mg/L) tarafından gerçekleştirildiğini görmekteyiz. Bunu sırasıyla sükroz (en düşük 72. saatte 85,33 mg/L - en yüksek 24. saatte 6458,89 mg/L), glikoz (en düşük 96. saatte 28,07 mg/L - en yüksek 96. saatte 5881,11 mg/L), zeytinyağı fabrikası atık suyu (en düşük 24. saatte 47,4 mg/L - en yüksek 72. saatte 417,56 mg/L) ve gliserol (en düşük 72. saatte 8,29 mg/L- en yüksek 72. saatte 151,18 mg/L) takip etmektedir. Peyniraltı suyunda hem organik madde miktarı hem de kimyasal oksijen ihtiyacı yüksektir. Bakterinin stres koşullarına bağlı olarak daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleşmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Sükroz ise bir disakkarittir. Bakterinin sükrozu monomerlerine ayırmak için enzim sentezlemesi ve enerji harcaması gerekir. Glikoz monomer olduğu için sükroza göre bakteri tarafından daha kolaylıkla alınıp kullanılabilir. Ayrıca tüm canlıların ana enerji kaynağı olarak glikozu tercih etmeleri nedeniyle ortamda önce glikoz tüketilir. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun kimyasal oksijen ihtiyacı ve organik madde miktarının az olmasından dolayı peyniraltı suyuna göre ramnolipit miktarı azdır. Gliserol ise, yağların yapı taşıdır ve parçalanması oldukça zordur. Bundan dolayı bakteriler gliserolu çok zor kullandığından bakterilerin ölmesine yol açmış olabilir. Bu da ramnolipit üretimini olumsuz yönde etkilemiştir.

Çalışmamızda kullandığımız doğal besiyerlerini kendi aralarında karşılaştırdığımızda peynir altı suyunda, zeytinyağı fabrikası atık suyuna göre yaklaşık 20 kat daha fazla ramnolipit üretildiği görülmüştür. Sentetik besiyerlerini kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise, en yüksek ramnolipit üretimini sükrozun gerçekleştirdiğini görmekteyiz. Bunu sırasıyla glikoz ve gliserol takip etmektedir. Bu sonuçlara göre doğal besiyeri daha avantajlı görülmektedir. Ancak her doğal besiyeri de ramnolipit üretimi açısından yüksek verim verir diyemeyiz. Zeytinyağı fabrikası atık suyunda peyniraltı suyunda olduğu gibi verim elde etmememiz bunun göstergesidir.

En yüksek ramnolipit üretiminin çoğunlukla 72. saatte meydana geldiği araştırmalarımız sonucunda tespit edilmiştir. Bunun nedeni 72. saat ve sonrası kapalı sistemlerde sekonder metabolitlerin en yoğun üretildiği zaman dilimi olmasıdır. Çalışmamızda da bunu teyit edecek sonuçlar elde ettik. 64 referans noktasının 25 tanesinde (11'i PaJC, 14'ü Pa tarafından) 72. saatte daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleştirilmiştir. Yani, sekonder (durağan) fazda üretimin gerçekleştiği görülmüştür. Bunu sırasıyla 96., 24. ve 48. saatler izlemektedir. Ayrıca en yüksek üretim kapasitesi

genellikle PaJC tarafından gerçekleştirilmiştir. Özellikle peyniraltı suyunda PaJC, bütün şartlarda Pa'dan daha fazla (PaJC, en yüksek 13300 mg/L, en düşük 2175,56 mg/L) ramnolipit üretmiştir. Zeytinyağı fabrikası atık suyunda 37 °C 200 rpm hariç diğer şartlarda PaJC (en yüksek 417,56 mg/L, en düşük 54,62 mg/L) üstün durumdadır. % 1'lik sükroz bulunan ortamlarda 37 °C 100 rpm; % 0,1'lik sükroz bulunan ortamlarda 30 °C 200 rpm ve 37 °C 100 rpm hariç diğer durumlarda PaJC (en yüksek 6458,89 mg/L, en düşük 85,33 mg/L) daha fazla ramnolipit üretmiştir. % 0,1'lik gliserol bulunan ortamlarda 30 °C 100 rpm ve 37 °C 100 rpm hariç diğer durumlarda ve % 1'lik gliserol bulunan ortamlarda PaJC (en yüksek 139,51 mg/L, en düşük 19,07 mg/L) daha fazla ramnolipit üretmiştir. % 0,1'lik glikoz bulunan ortamlarda 37 °C 100 rpm hariç diğer şartlarda PaJC (en yüksek 3536,67 mg/L, en düşük 46,96 mg/L) üstün durumdadır. % 1'lik glikoz bulunan ortamlarda ise, PaJC avantaj yakalayamamıştır. Bunun nedeni VHb/*vgb* sisteminin, glikoz miktarındaki artıştan negatif yönde etkilenmesidir. Glikoz fazlalığında, genin promotörü baskılanmaktadır. Pa'nın bazı şartlarda PaJC'dan üstün olmasının sebebi ise, PaJC'da bulunan fazladan genin bakteri üzerinde metabolizmayı yorucu etki yapmış olması olabilir. Fazladan gen bakterinin fazladan protein sentezlemesi anlamına gelir. Fazladan protein bakterinin fazladan enerji harcamasını gerektirir.

