

Pseudomonas* sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biyosüpfektan Eldesi

Uğur SİDAL**

Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hatay-TÜRKİYE

Nazif KOLANKAYA

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara-TÜRKİYE

Cengiz KURTONUR

Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Edirne-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 23.02.1999

Özet: Zeytinyağı fabrikası atığı Akdeniz ülkelerinde tarımsal endüstrinin en önemli kirleticilerinden biridir. Bu ülkelerdeki zeytinyağı fabrikaları yıllık yaklaşık 2-3 milyon tonluk bir atık meydana getirir. Zeytinyağı fabrikası atığı, zeytinyağı işleme projesinde kullanılan su ve olgun zeytinlerin suda çözünen fraksiyonunu içeren siyah bir likördür. Bu atık su yüksek mineral içeriğine sahiptir ve kullanılan zeytinyağı ekstraksiyon işlemine bağlı olarak 25.000-100.000 mg/l kimyasal oksijen ihtiyacı gösterir.

*Bu çalışma zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile ramnolipid olarak bilinen biyosüpfektan elde etme prosesini sunmaktadır. Bu amaçla biyosüpfektan üreten bazı suşlar denenmiş ve karbon kaynağı olarak zeytinyağı fabrikası atığı siyah likörde üreyebilen bazı *Pseudomonas* suşları tespit edilmiş ve bunların ramnolipid ürettikleri saptanmıştır. Üreme ortamı olarak kullanılan zeytinyağı fabrikası atığı seyreltilmiş (dilue edilmiş) ortama sadece NaNO₃ (2.5 g/l) ilave edilmiştir. Litre substrat başına ramnolipid üretimi 0.875 g/l dir. Zeytinyağı fabrikası atığının Kimyasal Oksijen İstemi yükü 72. saatte yaklaşık %50-70 oranında indirgenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Zeytinyağı Fabrikası Atığı, *Pseudomonas* sp., Biyosüpfektan, Ramnolipid

Obtaining Biosurfactant from Olive Oil Mill Effluent (OOME) Using *Pseudomonas* sp.

Abstract: Olive oil mill effluent (OOME) is one of the major pollutants produced by the agricultural industry in Mediterranean countries. The olive oil mills in these countries generate about 2-3 million tonnes of effluent annually. OOME is a black liquor containing a water-soluble fraction of ripe olives and water that is used in the process of olive oil extraction. This waste has a high mineral content and a chemical oxygen demand of 25.000-100.000 mg/l. depending on the olive oil extraction process used.

This study presents a process for biosurfactant as rhamnolipid production by *Pseudomonas* sp. from olive oil mill effluent (OOME). For this purpose, some biosurfactant-producing strains were assayed

* Bu çalışma TÜBİTAK, TBAG-1507 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

**Bu çalışma doktora tezinin bir bölümüdür.

and several strains of *Pseudomonas* sp. were able to grow on OOME as the sole carbon source and accumulate rhamnolipids. Samples of OOME used as a medium of production were diluted and it was only necessary to add NaNO_3 (2.5 g/l) to the medium. The conversion yield was 0.875 g of rhamnolipid per litre of substrate (OOME). The COD of the OOME was reduced by 50-70% in 72 h.

Key Words: Olive Oil Mill Effluent (OOME) *Pseudomonas* sp., Biosurfactant, Rhamnolipid.

Giriş

Endüstride hammaddeler belirli bir amaca göre işlenirken bazı maddeler de atık olarak kalır. Bunlar daha sonra verildikleri alıcı ortamların yani havanın, toprağın, suların dolayısı ile çevrenin kirlenmesine neden olduklarından ya yok edilmeleri ya da kirlilik yüklerinin azaltılması gerekmektedir. Ancak ekonomik yönden değerlendirilmeleri ön planda geleceğinden, çeşitli değerlendirme şekilleri son yıllarda büyük önem kazanmıştır.

Genel olarak Akdeniz ülkelerinde zeytinyağı fabrikası atıklarının tarımsal endüstrinin en önemli kirleticilerinden biri olduğu görülmektedir. Rakamsal olarak ifade etmek gerekirse, bu fabrikalar yılda ortalama olarak 2,5-3 milyon ton atık meydana getirirler. Zeytinyağı fabrikası atığı, zeytinyağı işleme prosesinde kullanılan su ve olgun zeytinlerin suda çözünen fraksiyonunu içeren siyah bir likördür. Bu atık su yüksek mineral içeriğine sahiptir ve kullanılan zeytinyağı ekstraksiyon işlemine bağlı olarak 25.000-100.000 mg/l kimyasal oksijen ihtiyacı (K.O.I.) gösterir (1).

Zeytinyağı fabrikası atığı polifenoller gibi toksik maddeler içerdiği gibi, şekerler, azotlu bileşikler, organik asitler ve atık yağ gibi ticari öneme sahip organik maddeler de içerir (2, 3). Bu nedenle günümüz fermentasyon teknolojisi içinde zeytinyağı fabrikası atığı önemli bir hammadde olma özelliğini sürdürmektedir. Özellikle, tek hücre proteini üretimi, pektik enzimlerin biyosentezi ve anaerobik koşullarda enerji eldesi gibi fermentasyon prosesleri bu teknolojinin en önemli uygulamalarıdır (4-6).

Zeytinyağı fabrikası atığı siyah likörün kompozisyonu Tablo 1'de gösterilmiştir (7). Bilindiği gibi birçok mikroorganizma çok değişik karbon kaynakları kullanılarak üretildiğinde farklı tipte biyosüpfektanlar sentezleyebilir. Bazı *Pseudomonas* suşlarının da farklı karbon kaynaklarında üretildiklerinde rhamnolipid olarak karakterize edilen yüzey aktif bileşikler sentezlediği bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı son zamanlarda biyosüpfektan üreten mikroorganizmalar üzerine çalışan araştırmacıların sayısında belirgin bir artış görülmektedir. Ekstraselüler olarak ortama salındıklarında hidrokarbonları emülsifiye etmeleri, hücre duvarının yapısında yer aldıklarında ise hidrokarbonların periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları ile tanınan doğal ve sentetik süpfektanlar bu nedenle uzun yıllardan beri ticari amaçla çok çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle makine sanayi ve motor yağları endüstrisinde, çevre biyoteknolojisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik sanayiinde her gün artan hammadde talebini karşılamak amacıyla proses geliştirmeye yönelik çalışmalar da hızlanmıştır. Bu prosesler sonucu sentezlenen ürünlerden özellikle düşük molekül ağırlıklı olanları yağ ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeme yeteneğine sahip olduklarından daha da geniş bir kullanım alanı bulurlar. Biyosüpfektanların fermentasyon teknolojisinde ön plana çıkmasının nedeni ise sentetik

