

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TUZ GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK
MİKROORGANİZMALARIN SERİN PROTEAZ
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE KISMİ
SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ ARSLAN

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TUZ GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK
MİKROORGANİZMALARIN SERİN PROTEAZ
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE KISMİ
SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ ARSLAN

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ALİ ARSLAN tarafından hazırlanan **Tuz Gölünden İzole Edilen Halofilik Mikroorganizmaların Serin Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Kısmi Saflaştırılması** başlıklı tezinin, 01/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Doç. Dr. Demet ÇETİN (Jüri Başkanı)

Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı,
Gazi Üniversitesi, Ankara

İmza:



Doç. Dr. Gülten ÖKMEN (Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

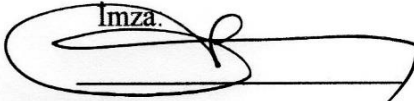
İmza:



Yrd. Doç. Dr. Ersin DOĞAÇ (Üye)

Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:




ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkan V.,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 01/08/2017

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, döküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Ali ARSLAN

01/08/2017

ÖZET

**TUZ GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK
MİKROORGANİZMALARIN SERİN PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE KISMİ SAFLAŞTIRILMASI**

Ali ARSLAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Ağustos 2017, 88 sayfa

Bu çalışmanın amacı, halofil mikroorganizmalardan serin proteaz enziminin tanımlanması, aktivitelerinin belirlenmesi ve kısmen saflaştırılmasıdır. Tuz Gölü'nden izole edilen kültürler Sehgal-Gibbons broth (SGB) ve Sehgal-Gibbons agar (SGA) ortamında yetiştirildi. Proteaz aktivitesi olan kültürler %1 skim milk içeren SGA ortamı vasıtası ile belirlenmiştir. En iyi proteaz etkinliğine sahip 3 kültür sonraki basamaklarda kullanılmıştır. En iyi proteaz aktivitesine sahip bir kültür, enzim saflaştırması için aday olarak seçilmiştir. Bu kültür, amonyum sülfat çökeltmesi ve jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırma için kullanılmıştır. Enzim % 22 saflaştırma oranı ve % 6,2 verimle elde edilmiştir. Enzimin varlığı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiş ve enzimin yaklaşık 55 kD olduğu bulunmuştur. Enzim karakterizasyonu çalışmalarında, saf enzimin aktiviteleri farklı sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu, metal iyonları, substratlar, inhibitörler ve yüzey aktif maddelerinde saptanmıştır. Optimum enzim aktivitesi 60 °C' de bulunmuştur. pH 7' de, enzim optimum aktivite göstermiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında, enzimin optimum aktivitesi % 10 NaCl ortamında bulunmuştur. Farklı metal iyonlarının kullanıldığı çalışmalarda, optimum enzim aktivitesi 1 mM MgCl₂ (% 95,9) içeren ortamda belirlenmiştir. Buna ek olarak, optimum enzim aktivitesi % 0,65 sığır serum albümin (BSA) içeren ortamda bulunmuştur. Fenil metil sülfonil florid (PMSF) enzim aktivitesini çok fazla inhibe etmesinden dolayı serin proteaz olduğunu düşündürmektedir. Farklı yüzey aktif maddelerinin kullanıldığı çalışmalarda, enzim aktivitesi sodyum dodesil sülfat (SDS)' den en fazla inhibe (% 87,5) olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Halofil, Proteaz, Serin Proteaz Aktivite, Kısmi Saflaştırma

ABSTRACT

**THE DETERMINATION OF SERINE PROTEASE ACTIVITIES OF
HALOPHILIC MICROORGANISM ISOLATED FROM TUZ LAKE AND
THEIR PARTIAL PURIFICATION**

Ali ARSLAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülten ÖKMEN

August 2017, 88 pages

The purpose of this work was to identify, determine their activities, and perform purification of this enzyme serine protease from halophilic microorganisms. The cultures isolated from Lake Tuz were grown in Sehgal-Gibbons broth (SGB) and Sehgal-Gibbons agar (SGA) media. The cultures with protease activity were determined by SGA media contain 1% skim milk. The 3 cultures with best protease activity were used at the following. The one culture with the best protease activity has been selected as candidate for enzyme purification. This culture was used for ammonium sulphate precipitation and purification by gel permeation chromatography. The enzyme was obtained with 22 % purification rate and 6.2 % yield. The presence of the enzyme was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method, and the enzyme was found to be about 55 kD. In the enzyme characterization studies, activities of pure enzyme have been determined at different temperatures, pH, salt concentrations, metal ions, substrat, inhibitors and surfactants. Optimal enzyme activity was found at 60 °C. In pH 7, enzyme showed optimum activity. At different salt concentrations, the optimum activity of enzyme has been found in 10 % NaCl containing media. In studies with the different metal ions in the medium optimum enzyme activity was determined in the medium containing 1 mM MgCl₂ (95.9 %). Additionally, optimum enzyme activity was found in the medium containing 0.65 bovine serum albumin (BSA). Since the inhibition of enzyme by phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) was dramatic, it was thought that enzyme is serine protease. In studies with different surfactants in the medium the highest inhibition (% 87.5) was due to sodium dodecyl sulfate (SDS).

Keywords: Halophile, Protease, Serine Protease, Partial Purification



Sevgili ailem' e,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve sonuçlandırılmasında emeği geçen, kendimi geliştirmem için beni teşvik edip, destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülten ÖKMEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Ersin DOĞAÇ' a teşekkür ederim.

Y. Lisans eğitimim süresince destek, hoşgörü ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Mustafa VURKUN, Biyolog Haldun ÇAKAR, Uzm. Biyolog Taner KAYNAR, Uzm. Kimyager Ceyhun IŞIK, Araş. Gör. Şükrü Sertev ÇATAV, Araş. Gör. Burcu ŞAHİN, Biyolog Abuzer GÜLER, Uzm. Biyolog Seda KANLIKAYA, Biyoloji Öğretmeni Mehabbet HANLI, Uzm. Biyolog Güven GÖKDERE, Uzm. Biyolog Merve SEZER, Uzm. Biyolog Esra DİBEK, Araş. Gör. Müjgan Kesik OKTAY, Araş. Gör. Erhan KAPLANER, Araş. Gör. Tuğba ÖREN, Araş. Gör. Mehmet VAROL, Araş. Gör. Yeşim KAYA ve Uzm. Dr. Olcay CEYLAN'a teşekkür ederim.

Her konuda desteklerini aldığım sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tuz Gölü.....	1
1.2. Halofilik Mikroorganizmalar	3
1.3. Sistematigi.....	3
1.4. Genel Özellikleri.....	4
1.5. Prokaryotik Lipid Yapıları.....	6
1.6. Halofilik Mikroorganizmalar	7
1.7. Halofilik Protein.....	9
1.7.1. Halofilik proteinlerin aminoasit kompozisyonu	9
1.8. Halofilik Mikroorganizmaların Uygulama Alanları	10
1.8.1. Fermente yiyeceklerin hazırlanması	10
1.8.2. Hidrokarbon parçalama potansiyeli	11
1.8.3. Bakteriyorodopsin.....	11
1.8.4. Biyopolimer üretimi.....	13
1.9. Antibiyotik Dirençliliği.....	13
1.10. Ozmotik Regülasyon	14
1.11. Enzimler.....	15
1.11.1. Proteaz	15
1.11.1.1. Serin Proteaz.....	16
1.11.1.2. Serin ailesi biyosentezi (Serin, Glisin, Sistein).....	17
1.12. Enzimlerin Ekonomik Değeri ve Kullanım Alanları	17
1.13. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	19
1.14. Jel Filtrasyon Kromatografisi	20
2. MALZEME ve YÖNTEM	22
2.1. Materyal	22
2.1.1. Araç, gereç ve kimyasal maddeler	22

2.1.2 Organizma.....	24
2.1.3 İzolasyon ve identifikasyon	24
2.1.4 Antibiyotik duyarlılık testleri.....	26
2.1.5 Proteolitik aktivitenin kalitatif belirlenmesi	26
2.1.6 Biyokimyasal testler.....	26
2.1.6.1 Oksidaz testi	26
2.1.6.2 Katalaz testi.....	26
2.1.6.3 İndol testi.....	27
2.1.6.4 Nitrat redüksiyonu.....	27
2.1.7 Halofil mikroorganizmaların gelişimi üzerine çevresel faktörlerin etkisinin belirlenmesi.....	27
2.1.7.1 Farklı sıcaklık değerlerinin halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	27
2.1.7.2 Farklı pH değerlerinin halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	28
2.1.7.3 Farklı karbon kaynaklarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	28
2.1.7.4 Farklı azot kaynaklarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	28
2.1.7.5 Tuzun farklı konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi.....	29
2.1.7.6 Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	29
2.1.7.7 Farklı magnezyum konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi	30
2.2 Analiz Yöntemleri	30
2.2.1 Kuru ağırlığın belirlenmesi	30
2.1.2 Toplam protein tayini ve standart eğrisinin hazırlanması.....	30
2.1.3 Toplam proteaz tayini ve tirozin standart eğrisinin hazırlanması.....	31
2.1.4 Proteaz aktivitesinin kantitatif belirlenmesi.....	31
2.1.5 Serin proteaz enziminin kısmi saflaştırılması	32
2.1.6 Jel filtrasyon kromatografisi	33
2.1.7 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	33
2.1.8 Enzim karakterizasyonu	33
2.1.8.1 Farklı sıcaklık değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi	33
2.1.8.2 Farklı pH değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi.....	34
2.1.8.3 NaCl farklı konsantrasyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi....	34
2.1.8.4 Farklı metal iyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi.....	34

2.1.8.5 Farklı substratların serin proteaz aktivitesine etkisi.....	34
2.1.8.6 Farklı inhibitörlerin serin proteaz aktivitesine etkisi.....	35
2.1.8.7 Farklı yüzey aktif maddelerin serin proteaz aktivitesine etkisi	35
3. SONUÇLAR	36
3.1. Tuz Gölü'nden İzole Edilen Kültürlerin Kalitatif Proteolitik Aktiviteleri	41
3.2. Tuz Gölü'nden İzole Edilen Kültürlerin Gelişimine Farklı Çevresel Koşulların Etkisi	41
3.3. Kantitatif proteaz aktiviteleri	46
3.4. Jel filtrasyon kromatografisi.....	46
3.5. Serin Proteaz Enzimi Saflaştırma Çizelgesi.....	48
3.6. Kısmi Saflaştırılmış Proteazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	49
3.7. Enzim Karakterizasyon Sonuçları	50
4. TARTIŞMA	55
5. ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	75
EK A. Kullanılan Malzemeler Ve Solüsyonlar	75
EK A. Standart Eğriler	81
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Tuz Gölü suyunun kimyasal bileşimi	2
Çizelge 1.2. Tuz Gölü suyunun pH, yoğunluk ve sıcaklık verilerinin Haziran ve Eylül farklılıkları	2
Çizelge 1.3. Arkelerin genel özellikleri	5
Çizelge 1.4. Bakteriyorodopsinin biyoteknolojik kullanım alanları	12
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları	23
Çizelge 2.6. SGA besiyerinin bileşimi	24
Çizelge 3.9. Tuz Gölünden izole edilen halofilik mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri	37
Çizelge 3.10. Tuz gölünden izole edilen halofilik mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilik profilleri.....	40
Çizelge 3.11. Kültürlerin proteaz aktivitelerinin optimizasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması.....	46
Çizelge 3.12. A22 kültürünün serin proteaz enzimine ait saflaştırma çizelgesi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tuz Gölü'nün uydu görüntüsü	1
Şekil 1.2. Bakteri ve arkelerin lipit yapısı.....	6
Şekil 1.3. Proteazların sınıflandırılması	16
Şekil 2.4. Saf kültürlerin SGB besiyeri görüntüsü.....	25
Şekil 2.5. Saf kültürlerin SGA besiyeri görüntüsü.....	25
Şekil 3.6. Kültürlerin kalitatif proteolitik aktiviteleri	41
Şekil 3.7. Farklı sıcaklık değerlerinin kültürlerin gelişimi üzerine etkisi	42
Şekil 3.8. Farklı pH değerlerinin kültürlerin gelişimi üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.9. Farklı karbon kaynaklarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi.....	43
Şekil 3.10. Farklı azot kaynaklarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi	43
Şekil 3.11. Maya özütü farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi 44	
Şekil 3.12. Magnezyum farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi 45	
Şekil 3.13. Tuzun farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi.....	45
Şekil 3.14. Jel filtrasyon kromatografisi ile toplanan fraksiyonların toplam protein sonuçları	47
Şekil 3.15. Jel filtrasyon kromatografisi ile toplanan fraksiyonların toplam proteaz sonuçları	47
Şekil 3.16. Saflaştırılmış serin proteaza ait SDS-PAGE görüntüsü.....	49
Şekil 3.17. Farklı sıcaklık değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi.....	50
Şekil 3.18. Farklı pH değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi	51
Şekil 3.19. Tuzun farklı konsantrasyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi	51
Şekil 3.20. Farklı metal iyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 3.21. Farklı doğal substratların serin proteaz aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 3.22. Farklı inhibitör maddelerin serin proteaz aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 3.23. Farklı yüzey aktif maddelerinin serin proteaz aktivitesine etkisi	54
Şekil 27. Tirozin standart eğrisi	81
Şekil 28. BSA standart eğrisi	82

Şekil 29. B7 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi.....	83
Şekil 30. B8 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi.....	84
Şekil 31. A22 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi	85



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
BSA	Sığır serum albumin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
km ²	Kilometre kare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Moleküler ağırlık
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tampon tuzu
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid jel Elektroforezi
SGA	Sehgal-Gibbons agar
SGB	Sehgal-Gibbons broth
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SPCR	Sekans Polimeraz zincir reaksiyonu
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris-hidroksimetil amino metan
V	Volt

1. GİRİŞ

1.1. Tuz Gölü

Tuz Gölü, 38° 25'-39° 10 'K ve 35° 5'- 33° 48' koordinat düzleminde 910 m yükseklikte yer almaktadır (Şekil 1.1.). İç Anadolu Bölgesinde yer alan göl, Dünya'daki önemli tuz göllerinden biridir (Kılıç ve Uyanık, 2001). Uzunluğu 85, genişliği ise 45 km'e ulaşan gölün beslenme havzası yaklaşık 16.000 km²' dir (Uygun ve Şen, 1978). Tuz Gölü, 1665 km² yüzey alanı ile Türkiye'nin ikinci büyük gölü olup, Uluslararası Ramsar Anlaşması uyarınca koruma altına alınmış ve 2000 yılında yüksek biyolojik çeşitlilik ve endemizm oranına sahip olduğu için Özel Çevre Koruma Alanı olarak ilan edilmiştir. Ayrıca göl göçmen kuşların göç, yuvalama ve üreme güzergahı üzerinde bulunmaktadır. Tuz gölü'nün farklı dönemlerde sularına ait kimyasal bileşimi incelenmiş olup, Çizelge 1.1.' de özetlenmiştir (Kılıç ve Uyanık, 2001). Tuz Gölü'nün en derin yeri doğu bölgesinde olup ortalama 1,5-2 m derinliğinde, çok tuzlu alkali ve kapalı bir göldür. Kış sezonunda yeraltı su girişleri ve yağmur akışları tarafından beslenir ancak yaz sezonunda kurumaktadır.



Şekil 1.1. Tuz Gölü'nün uydu görüntüsü (Google earth, 06/07/2017)

Çizelge 1.1. Tuz Gölü suyunun kimyasal bileşimi (Kılıç ve Uyanık, 2001)

Elementler	Haziran	Eylül
	(g/L)	(g/L)
Li	0,050	0,303
Sr	0,127	0,175
B	0,046	0,330
Br	0,935	0,642
Na	111,2	85
K	1,4	9,13
Ca	0,85	0,15
Mg	3,5	1,42
Cl	180	182
SO ₄	8,2	45

Tuz (NaCl) kolay parçalanabilen, kokusuz, suda çözünebilen, saf iken % 40 sodyum ve % 60 klordan meydana gelmekte, yoğunluğu ise 2.10-2.55 g/cm³ arasında bir maddedir. Erime derecesi 800 °C ve kaynama derecesi ise 1412 °C olan tuz, saf halde iken renksizdir ancak doğada gri, sarı, kırmızı hatta mavi ve yeşil olabilmektedir. Tuz Gölü'nde olan tuz ise çoğunlukla beyaz ve pembe görünümündedir (Birbir ve Kallı, 2000). Tuz gölü'nün Haziran ve Eylül aylarına ilişkin pH, yoğunluk, sıcaklık verileri Çizelge 1.2.' de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Tuz Gölü suyunun pH, yoğunluk ve sıcaklık verilerinin Haziran ve Eylül farklılıkları (Kılıç ve Uyanık, 2001)

pH		Yoğunluk (g/L)		Sıcaklık (°C)	
Haziran	Eylül	Haziran	Eylül	Haziran	Eylül
7,3	7,15	1,18	1,30	23	26

Tuz Gölü'nün mikrobiyolojisi üzerine yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölü'nden izole ettiği organizmaların halofilik archaea olabileceğini bildirmiş ve daha üst düzey teknikler kullanılarak bunun doğrulanması gerektiğini belirtmiştir. Birbir ve Sesal, (2003), gölden izole ettikleri mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonlarını yapmışlardır. Birbir, vd., (2007), yaptıkları bir diğer çalışmada ise, izole ettikleri 27 kültürün fenotipik karakteristiklerini ve antibiyotik duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Kemoorganotrof ve ekstrem halofil olan arkeler üzerine de bir çalışma bulunmaktadır (Madigan ve Martinko, 2006; Valera, vd., 1985; Valera, 1988; Birbir ve Kallı, 2000). Mutlu (2006) yaptığı çalışmada *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloquadrata*, *Haloterrigena* ve *Salinibacter* cinslerine ait türleri rapor etmişlerdir.

1.2. Halofilik Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal hayatın bilinen çevrelerle sınırlı kalmadığını, mikrobiyal komünitenin yüksek tuz, asidik ve alkali pH ortamlarında, yüksek sıcaklık ve basınç ortamlarında bulunabildiğini ortaya koymuştur (Van den Burg, 2003). Mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalar günümüzde moleküler tekniklere dayandığı ve moleküler düzeyde belirlendiği için (16S ve 18S rRNA) bu konu üzerindeki eksikliklere büyük katkı sağlamaktadır. Takson tanımları daha objektif bir temele oturmaya başlamıştır (Woese vd., 1990).

1.3. Sistematiği

Dünya'da yaşam Woese vd. (1990) tarafından Bacteria, Eukarya ve Archaea olmak üzere 3 domain olarak bildirilmiştir. Ekstrem koşulların çoğunda yaşayan mikroorganizmalar Archaea domainine aittir. Bu domain kendi arasında Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota ve Nanoarchaeota olarak 4 ana Phylum'a ayrılmaktadır.

1.4. Genel Özellikleri

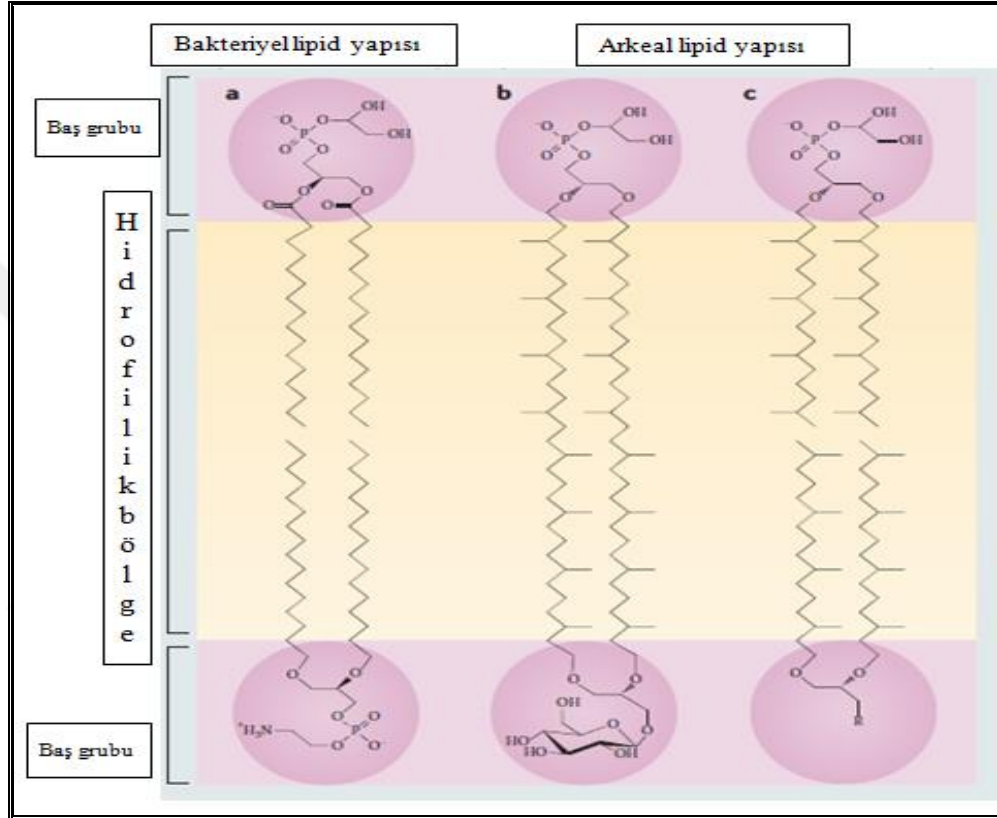
Arkeler fizyolojik özellikleri bakımından farklı grupları içermekte olup, özellikle Euryarchaeota içinde yer alan arkeler ekstrem koşullarda yaşamaktadırlar. Bu grubun içerisinde metanojenikler ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) bulunmaktadır. Beslenme özellikleri dikkate alındığında arkelerin kemoorganotrof, kemolitotrof veya ototrof oldukları bildirilmektedir (Madigan, vd., 2006; Munson, vd., 1997; Spring, vd., 1996; Valera, 1981; Vreeland, 1993). Arkelere ait genel özellikler aşağıda Çizelge 1.3.' de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Arkelerin genel özellikleri (Özcan, 2004; Birbir, 2000; Oren, 2000)

Özellikler	Arkelerde
Sirküler plazmid varlığı	+
Ribozom	70 S
Ribozomal RNA	16S, 23S, 5S
RNA polimeraz sayısı	Birkaç adet (her biri 8-12 alt birim)
Transkripsiyon faktörü (EF-2)	+
Promotor bölgesi	TATA kutusu (-38 ve -25 sekansları)
Azot fiksasyonu	+
Denitrifikasyon	+
Metan oluşturma	+
Klorofil ile fotosentez	-
Kemolitotrofik metabolizma	+
80°C ve 1,5 M üzeri tuzda üreme	+
PHB üretimi	+
Peptidoglikan varlığı	-
Sterol varlığı	-
Zar lipitleri	Gliserole eter bağlı fitanil zincirleri
Prokaryotik hücre yapısı	+
Histon protein varlığı	+
Flagella yapısı (9+2 düzeninde)	-
Başlangıç amino asiti	Metiyonin
5'CAP ve poli-A uzantısı	-
Mitoz	-
B-laktam, kloramfenikol, streptomisin, Sikloheksimit	-

1.5. Prokaryotik Lipid Yapıları

Bakteri ve ökaryotların hücre zarında gliserole ester bağı ile bağlanan yağ asitleri bulunurken, arkelerin hücre zarında ise gliserole eter bağları ile bağlanmış uzun hidrokarbon zincirleri bulunmaktadır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Bakteri ve arkelerin lipid yapısı (Kates, 1996)

a) Bakterilerde fosfatidil gliserol (üst kısım) ve fosfatidil etanol amin (alt kısım) bulunmaktadır. b) Tetraeter lipidlerin yapısını göstermektedir. c) Archaeal dieter lipidlerin yapısını göstermektedir.

Halobacteriales üyeleri gliserole eter bağı 20 karbonlu (fitanil, C20) ve bazen de 25 karbonlu (sesterpenil, C25) zincirler halinde dallanmış lipidlere sahiptir. Çok çeşitli nötral lipidler ve fosfolipid, sülfolipid, glikolipidleri içeren polar lipidler grubun farklı temsilcilerinde bulunabilir. Polar lipid türleri taksonomik sınıflandırmada önemli bir karakteristiktir (Oren, 2006). Polar lipid yapıları C20,C20 veya C25,C20 temel lipidlerinin türevleridir. Günümüze kadar bilinen tüm halofilik arkeler PG

(fosfotidil gliserol) ve Me-PGP (metil ester fosfotidil gliserofosfat)' in dieter türevlerini içermektedir (Kates, 1996). Fosfatidil gliserosülfat (PGS) çoğu nötrofilik türlerde bulunmaktadır (Hancock ve Kates, 1973). Bazı cinslerde (*Haloferax*, *Natrialba*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Halogeometricum*) PGS yokluğu Halobacteriaceae sınıflandırılmasında ayırt edici bir özelliktir. Bu güne kadar karakterize edilen alkalifilik üyelerin tamamı PGS'den yoksundur (Oren, 2006). Bununla birlikte nötral lipitler ise Halobacteriales takımındaki halofilik arkelerin toplam lipid içeriğinin yaklaşık %10' unu oluşturmaktadır (Kamekura ve Kates, 1999).

