

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

169300

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VE *PSEUDOMONAS PUTIDA*
MİKROORGANİZMALARINDAN YARARLANILARAK
ENDÜSTRİYEL ATIK MADDELERDEN RHAMNOLİPİD ELDE EDİLMESİ**

Mustafa KAHYAOĞLU

Tez Yöneticisi
Yard.Doç.Dr. Vahit KONAR

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

ELAZIĞ
2005

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE *PSEUDOMONAS PUTIDA*
MİKROORGANİZMALARINDAN YARARLANILARAK
ENDÜSTRİYEL ATIK MADDELERDEN RHAMNOLİPİD ELDE EDİLMESİ

Mustafa KAHYAOĞLU

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

Bu tez,..... tarihinde, aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği / oy çokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman : Yard.Doç.Dr. Vahit KONAR

Üye : Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ

Üye : Doç.Dr. Sevda KIRBAĞ

Üye : Yard.Doç.Dr. Süleyman AYDIN

Üye : Yard.Doç.Dr. Ergin KARİPTAŞ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..06../05...tarih

ve 2005-13/11... Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Doktora Tezi

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VE *PSEUDOMONAS PUTIDA* MİKROORGANİZMALARINDAN YARARLANILARAK ENDÜSTRİYEL ATIK MADDELERDEN RHAMNOLİPİD ELDE EDİLMESİ**

Mustafa KAHYAOĞLU

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genel Biyoloji Anabilim Dalı

2005, Sayfa : 71

Doğada bir çok bakteri, maya ve funguslar biyoyüzeyaktif maddeler sentezlemektedir. Biyoyüzeyaktif maddeler katı, sıvı ve gaz moleküller arasında yüzey ve iç yüzey gerilimi azaltabilen yüzey aktif bileşiklerdir.

Genellikle *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen ve salınan ramnoz şekeri içeren glikolipid yapısındaki biyoyüzeyaktif maddelere ramnolipid denilmektedir. Toprak ve denizlerde çözünmeyen organik kirleticilerin parçalanmasında yararlanır. Çevre teknolojisi, tarım, gıda, eczacılık, kozmetik ve petrol endüstrisi gibi endüstriyel bir çok alanda kullanılır.

Şeker pancarı melası, şilempe ve peynir altı suyu endüstriyel atık maddelerdir. Melas, şilempe ve peynir altı suyu ülkemizde tarım endüstrinin en önemli kirleticileridir. Bu çalışmada melas şilempe ve peynir altı suyunda *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 ve *Pseudomonas putida* tarafından ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretilmesi amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada 90 saate melas'tan 0,78 gr/lt peynir altı suyundan 0,48 gr/lt ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretildiği, melas ve peynir altı suyunun kimyasal oksijen yüklerinin % 35-45 oranında azaldığı görülmüştür. Rhamnolipid karışımlarında Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) deki analizlerde melas ve peynir altı suyu ortamında mono ve di-ramnolipid'e sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu atık maddeler yanında diğer atık maddelerde benzer ramnolipid üretimler yapılabilir. Bu çalışma gelecekteki araştırmalara yararlı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler : Biyoyüzeyaktif madde, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomona putida*, Ramnolipid.

ABSTRACT**PhD Thesis****RHAMNOLIPID PRODUCTION BY *PSEUDOPMONAS AERUGINOSA* AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* MICROORGANISM USING FROM INDUSTRIAL WASTES**

Mustafa KAHYAOĞLU

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2005, Page : 71

Some bacteria, yeast and fungi are able to produce biosurfactants. Biosurfactants are surface active compounds capable of reducing surface and interfacial tension at the interfaces between liquids, solids and gases.

Pseudomonas aeruginosa produces and secretes rhamnolipids containing glycolipid biosurfactants called rhamnolipid. They are useful in remediation of insoluble organic pollutants in soil and marine environments. There are also a large number of industrial uses such as environmental technology, agriculture, food, pharmaceutical, cosmetic and oil industrial.

Sugar beet molasses and silage and cheese whey, which were from industrial waste. Molasses, silage and cheese whey are one of the major pollutants by agricultural industry in our country. This study was to biosurfactant as rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 and *Pseudomonas putida* from molasses, silage and cheese whey.

It was seen that amount of rhamnolipids biosurfactants are 0,78 gr/l in molasses and 0,48 gr/l in cheese whey substrate. COD of molasses and cheese whey was reduced by % 35-45 in 90 hours. In the analysis of High performance liquid chromatography in molasses and cheese whey medium mono-di rhamnolipid have been observed.

As a result beside these waste substrate other waste substrate may give similar rhamnolipid production. It will be a good subject to study on that for future research.

Key Words : Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, Rhamnolipid

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde, yol gösterici düşünce, değerli bilgileri ve yardımları ile her zaman için destek olan değerli hocam Yard.Doç.Dr. Vahit KONAR'a öncelikle teşekkürlerimi sunarım.

Tezin deneysel çalışmalarında gerekli malzeme ve laboratuvar olanaklarını esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanı ve öğretim elemanlarına,

Bu tezi 658'nolu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi FÜBAP Kurulu Başkanlığına;

Bütün çalışmalarında bana her zaman destek olan Sevgili Eşim oğlum ve Ailem'e emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
 GİRİŞ.....	 1
1.1. Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yapısı ve Özellikleri	4
1.2. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yapısı ve Özellikleri	8
1.3. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Sentezi	12
1.4. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Genetik Düzenlenmesi	15
1.5. Pseudomonasların Genel Özellikleri	16
1.6. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerinin Elde Edilmesinde Kullanılan Besiyortamları	 18
1.6.1. Yağ ve Yağ Atıklarından Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Sentezi	20
1.6.2. Tarım Endüstrisi Atık Maddelerinden Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Üretimi	 22
1.7. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerinin Kullanım Alanları	23
1.7.1. Metal Kirleticilere Karşı Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı .	25
1.7.2. Organik Kirleticilere Karşı Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı....	27
1.7.3. Biyolojik Mücadelede Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı.....	28
1.7.4. Sağlık ve Kozmetik Alanında Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı..	28

2. MATERYAL VE METOD	30
2.1. MATERYAL	30
2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	30
2.1.2. Kullanılan Kùltür Ortamları	30
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri	31
2.1.3.1. Triptik Soy Agar	31
2.1.3.2. Nutrient Broht	31
2.1.3.3. Nutrient Agar	31
2.1.3.4. Mùler Hinton Agar	32
2.1.3.5. Minimal Besiortamı	32
2.1.3.6. Melas Besiortamı	32
2.1.3.7. Şilempe Besi ortamı	33
2.1.3.8. Peynir altı suyu Besi ortamı	33
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
2.1.5. Kullanılan Cihazlar	33
2.2. METOT	34
2.2.1. Mikroorganizmaların Kùltür Ortamlarına Ekimleri ve İnkübasyonu	34
2.2.2. Kùltür Ortamlarında Üremelerin Ölçùlmesi	34
2.2.3. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Miktarının Ölçùlmesi	35
2.2.4. İndirgen Şeker Miktarının Ölçùlmesi	35
2.2.5. Kimyasal Oksijen İstek (KOI) Yükünün Ölçùlmesi	35
2.2.6. Toplam Fenol Miktarının Ölçùlmesi	36
2.2.7. Ramnolipidlerin Biyoyüzeyaktif Maddelerin Anti mikrobiyal Etkisi	36
2.2.8. Kùltür Ortamlarında Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Ekstraksiyonu	37
2.2.9. Kùltür Ortamlarında Üretilen Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)'de Analizleri	37

3. BULGULAR	40
3.1. Kültür Ortamlarında Mikroorganizmaların oğalması	40
3.2. Melas Kültür Ortamında Mikroorganizmaların üremesi ve Ramnolipid Eldesi	43
3.3. Peynir altı suyu Kültür Ortamında Mikroorganizmaların üremesi ve Ramnolipid Eldesi	44
3.4. Şilempe Kültür Ortamında Mikroorganizmaların üremesi ve Ramnolipid Eldesi	45
3.5. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Bazı Mikroorganizmalara Karşı Antimikrobiyal Etkileri	46
3.6. Kültür Ortamlarında retilen Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi’de Analizleri	52
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	65
ZGEMIŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tarafından üretilen ramnolipidlerin moleküler yapıları	5
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tarafından sentezlenen R1, R2, R3, R4 ramnolipidlerin moleküler yapıları	9
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentez mekanizması	14
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın ramnolipid sentezinin genetik düzenlenmesi ..	16
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın elektron mikroskopundaki görünüşü	17
1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın besi ortamındaki genel görünüşü ..	18
2.1. Toplam hücre sayısı standart eğrisi	38
2.2. Ramnolipid standart eğrisi	38
2.3. İndirgen şeker miktarı standart eğrisi	39
2.4. Toplam fenol miktarının standart eğrisi	39
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı	42
3.2. <i>Pseudomonas putida</i> 'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı	42
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın kültür ortamlarındaki zamana bağlı toplam hücre sayısı	47
3.4. <i>Pseudomonas putida</i> 'nın kültür ortamlarındaki zamana toplam hücre sayısı	48
3.5. Melas kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın ramnolipid biyoyüzeyaktif miktarı	48
3.6. Melas kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın toplam indirgen şeker miktarı	49
3.7. Melas kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın kimyasal oksijen istek yükü	49
3.8. Melas kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın toplam fenol miktarı	50
3.9. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı	50

3.10. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın toplam indirgen şeker miktarı	51
3.11. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın kimyasal oksijen isteği	51
3.12. Yüksek performanslı sıvı kromatografi'de ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin standart kromatogramı	52
3.13. Yüksek performanslı sıvı kromatografi'de melas kültür ortamında ramnolipid biyoyüzey maddelerin kromatogramı	53
3.14. Yüksek performanslı sıvı kromatografi'de melas kültür ortamında ramnolipid biyoyüzey maddelerin kromatogramı	54



TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Melas içeriği	2
1.2. Peynir altı suyu içeriği	3
1.3. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddeler	7
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tarafından üretilen ramnolipidlerin yapısı ve özellikleri	10
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tarafından minimal tuz veya kompleks besiortamlarında 28-37 ⁰ C ve pH 6-7,5'de ürettikleri ramnolipidler	11
1.6. Çeşitli biyoyüzeyaktif maddelerinin elde edilmesinde kullanılan yöntemler	19
1.7. Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin su ve topraktaki kirliliği ortadan kaldırması	24
3.1. Mikroorganizmaların kültür ortamlarındaki çoğalması	40
3.2. Kültür ortamlarında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın toplam hücre sayılar x10 ⁹ /ml.	41
3.3. Kültür ortamlarında <i>Pseudomonas putida</i> 'nın toplam hücre sayıları x10 ⁹ /ml	41
3.4. Melas ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nin üreme ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarının zamana bağlı değişimi	44
3.5. Peynir altı suyu ortamında gelişebilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nin üreme ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarının zamana bağlı değişimi	45
3.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın melas kültür ortamlarında zamana bağlı ramnolipid biyoyüzeyaktif madde verimliliği	45
3.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın peynir altı suyu kültür ortamlarında zamana bağlı ramnolipid biyoyüzeyaktif madde verimliliği	46
3.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın kültür ortamlarından elde edilen ramnolipidlerin ve standart antiyotiklerin bazı mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları inhibisyon zonları (mm)	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

β	: Beta
$\sigma_{\min}$	: Minimum yüzey gerilimi
$\gamma_{\min}$	: Minimum iç yüzey gerilimi
kDa	: Kilodalton
ark	: Arkadaşları
me	: Metil ester
KOI	: Kimyasal Oksijen isteği
KMK	: Kritik misel konsantrasyonu
$Y_{p/s}$	: Ürün miktarı ve üretim hacmi
P_v	: Üretim hacmi
Rh-1	: Ramnolipid-1
Rh-2	: Ramnolipid-2
dTDP	: Deoksitimidin difosfat
Rml A	: Glikoz-1-fosfat timidiltransferaz
Rml B	: dTDP-D-glukoz 4,6-dehidrataz
Rml C	: dTDP-6- deoksi -D-ksilo-4-hekzo 3,5-epimeraz
Rml D	: dTDP-6-deoksi-L-4- hekzoredüktaz
Rml G	: β - keto dekonil esteraz
LPS	: Lipopolisakkarit
HSL	:N-açilat homoserin lakton
PAH	: Poliaromatik hidrokarbonlar
PBC	: Poliklorobifenil
NAPL	: Sucul olmayan kirletici sıvılar
MSR	: Molar çözebilme oranı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

GİRİŞ

Küresel endüstrileşme ve teknolojiadaki hızlı gelişmelere bağlı olarak klasik endüstri yöntemleri yerini biyoteknolojik yöntemlere bırakmaktadır. Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile atık maddelerin parçalanması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılacak ve hem de insanların yaşamı için yararlı ürünler elde edilmesi sağlanmış olacaktır. Biyoteknoloji; canlı hücreler (mikroorganizmalar, bitki- hayvan hücreleri ve dokuları) ve/veya hücrelerden elde edilen enzimler tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlarla ilgilenmektedir [1].

Son yıllarda atık maddelerin geri kazanımı çevre dostu teknolojilerin temel hedefi durumuna gelmiştir. Bu sebeple araştırmamızda melas, şilempe ve peynir altı suyu gibi şeker ve süt fabrikası atığı ortamlarında gelişebilecek *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* mikroorganizmalarından ramnolipid elde edilmesi amaçlanmıştır.

Böylece endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemlerle geri kazanılarak tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda ekonomik olarak değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır. Ayrıca endüstriyel atık maddelerden elde edilen ramnolipidlerin yapıları yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)'de araştırılmıştır. Bunun yanında bazı mikroorganizmalara karşı ramnolipidlerin antimikrobiyal aktiviteleri de araştırılmıştır.

Biyoteknoloji ürünlerinin dünya pazarındaki yeri 1982 yılında 25 milyon dolar iken 1992 yılında 1,7 milyar dolara çıkmıştır. Bu yüzyılında ise 500 milyar dolara çıkacağı tahmin edilmektedir [2].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen yüzey aktif maddelere biyoyüzeyaktif maddeler denilmektedir. Biyoyüzeyaktif maddeler katı, sıvı ve gaz molekülleri arasındaki yüzey ve iç yüzey gerilimini azaltabilen yüzey aktif bileşiklerdir. Bu nedenle kimya endüstrisinin en önemli sınıflarından birisi olup modern endüstrinin hemen her sektöründe kullanılmaktadır. Son 20 yılda Amerika Birleşik Devletlerinde yüzey aktif madde kullanımı %300'lük artış göstermiştir. Bugün dünya üzerinde yıllık 3 milyon ton'dan fazla üretilmektedir. Bunların çoğu petrolden kimyasal yollarla elde edilmektedir [2].

Endüstride ham maddeler belirli bir amaca göre işlenirken bazı maddeler atık madde olarak ortaya çıkmaktadır. Tarımsal ürünlerin örneğin tahıl ürünlerinin % 60'ı, yağlı tohum ürünlerinin

%85'i, şeker ürünlerinin %90'nı kullanılmayan atık madde olarak çevreye bırakılmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarla bu atık maddelerin büyük bir kısmı geri kazanılmaktadır [1].

Bunlardan melas ve şilempe şeker fabrikalarının atık maddelerindendir. Melas; şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli kolloidal bileşiktir. Türkiye'de yıllık 380.000 ton'dan fazla melas üretilmektedir. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarından 4 kg kadar melas oluşmaktadır.

Tablo.1.1. Melas içeriğinin bileşim oranı (%) (Olbrich, H.'ye göre).

İçindeki Maddeler	Bileşim Oranı (%)
Su	16,5
Organik Maddeler	
Şeker: Sakkaroz	51,0
Glikoz	-
Fruktoz	-
Rafinoz	1,0
Invert Şeker	1,0
Şeker Dışı Maddeler:	
Azotlu Maddeler, Serbest ve Bağlı Asitler	19,0
Çeşitli Polisakkaritler	
Anorganik Maddeler (Kül)	
SiO ₂	0,1
K ₂ O	3,9
CaO	0,26
MgO	0,16
P ₂ O ₅	0,06
Na ₂ O	1,3
Fe ₂ O ₃	0,02
Al ₂ O ₃	0,07
Karbonatlar	3,5
Sülfatlar	0,55
Klorürler	1,6

Melas içerisinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, koyu renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit,

formik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler bulunmaktadır. Melas ticari olarak ispiro ve maya üretiminde, hayvan yemlerinin besin değerini artırmak için kepek, saman ve kuru küspelere eklenerek de kullanılmaktadır [5].

Şilempe ise bir başka şeker fabrikası atık maddesi olup melastan fermentasyon yoluyla alkol üreten fabrikalarda ortaya çıkan kötü kokulu koyu kahve renkli sıvımsı bir atık maddedir. Üretilen her 1 litre alkol için yaklaşık 12 litre şilempe oluşmaktadır. Yoğun organik yükü nedeniyle doğrudan doğruya alıcı ortamlara verilmesi sakıncalar doğurmaktadır. Azot ve fosfor bakımından oldukça fakir bir bileşiktir. Genellikle potasyum kaynağı, sıvı gübre ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır [5].

Peynir altı suyu besin endüstrisinin atık maddelerindendir. Süt fabrikalarında sütte peynir üretimi sırasında peynir mayasının sütteki kazeini çöktürülmesi sonunda geri kalan yeşilimsi sarı renkli sıvı bir atık maddedir. Protein yönünden oldukça zengin olup ülkemizde hemen hemen hiç değerlendirilmeden toprak ve su gibi alıcı ortamlara verilmektedir. İçeriğinde laktoz, protein, organik asitler, vitaminler ve mineral maddeler bulundurmaktadır [5].

Tablo.1.2. Peynir altı suyu içeriği (Makkar R.M. ve ark 2002)

İçindeki maddeler	Bileşim oranı (%)
Laktoz	75
Protein, organik asit ve vitaminler	12-14
Mineral maddeler (Ca^{+2})	10-13

Doğada bir çok mikroorganizma üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynaklarından biyoyüzeyaktif madde sentezlemektedir. Çevre koruma bilincinin artması ve çevre düzenleme yasalarının yaptırımları sonucunda mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddelere olan ilgi giderek artmaktadır. Muhtemelen ileri de kimyasal yüzey aktif maddelere alternatif olacaktır [6].

Pseudomonaceae'ye ait bakterileri genellikle glikolipit yapısında ramnolipid denilen yüzey aktif bileşikler üretmektedir. Ramnolipidler hücre duvarının yapısında bulundukları zaman hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları, ekstraselular olarak salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özellikleri ile tanınan bileşiklerdir.

Özellikle makine sanayi, motor yağları, çevre teknolojisi, petrol endüstrisi, tarım, tıp ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır [3, 4].

1.1. Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yapısı ve Özellikleri

Biyoyüzeyaktif maddeler mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrofilik ve hidrofobik kısım içeren mikrobiyal hücrelerin yüzeylerinde bulunan veya ekstraselular olarak salınan yüzey ve iç yüzey gerilimini azaltabilen amfilik bileşiklerdir [2, 6].

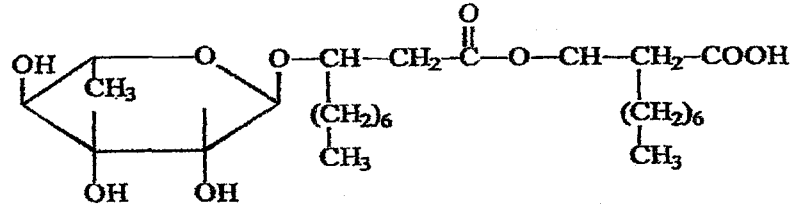
Biyoyüzeyaktif maddeler genellikle karbonhidrat, yağ ve petrol gibi ortamlarda gelişebilen aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilen ve çoğalma sırasında ortama salınan anyonik yapıda bileşiklerdir. Şimdiye kadar katyonik yapıda olan biyoyüzeyaktif maddelere rastlanılmamıştır. Hem biyoemülsifer hem de emülsifikasyon özelliğine sahiptir. Bu nedenle biyoemülsiferler sık sık biyoyüzeyaktif maddelerle birlikte sınıflandırılmasına rağmen yüzey gerilimini azaltma kabiliyetine sahip değildir [2, 6, 7].

Mikroorganizmalar farklı kimyasal özellikte ve moleküler ağırlıkta biyoyüzeyaktif madde üretmektedir. Düşük molekül ağırlıklı sürfektanlar glikolipid yapısında bulunurken yüksek molekül ağırlıklı sürfektanlar ya kovalent bağlarla bağlanmış hidrofobik zincirler içeren polianyonik heteropolisakkaritler yada protein ve polisakkarit komplekslerdir. Biyoyüzeyaktif maddelerin yapıları mikolik asit, glikolipid, polisakkarit lipit kompleksi, lipopeptit, fosfolipit veya mikrobiyal hücre yüzeylerinin kendisi olabilir.

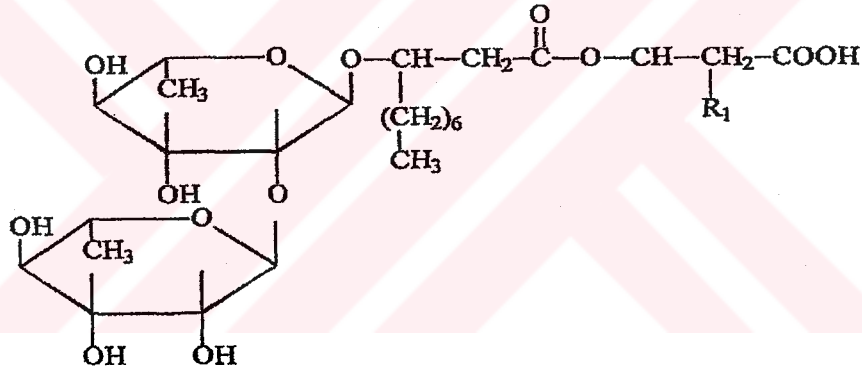
Mikroorganizmalar tarafından üretilen yüzey aktif bileşiklerin yapısında bir veya bir kaç tane hidrofobik ve hidrofilik kuyruk bulunmaktadır. Hidrofobik kısımlar yağ asitleri içerirken hidrofilik kısımlar ise hidroksil, ester, fosfat, karboksilat ve karbonhidrat gibi bileşikler içermektedir. Biyoyüzeyaktif maddeler genellikle aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- 1- Glikolipitler: Glikoz, mannoz, galaktoz, glukonik asit, ramnoz ve galaktoz sülfat içeren mono, di-, tri-, tetrasakkarit ve genellikle yağ asitlerinden oluşmaktadır. *Mycobacterium*'un sentezlediği trehalozlipitler, mayaların sentezlediği sophorolipitler veya *Pseudomonas sp.*'nin sentezlediği ramnozlipitler düşük polariteli biyoyüzeyaktif maddelerdir.
- 2- Lipopolisakkaritler: Yüksek molekül ağırlıklı hidrokarbonları parçalayabilen ve *Acinetobacter calcoaceticus* gibi bakteriler tarafından üretilen suda çözünebilir ekstraselular biyoyüzeyaktif maddelerdir.
- 3- Fosfolipitler: Bütün mikroorganizmalarda olmasına rağmen genellikle *Corynebacterium lepus* tarafından üretilen ekstraselular bileşiklerdir.

- 4- Lipopeptidler: *Bacillus subtilis* tarafından üretilen ornitolipit ve surfektin gibi biyoyüzeyaktif maddelerdir.
- 5- Nötral lipidler ve Yağ asitler: Ustilaj asit, Coryneomikolik asit, Lipotekoik asit ve hidrofobik proteinler gibi biyoyüzeyaktif maddelerdir.



Monorhamnolipid ($RhC_{10}C_{10}$)



Dirhamnolipids ($Rh_2C_{10}C_n$)

Şekil.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen mono-ramnolipid ve di-ramnolipid'in moleküler yapısı (Mata Sandoval ve ark 1999).

Yüzey aktif maddeler hidrofobik ve hidrofilik kısım içeren amfilik bileşiklerdir. Polar olmayan hidrofobik kısımları hidrokarbon zincirlerinden oluşurken, polar kısımları çok çeşitli bileşiklerden oluşmaktadır. Etoksilat, etilen, propilen oksit polimerleri ve sorbitol esterleri iyonik olmayan yüzey aktif maddeler olup yağ asitler, ester sülfonatlar, sülfatlar ve quaterner amonyum tuzları ticari olarak yaygın bir şekilde kullanılan iyonik yüzey aktif maddelerdir [2].

Bazı mikroorganizmalar hücre duvarında yüzey aktif maddeler sentezleyerek hücre duvarının yapısını değiştirmektedir. Örneğin *Candida lipolytica* ve *Candida tropicalis* alkanlar üzerinde büyüdükleri zaman hücre duvarında lipopolisakkarit biyoyüzeyaktif maddeler üretmektedirler. Mikroorganizmalar hidrokarbonlar gibi suda çözünmeyen substratlara difüze olmak için, bazı mikroorganizmalar da substratlardaki hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etmek için biyoyüzeyaktif maddeler üretmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın sentezlediği ramnolipidler ve *Torulopsis* sp.'nin sentezlediği sophorolipidler böyle biyoyüzeyaktif maddelerdir [18].

