



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARINDA  
RAMNOLİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Banu KAŞKATEPE**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ**

**2013- ANKARA**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARINDA  
RAMNOLİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Banu KAŞKATEPE**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ**

**2013-ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Farmasötik Mikrobiyoloji Doktora Programı**  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.11.2013

Prof. Dr. Ahmet AKIN  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ  
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi

Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Meral ÖZALP  
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Çizelgeler	ix
Şekiller	x
<b>1.GİRİŞ</b>	
1.1. Pseudomonas Cinsinin Genel Özellikleri	1
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.1.1. Biyokimyasal Özellikleri	3
1.1.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Virulans Faktörleri	3
1.2. Sürfaktanlar	5
1.2.1. Anyonik Sürfaktanlar	6
1.2.2. Katyonik Sürfaktanlar	6
1.2.3. Noniyonik Sürfaktanlar	7
1.2.4. Amfoterik Sürfaktanlar	7
1.3. Biyosürfaktanlar	10
1.3.1. Glikolipidler	11
1.3.1.1. Ramnolipid	12
1.3.2. Fosfolipidler, Doğal Yağlar ve Yağ Asitleri	15
1.3.3. Lipopeptidler ve Lipoproteinler	16
1.3.4. Polimerik Biyosürfaktanlar	16
1.3.5. Partiküler Biyosürfaktanlar	17
1.4. Biyosürfaktanların Fonksiyonu ve Kullanım Alanları	17
1.4.1. Biyosürfaktanların Çevresel Kullanımı	19
1.4.2. Biyosürfaktanların Sağlık Alanında Kullanımı	20
1.4.3. Biyosürfaktanların Gıda Endüstrisinde Kullanımı	23

1.4.4.	Biyosüpfaktanların Kozmetik Alanında Kullanımı	23
1.4.5.	Biyosüpfaktanların Diğer Kullanım Alanları	23
1.5.	Biyosüpfaktanların Sentezi	24
1.5.1.	Biyosüpfaktan Sentezini Etkileyen Faktörler	25
1.5.1.1.	Karbon Kaynakları	25
1.5.1.2.	Nitrojen Kaynakları	25
1.5.1.3.	Kültür Şartları	26
1.6.	Çalışmanın Amacı	27
<b>2.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>29</b>
2.1.	Bakteri Kökenleri	29
2.2.	Araştırmada Kullanılan Küspeler	30
2.3.	Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar	32
2.4.	Ramnolipid Üretiminde Kullanılan Besiyerleri	35
2.5.	Yöntem	36
2.5.1.	Mikroorganizmaların İzolasyon ve İdentifikasyonu	36
2.5.2.	Mikroorganizmaların Üretilmesi	36
2.6.	Elde Edilen Ramnolipidin Saflaştırılması	37
2.7.	Ramnolipid Miktarının Ölçülmesi	38
2.8.	Farklı Ortamların Ramnolipid Üretimine Etkisi	39
2.8.1.	Farklı Bakteri Konsantrasyonlarının Üretime Etkisi	39
2.8.2.	Arpa Küspesinde Ramnolipid Üretimi	39
2.8.3.	Fındık Küspesinde Ramnolipid Üretimi	40
2.8.4.	Ayçiçeği Küspesinde Ramnolipid Üretimi	41
2.8.5.	Kefir Süzüntüsünde Ramnolipid Üretimi	42
2.8.6.	Balık Ununda Ramnolipid Üretimi	42
2.8.7.	Karışım Ortamı	42
2.8.8.	Ardışık İnkübasyonun Ramnolipid Üretimi Üzerine Etkisi	43
2.8.9.	UV Işınlarnın Ramnolipid Üretimine Etkisi	43
2.9.	İstatistiksel Analiz	44
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>45</b>
3.1.	Bakterilerin İdentifikasyonu	45
3.2.	<i>Ps. aeruginosa</i> Suşlarında Ramnolipid Üretimi	45

3.2.1.	Farklı Bakteri Yoğunluklarında Ramnolipid Miktarları	45
3.2.2.	Arpa Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları	46
3.2.3.	Fındık Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları	49
3.2.4.	Ayçiçeği Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları	50
3.2.5.	Kefir Süzüntüsü Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları	51
3.2.6.	Balık Unu Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları	52
3.2.7.	Karışım Ortamında Ramnolipid Miktarları	53
3.2.8.	UV Işınlının Ramnolipid Üretimine Etkisi	55
3.2.9.	Ardışık İnkübasyonların Ramnolipid Üretimine Etkisi	56
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>74</b>
	<b>ÖZET</b>	<b>76</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>77</b>
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>78</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>89</b>

## ÖNSÖZ

Biyosümfaktanların endüstrinin farklı kollarında kullanılabilirliğinin ortaya çıkması sonucu üretim ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının ürettiği glikolipid yapıdaki biyosümfaktan olan ramnolipidin başta petrol atıklarının biyodegradasyonu olmak üzere birçok alanda kullanılabilirliği bildirilmiştir. Bu çalışmada da farklı noktalardan alınan su ve toprak örneklerinden ramnolipid üretebilen *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilmesi ve farklı besi ortamları oluşturularak ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılması amaçlandı.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ'a ve Anabilim Dalı hocalarım Sayın Prof.Dr. Ahmet AKIN ve Sayın Prof.Dr.Nurten ALTANLAR'a, desteklerini her zaman hissettiğim anne ve babama, bu yolculuğa başladığım günden itibaren hep yanımda olan sevgili eşim Özcan KAŞKATEPE' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

ACP	Acyl carrier protein (Açıl Taşıyıcı Protein)
ATCC	American Type Culture Collection
MSM	Mineral Salt Medium
MCA	Mac Conkey Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
NB	Nutrient Broth
rpm	Devir sayısı
KMK	Kritik Misel Konsantrasyonu
ml	Mililitre
l	Litre
mg	Miligram
mN	milinewton
g	Gram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
M	Molar
pH	Asitlik- bazlık birimi



## ÇİZELGELER

**Çizelge 1.** Mikrobiyal biyosüpfaktanlar

**Çizelge 2.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının örnek alındığı bölgeler ve kaynakları

**Çizelge 3.** Arpa küspesi içeriği

**Çizelge 4.** Fındık küspesi içeriği

**Çizelge 5.** Ayçiçeği küspesi içeriği

**Çizelge 6.** Kefir içeriği

**Çizelge 7.** Balık unu içeriği

**Çizelge 8.** Mineral Salt Medium temel besiyeri

**Çizelge 9.** MSM besiyeri eser element çözeltisi

**Çizelge 10.** Mc Farland 1 ve 2 bulanıklığına göre MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 11.** Arpa küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 12.** Fındık küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 13.** Ayçiçeği küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 14.** Kefir süzüntüsü kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 15.** Balık unu kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 16.** Karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 17.** UV ışınlarına maruziyet sonrası elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 18.** Ardışık inkübasyonlar sonucu elde edilen ramnolipid miktarları

**Çizelge 19.** Tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarları

## ŞEKİLLER

**Şekil 1.** Misel oluşumu

**Şekil 2.** Ramnolipidin yapısı

**Şekil 3.** Ramnolipidin biyosentezi

**Şekil 4.** Çalkalamalı inkübatörde ramnolipid üretimi

**Şekil 5.** Arpa küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 6.** Fındık küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 7.** Ayçiçeği küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 8.** Kefir süzüntüsü kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 9.** Balık unu kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 10.** Karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 11.** UV ışınlarına maruziyet sonrası ramnolipid miktarları

**Şekil 12.** Tüm ortamlarda elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 13.** ATCC 9027 suşunun oluşturulan tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 14.** SB1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 15.** ST1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

**Şekil 16.** SY1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

## 1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfaktanlar, düşük toksisitesi, biyolojik uygulamalara uyum göstermesi gibi avantajları ile sentetik formlarına kıyasla geniş kullanım alanı bulmuşlardır.

Son yıllarda biyosümfaktanların kullanılabilirdiği birçok alanda artan hammadde teminini karşılamak amacıyla üretimi geliştirmeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Biyoteknoloji ve çevre teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak endüstriyel atık maddelerden biyosümfaktan üretimine olan ilgi artmıştır. Literatürlerde çok farklı ham madde seçenekleri ile biyosümfaktan üretimi rapor edilmiştir. Biyosümfaktanların bitkisel yağlar, gıda sanayi atıkları, özellikle süt sanayisindeki atıklar çeşitli zirai ve endüstriyel atıklardan üretilebileceği bildirilmektedir(Bodour ve ark, 2003). Atık substratları kullanarak maliyeti düşürmek, mikroorganizma seçimi, maksimum ürün elde edilebilmesi için uygun kültür koşullarını içeren biyoprosesleri geliştirmek biyosümfaktan üretimi için önemlidir.

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan su ve toprak örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilerek, ramnolipid biyosümfaktan üretimlerinin belirlenmesi ve üretimi arttırmaya yönelik besi ortamı geliştirme çalışmaları yapılması planlanmıştır.

### 1.1. PSEUDOMONAS Cinsinin Genel Özellikleri

Toprakta ve suda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler düz veya hafif eğri, uçları yuvarlak, ileri derecede hareketli Gram negatif basillerdir (Bilgehan,2000). Son elektron alıcısının oksijen olduğu zorunlu aerob solunuma dayalı bir metabolizmaları olmakla birlikte, bazı durumlarda

nitratın son elektron alıcısı olarak kullanılmasına bağlı, anaerob şartlarda üreyebilirler (Blondel-Hill ve ark.2009).

Oksidaz, katalaz, sitrat ve L-arginin dehidrolaz pozitif, L-lizin dekarboksilaz negatiftirler. Piyosiyenin (yeşil) ve piyoverdin (sarı) pigmentleri oluşturabilirler. Bazı suşlar rengi koyu kırmızı olan piyorubin ve siyah olan piyomelanin pigmenti üretir (Çakar, 2009).

### **1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa***

İlk kez 1882 yılında Gessard tarafından mavi irin etkeni olarak gösterilmiştir. 1.5–3 µm uzunluğunda, 0.5–0.8 µm eninde, sporsuz, kapsülsüz çomaklardır. Kolay boyanırlar. Kültür besiyerlerinde 30 - 37 °C' de, hafif alkali ortamda kolayca üreyerek düzgün, yuvarlak, floresans yeşilimsi bir rengi ve tatlı, esans kokusuna benzer bir kokusu olan koloniler verirler (Akman ve Gülmezoğlu, 1980; Bilgehan, 2000). Pek çok karbon kaynağını kullanabilmesi *P.aeruginosa'* ya kompleks besiyerinin yanı sıra basit besiyerinde de üreyebilme avantajı sağlar. Distile suda dahi üreyebilme yeteneğine sahiptirler. 42 °C' de arka arkaya üç pasajda üreyebilmesi *Pseudomonas fluorescens'* den ayırt edici özelliğidir. Buyyonda yüzeyde zar yapmak üzere bol ve homojen bir üreme gösterirler. Kökenlerinin çoğu zarın hemen altında mavi-yeşil ekstrasellüler pigment olan ve yalnız aerop şartlarda meydana gelen, suda ve kloroformda eriyen piyosiyenin yapar. Çoğu suşta ekstrasellüler polisakkarit olan alginat bulunur. Fazla miktarda alginat sentezi, bakterinin mukoid koloni oluşturmasına neden olduğu gibi, biyofilm oluşumunda da önem taşır (Brooks ve ark.,2004;Çakar,2009).

İnsanlarda önemli bir fırsatçı patojen olan mikroorganizma, özellikle yara ve yanık gibi bütünlüğü bozulmuş olan vücut bölgelerinde infeksiyon etkenidir. Bitkilerde ve hayvanlarda da patojen olabilir. Fiziksel ve kimyasal şartlara oldukça kolay uyum sağlar. Özellikle nemli ortamlarda kolay

üreyebilir, insanlarda perine, aksilla ve kulaklarda kolaylıkla kolonize olabilir. (Yücesoy-Dede,2006). Hastanelerde özellikle suni solunum cihazlarında, su gibi çok az besin içeren sıvılarda, hatta heksaklorofen gibi dezenfektan sıvılarda üreyebilir (Akman ve Gülmezoğlu, 1980).

#### 1.1.1.1.Biyokimyasal Özellikleri

Karbonhidratı fermente etmez ancak glikoz, fruktoz ve ksiloz gibi az sayıda bazı karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalar. Katalaz pozitif, oksidaz pozitif, indol, H<sub>2</sub>S, Voges-Proskauer ve metil kırmızısı deneyleri negatiftir. Nitrattan gaz yapar. KCN' ye dirençlidir. Metilen mavisi ve prontosilin rengini gidermesi ile fluorescens' den ayrılır. Piyosiyanın dışında bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) pigmenti yaparlar (Berkiten, 2005; Çakar,2009). Piyoverdin tüm Pseudomonaslar tarafından oluşturulurken piyosiyanın sadece *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) türleri tarafından oluşturulabilir. Piyosiyanın pigmenti üretimi ve 2-aminoasetofenon' dan dolayı kültürde tatlı üzüm benzeri kokusu *Ps. aeruginosa* için spesifik ayırma kriteri olarak kabul edilmektedir (Çakar,2009).

#### 1.1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulans faktörleri

**Adezinler:** *Ps. aeruginosa*' da yüzeylere tutunmada rol alan pek çok adezin bulunmaktadır. Bakterinin uç kısımlarında bulunan pili, hem konak dokulara adezyondan sorumlu hem de abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol alan en önemli aderens faktörüdür (Çakar,2009). Konak epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan GM-1 gangliosid reseptörlerine tutunmayı sağlar. Pilus aracılığıyla tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önemli rol oynar (Yücesoy-Dede,2006). Bakteride bulunan polar flagella, hareket ve adezyondan sorumlu olup çevreden ve hastaneden izole edilen suşların

çoğunda bulunurken, kistik fibrozisli hastalardan ve kronik infeksiyonu olan hastalardan izole edilen suşların çoğunda bulunmamaktadır(Çakar,2009).

Bu adezinlere ek olarak hücrelere bağlanmada kullandığı diğer adezinler arasında lipopolisakkarit, PA-IL (galaktoz bağlayan lektin) ve PA-III (fukoz ve mannoz bağlayan lektin) gibi moleküller de sayılabilir (Çakar,2009).

**Polisakkarit Kapsül:** Glikokaliks, ekzopolisakkarit ya da alginat olarak da adlandırılan bu yapı  $\beta$ -1,4 glikozit bağları ile birbirine bağlı mannuronik asit ve glukronik asitten oluşmakta ve alginatla sonlanmaktadır. Özellikle mukoid suşlarda bulunmaktadır. Müsin salgılanması, bakterinin fagositozdan korunması ve bakterinin biyofilm tabakasının oluşması gibi işlevleri vardır (Erdem,1999; Yücesoy-Dede,2006).

**Endotoksin:** Lipopolisakkarit yapısındaki endotoksin diğer Gram (-) bakterilerde olduğu gibi önemli bir hücre duvarı antijenidir. Sepsis sendromundan sorumludur (Erdem,1999; Çakar,2009).

**Ekzotoksin A:** Patojenik *Ps. aeruginosa* suşları tarafından üretilen en önemli virulans faktörlerinden biridir. Ökaryot hücrelerde protein sentezi için gerekli bir faktör olan elongasyon faktör (EF) -2' yi inaktive ederek protein sentezini durdurur. Ayrıca yanıklarda dermatonekroz, oküler infeksiyonlarda kornea hasarı ve kronik solunum yolu infeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır (Çakar,2009).

**Ekzoenzim S ve T:** Hücre dışı toksinlerdir. Bu iki toksin, tip III sekresyon sisteminde yer almaktadır. Bu sistem ökaryotik hücrelere bakteriyel toksinlerin direkt enjeksiyonunu sağlamaktadır. Protein sentezi üzerine etki ederek hücrenin iskelet sistemini bozmakta ve akut infeksiyon geçiren hastalarda mortalitenin artmasına neden olmaktadır( Çakar, 2009).

**Piyosiyenin:** *Ps. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyenin molekülü önemli patojenite faktörlerinden biridir ve üretimi, çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındadır. Birçok bakteri türüne karşı antibakteriyel özellik göstermektedir (Ulusoy,2007). Yapılan çalışmalar sonucunda piyosiyenin hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu ve akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarına neden olduğu saptanmıştır( Karatuna ve ark,2008).

**Elastaz ve Alkali proteaz:** Klinik örneklerden izole edilen çoğu *Ps. aeruginosa* kökeni hücre dışı proteaz üretmektedir. Bunlardan en iyi araştırılanlar elastaz ve alkali proteazdır. Her ikisi de deride, akciğerde ve korneada nekroz yapar. Elastaz, elastin ve kollajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan bir metalloproteazdır (Ulusoy,2007). Alkali proteaz fibrinoliz etkili metalloproteazdır. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin infeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir (Karatuna,2008).

**Fosfolipaz C:** *Ps. aeruginosa'* nın ısıya duyarlı hemolizindir. Solunum yolları ve idrar yolları infeksiyonlarındaki yeri açık değildir. Ancak bu hemolizinin üretimi ile hastalık arasında ilişki bulunmaktadır. Lipid ve lesitini hasara uğratarak dokulara invazyonu kolaylaştırmaktadır (Erdem,1999; Çakar,2009).

**Ramnolipid:** *Ps. aeruginosa'* nın ısıya dirençli ve hemolitik etkisi olan hemolizindir. Önemli bir biyosümfaktandır.

## 1.2.Sümfaktanlar

"Surface active agent" kelimelerinin kısaltılmasından oluşan ve "Yüzey aktif ajan" olarak adlandırılan sümfaktanlar, yüzeyler arasında adsorbe olan ve yüzey gerilimini düşüren maddelerdir. Su-petrol, hava-su, sıvı-katı yüzeyi gibi

farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik göstermekte ve çok fazlı sistemlerde polar ve polar olmayan fazlar arasındaki yüzeyde ya da yüzeyler arasında etkin olmaktadır (Desai ve Banat 1997). Hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruk kısmından oluşan amfifilik moleküllerdir (Georgiou ve ark. 1992).

Sümfaktanların büyük bir kısmının moleköl ağırlıkları 100-1000 kDa arasındadır. Ancak yüksek moleköl ağırlıklı yüzey aktif polimerler de bulunmaktadır ve polimerik sümfaktanlar olarak adlandırılmaktadır (Tadros ve ark.,2004). Sümfaktanlar hidrofilik baş kısmının yüküne bağılı olarak anyonik (negatif yüklü), katyonik (pozitif yüklü), noniyonik (yüksüz) ve amfoterik (hem pozitif hem negatif yüklü) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. (Georgiou ve ark. 1992).

### **1.2.1.Anyonik sümfaktanlar**

Baş kısmında negatif yük taşıyan sümfaktanlardır. En yaygın olarak kullanılan sümfaktan grubudur (Banat ve ark.,2000). Alkil benzen sülfonat (deterjanlar), yağ asidi (sabunlar), lauril sülfat (köpürtücü ajanlar), dialkil sülfosüksinat (ıslatıcı ajanlar) içermektedirler (Salager,1999). Sert suya hassasdırlar ve sulu solüsyonlarda çökelti oluşturma eğilimleri vardır. Sümfaktan piyasasının yaklaşık %60'ını anyonik sümfaktanların oluşturduğu tahmin edilmektedir (Wang,2011).

### **1.2.2.Katyonik sümfaktanlar**

Anyonik sümfaktanların tersine hidrofilik baş kısmında pozitif yük taşımaktadırlar. Katyonik surfektanlar, metal, plastik ve fiber içeren birçok yüzey ve bakteri hücre duvarı negatif yüklü olduğu için, pozitif yüklü baş kısmın negatif yüklü bu yüzeylere yönelmesini sağlayan elektrostatik ilişki sayesinde bu yüzeylere kolaylıkla adsorbe olabilirler. Sentez esnasında



yüksek basınçlı hidrojenlenme tepkimeleri nedeniyle maliyetleri yüksek olduğu için anyonik sürfaktanlar kadar yaygın kullanımları yoktur (Saleger, 1999; Wang,2011).

### **1.2.3.Noniyonik sürfaktanlar**

Hidrofilik baş kısmı iyonlara ayrışmamıştır bu nedenle yüksüzdür. En sık kullanılan ikinci sürfaktan grubudur. Noniyonik sürfaktanlar diğer tüm sürfaktanlar ile uyumludur. Bu nedenle sürfaktan sistemlerinde kullanılabilirler. Çok iyi seyrelticilerdir (Saleger,1999).

### **1.2.4.Amfoterik sürfaktanlar**

Baş kısmında pozitif ve negatif yük taşıyan, dolayısıyla pozitif ve negatif yüzeylere adsorbe olabilen sürfaktanlardır. Diğer sürfaktanlarla uyumludur. Genellikle cilde ve göze zararı daha az olduğu için cilt bakım ürünlerinde bu grup sürfaktanlar kullanılmaktadır.

Amfifilik olmaları nedeniyle sürfaktanların su-hava ara yüzeyine bağlanma ve kritik misel konsantrasyonu (KMK) olmak üzere iki temel özelliği bulunmaktadır (Prosser ve Franses,2001).

Sıvılarda iç kısımlarda, moleküller komşu moleküller tarafından çekim kuvvetlerinin etkisi altındadır. Oysa sıvının yüzeyinde bulunan bir molekül buhar fazındaki yoğunluk sıvı fazdan düşük olduğundan sadece yüzeyin altındaki moleküller tarafından sıvının içerisine doğru çekilir ve sıvının yüzü gergin bir zar halini alır. Bir gazla bir sıvının ya da birbirleriyle karışmayan iki sıvının temas yüzeyleri böyledir. Bu gerilim sıvının serbest yüzüne ait ise yüzey gerilimi; iki sıvının sınır yüzeyine ait ise ara yüzey gerilimi (yüzeyler arası gerilim) adını alır. Başka bir ifade ile yüzey gerilimi, sıvı yüzeyindebirim

uzunluğu gergin tutan kuvvettir (Balıkesir Üniversitesi,2013) Bu özellik sayesinde biyosümfaktanlar/sümfaktanlar sıvı moleküllerini bir arada tutan kuvvetin azalmasına neden olur ve birbiri içinde karışmayan maddelerin karışmasını sağlayarak çözünürlüklerini arttırır.

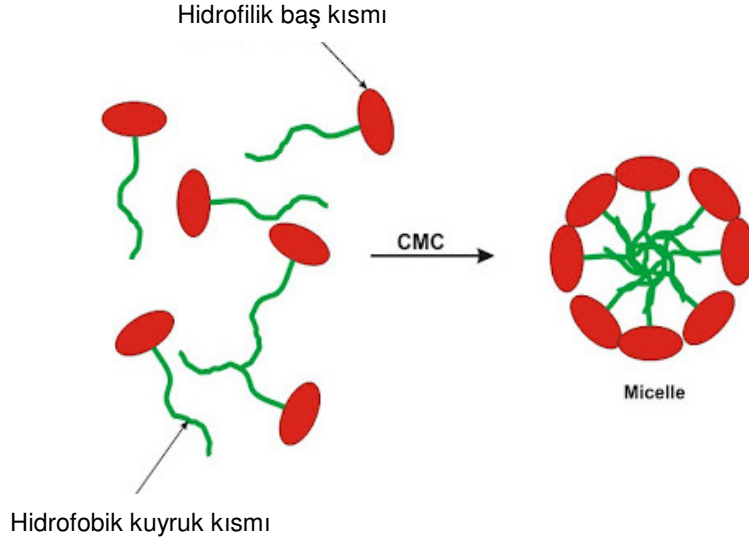
Sümfaktan molekülleri suda çözündüklerinde hidrofilik kısmı ile suya, hidrofobik kısmı ile havaya olmak üzere su/hava yüzeyine adsorbe olma eğilimindedir. Bu şekilde su içerisinde kendi kendilerine oto-organize olarak yüzey gerilimini değiştirirler (Zang,2011).