Bileşenler	
Kuru Madde (%)	12.0
Organik Maddeler (%)	10.5
Mineraller (%)	2.5
Organik Bileşenler (%)	
Şekerler	5.0
Protein	1.2
Organik Asitler	0.7
Polialkoller	1.8
Pektinler, Tanenler	1.0
Polifenoller	1.0
Lipidler	0.1
Mineral Bileşenler (ppm)	
P	500
K	3000
Ca	350
Mg	200
Na	450
Fe	35
pH	4.5-5
K.O.I. (g/l)	90-100

Tablo 1. Zeytinyağı Fabrikası Atığının Kompozisyonu.

sürfektanlara göre sahip olduğu avantajlarıdır. Bu avantajlar; Biyosürfektanlar bazı durumlarda sentetik sürfektanlardan farklı yüzey aktif özellikler gösterirler, bu da endüstriyel uygulamalar için yeni ihtimalleri ortaya çıkarır; Mikrobiyal sürfektanlar birçok geleneksel sürfektanlara göre özel uygulamalar için de çok daha etkilidir ve biyosürfektanlar genellikle non-toksik ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliktedir, şeklinde sıralanabilir (1, 8).

Zeytinyağı Ülkemizin önemli üretim maddelerinden birisidir. Bu maddenin üretimini yapan fabrikaların atıkları da önemli bir çevre kirleticisidir. Çevre kirletici atık ürünlerin yeniden kazanımı son yıllarda çevre dostu teknolojilerin ana hedefi durumuna gelmiştir. Bununla birlikte sürfektanlar çeşitli endüstrilerde geniş bir kullanım alanı bulmakta ve doğal sürfektanlar sahip oldukları avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu sebeple zeytinyağı fabrikası atığından biyosürfektan elde edilmesini amaçlayan bu projemiz ülkemiz ekonomisi ve ekolojisi için oldukça önemlidir. Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda farklı prosesler ve farklı suşlar kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmamızda ülkemiz ekosistemine adapte olmuş *Pseudomonas* suşları izole edilmiş ve aerobik koşullarda biyosürfektan verimliliği diğer sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak bu çalışma zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile ramnolipid olarak bilinen biyosürfektan elde etme prosesini sunmaktadır.

Materyal ve Metod

1. Kullanılan Mikroorganizma; İzolasyonu ve Saflaştırılması: Edremit-Ayvalık-Gömeç mevki'nden, zeytinyağı fabrikası atığı ile kontamine olmuş 4 farklı istasyondan alınan toprak ve

su örneklerinden izole edilen ve biyosüpfektan sentezleme yeteneğinde olan 8 mikroorganizma saptandı. Bu izolatların *Pseudomonas sp.* olduğu Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na göre yapılan mikroskopik ve biyokimyasal testler (asit, gaz, IMVIC, oksidaz vb.) sonucunda anlaşıldı. *Pseudomonas sp.*'leri içinde en yüksek aktiviteye sahip olan ve *Pseudomonas sp.* A01 olarak isimlendirilen suş bundan sonraki bütün çalışmalarda kullanıldı (1, 9-15).

2. Kullanılan Besiyeri: Çalışmalarda temel besiyeri olarak Edremit-Ayvalık-Gömeç mevkii, Akıllıoğlu Ltd.Şti. Zeytinyağı Fabrikası'ndan temin edilen zeytinyağı fabrikası atık suyu (siyah likör) kullanıldı. 1/10 (v/v) oranında distile su ile seyreltilen kültür ortamlarına 2.5 g/l olacak şekilde NaNO_3 ilave edildi ve pH'ları 7'ye ayarlandı. Hazırlanan besi yerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi (1).

3. Ortamlara Ekim ve Kültürasyon: Çalışmalarda kullanılan besi ortamına *Pseudomonas sp.* bakterisinin ekimi için yatık Nutrient Agar (Oxoid) tüplerindeki stok kültürler içerisine Mc Farland 2 (%1'lik H_2SO_4 çözeltisinden 9.8 ml + %1'lik BaCl_2 çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulunıklığa gelinceye kadar steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ilave edildi ve homojen bir bakteri süspansiyonu hazırlandı (16). Bu süspansiyondan besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapıldı. Üretim 30°C'de, 150 r.p.m. döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde (Hybaid Midi Dual 14) gerçekleştirildi.

4. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi: Kültürlerde üreme, kültür ortamındaki bakteri yoğunluğunun Mc Farland standartındaki değerlerine bakılarak saptandı. Bu amaçla öncekilke 545 nm. dalga boyunda, Cecil 5000 UV/VIS spektrofotometrede köre karşı Mc Farland standartı çıkarıldı (17).

5. Kültürlerde Ramnolipid Miktarının Ölçülmesi: Ramnolipid miktarının tayini için ilk olarak bakteri hücrelerinden arındırılmış kültür ortamının sahip olduğu kahverengi bileşiklerin arıtımı yapıldı. Bu amaçla temel besi yeri 1:3 oranında asetonitril ile muamele edildi (1). Presipitat uzaklaştırıldı ve örnekteki ramnolipid miktarı Dubois ve arkadaşlarının (1956) önerdiği fenolsülfirik asit metoduna göre kolorimetrik (480 nm'de, Cecil 5000 UV/VIS spectrophotometer) olarak tayin edildi (18).

6. İndirgen Şeker Miktarının Ölçümü: Kültür ortamlarındaki indirgen şeker miktarı Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle tayin edildi (19).

7. Kimyasal Oksijen İstemi (K.O.İ.) Yükünün Tayini: Örneklerin Kimyasal Oksijen İstemi yükü Rand ve ark.'nın (1975) önerdiği yöntemle göre yapıldı (20).

8. Total Fenol Miktarının Tayini: Örneklerdeki (bakteri hücrelerinden arındırılmış kültür ortamı) total fenol miktarının tayini kloroform-ekstraksiyon metoduna göre yapıldı (21).

9. *Pseudomonas sp.* A01'in Üreme ve Ramnolipid Üretimine Etkili Kültürel Parametrelerin Saptanması

9.1. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması: İnkübasyon sıcaklığının ramnolipid sentezine etkisini incelemek amacıyla, mikroorganizma yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan temel besi ortamında 20, 25, 30, 35 ve 40°C'lerde inkübe edildi.

