Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR
(Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)
Yıl: 2010 Cilt: 08 Sayı: 1 Sayfa: 20-30
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702100102.pdf

Süt Fabrikası Atıksuyundan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosürfektan Üretimi: Optimum Koşullarının Araştırılması

Fadime Yılmaz[1], Aysun Ergene[1], Emine Yalçın[2]

Özet

Bu çalışmada süt endüstrisi atık sularından izole edilen farklı mikroorganizmalar ile biyosürfektan eldesi ve peyniraltı suyunun biyolojik kullanılabilirliği çalışılmıştır. Bu amaçla Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası'ndan alınan atık su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. İzolatların biyosürfektan üretme yeteneklerini belirlemek için "drop-collapse" yöntemi uygulanmıştır ve üç izolatın, *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia*'nın biyosürfektan üretebildikleri tespit edilmiştir. *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* tarafından sentezlenen biyosürfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır. İzolatların MSM kültür ortamında ürettikleri biyosürfektan miktarların fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiş ve BS-I, BS-II ve BS-III için sırasıyla 728, 827 ve 656 mg/L olarak bulunmuştur. Biyosürfektan madde üretimi üzerine optimum koşulları belirlemek için pH etkisi, azot kaynağı, karbon kaynağı, EDTA konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır.

Belirlenen optimum koşullar ile modifiye edilen peyniraltı suyu, biyosürfektan madde üretiminde temel besiyeri olarak kullanılmıştır. İzolatlar, biyosürfektan üretimi için peyniraltı suyu ile 10 gün süreyle 35^{o}C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında peyniraltı sularından elde edilen BS-I, BS-II ve BS-III miktarları sırasıyla 946 mg/L, 992 mg/L ve 1115 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma, süt endüstrisi atıklarından biri olan peyniraltı suyunun, biyosürfektan üretimi için ucuz ve uygun mikrobiyal büyüme sağladığını ve ticari ölçekte biyosürfektan üretiminde peyniraltı suyunun sentetik ortamlara göre daha iyi substrat olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosürfektan, peyniraltı atık suyu

[1] Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-Posta adresi: y.fadime@gmail.com [2] Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun

Giriş

Sürfektan maddeler, suyun yüzey gerilimini düşüren amfipatik bileşiklerdir. Bu nedenle "yüzey aktif" maddeler olarak anılırlar. Farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik gösterirler (1). Sürfektanlar kimyasal olarak ya da mikrobiyolojik olarak üretilebilirler. Mikroorganizmalar özellikle suda karışmayan substratlarda gelişmeleri boyunca sürfektan bileşikleri çoğunlukla oksijenli ortam koşullarında sentezler. Biyosürfektanlar karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler (2). Yapısal farklılıkları (glikolipidler, lipopeptidler, yağ asitleri gibi), düşük toksisiteleri, biyolojik olarak parçalanabilmelerinden dolayı bu moleküller yaygın bir şekilde kozmetikte, ilaç, gıda sanayinde emülsifier, ıslatıcı-nemlendirici, koruyucu madde ve deterjan olarak kullanılmaktadırlar. Biyosürfektanlar ekonomik olarak çeşitli substratlardan başta bitkisel yağlar, içki ve süt sanayi atıkları gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilebilirler (3). Özellikle fermentasyon teknolojisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyosürfektanlar, metallerle kompleks oluşturma eğilimindedirler (4). Bu çalışmada, çevre kirliliği unsuru olan peyniraltı suyu kullanılarak biyosürfektan eldesi amaçlanmıştır. Peyniraltı suyu, süt bileşenlerinden laktoalbumin ve laktogulobilin gibi serum proteinleri ile değişen düzeylerde laktoz, yağ, mineral madde, proteinler içeren ve peynir yapımı sırasında süzme sonucunda oluşan önemli bir yan üründür (5). Süt endüstrisinde toplam kirlilik yükünün büyük kısmını peyniraltı suları oluşturmaktadır (6). Bu çalışmanın amacı, süt fabrikası atık sularından izole edilen mikroorganizmaların peyniraltı suyu kullanılarak biyosürfektan üretimi üzerine optimum koşulları belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Mikroorganizma

Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalar Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan, steril şişe içerisine alınan su örneklerinden izole edilmiştir. 0.1 ml örnek, L bagetle Muller Hinton Agar besiyerine aktarılmış ve 35 ^{o}C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerin saflaşana dek çizgi ekimleri yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların koloni ve mikroskobik özellikleri incelenerek, biyokimyasal testler (IMViC, hemoliz, okdidaz, Gram boyama vb.) ile identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon için gerekli biyokimyasal testler BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System kitleri, API kiti ve VITEK 2 cihazı (Biomerieux) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Stok bakteri kültürlerinin hazırlanması amacı ile mikroorganizmalar yatık Muller Hinton Agar besiyerine ekilerek 48 saat süreyle üretilip bu süre sonunda daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4^{o}C'de saklanmıştır. Tüm ekim ve pasajlama işlemleri steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizmaların Üretilmesi

Mikroorganizma üretimi için temel besiyeri Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri (g /L olarak; $NaNO_3$ 4.0; NaCl 1.0; KCl 1.0; $CaCl_2.2H_2O$ 0.1; KH_2PO_4 3.0¸ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 3.0; $MgSO_4$ 0.2; $FeSO_4.7H_2O$ 0.001; $FeCl_3.6H_2O$ 0.008; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.75; $CoCl_2.6H_2O$ 0.08; $CuSO_4.5H_2O$ 0.075; $MnSO_4.H_2O$ 0.75; H_3BO_3 0.15; $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.05) kullanılmıştır. Besiyerinin pH değeri 6.8 olarak ayarlandıktan sonra 121^{o}C'de 1 atm basınç altında 30 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Ekim ve kültürasyon

Daha önce hazırlanan stok kültürleri kullanılarak mikroorganizmalar steril MSM kültürlerine aktarılmıştır. Bu amaçla tüm izolatlardan Mc Farland 2 (%1'lik H_2SO_4 çözeltisinden 9.8 ml + %1'lik $BaCl_2$ çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklıkta steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ilave edilerek homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan MSM besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon, 35 ^oC'de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (Heidolph Ins., Unimax 1010) gerçekleştirilmiştir.

Kültürlerde biyosürfektan varlığının saptanması

Mikroorganizma kültürlerinde biyosürfektan üretiminin belirlenmesi için Bodour ve arkadaşlarının rapor ettiği "drop-collapse" yöntemi kullanılmıştır (7). Bu yöntem için 96 kuyucuğa (microwell plate) sahip bir platform kullanılmıştır. Kuyucuklar ilk olarak 7 µl mineral yağ ile kaplanmıştır. Kontrol sıvısı olarak da steril su ve ekim yapılmamış besiyeri kullanılmıştır. Kültürler 10000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında süpernant Millipore Filtrasyon sistemi ile steril edilmiştir. Elde edilen son filtrat, biyosürfektan varlığı için "drop collapse" yöntemi ile test edilmiştir. Su ve filtratlardan alınan 25µl'lik örnekler 45 ^oC'lik açı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma ya da stabil kalma durumları gözlenerek biyosürfektan varlığı belirlenmiştir.

Kültürlerde biyosürfektan miktarının ölçülmesi

Kültürlerde biyosürfektan miktarı, Saha ve Brewer'in önerdiği fenol sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir(8). İlk olarak kültürler 10000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernant Millipor seti ile filtre edilmiştir ve filtrat biyosürfektan miktarının tayininde kullanılmıştır. Bu amaçla 1.0 ml örnek, 1.0 ml fenol (% 5) ve 3.0 ml H_2SO_4 (% 98) vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Oluşan renkli (sarı-turuncu) bileşik spektrofotometrik olarak 480 nm'de ölçülmüştür. Standart L-Ramnoz çözeltileri (0.1-1.0g/L) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi, biyosürfektan madde miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu çalışmada maksimum miktarda biyosürfektan elde edebilmek için çeşitli sistem parametrelerinin biyosürfektan üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH, $NaNO_3$ konsantrasyonu ve karbon kaynağının biyosürfektan üretimi üzerine etkisi belirlenmiştir. Peyniraltı suyu, elde edilen veriler doğrultusunda optimum koşullar ile modifiye edilmiştir.