Yüzey aktif maddeler fonksiyonlarını yerine getirmek için bulunduğu ortamlarda misel hücreleri oluştururlar (Mulligan ve ark,2001). Miseller yapı ancak bir kritik misel konsantrasyonunun (KMK) üzerinde moleköl ve iyonların bir araya gelmesiyle meydana gelir. Ayrıca, şekil ve büyüklük bakımından değişebilen ve sürekli hareket halinde olan sistemlerdir (Göl,2012). Oluşan misel hücreleri ile hidrokarbon molekülleri sarılmış olur ve daha da küçük moleküllere bölünebilirler.

Sümfaktanlar, farklı yüzeyler arasında birleştirici olarak çalışma özelliğine sahiptir. Miseller, mikroorganizmaların organik kirliliğe yani hidrokarbon moleküllerine daha hızlı ulaşmalarını sağlar (Uysal,2004) Misellerin oluştuğu kritik misel konsantrasyonu, yüzey gerilimini en düşük değere düşürebilen minimum sümfaktan konsantrasyonu olarak tanımlanır. Sümfaktan konsantrasyonuna bağlı olarak yüzey gerilimi azalır. (Desai ve Banat, 1997; Mulligan ve ark.2001)

Fazlar arasındaki ara yüzey geriliminin azalması ve misel oluşumu ile hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğu artarak bu bileşiklerin, mikroorganizmalar tarafından alımı kolaylaşmaktadır ve sümfaktanların varlığında hidrokarbonların çözünürlüğünün artmasıyla biyolojik ayrışma hızlanmaktadır. Sümfaktan molekülleri misellerde toplandıktan sonra kritik

misel konsantrasyonunun üzerinde ayrışma meydana gelmektedir (Uysal,2004).



**Şekil 1.** Misel oluşumu (Biotek,2012)

Ayrışmış hidrofobik bileşikler miseller içinde tutulmaktadır. Böylelikle miseller organik kirliliğin parçalanma oranını arttırmış olur. Bu durum çözeltilerdeki sürfaktanın, bileşiklerin ayrışmasını artırdığını göstermektedir. Sudaki hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğünün artması sürfaktanın dozuna ve türüne bağlı olarak değişmektedir(Uysal, 2004).

Sürfaktanlar kimyasal olarak ya da mikrobiyolojik olarak üretilebilirler. Mikroorganizmalar özellikle suda karışmayan substratlarda gelişmeleri boyunca bu bileşikleri çoğunlukla oksijenli ortam koşullarında sentezlemektedirler. Sürfaktanlar düşük ayrışabilirlikleri nedeniyle biyolojik arıtmaya karşı dirençlidir ve sucul ortamda yaşayan canlılar üzerinde toksik etkiye sahiptirler. Bu olumsuz özelliklerinin aksine biyosürfaktanlar düşük toksisitesi, biyolojik olarak parçalanabilirliği, ve ekolojik uygunluğu gibi özellikleri nedeniyle kimyasal olarak sezzelenen sürfaktanlara alternatif olarak gündeme gelmişlerdir (Banat ve ark., 2000; Ron ve Rosenberg, 2001).

### 1.3. Biyosümfaktanlar

Bakteri, maya ve funguslar tarafından hücre zarında sentezlenen ve hücre dışına salınan sümfaktanlar biyosümfaktanlar olarak adlandırılır. Biyosümfaktanlar karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Cooper ve Zajic,1980; Bognolo,1999;Uysal,2004).

Bir hidrofilik (aminoasitler, peptitler, anyonlar, katyonlar ve polisakkarit birimleri) ve bir hidrofobik (doymuş ya da doymamış yağ asitleri) kısımdan oluşan amfifilik moleküllerdir. (Desai ve Banat, 1997; Lang,2002)

Biyosümfaktanlar moleköl ağırlıklarına ve yapısal özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Moleköl ağırlıklarına göre biyosümfaktanlar, düşük moleköl ağırlıklı moleküller ve yüksek moleköl ağırlıklı polimerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Düşük moleköl ağırlıklı biyosümfaktanlar genelde glikolipid veya lipopeptid yapısındadırlar (Ron ve Rosenberg,2001). Yüksek moleköl ağırlıklı biyosümfaktanlar ise amfipatik polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler veya biyopolimerlerin kompleks karışımlarıdırlar (Banat ve ark,2000).

Yapısal özelliklerine göre ise biyosümfaktanlar glikolipidler, fosfolipidler/doğal yağlar/yağ asitleri, lipopeptidler ve lipoproteinler, polimerik biyosümfaktanlar ve partiküler biyosümfaktanlar olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır (Hommel,1990;Georgiou ve ark, 1992;Lang and Wullbrandt, 1999;Ron ve Rosenberg,2001)

**Çizelge 1.** Mikrobiyal biyosümfaktanlar

	Biyosümfaktan tipi	Mikroorganizma
Glikolipidler	Trehalolipid	<i>Rhodococcus sp.</i>
	Sophorolipidler	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
	Ram nolipidler	<i>Pseudomonas spp.</i>  <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida tropicalis</i>
Fosfolipidler Doğal yağlar Yağ asitleri		<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Candida lepus</i>
Lipopeptidler/ Lipoproteinler	Gramisidin Polimiksin Sümfaktin	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Polimerik biyosümfaktanlar	Emülsan Liposan Mannoprotein	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Partiküler biyosümfaktanlar	Vezikül / fimbria	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>

### 1.3.1. Glikolipidler

Biyosümfaktanlar arasında en çok bilinen gruptur. İlk kez Bergström ve arkadaşları tarafından *Pseudomonas pyocyanea*' dan üretilmişlerdir (Bergström,1946). Uzun zincirli alifatik asitler veya hidroksi alifatik asit yapısındaki karbonhidratlardır (Desai ve Banat,1997). Glikolipid yapıdaki biyosümfaktanlar mono-, di-, tri ve tetrasakkarit bileşenleri, glukoz, mannoz,

galaktoz, glukuronik asit ve ramnoz içermektedir. *Mycobacterium*, *Rhodococcus erythropolis* (Ristau ve Wagner,1983) ve *Arthrobacter sp.* tarafından üretilen trehalolipidler, *Pseudomonas* cinsine ait türler tarafından üretilen ramnolipidler (Jarvis and Johnson,1949) ve mayalar tarafından üretilen soforolipidler gibi düşük polariteli biyosümfaktanlar bu grupta yer almaktadır (Rodrigues ve ark.,2006;Muthusamy ve ark.,2008).

*R. erythropolis* ve *Arthrobacter sp.* türlerinden elde edilen trehalolipidlerin yüzey gerilimini 25mN/m ve 40 mN/m'ye, yüzeyler arası gerilimi ise 1 mN/m ve 5 mN/m'ye düşürdükleri bildirilmiştir (Rapp ve ark. 1979;Li ve ark.,1984; Desai ve Banat,1997).

Soforolipidlerin özellikle *Torulopsis bambicola* (Cooper ve Paddock,1984), *T.petrophilum* (Cooper ve Paddock,1983) ve *T.apicola* tarafından üretildiği ve yüzey gerilimini 72.8 mN/m' den 30-40 mN/m'ye düşürdükleri bildirilmiştir. Asidik ve laktonik olmak üzere iki ana grup içermektedirler. Asidik soforolipidler, yağ asidi zincirinin terminal ya da sub-terminal karbon atomuna soforoz bağlı disakkarit ihtiva eden soforolipidlerdir. Laktonikler ise, disakkarit biriminin 4. karbon atomuna yağ asidinin karboksilik asid kısmı katılmış soforolipidlerdir (Cooper ve Paddock, 1984; Nunez ve ark.,2001).

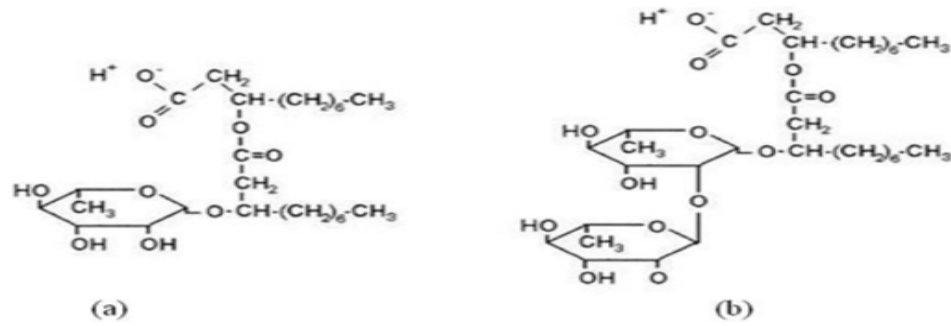
Cilde uyumlu olmaları nedeniyle kozmetik endüstrisinde uygulama alanı bulan soforolipidler, ıslatıcı-nemlendirici olarak kişisel bakım ürünlerinde ve makyaj ürünlerinde kullanılmaktadır (Kural ve Gürsoy,2011).

### 1.3.1.1.Ramnolipid

Yapısında ramnoz şekeri ve  $\beta$ -hidroksidekanoik yağ asitleri içeren biyosümfaktanlara ramnolipid adı verilmektedir. *Ps. aeruginosa* türlerinin ramnolipid üretimi ilk kez Jarvis ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Jarvis

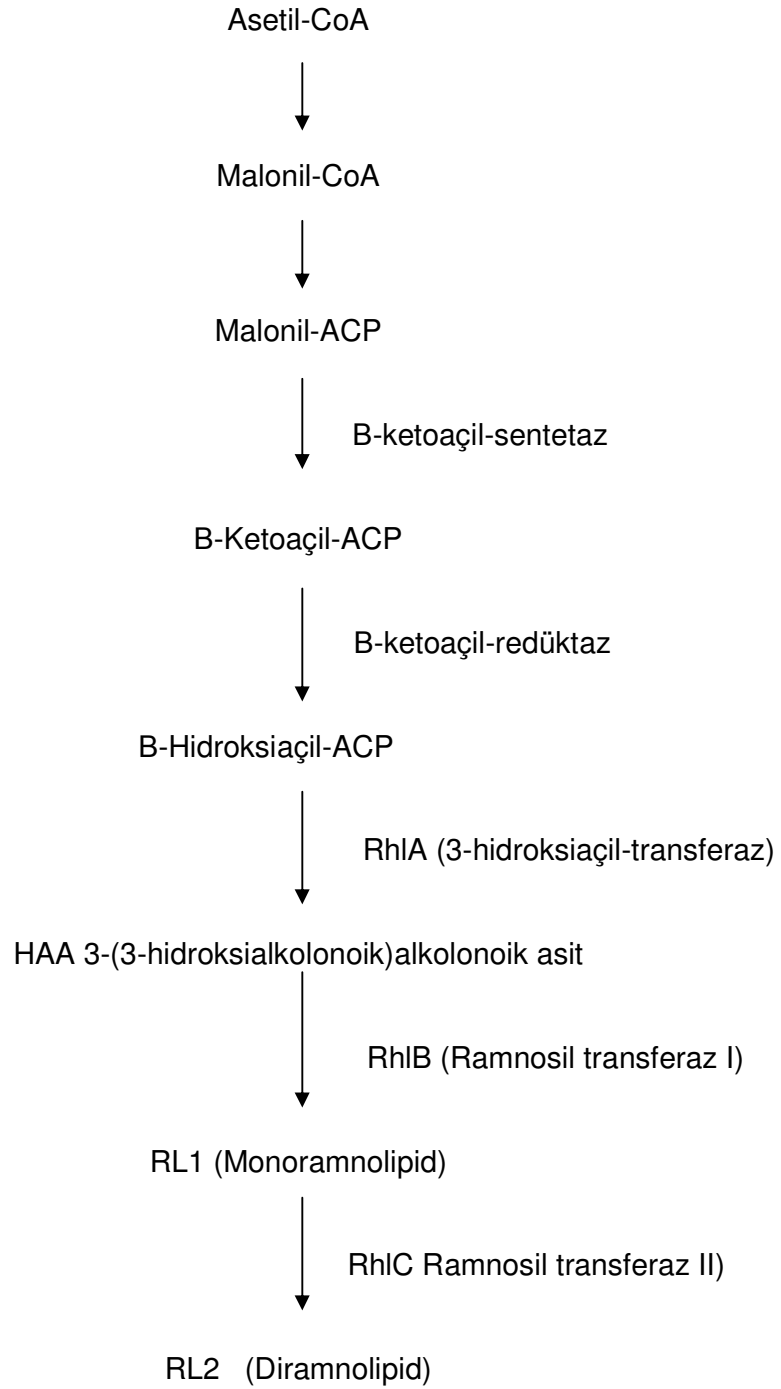
ve ark.,1949). Ramnolipidler hücre duvarının yapısında bulduklarında hidrokarbonlu bileşiklerin periplazmik bölgeye penetrasyonunu kolaylaştırma, hücre dışına salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özellikleri ile bilinen biyosümfaktanlardır (Kahyaoğlu, 2008). Ramnolipidlerde bulunan ramnoz şekeri bileşiğe hidrofilik özellik, yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özellik kazandırmaktadır (Mato-Sandoval ve ark, 1999).

Ramnolipidler içerisinde, yapısında bir tane beş karbonlu ramnoz şekeri ve yağ asidi taşıyanlar monoramnolipid, iki tane ramnoz şekeri ve yağ asidi taşıyanlar di-ramnolipidler adını alır (Mata Sandoval,1999).



**Şekil 2.** Ramnolipidin yapısı a) monoramnolipid b) diramnolipid

Mono ve diramnolipidler farklı iki ramnosil transferaz enzimi tarafından ve ardışık iki ramnosil transferaz reaksiyonu sonucu katalizlenirler. Monoramnolipidlerin sentezi ramnosil transferaz 1 (RhIB) tarafından katalizlenirken (Maier ve Soberon-Chavez,2000) 2000 yılında Rahim ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile RhIC' nin diramnolipid sentezini katalizlediği gösterilmiştir (Rahim ve ark.2001).



**Şekil 3.** Ramnolipid biyosentezi (Zhu ve Rock, 2008)



Ramnolipidler ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen fonksiyonları hala tartışma konusudur. Yüzey gerilimini düşürme ve emülsiyon aktivitesi göstermesi neticesinde sürfaktan olarak kabul edilmiş ve yapılan çalışmalar daha çok çözme yetenekleri ve özellikle hidrofobik substratlar olan hidrokarbonların ayrımını sağlamaları üzerine yoğunlaşmıştır (Zhang ve Miller,1995; Saberón Chavez,2005). Ramnolipidler, suyun yüzey gerilimini 72 mN/m' den 30 mN/m değerlerine, su/yağ sistemlerinde ise yüzeyler arası gerilimi 43 mN/m' den 1 mN/m değerlerine kadar düşürebilmektedirler (Jarvis ve ark.1949). Ayrıca hidrokarbonları emülsifiye etme özelliğine sahip olup emülsiyonlar için de stabilizan özellik gösterirler (Kural ve Gürsoy 2011).

*Ps. aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipid kirletilmiş topraklarda hidrofobik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında kullanılan bir biyosürfaktandır (Van Dyke ve ark.,1993). Ramnolipidin yüzey geriliminin düşük (30-32 mN/m), emülsiyon aktivitesinin yüksek (10.4-15.5 U/ml filtrat), kritik misel konsantrasyonunun düşük (5-65 mg/l) ve hidrofobik moleküllere afinitesinin yüksek olması kirletilmiş topraklarda kirleticilerin ortadan kaldırılmasında önemli kriterler olarak kabul edilmektedir (Mata Sandoval,1999).

Yüzey aktif ajan olan ramnolipidlerin bir diğer rolü bazı mikroorganizmalara karşı toksisitesidir. Daha çok Gram pozitif olmak üzere birkaç Gram negatif bakteriye karşı da antibakteriyel aktivite göstermektedir. Bunun dışında antiviral, antifungusidal, mikoplazmasidal, zoosporisidal aktiviteleride yapılan çalışmalar da rapor edilmiştir (Saberón Chavez,2005).

### **1.3.2.Fosfolipidler, doğal yağlar ve yağ asitleri**

Bazı mantarlar ve bakteriler yağ asitlerini ve fosfolipidleri gelişimleri esnasında mikrobiyal oksidasyon sonucu alkanlardan üretmektedir (Crigliano ve Carman,1985). Fosfolipidler *Candida sp.*, *Corynebacterium sp.*,

*Micrococcus sp.*, *Thiobacillus sp.* gibi birçok bakteri ve maya tarafından üretilen biyosümfaktanlardır. (Desai ve Banat,1997). Yağ asitleri gıda endüstrisinde sıkça kullanılırken, fosfolipidler gen taşıyıcı sistemlerde taşıyıcı materyalle hibridizasyon oluşturmada kullanılırlar (Kural ve Gürsoy,2011).

### 1.3.3.Lipopeptidler ve lipoproteinler

Değişik türdeki mikroorganizmalar tarafından çok sayıda siklik yapıda lipopeptid üretilmektedir. Lipopeptidler antibiyotik, antiviral-antitümör ajanlar, immunomodulator, spesifik toksin ya da enzim inhibitörü olarak rol oynayabilmektedir (Rodrigues ve ark.,2006). Dekapeptid antibiyotiklerini (gramisidin) ve lipopeptid antibiyotiklerini (polimiksin) içeren çok sayıda siklik lipopeptid yapıdaki biyosümfaktanların büyük çoğunluğu *Bacillus brevis* ve *Bacillus polymyxa* türleri tarafından üretilmektedir (Desai ve Banat,1997).

*Bacillus subtilis* tarafından üretilen siklik lipopeptid sümfaktin çok güçlü bir biyosümfaktandır ve %0.005 gibi düşük bir konsantrasyonda bile suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 27.9 mN/m'ye kadar düşürebilmektedir (Arma,1968 (Desai ve Banat 1997' den)

### 1.3.4. Polimerik biyosümfaktanlar

Polimerik sümfaktanlardan en iyi bilinenleri emülsan, liposan ve mannoproteindir (Gautam ve Tyagi,2006). *Acinetobacter calcoaceticus* tarafından üretilen bir biyosümfaktan olan emülsan %0.001 ve % 0.01'lik konsantrasyonlarda bile etkili bir emülsifiye edici ajandır. Günümüzde bilinen en güçlü stabilizantlardan biridir. Yüzey gerilimini düşürmede çok iyi değildirler ancak güçlü etkilerinden dolayı biyoemülsifiye ediciler olarak tanımlanmaktadır.

*Candida lipolytica* tarafından üretilen liposan ise %83 karbonhidrat (glukoz, galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit) ve %17 proteinden oluşmaktadır (Cirigliano ve Carman, 1985). *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen polimerik yapıdaki mannoptein çeşitli organik çözücülerde yüzey aktif özellik gösteren bir biyosürfaktandır (Cameron ve ark.,1988).

### **1.3.5. Partiküler Biyosürfaktanlar**

Ekstraselüler kesecikler hidrokarbonları mikroemülsiyon forma dönüştürerek, bunların mikroorganizmalar tarafından hücre içine alınmasında, önemli rol oynar. Acinetobacter cinsine ait türlerde veziküller 20-50 nm çaplarında protein, fosfolipid ve lipopolisakkaritten oluşmaktadır. Bu tür veziküller aynı mikroorganizmanın dış membranına kıyasla 5 kat fazla fosfolipid, 350 kat fazla polisakkarit içermektedir (Kural ve Gürsoy,2011).

### **1.4.Biyosürfaktanların Fonksiyonu ve Kullanım Alanları**

Biyosürfaktanlar, moleküler karakteristikleri doğrultusunda farklı uygulama alanlarına sahip mikrobiyal bileşiklerdir. Farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlendiklerinden çok farklı kimyasal yapı ve yüzey özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle, bu moleküllerin doğal rolleri hakkında genelleme yapmak oldukça güçtür.

Biyosürfaktanlar katı, sıvı ve gaz molekülleri arasındaki yüzey ve yüzeyler arası gerilimi azaltabilen kuvvetli yüzey aktif ajanlardır. Biyosürfaktanların yüzey gerilimini azaltabilme yeteneği KMK ile açıklanmaktadır. Biyosürfaktanların sentetik sürfaktanlara oranla 10-40 kat daha düşük KMK' ya sahip olduğu, dolayısıyla çözünmeyen fazda solüsyonu dağıtmak için daha düşük konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğu ve bu

nedenle daha etkin olduğu bildirilmektedir (Lang ve Philp, 1998, Van Hamme ve ark.,2006) Ayrıca;

- Düşük toksisitesi
- Biyolojik olarak parçalanabilirliği
- Etkinliği
- Ekolojik uygunluğu
- Ucuz substratlardan elde edilmesi ve
- Biyolojik uygulamalara uyum göstermesi

gibi özellikleri kimyasal olarak sentezlenen sürfaktanların yerine biyosürfaktanların birçok endüstriyel alanda kullanımına olanak sağlamıştır. (Kosaric, 1992; Zang ve Miller,1992;Banat ve ark., 2000; Ron ve Rosenberg, 2001) Bunlara ek olarak yüksek sıcaklığa, pH değişikliğine ve tuzluluğa daha dayanıklı olmaları biyosürfaktanların ticari kullanımını daha uygun hale getirmektedir (Cameotra ve Makkar,2004; Rodridues,2006)

Biyosürfaktanlar; hidrokarbonların, ağır metallerin ve pestisitlerin mikrobiyal parçalanmaları konularında çevre, petrol ve ziraat endüstrisinde, hem de stabilizan, ıslatıcı, ve katkı maddesi olarak gıda ve kozmetikte uygulama alanı bulmuşlardır (Ron ve Rosenberg, 2001; Cameotra ve Makkar 2004; Kural ve Gürsoy,2011; Gharaei-Fathabad,2011;Gautam ve Tyagi,2006). Ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiadhesiv etkiye sahiptirler (Ron ve Rosenberg,2001; Cameotra ve Makkar, 2004; Kural,2011).

Tüm bu olumlu özelliklerine karşın yüksek üretim maliyeti biyosürfaktanların sürfaktanlar kadar yaygın kullanımına engel olmaktadır.

#### 1.4.1. Biyosümfaktanların Çevresel Kullanımı

Doğada kompleks moleküllerin parçalanması, biyolojik parçalanma/ biyodegradasyon olarak kendiliğinden devam ederken, ortam şartlarında insan eliyle yapılan değişikliklerle hızlandırılabilen ve biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme) çalışmaları olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoremediasyon, mikroorganizmalar kullanılarak kontamine olmuş toprak ya da diğer ortamlardan kimyasal sıvıların ve zehirli atıkların arıtılması, zararlı maddelerin toksik olmayan bileşiklere dönüştürülmesi sürecidir (Ceyhan ve Esmersoy,2012).