9.2. Optimum İnkübasyon pH'sının Saptanması: Temel besiyeri pH: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olacak şekilde ayarlandı. Ortamlar sterilize edildikten sonra ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinde, inkübasyon sonunda üreme ve ramnolipid verimi ölçüldü.

9.3. Ramnolipid Miktarının Zamana Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması: En yüksek ramnolipid sentezini sağlayan inkübasyon süresini saptamak amacıyla *Pseudomonas* sp. A01 suşunun zamana göre üremesi, ramnolipid verimi, total fenol içeriği ve kimyasal oksijen istemi yükü tayin edildi.

9.4. Çeşitli Karbon Kaynaklarının Ramnolipid Sentezine Etkisi: Ramnolipid sentezine etkili olan karbon kaynaklarını incelemek amacıyla sıvı besiyerlerine değişik karbon kaynakları (glukoz, ramnoz, sukroz, gliserol, mannitol, fruktoz, maltoz, galaktoz, nişasta) milipor filtrasyon (por çapı 0.45µ) sonrası %2 oranında ilave edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde üreme ve ramnolipid miktarı tayin edildi (22).

9.4.1. Glukoz Konsantrasyonunun Ramnolipid Sentezine Etkisi: Glukoz konsantrasyonunun ramnolipid sentezine etkisini incelemek amacıyla sıvı besiyerlerine değişik konsantrasyonlarda (%1, 2, 4, 6, 8, 10, 12) glukoz milipor filtrasyon (por çapı 0.45µ) sonrası ilave edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde üreme ve ramnolipid miktarı tayin edildi.

9.5. Uygun Azot Kaynağının Saptanması: Ramnolipid üretiminde rol oynayan azot kaynağı türü Ramana ve Karanth'ın (1989) önerdiği şekilde saptandı (22). Buna göre azot kaynağı olarak sıvı besi yerlerine sadece NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NaNO_3 ve KNO_3 %0.1 (w/v) olacak şekilde ilave edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür ortamlarında üreme ve ramnolipid miktarı tayin edildi.

9.5.1. NaNO_3 Konsantrasyonunun Ramnolipid Sentezine Etkisi: NaNO_3 konsantrasyonunun ramnolipid sentezine etkisini incelemek amacıyla temel besi yerlerine değişik konsantrasyonlarda (1, 2.5, 4 ve 6 gr/l) NaNO_3 ilave edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde üreme ve ramnolipid miktarı tayin edildi.

Bulgular

1. Biyosüpfektan Üretiminde Kullanılacak Uygun Mikroorganizmanın Saptanması: Temel besiyeri olarak kullanılan zeytinyağı fabrikası atığı siyah likörde üreyebilen ve biyosüpfektan sentezleme yeteneğinde olan 8 *Pseudomonas* sp. içinde en yüksek aktiviteye sahip olan suşu saptamak amacıyla yaptığımız çalışmada *Pseudomonas* sp. A01 olarak isimlendirdiğimiz suşun en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Bu suşun hem ramnolipid sentezleme yeteneği (0.460 g/l) hem de kirlilik yükü parametreleri (K.O.İ.: 8.40 g/l, Total fenol: 1.67 g/l) denenen diğer suşlara göre en uygun değerlere sahiptir.

2. *Pseudomonas* sp. A01'in Üremesi ve Ramnolipid Sentezine Fizyolojik Koşulların Etkisi: Bu çalışmada *Pseudomonas* sp. A01'in üremesi ve ramnolipid sentezine fizyolojik koşulların etkisini incelemek amacıyla inkübasyon sıcaklığı (Şekil 1a, b c), ortam pH'sı (Şekil 2a, b, c), uygun inkübasyon süresinin saptanması ve ramnolipid sentezinin zamana göre değişimi

Tablo 2. Çalışmada Kullanılacak Uygun Mikroorganizmanın Saptanması.

ÖRNEK	Total hücre sayısı ($\times 10^6$)/ml	K.O.I. (g/l)	Redüktör şeker (g/l)	Total fenol (g/l)	Ramnlipid (g/l)	Verimlilik (g/total hücre)
Kontrol	-	28.85 $\pm$ 0.9	6.25 $\pm$ 0	3.56 $\pm$ 0.005774	-	-
J02	186 $\pm$ 1.154701	10.09 $\pm$ 0.91	5.75 $\pm$ 0.05	2.01 $\pm$ 0.011547	0.440 $\pm$ 0	2.37 $\times 10^{-9}$
E01	174 $\pm$ 2	8.27 $\pm$ 0.011547	5.25 $\pm$ 0	2.10 $\pm$ 0.005774	0.455 $\pm$ 0	2.62 $\times 10^{-9}$
F03	188 $\pm$ 0.57735	8.96 $\pm$ 0.015275	5.25 $\pm$ 0	2.24 $\pm$ 0.015275	0.448 $\pm$ 0.002517	2.38 $\times 10^{-9}$
A01	165 $\pm$ 1.527525	8.40 $\pm$ 0.05	5.50 $\pm$ 0.028868	1.67 $\pm$ 0.005774	0.460 $\pm$ 0	2.79 $\times 10^{-9}$
G02	176 $\pm$ 1.154701	8.96 $\pm$ 0.005774	5.38 $\pm$ 0.028868	1.81 $\pm$ 0.011547	0.460 $\pm$ 0	2.62 $\times 10^{-9}$
K01	179 $\pm$ 0.57735	8.00 $\pm$ 0.005774	5.63 $\pm$ 0.025166	2.03 $\pm$ 0.015275	0.448 $\pm$ 0.001155	2.50 $\times 10^{-9}$
I03	180 $\pm$ 0.57735	8.35 $\pm$ 0.01	5.35 $\pm$ 0.011547	2.31 $\pm$ 0.036056	0.435 $\pm$ 0.005	2.42 $\times 10^{-9}$
I01	180 $\pm$ 2.081666	8.00 $\pm$ 0	5.00 $\pm$ 0.076376	2.58 $\pm$ 0.025166	0.423 $\pm$ 0.002887	2.35 $\times 10^{-9}$

Tablo 3. Ramnlipid Sentezi İçin Uygun Glukoz Konsantrasyonunun Saptanması.