Peyniraltı suyundan biyosürfektan eldesi

Biyosürfektan üretiminin optimum olduğu sistem parametreleri (pH, karbon kaynağı, $NaNO_3$ ve EDTA konsantrasyonu gibi) belirlendikten sonra, optimum koşullar uygulanarak mikroorganizmalar ile atık sulardan maksimum biyosürfektan üretimi sağlanmıştır. Peyniraltı sularından biyosürfektan eldesi için, atık su örnekleri besiyeri olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmalar, 35 ^oC'de 10 gün süre ile atık suyu içeren

besiyerinde inkübe edilerek, kültürlerdeki biyosürfektan miktarı fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Kültür ortamından biyosürfektanın ayrıştırılması için, kültürler 5000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Biyosürfektan presipitasyonu için santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant, 6 N H_2SO_4 ile çözelti pH'ı 2.0 noktasına ulaşana dek asidifiye edilmiştir. Çökelti kloroform/metanol (1:1, v/v) karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Evaporatör ile çözücünün ortamdan uzaklaştırılması sağlanarak, elde edilen ekstrakt toplanmıştır ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon

Ankara Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan alınan su örneklerinden beş farklı koloni tipi ayırt edilmiştir. İdentifikasyon sonrasında izolatlar *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır. Literatürde süt fabrikası atık suları ile ilgili çok çeşitli çalışmalara rastlanmaktadır. Süt atıkları florasını araştıran bir çalışmada, Thanomsub ve arkadaşları (9), süt fabrikası atıklarından *Pseudomonas aeruginosa* B189'u izole etmiş ve bu suşun ürettiği ramnolipitin, biyolojik aktivitesini ve kimyasal yapısını incelemişlerdir**.** Rajeshkumar ve Jayachandran (10) tarafından yapılan fizyokimyasal ve biyolojik analizler sonucunda, süt fabrikası atık sularının KOİ değerinin yüksek ve pH değerininin de 6.4 olduğunu belirtmişler ve bu sulardan *Sporolactobacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. ve *Proteus* sp. gibi çeşitli bakteri suşlarını izole edip tanımlamışlardır. Babu ve arkadaşlarının (11) yaptığı bir diğer çalışmada, süt fabrikası atıklarından *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Neisseria* sp. ve *Lactobacillus* sp. mikroorganizmalarını izole edip tanımlamışlardır.

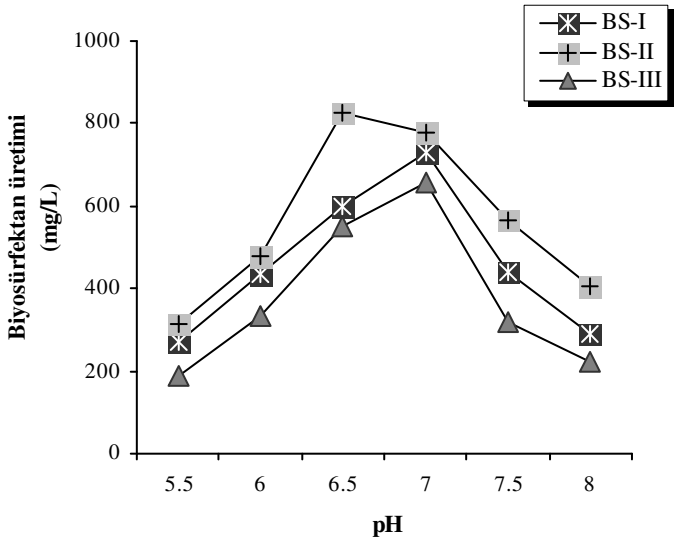
Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfektan varlığının saptanması için MSM besiyerinde üretilmiş *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* kültürleri 20 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatantlar, su ve ekim yapılmamış besiyeri örnekleri, mineral yağ ile kaplanmış microwell plate içerisindeki kuyucuklara enjekte edilmiştir. Su ve ekim yapılmamış besiyeri örneklerinin boncuk şeklini aldığı, izolatlara ait kültür örneklerinde ise kuyucuklardaki damlaların yayıldığı gözlenmiştir. İzolatlar tarafından biyosurfektan üretiminin saptanması sonrasında *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen biyosürfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır.