Farklı oranlarda minimal besiyerine katılan karbon kaynakları açısından incelediğimizde ise, % 1 oranında karbon kaynağı katılan ortamlardaki ramnolipit miktarının % 0,1 oranında karbon kaynağı katılan ortamlara göre daha fazla üretim görülmüştür. Sadece gliserol bulunan 100 rpm besi ortamında bu durum gözlenmemiştir.

Yapılan bir çalışmada, ramnolipit üretimi için en uygun optimum inkübasyon sıcaklığının 30 °C ve pH'nın ise 7 olduğu saptanmıştır. Ayrıca optimum inkübasyon süresi ise 72 saat olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada ramnolipit üretimi için en uygun glikoz konsantrasyonunun % 2 olduğu (0,380 g/l ramnolipit üretimi ile) saptanmıştır. Bu konsantrasyonda ramnolipit üretimi en yüksek değerdedir ve konsantrasyonun artması ramnolipit üretimini ters yönde etkilemektedir. Ramana ve ark., (1991)'nin konu ile ilgili yaptığı çalışmalar bu bulguları destekler niteliktedir [117]. Bizim pH 7'de yaptığımız çalışmalarımız sonucunda, ramnolipit üretimi açısından % 1'lik karbon kaynağı konsantrasyonunda % 0,1'lik karbon kaynağı konsantrasyona göre daha uygun olduğunu saptadık. Sadece % 0,1 gliserol içeren 100 rpm ortamda, % 1 gliserol içeren 100 rpm ortama göre daha fazla miktarda ramnolipit üretimi olduğunu tespit ettik. Sıcaklık bakımından ise, 37 °C'de 30 °C'ye göre daha fazla ramnolipit üretiminin

gerçekleştirdiğini tespit ettik.

Değişik karbon kaynaklarının ramnolipit üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada karbon kaynağı olarak mannitol ve gliserol içeren kültür ortamlarından [118] ramnolipit verimi diğer karbon kaynaklarını içeren kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Benzer bulgular Ramana ve Karanth'ın (1989) konu ile ilgili yaptığı çalışmada gösterilmiştir [107]. Ancak mannitol ve gliserol maliyetleri oldukça yüksek karbon kaynaklarıdır. Dolayısı ile bu tür endüstriyel uygulamalar için tercih edilmezler. Zeytinyağı fabrikası atık suyu bileşimi içinde de bu şeker alkoller yer almamaktadır. Aynı çalışmada gliserol ve mannitol'den sonra en yüksek ramnolipit üretimi glikoz içeren kültür ortamında bulunmuştur. Bunu sırasıyla fruktoz, ramnoz, sükroz, maltoz ve galaktoz takip etmektedir. Nişasta içeren kültür ortamında ise ramnolipit üretimine hiç rastlanmamıştır. Ramnolipit üretiminde redüktör şeker ihtiva eden kültür ortamlarının uygun karbon kaynağı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [107,119]. Bizim yaptığımız çalışmada ise bu çalışmadan farklı olarak en fazla ramnolipit üretimi peyniraltı suyunda görülmüştür. Bunu sırasıyla sükroz, glikoz, zeytinyağı atık suyu ve gliserol takip etmektedir.

Bazı çalışmalarda ise yalnızca glikoz içeren ortamların yerine bitkisel yağlarla karışım halindeki kültür ortamlarında ramnolipit üretiminin daha yüksek değerlerde olduğu vurgulanmıştır [120].