Biyosümfaktan uygulamalarının en önemli kullanım potansiyeli, petrolün mikrobiyal kazanımı ve biyoremediasyon üzerinedir (Mulligan,2005; Wang ve ark.,2007). Geri kazanımda yüzeyler arası gerilimin düşürülmesi amacı ile depolara inoküle edilen mikroorganizma biyosümfaktan üretmesi için indüklenmektedir (Desai ve Banat,1997). Biyosümfaktanların hidrokarbon-su karışımlarını emülsifiye etme yeteneği hidrokarbonların degradasyonunu arttırmaktadır (Banat ve ark.,2000). Bu emülsifikasyon özellikleri ile petrol hattı ve taşımacılık alanlarında da kullanılmaktadır.

Petrol endüstrisinin ve petrol pazarının genişlemesiyle, patlama sonucu petrol saçılması, depo tanklarından veya boşaltım esnasında tankerlerden sızma, petrol taşıyan deniz araçlarının kaza yapması gibi nedenlerle ortaya çıkan petrol kirliliği günümüzde en önemli çevre kirliliği etkenlerinden biridir. 1989' da meydana gelen Exxon Valdez Petrol sızıntısı ABD tarihinin en önemli tanker facialarından biri olarak kabul edilmektedir. Tanker, Alaska Bligh Reef' de karaya oturmuş, geminin gövdesinde açılan delikten 11 milyon galondan fazla ham petrol denize dökülmüş ve kirlilik 2250 km'lik bir sahil şeridine yayılmıştır (Harvey ve ark.,1990). Sorunu çözmek için uğraşan bilim adamları, bölgenin ekolojik dengesini yerine getirmek için yine doğadan faydalanmayı düşünmüşler ve yapılan çalışmalar sonucu kontamine

alandaki 10.000 in üzerinde petrol parçalayan bakteri türü bulmuşlardır. Bu türler arasında Pseudomonas türleri de bulunmaktadır (Ceyhan ve Esmeroy,2012). Kazada denize yayılan petrolün temizlenmesinde biyosümfaktanlar kullanılmıştır (Harvey ve ark,1990).

Banat ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada iki ton biyosümfaktan içeren hücre kültürünü 850 m<sup>3</sup> petrol tankını temizlemek için kullanmışlar ve yaklaşık olarak % 91 (tankın 744 m<sup>3</sup> 'lük alanı) oranında verim elde ederek petrolün yeniden satılabilir halde geri kazanıldığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak biyosümfaktanların petrol depolayan tankların temizliğinde kullanılabildiğini ve emülsifiye ettiği çamurdan hidrokarbonların geri kazanılabileceğini belirtmişlerdir. Bazı teknoloji firmaları petrol geri kazanım uygulamaları için biyosümfaktanları ticarileştirmektedirler.

Biyosümfaktanlar arasında özellikle ramnolipidin hidrokarbon degradasyonu ile en iyi ilişkilendirilen biyosümfaktan olduğu, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenici maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendini yenilemesini sağlayan bileşikler olduğu bildirilmiştir (Zhang ve Miller,1995). Noordman ve Janssen' in yaptıkları çalışmada ramnolipid ilavesinin uzun zincirli alkanlerin biyodegradasyonunu stimüle ettiği belirtilmiştir (Noordman ve Janssen,2002). Ayrıca kirli topraklardaki Cd, Pb, Zn gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Ron ve Rosenberg, 2001; Gautam ve Tyagi, 2006). Biyosümfaktanlarla ağır metal giderimi konusundaki çevresel çalışmalar henüz sınırlıdır ancak son yıllarda büyük ilgi görmektedir.

#### **1.4.2. Biyosümfaktanların Sağlık Alanında Kullanımı**

Biyosümfaktanların sentetik ilaçlara ve antimikrobiyal ajanlara alternatif olduğu ve böylece etkili ve güvenli terapötik ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

(Cameotra ve Makkar,2004;Singh ve Cameotra 2004). *Ps. aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipid, *Bacillus subtilis*' in ürettiği lipopeptidler ve *Candida antarctica*' nin ürettiği mannosileritritol lipidlerin antimikrobiyal aktivitesinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. (Abolos ve ark.,2001; Kitomoto ve ark. 2002; Benincasa ve ark.,2004). Biyosümfaktanların hücre membranlarının bütünlüğü üzerine etki ederek antimikrobiyal aktivite gösterdiği kabul edilmektedir (Cameotra ve Makkar, 2004). Ancak her biyosümfaktanın membran üzerine etkisi farklıdır. Bir lipopeptid olan surfaktin hücre membran fosfolipidlerine etki etmek suretiyle membran geçirgenliğini arttırarak etki etmektedir (Carrillo ve ark.,2003). Benzer mekanizma ile ramnolipidler de hücre membranının lipid kısmına etki etmektedirler (Sotirova ve ark.,2008).

*Bacillus subtilis* türleri tarafından sentezlenen lipopeptid yapısında iturin A maya hücrelerinde intramembranöz taneciklerin kümelenmesi ve küçük keseciklerin oluşumuyla plasma membranının bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca lipid membranının elektriksel iletkenliğini arttırmaktadır (Singh ve Cameotra 2004; Rodrigues ve ark.,2006). İturin A mantar infeksiyonlarında etkili bir antifungal olarak önerilmekte, iturin benzeri biyosümfaktanların alternatif antifungaller olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Tanaka ve ark.,1997).

Antimikrobiyal özelliği iyi bilinen bir diğer grup lipopeptid ise *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen (Cooper ve ark.1981) siklik yapıdaki surfaktinlerdir. Glutamik asit, lösin, aspartik asit ve valin aminoasitleri içermektedirler. Yapılarında bulunan bu aminoasitlerin farklılığına göre A,B,C olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Surfaktinler antifungal, antiviral ve antibakteriyel özelliklerine ek olarak pıhtı oluşumunu engelleme, siklik adenosin monofosfat inhibisyonu ve iyon kanal oluşumu gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptirler (Tanaka ve ark.,1997; Abalos ve ark.,2001). Aynı zamanda antitümöral etki

göstermektedirler. Sürfaktinlerin bu farmakolojik özellikleri, molekülün hedef membran ile etkileşerek membranın çift tabaka özelliklerinde değişikliklere sebep olması ile açıklanmaktadır. (Rodrigues ve ark., 2006; Konar, 2006; Banat ve ark.,2010) Sürfaktin ve analoglarının özellikle herpes virus ve retroviruslar gibi zarflı virüslara karşı daha etkin olduğu ve bu inhibitör etkinin virus zarfı ve sürfaktan arasındaki fizikokimyasal ilişkiden kaynaklandığı belirtilmektedir (Vollenbroich ve ark.,1997).

Benincasa ve arkadaşlarının çalışmasında (2004) *P.aeruginosa* tarafından sentezlenen ramnolipidin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* ve *Streptococcus faecalis* bakterilerine karşı antibakteriyel etkisinin olduğu, ayrıca herpes simplex virus tip 1 ve tip 2' ye karşı antiviral etkisinin bulunduğu belirtilmiştir (Remichkova ve ark.,2008). Yine Haba ve arkadaşları (2003) *P.aeruginosa* 47T2 suşu ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri ramnolipidin *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis*' e karşı etkilerini incelemişler ve MİK değerlerini sırasıyla (4 µg/mL, 8 µg/ mL, 0.5 µg/mL , 32 µg/mL, 32 µg/mL ve 16 µg/mL olarak bildirmişlerdir.

Biyosürfaktanların bir diğer özelliği patojenlerin biyofilm oluşturmasında anti-adhesiv özelliğe sahip olmalarıdır. Bu özellikleri ile biyomedikal uygulamalarda, üretral kateterlerde ve protezlerde bakteri kolonizasyonunu önleyebileceği bildirilmiştir (Rodrigues ve ark., 2006). Rivardo ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* V9T14 ve *Bacillus licheniformis* V19T21 suşlarının ürettiği lipopeptid biyosürfaktanların patojenik bakterilerin biyofilm adezyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Hırvatistan çalışma grubu tarafından yapılan çalışmalarda *Ps. aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipidin sedef hastalığının tedavisinde önemli etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmada ramnolipid



kullanılarak hazırlanan topikal preparat sedef hastalarına uygulanmış ve yedi yıl sonra belirtilerin kaybolduğu gözlenmiştir (Piljac ve Piljac,1995).

#### **1.4.3. Biosümfaktanların Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Biosümfaktanlar gıda endüstrisinde genellikle emülsifiye edici olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark.,2005). Ayrıca yağ damlalarının bir araya toplanmasını sağlamak, havalandırmalı sistemleri stabilize etmek, nişasta içeren ürünlerin raf ömrünü artırmak, buğday ve hamurun akıcılık özelliklerini değiştirmek, yağ bazlı ürünlerin tutarlılık ve dokusunu geliştirmek, ekmek ve dondurma formülasyonlarında kıvamı ayarlamak, bayatlamayı geciktirmek ve ilave edilen yağları dengelemek için de kullanılmaktadırlar (Zang ve arkadaşları,2005;Nitschke ve Costa, 2007).

#### **1.4.4. Biosümfaktanların Kozmetik Alanında Kullanımı**

Biosümfaktanlar nemlendirici ve cilde uygunluk özellikleri ile cilt bakım ürünlerinde kullanılmaktadır. Japonya' da Iwata şirketi ramnolipidleri kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanmaktadır. Kozmetik endüstrisinde lipozom ve emülsiyon yapımında ramnolipidlerin kullanımıyla ilgili patentler alınmıştır (Cameotra ve Makkar, 1998; Banat ve ark., 2000).

#### **1.4.5. Biosümfaktanların Diğer Kullanım Alanları**

Biosümfaktanlar, kağıt, tekstil ve seramik endüstrisinde de kullanım alanı bulmuşlardır. *Macrocystis pyrifera* dan elde edilen heteropolisakkaritlerin seramik endüstrisinde dağıtıcı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir(Banat ve ark.2000).

### 1.5.Biyosümfaktanların Sentezi

Biyosümfaktanlar kimyasal olarak sentezlenen türleri karşısında birçok avantaja sahiptir ve bu durum son yıllarda biyosümfaktanlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Ancak yüksek üretim maliyeti ve düşük verimi nedeniyle sümfaktanlarla rekabet edememektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda amaç biyosümfaktan üretim maliyetini düşürmektir. Sentezleyen mikroorganizma seçimi ve kullanılan hammadde maliyeti üretim ekonomisini etkileyen önemli faktörlerdendir. Kosaric ve arkadaşları maliyeti düşürmek için;

- En yüksek ürünü veren mikroorganizmaların seçilmesi,
- Üretim yolunun kısa ve düşük maliyetli olması
- Mikroorganizmaların gelişmesinde kullanılan besi ortamının düşük maliyette olması,
- Ürünlerin kolay ve tekrar kullanılabilir olması gerektiğini belirtmişlerdir. (Kosaric ve ark.,1984)

Ucuz ham madde seçeneği, kapsamlı ekonomik işlemlerde oldukça önemlidir. Ham madde miktarı ve cinsi üretim maliyetini büyük ölçüde etkilemektedir. Ham maddelerin biyoteknolojik proseslerde %10–30 oranında toplam üretim maliyetinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir ( Mukherjee ve ark., 2006). Biyosümfaktanların kompozisyonunu belirleyen parametreler arasında sentezleyen mikroorganizma kadar kültür şartları da önem taşımaktadır. Üretilen biyosümfaktanın kalitesi ve miktarı, besi ortamında kullanılan karbon kaynağı, nitrojen kaynağı, besiyerinde kullanılan iyonların miktarı ve pH, sıcaklık, dilüsyon oranı gibi kültür şartları biyosümfaktan sentezini etkileyen parametreler olarak belirtilmektedir (Guerra-Santos ve ark.,1984).

## **1.5.1. Biyosürfaktan Sentezini Etkileyen Faktörler**

### **1.5.1.1.Karbon kaynakları**

Birçok mikroorganizma farklı karbon kaynaklarında biyosürfaktan sentezlemektedir. Biyosürfaktan üretiminin, kullanılan karbon kaynağına ve besi ortamına göre değiştiğini belirten çalışmalar vardır (Robert ve ark.,1989; Comeotra ve Makkar,1998;Bodour ve ark.,2003;Soberon-Chavez ve ark.2005).

Biyosürfaktan üretiminde kullanılan karbon kaynakları genellikle karbonhidratlar, hidrokarbonlar ve bitkisel yağlar olmak üzere üç kategoriye ayrılmaktadır (Salihu ve ark.2009). Ham petrol, glikoz, sükroz ve gliserolun biyosürfekan üretiminde kullanılabilecek ve iyi üretim sağlayan kaynaklar olduğu belirtilmektedir (Desai ve Banat,1997;Silva ve ark.,2010). Ramnolipid üretiminde önerilenler ise gliserol, glikoz, mannitol ve etanol gibi genellikle suda çözünen karbon kaynaklarıdır.

### **1.5.1.2.Nitrojen kaynakları**

Üretimde kullanılacak olan nitrojen kaynağının biyosürfaktan sentezinin düzenlenmesinde önemli bir anahtar olduğu belirtilmektedir (Araji ve ark.,2007). Yapılan çalışmalarda ramnolipid üretimi için en iyi nitrojen kaynağının nitrat olduğu belirtilmiştir (Haba ve ark,2000; Santa-Anna ve ark,2002) Guerra-Santos ve ark.ları (1984) yaptıkları çalışmalarında sınırlı nitrojen ortamında ramnolipid üretiminin arttığını bildirmişlerdir. Biyosürfaktan üretiminde artış için yüksek karbon nitrojen oranına (C/N) ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Lang ve Wullbrandt 1999).

### 1.5.1.3.Kültür Şartları

Sıcaklık, pH, oksijen durumu, çalkalama hızı, inkübasyon süresi gibi faktörler hücrel büyüme etkileyerek biyosüfaktan üretimine etki ederler.

**pH:** Yapılan çalışmalar tercih edilen bakteri türüne göre uygun pH aralığının değiştiğini göstermektedir. Cooper ve Goldenberg (1987) çalışmalarında *Bacillus sp.* için uygun pH aralığını 6.5-7 olarak belirlerken, Guerra Santos ve ark.ları (1984) *Pseudomonas sp.* için optimum pH aralığını 6-6,5 olarak belirlemiş ve pH 7' nin üzerinde ramnolipid üretiminin azaldığını göstermişlerdir.

**Sıcaklık:** Biyosüfaktan sentezleyen mikroorganizma türüne göre etkili sıcaklık değerleri değişmektedir. Termofilik *Bacillus* türleri 40 °C' de biyosüfaktan üretirken, Wei ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada *P.aeruginosa* için optimum sıcaklığın 30-37°C olduğunu bildirmişlerdir. Sahoo ve arkadaşlarının (2011) yine *P.aeruginosa* ile yaptığı çalışmada ise optimum sıcaklık 30-35°C olarak tespit edilmiştir. Biyosüfaktan üretiminde laboratuvarlarda erlenlerle yapılan çalışmalarda tercih edilen sıcaklık aralığı genellikle 30-37 °C dir (Santa-Anna ve ark.2002; Raza ve ark.,2007; Chen ve ark.,2007; Onbaşılı ve Aslım;2011;Suganya,2013).

**Çalkalama hızı:** Biyosüfaktan üretiminde inkübasyon süresince oksijenlenmenin iyi sağlanabilmesi için uygulanan çalkalama hızı ve şekli önemlidir. Pimienta ve arkadaşları (1997) yaptığı çalışmada orbital çalkalamanın lateral çalkalamaya göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Erlenlerde yapılan çalışmalarda çalkalama hızları 120 rpm-220 rpm arasında değişmektedir. Wei ve arkadaşları (2005) petrokimyasal atık sularından izole edilen *P.aeruginosa* suşları ile yaptıkları çalışmada 50 ile 250 rpm arasını test etmişler ve 200 rpm' in daha iyi sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir.

**İnkübasyon periyodu:** Yapılan çalışmalarda flasklerde uygulanan inkübasyon süresi 3 - 12 gün arasında değişmektedir (Santa-Anna ve ark.,2002; Wei,2005; Zhang ve ark.2005; Sahoo ve ark., 2011). Ramnolipid eldesi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra yüksek ramnolipid sentezine üretimin 120. saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır (Gunther ve ark,2005; Pereira ve ark.,2010).

### 1.6.Çalışmanın Amacı

Ramnolipidlerin endüstrinin farklı kollarında kullanılabilirliğinin ortaya çıkması ile son yıllarda yapılan çalışmalar ramnolipid üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki izole edilen suşların ürettiği ramnolipid miktarları izole edilen bölgelere göre değişmektedir. Ayrıca farklı karbon kaynaklarında ve koşullarda elde edilen ramnolipid miktarları da birbirinden farklıdır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Sıdal ve arkadaşları (2001) zeytinyağı fabrikası atığı ile kontamine olmuş alandan izole edilen *Pseudomonas* türleri ile çalışmışlar ve zeytinyağı fabrikası atık suyu olan siyah likörü besiyeri olarak kullanmışlardır. Yılmaz ve arkadaşları (2008) ise süt fabrikası atık suyundan izole edilen *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* için peynir altı suyunu temel besiyeri olarak kullanarak ramnolipid üretimini araştırmışlardır. Aynı şekilde Kahyaoğlu ve Konar (2008) da peynir altı suyunda *Ps. aeruginosa* DSM 50071 standart suşunun ramnolipid üretimini araştırmışlardır. Onbaşılı ve Aslım (2011) şeker pancarı melasını besi ortamı olarak kullanırken Yalçın ve arkadaşları (2008) rafineri atık suları ile kontamine olmuş alandan izole ettikleri *Pseudomonas* türlerinin ramnolipid üretimlerini Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanarak incelemişlerdir.

Tüm dünyada yapılan çalışmalarda da yine petrokimyasal atık suları, süt fabrikası atıkları, soya yağı atıkları, rafineri atık sularından izole edilen suşlarda ramnolipid üretimi gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda soya fasulyesi yağı, şeker kamışı küspesi, şeker pancarı, mısır kepeği ve benzeri maddelerin besi ortamına ilavesi ile farklı miktarlarda ramnolipid üretildiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Trummler ve ark.2003; Dubey ve Juwarkar,2004; Thanomsub ve ark., 2007; Wei ve ark.,2005; Comilios-Neto ve ark.,2010; Nitschke ve ark., 2004; ). Tüm bu çalışmalarla ramnolipid üretimi ile ilgili veriler elde edilse de halen yüksek oranda ve daha ekonomik ramnolipid üretimi sağlamaya yönelik çalışmalar yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Cameotra ve Makkar, 2004).

Bu noktadan hareketle çalışmamızda yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, çok sayıda noktadan ve farklı kaynaklardan numune alarak ramnolipid üretimi iyi olan *P.aeruginosa* suşları elde etmeyi ve bu suşlar üzerinde ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik besi ortamı geliştirme çalışmaları yapmayı amaçladık.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.Bakteri Kökenleri

Çalışmada kullanılmak üzere *P.aeruginosa* kökenleri Türkiye'nin farklı noktalarından alınan su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. Yirmialtı noktadan örnek alınmıştır. *P.aeruginosa* suşları yağlı ortamlarda daha çok ramnolipid ürettiği için örnek alınacak noktalar belirlenirken özellikle fabrika atıkları ile kontamine olmuş, yağlı alanlar tercih edilerek ramnolipid üretimi iyi olan suşların elde edilmesi amaçlanmıştır. Örneklerin alındığı bölgeler ve kaynakları Çizelge 2' de verilmiştir.

**Çizelge 2.** *Ps. aeruginosa* suşlarının örnek alındığı bölgeler ve kaynakları

No	Örnek	Bölge	Kaynak
1	D1	Diyarbakır, petrol kuyusu çevresi	Toprak
2	A1	Adıyaman, petrol kuyusu çevresi	Toprak
3	H1	Hatay, zeytin yağı işletmesi çevresi	Toprak
4	BT1	Bafra derbent barajı çevresi	Toprak
5	S1	Samsun balık unu, balık yağı fabrikası ilerisi	Toprak
6	HST1	Hastane infeksiyonu etkeni	Klinik
7	HST2	Hastane infeksiyonu etkeni	Klinik
8	SB1	Bafra derbent barajı	Su
9	SS1	Samsun balık unu, balık yağı fabrikası ilerisi	Su
10	ST1	Samsun balık unu, balık yağı fabrikası yakını	Toprak
11	SY1	Kuşadası Davutlar Zeytin yağı fabrikası çevresi	Toprak
12	SY2	Kuşadası Davutlar Z. yağı fabrikası çevresi dere yakını	Toprak
13	SD1	Antalya Adrasan, Dere	Su

## 2.2. Araştırmada Kullanılan Küspeler

**Arpa küspesi:** Kazan Efes Bira fabrikasından temin edilmiştir. İçeriği izelge 3' de verilmektedir.

**Çizelge 3.** Arpa küspesi içeriği

İçerik	%
H. Protein	27.84
H.Yağ	9.92
Nişasta	6.96
Selüloz	30.21
Kül	4.27
Nem	78.45
Azotsuz z eksrakt madde	6.21

**Fındık Küspesi:** Ordu Altaş Yağ fabrikasından temin edilmiştir. İçeriği izelge 4' de verilmektedir.

**Çizelge 4.** Fındık küspesi içeriği

İçerik	%
Yağ	1.5-2
Protein	44-46
Rutubet	10-12

**Ayçiçeği Küspesi:** Ordu Altaş Yağ fabrikasından temin edilmiştir. İçeriği izelge 5' de verilmektedir.

**Çizelge 5.** Ayçiçeği küspesi içeriği

İçerik	%
Yağ	0.55-0.75
Protein	28-30
Rutubet	10-12



**Kefir:** Ticari olarak satın alınmıştır. İçeriği Çizelge 6' da verilmektedir.

**Çizelge 6.** Kefir içeriği

<b>Maddeler</b>	<b>%</b>
Su	88-89
Süt asidi	0.8-0.9
Etil alkol	0.6-1.1
Laktoz	1.7-2.7
Kazein	2.5-2.9
Mineraller	0.6-0.8
Albumin	0.1-0.3
Yağ	2.8-3.3

**Balık unu:** TURTAŞ balık unu fabrikasından temin edilmiştir. İçeriği Çizelge 7' de verilmektedir.

**Çizelge 7.** Balık unu içeriği

<b>Maddeler</b>	<b>%</b>
Ham madde	91.7
Ham protein	65.3
Ham yağ	8.9
Ham kül	14.2
Metionin	2.19
Glisin	5.09
Lösin	5.48
Lizin	5.69
Treonin	3.30
Histidin	2.00
İsolösin	3.33
Fenilalanin	3.15
Trosin	2.38
Valin	4.04

### 2.3. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

#### Nutrient Broth (DIFCO)

Besiyeri içeriği (g/l)

Bacto-beef extract	3 g
Bacto-peptone	5 g

Besiyeri karışımından 8 gr tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 6.8'e ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

#### Cetrimide agar (HIMEDIA)

Besiyeri içeriği (g/l)

Pancreatic digest of gelatin	20 g
Magnesium chloride	1.40 g
Dipotassium sulphate	10 g
Cetrimide	13.60 g

Besiyeri karışımından 45.3 gr tartılıp içerisinde 10 ml gliserol bulunan 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 7.2' ye ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

#### Tryptone Soy Agar (Lab M)

Besiyeri içeriği ( g/l);

Tryptone	15 g
Soy peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar no 2	12 g

Besiyeri karışımından 37 gr tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 7.3' e ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

### **Mac Conkey Agar (DIFCO)**

Besiyeri içeriği ( g/l);

Bacto - Peptone	20 g
Proteose-Peptone	3 g
Bacto-Lactose	10 g
Bacto-Bile Salts No.3	1,5 g
Sodium Chloride	5 g
Bacto – Agar	15 g
Bacto- Neutral red	0.03g (% 1 lik den 3 ml)
Bacto- Crystal violet	0.001g (% 1 lik den 0,1 ml)
Distile su	1000 ml
Son pH: 7,1	

Besiyeri karışımından 50 gr tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 7.1'a ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

### **Simmons Citrat Agar (FLUKA)**

Besiyeri içeriği ( g/l);

Magnesium heptahydrate	0.2 g
Ammonium dihydrogen phosphate	0.2 g
Disodium ammonium phosphate	0,8 g
Trisodium citrate	2 g
Sodium chloride	5 g
Bromthymol blue	0.08 g
Agar	15 g

Besiyeri karışımından 23.3 gr tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 7' ye ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

### **TSI Agar (OXOID)**

Besiyeri içeriği (g/l)

Lab Lemco beef extract	3 g
Yeast extract	3 g
Peptone	5 g
Sodium chloride	10 g
Lactose	10 g
Sucrose	1 g
Dextrose	3 g
Ferric citrate	0.3 g
Sodium thiosulphate	0.3 g
Oxoid agar no:3	12 g

Besiyeri karışımından 65 gr tartılıp 1000 ml distile suda ısıtılarak erimesi sağlandı ve pH 7.4' e ayarlandıktan sonra 121 °C' de otoklavda 15 dakika steril edildi.