Biyoyüzeyaktif maddeler özellikle kara ve denizlere dökülmüş petrol atıklarının temizlenmesinde veya petrol taşıyan boru ve depolarda vizkoziteyi artırmak için kullanılmaktadır. En büyük pazarı petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi oluşturmaktadır. Bu amaç için Dünya'da 1982 yılında 300-400 milyon/kg biyoyüzeyaktif madde üretildiği bildirilmiştir [6].

Bartha (1986); dünya üzerinde üretilen petrollerin % 0,4 - 0,8'nin deniz yoluyla taşındığını denizlerde ve okyanuslarda meydana gelen kazaların önemli kirliliklere neden olduğunu bildirmiştir [8, 9].

Örneğin 1978'de Britanya kıyılarındaki Amoco-Cadiz kazası, 1989'da Exxon Valdez kazası, 1991'de İtalya kıyılarındaki petrol kirliliği, 1997'de Japon denizinde Okio Adalarında Nakhado tankerinin denize akıttığı petrol, yine 1997'de Venezüella Körfezindeki Maracaibo kanalındaki Nissos Amorgos petrol kirliliği ve 1991'de Körfez savaşında yüz bin ton'dan fazla petrol Basra körfezi sularına karışmış kıyı ve deniz ekosistemini ve burada bulunan bitki ve hayvan yaşamlarını önemli ölçüde tehdit etmiştir [2].

Böyle kazalar, araştırmacıları hem kıyı hem de denizlerde petrol kirliliğini ortadan kaldıracak doğa dostu bileşiklerin araştırılmasına yöneltmiştir. Biyolojik parçalayıcıların genel amacı çevrede bulunan kirleticilerin konsantrasyonunu azaltmaktır. Biyoyüzeyaktif maddeler böyle bileşikler olup Exxon Valdez deniz kazasında kullanılmıştır. Genellikle biyoyüzeyaktif madde üreten mikroorganizmalar ortama eklenerek su-hidrokarbon emülsiyonundaki hidrokarbonları parçalayıp kirleticileri ortamdan uzaklaştırmaktadır [10].

Mikroorganizmaların petrolde bulunan hidrokarbonları parçalayabilmesi için önceden hidrokarbonların çözünmüş olması gereklidir. İşte biyoyüzeyaktif maddeler hidrofobik maddelerin yüzey alanlarını etkileyerek onların suda çözünübilirliğini artırmakta ve böylece hem sudaki hem de topraktaki hidrokarbonların mikrobiyal olarak parçalanmasını sağlamaktadır [2, 6].

Sucul çevrelerden hidrokarbonları parçalayabilen mikroorganizmalar izole edilmektedir. Chakrabarty (1985); petrolle kirlenmiş plajlarda, hidrokarbonları temizlemek için *Pseudomonas aeruginosa* SB30 kültürleri tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddelerin (ramnolipid) kullanılabileceğini bildirmiştir [11].

Mattei ve ark (1986); deniz suyundan izole ettikleri karışık bakteri kültürlerinin akışkan fermantörlerde ham petrolü parçaladığını bildirmişlerdir [12].

Brezilya'nın kuzey doğusundaki Sergipe bölgesindeki petrol üretim tesislerinde izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* PA1 kültürlerinin ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin üretildiğini bildirilmiştir [13].

Tablo.1.3. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddeler (Mulligan ve Gibbs 1993; Banat 1995'den alınmıştır).

Trehaloz lipidler	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Ramnolipidler	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sopharoz lipidler	<i>Candida apicola</i> <i>Candida bombicola</i>
Lipopolisakkaridler	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1) <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Candida lipolytica</i>
Lipopeptidler	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Fosfolipidler	<i>T.thiooxidans</i> <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>
Yağ asidleri (corynemikolik asidler, spikulisporik asid vb.)	<i>Penicillium spiculisporium</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i>
Sülfolipidler	<i>Capnocytophaga spp.</i>

Shafeea (1989); *Pseudomonas aeruginosa* S8 kültürlerinin ortamdaki hidrokarbon karışımlarını parçalayabilen biyoyüzeyaktif maddeler oluşturduğunu, Harvey (1990) ise Alaska'daki petrol kirliliğinde ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üreten *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin ham petrolü parçalayabilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir [10, 14].

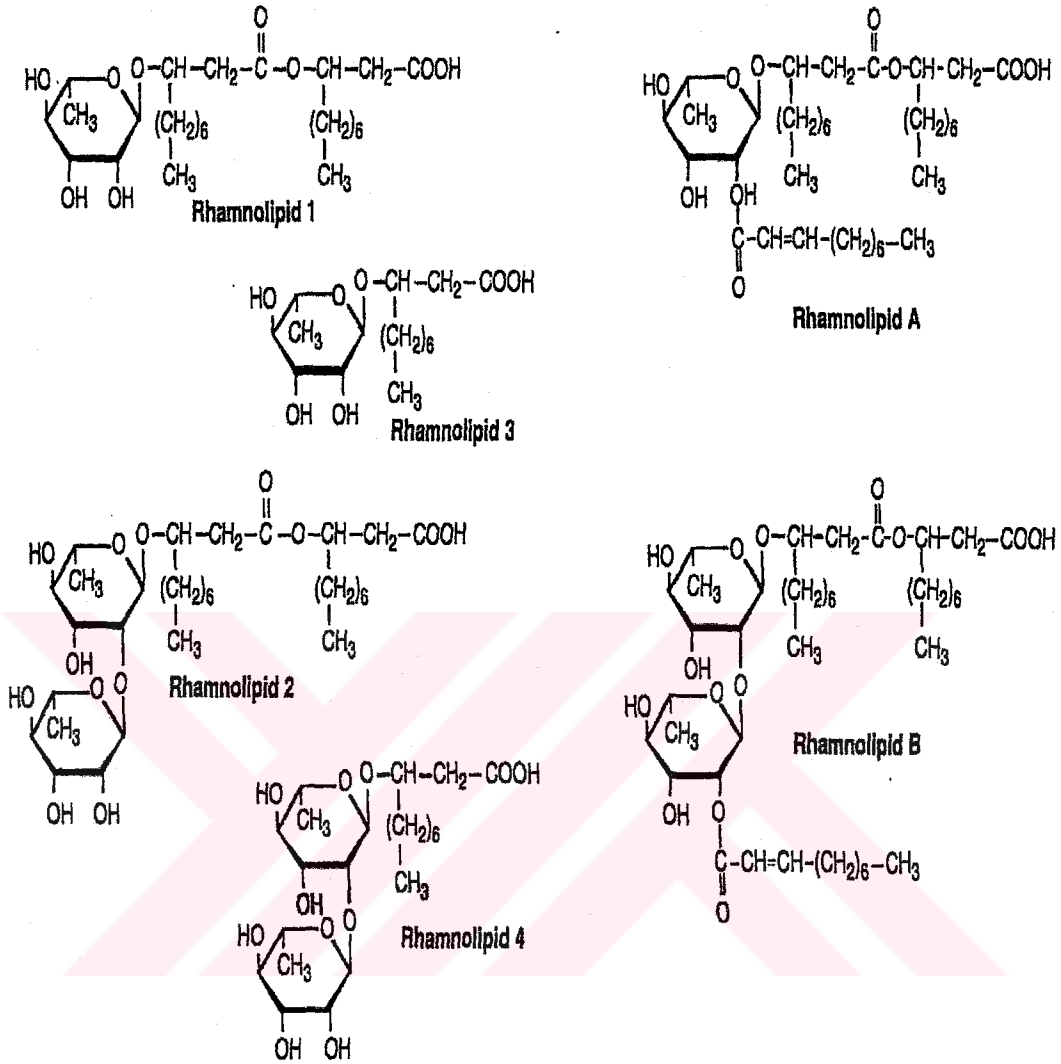
1.2. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yapısı ve Özellikleri

İlk defa Bergström (1946) tarafından glikoz üzerindeki gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinde ramnoz şekeri ve β -hidroksidekanoik yağ asidi yapısında glikolipitler elde edildiğini, Jarvis ve Johnson (1949) ise % 3'lük gliserol üzerinde çoğalabilen *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinde iki tane ramnoz şekerlerinin β -hidroksidekonil- β -hidroksidekonat yağ asitlerine glikozidik bağlarla bağlandığını bildirmişlerdir. Genellikle yapısında ramnoz şekeri ve β -hidroksidekanoik yağ asitleri içeren biyoyüzeyaktif maddelere ramnolipidler denilmektedir [15].

Eğer yapıda bir beş karbonlu ramnoz şekeri ve yağ asitleri varsa mono-ramnolipid yapısında iki tane ramnoz şeker ve yağ asitleri varsa di-ramnolipidler denilmektedir [15].

Endüstriyel alanda kullanılan ramnolipidlerin büyük bir çoğunluğu genellikle L-ramnoz şeker kaynaklarından elde edilmektedir. Ramnoz şekeri çeşitli bitkilerde örneğin meşe kabuğunda quersitrin, turuncgillerin kabuğunda rutin veya narincin şeklinde bulunmaktadır. Ramnolipidler bazı organik maddelerin sentezinde başlatıcı (starter) madde olarak görev almaktadır. Özellikle endüstride furanol gibi uçucu bileşiklerin ön maddesi olarak kullanılmaktadır [15, 16].

Beş karbonlu ramnoz şekerleri hem bitki hem de mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Fakat bitkilerde bulunan ramnoz şekerleri büyük ve istenmeyen birçok farklı polisakkarit içerdiğinden bitkilerden ramnoz şekerlerini elde etmek oldukça zor ve pahalıdır. Bazı araştırmacılar mikroorganizmalar tarafından üretilen ramnolipidlerin ramnoz şeker kaynağı olarak kullanılabileceği belirtmişlerdir. Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeler mikroorganizmaların büyüme ve durgunluk dönemlerinde üretilmekte ve hücreden kolaylıkla izole edilmektedir. dTDP (deoksi timidin di-fosfat) şekerlerini aktifleştiren ekzoenzimler merkezi metabolik yoldaki yağ asitleri tarafından sentezlenmektedir. İzole edilen ramnolipidlerin yapısında L-rhamnoz şekeri ve 3-hidroksi dekanoik yağ asitleri içerdiği bildirilmiştir. Syldatk ve Wagner (1999) tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli karbon kaynaklarında üreyebilen *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinin ramnolipid-1 ($RhC_{10}C_{10}$), ramnolipid-2 (RhC_{10}), ramnolipid-3 ($Rh_2C_{10}C_{10}$) ve ramnolipid-4 (Rh_2C_{10}) şeklinde sınıflandırılabilceğini bildirmişlerdir [15, 17].



Şekil.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen R1, R2, R3 ve R4 ramnolipidlerin moleküler yapıları (Lang S., Wullbrandt D., 1999'den alınmıştır).

Mikroorganizmalar değişik karbon kaynaklarından farklı yapılar da ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeler sentezlemektedir. % 10'luk alkanlar üzerinde gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 kültürlerinde ramnolipid-1 ve ramnolipid A ve B, hekza dekan ve parafin üzerinde gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁ kültürlerinde ramnolipid-2, *Pseudomonas aeruginosa* 158 kültürlerinin metil ester reaksiyonlarından ise ramnolipid-1 ve ramnolipid-2 biyoyüzeyaktif maddeleri elde edildiği bildirilmiştir [15].

Tablo.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin yapısı ve özellikleri (Lang S., Wullbrant D., 1999'dan alınmıştır).

Kültürler	Ürün	$\sigma_{\min}$ (mNm ⁻¹)	$\gamma_{\min}$ (mNm ⁻¹)	KMK (mg l ⁻¹)	Referanslar
<i>P.aeruginosa</i> S ₇ B ₁	R2	40	-	50	Hisatsuka ve ark 1971
<i>P. sp.</i> DSM 2874	R1 + R2	26	< 1 ^a	20	Syldatk ve ark 1985
<i>P. sp.</i> DSM 2874	R1 - R2	28	< 1 ^a	20	Syldatk ve ark 1985
<i>P.sp.</i> DSM 2874	R2	26	4 ^a	20	Syldatk ve ark 1985
<i>P. sp.</i> DSM 2874	R2	27	< 1 ^a	10	Syldatk ve ark 1985
<i>P. sp.</i> DSM 2874	R2	25	< 1 ^a	200	Syldatk ve ark 1985
<i>P. sp.</i> DSM 2874	R2	30	< 1 ^a	200	Syldatk ve ark 1985
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R2	25	0.2 ^b	11	Parra ve ark 1989
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R2	25	1 ^b	11	Parra ve ark 1989
<i>P.aeruginosa</i> BOP100	R2	28	3.5 ^c	260	İshigami ve ark 1993
<i>P.aeruginosa</i> BOP100	R2	31	0.1 ^c	400	İshigami ve ark 1993

R1: Ramnolipid-1, R2: Ramnolipid-2, $\sigma_{\min}$: Minimum yüzey gerginliği, $\gamma_{\min}$: Minimum iç yüzey gerginliği, KMK: Kritik misel konsantrasyonu, Me: Metilester, ^a: n-C₁₆, ^b: Karosen, ^c: n-C₈).

Yapılan benzer çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2874 kültürlerinin ramnolipid-1 ve ramnolipid-2'ye benzer yapıda fakat bir tane β -hidroksi dekonil yağ asidi zinciri içeren ramnolipid-3 ve ramnolipid-4 sentezlediği, klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde ise farklı uzunluklarda (C₈, C₁₂) β -hidroksi yağ asitleri zincirleri içeren ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri sentezlendiği bildirilmiştir [15].

Pseudomonas aeruginosa kültürleri tarafından üretilen ramnolipidler kirletilmiş topraklarda hidrofobik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında kullanılan biyoyüzeyaktif maddeler arasında yer almaktadır. Ramnolipidlerin yüzey gerilimi düşük (30-32 mN/m), emülsiyon aktivitesi yüksek (10,4 - 15,5 U/ml filtrat), kritik misel konsantrasyonu (KMK) düşük (5-65 mg/l) ve hidrofobik moleküllere affinitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu özellikler kirletilmiş topraklarda kirleticilerin taşınmasında ve ortadan kaldırılmasında optimum özellikler olarak sayılmaktadır [18].

Tablo-1.5. *Pseudomonas aeuroginosa* tarafından minimal tuz veya kompleks besiortamlarında, 28-37°C ve pH 6-7,5'da ürettikleri ramnolipidler (Lang S., Wullbrant D., 1999'dan).

Kültürler	Karbon Kaynağı g/l	RL gl ⁻¹	Y _{PS} g/l ⁻¹	Süre (s)	P _V (gl ⁻¹ h ⁻¹)	Referans
<i>P.aeuginosa</i>	Gliserol (30)	2,5	0,083	96	0,026	Jarvis ve Johnson 1949
<i>P.aeuginosa</i>	Gliserol (30)	2,0	0,067	120	0,016	Hauser ve Karnovsky 1954
<i>P.aeuginosa</i> KY 4025	n-Parafin (90)	8,5	0,094	144	0,059	Itoh ve ark 1971; Suzuki ve Itoh 1972
<i>Pseudomonas</i> sp.	n-Parafin (50)	14	0,280	120	0,117	Yamaguchi ve ark 1976
<i>Pseudomonas</i> sp. MUB	n-C14/15 (20)	2,9	0,145	48	0,060	Wagner ve ark 1983
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 2874	n-C14/15 (80)	12,8	0,160	180	0,071	Wagner ark 1984; Syldatk ve ark 1985
<i>P.aeuginosa</i> UI 29791	Mısır yağı (75)	46	0,613	192	0,240	Linhardt ark 1989
<i>P.aeuginosa</i> 44T1	Zeytin yağı (20)	7,65	0,382	72	0,106	Robert ve ark 1989
<i>P.aeuginosa</i> 44T1	Zeytin yağı (20)	9,0	0,450	120	0,075	Parra ve ark 1990
<i>P.aeuginosa</i> 44T1	Zeytin yağı (20)	10,0	0,500	110	0,091	Manresa ve ark 1991
<i>Pseudomonas</i> sp. JAMM	Zeytin yağı (24)	78	0,058	150	0,009	Mercade ve Manresa 1994
<i>P.aeuginosa</i> DSM 7108	Soya yağı (125)	112	0,624	167	0,467	Wullbrandt 1998; Giant ark1997
<i>P.aeuginosa</i> DSM 7107	Soya yağı (163)	1,78	0,687	264	0,424	Wullbrandt ve ark 1984; 1995
<i>P.aeuginosa</i> BS2	Peyniraltı suyu (20)	1,85	0,089	44	0,040	Babu ve ark 1996
<i>P.aeuginosa</i> BS2	Sükroz (20)	5,8	0,093	44	0,042	Babu ve ark 1996
<i>P.aeuginosa</i> GL1	Gliserol (30)	3,0	0,193	150	0,038	Arino ve ark 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. BOP100	Etanol (30)	32,0	0,100	120	0,025	Osman ve ark 1996
<i>P.aeuginosa</i> IFO 3924	Etanol (55)	24,3	0,582	168	0,190	Matsufuji ve ark 1997

RL: Ramnolipid miktarı, Y_{PS}: Ürün miktarı ve üretim hacmi, P_V: Üretim hacmi.

Hisatsuka ve ark (1971) tarafından yapılan bir çalışmada; *P. aeruginosa* kültürlerinin hekzadekan üzerinde gelişmesi için ramnolipid-2 biyoyüzeyaktif maddeleri uyarıcı etki yaptığını fakat diğer bakteri kültürlerinde aynı etkiyi yapmadığı ayrıca *P. aeruginosa* KY-4025 ve *P. aeruginosa* PG 201 kültürlerinin ramnolipid üretmeyen negatif mutantlarının alkan ve parafin üzerinde üremesi ve çoğalmasının ramnolipid üreten kültürlerle göre daha yavaş olduğunu bildirmişlerdir [18].

Ramnolipidlerde bulunan ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken, yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliğini artırmaktadır. Bu özellikler ramnolipidlerin sağlamlığını ve hidrofobik bileşikler çözünbilme kapasitesini etkilemektedir.

Yakın gelecekte ramnolipidlerin bu yapısal özelliklerinden dolayı bir çok alanlarda kullanılabileceği belirtilmektedir. Ramnolipid üreticisi olan *P. aeruginosa* bakterisinin insanlar için fırsatçı bir patojen olmasına rağmen aseptik çalışmalar bu dezavantajı ortadan kaldırmaktadır.

1.3. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Sentezi

Ramnoz şekerleri bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen biyosentez mekanizması mikroorganizmalarda açıklanmıştır. Spesifik çevre koşulları altında bazı mikroorganizmalar ramnoz şekeri içeren glikolipid yapısında biyoyüzeyaktif madde sentezlemektedir. L-ramnoz biyosentez mekanizması 30 yıldır bilinmesine rağmen son yıllarda tedavi edici özelliklerinden dolayı daha fazla araştırılmaktadır [17].

Ramnolipidlerin biyosentezinde hücre membranlarında ve sitoplazmada aktivite gösteren spesifik ramnosil transferaz enzimleri rol oynamaktadır. Burger ve ark (1963); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7700 kültürlerinde ramnolipidlerin biyosentez mekanizmasını, Ochsner ve ark (1996) ise *P. aeruginosa* PG 201 kültürlerinde ramnolipid biyosentezinde görev alan enzimlerin yapılarını göstermişlerdir [20, 21].

Pseudomonas aeruginosa kültürlerinde monoramnolipid (ramnosil- β -hidroksidekonil- β -hidroksidekonat) ve diramnolipid (ramnosil-ramnosil- β -hidroksidekonil- β -hidroksidekonat) olmak üzere iki çeşit ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlemektedir. Bu yüzey aktif moleküllerin sentezi her biri spesifik ramnosil transferaz enzimleri tarafından katalizlenen ramnosil transfer reaksiyonlarıyla olmaktadır [17, 20].

Genellikle ramnoz şekerleri bakteri ve bitkilerde yaygın olarak bulunan deoksi yapısında L-ramnoz şekerleridir. Ramnoz şekerlerinin kuyruklarında değişik uzunlukta yağ asitleri

bulunmaktadır. Yağ asitleri, yağ asidi biyosentez yolunda bulunan β -ketodekonil esterlerinin ketoaçıl redüksiyon reaksiyonlarından meydana gelmektedir. Burada RmlG olarak adlandırılan enzimler görev yapmaktadır [17, 20].

L-ramnoz şekerlerinin biyosentezinde dört önemli enzim bulunmaktadır. Bunlar *P.aeruginosa* bakterilerinde Glikoz-1-fosfat'tan L-ramnoz şekerlerini sentezlenmektedir. Karbonhidrat polimerlerindeki ramnoz kaynakları deoksitimidildifosfat (dTDP)-L-ramnozlardır. L-ramnoz bir çok patojenik bakterinin kapsülünde ve hücre duvarlarında yaygın olarak bulunmaktadır.

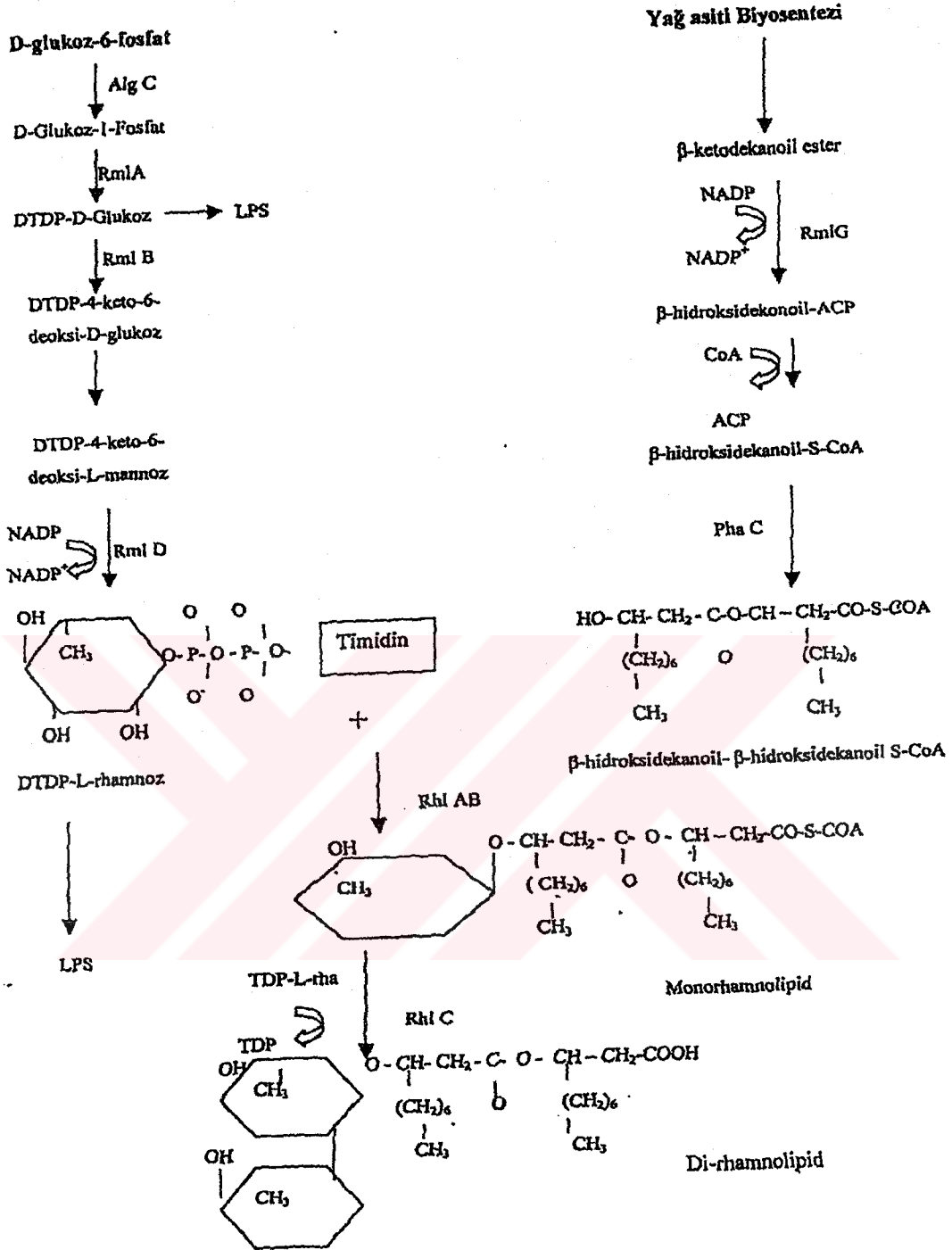
Ramnoz biyosentezinde rol alan ilk enzim Rml A (glikoz 1 fosfat timidil transferaz) Glukoz-1 fosfat'ı deoksi timidil di fosfat nükleotide transfer etmektedir. İkinci enzim olan Rml B (dTDP-D-glukoz 4,6-dehidrataz) ise şekerlere C4 hidroksil gruplarının oksidasyonunu ve dehidratasyonu sağlamaktadır.