Bir başka çalışmada ise gliserolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı BMSM (Basal Mineral Salt Medium) sıvı besi ortamında *P. aeruginosa* suşu tarafından 12,92 g/L ramnolipit üretildiği rapor edilmiştir [51]. Bizim çalışmamızda bu çalışmaya göre farklı sonuçlar elde ettik. Gliserolü karbon kaynağı olarak kullandığımız minimal besi ortamında *P. aeruginosa* tarafından en düşük 8,29 mg/L, en yüksek 151,18 mg/L ramnolipit üretildiği görülmüştür.

Pseudomonas spp. suşlarının biyosüpfektan (ramnolipit) üretimi üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipit sentezinin ikincil metabolizma ile ilişkili olduğunu ve ikincil metabolitlerin sentezinin üremenin durgunluk fazına erişmesi ile arttığını göstermektedir. Ramnolipit eldesi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra yüksek ramnolipit sentezine üretimin 24, 90 ve 120 saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır [56,105-107]. Bizim de çalışmamızda bu çalışmaya benzer olarak en yüksek ramnolipit üretimi genelde 72. saatte bulundu.

Sudhakar Babu ve ark (1996); ramnolipit elde edilmesinde bazı sentetik maddeler ve peynir altı suyunu besi ortamı olarak kullanmışlar ve mikroorganizmaların peynir altı

suyu atık maddelerinde spesifik büyüme oranları ve ürün oluşturma oranlarının sentetik besi ortamlarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini ve ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesinde peynir altı suyu atık maddelerinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir [121]. Bizim çalışmamızda da yapılan bu çalışmayla uyumlu olarak kullandığımız peyniraltı suyu atık maddesinde diğer sentetik besiyerlerine göre daha fazla ramnolipit üretimi gerçekleşmiştir.

Biyosüpfektanların üretimi, sentetik süpfektanlara göre günümüzde henüz arzu edilen düzeyde değildir. Biyosüpfektan üretiminde atık madde kullanılarak üretim maliyetinin düşürülebilmesi, ekstrem koşullarda kullanılabiliirliği, çok düşük toksik etkileri ve performans açısından sentetik türleri ile arasında fark olmaması gibi özellikleri nedeniyle üretimin miktarının arttırılacağı şüphesizdir. Ayrıca, mevcut atıkların kullanılabilmesi sayesinde günümüz dünyasının en önemli sorunlarından çevre kirliliğinin azaltılmasına da, katkıda bulunulacaktır. Mikrobiyal kaynaklı ekonomik biyosüpfektan üretiminde standart ve stabil bir üretimin sağlanabilmesi için, mikroorganizmaların gelişimleri sıcaklık, pH ve uygun besiyeri koşullarının temini üzerinde durulması gereken unsurlardır [37]. Bütün bunlar, biyosüpfektanlardan daha etkin yararlanabilmemiz için dikkat etmemiz gereken özelliklerdir. Ayrıca, sonuçlarımızdan da anlaşılacağı üzere VHb/vgb sistemi aktarıldığı bakteriye önemli avantajlar sağlamaktadır. VHb/vgb sistemi sayesinde oksijenin yetersiz olduğu ortamlarda daha yüksek verim elde edilebilir.

Doğal (peyniraltı suyu ve zeytinyağı fabrikası atık suyu) ve sentetik (glukoz, sükröz ve gliserol içeren) ortamlardan biyosüpfektan elde edilmesini amaçlayan bu çalışmamız ülkemiz ekonomisi ve ekolojisi için oldukça önemlidir. Bununla ilgili birçok araştırma yapılmış olsa da bizim yaptığımız çalışma doğal ve sentetik ortamlarda vgb geni aktarılmış *P. aeruginosa* ile ramnolipit üretiminin nasıl ve ne seviyede olduğunun belirlenmesi yönünden farklıdır. Bu çalışmamızın bundan sonra yapılacak benzer konudaki bilimsel çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