Kültürlerde biyosürfektan miktarının ölçülmesi

Y. lipolytica, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından biyosürfektan üretimi saptandıktan sonra kültürlerdeki biyosürfektan miktarı belirlenmiştir. Temel MSM besiyerinde *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen biyosürfektan miktarları sırası ile 728, 827 ve 656 mg/L bulunmuştur. Kahyaoğlu ve Konar'ın (12) yaptığı çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 suşu ile besiortamı olarak şeker fabrikası atık maddesi olan % 5'lik melas kullanılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında 0,78 g/L ramnolipid elde edildiği gözlenmiştir. Patel ve Desai'nin (13), karbon kaynağı olarak

melas ve mısır likörünü kullandıkları çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* GS3 kültürlerinde 0,25 g/L ramnolipid elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Tüm izolatlar için biyosürfektan üretimi üzerine pH etkisi 5.5-8.0 aralığında incelenmiştir ve bütün izolatların 5.5.-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük biyosürfektan üretimi gösterdiği, pH 6.5-7.0 aralığında ise yüksek biyosürfektan üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *B. cepacia* ve *Y. lipolytica* için en yüksek biyosürfektan üretimi pH 7.0'de sırası ile 675 ve 763 mg/L olarak gözlenmiştir. *M. luteus* için maksimum biyosürfektan miktarının, pH 6.5'de 856 mg/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Literatür çalışmalarında genellikle pH 6.5-7.0 aralığında biyosürfektan üretiminin arttığına dair veriler bulunmaktadır. Cooper ve Goldenberg'in (14) yaptığı bir çalışmada ise *Bacillus* sp.'nin pH 6.5-7.0 aralığında biyosürfektan sentezini arttırdığı görülmüştür. pH 5.5'e düştüğünde hem bakteriyal büyüme hem de biyosürfektan madde sentezi azalmıştır. *Rhodococcus*'un pH 6.5-7.2 aralığında maksimum biyosürfektan üretip yüzey gerilimini düşürdüğü bildirilmiştir (15).

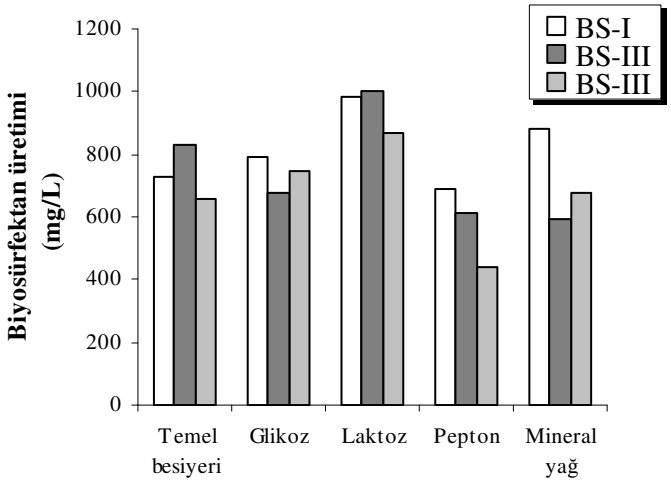


Şekil 1. Biyosürfektan üretimi üzerine pH etkisi

Biyosürfektan üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi glukoz, pepton, laktoz ve mineral yağ kaynakları içeren ortamlarda test edilmiştir. Kültürlerde en yüksek ve en düşük biyosürfektan miktarı tespit edilmiştir. *B. cepacia*, laktoz içeren ortamda maksimum biyosürfektan üretimi gösterirken (867 mg/L), en düşük üretim kapasitesini pepton içeren ortamda (440 mg/L) göstermiştir. *M. luteus* en fazla üretim kapasitesine laktoz içeren ortamda ulaşırken (1005 mg/L), mineral yağ bulunan ortamda 595 mg/L'lik kapasite ile düşük biyosürfektan üretimi sergilemiştir. *Y. lipolytica* ise *B. cepacia* ile benzer şekilde en fazla laktozlu besiyerinde 986 mg/L, en az peptonlu ortamda (691 mg/L) biyosürfektan üretimi göstermiştir (Şekil 2). Yakimov ve arkadaşları (16) % 2'lik sükroz ve glikozun *Bacillus licheniformis* BAS 50 suşunun biyosürfektan üretiminde en iyi karbon kaynakları olduğunu ve 160 mg/L ürün elde edildiğini bildirmiştir.