Üçüncü enzim Rml C (dTDP-6-deoksi-D-siklo-4-hekzo 3, 5, epimeraz) ise C3 ve C5 pozisyonlarında çift epimerizasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir. Son olarak RmlD (dTDP-6-deoksi L-siklo-4-hekzoredüktaz) enzimi ise dTDP-L-ramnoz'u son ürüne indirgemektedir. Ramnoz biyosentezi hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde görülmektedir. Gram negatif bakterilerde L-ramnoz lipopolisakkaritlerin (LPS) O-antijeninde yaygın olarak bulunmaktadır [22].

Yapılan araştırmalar *P. aeruginosa* hücrelerinin azot kaynağı tükendikten sonra hücrenin durgun fazında ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlediğini göstermektedir. Ortama azot kaynağı ilave edildiğinde *Pseudomonas* sp. DSM 2874 hücrelerinin ramnolipid sentezinin engellendiği bildirilmiştir [15].

Ochsner ve ark (1995)'de *Pseudomonas aeruginosa* genlerinin ekspresyonuyla sınırlı miktarda azot kaynaklarında *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* bakterilerinin ramnolipid sentezini, Mulligan ve Gibbs (1989) *Pseudomonas aeruginosa*'da glutamin sentetaz aktivitesi ve ramnolipid sentezi arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Biyosentezde yer alan enzimler büyüme fazının sonunda ve ramnolipid üretiminin başında en yüksek aktivite gösterdiğini ve bazı bilim adamları ise fosfat metabolizması ile biyoyüzeyaktif madde sentezi arasında bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir [22, 23, 24].

Guerra Santos ve ark (1986) tarafından yapılan çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659'nın sınır miktarda Mg, Ca, K, Na, Fe iyonları ve iz elementlerde ramnolipid miktarını arttırdığını belirtmişlerdir [24, 25].



Şekil.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentez mekanizması (Maier, R.M., 2000'den alınmıştır)

1.4. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Genetik Düzenlenmesi

Genellikle doğadan ve klinik laboratuvarlardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlemektedir. Bakterilerin salgıladıkları toksin bileşikler ve hidrolitik enzimlerle patojeniteleri arasında doğrudan doğruya bir ilişki vardır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın salgıladığı ekzo bileşikler içerisinde proteazlar, fosfolipaz C, ekzotoksin A, ramnolipidler ve fiyosiyenin bulunmaktadır [17].

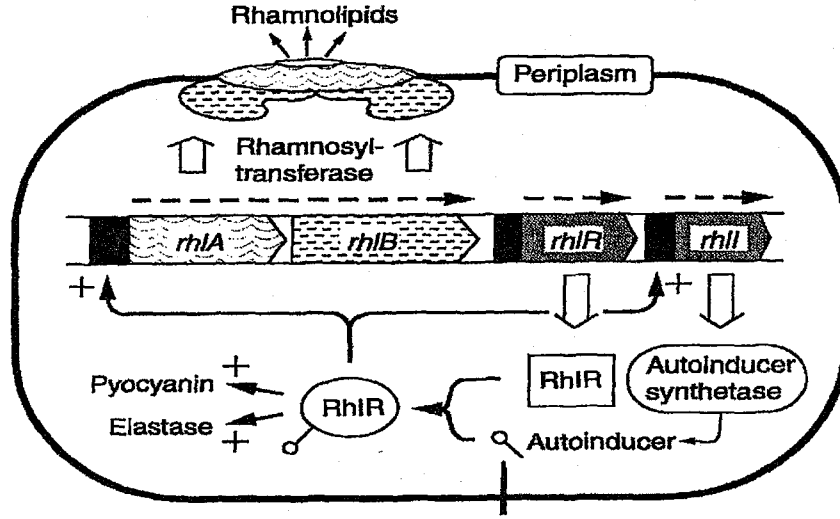
Bu ürünlerin transkripsiyonal olarak düzenlenmesinde en az iki quorum duyarlı sistem bulunmaktadır. Quorum duyarlı bakterilerde yaygın olarak bulunan otomatik uyarıcı olarak isimlendirilen difüze olabilen bileşiklerin üretiminden sorumlu genlerdir. Bazı bakterilerde N-açılak homoserin lakton (HSL) maddesi otomatik uyarıcı bileşik olarak görev yapmaktadır [17].

Pseudomonas aeruginosa'da ramnolipid biyoyüzeyaktif madde transkripsiyonunda ise iki otomatik uyarıcı bileşik tanımlanmıştır. Birincisi rhl R genin sentezlediği N-(3-oktodekonoil)-HSL'dir. Bu bileşik elastaz, alkalik proteaz genlerin transkripsiyondan sorumlu LasR' genini aktive eder. İkinci otomatik uyarıcı bileşik ise Rhl I tarafından üretilen N-bütiril HSL'dir. Bu ise rhlR geninin aktivasyonu, fiyosiyenin üretimini ve ramnosil transferaz enzimlerini kodlayan rhl A ve rhlB genlerini kontrol etmektedir. Rhl R belli koşullar altında ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlemesini başlatmaktadır [17].

Son zamanlarda *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 türleri kromozomlarında quorum duyarlı sisteminde üçüncü bir eleman Phz R tespit edilmiş fakat bunun ramnolipid üretiminde nasıl bir rol oynadığı henüz anlaşılamamıştır [17].

Ramnolipid sentezinin genetik mekanizması ile ilgili çalışmalara Ochsner ve ark; *P.aeruginosa* PG 201 ramnolipid üreten türler ile ramnolipid üretmeyen mutant genlerini karşılaştırılmış, Rhl A, B, R ve I olarak isimlendirilen Rhl bölgeleri tespit edilmiştir [15, 17, 20].

Rhl A ve B genleri ramnosil transferaz enzimlerini kodlamaktadır. Rhl R ve Rhl I genleri ise Rhl A ve B genlerini kontrol etmektedir. Rhl R geni hücre yoğunluğundan ve N-açılak homoserin lakton maddelerinden etkilenmektedir. Genetik çalışmalarla patojenik olan *P.aeruginosa* ramnolipid üreten Rhl A ve Rhl B ramnosil transferaz enzimlerini kodlayan genleri patojenik olmayan bakterilere aktararak ramnolipid üretilmeye çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada Rhl A ve B geni *P. putida* PU 098 türlerindeki plazmid'in tac promotorlarına transfer edilerek rekombinant *P. putida* KT 2442 kültürlerinde 0,6 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin elde edilmiştir [15].

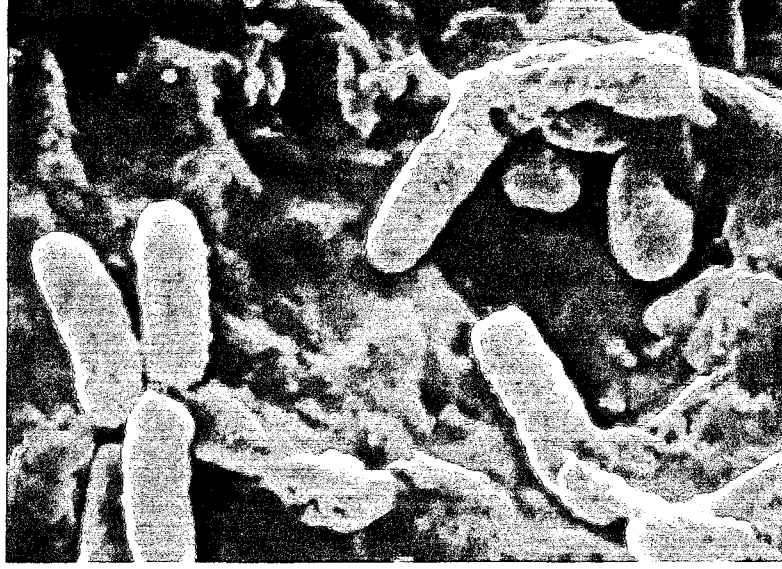


Şekil.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid sentezinin genetik düzenlemesi (Ochsner ve Reiser 1995).

1.5. Pseudomonasların Genel Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa ve *Pseudomonas putida* bakterileri Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer almaktadır. Pseudomonadaceae bakterileri morfolojik özellikleri, pigment yapıları, metabolik faaliyetleri, DNA/RNA hibridizasyonu ve rRNA gruplarına göre sınıflandırılmaktadır.

Pseudomonas aeruginosa sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır. Genellikle uçlarında bir nadiren iki veya üç adet kamçısı bulunmaktadır. Çok hareketlidirler. Gram negatif, 1,5 – 3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, çiftli veya kısa zincirler halinde görülmektedir. Genellikle optimum 30–37°C sıcaklıklarda üremektedir fakat 41°C'de üremesi ile *P. fluorescens*'den ayrılmaktadır. Buyyon besi ortamında yüzeyde zar yaparak yoğun ve homojen bir üreme göstermekte ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmentler oluşturmaktadır. Katı besi yerlerindeki tip 1 kolonileri yuvarlak, yumuşak, yassı, ortası kabarık beyazımsı renkte görülmekte ve genellikle bu koloniler klinik materyallerden izole edilen bakterilerdir. Floresans özelliği olan ve besi yerinin her tarafına yayılmış bulunan bakterilerde yeşilimsi mavimsi pigmentler görülmektedir. Ayrıca; kabarık küçük ve koliform kolonilerine benzeyen R kolonilerinde bulunmaktadır. Bazı kolonileri de mukoid şeklinde görülmektedir. Kültürler ortama aromatik meyve, tatlımsı veya trimetilamin kokusuna benzer koku yaymaktadır [26, 27].



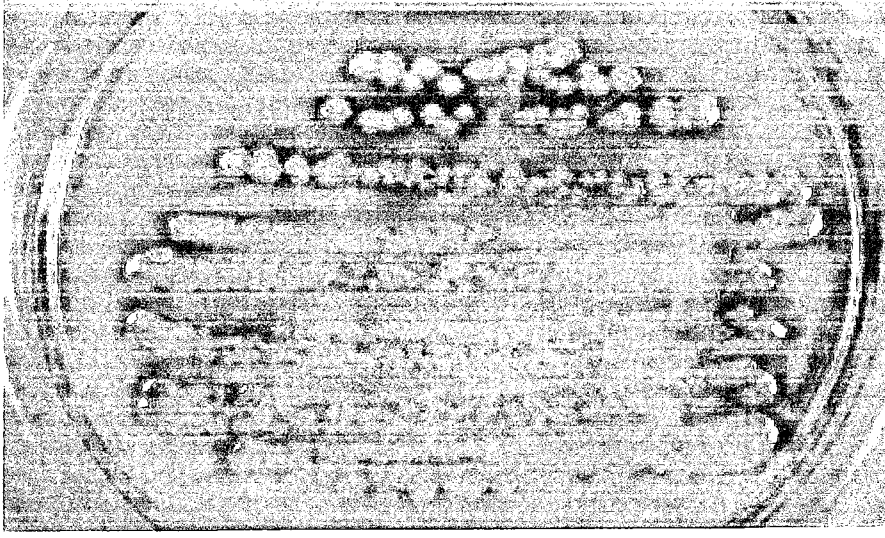
Şekil.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*'nın elektron mikroskopundaki görünüşü

Pseudomonas cinsi bakterilerinin çoğu toprak ve suda yoğun olarak bulunmaktadır. Bazıları bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda patojenik özellik göstermektedir. Katalaz ve Oksidaz pozitif olup, şekerleri parçalayan fakat fermentasyon yapmayan bakterilerdir [26].

Pseudomonas aeruginosa'nın bazı özellikleri şöyle sıralanmaktadır. Laktoz ve sakkaroz'a etkisiz olup glikoz ve bazı karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluşturmaktadır. Oksidaz, katalaz, arginin dihidrolaz ve jelatin hidroliz testleri pozitif, lizin, ornitin dekarboksilaz, indol, H₂S oluşumu, metil kırmızısı ve Voges- Proskauer testleri negatiftir [27].

Pigmentleri oksijensiz ortamda görülmez, oda sıcaklığında ve etüvde daha iyi görülmektedir. Genelde fiyosiyenin, fiyoverdin veya floresans olmak üzere iki tip pigment özelliği vardır. Fiyosiyenin; suda ve kloroform'da erimekte ve mavimsi renk oluşturmaktadır. Bu *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgüdür. Fiyosiyenin maddesinin antibiyotik özelliği vardır. Bu nedenle *Brucella*, *Shigella*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella*, *Vibrio* gibi bakterilere karşı bakteriyostatik etki göstermektedir [27].

Fiyoverdin sadece suda erimekte ve yeşilimsi floresans renk meydana getirmektedir. Ayrıca fiyoverdin ile kırmızı, fiyomelanin ile kahverengi-siyah pigment maddelerde vardır.



Şekil 1.6. *Pseudomonas aeruginosa*'nın besi ortamındaki genel görünüşü.

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunabilen bir bakteri olduğu için, organik maddeler içinde ve sulara uzun süre canlı kalabilmektedir. İnsan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunurlar ve yüksek ısı ve kuruluğa dirençsizdirler. Hastane gibi ortamlar, organik madde (kan, irin, deri döküntüleri) yönünden zengin olduğu için sık rastlanılan fırsatçı patojen olarak görülmektedir [27].

Pseudomonas aeruginosa'nın proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikleri hücre dışı salgıları ve fırsatçı patojen özelliğinin bulunması çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. *Pseudomonas*'lar; idrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, sepsis, osteomyelit, pseudomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilmektedirler [26, 27].

1.6. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Elde Edilmesinde Kullanılan Besi ortamları

Ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesinde en uygun substratın kullanılması üzerine yapılan çalışmalar, çeşitli ülkelerde halen devam etmektedir. Dünya'da hemen her yıl milyonlarca ton atık madde çevreye atılmaktadır. Bu atık maddelerin yok edilmesi çeşitli endüstri

ekonomik bir şekilde değerlendirilmesi için geri dönüşümle tekrar ham madde olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [28].

Biyoteknolojideki son gelişmeler biyoyüzeyaktif maddelerin daha ekonomik elde edilmesini sağlamaktadır. Ham madde elde etme yöntemlerinin kolay ve ucuz olmasına bağlı olarak biyoyüzeyaktif madde maliyeti % 10 - 30 arasında azalmaktadır. biyoyüzeyaktif maddelerin üretiminde üç önemli nokta vardır. Üretim maliyeti, biyoyüzeyaktif maddelerin fonksiyonu ve üretim kapasitesi. Eğer yağların zenginleştirilmesi gibi çok miktarlarda kullanım gerektiren alanlarda biyoyüzeyaktif madde üretilcekse üretim maliyetlerinin düşük olması gerekmektedir. Bunun yanında tıp ve kozmetik gibi alanlarda az miktarda üretilip kullanılacaksa biyoyüzeyaktif madde maliyetinin yüksek olması kısmen tolare edilmektedir [29].

Kosaric ve ark (1984); biyoyüzeyaktif madde maliyetlerini aşağıya çekmek için dört önemli noktanın olduğunu bunların;

- 1- Mikroorganizmalar (en yüksek ürünü veren mikroorganizmaların seçilmesi),
- 2- Üretim yolu (kısa ve maliyeti düşük olması)
- 3- Mikroorganizmaların gelişmesinde kullanılan besi ortamı (düşük maliyetle olması),
- 4- Ürünlerin kolay ve tekrar kullanılabilir olması şeklinde belirtmişlerdir.

Tablo.1.6. Çeşitli biyoyüzeyaktif maddelerin elde edilmesinde kullanılan yöntemler (Lang S., Wullbrant D.1999).

Biyoyüzeyaktif Maddeler	Yöntemler
Ramnoflipidler Glikolipidler Lipopeptidler	Adsorpsiyon yöntemi
Trehalozlipidler Sopharolipidler Liposan	Çözücü ekstraksiyonu yöntemi
Glikolipidler	Santrifüj yöntemi
Glikolipidler	Kristalizasyon yöntemi
Glikolipidler	Ultrafiltrasyon yöntemi
Surfaktin	Asitle çöktürme yöntemi

Biyoyüzeyaktif maddelerin saflaştırılmasında en çok hekzan, asetonitril, kloroform/metanol, diklorometan/metanol, bütanol/etilasetat, asetik asit, eter gibi çözücüler veya

asitlerle çöktürme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Buna rağmen kristalizasyon, santrifüj, amonyum sülfatla çöktürme veya absorpsiyon gibi yöntemlerinde kullanılabileceği bildirilmiştir [28].

Son zamanlar çeşitli ülkelerde ramnolipidlerin elde edilmesinde soya fasulyesi, şeker pancarı, patates gibi ürünlerle, kepek, buğday samanı, pirinç, mısır, fındık kabuğu, şeker pancarı atığı, kahve lapası, kahve kabuğu, kahve posası gibi kahve endüstrilerinin atık maddeleri ayrıca elma, üzüm kompostları, havuç, ananas, muz atıkları gibi meyve endüstrisinin atık maddeleri ve Hindistan cevizi yağı, yer fıstığı yağı, soya yağı, hurma yağ fabrikalarının atık maddeleri, mısır koçanı, hindibağ kökleri, çay atıkları ve buna benzer tarımsal atıkların ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesinde substrat olarak kullanılması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ramnolipidlerin elde edilmesinde ham madde olarak başka atık maddelerin kullanılması üzerine çalışmalarda devam etmektedir [28, 29].

1.6.1. Yağ ve Yağ Atıklarında Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Sentezi

Yağ ve yağ asitleri bütün canlıların yapısında bulunmaktadır. Dünya’da yağ üretimi yıllık 2,5-3 milyon ton olup bunların % 75’den fazlası bitkilerden elde edilmekte ve çoğu besin endüstrisinde kullanılmaktadır. Tohum yağlarının ekstraksiyonundan oluşan serbest yağ asitleri, domuz yağları, donmuş yağlar ve sabun atıkları büyük miktarlarda atık maddeler oluşturmaktadır. Çevre için büyük problemlere neden olan bu atık maddelerin mikrobiyal transformasyonla tekrar kullanılması üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün daha da artmaktadır [28, 30].

Vollbrecht (1999) *Tsukamurella* sp DSM 44370 kültürlerinde biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine yaptığı çalışmada; karbon kaynağı olarak kompleks hidrofobik karbonlar yerine bitkisel yağlarda glikolipid yapısındaki biyoyüzeyaktif maddelerin (ramnolipid) daha fazla elde edildiği ve oleik yağ asitleri yönünden zengin bitkisel yağlarında daha iyi sonuçlar alındığını ayçiçek yağında 5 gr/l glikolipit biyoyüzeyaktif madde elde ettiğini ve fizikokimyasal özelliği incelendiğinde ise suyun yüzey gerilimini 72 mN/m’den 35 mN/m’ye düşürdüğünü ve kritik misel konsantrasyonun ise 10 mg/l olduğu bildirmiştir [31].

Mercada ve ark (1993) tarafından yapılan çalışmalarda; *Pseudomonas* sp JAMM kültürlerinde ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin elde edilmesinde zeytin yağı fabrika atıklarını substrat olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Zeytin yağı fabrikasının atığı Akdeniz ülkelerinde tarım endüstrisinin önemli kirleticilerinden birisidir. Zeytin yağı fabrika atığı, zeytin yağının

işlenmesi sırasında kullanılan suyun ve olgunlaşmış zeytinlerin suda çözünen parçacıklarını içeren siyah renkli bir likördür. Zeytin yağı atığının içeriğinde; şekerler (20-80 g/l), azotlu bileşikler (12-24 g/l), organik asitler (5-15 g/l), atık yağlar (0,3-5 g/l) gibi değerli organik maddeler ve polifenoller gibi toksik maddeler içermektedir. Aynı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda zeytin yağı fabrika atığında denediği 22 mikroorganizmadan yalnız 15 tanesinin geliştiği, bunların *Pseudomonas* genusuna ait bakterilerin olduğu, yüzey gerilimini 40mN/m'den 30mN/m'ye, iç yüzey gerilimi 21mN/m'den 5mN/m'ye düşürdüğünü ve emülsiyon özelliği ise % 10'dan % 60-70'e artırdığını bildirmişlerdir [32, 33].

Mercada ve ark'nın *Pseudomonas* 42A2 kültürlerinde oleik asit yönünden zengin bitkisel yağlarda yüzey gerilimi 55 mN/m'den 32mN/m'ye, iç yüzey geriliminin 24 mN/m'den 5 mN/m'ye düştüğü ve 7,10 di hidroksi-8E-oktodekonoik yağ asitleri yapısında biyoyüzeyaktif maddeler elde edildiğini bildirmişlerdir [33].

Abolos (2001); *Pseudomonas aeruginosa* AT110 kültürlerinde ramnolipidlerin elde edilmesi için soya yağı atıklarının kullanılabileceğini 96 saatte 9,5 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edildiğini yüzey geriliminin ise 26,8 mN/m'ye düştüğünü ve kritik misel konsantrasyonun (KMK) $1,2 \times 10^2$ mg/l olduğunu bildirmişlerdir [34].

Hem besin endüstrisinde hem de evlerde kullanılmak için çok miktarlarda kızartma yağı üretilmektedir. Bunlar kullanıldıkları yerlere, kullanım şekillerine, besin çeşitlerine ve kaç kez kullanıldıklarına bağlı olarak % 30'dan fazla polar bileşikler içermektedir [28].

36 mikroorganizmanın zeytin ve ayçiçek yağı atık maddelerini karbon kaynağı olarak kullanılması üzerine yapılan çalışmalarda, mikroorganizmaların zeytin yağı atığında daha iyi üreme ve çoğalma gösterdiği *Pseudomonas* kültürlerinin çoğunun yüzey gerilimini 35mN/m'den daha aşağıya düşürdüğünü ve ramnolipid yapısında biyoyüzeyaktif maddeler ürettiğini ayrıca *Bacillus* bakterilerinin de biyoyüzeyaktif maddeler ürettiğini fakat yüzey gerilimini *Pseudomonas* bakteri kadar azaltmadığı diğer *Rhodococcus* sp, *Candida* sp ve *Acinetobacter calcoaceticus* mikroorganizmalarının ise *Pseudomonas* ve *Bacillus* kadar iyi sonuçlar vermediğini bildirmişlerdir [30].

Yağ atıkları çevreye bırakıldıkları zaman bulundukları ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle ve organizmalarla sıkı bağlar kurmaktadır. Mercade (1996); mikroorganizmalar tarafından biyoyüzeyaktif madde üretiminde atık maddelerin substrat olarak kullanılabileceklerini bildirmiştir [30].

1.6.2. Tarım Endüstrisi Atık Maddelerinden Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Üretimi

Bazı araştırmacılar biyoyüzeyaktif madde üretiminde patates işleme fabrikalarının atık maddelerinin, substrat olarak kullanılabilecekleri belirtmişlerdir. Fox ve Bala (2000); patates işleme fabrikalarının nişasta yönünden ekonomik değeri ve çevreye olan potansiyel tehditleri üzerine yapmış oldukları çalışmalarında patates içeriğinin % 80'nin su, % 17'sinin karbonhidrat, % 2'sinin protein, % 1'inin yağ ve % 0,9'unun vitaminler, inorganik mineraller ve iz elementler olduğu bildirilmiştir [28].

Hindistan'da biyoyüzeyaktif maddelerin elde edilmesi üzerine yapılan bir çalışmada şeker fabrikası atık maddelerinden melas'ın substrat olarak kullanılabileceği, melas kamışının bileşiminde % 48-56 şeker, % 9-12 şeker olmayan organik maddeler, % 2,5 protein, % 1,5-5 potasyum, % 0,4-0,8 kalsiyum, % 0,06 magnezyum, % 0,06-0,2 fosfor, 1-3 mg/kg biotin, 15-55 mg/kg pantotenik asit, 2,5-6 mg/kg inositol ve 1,8 mg/kg tiamin bulunduğu ve melas'ın sükroz yanında diğer bileşikler yönünden de zengin bir bileşik olduğu ve diğer şeker kaynakları ile karşılaştırıldığında maliyetinin daha düşük olduğu ve ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin elde edilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir [28].

Rida ve ark; karbon kaynağı olarak şeker fabrikası atık maddesi olan melastan ramnolipid üretimi üzerine yaptığı çalışmalarında *Pseudomonas aeruginosa*'da 0,05 g/biomas ramnolipid elde edildiğini ve şeker fabrikası atık maddesinin ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretiminde kullanılabileceğini bildirmişlerdir [35].