6. KAYNAKLAR

- [1] V. Konar, M. Kahyaoğlu, *Ramnolipit biyosürfektanlarının üretiminde endüstriyel atık maddelerinin kullanılması ve ramnolipitlerin uygulama alanları*, **Dumlupınar Ünv. Fen Bil. Enstitüsü Dergisi**, 12 (2006) 1302-3055.
- [2] A. Telefoncu, *Biyoteknoloji*, Ege Ünv. Fen Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir, 1995.
- [3] J. W. C. Wong, M. Fang, Z. Zhao, B. Xing, *Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions*, **J. Environ. Qual.**, 33:6 (2004), 2015-2025.
- [4] J. D. Desai and I. M. Banat., *Microbial production of surfactants and their commercial potential*, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 61 (1997) 47–64.
- [5] <http://w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/surfaktan.html>
- [6] <http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS8%282%29/C.RangelYagui/solubilization.htm>
- [7] S. S. Cameotra, and R. S. Makkar, *Synthesis of biosurfactants in extreme conditions*, **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 50 (1998) 520-529.
- [8] V. Mezzanotte, F. Castiglioni, R. Todeschini, M. Pavan, *Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants*, **Bioresource Technol.**, 87 (2003) 87-91.
- [9] R. S. Makkar, K. J. Rockne, *Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 22:10 (2003) 2280-2292.
- [10] E. Liwarska-Bizokoje, M. Korneliusz, A. Malachowska-Jutcz, J. Kalka, *Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and noionic surfactants*, **Chemosphere**, 58 (2005) 1249-1253.
- [11] İ. Arslan-Alaton ve E. Erdinç, *Effect of photo-chemical treatment on the biocompatibility of a commercial nonionic surfactant used in the textile industrys*, **Water Res.**, 40:18 (2006) 3409-3418.
- [12] N. Kosaric, *Biosurfactants and their application for soil bioremediation*, **Food Technol. Biotechnol.**, 39:4 (2001) 295–304.
- [13] K. K. Gautam and V. K. Tyagi, *Microbial surfactants*, **J. Oleo Sci.**, 55:4 (2006) 155-166.
- [14] I. M. Banat, R. S. Makkar, S. S. Cameotra, *Potential commercial applications of microbial surfactants*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 53 (2000) 495-508.
- [15] R. S. Makkar, S. S. Cameotra, *An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 58 (2002) 428-434.
- [16] M. I. Van Dyke, H. Lee, J. T. Trevors, *Applications of microbial surfactants*, **Biotechnol. Adv.**, 9 (1991) 241-252.

- [17] E. Z. Ron, E. Rosenberg, *Natural roles of biosurfactants*, **Environ. Microbiol.**, 3 (2001) 229-236.
- [18] A. Uysal, A. Türkman, *Klorofenollü bileşiklerin ayrışabilirliğinin biyosüpfektan kullanımı ile hızlandırılması*, **SSKD**, 14:2 (2004) 23-30.
- [19] L. R. Rodrigues, J. A. Teixeira, R. Oliveira, *Biosurfactants: potential applications in medicine*, **Biochem. Eng. J.**, 32 (2006) 135–142.
- [20] D. C. Herman, Y. Zhang, R. M. Miller, *Rhamnolipid (Biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 63 (1997) 3622-3627.
- [21] J. C. Mata-Sandoval, J. Karns, A. Torrents, *High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on corn oil*, **J. Chromatog. A**, 864 (1999) 211.
- [22] L. Thimon, F. Peypoux, J. Wallach, G. Michel, *Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 128 (1995) 101-106.
- [23] R. Maget-Dana, M. Ptak, F. Peypoux, G. Michel, *Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic*, **Bioch. Bioph. Acta**, 815 (1985) 405–409.
- [24] Y. Tanaka, T. Tojo, K. Uchida, J. Uno, Y. Uchida, OC. Shida, *Method of producing iturin A and antifungal agent for profound mycosis*. **Biotechnol Adv.**, 15 (1997) 234.
- [25] S. M. Eshita, N. H. Roberto, J. M. Beale, B. M. Mamiya, R. F. Workman, *Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolation, structures, and antifungal activities of the congeners*, **J. Antibiot.**, 48:11 (1995) 1240-1247.
- [26] A. L. Moyne, R. Shelby, T. E. Cleveland, S. Tuzun, *Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against Aspergillus flavus*, **J. Appl. Microbiol.**, 90 (2001) 622-629.
- [27] Y. R. Chung, C. H. Kim, I. Hwang, J. Chun, *Paenibacillus koreensis sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound*, **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 50 (2000) 1495.
- [28] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, M. Manresa, *Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa LBI from soapstock*, **Anton. Leeuw.**, 85 (2004) 1-8.
- [29] A. Abalos, A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. Garcia, A. Manresa, *Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from soybean oil refinery waste*, **Langmuir**, 17 (2001) 1367-1371.
- [30] D. Haferburg, R. Hommel, H. P. Kleber, S. Klug, G. Schuster, H. J. Zchienger, *Antiviral activity of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa*, **Acta Biotech.**, 7 (1987) 353–356.