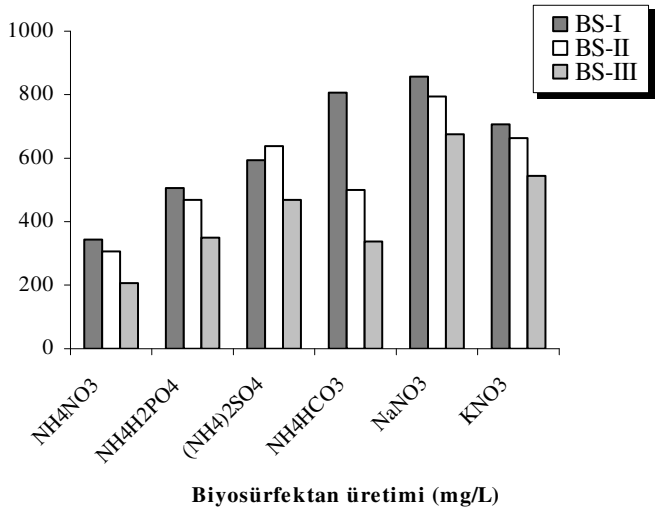
Sıdal ve arkadaşları (17) zeytinyağı fabrikası atığı ile kontamine olmuş toprak ve su örneklerinden izole ettiği ve biyosürfektan sentezleme yeteneğinde olan *Pseudomonas* sp. A01 suşu ile zeytin yağ fabrikası atıklarını kullanarak 0.875 g/L

biyosürfektan üretildiğini gözlemlemişlerdir. Biyosürfektan üretim aşaması sekonder mikrobiyal metabolik proses olarak öne sürülmüştür. Rashedi ve arkadaşları (18) İran'ın güney bölgesinde bir petrol kuyusundan *P. aeruginosa* izole etmişlerdir. Bu suş benzin, parafin, gliserol ve peyniraltı suyunu kullanarak ramnolipid üretebilmiştir. % 5'lik gliserol varlığında 2.8 g/L maksimum ramnolipid üretirken, kültür ortamının yüzey gerilimini de 73 mN/m'den 32 mN/m'ye düştüğü gözlenmiştir.



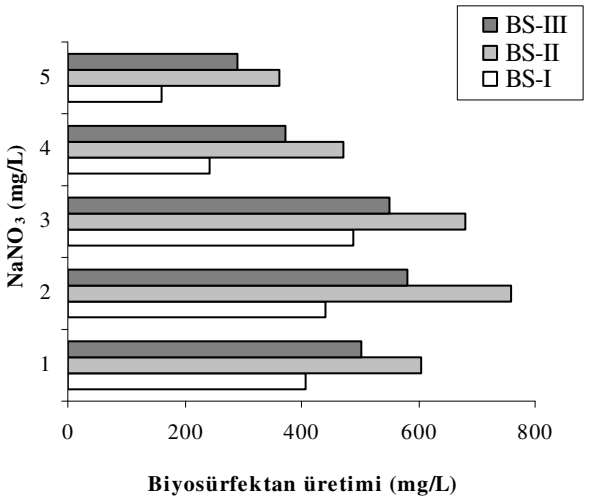
Şekil 2. Farklı karbon kaynaklarının biyosürfektan üretimi üzerine etkisi

Azot kaynağının biyosürfektan üretimi üzerine etkisini belirlemek için temel besiyeri bileşimine NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4HCO_3, $NaNO_3$ ve KNO_3 azot kaynakları ilave edilmiştir. *B. cepacia*, *M. luteus* ve *Y. lipolytica* izolatları için diğer azot kaynaklarına kıyasla $NaNO_3$ içeren besiyerinde biyosürfektan üretimi açısından daha yüksek verim elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 Farklı azot kaynaklarının biyosürfektan üretimi üzerine etkisi