### **Oksidaz testi için ayıraç**

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	0.5 ml
DMSO	100 ml

## 2.4. Ramnolipid Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullandığımız suşların ramnolipid üretimlerini belirlemek için Zhang ve Miller' in önerdiği Mineral Salt Medium temel besiyeri (Zhang ve Miller, 1992) kullanılmıştır. MSM içeriği Çizelge 8' de, eser element çözeltisi içeriği ise Çizelge 9' da verilmektedir.

**Çizelge 8.** Mineral Salt Medium temel besiyeri

Temel Besiyeri g/l	
Madde	Miktar
NaNO <sub>3</sub>	4 g
NaCl	1 g
KCl	1 g/
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g

**Çizelge 9.** MSM besiyeri eser element çözeltisi

Eser Elementler g/l	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,08 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75g
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,08 g
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,075 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,75 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,15 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,05

Yukarıda belirtilen oranlarda besiyeri bileşimi 2 ml eser element solüsyonu ilave edilerek 1000 ml' ye tamamlanmış ve son pH' sı 6,8' e ayarlanarak 121°C' de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

## 2.5. YÖNTEM

### 2.5.1. Mikroorganizmaların İzolasyon ve İdentifikasyonu

Çalışmamızda kullanılan *P.aeruginosa* suşları ülkemizin farklı bölgelerinden alınan su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. Alınan örneklerden Nutrient Broth (NB) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. İnkübasyon sonrası Cetrimide agara pasajlar yapılarak oluşan koloniler incelenmiş ve klasik bakteriyolojik yöntemler kullanılarak identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon testleri sonucu *P.aeruginosa* olduğu belirlenen 13 suş ve kontrol suşu olarak ramnolipid üretimi bilinen ATCC 9027 standart suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

Tüm izolatların % 20 lik gliserolde stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edilmiştir.

### 2.5. 2. Mikroorganizmaların Üretilmesi

Mikroorganizma üretimi için Zhang ve arkadaşları, tarafından önerilen Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanılmıştır (Zhang ve Miller,1992).

- Daha önce stok kültürleri hazırlanan *P.aeruginosa* suşlarının NB' ye pasajları yapılarak üretimleri sağlanmıştır
- Suşların bu taze kültürlerinden Mc Farland 2 bulanıklığına eş değer bulanıklıkta bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve MSM besiyerine 1/20 oranında inoküle edilmiştir.
- 35 °C'de döngüsel çalkalımlı inkübatörde 150 rpm'de (STIR) 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.



**Şekil 4.** Çalkalamalı inkübatörde ramnolipid üretimi

## 2.6. Elde Edilen Ramnolipidin Saflaştırılması

MSM ortamında inkübasyona bırakılan *P.aeruginosa* suşları tarafından üretilen ramnolipid, Mato ve Sandoval'ın yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır (Mato ve Sandoval,1999). Bu amaçla;

- Kültürler 9000 rpm' de 20 dk. süre ile santrifüj (Hitacchi) edilmiştir.
- Elde edilen süpernatantın pH' ı 6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 2' ye ayarlanmış ve 1 gece buzdolabında bekletilmiştir.
- İkinci gün süpernatantlar eşit miktarda kloroform-metanol (2:1) ile muamele edilmiş ve tekrar 10 dk. çalkalamalı inkübatörde çalkalanmıştır.
- Ayırma hunisi ile ayrılan kültürden altta kalan organik faz evaporatörde uçurulmuş ve elde edilen ürün daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

## 2.7. Ramnolipid Miktarının Ölçülmesi

Shimadzu 1601 marka UV/VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak Dubois ve ark. larının önerdiği fenol-sülfürik asit yöntemi ile ramnolipid miktarları belirlenmiştir(Dubois ve ark.,1956).

Bu amaçla; öncelikle saf standart L-ramnoz kullanılarak farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler üzerine 5 ml derişik sülfürik asit ve 50 µl %80 lik fenol eklenerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan derişimlere karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Standart L-ramnoz çözeltileri hazırlanarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ramnolipid miktarını belirlemede kullanılmıştır.

Saflaştırılan ramnolipid miktarlarını belirlemek için evaporasyon sonrası elde edilen ürün metanolde çözdürülüp 0,22 µm'lik milipor filtrelerle filtre edilmiştir. 2 ml örnek, 50µl %80 lik fenol, 2.95 ml saf su üzerine 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmiş, karıştırılmış ve soğuduktan sonra UV spektrofotometrede 480 nm' de kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Çalışmaya ait validasyon işlemleri oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden yapılmıştır. Hazırlanan bu çalışmada, ICH'ye (International Conference on Harmonization; Uluslararası Uyum Konferansı) göre uygun bulunan validasyon parametrelerinden seçicilik, doğrusallık, aralık, duyarlılık, kesinlik (tekrar edilebilirlik, gün içi tekrar edilebilirlik, günler arası tekrar edilebilirlik),sağlamlık parametreleri uygulanmıştır.



## 2.8. Farklı Ortamların Ramnolipid Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

### 2.8.1.Farklı Bakteri Konsantrasyonlarının Üretime Etkisi

Farklı bakteri konsantrasyonlarının ramnolipid üretimi üzerine etkisini araştırmak için Nutrient Broth' a ekimi yapılan 14 adet *P.aeruginosa* suşunun densitometre cihazı ile bakteri yoğunlukları Mc Farland 1 ve 2 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 1/20 oranında MSM besiyerine inoküle edilerek 37 °C de 150 rpm' de 7 gün süreyle inkübasyonları sağlanmıştır. Daha sonra 9000 rpm' de 20 dk. santrifüj edilerek bakteri hücreleri uzaklaştırılmış, pH'ı 2' ye ayarlanmış ve 1 gece +4 °C de bekletilmiştir. 2. gün supernatantlar eşit miktarda kloroform-metanol (2:1) ile muamele edilerek ekstraksiyonları sağlanmış ve evapore edilmiştir. Saf olarak elde edilen ramnolipid miktarları UV spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

### 2.8.2.Arpa Küspesinde Ramnolipid Üretimi

Farklı ortamlar kullanılarak ramnolipid üretimini arttırmayı hedeflediğimiz çalışmamızda, iyi bir verim elde etmek ve aynı zamanda atık materyallerin değerlendirilmesi ile daha ucuz maliyetle üretimi sağlamak amacıyla bira sanayi ara ürünü olan ve karbonhidrat bakımından zengin arpa küspesi ve bira mayası kullanılmıştır.

Besi ortamı oluşturmak amacıyla arpa küspesi 2 katı su ilave edilerek bir gece buzdolabında bekletilmiş, ikinci gün kaynatılarak süzölmüş ve filtre edilmiştir. Bir birim süzüntüye iki birim fosfat tamponu eklenmiş ve her 400 ml'lik temel besi ortamına farklı maddeler ilave edilerek dört farklı besi ortamı oluşturulmuştur.

Birinci ortam (A): temel besi ortamı 400 ml + 0,5 gr NaCl+ 1 ml eser element çözeltisi (temel besi ortamı)

İkinci ortam (B): temel besi ortamı 400 ml + 0,5 gr NaCl+ 1 ml eser element çözeltisi+ 5 ml gliserol

Üçüncü ortam (C): temel besi ortamı 400 ml + 0,5 gr NaCl+ 1 ml eser element çözeltisi + 5 ml bira mayası

Dördüncü ortam (D): temel besi ortamı 400 ml + 0,5 gr NaCl+ 1 ml eser element çözeltisi + 1 gr NaNO<sub>3</sub>

Yukarıda belirtilen şekilde maddelerin ilavesi ile hazırlanan besiyerleri 500 ml' lik erlenlere 200' er ml olacak şekilde taksim edilmiş ve 121 °C de otoklavda steril edilmiştir.

Hazırlanan besiyerlerine Mc Farland 2 bulanıklığına eş değer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları 1/20 oranında inoküle edilerek daha önce ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde (2.5.2 ve 2.6) 35 °C de 150 rpm de üretimleri sağlanmış ve elde edilen ramnolipid saflaştırılmıştır.

### **2.8.3.Fındık Küspesinde Ramnolipid Üretimi**

Bakterilerin zengin protein içeren ortamlarda daha iyi üremesinden yola çıkarak içeriğinde %44-46 oranında protein bulunduran ve yağın ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonucu elde edilen fındık küspesi ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik olarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu amaçla; küspeye 5 katı su ilave edilmiş ve 1 gece buzdolabında bekletilmiştir. İkinci gün kaynatılarak suyu süzölmüş ve filtre edilmiştir. Elde edilen süzöntüye 2 birim fosfat tamponu ilave edilerek baz besiyeri hazırlanmış ve her 400 ml'lik besiyeri 0,5 gr NaCl ve 1 ml MSM besiyerinde kullanılan eser element çözeltisi ile zenginleştirilmiştir. Hazırlanan besiyerleri 500 ml' lik erlenlere 200' er ml taksim edilerek otoklavda steril edilmiştir.

Hazırlanan besiyerlerine Mc Farland 2 bulanıklığına eş değer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları 1/20 oranında inoküle edilerek daha önce ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde ( madde 2.5.2 ve 2.6) 35 °C de 150 rpm de ramnolipid üretimleri sağlanmıştır.

#### **2.8.4. Ayçiçeği Küspesinde Ramnolipid Üretimi**

*P.aeruginosa* suşlarının ramnolipid üretimini arttırmak amacıyla ayçiçek yağı fabrikası atık ürünü olan ayçiçeği küspesi kullanılmıştır. Ayçiçeği küspesi, ayçiçeği yağlı tohumlarından yağın alınmasından sonra geriye kalan kısımlardır. Kükürtlü amino asitlerce diğer küspelere göre daha zengindir ve %28-30 oranında protein ihtiva etmektedir. Bu nedenle bakterilerin üremesi için iyi bir ortam oluşturmaktadır.

Besi ortamı oluşturmak amacıyla; küspe 6 katı su ilave edilerek bir gece buzdolabında bekletilmiş ve ikinci gün kaynatılarak süzölmüştür. Süzöntü filtre edilerek fosfat tamponu ile baz besiyeri hazırlanmış ve yine NaCl ve eser element solüsyonu ilavesi ile zenginleştirilmiş ve otoklavda steril edilmiştir.

Hazırlanan besiyerlerine Mc Farland 2 bulanıklığına eş değer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları 1/20 oranında inoküle edilerek ramnolipid üretimleri sağlanmıştır.

#### **2.8.5. Kefir Süzöntüsünde Ramnolipid Üretimi**

Kefir laktoz, kazein, albumin ve yağ içermektedir. Ayrıca kefirde bol miktarda kalsiyum, magnezyum, fosfor, flor ve selenyum bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda besiortamına magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum tuzları ve iz elementlerin eklenmesinin *P.aeruginosa*'da ramnolipid üretimini artırdığı

bildirilmiştir (Guerra-Santos ve ark.,1986; Wu ve ark.2008). Biz de çalışmamızda zengin içeriğini göz önüne alarak ticari olarak satın aldığımız kefiri kullandık.

Besi ortamı geliştirmek amacıyla öncelikle kefir, süzgeç kağıdı ile süzülerek elde edilen kefir suyuna iki birim fosfat tamponu ilave edilmiş ve 400 ml'lik karışıma 0.5 gr NaCl ve 1ml eser element çözeltisi ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerine bakteri süspansiyonları Mc Farland 1 ve 2 bulanıklığına eşdeğer olarak şekilde hazırlanmış ve her iki bakteri yoğunluğunda kefir suyunda ramnolipid üretimi sağlanmıştır.

### **2.8.6. Balık Ununda Ramnolipid Üretimi**

Zengin protein ve mineral içeriği ile bilinen ve aynı zamanda hayvansal yem katkı maddesi olarak da kullanılan balık unu diğer küspelere oranla daha yüksek kalsiyum ve fosfor ihtiva etmektedir. Ramnolipid üretimine etkisini araştırmak amacıyla geliştirdiğimiz besi ortamı için, balık unu 3 katı su ilavesi ile bir gece buzdolabında bekletilmiştir. İkinci gün filtre edilerek elde edilen süzüntüye fosfat tamponu ilave edilmiş ve baz besiyeri hazırlanmıştır. Madde 2.8.2' de ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde zenginleştirilerek otoklavda steril edilen besiyerine bakteri süspansiyonları ilave edilerek çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen ramnolipid saflaştırılarak, miktar tayini yapılmıştır.

### **2.8.7. Karışım Ortamı**

Ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik olarak oluşturduğumuz besi ortamlarından elde ettiğimiz sonuçlar baz alınarak düşük maliyetle yüksek verim elde etmeyi hedefleyerek fındık küspesi, arpa küspesi ve balık unu karışımından yeni bir besi ortamı elde edilmiştir. Yüksek protein içeriği ve

diğer küspelere göre daha fazla yağ ihtiva etmeleri nedeniyle balık unu ve fındık küspesi, Zengin karbonhidrat içeriği nedeniyle de arpa küspesi kullanılmıştır. Maliyeti düşürmek amacıyla fındık küspesi daha ucuz olduğu için miktar olarak balık unundan daha fazla kullanılmıştır. Bu amaçla; Bir birim fındık küspesi süzüntüsü + ½ birim arpa küspesi süzüntüsü+ ½ birim balık unu süzüntüsü karıştırılmış ve bu karışıma 2 birim fosfat tamponu ilave edilmiştir. Elde edilen 400 ml' lik süzüntü ve fosfat tamponundan oluşan karışıma 0,5 g NaCl ve 1 ml eser element çözeltisinden ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerlerine 1/20 oranında bakteri süspansiyonu ilave edilerek çalkalamalı inkübatörde ramnolipid üretimleri sağlanmıştır.

#### **2.8.8.Ardışık İnkübasyonun Ramnolipid Üretimi Üzerine Etkisi**

Ramnolipid üretimine etkisini araştırdığımız bir diğer parametre ise ardışık inkübasyondur. Bu amaçla *P.aeruginosa* ATCC 9027 standart suşunun MSM besiyerindeki ilk 7 günlük inkübasyonundan sonra suşun taze pasajı yapılarak tekrar MSM besiyerinde 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem ard arda dört kez tekrarlanmış ve her 7 günlük periyottan sonra ramnolipid miktarları ölçülmüştür.

#### **2.8.9. UV Işıklarının Ramnolipid Üretimine Etkisi**

UV ışınlarının ramnolipid üretimine etkisini araştırmak amacıyla TSA besiyerine ekimi yapılan *P.aeruginosa* ATCC 9027 suşunun NB' de Mc Farland 2 bulanıklığına eş değer bakteri süspansiyonları hazırlanarak her bir petriye 20 µl ilave edilmiş ve öze ile yayılmıştır. Daha sonra petriyerler 60, 75, 90, 105, 120 sn ve 5,10, 20 ve 30 dk. UV ışığı altında tutularak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her petri süre bitiminde karanlık odada bekletilerek toplam süre bitiminde etüve kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası üreme

gözlenen petrilere alınan koloniler yine Cetrimid Agar ve Mac Conkey Agara ekilerek koloni morfolojileri incelenmiştir. Belirlenen süreler sonunda elde edilen kolonilerden bakteri süspansiyonları hazırlanarak MSM besiyerine ekimler yapılmış ve 37 °C' de 7 gün çalkalamalı inkübatörde ramnolipid üretimleri sağlanmıştır.

## **2.9. İstatistiksel Analiz**

Çalışmalarda elde edilen değerler ortalama  $\pm$  Standart Sapma olarak verilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde SPSS (Version,17.0) paket programı kullanılmıştır. Oluşturulan besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarları One Way Anova testi ile karşılaştırılmıştır ( $p \leq 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir). Çalışma çift kontrollü olarak yürütülmüştür.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bakterilerin İdentifikasyonu

Klasik bakteriyolojik yöntemlerle identifikasyonu yapılan suşlardan oksidaz pozitif, hareketli, Brain-Heart infüzyon broth' da 42° C' de ve 37° C' de üreyen, + 4° C'de üremeyen, karakteristik kokusu olan ve mavi-yeşil pigment yapan suşlar *P.aeruginosa* olarak değerlendirilmiştir.

Ramnolipid üretimi tespit edilen 13 *P.aeruginosa* suşu ve kontrol olarak ramnolipid ürettiği bilinen *P.aeruginosa* ATCC 9027 standart suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.2. *P.aeruginosa* Suşlarında Ramnolipid Üretimi

##### 3.2.1. Farklı Bakteri Yoğunluklarında Ramnolipid Miktarları

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ramnolipid miktarını belirlemek ve farklı bakteri yoğunluklarının ramnolipid üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, Mc Farland 1 ve 2 yoğunluklarına göre ayarlanan bakteri süspansiyonları MSM besiyerine ilave edilerek ramnolipid üretimleri sağlanmış ve elde edilen ürün saflaştırılarak miktar tayini yapılmıştır Buna göre; Mc Farland 2 bulanıklığına göre yapılan ekimler neticesinde elde edilen ramnolipid miktarları, Mc Farland 1' e göre daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında oluşturulacak olan besi ortamlarında Mc Farland 2 bakteri yoğunluğunun kullanılmasına karar verilmiştir. Elde edilen ramnolipid miktarları Çizelge 10' da verilmektedir.

**Çizelge 10.** Mc Farland 1 ve 2 bulanıklığına göre MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarları

No	Mc Farland 1 Miktar (g/l)	Mc Farland 2 Miktar (g/l)
D1	0.7	1.2
A1	0.7	1.2
H1	0.7	1
BT1	0.9	1.7
S1	0.9	1.6
HST1	0.8	1.2
HST2	0.9	1.4
SB1	1.5	4.6
SS1	0.9	1.7
ST1	0.9	3.6
SY1	1.2	1.7
SY2	0.9	1.9
SD1	0.7	0.9
ATCC	1.3	1.5

Mc Farland 1 ve 2 bulanıklıklarına göre ramnolipid üretim verimi en iyi olan 3 suş seçilmiş ve besi ortamı geliştirme çalışmaları SB1, ST1, SY1 ve ATCC suşları ile devam ettirilmiştir.

### **3.2.2. Arpa Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında**

#### **Ramnolipid Miktarları**

Arpa küspesi ve bira mayası kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları Çizelge 11' de verilmiştir.

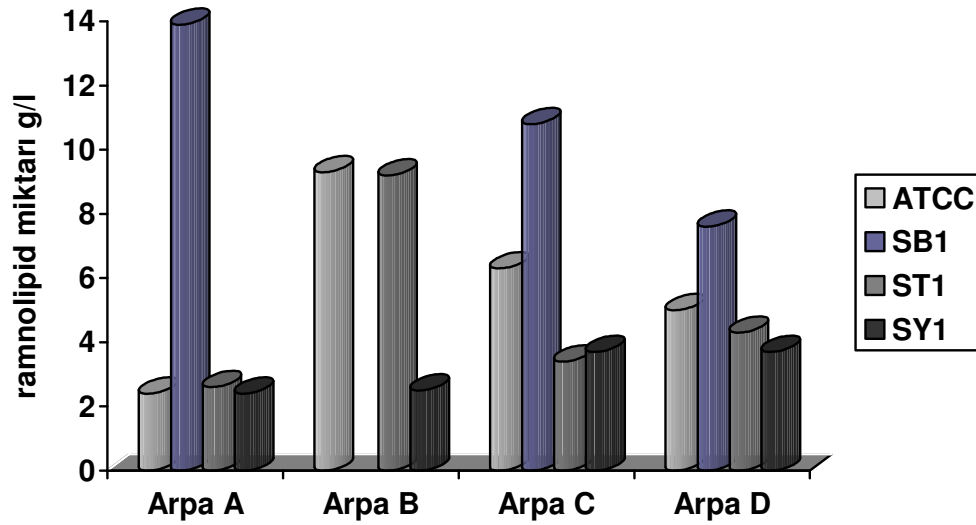
Arpa küspesine farklı maddelerin ilavesi ile hazırladığımız dört farklı besi ortamında da elde ettiğimiz ramnolipid miktarları tüm suşlar için MSM besiyerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur.