- [31] T. Benjamas, P. Wanna, L. Anirut, A. Panarat, P. Wipawan, N. Teruhiko, K. Hiroshi, *Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa B189 isolated from milk factory waste*, **Bioresource Technol.**, 98 (2007) 1149-1153.
- [32] T. Meylheuc, C. J. Van Oss, M. N. Bellon-Fontaine, *Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of Listeria monocytogenes LO28*, **J. Appl. Microbiol.**, 91 (2001) 822-832.
- [33] J. R. Mireles, A. Toguchi, R. M. Harshey, *Salmonella enterica Serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation*, **J. Bacteriol.**, 183 (2001) 5848-5854.
- [34] P. Singh, S. S. Cameotra, *Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences*, **Trends Biotech.**, 22 (2004) 142-146.
- [35] S. Maneerat, *Biosurfactants from marine microorganisms*, **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 27:6 (2005b) 1263-1272.
- [36] N. H. Youssef, K. E. Duncan, M. J. McInerney, *Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 71:2 (2005) 7690-7695.
- [37] T. Kaya, "Research of surface active properties of some microorganisms in various industrial wastes" M.Sc. Thesis, Gazi University Turkey, 2008.
- [38] C. Calvo, F. Martínez-Checa, F. Toledo, J. Porcel, E. Quesada, *Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by Halomonas eurihalina and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons*, **Appl. Microbiol. Biotech.**, 60 (2002) 347-351.
- [39] I. O. Moraes, M. Benincasa, R.M. Alegre, *Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of Pseudomonas aeruginosa*, **Braz. J. Food Technol.**, 60:5 (2002) 145-149.
- [40] R. M. Patel, A. J. Desai, *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa GS3 from molasses*, **Lett. Appl. Microbiol.**, 25 (1997) 91-94.
- [41] L. H. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter, *Dependence of Pseudomonas aeruginosa continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors*, **Appl. Microbiol. Biot.**, 24 (1986) 443-448.
- [42] R. A. Al-Tahhan, T.R. Sandrin, A. A. Bodour, R. M. Maier, *Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 66:8 (2000) 3262-3268.
- [43] M. Bonilla, C. Olivaro, M. Corona, A. Vazquez, M. Soubes, *Production and characterization of a new bioemulsifier from Pseudomonas putida ML2*, **J. Appl. Microbiol.**, 98 (2005) 456-463.
- [44] Y. Zhang, R. M. Miller, *Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 61 (1995) 2247-2251.

- [45] B. D. Azma, "Extraction of copper from minning residues by rhamnolipids" Master Thesis, Concordia University, Montreal, Quebec, Canada, 2002.
- [46] S. Lang, D. Wullbrandt, *Rhamnose lipids-biosynthesis microbial production a application potential, applied microbiology and biotechnology*, **Appl. Microbiol. Biot.**, 51:1 (1999) 22-32.
- [47] R. M. Maier, G. Soberon-Chavez, *Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications*, **Appl. Microbiol. Biot.**, 54 (2000) 625-633.
- [48] K. S. Rahman, I. M. Banat, J. Thahira, Thayumanavant., P. Lakshmanaperumalsamy, *Bioremediation of gazoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant*, **Bioresource Technol.**, 81:1 (2002) 25-32.
- [49] J. W. C. Wong, M. Fang, Z. Zhao, B. Xing, *Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions*, **J. Environ. Quality**, 33:6 (2004) 2015-2025.
- [50] Z. Guo-liang, W. Yue-ting, Q. Xin-ping, M. Qin, *Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids*, **J. Zhejiang University Science**, 6B (8) (2005) 725-730.
- [51] G. Zhang, Y. Wu, X. Qian, Q. Meng, *Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids*, **J. Zhejiang University Science**, 6B (8) (2005) 725-730.
- [52] M. Kumar, V. Leon, A. D. S. Materano, O. A. Ilzins, *Enhancement of oil degradation by co-culture, of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria*, **Polish Microbiol.**, 55:2 (2006) 139-146.
- [53] R. Song, Z. Hua, H. Li, J. Chen, *Biodegradation of petroleum hydrocarbons by two Pseudomonas aeruginosa strains with different uptake modes*, **J. Environ. Sci. Heal.**, 41 (2006) 733–748.
- [54] F. G. Jarvis, M. J. Johnson, *A glyco-lipide produced by Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, 71 (1949) 4124-4126.
- [55] R. M. Miller, *Biosurfactant facilitated remediation of metal contaminated soils*, **Environ. Heal. Pers.**, 103 (1995) 59-62.
- [56] M. E. Mercada, M. A. Manresa, M. Robert, M. J. Espuny, C. D. Andres, J. Guinea, *Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production*, **Bioresource Technol.**, 43 (1993) 1-6.
- [57] M. Hamdi, *Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater*, **Bioresource Technol.**, 36 (1991) 173-178.
- [58] M. Hamdi, C. Festino, C. Aubart, *Anaerobic digestion of oil mill wastewaters in fully mixed reactors and in fixed film reactors*, **Process Biochem.**, 27 (1992) 37-42.
- [59] E. Ercoli, R. Etrola, *SCP from olive black water*, **Biotechnol. Lett**, 5:7 (1983) 457-462.