Glukoz konsantrasyonu (%)	Ramnlipid (g/l)	Total hücre sayısı ($\times 10^6$)/ml	Verimlilik (g/total hücre)
1	0.145 $\pm$ 0.05	174 $\pm$ 0.005774	0.83 $\times 10^{-9}$
2	0.380 $\pm$ 0.001155	176 $\pm$ 0.005	2.16 $\times 10^{-9}$
4	0.075 $\pm$ 0.028868	172 $\pm$ 0.015275	0.44 $\times 10^{-9}$
6	0.070 $\pm$ 1.154701	178 $\pm$ 0.028868	0.39 $\times 10^{-9}$
8	0.045 $\pm$ 1.527525	172 $\pm$ 0.025166	0.26 $\times 10^{-9}$
10	0.020 $\pm$ 1.154701	176 $\pm$ 0.9	0.12 $\times 10^{-9}$
12	0.020 $\pm$ 2.081666	180 $\pm$ 0.91	0.11 $\times 10^{-9}$

(Şekil 3a, b, c), çeşitli karbon kaynaklarının ramnlipid sentezine etkisi (Şekil 4), glukoz konsantrasyonunun ramnlipid sentezine etkisi (Tablo 3), uygun azot kaynağının saptanması (Şekil 5), NaNO₃ konsantrasyonunun ramnlipid sentezine etkisi (Tablo 4) ve C/N oranının ramnlipid sentezine etkisinin (Tablo 5) optimum değerleri saptanmıştır.

Şekil 1’de görüldüğü gibi optimum inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu bulunmuştur. Şekil 2 ve 3’deki bulgulara göre optimum inkübasyon pH’sı 7, optimum inkübasyon süresi 72 saat olarak saptanmıştır. Çeşitli karbon kaynaklarının ramnlipid sentezine etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada denenen karbon kaynakları arasında mannitol, gliserol ve glukozun en iyi verim sağlayıcı kaynaklar olduğu ancak glukozun maliyet düşürücü olması nedeniyle tercih edilmesine bağlı olarak en uygun glukoz konsantrasyonunun da %2 olduğu bulunmuştur (Şekil 4, Tablo 3). Uygun azot kaynağını saptamak amacıyla yapılan çalışmada NaNO₃’ın diğer azot kaynaklarına göre ramnlipid sentezi açısından en uygun olduğu saptanmıştır (Şekil 5). NaNO₃’ın optimum konsantrasyonunu tespit etmek için yapılan çalışmada bulunduğumuz değer 2.5 g/l’dir

Tablo 4. Değişik Konsantrasyonlarda NaNO₃ İçeren Kültür Ortamlarında Üreme ve Ramnolipid Miktarı.

NaNO ₃ kons. (g/L)	Total hücre sayısı (x10 ⁶)/ml	K.O.I. (g/l)	Redüktör şeker (g/l)	Total fenol (g/l)	Ramnolipid (g/l)	Verimlilik (g/total hücre)
Kontrol	-	28.85±0.9	6.25±0	3.56±0.005774	-	-
1	160±0.57735	10.37±0.079373	3.75±0.07	2.12±0.02	0.600±0.002887	3.75x10 ⁻⁹
2.5	166±1.732051	9.50±0.055076	4.63±0.026458	1.84±0.005774	0.675±0.002887	4.07x10 ⁻⁹
4	162±0	9.94±0.017321	3.13±0.017321	2.45±0.05	0.625±0.005	3.86x10 ⁻⁹
6	160±0.57735	10.37±0.07	3.00±0.005774	2.48±0.052915	0.600±0.002887	3.75x10 ⁻⁹

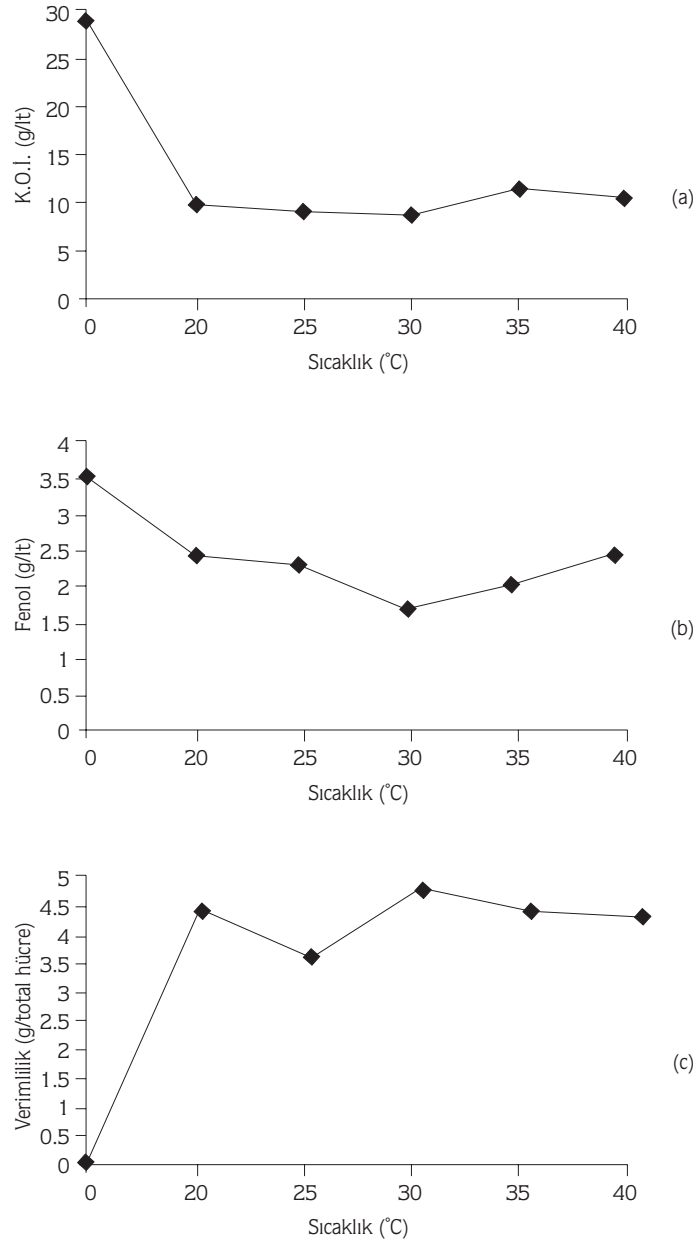
Tablo 5. C/N Oranının Üreme ve Ramnolipid Sentezine Etkisi.