**Çizelge 11.** Arpa küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında üretimle elde edilen ramnolipid miktarları (g/l)

Suşlar	A	B	C	D	MSM
ATCC	2.4±0.4	9.3±0.05	6.3±1	5±0.9	1.5±0.04
SB1	13.9±1.6	-	10.8±0.8	7.6±1.5	4.6±0.1
ST1	2.6±0.2	9.2±0.2	3.4±0.01	4.3±0.3	3.6±0.03
SY1	2.4±0.2	2.5±2.1	3.7±0.2	3.7±0.2	1.7±0.1

\*A: baz besiyeri, B: baz besiyeri +gliserol, C: baz besiyeri +bira mayası, D: baz besiyeri+NaNO<sub>3</sub>



**Şekil 5.** Arpa küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

Verilerin istatistiki analizi yapıldığında ATCC suşu için B ve C ortamında elde edilen değerler MSM ortamına göre anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla, p=0,000 ve p=0,036). Oluşturulan dört ortam kıyaslandığında ise B ortamında elde edilen değerler diğer ortamlardan istatistiki olarak yüksek bulunmuştur (p=0.000)

Arpa küspesi süzütüsüne gliserol ilave ederek hazırladığımız B ortamında üretilen SB1 suşunun ramnolipid miktarı çok yüksek elde edilmiştir. Bu durumun SB1 suşunun yüksek piyosiyanın üretiminin fenol sülfürik asit yöntemi ile ölçümü olumsuz etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. SB1 suşunun piyosiyanın üretimi fenol sülfürik asit yöntemi ile ölçümde olumsuz sonuç vermektedir. SB1 suşunun yüksek ramnolipid üretimi gösterdiği açıktır ancak net bir sonuç için diğer ölçüm yöntemlerine başvurulmalıdır. Bu nedenle SB1 suşu B ortamı sonucu değerlendirme dışı bırakılmıştır. B ortamı çıkartılarak yapılan istatistiki değerlendirmede A ve C ortamında elde edilen değerler MSM ortamı ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlıdır( sırasıyla;  $p=0.005$ ,  $p=0.021$ ).

ST1 suşu için B ortamında elde edilen değerler diğer tüm ortamlara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p=0.000$ ). A, C ve D ortamında elde edilen ramnolipid miktarları ile MSM ortamında elde edilen miktarlar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

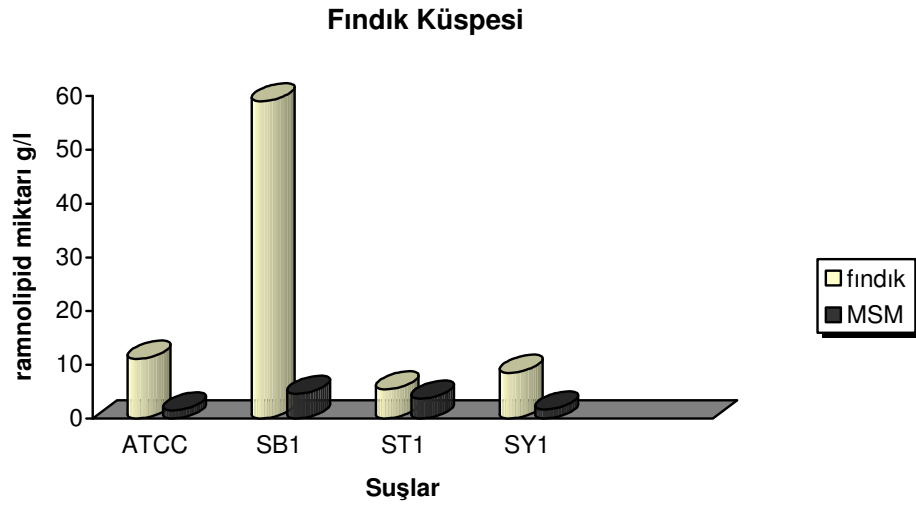
SY1 suşu MSM ile kıyaslandığında arpa küspesi ile oluşturulan tüm ortamlarda elde edilen değerler istatistiki olarak anlamlıdır (A,B,C,D sırasıyla;  $p=0.048$ ,  $p=0.031$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ). C ve D ortamında elde edilen değerler diğer ortamlara göre istatistiki olarak farklılık göstermiştir( $p=0,000$  ve  $p=0,002$ ).

### **3.2.3. Fındık Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları**

Fındık küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları MSM ortamında elde edilen miktarlara göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 12' de verilmiştir.

**Çizelge 12.** Fındık küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında ramnolipid miktarları

Suşlar	Fındık Küspesi (g/l)	MSM (g/l)
ATCC	11.1±1	1.5±0.04
SB1	59±2.8	4.6±0.1
ST1	5.4±0.2	3.6±0.03
SY1	8.5±1.2	1.7±0.1



**Şekil 6.** Fındık küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

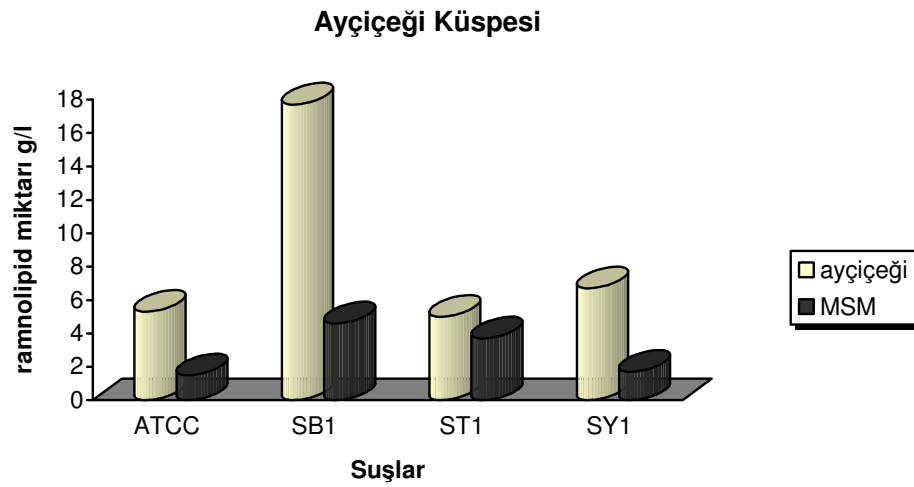
MSM ile kıyaslandığında tüm suşlarda ramnolipid miktarlarında meydana gelen artış istatistiki olarak anlamlıdır ( ATCC  $p= 0,003$ , SB1  $p=0,00$ , ST1  $p=0,035$ , SY1  $p=0,003$ ).

### 3.2.4. Ayçiçeği Küspesi Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları

Ayçiçeği küspesi kullanarak oluşturulan besi ortamında tüm suşlar için elde edilen ramnolipid miktarları MSM' de elde edilen miktarlardan yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 13' de verilmiştir.

**Çizelge 13.** Ay çiçeği küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında ramnolipid miktarları

Suşlar	Ayçiçeği (g/l)	MSM (g/l)
ATCC	5.3±0.3	1.5±0.04
SB1	17.7±2	4.6±0.1
ST1	5±0.6	3.6±0.03
SY1	6.7±1	1.7±0.1



**Şekil 7.** Ayçiçeği küspesi kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

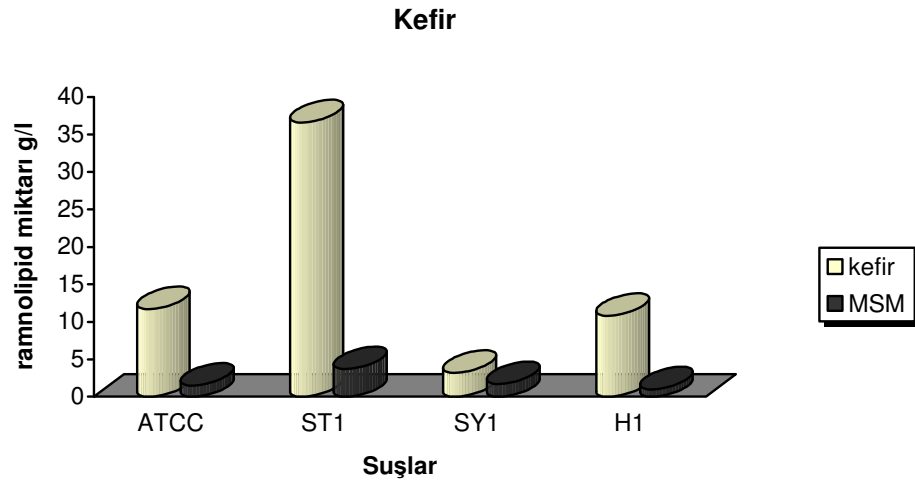
Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ATCC suşunun ayçiçeği küspesi ortamında ürettiği ramnolipid miktarındaki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmazken ( $p=0,121$ ), SB1, ST1 ve SY1 suşlarının ramnolipid miktarlarındaki artış anlamlıdır ve p değerleri sırasıyla;  $p=0,014$ ,  $p=0,049$ ,  $p=0,010$  olarak bulunmuştur.

### 3.2.5. Kefir Süzüntüsü Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Ramnolipid Miktarları

Kefir süzüntüsü kullanarak hazırladığımız besi ortamında tüm suşlar için elde ettiğimiz ramnolipid miktarları MSM ortamında elde edilen miktarlardan yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 14' de verilmiştir. SB1 suşu için kefir süzüntüsü ortamında elde edilen miktar yüksek bulunduğu için devre dışı bırakılmıştır.

**Çizelge 14.** Kefir süzüntüsü kullanılarak oluşturulan besi ortamında ramnolipid miktarları

Suşlar	Ramnolipid miktarları (g/l)	MSM (g/l)
ATCC	11.7±0.8	1.5±0.04
H1	10.8±0.6	4.6±0.1
ST1	36.6±6	3.6±0.03
SY1	3.2±0.8	1.7±0.1



**Şekil 8.** Kefir süzüntüsü kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

ATCC suşunun kefir süzüntüsü içeren besi ortamında ürettiği ramnolipid miktarındaki artış MSM ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,003$ ). Aynı şekilde ST1 ve H1 suşu için istatistiki anlamlılık söz konusu iken ( $p=0,000$ ) SY1 suşunun ramnolipid üretimindeki artış MSM besiyerine göre anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,531$ ).

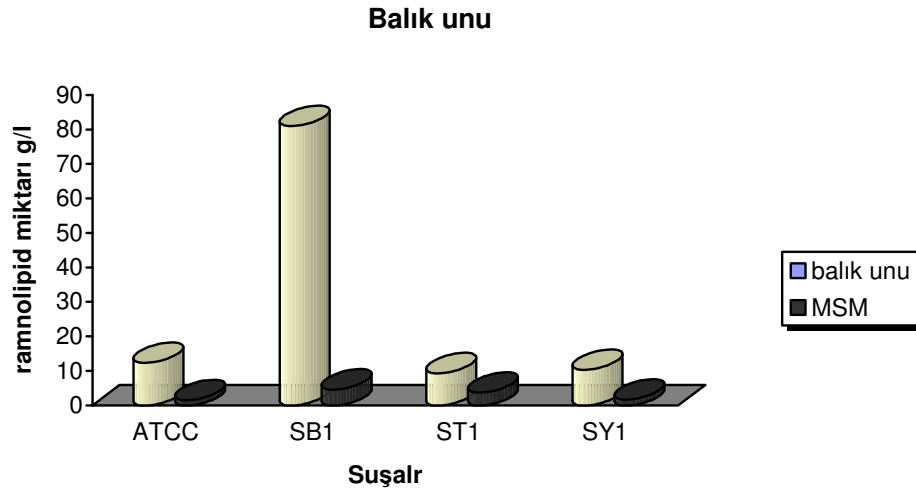
### 3.2.6. Balık Unu Kullanılarak Oluşturulan Besi Ortamında Elde Edilen Ramnolipid Miktarları

Balık unu kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları aynı suşların MSM ortamında ürettikleri ramnolipid miktarlarından yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 15'de verilmiştir.

Veriler istatistiki olarak değerlendirildiğinde; MSM' ye kıyasla balık unu ortamında meydana gelen ramnolipid artışı tüm suşlar için istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (ATCC, SB1, ST1 ve SY1 için sırasıyla,  $p=0,002$ ,  $p=0,016$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,001$ ).

**Çizelge 15.** Balık unu kullanılarak oluşturulan besi ortamında ramnolipid miktarları

Suşlar	Balık unu (g/l)	MSM (g/l)
ATCC	12.3±2.3	1.5±0.04
SB1	81±10	4.6±0.1
ST1	9.3±0.2	3.6±0.03
SY1	10.3±0.5	1.7±0.1

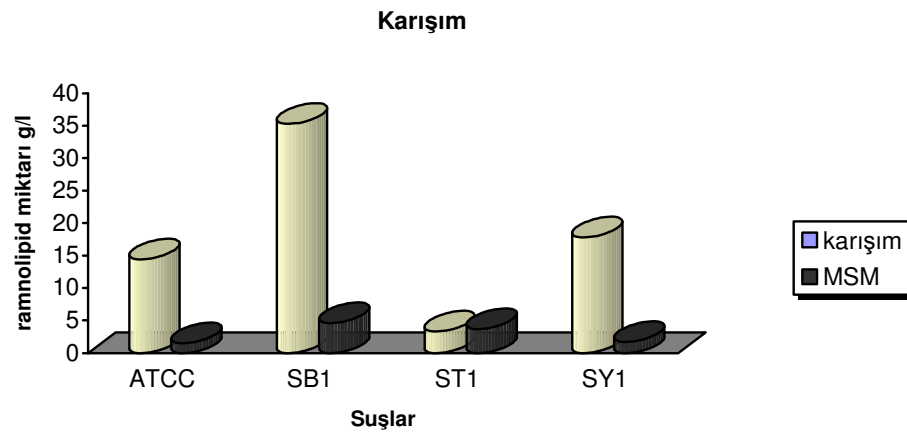
**Şekil 9.** Balık unu kullanılarak oluşturulan besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

### 3.2.7. Karışım Ortamında Ramnolipid Miktarı

Ranolipid üretimini arttırmaya yönelik olarak besi ortamı geliştirme çalışmalarımızda denediğimiz atık ürünlerin üretim verimliliğini artırması sonucu oluşan yeni besi ortamı sonuçları Çizelge 16'da verilmiştir.

**Çizelge 16.** Karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarları

Suşlar	Karışım ortamı (g/l)	MSM
ATCC	14.4±0.3	1.5±0.04
SB1	35.3±2.4	4.6±0.1
ST1	3.3±0.06	3.6±0.03
SY1	17.8±1.9	1.7±0.1

**Şekil 10:** Karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

Bu ortamda ATCC suşu için elde edilen değer MSM, Arpa A, Arpa B, Arpa C, Arpa D ve ayçiçeği ortamına göre istatistiki olarak anlamlı bulunurken ( $p=0,000$ ), karışım ortamı ile kefir, fındık ve balık ortamı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

SB1 suşu için karışım ortamında elde edilen değer fındık küspesi ve balık unu ile hazırlanan besi ortamında elde edilen değerlerden düşük, diğer ortamlarda elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur. Balık unu ortamında elde edilen değer istatistiki olarak karışım ortamında elde edilen değerden yüksek bulunurken ( $p=0,015$ ), oluşturulan diğer ortamlarla arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.



ST1 suşu için tüm ortamlar birlikte değerlendirildiğinde karışım ortamında elde edilen değer diğer 9 ortamdaki istatistik olarak anlamlı bir farkı olmadığı saptanmıştır.

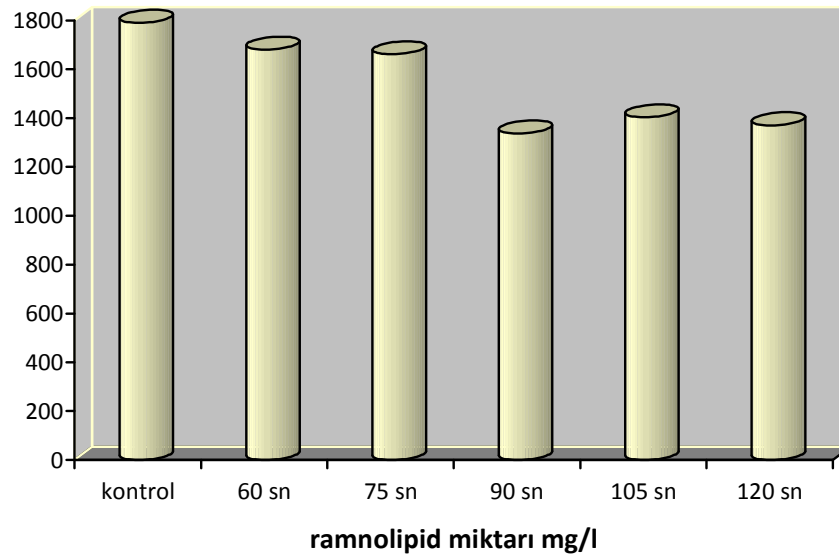
SY1 suşu için ise karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarı diğer tüm ortamlardan istatistik olarak anlamlı ( $p=0,000$ ) bulunmuştur.

### 3.2.8. UV Işınlınının Ramnolipid Üretimine Etkisi

UV ışınlarının ramnolipid üretimine etkisini araştırmak amacıyla *P.aeruginosa* ATCC 9027 standart suşunun Nutrient agara ekimleri yapılarak 2, 5, 10, 20 ve 30 dk. UV ışınlarına maruz bırakılmıştır. 37 °C de 72 saate kadar yapılan inkübasyon sonucu 2 dk.lık petri dışındaki petrilere üreme gözlenmediği için süreler 60, 75, 90, 105 ve 120 sn olarak yeniden düzenlenmiştir. Belirtilen sürelerde UV ışınlarına maruz bırakılan suşlar inkübasyona bırakılarak elde edilen kolonilerden Cetrimide agar, MCA ve TSA' ya ekimler yapılarak koloni morfolojileri incelenmiş, bir değişim gözlenmemiştir. Bu kolonilerden hazırlanan bakteri süspansiyonlarından MSM besiyerine yapılan ekimlerin 7 günlük inkübasyonu sonucu elde edilen ramnolipid miktarları Çizelge 17'de verilmiştir. Veriler istatistik olarak değerlendirildiğinde değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre UV ışınlarına maruz bırakmanın *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 suşunun ürettiği ramnolipid miktarını arttırmadığı hatta süre artışına bağlı ramnolipid üretiminde azalma gözlenmiştir.

**Çizelge 17:** ATCC 9027 suşunun UV ışınlarına maruziyeti sonrası yapılan üretimde elde edilen ramnolipid miktarları (mg/l)

Suş	Kontrol	60 sn	75 sn	90sn	105 sn	120 sn
ATCC 9027	1790	1680	1661	1337	1403	1370



**Şekil 11.** ATCC 9027 suşunun UV ışınlarına maruziyeti sonrası elde edilen ramnolipid miktarları

### 3.2.9. Ardışık İnkübasyonların Ramnolipid Üretimine Etkisi

Ardışık inkübasyonların üretime etkisini belirlemek amacıyla MSM besiyerine ekilerek orbital çalkalamalı inkübatörde 35°C de 150 rpm'de yedi günlük inkübasyona bırakılan suşlar, ramnolipid miktarının belirlenmesinin ardından pasajları yapılarak tekrar MSM besiyerinde yedi günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde ard arda dört kez 7'şer gün şeklinde tekrarlanan inkübasyon periyodu ve her 7 gün sonunda ramnolipid miktarının belirlenmesi şeklinde oluşturulan süreçte elde edilen ramnolipid miktarları Çizelge 18' de verilmiştir. Ancak elde edilen değerler göz önüne alındığında ardışık inkübasyon ile ramnolipid üretiminin artmadığı gözlenmiştir.

**Çizelge 18.** ATCC 9027 suşunda ardışık inkübasyonlar sonrası elde edilen ramnolipid miktarları (mg/)

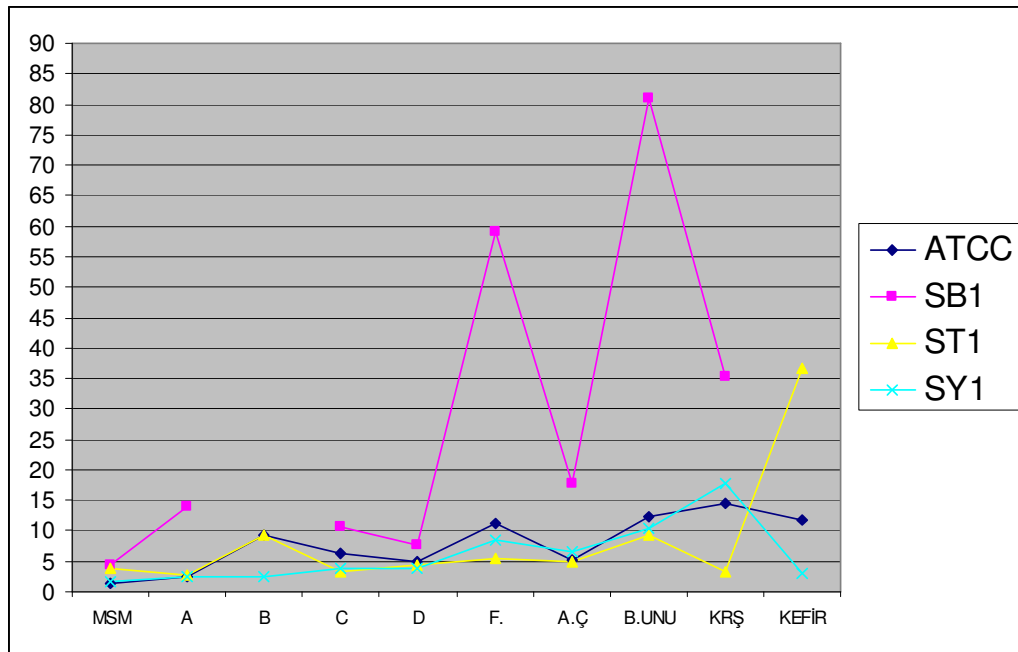
Bakteri	Birinci 7 gün	İkinci 7 gün	Üçüncü 7 gün	Dördüncü 7 gün
ATCC 9027	1462	1392	1402	1511

Ramnlipid verimini arttırmaya yönelik olarak oluşturduğumuz besi ortamlarında tüm suşlar için elde ettiğimiz sonuçlar Çizelge 19' da verilmiştir.