- [60] F. Federici, G. Montedoro, M. Servili, M. Petrucciolo, *Pectic enzyme production by *Cryptococcus albidus albidus* on olive vegetation waters enriched with sun-flower calathide meal*, **Biol. Wast.**, 25 (1988) 291-301.
- [61] J. A. Fiestas, *Current status of research and technology concerning the problems posed by vegetation water*, In International Symposium on Olive Oil By-Products Valorization, 1986.
- [62] S. Kahraman, O. Yeşilada, *Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*, **Folia Microbiol. Rev.**, 44:6 (1999) 673-676.
- [63] <http://geka.org.tr/yukleme/dosya/zeytinatiklarinindegerlendirilmesi.pdf>
- [64] A. H., Ensminger, M. E., Ensminger, J. E. Konlande, J. R. K., Robson, *Milk and milk products. The Concise encyclopedia of foods and nutrition*, CRC Press Inc, U.S.A, 1995, 691-710.
- [65] Velioğlu Öğünç, A., Yalçın A. S., *Süt serumu proteinlerinin in vitro koşullardaki antioksidan etkileri*, **Marmara Eczacılık Dergisi**, 15 (2011) 18-24.
- [66] <http://www.forumfood.net/peyniralti-suyunun-degerlendirilme-olanaklari-t24057.html?s>
- [67] T. Uraz, *Peynir suyu ve degeri*, **Gıda Dergisi**, 1 (1978) 17-21.
- [68] F. V. Kosikowski, *Whey and whey foods. In cheese and fermented milk foods*, Edwards Brothers Inc., Brooktondale, New York, 1982, 446-469.
- [69] E. O. Rukke, *Fermentation, chemical and biochemical transformation of whey*, **Meieriposten**, 79:18 (1990) 559-565.
- [70] F. Havel, *Economic comparisons of methods of whey utilization*, **Prumysl-Potravin**, 41:6, 1990, 304-307.
- [71] R. S. Patel, H. M. Jayaprakasha, S. Singh, *Recent advances in concentration and drying of whey*, **Indian-Dairyman**, 4:39 (1991) 417-421.
- [72] T. Sienkiewicz, C. L. Riedel, *Whey and whey utilization: possibilities for utilization in agriculture and foodstuffs production*, Verlag Th. Mann. Gelsenkirchen-Buer, Germany, 1990, 379.
- [73] C. L. Riedel, *Whey utilization. Situation and prospects*, **Deutsche-Milchwirtschaft**, 39:49 (1988) 1780-1789.
- [74] E. J. Mann, *Whey utilisation - Part 2*, **Dairy-Industries-International**, 56:4 (1991) 18-19.
- [75] T. Uraz, *Peynir suyu ve değerlendirme şekilleri*, **Sınai Eğitim ve Geliştirme Merkezi, Ankara**, 103 (1981) 208-205.
- [76] T. Uraz, *Homojenizasyon işleminin peyniraltı suyu bileşimine etkisi*, Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu, (1989) 178-183.
- [77] E. Apohan, E. Birhanlı, “*Peyniraltı suyu ortamında beyaz çürükçül fungus peletleriyle lakkaz üretiminin araştırılması*” İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No:2008/58-2011.