C/N Oranı (g/g)	Total Hücre Sayısı (x10 ⁶)/ml	Ramnolipid g/l	Verimlilik (g/total hücre)
6.250/1.0=6.250	160±0.577350	0.600±0.002887	3.75x10 ⁻⁹
6.250/2.5=2.500	166±1.732051	0.675±0.002887	4.07x10 ⁻⁹
6.250/4.0=1.560	162±0.000000	0.625±0.005000	3.86x10 ⁻⁹
6.250/6.0=1.040	160±0.577350	0.600±0.002887	3.75x10 ⁻⁹
3.125/1.0=3.125	168±0.006000	0.475±0.00866	2.82x10 ⁻⁹
3.125/2.5=1.250	170±0.055076	0.425±0.001155	2.50x10 ⁻⁹
3.125/4.0=0.780	172±0.010000	0.400±0.026458	2.33x10 ⁻⁹
3.125/6.0=0.520	178±0.577350	0.360±0.017321	2.02x10 ⁻⁹

(Tablo 4). Uygun C/N oranını tespit etmek için yapılan çalışmada C/N oranının 2.5 olduğu değer bu çalışma için optimum C/N oranı olarak saptanmıştır (Tablo 5).

Sonuç ve Tartışma

Zeytinyağı fabrikası atığında biyosüpfektan üretimini amaçlayan bu çalışmada öncelikle Edremit-Ayvalık-Gömeç mevkiinde zeytinyağı fabrikası atığı ile kontamine olmuş 4 farklı istasyondan alınan toprak ve su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu atıkla kontamine olmuş doğal ortamlarda farklı mikroorganizmalar bulunabilmektedir (10, 23). Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na göre yapılan gerek mikroskopik gerekse biyokimyasal testler sonucunda izole edilen 8 mikroorganizmanın *Pseudomonas* sp. olduğu saptanmıştır. Bu isolatlardan da *Pseudomonas* sp. A01 olarak isimlendirdiğimiz suşun hem biyosüpfektan sentezleme yeteneği açısından hem de kirlilik yükü parametreleri açısından en uygun mikroorganizma olduğu yaptığımız çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (Tablo 2). Bu aşamadan sonraki tüm



Şekil 1. *Pseudomonas* sp. A01 Suşunda Ortam Sıcaklığının Kimyasal Oksijen İstemi Yüküne (a), Fenol Giderimine (b) ve Ramnolipid Hücre Verimliliğine (c) Etkisi. (Şekildeki ramnolipid hücre verimliliği= sentezlenen ramnolipid (g) / toplam hücre sayısı $\times 10^{-9}$ Olarak Gösterilmiştir)

araştırmalarda bu mikroorganizma ile çalışılmıştır. Zeytinyağı fabrikası atığı sahip olduğu organik bileşenler ve toksik içeriği ile mikrobiyal üremeyi sınırlayıcı bir özelliğe sahiptir (7). Buna rağmen izole edilen organizmaların hepsinin bu atıkta üreyebilme yeteneğinde olduğu saptanmıştır.

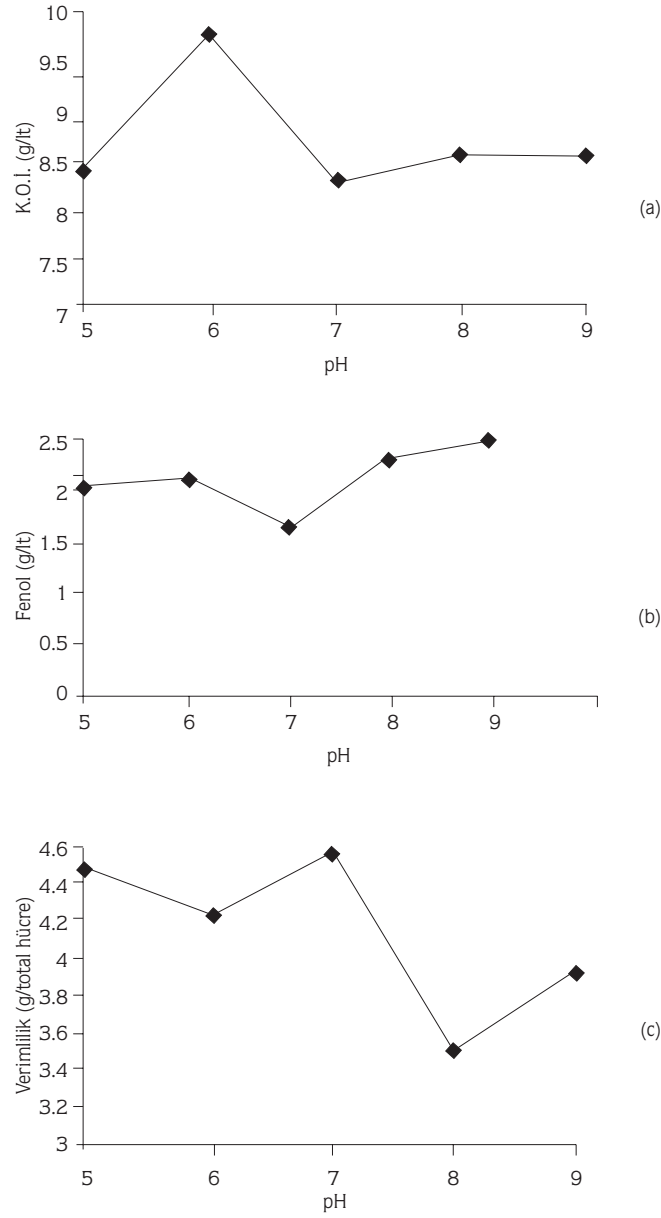
Bakteriler genel olarak 6-8 pH aralığında optimum üreme göstermektedirler. Çalışmalarımız sonucunda ramnolipid üretimi için en uygun başlangıç pH'sı 7 olarak bulunmuştur (Şekil 2). Bu pH'da K.O.İ. yükü ve total fenol değerleri de istenilen düzeydedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar ramnolipid üretimi için başlangıç pH değerini 6 olarak bulmuşlardır (1, 7, 22, 24). Bu araştırmacıların buldukları değer çalışmamızın sonucunu destekler niteliktedir. Çünkü bizim çalışmamızda da ramnolipid üretimi için en uygun başlangıç pH değeri 7 iken final pH değeri 6 olarak bulunmuştur (9).

Kültürasyon sıcaklığı ramnolipid üretimini önemli ölçüde etkileyen fizyolojik koşullardan biridir. Çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklarda istenilen sonuçlar elde edilememektedir. Çalışmamızda optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur (Şekil 1). Bu sıcaklık derecesinde hem ramnolipid üretimi en yüksek değerde, hem de kirlilik yükü parametreleri en uygun değerlerde saptanmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda verim azalmaktadır. Bunun başlıca nedeni bu sıcaklıklarda enzimlerin optimal ısılarının geçilmesidir. Kültürasyon sıcaklığı ile ilgili literatür sonuçları incelendiğinde benzer bulgulara rastlanmaktadır (1, 11, 22). Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda optimum inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak verilmiştir.