1.6. Halofilik Mikroorganizmalar

Ekstrem halofil mikroorganizmalar tuz konsantrasyonunun doyumluğa yakın olduğu geniş tuz gölleri, durgun denizler gibi ekolojik alanı büyük olan yerlerde optimum gelişme göstermektedirler (Ginzburg, vd., 1970). Ekstrem tuzlu çevrelerde halofilik arkeler ve bunlarla birlikte daha az oranda halofilik bakteriler, halofilik fungi ve protistalar bulunmaktadır (Pasic ve ark., 2005).

Bakteri domaininde yer alan halofil mikroorganizmalar Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes ve Bacteroidetes içinde yer almaktadır. Funguslar içerisinde halofil kriterlerine uyan yüksek hatta doyumluğa yakın tuz konsantrasyonlarında üreyebilen üyeler bulundurur; *Trimmatostroma salinum* ve *Hortaea werneckii*. Bu organizmalar tuzlu su ve diğer hipertuzlu ortamların doğal canlılarıdır (Oren, 2008).

Bu tür organizmalar dış ozmotik basıncı karşılamak için sitozollerinde KCl (3 M' dan fazla) ihtiva ederler (Ginzburg, vd., 1970). Ekstrem halofilik *Archaea* tuz konsantrasyonunun 250-300 g/L' yi geçtiği tuzlu ortamlarda çoğunlukla baskın olarak bulunan, kırmızı pigment içeren heterotrof organizmalardır. Ekstrem halofillerin metabolizmaları için en az 1,5 M NaCl (yaklaşık % 9) ve bir çok türün optimum gelişmesi için 2 ile 4 M NaCl (% 12- 20) gerekmektedir (Boone, vd., 2001; Madigan ve Martinko, 2006).

Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller üç domain içinde yer almaktadır (Horikoshi ve Grant, 1998). Kushner (1993)' e göre halofilik olmayanlar (0- 1 M), az halofiller (0,2- 2 M), ılımlı halofiller (0,4- 3,5 M), ekstrem yakın halofiller (1,4- 4 M), ekstremler (2- 5,2 M), halotolerantlar (0- >1 M) ve değişken halofiller (0- >3 M) olarak sınıflandırılmışlardır. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi cinsler ise Archaea domaininde yer alan ve tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilen mikroorganizmalardır (Horikoshi ve Grant, 1998).

Na⁺ konsantrasyonuna ek olarak özellikle Mg²⁺ ve Ca²⁺ gibi iki değerlikli katyonların konsantrasyonları da önemli derecede ekolojik öneme sahiptir. Deniz suyunun buharlaşmasıyla oluşan deniz kökenli (thalassohaline) çevrelerde Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının baskın olmasının yanında oldukça farklı iyonik kompozisyona sahip deniz kökenli olmayan (athalassohaline) çevrelerde bulunmaktadır. Bunlardan Ölü Deniz (İsrail) 1,9 M Mg²⁺ ve 0,4 M Ca²⁺ içermesiyle iki değerlikli katyonlarca baskın durumdadır. Bunlara ek olarak 1,7 M Na⁺ ve 0,14 M K⁺ katyonu içermektedir (Oren, 2006).

Kırmızı halofilik arkeler Magadi Gölü, Wadi Natrun gölleri, Çin ve Hindistan'daki aşırı tuzlu soda göllerinde de bol miktarda bulunmaktadır. Halobacteriales takımının alkalifilik üyelerinin bu göllerde kırmızı renk oluşturduğu bildirilmiştir (Oren, 2006). Ayrıca Halobacteriaceae üyeleri tuzlanmış gıda, deri ve koruma amaçlı yüksek konsantrasyonda tuz eklenen diğer ürünlerde de gelişebilmektedir (Lochhead, 1934; Oren, 2006). Halobacteriaceae ailesindeki cins ve türler arasında tuz gereksinimi ve toleransı arasında büyük farklılık görülmektedir. *Haloferax* cinsine ait türler *Halobacterium* cinsine ait olanlardan daha düşük tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedirler (Valera, vd., 1985). Bununla birlikte nötrofil halofilik arkelerin büyük çoğunluğu fazla Mg²⁺ konsantrasyonuna (minimum 50-100 mM) gereksinim duymaktadırlar. Alkalifilik üyeler ise üremeleri için yüksek Mg²⁺ konsantrasyonuna gerek duymamaktadırlar (Özcan, 2004).

1.7. Halofilik Protein

Halofilik organizmaların proteinlerinin aktivite göstermesi, kararlılık veya çözümlükleri için tuza ihtiyaçları vardır. Bir proteinin halofilik protein olarak adlandırılması için ortamda en az 2,5 M NaCl bulunmalıdır. Yüksek tuz konsantrasyonları proteinlerin üç boyutlu yapısını, dolayısı ile kararlılığını etkilemektedir (Madern, vd., 2000). Halofilik arkelerde tuz yokluğunda hücre duvarının denatüre olmasından ve dağılmasından ötürü hücreler parçalanır ve protein içerikleri dışarı verilmektedir (Kushner, vd., 1993). Halofilik protein üreten 3 çeşit organizma tanımlanmıştır. Bunlar; aerobik halofil Archaea, anaerobik halofil metajenik Archaea ve halofil Bacteria' dır. Bu mikroorganizmalar sitoplazmalarında doyma derecesine yakın oranlarda KCl ihtiva etmektedirler (Madern, vd., 2000).

1.7.1. Halofilik proteinlerin aminoasit kompozisyonu

Yüksek tuz konsantrasyonları halofilik olmayan proteinlerin kararlılığını ve çözümlüğünü değıştirirken, bir çok halofilik protein tuz konsantrasyonu azaldığı zaman denatüre olmaktadır (Madern, vd., 2000). Doymuş tuz konsantrasyonlarında kararlı ve çözümlür kalmak için halofilik proteinler adapte edici mekanizmalar geliştirmek zorundadırlar. Çözümlür halofilik enzimlerin ana karakteristikleri aminoasit dizilimlerindeki yüksek asit rezidüleri ile ilişkilidir (Wesson ve Eisenberg, 1992). Dym vd. (1995) halofilik proteinler üzerinde yaptıkları çalışma ile asidik rezidülerin protein yüzeyinde bulunduğunu göstermişlerdir. *Haloarcula marismortui*' den malat dehidrojenaz enzimi ile yapılan çalışmalarda benzer sonuçları rapor edilmektedir (Madern, vd., 2000).

1.8. Halofilik Mikroorganizmaların Uygulama Alanları

Ekstremofilleri kapsayan birçok uygulama da biyomoleküller (öncelikli olarak enzimler, proteinler, lipidler veya küçük moleküller gibi diğer bileşenler) üzerine dayanmaktadır. Bir ekstremofil ürünü olan ve en iyi bilinen moleküler biyolojide çığır açan Taq DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*' tan elde edilmiştir (Gihring, vd., 2001). Biyoteknolojik süreçleri geliştirmek amacıyla bu organizmaların izole edilmesi çok önemli olup, buna ek olarak karşılaştırmalı genomik metodlarının kullanımı ile bu ekstrem koşullara adaptasyonun genetik ve moleküler temelini belirlemek elzemdir. Halofil mikroorganizmaların çoğu proteinin çökmesi ve denatürasyona yol açan koşullar altında işlev yapabilen (örneğin, DNAzlar, lipazlar, amilazlar, jelatinazlar ve proteazlar gibi diğer birçok hidrolitik enzimler de dahil olmak üzere) stabil enzimler üretmektedirler (Sánchez-Porro, 2003).

1.8.1. Fermente yiyeceklerin hazırlanması

Halofilik Archaea üzerine 20. yüzyıl başında yapılan ilk çalışmalarda "kırmızı" halofillerin tuzlanmış balık ve derilerde önemli derecede hasarlara neden olduğunun görülmesi üzerine çalışmalara başlanmıştır. Deri üzerinde kırmızı mikrobiyal gelişimin, *Halobacterium* ve *Halococcus* gibi arkeler yüzünden olduğu bilinmektedir (Oren, 2002). Uzak Doğu' da bazı geleneksel fermente yiyeceklerin üretimi, farklı halofilik ve/veya yüksek oranda halotolerant mikroorganizmaların ve bazı durumlarda *Halobacteriaceae* familyasından arkelerin varlığı saptanmıştır. Bu ürünlerden biri olan "nam pla" Tayland'da üretilen fermente edilmiş bir balık sosudur. Fermentasyon süresi yaklaşık bir yıldır ve bu üründen elde edilen arkeler *Halobacterium* ve *Halococcus* gibi kırmızı halofilik arkelerdir. Halobakteriyal proteazların bu süreçte rol oynadığı ve arkelerin metabolizması sonucu oluşan ürünlerin bu sosun aromasına katkı yaptığı düşünülmektedir. Bundan başka halofilik arkeler üzerine son çalışmalardan birisi de arkelerin izoprenoid dieter lipidlerinin emulsifiye edici ve/veya düşük kalorili yağ bileşikleri halinde besinlere katkı maddesi olarak kullanılması yönündedir (Oren, 2002).

1.8.2. Hidrokarbon parçalama potansiyeli

Hidrokarbon parçalayıcı halofilik arkeler günümüzde bilinmektedir. Güney Fransa'da tuzla havuzundan izole edilmiş ve EH4 olarak isimlendirilmiş bir suşun doymuş ve aromatik hidrokarbonlar üzerinde gelişim gösterdiği saptanmıştır. Bu arke % 48 ile 88 arasında düz zincir içeren hidrokarbonların veya % 19 ile 24 arasında aromatik hidrokarbonların (0,5 g/L) parçalanmasını 32 °C' de 30 günde yapmaktadır. İlaveten hidrokarbon parçalayan bir kırmızı arke Rusya'daki petrol bölgelerinden izole edilmiştir (Oren, 2002).

1.8.3. Bakteriyorodopsin

Mor pigmentli bakteriyorodopsin ilk kez *Halobacterium salinarum* türünde tanımlanmıştır (Oesterhelt ve Stoeckenius, 1971). Bu türün bakteriyorodopsin gen kümesi üzerine yapılan çalışmaları protein ekspresyonunun düşük oksijen stresinde ve ışık ile uyarıldığını göstermiştir (Brock ve Petersen, 1976). Hücrelerde ışık enerjisini direkt kullanmayı sağlayan bakteriyodopsinin varlığı önemli bir ekolojik avantajdır. Pigmenti içeren hücrelerde düşük besin konsantrasyonlarında ışığın enerji sağladığı ve ayrıca kemostat kültürlerde de ürünleri arttırdığı bildirilmiştir (Valera vd., 1983).

Halobacterium salinarum türünden elde edilen ışığa bağımlı proton pompası bakteriyorodopsinin önemli biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu ve bilgi depolamada kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Oren, 2002). Ayrıca bakteriyorodopsinin güneş ışığından elektrik üretimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması gibi alanlarda da biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Çizelge 1. 4.) (Margesin ve Scihinner, 2001). Halobacteriales üyelerinin çoğu, hücre membranlarında yüksek düzeyde karotenoid pigment içermekte ve parlak kırmızı-turuncu renktedir (Oren, 2006). Bunlarda tanımlanan 4 adet retinal proteinin ilki ışıkla çalışan dış proton pompası bakteriyorodopsin, ikincisi ışıkla çalışan iç klorid pompası halorodopsin ve son ikisi fototaksi için ışığa duyarlı iki adet alıcı rodopsindir (Oren, 2006).

Çizelge 1.4. Bakteriyorodopsinin biyoteknolojik kullanım alanları (Oren, 2002).

Özellik	Kullanım alanları
Protein transportu	ATP üretimi, deniz suyunun tuzdan arındırılması, Güneş ışığının elektriğe dönüştürülmesi,
Fotoelektrizm	Çok hızlı ışık deteksiyonu, Yapay retinalar, Hareket deteksiyonu,
Fotokromizm-optik depolama	2D depolama, 3D depolama, Holografik depolama, Yardımcı hafızalar,
Fotokromizm-optik süreçler	Optik bistabilite / ışık anahtarlığı, optik filtreleme, sinyal kondisyonlandırma, sinir ağları, boşluksal ışık modulatörleri, faz konjugasyon, pattern tanınması, interferometri,
Diğer	İkinci harmonik oluşum, Radyasyon deteksiyonu, Biyosensör uygulamaları,

Holografik bakteriyorodopsin filmleri bilgisayar hafızalarının yapımı için uygundur. Gelişen teknolojinin yeni nesil bilgisayarların oluşumuna yol açması beklenmektedir. Molekül, bilgisayar hafızalarının ve bilgi işlem ünitelerinin elementi olarak kullanılacaktır. Optik dönüştürücü (anahtar) element olarak görev yapacak yarı iletkenlerin iletken/iletmeyen safhalarının analoğu olacaktır. Yüksek yoğunluklu bilgi depolanması da bu molekülün kullanımı ile mümkün olacak ve tüm bilgiler eş zamanlı olarak işlenebilecektir. Bakteriyorodopsin filmleri yüksek çözünürlük gösterir ve mükemmel geri dönüşebilirliğe ($>10^6$ yazma/silme döngüsü) sahiptirler (Oren, 2002).

Farklı antijen bağlanma bölgelerine sahip (birisi bakteriyorodopsinin spesifik bölgesine diğeri bir fosfolipid haptene) antibadilerin iki çeşidi kullanılarak mor membranından yapılmış biyofilmler elde edilmiştir. Bu filmler, ışığa duyarlı fotoelektrik aletlerin yapımında kullanılmaktadır. Son yıllarda patente yönelik yapılan çalışmalarda bu pigment biyoelement olarak hareket sensörü olarak kullanılmıştır (Oren, 2002).

Bakteriyorodopsin cam tabakalara kolaylıkla immobilize olabilmekte veya polimerlere gömülebilmektedir. 0- 45°C arasında ve 1'den 11'e kadar olan tüm pH aralıklarında iyi fonksiyon göstermektedir. Tuzlu veya tatlı suda aktif, suda 80 °C' ye kadar kuru ortamda ise 140 °C' ye kadar sıcaklığı tolere edebilmekte ve tekrarlanabilirliği yüksek fotoelektrik sinyalleri üretmektedir. Tüm bu uygulamalar bakteriyorodopsinin fotokimyasal stabilitesi ve mükemmel termodinamiği sayesinde mümkün olabilecektir. Bunun dışında başka bir önemli nokta ise tuz yokluğunda da stabilitesini koruyabildiği ve aktif kalabildiği için bu protein aslında "halofilik bir protein" de değildir. Dolayısı ile bu da uygulama alanlarını arttırmaktadır (Oren, 2002).

1.8.4. Biyopolimer üretimi

Bazı halofilik arke türlerinin hücrelerinde biyoplastik yapımında kullanılan poli-3-hidroksi alkonat (PHA) biriktirdiği bildirilmektedir (Hezayen, vd., 2002). Bunlardan *Haloferax mediterranei*, önemli miktarda β-hidroksibutirat (PHB) ve poli- β-hidroksi alkonat (PHA) içermekte ve yüksek tuz konsantrasyonlarında bile üretimin mümkün olduğu bildirilmektedir. Poli-β-hidroksi alkonat biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu tür termoplastikler yüksek direnç ve düşük erime sıcaklığı gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren, 2002).

1.9. Antibiyotik Dirençliliği

Halofilik arkelerin antibiyotiklere ve diğer antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık özelliği taksonomik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Oren, vd., 1997). Halofilik arkeler peptidoglikan yapıda hücre duvarına sahip olmadığından penisilin, ampisilin, sikloserin, kanamisin, neomisin, polimiksin, karbenisilin, sefatoksim ve streptomisin gibi antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Halofilik arkelerin novobiyosin, basitrasin, rifampisin ile ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olan anizomisin ve quinolon türevlerine karşı ise duyarlılık gösterdikleri belirtilmiştir (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo, vd., 1984).

Holmes ve Dyall-Smith (1991), halofilik arkebakterilerde novobiosin direnciyle sonuçlanan çalışmalarında DNA girazdaki mutasyonları ortaya koymuşlar ve halofil arkelerde kullanılmak üzere seçici bir marker olarak novobiosin dirençliliğine sahip klonlama vektörü geliştirmişlerdir. Novobiosin antibiyotiğinin genel olarak öbakteriyal DNA giraz inhibitörü olduğunu ve Halobacteria' yı kapsayan arkelerde de güçlü bir inhibitör olduğunu da rapor etmişlerdir.

1.10. Ozmotik Regülasyon

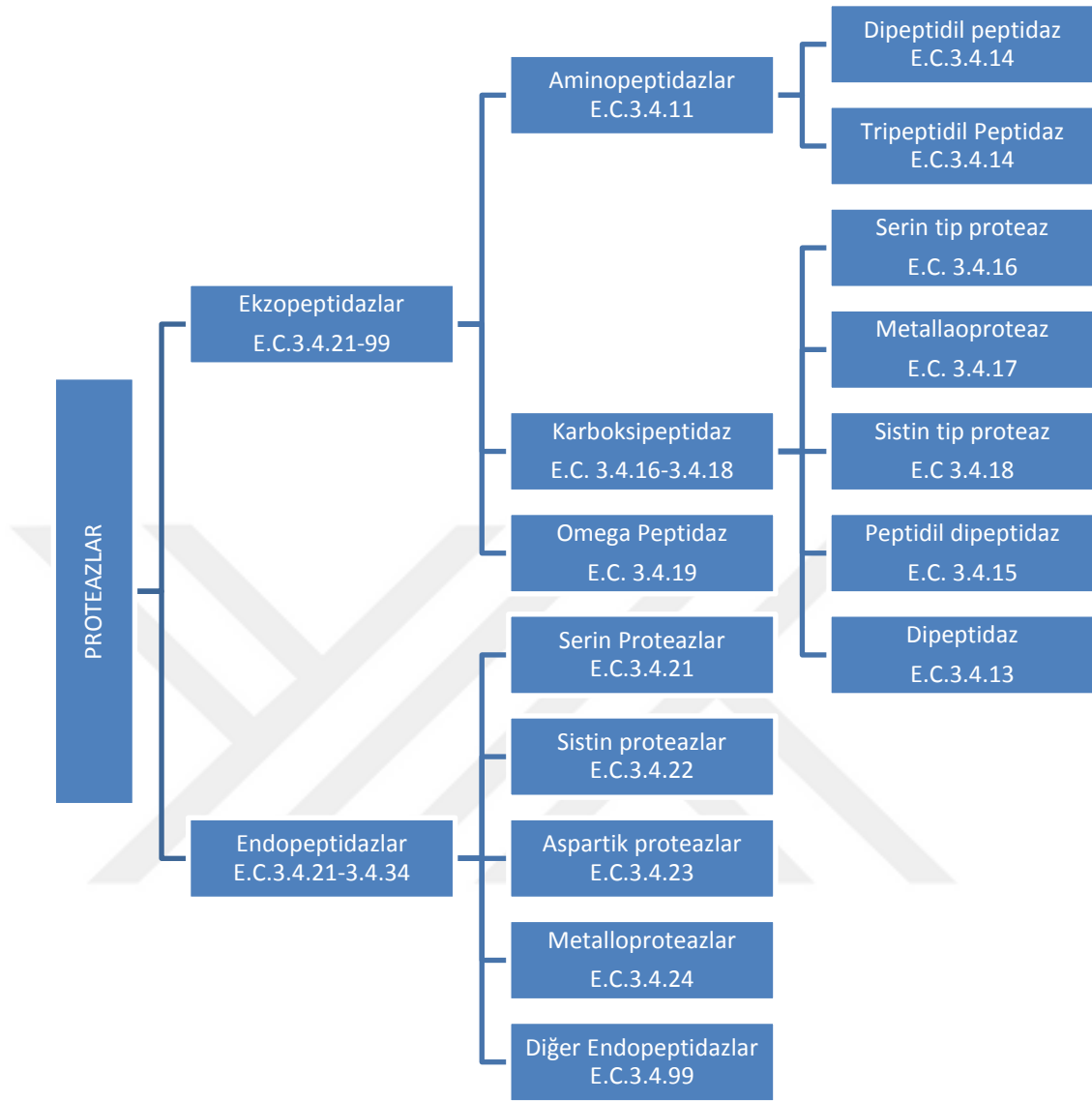
Halofilik arkeler 5,2 M NaCl gibi doymuş tuz konsantrasyonlarında yaşayabilmek için "salt-in" stratejisi ile ozmotik dengesini sağlamaktadırlar. Bunun içinde sitoplazmalarında başta K⁺ ve Cl⁻ olmak üzere yüksek oranlarda iyon biriktirirler. Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun büyük bir bölümünü KCl ve daha az olarak NaCl' den oluşmaktadır (Price ve Stevens, 1982; Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989). Halofilik habitatlarda yaşayan arkeler, hücre metabolizmalarında ozmolit çözünen madde olarak, dış ortamın 100 katı oranında KCl depo ettikleri için, hücresel yapıları bu yüksek tuz konsantrasyonuna uyumlu hale gelmiştir. Haloarkeal ekstremozimler tuza dayanıklı olmalarının yanı sıra, yüksek sıcaklıklara karşı da termotoleranttırlar (Obayashi, vd., 1988). Halofillerdeki bütün proteinler doymuş tuz şartları altında ve aynı hipertermofil proteinlerde olduğu gibi yaklaşık 100 °C' de kendini koruyabilmektedir (Rao, vd., 1998). Ekstrem halofil mikroorganizmalar tuz toleransı açısından model organizmaları olduğu için, farklı sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren lipaz, proteaz, DNaz, esteraz, selülaz, pullanaz, amilaz ve ksilinaz gibi hidrolitik enzimlerin kaynağını oluşturmaktadır (Obayashi, vd., 1988). Halobacteriales türlerinin çoğu proteaz, lipaz, DNaz ve amilaz gibi ekzoenzimler üretmektedir (Oren, 2006). Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren bu ekzoenzimler yüksek tuz içeriğine sahip ortamlarda bulunan makromoleküllerin yıkımı çalışmalarında kullanılmaktadırlar (Margesin ve Scihinner, 2001).

1.11. Enzimler

Enzimler endüstride kullanımları büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, günümüzde ihtiyaç duyulan bazı enzimlerin az bulunur olması ve yüksek maliyetlerinden dolayı endüstriyel uygulamaları güçleşmektedir. İşte bu noktada devreye mikrobiyal enzim kullanımı girmektedir. Proteaz, lipaz, katalaz, laktaz, trans-glutaminaz gibi enzimler gıda sektöründe kullanılan başlıca mikrobiyal enzimlerdir. Mikrobiyal enzim kullanımı Dünya'da gıda endüstrisinde özellikle kaliteli ve iyi fiziksel özelliklere sahip gıda ürünlerinin geliştirilmesinde tercih edilmeye başlanmıştır (Er ve Sarımeahmetoğlu, 2009). Enzim saflaştırma işlemlerinin amacı, istenilen enzimin en iyi verimle elde edilmesi olup, verim ise elde edilen enzim aktivitesi ile ham homojenatın toplam aktivitesi arasında yapılan yüzde oranı ile belirlenmektedir. Bunun dışında enzimin maksimum katalitik aktiviteye sahip olması da istenmektedir. Enzimin katalitik aktivitesi ise substratın yok olma oranı veya ürünün oluşma oranı, substrat konsantrasyonu, ısı, pH ile belirlenmektedir (Price ve Stevens, 1982). Enzim ayırma ve saflaştırma yöntemleri enzimin büyüklük, kütle, yük, çözünürlük gibi özelliklerine göre belirlenmektedir (Price ve Stevens, 1982).

1.11.1. Proteaz

Hücre metabolizmasında büyük önem arz eden reaksiyonlar hidroliz reaksiyonları olup, bu reaksiyonları katalizleyen enzim ise proteazdır. Proteazlar, polipeptit ve protein zincirlerini hidroliz eden, proteinaz veya peptidaz olarak da bilinen enzimlerdir. Proteazlar, alınan besinlerdeki proteini, polipeptit zincirlerindeki amid bağlarını hidroliz ederek parçalarlar. Proteazlar, sindirim sisteminde bol yer almasından dolayı ilk keşfedilen enzimlerdendir. En yüksek proteaz biyosentezine sahip mikroorganizmalar; *Aspergillus* (Fan-Ching, vd., 1998), *Rhizopus* (Rao, vd., 1998), *Penicillium* (Farley ve Ikasari, 1992) gibi funguslardır. Virüsler arasında da bu enzimi kodlayanlar bulunmaktadır. Bunlar Adenovirüslerde sistein proteaz, Picornavirüslerde serin proteaz ve HIV' de aspartil proteaz olarak karşımıza çıkmaktadır (Fersht, 1998). Proteazların sınıflandırılması Şekil 1.3.' te özetlenmiştir.