**Çizelge 19.** Tüm ortamlarda elde edilen ramnlipid miktarları (g/l)

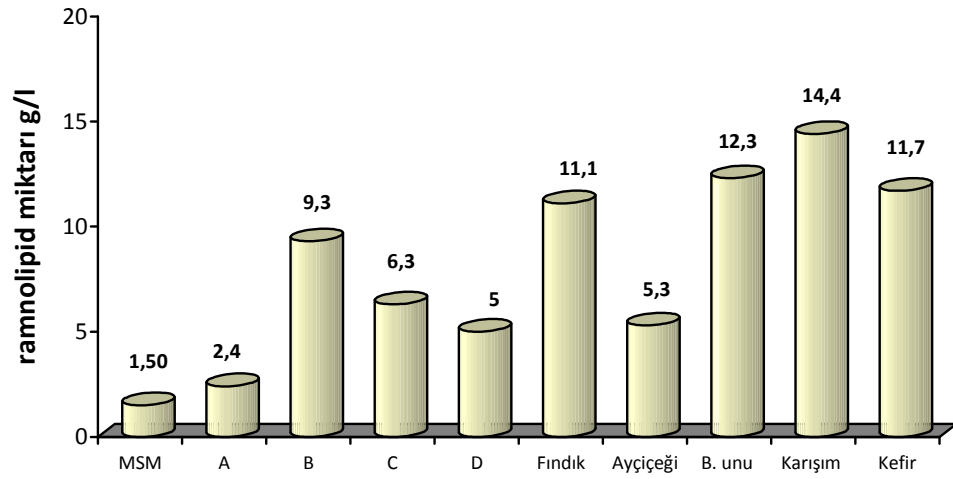
	MSM	A	B	C	D	F.	A.Ç	B.UNU	KRŞ	KEFİR
<b>ATCC</b>	1.5	2.4	9.3	6.3	5	11.1	5.3	12.3	14.4	11.7
<b>SB1</b>	4.6	13.9	-	10.8	7.6	59	17.7	81	35.3	-
<b>ST1</b>	3.6	2.6	9.2	3.4	4.3	5.4	5	9.3	3.3	36.6
<b>SY1</b>	1.7	2.4	2.5	3.7	3.7	8.5	6.7	10.3	17.9	3.1

A: Arpa temel besiyeri, B: A+gliserol, C: A+bira mayası, D: A+ NaNO<sub>3</sub> F: Fındık, Krş: Karışım



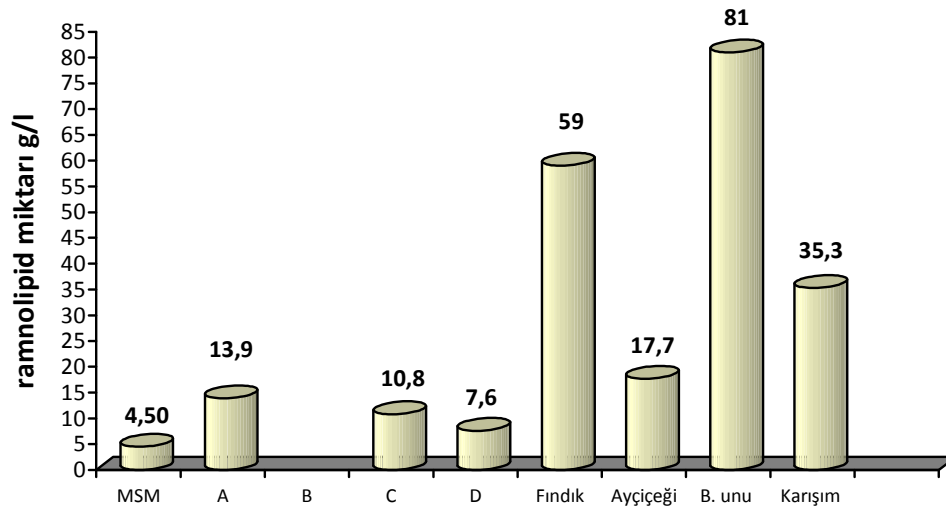
**Şekil 12.** Tüm ortamlarda elde edilen ramnlipid miktarlarının karşılaştırılması

Sonuçlar değerlendirildiğinde; ATCC suşu için kefir, balık unu, fındık küspesi ve karışım ortamları en iyi ortam olarak belirlenmiştir.



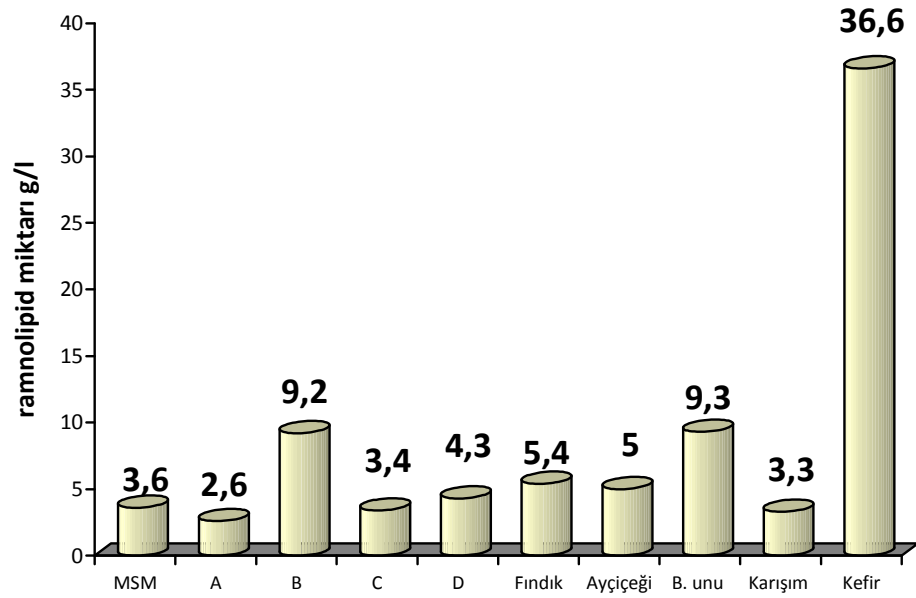
**Şekil 13.** ATCC 9027 suşunun oluşturulan tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

SB1 suşu için fındık küspesi ve balık unu ile hazırlanan besi ortamı en iyi ortamlar olarak belirlenmiştir. Bu ortamlarda elde edilen ramnolipid miktarındaki artış diğer ortamlara göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.



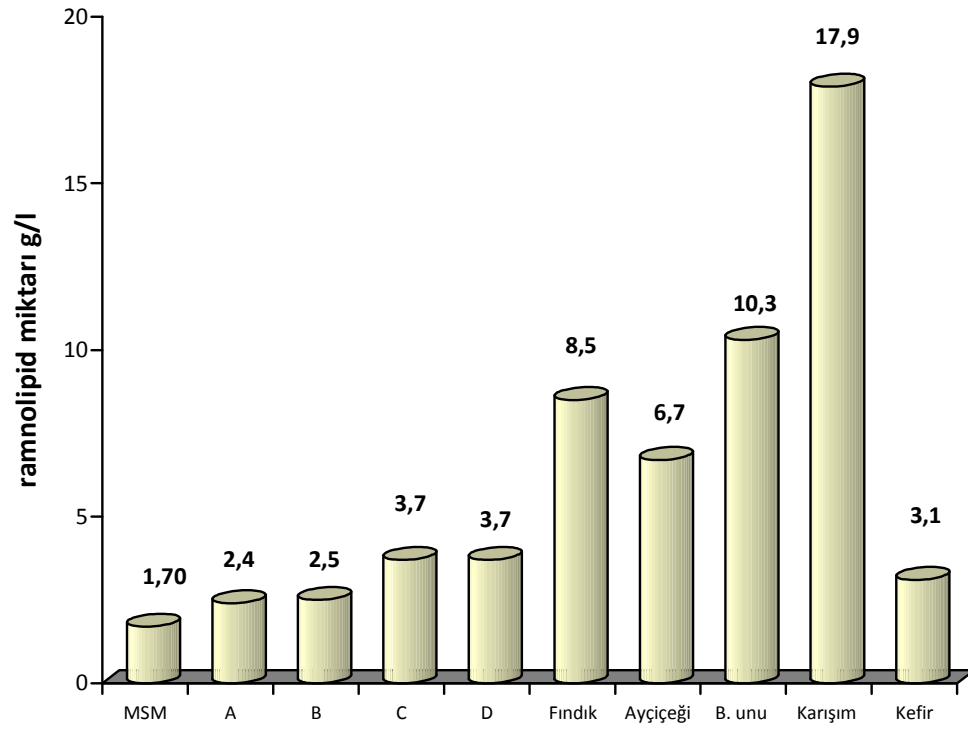
**Şekil 14.** SB1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

ST1 suşu için kefir ile hazırlanan besi ortamı en iyi ortam olarak belirlenmiştir. Bu ortamda elde edilen değer, diğer ortamlarda elde edilen değerlerden statistiki olarak anlamlıdır.



**Şekil 15.** ST1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

SY1 için karışım ortamı en iyi ortam olarak belirlenmiştir.



**Şekil 16.** SY1 suşunun tüm besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarlarının karşılaştırılması

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı kaynaklarından alınan su ve toprak örneklerinden izole edilen *Ps. aeruginosa* suşlarında, çeşitli fabrika atıkları ve farklı maddeler kullanılarak ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik besi ortamı geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Örnek alınacak bölgelerin seçiminde zeytinyağı fabrikası, balık yağı fabrikası, meyve suyu fabrikası, petrol kuyuları çevresi gibi yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş alanlar tercih edilerek ramnolipid üretimi iyi olabilecek suşların izole edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca hastane infeksiyonu etkeni *P.aeruginosa* suşlarının ramnolipid üretimi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar dikkate alınarak, iki adet hastane infeksiyonu etkeni suş çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma 13 *Ps. aeruginosa* suşu ve ATCC 9027 kontrol suşu olmak üzere toplam 14 suş ile yürütülmüştür.

Çalışmamızda mikroorganizmaların üretim koşulları belirlenirken en iyi verimi elde edebilmek amacıyla bugüne kadar yapılan çalışmalar değerlendirilmiştir.

Biyosüfaktan üretimini etkileyen faktörler arasında karbon kaynağı, nitrojen kaynağı gibi temel besin öğelerinin yanında pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, çalkalama hızı gibi kültür şartları da önemli yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalarda Guerra-Santos ve ark.ları (1984) *Pseudomonas sp.* için uygun pH aralığının 6-6.5 arasında olduğunu, Chen ve ark.ları (2007) ise 6,5 dan düşük ve 7.5 dan yüksek pH değerlerinde üretimin belirgin şekilde düştüğünü göstermişlerdir. George ve Jayachandran ise ramnolipid üretiminde pH 7' de en iyi verimi elde ettiklerini bildirmişlerdir (George ve Jayachandran,2012).

Kültür şartları içerisinde üretimi etkileyen bir diğer parametre ise uygun sıcaklıktır. Robert ve ark.ları (1989) *Ps. aeruginosa* 44T1 suşu ile glukoz kullanarak ramnolipid üretimini araştırdıkları çalışmalarında uygun sıcaklığı

37 °C, Panesar ve ark.ları (2011) ise *P.aeruginosa* MTCC 2297 için uygun sıcaklık aralığını 35-37°C olarak bildirmişlerdir.

Biyosürfaktan üretiminde oksijenlenmenin iyi bir şekilde sağlanabilmesi için çalkalama hızı ve şekli de verimi etkileyen önemli parametreler arasındadır. Yapılan çalışmalarda orbital çalkalamanın lateral çalkalamaya göre daha etkin olduğu gösterilmiştir. Önerilen çalkalama hızı 120–220 rpm arasında değişmekle birlikte birçok çalışmada 150 rpm tercih edilmiştir. (Sahoo ve ark.,2011).

Çalışmamız ise literatür verileri dikkate alınarak kültürler, pH' ı 6.5' e ayarlanan MSM besi ortamında 35 °C' de ve 150 rpm de 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen süre sonunda Mato ve Sandoval' ın yöntemi ile saflaştırılan ramnolipid, fenol sülfirik asit metoduyla spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Buna göre izole edilen 13 suş arasından en iyi üretim elde edilen SB1, ST1 ve SY1 suşlarının ramnolipid miktarları sırasıyla 4.6, 3.6, 1.7 g/l olarak belirlenmiştir. Besi ortamı geliştirme çalışmaları bu üç suş ve kontrol olarak ramnolipid ürettiği bilinen ATCC 9027 suşu (1.5 g/l) olmak üzere toplam dört suş ile yürütülmüştür.

Tüm üretim süreçlerinde olduğu gibi biyosürfaktan üretiminde de ham madde miktarı ve cinsi üretim maliyetini etkileyen önemli parametrelerdir. Bitkisel ve hayvansal yağlar ramnolipid üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılan önemli hammaddelerdir. Sim ve ark. (1997) bitkisel yağ karışımlarını (kanola yağı, soya yağı ve glukoz) *Ps. aeruginosa* UW-1 suşunda denemiş ve bitkisel yağlarda ramnolipid artışında, glukoz oranla 10-12 kat artış elde edildiğini bildirmişlerdir. Rahman ve ark.ları (2002) *Ps. aeruginosa* DS10-129 suşu ile soya yağı, aspir yağı kullanarak yaptıkları çalışmalarında, sırasıyla 4.31 ve 2.93 g/l ramnolipid elde etmişlerdir. Thaniyavarn ve ark.'ları (2006) ise *Ps. aeruginosa* A41 suşu ile zeytinyağı, palm yağı ve hindistancevizi yağında sırasıyla 6.58, 2.91, 2.93 g/l ramnolipid üretimi sağlamışlardır. Literatürlerde *P.aeruginosa*'nın hidrokarbonlar (Santa



Anna,2002) glukoz (Bodour ve ark,2003), mannitol (Deziel ve ark.1999) ve gliserol (Das ve ark.,2009) gibi farklı karbon kaynaklarında ramnolipid üretimini belirten çalışmalar da yer almaktadır.

Biyoteknoloji ve çevre teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak maliyeti düşürmek amacıyla endüstriyel atık maddelerden biyosüpfaktan üretilmesine ağırlık verilmiştir. Dünyada her sene milyonlarca ton atık oluşmaktadır. Bu atıklar için arıtma ve bertaraf maliyetleri büyük mali ve sanayi yük oluşturmaktadır (Makkar ve Cameotra, 2002). Atık maddelerin ham madde olarak çeşitli ürünlerin elde edilmesinde kullanılması, bu yükü azaltmak ve aynı zamanda atık ürünleri değerlendirerek elde edilmesi istenen ürünün üretim maliyetini düşürmek açısından önem arz etmektedir.

Pandey ve ark.ları (2000) soya fasulyesi, şeker pancarı, patates gibi ürünlerle, kahve endüstrilerinin atık maddeleri, meyve endüstrisinin atık maddeleri, yağ fabrikalarının atık maddeleri, mısır koçanı, çay atıkları ve buna benzer tarım ürünlerinin atık maddelerinin değerlendirilebilir atıklar olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar ve direkt ulaşılabilen karbon kaynakları dışında pekmez, peynir altı suyu, süt ya da içki fabrikası atıkları, yağ fabrikası atıkları, melas, petrol atıkları, kızartma yağları ve su ile karışabilir atıkların ucuz ham maddeler olup, mikroorganizmaların gelişmesi ve biyosüpfaktan üretiminde büyük bir potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir (Cameotra ve Makkar,1998; Makkar ve Cameotra 2002; Mukherjee ve ark.,2006). Ramnolipid üretimi ile ilgili ilk kez Mercade ve ark.'larının (1993) *Ps. aeruginosa* 47T2 suşu ile zeytinyağı fabrikası atıklarını karbon kaynağı olarak kullanarak ramnolipid elde etmesi, diğer lipofilik atıkların da ramnolipid üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir. Daha sonraları şeker fabrikası atığı melas, peyniraltısu gibi farklı atıkların da kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (Patel ve Desai, 1997; Rashedi ve ark.,2005; Raza ve ark.,2007). Nitschke ve ark.ları (2005) soya, pamuk, mısır

yağı atıklarını kullanarak *Ps. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmalarında, 11.7 g/l ramnolipid elde etmişler ve soya yağı çökeltisini en iyi atık madde olarak belirlemişlerdir.

Ülkemizde ise şeker fabrikası atığı melas, rakı fabrikası atığı cibri, peyniraltı atık suyu ramnolipid üretiminde kullanılan atıklardır. Sıdal ve ark.' ları (2001) zeytinyağı fabrikası atık suyu siyah likörü temel besiyeri olarak kullanarak *Ps. aeruginosa* suşu ile 0.875 g/l ramnolipid elde etmiştir. Bu çalışmada ayrıca farklı C ve N kaynaklarının üretime etkisi araştırılmış ve en yüksek verim mannitol ve gliserolde elde edilmiştir. En iyi azot kaynağı ise  $\text{NaNO}_3$  olarak tespit edilmiştir. Onbaşılı ve Aslım' ın (2011) *Pseudomonas* türleri ile yaptığı çalışmada şeker fabrikası atığı melas besi ortamı olarak kullanılmış ve 0,53 g/l ramnolipid elde edilmiştir. Kahyaoğlu ve Konar' ın (2006) melas kullanarak yaptıkları çalışmada ise 0.78 g/l ramnolipid elde edilmiştir

Atıkların biyosüfaktan üretiminde substrat olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar çeşitli ülkelerde halen devam etmektedir (Dubey,2012; Amani ve ark.2013).

*P.aeruginosa* suşlarında ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik olarak besi ortamı geliştirmeyi hedeflediğimiz çalışmamızda, direkt olarak yağları kullanmak yerine maliyeti düşürmek ve atıkları değerlendirmek amacıyla, bira ve yağ fabrikaları atık ürünleri tercih edilmiş ve besiyeri içeriği belirlenirken mikroorganizmaların üretimi için gerekli olan temel gruplar, makro ve mikro elementler dikkate alınmıştır.

Bu amaçla ilk olarak bira fabrikası atık ürünü olan arpa küspesi kullanılmıştır. Arpa küspesi; arpa, mısır, pirinç, şerbetçi otundan oluşmaktadır. Bira yapımı sırasında kullanılan arpanın kapsadığı eriyebilir karbonhidratların hemen tamamı fermente olarak alkol ve karbondioksite dönüşmekte, diğer besin maddeleri ise yaklaşık üç katı yoğunlaşarak posada

kalmaktadır. Bu nedenle arpa posasının protein kapsamı, arpanın kendisinin protein kapsamının üç katına ulaşmaktadır. Arpa posasının kuru maddesinin %28 civarında ham protein kapsadığı, bu miktarın buğday kepeğinden çok fazla, mısır glutenine ise eşit olduğu belirtilmektedir. Arpa posasının selenyum kaynağı olduğu, kalsiyum ve fosfor kapsamının da arpanın üç katı olduğu belirtilmektedir(Arpa Gıda,2013). Yüksek protein içeriği ve ucuz maliyeti nedeniyle çalışmamıza dahil edilmiştir.

Arpa küspesi kullanılarak dört farklı besi ortamı oluşturulmuştur. Öncelikle arpa küspesi süzüntüsü, NaCl ve eser element çözeltisinden oluşan temel besi ortamı (A) hazırlanmıştır. Bu ortamda elde edilen değerler ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşu için sırasıyla 2.4, 13.9, 2.6, 2.4 g/l olarak belirlenmiştir. ST1 suşu dışındaki suşlarda MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarlarından daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Arpa küspesi ile hazırlanan temel besi ortamına çeşitli maddelerin ilavesi ile yeni ortamlar oluşturulmuştur. Gliserolün mikroorganizmaların ve metabolitlerin üretiminde iyi bir karbon kaynağı olduğu bilinmektedir. Zhang ve ark.ları (2005) temel besi ortamı olarak MSM' ye %3 oranında farklı karbon kaynakları ekleyerek oluşturdukları besi ortamlarında ramnolipid üretimini incelemişler ve ramnolipid miktarlarını glukoz ortamında 0.45, gliserolle 12.92, parafinle 8.05 ve bitkisel yağ ilave edildiğinde ise 10.77 g/l olarak tespit etmişlerdir. Da Silva ve ark.ları (2009) gliserol ilave ederek hazırladıkları farklı bir temel besiyerinde *Ps. aeruginosa* UCP0992 suşu ile 96 saatin sonunda 8 g/l ramnolipid elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu noktadan hareketle temel besi ortamına gliserol ilavesi ile yeni bir besi ortamı oluşturulmuş (B) ve suşların ramnolipid miktarları incelenmiştir. Bu ortamda elde edilen değerler ATCC, ST1 ve SY1 suşu için sırasıyla 9.3, 9.2, 2.5 g/l olarak belirlenmiştir.

*P.aeruginosa* suşlarının pigment üretim düzeyleri birbirinden farklıdır ve özellikle gliserollü ortamda daha fazla pigment üretimi gösterdikleri

bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız SB1 suşu yüksek piyosiyanın üretimine sahip bir suştur ve özellikle gliserol ilaveli B ortamında daha fazla pigment üretimi göstermiştir. Ramnolipidin kloroform-metanol kullanılarak saflaştırılması esnasında piyosiyanınin de kloroforma geçmesi fenol sülfürik asit yöntemi ile yaptığımız spektrofotometrik ölçümü olumsuz yönde etkilemektedir. Literatürlerde pyosiyanın üretiminin 3 günden sonra daha yüksek seviyelere ulaştığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Onbaşılı, 2006). Bu noktadan hareketle piyosiyanın üretimini sınırlamak ve daha güvenilir bir sonuç elde etmek amacıyla, B ortamı için SB1 suşu 7 gün yerine 3 gün inkübe edilerek çalışma tekrarlanmıştır. İnkübasyon sonucu elde edilen ramnolipid miktarı 95.8 g/l olarak bulunmuştur. Yine de çok yüksek değerler bulunması nedeniyle SB1 suşu sonuçları değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Ballot (2009) da çalışmasında fenol sülfürik asit yönteminin özellikle yüksek piyosiyanın üretimine sahip suşlarda daha abartılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bu çalışmayı destekler niteliktedir. SB1 suşunun yüksek ramnolipid ürettiği görülmektedir, ancak yüksek piyosiyanın üreten suşlar için farklı bir ölçüm yöntemi uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Temel besi ortamına (A) bira mayası ilave edilerek üçüncü ortam (C) hazırlanmıştır. Maya ekstraktı (maya özütü = yeast extract) parçalanmış bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Özellikle yüksek B kompleksi vitamin konsantrasyonu nedeniyle, çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar. Bileşimindeki amino asitler, peptidler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller sayesinde pek çok mikrobiyolojik çalışmada kullanılmaktadır (Difco,2009). Bira mayası ilave edilerek hazırlanan C ortamında ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşu için elde edilen ramnolipid miktarları sırasıyla 6.3, 10.8, 3.4, 3.7 g/l olarak belirlenmiştir. Wu ve ark.ları (2008) *Ps. aeruginosa* EM1 suşu ile yaptıkları çalışmalarında, farklı bir MSM besiyerine 10 g/l yeast extract eklemişler ve 2.24 g/l ramnolipid elde etmişlerdir.

Karbon kaynağının yanı sıra, nitrojen kaynağının da ramnolipid üretimine etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Robert ve ark.larının (1989) *Pseudomonas* 44T1 ile yaptıkları çalışmada biyosürfaktan üretiminde en uygun azot kaynağının nitrat olduğu belirtilmiştir. Santa Anna ve ark.'larının (2002) yaptığı çalışmada ise petrol atıklarından izole edilen *P.aeruginosa* PA1'in ramnolipid üretiminde en uygun nitrojen kaynakları olarak  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  kullanılmış ve sonuçta maksimum ürünün (3.16 g/L) sodyum nitratlı ortamda elde edildiği görülmüştür. Wu ve ark.larının çalışmasında (2008) ise *Ps. aeruginosa* EM1 suşu ile sodyum nitratlı ortamda 8.6 g/l ramnolipid üretimi elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda literatürler dikkate alınarak arpa küspesi ile oluşturduğumuz temel besi ortamına üretimi arttırmak amacıyla  $\text{NaNO}_3$  ilavesiyle dördüncü ortam (D) hazırlanmıştır. Bu ortamda elde edilen ramnolipid miktarları ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşu için sırasıyla 5, 7.6, 4.3, 3.7 g/l olarak belirlenmiştir. Tüm suşlarda temel besi ortamına kıyasla D ortamında ramnolipid miktarlarının arttığı gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarımız Wu ve ark.ları (2008) Santa Anna ve ark.larının (2002) çalışmaları ile paralellik göstermekte,  $\text{NaNO}_3$  ilavesi ile ramnolipid miktarlarında artış gözlenmektedir.