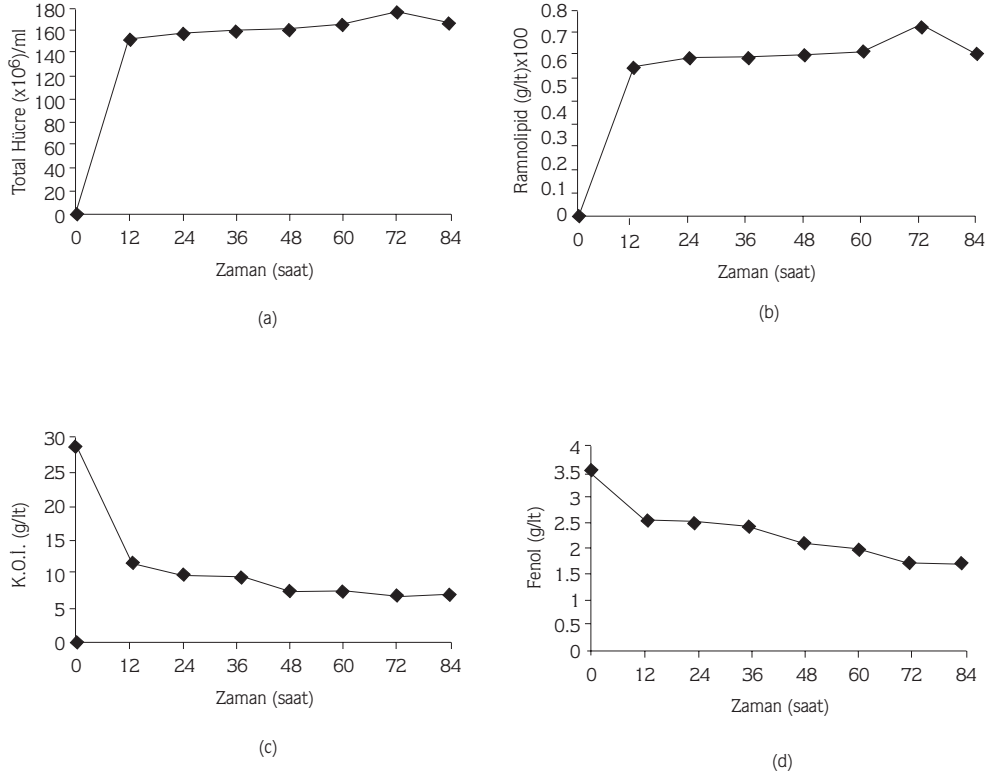
Biyosüpfektan (ramnolipid) üretimi üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipid sentezinin sekonder metabolizma ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bilindiği gibi sekonder metabolitlerin sentezi üremenin durgunluk fazına erişmesi ile artar. Ramnolipid eldesi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanısıra yüksek ramnolipid sentezine üretimin 24, 90 ve 120 saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır (1, 11, 22, 25, 26). Çalışmamızda ramnolipid sentezinin 12-24 saatlerde başladığı ve miktarının zamana bağlı olarak artarak 72 saatte en yüksek değere ulaştığı saptanmıştır (Şekil 3). Aynı çalışmada redüktör şeker miktarının da inkübasyon süresine bağlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Inkübasyonunun 72 saatinden sonra K.O.İ. yükü ve total fenol değerinde bir miktar düşüş olsa bile ramnolipid üretiminde herhangi bir artış olmamıştır.

Değişik karbon kaynaklarının biyosüpfektan üretimine etkisinin incelendiği çalışmamızda karbon kaynağı olarak Mannitol ve Gliserol içeren kültür ortamlarından (10) biyosüpfektan verimi diğer karbon kaynaklarını içeren kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4). Benzer bulgular Ramana ve Karanth'ın (1989) konu ile ilgili yaptığı çalışmada gösterilmiştir (22). Ancak Mannitol ve Gliserol maliyetleri oldukça yüksek karbon kaynaklarıdır. Dolayısı ile bu tür endüstriyel uygulamalar için tercih edilmezler. Temel besi ortamı olarak kullandığımız zeytinyağı fabrikası atığı siyah likörün bileşimi içinde de bu şeker alkoller yer almamaktadır. Çalışmamızda Gliserol ve Mannitol'den sonra en yüksek biyosüpfektan üretimi glukoz içeren kültür ortamında bulunmuştur. Bunu sırasıyla fruktoz, ramnoz, sukroz, maltoz ve galaktoz takip etmektedir. Nişasta içeren kültür ortamında ise biyosüpfektan üretimine hiç rastlanmamıştır. Biyosüpfektan üretiminde redüktör şeker ihtiva eden kültür ortamlarının uygun karbon kaynağı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (22, 27). Bazı çalışmalarda ise yalnızca glukoz içeren ortamların yerine bitkisel yağlarla karışım halindeki kültür

Pseudomonas sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biyosüpfektan Eldesi



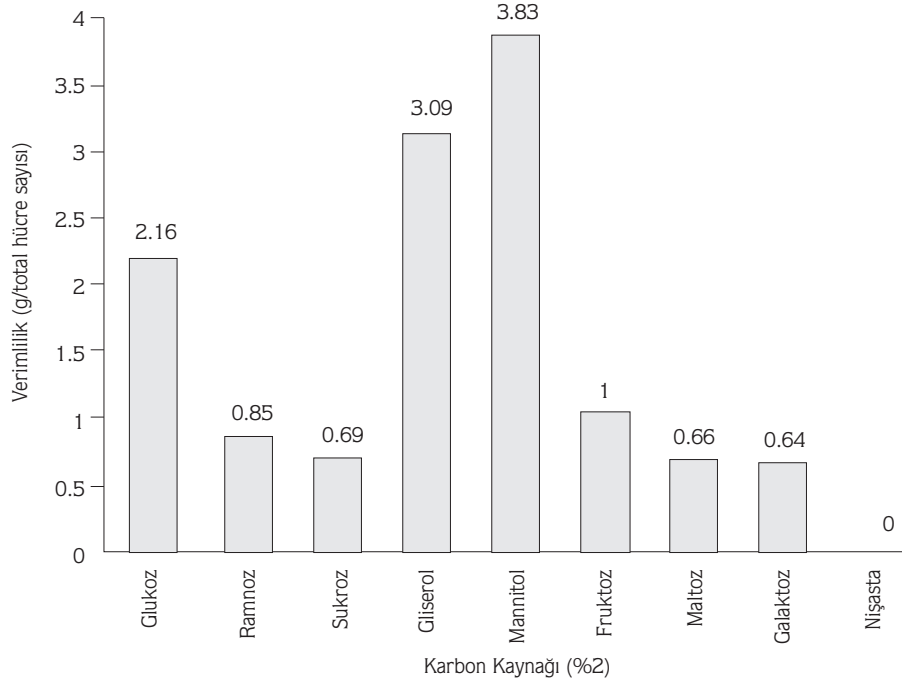
Şekil 2. *Pseudomonas sp.* A01 Suşunda Ortam pH'sının Kimyasal Oksijen İstemi Yüküne (a), Fenol Giderimine (b) ve Ramnolipid Hücre Verimliliğine (c) Etkisi. (Şekildeki ramnolipid hücre verimliliği= sentezlenen ramnolipid (g) / toplam hücre sayısı $\times 10^{-9}$ Olarak Gösterilmiştir)