Şekil 1.3. Proteazların sınıflandırılması (Rao, vd., 1998)

1.11.1.1. Serin Proteaz

Serin proteazlar (EC.3.4.21.) aktif bölgelerinde serin grupları bulunduran bir enzim olmakla beraber arkeler, virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bulunmakta ve bu organizmalarda hayati önem taşıdıkları düşünülmektedir. Benzerliklerine göre serin proteazlar 20 aile içinde ve ortak atalarına göre 6 grup altında toplanmışlardır (Barett, 1994). Serin proteazların inhibitörleri, di-izopropil florofosfat (DFP), fenil metil sulfonil florid (PMSF) ve p-kloro merkuri benzoat 'dir (PCMB) (Rao, vd.,

1998). Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH' larda, optimum pH 7- 11 arasında aktif, izoelektrik noktaları genellikle pH 4- 6 arasındadır (Çalık, 1998). Yüksek alkalın pH' larda aktivite gösteren serin alkalın proteazlar, serin proteazların geniş alt gruplarıdır. Serin endopeptidazlar substrat tercihlerine göre 3 grup altında toplanmaktadır. Bunlar; (i) tripsin-benzeri, (ii) kimotripsin benzeri, (iii) elastaz benzeri olarak adlandırılmışlardır (Akolkar, 2009).

Çoğu ticari serin proteinazlar, *Bacillus*, *Thermuscaldophilus*, *Desulfurococcus mucosus* ve *Streptomyces*, *Aeromonas* ve *Escherichia coli* tarafından üretilmektedir. (Rawling, vd., 1994). Arkelerde ise enzim aktivitesi için uygun tuz konsantrasyonu 1- 2 M, sıcaklık ise 60 °C' dir. Serin proteazın karakterize edildiği arkeler ise, *Natronococcus occultus* (Studdert, vd., 1997) ve *Natrialba magadii* olmuştur (Gimenez, vd., 2000).

1.11.1.2. Serin ailesi biyosentezi (*Serin, Glisin, Sistein*)

Serin biyosentezi iki farklı yol ile olmaktadır. Fosforile edilmiş yolaktaki, bir glikolitik ara madde 3-fosfo-hidroksi-piruvata oksitlenir, 3-fosfat gliserat fosfoferinden serine doğru transaminaz ve fosfataz aktivitesi ile oluşabilmektedir. Bir diğer yol ise fosforile-olmayan yoldan gliserat doğrudan hidroksipiruvata okside olur ve sonra transamine edilir. Dört Haloarchaea üyesinde fosfogliserat dehidrogenaz ve fosfoferin fosfataz için genler bulunmaktadır. Bununla birlikte ara yolak için gerekli olan enzim geni, fosfoferin transaminaz için eksiktir (Helgadottir, vd., 2007).

1.12. Enzimlerin Ekonomik Değeri ve Kullanım Alanları

Enzimlerin pazar payları 1980' lerin sonunda 10000 ton ve 2 milyar dolar iken, 2015 yılında bu pazarın 4,4 milyar dolara ulaştığı bildirilmektedir. Pazar payları dikkate alındığında en büyük pazarın süt sektörüne ait olduğu, daha sonra sırası ile deterjan ve temizlik maddeleri sektörü, gıda ve hayvan yemi, kağıt hamuru ile kağıt, tekstil, deri ve kürk endüstrisi gelmektedir (Binod, vd., 2013). Endüstride kullanılan enzim

pazarının yarısından fazlasını gıda üretiminde kullanılan enzimler oluşturmaktadır (Spök, 2006). Bugüne kadar 2000' den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticarileşmiş, ancak günümüzde bunlardan sadece 20 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir.

Endüstride kullanılan enzimlerin % 75'i hidrolitik enzimlerdir (Rao, vd.,1998). Enzim satışlarının % 60'ını oluşturan proteazlar, çok sayıda endüstriyel süreçte geniş bir uygulama alanına sahiptir. Proteazların endüstriyel uygulamaları ise özellikle besin ve deterjan endüstrilerinde çok eskiye dayanmaktadır (Buchholz, vd., 2005). Çamaşır deterjanlarında kullanılabilir enzimlerin yüksek etkiye, düşük spesifikiteye, pH 9- 11 arasında bir saat boyunca stabil olmasına, 95 °C' ye ulaşan sıcaklıklarda çalışabilme, en az bir yıl boyunca aktivitesini kaybetmeden koruyabilme özelliklerine sahip olması gerekmektedir. Bu özelliklere en uygun enzim mikrobiyal serin proteazlar olarak bildirilmektedir (Uhlig, 1998). Bulaşık makinesi deterjanları metasilika kaynaklı oldukları için yüksek alkaliniteye ve temizleme yeteneğine sahiptirler. Yıkama çözeltisinin pH'ı 11,5 altına düştüğü takdirde bu temizleme özelliği ciddi bir şekilde azalmaktadır. Bu yüzden bulaşık deterjanlarına proteaz enzimi katkısı alkaliniteyi yükselterek deterjanın yıkama performansını iyileştirmektedir (Rao, vd., 1998).

Günümüzde yapılan çalışmalarda tüketicilerin tercihi ekolojik ürünlere doğru kaymıştır. Yapılan çalışmalar arasında yün liflerinin ağartılmasında papain, pronaz ve pepsin enzimlerinin kullanımı bulunmaktadır (Duran, vd., 2007). Diğer bir uygulama alanı deri üretimi olup, hayvanların post ve derilerinin işlenmesinde proteaz enzimlerinin kullanılma sebebi kıl ve deri yapısında bulunan proteinler ile epidermal membranın yapısında bulunan proteinler ve ayrıca keratinlerin yok edilmek istenmesidir (Gerze, 2003). Ayrıca proteazlar, tekstil endüstrisinde yün ve ham ipeğin işlenmesi süreçlerinde kullanılmaktadır (Gerze, 2003). Gıda sektöründe ise, proteaz enzimi peynir üretiminde sütün kesilmesi veya pıhtılaşmasında kullanılmaktadır (Uhlig, 1998). Et işleme sürecinde küçük et parçaları bağ dokuya ve kemiklere bağlı olarak kaldığı için alkaline bakteriyel proteaz kullanılmaya başlanmış (O'Meara ve Munro, 1984), pH 8,5' ta ve 55-60 °C arasındaki sıcaklıklarda küçük et parçalarının % 94' ünün parçalandığı rapor edilmiştir (Uhlig, 1998). Proteazlar yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılmasında, kraker ve bisküvi üretiminde de

kullanılmaktadır (Uhlig, 1998). Bira endüstrisindeki en büyük sorunlardan biri proteinlerdir. Biranın kalitesini ve stabilitesini proteinler bozmaktadır. Bu sorunu gidermek amacı ile proteazlar bira yapımında kullanılmaya başlanmıştır (Uhlig, 1998). Papaya ve ananas gibi bitki kaynaklı proteazlar yüz bakımı ürünlerinde hassas cilt soyma amacıyla kullanılmaktadırlar (Rao, vd., 1998). Subtilisin proteazlar membranların üzerinde biriken ve film tabakası oluşturarak membranın çalışmasını engelleyen protein moleküllerini temizlemek amacıyla kullanılmaktadır (Rao, vd., 1998). Alkalın proteazlar, gıda endüstrisindeki çeşitli süreçlerden sonra ortaya çıkan atıkların işlenmesinde de kullanım potansiyeline sahiptir. Ayrıca alkalın proteazların boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi atık lifli proteinleri parçalayarak yararlı biyokütle haline dönüştürebildikleri rapor edilmektedir (Gerze, 2003; Öztürk, 2004). Proteazların proteinleri parçalama özelliği sayesinde hayvanların sindirim sistemleri tarafından oluşturulan küçük moleküllerin absorblanabilmesi kolaylaştırılmaktadır (Rao, vd., 1998). Serin alkalın proteazlar aromatik ve hidrofobik aminoasit esterlerini parçaladıkları da rapor edilmiştir (Anwar ve Saleemuddin, 1998). Günümüzde sindirim sistemini desteklemek amacı ile üretilen ilaçlarda, kan ve dokudaki uyuşturucu madde tanısında proteazlar kullanılmaktadır (Gerze, 2003). Alkalın proteazlar, kullanılmış X- Röntgen filmlerinden gümüş eldesi süreçlerinde kullanılmaktadır. Kullanılmış X- Röntgen filmleri ortalama % 1,5- 2 oranında gümüş içermektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine yol açmakta, bu sebeple jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır (Öztürk, 2004).

1.13. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Protein çökeltileri, santrifüjleme sonrası edilen protein moleküllerinin kümelenmiş halidir. Proteinlerin çözünürlükleri hidrofilik ve hidrofobik yapıların dağılımına bağlıdır. Belli bir sıcaklıkta ortama eklenen organik çözücüler seçici protein çökeltmelerine neden olmaktadır.

Amonyum sülfat ile çöktürmenin prensibi protein molekülünün mikro ortamındaki dehidratasyonudur. Bu çöktürmede, su molekülleri sülfat iyonuna (SO_4^{-2}) bağlanır, böylece protein molekülleri ile etkileşen su miktarı azalmakta ve protein belirli bir konsantrasyondaki amonyum sülfat ile çökmeye neden olur. İşlemin düşük sıcaklıkta yapılması kararlılığını artırır ve çözünürlüğünü azaltır. En iyi çökme nötr bir pH olan 6- 7,5 değerinde olmaktadır. Amonyum sülfatla çöktürmenin en önemli basamağı doygunluğun yüzde olarak belirlenmesidir (Rosenberg, 2005).

1.14. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Proteinlerin ve farklı biyolojik makromoleküllerin boyut farklılıklarına dayalı bir ayırma tekniğidir (Anonim, 2002; Cutler, 2004). Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan dolgu materyali genellikle agaroz veya dekstran gibi doğal polimerlerden oluşabildiği gibi poliakrilamid gibi, sentetik polimerlerden de oluşabilmektedir.

Bu yöntemde çapraz bağlı üç boyutlu moleküler ağdan oluşan boncuk şeklinde olan jellerdeki gözeneklerden, boyutları gözenek çapından daha küçük olan moleküller jele nüfuz ederek geçerken, büyük moleküllerin geçişi engellenmektedir. Dolayısıyla jele geçiş yapamayan büyük moleküller jele geçiş yaparak ilerleyen küçük moleküllerden daha önce kolondan ayrılmaktadır. (Kumpalume, vd., 2003; Hedhammar, vd., 2006; Ostrove, 1990; Rosenberg, 2005).

Jel filtrasyon kromatografisinde başarılı bir şekilde ayırım yapılabilmesi boncukların gözenek çapına, kolon dolgu materyaline ve kolon uzunluğuna bağlıdır (Kumpalume, vd., 2003; Rosenberg, 2005). Ayrıca örnek hacmi, örnek hacminin kolon hacmine oranı, partikül boyutu, akış hızı, örneğin ve tampon çözeltinin viskozitesi de ayırmada etkili olmaktadır. En iyi ayırım uzun bir kolonda düşük akış hızında yapılan saflaştırma işlemiyle elde edilmektedir (Anonim, 2002; Rosenberg, 2005). Jel filtrasyon kromatografisinde ayrılacak proteinlerin boyutunda ve stabilitesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemelidir. Özellikle bu dikkate alındığında tampon çözeltinin pH'sı iyonik kuvvet ve içeriğinin önemli oranda değişiklik yapmadığı bildirilmektedir. Tampon çözeltinin seçiminde en önemli unsurlardan bir tanesi hedef molekül ile uyumlu olmasıdır. Bu yüzden şekilsel değişikliklere,

biyolojik olarak aktif bir bileşimin inaktive edilmesine veya proteinlerin alt birimlere ayrıştırılmasına sebep olmayan, uygun tamponun seçimine dikkat edilmesi gerekmektedir (Rosenberg, 2005)



2. MALZEME ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Araç, gereç ve kimyasal maddeler

Bu çalışma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Biyoloji Bölümündeki Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarında bulunan cihaz ve kimyasal maddeler ile yürütülmüştür. Ayrıca Biyoloji bölümündeki diğer laboratuvarlardan da destek temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi EK 1' de verilmektedir.

Çalışmada çok sayıda kimyasal madde kullanılmış olup, kimyasal maddelerin tamamı analitik saflıkta ve Merck, Sigma, WMR, Biobasic ve Thermo gibi firmalar kısaca belirtilmiştir. Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), Meat Extract (Merck), Meat Peptone (Merck), Yeast (Merck), Sukroz (Merck), Starch (Merck), Malt Extract (Merck), Proteaz Pepton (Merck), Skim Milk Powder (Merck), Simons Sitrat Agar (Merck), TSI Agar (Merck), OF Basal Medium (Merck), Tirozin (Merck), Kazein (Merck), Sodyum karbonat (Merck) Potasyum klorür (Merck), Amonyum klorid (Merck), Potasyum hidroksit (Merck), Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (Merck), Manganez (II) klorid tetrahidrat (Merck), Magnezyum sülfat heptahidrat (Merck), Potasyum nitrat (Merck), Borik asit (Merck), Sitrik asit monohidrat (Merck), Di-potasyum hidrojen fosfat (Merck), EDTA (Sigma), Kobalt (II) klorid (Merck), Kazamino asit (WMR), Gliserol (Merck), Sodyum bromür (Merck), Magnezyum sülfat (Merck), Sülfürik asit (Merck), Baryum klorür (Merck), Sodyum sitrat (Merck), Sodyum potasyum tartarat (Merck), Bakır sülfat (Merck), Hidroklorik asit (Merck), Sığır serum albumin (Sigma), Merkaptto etanol (Sigma), (Merck), Triton X-100 (Sigma), N,N-Metilen bis (Akrilamid) (Sigma), Akrilamid (Sigma),

Glisin (Multicell), Folin 2N (Sigma), TEMED (Sigma), Brom timol mavisi (Merck), Lugol (Merck), Safranin (Merck), Kristal viyole (Merck), DNA Marker (Biobasic), Protein Marker (Thermo), Üre (Merck), Etanol (Merck), Metanol (Merck), TCA (Merck).

Çalışmada kullanılan cihazların isimleri ve markaları ise aşağıda verilmektedir (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz adı	Markası
Santrifüj	Thermo
Spektrofotometre	Optizen
Hassas terazi	Sartorius
Su Banyosu	Memmeth
Derin dondurucu	Arçelik
Buzdolabı	Arçelik
Vorteks	Dragon Lab.
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Isolab
pH metre	Thermo
Etiv	Nüve
Otomatik pipet	Isolab, Brand
Otoklav	Daihan
Dikey Elektrophorez cihazı	Thermo OWL
Yatay Elektrophorez cihazı	Thermo
PCR cihazı	Eppendorf
Saf su cihazı	Şimşek Labortek
Vakumlu inkübatör	Nüve
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Jel dökümantasyon sistemi	DNR MiniBIS

2.1.2 Organizma

Organizma kaynaklarını temin etmek amacı ile çalışma alanı olarak Konya ili, Cihanbeyli ilçesine bağlı Sağlık Köyündeki Yavşan Tuzlası seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan organizmaların izolasyonu için adı geçen tuzladan tuz, toprak ve su örnekleri toplanmış ve organizma kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.1.3 İzolasyon ve identifikasyon

Bu çalışmada organizma kaynağı olarak Konya ili, Cihanbeyli ilçesine bağlı Sağlık Köyünde bulunan Yavşan Tuzlasından alınan tuz, toprak ve su örnekleri kullanılmıştır. Öncelikli olarak yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti gösteren halofil izolatlar seçilmiştir. Bu amaç için % 5- 10 ve 20 NaCl içeren SGB besiyerine numunelerden seyreltme yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Farklı morfolojik özellik gösteren izolatlardan rastgele alınarak, seri pasajlamaları yapılmıştır. Pasajlamalar sonunda saflaştırılan halofil izolatlar B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, A2, A11 ve A22 olup, tüm izolatlar katı besiyerinde (SGA) çoğaltıldıktan sonra, tekrar SGA/ SGB besiyerlerine ekimleri yapılmış (Şekil 2.4. ve Şekil 2.5.) ve 37 °C' de 7 gün inkübasyona bırakılarak gelişimleri sağlanmıştır (Sehgal ve Gibbons, 1960). İzole edilen saf kültürler buzdolabı şartlarında stoklanmıştır. SGA besiyerinin bileşimi Çizelge 2.6.' da verilmektedir.

Çizelge 2.6. SGA besiyerinin bileşimi (g/L)

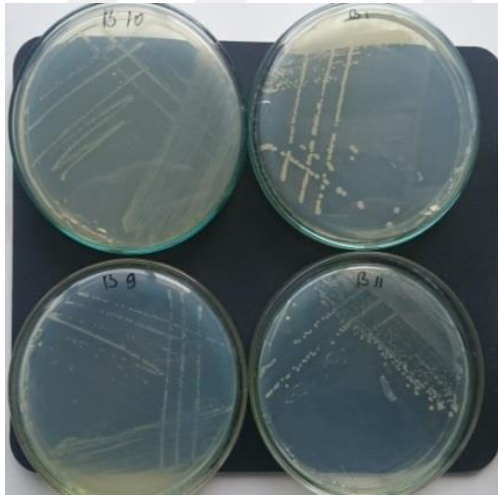
NaCl	180
KCl	1,44
MgSO ₄	14,4
Yeast	0,72
Na ₂ CO ₃	2,16
Kazamino	5,4
FeSO ₄	0,0016

İzole edilen kültürlerin identifikasyonları geleneksel olarak, morfolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak yapılmıştır (Oren, vd., 1997). Bu testler Gram

boyama, antibiyotik duyarlılık testi (Novobiyosin 5 µg, eritromisin 15 µg, streptomisin 10 µg, basitrasin 0,04 U, penisilin-G 10 U, ampisilin 10 µg ve tetrasiklin 30µg), koloni morfolojisi, pigmentasyon ve tuzluluk toleransıdır (Dussault, 1955; Montalvo-Rodriguez, vd., 1998; Birbir ve Sesal, 2003; Birbir, vd., 2007). Ayrıca indol testi, nitrat indirgenmesi testi, oksidaz testi, katalaz testi de uygulanmıştır (Wistreich ve Lechtman, 1980; Gerhardt, vd., 1994; Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Birbir, vd., 2004).



Şekil 2.4. Saf kültürlerin SGB besiyeri görüntüsü



Şekil 2.5. Saf kültürlerin SGA besiyeri görüntüsü

2.1.4 Antibiyotik duyarlılık testleri

Saf kültürlerin tamamı (SGB) sıvı besiyerinde 37 °C' de 7 gün inkübasyona bırakılarak aktiveleştirildikten sonra, SGA içeren plaklara inoküle edilmiş (100 µL) ve disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testleri uygulanmıştır. Steril antibiyotik diskleri (6 mm) aseptik koşullarda besiyeri yüzeyine yerleştirildikten sonra 37 °C' de 7 gün kültive edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zon çapları mm cinsinden kayıt altına alınmıştır (Montalvo-Rodriguez, vd., 1998; Birbir ve Sesal, 2003; Birbir, vd., 2004).

2.1.5 Proteolitik aktivitenin kalitatif belirlenmesi

Saf halofil kültürlerin proteolitik aktivitesi Swift, vd. (1996)' nin yaptıkları çalışmaya göre modifiye edilerek belirlenmiştir. Tüm kültürler içerisinde % 1 skim milk içeren SGA plaklarına inoküle edilmiş (100 µl) ve 37 °C' de 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra, kolonilerin etrafındaki şeffaf zon varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.6 Biyokimyasal testler

2.1.6.1 Oksidaz testi

SGA plaklarında 37 °C' de 7 gün inkübe edilen kültürlerden aseptik şartlarda alınmış ve % 1'lik tetrametil-*p*-fenil diamin dihidroklorid çözeltisi emdirilmiş filtre kağıdına sürülmüştür. Mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

2.1.6.2 Katalaz testi

Kültürler SGA plaklarında 37 °C' de 7 gün inkübe edildikten sonra temiz bir lam yüzeyine alınmış ve kültürlerin üzerine % 3' lük H₂O₂ damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlenen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

2.1.6.3 İndol testi

Kültürler aseptik koşullarda % 1 tripton içeren SGB besiyerlerine inoküle edildikten sonra 37 °C' de 7 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kültürlerin üzerine 0,5 mL Kovaks ayırıcı damlatılmış ve tüpün üst kısmında kırmızı halka varlığı kontrol edilmiş, kırmızı halka varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz,1994).

2.1.6.4 Nitrat redüksiyonu

Kültürler % 1 KNO₃ içeren SGB besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37 °C' de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası dürham tüpündeki gaz oluşumunun varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

Ayrıca kültürler % 1 KNO₃ içeren SGB besiyerlerine inoküle edilmiş (100 µL) ve 37 °C' de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürler üzerine % 0,5' lik N,N-dimetil- α-naftil amin ve % 0,8' lik sülfanilik asit damlatılmış, koyu mavi-siyah renk oluşumu gözlenmiş ve mavi renk varlığı nitrit oluşumu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Renk oluşturmayan nitrit negatif olan tüplere 1 damla α-naftol ve 2 damla konsantre H₂SO₄ damlatılarak koyu mavi-siyah rengin oluşumu nitrat varlığı için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

2.1.7 Halofil mikroorganizmaların gelişimi üzerine çevresel faktörlerin etkisinin belirlenmesi

Farklı çevresel faktörlerin (sıcaklık, pH, karbon, azot, tuz, maya ekstraktı ve magnezyum) gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmalarda tüm kültürlerin gelişimi kuru ağırlık (mg/ mL) olarak takip edilerek kayıt altına alınmıştır.

2.1.7.1 Farklı sıcaklık değerlerinin halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı sıcaklık değerlerinin gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, SGB besiyerlerine kültürlerden inoküle edilmiş (100 µL) ve 20, 37 ile

45 °C' de ve çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürlerin gelişimi 7 ile 14 gün boyunca izlenmiş ve kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.2 Farklı pH değerlerinin halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı pH değerlerinin gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, SGB besiyerlerinin pH değerleri 5, 7, 9 ve 10' a ayarlanmış ve kültürlerden inokülasyon (100 µL) yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürlerin gelişimi 7 gün boyunca izlenmiş ve kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra optimum pH değerleri belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.3 Farklı karbon kaynaklarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, karbon kaynağı olarak glukoz, nişasta ve sukroz kullanılmıştır. Hazırlanan SGB besiyerleri içersine % 1 konsantrasyonda olmak üzere aseptik olarak glukoz, nişasta ve sukroz eklenmiş ve daha sonra kültürlerden inokülasyon yapılarak (100 µL) çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürlerin gelişimi 7 gün boyunca izlenmiş ve kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra, optimum tercih ettiği karbon kaynağı belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.4 Farklı azot kaynaklarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı azot kaynaklarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, azot kaynağı olarak proteaz pepton, meat ekstrakt ve NH₄Cl

kullanılmıştır. Hazırlanan SGB besiyerleri içersine % 1 konsantrasyonda ve aseptik olarak proteaz pepton, meat ekstrakt ve NH₄Cl eklenmiş, daha sonra kültürlerden inokülasyon yapılarak (100 µL) çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürlerin gelişimi 7 gün boyunca izlenmiş ve kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra, optimum tercih ettiği azot kaynağı belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.5 Tuzun farklı konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Tuzun farklı konsantrasyonlarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, tuz kaynağı olarak NaCl kullanılmıştır. Hazırlanan SGB besiyerleri içersine % 0; 5; 10; 20 ve 30 w/v konsantrasyonlarında olmak üzere NaCl eklenmiş, daha sonra kültürlerden inokülasyon yapılarak (100 µL) çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürlerin gelişimi 7 gün sağlandıktan sonra kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alınmış ve optimum tercih ettiği tuz konsantrasyonu belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.6 Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, hazırlanan SGB besiyerleri içersine % 0; 0,01; 0,1 ve 0,5 w/v konsantrasyonlarında olmak üzere maya ekstraktı eklenmiş, daha sonra kültürlerden inokülasyon yapılarak (100 µL) çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi 7 gün olup, bu süre sonunda kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra optimum tercih ettiği maya ekstraktı konsantrasyonu belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.1.7.7 Farklı magnezyum konsantrasyonlarının halofilik mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisi

Farklı magnezyum konsantrasyonlarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, tuz kaynağı olarak $MgCl_2 \times 6H_2O$ kullanılmıştır. Hazırlanan SGB besiyerleri içersine % 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8;ve 3 w/v konsantrasyonlarında $MgCl_2 \times 6H_2O$ eklenmiş, daha sonra kültürlerden inokülasyon yapılarak (100 μ L) çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 40 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Halofil kültürler 7 gün boyunca geliştirilmiştir. Kültürlerin gelişimi (mg/ mL) kayıt altına alındıktan sonra, optimum tercih ettiği $MgCl_2 \times 6H_2O$ konsantrasyonu belirlenmiştir (Montalvo-Rodriguez, vd., 1997; Montalvo-Rodriguez, 1998; Stan-Lotter, vd., 2002; Gruber, vd., 2004).