Arpa küspesi ile hazırlanan bu dört ortamın verilerinin istatistiki analizi yapıldığında ATCC suşu için B ve C ortamında elde edilen değerler MSM ortamına göre anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

SB1 suşu için A ve C ortamında elde edilen değerler ile D ortamında elde edilen değer arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

ST1 suşu için B ve D ortamında elde edilen ramnolipid miktarları MSM ortamına göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak sadece B ortamında elde edilen değer istatistiki olarak anlamlıdır ( $p=0.000$ ). A, C ve D ortamında elde edilen ramnolipid miktarları ile MSM ortamında elde edilen miktarlar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

SY1 suşu MSM ile kıyaslandığında C ve D ortamlarında elde edilen değerler istatistiki olarak anlamlıdır.

Arpa küspesi kullanılarak oluşturulan ortamlarda elde edilen sonuçlar, arpa küspesinin ramnolipid üretiminde kullanılabilir ucuz bir hammadde olduğu ve özellikle C ve N kaynakları ile zenginleştirildiğinde daha iyi bir verim elde edildiğini göstermektedir. Literatürlerde arpa küspesi ile ramnolipid üretimi üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız başka bir çalışma ile kıyaslanamamıştır.

Besi ortamı geliştirmeye yönelik olarak yürüttüğümüz çalışmamızda kullandığımız bir diğer ham madde fındık küspesi olmuştur. Yıllık ortalama 500.000 ton üretim miktarına sahip olduğumuz fındıktan yan ürün olarak fındık küspesi elde edilmektedir. Türkiye, dünya fındık üretimi ve ihracatında birinci sırada yer alarak dünya üretiminin % 80'ini, dünya ihracatının ise yaklaşık % 70'ini gerçekleştirmektedir. Genellikle üretim fazlası, dış satım olanakları bulunmayan ve pazara arz edilecek kalitede olmayan fındıkların yağı çıkarılarak işlenmesiyle fındık küspesi elde edilir. Bu atık proteince zengin (yaklaşık %40) selülozca fakir olup (yaklaşık %9) değerli bir protein kaynağıdır. Fındık küspesinin aminoasit bileşenleri incelendiğinde lizin (%0.99) ve metiyonin (%0.15) gibi bazı amino asitler yönünden fakir olmasına rağmen arginin (%4.53), lösin (%2.77) ve izolösin (%2.82) bakımından zengin bir yapı gösterdiği % 0.27 kalsiyum ve % 0.94 fosfor içerdiği belirlenmiştir (Doğan ve Bircan,2010). Çalışmamızda kullandığımız küspe %44-46 oranında protein ve %1.5-2 oranında yağ içermektedir.

Fındık küspesi süzüntüsüne NaCl ve eser element çözeltisi ilave edilerek hazırladığımız besi ortamında üretim sonucu elde edilen ürün miktarı ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşları için sırasıyla 11.1, 59, 5.3, 8.5 g/l olarak belirlenmiştir. Tüm suşlar için elde edilen ramnolipid miktarlarındaki artış MSM' ye kıyasla istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (ATCC p= 0,003, SB1

$p=0,00$ , ST1  $p=0,035$ , SY1  $p=0,003$ ). Literatür taramalarında fındık küspesi kullanılarak ramnolipid üretimi ile ilgili çalışmaya rastlanmamış ancak fındık yağı ile yapılmış tek bir çalışma bulunmuştur. Costa ve ark.ları (2006) MSM' ye Brezilya fındığı yağı (%2) ilave ederek hazırladıkları besiyerinde *Ps. aeruginosa* LBI suşu ile 9.9 g/l ramnolipid elde etmişlerdir. Fındık küspesi ile elde ettiğimiz miktarlar göz önüne alındığında fındık yağına oranla düşük maliyeti fındık küspesinin daha uygun bir hammadde olduğunu göstermektedir.

Ülkemizde en fazla üretimi olan küspelerden birisi de ayçiçeği küspesidir. Ayçiçeği küspesi, ayçiçeği yağlı tohumlarından yağın alınmasından sonra geriye kalan kısımlarıdır. Piyasada iki tip ayçiçeği küspesi bulunmaktadır. Bunlardan birisi, % 2-3 yağ içeren düşük ham proteinli buna karşılık fazla kabuklu olmaları sebebiyle ham selüloz içeriği yüksek olan kabuk karıştırılmış küspelerdir. Diğer küspe türü ise, kabuk oranı düşük olan küspelerdir. Bu tip küspelerde yağ oranı %1.5' i geçmemektedir. Ayrıca protein oranı da kabuk içerene göre daha fazladır (Tosun,2003). Bizim kullandığımız ayçiçeği küspesinin protein içeriği %28-30, yağ oranı %0.55-0.75 civarındadır.

Ayçiçeği küspesi kullanarak oluşturulan besi ortamında tüm suşlar için elde edilen ramnolipid miktarları MSM' de elde edilen miktarlardan yüksek bulunmuş, ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşları için sırasıyla 5.3, 17.7, 5, 6.7 g/l olarak belirlenmiştir. Ayçiçeği küspesi içeren ortamda elde edilen miktarlar MSM' ye oranla yüksek olsa da fındık küspesi ile oluşturulan ortamda elde edilen değerlerden daha düşük olması ayçiçeği küspesinin yağ oranı ile ilişkilendirilebilir. Literatürlerde yapılan taramalarda ayçiçeği küspesinin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Haba ve ark. (2000) basal medium' a %2-4 oranında atık kızartma yağı (zeytin yağı ve ayçiçeği yağı ) ilave ederek hazırladıkları besi ortamında *Ps. aeruginosa* 47T2 NCIB 400044 suşu ile 2.7 g/l ramnolipid elde etmişlerdir. Rikaloviç ve ark. ları (2013) ise *Ps. aeruginosa* NCAIM(P) B001380 suşu ile ayçiçeği yağı kullanarak

yaptıkları çalışmalarında 0.43 g/l, atık kızartma yağı (ayçiçeği yağı) ile 1.30 g/l ramnolipid elde etmişlerdir.

Arpa, fındık ve ayçiçeği küspesine ek olarak üretime etkisini araştırdığımız diğer atık ürün balık unudur. Balık unu, protein kalitesi iyi, mineral ve aminoasit yönünden zengin önemli bir protein kaynağıdır. Taze balık ve deniz ürünlerinden ya da işlenmeden atılan balık atıklarından elde edilen, önemli bir amino asid ve vitamin kaynağıdır. Balık unu elde etmek için kullanılan hammaddeler kurutularak değirmenden geçirilmekte ve yağı alındıktan sonra yem sanayisi içerisinde kullanılmaktadır.

Balık unu ile hazırladığımız besi ortamında elde edilen ramnolipid miktarları ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşları için sırasıyla 12.3, 81, 9.3, 10.3 g/l olarak belirlenmiştir. Literatürlerde balık unu ile yapılmış çalışmalar bulunmamaktadır ancak Lee ve ark. ları (2004) *Ps. aeruginosa* BYK-2 KCTC suşu ile yaptıkları çalışmada karbon kaynağı olarak balık yağını (25g/l) kullanarak 17 g/l ramnolipid elde etmişlerdir. Piriato ve ark.ları (2008) temel besiyerine soya yağı (40g/l) ve balık yağı(40g/l) ilave ederek yaptıkları çalışmada soya yağı ile 0.94 g/l, balık yağı ile daha az ramnoz elde etmiş, soya yağının balık yağından daha iyi bir karbon kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda MSM' ye kıyasla tüm suşlar için balık unu ortamında elde edilen ramnolipid miktarları istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Balık unu ile elde edilen ramnolipid miktarları göz önüne alındığında düşük maliyeti ve yüksek verimi üretim için uygun bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Farklı atıklar kullanılarak oluşturduğumuz besi ortamlarında elde edilen değerlerin yüksek olması bu ortamların hazırlanmasında kullanılan atıkların karışımıyla farklı bir besiyeri oluşturma fikrini doğurmuştur. Hazırlanan yeni besiyerinde kullanılacak atıklar seçilirken üretim verimleri esas alınarak fındık küspesi, arpa küspesi ve balık unu kullanılmıştır. Oranların belirlenmesinde ise içerikleri ve maliyetleri esas alınmış, 2 birim



fındık küspesi, 1 birim arpa küspesi ve 1 birim balık unu süzütüsü kullanılmıştır. Küspe süzütülerine fosfat tamponu, NaCl ve eser element çözeltisi ilave edilerek hazırlanan besi ortamında ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşları için elde edilen ramnolipid miktarları sırasıyla 14.4, 35.3, 3.3, 17.9 g/l olarak belirlenmiştir. Sonuçlar tüm suşlar için MSM besiyerinde elde edilen miktarlardan daha yüksek bulunmuştur.

Karışım ortamında elde edilen ramnolipid miktarları, bu ortamın bileşiminde yer alan arpa küspesi, fındık küspesi ve balık unu ile hazırlanan besi ortamlarında elde edilen miktarlarla da karşılaştırılmış ve ATCC suşu için en yüksek ramnolipid miktarı karışım ortamında elde edilmiştir. SB1 suşu fındık ve balık unu ortamında daha yüksek ramnolipid üretirken, karışım ortamında elde edilen değer, ayçiçeği küspesi ile hazırlanan ortamdaki yüksek bulunmuştur. ST1 suşu için karışım ortamında ramnolipid miktarında artış gözlenmemiştir. SY1 suşu ise en iyi verimi karışım ortamında göstermiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ATCC suşu için karışım ortamında elde edilen değerler ile fındık küspesi ve balık unu kullanılarak hazırlanan besi ortamında elde edilen değerler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamış, ancak arpa ve ayçiçeği küspesi ile oluşturulan besi ortamlarında elde edilen değerlerden istatistiki olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0,000$ ). SB1 suşu için balık unu ortamında elde edilen ramnolipid miktarı, karışım ortamında elde edilen miktardan istatistiki olarak yüksek bulunurken ( $p=0.015$ ) diğer ortamlarla karışım ortamı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ST1 suşu için karışım ortamında elde edilen değerler ile diğer ortamlar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, SY1 suşu için karışım ortamında elde edilen değerler diğer tüm ortamlarda elde edilen değerlerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,000$ ).

Elde edilen atık ürünlere ek olarak ramnolipid üretimine etkisini araştırdığımız bir diğer ürün kefirdir. Kefir içerisinde bulunan çözünmüş organik maddeler,

özellikle proteinler, laktoz ve yağ mikroorganizmaların gelişmesi için iyi bir ortam oluşturmaktadır. Literatürde kefir kullanılarak yapılan ramnolipid üretimi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak yine protein, laktoz ve yağ açısından zengin süt fabrikası atığı olan peyniraltı suyu ile yurt dışında ve Türkiye’de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Dubey ve Juwarkar (2004) *P.aeruginosa* BS2 suşu ile yaptıkları çalışmada peyniraltı suyunda 0.92 g/l ramnolipid elde ederken, Kahyaoğlu ve Konar (2008) *P.aeruginosa* DSM 50071 suşu ile 0.48g/l ramnolipid elde etmişlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen ramnolipid miktarları aynı suşların temel besiyerindeki miktarları ile kıyaslanmamış, sadece peyniraltı suyunun ramnolipid üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde farklı suşlarla yapılan iki çalışmada da elde edilen miktarlar kefir süzütüsü ile oluşturduğumuz besi ortamında elde ettiğimiz miktarlara göre çok düşüktür. Bizim çalışmamızda elde edilen miktarlar ATCC, ST1, SY1 ve H1 suşları için sırasıyla 11.7, 36.5, 3.2 ve 10.8 g/l şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda suşların ramnolipid üretimi MSM ortamı ile kıyaslanmış ve kefir süzütüsü ile oluşturduğumuz ortamda çok daha yüksek değerler elde edilmiştir. Kefir içeriğinin peyniraltı suyuna göre daha zengin olması ve daha yüksek miktarlarda yağ içermesinin sonuçlarda etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Kefir ortamında diğer ortamlardan farklı olarak MSM ortamında ramnolipid üretim verimi yüksek olmayan bir suş daha çalışmaya dahil edilmiştir. MSM besiyerinde ramnolipid miktarı 1 g/l olarak tespit edilen H1 suşunun kefir içeren ortamda ramnolipid miktarı ise 10.8 g/l bulunmuştur. SY1 suşunun MSM deki miktarı (1.7 g/l) H1 suşuna göre yüksek olmasına karşın kefir içeren ortamdaki miktarı oldukça düşüktür. H1 suşunun ramnolipid üretimindeki artış SY1 suşuna oranla istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Bu durum bize her suşun her ortama verdiği cevabın birbirinden farklı olabileceğini ve ramnolipid üretiminde suş seçiminin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Ramnolipid üretimini arttırmak amacıyla oluşturan besi ortamlarının yanı sıra ardışık inkübasyon ve UV ışınları gibi bazı parametrelerin üretime etkisi de

araştırılmıştır. Ardışık inkübasyonun üretime etkisini araştırmak amacıyla 7 günlük inkübasyon sonucu ramnolipid miktarları belirlenen suşlar taze pasajları yapılarak tekrar 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem ard arda dört kez tekrarlanmıştır ve her yedi günlük periyod sonrası ramnolipid miktarları ölçülmüştür. Buna göre; ATCC 9027 suşu ile yapılan ölçümlerde sırasıyla 1462, 1392, 1402, 1511 mg/l ramnolipid elde edilmiştir. Miktarlar arasında anlamlı bir fark olmadığı, ardışık inkübasyonun ramnolipid üretimini arttırmada etkili olmadığı gözlemlenmiştir.

UV ışınlarının ramnolipid üretimine etkisini araştırmak amacıyla petrilere ekimleri yapılan *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 suşu 60, 75, 90, 105 ve 120 sn UV ışınlarına maruz bırakılmış ve süre sonunda elde edilen kolonilerden MSM besiyerine ekimler yapılarak çalkalamalı inkübatörde gelişmeleri sağlanmıştır. 7 günlük inkübasyon sonucu elde edilen ramnolipid değerleri arasında anlamlı bir farka rastlanmamış ve UV ışınlarına maruz kalmanın ramnolipid üretimini arttırmadığı gözlenmiştir.

*Ps. aeruginosa* suşlarında ramnolipid üretimini arttırmak amacıyla arpa küspesi, bira mayası, fındık küspesi, ayçiçeği küspesi, kefir ve balık unu kullanarak hazırlanan besi ortamlarında elde ettiğimiz sonuçlar, bu maddelerin ramnolipid üretiminde kullanılabilecek önemli hammaddeler olabileceğini göstermektedir. Literatürlerde *Ps. aeruginosa* suşlarında ramnolipid üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde bu maddelerin daha önce kullanılmamış olması nedeniyle yaptığımız çalışmanın bundan sonra yapılacak çalışmalar için kaynak teşkil edeceği düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada farklı kaynaklardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik besi ortamı geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla arpa küspesi, ayçiçeği küspesi, fındık küspesi, balık unu ve kefir kullanılarak farklı besi ortamları hazırlanmış ve elde edilen ramnolipid miktarları ölçülmüştür. Ayrıca ardışık inkübasyonun ve UV ışınlarına maruziyetin ramnolipid üretimine etkisi araştırılmıştır.

Buna göre; arpa küspesi, fındık küspesi, ayçiçeği küspesi, balık unu ve tüm bu atıkların bileşiminden oluşan karışım ortamında elde edilen değerler incelendiğinde, ATCC suşu için en yüksek verim karışım ortamında elde edilirken, karışım ortamı ile kefir, fındık küspesi ve balık unu ortamı arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

SB1 suşu için; fındık ve balık ortamı en iyi ortam olarak belirlenmiştir. MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarı ile kıyaslandığında fındık küspesi ( $p=0.008$ ) ve balık unu ( $p=0.001$ ) ile hazırlanan ortamlarda elde edilen ramnolipid miktarlarındaki artış oluşturduğumuz diğer ortamlarda elde edilen ramnolipid miktarlarından istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

ST1 suşu için oluşturulan besi ortamlarında en yüksek verim kefir ile elde edilirken ( $p=0.000$ ) diğer ortamlarda elde edilen ramnolipid miktarları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

SY1 suşu için karışım ortamında elde edilen değerler diğer tüm ortamlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0.000$ ).

Ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik olarak hazırlanan besi ortamlarına ilaveten, bakteri kolonilerinin UV ışınlarına maruziyeti ve MSM besiyerinde yedi günlük sürelerle dört kez tekrarlanan ardışık inkübasyonun

üretim etkisi araştırılmıştır. Belirli sürelerde UV ışınlarına maruz bırakılan *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 suşunun MSM besiyerinde inkübasyonu sonucu elde edilen ramnolipid üretiminde artış gözlenmemiştir. Aynı şekilde ardışık inkübasyona bırakılan ve her yedi günlük inkübasyon sonucu ramnolipid miktarları belirlenen ATCC 9027 suşunun ramnolipid üretimleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen ramnolipid miktarları literatürde yer alan çalışmalarla kıyaslandığında özellikle ayçiçeği küspesi, fındık küspesi ve balık unu ile hazırladığımız besi ortamlarında elde ettiğimiz miktarlar, diğer çalışmalarda aynı maddelerin yağları ilave edilerek hazırlanan besi ortamlarında elde edilen miktarlardan çok yüksek bulunmuştur. Bu nedenle düşük maliyeti göz önünde bulundurularak kullandığımız küspelerin ramnolipid üretiminde kullanılabilecek önemli kaynaklar olduğunu düşünmekteyiz. Ülkemizin dünya fındık üretimi ve ihracatında ilk sırada yer aldığı düşünüldüğünde özellikle fındık küspesi ile elde edilen sonuçların yüksek olması büyük önem taşımaktadır.

## ÖZET

### Farklı Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Ramnolipid Üretimi Üzerine Çalışmalar

Biyosümfaktanların sümfaktanlar karşısında sahip olduğu avantajlar biyosümfaktanlara olan ilgiyi arttırmıştır. Ancak sümfaktanların maliyetinin daha düşük olması biyosümfaktanların kullanım alanını sınırlamaktadır. Bu nedenle düşük maliyetle ucuz materyallerden biyosümfaktan elde edilebilmesi ve iyi üretim verimine sahip suşlar izole edilebilmesi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada Türkiye' nin farklı noktalarından alınan su ve toprak örneklerinden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında ramnolipid üretimini arttırmaya yönelik besi ortamı geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla izolatların ramnolipid üretimleri MSM besiyerinde sağlanmış, elde edilen ramnolipid saflaştırılarak miktar tayini fenol sülfürik asit metoduyla kolorimetrik olarak yapılmıştır ve en yüksek verim elde edilen 3 suş ve ATCC 9027 suşu besi ortamı geliştirme çalışmalarına dahil edilmiştir. MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarları ATCC, SB1, ST1 ve SY1 suşları için sırasıyla, 1.5, 4.6, 3.6, 1.7 g/l olarak belirlenmiştir. Arpa küspesi, ayçiçeği küspesi, fındık küspesi, balık unu ve kefir kullanılarak besi ortamları oluşturulmuş, oluşturulan tüm ortamlarda elde edilen değerler MSM ortamına kıyasla yüksek bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, ATCC suşu için en iyi besi ortamı küspelerin bileşiminden oluşan karışım (14.4 g/l), kefir (11.7 g/l) , fındık küspesi (11.1 g/l) ve balık unu (12.3 g/l) ortamı olarak belirlenmiş, SB1 suşu için fındık küspesi (59 g/l) ve balık unu ortamları (81 g/l), ST1 suşu için kefir (36.6 g/l), SY1 suşu için karışım ortamı (17.9 g/l) en iyi besi ortamları olarak belirlenmiştir.

Besi ortamı geliştirme çalışmalarına ek olarak UV ışınlarına maruziyet ve ardışık inkübasyon olmak üzere iki farklı parametrenin ramnolipid üretimine etkisi araştırılmıştır. UV ışınlarına maruz bırakılan kolonilerden yapılan ekimler sonucu MSM besiyerinde elde edilen ramnolipid miktarları ile UV ışınlarına maruz bırakılmayan kontrol suşundan yapılan ekimler sonucu elde edilen miktarlar arasında farka rastlanmamıştır. Aynı şekilde ardışık olarak dört kez 7'şer gün süreyle inkübasyona bırakılan ve her yedi günlük inkübasyon sonunda ramnolipid miktarları belirlenen ATCC 9027 suşunun her periyod sonrası elde edilen ramnolipid miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Oluşturulan besi ortamlarında elde edilen ramnolipid miktarları dikkate alındığında daha ucuz maliyetle ve yüksek miktarlarda ramnolipid eldesi açısından arpa, ayçiçeği ve fındık küspesi ile balık ununun ramnolipid üretiminde önemli kaynaklar olabileceği görülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Atık materyal, biyosümfaktan, *P.aeruginosa*, ramnolipid

## SUMMARY

### **A Study on Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Different Resources**

The advantages of biosurfactants unlike surfactants, have increased the interest to biosurfactants. However, lower cost of surfactant limits the application of biosurfactant. Therefore, the study focused on biosurfactant obtaining from inexpensive materials with low cost and isolation of good biosurfactant-producing strains.

In this study, development researches of medium were carried out to increase the production of rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from water and soil in the different region of the Turkey. For this purpose rhamnolipid production of isolates provided in MSM medium and rhamnolipid amount produced by isolates were quantified by phenol-sulfuric acid method. Three strains and ATCC 9027, which produced highest amount rhamnolipid, were included the medium development study. The rhamnolipid amounts of ATCC, SB1, ST1, SY1 strains were determined as 1.5, 4.6, 3.6, 1.7 g/l respectively in MSM medium. Different mediums created using barley pulp, sunflower pulp, hazelnut pulp, fish flour and kefir, in all these media rhamnolipid amounts were determined higher compared to MSM. The results were statistically analyzed, Mixture medium, containing the pulps (14.4 g/l), hazelnut pulp (11.1 g/l), fish flour (12.3 g/l), kefir (11.7 g/l) are for ATCC 9027 strain, Hazelnut pulp (59 g/l) and fish flour (81 g/l) are for SB1, Kefir (36.6 g/l) is for ST1 and mixture medium is for SY1 (17.9 g/l) are determined as the best medium.

Additionally to study on the development of medium, effects on rhamnolipid production of two different parameters, exposure to UV radiation and successive incubation are investigated. There is no differences between rhamnolipid amounts obtained after culturing from colonies exposed to UV radiation and control strains not exposed to UV radiation. ATCC 9027 strain incubated for a period of four consecutive 7 days and rhamnolipid quantities detected after every seven days incubation, Likewise there is no meaningful differences between the amounts of rhamnolipid obtained after each period.

Rhamnolipid amounts obtained in our created medium are take into consideration, barley, sunflower, hazelnut pulps and fish flour can seen important sources for cheaper cost and in large quantities of rhamnolipid production.