- [78] F. Aydın, “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması” A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001.
- [79] M. Özcan, “Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa* 'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar” A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara, 1996.
- [80] D. B. Davis, R. Dulbecco, H. Eisen, H. S. Ginsberg, and W. B. Wood, *Microbiology*, Hober Medical Division, New York, 1968, 756-757.
- [81] M. Frobisher, *Fundamentals of microbiology*, W. B. Saunders Company, USA, 1968, s. 457.
- [82] <http://microworld-navigator.deviantart.com/art/Pseudomonas-aeruginosa-212457490>
- [83] <http://www.mikrobiyoloji.org>
- [84] A. Ilgaz, *Özel mikrobiyoloji*, Medison Yayınları, Ankara, (1999) 91-96.
- [85] S. G. Wilson and A. A. Miles, *Principles of bacteriology and immunity*, Edward Arnold (Publishers) Ltd. London, 1964, 636-643..
- [86] J. G. Tortora, R. B. Funke and L. C. Case, *Microbiology*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California, 1992, 169, 277, 523.
- [87] Karaboz ve Sukatar, *Bakterilerde sosyal davranışlar (Bakterilerde iletişim mekanizmaları)*, **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 02:05 (2004), 23-32.
- [88] E. P. Greenberg, *Bacterial communication and group behavior*, **J. Clin. Invest.**, 112:9 (2003) 1288-1290.
- [89] M. T. Madigan, J. M. Martinko and J. Parker, *Biology of microorganisms*, Prentice- Hall Int. Ltd. London, 2000.
- [90] M. J. Federle and B. Bassler, *Interspecies communication in bacteria*, **J. Clin. Invest.**, 112:9 (2003) 1291-1299.
- [91] R. Daniels, J. Vanderleyden and J. Michiels, *Quorum sensing and swarming migration in bacteria*, **FEMS Microbiol. Rev.**, 28 (2004) 261-289.
- [92] A. Podbielski, and B. Kreikemeyer, *Cell density-dependent regulation: basic principles and effect on the virulence of Gram-positive cocci*, **Int. J. Infect. Dis.**, 8:2 (2004) 81-95.
- [93] K. B. Xavier and B. L. Bassler, *LuxS quorum sensing: more just a numbers game*, **Cur. Opin. Microbiol.**, 6 (2003) 191-197.
- [94] A. Sukatar ve İ. Karaboz, *Sucul canlılarda biyoluminesens*, **E.Ü. Su Ürünleri Dergisi**, 18:3-4 (2001) 547-554.
- [95] B. R. Boles, M. Thoendel, P.K. Singh, *Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms*, **Mol. Microbiol.**, 57:5 (2005) 1210-1223.

- [96] D. G. Davies, C. N. Marques, *A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms*, **J. Bacteriol.**, 191:5 (March 2009) 1393–403.
- [97] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/>
- [98] D. G., Davies, M. R., Parsek, J. P. Pearson, B. H., Iglewski, J. W. Costerton, E. P. Greenberg, *The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm*, **Sci.**, 280 (1998) 295-298.
- [99] S. Aydın, N. Kılıç, *Bakteriyel hemoglobin, Vitreoscilla Hemoglobin (VHb)*, **Türk Biyokimya Dergisi**, (2000) 152-157.
- [100] E. Aytan, “*Vitreoscilla hemoglobin geninin Erwinia herbicola’ya klonlanması ve L-dopa üretimi üzerine etkisi*” Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2009.
- [101] K. Dubey, A. Juvarkar, *Distillery and curd whey waste as visable alternative source for biosurfactant production*, **World J. Microbiol. Biotech.**, 17 (2001) 61-69.
- [102] L. Al-Araji, R. Noor, Z. Raja, A. Rahman, M. Basri and A. B. Salleh, *Microbial surfactant*, **Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.**, 15:3 (2007) 99-105.
- [103] B. K. Tuleva, G. R. Ivanov and N. E. Christova, *Biosurfactant production by a new Pseudomonas putida strains*, **Z. Naturforsch.**, 57c (2002) 356-360.
- [104] D. Onbaşılı, “*Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi*” Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Türkiye, 2006.
- [105] C. Sylatk and F. Wagner, *Production of biosurfactants. In biosurfactants and biotechnology*, (ed.) N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray, M. Dekker, New York, 1987, 89-120.
- [106] K. V. Ramana and N. G. Karanth, “*Production of biosurfactants by the resting cells of Pseudomonas aeruginosa CFTR-6*”, **Biotech. Lett.**, 11 (1989a) 437- 442.
- [107] K. V. Ramana and N. G. Karanth, *Factors affecting biosurfactant production using Pseudomonas aeruginosa CFTR-6 under submerged conditions*, **J. Chem. Tech. Biotech.**, 45 (1989b) 249-258.
- [108] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante, A. Manresa, *Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47 T2 NCBIM 40044*, **Biotechnol. Bioeng.**, 81:3 (2000) 316-322.
- [109] J. W. Chung, D. A. Webster, K. R. Pagilla and B. C. Stark, *Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability*, **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.**, 27:1 (2001) 27-33.
- [110] Y. Wei, C. Chou, J. Chang, *Rhamnolipid production by indigenous Pseudomonas aeruginosa J4 originating from petrochemical wastewater*, **Bioch. Eng. J.**, 27 (2005) 146-154.