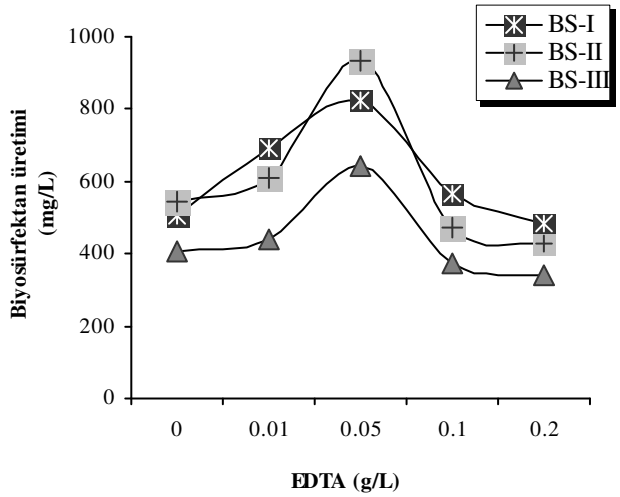
Optimum azot kaynağı konsantrasyonunu tespit etmek için farklı oranlarda $NaNO_3$, besiyeri ortamına ilave edilmiş ve en iyi sonuç Şekil 4'de görüldüğü gibi 1g/L'lik derişimde bulunmuştur. Desai ve Banat (1) *Pseudomonas* 44T1 ve *Rhodococcus* ST-5 ile biyosürfektan üretiminde en uygun azot kaynağının nitrat olduğunu belirtmişlerdir. Guerra-Santos'a göre (19) glutamin-glutamat metabolizması tarafından nitrat, amonyuma göre daha yavaş ve daha iyi metabolize olmaktadır. Bu yüzden nitrojen, sınırlı bir şekilde ortama verildiğinde biyosürfektan miktarının arttığını saptamışlardır. Sınırlı miktarda ortama azot verildiğinde *P. aeruginosa* ve *C. tropicalis* ITP-4'ün biyosürfektan üretimini arttırdığı gözlenmiştir (1). Abouseouda ve arkadaşları (20), *Pseudomonas fluorescens*'in biyosürfektan üretimi üzerine optimum azot kaynağı etkisini araştırmak için 1 g/L NH_4Cl, $NaNO_3$ ve NH_4NO_3 kullanmışlar ve sonuçta $NaNO_3$ ile NH_4NO_3'ün en iyi azot kaynakları olduğunu belirlemişlerdir. NH_4Cl, içerisindeki amonyum tuzu biyosürfektan üretiminde değil, bakteriyel büyümede kullanılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada optimum azot kaynağı konsantrasyonunu tespit etmek için farklı oranlarda $NaNO_3$ besiyeri ortamına ilave edilmiş ve en iyi sonuç 1g/L'lik derişimde bulunmuştur.



Şekil 4. Azot kaynağı olarak kullanılan $NaNO_3$ konsantrasyonunun biyosürfektan üretimi üzerine etkisi

Hücre duvarı geçirgenliğini arttırdığı düşünülen EDTA'nın biyosürfektan üretimine etkisi Şekil 5'de verilmiştir. 0.01-0.05 g/L aralığındaki düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığının biyosürfektan üretimini artırdığı 0,1 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarında ise bakteri gelişiminin ve buna bağlı olarak biyosürfektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Sonuçta en yüksek biyosürfektan üretimi 0.05 g/L EDTA konsantrasyonunda gözlenmiştir ve *Y. lipolytica*, *M. luteus*, *B. cepacia* için sırasıyla 825, 932 ve 645 mg/L olarak bulunmuştur. Literatürde EDTA konsantrasyonuna, mikroorganizma ve kültür ortamına bağlı olarak biyosürfektan üretiminin arttırılabildiği ya da baskılanabildiği ile ilgili veriler yer almaktadır. Düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığı ile biyosürfektan üretiminin artması hücre geçirgenliğinin artması, besinlerin hücre içerisine daha kolay alınması ve daha çok metabolit üretilmesi ile açıklanabilir. *Pseudomonas* hücrelerine ait dış membranlar Mg (II) iyonları ve lipopolisakkaritlerin kovalent olmayan çapraz bağlarla etkileşimi ile stabil hale gelmektedir.

Düşük miktarlarda EDTA Mg (II) iyonları ile etkileşime girerek dış membran akıcılığında ve bütünlüğünde değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişimler dış membranın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Besiortamında EDTA miktarının arttırılması ile biyosürfektan üretiminin azalması, MSM besiyeri bileşiminde bulunan ve mikroorganizmaların üremesi için gerekli Mn(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II) ve Co(III) metallerinin EDTA ile kompleks oluşturması ile açıklanabilir. EDTA, yapısında dört karboksilat ve iki amin grubu içermektedir ve bu gruplar EDTA'nın metallerle kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. EDTA özellikle Mn(II), Cu(II), Fe(III), Pb (II) ve Co(III) metal iyonları ile güçlü kompleksler oluşturmaktadır. EDTA-metal kompleksinin oluşması ile mikroorganizmaların bu metallere erişimi kısıtlanmakta, mikroorganizma metabolizmasında ve metabolit üretiminde aksamalar meydana gelmektedir.