Şekil 3. *Pseudomonas* sp. A01 Suşunda Zamana Bağlı Olarak Üreme (a), Rhamnolipid Sentezi (b), Kimyasal Oksijen İstemi Yüğü (c) ve Fenol Giderimi (d).

ortamlarında biyosüpfektan üretiminin daha yüksek değerlerde olduğu vurgulanmıştır (7). Uygun karbon kaynağından sonra uygun karbon kaynağı konsantrasyonunun biyosüpfektan sentezine etkisini araştırdığımız çalışmamızda %2 glukoz konsantrasyonunda, diğer konsantrasyonlara kıyasla biyosüpfektan üretimi daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3). Bu konsantrasyonda biyosüpfektan üretimi en yüksek değerdedir ve konsantrasyonun artması biyosüpfektan üretimini ters yönde etkilemektedir. Ramana ve ark., (1991)'nin konu ile ilgili yaptığı çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir (12).

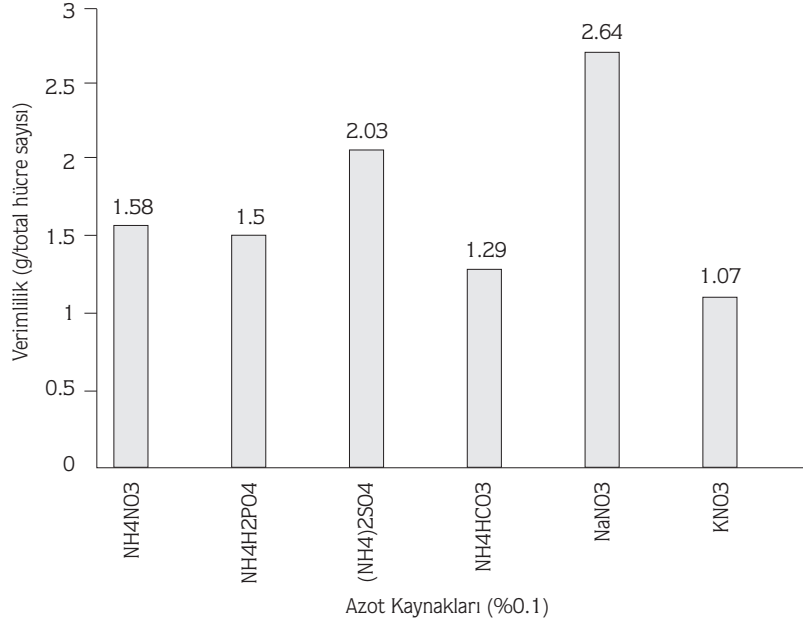
Biyosüpfektan üretiminde kültür ortamına ilave edilen azot kaynağı türünü saptamak amacıyla; değişik azot kaynakları (NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NaNO_3 , KNO_3), temel besi yeri olarak kullanılan ve zeytinyağı fabrikası atığı içeren (1/10 V/V) sıvı besiyerlerine ilave edilmiştir. Bulgulara göre en yüksek biyosüpfektan verimi NaNO_3 (Sodyum nitrat) kullanılan ortamda elde edilirken, en düşük verim ise KNO_3 (potasyum nitrat) içeren ortamda saptanmıştır (Şekil 5). Bu sonuçlara göre nitrat azotu amonyum azotundan daha iyi metabolize edilmektedir.



Şekil 4. Farklı Karbon Kaynaklarında Üretilen *Pseudomonas sp.* A01 Suşunda Rhamnolipid Verimliliği. (Şekildeki rhamnolipid verimliliği= sentezlenen rhamnolipid (g)/toplam hücre sayısı x 10^{-9} olarak gösterilmiştir).

Ramana ve Karanth (1989), Mulligan ve Gibbs (1989) da nitrat azotunun amonyum azotundan daha iyi metabolize edildiğine işaret etmiş ve biyosüpfektan fermentasyonunda azot kaynağı olarak NaNO_3 kullanmışlardır (22, 28). Azot kaynağı kadar azot kaynağı konsantrasyonu da biyosüpfektan sentezini etkileyen önemli bir faktördür. Bu amaçla yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre en yüksek biyosüpfektan verimi 2.5 g/l NaNO_3 kullanılan ortamda elde edilmiştir (Tablo 4). Bu konsantrasyonda K.O.I. yükü ve total fenol değerleri de en uygun düzeydedir. NaNO_3 konsantrasyonunun artması ya da azalması ile biyosüpfektan üretimi arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Mercadé ve arkadaşları (1993)'de yaptıkları çalışma sonucunda benzer sonuçlar elde etmişlerdir (1).

Çeşitli metabolitlerin biyosentezinde kültür ortamındaki karbon/azot (C/N) oranı önemli rol oynamaktadır. Fermentatif ürünlerin verimliliğini artırmak için uygun karbon/azot oranının gerekliliği ve önemi çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (28, 29). Bu amaçla yapılan çalışmada, değişik miktarlarda karbon ve azot kaynağının *Pseudomonas sp.* A01 kültürlerindeki biyosüpfektan verimine etkisi incelenmiştir. Bulgulara göre değişik miktarlarda karbon ve azot kaynağı içeren kültürlerdeki üremenin ve biyosüpfektan üretiminin C/N oranının 2.5 olduğu durumda en yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 5). Azot miktarının artması biyokitleyi arttırmakta, buna karşın biyosüpfektan verimini düşürmektedir. Uygun miktarda bulunan azot



Şekil 5. Farklı Azot Kaynaklarında Üretilen *Pseudomonas* sp. A01 Suşunda Rhamnolipid Verimliliği. (Şekildeki rhamnolipid verimliliği= sentezlenen rhamnolipid (g)/toplam hücre sayısı x 10⁻⁹ olarak gösterilmiştir).

kültür ortamında hızlı bir şekilde kullanılmakta ve sekonder metabolizmaya geçişi hızlandırmaktadır. Nitekim konu ile ilgili benzer sonuçlar Singer ve Finnerty (1990), Raman ve Karanth (1989) tarafından da gösterilmiştir (22, 27).