- [111] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*, **Anal. Chem.**, 28 (1956) 350- 356.
- [112] M. Benincasa, J. Contiero, M. A. Manresa, I. O. Moraes, *Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source*, **J. Food Eng.**, 54 (2002) 283-288.
- [113] A. Abalos, F. Maximo, M. A. Manresal, J. Bastida, *Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa AT10*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 77 (2002) 777-784.
- [114] E. V. Chandrasekaran and J. N. Bemiller, *Constituent analyses of glycosaminoglycans*, In: *Methods in compounds. Carbohydrate chemistry* (R. L. Whistler, ed.), Academic Pres, New York, 1980, pp. 89-96.
- [115] E. R. Roberts, *Remediation of petroleum contaminated soils*, Lewis Publishers, New York Washington, D.C., 1992, 139, 249.
- [116] H. Kahraman, “Bakteriyel hemoglobin geni klonlanmış *Pseudomonas sp.*’lerinin çeşitli zararlı aromatik madde yıkım potansiyellerinin araştırılması” Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2004.
- [117] U. Sidal, N. Kolankaya, C. Kurtonur, *Pseudomonas sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosüpfektan eldesi*, **Türk J. Biol.**, 24 (2000) 611-625.
- [118] A. S. Abu-Ruwaida, I. M. Banat, S. Haditirto, A. Salem, M. Kadri, *Isolation of biosurfactant producing bacteria; product, characterization and evaluation*, **ACTA Biotechnol**, 11 (1991) 315-324.
- [119] M. E. V. Singer, W. R. Finnerty, *Physiology of biosurfactant synthesis by Rhodococcus species H13-A*. **Can. J. Microbiol.**, 36:11 (1990) 741-745.
- [120] M. E. Mercada and M. A. Manresa, *The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. j of the am*, **Oil Chem. Society**, 71:1 (1994) 61-64.
- [121] P. Sudhakar-Babu, A. N. Vaidya, A. S. Bal, R. Kapur, A. Juwarkar, P. Khanna, *Kinetics of biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa strain BS2 from industrial waste*, **Biotechnol. Lett.**, 18 (1996) 263-268.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : AYLİN ÇOLAK
Doğum Yeri ve Tarihi : İSTANBUL/KADIKÖY - 07.12.1980

EĞİTİM DURUMU

İlkokul :Barbaros İlköğretim Okulu (Malatya, 1986–1991)
Ortaokul :Atatürk İlköğretim Okulu (Malatya,1991–1994)
Lise : Malatya Lisesi (Malatya, 1994–1997)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği
Bölümü, (Malatya, 1998–2003)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, (Malatya, 2008-2012)

İŞ DENEYİM

- * Malatya Hekimhan Kurşunlu İlköğretim Okulu Vekil Öğretmenlik (4 ay)
- * Malatya Seviye Dershanesinde Etüt Öğretmenliği (1 yıl)
- * Malatya Akçadağ Şehit Hava Üstğ. Semih Desticioğlu İlköğretim Okulu Vekil Öğretmenlik (1 ay)
- * İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde memuriyet (2007-.....)

BİLİMSEL FAALİYET

Biyosüpfektanlar (Malatya İnönü Üniversitesi, Yüksek Lisans Semineri, 2011)