Şekil 5. Biyosürfektan üretimi üzerine EDTA etkisi

Mikroorganizmalar tarafından ihtiyaç duyulan bu metaller biyokimyasal reaksiyonların katalizasyonunda, bazı enzimlerin ve kofaktörlerin yapısında yer almaktadırlar. Ortamda çok az bulunan ve hücreler tarafindan da çok az miktarda ihtiyaç duyulan böyle elementler, iz elementler olarak tanımlanmaktadır. Bu elementlerin noksanlığı veya azlığı bakterilerin üremelerini ve gelişmelerini olumsuz yönde etkilemektedir. İz elementlerden, demir, elektron transport mekanizması ve sitokrom sentezi için önemlidir. Nitratların redüksiyonunda ve melanin sentezinde bakır önemli bir role sahiptir. Manganez nitrat redüksiyonları için, çinko ise alkol dehidrogenaz aktivitesi ve sitokrom-c'nin sentezi için gereklidir. Mikrobiyal metabolizmada farklı yollarda işlev gören bu elementlerin EDTA ile uzaklaştırılması ya da maskelenmesi, ilgili yollarda aksamalara neden olacaktır ve bu yolla metabolit üretimide azalacaktır. *Rhodococcus erythropolis*'in biyosürfektan üretiminde EDTA'nın etkisinin oduğu ve biyosürfektan üretimini arttırdığı belirlenmiştir. *Pseudomanas* sp. 2874 suşunda ortama verilen EDTA'nın, ramnolipid üretimini engellediği saptanmıştır (21). Literatürde yer alan bilgiler elde ettiğimiz verileri desteklemektedir

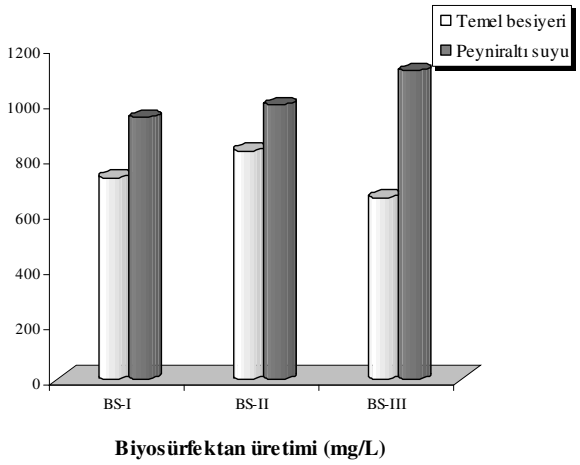
.

Peyniraltı suyundan biyosürfektan eldesi

Biyosürfektan üretiminin optimum olduğu sistem parametreleri (pH, Karbon kaynağı, $NaNO_3$ ve EDTA konsantrasyonu) belirlendikten sonra, optimum koşullar mikroorganizmalar ile peyniraltı atık su örneğine uygulanmıştır.

Mikroorganizmalar, besiyeri olarak kullanılan peyniraltı suyunda 35 ^oC'de 10 gün süre ile muamele edilmiş ve kloroform/metanol ekstraksiyonu sonrasında biyosürfektan katı halde elde edilmiştir. Sonuç olarak maksimum biyosürfektan üretimi sağlanmıştır.

Şekil 6'da görüldüğü gibi *Y. lipolytica*, temel MSM besiyerinde 728 mg/L biyosürfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 946 mg/L biyosürfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosürfektan miktarının 1.3 kat arttığı gözlenmiştir. *M. luteus*, temel MSM besiyerinde 827 mg/L biyosürfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 992 mg/L biyosürfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosürfektan miktarının 1.2 kat arttığı gözlenmiştir. *B. cepacia*, temel MSM besiyerinde 656 mg/L biyosürfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 1115 mg/L biyosürfektan üretmiştir.