Sudhakar Babu ve ark (1996); ramnolipid elde edilmesinde bazı sentetik maddeleri ve peynir altı suyunu besi ortamı olarak kullanmış ve mikroorganizmaların peynir altı suyu atık maddelerinde spesifik büyüme oranları(μ_{max}) ve spesifik ürün oluşturma oranlarının (V_{max}) sentetik besi ortamlarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini ve ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin elde edilmesinde peynir altı suyu atık maddelerinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir [37].

Dubey ve Juwarkar (2001) yağlardan izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* BS2'nın sentetik besi ortamları ve peynir altı suyu ortamlarında biyoyüzeyaktif madde elde edilmesi üzerine yaptıkları çalışmalarında; sentetik besi ortamında *Pseudomonas aeruginosa* BS2 kültürlerinin fermentasyon ortamında yüzey gerilimi 57 mN/m'den 27 mN/m'ye düşürdüğü ve 0,97g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edildiğini, peynir altı suyu ortamında ise ramnolipid miktarının 0,92 g/l olduğu, suyun yüzey gerilimi 72 mN/m'den 27 mN/m'ye düştüğü, kritik misel

konsantrasyonun 0,028 g/l olduğunu ve peynir altı suyunun biyoyüzeyaktif madde elde edilmesinde uygun bir substrat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [37].

1.7. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerinin Kullanım Alanları

Teknolojik gelişmeler endüstriyel faaliyetlerde önemli role sahip olmasının yanında meydana getirdikleri atık maddelerle doğal çevrenin kirlenmesine neden olmaktadır. Bu kirleticilerin önemli bir kısmı besin zinciri yoluyla canlılara girip onlara zarar vermektedir.

Son zamanlarda ABD'nin ulusal çevre araştırma konseyi raporlarına göre en az üç yüz bin bölgenin toprak ve yeraltı sularının kirlenmiş olduğu bildirilmiştir. Bunların temizlenmesi için aşağı yukarı bir trilyon ABD doları gerekmektedir. Buda kirlenmiş bölgelerde biyolojik parçalayıcıların kullanımına olan ilgiyi daha da artırmaktadır. Ramnolipidler kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenici maddelerin parçalanmasını artıran ve çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşiklerdir [37].

Aromatik ve alifatik hidrokarbonlar olan heksadekan, oktadekan, parafin penatren, tetradekan, pristan ve kreostat gibi hidrokarbonlarla kirlenmiş topraklarda ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin eklenmesinin biyolojik parçalanmayı artırması ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır [38, 39].

Kirlenmiş topraklarda saf kültürlerin veya ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin bulunmasının biyolojik parçalanmayı artırıp artırmayacağı veya engelleyip engellemeyeceği daha çok mikroorganizmaların cinsine bağlıdır. *Pseudomonas* türleri diğer türlere göre daha fazla ramnolipid üretmekte fakat *Pseudomonas* türlerinin ramnolipidlere olan cevapları birbirinden farklıdır. Bunun yanında toprak sistemlerinde ramnolipid oluşumunun engellemesinin nedeni daha belli değildir. Buna rağmen yapılan çalışmalarda ramnolipidlerin oluşumunda karbon kaynaklarının önemli olduğunu göstermektedir [18].

Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin biyolojik parçalamayı artırmasında iki mekanizma önerilmektedir. Birincisi parçalayıcı hücrelerin sayılarını artırarak hidrokarbon çözünürlüğünü artırmak ikincisi ise hidrokarbonları parçalayan hücrelerin hidrofobik yüzeylerini artırmak veya hidrofobik maddelere bağlanmalarını kolaylaştırmaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar hidrokarbonların parçalanmasında ikinci mekanizmanın daha etkili olduğunu göstermektedir [18].

Tablo.1.7. Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin toprak ve sudaki kirliliği ortadan kaldırması (Lang S., Wullbrant D.1999).

İlave edilen ramnolipidler	Deney koşulları	Etkisi	Referanslar
R1+R2	<i>P. aeruginosa</i> 'nın topraksız batık kültürü deneyi	n-C ₁₈ ayrımı: + n-C ₁₈ parçalanması: +	Zhang ve Miller 1992
R1	4 tane <i>P. aeruginosa</i> 'nın topraksız batık kültürü deneyi	n-C ₁₈ parçalanması: +/-	Zhang ve Miller 1994
R2-Metil ester, R2	7 tane <i>P. aeruginosa</i> 'nın topraksız batık kültürü deneyi	n-C ₁₆ ve n-C ₁₈ parçalanması: ++; + (R2)	Zhang ve Miller 1995
R1	Petrolle kirlenmiş toprakta kolon deneyleri	Bakteri nakli: +	Bai ve ark 1997
R1	Petrolle kirlenmiş toprakta kolon deneyleri	n-C ₁₆ nakli: +	Bai ve ark 1997
R1+R2	<i>Pseudomonas</i> sp. Petrolle kirlenmiş toprakta kolon deneyleri	n-C ₁₆ parçalanması: +	Herman ve ark 1997
<i>P.aeruginosa</i> UG2 ramnolipidleri	Alifatik ve aromatiklerle kirlenmiş alüvyonlu verimli toprak, doğal toprak kirleticileri	Alifatiklerin parçalanması: + Aromatiklerin parçalanması: +/-	Jain ve ark 1992
<i>P.aeruginosa</i> UG2 ramnolipidleri	Alifatik, aromatik ve kloratlı aromatiklerle kirlenmiş alüvyonlu verimli toprak deneyleri	Ramnolipidlerin topraklarda yağların kaldırılması: +/-	Van Dyke ve ark 1993
<i>P.aeruginosa</i> UG2 ramnolipidleri	Kumlu verimli toprak ve petrol modellerinde kolon deneyleri	Yağların kaldırılması: +	Scheibenbogen ve ark 1994
<i>P.aeruginosa</i> UG2 ramnolipidleri	<i>Pseudomonas</i> sp. penatren içeren kumlu verimli toprak deneyleri	Konsantrasyona bağlı olarak penatren parçalanması: +/-	Providenti ve ark 1995
<i>P.aeruginosa</i> UG2 ramnolipidleri	Havadaki karosenle kirlenmiş topraklar (PAH), doğal toprak kirleticileri	3 zincirli PAH parçalanması: +/- 4 zincirli PAH parçalanması: -	Deschenes ve ark 1996

Kuvvetli pozitif etki: ++, Pozitif etki: +, Negatif etki: -, Etkisiz: +/-, PAH: Poliaromatik hidrokarbonlar

Oktadekanın biyolojik olarak parçalanmasında mikrobiyal yüzey aktif maddelerinin etkisi üzerine yapılan bir çalışmada; amonyum tuzları, fosfat, proteaz, pepton ve glikoz içeren besi ortamında *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 kültürlerinin 300 mg/lt ye kadar değişen oranlarda ramnolipid ürettiği, oktadekanın % 5'nin parçalandığı ramnolipid varlığında ise oktadekanın 84 saate % 20'sinin parçalandığını ayrıca oktadekan'nın parçalanmasında pH'ya bağlı olarak düşük konsantrasyondaki ramnolipidlerin yüksek miktarlardaki ramnolipidlere göre çok daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir [41].

Pseudomonas bakterilerinde ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri üzerine yapılan çalışmalar; hücre yüzeylerinin en önemli hidrofilik bileşiklerinden birisi olan LPS'nin

kaybolmasıyla ramnolipid arasında bir ilişkinin olduğunu, LPS'nin kaybolmasıyla hücrelerin hidrofobik özelliklerinin arttığını göstermektedir [39, 40].

Bakterilerin hücre duvarlarındaki hidrofobik bileşiklerle ortamdaki hidrokarbonlu bileşiklere bağlanmaları arasında sıkı bir ilişkinin olduğu bilinmektedir *Pseudomonas aeruginosa*'nın kültür ortamlarına ramnolipid biyoyüzeyaktif madde ilave edilerek oktadekan'ın parçalanması üzerine yapılan bir çalışmada; yüksek hidrofobik özellik gösteren ve hekza dekan'a %55-74 oranında bağlanan kültürler (ATCC 15442 ve ATCC 27853) ve düşük hidrofobik özellik gösteren ve heksadekan'a % 27-40 oranında bağlanan kültürler (ATCC 9027 ve NRRL 3198) olarak iki gruba ayrıldığı bildirilmiştir. Ortama az miktarda ramnolipid (0,6mM) ilave edildiğinde oktadekanın parçalanmasının daha fazla miktarda (6 mM) ilave edilen ramnolipidlere göre 10 kat daha hızlı olduğu, hekza dekan'a çabuk bağlanabilen kültürlerin parçalanmalarının daha yavaş olduğu heksadekana yavaş bağlanabilen kültürlerde ise oktadekanı parçalama oranının daha yüksek olduğu ve heksadekan'a yavaş bağlanabilen kültürlerde ramnolipidlerin hücre hidrofobikliğini artırırken heksadekan'a hızlı bağlanabilen kültürlerde hücre hidrofobikliğini değişmediği bildirilmiştir [42].

Yapılan bir çalışmada; benzin dökülmüş topraklarda *Pseudomonas sp.* DS10-129 kültürlerin 90 gün boyunca hücre sayısı, ramnolipid miktarı, hidrokarbonu parçalanma oranı ve *Phaseolus aureus* (fasulye) bitkisinin çimlenmesi sırasındaki kök, gövde uzunluğu ve klorofil içeriği gibi parametreleri araştırılmıştır. Sonuçta % 0,1 ve % 1'lik benzin bulunan toprak karışımlarında ramnolipid bulunan ve bulunmayan toprak örneklerinde 60 günde bakteri sayısı $4,6 \times 10^5$ CFU/g ve $4,2 \times 10^6$ CFU/g olurken 90 günde bakteri sayısında bir azalma olduğu, ramnolipid bulunan toprak karışımlarında ise hidrokarbonların 60 günde yaklaşık % 67 ve % 78'nin parçalandığı, *Phaseolus aureus* bitkisinin kök ve gövde uzunluğunun ve klorofil miktarının arttığını bildirmiştir [43].

1.7.1. Metal Kirleticilere Karşı Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı

Endüstriyel faaliyetler sonucu oluşan kurşun, kadmiyum, bakır, çinko, demir, nikel, krom gibi ağır metaller canlı organizmalarda biyolojik birikime neden olan en önemli kirleticilerdir. Bu nedenle ağır metallerin çevredeki olumsuz etkilerini azaltmak gerekmektedir. Çevre koruma

teknolojisi toprak ve sudaki ağır metallere, metallere kirletilmiş kanalizasyon atıklarına ve toksik atık maddelere karşı yeni yöntemler geliştirmektedir. Bu amaç için ramnolipidler:

- 1- Kanalizasyon ve atık sularındaki metallerin kaldırılmasında
- 2- Kirletilmiş topraklarda bulunan tarihi eserlerdeki kirletici metallerin kaldırılmasında
- 3- Ağır metallerle kirletilmiş toprakların temizlenmesinde kullanılmaktadır.

Metal ve organik birleşiklerle kirletilmiş topraklarda, organik bileşiklerin parçalanmasında kullanılarak metallerin toksin etkisinin azaltılması ve böylece ekosistemin korunması veya metal kirliliğinin azaltılması veya ortadan kaldırılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir [44].

Yapılan bir çalışmada toprak sedimentlerindeki ağır metallerin kaldırılmasına, *Bacillus subtilis*'in ürettiği surfaktan, *Pseudomonas aeruginosa*'nın ürettiği ramnolipid ve *Torulopsis bombicola*'nın ürettiği saphorolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin ağır metalleri (bakır 110 mg/kg ve çinko 3300 mg/kg) ortadan kaldırma değerleri araştırılmış buna göre; % 0,5'lik ramnolipidlerin bakır'ın % 65'ni ve çinko'nun % 18'ini ortadan kaldırırken, % 4'lük saphorolipid'in bakır'ın % 25'ni ve çinko'nun % 60'nı kaldırdığını, surfaktan biyoyüzeyaktif maddeleri daha az etkili olup bakır'ın % 15'ni ve çinko'nun % 6'nı ortadan kaldırdığını, sedimentlerdeki çinko'nun % 90'ın karbonat ve oksit partiküllere bakır'ın ise % 70'nin organik partiküllere bağlandığını ve ramnolipid ve surfaktanın bakırdaki organik bağları kaldırırken saphorolipitlerin ise çinkodaki karbonat ve oksit bağlarını kaldırdığı bildirilmişlerdir [7].

Yapılan başka bir çalışmada; ramnolipidlerin % 12,6'lık petrol ve gres yağı içeren kirletilmiş topraklardaki çinko ve bakır'ın kaldırılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir [45].

Maslin ve Maier tarafından yapılan OECD 301D biyolojik parçalanması testlerinde ramnolipidlerin kolay ve çabuk parçalandığı bildirilmiştir. Ayrıca Jeneil Biyoyüzeyaktif Madde şirketi tarafından üretilen ramnolipidlerin OECD 202 omurgasız canlılara toksik etkisi üzerine yapılan testlerde ramnolipidlerin toksik etkisinin çok düşük olduğu gösterilmiştir [17].

Çevreye dağılmış toksik metaller insan yaşamı için olumsuz etki yapmaktadır. Genellikle bu çevrelerdeki metaller organik ve kolloidal maddelerle sıkı bir bağ yapmaktadır. Anyonik yapıda yüzey aktif madde olan ramnolipidler bu metallerin kaldırılmasını kolaylaştırmaktadır [7].

Ramnolipidler kadmiyum, kurşun, lantan, çinko, bakır gibi çeşitli metallere karşı yüksek affinite özellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarla ramnolipidlerin topraktaki hem lantan'ı hem de kadmiyum'u parçaladığını göstermektedir [46, 47, 48].

Doğada yaygın olarak bulunan çeşitli metal kirleticilere karşı sabit koşullar altında ramnolipidlerin bağlanma eğilimleri üzerine yapılan bir çalışma sonucunda $Al^{+3} > Cu^{+2} > Pb^{+3} >$

$Cd^{+2} > Zn^{+2} > Fe^{+3} > Hg^{+2} > Ca^{+2} > Co^{+2} > Ni^{+2} > Mn^{+2} > Mg^{+2} > K^{+}$ olduğu buna göre ramnolipidlerin toprakta ve suda bulunan cıva, kadmiyum, kurşun gibi metal kirleticilere ilk olarak bağlandığı ve ramnolipidlerin metallere bağlanma oranları metallerle birleşen asetik asit, oksalik asit, sitrik asit ve fulvik asitden çok daha yüksek olduğu ve uygun koşullar altında toprak, göl, dere, akarsu, çay ve yeraltı sularındaki metal kirleticilerinin kaldırılmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceği bildirmiştir [49].

1.7.2. Organik Kirleticilere Karşı Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı

Bazı topraklardaki kirletici organik maddeleri temizlemek için basınçlı su kullanılmaktadır. Bu yöntem topraktaki biyolojik parçalanmayı yavaşlatmakta veya zorlaştırmaktadır. Bunun yerine ramnolipid gibi mikrobiyal yüzey aktif maddelerin kullanımı önerilmektedir [17].

Doğada organik kirletici bileşikler iki şekilde bulunmaktadır. Birincisi petrol ve klorlanmış çözücüler gibi sucul olmayan sıvı fazdaki (NAPL) kirleticiler. İkincisi ise poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) dır. Bazı organik maddeler suda çözünürken bazı maddeler suda çözünmemektedir. Örneğin NAPL (sucul olmayan sıvı fazdaki kirleticiler)'ların bulunduğu ortamlara biyoyüzeyaktif maddeler ilave edildiğinde sucul olmayan sıvılar (NAPL) arasındaki iç yüzey gerilimini azaltmakta ve çözünürlülüğü artırmaktadır [17].

Ramnolipidlerin sucul olmayan sıvıları (NAPL) çözebilme kapasitesi veya molar çözebilme oranı (MSR), hekzadekan akil-benzil-sülfonat gibi sentetik yüzey aktif maddelerin molar çözünebilme oranından 20 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [17].

Topraktaki hekzadekan'ı ortadan kaldırmak için yapılan bir çalışmada; ramnolipidlerin hekzadekan'ın % 20'sini ortadan kaldırırken, sodyum dodesil sülfat (SDS) (çok az miktarda) ve Tween 80 (%6'sını kaldırmış) gibi sentetik yüzey aktif maddelerden çok daha etkili olduğu bildirilmiştir [50].

Yapılan benzer bir çalışmada; ramnolipidlerin oktadekan'ı molar çözebilme oranı Triton X-114 sentetik yüzey aktif maddelerin molar çözebilme oranından 10 kat fazla olduğu ve Corexit 0600 sentetik yüzey aktif maddesinden 5 kat fazla olduğu, ramnolipidlerin topraktaki penatren, pren, poliklorabifeniller (PBC) ve çeşitli poliaromatik hidrokarbonları (PAH) kaldırmada hem Triton X-100'den hem de Tween 60'dan çok daha etkili olduğu bildirilmiştir [17].

1.7.3. Biyolojik Mücadelede Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı

Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* ve *Plasmopora lactucae* gibi bitki patojenlerinin zoosporlarına karşı yüksek etki gösterdiği 5 mg/lt ile 30 mg/lt'e arasında değişen konsantrasyonlarda ramnolipidlerin bir dakikadan daha kısa bir sürede patojenlerin zoosporları içerisine girerek hareketlerini kısıtladığı ve lizis ettiği bildirilmiştir [51].

Haferburg ve ark (1987) tarafından yapılan bir çalışmada; ramnolipidlerin tütün mozaik virüsü ve patates X virüsü ile enfekte edilmiş *Nicotiana glutinosa* yapraklarında biyolojik kontrol için kullanılabileceğini bildirmişlerdir [28].

Saccharomyces cerevisiae maya hücreleri üzerine *Pseudomonas sp.* S-17 kültürlerinin ürettiği PS biyoyüzeyaktif maddeleri ve sentetik yüzey aktif madde olan Triton X-100'ün maya hücrelerinin ayrımı, enzim aktiviteleri ve protein salınımlarının hücre zarı geçirgenliğine etkileri üzerine yapılan bir çalışmada; biyoyüzeyaktif maddelerin hücre kültürlerinde büyüme kinetiklerini etkilemediği, Triton X-100'ün membran proteinlerini ve hücredeki polipeptidleri değiştirdiğini ve sonuçta Triton X-100 ve PS biyoyüzeyaktif maddeleri maya hücrelerinin intrasellüler yapıları etkilemezken hücre yüzeylerinde benzer etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [52].

1.7.4. Sağlık ve Kozmetik Alanında Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Kullanımı

Kozmetik ve sağlık endüstrisinde kullanılan ürünlerin büyük bir bölümünde çeşitli sürfektanlar katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kontak lens solüsyonlarında, saç boyası ve bakımı ürünlerinde, deodorant, tırnak bakımı, dudak boyası, göz maskaralarında, diş macunu ve diş temizleme ürünlerinde, bebek bakımı ürünlerinde, antiseptik, after shave ve nemlendirici ürünlerin yapısında çeşitli yüzey aktif maddeler katılmaktadır. Japonya'da Iwata şirketi ramnolipidleri kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanmaktadır. Son zamanlarda kozmetik endüstrisinde lipozom ve emülsiyon yapımında ramnolipidlerin kullanımıyla ilgili patentler alınmıştır [2,29].

Pseudomonas aeruginosa tarafından üretilen ramnolipidler ve *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen lipopeptidler biyoasidik ajan olarak tedavi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir [2].

Birçok bakteri, maya ve funguslar çeşitli karbon kaynaklarında farklı kimyasal özellikte ve moleküler ağırlıkta biyoyüzeyaktif madde sentezlediği bildirilmiştir. Bazı mikroorganizmalar gliserol, glikoz, etanol, parafin, soya yağı, mısır yağı ve zeytin yağı gibi farklı karbon

kaynaklarında üreyebildiği ve ramnolipid yapısında biyoyüzeyaktif madde sentezlediği bilinmektedir. Çalışmamızda melas, şilempe ve peynir altı suyu gibi şeker ve süt fabrikası atık maddeleri karbon kaynakları olarak kullanılarak bazı endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaç için ön işlemlerden geçirilmiş melas, şilempe ve peynir altı suyu atık maddelerinde üreyip çoğalabileceği düşüncesi ile *Pseudomonaceae* ailesine ait *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* mikroorganizmaları kullanılmıştır.



2- MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* DMS 50071 ve *Pseudomonas putida* Fırat Üniversitesi ve Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji koleksiyonlarından temin edilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa DMS 50071 suşu, 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiş 200 ml Nutrient Broht (Oxoid) besiyortamına steril koşullarda ilave edilmiştir. 37°C'de 100 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örneklerden steril koşullarda aşağıda içeriği verilen Triptik Soy Agar'a (Oxoid) çizgi ekimi yöntemi ile ekim yapıldı aynı işlemler *Pseudomonas putida* içinde yapılmıştır.

Kültürler 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden alınan örnekler çalışmada kullanılmak üzere önceden hazırlanmış yatık Nutrient Agar besiyortamına 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Kültürler daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Stok kültürler her 20 günde bir Nutrien Agar'lı yatık besiyortamına pasajları yapılmıştır [3, 4].

2.1.2. Kullanılan Kültür Ortamları

Çalışmamızda kültür ortamlarında kullanılan melas ve şilempe şeker fabrikasının yan ürünler olup, melas Elazığ Şeker fabrikasından, şilempe ise Eskişehir Şeker Fabrikasından temin edilmiştir. Bir diğer gıda fabrikası atık maddesi olan peynir altı suyu ise Elazığ Süt Fabrikasından temin edilmiştir.

Melas içerdiği bazı kolloidal bileşik ve ağır metalleri (Cu, Fe, Pb, vb.) uzaklaştırmak amacıyla ön işlemlerden geçirilmiştir. Bunun için; 170 gr melas 300 ml distile su içinde karıştırılarak çözüldükten sonra üzerine 50 ml distile suda çözünen 0,3 gr potasyum trisiyanat çözeltisi konulmuştur. Tüm çözelti distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve iyice karıştırılmıştır. Bir gece +4°C'de bekletilen melas çözeltisinden istenmeyen bazı bileşikler arındırıldı ve berrak bir melas çözeltisi elde edilmiştir [5].

Elde edilen melas besiortamının toplam şeker içeriği yaklaşık % 54 civarında olduğundan distile su ile % 5 oranında seyreltilmiştir. Aynı işlemler şilempe besiortamı içinde yapılmıştır.

Peynir altı suyu'da içerdiği proteinlerden arındırmak için ön işlemlerden geçirilmiştir. Bunun için; peynir altı suyu 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve bir gece +4 °C'de bekletildikten sonra yeşilimsi sarı renkte berrak peynir altı suyu besiortamı elde edilmiştir [5].

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

2.1.3.1. Triptik Soy Agar (Merck)

Patates infüsyonu	4 gr/lt
D(+) glikoz	20 gr/lt
Agar-agar	15 gr/lt

Triptik Soy Agar litrede 39 gr/lt olacak şekilde distile suda çözündürülerek otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanıldı.

2.1.3.2. Nutrient Broth (Oxoid)

Et ekstrakt	4 gr/lt
Pepton	20 gr/lt

Nutrient Broth litrede 24 gr/lt olacak şekilde distile suda çözündürülerek otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanıldı.

2.1.3.3. Nutrient Agar (Oxoid)

Et ekstrakt	4 gr/lt
Pepton	20 gr/lt
Agar-agar	15 gr/lt

Nutrient Agar litrede 39 gr/lt olacak şekilde distile suda çözündürülerek otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanıldı.

2.1.3.4. Müller Hinton Agar (Oxoid)

Et ekstrakt	2 gr/lt
Kazein hidralat	17,5 gr/lt
Nişasta	1,5 gr/lt
Agar-agar	17 gr/lt

Müller Hinton Agar litrede 38 gr/lt olacak şekilde distile suda şözündürölerek otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanıldı.

2.1.3.5. Minimal Besiortamı

KH ₂ PO ₄	2,9 gr/lt
Na ₂ HPO ₄	7,6 gr/lt
NH ₄ Cl	1,0 gr/lt
MgSO ₄	0,5 gr/lt
Glikoz	1,8 g/lt

Minimal besiortamı distile suda şözündürölerek otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanıldı. Besiortamına glikoz 50 ml distile suda şözündürölüdükten sonra 0,22 µl disposable miliporlardan steril edilerek ortama ilave edilmiştir.