2.2 Analiz Yöntemleri

2.2.1 Kuru ağırlığın belirlenmesi

SGB besiyerinde 37 °C' de 24 saat boyunca geliştirilen tüm kültürler, logaritmik fazda hasat edilmiştir. Hasat sonucu elde edilen pellet 0,45 μ m por çapındaki Whatman GF/C filtreler ile süzölmüş ve 50 °C' de 24 saat kurutularak kuru ağırlıkları saptanmıştır (Cappuccino ve Sherman, 2001). Tüm çalışmalarda mikroorganizmaların gelişimi kuru ağırlık standart eğrisinden hesaplanmıştır. Bu amaç için 0,002; 0,004; 0,006 ve 0,008 g/mL konsantrasyonlarında kuru ağırlıklar hazırlanmış ve standart eğri çizimi Excel programı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31).

2.1.2 Toplam protein tayini ve standart eğrisinin hazırlanması

Total protein miktarı (5- 100 μ g/mL) hassalığına sahip olan Bradford vd. (1976), yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada standart olarak sığır serum albüminin (BSA) önerilen konsantrasyonları (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, μ g) çalışılmıştır (Şekil 27). Bu

yöntem proteinlere coomassie brillant blue G-250 boyasının bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbands göstermektedir.

2.1.3 Toplam proteaz tayini ve tirozin standart eğrisinin hazırlanması

Total protein miktarı (5-100 µg/mL) hassalığına sahip olan Lowry vd. (1951), yöntemi ile belirlenmiştir. Proteaz aktivitesinin hesaplamasında kullanılan tirozin standart eğrisinin oluşturulması için, 50 mM Glisin-NaOH-NaCl (pH 10,5) tamponunda 0- 0,66 µg/mL tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır (Şekil 28). Folin-Ciocalteu (fosfomolibden ve fosfotungsten), tirozin ve triptofan aminoasitlerine bağlanarak 660 nm’ de maksimum absorbands vermektedir. Elde edilen veriler ile tirozin standart eğrisi Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

2.1.4 Proteaz aktivitesinin kantitatif belirlenmesi

Tüm halofil kültürler için kendi optimum koşullarında hazırlanan besiyerlerinde, kültürlerin gelişimleri sağlandıktan sonra kantitatif enzim aktivitesi çalışmalarına geçilmiştir. Kültürlerin kazeinaz aktivitesi Namwong, vd. (2006) ve Brock, vd. (1982) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Öncelikli olarak optimum koşullarında geliştirilen kültürler 15 mL’lik falkon tüplerine alınmış ve 10000 rpm’de 10 dakika +4 °C’ de santrifüj edilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmaları için % 0,65 (v/w) kazein substratı % 20 NaCl içeren 50 mM Glisin-NaOH tamponunda (pH 7,5) hazırlanmış ve bundan sonra substrat 40 °C’ deki ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak çözüldürülmüştür. Kazein substratı 1:1 oranında örnek ve şahit olacak şekilde hazırlanan temiz tüplere 2,5 mL dağıtılmıştır. Hazırlanan denemeler 37 °C’ de su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 10000 rpm’de 10 dakika +4 °C’ de tekrar santrifüj edilen örneklerden 0,5 mL alınarak şahit dışındaki tüplere aktarılmıştır. 37 °C’ de, 10 dakikalık inkübasyon sonunda, örnekler üzerine 2,5 mL 110 mM Trikloro asetik asitten (TCA) (% 1,79 v/w) ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Şahit olarak 2,5 mL TCA ve 0,5 mL enzim çözeltisi kullanılmıştır. Numunelerin tamamı karıştırıldıktan sonra 37 °C’ de 30 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda numuneler 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant

kısından 0,5 mL alınarak temiz tüplere aktarım yapılmış ve üzerlerine 1,25 mL Na_2CO_3 (500 mM) ilave edilmiştir. Ardından üzerine 0,25 mL Folin reaktifi eklenmiştir (1:4). Numuneler karıştırıldıktan sonra 37 °C' de 30 dakika su banyosunda tutulmuş ve daha sonra absorbans değerleri spektrofotometrik (Optizen) olarak 660 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri üzerinden proteaz aktivitelerinin hesaplamaları yapılmıştır (Namwong, vd., 2006; Brock, vd., 1982).

1 birim proteaz aktivitesi reaksiyon koşullarında dakikada 1 μmol (181 μg) tirozin oluşturan enzim miktarı olarak alınmıştır (Malashetty, vd., 2006). Enzim aktivitesinin hesaplanması aşağıdaki formülden yararlanılarak yapılmıştır (2.1).

$$\text{Unit/mL} = \frac{\frac{\text{Absorbans}}{\text{eğim}} \times \text{Denemenin toplam hacmi (5,5 mL)}}{\text{Kullanılan enzim miktarı (0,5 mL)} \times \text{Reaksiyon süresi (10dk)} \times \text{Kolorimetrik tayinde kullanılan enzim hacmi (0,5 ml)}} \quad (2.1)$$

2.1.5 Serin proteaz enziminin kısmi saflaştırılması

Enzim aktivitesi yüksek olan bir adet halofil kültür optimum gelişim şartları altında inkübasyona bırakılmış ve biyokütle elde edilmiştir. Biyokütle üretimi 2000 mL' lik erlenlerde 1000 mL olacak şekilde ve kendi optimum koşullarında hazırlanmış besiyeri bulunan ortamlara, % 10 oranında inokülüm ilave edilerek sağlanmıştır. Kültürler 40 °C' de 7 gün inkübasyona bırakılarak halofil kültür gelişimi elde edilmiştir. Elde edilen halofil kültür biyokütelleri, 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, hücre dışı enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere süpernatantı ayrılmıştır. Elde edilen ham enzim, % 40 amonyum sülfatın damla damla eklenmesi ile çöktürülmüştür. Oluşan çökelti % 20 NaCl ihtiva eden 5 mL, 50 mM glisin-NaOH tamponu (pH 10) içinde yeniden süspansiyona alınmış ve aynı tampon içinde diyalize alınmıştır. Diyalizden geçirilen örnek % 20 NaCl ihtiva eden 50 mM glisin-NaOH tamponu (pH 10) ile dengelenmiş sefakril S-200 HR dolgu maddesi içeren bir kolona yüklenmiş (1,6 x 60 cm) ve kolonun akış hızı dakikada 0,2 mL olacak şekilde ayarlandıktan sonra 2 mL' lik fraksiyonlar toplanmıştır. Saflaştırma işlemleri oda sıcaklığında (25± 2 °C) gerçekleştirilmiştir. Toplanan fraksiyonların tamamına protein tayini ve kazeinaz aktivitesi yapılmıştır. Saflaştırılan enzimin alikotları, 5

mM serin proteaz inhibitörü olan, fenil metil sülfonil florür (PMSF) ile 25 °C' de 1 saat bekletilerek inaktive edilmiştir (Vidyasagar vd., 2006).

2.1.6 Jel filtrasyon kromatografisi

Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kolon dolgu maddesi % 20' lik etanol içerisinde kullanıma hazır olarak alınmıştır. 20 mL kolon dolgu maddesi (1,6 x 60 cm) kolona doldurulduktan sonra, distile su ile yıkanmak suretiyle etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kolon 50 mM glisin- NaOH (pH 10) dengeleme tamponuyla dengelenmiştir. Elüsyonlar toplandıktan sonra 280 nm' de UV absorbansları ve 660 nm' de ise proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

2.1.7 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), molekül ağırlığı 10 kD' den büyük proteinleri ayırmak için kullanılmaktadır. Bu çalışmada diyaliz edilmiş enzim numunesi, sodyum dodesil sülfat (% 15) poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak ayırt edilmiştir (Laemli, 1970). Bu çalışmada kullanılan markör içeriği β -galaktozidaz 116 kDa, sığır serum albümin 66,2 kDa, oval albumin 45 kDa, laktat dehidrojenaz 35 kDa, REase Bsp981 25 kDa, β -laktoglobulin 18,4 kDa ve lizozim 14,4 kDa' dur.

2.1.8 Enzim karakterizasyonu

Kısmi olarak saflaştırılan enzimin karakterizasyonu amacı ile yürütülen çalışmalarda sıcaklık, pH, NaCl, farklı metal iyonları, doğal substratlar, inhibitörler ve yüzey aktif maddeleri çalışılmıştır.

2.1.8.1 Farklı sıcaklık değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı sıcaklık değerlerinin saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile sıcaklık değeri olarak 20, 40, 60 ve 80 °C' de çalışılmış ve optimum enzim aktivitesi görülen sıcaklık değeri tayin edilmiştir. Çalışma

Vidyasagar, vd., (2006)'ın bildirdiği metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)'nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

2.1.8.2 Farklı pH değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı pH değerlerinin saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile pH değeri olarak 6, 7, 8, 9 ve 10 aralıkları belirlenmiş ve optimum enzim aktivitesi görülen pH değeri tayin edilmiştir (Vidyasagar, vd., 2006). Enzim aktiviteleri ise, Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)'nin bildirdiği metotlara göre belirlenmiştir.

2.1.8.3 NaCl farklı konsantrasyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi

NaCl farklı konsantrasyonlarının saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile, tuz konsantrasyonu olarak % 5, 10, 20 ve 30 aralıkları denenmiş ve optimum enzim aktivitesi görülen tuz konsantrasyonu tayin edilmiştir (Vidyasagar, vd., 2006). Enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)'nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

2.1.8.4 Farklı metal iyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 6 metal iyonu denenmiş ve konsantrasyonu 1 mM olarak belirlenmiştir. Bu metal iyonları, FeCl₃, MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, BaCl₂ ve KCl' dir. Çalışmalar sonucunda optimum enzim aktivitesinin görüldüğü metal iyonu belirlenmiştir (Vidyasagar, vd., 2006). Enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)'nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

2.1.8.5 Farklı substratların serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı substratların saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 3 substrat % 0,65 konsantrasyonunda denenmiştir. Bu substratlar kazein, sığır serum albumin (BSA) ve jelatindir. Çalışma sonunda optimum enzim

aktivitesinin görüldüğü substrat saptanmıştır (Vidyasagar, vd., 2006). Enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)' nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

2.1.8.6 Farklı inhibitörlerin serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı inhibitörlerin saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 4 inhibitör kullanılmış ve bunların konsantrasyonu 1mM olacak şekilde belirlenmiştir. Bu inhibitörler, fenil metil sulfonil florid (PMSF), β - Merkaptto etanol, EDTA ve üredir. İnhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi Vidyasagar, vd., (2006) ile enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)' nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

2.1.8.7 Farklı yüzey aktif maddelerin serin proteaz aktivitesine etkisi

Farklı yüzey aktif maddelerinin saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 2 yüzey aktif maddesi kullanılmış ve bunların konsantrasyonu 1mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu yüzey aktif maddeleri Triton X-100 ve SDS' dir. Yüzey aktif maddelerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi Vidyasagar, vd., (2006) göre belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri ise Namwong, vd., (2006) ile Brock, vd., (1982)' nin bildirdiği metotlara göre saptanmıştır.

3. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Tuz Gölü'nden elde edilen izolatlara ait biyokimyasal ve morfolojik özellikler Çizelge 2.7.'de özetlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, izolatların tamamının Gram negatif hücre duvarı yapısında olduğu saptanmıştır. Mikroskobik morfolojilerinin yaklaşık % 71' i basil yapısında olduğu sadece üç kültürün pleomorfik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Koloni pigmentlerinin ise farklılık gösterdiği, kültürlerin tamamının oksidaz pozitif ve katalaz pozitif olduğu saptanmıştır. Nişastayı parçalamayan tüm kültürler hareketsiz olup glukoz, sukroz ve laktozu kullanmadıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Tuz Gölünden izole edilen halofilik mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

Mikroorganizma Özellikler	B1	B2	B4	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	A11	A22	A2
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfoloji	Basil	Basil	Basil	Basil	Pleomorfik (üçgen, kare)	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Pleomorfik (yuvarlak, kare)	Pleomorfik
Pigment	Krem	Krem	Krem	Krem	Krem	Krem	Şeffaf	Açık kahverengi	Krem	Krem - Kahve	Kahverengi	Krem	Kırmızı
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat indirgenmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Çizelge 3.9. (Devamı)

Nitrit redüksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein hidrolizi	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Hareket testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H₂S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asit üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tuz gölünden izole edilen tüm kültürlerimizin antibiyotik dirençlilik profilleri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.10.' da özetlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde ise kültürlerin ampisilin (10 µg), basitrasin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve novobiyosin (30 µg) antibiyotiklerine dirençlilik gösterdiği saptanmıştır. Streptomisin (10 µg) ve eritromisin (15 µg) antibiyotiklerine ise duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 3.10.).



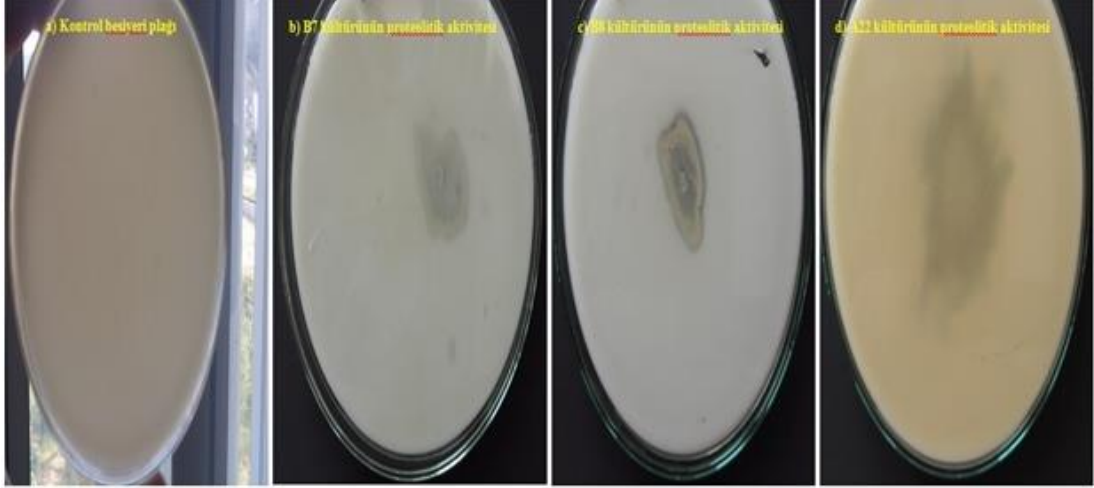
Çizelge 3.10. Tuz gölünden izole edilen halofilik mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilik profilleri

Mikroorgaizma	B1	B2	B4	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	A11	A22	A2
	inhibisyon zon çapları (mm)												
Ampisilin	-	0	0	10	-	20	30	0	0	0	-	10	-
Streptomisin	-	70	60	60	-	40	40	40	40	40	-	40	-
Eritromisin	-	60	70	60	-	50	60	50	60	50	-	50	-
Penisilin	-	30	10	10	-	0	0	0	20	20	-	40	-
Basitrasin	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-
Novobiyosin	-	15	15	20	16	16	10	10	0	0	-	14	-
Tetrasiklin	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	-

0: inhibisyon yok; (-): denenmemiştir

3.1. Tuz Gölü'nden İzole Edilen Kültürlerin Kalitatif Proteolitik Aktiviteleri

Tuz Gölü'nden alınan numunelerden izole edilen 13 kültürün proteolitik aktivitelerinin varlığını saptamak amacı ile çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda % 1 skim milk içeren SGA plaklarına aktif kültürlerin inokülasyonu sağlanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerin etrafındaki şeffaf zon varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar Şekil 3.6.'da verilmektedir. Çalışmalar sonucunda 3 kültürün (B7, B8 ve A22) proteolitik aktiviteye sahip olduğu saptanmış ve bu 3 kültür ile ileri çalışmalara devam edilmiştir.

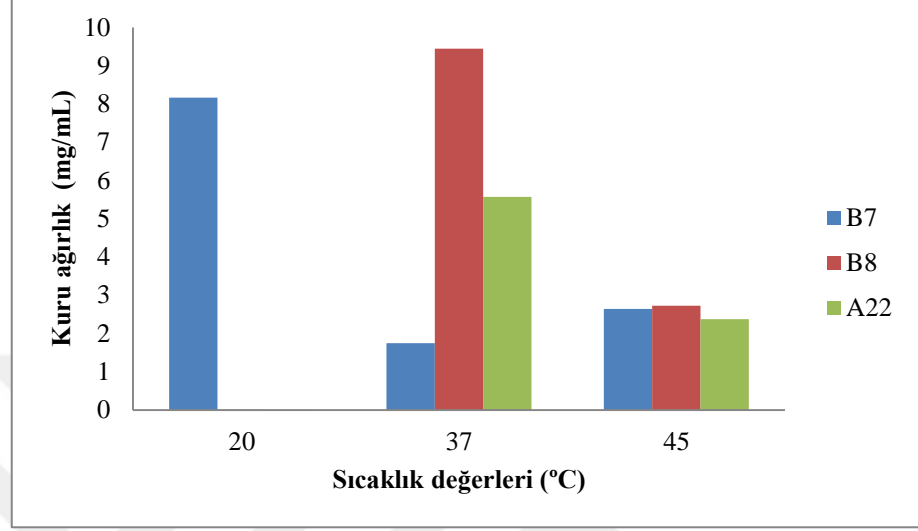


Şekil 3.6. Kültürlerin kalitatif proteolitik aktiviteleri

3.2. Tuz Gölü'nden İzole Edilen Kültürlerin Gelişimine Farklı Çevresel Koşulların Etkisi

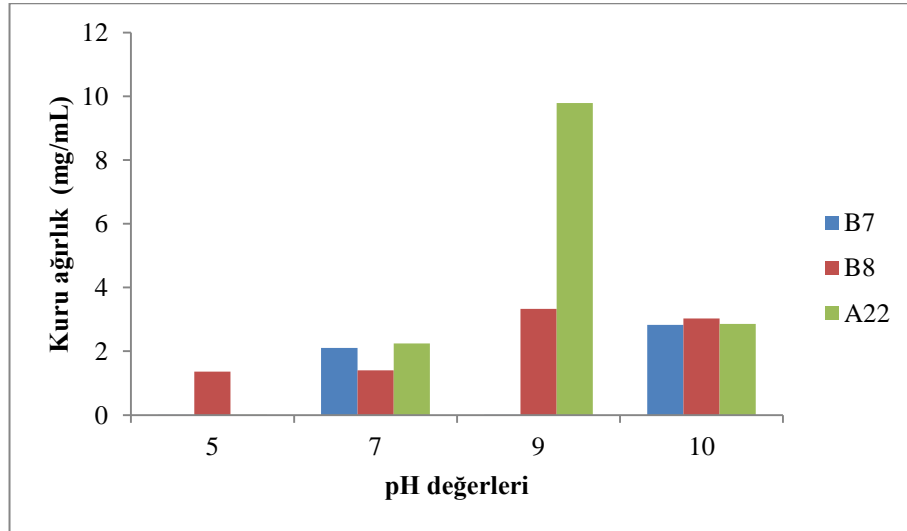
Tuz Gölünden izole edilen halofil izolatların gelişimine farklı çevresel koşulların etkisi incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13' de özetlenmiştir.

Şekil 7’de farklı sıcaklık değerlerinin (20, 37, 45 °C) izolatların gelişimlerine etkisi incelenmiş ve B8 ve A22 izolatlarının optimum sıcaklığının 37 °C, B7 izolatının ise 20 °C olduğu saptanmıştır (Şekil 3.7.).



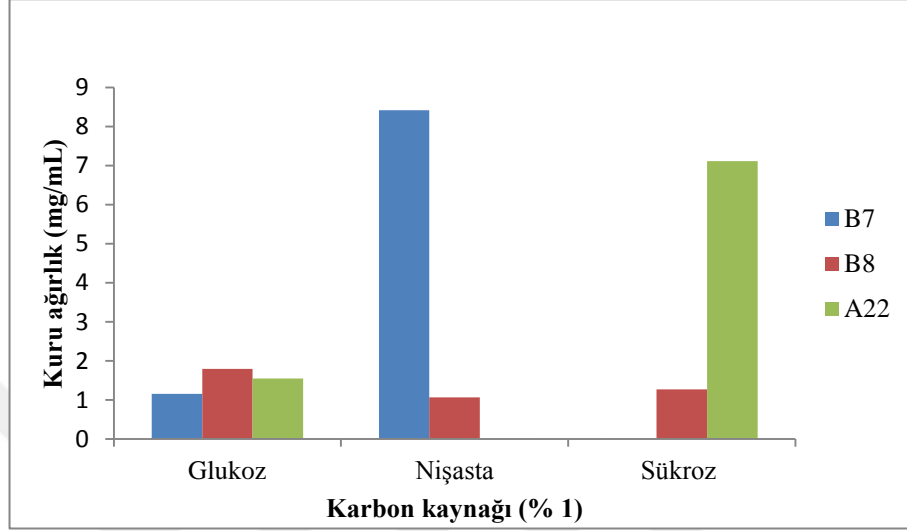
Şekil 3.7. Farklı sıcaklık değerlerinin kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Farklı pH değerlerinin (pH 5, 7, 9, 10) halofilik kültürlerin gelişimi üzerindeki etkisi Şekil 3.8.’ de verilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında, A22 ve B8 kültürleri için optimum pH 9 iken, B7 izolatı için bu değer pH 10 olarak bulunmuştur.



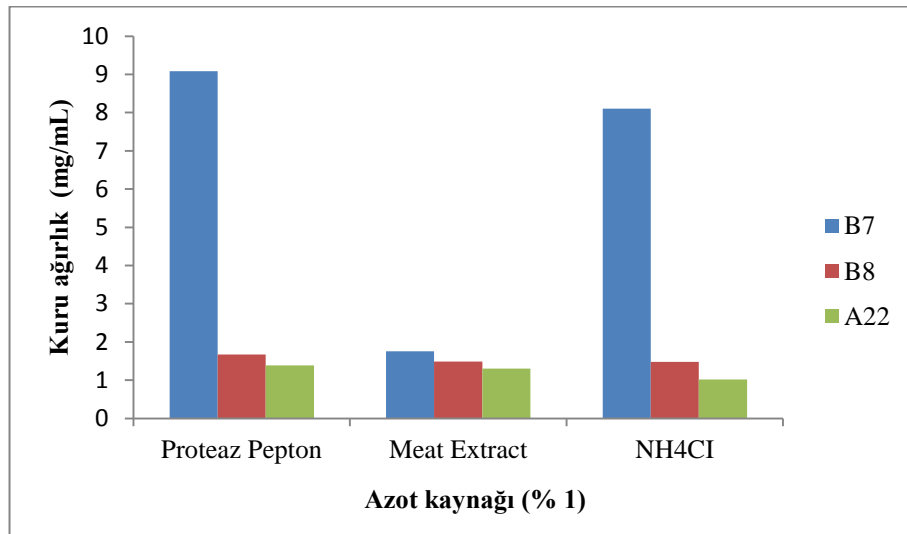
Şekil 3.8. Farklı pH değerlerinin kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının kültürlerin gelişimi üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile % 1 oranında glukoz, nişasta ve sukroz karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.. Çalışmaya göre B7 kültürü optimum gelişimini % 1 nişasta içeren ortamda gerçekleştirmiştir. A22 kültürü ise % 1 sukroz ortamında, B8 kültürü ise % 1 glukoz ortamında optimum gelişim göstermiştir (Şekil 3.9.).