Hem doğal hem de sentetik sürfektanlar uzun yıllardan beri ticari amaçla çok çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle makina sanayi ve motor yağları endüstrisinde, çevre biyoteknolojisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik sanayiinde her gün artan hammadde talebini karşılamak amacıyla sürfektan elde etme proseslerini geliştirme yönündeki projeler hızlanmıştır. Ülkemizde ise üretim prosesleri yerine hammadde ithali önemli döviz kaybına yol açmaktadır.

Sonuç olarak bütün çalışmalarımızda çok değişik endüstrilerde önemli bir hammadde olan biyosürfektanın bakteriyal kaynaklardan eldesi araştırılmıştır. Bu amaçla bakteri izolasyonu yapılmış, bakteri üremesine ve biyosürfektan sentezine etkili kültürel parametreler incelenmiştir. elde ettiğimiz bulgular *Pseudomonas* sp. A01 olarak isimlendirdiğimiz suşun biyosürfektan eldesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu suşun verimliliğini arttırma yönündeki çalışmalar bundan sonraki aşamalarda gözönüne alınacaktır. Yaptığımız bu çalışmanın konu ile ilgili bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

Kaynaklar

1. Mercadé, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., Andrés, C.De, Guinea, J., 1993, Olive Oil Mill Effluent (OOME), New Substrate for Biosurfactant Production. *Bioresource Technology*, 43, 1-6.
2. Hamdi, M., 1991, Effects of Agitation and Pretreatment on the Batch Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewater. *Bioresource Technology*, 36, 173-178.
3. Hamdi, M., Festino, C., Aubart, C., 1992, Anaerobic Digestion of Oil Mill Wastewaters in Fully Mixed Reactors and in Fixed Film Reactors. *Process Biochemistry*, 27, 37-42.
4. Ercoli, E., Etrola, R., 1983, SCP from Olive Black Water. *Biotechnol. Lett.*, 5(7), 457-462.
5. Federici, F., Montedoro, G., Servili, M., Petrucciolo, M., 1988, Pectic Enzyme Production by *Cryptococcus albidus* on Olive Vegetation Waters Enriched With Sun-flower Calathide Meal. *Biological Wastes*, 25, 291-301.
6. Fiestas, J.A., 1986, Current Status of Research and Technology Concerning the Problems Posed by Vegetation Water. In *International Symposium on Olive Oil By-Products Valorization*.
7. Mercadé, M.E. and Manresa, M.A., 1994, The Use of Agroindustrial By-Products for Biosurfactant Production. *J of the Am. Oil Chem. Society.*, 71(1), 61-64.
8. Parra, J.L., Guinea, J., Manresa, M.A., Robert, M., Mercadé, M.E., Commelles, F., Bosch, M.P., 1989, Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66(1), 141-145.
9. Sidal, U., 1997, *Pseudomonas sp.* ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biyosüpfektan Eldesi. Doktora Tezi, TrakyaÜniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
10. Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M., 1991, Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria: Product, Characterization and Evaluation. *ACTA Biotechnologica*, 11(4), 315-324.
11. Ramana, K.V., Karanth, N.G., 1989, Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotech. Lett.*, 11(6), 437-442.
12. Ramana, K.V., Charyulu, N.C.L.N., Karanth, N.G., 1991, A Mathematical Model for the Production of Biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: Production of Biomass. *J. of Chem. Tech. and Biotech.*, 51(4), 525-538.
13. Prescott, M.L., Harley, P.J. and Klein, A., 1990, *Prokaryotic Cell Structure and Function: Microbiology*, Kane, K. (ed.), Wm. C. Brown Publishers, USA, s.49-51.
14. Prescott, M.L., Harley, P.J. and Klein, A., 1990, *The Bacteria: Microbiology*, Kane, K. (ed.), Wm.C.Brown Publishers, USA, s.430-431.
15. Rose, N.R., Barron, A.L., 1983, *Microbiology: Basic Principles and Clinical Applications*. MacMillan Publishing Company, New York, p.181-185.
16. Çetin, E.T., 1973, Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, Sermet Matbaası, İstanbul, s.390-391.
17. Gürgün, V., Halkman, A.K., 1988, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No.7, San Matbaası, Ankara, s.68-70.
18. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, Colorimetric Method of Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
19. Miller, G.L., 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
20. Rand, M.C., Arnold, E., Michael, J.T., 1975, *Standard Method for Examination of Water and Wastewater*, 14th Edition, 543-554.
21. Rodier, J., 1975, *Analysis of Water*. John Wiley and Sons (ed.), Halsted Press, New York, s.354-360.

22. Ramana, K.V., Karanth, N.G., 1989, Factors Affecting Biosurfactant Production Using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 Under Submerged Conditions. *J. of Chem. Tech. and Biotech.*, 45(4), 249-258.
23. Perez, J., Ramos-Cormenzana, A., Martinez, J., 1990, Bacteria Degrading Phenolic Acids Isolated on a Polymeric Phenolic Pigment. *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 1, 38-42.
24. Rocha, C., San Blas, F., San Blas, G., Vierma, L., 1992, Biosurfactant Production by Two Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. of microbiology Biotechnology*. 8(2), 125-128.
25. Sylatk, C., and Wagner, F., 1987, Production of Biosurfactants. In *Biosurfactants and Biotechnology*. (ed.) N. Kosaric, W.L. Cairns and N.C.C. Gray. Marcel Dekker, New York, p.89-120.
26. Guerra-Santos, L. Kapeli, O., Fiechter, A., 1984, *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 301-305.
27. Singer, M.E.V., Finnerty, W.R., 1990, Physiology of Biosurfactant Synthesis by *Rhodococcus* species H13-A. *Canadian J. of Microbiol.*, 36(11), 741-745.
28. Mulligan, C.N., Gibbs, B.F., 1989, Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 55(11), 3016-3019.
29. Rosenberg, E., 1993, Exploiting Microbial Growth on Hydrocarbons-New Markets *Tib. Tech.*, October, 11, 419-424.