2.1.3.6. Melas Besiortamı

KH ₂ PO ₄	2,9 gr/lt
Na ₂ HPO ₄	7,6 gr/lt
NH ₄ Cl	1,0 gr/lt
MgSO ₄	0,5 gr/lt

Melas % 5 ve % 10'luk şeklinde distile su ile seyreltildi ve 10 M NaOH ve 3M H₂SO₄ kullanılarak pH 6'ya ayarlandıktan sonra otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.3.7. Şilempe Besiortamı

KH_2PO_4	2,9 gr/lt
Na_2HPO_4	7,6 gr/lt
NH_4Cl	1,0 gr/lt
MgSO_4	0,5 gr/lt

Şilempe % 5 ve % 10'luk şeklinde distile su ile seyretildi ve 10 M NaOH ve 3M H_2SO_4 kullanılarak pH 6'ya ayarlandıktan sonra otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.3.8. Peynir Altı Suyu Besiortamı

KH_2PO_4	2,9 gr/lt
Na_2HPO_4	7,6 gr/lt
NH_4Cl	1,0 gr/lt
MgSO_4	0,5 gr/lt

Peynir altı suyu ortamı 10 M NaOH ve 3M H_2SO_4 kullanılarak pH 6'ya ayarlandıktan sonra otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır..

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fermentasyon sonrası ramnolipid ekstraksiyonu için Metanol (merck), Hekzan (merck), Kloroform (merck), Asetonitril (merck), Etanol (merck), Rhamnoz, Fosforik asit, hidroklorik asit (HCl), Sülfirik asit (H_2SO_4), Sodyum hidroksil (NaOH), Baryum klorür (BaCl), Sodyum klorür (NaCl), Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), Dinitrosalisik asit, Gümüş sülfat (AgSO_4), Civa sülfat (HgSO_4), Potasyum kromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Demir amonyum sülfat, Potasyum ferri siyanür, Aminoantipirin.

2.1.5. Kullanılan Aletler

Fermantasyon için inkübasyon ortamı olarak Gerhardt Termoshake Çalkalamalı Etüv, Clifton Çalkalamalı Su banyosu, Hettich Rotofix 32 Santifluj, kolorimetrik analizler için Celcil

5000 UV/VIS spektrofotometre ve HPLC-ES-MS Hewlett Packard Waters 2690 Separation Module ve Novapak C₁₈ (100 mm x 8 mm , 4 µm) kolonu kullanılmıştır.

2.2. METOT

2.2.1. Mikroorganizmaların Kültür Ortamlarına Ekimleri ve İnkübasyonu

Çalışmada kullanılan fermentasyon ortamlarına *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 mikroorganizmaların ekimi için stok kültürlerin bulunduğu yatık Nutrient Agar tüplerine Mc Farland 1 (% 1'lik H₂SO₄ çözeltisinden 9,8 ml + % 1'lik BaCl₂ çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklığa gelinceye kadar steril serum fizyolojik su (% 0,9 NaCl) ilave edilmiş ve homojen bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan (300x10⁶) steril koşullarda kültür ortamlarına ekimleri yapılmıştır [3, 4, 54].

Fermentasyon için Gerhardt Termoshake çalkalamalı etüv kullanılmıştır 250 ml erlenmayer içine 50 ml olarak hazırlanan kültür ortamları çift paralel olarak çalkalamalı inkübatör'de 100 (r.p.m)'de 37⁰C sıcaklıkta fermentasyona bırakılmıştır.

2.2.2. Kültür Ortamlarında Üremelerin Ölçülmesi

Kültürlerde üremenin ölçülmesi McFarland yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaç için öncelikle 545 nm dalga boyunda Celcil 5000 UV/VIS spektrofotometre'de köre karşı McFarland standart eğrisi çıkarılmıştır. Kültür ortamlarında üremenin saptanması için örnekler köre karşı okunmuştur. Bulunan optik yoğunluk değerlerine karşılık gelen bakteri sayısı standart eğriden hesaplanmış (Şekil 2.1.) ve ml'deki bakteri sayısı olarak verilmiştir [54].

Ayrıca kültür ortamlarında logaritmik dönemde hücre bölünme süresi de aşağıda belirtilen formüllere göre hesaplanmıştır [66, 67]. Buna göre;

$$\text{Bölünme sayısı (N): } \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

$$\text{Bölünme süresi (g): } \frac{t \text{ (süre)}}{N \text{ (Bölünme sayısı)}} \quad \text{göre hesaplanır}$$

2.2.3. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Madde Miktarının Ölçülmesi

Ramnolipid miktarının tayini için Dubois ve ark. (1956) önerdiği fenol sülfirik asit metoduna göre kolorimetrik olarak yapılmıştır. Bunun için ilk olarak örnekler 10 ml % 80 etanol'de 4 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 0,2 µl disposable miliporlarda filtre edildi. ve 0,5 ml örnek deney tüpüne konuldu. Üzerine 5 ml % 5'lik fenol çözeltisi eklendi. Daha sonra 2,5 ml sülfirik asit eklendi ve vorteks'de çalkalandı. 30 °C sıcaklıkta 20 dk bekletildi. 490 nm dalga boyunda köre karşı Celcil 5000 UV/VİS spektrofotometre'de okuma yapıldı. Önceden hazırlanan standarda göre (Şekil 2.2.) ramnolipid miktarı hesaplanmıştır [55].

2.2.4. İndirgen Şeker Miktarının Ölçülmesi

Kültür ortamlarındaki indirgen şeker miktarı dinitrosalikilik asit (DNS) yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaç için 0,5 ml örnek üzerine 1,5 ml DNS ilave edilmiş tüpler 10 dk. süre ile kaynar su banyosunda tutuldu ve daha sonra soğutuldu. Celcil 5000 UV/VİS spektrofotometre'de 550 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapıldı. Bulunan optik yoğunluk değerleri standarda göre (Şekil 2..3.) g/lt cinsinden indirgen şeker miktarı olarak hesaplanmıştır [3, 4].

2.2.5. Kimyasal Oksijen İstek (K.O.İ) Yükün Ölçülmesi

Örnekleri kimyasal oksijen istemi yükü Rant ve ark. önerdiği yönteme göre yapılmıştır. 20ml örnek (bakteri hücrelerinden arındırılmış ve 1/100 oranında sulandırılmış kültür ortamı) üzerine 5 ml gümüş sülfatlı sülfirik asit ile 0,4 gr HgSO₄ ilave edilip karıştırıldı. Bu karışıma 10 ml 0,25 N K₂Cr₂O₇ ilave edildi. 25 ml gümüş sülfatlı sülfirik asit çözeltisi yavaşça ilave edilip balon iyice karıştırıldı. 2 saat süre ile kaynatılan balonlar soğutulup toplam hacim 140 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. Balonlardaki örneklerin her birisine bir kaç damla (2-3) ferroin indikatörü ilave edilip 0,1 N Demir amonyum sülfat (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) ile renk kırmızıya dönene kadar titre edildi. Titrasyon sonucu K.O.İ. yükü mg/lt cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [3, 4].

$$K.O.I. (mg/lt) = \frac{(V_0 - V_1) \times N \times 8000}{V}$$

V_0 = Köre sarf edilen demir amonyum sülfat miktarı

V_1 = Örneğe sarf edilen demir amonyum sülfat miktarı

V = Alınan ml numune miktarı

N = Demir amonyum sülfat normalitesi

2.2.6. Toplam Fenol Miktarının Ölçülmesi

Örneklerdeki total fenol miktarı kloroform-ekstraksiyon metoduna göre yapılmıştır. Bu amaç için ilk önce örneklerin pH'sı 10'a ayarlandı ve üzerine 4 aminoantipirin ilave edilip karıştırıldı. Karışımın üzerine potasyum ferrisiyanür ilave edilip sarı renk oluşması baklandı. Daha sonra ard arda 3 kez kloroform ekstraksiyonu yapıldı ve ekstraktlar birleştirilip 460 nm dalga boyunda Celcil 5000 UV/VİS spektrofotometre'de köre karşı okundu. Bulunan absorbans değerleri standarda göre (Şekil 2.4.) gr/lt cinsinden total fenol miktarı olarak hesaplanmıştır [3, 4].

2.2.7. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Antimikrobiyal Etkisi

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın melas ve peynir altı suyu kültür ortamlarından elde edilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin disk difüzyon yöntemine göre bazı bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonlarından alınmıştır. Araştırmada; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* FMC 3, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Staphylococcus aureus* bakterileri ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida* sp. mayaları kullanılmıştır.

Bunun için; kültür ortamlarından metanol : kloroform (2:1)'da ekstrakte edilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri 6 mm çapındaki (Whaltman no 4) disklere 0,1 ml emdirilmiştir. Kontrol olarak da steril su kullanılmıştır. Karşılaştırma amacıyla kullanılan standart antibiyotik diskler streptomisin sülfat, tobramisin ve nistatin Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edilmiştir.

Bakteriler Nutrient Broth (Oxoid)'a aşılanarak 30°C'de, mayalar malt ekstrakt Broth 28°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Erlenmayerde sterilize edilen ve 45-50°C'ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar (Oxoid)'a yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan bakteri (10^3 adet/ml) ve maya (10^2 adet/ml) kültürlerinden % 1 oranında aşılanarak iyice çalkalandıktan

sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına Muller Hinton Agar besiyeri homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır [26].

Katılaşan Müller Hinton agar üzerine rhamnolipid emdirilmiş diskler yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C’de 1 saat bekletildikten sonra bakteriler 37°C’de, mayalar ise 28°C’de inkübe edilmiştir. Çalışma ift paralel olarak yürütülmüş ve oluşan inhibasyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir [26].

2.2.8. Kültür Ortamlarından Rhamnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Ekstraksiyonu

Mikroorganizmalar n işlemlerden geçmiş melas, şilempe ve peynir altı suyu kültür ortamlarında gelişmeye bırakılmıştır. 15 gün sonra kültürün pH’sı 10 M NaOH kullanılarak 8,0’e ayarlandı ve 20 dak. 5.000 devirde santrifüj edildi. Daha sonra kültür ortamının pH’sı 3 M H₂SO₄ ile 2’ye ayarlandı ve eşit hacimde kloroform (merck) : metanol (merck) (2:1) ilave edildi. 10 dk. Çalkalamalı etüvde çalkalandıktan sonra 10 dk 5.000 devirde santrifüj edildi.

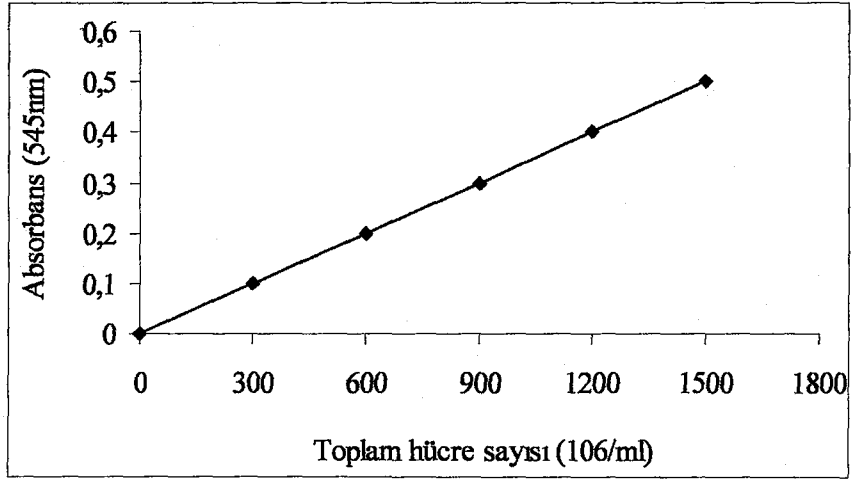
Ekstraksiyon bir kere daha tekrarlandı. Açık sarı renk ürün elde edildi. Metanol’ de znd ve 0,22 m’lik disposable miliporlarda filtre edildi [18].

2.2.9. Kültür Ortamlarından retilen Rhamnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)’de Analizleri

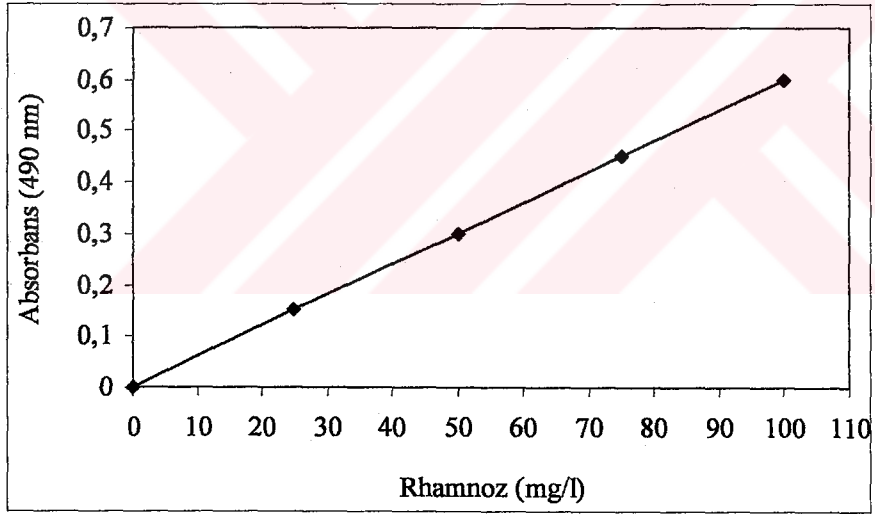
Melas ve peynir altı suyu gibi substratlarda gelişebilen kültürlerden ekstrakte edilen rhamnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin yapısı gradiyent yöntemine göre yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmalarımızda HPLC-ES-MS Hewlett Packard Waters 2690 kullanıldı. Rhamnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin tanımlanması için Novapak C₁₈ (100 mm x 8 mm , 4 m) kolonu kullanılmıştır.

İzole edilen rhamnolipid örnekleri havada kurutuldu ve asetonitril, bromasetofenol ve trietilamin (1:4:2) içerisinde çözündürüldü ve 80 C’de 1 saat bekletildikten sonra 0,22 m’lik disposable miliforlarda filtre edilmiştir [18].

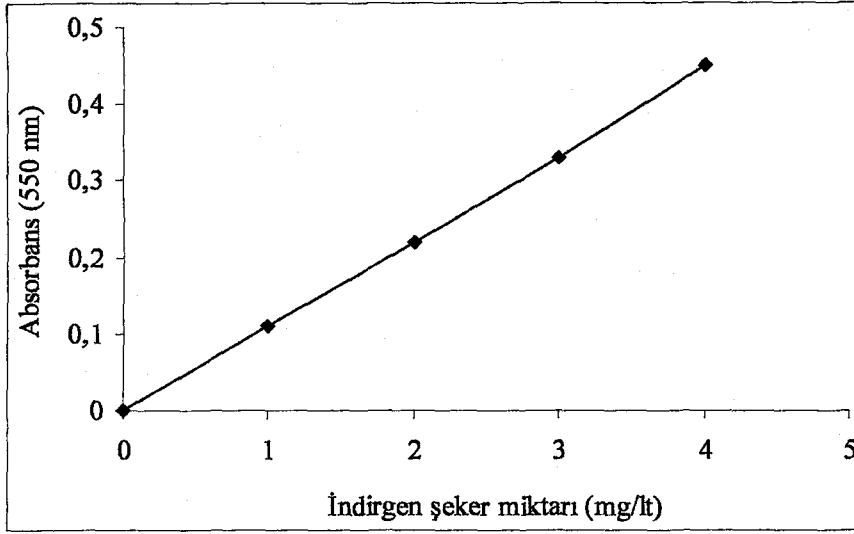
Rhamnolipid biyoyüzeyaktif madde yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)’de gradiyent yöntemine göre (3 dk 50:50 v/v’de, 19 dk. 50:50’den 100:0’a v/v’de, 5 dk 100:0 v/v’de, 3 dk 100:0’dan 50/50 v/v’de ve 10 dk 50/50 v/v’de) dakikada 1 ml asetonitril ve fosforik asit çözücüleri akıtılarak 244 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı [18].



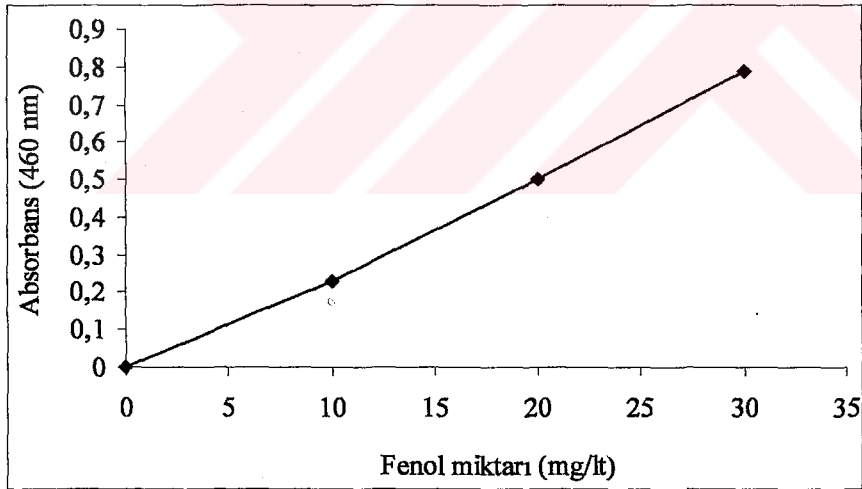
Şekil. 2.1. Toplam hücre sayısı standart eğrisi



Şekil. 2.2. Ramnolipid standart eğrisi



Şekil. 2.3. İndirgen şeker miktarı standart eğrisi



Şekil.2.4. Toplam fenol miktarı standart eğrisi

3. BULGULAR

3.1. Kùltür Ortamlarında Mikroorganizmaların Üremesi

Pseudomonas aeruginosa ve *Pseudomonas putida*'nın melas, şilempe ve peynir altı suyunu kùltür ortamı olarak kullanması ve üremesi üzerine yaptığımız çalışmada tablo 3.1.'de görüldüğü gibi her iki mikroorganizma minimal besiortamında ürediğı, *Pseudomonas aeruginosa* minimal besiortamı içeren ve içermeyen % 5 ve % 10 melas ortamlarında ürerken, minimal besiortamı içeren % 5 ve % 10 şilempe ortamı ve şilempe ortamlarında üremediğı, yine minimal besiortamı içeren peynir altı suyu ve peynir altı suyu ortamlarında ürediğı görülmüştür.

Pseudomonas putida ise minimal besiortamı içeren % 5 ve % 10 melas ortamlarında ve peynir altı suyu ortamlarında ürediğı bunun yanında minimal besiortamı içermeyen melas ve peynir altı suyu ortamlarında ve % 5 ve % 10'luk şilempe ortamlarında ise her hangi bir üreme göstermediğı görülmüştür.

Tablo.3.1. Mikroorganizmaların kùltür ortamlarındaki çoğalması

Kùltür ortamları	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Minimal besiortamı	+	+
Minimal besiortamı + % 5 Melas	+	+
Minimal besiortamı + % 10 Melas	+	+
Melas (% 5 ve % 10 melas)	+	-
Minimal besiortamı + % 5 Şilempe	-	-
Minimal besiortamı + % 10 Şilempe	-	-
Şilempe	-	-
Minimal besiortamı + peynir altı suyu	+	+
Peynir altı suyu	+	-

Pseudomonas aeruginosa'nın toplam hücre sayısı $31,5 \times 10^9/\text{ml}$ ile en fazla minimal besiortamı içeren % 5 melas kùltür ortamında olduğı, % 10 melas ortamında ise toplam hücre sayısının $22,5 \times 10^9/\text{ml}$ olduğı toplam hücre sayısı % 5 melas ortamında % 10 melas ortamına göre daha fazla miktarda olduğı görülmüştür. Peynir altı suyu ortamında ise toplam hücre sayısı miktarı $18,5$ ve $9,5 \times 10^9/\text{ml}$ olmuştur.

Pseudomonas putida ise toplam hücre sayısı miktarı en fazla $2,5 \times 10^9$ /ml ile minimal besiortamı içeren % 5 melas kültür ortamında olmuştur. % 10 melas içeren kültür ortamında ise toplam hücre sayısı $1,4 \times 10^9$ /ml olmuştur. Minimal besiortamı içermeyen melas ve peynir altı suyu ortamlarında her hangi bir üreme görülmemiştir. Minimal besiortamı içeren peynir altı suyunda ise toplam hücre sayısı $1,9 \times 10^9$ /ml olduğu, buna göre melas ve peynir altı suyu kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı *P. aeruginosa*'da *P. putida*'ya göre daha iyi olduğu görülmüştür.

Tablo.3.2. Kültür ortamlarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın toplam hücre sayıları $\times 10^9$ /ml (A: Minimal besiortamı, B: Minimal besiortamı + % 5 melas, C: minimal besiortamı + % 10 melas D: Melas, E: Minimal besiortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)

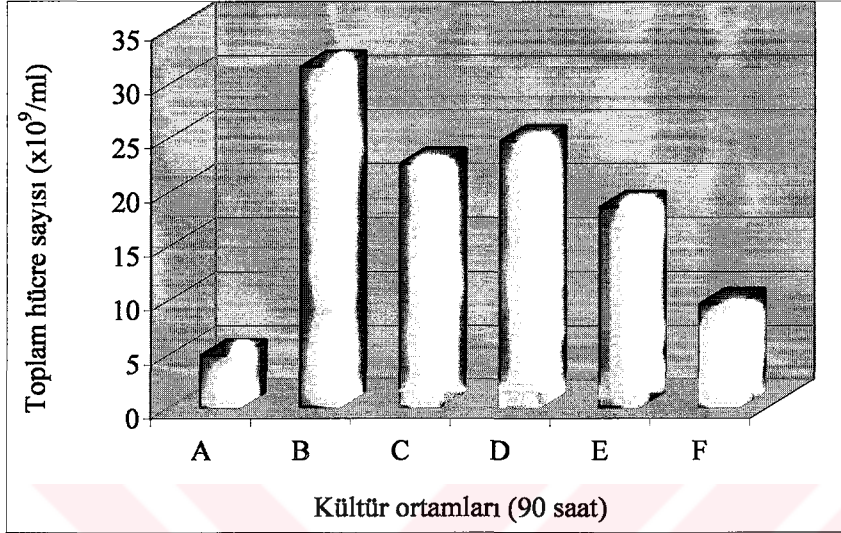
Zaman (Saat)	A	B	C	D	E	F
0	-	-	-	-	-	-
24	1,9	10,5	8,0	5,6	5,0	1,6
36	3,6	15,6	11,2	8,7	6,3	2,0
48	4,2	20,5	19,8	21,0	14,1	8,9
72	4,3	32,4	20,6	23,0	18,0	9,1
90	4,8	31,5	22,5	24,6	18,5	9,5

Tablo.3.3. Kültür ortamlarında *Pseudomonas putida*'nın toplam hücre sayıları $\times 10^9$ /ml (A: Minimal besiortamı, B: Minimal beisortamı + % 5 melas, C: minimal besiortamı + % 10 melas D: Melas, E: Minimal besiortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)

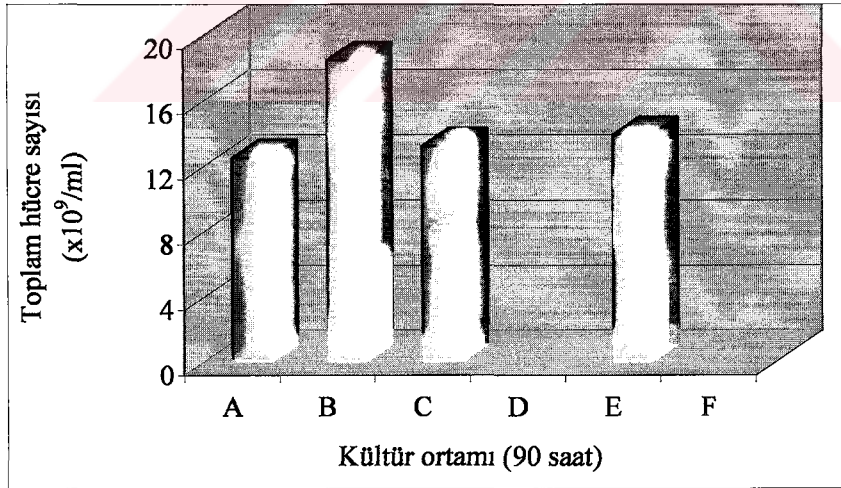
Zaman (Saat)	A	B	C	D	E	F
0	-	-	-	-	-	-
24	1,6	3,2	0,9	-	1,2	-
36	2,5	3,8	8,8	-	3,3	-
48	3,1	14,7	9,5	-	5,5	-
72	11,7	16,9	10,6	-	12,7	-
90	12,5	18,5	13,2	-	13,9	-

Pseudomonas aeruginosa'nın kültür ortamlarındaki bölünme zamanları ise minimal besiortamında 28,2 dak., minimal besiortamı içeren % 5 melas'da 18 dak. minimal besiortamı

içeren % 10 melas'da 26 dak. melas kültür ortamında 19dak., minimal besiortamı içeren peynir altı suyu ortamında 28,5 dak. ve peynir altı suyu ortamında ise 29,7 dak olduğu görülmüştür.