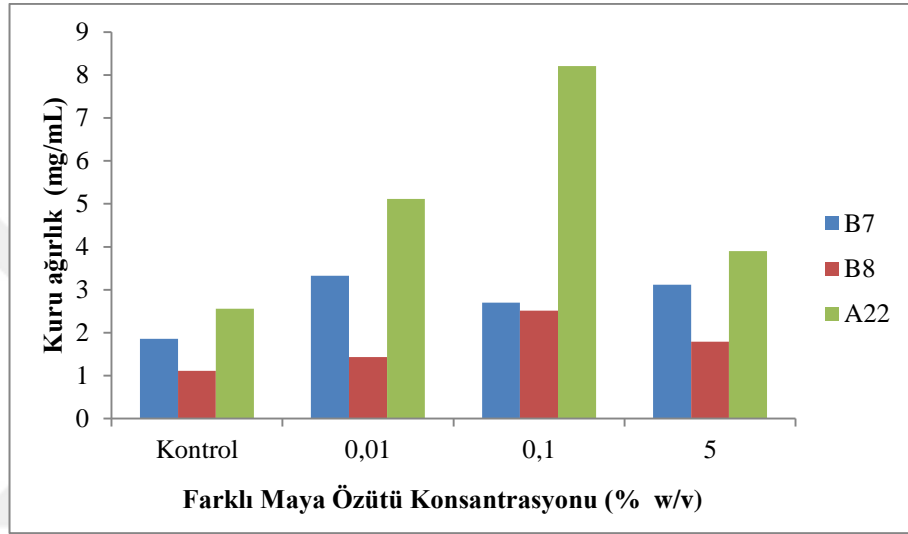
Şekil 3.9. Farklı karbon kaynaklarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Çalışmada seçilen kültürlerin gelişimi üzerine farklı azot kaynakları olarak % 1 oranında proteaz, pepton, meat ekstrakt ve amonyum klorür denenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler Şekil 3.10.' da özetlenmektedir. Buna göre B7, B8 ve A22 kültürleri % 1 proteaz pepton ortamında optimum gelişme göstermişlerdir.



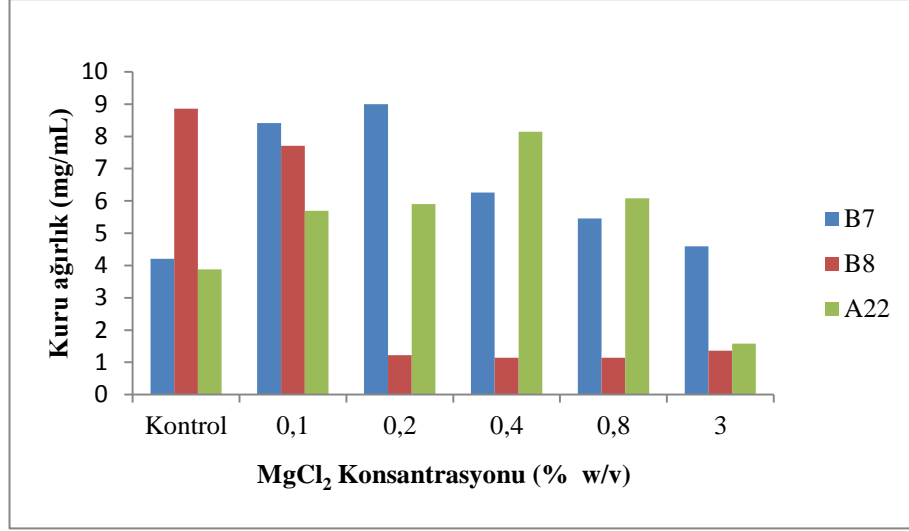
Şekil 3.10. Farklı azot kaynaklarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Optimizasyon çalışmalarımızda denediğimiz bir diğer çevresel koşul maya özütünün etkisi olmuştur. Bu çalışmada maya özütü farklı konsantrasyonlarının (% 0,001, 0,1 ve 5) gelişim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Şekil 3.11.' de verilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında kültürlerin farklı etkilendiği gözlenmiştir. A22 kültürünün optimum gelişme gösterdiği maya özütü konsantrasyonu % 0,1 iken, B7 kültürünün % 0,01 ve B8 kültürünün ise optimum gelişimi % 0,1 maya özütü konsantrasyonundan sağlanmıştır.



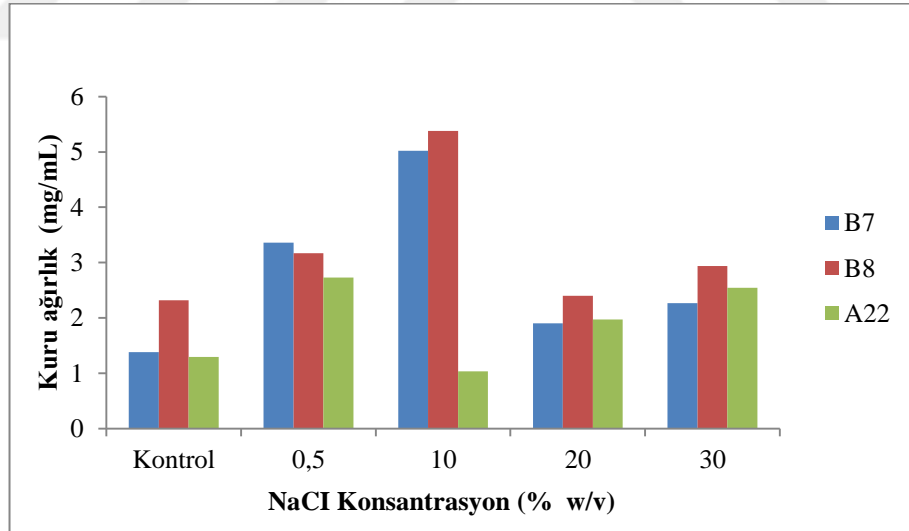
Şekil 3.11. Maya özütü farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Halofil kültürlerin gelişimi üzerine $MgCl_2$ farklı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş ve bu çalışmada % 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ve 3 konsantrasyonları denenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları Şekil 3.12.' de verilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında ise, kültürlerin magnezyumdan farklı etkilendiği saptanmıştır. Buna göre B7 kültürünün optimum gelişim gösterdiği $MgCl_2$ konsantrasyonu % 0,2 iken, B8 kültürünün % 0,1 olmuş ve A22 kültürünün ise % 0,4 $MgCl_2$ konsantrasyonunda optimum gelişim gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 3.12. Magnezyum farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

Tuzun farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkileri incelenmiş ve bu çalışmada % 0,5; 10; 20 ve 30 NaCl konsantrasyonları denenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler Şekil 3.13.' de özetlenmiştir. Bu çalışmaya göre B7 ve B8 kültürleri optimum gelişmelerini % 10 NaCl konsantrasyonunda göstermişlerdir. A22 kültürü ise % 0,5 NaCl konsantrasyonunda optimum gelişmiştir.



Şekil 3.13. Tuzun farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkisi

3.3. Kantitatif proteaz aktiviteleri

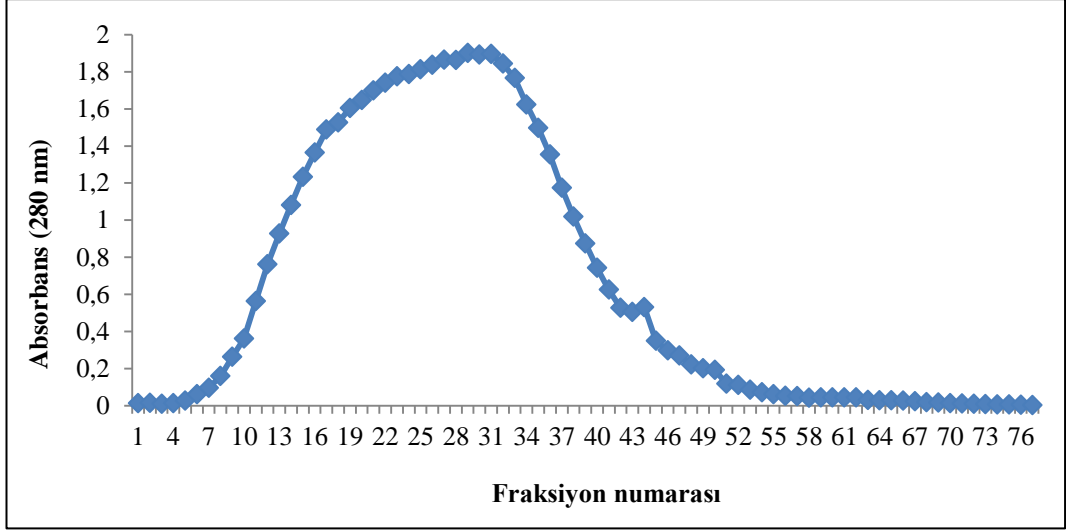
Tuz Gölü'nden izole edilen kültürlerin optimum gelişimini sağlamak amacıyla farklı çevresel koşullar denenmiş ve elde edilen sonuçlar dikkate alınarak kültürler kendi şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürlerin proteaz aktiviteleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmamızdan elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11.'de verilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında, en yüksek proteaz aktivitesi A22 kültüründen elde edilmiştir. Saflaştırma denemelerine bu kültür ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.11. Kültürlerin proteaz aktivitelerinin optimizasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması

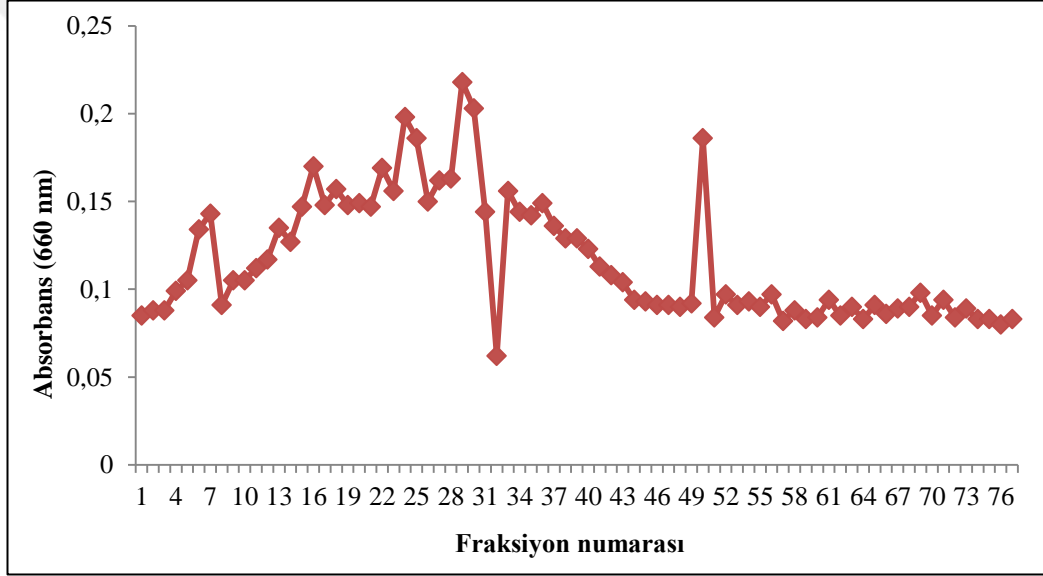
Mikroorganizma / Aktivite	7	7 Optimize	8	8 Optimize	22	22 Optimize
U/mL	0,33	0,61	0,30	0,53	0,30	0,70

3.4. Jel filtrasyon kromatografisi

Protein saflaştırma işlemleri jel filtrasyon kromatografisi tekniği ile ve 5- 250 kDa ayırma aralığına sahip Sefakril S-200 HR kullanılarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler Şekil 3.14. ve Şekil 3.15.'de özetlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları dikkate alındığında 27 ile 31. fraksiyonların aralığı proteaz enzimini ve serin proteaz enziminin varlığını göstermektedir. En yüksek aktivitenin görüldüğü fraksiyon ise 29. fraksiyondur. Fraksiyonlardaki serin proteaz varlığı, bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile reaksiyona sokulduktan sonra inhibisyonun gözlenmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Daha sonra aktivite gösteren tüm fraksiyonlar toplanmış ve enzim fraksiyonlarının daha fazla saflaştırılmasına yönelik olarak diyaliz için kullanılmıştır.



Şekil 3.14. Jel filtrasyon kromatografisi ile toplanan fraksiyonların toplam protein sonuçları



Şekil 3.15. Jel filtrasyon kromatografisi ile toplanan fraksiyonların toplam proteaz sonuçları

3.5. Serin Proteaz Enzimi Saflaştırma izelgesi

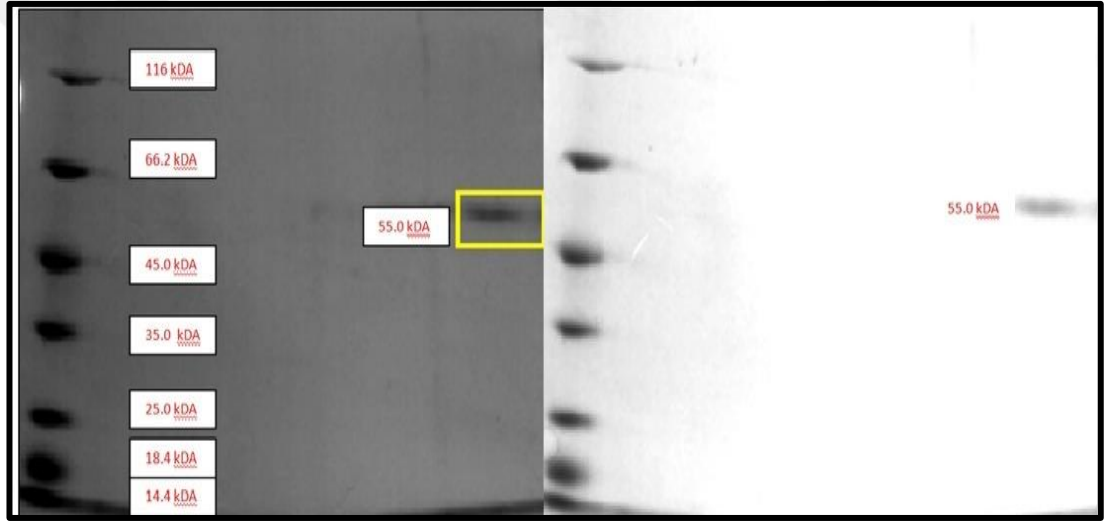
Çalışmada A22 kültüründen serin proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Ham enzimin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ktrmesi sonucu elde edilen enzim ile kolon kromatografisi sonucu elde edilen saf enzime ait değerler izelge 3.12.' de özetlenmiştir. Bu çalışmamıza göre $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ktrmesi sonucunda % 71, kolon kromatografisi sonucunda ise % 6,2 verimle enzim elde edilmiştir.

Çizelge 3.12. A22 kültürünün serin proteaz enzimine ait saflaştırma izelgesi

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U/mL)	Spesifik aktivite U/mg	Saflaştırma oranı	Verim (%)
Ham ekstrakt	450	17550	247,5	0,014	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400	21040	176	0,008	0,5	71,1
Jel Geçirgenlik Sefakril S-200	50	5510	15,5	0,31	22	6,2

3.6. Kısmi Saflaştırılmış Proteazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış enzim SDS-PAGE ile ileri saflaştırmaya alınmış ve enzimin boyutu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan markörün sahip olduğu moleküler ağırlık bantları; β -galaktozidaz 116 kDa, sığır serum albümin 66.2 kDa, oval albumin 45 kDa, laktat dehidrojenaz 35 kDa, REase Bsp981 25 kDa, β - laktoglobulin 18,4 kDa ve lizozim 14,4 kDa' dur (Şekil 3.16.). Kısmi saflaştırılmış halofilik kültürün enzimine ait SDS-PAGE görüntüsü ise Şekil 3.16' da verilmektedir. Çalışma sonucu elde edilen bandın moleküler ağırlığı yaklaşık 55,0 kDa olarak belirlenmiştir.

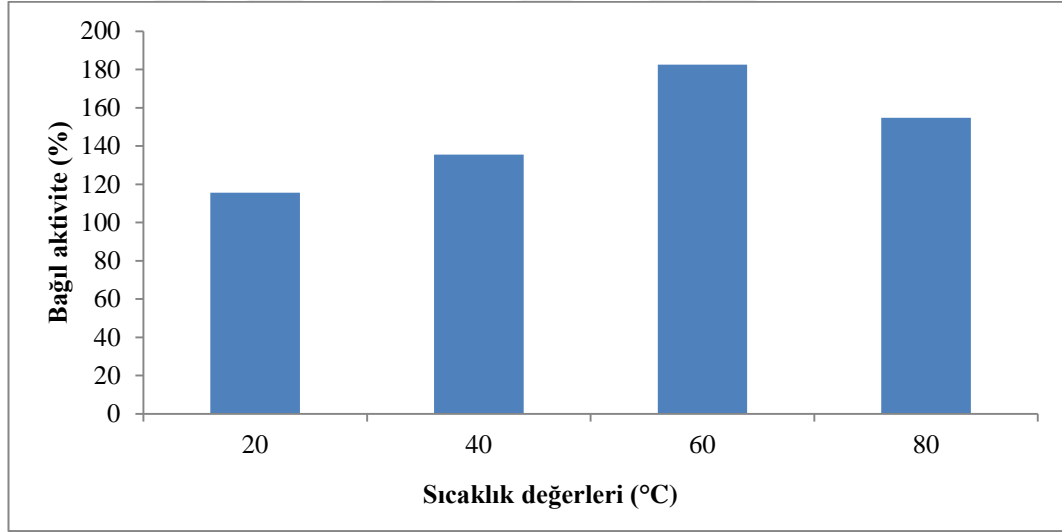


Şekil 3.16. Saflaştırılmış serin proteaza ait SDS-PAGE görüntüsü

3.7. Enzim Karakterizasyon Sonuçları

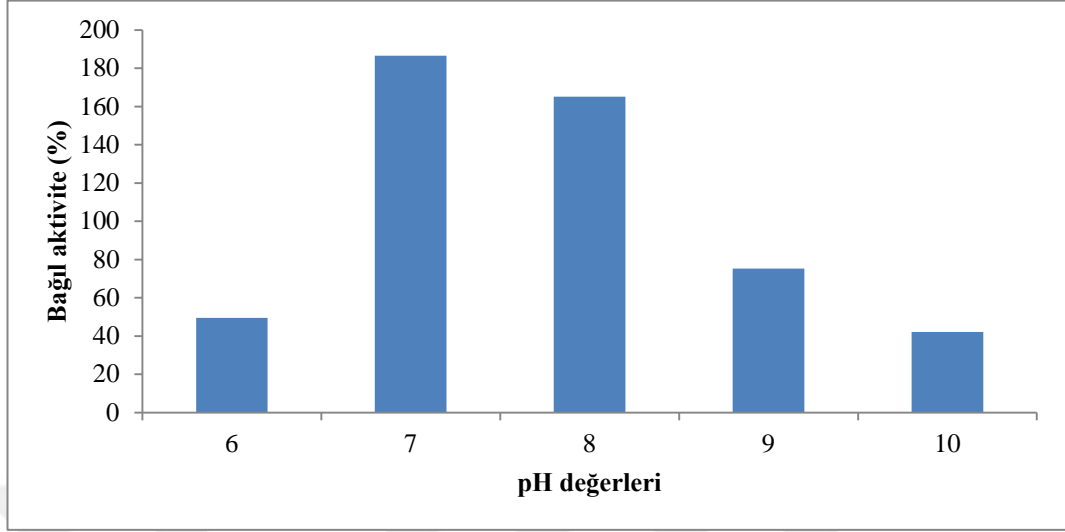
A22 kültründen saflaştırılan enzimin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda farklı çevresel koşullar denenmiştir. Bunlar farklı sıcaklık (20, 40, 60 ve 80 °C), farklı pH (6, 7, 8, 9 ve 10), farklı tuz konsantrasyonları (% 5, 10, 20, 30 NaCl), farklı metal iyonları (1mM FeCl₃, MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, BaCl₂, CoCl₂ ve KCl), farklı doğal substratlar (% 0,65 kazein, BSA ve jelatin), farklı inhibitör maddeler (1 mM PMSF, β-merkapt etanol, EDTA, üre) ile farklı yüzey aktif maddeleri (1mM Triton X-100, SDS)' dir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar Şekil 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22 ve 3.23.' de özetlenmiştir.

A22 kültüründen saflaştırılan enzimin karakterizasyonunda farklı sıcaklık değerleri denenmiş ve enzimin 60 °C' de optimum aktiveye sahip olduğu (% 182) belirlenmiştir (Şekil 3.17.).



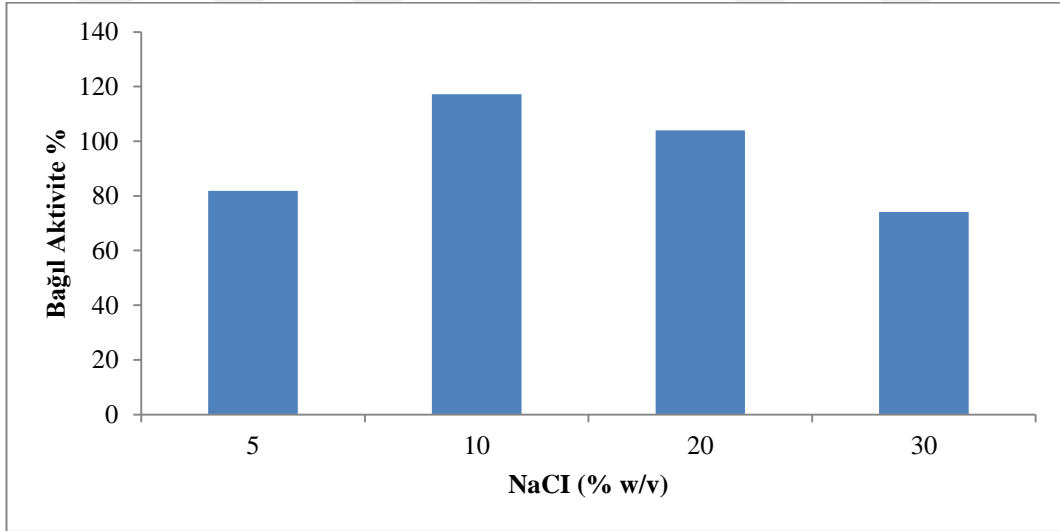
Şekil 3.17. Farklı sıcaklık değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi

Saflaştırılan enzimin farklı pH değerlerindeki aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda enzim pH 7’ de optimum aktivite (% 186) göstermiştir (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Farklı pH değerlerinin serin proteaz aktivitesine etkisi

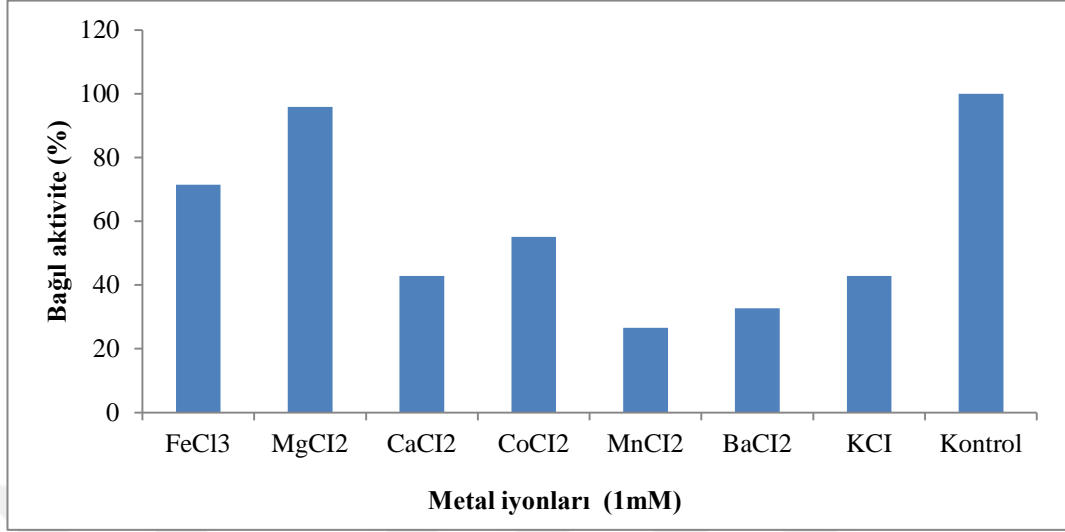
Tuzun farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalarda ise, enzimin % 10 NaCl ortamında optimum aktivite (% 117) gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. Tuzun farklı konsantrasyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi

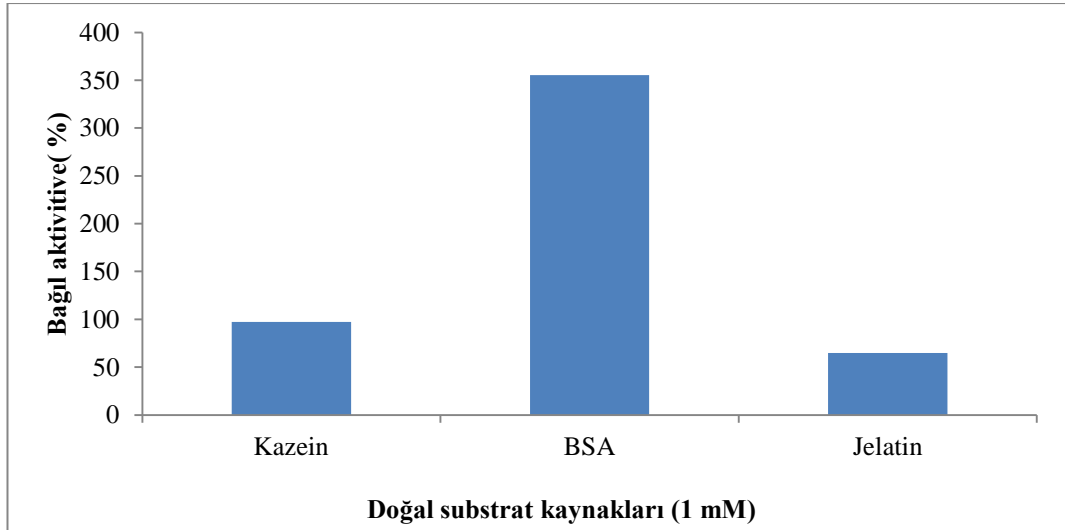
Farklı metal iyonlarının enzim üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, enzimin 1mM MgCl₂ içeren ortamda optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (% 95,9) (Şekil 3.20.). Bu çalışmada kullanılan metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri çalışmasında en yüksek enzim aktivitesinden düşüğe doğru sıralama yapıldığında ise,

MgCl₂ > FeCl₃ > CoCl₂ > CaCl₂ > KCl > BaCl₂ > MnCl₂ şeklinde aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.20. Farklı metal iyonlarının serin proteaz aktivitesine etkisi

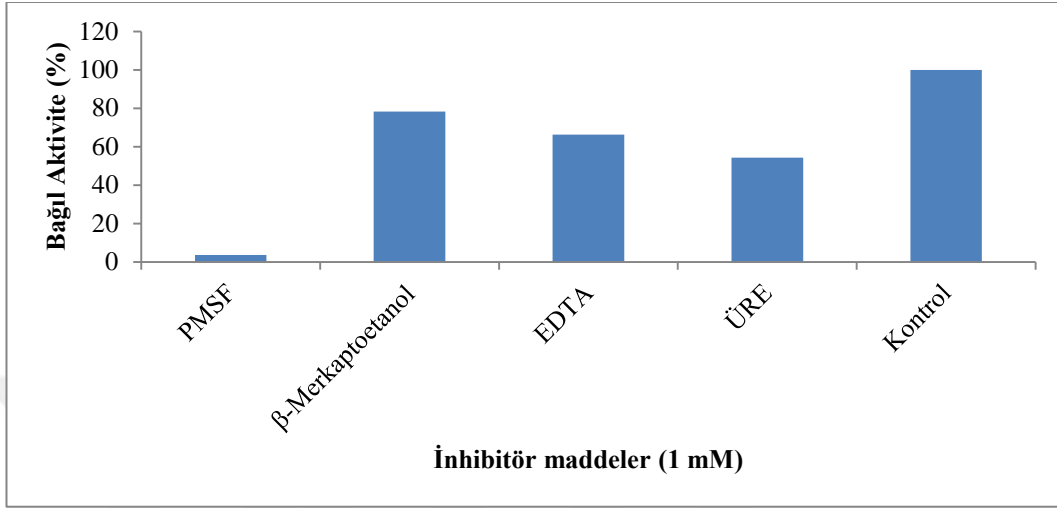
Enzim karakterizasyonu üzerinde yapılan bir diğer çalışma ise, farklı doğal substratların etkisi olmuştur. Bu çalışmada yaygın kullanılan 3 substrat seçilmiştir. Bunlar kazein, BSA ve jelatindir. Bu çalışmanın verileri aşağıda Şekil 3.21' de verilmektedir. Enzimin optimum aktivite (% 355) gösterdiği substrat % 0,65 BSA' dır.



Şekil 3.21. Farklı doğal substratların serin proteaz aktivitesine etkisi

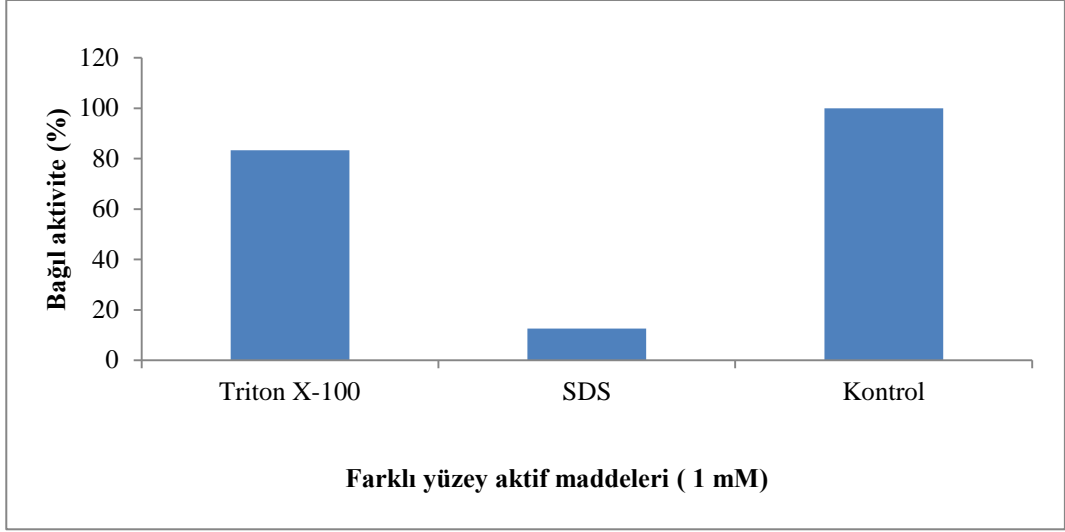
Farklı inhibitör maddelerin enzim üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda 4 farklı inhibitör denenmiştir. Bunlar 1 mM konsantrasyonda olan PMSF, β-

merkaptotanol, EDTA ve üredir. Bu çalışmanın verileri Şekil 3.22.' de verilmektedir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu en fazladan en aza doğru sıralandığında ise, PMSF < üre < EDTA < β-merkaptotanol şeklinde bir baskılanma saptanmıştır (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. Farklı inhibitör maddelerin serin proteaz aktivitesine etkisi

Enzim karakterizasyonu çalışmalarında incelenen bir diğer çevresel faktör ise yüzey aktif maddeleri olmuştur. İki yüzey aktif maddesi bu çalışmada denenmiş olup, bunlar 1 mM konsantrasyonda Triton X-100 ile SDS' dir. Bu çalışmanın verileri Şekil 3.23.' de verilmektedir. Çalışmada enzim aktivitesinin en fazla SDS' ten etkilendiği saptanmıştır. Enzim aktivitesi % 12,5 oranında kalırken, inhibisyon oranı % 87,5 gibi yüksek bir oranda olmuştur. Triton X-100'de ise enzim aktivitesi % 16,7 oranında inhibe olmuştur (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Farklı yüzey aktif maddelerinin serin proteaz aktivitesine etkisi

4. TARTIŞMA

Halofilik mikroorganizmaların karakterizasyonu veya karşılaştırılması üzerine yapılan taksonomik çalışmalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal maddelere duyarlılık oldukça fazla kullanılmaktadır (Oren, vd., 1997). Halofilik arkeler, bakterilere özgü olan peptidoglikan yapısında hücre duvarına sahip olmadıkları için bir çok antibiyotikten etkilenmemektedirler (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo, vd., 1984; Böck ve Kandler, 1985).

Tuz gölünden izole edilen halofilik kültürlerin antibiyotik dirençlilik profilleri bu çalışmada incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.10.' da özetlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, kültürlerin bir çoğunun ampisiline dirençli olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.10.). β -laktam halkası içeren ampisilin bakterilerde hücre duvarı sentezinde transpeptidasyonu sağlayan transpeptidaz enzimini inhibe ederek duvar sentezini engellemektedir (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo, vd., 1984). Literatüre göre *Haloterrigena longa* sp. (Heng-Lin Cui, vd., 2006), *Halococcus qingdaonensis* (Wang, vd., 2007), *Halococcus dombrowskii* sp. (Stan-Lotter, vd., 2002), *Haloarcula vallismortis* (HA3) ile *Haloarcula quadrata* (HA9) (Asha, vd., 2005), *Halogeometricum borinquense* sp. (Montalvo-Rodriguez, vd., 1998), *Natronoarchaeum mannanyticum* (Shimane, vd., 2010) ve *Haloterrigena salina* sp. (Gutie'rrrez, vd., 2008) arkeal kültürlerinin ampisiline dirençli olduğunu bildirilmiştir. Literatürden sağlanan bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

Bu çalışmada halofilik kültürlerin birçoğunun penisiline dirençli olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.10.). Penisilinler ilk keşfedilen doğal antibiyotiklerden olup, *Penicillium* cinslerinden elde edilmekte ve bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir. Doğal ve yarı-sentetik olmak üzere iki farklı çeşidi olmasına rağmen, yapısal olarak bütün penisilin molekülleri bir β -laktam çekirdeğinden (6-APA) ve bu çekirdeğe bağlı bir yan zincirden meydana gelmektedir. 6-APA çekirdeği L-sistein ve D-valin amino asitlerinden oluşmaktadır (Demain ve Elander, 1999). Literatürden sağlanan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Bu çalışmalar *Haloterrigena longa* sp. (Heng-Lin Cui, vd., 2006), *Halococcus qingdaonensis* sp. (Wang, vd., 2007), *Halodaptatus paucihalophilus* (Savage, vd., 2007), *Haloarcula qudrata* (HA9) (Asha, vd., 2005), *Halogeometricum borinquense* sp. (Montalvo-Rodriguez, vd., 1998), *Natronoarchaeum mannanyticum* (Shimane, vd., 2010), *Haloterrigena salina* sp. (Gutie´rrez, vd., 2008) ile yapılmış ve penisiline dirençleri literatürde bildirilmiştir.

Çalışmamızda ayrıca kültürlerin birçoğunun basitrasine dirençli olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.10.). Bakterilerde pirofosfataz enzimine bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eden basitrasine, böylece bakteride taşıyıcı lipitlerin alıcı lipit formuna geçmesini sağlamaktadır. Basitrasinin kokkoid yapıda olmayan halofilik arkelerde hücre duvarı yapısındaki glikoprotein içerisine yüksek molekül ağırlıklı şekerlerin katılımını inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca C55-izoprenil pirofosfat ile kompleks oluşturup yüzey glikoproteinlerinin sentezini inhibe ettiği ve lipit biyosentezini inhibe edebileceği de ileri sürülmektedir (Wieland, vd., 1982; Bonelo, vd., 1984). Bildirilen bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında, *Haloterrigena longa* sp. ve *Haloterrigena limicola* sp. türleri (Heng-Lin Cui, vd., 2006) ile, *Haloarcula qudrata* (HA9) (Asha, vd., 2005) türünün basitrasine dirençli olduğu rapor edilmektedir.

Novobiyosin ile yaptığımız çalışmalar sonucunda ise, halofilik kültürlerin birçoğunun bu antibiyotiğe dirençli olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.10.). Novobiosin hem bakterilerde hem de arkelerde DNA' ya topolojik olarak negatif süper dönüşler yaptıran Tip II topoizomerazın (DNA giraz) *gryB* alt ünitesini inhibe etmektedir. Bu antibiyotiğin halofilik arkelerde küçük plazmidlerin pozitif süper sarmal hale dönüşmesini de indüklediği bildirilmiştir (Sioud, vd., 1988). *Halococcus saccharolyticus* (Oren, 2001) ve *Haloarcula qudrata* (HA9) (Asha, vd., 2005) ile yapılan çalışmalarda novobiyosine karşı direnç saptanmıştır. Yıldız (2010), yaptığı çalışmada halofil arkeal izolatların bu antibiyotiğe karşı 2 ila 35 mm arasında inhibisyon zonu gösterdiklerini rapor etmiştir. Benzer şekilde Birbir vd. (2004) yaptıkları çalışmada, tüm arkeal izolatların novobiyosine karşı dirençli olduğunu saptamıştır. Literatürden sağlanan bu veriler çalışmalarımız ile paralel yöndedir.

Tetrasiklin ile yaptığımız çalışmalar sonucunda ise halofilik kültürlerin birçoğunun bu antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.10.). Tetrasiklin,

Streptomyces rimosus tarafından üretilen, ribozomlarda tRNA - mRNA arasında kodon-antikodon etkileşiminin bozulmasını sağlayan bir antibiyotiktir (Anstead, vd., 2007). *Haloterrigena longa* sp. nov. ve *Haloterrigena limicola* sp. (Heng-Lin Cui, vd., 2006), *Halococcus qingdaonensis* sp. (Wang, vd., 2007), *Halococcus dombrowskii* sp. (Stan-Lotter, vd., 2002), *Haloarcula quadrata* (HA9) (Asha, vd., 2005), *Halogeometricum borinquense* sp. (Montalvo-Rodriguez, vd., 1998), *Natronoarchaeum mannilyticum* (Shimane, vd., 2010) ve *Haloterrigena salina* sp. (Gutie'rrrez, vd., 2008) ile yapılan çalışmalar sonucunda arkeal susların tetrasikline karşı dirençli olduğu rapor edilmektedir. Bu da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda, kültürlerin pek çoğunun streptomisin ve eritromisine duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 3.10.). Streptomisin bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek ve mRNA' daki genetik bilginin doğru okunuşunu bozarak hızlı bakterisidal etki gösteren aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir (Willke, 2003; Itoh, vd., 1984; Cachet, vd., 1987; Omura, vd., 1987). Son yıllarda arkeal kültürlerin antibiyotik profillerine yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Roh vd. (2007) yaptıkları çalışmada, *Halalkalicoccus jeotgali* sp. türünün basitrasin, penisilin, ampisilin, kloramfenikol ve eritromisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Asha vd. (2005), *Haloarcula vallismortis* (HA3) ve *Haloarcula quadrata* (HA9) izolatları ile yaptığı çalışmada, streptomisine ve eritromisine duyarlılıklarını araştırmışlar ve bu antibiyotiklere karşı *Haloarcula vallismortis* (HA3) kültürünün duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürden sağlanan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

Bu çalışmada, izole edilen halofilik kültürlerin gelişimlerini optimize etmek amacı ile farklı çevresel koşullar denenmiştir. Bunlardan biri sıcaklık olup 20, 37 ve 45 °C sıcaklık değerleri çalışılmıştır. Çalışmamızda, izole ettiğimiz kültürlerin gelişimi 37 ve 20 °C' lerde optimum gelişimi sağlamıştır (Şekil 3.7.). Yachai (2009) yaptığı çalışmada, *Halobacterium piscalsi* (37- 40 °C), *Halobacterium noricense* (28- 50 °C) ve HPC1-2T (20- 60 °C) için optimum gelişim sıcaklıklarını bildirmiştir. Nyakeri (2013) yaptığı çalışmada, *Halomonas* X5 izolatu için optimum gelişimin 25- 30 °C arasında olduğunu rapor etmiştir. Kebbouche-Gana, vd. (2009) yaptıkları çalışma sonucunda, *Halovivax* izolatının 37 °C' de optimum geliştiğini bildirmiştir. Baltacı

(2014) yaptığı çalışmada, *Halobacterium salinarium*, *Halobacterium halobium*, kültürlerinin optimum gelişme sıcaklıklarını 37 °C olarak bildirmiştir. Bilgi (2012) yaptığı çalışmada ise, arkeal kültürlerin gelişimlerinin 37- 40 °C aralığında optimum olduğunu rapor etmiştir. Literatürden sağlanan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

Çalışmada kültürlerin gelişimi üzerine denenen çevresel koşullardan biri farklı pH değerleridir (pH 5, 7, 9, 10). Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında kültürlerin pH 9 ve 10' da optimum gelişime sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 3.8.). Nyakeri (2013) yaptığı çalışmada *Halomonas* X5 izolatının pH 8- 9 arasında optimum gelişme gösterdiğini rapor etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları çalışmalarımızı desteklemektedir.

Farklı karbon kaynaklarının gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile glukoz, nişasta ve sukroz karbon kaynağı olarak kullanılmamıştır. Bu çalışmamıza göre her bir izolatın farklı karbon kaynağını tercih ettiği ve optimum gelişme gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.9.). Taran ve Amirani (2010) *Haloarcula* sp. IRU1 için en yüksek gelişimin glukozda 2 g/L' de olduğunu bildirmiştir. Yachai (2009) halofilik arkeler ile yaptığı çalışmasında, optimal gelişimin % 1 glukoz ortamında olduğunu rapor etmiştir. Jantzer, vd. (2011) yaptıkları araştırmada, *Haloferax volcanii* için % 0,5 glukozun optimum gelişimi sağladığını rapor etmiştir. Cui, vd. (2006) yaptıkları çalışmada, arkeal izolatların glukoz ve sukrozu asimile ettiklerini bildirmişlerdir. Xu, vd. (1999) yaptıkları çalışmada, 3 haloalkalifilik arkenin glukoz ve sukrozu kullanabildiğini rapor etmişlerdir. Roh, vd. (2007) yaptıkları çalışmada, *Halalkalicoccus jeotgali* sp. türünün glukoz ve sukrozu kullandığını rapor etmiştir. Hezayen, vd. (2001) yaptıkları çalışmada, arkeal izolatların glukoz ve nişastayı kullandıklarını bildirmektedir. Goh, vd. (2006) halofilik arkelerle yaptıkları araştırmada, glukoz ve sukrozun kullanıldığı rapor etmiştir. Lillo ve Valera (1990) *Haloferax mediterranei* suşunun glukoz, sukroz ve nişastayı kullanabildiğini rapor etmiştir. Coronado, vd. (2000) ile Koning, vd. (2002) yaptıkları çalışmada ise, arkeal kültürlerin glukoz, sukroz ve nişastayı kullandıklarını rapor etmektedirler. Literatürden sağlanan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

Farklı azot kaynaklarının (proteaz pepton, meat ekstrakt, amonyum klorür) gelişim üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarımız sonucunda, tüm kültürlerin % 1 proteaz peptonda optimum gelişme gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 3.10.). Hezayen, vd. (2002) yaptıkları çalışmada halofilik arkelerin proteoz pepton, yeast ekstrakt, tripton ve kazamino asidi azot kaynağı olarak kullandığını ayrıca bu kaynakların iyi gelişime aracılık ettiğini bildirmiştir. Bu çalışma bizim sonuçlarımızı da desteklemektedir.

Optimizasyon çalışmalarımızda denediğimiz bir diğer çevresel faktör maya özütünün farklı konsantrasyonlarının gelişim üzerindeki etkileri olmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında kültürlerden ikisi % 0,1 maya özütünde en iyi gelişimi gösterirken, kültürün diğerinin ise % 0,01 maya özütünde optimum gelişime sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 11). Kahraman (2008) yaptığı çalışmada, % 0,1 maya özütünü optimal verirken, Jantzer, vd. (2011) yaptığı çalışmada, *Haloferax volcanii* için % 0,01 maya özütü konsantrasyonunu optimal vermiş, Bilgi (2012) ve Gruber, vd. (2004) ise yaptıkları çalışmada, aynı maya özütlerini optimum olarak bildirmişlerdir. Literatürden sağlanan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

Çalışmamızda $MgCl_2$ farklı konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisi incelenmiş, sonuçta kültürlerin farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında (% 0,1; 0,2; ve 0,4) optimum gelişim gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 3.12.). Literatürden sağlanan sonuçlara bakıldığında ise, *Halobacterium cutirubrum* için 0,1 M (Boring, vd., 1963), *Halobacterium halobium* için 0,1- 0,5M (Brown ve Gibbons, 1955), halofilik kültürler için 0,6 - 0,9 M (Gruber, vd., 2004), *Halobacterium noricense* için 0,6- 0,9 M (Yachai, 2009), bazı arkeal kültürler içinde % 0,005 (Montalvo-Rodriguez, 1997) ve % 0,05 konsantrasyonları (Bilgi, 2012) rapor edilmektedir.

Tuz farklı konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkileri çalışmalarında 3 farklı NaCl konsantrasyonu çalışılmıştır. Buna göre 2 halofilik kültür % 10 NaCl konsantrasyonunda optimum gelişirken, diğer kültür ise % 0,5 konsantrasyonunu tercih etmiştir (Şekil 3.13.). Nyakeri (2013) yaptığı çalışmada, *Halomonas* X5 izolatu için % 10- 15 NaCl konsantrasyonunu optimum vermiş, Manjula (2014) ise yaptığı çalışmada, *Natrinema* sp. BTSH10 izolatu için % 25 NaCl konsantrasyonunu optimum olarak vermiştir. Baltacı (2014) ise yaptığı çalışmada, *Halobacterium*

salinarium ve *Halobacterium halobium* için optimum NaCl konsantrasyonunu % 20-30 olarak bildirmektedir.

Çalışmamızda saflaştırılan proteazın molekül kütleini belirlemek amacıyla SDS-PAGE uygulanmış ve enzimin molekül ağırlığının yaklaşık 55 kDa olduğu saptanmıştır (Şekil 3.16.). Literatüre göre Studdert, vd. (2001) *Natronococcus occultus* proteazı için 130 kDa bildirirken, Kamekura ve Seno (1990) halofilik bir tür için 42 kDa, Yu (1991) *Natronobacterium* sp. için 49 kDa, Schmitt vd. (1990) *Halobacterium halobium* için 60 kDa, Gimenez vd. (2000) *Natrialba magadii* için 45 kDa, Izotova, vd. (1983) *Halobacterium halobium* için 41 kDa ve Stepanov, vd. (1992) *Halobacterium mediterranei* için 41 kDa ağırlıklarını rapor etmişlerdir. Buna ilaveten Durham, vd. (1987) alkalofilik *Bacillus* sp. için 36 ve 27,5 kDa büyüklüğünde 2 adet proteaz enziminin varlığını rapor etmişlerdir.

Yüksek proteaz aktivitesine sahip bir kültürün enziminin saflaştırmasına gidilmiş ve çalışmalarımız sonucunda spesifik aktivite 0,008 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.12.). Literatürden sağlanan sonuçlar birbirinden farklılık göstermektedir. Namwong, vd. (2006) *Halobacillus* sp. SR-3 izolatu ile yaptıkları çalışmada % 80 verim ile spesifik aktiviteyi 2,7 U/mg bulurken, Li ve Yu (2012) % 75 oranında amonyum sülfat çöktürmesi verimi ile spesifik aktiviteyi 573,5 U/mg bildirmiş, Wu, vd. (2015) yaptıkları çalışmada spesifik aktiviteyi 179,2 U/mg olarak rapor etmişlerdir.

Yüksek proteaz aktivitesine sahip halofil kültürün enzimini saflaştırmak amacı ile yapılan kolon kromatografisi çalışmalarımızda spesifik aktivite 0,31 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.12.). Vidyasagar, vd. (2006), *Halogeometricum borinquenses* TSS101 ile yaptıkları çalışmada spesifik enzim aktivitesini 294 U/mg olarak tespit etmişlerdir. Buna ilaveten *Natrialba magadii* türü ile çalışan Gimenez, vd. (2000) yaptıkları çalışmada sonuçta spesifik enzim aktivitesini 890,7 U/mg olarak rapor etmişlerdir. Literatürden sağlanan sonuçların birbirinden farklı olduğu görülmektedir.