Şekil 6. Peyniraltı suyundan biyosürfektan üretimi

Peyniraltı suyunda biyosürfektan miktarının 1.7 kat arttığı gözlenmiştir. Rodrigues ve arkadaşları (22) *Lactobacillus pentosus* ile peyniraltı suyunu kullanarak 72 saatlik inkübasyon sonrasında 1.4 g/L maksimum biyosürfektan elde etmişlerdir. Dubey ve Juwarkar (23) biyosürfektan üretmek için *Pseudomonas aeruginosa* BS2 suşu ile peyniraltı suyunu kullanmıştır. 48 saatlik inkübasyonda 0.92 g/L biyosürfektan gözlenmiştir. Peyniraltı suyunda üç izolatımızın da biyosürfektan madde miktarını attırdıkları görülmüştür. Çalışma kapsamında süt fabrikası atıklarından biri olan peyniraltı sularının biyosürfektan üretiminde optimum koşulları belirlenmiş ve maksimum miktarda ürün elde edilmiştir. Ayrıca çevre için önemli bir tehdit unsuru olan bu sular biyolojik olarak arıtılmıştır.

Kaynaklar

1. Desai, J. D. and I, M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61;47–64.

2. Uysal, A.,Türkman A., 2004, Klorofenollü Bileşiklerin Ayrışabilirliğinin Biyosürfektan Kullanımı ile Hızlandırılması, SSKD Cilt 14,Sayı 2 Sh , 23-30.

3. Makkar, R.S. and 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.

4. Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Oliveira R., 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine Biochemical Engineering Journal, 32; 135–142.

5. Sözer, S. ve Yaldız O., 2006, Sığır gübresi ve peyniraltı suyu karışımlarından biyogaz üretimi üzerine bir araştırma, 19; 179–183.

6. Yiğit, N. 2007. Peyniraltı suyundan sürekli sistemde biyogaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi. Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, ,98.

7. Bodour A. and Miller-Maier R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technigue for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms Journal of Microbiological Methods, 32; 273-280.

8. Saha S.K., and Brewer C.F.,1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method Carbohydrate Research, 254; 157-167.

9. 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.

10. Rajeshkumar K. and Jayachandran K., 2004. Treatment of dairy wastewater using a selected bacterial isolate, *Alcaligenes* sp. MMRR., Appl Biochem Biotechnol.;118; 65-72.

11. Ramesh Babu B., Maruthamuthu S., Rajasekar A., Muthukumar N. and Palaniswamy N., 2006. Microbiologically influenced corrosion in dairy effluent. Int. J. Environ. Sci. Tech., 3; 159-166.

12. Kahyaoğlu, M. ve Konar, V. 2006. Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan Ramnolipit Biyosürfektanı Elde Edilmesi Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. J of Fırat Univ, 18; 493-498.

13. Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses.Lett. Appl. Microbiol., 25: 91-94.

14. Cooper D. and Goldenberg B., 1987. Surface-active agents from two Bacillus species. Appl Environ Microbiol., 53; 224–229.

15. Tabatabaee, A., Mazaheri Assadi, M., Noohi A. A. and Sajadian, V. 2005. A Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2; 6-12.

16. Yakimov M.M., Timmis K.N., Wray V. and Fredrickson H.L.1995. Characterization of a new lipopetide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50. Appl. Environ. Microbiol., 61; 3276–3282.

17. Sıdal, U., Kolonkaya N., Kurtonur C., 2000. *Pseudomonas* sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosürfektan elde edilmesi, Turkish J. of Biology, 24: 611–625.

18. Rashedi, H., Jamshidi, E., Mazaheri Assadi M. and Bonakdarpour, B. 2005. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginos*a isolated from Iranian southern wells oil. Int. J. Environ. Sci. Tech., 2; 121-127.

19. Gautam K.K. and Tyagi,V.K. 2005. Microbial surfactants: A Review. J. Oleo Sci., 55; 155–166.

20. Abouseouda, M., Maachib R., Amranec, A., Bouderguaa S. and Nabia, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 223; 143–151.

21. Yalçın, E. 2008. Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosürfektan Eldesi ve Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 136.

22. Rodrigues, L.R., Moldes, A., Teixeira, J.A.and Oliveira, R. 2006. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. Biochem. Eng. J., 28; 109-116.

23. Dubey, K. and Juwarkar, A. 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. World J. Microbiol. Biotechnol., 17; 61–69.