Şekil. 3.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı (A: Minimal besiortamı, B: Minimal besiortamı + % 5 melas, C: minimal besiortamı + % 10 melas D: Melas, E: Minimal besiortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)



Şekil. 3.2. *Pseudomonas putida*'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı (A: Minimal besiortamı, B: Minimal besiortamı + % 5 melas, C: minimal besiortamı + % 10 melas D: Melas, E: Minimal besiortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)

Pseudomonas putida kültür ortamlarındaki bölünme zamanların ise minimal besi ortamında 26 dak, minimal besi içeren % 5 melas ortamında 19,8 dak, minimal besiyeri içeren % 10 melas ortamında 27,3 dak ve minimal besi ortamı içeren peynir altı suyunda ise 30 dak. olduğu görülmüştür.

3.2. Melas Kültür Ortamında Mikroorganizmaların Üremesi ve Ramnolipid Eldesi

Elazığ şeker fabrikasından temin ettiğimiz melas ortamı, şeker fabrikalarının yan ürünü olup koyu kahverenkte koloidal bir bileşiktir. Melas bileşim zenginliği yönünden yurdumuzda bazı endüstri kollarında kullanılmaktadır. İçerisinde kompleks polisakkaritler invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, koyu renkli azot içeren polimer bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, sitrik asit, laktik asit, formik asit gibi organik asitler bulundurmaktadır.

Melas kültür ortamında mikroorganizma kültürlerinin üreme ve ramnolipid sentezleme yeteneğini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmalarda zamana bağlı toplam hücre sayısı, ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı, indirgen şeker miktarı, kimyasal oksijen isteği, toplam fenol miktarı Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Melas ortamı kullanılarak yapılan denemelerde *Pseudomonas aeruginosa*'nın zamana bağlı olarak toplam hücre sayısında artma olduğu 90. saat'te $24,6 \times 10^9$ /ml olduğu ve en yüksek ramnolipid miktarı 72. saat'te 0,78 g/l ile olduğu görülmüştür. İndirgen şeker miktarının ise zamana bağlı olarak 24,5 g/l' den 11,4 g/l' ye düştüğü, kimyasal oksijen isteğinde 36,4 g/l' den 16,5 g/l' ye düştüğü ve kirlilik yükünün belirlenmesinde önemli faktörlerden birisi olan toplam fenol miktarı ise 2,2 g/l' den 1,64 g/l' ye düştüğü görülmüştür.

Şeker fabrikası endüstrisi atık maddesi olan melas kültür ortamında 90 saat sonra kimyasal oksijen isteğinde % 55, fenol miktarında % 26,5 ve indirgen şeker miktarında % 4,5'lik bir azalma olduğu görülmüştür.

Yapmış olduğumuz çalışmada zamana bağlı olarak toplam hücre sayısında bir artma olurken ramnolipid miktarında da bir artma olduğu buna bağlı olarak indirgen şeker miktarında, kimyasal oksijen yükünde ve toplam fenol miktarında bir azalma olmuştur.

Pseudomonas putida minimal besi ortamı içeren % 5 ve 10 melas ortamında toplam hücre sayısının 18,5 ve $13,2 \times 10^9$ /ml olduğu melas ortamında ise üreme göstermediği görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* şeker konsantrasyonunda *Pseudomonas putida* göre daha iyi ürettiği görülmüştür.

Tablo. 3.4. Melas ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın üreme ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarının zamana bağlı değişimi

Zaman (saat)	Hücre sayısı ($\times 10^9$ /ml)	Ramnolipid miktarı (g/l)	İndirgen şeker miktarı (g/l)	Kimyasal oksijen isteği (g/l)	Toplam fenol miktarı (g/l)
0	-	-	24,5	36,4	2,20
24	5,6	0,36	20,3	22,5	2,10
36	8,7	0,44	18,5	17,3	2,04
48	21,0	0,50	14,3	17,1	1,75
72	23,0	0,78	12,2	16,8	1,64
90	24,6	0,75	11,4	16,5	1,60

3.3. Peynir Altı Suyu Kültür Ortamında Mikroorganizmaların Üremesi ve Ramnolipid Eldesi

Peynir altı suyu süt peynir imalat sırasında süttten peynir mayası yardımıyla kazeininin çöktürülmesinden kalan yeşilimsi sarı renkli sıvıdır. Yurdumuzda her yıl yaklaşık 800 bin ton civarında peynir altı suyu oluşmakta ve hemen hemen hiç değerlendirilmeden araziye veya alıcı ortamlara bırakılmaktadır. Bileşim yönünden çok zengin olan bu madde içerisinde laktoz, protein, organik asitler, vitaminler ve mineral maddeler içermektedir.

Peynir altı suyu ortamında mikroorganizma kültürlerinin üreme ve ramnolipid sentezleme yeteneğinin zamana bağlı toplam hücre sayısı, ramnolipid miktarı, indirgen şeker miktarı, kimyasal oksijen isteği (KOİ) tablo 3.5.'de verilmiştir.

Peynir altı suyu ortamı kullanılarak yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın zamana bağlı olarak hücre sayısının artışı 90 saat'te $9,5 \times 10^9$ /ml olduğu, ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarının en yüksek 0,48 g/l olduğu görülmüştür.

Peynir altı suyu ortamında indirgen şeker miktarı zamana bağlı olarak 3,1 g/l' den 2,6 g/l'ye düştüğü, kimyasal oksijen isteğinin 12,5 g/l' den 8,4 g/l' ye düştüğü görülmüştür. Peynir altı suyu ortamında kimyasal oksijen isteğinde % 33, indirgen şeker miktarında ise % 27,8'lik bir azalma olduğu görülmüştür.

Peynir altı suyu atığı kültür ortamında minimal besiortamı içeren peynir altı suyunda toplam hücre sayısı $13,9 \times 10^9$ /ml olduğu görülmüştür. Minimal besiortamı içeren peynir altı suyundan NH_4Cl çıkarılınca *Pseudomonas putida*'nın üremediği görülmüştür.

Tablo. 3.5. Peynir altı suyu ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın üreme ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarının zamana bağlı değişimi

Zaman (saat)	Hücre sayısı (x10 ⁹ /ml)	Ramnolipid miktarı (g/l)	İndirgen şeker miktarı (g/l)	Kimyasal oksijen isteği (g/l)	Toplam fenol miktarı (g/l)
0	-	-	3,1	12,5	-
24	1,6	0,23	3,0	9,3	-
36	2,0	0,35	3,0	9,0	-
48	8,9	0,42	2,8	8,6	-
72	9,1	0,44	2,7	8,48	-
90	9,5	0,48	2,6	8,4	-

3.4. Şilempe Kültür Ortamında Mikroorganizmaların Üremesi ve Ramnolipid Eldesi

Eskişehir Şeker Fabrikasından temin ettiğimiz şilempe şeker fabrikasının yan ürünü olan melas'tan mayalanma yoluyla alkol üreten fabrikalarda ortaya çıkan kötü kokulu, koyu kahve renkli sıvımsı bir atık maddedir. Üretilen her bir litre alkol içerisinde yaklaşık on iki litre şilempe atığı oluşmaktadır. Şilempe azot ve fosfor bakımından oldukça fakir, potasyum bakımından ise oldukça zengin bir bileşiktir. Yoğun organik kirlilik yükü nedeniyle doğrudan doğruya toprak ve su gibi alıcı ortama verilmesi sakıncalar doğurmaktadır.

Şilempe kültür ortamlarında *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida*'nın üreme ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezleme yeteneğini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmalarda minimal besiortamı içeren % 5 ve % 10 şilempe ve içermeyen şilempe ortamlarında mikroorganizmaların üremediği görülmüştür.

Şilempe kültür ortamının *P. aeruginosa* ve *P. putida* karşı antimikrobiale etkisi üzerine yaptığımız çalışmada şilempe'nin bu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Tablo.3.6. *Pseudomonas aeruginosa*'nın melas kültür ortamlarında zamana bağlı ramnolipid biyoyüzeyaktif madde verimliliği

Zaman (saat)	Toplam Hücre Sayısı ($\times 10^3$)/ml	Ramnolipid biyoyüzeyaktif madde (g/l)	Verimlilik (g/toplam hücre)
24	5,6	0,36	$0,06 \times 10^{-10}$
36	8,7	0,44	$0,05 \times 10^{-10}$
48	21,0	0,50	$0,23 \times 10^{-9}$
72	23,0	0,78	$0,33 \times 10^{-9}$
90	24,6	0,75	$0,30 \times 10^{-9}$

Tablo.3.7. *Pseudomonas aeruginosa*'nın peynir altı suyu kültür ortamlarında zamana bağlı ramnolipid biyoyüzeyaktif madde verimliliği

Zaman (sa)	Toplam Hücre Sayısı ($\times 10^9$)/ml	Ramnolipid biyoyüzeyaktif madde (g/l)	Verimlilik (g/hücre sayısı)
24	1,6	0,23	$0,14 \times 10^{-9}$
36	2,0	0,35	$0,17 \times 10^{-9}$
48	8,9	0,42	$0,04 \times 10^{-9}$
72	9,1	0,44	$0,04 \times 10^{-9}$
90	9,5	0,48	$0,05 \times 10^{-9}$

3.5. Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerinin Mikroorganizmalara Karşı Antimikrobiyal Etkileri

Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri üzerine yaptığımız çalışmada elde edilen bulgular Tablo. 3.8'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi ramnolipidler gram pozitif bakterilerden *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* bakterilere karşı etkili olmadığı yine gram negatif bakterilerden *Escherichia coli*' ye karşı da etkili olmadığı bunun yanında *Klebsillea pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisinin çok az olduğu görülmüştür. Ramnolipidler *Saccaromyces cerevisiae* ve *Candida sp.*'e karşı her hangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir.

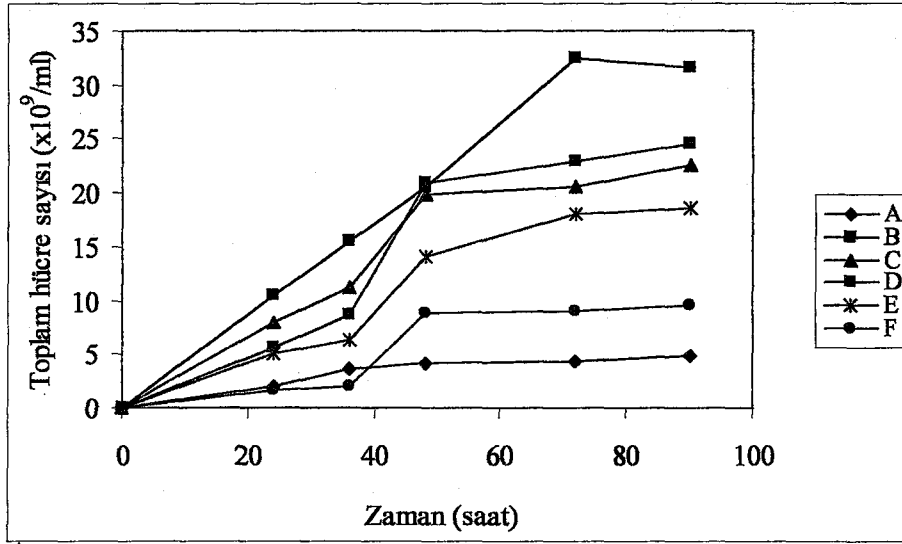
Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri denediğimiz diğer mikroorganizmalara göre *Klebsillea pneumoniae*'de daha fazla etkili olduğu, *Enterobacter aerogenes* ve *Bacillus subtilis*'te de çok az etkili olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar standartlarla karşılaştırıldığında streptomisin sülfat, tobramisin ve nistatin'nin bakteri ve mayalara karşı daha etkili olduğu ramnolipidlerin *Klebsillea pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Bacillus subtilis*'de çok az etkili olduğu *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterileri ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida sp.* mayalarında etkili olmadığı görülmüştür.

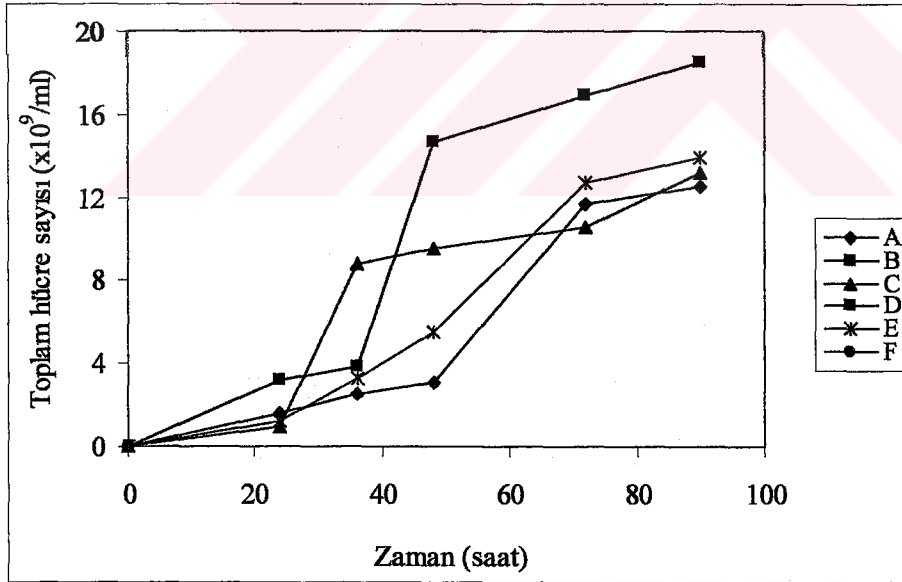
Tablo.3.8. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 kültürlerinden elde edilen ramnolipidlerin ve standart antiyotiklerin bazı mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları inhibisyon zonları (mm)

Mikroorganizmalar	Ramnolipidler	Streptomisin sülfat	Tobramisin	Nistatin
<i>Bacillus cereus</i>	-	16	-	ND
<i>Bacillus subtilis</i>	8	19	16	ND
<i>Escherichia coli</i>	-	21	10	ND
<i>Klebsillea pneumoniae</i>	9	16	10	ND
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	16	11	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	17	13	ND
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	20

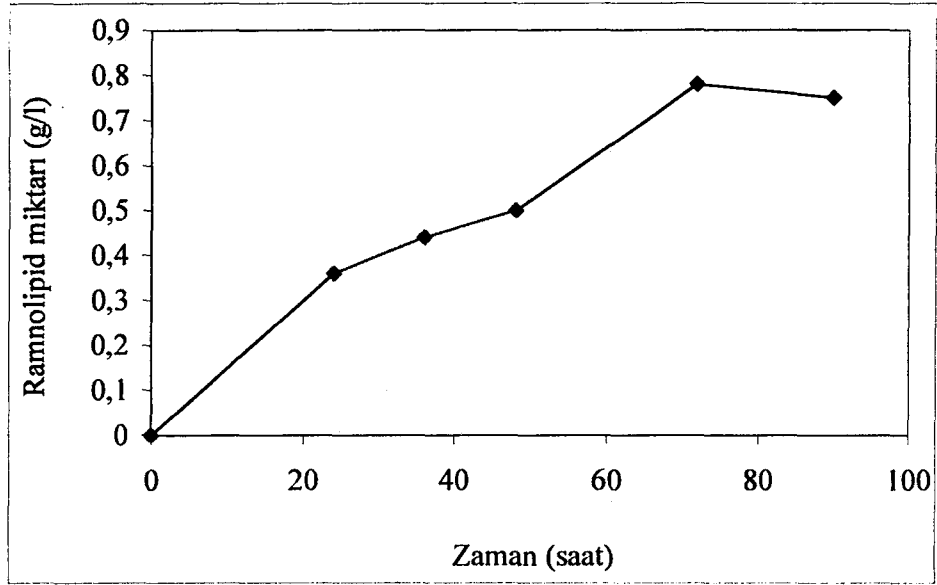
ND: Denenmedi



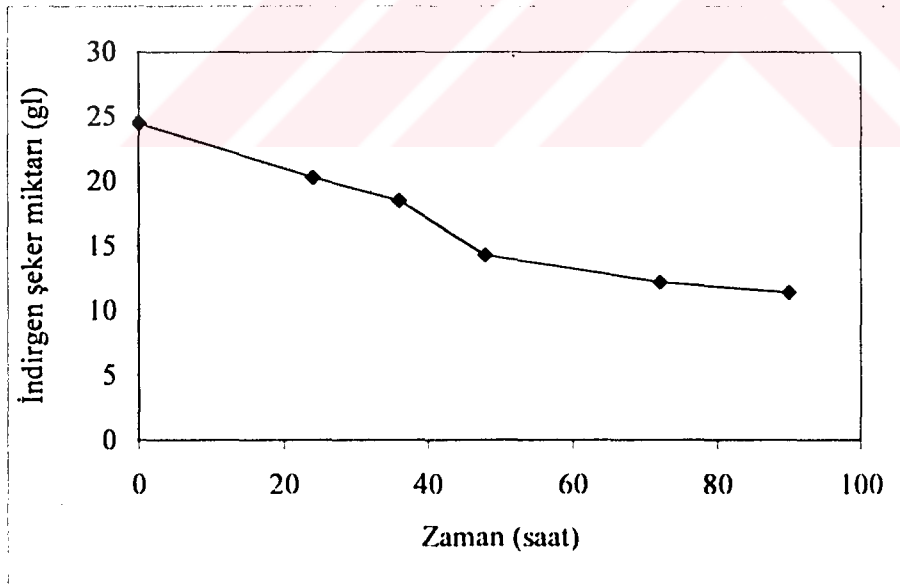
Şekil 3.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı (A: Minimal besiyortamı, B: Minimal besiyortamı + % 5 melas, C: Minimal besiyortamı + % 10 melas, D: Melas, E: Minimal besiyortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)



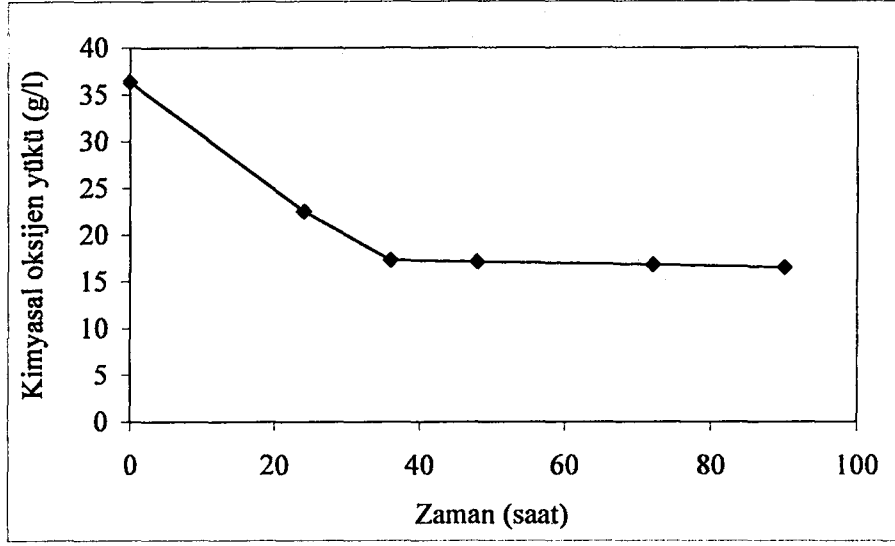
Şekil 3.4. *Pseudomonas putida*'nın kültür ortamlarındaki toplam hücre sayısı (A: Minimal besiyortamı, B: Minimal besiyortamı + % 5 melas, C: Minimal besiyortamı + % 10 melas, D: Melas, E: Minimal besiyortamı + peynir altı suyu, F: Peynir altı suyu)



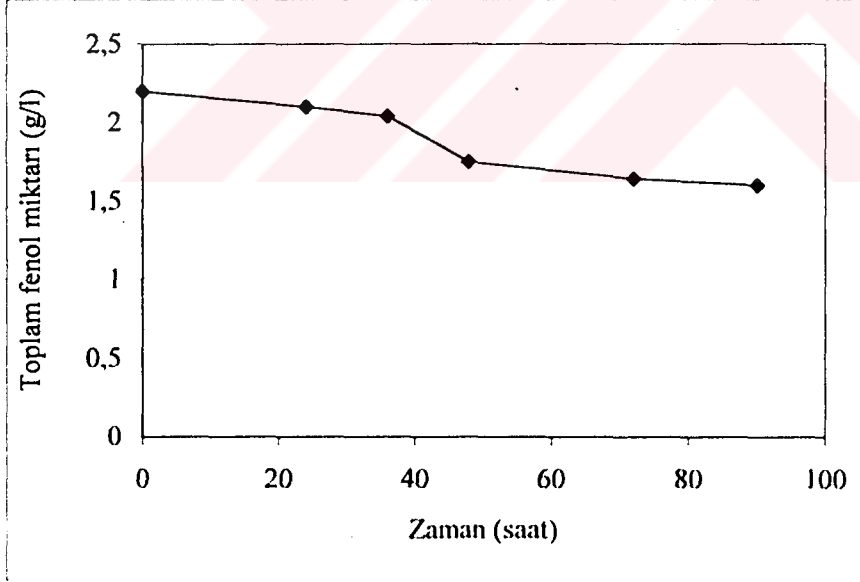
Şekil 3.5. Melas kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid biyoyüzeyaktif miktarı



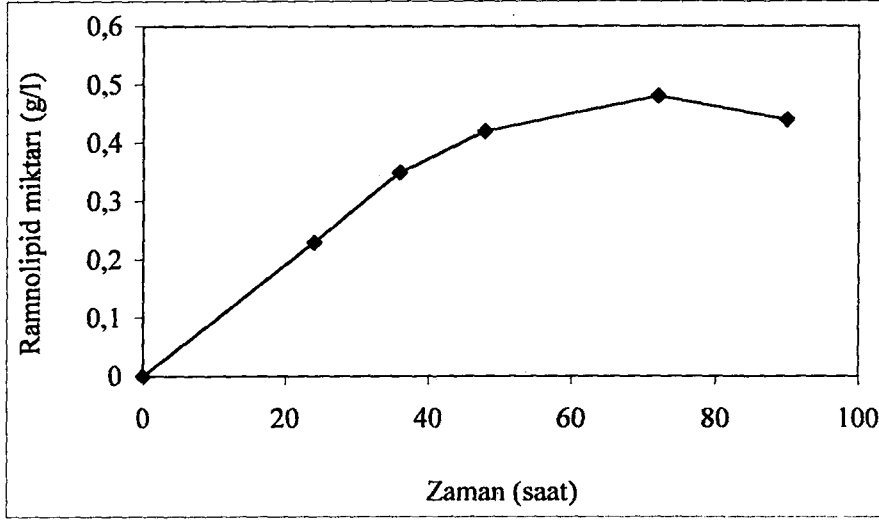
Şekil 3.6. Melas kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın toplam indirgen şeker miktarı



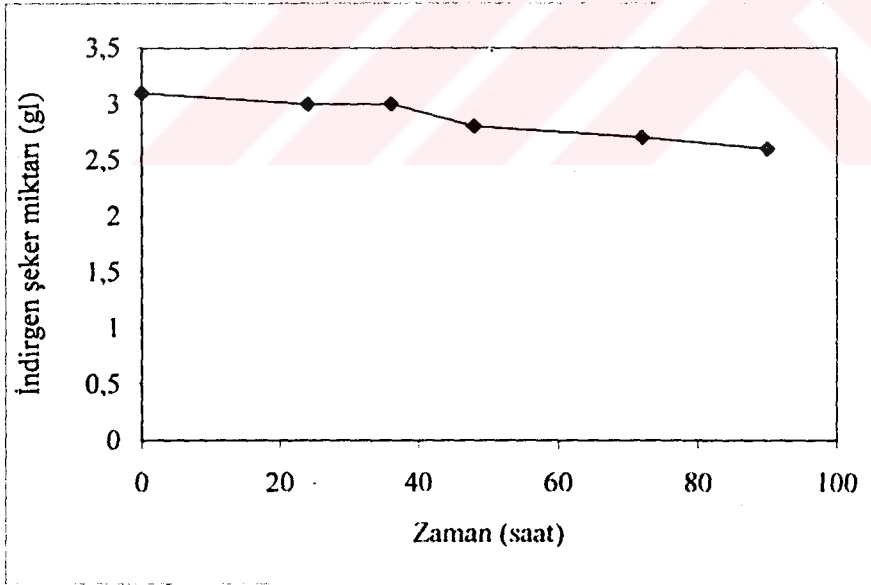
Şekil 3.7. Melas kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın kimyasal oksijen istek yükü



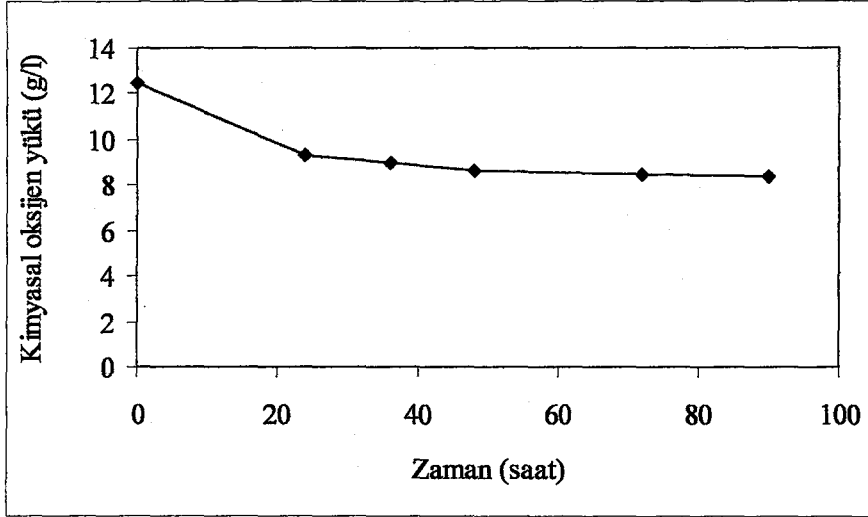
Şekil 3.8. Melas kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın toplam fenol miktarı



Şekil 3.9. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı



Şekil 3.10. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın toplam indirgen şeker miktarı



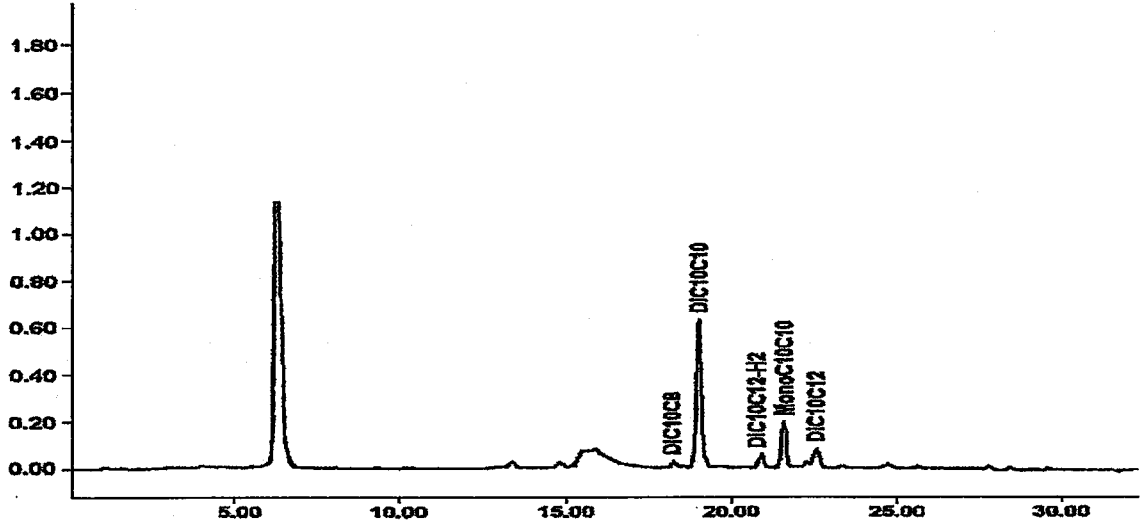
Şekil 3.11. Peynir altı suyu kültür ortamında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın kimyasal oksijen isteği

3.6. Kültür Ortamlarında Ramnolipid Biyoyüzeyaktif Maddelerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)'de Analizleri

Şeker fabrikası atık maddesi olan melas ortamında *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinden elde edilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin 18.5, 19.5, 20.0 dk'daki piklerde mono ve di ramnoz şekerleri (Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ve Rha-C₁₀-C₁₀) görülmüştür. Ramnoz şekerinin % 27,5'i mono ramnoz % 59,7'si di ramnoz şekerleri olduğu ve di-ramnoz şekerlerin mono ramnoz şekerlerinde fazla miktarlarda olduğu tespit edilmiştir.