5. ÖNERİLER

Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik mikroorganizmalardan proteaz aktivitesi olan 3 adet kültürde serin proteaz aktivitesi aranmış ve aktiviteyi yüksek gösteren bir kültür ile çalışmalar yürütülmüştür. Enzim % 22 saflıkla ve % 6,2 verimle kısmen saflaştırılmıştır. Kısmen saflaştırılan enzim PMSF ile yüksek oranda inhibe olduğundan serin proteaz karakterde olduğu ve % 10 tuz konsantrasyonunda optimum aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzimin 60°C'de, pH7'de, 1 mM MgCl₂'de yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış enzimin sırası ile MgCl₂, FeCl₃, CoCl₂, ve KCl varlığında yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Enzim, yüzey aktif maddelerinden olan SDS ile çok fazla inhibe olmasına rağmen, Triton X-100'den çok az etkilenmiştir. Doğal substratlardan BSA'nin hidroliz olabildiği ve enzimin aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmada kullanılan kazein ve jelatin substratları da hidroliz olmuştur. Tüm bu sonuçlar, saflaştırılan serin proteazın, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar için potansiyel olarak yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bundan sonraki çalışmalarda serin proteaz enziminin verimini ve saflığını artırmak için daha ileri saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimin ticari boyutta üretimini sağlamak amacı ile besiyortamı daha fazla optimize edilmeli ve biyoreaktörde enzim üretimi sağlanabilmelidir. Enzim stabilitesinin kararlılığına yönelik çalışmalar yürütülmelidir. İlaveten enzim aktivitesini etkileyen çevresel faktörlerin daha fazla belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akolkar, A. (2009) *Isolation And Characterization of Halophilic Archaea. Production, Characterization And Application of Extracellular Protease From Halobacterium sp. SPI(1)* (Doktora Tezi). The Maharaja Sayajirao University of Baroda, Gujarat, India, 83.
- Anonim, (2002) Gel Filtration. In: Protein Separation (Handbook Collection Amersham), 106-227.
- Anstead, G.M., Quinones-Nazario, G., Lewis, J.S. (2007) Treatment of infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*, *Methods Mol Biol*, 391: 227-258.
- Anwar, A. ve Saleemuddin, M. (1998) Alkaline Proteases: A Review, *Bioresour. Technol*, 64, 175-183.
- Asha, K., Vinitha, DA., Kiran, SG., Manjusha, W., Sukumaran, N., Selvin, J. (2005) Isolation and Cultivation of Halophilic Archaea from Solar Salterns Located in Peninsular Coast of India. *Int. J. Microbio*, 1-2.
- Baltacı, N., Yüksekdağ, Z.N. (2014) Organik Kirleticilerin Tuzcul Çevrelerde Biyodegradasyonu, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(2):48-56 2014.
- Barett, A.J. (1994) Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. *Methods Enzymology*, 244:1-15.
- Bilgi, S.T. (2012) *Ham Derilerden izole Edilen Haloflik Arkelerin Hidrolitik Enzim Kapasitelerinin Belirlenmesi, Fenotipik ve Filogenetik Olarak Tanımlanması*, (Yüksek lisans), ÇOMÜ, Çanakkale, 122.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K., Duggal, A., Dey, K., Pandey, A. (2013) Industrial enzymes: present status and future perspectives for India: present scenario and perspectives, *J. Sci. Ind. Res.* 72:271-286.
- Birbir, M. ve Sesal C. (2003) Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey, *Turk. J. Biol*, 27:7-22.
- Birbir, M., Çallı, B., Mertoğlu, B., Elevi Bardavid, R., Oren, A., Öğmen, M. N., Ogan, A. (2007) Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldırım and Kayacık salterns, *World J Microbiol Biotechnol*, 23:309-316.

- Birbir, M., Kallı N. (2000) Sereflikoçhisar Tuz Gölündeki Asırı Halofilik Bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu, Marmara Üniversitesi, Arastırma Fonu, Fen Proje No:6.
- Birbir, M., Ogan, A., Çallı, B., Mertoglu, B. (2004) Enzymatic characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzköy Salt Mine Turkey, *World J Microb Biot.* 2004, 20:613–21.
- Bonelo, G., Ventosa, A., Megias, M. ve Ruiz-Berraquero, F. (1984) The sensitivity of halobacteria to antibiotics, *FEMS Microbiol. Lett*, 21: 341-345.
- Boone, D.R., Csatenholz, R.W., Garrity, G.M. (2001) *The Archaea and the Deeply Branching and Prototrophic Bacteria*, In Bargey's Manuel of Systematic Bacteriology., Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. Eds.: Springer-Verlag, NewYork, 294-335.
- Boring, J., Kushner, DJ., Gibbons, NE. (1963) Specificity of the salt requirement of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol*, 2:143–154.
- Böck, A ve Kandier, O. (1985) *Antibiotic sensitivity of archaeobacteria* In: C.R. Woese and R. S. Wolfe (Eds), *The Bacteria-a treatise on structure and function*. Archaeobacteria, Academic Press, Orlando, Vol.III, 525-541.
- Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248–251.
- Brock, F.M., Frosbergand, C.W., Buchanan-Smith, J.G. (1982) Proteolytic activity of rumen microorganisms and effect of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol*, 44:561–569.
- Brock, T.D., ve Petersen, S. (1976) Some Effects of Light on the Viability of Rhodopsin Containing Halobacteria. *Arch. Microbiol*, 109:199-200.
- Brown, H.J.ve Gibbons, N.E. (1955) The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol*, 1:486–494.
- Buchholz, K., Kasche, V ve Bornscheuer, U.T. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Kga, USA.

- Cachet, T., Roets, E., Hoogmartens, J., Vanderhaeghe, H. (1987) Separation of novel derivatives from commercial erythromycin samples by thin-layer chromatography, *J Chromatogr*, 403: 343–349.
- Cappuccino, J.G. ve Sherman, N. (2001) *Microbiology A Laboratory Manual*, 6. baskı, Benjamin Cummings, Francisco, 119.
- Coronado, M., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, JJ and Ventosa, A. (2000) The α -amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization, *Microbiology*, 146: 861–868.
- Cui, H.L., Tohty, D., Zhou, P.J. ve Liu, S.J. (2006) *Haloterrigena longa* sp. nov. and *Haloterrigena limicola* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from a salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 56:1837–1840.
- Cutler, P. (2004) *Size- Exclusion Chromatography*. In: Protein Purification Protocols, P. Cutler (Editor), Humana Press, pp. 239-252, New Jersey.
- Çalık, P. (1998) *Serin Alkali Proteaz Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi*. (Doktora Tezi) F.E.B., Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Demain, A.L., Elander, R.P. (1999) The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75:5-19.
- Duran, K., Bozacı, E., Karahan, A. (2007) Protein Esaslı Mamullerin Enzimatik Ön Terbiyesi, *Tekstil ve Konfeksiyon Dergisi*, 3: 187-190.
- Durham, D.R., Stewart, D.B., Stellwag, E.J. (1987) Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol*, 169(6): 2762-2768.
- Dussault, H.P. (1955) An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J. Bacteriol*, 70:484-485.
- Dym, O., Mevarech, M., Sussman, J.L. (1995) Structural features that stabilize helophilic MDH from an archaeobacterium. *Science*, 267:1344-1346.
- Er, B. ve Sarımehmetoğlu, B. (2009) Süt Endüstrisinde Mikrobiyel Enzim Kullanımı. *Vet. Hekim Der. Derg*, 80 (1), 25-30.

- Fan-Ching, Y., Lin, I.H. (1998) Production of Acid Protease Using Thin Stillage From a Rice Spirit Distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology Technology*, 23: 397–402.
- Farley, P.C ve Ikasari, L. (1992) Regulation of Secretion of *Rhizopus oligosporus* Extracellular Carboxyl Proteinases. *J. Gen. Microbiol*, 138: 2539–2544.
- Fersht, A. (1998) *Structure and Mechanism in Protein Science*, A guide Enzyme Catalysis and Protein Folding, 3. Edition, New York, Freeman and Company, USA.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. ve Krieg, N. R. (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 270–271
- Gerze, A. (2003) *Proteaz Enziminin Bacillus subtilis megatherium ve Bacillus polymxa Bakteri Türlerinden Kısmi Saflastırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi*, (Yüksek Lisans) İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Gihring, T.M., Druschel, G.K., McCleskey, R.B., Hamers, R.J., Banfield, J.F. (2001) Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations, *Environ. Sci. Technol.* 35 (19) 3857–3862.
- Gimenez, M.I., C.A., Studdert, J., Sanchez, R.E., De Castro. (2000) Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization, *Extremophiles*, 4(3):181–188.
- Ginzburg, M., Sachs, L. ve Ginzburg, B.Z. (1970) Ion Metabolism in a *Halobacterium*, *J. Gen. Physiol*, 55:187-207.
- Goh, F., Leuko, S., Allen, M.A., Bowman, J.P., Kamekura, M., Neilan, B.A ve Burns, B.P. (2006) *Halococcus hamelinensis* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from stromatolites in Shark Bay, Australia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 56: 1323–1329.
- Gruber, C. vd. (2004) *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*, *Extremophiles*, 8: 431–439.

- Gutiérrez, M.C., Castillo, A.M., Kamekura, M. ve Ventosa, A. (2008) *Haloterrigena salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 58: 2880–2884.
- Hancock, A.J. ve Kates, M. (1973) Structure Determination of the Phosphatidyl Glycerosulfate (diether analog) from *Halobacterium cutirubrum*, *J. Lipid Res.*, 14:422-429.
- Hedhammar, M., Karlström, A.E., Hober, S. (2006) *Chromatographic methods for protein purification*. Stockholm: Royal Institute of Technology.
- Helgadottir, S., Rosas-Sandoval, G., Sol, D., Graham, D.E. (2007) Biosynthesis of phosphoserine in the Methanococcales. *Bacteriol*, 189:575–582.
- Hezayen, F.F., Rehm, B.H.A., Tindall, B.J. ve Steinbüchel, A. (2001) Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51:1133–1142.
- Hezayen, F.F., Tindall, B.J., Steinbüchel, A., Rehm, B.H.A., (2002) Characterization of a Novel Halophilic Archaeon, *Halobiforma haloterrestis* gen. nov., sp. nov., and Transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52:2271–2280.
- Holmes, M.L. ve Dyll-Smith, M.L. (1991) Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaebacteria. *J. Bacteriol*, 173:642- 648.
- Horikoshi, K., W.D, Grant (Ed). (1998) Ekstremophiles, Chapter 4 *Halophiles* (W.D. Grant, R. T. Gemmel, T. J. Mcgennity), Wiley-Sons Inc. New York, 93-133.
- Hough, D.W. ve Danson, M.J. (1989) Archaeobacteria: Ancient Organisms With Commercial Potential, *Lett. Appl. Microbiol*, 9:33-39.
- Itoh, Z., Nakaya, M., Suziki, T., Arai, H., Wakabayashi, K. (1984) Erythromycin mimics exogenous motilin in gastrointestinal contractile activity in the dog. *Am. J. Physiol.* 247(6): 688-94.
- Izotova, L.S., Strongin, A.Y., Chekulaeva, L.W., Sterkin, ve., Ostoslavskaya, V.I., Lyublinskaya, E.A., Timokhina, E.A ve Stepanov, V.M. (1983) Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*, *J. Bacteriol*, 155:826–830.

- Jantzer, K., Zerulla, K., Soppa, J. (2011) Phenotyping in the Archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiol. Lett*, 322:123–130.
- Kahraman, Ö. (2008) *Halofilik Mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Ekstraselüler Enzimlerinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitü. Bornova-İZMİR.
- Kallı, N. (2000) *Tuz Gölü'nden İzole Edilen Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonlarının Geliştirilmesi*, (Yüksek Lisans), Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kamekura, M. ve Kates, M., (1999) Structural Diversity of Membrane Lipids in Members of Halobacteriaceae. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 63 (6): 969-972.
- Kamekura, M. ve Seno, A. (1990) Halophilic Extracellular Protease from A Halophilic Archaeobacterium Strain 172 P1. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(1):352-9.
- Kates, M. (1996) Structural Analysis of Phospholipids and Glycolipids in Extremely Halophilic Archaeobacteria. *J. Microbiol. Meth*, 25:113–128.
- Kebbouche-Gana, S., Gana, M.L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N.A., Penninckx, M. ve Hacene, H. (2009) Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36, 727– 738.
- Kılıç, A. M. ve Uyanık, E. (2001) Tuz Gölü'nde Oluşan Kirlenmenin Göl Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, 4. Endüstriyel Ham maddeler Sempozyumu 118-19 Ekim 2001, İzmir, Türkiye.
- Koning, S.M., Konings, W.N. ve Driessen, A.J.M. (2002) Biochemical evidence for the presence of two glucoside ABC transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, 1: 19–25.
- Kumpalume, P., Ghose, S. (2003) *Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation*. In: Isolation and Purification of Proteins, R. Hatti-Kauland B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, New York, pp. 29-56.

- Kushner, D.J. (1985) The Halobacteriaceae. In: Woese C.R. ve Wolfe R.S ed. *The bacteria. A treatise on structure and function. Archaeobacteria*, Vol 8. Academic Press, London. p. 171-214.
- Kushner, D.J. (1993) *Growth and Nutrition of Halophilic Bacteria*, In The Biology of Halophilic Bacteria, Vreeland, R.H., Hochstein, L.I. Eds., FI: CRS Press, Baco Raton, 87-103.
- Laemli, U.K. (1970) Cleavage Of Structural proteins during the Assembly, The head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, 115–148, Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Modern Microbiological Methods*. Wiley, New York.
- Li, X., Yu, H.Y. (2012) Purification and characterization of novel organic solvent-tolerant beta-amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20, *FEMS Microbiol Lett*, 329:204-211.
- Lillo, J.G, ve Rodriguez-Valera, F. (1990) Effects of culture conditions on poly (3 hydroxy butyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol*, 56:2517-2521.
- Lochhead, A.G. (1934) Bacteriological Studies on the Red Discoloration of Salted Hides. *Can. J. Res*, 10: 275-286.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265-27.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes, *Extremophiles*, 4 (2): 91-98.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2006) *Prokaryotic Diversity: Archaeobacteria*, In Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition, Prentice Hall International, Inc. New Jersey, 546-552.
- Malashetty, V., Prakash, S., Litchfield, C., Sreeramulu, R. (2006) Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea*, 2:51–7.

- Manjula, R. (2014) *Protease Production by haloarchaea Natrinema sp. BTSH10 isolated from salt pan of South India*, Cochin University of Science and Technology. (Doktora). India, 125.
- Margesin, H. ve Schinner, F. (2001) Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology, *Extremophiles*, 5:73-83.
- Montalvo-Rodriguez, R., Ruiz-Acevedo, A., López-Garriga, J. (1997) New isolates of extremely halophilic archaeobacteria (Halobacteria) from Puerto Rico and the Caribbean, *Caribb. J. Sci*, 33: 98-104
- Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R.H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C. ve Lopez-Garriga, J. (1998) *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48(4): 1305–1312.
- Munson, M.A., Nedwell, D.B., Embley, T.M. (1997) Phylogenetic Diversity of Archaeal Sediment Samples from Coastal Salt Marsh. *Appl. Environ. Microbiol*, 63(12):4729-4733.
- Mutlu, M.B. (2006) *Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı*, (Doktora), Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 127.
- Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tsunemi, M., Tanasupawat, S., Oda, K. (2006) A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 70:1395– 401.
- Nyakeri, E.M. (2013) *Isolation and Characterization of Extreme Haloalkaliphilic Bacteria and Archaea from Lake Magadi*, (Yüksek Lisans), Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya,122.
- O'Meara G.M, Munro P.A (1984) Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb. Technol*, 6:181–185.
- Obayashi, A., Hiraoka, N., Kita, K., Nakajimaand, H., Shuzo, T. (1988) US Patent 4: 724, 209, US Cl. 435/199.
- Oesterhelt, D. ve Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 233:149–152.

- Omura, S., Tsuzuki, K., Sunazuka, T., (1987) Macrolides with gastro-intestinal motor stimulating activity, *J. Med. Chem.*, 30:1941–1943.
- Oren A. (2002) *Halophilic Microorganisms and Their Environments*. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht, 575.
- Oren, A. (2000) *Life at High Salt Concentrations*. In: *The prokaryotes*. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. And Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Oren, A. (2001) *The Order Halobacteriales*. In: *The prokaryotes*. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Oren, A. (2006) *The Order Halobacteriales*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. ve Stackebrandt E., eds. *The Prokaryotes*. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry, (vol. 3). New York: Springer. 113–164.
- Oren, A. (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4: 2.
- Oren, A., Ventosa, A. ve Grant, W.D. (1997) Proposed Minimal Standarts for Description of New Taxa in The Order Halobacteriales, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47(1): 233- 238.
- Ostrove, S. (1990) Affinity Chromatography: General Methods. In: *Methods in Enzymology*, I.N. Abelson and M.I. Simon (Editors), Academic Press, pp. 357-371, New York.
- Özcan, B. (2004) *Türkiye'den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, (Doktora), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 111.
- Öztürk, M.H. (2004) *Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated Bacillus Strains*, (Yüksek Lisans) İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 138.

- Pasic, L., Bartual, S.G., Ulrih, N.P., Grabnar, M., Velikonja, B.H. (2005) Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol Ecol.* 54(3): 491-8.
- Pecher, T. ve Böck, A. (1981) *In vivo* Susceptibility of Halophilic and Methanogenic Organisms to Protein Synthesis Inhibitors. *FEMS Microbiol. Letters*, 10:295-297.
- Piubeli, F., Lourdes Moreno, M, Kishi, L.T., Henrique-Silva, F., Garcia, M.T., Mellado, E. (2015) Phylogenetic profiling and diversity of bacterial communities in the Death Valley, an extreme habitat in the Atacama Desert, *Indian J. Microbiol*, 55:392–399.
- Price, N. C. ve Stevens, L. (1982) *Fundamentals of enzymology*. Oxford University Press, Oxford.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Desphande, V.V. (1998) Molecular And Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 62:597-635.
- Rawling, N.D., Barret, A. (1994) Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol*, 244: 18-61.
- Roh, S.W., Nam, Y.D., Chang, H.W., Sung, Y., Kim, K.H., Oh, H.M., ve Bae, J.W. (2007) *Halalkalicoccus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2296–2298.
- Rosenberg, I.M. (2005) Gel Filtration Chromatography. In: *Protein Analysis and Purification : Benchtop techniques* Birkhäuser, Basel. Springer : Boston, 326-338.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. and Ventosa, A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 94:295-300.
- Savage, K.N., Krumholz, L.R., Oren, A., Elshahed, M.S. (2007) *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low salt, sulfide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 57: 19-24.
- Schmitt, W., Rdestand, U., Goebel, W. (1990) Efficient high performance liquid chromatographic system for the purification of a halobacterial serine protease *J. Chromatogr*, 521:211–220.

- Sehgal, S. N. ve N. E. Gibbons. (1960) Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*, *Can. J. Microbiol*, 6:165–169.
- Shimane, Y., Hatada, Y., Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Miyazaki, M., Ohta, Y., Usami, R., Grant, W. D. ve Horikoshi, K. (2010) *Natronoarchaeum mannanyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 60:2529–2534.
- Sioud, M., Baldacci, G., de Rocondo, A.M. ve Forterre, P. (1988) Novobiocin induces positive supercoiling of small plasmids from halophilic archaeobacteria *in vivo*. *Nucleic Acids Resourch*, 16 (4):1379-1391.
- Spök, A. (2006) Safety regulations of food enzymes. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2):197- 209.
- Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M.C., Ventosa, A., Schleifer, K.H. (1996) *Halobacillus* gen. nov. with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov. and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriology*, 46:492-496.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenuemer, M., Legat, A., Buse, H.J., Radax, C., Gruber, C. (2002) *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an Archaeal isolate from a Permian Alpine salt deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52:1807–1814.
- Stepanov, V.M, Rudenskaya, G.N., Revina, L.P., Gryaznova, Y.B., Lysogorskaya, E.N., Filipova, I.Y., Ivanova, I.I. (1992) A serine protease of an archaeobacterium *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisin, *Biochem. J*, 285:281-286.
- Studdert, C.A., De Castro, R.E., Herrera Seitz, K., Sa'nchez, J.J. (1997) Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic Activities of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *Arch. Microbiol*, 168(8):532–538.
- Studdert, C.A., Seitz, MKH., Gil, M.I.P., Sanchez, J.J. ve De Castro, R.E. (2001) Purification, biochemical characterization of the haloalkaliphilic archeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease, *J. Gen. Microbiol*, 41:375–383.
- Swift, S., Martin, L., David, F., Juan, M., Toma, S., Gordon, S and Paul, W. (1996) Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67: 5192–5199.

- Taran, M. ve H. Amirkhani. (2010) Strategies of poly (3-hydroxybutyrate) synthesis by *Haloarcula* sp. IRU1 utilizing glucose as carbon source: optimization of culture conditions by Taguchi methodology, *Int. J. Biol. Macromol*, 47(5):632–634.
- Temiz, A. (1994) *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Ders Kitabı, Ankara. Syf:100-125-128.
- Uhlig, H. (1998) *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Uygun, A., Şen, E. (1978) Tuz Gölü Havzası ve Doğal Kaynakları I: Tuz Gölü Suyunun Jeokimyası. *Türkiye Jeoloji Kurumu Bülteni*, 21: 113-120.
- Valera, F.R. (1988) *In Halophilic Bacteria*, CRS Press, Baco Raton, Vol: 1-2.
- Valera, F.R., Nieto, J.J. ve Ruiz-Berraquero, F. (1983) Light as an Energy Source in Continuous Cultures of Bacteriorhodopsin-containing *Halobacteria*, *Appl. Env. Microbiol*, 45:868–871.
- Valera, F.R., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J.F. (1985) Variation of Environmental Features and Micobial Populations with Salt Concentrations in a Multi-Pond Saltern. *Microb. Ecol*, 11:107-115.
- Valera, F.R., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J.F. (1981) Variation of Environmental Features and Microbiol Populations with Salt Concentration in a Multi-pond Saltern, *Microb. Ecol*, 7:235-243.
- Van Den Burg, B. (2003) Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, *Current Opinion in Microbiology*, 6:213–218.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Litchfield, C. ve Sreeramulu, K. (2006) Purification and Characterization of a Thermostable, Haloalkaliphilic Extracellular Serine Protease from the Extreme Halophilic Archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea*, 2: 51-57.
- Vreeland, R.H. (1993) *Taxonomy of Halophilic Bacteria*, *In The Biology of Halophilic Bacteria*, Vreeland, R.H., Hochstein L.I.: Eds., FI: CRS Pres, Baco Raton, 105-134.

- Wang, Q.F., Li, W., Yang, H., Liu, Y.L., Cao, H.H., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Stan-Lotter, H. ve Guo, G.Q. (2007) *Halococcus qingdaonensis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a crude sea-salt sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 57:600–604.
- Wesson, L ve Eisenberg, D. (1992) Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Sci.* 1, 227–235.
- Wieland, F., Lechner, J. ve Sumper, M. (1982) The cell wall glycoprotein of *Halobacterium* structural, functional and biosynthetic aspects. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig*, C3:161-170.
- Willke, TA. (2003) *Aminoglikozitler*, Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi,: 313-323.
- Winzor, D.J. (2003) Analytical exclusion chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 56: 15-52.
- Wistreich, G.A ve Lechtman, M.D. (1980) *Laboratory Exercises in Microbiology*, 3rd Ed, Glencoe Press, London.
- Woese, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4576-4579.
- Wu, S., Liu, G., Zhang, D., Li, C. ve Sun, C. (2015) Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1, *J. Basic Microbiol*, 55:1427–1434.
- Xu, Y., Zhou, P., ve Tian, X. (1999) Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriology*, 49:261-266.
- Yachai, M. (2009) *Carotenoid production by Halophilic Archaea and its application* (Doktora), Prince of Songkla University, Tayland, 173.
- Yıldız, M. ve Sinan, A. (2010) Evaluation of Geotechnical Properties of the Salt Layers on the Lake Tuz, *Sci. Res. Essays*, 5(18):2656–2663.
- Yu, X.T. (1991) *Protease of haloalkaliphiles*. In *Superbugs*. Eds. K. Horikoshi and W.D. Grant. Springer- Verlag, New York, pp:76–83.

EKLER

EK A. Kullanılan Malzemeler Ve Solüsyonlar

α -naftol çözeltisi

Alfa- naftol çözeltisi nitrattan nitrit oluşumu testinde nitrit negatif tüplerde nitrat varlığının saptanması için kullanılmaktadır. 5 g α -naftol; %96'lık 100 mL alkol içinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.

Kovaks ayıracı

Kovaks ayıracı indol testinde kullanılmaktadır. 5 g *p*-dimetil amino benzaldehit, 75 mL izo- veya normal amil alkol ve 25 mL konsantr HCl ile hazırlanmaktadır. Çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.

Tetrametil *p*-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisi

1 g tetrametil *p*-fenilen daimin dihidroklorid 100 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve oksidaz testinin uygulanmasında kullanılmaktadır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi (% 3)

3 mL H₂O₂, 100 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Katalaz testinin uygulanmasında kullanılmaktadır.

Kristal viyole boya çözeltisi

İzolatların sahip oldukları hücre duvar yapılarının belirlenmesi amacı ile kullanılmaktadır. 0,5 g kristal violet (gentian violet), 100 mL distile su içinde çözdürülmüştür. Daha sonra boya kaba filtre kağıdından süzülerek kullanılmaktadır.

Safranin boya çözeltisi

İzolatların sahip oldukları hücre duvar yapılarının belirlenmesi amacı ile kullanılmaktadır. 0,5 g safranin, (% 95) 10 ml etil alkol; 100 ml distile su bileşiminden oluşmaktadır. Safranin etil alkol içinde çözdürüldükten sonra distile su ile karıştırılmıştır.

Na₂CO₃ (500 mM)

5,3 g Na₂CO₃ 100 mL distile suda çözülmüştür. Ortam pH' sını alkali yapmak amacı ile kullanılmaktadır.

Folin reaktifi (1:4)

100 mL için, 20 mL folin 80 mL steril distile su ile karıştırılarak elde edilmektedir. Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturup, proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin (Tyr), triptofan (Trp) ve sistein (Cys) aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olmaktadır.

50 mM Sodyum-fosfat (pH 6,0- 6,5- 7,0)

6,80 g potasyum dihidrojen fosfat ve 13,40 g di-sodyum hidrojen fosfat distile su ile 1 L' ye tamamlanır. Elde edilen pH' ya göre HCl ya da NaOH ile istenilen pH' ya ayarlama yapılmaktadır.

50 mM Tris-HCl (pH 7,5- 8,0- 8,5)

6,057 g Tris distile su ile 1 L' ye tamamlandıktan sonra HCl ile istenilen pH' ya ayarlanmıştır. SDS-PAGE çalışmalarında jelin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

50 mM Glisin-NaOH (pH 9,0- 9,5)

3,753 g glisin distile su ile 1 L' ye tamamlandıktan sonra NaOH ile istenilen pH' ya ayarlanmıştır. Enzim saflaştırmasında genel tampon olarak kullanılmaktadır.

1 M Tris-HCl (pH 6,8)

60 g Tris Base 500 mL distile su ile çözdürülür ve çözelti pH' sı HCl ile 6,8' e ayarlanmıştır. SDS-PAGE çalışmalarında konsantratör jelin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

91 g Tris Base 500 ml distile su ile çözdürülür ve çözelti pH' sı HCl ile 8,8' e ayarlanmıştır. SDS-PAGE çalışmalarında ayırıcı jelin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Amonyum sülfat çözeltisinin hazırlanması (% 40)

Amonyum sülfat 25 mL için 1,41g tartılıp yavaş yavaş eklenmiştir. Proteinleri çöktürme amaçlı kullanılmaktadır.

TCA çözeltisi

250 mL çözelti için 1,798 g TCA, ile 2,99 g Na-asetat ve 1,88 mL asetik asit son hacim 250 mL olacak şekilde distile su ile karıştırılmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmalarında, reaksiyonu sonlandırmak ve tirozinin serbestleşmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Akrilamid / bisakrilamid çözeltisi (% 30)

% 29,2 akrilamid ve % 0,8 bis-akrilamid 70 mL distile su içerisinde çözülür, hacim 100 mL' ye tamamlanarak filtre kağıdından geçirilir ve +4 °C' de karanlık ortamda (veya koyu renkli şişede) saklanmıştır.

SDS (% 10)

10 g SDS, 100 mL distile suda çözülür. Protein yapısını denatüre ederek yapının negatif yükü yüklenmesini sağlamaktadır.

Amonyum persülfat (APS; % 10)

0,1g amonyum persülfat (APS) 1mL distile su içerisinde çözülür. Çalışmalar esnasında taze hazırlanmalıdır. Poliakrilamid jelin polimerizasyon reaksiyonunu başlatmaktadır.

TEMED

Ticari olarak bulunan bu madde, jelin hazırlanışı esnasında son aşamada konulmalıdır (Poliakrilamid jelin polimerizasyon reaksiyonunu katalizler). Ticari olarak temin edilmiş olup poliakrilamid jelin polimerizasyon reaksiyonunu katalizlemektedir.

Stacking gel buffer (Yükleme jel tamponu)

0,5 M Tris-Cl (Trizma Base kullanılabilir) 100 mL distile su kullanılarak tampon hazırlanmıştır ve tamponun pH' ı 6,8' e ayarlanmıştır. +4 °C' de saklanmıştır. SDS-PAGE sisteminin üst kısmında yer alan bu jel içerik olarak az oranda akrilamid-bisakrilamid karışımı içermektedir. Bundan dolayı por büyüklüğü geniş olup, tüm

protein örneklerinin kolaylıkla ilerleyip hizalanması sağlamaktadır. Protein örneklerinin jelde yürümesi esnasında stacking jelde bir sandviç sistemi oluşmaktadır. Cl⁻ iyonları negatif yüklü olup, diğer moleküllerden hızlı hareket etmektedirler. Stacking jeli hazırlamada Tris-HCl pH 6,8 kullanılır ve bu pH değerinde glisin aminoasiti nötral yapıdadır. Büyük protein molekülleri bu Cl⁻ / glisin yapısı arasında kalmaktadır. Bu mekanizma tüm örneklerin aynı hizaya gelebilmesi için önemlidir.

Seperating gel buffer (Ayrırma jel tamponu)

Tampon, 1,5 M Tris-Cl (Trizma Base kullanılabilir) ve 100 mL distile su kullanılarak hazırlanmış ve pH' ı 8,8' e ayarlanmıştır, daha sonra +4 °C' de saklanmıştır. SDS-PAGE sisteminin alt kısmında yer alan bu jel içerik olarak daha fazla oranda akrilamid-bisakrilamid karışımı içermektedir. Stacking jele göre daha küçük por yapısına sahiptir. Resolving jeli hazırlamada Tris-HCl pH 8,8 kullanılır ve bu pH değerinde glisin aminoasiti negatif yüklü yapıdadır. Cl⁻ iyonları ve glisin yapısı negatif yüklü olduğundan proteinlerden daha hızlı ilerleme göstererek örneklerin ilerlemelerini kolaylaştırmaktadır. Sonuç olarak küçük molekül ağırlığına sahip olan örnekler daha hızlı ilerleme göstermektedirler.

10x Yürütücü tampon (1x 25 mM Tris, 192 mM glisin, % 0,1 SDS, pH 8,3)

Tris base' ten 30 g, 144 g glisin ve 10 g SDS, steril bir spatul ile tartılıp, 600 mL distile su eklenmiştir. Ardından pH 8,3' e ayarlandıktan sonra 1000 mL' ye distile su ile tamamlanmıştır. Filtreden geçirildikten sonra +4 °C' de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda 1X' e seyreltilerek kullanılmaktadır.

Bradford reaktifi

Coomassie Brilliant Blue G-250' den 40 mg alınıp, 50 mL % 95' lik etil alkol içinde çözdürülür ve üzerine 55 mL % 88' lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 L' ye tamamlanıp filtre edilmiştir. Güneş ışığından korunarak +4 °C' de depo edilmiştir. Enzim örneklerinde protein miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Diyaliz tamponu

50 mM Tris-HCl tamponu 0,5 M NaCl içerecek şekilde istenilen hacime göre hazırlanmaktadır. Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen proteaz enzim karışımından amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır.

Boyama çözeltileri

1 g coomassie, 100 mL glasiyel asetik asit, 400 mL metanol ve 500 mL distile su ile karıştırılır ve filtreden geçirilerek boya partikülleri elimine edilir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir. SDS-PAGE çalışmalarında proteinlerinin görünür hale gelmesi için jelin boyanmasında kullanılmaktadır.

Boyama çıkarma çözeltileri

100 mL glasiyel asetik asit, 200 mL metanol ve 700 mL distile su ile karıştırılır ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Metal çözeltileri

FeCl₃.6H₂O çözeltileri (1 mM): 0,0081 g FeCl₃.6H₂O tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

MgCl₂ çözeltileri (1 mM): 0,00286 g MgCl₂ tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

CaCl₂ çözeltileri (1 mM): 0,0033 g CaCl₂ tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

AgNO₃ çözeltileri (1 mM): 0,0034 g AgNO₃ tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

ZnCl₂ çözeltileri (1 mM): 0,00409 g ZnCl₂ tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

KCl çözeltileri (1 mM): 0,0022 g potasyum tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

CoCl₂.6H₂O çözeltileri (1 mM): 0,0071 g CoCl₂.6H₂O tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

MnCl₂ çözeltileri (1 mM): 0,0037 g MnCl₂ tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

NiCl₂.6 H₂O çözeltileri (1 mM): 0,0071 g NiCl₂.6H₂O tartılıp, 30 mL % 0,65' lik kazein çözeltilerinde 1 mM olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

İnhibitör çözeltileri

PMSF çözeltisi (1 mM): 0,017 g PMSF, 5 mL etanolde çözülerek 1 mM olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır.

β -merkaptoetanol çözeltisi (1 mM): 35 μ L β -merkaptoetanol alınıp, 5 mL tampon içinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden 1 mM olacak şekilde kullanılmıştır.

EDTA çözeltisi (1 mM): 0,039 g EDTA ve bir miktar Tris-HCl (pH 8,5) tamponu ile çözülmüş ve son hacim 5 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Üre çözeltisi (1 mM): 0,604 mg üre, 50 mL suda 1 mM konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Yüzey aktif madde çözeltileri

Triton X-100 (%1): 0,3 mL Triton X-100' den alınmış, distile su ile 30 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

SDS (%1): 0,3 g SDS alınmış, 30 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Doğal substrat çözeltileri

% 0,65' lik kazein çözeltisi: 0,195 g kazein tartılarak son hacim 30 mL olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözülmüştür.

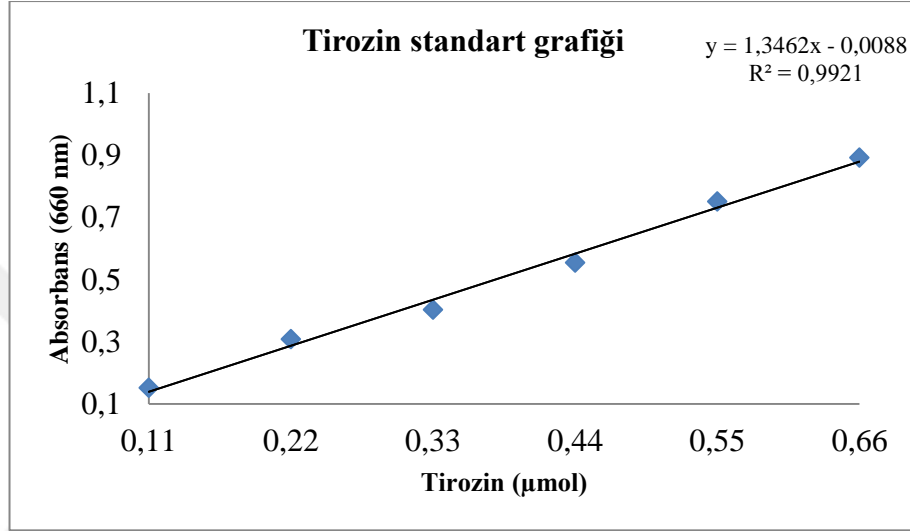
% 0,65' lik BSA çözeltisi: 0,195 g BSA tartılarak son hacim 30 mL olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözülmüştür.

% 0,65' lik jelatin çözeltisi: 0,195 g jelatin tartılıp, son hacim 30 mL olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda çözülmüştür.

EK A. Standart Eğriler

Tirozin standart eğrisinin hazırlanması

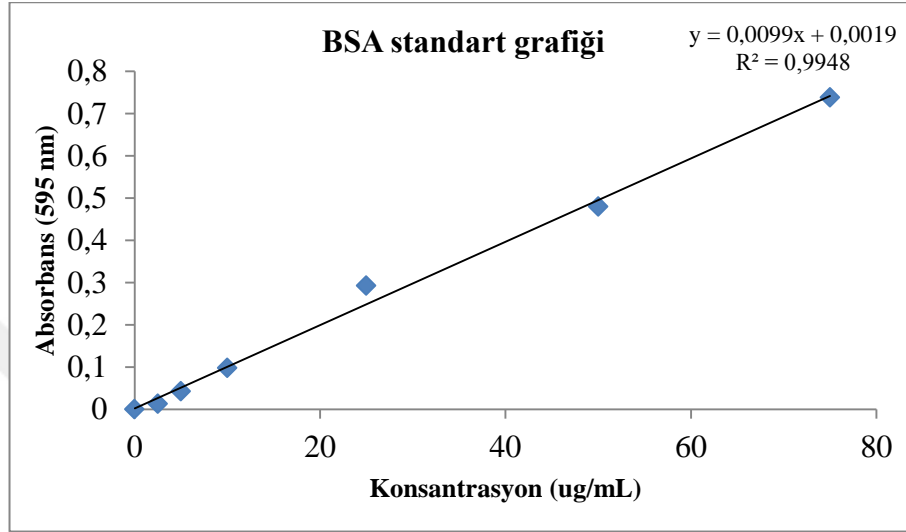
1,1 mM L-Tirozin çözeltisi için, 100 mL steril distile suya 0,0199 g L-Tirozin eklendikten sonra hafifçe ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Protein miktar tayini için kullanılmaktadır.



Şekil 27. Tirozin standart eğrisi

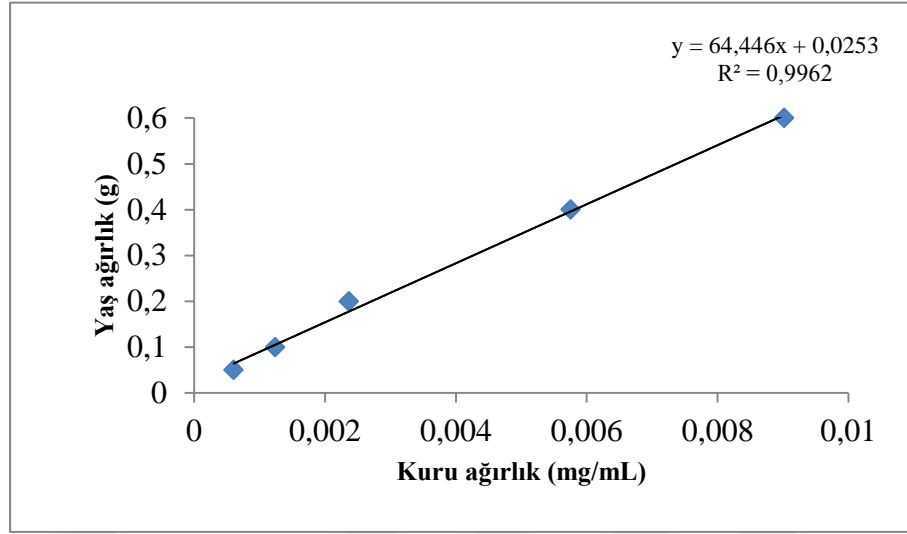
BSA standart eğrisinin hazırlanması

Protein miktarının belirlenmesinde standart olarak BSA kullanılmıştır. BSA stok solüsyonu 0,2 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Protein miktar tayini için kullanılmaktadır.



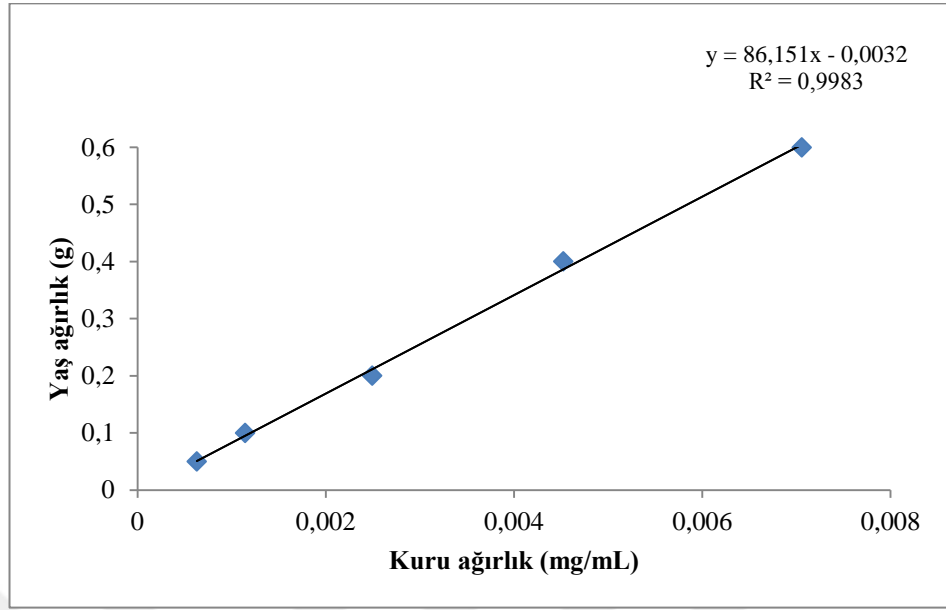
Şekil 28. BSA standart eğrisi

Kuru ağırlık standart eğrileri



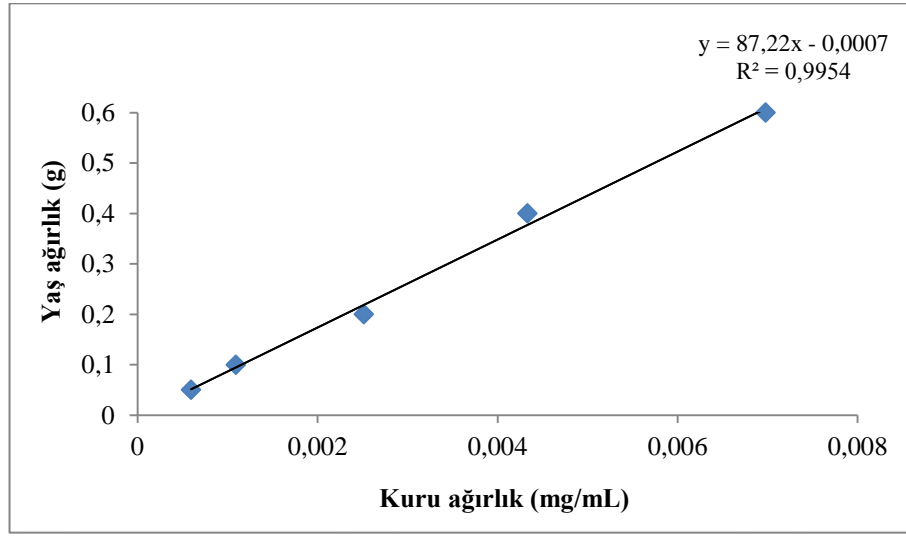
Şekil 29. B7 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi

Kuru ağırlık standart eğrileri



Şekil 30. B8 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi

Kuru ağırlık standart eğrisi



Şekil 31. A22 kültürünün yaş/kuru ağırlık standart eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Ad Soyad : Ali ARSLAN
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul -02.05.1992
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 5344104892
E-posta : aliarslan47@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Şehit Galip Balkar E.M.L	2010
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2017

Bilimsel Faaliyetler

A. MAKALELER

A-1. Gülten Ökmen, Olcay Ceylan, Pınar Erdal, Dilek Işık, Duygu Bayrak, Şükran Kardaş, Güven Görk, **Ali Arslan**. Gıda patojenlerine karşı *Cyclamen mirabile* Hildebr. kök özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir çalışma. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi, 5(2): 1-7, 2014.

A-2. Gulden Okmen, Sukran Kardas, Duygu Bayrak, **Ali Arslan** and Haldun Cakar. The Antibacterial Activities of *Crocus sativus* against Mastitis Pathogens and Its Antioxidant Activities. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(3): 146-156.

A-3. Gulden Okmen, Mustafa Vurkun, **Ali Arslan**, Olcay Ceylan. The Antibacterial Activities of *Piper nigrum* L. against Mastitis Pathogens and its Antioxidant Activities. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3):170-175.

A-4. Ahmet Sadan Okmen, Gulden Okmen, **Ali Arslan**, Mustafa Vurkun. Antibacterial Activities of *Mentha piperita* L. Extracts against Bacteria Isolated from Soccer Player's Shoes and its Antioxidant Activities. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3):163-169.

B. BİLDİRİLER

B-1. Gülten Ökmen, Şükran Kardaş, Pınar Erdal, Dilek Işık, Duygu Bayrak, Olcay Ceylan, Güven Görk, **Ali Arslan**. *Cyclamen mirabile* Kök Özütlerinin Gıda Patojenlerine Karşı Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine bir Çalışma. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran 2014. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye (*Poster sunumu*).

B-2. Gulden Okmen, **Ali Arslan**, Sukran Kardas, Duygu Bayrak. The Antibacterial Activities of *Crocus sativus* Against Mastitis Pathogens and its Antioxidant Activities. International Congress on Applied Biological Sciences. Macedonia, Skopje. 16-20 September, 2015. p49 (*poster sunum*).

B-3. Gulden Okmen, **Ali Arslan**, Pınar Erdal, Sukran Kardas, Dilek Isik, Duygu Bayrak. The Biological Activities of *Hypericum perforatum* L. International Congress on Applied Biological Sciences. Macedonia, Skopje 16-20 September, 2015. p50 (*poster sunum*).

B-4. **Ali Arslan**, Gülten Ökmen. Tuz Gölünden İzole Edilen Halofilik Arkelerin Serin Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Kısmi Saflaştırılması. MSKÜ, III. Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu. 5 Mayıs 2016.

B-5. Ökmen Gülten, **Arslan Ali**, Bayrak Duygu, Kardaş Şükran, Çakar Haldun, Ceylan Olcay, Görk Güven. Farklı baharat özütlerinin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi. Gaziantep, 5-9 Eylül 2016.

B-6. Ökmen Gülten, Çakar Haldun, Kardaş Şükran, Bayrak Duygu, **Arslan Ali**. *Ocimum basilicum* L. özütlerinin mastitis patojenlerine karşı antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi. Gaziantep, 5-9 Eylül 2016.

B-7. Kardaş Şükran, **Arslan Ali**, Ökmen Gülten. Buğday Alanlarından İzole Edilen ACC deaminaz aktivitesine sahip Gram Negatif Bakterilerin gelişimine çevresel faktörlerin etkisi. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi. Gaziantep, 5-9 Eylül 2016.

B-8. Gülten Ökmen, Haldun Çakar, **Ali Arslan**, Mustafa Vurkun, Mehabbet Memmedhanlı. *Ribes nigrum* L' in Biyolojik Aktivitelerini Üzerine bir Çalışma. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*poster sunum*).

B-9. Gulden Ökmen. Haldun Çakar, **Ali Arslan**. Mustafa Vurkun, Mehabbet Memmedhanlı. *Mentha piperita'* nın Oral Patojenlere Karşı Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*poster sunum*).

B-10. Gulden Ökmen, Haldun Çakar, **Ali Arslan**. Mustafa Vurkun, Mehabbet Memmedhanlı. *Origanum majorana* L.' nin Mastitis Patojenlerine Karşı Antibakteriyel Aktivitesi ve Antioksidan Aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*sözlü sunum*).

B-11. Gulden Ökmen. Haldun Çakar, **Ali Arslan**. Mustafa Vurkun, Mehabbet Memmedhanlı. Oral Patojenlere Karşı *Lavandula angustifolia* Mill' in *in vitro* Antibakteriyel Aktivitesi ve Antioksidan Aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*sözlü sunum*).

B-12. Gulden Okmen, Mustafa Vurkun, **Ali Arslan**, Olcay Ceylan. The Antibacterial Activities of *Piper nigrum* L. Against Mastitis Pathogens and Its Antioxidant

Activities. 3rd Mediterranean Symposium on Medicinal And Aromatic Plants. April, 13-16, 2017 / Girne – T.R.N.C.

B-13. Ahmet Sadan Okmen, Mustafa Vurkun, Gulden Okmen, **Ali Arslan.** Antibacterial Activities of *Mentha piperita* L. Extracts Against Bacteria Isolated from Soccer Player's Shoes and Its Antioxidant Activities. 3rd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April, 13-16, 2017 / Girne – T.R.N.C.

B-14. Duygu Bayrak, Gülten Ökmen, **Ali Arslan,** Mustafa Vurkun. The Biological Activities of *Lavandula stoechas* L. against Food Pathogens. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. 10-12 May 2017, Konya.

B-15. Duygu Bayrak, Gulden Okmen, **Ali Arslan.** The Biological Activities of *Silybum marianum* L. Gaertn. against Food Spoilage Microorganisms. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. 10-12 May 2017, Konya.

C. PROJELER

C-1. Tuz Gölünden İzole Edilen Halofilik Arkelerin Serin Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Kısmi Saflaştırılması. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 16/140 (Araştırmacı) (*devam ediyor*).

C-2. Bazı Bitki Ekstraktlarının Gıda Bozan Mikroorganizmalara Karşı Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 0338-Nap-16 (Araştırmacı) (*devam ediyor*).

D. ÖDÜLLER

D-1. Muğla Sıtkı Koçman Vakfı (2015). Yurtdışı Bilimsel Etkinlikleri Destekleme Ödülü.

D-2. Muğla Sıtkı Koçman Vakfı (2016). Yurtiçi Bilimsel Etkinlikleri Destekleme ödülü.