**Key words:** Biosurfactant, *P.aeruginosa*, , rhamnolipid, waste material

## KAYNAKLAR

- ABALOS, A., PINAZO, A., INFANTE, M.R., CASALS, M., GARCIA, F., MANRESA, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. **17**:1367–1371
- AKMAN, M., GÜLMEZOĞLU, E. (1980). Tıbbi Mikrobiyoloji. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 3. Baskı. s:356
- AMANI, H., MÜLER, M.M., SYLDATK, C. HAUSMANN R. (2013). Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. *Appl Biochem Biotechnol* **170**:1080–1093
- ARPA GIDA (2013). Arpa posası. Erişim: [www.arpa.com.tr](http://www.arpa.com.tr). Erişim tarihi: 03.05.2013
- ARAJI, L., RAJA, R.N.Z., RAHMAN, A., BASRI, M., SALLEH, A.B. (2007). Microbial surfactant. *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. **15(3)**: 99-105
- AZMA, B. D. (2002). Extraction of copper from minning residues by rhamnolipids, Master Thesis, Concordia University, Montreal, Quebec, Canada
- BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ (2013). Sıvı-gaz ve sıvı-sıvı ara yüzeyleri Erişim:[http://w3.balikesir.edu.tr/~ruhan/html/kimya/yuzey\\_gerilimi.doc](http://w3.balikesir.edu.tr/~ruhan/html/kimya/yuzey_gerilimi.doc). Erişim tarihi: 04.05.2013
- BALLOT, F.(2009). Bacterial production of antimicrobial biosurfactants. Master of Science in Engineering. In the Department of Process Engineering at the University of Stellenbosch.
- BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M.G., FRACCHIA, L., SMYTH T.J., MARCHANT, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **87(2)**: 427-444
- BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 495-508
- BANAT, I.M., SAMARATH, N., MURAD, M., HORNE, R., BANERJEE, S. (1991) Biosurfactant production and use in oil tank clean up. *World J Microbiol Biotechnol* **7**: 80-84
- BENINCASA, M., ABOLOS, A., OLIVEIRA, I., MANRESA, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **85**:1-8
- BERGSTROM, S., THEORELL, H., DAVIDE, H. (1946). On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*. pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. *Arkiv Chem Mineral Geol*. **23A(13)**:1–12.



- BERKİTEN, R. (2005). Fakültatif anaerop Gram negatif çomaklar. Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Baskı. Bozkaya E. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri. s:78-80
- BIOTEK (2012). Misel oluşumu. Erişim:<http://blog.biotek.com/2012/10/determination-of-critical-micelle.html>. Erişim tarihi: 08.07.2013
- BİLGEHAN, H. (2000). Non-fermantatif Gram olumsuz bakteriler. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Ed.: BİLGEHAN H., Barış Yayınları, İzmir, s: 175
- BLONDEL-HILL, E., HENRY, D.A., SPEERT, D.P. (2009). Çev. ŞENER, B. Pseudomonas. In: Manual of Clinical Microbiology. (Klinik Mikrobiyoloji) Ed.: Murray, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., LANDRY, M.L., PFALLER, M.A. ASM Pres. Çev. Ed. Başustaoğlu, A. Washington, D.C. p: 734-743
- BODOUR, A.A., DREES, K.P., MAIER, R. M., (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol* **69(6)**: 3280–3287
- BOGNOLO, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Physicochemical and Engineering Aspects*. **152**: 41-52
- BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. (2004). Pseudomonas, Acinetobacters, uncommon Gram negative bacteria. In: Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology. McGraw-Hill Education. p:262-264
- CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 520-529
- CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, **7**: 262–266
- CAMERON, D.R., COOPER, D.G., NEUFELD, R.J. (1988). The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol* **54(6)**: p. 1420-1425
- CAMILIOS-NETO, D., BUGAY, C., SANTANA-FILHO, A.P., JOSLIN, T. DE SOUZA L.M., SASSAKI, G.L., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. (2011). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:1395–1403
- CARRILLO, C., TERUEL, J.A., ARANDA, F.J., ORTIZ, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1611**: 91 – 97
- CEYHAN, N., ESMERSOY, N. (2012). Petrol kirliliği ve biyoremediasyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. **5(1)**: 95-101
- CHEN, S.Y. WEI, Y.H., CHANG, J.S. (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 67–74

- CIRIGLIANO, M.C., CARMAN, G.M. (1985). Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **50(4)**: 846-850
- COOPER, D.G., GOLDENBERG, B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53(2)**: 224–229.
- COOPER, D. G., MACDONALD, C. R., DUFF, S. J. B., KOSARIC, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42(3)**: 408-412
- COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **46 (6)**: 1426-1429
- COOPER, D.G., PADDOCK, D.A.(1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:173-176.
- COOPER, D.G., ZAJIC, J.E. (1980). Surface-active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-253
- COSTA, S.G., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M.N. CONTIERO, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Pro Biochem* **41**:483-488
- ÇAKAR, A.(2009). Pseudomonas. Hacettepe mikrobiyoloji serisi-1 Klinik Bakteriyoloji. Ed.:Özkuyumcu C. Güneş Tıp Kitabevleri Ankara. s:155-163
- DA SILVA, G.P. MACK, M., CONTIERO, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* **27**:30–39
- DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour Technol.* **100**:1015-1019
- DESAI, J.D., BANAT, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**: 47-64
- DIFCO (2009). Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media Second Edition. [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbmanual\\_2nded\\_lowres.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbmanual_2nded_lowres.pdf) Erişim tarihi: 15.09.2013
- DOĞAN, G., BİRCAN, R. (2010). Balık yemlerinde alternatif bitkisel protein kaynağı olarak fındık küspesi kullanımı. *MAKUFEBED* (2010) **2**: 49 -57
- DUBEY, K., CHARDE , P.N., MESHARAM, S.U., YADAV, S.K., SINGH, S., JUWARKAR, A.A..(2012). Potential of new microbial isolates for biosurfactant production using combinations of distillery waste with other industrial wastes. *J Petrol Environ Biotechnol* 2012, doi:10.4172/2157-7463.S1-002
- DUBEY, K., JUWARKAR, A. (2004). Determination of genetic basis for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian J.Biotechnol.* **3**: 74-81

- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J. K, REBERS, P.A., SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356
- ERDEM,B. (1999). Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed.: Ustaçelebi Ş. Güneş Kitabevi, Ankara, p: 551-558
- GAUTAM, K.K., TYAGI, V.K. (2006). Microbial surfactants, *J. Oleo Sci.*, **55**: 155-166
- GEORGE, S., JAYACHANDRAN, K. (2012). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*. **114**: 373-383
- GEORGIU, G., LIN, S.C., SHARMA, M.M.(1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*. **10**:60-65
- GHARAEI-FATHABAD, E., (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Am. J. Drug Discovery Develop.*, **1**: 58-69.
- GUERRA-SANTOS,L., KAPPELI,O.R., FIECHTER,. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol*, **48 (2)**: 301-305
- GUNTHER, N.W., NUNEZ, A., FETT, W., SOLAIMAN, D.K.Y. (2005). Production rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2288-2293
- GÜL, Ü.D. (2012). Mikrobiyal yüzey aktif maddeler ve çevresel uygulamalarda kullanımı. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*. **10(2)**:45-55
- HABA, E., ESPUNY, M.J., BUSQUETS, M., MANRESA A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 379–387
- HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., ESPUNY, M.J., INFANTE, M.R., MANRESA, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology And Bioengineering* **81(3)**:316-322
- HARVEY, S., ELASHVILLI, I., VALDES, J.J.KAMELY, D., CHAKRABARTY, A.M. (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology*, **8**: 228-230
- HÖMMEL, R.K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. Biosurfactants in hydrocarbon utilization. *Biodegradation* **1**:107-119
- JARVIS, F.G., JOHNSON, M. J. (1949). A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **71**: 4124-4126
- KAHYAOĞLU, M. (2008). Biyosürefektanların antimikrobiyal aktiviteleri ve uygulama alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **24(1-2)**: 39-51

- KAHYAOĞLU, M., KONAR, V., (2006). Şeker fabrikası atık maddeleri kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*' dan rhamnolipid biyosüfektanı elde edilmesi. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, **18 (4)**: 493-498
- KAHYAOĞLU, M., KONAR, V., (2008). Karbon kaynağı olarak peyniraltı suyu atığı Kullanılarak rhamnolipit biyosüfektanı üretimi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. **8(1)**: 53-62
- KARATUNA, O., YAĞCI, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*' da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **38 (1)** : 42-51
- KITAMOTO, D., ISODA, H., NAKAHARA, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94(3)**: 187-201
- KONAR, V., KAHYAOĞLU, M. (2006). Rhamnolipit biyosüfektanlarının üretiminde endüstriyel atık maddelerin kullanılması ve rhamnolipitlerin uygulama alanları. *D.P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. **12**: 1-12
- KOSARIC, N. (1992). Biosurfactants in Industry. *Pure&Appl.Chem.* **64(11)**: 1731-1737
- KOSARIC, N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39 (4)**: 295–304.
- KOSARIC, N., CAIRNS, W. L., GRAY, N. C. C., STECHEY, D., WOOD, J. (1984). The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61(11)**: 1735-1743
- KURAL, F.H., GÜRSOY, R.N. (2011). Biyosüfektanlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. **31**: 71-82
- LANG, S.(2002). Biological amphiphiles microbial biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **7**: 12-20
- LANG, S., PHILIP, J. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 59–70
- LANG, S., WULLBRANT, D. (1999). Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**: 22-32
- LEE, K., HWANG, S.H., HA, S., JANG, J.H., LIM, D.J., KONG, J.Y. (2004). Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnol Biopro Eng* **9**: 267-273
- LI, Z.Y., LANG, S., WAGNER F., WITTE, L., WRAY, V. (1984). Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **(48)3**: 610-617
- MAIER, R.M., SOBERON-CHAVEZ, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **54**: 625-633

- MAKKAR, R.S, CAMEOTRA, S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**: 428–434
- MATA-SANDOVAL, J. C., KARNIS J., TORRENTS A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromatogr. A*, **864**: 211-220.
- MERCADE, M.E., MANRESA, M.A., ROBERT, M., ESPUNY, M.J., DE ANDRES, C., GUINEA, J.. (1993). Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresour Technol* **43**:1-6
- MUKHERJEE, S., DAS, P., SEN, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* **24(11)**: 509–515.
- MULLIGAN, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**: 183–198
- MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* **60**: 371-380
- MUTHUSAMY, K., GOPALAKRISHNAN, S., RAVI, T.K., SIVACHIDAMBARAM, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, **94 (6)**: 736-747
- NITSCHKE, M., COSTA, S.G.V.A.O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, **18**: 252-259
- NITSCHKE, M., COSTA, S.G., HADDAD, R., GONCALVES, L.A., EBERLIN, M.N., CONTIERO, J. (2005). Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol Prog* **21**:1562-1566
- NITSCHKE, M., FERRAZ, C., PASTORE, G.M. (2004). Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.*, **35**: 81-85
- NOORDMAN, W.H., JANSSEN, D.B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68(9)**:4502–4508
- NUNEZ, A., ASHBY, R., FOGLIA, T.A., SOLAIRNAN D.K.Y. (2001). Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromotographia* **53**: 673-677
- ONBAŞILI, D. (2006). Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi.
- ONBAŞILI, D., ASLIM, B. (2011). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin biyoteknolojik açıdan önemli bazı sekonder metabolitleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **9**: 25-34

- PANDEY, A., SOCCOL, C.R. MITCHELL, D. (2000). New developments in solid state fermentation: l-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* **35**:1153–1169
- PANESAR, R., PANESAR, P.S., BERA, M.B. (2011). Development of low cost medium for the production of biosurfactants. *Asian Journal of Biotechnology*. doi: 10.3923/ajbkr
- PATEL, R.M., DESAI, A.J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Appl. Microbiology*. **25**: 91-94.
- PEREIRA, D.S.T., SILVA, A.L.S., A.M.Q. LÓPEZ (2010). Production of emulsifier by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* (C1 LBPVMA- (C1 LBPVMA--UFAL) using lubricant oil as main carbon source UFAL) using lubricant oil as main carbon source UFAL) using lubricant oil as main carbon source. *Maringá* **32(1)**: 33-36
- PILJAC, G., PILJAC, V. (1995). Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid. United States. 5,455,232.
- PIMIENTA, A. L., R., DÍAZ M M. P., CARVAJAL, S. F. G., GROSSO V. J. L. (1997). Production of biosurfactants (rhamnolipids) by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Colombian sludges. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*. **1(3)**: 95-108
- PRIETO, L.M., MICHELON, M., BURKERT J.F.M., KALIL, S.J., BURKERT, C.A.V. (2008). The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere* **71**:1781–1785
- PROSSER, A.J., FRANCES, E.I. (2001). Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air–water interface: review and evaluation of equilibrium Models. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **178**:1–40
- RAHIM, R., OCHSNER, U. A., OLVERA, C., GARANINGER, M., MESSNER, P., LAM, J.S., SOBERÓN-CHÁVEZ, G., (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis, *Mol. Microbiol.*, **40**: 708-718
- RAHMAN, K.S.M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* **18**: 1277-1281
- RAPP, P., BOCK, H., WRAY, V., WAGNER, F. (1979). Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Journal of General Microbiology*. **115**: 491-503
- RASHEDI, H., ASSADI, M.M., BONAKDARPOUR, B., JAMSHIDI, E. (2005). Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **2(1)**: 59-62.
- RAZA, Z.A., KHAN, Z.M. (2007). Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* **42**: 72-80

- REMICHKOVA, M., GALABOVA, D., ROEVAA, I., KARPENKOB, E. SHULGAB, A., GALABOVA, A.S. (2008). Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas sp.* S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Z. Naturforsch.* **63**: 75-81
- RIKALOVIC, M.G., ABDEL-MAWGOUD, A.M., DE'ZIEL, E.,GOJGIC-CVIJOVIC, G.DJ. NESTOROVIC, Z.,VRVIC, M.M., KARADZIC, I.M. (2013). Comparative analysis of rhamnolipids from novel environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Surfact Deterg* **16**:673–682
- RISTAU, E.,WAGNER, F. (1983). Formation of novel anionic trehalosetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. *Biotechnology Letters.* **5**: 95-100.
- RIVARDO, F., TURNER, R.J., ALLEGRONE, G., CERÌ, H. AND MARTINOTTI, M.G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus spp.* prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**: 541-553.
- ROBERT, M., MERCADE, M.E., BOSCH, M.P., PARA, JL., ESPINY, M.J., MANRESA, M.A., GUINEA, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production on *Pseudomonas aeruginosa* 44 T1. *Biotechnol Lett.* **11**: 871-874
- RODRIGUES, L., BANAT, I.M., TEIXEIRA, J., OLIVEIRA, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemoth.* **57**: 609-618.
- RON, E.Z., ROSENBERG, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology.* **3**: 229-236
- SAHOO, S., DATTA, S., BISWAS D. (2011). Optimization of culture condition for biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *Journal of Advanced Scientific Research.* **2(3)**: 32-36
- SALAGER, J.L., (1999). Surfactants types and uses. Firp Booklet E300-A *Teaching Aid in Surfactant Science & Engineering* <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>
- SALIHU, A., ABDULKADİR, I., ALMUSTAPHA, M.N. (2009). An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnol Mol Biol Rev.* **3(5)**:111–117.
- SANTA ANNA, L.M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P.,ALVES, T.L.M., SANTOS, A.S., PEREIRA, N., FERREIRE, D.M.G. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated In oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* **19**: 159-166
- SIDAL, U., KOLONKAYA, N., KURTONUR, C. (2001). *Pseudomonas sp.* ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosüर्फektan elde edilmesi. *Turkish Journal of Biology.* **24**: 611-625.
- SILVA, S.N., FARIAS, C.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. (2010). "Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992." *Colloids and Surfaces. Biointerfaces.* **79(1)**: 174-183.
- SIM, L., WARD, O.P., LI, Z.Y. (1997). Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **19**: 232-238

- SINGH, P., CAMEOTRA, S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS in Biotechnology* **22(3)**: 142-146
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **68**:718–725.
- SOTIROVA, A.V., SPASOVA, D.I., GALABOVA, D.N., KARPENKO, E., SHULGA, A. (2008). Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Curr Microbiol* **56**: 639–644
- SUGANYA, R.S. (2013). Screening optimization and production of biosurfactants from *Bacillus* and *Pseudomonas* species. *Int J Curr Pharm Res.* **5(1)**: 19-23
- TADROS, T.F., VANDAMMEB, A., LEVECKEB, B., BOOTENB, K., STEVENS C.V. (2004). Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin. *Advances in Colloid and Interface Science* **108-109**: 207–226
- TANAKA, Y., TOJO, T., UCHIDA, K., UNO, J., UCHIDA, Y., SHIDA, O. (1997). Method of producing iturin A and antifungal agent for profound mycosis. *Biotechnology Advances.* **15(1)**: 234-235
- THANIYAVARN, J., CHONGCHIN, A. WANITSUKSOMBUT, N., THANIYAVARN, S. PINPHANICHAKARN, P., LEEPIPATPIBOON, N., MORIKAWA M., KANAYA, S. (2006). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *J Gen Appl Microbiol* **52**:215-222
- THANOMSUB, B., PUMEECHOCKCHAI, W., LIMTRAKUL, A., ARUNRATTIYAKORN, P., PETCHLEELAHA, W., NITODA, T., KANZAKI, H., (2007). Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste *Bioresource Technology*, **98**: 1149–1153.
- TOSUN, M. (2003). Türkiye Kalkınma Bankası A.S. Genel araştırmalar bitkisel sıvı yağlar sektör araştırması. Ankara Erişim: [http://www.kalkinma.com.tr/data/file/raporlar/ESA/SA/2003-SA/SA-03-01-02\\_Bitkisel\\_Sivi\\_Yaglar\\_Sektoru.pdf](http://www.kalkinma.com.tr/data/file/raporlar/ESA/SA/2003-SA/SA-03-01-02_Bitkisel_Sivi_Yaglar_Sektoru.pdf). Erişim tarihi: 15.06.2013
- TRUMMLER, K., EFFENBERGERA, F., SYLDATK, C. (2003). An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas sp.* DSM 2874. *Eur.J.Lipid. Sci.Technol.*, **105**: 563-571
- ULUSOY, S. (2007). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suslarında n-açıl homoserin lakton üretiminin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi.
- UYSAL, A., TÜRKMAN, A. (2004). Klorofenollü bileşiklerin ayrışabilirliğinin biyosürefektan kullanımı ile hızlandırılması. *SKKD.* **14(2)**: 23-30
- VAN DYKE, M. I., COUTURE, P., BRAUER, M., LEE, H. AND TREVORS, J.T., (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can.J. Microbiol*, **39**: 1.071 - 1.078.



- VAN HAMME JD, SINGH A, WARD OP. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv.* **24(6)**:604-20.
- VOLLENBROICH, D. OZEL, M., VATER, J., KAMP, R.M., PAULI, G. (1997). Mechanism of Inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* . **25**: 289–297
- WANG, H. (2011). Solution and interfacial characterization of rhamnolipid biosurfactants and their synthetic analogues. Doctoral thesis. The University of Arizona.
- WANG, Q., FANG, X., BAI, B., LIANG, X., SHULER, P.J., GODDARD, W.A., TANH, Y.(2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*. **98(4)**: 842-853
- WEI, Y. H., CHOU, C.L., CHANG, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J.* **27**: 146-154
- WU, J.Y., YEH, K.L., LIN, C.L., CHANG, J.S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour Technol* **99**: 1157-1164
- YALÇIN, E. (2008). Rafineri atık sularından izole edilen mikroorganizmalar ile biyosüpfektan eldesi ve hidrokarbon degredasyonunun araştırılması. Kırıkkale Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi
- YILMAZ, F. (2008). Süt fabrikası atıksularından mikroorganizma izolasyonu ve biyosüpfektan üretimi. Kırıkkale Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- YÜCESOY-DEDE, B. (2006). Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. Uzmanlık Tezi
- ZANG, L. (2011). Effects of fatty acid substrates on rhamnolipid (biosurfactant) biosynthesis and congener distribution. Doctoral thesis. The University of Arizona
- ZHANG, G., WU, Y., QIAN, X., MENG, Q. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J. Zhejiang Univ.* **8**: 725-730
- ZHANG, Y., MILLER R. M. (1992). Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant), *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3276–3282.
- ZHANG, Y., MILLER R. M. (1995). Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2247-2251
- ZHU, K., ROCK, C.O. (2008). RhIA Converts  $\beta$ -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the  $\beta$ -Hydroxydecanoyl-  $\beta$  - Hydroxydecanoate Component of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*. **190(9)**: 3147–3154

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Banu KAŞKATEPE  
Doğum yeri ve tarihi : Hatay / 1980  
Uyruğu : T.C  
Medeni Durumu : Evli  
İletişim Adresi : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.  
Tandoğan / ANKARA  
Telefonu : 0 312 203 31 88

### II- Eğitim

2008- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji  
Ab.D.  
2005-2008 Üriner Sistem İnfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli*lerde  
siprofloksasin ve levofloksasinin subinhibitör konsantrasyonlarına  
karşı in vitro direnç gelişiminin araştırılması. Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Ab.D. Tezli Yüksek  
Lisans  
1998-2002 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dili: İngilizce

### III- Ünvan

2002- Biyolog  
2008- Uzman Biyolog

### IV- Mesleki Deneyimi

2002-2004 İSDEMİR A.Ş. / Biyolog  
2005- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji  
Ab.D / Araştırma Görevlisi

### V- Yayınlar

1. Banu Kaskatepe, Sulhiye Yildiz (2013). Investigation of association between slime production by *Candida* spp and susceptibility to fluconazole and voriconazole. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **12(5)**: 821-825 (SCI-Expanded)
2. Banu Kaskatepe, Sulhiye Yildiz (2013). In Vitro Development of Resistance to Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin and Levofloxacin in Uropathogen *Escherichia coli*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **7(2)**: 1431-1435 (SCI-Expanded)
3. KAŞKATEPE, B., YILDIZ, S. (2009). Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **39 (1-2)**: 36-39
4. KASKATEPE B., YILDIZ S. (2009).An Investigation on Uropathogen *Escherichia coli* Strains with Regard to Antimicrobial Susceptibility and Extended Spectrum Beta- Lactamase. *FABAD J.Pharm.Sci.*,**34**:173-177

### Posterler

1. KAŞKATEPE, B., YILDIZ, S. (2009). Investigation of in vitro resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection against subinhibitory concentrations of ciprofloxacin and levofloxacin. 23-26 Haziran ISOPS-9. 2009 Kongre özetleri Kitabı s: 386
2. KASKATEPE, B., YILDIZ, S. (2012).Investigation of In vitro Resistance of Slime Positive and Slime Negative *S.aureus* Strains Against Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin. ISOPS 10, 23-26 Abstract Book p:204
3. KASKATEPE, B., YILDIZ, S. (2012). Antibiotic Susceptibility of Coagulase Negative Staphylococci Isolated From Computers. ISOPS 10, 23-26 June, 2012 Abstract Book p:205

4. KASKATEPE, B., YILDIZ, S. (2012). In-vitro susceptibility of methicillin-resistant staphylococci isolated from clinical samples to newer antibiotics and vancomycin. IFIC 2012 Zagreb 10-13 September Abstract Book p:46

#### **VI- Seminerler**

1. Kanserli, İmmunosüpresif Tedavi Alan ve Nötropenik Hastalarda İnfeksiyonlar- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı – 2006
2. Sepsis- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı – 2009
3. Biyofilm- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı – 2009