Süt fabrikası atık maddesi olan peynir altı suyu kültür ortamında *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinden elde edilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri 21.5, 22.0 ve 22.5 dk. piklerde mono ve di ramnoz şekerleri (Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{10-H2} ve Rha-Rha-C₁₀-C₁₂) olduğu ve % 58,4'nü mono ramnoz şekerleri, % 30,8'ni di-ramnoz şekerleri olduğu tespit edilmiştir.

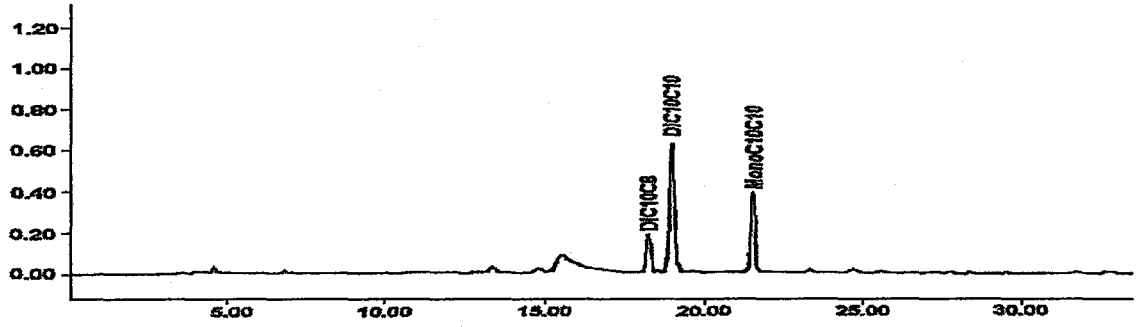
Melas ortamında di rhamnoz şekerleri mono rhamnoz şekerlerinden daha fazla miktarlar bulunurken peynir altı suyu ortamında ise mono ve di-ramnoz şekerleri ise aynı miktarda olmuştur.



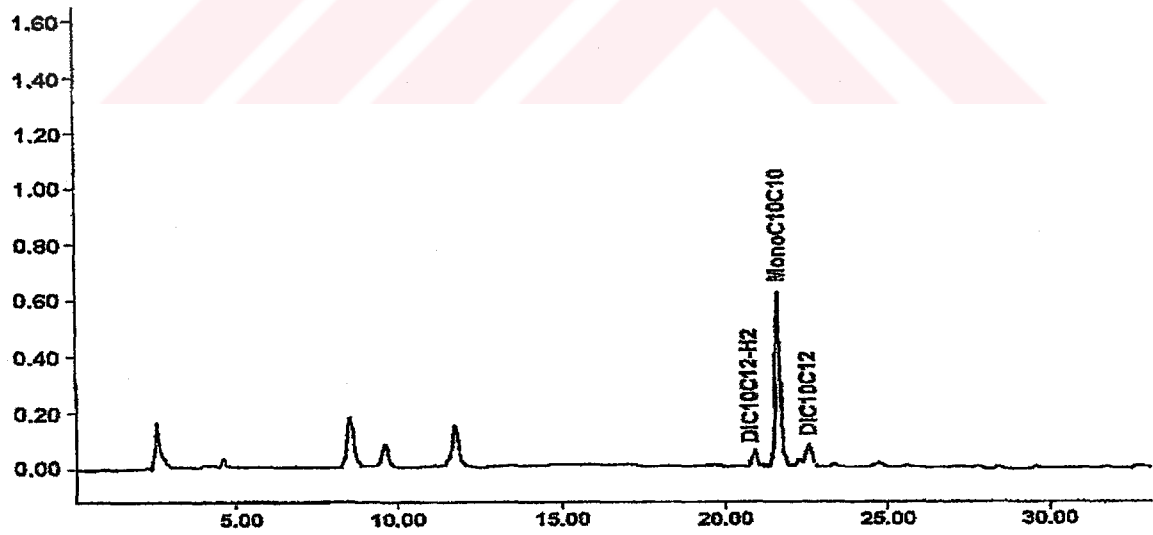
Şekil 3.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografi’de ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin standart kromatogramı

Rhamnolipid Yapısı	Retention time dk.	Pseudomolecular ion m/z	Relative abundance%		İyon fragment m/z
			Melas	Peynir altı	
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	13.35	677	ND	ND	163, 169
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	15.50	705.5	ND	ND	245, 145
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	18.50	763.4	13.5	ND	141, 452
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	19.50	645.5	46.2	ND	169, 311
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12-H2}	21.50	531.0	ND	14.5	333, 339
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	22.00	817.5	27.5	58.4	339, 321
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	22.50	819.5	ND	16.3	345, 433
Rha-C ₁₂	23.60	361.0	ND	ND	112, 265

ND: Tespit edilmedi



Şekil 3.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografi’de melas ortamında ramnolipid biyoyüzey maddelerin kromatogramı



Şekil 3.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografi’de peynir altı suyu ortamında ramnolipid biyoyüzey maddelerin kromatogramı

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çevre teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda biyoyüzeyaktif madde üretimine olan ilgi daha da artmıştır. Ülkemizde ise biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine çok az araştırma yapılmıştır. Dünya’da hemen her yıl milyonlarca ton zararlı veya zararsız atık madde çevreye atılmakta ve bu atık maddelerin yok edilmesi çeşitli sanayi kuruluşlarına büyük yükler getirmektedir. Tarımsal ürünlerin örneğin tahıl ürünlerinin % 60’ı, yağlı tohum ürünlerinin % 85’i, şeker ürünlerinin % 90’nı kullanılmayan atık madde olarak çevreye bırakılmaktadır. Modern endüstri klasik yöntemler yerin biyoteknolojik yöntemlere bırakmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarla, bu atık maddelerin büyük bir kısmı geri kazanılıp tekrar ham madde olarak kullanılabilceği belirtilmiştir [1, 28].

Araştırmamızda hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hem de tarım, tıp, kozmetik, çevre teknolojisi ve petrol endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan katı, sıvı ve gaz molekülleri arasındaki yüzey ve iç yüzey gerilimi azaltabilen yüzey aktif bileşikler olan ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için kültür ortamı olarak melas, şilempe ve peynir altı suyu atık maddeleri kullanılmıştır.

Atık maddeler çevreye bırakıldıkları zaman ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle veya organizmalarla sıkı bağlar kurmakta ve çevreye zarar vermektedir. Özellikle canlı yapısında birikerek toksik, kanserojenik ve mutajenik etki yapmaktadır. Mercade ve ark (1996); endüstriyel atık maddelerin mikroorganizmalar tarafından biyoyüzeyaktif madde üretiminde kültür ortamları olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir [28].

Çalışmamızda melas, şilempe ve peynir altı suyu gibi şeker ve süt fabrikası atık maddeleri üzerinde üreyip çoğalabilceği düşüncesiyle Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonlarından elde ettiğimiz *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* mikroorganizmalarından yararlanılmıştır. Ayrıca kültür ortamlarından elde edilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri yapıları yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)’de analizleri yapılmıştır. Bunun yanında ramnolipidlerin bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellikleri de araştırılmıştır.

Ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimini etkileyen en önemli fizyolojik faktörlerden birisi sıcaklıktır. Bir çok araştırmacı *Pseudomonas* bakterilerinin 30-37°C’deki sıcaklıklarda optimum gelişme gösterdiği ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde ürettiğini ve daha düşük veya yüksek sıcaklıklarda istenilen sonuçların elde edilmediğini bildirmişlerdir [4, 17, 56].

Bu nedenle çalışmamızda mikroorganizma kültürleri çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir. Robert ve ark (1989); glukoz üzerinde gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 kültürlerinde ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesi için en uygun sıcaklığın 37°C olduğunu, Mata-Sandoval ve ark (1999); mısır yağı üzerinde gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* UG2 kültürlerinin 37°C'de ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlediğini bildirmişlerdir [18, 56].

Biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine yapılan araştırmalar ramnolipid sentezinin sekonder metabolizma ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bilindiği gibi sekonder metabolitlerin sentezi üremenin durgunluk fazına erişmesi ile artmaktadır. Ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra 24. 90. ve 120. saatler olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır [4, 32, 59].

Birçok mikroorganizmanın farklı karbon kaynaklarında biyoyüzeyaktif maddeler ürettiği bilinmektedir. Melas, şilempe ve peynir altı suyu kültür ortamlarında mikroorganizmaların üremesi üzerine yatığımız çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* minimal besiortamında üredikleri, *Pseudomonas aeruginosa* minimal besiortamı içeren % 5, % 10 melas ortamlarında ve peynir altı suyu ortamlarında üredikleri görülmüştür. *Pseudomonas putida* minimal besiortamı içeren melas ve peynir altı suyu kültür ortamlarında üredikleri fakat minimal besiortamı içermeyen peynir altı suyunda üremediği görülmüştür. Yapılan denemeler sonunda peynir altı suyunda NH₄Cl yokluğunda *Pseudomonas putida*'nın üremediği tespit edilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa ve *Pseudomonas putida*'nın minimal besiortamı içeren içermeyen % 5 ve % 10 şilempe ve içermeyen şilempe kültür ortamlarında üreme göstermediği ve yapmış olduğumuz denemelerde *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* karşı antimikrobiyal etki özelliği gösterdiği görülmüştür.

Kültür ortamlarında toplam hücre sayısı *Pseudomonas aeruginosa*'da *Pseudomonas putida*'ya göre daha fazla olduğu, *Pseudomonas aeruginosa*'nın melas gibi yoğun şeker içeren ortamlarda *Pseudomonas putida*'ya göre daha iyi üredikleri ve toplam hücre sayısı en fazla 31,5x10⁹/ml ile minimal besiortamı içeren % 5 melas ortamında olduğu görülmüştür. *Pseudomonas putida*'da toplam hücre sayısı en fazla 18,5x10⁹/ml ile minimal besiortamı içeren % 5 melas ortamında olmuştur.

Pseudomonas aeruginosa minimal besiortamı içeren ve içermeyen peynir altı sularında toplam hücre sayısı 18,5 ve 9,55x10⁹/ml olduğu minimal besiortamı içeren peynir altı suyunda daha fazla olduğu görülmüştür. *Pseudomonas putida* ise minimal besiortamı içeren peynir altı suyunda toplam hücre sayısının 13,9x10⁹/ml olduğu görülmüştür. Azot kaynağı yetersizliği nedeniyle

Pseudomonas putida peynir altı suyunda üremediği bunun için minimal besi ortamına NH_4Cl ilave edilmesi gerektiği görülmüştür.

Bazı araştırmacılar ramnolipid üretiminde kültür koşulları ve besinlerin önemli olduğunu, Guerra-Santoz ve ark (1986) besi ortamına magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum tuzları ve iz elementlerin az miktarda eklenmesinin *P. aeruginosa*'da ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimini artırdığını, benzer şekilde Syldatk ve ark (1985) *Pseudomonas* DSM 2874 kültür ortamına sınırlı miktarda azot eklenmesinin ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretiminin artırdığını, Wu ve Ju (1998); sürekli ve sürekli olmayan hücre kültürlerinde Fe^{+2} , Mg^{+2} veya Ca^{+2} gibi katyonik iyonların ramnolipid miktarının artırdığını bildirmişlerdir [15, 25, 58].

Benzer çalışmalarda Sidal ve ark (2000); zeytinyağı fabrika atık maddesinde 72 saate toplam hücre sayısı $160 \times 10^6/\text{ml}$ olduğu, Dubey ve Juwarkar ve ark (2001); peynir altı suyu atık maddesinde hücre sayısının 48 saate $64 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ olduğunu bildirmişlerdir [4, 36].

Melas ve peynir altı suyu kültür ortamları kullanılarak ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesi üzerine yaptığımız çalışmada 72. saate *Pseudomonas aeruginosa* melas kültür ortamında en fazla 0,78 g/l ve peynir altı suyu kültür ortamında 90. saatte 0,48 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edildiği görülmüştür.

Birçok mikroorganizmanın farklı karbon kaynaklarında biyoyüzeyaktif madde ürettiği bilinmektedir. Yapılan benzer çalışmalarda Itoh ve ark (1971); parafin üzerinde gelişebilen *P.aeruginosa* KY 4025 kültürlerinin 17 g/l, Yamaguchi ve ark (1976)'da yine parafin üzerinde gelişebilen *Pseudomonas* kültürlerinde 14 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir. Para ve ark (1990); zeytinyağı üzerinde gelişebilen *P.aeruginosa* 44 T1 kültürlerinde 9 g/l, Manresa ve ark (1991) yine zeytinyağı besi ortamında 10 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [15].

Şeker fabrikası atığı olan melas ve şilempe ile süt fabrikasının atığı olan peynir altı suyu sahip oldukları organik bileşikler ve toksik içeriği nedeniyle mikroorganizmaların üremelerini engelleyici bir özelliği sahiptir.

Mercada ve ark (1993); *Pseudomonas* sp JAMM tarafından ramnolipid üretiminde zeytin yağı atıklarının kültür ortamı olarak kullanılması üzerine yaptığı çalışmada zeytin yağı fabrika atığında denediği 22 mikroorganizma kültürlerinden sadece 15 tanesinin geliştiğini bunlarında genelde *Pseudomonas* türlerine ait kültürler olduğunu bildirmişlerdir [32].

Zamana bağlı olarak kültür ortamlarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın ramnolipid ürün verimliliği melas ortamında en fazla $0,33 \times 10^{-9}$ g/hücre sayısı, peynir altı suyunda ise en fazla

$0,17 \times 10^{-9}$ gr/hücre sayısı olduğu ve toplam hücre sayısı ve ramnolipid miktarı melas kültür ortamında peynir altı suyu kültür ortamına göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Ayrıca zamana bağlı melas ortamında indirgen şeker miktarı 24,5 g/l' den 11,4 g/l' ye azaldığı, peynir altı suyunda ise 3,1 g/l' den 2,6 g/l' ye azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda beklenildiği gibi ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı ve toplam hücre sayısında zamana bağlı olarak genel olarak bir artma olurken indirgen şeker miktarında zamana bağlı olarak bir azalma olmuştur.

Riadi ve ark; karbon kaynağı olarak melas kullanılarak ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretilmesi üzerine yaptıkları çalışmalarda; *P. aeruginosa* kültürlerinde 0,21 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edildiğini bildirmişlerdir. Pattei ve Desai (1997) karbon kaynağı olarak melas ve mısır likörünü kullandıkları çalışmalarda; *Pseudomonas aeruginosa* GS3 kültürlerinde 0,24 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [15, 36].

Melas besi ortamında ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı yukarıdaki çalışmalara göre daha fazla olmuştur. Bunun nedeni kullanılan mikroorganizma kültürlerinin farklı olması olabileceği gibi melas ortamının içeriğinin farklı olması da olabilir.

Sudhakar Babu ve ark (1996) ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesinde peynir altı suyunun sentetik besiortamlarına göre daha uygun olduğunu ve peynir altı suyunda mikroorganizmaların spesifik büyüme oranları ve spesifik ürün oluşturma oranlarının daha fazla olduğunu belirtmiştir [35].

Dubey ve Juwarkar (2001); yağlardan izole ettiği *Pseudomonas aeruginosa* BS2 kültürlerinin peynir altı suyunda 0,92 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiğini ve fermantasyon ortamının yüzey gerilimini 72 mN/m'den 27 mN/m'ye düşürdüğünü ve peynir altı suyunun ramnolipid üretiminde uygun bir substrat olduğunu bildirmişlerdir [36].

Mikroorganizmalar ya ortamda bulunan ve çözünmeyen bileşiklere difüze olmak için ya da onları emülsifiye etmek için biyoyüzeyaktif maddeler sentezlemektedir. Bu nedenle bir farklı karbon kaynaklarında ramnolipid üretimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Sidal ve ark (2000); zeytinyağı fabrikası atık maddesinde 0,875 gr/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiğini, Jarvis ve Johnson (1949) karbon kaynağı olarak gliserol'ü kullandıkları çalışmalarında *P. aeruginosa* kültürlerinin 2,5 g/l, Osman ve ark (1996); etanol üzerinde gelişebilen *Pseudomonas* sp. BOP 100 kültürlerinden 32 g/l, Matsufuji ve ark (1997); etanol üzerinde gelişebilen *P. aeruginosa* IFO 3924 kültürlerinden 24,3 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [60, 61].

Mikroorganizmaların ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri üretilip üretilmemesi daha çok mikroorganizmanın cinsine bağlıdır. Genellikle *Pseudomonas* türleri diğer türlere göre daha fazla ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri üretmektedir. Fakat *Pseudomonas* türlerinin cevapları birbirlerinden farklıdır. Yapılan çalışmalar ramnolipid oluşumunda karbon kaynaklarının önemli olduğunu göstermektedir.

Linhardt ve ark (1989); mısır yağında gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* UI 29791 kültürlerinde 46 g/l ramnolipid elde ettiğini, Wullbrandt ve ark (1994) soya yağında gelişebilen *P.aeruginosa* DSM 7108 kültürlerinden 78 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [62].

Sim ve ark (1997) karbon kaynağı olarak kanola yağı üzerine yaptıkları çalışmalarda *P.aeruginosa* UW-1 kültürlerinde 24 g/l ramnolipid sentezlediğini, Babu ve ark (1996); *P.aeruginosa* BS 2 kültürlerinde mikrobiyal transformasyonla peynir altı suyunda 1,78 g/l, sükröz besi ortamında ise 1,85 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmiştir [15, 63].

Vollbrecht ve ark (1998); *Tsukamurella* sp DSM 44370 kültürleri tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddelerde verimliliği artırmak için bitkisel yağların kullanılması üzerine yaptığı çalışmada, karmaşık hidrofobik karbon kaynaklarının yerine doğal ve bitkisel yağlardan glikolipid yapısındaki biyoyüzeyaktif maddelerin (ramnolipid) daha fazla miktarda elde edildiği ve oleik asit yönünden zengin bitkisel yağların daha iyi sonuçlar verdiğini, ayçiçek yağında 5 g/l glikolipid elde ettiğini ve fizikokimyasal özelliği incelendiğinde ise suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 35 mN/m'ye düştüğünü ve kritik misel konsantrasyonun 10 mg/l olduğu bildirmiştir [31].

P. aeruginosa AT 110 kültürlerinin soya yağı atık maddesinde 9,5 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiğini ve soya yağı atık maddesinin ramnolipid üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. [34].

Ucuz substratlardan ramnolipid üretilmesi üzerine yapılan çalışmalarda; hidrokarbonları parçalayabilen *Pseudomonas aeruginosa* kültürleri soya yağı ve gliserol'de 4,31 g/l ve 1,77 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [65].

Mikroorganizmaların zeytinyağı ve ayçiçek yağı atığında biyoyüzeyaktif madde üretme yetenekleri üzerine yapmış oldukları çalışmalarda, mikroorganizmaların zeytinyağı atığında daha iyi üreme ve gelişme gösterdiğini, üretilen biyoyüzeyaktif maddelerinin ise glikolipid yapısında ramnolipidler olduğunu bildirmiştir. Ayrıca çeşitli *Bacillus* türlerinde biyoyüzeyaktif madde üretebilme yeteneğine sahip olduğunu fakat yüzey gerilimini *Pseudomonas* türleri kadar azalmadığını diğer mikroorganizmalardan *Rhodococcus* sp., *Candida* sp. ve *Acinetobacter calcoaceticus*'un *Pseudomonas* ve *Bacillus* kadar iyi sonuçlar vermediğini bildirmişlerdir [30].

Arino ve ark (1996) *Pseudomonas* GL1 kültürlerinde farklı karbon kaynaklarında ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarda; gliserol ortamının glukoz, galaktoz, mannoz, manitol ve sorbitol ortamlarına göre daha fazla miktarda ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [4, 15, 57].

Zeytinyağı fabrika atığından ramnolipid üretimine karbon kaynaklarının etkisi üzerine yaptıkları çalışmada; glukoz, ramnoz, süktroz, gliserol, manitol, früktoz, maltoz, galaktoz ve nişasta'yı denemiş ve gliserol'de ramnolipid miktarının daha fazla olduğunu fakat gliserol'ün diğer karbon kaynaklarına göre daha pahalı olduğunu için kullanımının ekonomik olmadığını belirtmişlerdir [4].

Pseudomonas aeruginosa LBI kültürlerinin farklı substratlarında ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine yaptığı çalışmalarında sabun köpüğünde 12 g/l ramnolipid elde ettiğini ve en uygun substratın sabun köpüğü olduğunu bunun yanında soya yağında 4,8 g/l, ayçiçek yağında 4g/l, zeytinyağında 5,4 g/l ve oleik yağ asitlerinde ise 4,5 g/l ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde ettiklerini bildirmişlerdir [64].

Ramana ve Karanth (1989), Mulligan ve Gibbs (1989) ramnolipid sentezinde azot kaynağının önemli olduğunu ve nitrat azot'un amonyum azot'undan ramnolipid miktarını daha fazla artırdığını bildirmişlerdir [4, 22, 23, 59].

Pseudomonas aeruginosa sp. ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesine azot kaynağının etkisi üzerine yaptığı çalışmada, sodyum nitrat'ın diğer azot kaynakları olan amonyum nitrat, amonyum fosfat, amonyum karbonat, potasyum nitrat'tan daha yüksek oranda ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edildiğini bildirmişlerdir [4].

Şeker ve süt fabrikasının atık maddesi olan melas ve peynir altı suyu ortamının kirlilik yükünün mikroorganizmalar tarafından kültürlerinin azaltma kabiliyetleri üzerine yapmış olduğumuz çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın melas ortamında kimyasal oksijen isteği % 55 oranında azaldığı, peynir altı suyunda ise kimyasal oksijen isteği % 35 oranında azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca melas besiyortamında toplam fenol miktarında ise % 30 oranında azaldığı tespit

edilmiştir. Melas ve peynir altı suyu ortamlarında toplam hücre sayısı ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarı zamanla artarken besi ortamların kimyasal oksijen isteğinin azaldığı görülmüştür.

Zeytinyağı atık maddesinin kirlilik yükünün *Pseudomonas* sp. türleri tarafından azaltılması ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimi üzerine yapmış oldukları çalışmalarda substrat'ın kimyasal oksijen isteğinin % 50-70 oranında azalttığı, total fenol miktarının ise % 30-40 oranında bir azalma olduğunu ve zeytinyağı atık maddesinin kirlilik yükünün zamanla azaldığını bildirmişlerdir [4].

Harvey (1990); Alaska'daki petrol kirliliğinde ramnolipid üreten *P. aeruginosa* bakterilerinin ham petrollü parçalayabilme yeteneğine sahip olduğunu, Chakrabarty (1985); petrole kirletilmiş plajlarda hidrokarbonları temizlemek için *Pseudomonas aeruginosa* SB30 kültürleri tarafından üretilen biyoyüzeyaktif maddelerin (ramnolipid) kullanılabileceğini bildirmiştir [10, 11, 14].

Pseudomonas aeruginosa kültürlerinin atık maddeler üzerinde üreyip çoğalabilme yeteneğinde sahip olduğu ve hidrokarbonları karbon kaynağı olarak kullanabildiğini ve ramnolipid biyoyüzeyaktif madde sentezlediğini göstermektedir [7, 8, 10, 11, 14, 17].

Yapılan bazı çalışmalar ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin antibakteriyal ve antifungal etkileri olduğu ve biyolojik kontrol amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir. Ramnolipidlerin *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* ve *Plasmopora lactucae-radicis* gibi bitki patojenlerinin zoosporlarına antifungal etki gösterdiği 5 mg/l' den 30 mg/l' ye kadar değişen oranlardaki konsantrasyonlarının bir dakikadan daha kısa bir sürede patojen fungusların zoosporları içerisine girerek hareketlerini kısıtladığı ve lizis ettiği bildirilmiştir [19].

Bazı araştırmacılar; % 1'lik ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin tütün mozaik virüsü ve patates X virüsü için *Nicotiana glutinosa* yapraklarında biyokontrol olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [29].

Kültür ortamlarından elde ettiğimiz ramnolipidlerin antimikrobiyal etkisi üzerine yaptığımız çalışmada, gram pozitif bakterilerden *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olmadığı, gram negatif bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes*'de az etkili olduğu, *Escherichia coli*'ye ve bunun yanında *Saccaromyces cerevisiae* ve *Candida* sp. gibi mayalara karşı inhibasyon etkisi göstermediği görülmüştür.

Klebsiella pneumoniae'da ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri çok az inhibasyon etkisi göstermesine rağmen denediğimiz diğer mikroorganizmalara göre daha fazla etkili olmuştur.

Elde edilen sonuçlar standartlarla (streptomisin sülfat, tobramisin ve nistatin) karşılaştırıldığında ramnolipid biyoyüzey aktif maddelerinin mikroorganizmalara karşı yeterince etkili olmadığı görülmüştür.

Haba ve ark (2000) tarafından *Pseudomonas aeruginosa* 47 T2 NCBIM 40044 kültürlerinden elde edilen ramnolipidlerin antimikrobiyal özellikleri üzerine yapmış oldukları çalışmalarda; ramnolipidlerin *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalarda etkili olmadığı, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Aureobasidium pullulans*'da da etkili olmadığı bunun yanında *Fusarium solani* ve *Glicadium virens* gibi funguslarda etkili olduğunu, gram pozitif bakterilerde ise *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* de çok az etkili olduğu gram negatif bakterilerde ise en fazla *Klebsilla pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Serratia marcescens*'de inhibasyon etkisi gösterdiğini bildirmiştir.

Birçok mikroorganizma değişik yerlerde yaşamlarını sürdürmektedir. Bunun sebebi her mikroorganizmanın kendine özgü bir çevresel isteğinin olmasıdır. Mikroorganizmaların çevresel istekleri genellikle beslenme gereksinimleri ve fiziksel istekleri şeklinde olmaktadır.

Yapılan çalışmalar ramnolipid biyoyüzeyaktif madde miktarında kullanılan karbon kaynaklar, kullanılan mikroorganizmalar ve ortama ilave edilen kimyasal maddelere göre büyük değişiklikler göstermektedir.

Çalışmamızda melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddelerin kültür ortamı olarak ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretiminde kullanılabileceği görülmüştür. Ancak diğer mikroorganizmalar ve endüstriyel atık maddelerde denenmelidir. Endüstriyel boyutta üretime geçilmeden önce fermentör deneyleri yapılarak en ekonomik sonuçlar elde edilmelidir.

Bir çok araştırmacı gaz kromatografi, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), mass spektrofotometre ve nukleer magnetik rezonans gibi yöntemlerle ramnolipidlerin yapısını araştırmıştır [29].

Çalışmada melas ve peynir altı atık suyu kültür ortamında *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturdukları ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin yapısı yüksek performanslı sıvı kromatografi'de analiz edildi. Buna göre melas ortamındaki ramnolipidler de mono ve di ramnoz şekerleri olduğu görülmüştür. Peynir altı suyu ortamındaki ramnolipidlerde de mono ve di ramnoz şekerleri olduğu tespit edilmiştir.

Mata Sandoval ve ark (1999); mısır yağı üzerinde gelişebilen *Pseudomonas aeruginosa* UG2 kültürlerinden elde ettikleri ramnolipidlerin izolasyonu ve tayini üzerine yaptıkları çalışmalarda $Rh_2C_{10}C_{10}$, $RhC_{10}C_{10}$ ve $Rh_2C_{10}C_{12}$ ramnolipid biyoyüzeyaktif madde olduğunu,

P.aeruginosa'nın yaşlı kültürlerinde (30 günlük) $R_2C_{10}C_{12}$ ve $R_2C_{10}C_{10}$ sabit kalırken $RC_{10}C_{10}$ ve $RC_{10}C_{12}$ 'nin azaldığını bildirmişlerdir [18].

Arino ve ark (1996) tarafından ramnolipid biyoyüzeyaktif madde üretimi ve analizi üzerine yaptıkları çalışmalarda; gaz kromatografisinde hidrofilik kuyruğun ramnoz şekeri olduğunu lipidik kuyruğun ise mass spektrofotometre ve gaz kromatografi analizleri sonunda hidroksi yağ asitleri içerdiğini bunların ise 3-hidroksidekonoik asit, 3-hidroksioktanoik asit ve 3-hidroksidodekonik asit olduğunu bildirmişlerdir [58].

Değişik çevre koşullarında farklı *Pseudomonas* türlerinin farklı yapıda ve miktarlarda ramnolipidler ürettiği bilinmektedir. *P. aeruginosa* kültürlerinin ürettiği ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin yüksek performanslı sıvı kromatografi ve gaz kromatografi yöntemleri ile tam ve hızlı bir şekilde tesbit edilmesi ramnolipid yapısının, miktarının ve sentezinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır.

Lang ve Wullbrandt (1999); HPLC ve TLC yöntemlerine göre izole edilip, tanımladıkları ramnolipid karışımlarının L- α -ramnoprenosil- β -hidroksidekonat ($RhC_{10}C_{10}$) ve L- α -ramnoprenosil- β -hidroksidekonoil- β -hidroksidekonat ($Rh_2C_{10}C_{10}$) olduğunu, Benincasa ve ark (2002); yüksek performanslı sıvı kromatografide tanımladıkları ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerde monoramnolipidlerin diramnolipidlere oranın 1: 3 olduğunu bildirmişlerdir [15, 65].

Bir çok araştırmacı rhamnolipid karışımındaki bileşiklerin özelliklerini TLC, mass spektrofotometre veya nükleer manyetik rezonans yöntemleri ile araştırmıştır. Bu yöntemlerde Rhamnolipidlerdeki şekerler ve yağ asitleri ayrı ayrı tanımlanmaya çalışılmakta fakat bu yöntemler hem çok zaman almakta da hem de rhamnolipid karışımındaki bileşiklerin miktarı ve özellikleri hakkında güvenilir bilgi vermemektedir.

Deziel ve ark (2000) yapmış oldukları çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa* 57RP strainin naftalin ve manitol üzerinde gelişebilen kültürlerinden elde ettikleri ramnolipid karışımlarını LC/MS yöntemleri ile tesbit etmeye çalışmışlar ve TLC ile saflaştırdıkları rhamnolipid karışımlarında $Rh_1C_{10}C_{10}$ ve $Rh_2C_{10}C_{10}$ elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Burger ve ark; dirhamnolipidlerin zorunlu olarak monorhamnolipidlerden oluşturduğunu Ochsner ve ark, Campos-Garcia ve ark rhamnolipid üretiminde rhl genlerinin aktifleştigi bildirmişlerdir. Denziel ve ark (2000); rhamnolipid karışımlarının iki farklı 3 hidroksi yağ asitleri zinciri içerdiğini iki karbondan birinin diğerinden kısa olduğunu rhamnoz kuyruğuna bağlanmış kısa zincirlerin ($Rh_2C_8C_{10}$ veya $Rh_2C_{10}C_8$) uzun zincirlerden en az iki kat kısa olduğu bildirilmiştir. $Rh_2C_{10}C_{12}$ ve $Rh_2C_{12}C_{10}$ çift bağ içeren hidroksi yağ asitlerinden daha büyük olduğunu bildirmiştir.

Ramnolipid biyoyüzeyaktif maddeleri tarım, kozmetik, gıda gibi bir çok alanda kullanıldığı için ilgi her geçen gün ilgi daha da artmaktadır. Petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi spesifik alanlarda kullanılan biyoyüzeyaktif maddelerinin sentez mekanizması, fizyolojik özellikleri ve biyokimyasal yapısının daha iyi bilinmesi gerekmektedir. Bunun için optimum koşullarda en yüksek üretimi gerçekleştirilmelidir. Geçen bir kaç yıl içerisinde ramnolipid sentezinin moleküler biyolojisi, saflaştırma yöntemleri araştırılmıştır. Ramnolipid sentezinde yapısal ve düzenleyici gen kodları izole edilmiştir.

Böylece ekstrasellular olarak ortama salınabilen ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin daha kolay ürün vermesini kolaylaştırıcı çevre koşulları tespit edilmelidir. Ayrıca diğer türlere gen transferi ile ramnolipid sentezi ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bunun yanında diğer endüstriyel atık maddeler denenmeli ve en ekonomik sonuçlar elde edilmelidir.

Ramnolipid verimini artırmak için mikroorganizmaların fizyolojik, biyokimyasal ve genetik araştırmaları yapılmalıdır.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada

- 1- Şeker fabrikası ve süt fabrikası atık maddesi olan melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddelerin karbon kaynağı olarak kullanılarak ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilebileceği görülmüştür.
- 2- Melas ve peynir altı suyu gibi atık maddelerin kültür ortamları olarak kullanılabilceği ve zamanla kirlilik yüklerinin azaltılabileceği görülmüştür.
- 3- Ramnolipidlerin antimikrobiyal etkilerinin bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilere çok az etkili olduğu mayalara ise etkili olmadığı görülmüştür.
- 4- Yüksek performanslı sıvı kromatografide yapılan çalışmalar ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerin melas ve peynir altı suyunda monoramnolipid ve dirhamnolipid yapısında olduğu görülmüştür.
- 5- Şilempe gibi şeker fabrikası atık maddelerinde mikroorganizma kültürlerinin üremediği ramnolipid biyoyüzeyaktif maddelerinin sentezlenmediği görülmüştür.

Çalışmamızda hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hem de tarım, tıp, kozmetik, çevre ve petrol endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan ramnolipid biyoyüzeyaktif madde elde edilmesi araştırılmıştır. Yaptığımız bu çalışmanın bundan sonraki çalışmalara faydalı olacağı inancındayız.

5. KAYNAKLAR

1. **Telefoncu A.**, (1995), Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, Bornova- İzmir
2. **Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.**, (2000), Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants, Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 495-508.
3. **Sidal U.**, (1997) *Pseudomonas* sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biosüpfektan Eldesi.Doktora Tezi,Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Edirne.
4. **Sidal U., Kolonyaka N., Kurtounur C.**, (2000), *Pseudomonas* sp. ile Zeytinyağı Atığından Biosüpfektan Elde Edilmesi, Turkish Journal of Biology, 24: 611-625.
5. **Kahyaoglu M.**, (1999), Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi.Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
6. **Van Dyke M.I., Lee H., Trevors J.T.**, (1991),Applications of Microbial Surfactants.Biotechnology, Advances, 9: 241-252.
7. **Mulligan CN., Yong RN., Gibbs BF.**, (2001), Heavy Metal Removal From Sediments by Biosurfactants, Journals of Hazard Material, 30; 85 (1-2). 111-125.
8. **Bartha R.**, (1986), Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation, Microbial Ecology, 12:155-172.
9. **Head I.M.**, (1998), Bioremediation: Towards Credible Tecnology, Microbiology, 144:599-608.
10. **Harvey S., Elashvilli I., Valdes JJ., Kamely D., Chakrabarty AM.**, (1990), Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil From Alaskan Gravel by a Microbiol Surfactant, Biotechnology, 8:228-230.
11. **Chakrabarty A.M.**, (1985), Genetically Maanipulated Microorganisms and Their Products in the Oil Service Industries, Trends Biotechnology, 3:32-38.
12. **Mattei G., Rambeloarisoa E., Giusti G., Rontani JF., Bernard JC.**, (1986), Fermentation Proceudue of a Crude Oil in Continuous Culture on Sea Water, Applied Microbiology and Biotechnology, 23:302-304.
13. **Santa Anna LM., Sebastian GV., Pereira N Jr., Alves TL., Menezes EP., Freire DM.**, (20019, Production of Biosurfactant from a New and Promissing strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1, Applied Biochemistry and Biotechnology,91-93:459-467.

14. Shafeeq M., Kokub D., Khan AM., Malik KA.,(1989), Degradation of Different Hydrocarbon and Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Costal Water, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5:505-510.
15. Lang S., Wullbrandt D., (1999), Rhamnose lipids-Biosynthesis Microbial Production a Application Potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 (1) : 22-32.
16. Hauthal HG.,(1994), L-rhamnose als Zuckerbaustein, *Nachere Chem Technol Lab*, 42:285.
17. Maier RM., Soberon-Chavez G., (2000) , *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Application, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 625-633
18. Mata-Sandoval JC., Karns J., Torrents A., (1999) High-performance Liquid Chromatography Method for The Characterization of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on Corn oil, *Journal of Chromatography A*, 864: 211-220
19. Burger MM., Glaser L., Burton RM., (1963), The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glicolipid by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Biological Chemistry*, 238: 2595-2601
20. Ochsner UA. Koch AK, Fiechter A, Reiser J, (1994), Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 176 (7): 2044-254.
21. Giraund MF., Naismith JH.,(2000), The Rhamnose Pathway, *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 687-696
22. Mulligan CN., Gibbs BF.,(1989), Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Enviromental Microbiology*, 55:3016-3019
23. Mulligan CN., Mahmoudides G., Gibbs BF.,(1989), The Influence of Phosphate Metabolism on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Biotechnology*, 12:1999-210.
24. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A., 1984, *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Pruduction in Continuous Culture wiht Glucose as Carbon Source, *Applied Environmental Microbiology*, 48 (2): 301-305
25. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.,(1986), Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Enviromental Factors, *Applied Microbial Biotechnology*, 24: 443-448
26. Collings CH., Lyne PM., (1985), *Microbiological Metods*, Butterworths Pres. London

27. **Skinner FA., Lovelock DW.,** (1979), Identification Methods for Microbiologists. Academic Pres, Inc The Society for Applied Bacteriology Technical Series No: 4. Jondon.
28. **Makar RS., Cameotra SS.,** (2002), An Uptake on use of Unconventional Substrates For Biosurfactant Production and Their New Applications, Applied Microbiology and Biotechnology 58:4258-434.
29. **Cameotra SS., Makkar RS.,** (1998), Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions, Applied Microbiology and Biotechnology, 50: 520-529.
30. **Haba E., Espuny MJ., Busquets M., Manresa M.,** (2000), Screening and Production of Rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47 T2 NCIB 400044 from Waste Fring oils, Journal of Applied Microbiology, 88:379-387.
31. **Volbrecht E., Heckmann R., Wray V., Nimtz M., Lang S.,** (1998), Production and Structure Elucidation of Di-oligosaccharideliids (Biosurfactants) from *Tsukamurella* sp., Applied Microbiology and Biotechnology, 50: 530-537.
32. **Mecrada M.E., Manresa A., Robert M., Espuny MJ., De Andres C., Guinea J.,** (1993), Olive Oil Mill Effluent (OOME). New Substrate for Biosurfactant Production, Bioresource Technology, 43: 1-6.
33. **Mecrada M.E., Monleon L., De Andres C., Rodon I., Martinez E., Espuny MJ., Manresa A.,** (1996), Screening and Selection of Surfactant Producing Bacteria from Waste Lubricating Oil, Journal of Bacteriology, 81:161-168.
34. **Abolos A., Pinazo A., Infante MR., Casals M., Garcia F., Manresa A.,** (2001), Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil refinery Waste, Langmuir, 17:1367-1371.
35. **Sudhakar-Babu P., Vaidya AN., Bal AS., Kapur R., Juwarkar A., Khanna P.,** (1996), Kinetics of Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from Industrial Waste, Biotechnology Letters, 18:263-268.
36. **Dubey K., Juwarkar A.,** (2001), Distillery and Curd Whey Waste as Visible Alternative Source for Biosurfactant Production, World of Journal of Microbiology and Biotechnology, 17:61-69
37. **Miller RM.,** (1995), Biosurfactant Facilitated Remediation of Metal Contaminated Soils, Environmental Health Perspectives, 103: 59-62.
38. **Zang Y., Miller RM.,** (1995), Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n Alkanes, Applied Environmental Microbiology, 61: 2247-2251.

39. **Herman DC., Zhang Y., Miller RM.,** (1997), Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane Under Saturated Flow Conditions, *Applied Environmental Microbiology*, 63: 3622-3627.
40. **Al Tahhan RA., Sandrin TR., Bodour AA., Maier RM.,** (2000), Cell Surface Properties of *Pseudomonas aeruginosa*: Effect of Rhamnolipid on fatty acid and Lipopolysaccharide Content, *Applied Environmental Sci*
41. **Zhang Y., Miller RM.,** (1992), Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid surfactant (Biosurfactant), *Applied Environmental Microbiology*, 58 (10): 3276-3282.
42. **Zhang Y., Miller RM.,** (1994), Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation Octadecane, *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2101-2106.
43. **Rahman KS., Banat IM., Thahira J., Thayumanavant., Lakshmanaperumalsamy P.,** (2002), Bioremediation of Gasoline Contaminated Soil by a Bacterial Consortium Amended with Poultry Litter, Coir Pith and Rhamnolipid Biosurfactant, *Bioresources Technology*, 81 (1):25-32.
44. **Maier RM., Neilson JW., Artiola JF., Jordan FL., Glen EP., Descher SM.,** (2001), Remedation of Metal-Contaminated Soil and Sludge Using Biosurfactant Technology, *International Journal of Occupation Medicinal Environment Health*, 14 (3): 241-248.
45. **Mulligans CN., Yong RN., Gibbs BF.,** (1999), On The Use of The Biosurfactants for The Removal of Heavy Metals from Oil Contaminated Soil, *Environmental Progress*, 18: 50-54.
46. **Herman DC., Artiola JF., Miller RM.,** (1995), Removal of Cadmium, Lead and Zinc from Soil by a Rhamnolipid Biosurfactant, *Environmental Science and Technology*, 29: 2202-2206.
47. **Tan H., Champion JT., Artiola JF., Brausseau ML., Miller RM.,** (1994), Complexation of Cadmium by a Rhamnolipid Biosurfactant, *Environmental Science and Technology*, 28-2402-2406.
48. **Torrens JL., Herman DC., Miller-Maier RM.,** (1998), Biosurfactant (Rhamnolipid) Sorption and The Impact on Rhamnolipid-Facilitated Removal of Cadmium from Various Soil, *Environmental Science and Technology*, 32-776-781.
49. **Ochoa Loza FJ., Artiola JF., Maier RM.,** (2001), Stability Constants for The Complexation of Various Metals with a Rhamnolipid Biosurfactant, *Journal of Environmental Quality*, 30 (2): 479-485.

50. Bai GY., Brausseau ML., Miller RM., (1997), Biosurfactant Enhanced Removal of Residual Hydrocarbon from Soil, *Journal of Contaminant Hydrology*, 25: 157-170.
51. Stangellini ME., Miller RM., (1997), Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens, *Plant Disease*, 81: 4-12.
52. Vasileva-Tonkova E., Galabova D., Karpenko E., Shulga A., (2001), Biosurfactant Rhamnolipid Effects on Yeast Cells, *Letters Applied Microbiology*, 33 (4):280-284.
53. Gürgen V., Halkman AK., (1988), *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 7, Ankara.
54. Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F., (1956), Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
55. Robert M., Mercade ME., Bosch MP., Para JL., Espuny MJ., Manresa MA., Guinea J., (1989), Effect of Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, *Biotechnology Letters*, 11:871-874.
56. Arino S., Marchal R., Vandecasteele JP., (1996), Identification and Production of Rhamnolipidic Biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* Species, *Applied Microbiol Biotechnol*, 45: 162-168
57. Wu J., Ju LK., (1998), Extracellular Polymers of Polymeric Material Formed in n-Hexane Fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Biotechnology*, 59: 193-202.
58. Ramana KV., Karanth NG., (1989), Factors Affecting Biosurfactant Production Using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 Under Submerged Cultures, *Journals of Chemistry Technology and Biotechnology*, 45 (4): 249-258.
59. Osman M., Ishigami Y., Someya J., Jensen HB., (1996), The Bioconversion of Ethanol to Biosurfactants and Dye by a Novel Coproduction Technique, *Journal of The American Oil Chemistry Society*, 73:851-856.
60. Matsufuji M., Nakata K., Yoshimoto A., (1997), High Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* Growing on Ethanol, *Biotechnology Letters*, 19:1213-1215.
61. Linghardt RJ., Bakhit J., Daniels L., Mayerl F., Pickenhagen W., (1989), Microbial Produced Rhamnolipid as a Source of Rhamnose, *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 365-358
62. Babu PS., Vaidya AN., Bal AS., Kapur R., Juwarkar A., Khanna P., (1996), Kinetics of Biosurfactants Production by *Pseudomonas aeruginosa* Strain BD2 from Industrial Waste, *Biotechnology Letters*, 18: 263-268.

64. Benincasa M., Contiero J., Manresa MA., Moraes IO., (2002), Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI Growing on Soapstock as Carbon Source, Journal of Food Engineering, 54: 283-288.
65. Rahman KS., Rahman TJ., McClean S., Marchant R., Banat IM., (2002), Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials, Biotechnology Progress, 18 (6): 1277-1281.
66. Özçelik S., (1995), Genel Mikrobiyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları No:1 Isparta

ÖZGEÇMİŞ

1974'de Eskişehir'de doğdum, ilköğretim ve ortaöğretimimi Eskişehir'de tamamladım. Lise öğretimimi Eskişehir Atatürk Lisesinde 1991'de tamamladım. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1996 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Biyolog unvanı ile mezun oldum. Aynı yıl Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim dalında Yüksek lisans programına girdim 1998'yılında yüksek lisansımı tamamladım. 1999 yılında Öğretim görevlisi olarak Dicle Üniversitesi Siirt Eğitim Fakültesi'ne atandım. 1999 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Genel Biyoloji Anabilim dalında Doktora programına girdim.

Araştırmalarım;

- 1- M.Kahyaoğlu " Sakarya nehri *Culicidae* Faunası Belirlenmesi Ön Çalışmaları" 1996 (Lisans Tezi).
- 2- M.Kıvanç, M.Kahyaoğlu, E. Çakır, T. Şenkeser, " Bir Şampuan ve Bulaşık Deterjanının *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus cereus* Tarafından Biyolojik Parçalanabilirliği" Anadolu Üniversitesi "Biyoteknolojide Sanayi İşbirliği" sempozyumunda poster olarak sunulmuştur. 1998, (Araştırma Makalesi).
- 3- M.Kahyaoğlu, " Endüstride Atık Maddelerden Fermantasyon Yoluyla Beta Karoten Üretimi" 1998, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans).