



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İMMOBİLİZE EDİLMİŞ HALOFİLİK ARKELERDE LİPAZ, PROTEAZ VE
AMİLAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

ZEHRA EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

NİSAN- 2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE EDİLMİŞ HALOFİLİK ARKELERDE LİPAZ, PROTEAZ VE
AMİLAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Zehra EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 19/04/2012 Tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Başkan

Doç. Dr. Birgül ÖZCAN

Üye

Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 1004Y0112

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirislerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Arkeler.....	4
2.2. Halofilik Arkeler.....	4
2.3. Halofilik Enzimler.....	6
2.3.1. Proteazlar.....	8
2.3.2. Amilazlar.....	10
2.3.3. Lipazlar.....	12
2.4. Hücre İmmobilizasyonu.....	13
2.4.1. Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
2.4.1.1. Adsorpsiyon.....	15
Celite.....	16
Kitosan.....	16
2.4.1.2. Kovalent Bağlama.....	17
2.4.1.3. Hapsetme.....	18
Agar.....	18
Aljinat.....	19
2.4.1.4. Çapraz Bağlama.....	20
2.4.1.5. Kapsülleme.....	21
2.4.2. Halofilik Arkelerde Hücre İmmobilizasyonu.....	21
3. MATERTAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	23
3.1.2. Halofilik Arkeler.....	23

3.1.3. Besiyeri.....	24
3.1.4. Halofilik Arke İzolatlarının İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri.....	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi	24
3.2.2. Hücre İmmobilizasyonu.....	24
3.2.2.1. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon.....	24
Celite 281 ile İmmobilizasyon.....	24
Kitosan ile immobilizasyon.....	25
3.2.2.2. Hapsetme Yöntemi ile İmmobilizasyon.....	25
Kalsiyum Aijinat ile İmmobilizasyon.....	25
Agar ile İmmobilizasyon.....	25
3.2.2.3. Çapraz Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon.....	26
Aljinat Kitosan ile İmmobilizasyon.....	26
Çapraz Bağlı-Aljinat ile İmmobilizasyon.....	26
Çapraz Bağlı-Kitosan ile İmmobilizasyon.....	26
3.2.3. Enzim Aktivitesi Tayin Yöntemleri.....	27
3.2.3.1. Lipaz Aktivitesi	27
3.2.3.2. Proteaz Aktivitesi.....	27
3.2.3.3. Amilaz Aktivitesi.....	28
3.2.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Optimizasyonu.....	29
3.2.4.1. Celite 281'e adsorpsiyon Yönteminin Optimizasyonu.....	29
3.2.4.2. Kitosana Adsorpsiyon Yönteminin Optimizasyonu.....	29
3.2.6.3. Kalsiyum Aljinata Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyonun Optimizasyonu.....	30
3.2.5. İmmobilize Edilmiş Hücrelerin İnkübe Edildiği Ortam Koşullarının Optimizasyonu.....	30
3.2.5.1. Optimum NaCl Konsantrasyonunun Saptanması.....	30
3.2.5.2. Optimum pH Değerinin Saptanması.....	30
3.2.5.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	32

4.1. Araştırma Bulguları.....	32
4.1.1. Standart Grafikler.....	32
4.1.2. İmmobilize Edilmiş Hücrelerde İnkübasyon Zamanına Bağlı Enzim Aktiviteleri.....	33
4.1.2.1. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları.....	33
4.1.2.2. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları.....	36
4.1.2.3. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları.....	38
4.1.2.4. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları.....	41
4.1.2.5. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları.....	43
4.1.2.6. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları.....	46
4.1.2.7. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları.....	49
4.1.2.8. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları.....	53
4.1.2.9. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları.....	56
4.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerine Bağlı Olarak Halofilik Arke İzolatlarının Enzim Aktivite Oranları.....	60
4.1.4. Serbest Hücrelerde İnkübasyon Zamanına Bağlı Enzim Aktiviteleri.....	62
4.1.5. İmmobilize ve Serbest Hücrelerde Hidrolitik Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	65
4.1.6. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Optimizasyon Sonuçları.....	66
4.1.7. Ortam Koşullarının Optimizasyon Sonuçları.....	69

4.1.7.1. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	69
4.1.7.2. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin PH'ya Bağlı Değişimi.....	73
4.1.7.3. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin Sıcaklığa Bağlı Değişimi.....	76
4.2. Tartışma.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKÇA.....	87
TEŞEKKÜR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	96

ÖZET**İMMOBİLİZE EDİLMİŞ HALOFİLİK ARKELERDE LİPAZ, PROTEAZ VE AMİLAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Tuz gölü, Acı göl, Tuzla gölü ve Samandağ tuzlu kıyı bataklığından izole edilmiş halofilik arke koleksiyonuna ait A138, A235, B45, D83A ve SD23 izolatları yedi farklı destek materyali kullanılarak üç değişik yöntemle immobilize edilmiştir. Immobilize edilmiş ve serbest halofilik arke hücrelerinin 192 saat boyunca lipaz (B45 ve A138), amilaz (B45 ve D83A) ve proteaz (A235 ve SD23) aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği immobilizasyon yöntemi optimize edilerek, her bir enzim aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının etkisi belirlenmiştir.

Bu çalışmada, yapılan immobilizasyon denemelerinde en verimli destek materyali, B45 ve A138 izolatları için kitosan, D83A ve A235 izolatları için Celite, ve SD23 izolatı için kalsiyum aljinat olarak belirlenmiştir. Yapılan tüm denemelerde immobilize edilen hücrelerde serbest hücrelere göre daha yüksek enzim aktivitesi olduğu saptanmıştır. Buna göre, lipaz aktivitesine sahip B45 ve A138 izolatlarında sırasıyla 10 ve 9 kat, proteaz aktivitesine sahip D83A ve B45 izolatlarında sırasıyla 8 ve 3 kat, amilaz aktivitesine sahip A235 ve SD23 izolatlarında ise 2 kat enzim aktivitesi artışı gözlemlenmiştir. Immobilize edilen arke izolatlarının her üç enzim yönünden de, 3-4 M NaCl, pH 7.5-8 ve 40 °C koşullarında en yüksek aktiviteyi gösterdikleri saptanmıştır.

Bu çalışma ile immobilize edilen halofilik arke hücrelerinin yüksek tuz konsantrasyonunda yüksek lipaz, proteaz ve amilaz aktivitesine sahip oldukları ve dolayısıyla biyoteknolojik potansiyellerinin olabileceği gösterilmiştir.

2012, 96 sayfa

Anahtar kelimeler: Halofilik arke, Hücre immobilizasyonu, Lipaz, Proteaz, Amilaz

ABSTRACT**THE DETERMINATION OF LIPASE, PROTEASE AND AMYLASE ACTIVITIES IN IMMOBILIZED HALOPHILIC ARCHAEA**

The isolates named as A138, A235, B45, D83A and SD23 were chosen from a collection of halophilic archaea isolates which were collected from various saline environments in Turkey (Tuz Lake, Aci Lake, Tuzla Lake and coastal saline marsh of Samandag) based on their high lipase (B45 and A138), protease (A235 and SD23) and amylase (B45 and D83A) activity. These isolates were immobilized with three different methods on seven different matrices and their related enzymatic activities were determined for 192 hours. Among the tested immobilization methods the one retaining the highest enzymatic activities was optimized and then the effects of temperatures, pH and salt concentrations on each of enzymatic activities were determined.

In this study, the most effective matrices for immobilization were found to be chitosan for B45 and A138 isolates, Celite for D83A and A235 isolates, and calcium alginate for SD23 isolate. In all attempts, the immobilized cells were shown to have higher enzymatic activities comparing to free cells. For example, B45 and A138 were found to have 10 and 9 times, respectively, higher lipase activity, D83A and B45 were found to have 8 and 3 times, respectively, higher protease activity, and A235 and SD23 were found to have 2 times higher amylase activity comparing to free cells. It was found that the immobilized halophilic archaea cells maintained at conditions with 40 °C, pH: 7.5-8 and 3-4 M NaCl have the highest amylase, lipase and protease activity.

With the current study it was shown that the immobilized halophilic archaea cells maintained under high salt conditions had high lipase, amylase and protease activity comparing to free cells and this result may have some biotechnological importance for future applications.

2012, 96 pages

Key words: Halophilic archaea, Cell immobilization, Lipase, Protease, Amylase

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNS	Dinitrosalsalik Asit
L	Litre
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SG	Sehgal-Gibbons Besiyeri
G	Gram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
pNPB	p-nitrofenilbütirat
pNP	p-nitrofenol
TCA	Trikloroasetik asit
Tris-HCL	Trizma Tamponu

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları.....	23
Çizelge 4.2. Halofilik arke hücrelerinin immobilizasyon yöntemi, enzim aktivitesi ve inkübasyon periyodu.....	80
Çizelge 4.3. İmmobilize ve serbest hücrelerde enzim aktivite değerleri.....	83
Çizelge 4.4. İmmobilize hücrelerde enzim aktivitesi için optimum NaCl, pH ve sıcaklık.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Adsorpsiyon yöntemi.....	16
Şekil 2.2. Kovalent bağlama yöntemi.....	17
Şekil 2.3. Hapsetme yöntemi.....	18
Şekil 2.4. Çapraz bağlama yöntemi.....	20
Şekil 2.5. Kapsülleme yöntemi.....	21
Şekil 4.6. pNP standart grafiği.....	32
Şekil 4.7. Tirozin standart grafiği.....	32
Şekil 4.8. Glukoz standart grafiği (DNSA yöntemi).....	33
Şekil 4.9. Kitosan desteğine immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	34
Şekil 4.10. Kitosan desteğine immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	34
Şekil 4.11. Celite 281'e immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	35
Şekil 4.12. Celite 281'e immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	35
Şekil 4.13. Kitosan desteğine immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	36
Şekil 4.14. Kitosan desteğine immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	36
Şekil 4.15. Celite 281'e immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	37
Şekil 4.16. Celite 281'e immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	37
Şekil 4.17. Celite 281 (a) ve kitosan desteğine (b) adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatı.....	38
Şekil 4.18. Kitosan desteğine immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	39
Şekil 4.19. Kitosan desteğine immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	39

Şekil 4.20. Celite 281'e immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	40
Şekil 4.21. Celite 281'e immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	40
Şekil 4.22. Agara hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatı.....	41
Şekil 4.23. Agara immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	41
Şekil 4.24. Agara immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	42
Şekil 4.25. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	43
Şekil 4.26. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	43
Şekil 4.27. Agara immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	44
Şekil 4.28. Agara immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	44
Şekil 4.29. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	45
Şekil 4.30. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	45
Şekil 4.31. Agara immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	46
Şekil 4.32. Agara immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	47
Şekil 4.33. Kalsiyum alginata hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatı.....	47
Şekil 4.34. Kalsiyum-aljinata immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	48
Şekil 4.35. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	48
Şekil 4.36. Alginat-kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş	

B45 izolatu.....	49
Şekil 4.37. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	50
Şekil 4.38. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	50
Şekil 4.39. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	51
Şekil 4.40. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	51
Şekil 4.41. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	52
Şekil 4.42. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	52
Şekil 4.43. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	53
Şekil 4.44. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	54
Şekil 4.45. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	54
Şekil 4.46. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	55
Şekil 4.47. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	55
Şekil 4.48. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	56
Şekil 4.49. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	57
Şekil 4.50. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	57
Şekil 4.51. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	58
Şekil 4.52. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş SD23 izolatının	

VIII

nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	58
Şekil 4.53. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	59
Şekil 4.54. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	59
Şekil 4.55. B45 ve A138 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş lipaz aktivitesi oranları.....	60
Şekil 4.56. D83A ve B45 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş proteaz aktivitesi oranları.....	61
Şekil 4.57. A235 ve SD23 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş amilaz aktivitesi oranları.....	61
Şekil 4.58. Serbest B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	62
Şekil 4.59. Serbest A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi.....	63
Şekil 4.60. Serbest D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	63
Şekil 4.61. Serbest B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.62. Serbest A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.63. Serbest SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi.....	65
Şekil 4.64. İmmobilize ve serbest hücrelerin hidrolitik enzim aktivitesi yönünden karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.65. Celite 281'e farklı yöntemlerle immobilize edilmiş D83A izolatının proteaz ve A235 izolatının amilaz aktivitesi.....	67
Şekil 4.66. Kitosana farklı yöntemlerle immobilize edilmiş A138 izolatının lipaz, B45 izolatının lipaz ve B45 izolatının proteaz aktivitesi.....	68
Şekil 4.67. Kalsiyum alginata farklı yöntemlerle immobilize edilmiş SD23 izolatının amilaz aktivitesi.....	69
Şekil 4.68. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu tuz	

derişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	70
şekil 4.69. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla tuz derişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	70
şekil 4.70. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla tuz derişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	71
şekil 4.71. D83A izolatının Celite 281'e immobilizasyonuyla tuz derişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	71
şekil 4.72. A235 izolatının Celite 281'e immobilizasyonuyla tuz derişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	72
şekil 4.73. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonuyla tuz derişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	72
şekil 4.74. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	73
şekil 4.75. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	73
şekil 4.76. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	74
şekil 4.77. D83A izolatının Celite 281'e immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	74
şekil 4.78. A235 izolatının Celite 281'e immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	75
şekil 4.79. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonuyla pH değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	75
şekil 4.80. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	76
şekil 4.81. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi.....	76
şekil 4.82. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	77
şekil 4.83. D83A izolatının celite 281'e immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi.....	77
şekil 4.84. A235 izolatının celite 281'e immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine	

bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	78
şekil 4.85. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonuyla sıcaklık değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi.....	78

1. GİRİŞ

Tüm yaşam formları arasındaki sistematik ilişkiyi belirlemek amacıyla protein sentezinin evrensel moleküler araçları olan ribozomların küçük alt ünite RNA (rRNA) gen dizileri karşılaştırılmış ve tüm yaşamın domain adı verilen üç temel soy üzerinde evrimleştiği açığa çıkarılmıştır: *Eukarya*, *Bacteria* ve *Archaea* (Woese ve Fox, 1977; Woese ve ark., 1990). *Archaea*, keşfedilmesinden bu yana modern mikrobiyolojinin en ilgi çeken konularından birini oluşturmuştur.

Archaea domaini üyeleri bazı genetik, biyokimyasal ve yapısal özellikleri yönünden *Bacteria* ve *Eukarya*'dan farklıdır ve büyük bir kısmı sıcak su kaynakları, tuz gölleri, volkanik habitatlar gibi ekstrem çevrelerde yaşamaktadır. Yaşamın üçüncü domaini olan *Archaea* domaini, *Euryarchaeota* ve *Crenarchaeota* olmak üzere iki filuma ayrılmıştır.

Halofilik arkeler (haloarkeler) *Euryarchaeota* filumu altında toplanmıştır. Solar tuzlalar, hipertuzlu göller, Ölüdeniz, yer altı tuz yatakları haloarkelerin en yoğun ve dominant bulunduğu hipertuzlu çevrelerdir (Oren, 2002). Haloarkeler aerobik ve obligat halofilik arkelerin oluşturduğu monofiletik bir gruptur, gram negatif boyanır, ikiye bölünerek çoğalır, spor veya dinlenme evreleri oluşturmazlar. Kültürü yapılmış çeşitli cinslerin hücreleri çubuk, kok, fincan ya da kare şekillidir. Kemoorganotrof olup karbonhidratları ya da organik asitleri kullanırlar ve optimum % 20-% 26 arasındaki tuz konsantrasyonlarında gelişirler. Halofilik arkelerin büyük bir kısmı nötrofilik karakterdedir. Bazı türleri ise alkalifilik özellikte olup, 8.5 ve üzerindeki pH derecelerinde üremektedir (Grant ve ark., 2001).

Halofilik arkelerin identifikasyonu, fenotipik özellikleri ile birlikte kimyasal (polar lipid kompozisyonu gibi) ve moleküler verilerin (16S rRNA gen dizileri ve DNA-DNA hibridizasyonu gibi) birlikte ele alındığı polifazik bir yaklaşımla yapılmaktadır (Oren ve ark., 1997; Grant ve ark., 2001; Gutierrez ve ark., 2007). Dünyanın farklı tuzlu alanlarından halofilik arke izolasyonu ve karakterizasyonları hızla devam etmekte olup, ülkemizde de bu tür çalışmalar yapılmaktadır (Ozcan ve ark., 2006; Mutlu ve ark., 2008; Yildiz ve ark. 2012).

Ekstrem halofilik arkelerin yaşadığı ortamların tuz konsantrasyonunun yüksek olması, hatta bazen doygunluğa ulaşabilmesinden dolayı, ozmotik dengeyi sağlamak için sitoplazmalarında yüksek miktarda KCl biriktirirler. Dolayısıyla hücre içi ve dışında ekstrem tuzlu koşullara maruz kalan haloarkelerin proteinleri de hipertuzlu koşullara adapte olmuştur. Haloarkeal proteinler stabilitelerini sağlamak ve aktivite göstermek için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar (en az 1-2 M NaCl veya KCl). Düşük tuz konsantrasyonlarında katlanma özellikleri değişir ve aktivitelerini kaybederler. Halofilik arkelerin enzimleri 0.75 aw kadar düşük su aktivitesinde dahi stabil ve aktif kalabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı halofilik enzimler, yüksek iyonik şiddete sahip ya da organik solventler gibi susuz ortamlardaki reaksiyonların katalizi için ideal adaylar olmaktadır (Madern ve ark., 2000; Mevarech ve ark., 2000; Marhuenda-Egea ve Bonete; 2002; Hutcheon ve ark., 2005).

Proteaz, lipaz ve amilaz, yüksek miktarda ticari üretimleri yapılan endüstriyel öneme sahip enzimlerdir ve başlıca, gıdadan deri, deterjan, kağıt, tekstil ve ilaca kadar farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadırlar (Vidyasagar ve ark. 2006; Monteiro de Souza ve Magalhaes, 2010; Kashmiri ve ark., 2006). Endüstriyel işlem koşulları gibi ekstrem özelliklere sahip ortamlarda işlevsel olmaları nedeniyle ekstremofil özellikteki arkelerin ürettiği enzimler oldukça ilgi çekmektedir. Arke kaynaklı enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma (Margesin ve Schinner, 2001; Gomes ve Steiner, 2004; Ozcan ve ark., 2012) yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir.

Enzimler veya hücreler, substrat ve ürün moleküllerini içeren hareketli sıvı fazdan immobilizasyon yöntemiyle ayrılabilirler. Immobilize edilen hücreler, biyolojik dönüşüm sonrasında ortamdaki kolayca ayrılabilirler ve tekrar tekrar kullanılabilirler. Immobilize hücreler fermantasyon ortamını kirletmedikleri ve alt akım işlemini kolaylaştırdıkları için sürekli sistemlerde çalışmaya çok uygundur. Ayrıca immobilizasyonda substrat, biyokütle sentezi için harcanmaz ve serbest hücrelere göre immobilize hücreler kontaminasyona daha az duyarlıdır (Rosevear, 1984; Kierstan ve Coughlan, 1985; Göksungur ve ark., 2005).

Bu çalışma ile,

- ✓ Türkiyenin farklı bölgelerinden (Tuz Gölü Şereflikoçhisar-Ankara, Acıgöl-Denizli, Tuzla Gölü-Kayseri ve Samandağ tuzlu kıyı bataklığı-Hatay) toplanmış tuzlu toprak ve su örneklerinden izole edilmiş olan halofilik arke izolatlarının farklı yöntemlerle immobilizasyonu,
- ✓ İmmobilize edilmiş ve serbest halofilik arke hücrelerinin lipaz, amilaz ve proteaz aktivitelerinin belirlenmesi,
- ✓ En yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği immobilizasyon yöntemi saptanarak, bu yöntemin optimizasyonu,
- ✓ Optimum koşulların uygulandığı immobilizasyon sonrası her bir enzim aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Arkeler

Evrimsel ağacın üç temel kolundan birini oluşturan arkelerin ökaryotlardan olduğu kadar bakterilerden de farklı olduğu gösterilmiştir (Garrett ve ark., 2007). Arke'nin bu farklı durumu 1970'li yılların sonlarında ortaya çıkartılmıştır. Carl Woese ve Fox (1977), prokaryot taksonomisindeki problemleri, nükleik asit dizi belirleme teknolojisiyle büyük oranda çözüme ulaştırmıştır. Bu amaçla bütün organizmalarda ortak molekül olan 16s rRNA moleküler kronometre olarak seçilmiştir. 16s rRNA analizleri sonucunda bazı prokaryotik mikroorganizmaların bakteri olmadığı ve ayrı bir canlı grubu olduğu gösterilmiş ve daha sonra Woese bu organizmalara "arkebakteri" adını vermiştir. (Woes ve Fox, 1977; Woese ve ark., 1990).

Arke domaini 16srRNA dizi analizleri sonucunda *Euryarchaeota* ve *Crenarchaeota* olarak iki temel filuma ayrılmıştır. *Crenarchaeota* filumu, *Thermoproteales*, *Sulfolobales* ve *Desulfurococcales* ordolarını *Euryarchaeota* filumu *Halobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Thermoplasmatales*, *Methanococcales*, *Thermococcales*, *Archaeoglobales*, *Methanopyrales* ordolarını içermektedir (Leigh ve ark., 2011).

2.2. Halofilik Arkeler

Halobacteriales ordosuna ait halofilik arkeler çeşitli yüksek tuzlu ekosistemlerde bulunabilmektedir. *Halobacteriaceae* familyası üyeleri, tuz gölleri (Franzmann ve ark., 1988; Oren ve ark., 1995; Ozcan ve ark., 2006), sodalı göller (Soliman ve Trüper, 1982; Tindall ve ark., 1984), tuzlalar (Nuttall ve Dyal-Smith, 1993; Juez ve ark., 1986; Ihara ve ark., 1997), tuzlu topraklar (Kobayashi ve ark., 1992) ya da tuz madenleri (Dener ve ark., 1994; Norton ve ark., 1993; Yıldız ve ark., 2012) gibi çeşitli yüksek tuzlu ortamlardan izole edilmişlerdir.

Halofilik arkelerin doğadaki dağılımını belirleyen en önemli faktörler; toplam tuz konsantrasyonu, tuzların iyonik kompozisyonu ve mevcut besinlerdir. Halofilik arkelerin çoğu türleri, 2.5-3 M'in altındaki tuz konsantrasyonlarında gelişmemektedir. 1-2 M tuzlu su içerisinde hücreler zarar görmekte ve türlerin çoğu lizize uğramaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda tuz konsantrasyonunun bulunması, halofilik arkelerin gelişebilmeleri için bir ön koşuldur. Dünya üzerinde halofilik arkeler, evaporasyonla

denizden kaynaklanan ve baskın iyon kompozisyonu Na^+ ve Cl^- olan deniz kökenli (thalassohaline) ve oldukça farklı iyonik kompozisyona sahip deniz kökenli olmayan (athalassohaline) ortamlarda yaşamaktadırlar. Doğal ortamların yanı sıra bu organizmalar yüksek tuz içeren tuzlanmış et, deri, sos gibi yapay ortamlardan da izole edilmiştir (Oren, 2001).

Yüksek tuzlu ortamlarda yaşayan diğer halofilik bakteri ve ökaryotların aksine, halofilik arkeler yaşadıkları ortam ile sitoplazmalarındaki osmotik dengeyi sağlamak için, genellikle sitoplazmalarında yüksek miktarda KCl biriktirirler (salt-in stratejisi). “Salt-out” stratejisiyle stoplazmalarındaki tuzu dışarı atan halotolerant bakterilere göre enerjik yönden daha avantajlı olan halofilik arkeler yüksek tuzlu ortamların baskın organizmalarıdır (Oren, 1999). Halofiliklerin proteinleri de “salt-in” stratejisi sonucu hücrede biriktirilen molar düzeydeki tuz konsantrasyonlarında işlev görecektir şekilde adapte olmuştur ve düşük tuz çözeltilerinde çoğunlukla denatüre olurlar.

Halofilik arkeler genellikle yüksek miktarda karotenoid içerdiklerinden nötral veya alkali, aşırı tuzlu ortamlarda yüksek yoğunluğa ulaştıklarında, buldukları ortamın kırmızı renk tonlarında görünmelerine neden olmaktadır (Arahal ve ark., 1996; Castillo ve ark., 2007). Halofilik arkelerin büyük bir kısmı nötral pH derecelerinde gelişmektedir ve asidofilik karakterde halofilik arkeler henüz rapor edilmemiştir. pH 6.0 civarında olan Ölüdeniz halofilik arkelerin yoğun olarak gelişebildikleri en asidik ortamdır (Oren ve Gurevich, 1993). Halofilik arkeler genellikle aerobik heterotrof olup bazıları anaerobik büyüme potansiyeline sahiptir (Falb ve ark., 2008). Karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, gliksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi ile trikarboksilikasit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO), dimetilsülfoksit (DMSO), arjinin varlığında veya ışık varlığında bakteriyorodopsin aracılığıyla anaerobik olarak üreme yeteneğine sahiptirler (Hartmann ve ark., 1980; Mancinelli ve Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren ve Litchfield, 1999). Halofilik arkeler genellikle optimum gelişme sıcaklıkları 40-50 °C olup hafif termofilik özellik gösterirler (Robinson ve ark., 2005).

Bazı halofilik arke türleri bakteriyorodopsin aracılığıyla ışık varlığında ATP sentezleyebilmektedir. Bakteriyorodopsin retinal içeren ve hücre dışına protonları

bırakan bir proton pompasıdır. *Halobacterium salinarum* da bakteriorodopsin haricinde üç protein daha keşfedilmiştir; klorür pompası olarak çalışan halorodopsin, fototaksiste görev alan alıcı rodopsin I ve II. *Halobacteriaceae* familyası türlerinin büyük kısmında bu retinal proteinler bulunmamaktadır. *Halobacterium salinarium*'un yanı sıra *Haloquadratum walsbyi*'ninde iki adet bakteriorodopsin ve bir adet halorodopsin içerdiği saptanmıştır (Bolhouis ve ark., 2006; Oren, 2009).

Halobacteriaceae familyasının ilk üyesinin yaklaşık yüz yıl kadar önce keşfinden bu yana (Nisan 2012), familya üyesi olan 38 cins ve yüzün üzerinde tür tanımlanmıştır (www.bacterio.cict.fr). Bugüne kadar oniki türün tüm genom dizisi çıkartılmış ve diğer türlerin dizi çalışmaları devam etmektedir (Pfeiffer ve ark., 2008; Soppa ve ark., 2008). Genelde bu grubun taksonomisi, numerik taksonomi, kemotaksonomi, moleküler filogeni, multilokus dizi analizi (MLSA) ve genomik karşılaştırma metotlarına dayalı olarak yapılmaktadır (Oren, 2012).

Ekstrem tuz konsantrasyonu ekolojik nişinde yaşamak üzere adapte olmuş halofilik arkeler çeşitli biyoteknolojik uygulama potansiyellerinin sahiptir. Bu alanlar; bakteriorodopsinin holografı, optik bellekler, üç boyutlu ışık modulatörleri ve optik programlama gibi teknik uygulama alanlarında, uyumlu çözünür maddelerinin biyomolekülleri ile hücrelerin stabilizasyonunda ve tuz antagonistleri ya da stres-koruyucu ajan olarak, ekzopolisakkarit ve biyosurfektan gibi biyopolimerlerinin mikrobiyal kaynaklı petrol eldesinde, fermente gıda ve gıda katkılarının üretilmesinde, çeşitli organik kirleticilerin yıkımı ve dönüşümü çalışmalarında, alternatif enerji üretimi alanlarında, yüksek tuz konsantrasyonunda aktif ve stabil kalan endüstriyel öneme sahip hidrolazlar ve yeni izomerazların elde edilmesidir (Litchfield, 2011; Oren, 2010; Margesin ve Schiner, 2001; Schiraldi ve ark., 2002).

2.3. Halofilik Enzimler

Halofilik enzimler, halofilik organizmaların enzimleri olup aktiviteleri, stabiliteleri veya solubiliteleri için tuza ihtiyaç duyarlar. 2.5 M ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında optimum üreyen halofilik arkelerin enzimlerinin aktif ya da stabil kalması için yüksek miktarda tuz gereklidir.

Halofilik arkeler osmoregülasyon için intraselüler olarak K^+ biriktirdikleri için intraselüler enzimleri yüksek K^+ konsantrasyonuna, ekstraselüler enzimleri ise yüksek

Na⁺ konsantrasyonuna adapte olmuştur. Dolayısıyla intraselüler enzimler 4 M KCl'de, ekstraselüler enzimler 5 M < NaCl'de aktif ve stabil kalmaktadır (Dason ve Hough, 1998). Halofilik arkeler protein yapısında, diğer canlılara göre %20 daha fazla negatif yüklü amino asit içermektedir. Ayrıca ortamın "salt-out" etkisini engellemek amacıyla halofilik proteinlerde polar olmayan amino asit miktarı azaltılmıştır. Örneğin *Halobacterium sp. NRC-1*'in biyoinformatik çalışmaları sonucunda glutamik asit, ve bir dereceye kadar, aspartik asit sayısındaki artışın halofilik mikroorganizmaların proteinlerinin genel bir özelliği olduğu anlaşılmıştır (Paul ve ark. 2008). Glutamik asitin diğer tüm amino asitlerden daha fazla su bağlama kapasitesine sahiptir ve genellikle halofilik proteinlerin yüzeyinde çok sayıda bulunduğu bildirilmiştir (Britton ve ark., 2006). Dolayısıyla halofilik arkelerin enzimleri 1 M'in altındaki NaCl ve KCl konsantrasyonlarında hızla denatüre ve disosiyeye olurlar, hatta bazen bu denatürasyon geriye dönüşümsüz olabilmektedir (Marhuenda-Egea ve Bonete, 2002).

Yüksek tuz konsantrasyonları genellikle halofilik proteinlerde konformasyon ve işlevselliği artırır (Rao ve ark., 2009). Tuz konsantrasyonları, anlamlı biçimde katlama, konformasyon, alt birim yapısı ve tuzcul proteinlerin kinetiğini etkileyebilir. Tuzun geri çekilmesi, genellikle protein yapısının kademeli kaybıyla ve halofilik proteinlerin katlanmamasıyla sonuçlanır.

Su moleküllerinin, protein molekülleri içine ve yüzeyine bağlanarak proteinlerin biyolojik fonksiyonlarında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Su, proteinlerin yüzeyindeki hidrofobik gruplar çevresinde düzenli kafes yapıları oluşturma eğilimindedir. Tuz iyonları, moleküller arası hidrojen bağlarının sayısını azaltarak, suyun kafes yapısını bozmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonu; çözünürlüğü, bağlanmayı ve stabilizeyi etkiler. Ayrıca proteinler ve protein alt birimleri arasındaki etkileşimler de tuzlardan tarafından etkilenir uzaklaştırılır (Paul ve ark., 2008).

Yüksek tuz su aktivitesini azalttığı için halofilik arkelerin ekstrem tuz koşullarına adapte olmuş enzimler, sulu/organik ve susuz/organik ortamlarda biyokatalizör olarak kullanım potansiyelleri yüksektir. Ayrıca endüstriyel organik sentezlerdeki yüksek özgüllükleri, stero özgüllükleri ve etkinliklerinden dolayı önemleri bir kat daha artmaktadır (Hough ve Danson, 1997; Sellek ve Chaudhuri, 1999; Gomes ve Steiner, 2004).

Halofilik arkeler, ekstrem halofilik karakterdeki enzimlerin başlıca kaynağıdır. Halofilik arkelerden amilaz, ksilanaz, proteaz ve lipaz gibi halofilik enzimlerin üretimi, izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Waino ve Ingvorsen, 2003; Gomes ve Steiner, 2004; Vidyasagar ve ark., 2006; Perez-Pomares ve ark., 2009; Ozcan ve ark., 2009)

Üretim ya da üretimle ilgili endüstriyel proseslerde tuza toleranslı enzim ihtiyacı sınırlı olduğu için genellikle çok az sayıda haloarkeal enzim uygulama amacı benimsenerek çalışılmıştır. Haloarke kaynaklı ticari enzimlerle ilgili çalışmalardan örnek biri, *Halococcus* türünden özel spesifiteye sahip yeni bir restiriksiyon enziminin üretimi ile ilgili olarak patent başvurusunun yapılmış olmasıdır. Yine başka bir çalışmada haloalkafilik bir arke olan *Natronomonas pharaonis*'ten izole edilen bir kimotripsinojen β - benzeri proteazın diğer halofilik arke enzimlerinde görülen düşük tuz konsantrasyonlarında aktivitesini kaybetmediği belirtilmiştir. Bu proteaz 3 mM gibi çok düşük tuz konsantrasyonlarında dahi aktivitesini koruduğu için deterjan katkısı olarak kullanılabilme özelliğine sahiptir (Eichler, 2001).

2.3.1. Proteazlar

Halofilik arkelerden çoğu proteolitik aktiviteye sahiptir. Bazı halofilik arkelerin ekstraselüler proteazı izole edilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Haloarkelerde ekstraselüler proteazı ilk defa Norberg ve Hofsten tarafından 1969'da tanımlanmıştır (Norberg ve Hofsten, 1969). 14 yıl sonra Izotova ve arkadaşları (1983), *Halobacterium Salinarum*'dan 41 kDa molekül ağırlığında, azokazeine yüksek spesifite gösteren proteazı karakterize etmiştir. Bu enzim diğer halofilik arkelerin proteazından farklı olarak sadece %5 dimetilformamid'de inhibe olmaktadır. Studdert ve arkadaşları (1997), *Natronococcus occultus*'un ekstraselüler proteolitik aktivitesini incelemiş ve maksimum aktivitenin 60°C'de 1-2 M NaCl ya da KCl'de, gözlendiğini belirtmiştir (Studdert ve ark., 1997). Seitz ve arkadaşları (1997), halofilik arke olan *Natronococcus occultus* suşunun durağan fazında intraselüler proteolitik aktivitesini büyüme ortamına karbon ve azot kaynağı eklemeyen incelemişler ve organizmanın 60 °C'de 2 M tuz derişiminde kazein ve jelatini parçaladığını belirtmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda intraselüler proteolitik aktivite ile ekstraselüler proteolitik aktivitenin benzer olduğu sonucuna varılmış ve intraselüler proteazın ısı işlemlere ve iyonik kuvvete daha

dirençli olduğunu gözlemişlerdir (Seitz ve ark., 1997). Thai balık sosundan izole edilen *Halobacterium* sp. PB407 suşu protezının pH 8’de, 40°C ve 2-3 M NaCl’de optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Kanlayakrit ve ark., 2004).

Halobacterium sp. SP1 suşunun ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine ortam bileşenlerinin etkisinin incelendiği çalışmada FeCl₃ ve soya ununun *Halobacterium* sp. SP1 suşunda ekstraselüler proteaz aktivitesini arttırdığı ve maksimum enzim aktivitesinin 0,811 U ml⁻¹ olduğu bildirilmiştir (Akolkar ve ark., 2008). *Haloferax lucentensis*’in ekstraselüler proteazının 57.8 kDa ağırlığında tek zincirli bir polipeptitten oluştuğu ve en yüksek aktiviteyi 60°C’de 4.3 M NaCl’de ve pH 8’de gösterdiği saptanmıştır. *Haloferax lucentensis*’in proteazı incelendiğinde proteolitik etkinliği, ethanol, bütanol, aseton, DMSO ve ksilen gibi suyla karışmayan çözücüler haricinde aktivitenin değişmediği belirtilmiştir (Manikandan ve ark., 2009). Akolkar ve Desai (2010) yılında *Halobacterium* sp. SP1 suşunda NaCl yokluğunda, farklı konsantrasyonlarda KCl, gliserol, mannitol, trehaloz, sükroz, betain, prolin ve Na-glutamat’ın proteaz aktivitesi üzerine etkilerini incelemişler ve maksimum enzim aktivitesini % 30’luk Na-glutamat varlığında gözlemişlerdir (Akolkar ve Desai, 2010). Buna benzer diğer bir çalışma da aynı ozmolitlerin aynı enzim üzerindeki katalitik ve termodinamik etkileri incelenmiş ve %30 Na-glutamat varlığında enzimin 80°C’de termal stabilitesini koruduğu belirtilmiştir. Enzimin Na-glutamat varlığında termal stabilitesini korumasının, NaCl’ün sınırladığı endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda kullanılabilme potansiyeli olabileceği bildirilmiştir (Aparha ve ark., 2010).

Nötrofilik haloarkelerin yanı sıra *Halogeometricum borinquense* TSS101 suşunda termostabil, haloalkafilik bir serin proteaz izole edilerek saflaştırılmıştır. Enzimin en yüksek aktivitesi pH 10, 60 °C ve %20 NaCl’de gözlemlendiği bildirilmiştir (Vidyasagar ve ark., 2006). *Natrialba magadii*’den izole edilen 45 kDa molekül ağırlığındaki ekstraselüler proteazın pH 6-12 arasında stabil kaldığı bildirilmiştir. Enzim aktivitesi için 1.5 M NaCl gerektiği ve kimotripsin tipi enzimin 60 °C’de aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Gimenez ve ark., 2000).

Dünya çapında ticari ölçekte üretilen proteazın miktarı, biyoteknolojide uygulanabilirliği açısından diğer enzimlerden daha fazladır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60’ını oluşturmaktadır. Proteazlar çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf ile organik sentezlerde ve atıkların

muamelesinde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazların hayvansal ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir (Banerjee ve ark., 1999).

Nonhalofilik proteazlarla kıyaslandığında halobakteriyel proteazların biyokimyada, enzimoloji, biyoteknolojik ve endüstriyel açıdan yeteri kadar ele alınmadığı görülmektedir.

2.3.2. Amilazlar

Amilaz gibi nişasta parçalayan enzimler her üç domeinde (*Eukarya*, *Bacteria* ve *Archaea*) yaygın bir şekilde bulunmaktadır ve bu enzimler karbonhidrat metabolizmasında anahtar role sahiptir. Ancak arkeal amilazla ilgili çalışmalar çok sınırlı düzeydedir.

Nişasta hidrolizine katılan geniş bir enzim geniş bir enzim çeşitliliği vardır ve bunların büyük bir kısmı endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır (Kadziola ve ark., 1998). Özellikle amilazlar gıda ve nişasta işleme sanayiinde kullanılan biyoteknolojik yönden değerli enzimlerdir (Vihinen ve Mentsala, 1989). İlk ticari olarak kullanılan enzim α -amilazdır. Günümüzde bakteri ve küflerden elde edilen amilazlar endüstriyel enzim pazarında %25'lik bir paya sahiptir (Aira ve ark., 1983; Rao ve ark., 1998).

Halofilik arkelerle ilgili ilk amilaz çalışması 1969'da yayınlanmıştır. Bu çalışmada *Halobacterium sp.* amilazının aktivite için yüksek miktarda NaCl'e gereksinimi olduğu ve % 25 NaCl'de, 55 °C'de stabil kaldığı belirtilmiştir (Litchfield, 2011). Takip eden yılda *Halobacterium halobium* olarak adlandırılan suşun amilazının düşük NaCl konsantrasyonunda (% 0.05) aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Good ve Hertman, 1970).

İlk detaylı halofilik arke amilazı *Natronococcus amylolyticus* Ah-36'da yapılmıştır. Enzim izole edilerek saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Ekstraselüler amilaz, nişastadan maltotrioz ünitelerini kopartmakta ve molekül ağırlığı 74 kDa olup maksimum aktivitesini pH 8.7, 55 °C ve 2.5 M NaCl'de göstermektedir. Enzim, 2.5 M NaCl'de pH 6-8 arasında ve 50 °C'ye kadar stabil kalmaktadır (Kobayashi ve ark., 1992). Çalışmanın devamında organizmanın α -amilaz geni *Haloferax volcanii*'de klonlanarak ekspresyonu sağlanmış ve dizisi çıkartılmıştır. Enzimin 43 amino asitlik bir sinyal peptit içerdiği saptanmıştır (Kobayashi ve ark., 1994).

Amonyum asetat içeren minimal ortamda geliştirilmiş *Haloferax mediterranei*'nin, otama nişasta eklendikten sonra amilaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Pomeres ve ark., 2003). İzole edilerek saflaştırılan enzim 8 kDa ağırlığında monomeric bir yapıya sahiptir. *Haloferax mediterranei*'nin amilazı stabilite ve aktivitesi için 2-4 M NaCl'ye ihtiyaç duymakta ve maksimum aktivitesini 3 M NaCl, pH 7-8 ve 50 – 60 °C arasında göstermektedir. Ayrıca enzim 80 °C'de maksimum aktivitesinin % 65'ini korumakta ve EDTA bir metalloenzim olan amilazın aktivitesini inhibe etmektedir (Pomeres ve ark., 2003). Aynı ekibin gerçekleştirdiği çalışmanın devamında *Haloferax mediterranei*'de üç farklı intraselüler amilaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. İntraselüler enzimlerden birinin aynı zamanda ekstraselüler olduğu ve 1-3 M NaCl'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Pomeres ve ark., 2009). *Haloarcula hispanica*'dan izole edilerek saflaştırılan α -amilaz enziminin optimum pH'sı 6.5 sıcaklığı 50 °C ve NaCl konsantrasyonu 4-5 M'dir. Enzim % 30'un altındaki NaCl konsantrasyonlarında aktivitesini kaybetmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında diğer enzimlerin denatüre olduğu 6 M üre varlığında aktivite göstermektedir. NaCl yokluğunda üre denatürasyona sebep olmakta bu durum enzimin tuza bağımlı olduğunu açık bir şekilde ortaya koymaktadır. *Haloarcula hispanica* amilazı twin-arginine translokaz yoluyla taşınımını sağlayan bir sinyal peptit içermektedir (Hutcheon ve ark., 2005).

Halofilik arkeler düşük su aktivitesine sahip ortamlarda yaşadıkları için enzimlerinin organik hidrofobik solventlerde işlevsel olabileceği beklenen bir durumdur. *Haloarcula sp. S-1* suşundan izole edilerek saflaştırılan 70 kDa ağırlığındaki ekstraselüler α -amilaz enzimi benzen, toluen kloroform gibi solventlerde aktif ve stabil kalabilmektedir. Enzim maksimum aktivitesini 50 °C'de, 4-3 M NaCl ve pH 7'de göstermektedir. Düşük iyonik şiddet varlığında aktivite göstermemesine rağmen düşük tuz konsantrasyonunda kloroform varlığında aktivite göstermiştir (Fukushima ve ark., 2005).

Ekstaselüler halofilik enzimler organik solvent toleransına sahip olabilmektedir. Bu nedenle halofilik enzimler hidrofobik organik solvent ve yüksek tuz içeren endüstriyel proseslerde kullanılabilme potansiyeline de sahip olabilmektedir.

2.3.3. Lipazlar

Karboksil ester hidrolazlardan esterazlar ve lipazlar biyoteknolojik uygulama alanına sahip enzimlerdir. Lipazlar uzun zincirli yağ asitli trigliseritleri substrat olarak kullanırken esterazlar, suda çözünen ve daha kısa yağ asitli trigliseritleri kullanır. Karboksil ester hidrolazlar, gıdaların fonksiyonel özellikleri ya da tatlarının geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Jaeger ve Eggert, 2002). Ayrıca organik solvent varlığında esterifikasyon, polimerizasyon gibi reaksiyonları da katalizleyebilmektedir (Shama ve ark., 2001).

Termofilik ve psikrofilik ekstremofillerden yeni lipaz ve esteraz izole edilmesine rağmen, proteaz ve amilazda olduğu gibi halofilik arke kaynaklı lipaz ile ilgili olarak da çok fazla çalışma yapılmamıştır. Eilat'daki bir tuzludan izole edilen halofilik arkelerin % 5-15'inde zeytinyağı yıkımına bağlı gerçek lipaz aktivitesine rastlanmıştır (Lifhfield, 2011).

Müller-Santos ve arkadaşları (2009), *Haloarcula marismortui* esteraz genini *E.coli*'de klonlamış ve recombinant proteini biyokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Enzim 3 M KCl'de maksimum aktivitesini göstermekte ve tuz yokluğunda aktivitesini kaybetmektedir. Protein substrat olarak kısa zincirli yağ asitleri ve monogliseridleri kullanmaktadır. İnhibitörlerinden yola çıkılarak yapılan çalışmada, hormon duyarlı lipaz ailesi üyeleri gibi bir serin karboksilesteraz olduğu belirlenmiştir. Proteinin 3D modelinde halofilik proteinlere ait bir özellik olan asidik amino asit miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bhatnagar ve arkadaşları (2005), Cezayir kültür koleksiyonunda bulunan halofilik arkelerde esteraz ve lipaz enzim aktivite taraması sonucunda 35 izolatin aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatlardan alkafilik karakterli *Natronococcus* sp.'nin 3 M NaCl ve 40 °C de lipaz ve esteraz aktivitesini gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmanın devamında lipaz enzimi kısmen saflaştırılmış ve enzimin zeytinyağı hidrolizinden dolayı gerçek lipaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca enzimin termostabil olduğu ve 4 M NaCl'de optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Boutaiba ve ark., 2006).

Türkiyeden izole edilen farklı halofilik suşların lipolitik aktivitesi Ozcan ve arkadaşları (2009) tarafından belirlenmiştir. Lipaz aktivitesine sahip izolatlar lipolitik aktivitelerini pH 8-9, 3-4 M NaCl ve 60-65 °C'de göstermiştir. *Haloarcula marismortu*'nin hem intraselüler hem de ekstraselüler lipaz ve esteraz aktivitesine sahip

olduğu, üremenin 60. saatinde enzim aktivitesinin maksimum düzeyde olduğu belirtilmiştir. Çalışmada 0.5 ve 5 M NaCl'de aktivite gösteren iki farklı enzim saptanmıştır (Camacho ve ark., 2009). *Halobacterium* sp. NRC-1 suşunun 3.5-5 M NaCl ve 30-46 °C'de inkübe edildiğinde 40. saatte maksimum düzeyde lipaz ürettiği belirlenmiştir (Camacho ve ark., 2010).

2.4. Hücre İmmobilizasyonu

Mikroorganizma veya enzimlerin, özelliklerini geliştirme ve endüstride kullanılabilme olanaklarını artırmak amacıyla inorganik ya da organik taşıyıcılarda çeşitli yöntemlerle hapsedilmesi ve bağlanması işleme tutuklama (immobilizasyon) denir (Çetin, 1983). Enzimlerin farklı yöntemlerle immobilize edilmeleri ve tekrar kullanılmalarıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. İmmobilize edilen bazı enzimler endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadırlar. Ancak daha kararlı ve ucuz olmalarından dolayı enzim ayırma ve saflaştırma işlemlerine gerek kalmadığı için çoğu kez immobilize hücreler immobilize enzimlere tercih edilmektedir (Göksungur ve Güvenç, 2002).

İmmobilize hücreler kullanılarak gerçekleştirilen işlemler yüksek hücre yoğunluğundan dolayı daha verimli olabilmektedir. İmmobilize enzimlere göre immobilize hücre kullanımının başlıca avantajları şunlardır; Çok aşamalı bir enzim reaksiyonuna uygulanması mümkündür, İmmobilizasyonda enzim aktivite verimliliği yüksektir, İşlevsel kararlılık genellikle yüksektir, Enzim ekstraksiyonu ve/veya saflaştırması gerekli değildir, Yüksek hücre yoğunluğu sağlanabilir, Hücre yoğunluğu ve enzim aktivitesi uzun süreli işlev sağlayabilir, Ürünler, immobilize hücrelerden kolaylıkla yeniden elde edilebilir, İmmobilize hücrelerin, mikrobiyal kontaminasyona daha az duyarlı olduğu görülür. Bu avantajların yanı sıra immobilize hücrelerin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar; tutuklama sırasında zamanla hücrelerin katalitik aktiviteleri azalabilir, tutuklanmış tanecik içerisinde mikroorganizmanın büyümesi aktiviteyi düşürür, yaşayan hücrelerin üremesi ve gaz çıkışı bazı tutuklanmış matris sistemlerinde mekanik parçalanma gibi önemli problemler doğurur, tutuklanmış yaşayan mikroorganizmalarda farklı metabolik sistemler sebebiyle, istenen metabolik reaksiyonların yanında istenmeyenler de oluşabilir (Gönen, 2006).

2.4.1. Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri

Hücreleri immobilize etmek için çok sayıda immobilizasyon metodu ve materyali mevcuttur. Yapılan detaylı çalışmalar sonucunda yöntem ya da destek materyalinin herhangi bir immobilizasyon çalışmasında belirli bir standartı olmadığı belirlenmiştir (Swalsgood, 1985). Biyoteknolojik işlemlerde, amaca yönelik immobilizasyon yöntemi ve destek maddesinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çoğu hücre bir biçimde doğal olarak immobilize edilmiştir, böylece immobilizasyon, hücreler için fiziksel bir destek sağlar. Hücre immobilizasyonunda ilk aşama destek maddesine karar vermektir, sonra temel immobilizasyon metodu uygulama için göz önünde bulundurulmalıdır. Hücre immobilizasyonunda kullanılacak destek maddesinde bulunması gereken toplam yedi temel özellik dikkate alınmalıdır.

Bunlar:

1. Fiziksel özellik: Dayanaklılık, parçacıkların sıkıştırılabilir olması, gözenek derecesi, yüzey alanı, geçirgenlik ve gözenek hacmi göz önünde bulundurulmalıdır.
2. Kimyasal özellik: Hücre modifikasyonu için uygun fonksiyonel grup içermesi ve desteğin yenilenebilir olması gereklidir.
3. Dayanaklılık: Desteğin depolama durumu ve stabilitesini koruması, hücrelerin canlılığının devam ettirilebilmesi gereklidir.
4. Direnç: Fungal ve bakteriyel saldırılara karşı, kimyasal bozulma, pH, sıcaklık, organik solventler, proteazlar ve hücre savunma proteinlerine karşı dirençli olmalıdır.
5. Güvenlik: Biyolojik yönden çalışanlar için sağlıklı ve güvenilir olması gereklidir.
6. Ekonomik özellik: Kullanılabilir ve düşük maliyetli olması, büyütülebilir ölçekli olması ve serbest hücre ürünlerine karşı sıfır kirlenmenin olması gereklidir.
7. Reaksiyon özelliği: Hücre yükleme ve katalitik verimlilik, reaksiyon kinetiği ve yan reaksiyon özellikleri, yüzey ve ürünlerin kütle transferi dikkate alınmalıdır (Bickerstaff, 1997).

2.4.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon hücre immobilizasyonunun en basit metodudur. Adsorpsiyon yönteminde hücre ile destek materyali arasında tersine çevrilebilir yüzey etkileşimleri kullanılır (Woodward, 1985). Yüzey etkileşimleri, van der-Walls güçleri gibi elektrostatik- iyonik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla sağlanır. Bunun yanı sıra hidrofobik etkileşimler de gerçekleşebilmektedir. Bu zayıf güçler çok sayıda kurulduğu için etkin bir bağlanma gerçekleşmektedir. Örneğin maya hücreleri yüzeylerinde yüksek miktarda negatif güç içerdiklerinden, pozitif yüklü bir destek materyali ile maya hücreleri başarılı bir şekilde immobilize edilebilir. Destek, hücre yüzeyindeki mevcut kimyasal gruplar ile etkileşime girdiği için, ayrıca bir kimyasal aktivasyon ve modifikasyona gerek kalmaz. Dolayısıyla bu metotta hücreler çok az zarar görmektedir.

Adsorpsiyon yönteminin ilk aşamasında uygun pH ve iyonik güçler varlığında destek materyali ve hücre karşılaştırılarak inkübe edilir. Daha sonra ise bağlanmayan hücrelerin uzaklaştırılması için yıkama işlemi gerçekleştirilir.

Adsorpsiyon yöntemiyle hücre immobilizasyonun avantajları;

- Hücrelere hasar vermez
- Basit, hızlı ve ucuz bir immobilizasyon şeklidir
- Hücre ya da destek materyalinde kimyasal değişikliğe neden olmaz
- Temiz hücre yenilenmesine izin vererek tersine çevirebilir.

Adsorpsiyon yöntemiyle hücre immobilizasyonun dezavantajları ise;

- Destekten ayrılan hücre ürünü kontamine edebilir
- Nonspesifik bağlanmadır
- Destek aşırı yüklenebilir
- Destek tarafından sterik olarak engellenebilir.

Adsorpsiyon yönteminin en önemli dezavantajı hücrelerin destekten ayrılmasıdır. Hücrelerin destek materyaline bağlanmaması durumunda, iyonik şiddet oranı pH ve sıcaklık gibi çevresel parametreler değiştirilerek başlanma miktarı arttırılabilir. Bazen kararlı bir şekilde adsorbe olmuş hücreler substrat kaynaklı kontaminantların desteğe bağlanmasından dolayı reaksiyon esnasında destekten kolayca ayrılabilirler. Kontrollü bir şekilde adsorpsiyon metodu uygulanmadığı zaman desteğin aşırı yüklenmesi düşük katalitik aktiviteye neden olabilir.



Şekil 2.1. Adsorpsiyon yöntemi

Celite

Celite olarak bilinen diatomeler yıllardır kimya endüstrisinde katalitik taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Bugün biyolojik taşıyıcı olarak da kullanılan Celite, enzim ve mikrobiyal hücre immobilizasyonu için uygun bir taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Celite, diatomların fosil tortularından üretilen ucuz ve doğal bir ürünü olup dünyada bol miktarda bulunmaktadır. İlaç ve gıda sanayiinde ve boya üretiminde kıvam arttırıcı olarak kullanılır. Celit kimyasal olarak %90 SiO_2 'dan ve az miktarda diğer inorganik oksitlerden Al_2O_3 (%3), Fe_2SO_4 (%1.7) ve CaO (%0.5) den oluşmaktadır. Celitin bu kimyasal kompozisyonu, mikroorganizmalar için toksik değildir, ayrıca kültür ortamında çözünmediği için biyolojik ataklardan hiç etkilenmemektedir. Ayrıca birbiriyle bağlantılı çok özel bir por yapısına sahip olduğu için adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanışlı bir destek maddesi olmaktadır.

Kitosan

Kitosan; yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların kabuklarından, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarından ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan kitinden elde edilen bir polimerdir. Herhangi bir toksitesinin bulunmaması, alerji ve iritasyon yapıcı olmaması nedeniyle, ilaç, yiyecek, biyoteknoloji, tarım ve kozmetik gibi sektörlerde geniş kullanım alanına sahiptir (Aranaz ve ark., 2009), Kitosan, kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan lineer bir polisakkarittir. Kitosan farklı viskozite, molekül ağırlığı (50000-2000000 kDa) ve deasetilasyon derecelerine (% 40-98) sahiptir. Kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi; kitinin kaynağına, izolasyon yöntemine, sodyum hidroksit ile işlem görme süresine, konsantrasyonuna ve işlem sırasındaki sıcaklığa bağlıdır (Guo ve ark., 2002). Kitosan, nötral ve alkali pH'da

çözünmez; fakat glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi inorganik ve organik asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşmektedir. Asidik ortamda ise, çözünmeyi takiben polimerin amino grupları protonlanır ve böylece molekül pozitif yüklenir. Her glukozamin ünitesinde bir yük olduğundan kitosan yüksek yük dansitesine sahip olup, negatif yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşir ve bir çok metal iyonu ile kompleks oluşturur (Singla ve Chawla, 2001).

Kitosan bu özel kimyasal yapısından kaynaklı adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanışlı bir destek maddesi olmaktadır.

2.4.1.2. Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon, hücre ile destek maddesi arasında kovalent bağların oluşumu ile gerçekleştirilir. Kovalent bağlama yöntemi genellikle enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Kovalent bağlar destek maddesinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplarla, hücre yüzeyinde bulunan amino asitlere ait fonksiyonel guruplar arasında oluşmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan, lizin ya da arjininin amino asit grubu (NH_2), aspartik asit ya da glutamik asitin karboksil grubu (CO_2H), serin ya da tironinin hidroksil grubu (OH) ve sisteyinin sülfidril grubunu (SH)'nun sayısı kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon için yeterli olmaktadır (Cabral ve Kennedy, 1991).

Kovalent bağlanma ile hücre immobilizasyonu ideal desteğin mevcut olmadığını göstermektedir. Bu nedenle hücre immobilizasyonunda kullanılacak desteğin avantajları ve dezavantajları iyi belirlenmelidir. Birçok faktör hücrenin desteğe bağlanmasını etkileyebilmektedir (Bickerstaff, 1997).



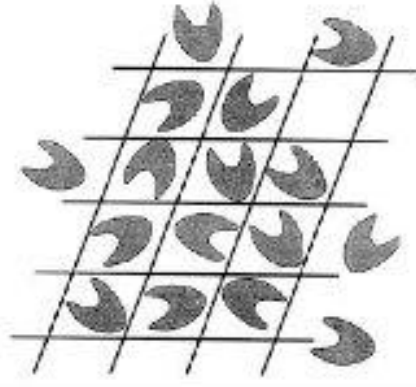
Şekil 2.2. Kovalent bağlama yöntemi

2.4.1.3. Hapsetme

Hapsetme yöntemi ile hücre immobilizasyonu yapay ya da doğal polimerlerde kafesler oluşturularak gerçekleştirilmektedir. Polimerik tanecikler, substratın ve ürünün taneciğın içine girip çıkabileceğı şekilde, substrat ve ürün molekülünden büyük, hücre boyutundan küçük gözenek boyutuna sahip olmalıdır. Böylece substrat ve ürünler gözenekli polimer ağı içerisinde rahat hareket edebilmekte ve hücrelerin reaksiyon ortamına karışması engellenmiş olmaktadır. Hapsetme yöntemi ile hücre immobilizasyonunun en önemli avantajı zararlı hücreler ve proteinlerin, immobilize edilmiş hücreyle etkileşimini engellemesidir.

Hapsetme yöntemiyle hücre immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan birkaç yöntem vardır. Bunlar: Multivalent katyonlarla iyonotropik jelasyon (alginat), sıcaklık azaltan jelasyon (agaro ve jelatin), kimyasal/fotokimyasal reaksiyonla organik polimerizasyon (poliakrilamit), immiscible solventten çözelti (polystyrene)'dir.

Sonuç olarak hapsetme yöntemiyle immobilizasyonda, etkin tutuklama maddesinin seçimindeki en önemli faktör, materyalin moleküler boyutu ve yapısı ile destek içine ve dışına difüzleneren substrat ile ürünün boyutudur (Bickerstaff, 1997).



Şekil 2.3. Hapsetme yöntemi

Agar

Agar agar (veya agar) bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidiaceae*, *Sphaerococcaceae* ve *Rhodophyceae*) elde edilen özüt olup, agaroz (%70) ve agaropektin polisakkaritlerini içermektedir. Bir Japon efsanesine göre agarın orijinal üretim yöntemi

tahminen 1658 yılında, 17. yüzyılın ortalarında keşfedilmiştir. Birçok bilim adamı tarafından agarın kimyasal yapısı, 1859 ile 1938 yılları arasında analiz edilmiştir ve D-galaktoz, 3,6-anhydro-L-galaktoz, sülfat'tan oluştuğu bulunmuştur. Agaropektin asidik bir polimer iken agaroz, hemen hemen nötr bir polimerdir. Agaroz, agarın yüksek polimerleştirme özelliğinden sorumlu iken, agaropektin vizikoz özellik verir. Agar 30 – 40 C° arasında jelleşirken, 90 – 95 C° sıcaklıklarda erir. Erime ve jelleşme sıcaklığında pH etkilidir. Agar bir poligalaktozit olup bazı hidroksil grupları sülfirik asitle esterleştirilmiştir. Agarın katılaştırma özelliğini, bileşimindeki D-galakton sağlamaktadır. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ bulunmaktadır. Mikrobiyolojide kullanılan ağarlar özel olarak saflaştırılarak, antimikrobiyal maddeler ve pigmentlerden arındırılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle, birkaç istisna dışında, mikro organizmalar tarafından kullanılmaz.

Agarın kullanım alanlarında geniş bir çeşitlilik vardır. Agar fırıncılıkta, şekerleme, süt endüstrisi ve et paketlemede, ilaç, biyomedikal, biyoteknolojik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. (<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>).

Aljinat

Sodyum, kalsiyum ve magnezyum tuzları şeklinde bulunan aljinatlar, aljinik asitin tuzlarıdır ve Phaeophyceae kahverengi algden üretilmektedir. Aljinik asit, (1-4) glikozidik bağlarıyla bağlı D-manuronik asit ve L-gluronik asitin bir kopolimeridir. Aljinat jellerin sertliği molekül ağırlığı, polimer değişimi ve manuronat/gluronat oranına bağlıdır. Manuronat oranı yüksek polimerler çok zayıf ve bulanık jeller oluştururken, gluronat oranı yüksek polimerler kararlı ve saydam jeller oluşturmaktadır. Sodyum alginatın suda çözünmesi, su tutma kapasitesi ve jelleşme hızı oldukça yüksektir. Sodyum alginat +2 değerlikli katyonlarla (Ca⁺², Mg⁺ Sr⁺ gibi) mekanik olarak dayanıklı jeller oluşturur.

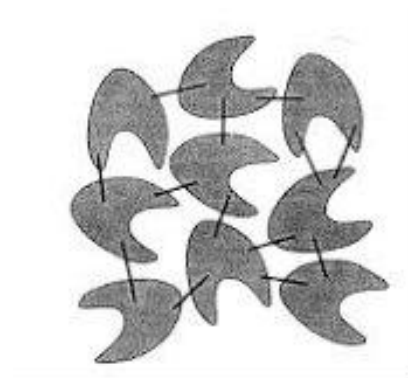
Mikroorganizmaların aljinata tutuklanmasında sodyum aljinat ve mikroorganizma çözeltisi ile yapılan polimer ağı için Ca⁺² gibi iki değerlikli katyonlar kullanılır. Na⁺ ile Ca⁺² iyonlarının yer değiştirmesi sonucu kalsiyum aljinat polimer tanecikleri oluşur. Bunun için Ca⁺² iyonları içeren inorganik tuzlar sodyum aljinat ile

temas ettirilir. Aljinatın Ca^{+2} ile jelleşmesi kalsiyum iyonlarının gluronat bloklarına bağlanması ile gerçekleşir. Jellerin kararlı, direncinin fazla olması için aljinatın yüksek miktarda gluronat blok içermesi gerekmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı sodyum aljinat, düşük derişimlerde kullanıldığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

2.4.1.4. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama yöntemiyle hücre immobilizasyonu serbest desteklidir ve büyük, üç boyutlu karmaşık yapılar oluşturmak için birbirine bağlanan hücrelerden oluşmaktadır. Çapraz bağlama yöntemiyle hücreler, bis-diazobenzidin-2,2 disülfonik asit, diizotiyosiyanatlar, glutraldehit ve tolüen gibi biyofonksiyonel ajanlarla fiziksel ve kimyasal bağlanarak polimerize edilir. Kimyasal çapraz bağlama yönteminde hücrelerin çift ya da çok fonksiyonlu bir ajan yardımıyla üç boyutlu bir örgü oluşturması sağlanır. Fiziksel çapraz bağlama yöntemiyle hücre immobilizasyonunda ise hücrelerin karşılıklı yapışma özelliğinden yararlanılarak hücre kitlesi oluşturma ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntem biyoteknolojide yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak çapraz bağlamada kullanılan ajanların toksikliği yüzünden hücre immobilizasyonunda bu yöntemin kullanılması sınırlıdır.

Çapraz bağlama diğer immobilizasyon yöntemleri için bir araç olarak farklı immobilizasyon metotlarında hücre sızmalarını önlemek ve bu metotları geliştirmek için kullanılmaktadır (Bickerstaff, 1997).

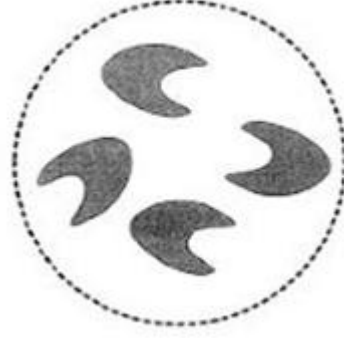


Şekil 2.4. Çapraz bağlama yöntemi

2.4.1.5. Kapsülleme

Kapsülleme yöntemiyle hücre immobilizasyonunda hücrelerin çevresinde çapı 1µ ya da daha büyük polimer yapıları oluşturulur. Kapsül zarı proteinler ve enzimlerin kapsül içine ya da dışına geçmesini önlerken küçük substratlar ve ürünler yarı geçirgen membrandan kolayca geçebilmesini sağlar. Kapsülleme yöntemiyle biyolojik hücrelerin kullanımı da mümkün olmaktadır. Örneğin, eritrosit membranı yarı geçirgen özelliktedir ve sadece küçük moleküllerin geçişine izin vermektedir. Bir çok polimer kapsül zarı olarak kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları: polisitiren, naylon, akrilat ve poliester membranlardır.

Kapsülleme yöntemiyle immobilizasyonda difüzyon ile ilgili herhangi bir problem sonucunda kapsül parçalanabilmektedir. Bu da kapsülleme yöntemiyle hücre immobilizasyonunun en önemli dezavantajı olmaktadır.



Şekil 2.5. Kapsülleme yöntemi

2.4.2. Halofilik Arkelerde Hücre İmmobilizasyonu

Halofilik arkelerde hücre immobilizasyonu ile ilgili olarak literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bagal ve Madamwar (1996) *Halobacterium salinarium* hücrelerini kalsiyum alginat ve polivinil alkol filimlerine immobilize ederek α -amilaz enzim aktivitesini incelemişlerdir. % 3.5 aljinata hapsedilen hücrelerin, PH7.2 de 40 °C'de en yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Halogeometricum sp. TSS101 hapsetme yöntemiyle % 2'lik agara immobilize edilerek proteaz aktivitesi belirlenmiştir (Vidyasagar ve ark., 2006). Serbest *Halogeometricum* sp. TSS101'de maksimum proteaz aktivitesi 84. saatte gözlenirken

immobilize edilen hücrelerde ise 10 tekrar boyunca 60. saatte gözlenmiştir (Vidyasagar ve ark., 2006).

Tapingkae ve arkadaşları (2010) hapsetme, adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemlerini kullanarak *Natrinema gari* BCC 24369 suşunu immobilize etmişler ve histamin degradasyonunu incelemişlerdir. *Natrinema gari* BCC 24369 hücreleri için en yüksek histamin degradasyonunun Celite 545'e adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen hücrelerde saptandığı belirtilmiştir. İkinci yüksek histamin degradasyonu hapsetme ile agar immobilizasyonda belirlenmiştir. Çapraz bağlama ile immobilizasyonda ise histamin degradasyonu görülmemiştir (Tapingkae ve ark., 2010).

Halobacterium sp. JS hücrelerinin kalsiyum alginat, k-karragenan poliakrilamid ve jelatine immobilize edildiği diğer bir çalışmada, halofilik proteaz üretimi incelenmiştir. Buna göre en yüksek proteaz aktivitesi ve en az hücre kaybı kalsiyum aljinat kullanılarak yapılan immobilizasyonda saptanmıştır (Vijayanand ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Sodyum klorür (NaCl), Magnezyum sülfat (MgSO₄), Potasyum klorür (KCl), Sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇), yeast ekstrakt, Agar, Celite 281, Glutaraldehit (%50), Kalsiyum klorür (CaCl₂), Nitrik asit (CHNO₃), p-nitrofenilbütrat, paranitrofenol, gum Arabic, Folin-ciocalteu's, Nişasta, Sodyum potasyum tartarat, Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum karbonat (Na₂CO₃), Fenol, Glukoz, Sodyum trifosfat, Hekzan, Etanol, Asetik asit, TCA, Tirozin, Kitosan, Sodyum aljinat, Dinitro Salisilik Asit (DNSA), Kazein, Trizma Base, Sigma ve Merck firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Hassas Terazı	Ohaus EP 214C
Otoklav	Alp CL32S
Manyetik Karıştırıcı	Are
Sıcaklık Ayarlı Sabit inkübatör	Nüve EN 500
Sıcaklık Ayarlı Çalkalamalı İnkübatör	Edmund Bühler GmbH
Santrifüj	Hettich zentrifugen EBA 12R
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1208
Laminer kabin	Kojair KR-130 Golden Line
Su Banyosu	Nüve BM 402
Vorteks	IKA
Etüv	Heraeus
pH metre	İnılab wtw series

3.1.2. Halofilik Arkeler

Çalışma kapsamında Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji laboratuvarında bulunan ve Samandağ (Hatay) dahil olmak üzere

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanarak izole edilmiş halofilik arke koleksiyonuna ait A138, A235, B45, D83A ve SD23 izolatları kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyeri

Halofilik arke izolatlarının aktiveştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla Sehgal-Gibbons (SG) besiyeri (250 g/L NaCl, 20 g/L MgSO₄.7H₂O, 2 g/L KCl, 3 g/L Sodyum sitrat, 0.023 g/L FeSO₄.7H₂O, 7.5 g/L casamino asit, 1 g/L yeast ekstrakt, pH 7.3) kullanılmıştır (Ozcan ve ark., 2007).

3.1.4. Halofilik Arke İzolatlarının İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri

Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda Celite 281 ve kitosana, hapsetme yöntemi ile immobilizasyonda agar ve sodyum aljinat, çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonda ise sodyum aljinat ve kitosan kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan her bir izolat SG sıvı besiyerine ekilerek, 37°C'de 125 rpm'de çalkalamalı olarak geç logaritmik faz ($A_{660} \sim 3.5-4$) aşamasına kadar üretilmiştir. Sıvı SG besiyerinde üretilen izolatlar 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve hücre peletleri elde edilmiştir.

3.2.2. Hücre İmmobilizasyonu

3.2.2.1. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon

Celite 281 ile İmmobilizasyon

Halofilik arke hücrelerinin Celite 281 ile immobilizasyonu Khare ve Nakajima (2000) ve Mansour ve Dawoud (2003)'e göre yapılmıştır. Celite 281 etanolle yıkandıktan sonra %10 nitrik asit çözeltisinde bir gece bekletilmiş, ardından yıkanarak 80 °C'de kurutulmuş ve immobilizasyona hazır hale getirilmiştir. Arke kültürlerinden santrifüjle toplanan hücre peleti standart tamponla (3.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, PH 7.4) iki kez yıkanarak immobilizasyona hazır hale getirilmiştir.

5g Celite, içersinde 0.5 g hücre bulunan 10 ml standart tampon ile karıştırılarak +4 °C’de bir saat bekletilmiş, sonra standart tampon ile yıkanarak süzölmüştür. Celite 281’e immobilize edilen hücreler, enzim aktivitesi belirleme çalışmalarına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

Kitosan ile immobilizasyon

Kitosan ile arke hücrelerinin immobilizasyonu Pereira ve arkadaşları (2003)’e göre yapılmıştır. Kitosan desteği oda ısısında 1 saat süreyle hekzanla muamele edilerek immobilizasyona hazır hale getirilmiştir. Arke kültürlerinden santrifüjle toplanan hücre peleti standart tamponla iki kez yıkanarak immobilizasyona hazır hale getirilmiştir. 0,5 g hücre, 10 ml standart tampon ve 5 g kitosan desteği ile karıştırılarak oda sıcaklığında 3 saat bekletilmiş, ve daha sonra +4 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışım, standart tamponla yıkanarak süzölmüştür. Kitosan desteğine immobilize edilen hücreler, enzim aktivitesi belirleme çalışmalarına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.2.2.2. Hapsetme Yöntemi ile İmmobilizasyon

Kalsiyum Aijinat ile İmmobilizasyon

Halofilik arke hücrelerinin sodyum aijinat ile immobilizasyonu Takeno ve ark. (2005)’a göre yapılmıştır. Sodyum-aljimat (%3.5) çözeltisiyle, santrifüjle toplandıktan sonra 2.5 ml standart tamponda süspanse edilmiş 0.5 g hücre peleti karıştırılmıştır. Aljimat hücre karışımı 100 ml 0.55 M CaCl₂ çözeltisine damlatılarak kalsiyum aljimat küreleri elde edilmiştir. Kalsiyum aljimat küreleri +4 °C’de bekletilmiş ve süzölerek standart tamponla yıkanmıştır. Sodyum-aljinata hapsedilmiş hücreler enzim aktivite çalışmalarına kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

Agar ile İmmobilizasyon

Agar ile immobilizasyon çalışması Takeno ve ark. (2005)’a göre yapılmıştır. Halofilik arke izolatlarını agara hapsetmek amacıyla %4’lük agar hazırlanmıştır. Hazırlanan agar otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C’ye kadar soğutulmuş ve santrifüjle toplandıktan sonra 2.5 ml standart tamponda süspanse edilen 0.5 g hücre peleti ile karıştırılmıştır. Hücre, agar karışımı, steril edilerek soğutulmuş sıvı yağ içerisine küt uçlu iğne yardımıyla damlatılarak agar küreleri elde edilmiş ve agar küreleri +4 °C’de

bekletildikten sonra süzülerek standart tamponla yıkanmıştır. Agara hapsedilmiş hücreler enzim aktivite çalışmalarına kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

3.2.2.3. Çapraz Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon

Aljinat Kitosan ile İmmobilizasyon

Halofilik arke hücrelerinin aljinat-kitosana immobilizasyonu Vidyasagar ve ark. (2006)’a göre yapılmıştır. Hücreleri aljinat-kitosana çapraz bağlayarak immobilize etmek için, % 3.5 aljinat çözeltisi, santrifüjle toplanmış ve içerisinde 0.5 g hücre peleti bulunan 2.5 ml standart tampon ile karıştırılmıştır. Aljinat hücre karışımı, içerisinde %2’lik asetik asitte çözülmüş % 0.5 kitosan bulunan %0.5’lik CaCl₂ çözeltisine damlatılmış ve kürelerin oluşması sağlanmıştır. +4 °C’de bir saat inkübe edilmiş hücre içeren küreler süzülerek standart tamponla yıkanmış ve enzim aktivite çalışmalarına kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

Çapraz Bağlı-Aljinat ile İmmobilizasyon

Çapraz bağlı aljinat ile immobilizasyon çalışması Vidyasagar ve ark. (2006)’a göre yapılmıştır. Arke hücrelerini aljinata çapraz bağlamak amacıyla % 3.5 aljinat çözeltisi, santrifüjle toplanmış ve 0.5 g hücre peleti içeren 2 ml standart tampon ile karıştırılmıştır. Hücre aljinat karışımına 1 ml % 0.5’lik glutaraldehit eklendikten sonra karışım oda ısısında bekletilmiş, 0.5 M’lık 100 ml CaCl₂ çözeltisine damlatılarak kürelerin oluşması sağlanmıştır. +4 °C’de inkübe edilmiş hücre içeren küreler süzülerek standart tamponla yıkanmış ve enzim aktivite çalışmalarına kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

Çapraz Bağlı-Kitosan ile İmmobilizasyon

Arke hücrelerinin çapraz bağlı kitosan ile immobilizasyonu Carrara ve Rubialo (1994)’a göre yapılmıştır. Hücreleri aljinata çapraz bağlayarak immobilize etmek için: % 2’lik asetik asitte çözülen kitosan çözeltisi % 15’lik 150 ml sodyum trifosfat çözeltisine damlatılarak kürelerin oluşması sağlanmıştır. Kitosan küreleri standart tamponla yıkandıktan sonra %0.1 glutaraldehit çözeltisi ile karıştırılıp oda ısısında bekletilerek aktif hale getirilmiştir. 5 g kitosan küresi, içerisinde 0.5 g hücre peleti bulunan 10 ml standart tamponla karıştırılarak 24 saat oda ısısında 100 rpm’de inkübe

edilmiş ve standart tamponla yıkandıktan sonra enzim aktivite çalışmalarına kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

3.2.3. Enzim Aktivitesi Tayin Yöntemleri

3.2.3.1. Lipaz Aktivitesi

Serbest ve immobilize hücrelerin lipaz aktivitesi tayini Ozcan ve ark. (2009)’a göre yapılmıştır. İnkübasyon zamanına bağlı lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla immobilize ve serbest hücreler, içerisinde % 0.5 sıvıyağ ve gum arabik içeren 40 ml standart tamponla karıştırılmış ve 37 °C’de, 125 rpm de inkübasyona kaldırılmıştır. 8 gün (192 saat) boyunca her 24 saatte bir immobilize ve serbest hücrelerin lipaz aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla ekstraselüler ortam 15000 g’de santrifüjlenmiş ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Hücrelerin lipaz aktivitesi substrat olarak p-nitrofenilbütirat (pNPB) kullanılarak belirlenmiştir. pNPB final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde NaCl içeren standart tamponda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 40 °C’de, 5 dakika statik koşullarda inkübe edildikten sonra 0.25 M Na₂CO₃ ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon ortamında açığa çıkan p-nitrofenol (pNP) derişimi 410 nm’de absorbans ölçülerek tayin edilmiş ve aktivite µmol pNP/dk.ml olarak hesaplanmıştır.

Bir ünite (enzim aktivitesi) 1 dakikada 1µmol pNP açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır

Enzim aktivitesi (U/ml) = serbest kalan pNP (µmol)/enzim kaynağı (ml)× inkübasyon süresi

3.2.3.2. Proteaz Aktivitesi

Proteaz aktivitesi tayini Vidyasagar ve ark. (2006)’a göre yapılmıştır. İnkübasyon zamanına bağlı proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla immobilize ve serbest hücreler, içerisinde % 0.5 kazein, gum arabik ve NaCl içeren 40 ml standart tamponla karıştırılmış ve 37 °C’de, 125 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 8 gün (192 saat) boyunca her 24 saatte bir immobilize ve serbest hücrelerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla ekstraselüler ortam 15000 rpm’de santrifüjlenmiş ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Hücrelerin proteaz aktivitesi substrat olarak standart tamponda hazırlanmış % 0.6 kazein çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 40 °C'de, 30 dakika statik koşullarda inkübe edildikten sonra, ortama % 5 trikloroasetik asit (TCA) ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. TCA ilave edilen örnekler santrifüjlendikten sonra alınan süpernatant üzerine 0.5 M Na₂CO₃ ardından üç kat sulandırılmış Folin-ciocalteu's çözeltisi eklenmiştir. Reaksiyon ortamında açığa çıkan tirozin derişimi 660 nm'de absorbans ölçülerek tayin edilmiş ve aktivite µmol tirozin/dk.ml olarak hesaplanmıştır.

Bir ünite (enzim aktivitesi) 1 dakikada 1µmol tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi (U/ml) = serbest kalan tirozin (µmol)/enzim kaynağı (ml)× inkübasyon süresi

3.2.3.3. Amilaz Aktivitesi

Amilaz aktivitesi Hasseltine ve ark. (2005)'e göre yapılmıştır. İnkübasyon zamanına bağlı amilaz aktivitesini belirlemek amacıyla immobilize ve serbest hücreler, içerisinde %0.5 nişasta içeren 40 ml standart tamponla karıştırılmış ve 37 °C'de, 125 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 8 gün (192 saat) boyunca her 24 saatte bir serbest ve immobilize hücrelerin amilaz aktivitesi belirlenmiştir. Amilaz aktivitesini belirlemek amacıyla ekstraselüler ortam 15000 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

İmmobilize edilmiş hücrelerin amilaz aktivitesi substrat olarak % 1 nişasta ve tuz içeren standart tampon (pH 7.4) kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 40 °C'de, 30 dakika statik koşullarda inkübe edildikten sonra dinitrosalisilik asit (DNSA) ilave edilerek 10 dakika kaynar suda bekletilmiştir. Örnekler soğutulduktan sonra 5 ml distile su ile seyreltme yapılmıştır. Reaksiyon ortamında açığa çıkan indirgen şeker miktarı olarak glukoz derişimi 575 nm'de absorbans ölçümüyle tayin edilmiş ve aktivite µmol glukoz/dk.ml olarak hesaplanmıştır.

Bir amilaz enzim ünitesi 1 dakikada bir µmol indirgen şeker (glukoz) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Enzim aktivitesi (U/ml) = serbest kalan glukoz (μmol)/enzim kaynağı (ml)× inkübasyon süresi

3.2.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Optimizasyonu

Her bir hidrolitik enzim yönünden en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenen immobilize arke izolatu için, immobilizasyon yöntemi basamakları değiştirilerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.4.1. Celite 281'e adsorpsiyon Yönteminin Optimizasyonu

Halofilik arke hücrelerinin Celite 281'e immobilizasyonunda, yukarıda verilen standart yöntemin basamakları değiştirilerek 5 farklı şekilde immobilizasyon yapılmıştır. Buna göre,

1. Yıkama işlemi yapılmamış Celite 281 kullanılarak,
2. Etanolle yıkanmış ve 48 saat % 10'luk nitrik asitte bekletilmiş Celite 281 kullanılarak,
3. Etanolle yıkanmış ve 24 saat % 20'lik nitrik asitte bekletilmiş Celite 281 kullanılarak,
4. Etanolle yıkanmış ve 48 saat 1 M hidroflorik asitte bekletilmiş Celite 281 kullanılarak,
5. Hücre peleti ve Celite 281 karışımı +4 °C'de 24 saat bekletilerek,

halofilik arke hücreleri immobilize edilmiştir.

3.2.4.2. Kitosana Adsorpsiyon Yönteminin Optimizasyonu

Halofilik arke hücrelerinin kitosan desteğine immobilizasyonunda, yukarıda verilen standart yöntemin basamakları değiştirilerek 6 farklı şekilde immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon basamaklarındaki değişiklikler, Preira ve ark. (2003) ve Shen ve ark. (2010)'a göre modifiye edilerek yapılmıştır. Buna göre;

1. Hekzanla muamele edilmiş kitosan desteği ile hücre süspansiyonu karışımı +4 °C'de inkübe edilmeden,
2. % 2'lik asetik asitte doksan dakika çözdürüldükten sonra % 5'lik NaOH ile pH 6-6,5'a ayarlanmış kitosan kullanılarak,
3. Hekzanla mamele edilmemiş kitosan kullanılarak,

4. Hekzanla muamele edilmiş ve % 2'lik asetik asitte 90 dk çözdürüldükten sonra % 5'lik NaOH ile pH 6- 6.5'a ayarlanmış kitosan kullanılarak,
5. Hekzanla muamele edilmiş ve 20 mM H₂O₂ ile oda ısısında inkübe edilmiş kitosan kullanılarak,
6. 20 mM H₂O₂ ile oda ısısında inkübe edilmiş kitosan kullanılarak,

halofilik arke hücreleri immobilize edilmiştir.

3.2.4.3. Kalsiyum Aljinata Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyonun Optimizasyonu

Halofilik arke hücrelerinin sodyum aljinat'a immobilizasyonunda, yukarıda verilen standart yöntemin basamakları değiştirilerek 6 farklı şekilde immobilizasyon yapılmıştır. Öncelikle yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü sodyum aljinat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla % 2, 3, 4 sodyum aljinat çözeltileri kullanılmış; sonra en yüksek enzim aktivitesinin sağlandığı aljinat çözeltisi ile birlikte, 0.15; 0.3; 0.55 ve 0.6 M olmak üzere farklı derişimlerde hazırlanan CaCl₂ çözeltisi ile immobilizasyon yapılmıştır.

3.2.5. İmmobilize Edilmiş Hücrelerin İnkübe Edildiği Ortam Koşullarının Optimizasyonu

Ortam koşullarının optimizasyonu çalışmaları, optimum immobilizasyon koşullarına göre immobilize edilmiş arke hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Optimum NaCl Konsantrasyonunun Saptanması

İmmobilize edilmiş arke hücrelerinin maksimum hidrolitik enzim üretimini gerçekleştirdikleri NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, 1,0, 1.5, 2,0, 2.5, 3,0, 3.5, 4,0 ve 4.5 M NaCl içeren standart tampon çözeltileri kullanılmıştır.

3.2.5.2. Optimum pH Değerinin Saptanması

İmmobilize edilmiş arke hücrelerinin maksimum hidrolitik enzim üretimini gerçekleştirdikleri pH değerinin belirlenmesi amacıyla, pH 5.0, 6.0, 6.5 ve 7.0 için 50 mM asetat tamponu, pH 7.5, 8.0, 8.5 ve 9 için 50 mM Tris-HCl tamponu ile hazırlanmış optimum NaCl içeren çözeltiler kullanılmıştır.

3.2.5.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

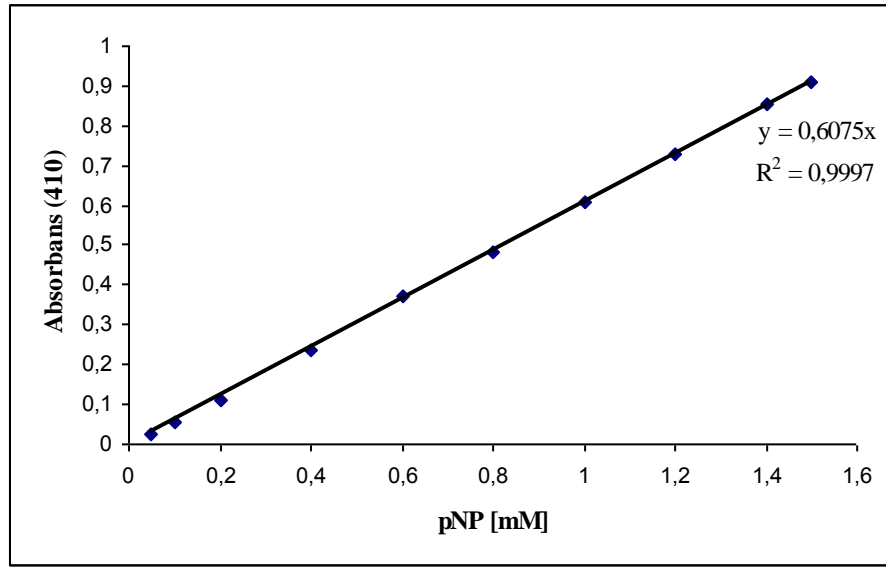
İmmobilize edilmiş arke hücrelerinin maksimum hidrolitik enzim üretimini gerçekleştirdikleri sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, optimum pH değerinde ve optimum NaCl içeren çözelti ortamında 10, 20, 30, 40, 50 °C olmak üzere beş farklı sıcaklık derecesinde inkübasyon yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

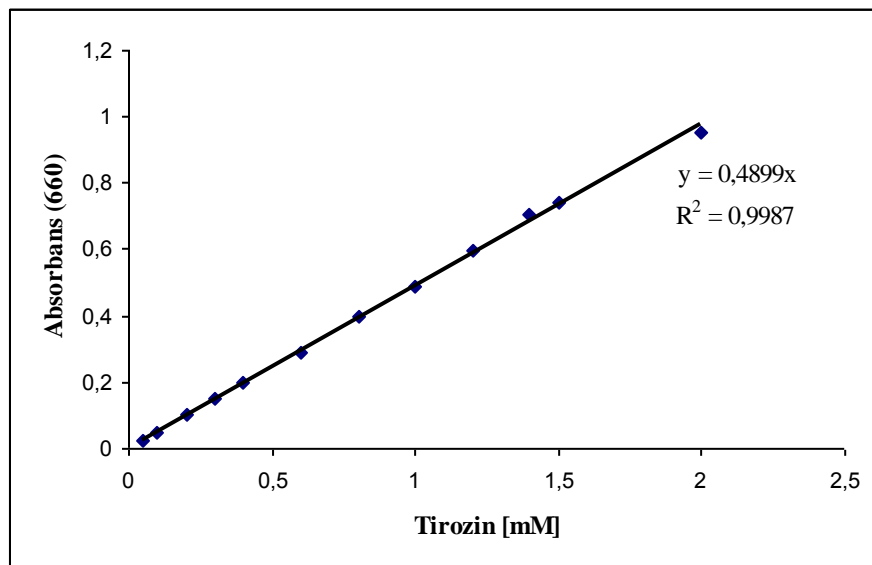
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Standart Grafikler

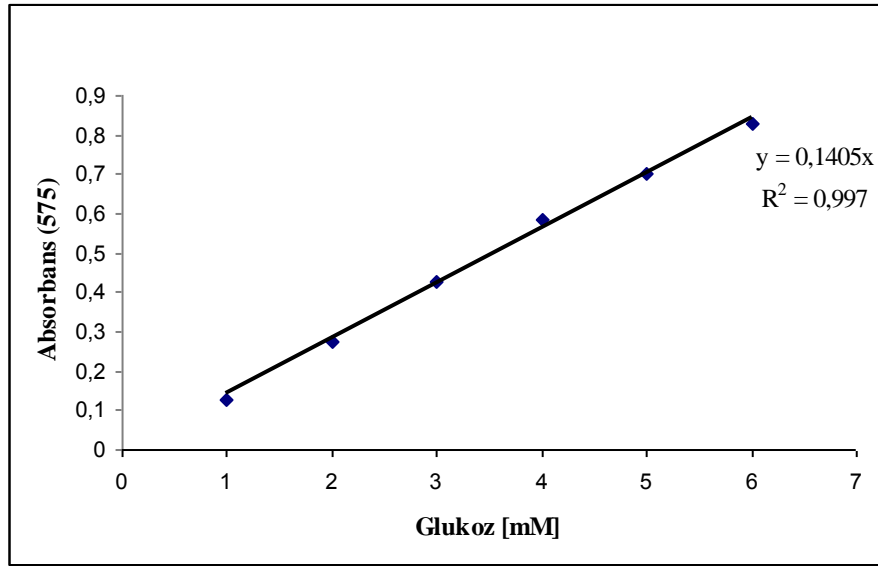
İmmobilize edilmiş ve serbest halofilik arke hücrelerinde lipaz, proteaz ve amilaz aktivitelerinin tayini için hazırlanan standart grafikler sırasıyla Şekil 4.6. - 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. pNP standart grafiği



Şekil 4.7. Tirozin standart grafiği



Şekil 4.8. Glukoz standart grafiği (DNSA yöntemi)

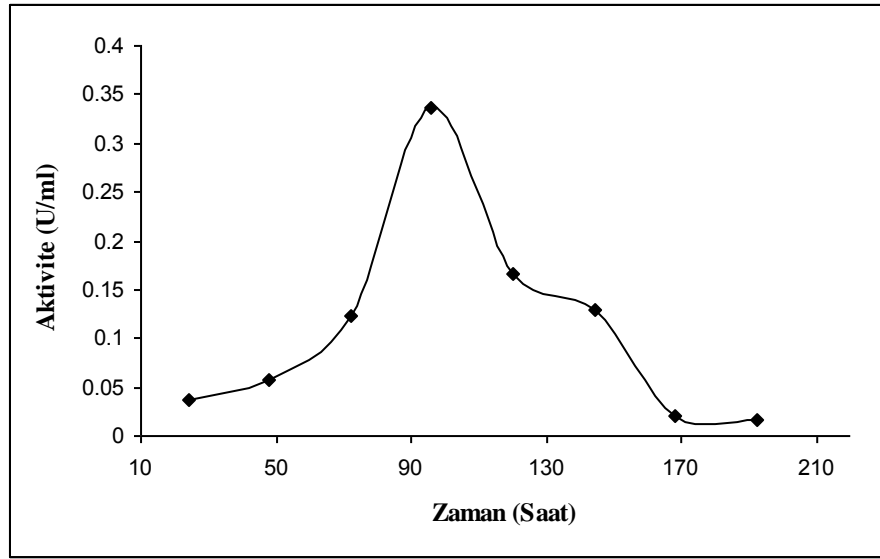
4.1.2. İmmobilize Edilmiş Hücrelerde İnkübasyon Zamanına Bağlı Enzim Aktiviteleri

Daha önceki çalışmalarla lipaz, amilaz ve proteaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiş toplam 50 izolat arasından en yüksek enzim aktivitesine sahip olanlar çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Tez kapsamında lipaz üreticisi olarak B45 ve A138, proteaz üreticisi olarak B45, D83A ve amilaz üreticisi olarak A235, SD23 izolatları kullanılmıştır.

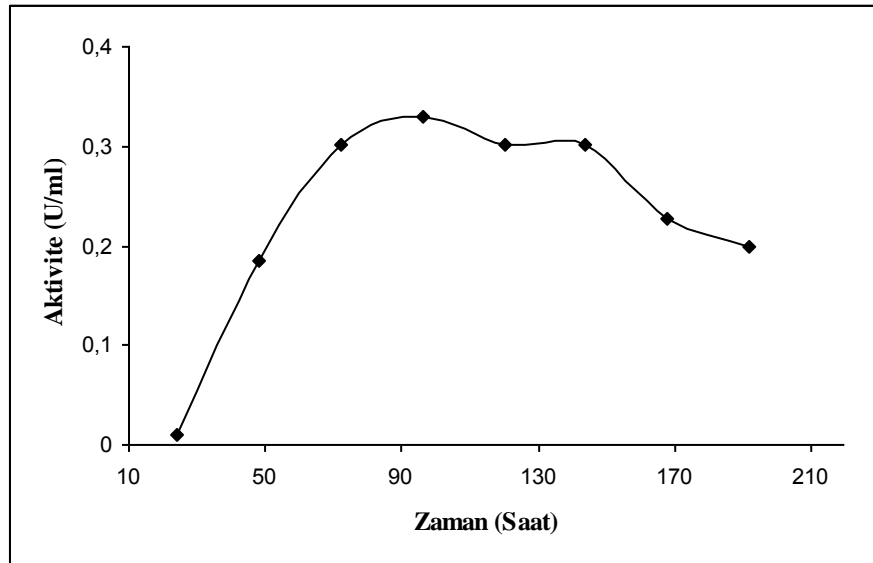
4.1.2.1. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları

B45 ve A138 izolatlarının kitosan ve Celite 281'e immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı lipaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.9. - 4.12.'de verilmiştir.

Kitosan desteğine adsorpsiyonla immobilize edilmiş B45 izolatının en yüksek lipaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 96. saatinde $0.3372 \mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak, A138 izolatı için immobilizasyon periyodunun 120. saatinde $0.3289 \mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

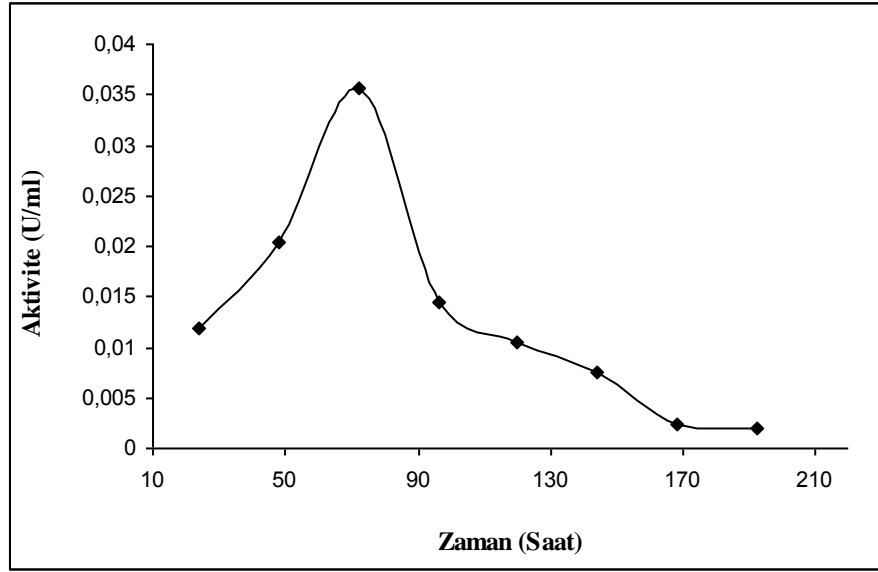


Şekil 4.9. Kitosan desteğine immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

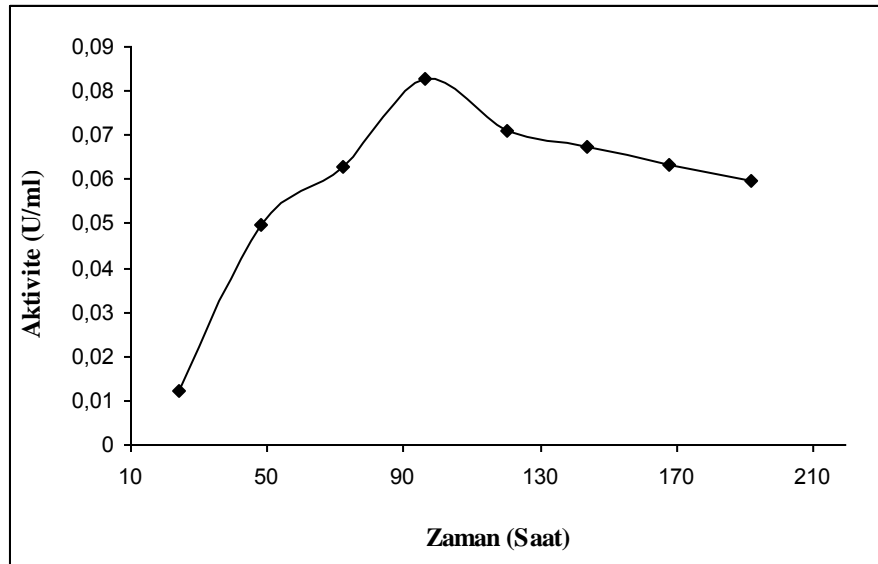


Şekil 4.10. Kitosan desteğine immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

Celite 281'e adsorpsiyonla immobilize edilmiş B45 izolatının en yüksek lipaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 72. saatinde $0.0356 \mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak, A138 izolatı için immobilizasyon periyodunun 96. saatinde $0.0826 \mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.



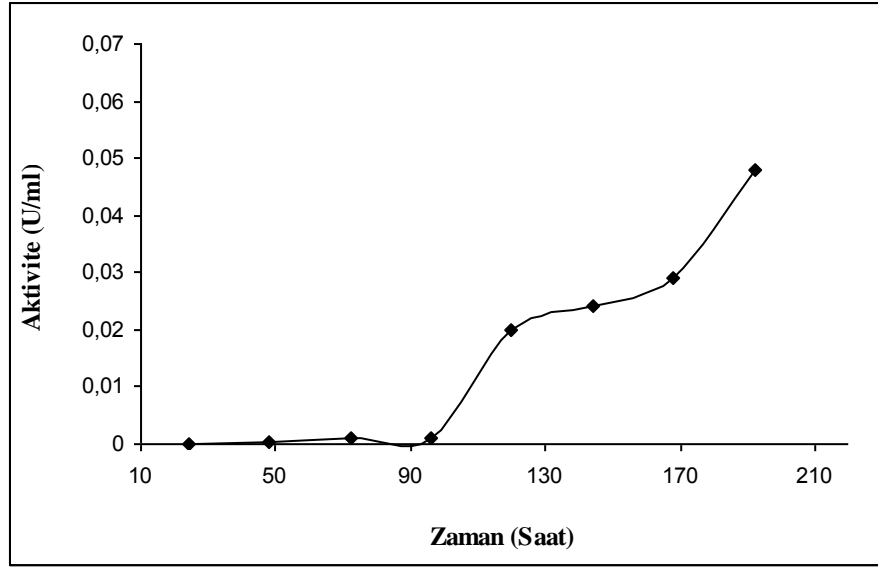
Şekil 4.11. Celite 281'e immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi



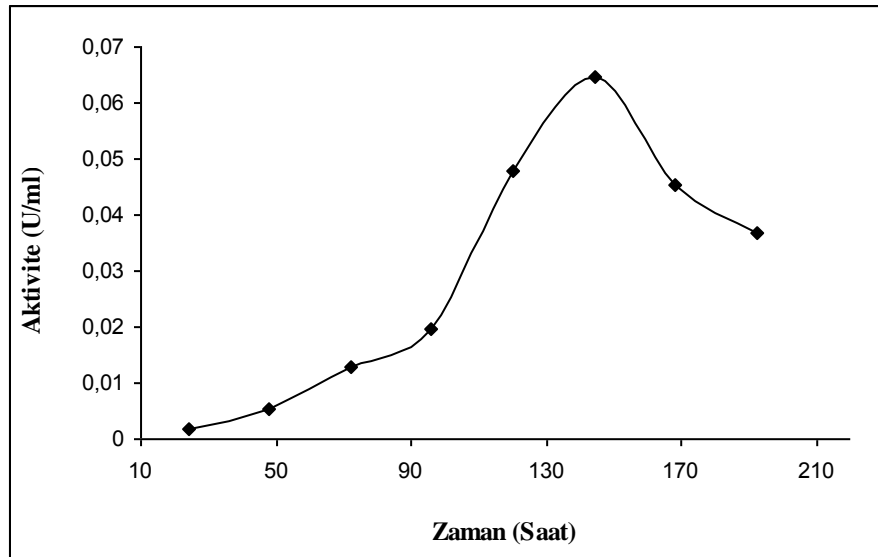
Şekil 4.12. Celite 281'e immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

4.1.2.2. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları

D83A ve B45 izolatlarının kitosan ve Celite 281'e immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.13. - 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.13. Kitosan desteğine immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

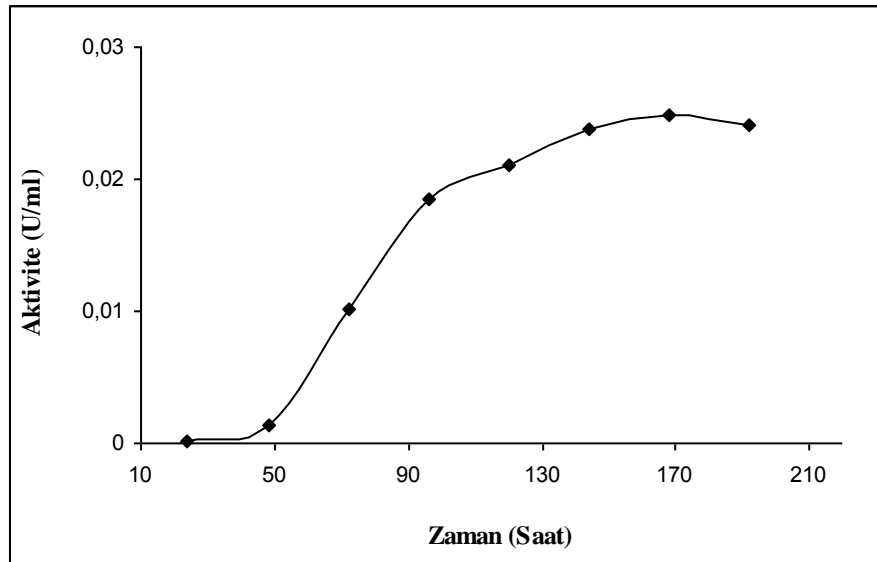


Şekil 4.14. Kitosan desteğine immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

Kitosan desteğine adsorpsiyonla immobilize edilmiş D83A ve B45 izolatları için en yüksek proteaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 168. saatinde sırasıyla 0.0478 ve 0.0646 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Celite 281'e immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



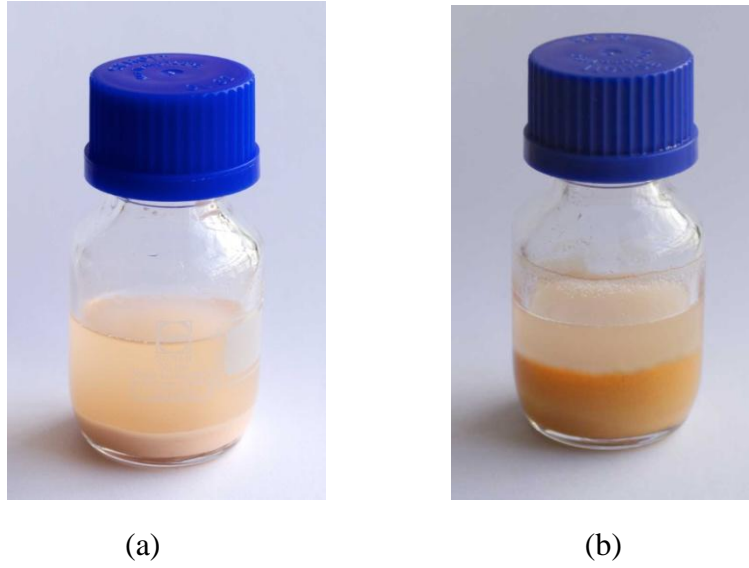
Şekil 4.16. Celite 281'e immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

Celite 281'e adsorpsiyonla immobilize edilmiş D83A ve B45 izolatları için en yüksek proteaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 168. saatinde sırasıyla 0.059 ve 0.0249 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

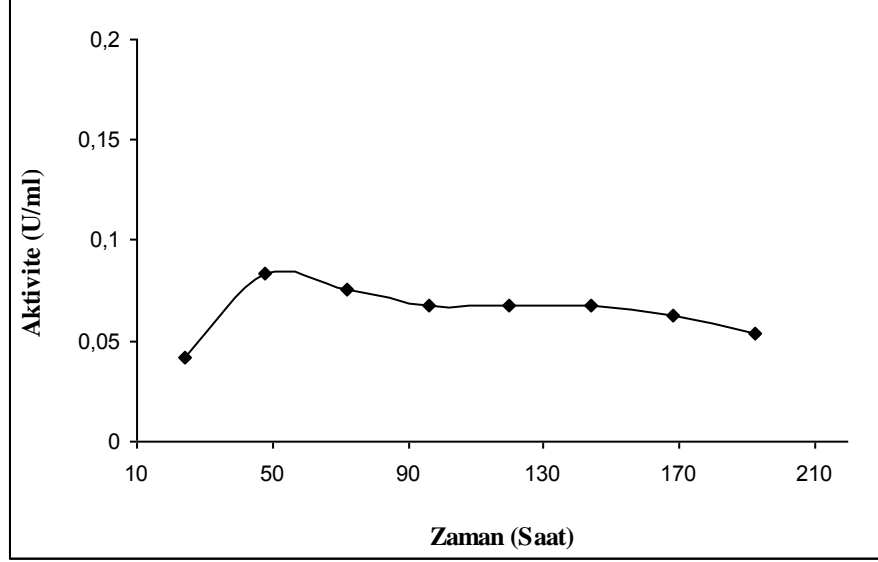
4.1.2.3. Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları

A235 ve SD23 izolatlarının kitosan ve Celite 281'e immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı amilaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.18. - 4.21.'de verilmiştir.

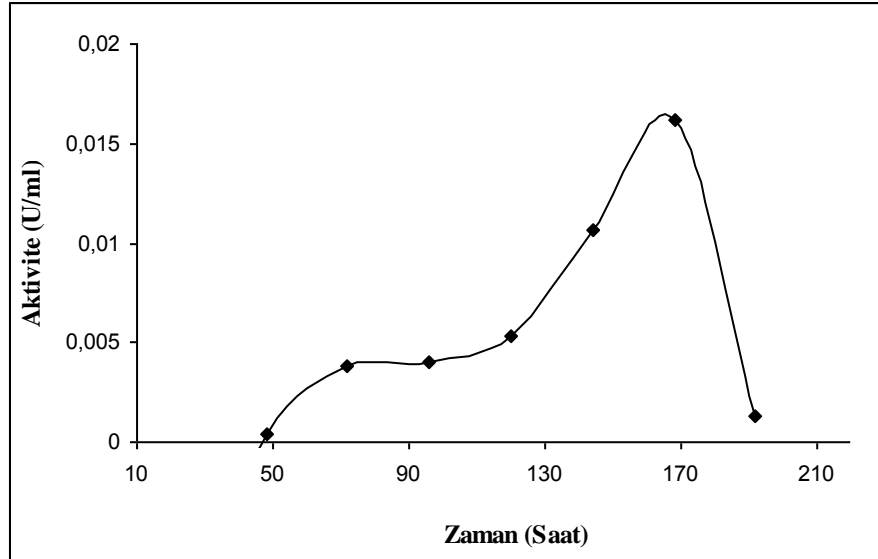
Kitosan desteğine adsorpsiyonla immobilize edilmiş A235 (Şekil 4.17.b) ve SD23 izolatlarının en yüksek amilaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun sırasıyla 48. saatinde 0,0831 ve 168. saatinde 0,0162 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Celite 281 (a) ve kitosan desteğine (b) adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatı

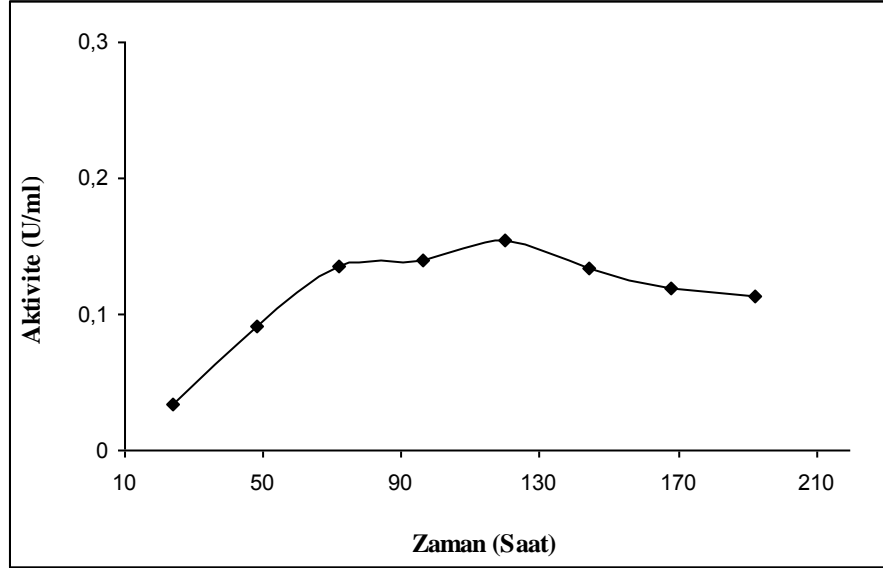


Şekil 4.18. Kitosan desteğine immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

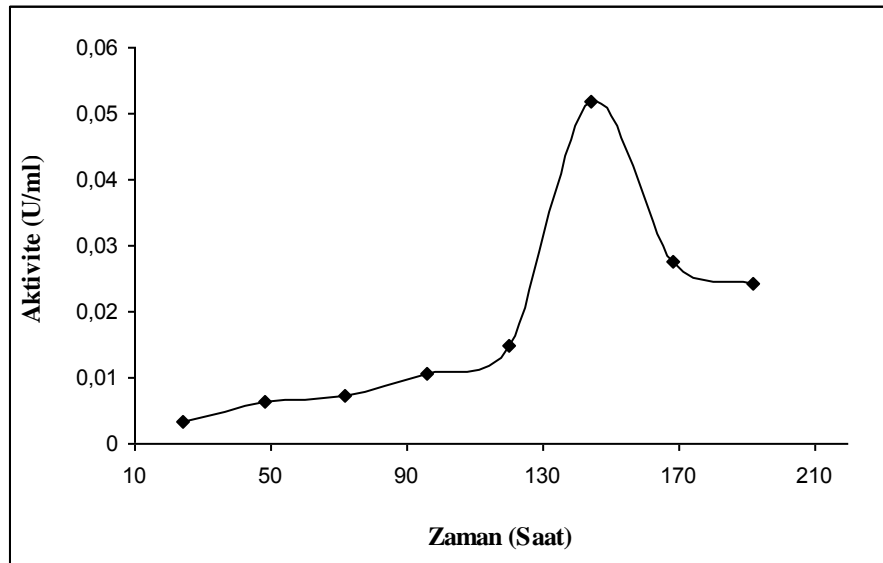


Şekil 4.19. Kitosan desteğine immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

Celite 281'e adsorpsiyonla immobilize edilmiş A235 izolatı için (Şekil 4.17.a) immobilizasyon periyodunun 120. saatinde 0,1542 ve SD23 izolatı için 144. saatte 0,0518 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Celite 281'e immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi



Şekil 4.21. Celite 281'e immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

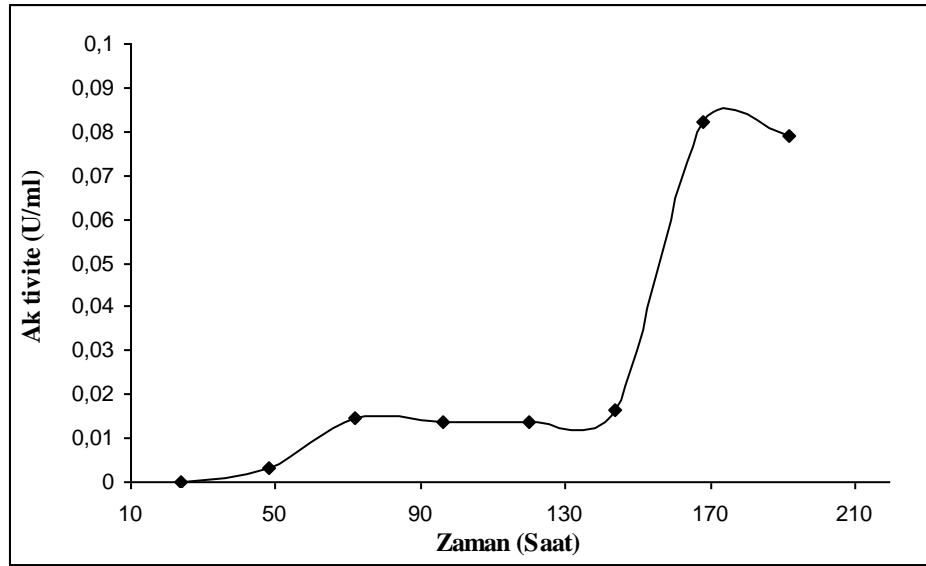
4.1.2.4. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları

B45 ve A138 izolatlarının agar ve kalsiyum aljinata immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı lipaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.23. - 4.26.'da verilmiştir.

Agara hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş B45 (Şekil 4.22.) izolatının en yüksek lipaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 168. saatinde $0.0824 \mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

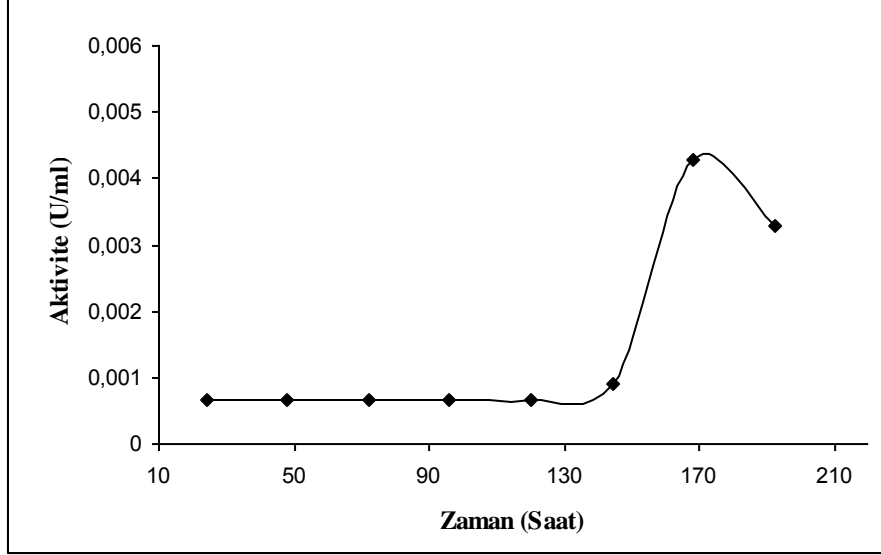


Şekil 4.22. Agara hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatı



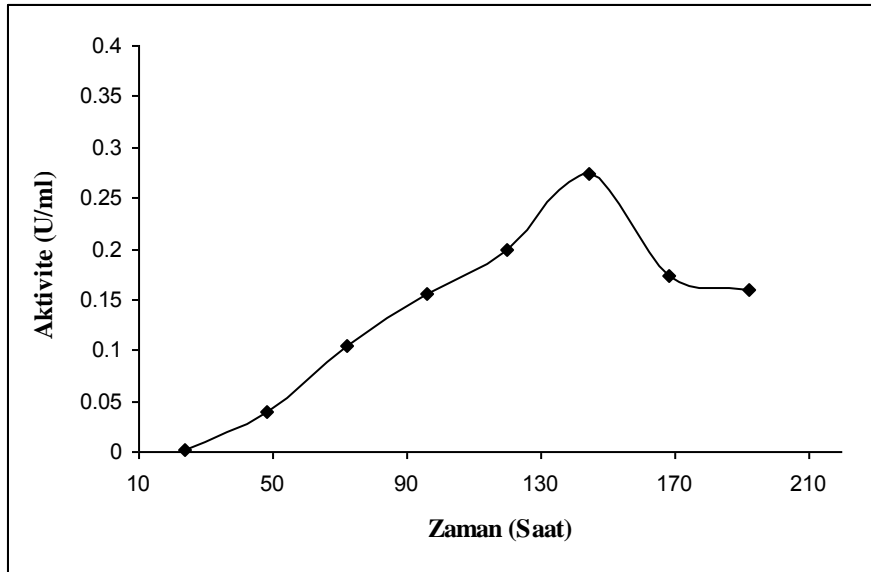
Şekil 4.23. Agara immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

A138 izolatu için immobilizasyon periyodunun 192. saatinde 0,0033 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

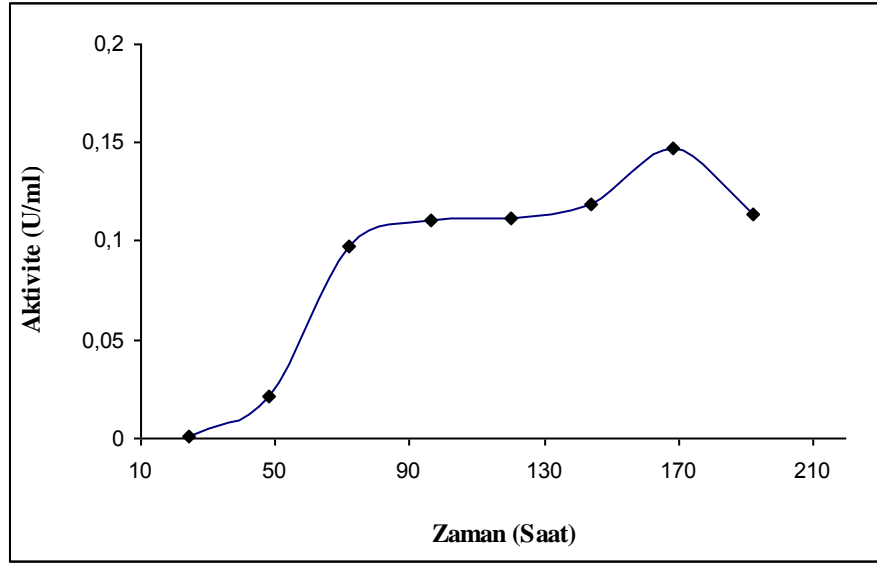


Şekil 4.24. Agara immobilize edilmiş A138 izolatu için immobilizasyon periyodunun 192. saatinde 0,0033 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiş lipaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değiştiği bir grafik.

Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş B45 izolatu için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0.0273 ve A138 izolatu için 168. saatte 0.1468 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.



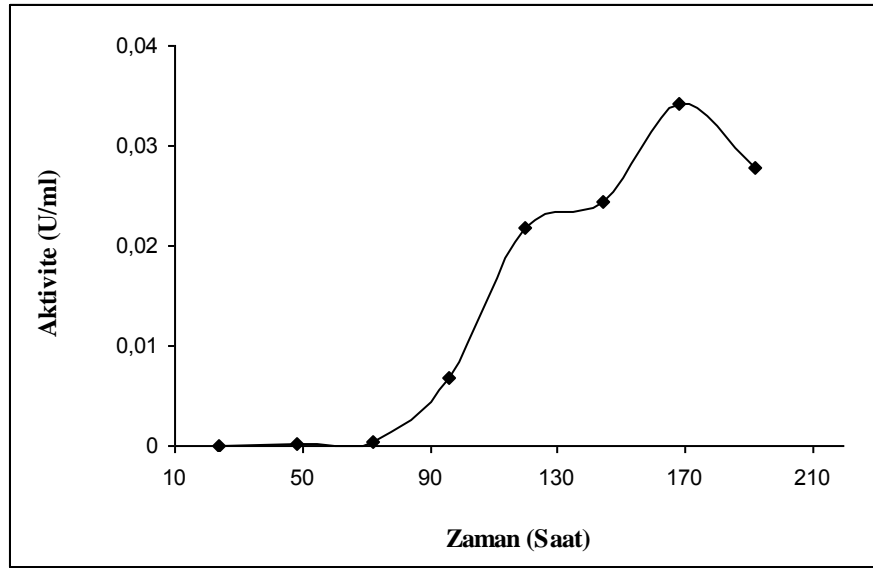
Şekil 4.25. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş B45 izolatu için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0.0273 ve A138 izolatu için 168. saatte 0.1468 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiş lipaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değiştiği bir grafik.



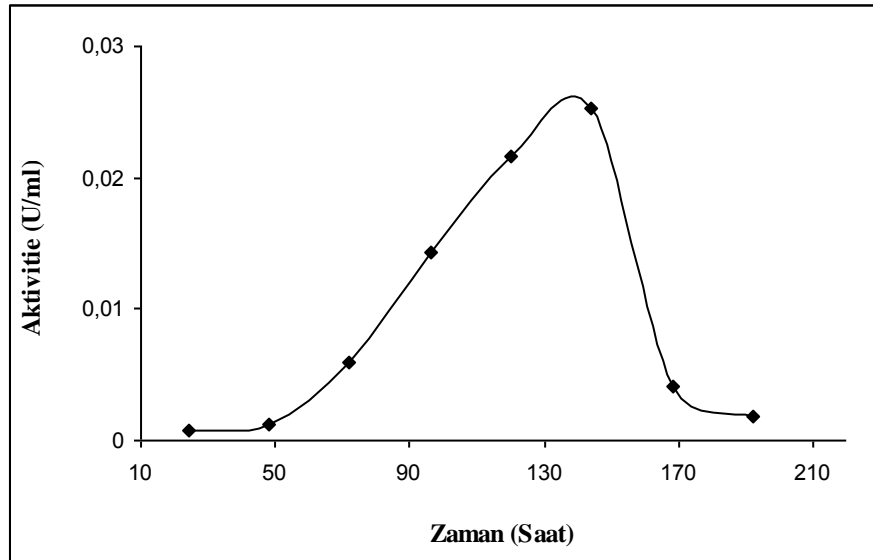
Şekil 4.26. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

4.1.2.5. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları

D83A ve B45 izolatlarının agar ve kalsiyum aljinata immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.27. - 4.30.'da verilmiştir. Agara hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş D83A izolatının en yüksek proteaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 168. saatinde 0.0341 μmol tirozin/dk.ml olarak, B45 izolatı için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0.0252 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

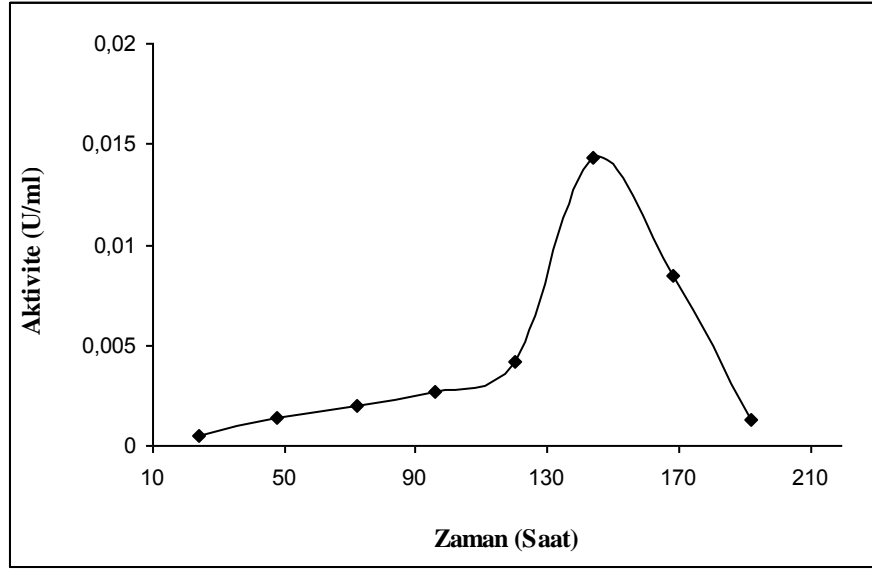


Şekil 4.27. Agara immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

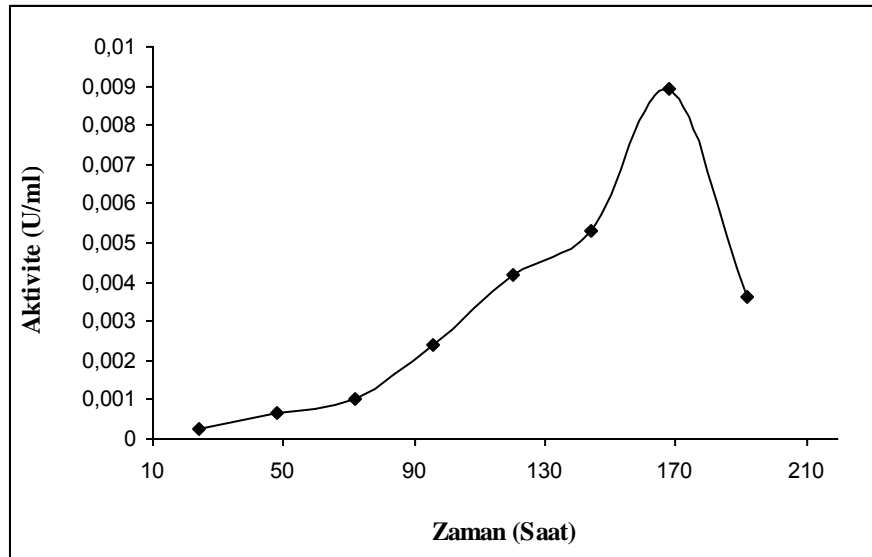


Şekil 4.28. Agara immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş D83A izolatu için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0.0145 ve B45 izolatu için 168. saatte 0.0089 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.



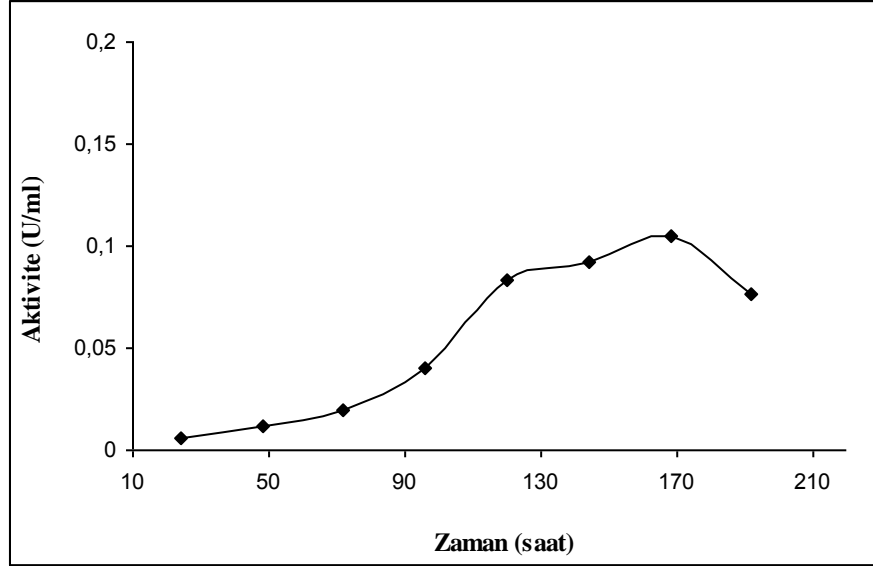
Şekil 4.29. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



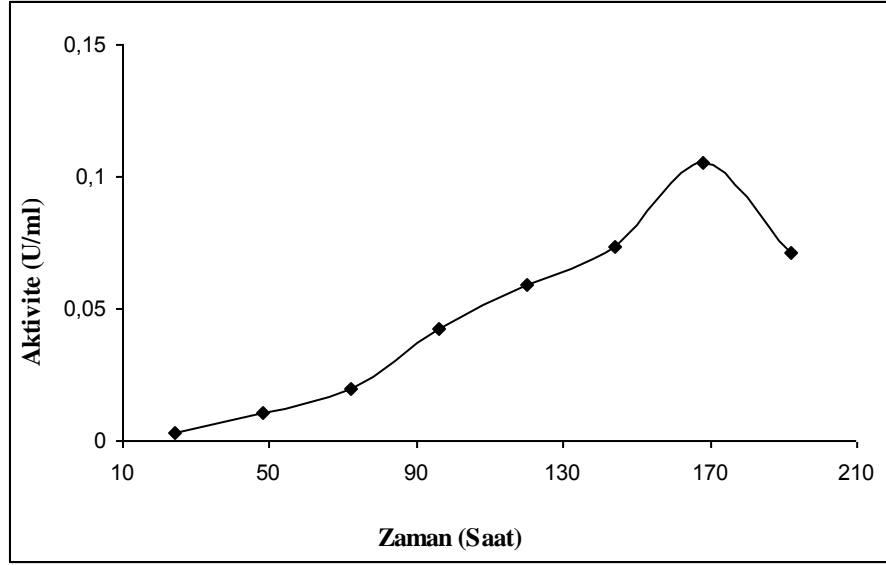
Şekil 4.30. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

4.1.2.6. Hapsetme Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları

A235 ve SD23 izolatlarının agar ve kalsiyum aljinata immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.31. - 4.35.'da verilmiştir. Agara hapsetme yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatının en yüksek amilaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 168. saatinde 0,1048 μmol glukoz/dk.ml olarak, SD23 izolatı için immobilizasyon periyodunun 168. saatinde 0,1056 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.

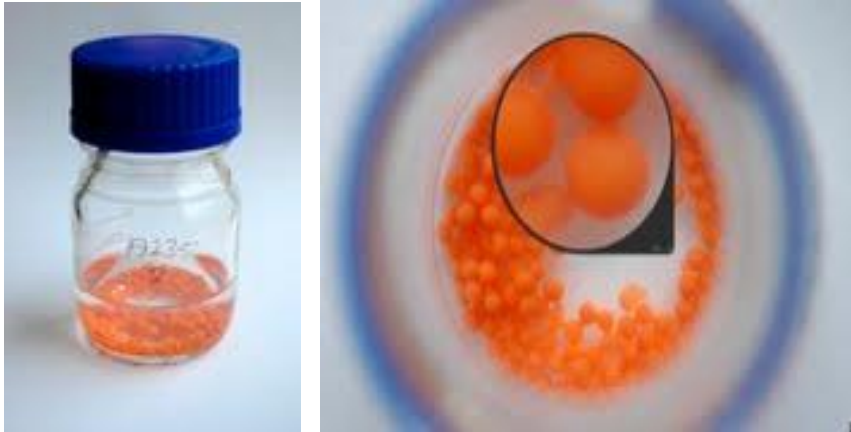


Şekil 4.31. Agara immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

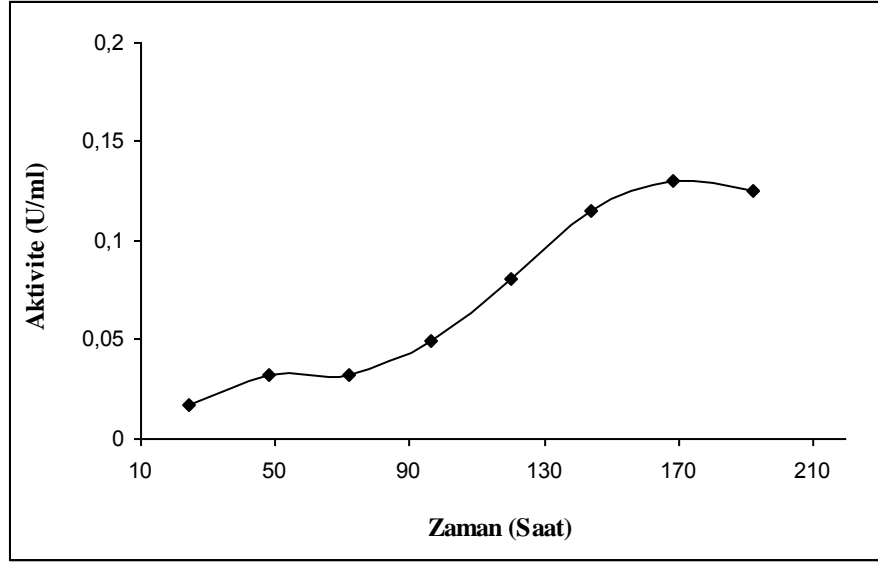


Şekil 4.32. Agara immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

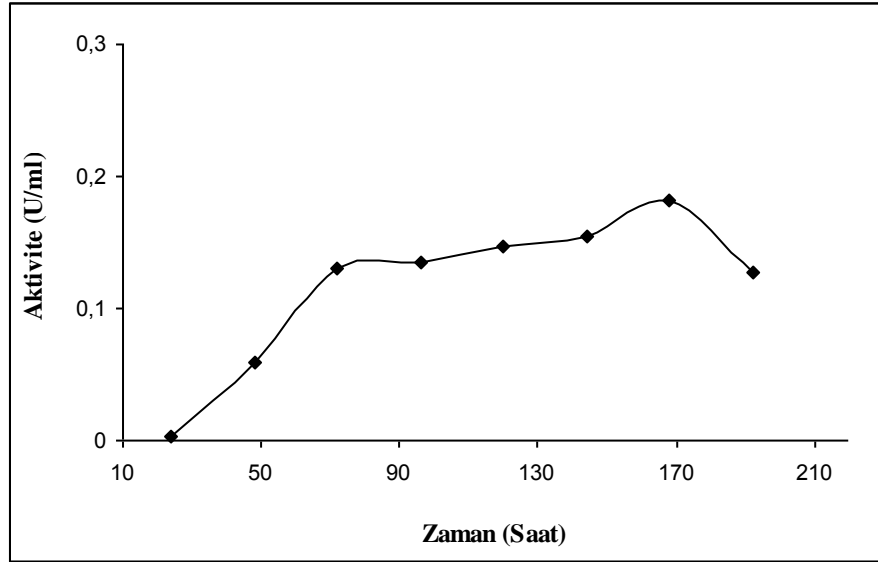
Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş A235 izolatı (Şekil 4.34.) için immobilizasyon periyodunun 168. saatinde 0,1302 ve SD23 izolatı için 168. saatte 0,1819 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.33. Kalsiyum aljinata hapsleme yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatı



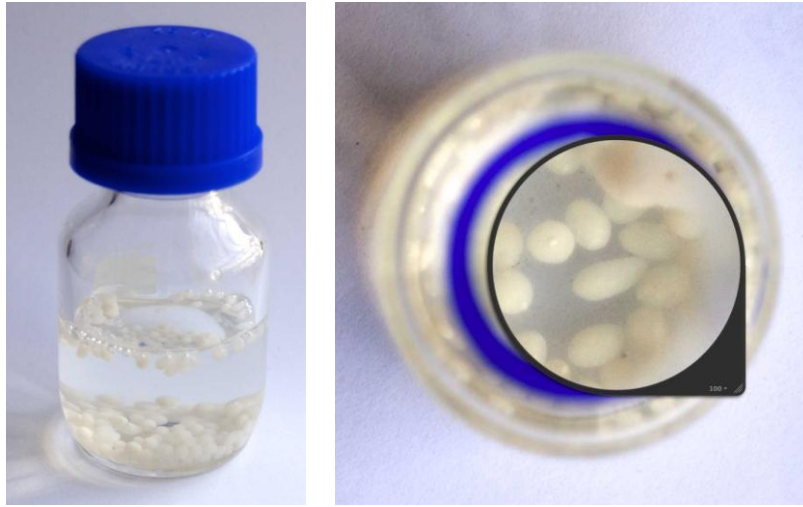
Şekil 4.34. Kalsiyum-aljinata immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi



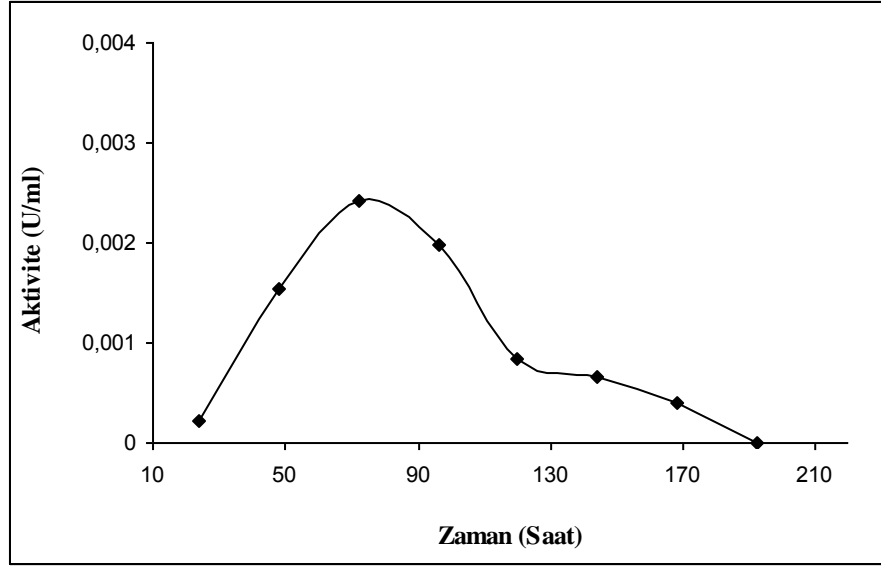
Şekil 4.35. Kalsiyum aljinata immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

4.1.2.7. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Lipaz Aktivitesi Sonuçları

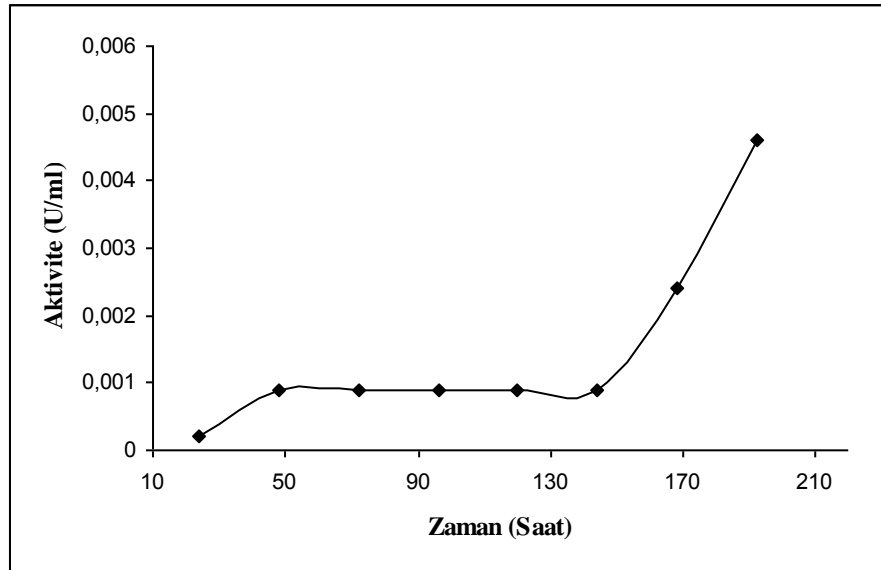
B45 ve A138 izolatlarının aljinat-kitosana, çapraz bağlı-aljinat ve çapraz bağlı-kitosana immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı lipaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.37. - 4.42.'de verilmiştir. Alginat-kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatının (Şekil 4.36.) en yüksek lipaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 72. saatinde 0.0024 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak, A138 izolatı için immobilizasyon periyodunun 192. saatinde 0.0046 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.36. Alginat-kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatı

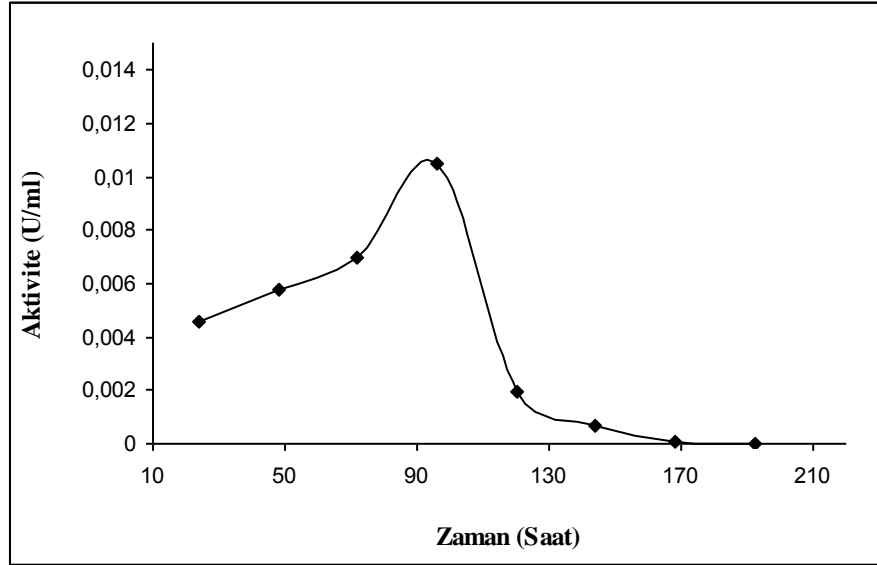


Şekil 4.37. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

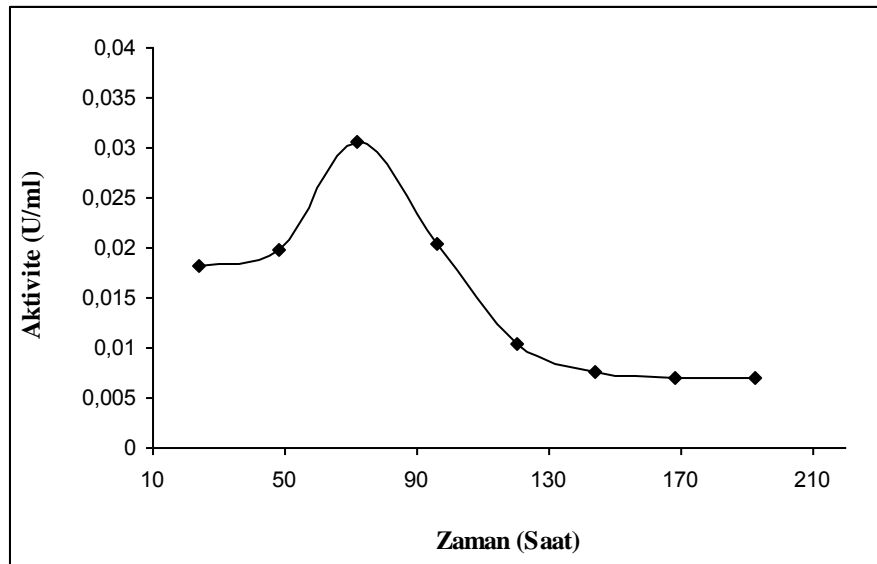


Şekil 4.38. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

Alginate çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatı için immobilizasyon periyodunun en yüksek lipaz aktivitesi 96. Saatinde 0.0105 μmol pNP/dk.ml ve A138 izolatı için 72. Saatte 0.0305 μmol pNP/dk.ml olarak belirlenmiştir.

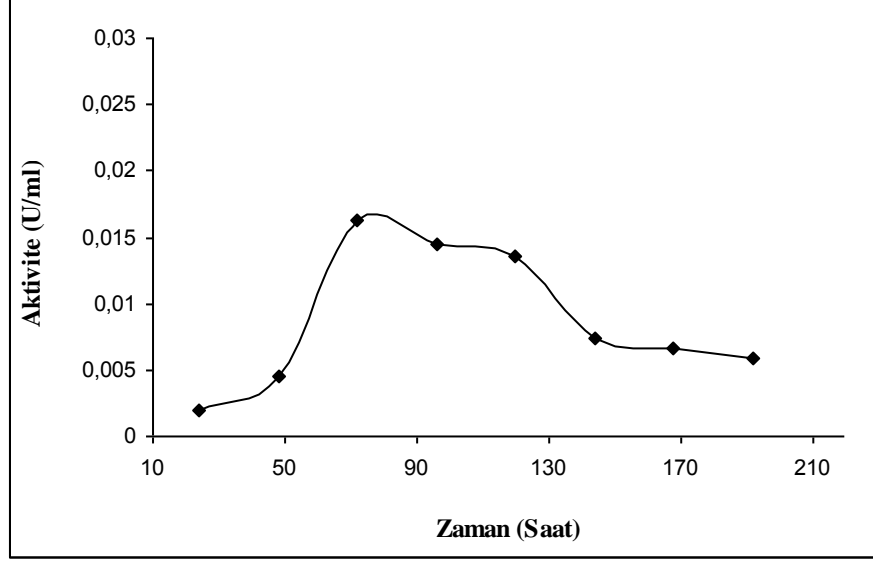


Şekil 4.39. Alginate çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

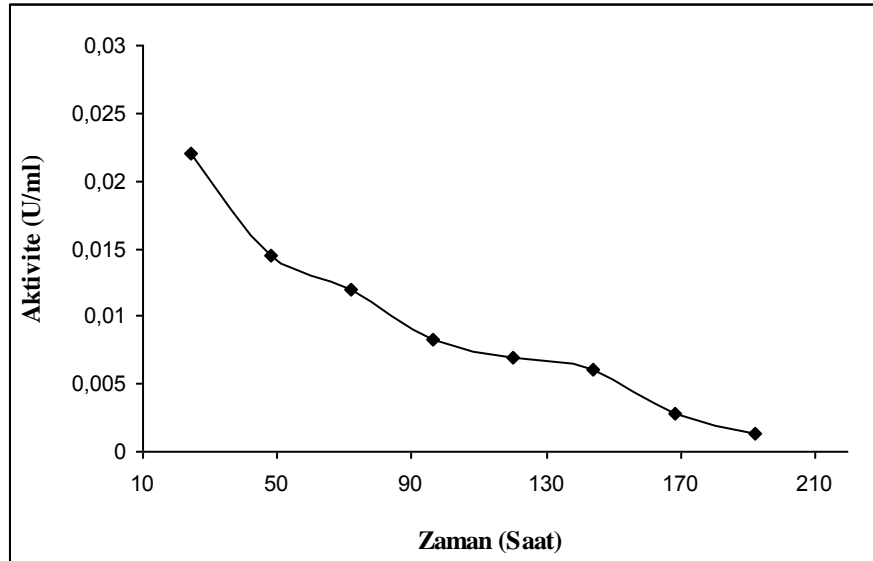


Şekil 4.40. Alginate çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

Kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş B45 izolatının en yüksek lipaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 72. saatinde 0.0162 μmol pNP/dk.ml olarak, A138 izolatı için immobilizasyon periyodunun 24. Saatinde 0.0219 μmol pNP/dk.ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.41. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi



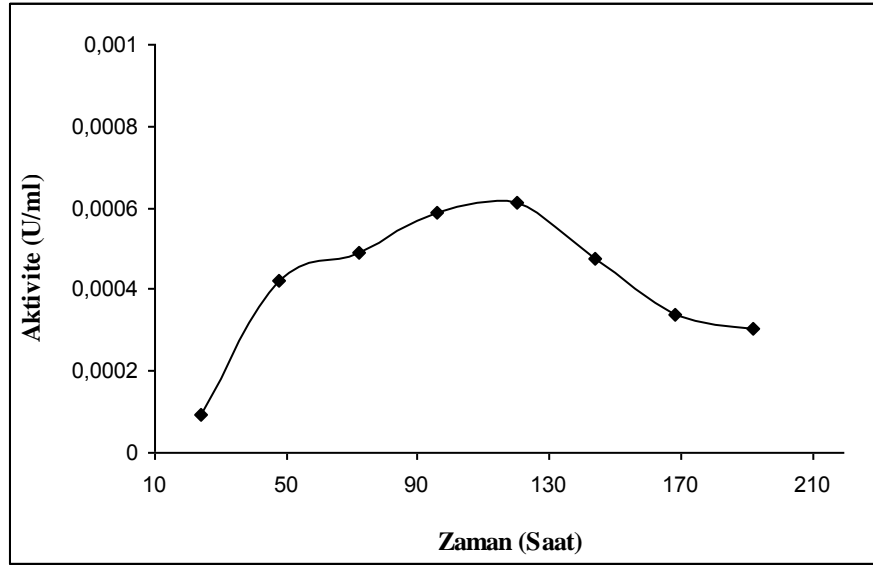
Şekil 4.42. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

4.1.2.8. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Proteaz Aktivitesi Sonuçları

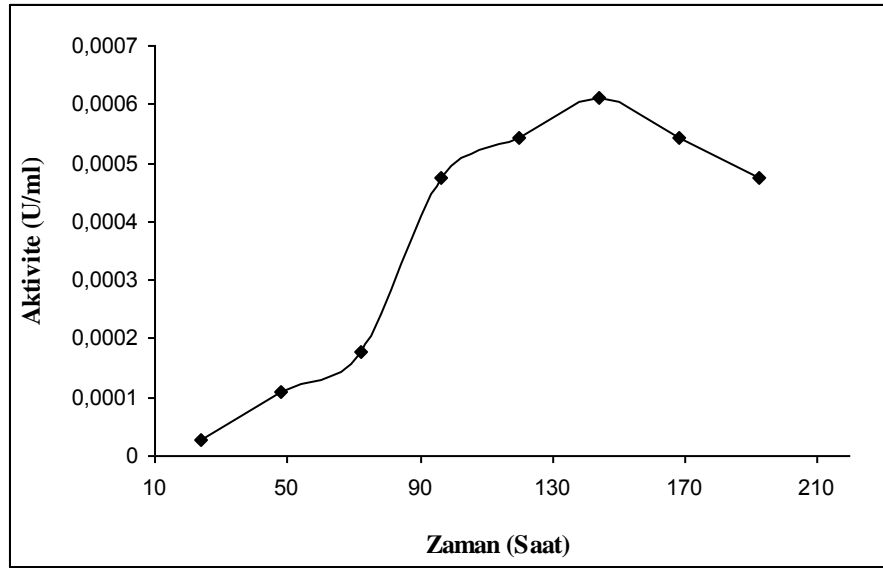
D83A ve B45 izolatlarının aljinat-kitosan, çapraz bağlı-aljinat ve çapraz bağlı-kitosana immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı proteaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.43. - 4.48.'da verilmiştir.

Alginat-kitosana ve alginata çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş D83A izolatının en yüksek proteaz aktivitesi sırasıyla immobilizasyon periyodunun 120. saatinde 0.0006 ve 0.0006 μmol tirozin/dk.ml, kitosana çapraz bağlama yönteminde ise 144. saatte 0.0009 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

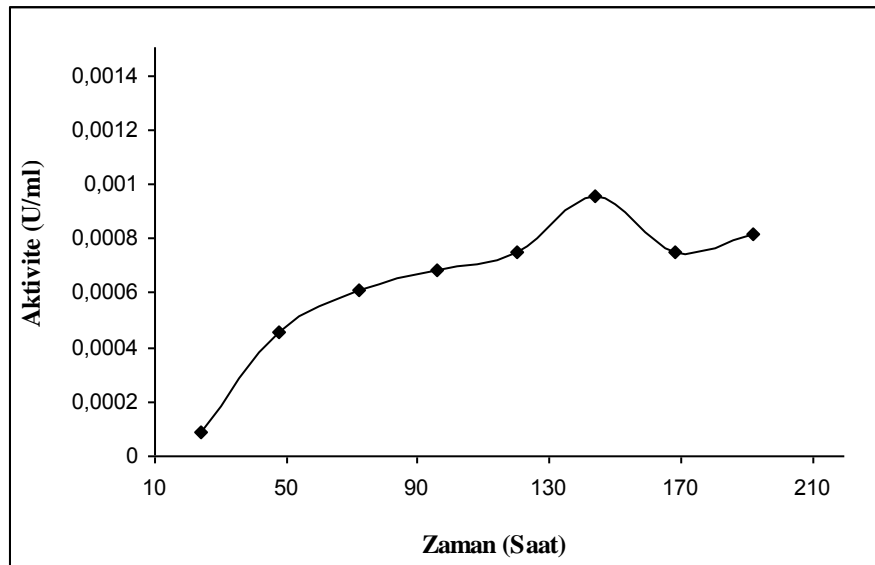
Alginat-kitosan, alginata ve kitosana çapraz bağlama yöntemleriyle immobilize edilmiş B45 izolatının en yüksek proteaz aktivitesi sırayla immobilizasyon periyodunun 168. Saatinde 0.0005, 0.0014, 0.0016 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.



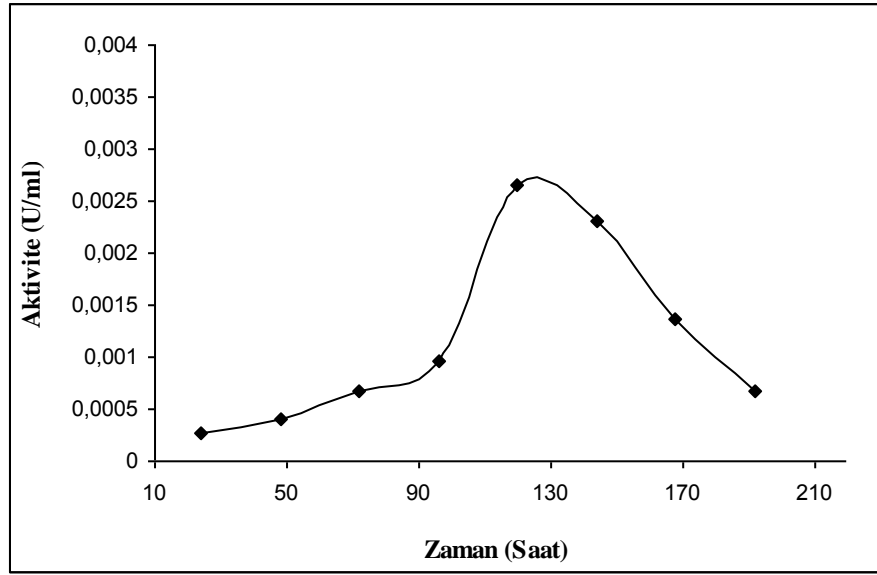
Şekil 4.43. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



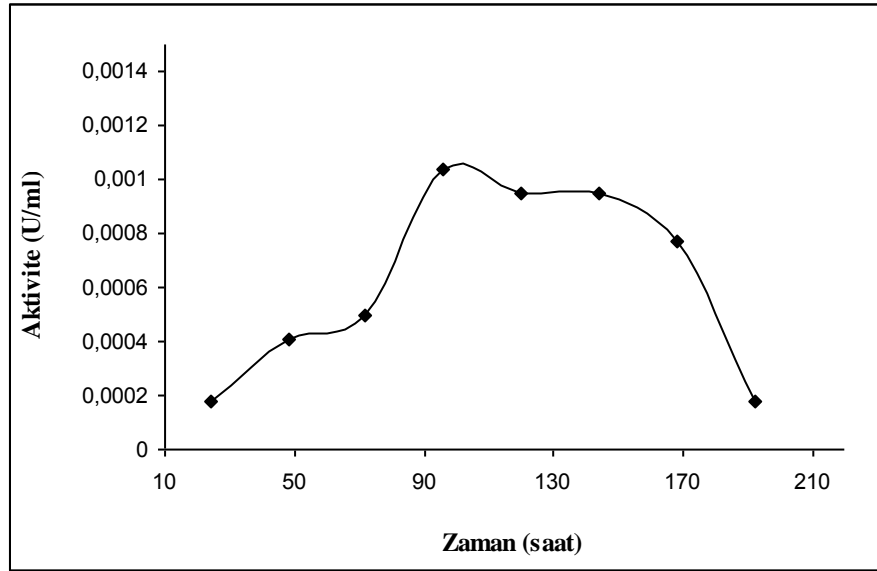
Şekil 4.44. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



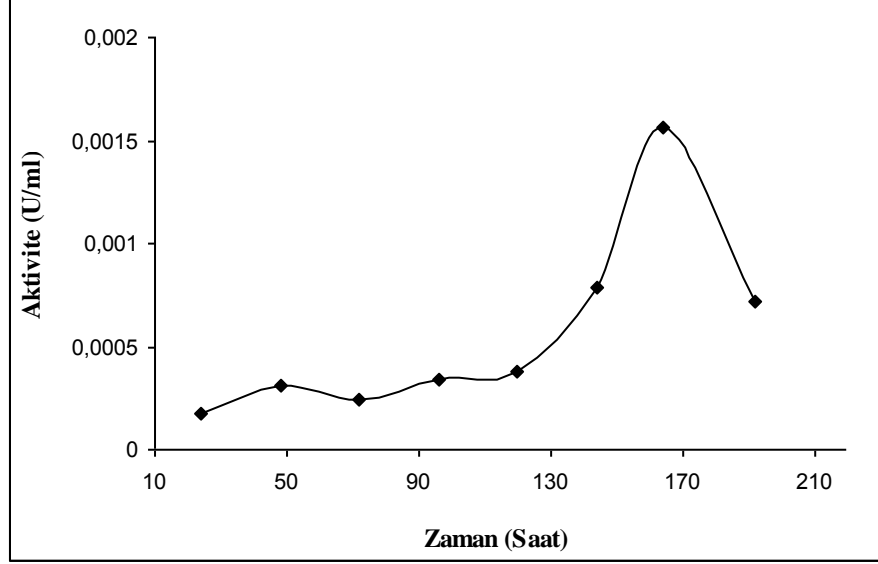
Şekil 4.45. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



Şekil 4.46. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



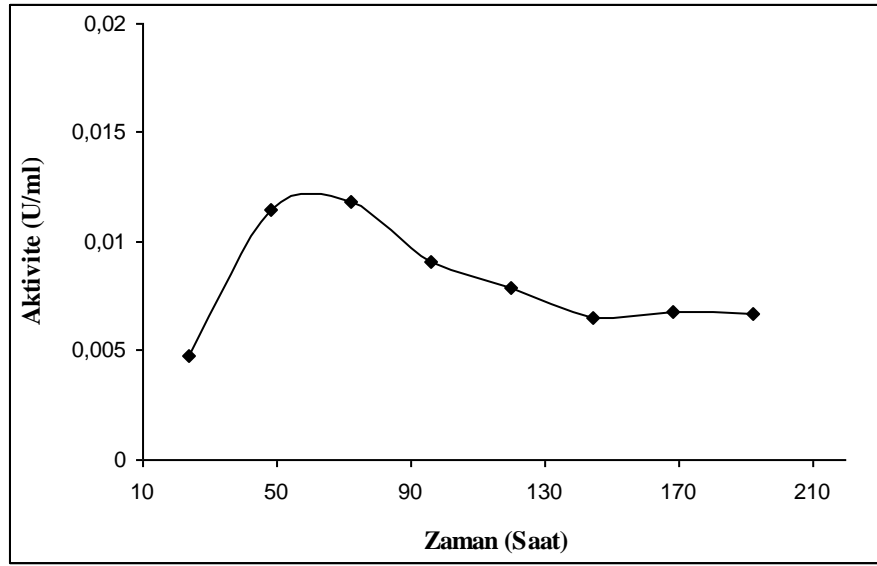
Şekil 4.47. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi



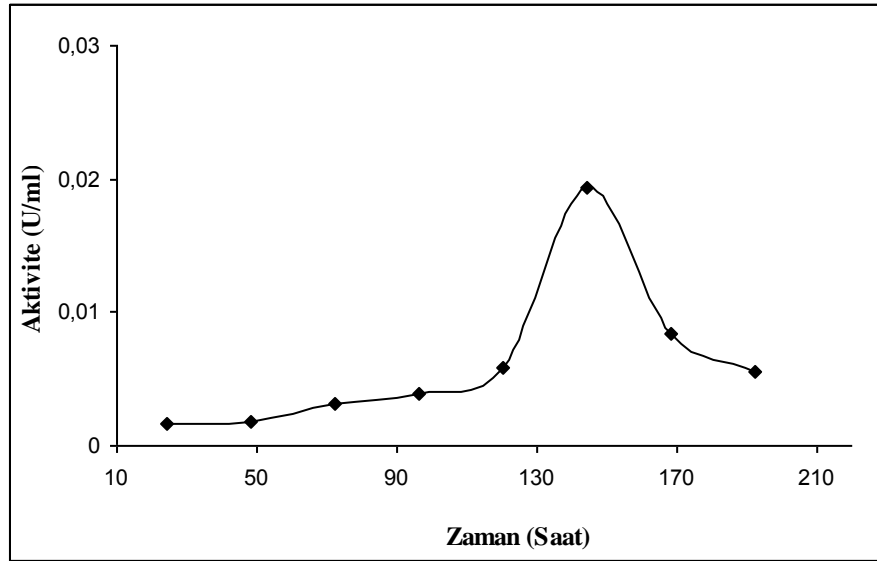
Şekil 4.48. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

4.1.2.9. Çapraz Bağlama Yöntemiyle İmmobilize Edilmiş Hücrelerde Amilaz Aktivitesi Sonuçları

A235 ve SD23 izolatlarının aljinat-kitosan, çapraz bağlı-aljinat ve çapraz bağlı-kitosana immobilize edilmiş hücrelerinin zamana bağlı amilaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.49. - 4.54.'de verilmiştir. Alginat-kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatının en yüksek amilaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 72. saatinde 0,0119 μmol glukoz/dk.ml olarak, SD23 izolatı için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0,0059 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.

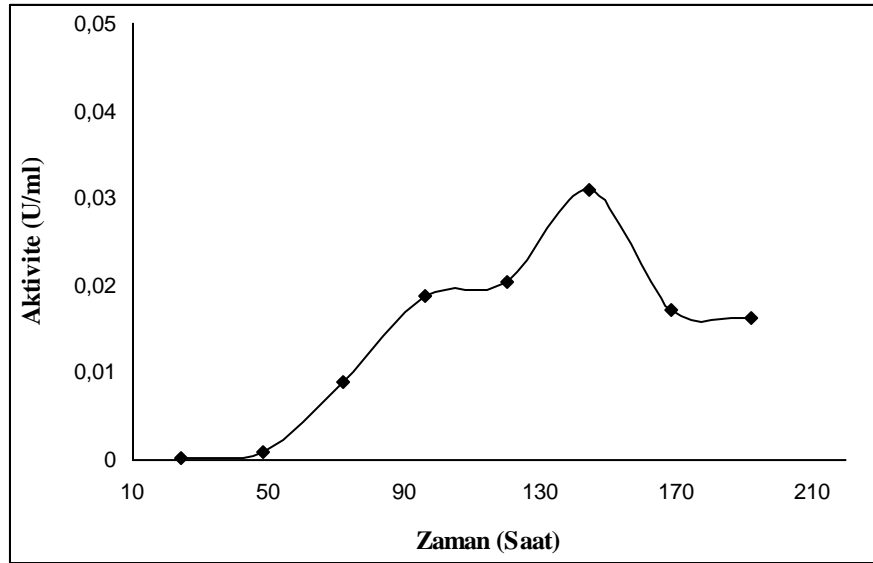


Şekil 4.49. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

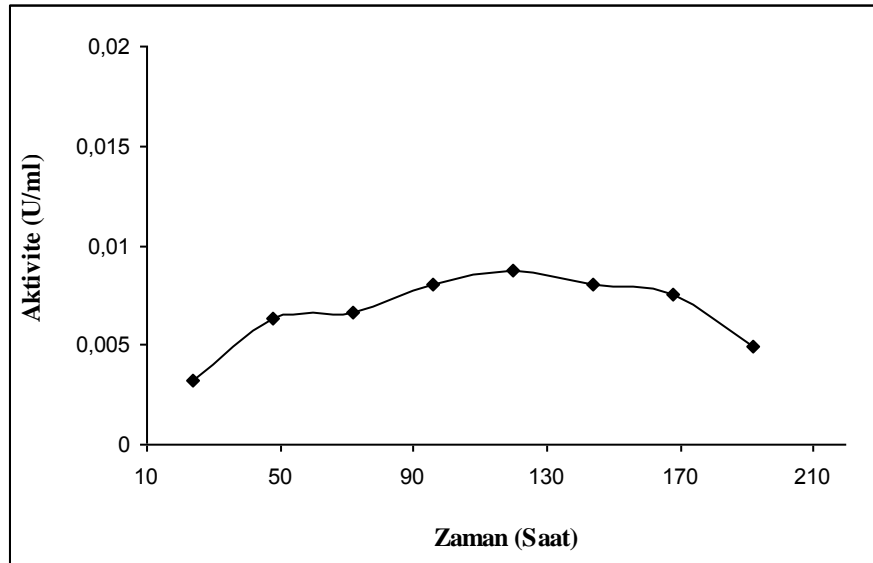


Şekil 4.50. Aljinat-kitosana immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

Alginate çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatı için immobilizasyon periyodunun en yüksek amilaz aktivitesi 144. saatinde 0,0310 μmol glukoz/dk.ml ve SD23 izolatı için 120. saatte 0,0088 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.

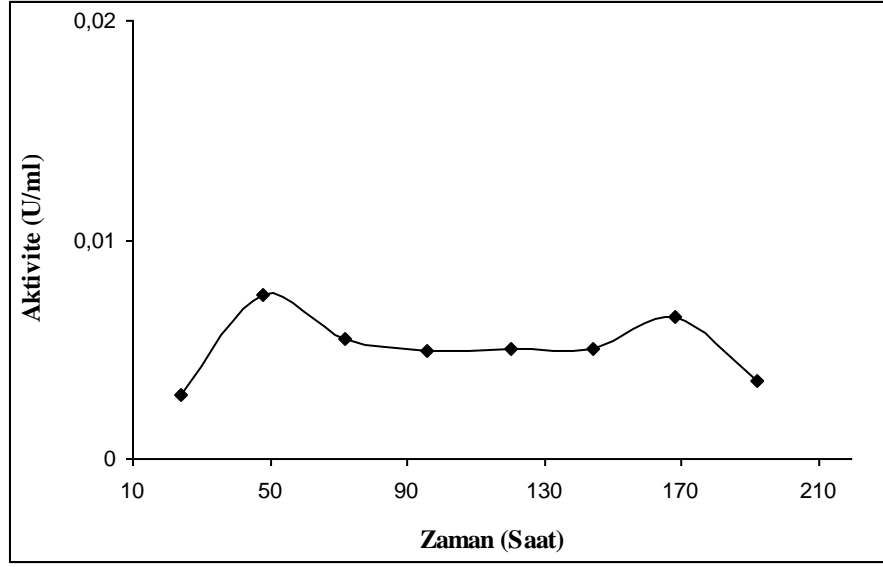


Şekil 4.51. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

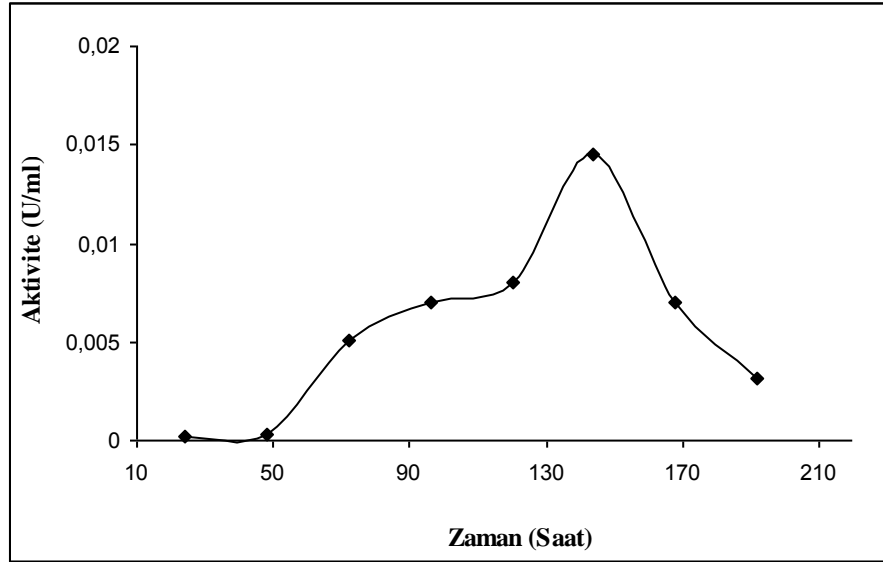


Şekil 4.52. Alginata çapraz bağlanarak immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

Kitosana çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş A235 izolatının en yüksek amilaz aktivitesi immobilizasyon periyodunun 48. saatinde 0,0075 μmol glukoz/dk.ml olarak, SD23 izolatı için immobilizasyon periyodunun 144. saatinde 0,0145 μmol pNP/dk.ml olarak belirlenmiştir.



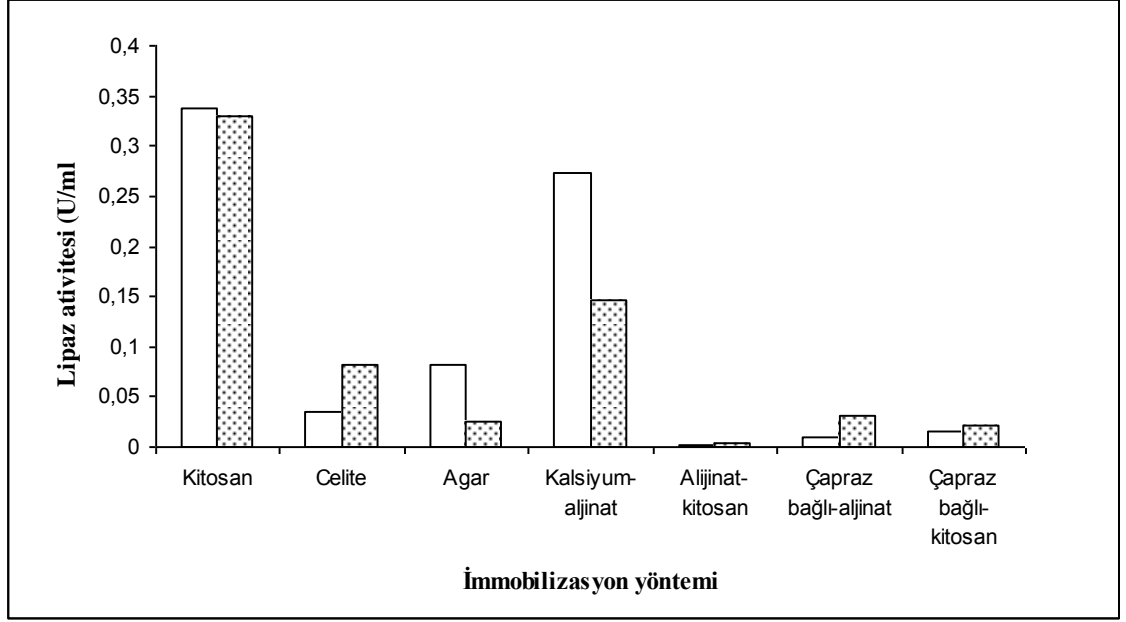
Şekil 4.53. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi



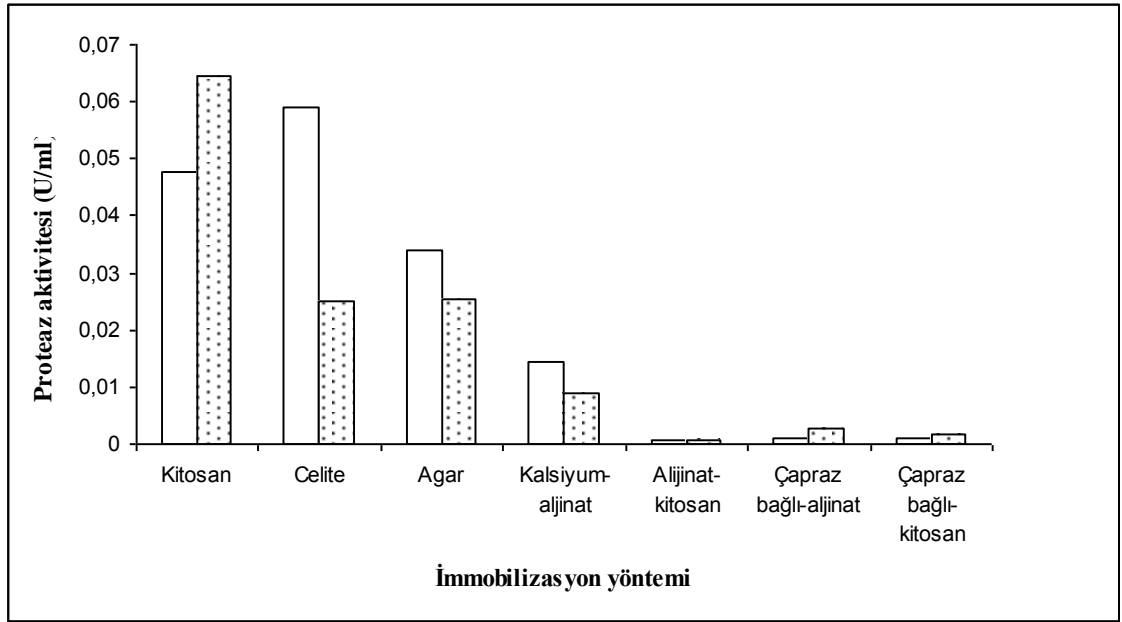
Şekil 4.54. Kitosana çapraz bağlanarak immobilize edilmiş SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

4.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerine Bağlı Olarak Halofilik Arke İzolatlarının Enzim Aktivite Oranları

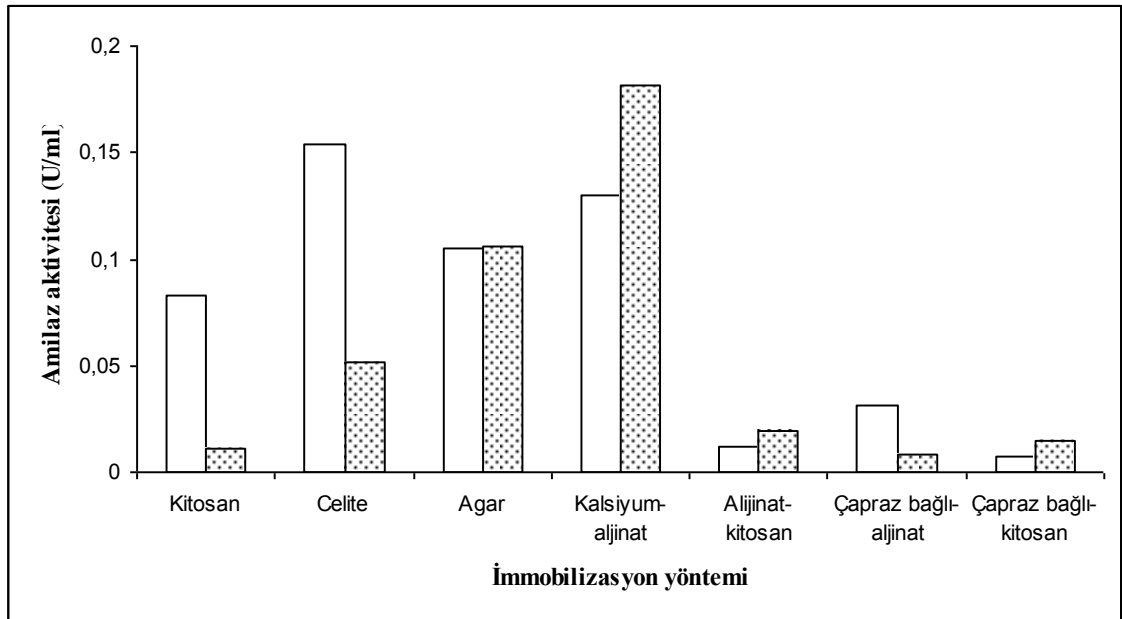
Üç farklı immobilizasyon yöntemi ve yedi farklı destek materyali kullanılarak immobilize edilen halofilik arke hücrelerinin immobilizasyon yöntemlerine bağlı enzim aktivite oranları Şekil 4.55.- 4.57.'de verilmiştir.



Şekil 4.55. B45 ve A138 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş lipaz aktivitesi oranları (□, B45; ▨, A138)



Şekil 4.56. D83A ve B45 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş proteaz aktivitesi oranları (□, D83A; ▨, B45)



Şekil 4.57. A235 ve SD23 izolatlarının farklı destek materyallerine immobilizasyonu sonucu belirlenmiş amilaz aktivitesi oranları (□, A235; ▨, SD23)

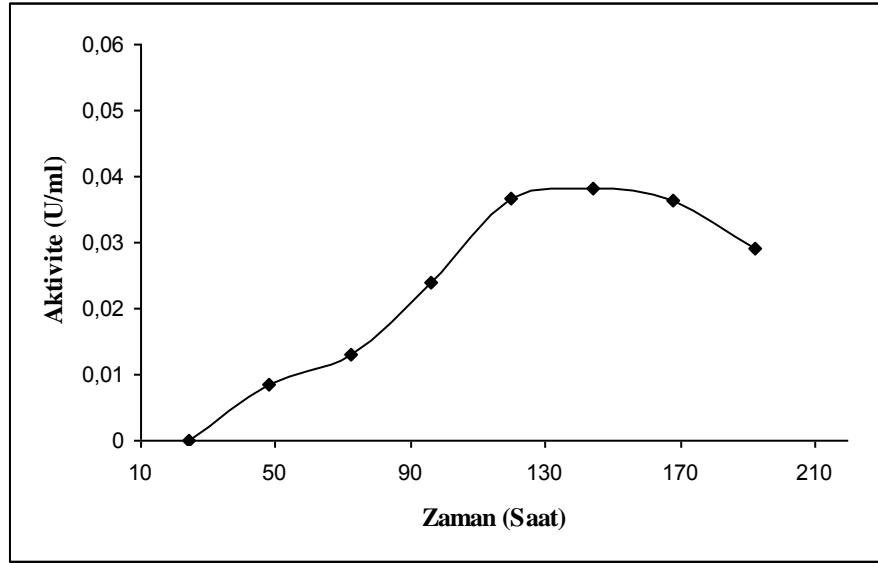
B45 ve A138 izolatları için en yüksek lipaz aktivitesi kitosana adsorpsiyonla immobilizasyon yönteminde elde edilmiştir. En yüksek proteaz aktivitelerinin elde

edildiği immobilizasyon yöntemi D83 izolatu için celite 281'e adsorpsiyon ve B45 izolatu için kitosana adsorpsiyon olmuştur. A235 izolatu için en yüksek amilaz aktivitesini celite 281'e adsorpsiyon ile gözlenirken SD23 izolatında ise kalsiyum alginata hapsedilmesiyle yapılan immobilizasyon yönteminde gözlenmiştir.

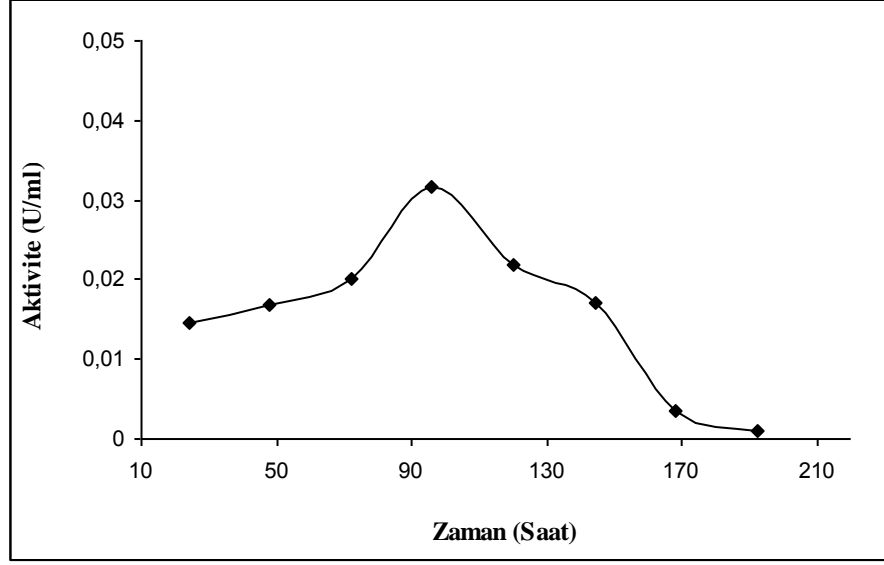
4.1.4. Serbest Hücrelerde İnkübasyon Zamanına Bağlı Enzim Aktiviteleri

İmmobilize edilmemiş halofilik arke hücrelerinin zamana bağlı lipaz, proteaz ve amilaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.58. - 4.63.'de verilmiştir.

Serbest B45 izolatının en yüksek lipaz aktivitesi inkübasyon periyodunun 144. saatinde 0.038 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak, A138 izolatu için inkübasyon periyodunun 96. saatinde 0.0316 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

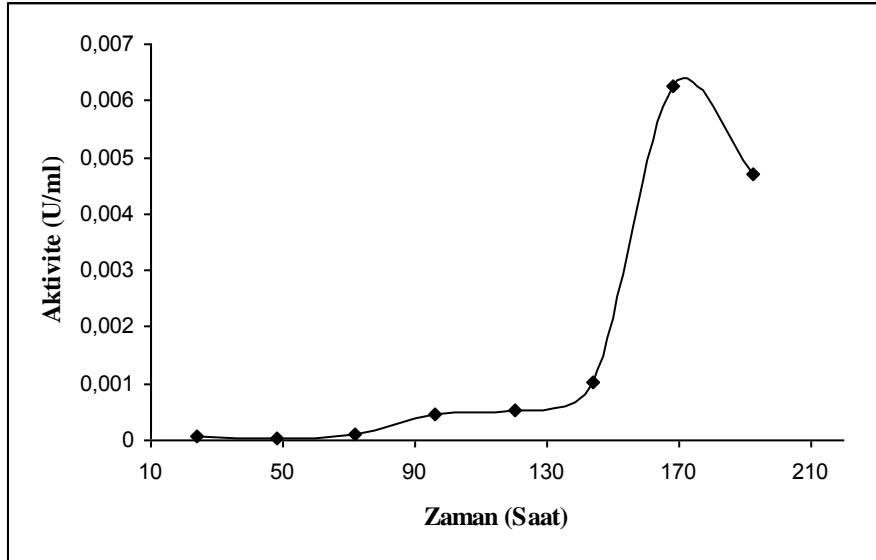


Şekil 4.58. Serbest B45 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

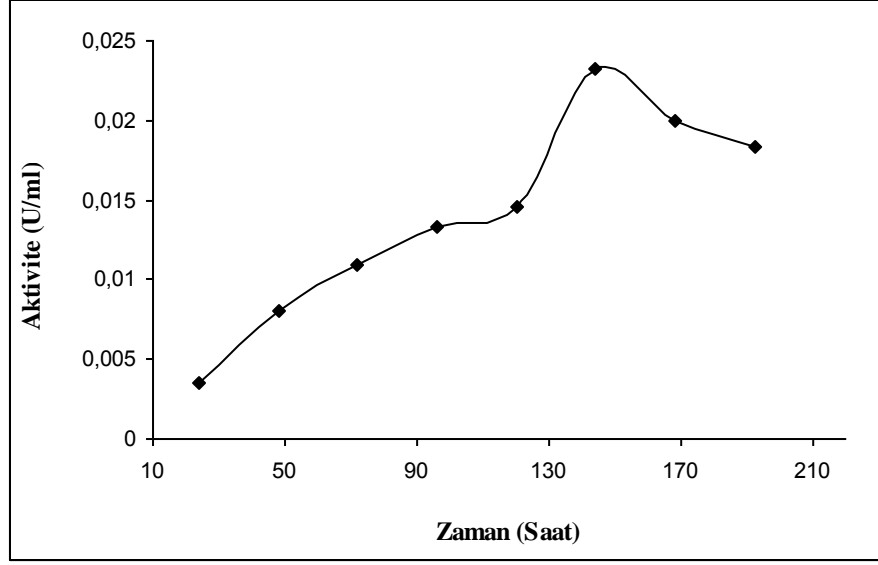


Şekil 4.59. Serbest A138 izolatının pNPB hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı lipaz aktivitesi

Serbest D83A izolatının en yüksek proteaz aktivitesi inkübasyon periyodunun 168. saatinde 0.0063 μmol tirozin/dk.ml olarak, B45 izolatı için inkübasyon periyodunun 168. saatinde 0.0233 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

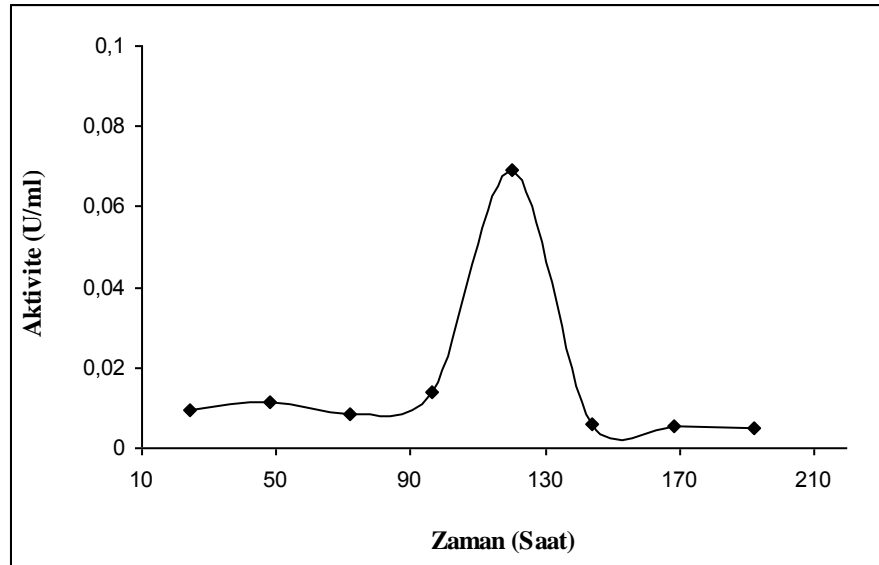


Şekil 4.60. Serbest D83A izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

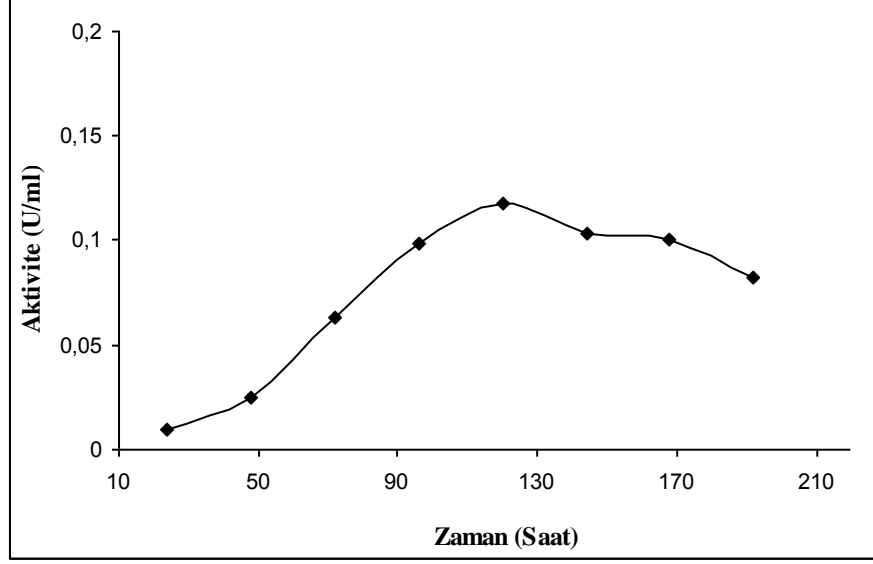


Şekil 4.61. Serbest B45 izolatının kazein hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı proteaz aktivitesi

Serbest A235 izolatının en yüksek amilaz aktivitesi inkübasyon periyodunun 120. saatinde 0,0692 μmol glukoz/dk.ml olarak, SD23 izolatı için inkübasyon periyodunun 120. saatinde 0,1175 μmol glukoz/dk.ml olarak belirlenmiştir.



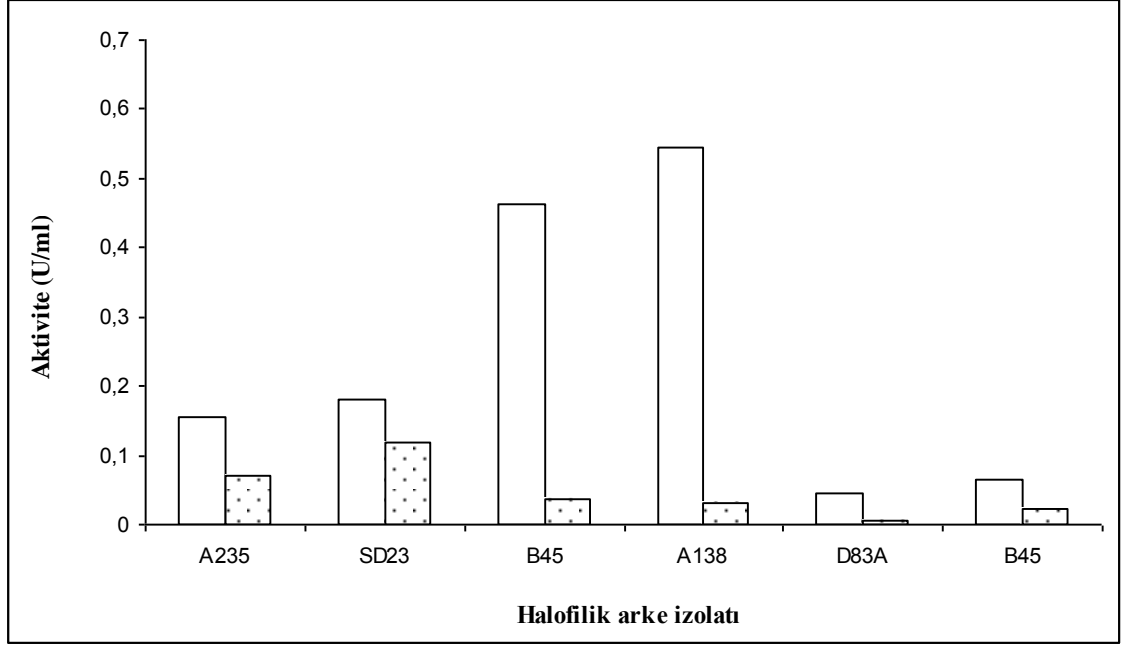
Şekil 4.62. Serbest A235 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi



Şekil 4.63. Serbest SD23 izolatının nişasta hidrolizine göre belirlenen zamana bağlı amilaz aktivitesi

4.1.5. İmmobilize ve Serbest Hücrelerde Hidrolitik Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması

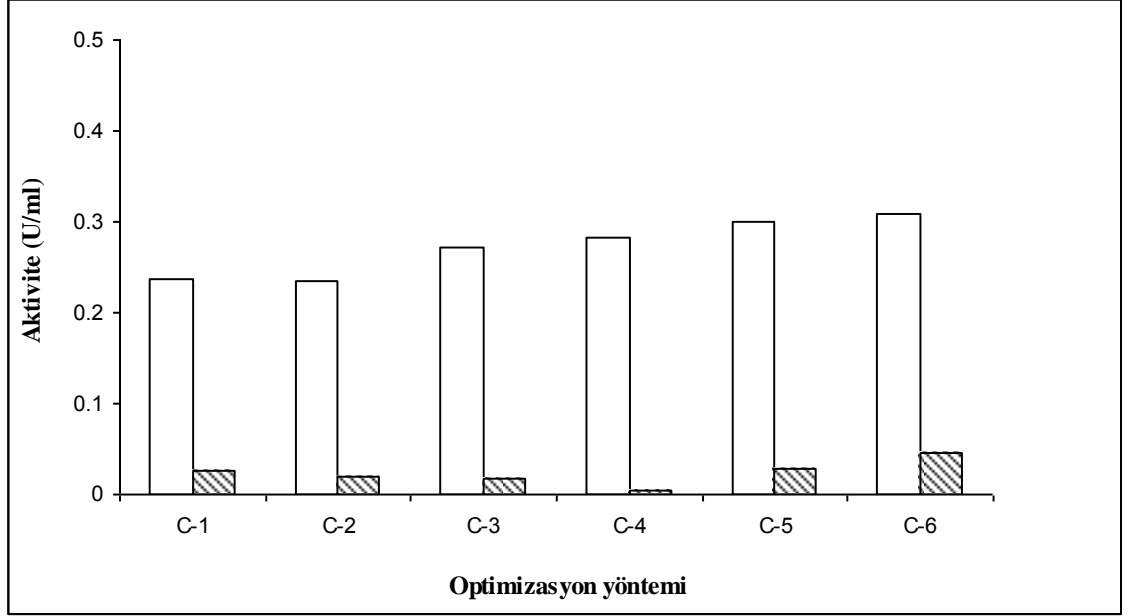
Hücre immobilizasyonu ile serbest hücrelerin hidrolitik enzim aktivitelerinin karşılaştırılması sonucunda, immobilize hücrelerde ölçülen amilaz, proteaz ve lipaz enzim aktivitelerinin serbest hücrelere oranla oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.64.).



Şekil 4.64. İmmobilize ve serbest hücrelerin hidrolitik enzim aktivitesi yönünden karşılaştırılması (□, İmmobilize edilmiş hücre; ▣, Serbest hücre)

4.1.6. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Optimizasyon Sonuçları

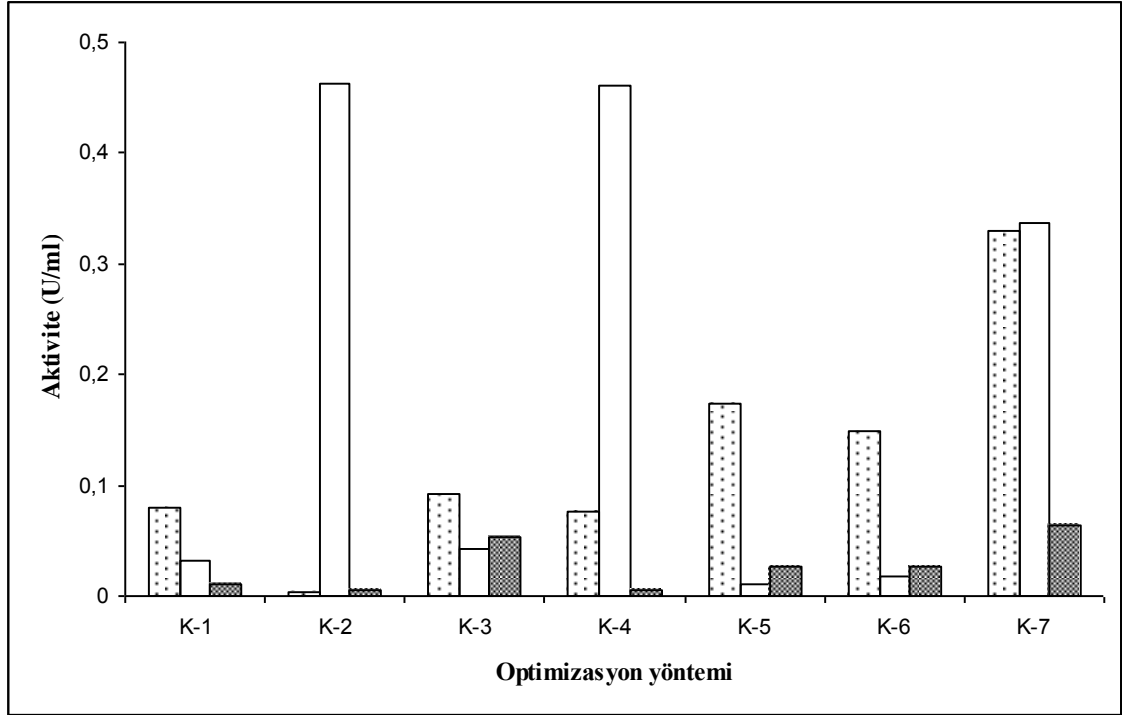
Altı halofilik arke izolatu için en yüksek enzim aktivitesinin sağlandığı immobilizasyon yöntemi ve immobilizasyon periyodu belirlendikten sonra, her bir izolat için en yüksek enzim aktivitesinin belirlendiği optimum immobilizasyon yöntemi koşulları saptanmıştır (Şekil 4.65. – 4.67.). Standart yöntem ve modifiye yöntemlerle Celite 281'e immobilize edilmiş D83A ve A235 izolatları için en yüksek proteaz ve amilaz aktivitesi sonuçları sırasıyla 0.0458 μmol tirozin/dk.ml, 0,154 μmol glukoz/dk.ml olmak üzere standart yöntemde gözlenmiştir.



Şekil 4.65. Celite 281'e farklı yöntemlerle immobilize edilmiş D83A izolatının proteaz ve A235 izolatının amilaz aktivitesi (□, A235; ▨, D83A)

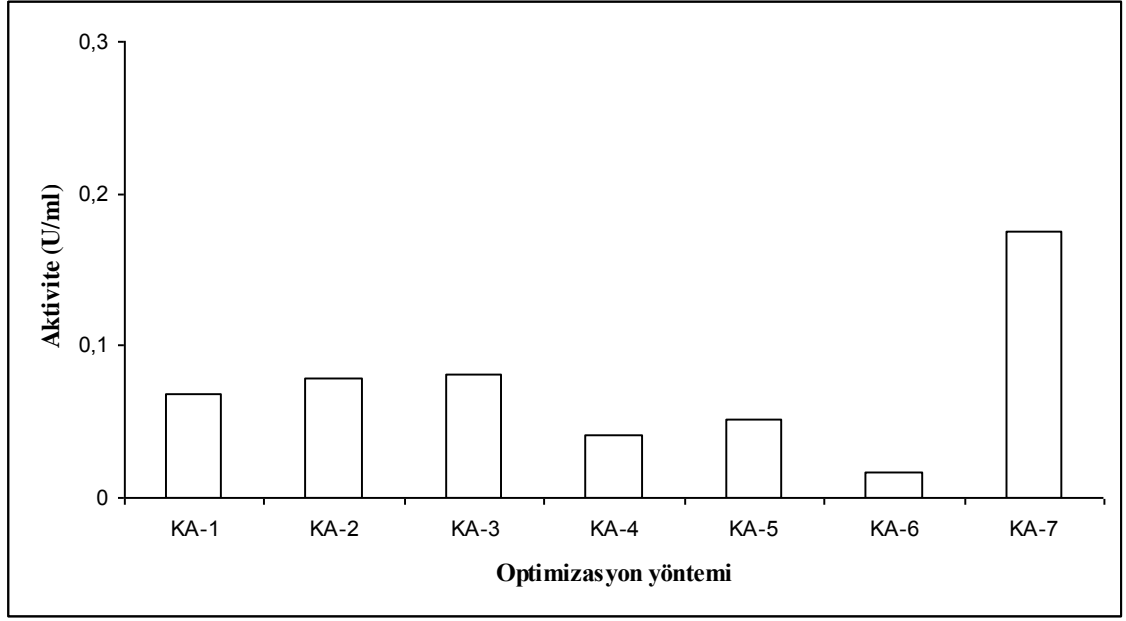
C-1: yıkama işlemi yapılmamış Celite 281'le immobilizasyon; C-2: etanolla yıkanmış ve 48 saat %10'luk nitrik asitte bekletilmiş Celite 281'le immobilizasyon; C-3: etanolla yıkanmış ve 24 saat %20'luk nitrik asitte bekletilmiş Celite 281'le immobilizasyon; C-4: etanolla yıkanmış ve 48 saat 1M hidroflorik asitte bekletilmiş Celite 281'le immobilizasyon; C-5: hücre peleti ve Celite 281 karışımı +4 °C'de 24 saat bekletilerek immobilizasyon; C-6: standart yöntem

Standart ve modifiye yöntemlerle kitosana immobilize edilmiş B45 izolatı için en yüksek lipaz aktivitesi 0.462 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak hekzanla muamele edilmiş %2'lik asetik asitli kitosanda, A138 izolatında en yüksek lipaz aktivitesi 0.329 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak standart yöntemde belirlenmiştir. B45 izolatında en yüksek proteaz aktivitesi ise 0.0647 $\mu\text{mol tirozin/dk.ml}$ olarak standart yöntemde belirlenmiştir.



Şekil 4.66. Kitosana farklı yöntemlerle immobilize edilmiş A138 izolatının lipaz, B45 izolatının lipaz ve B45 izolatının proteaz aktivitesi (▨, A138 lipaz; □, B45 lipaz; ▩, B45 proteaz)

K-1: Hekzanla muamele edilmiş kitosan ile hücre süspansiyonu karışımı +4 °C'de inkübe edilmeden; K-2: %2'lik asetik asitte doksan dakika çözdürüldükten sonra %5'lik NaOH ile PH 6-6,5'a ayarlanmış kitosan; K-3: hekzanla muamele edilmemiş kitosan; K-4: hekzanla muamele edilmiş ve %2'lik asetik asitte doksan dakika çözdürüldükten sonra %5'lik NaOH ile PH 6- 6.5'a ayarlanmış kitosan; K-5: hekzanla muamele edilmiş ve 20 mM H₂O₂ ile oda ısısında inkübe edilmiş kitosan; K-6: 20 mM H₂O₂ ile oda ısısında inkübe edilmiş kitosan; K-7: standart yöntem



Şekil 4.67. Kalsiyum alginata farklı yöntemlerle immobilize edilmiş SD23 izolatının amilaz aktivitesi

KA-1: % 2'lik alginat; KA-2: % 3'lük alginat; KA-3: % 4'lük alginat; KA-4: 0,15 M CaCl₂; KA-5: 0,3 M CaCl₂; KA-6: 0,6 M CaCl₂; KA-7: standart yöntem

Standart ve modifiye yöntemlerle kalsiyum alginata immobilize edilmiş SD23 izolatı için en yüksek amilaz aktivitesi 0.3495 μ mol glukoz/dk.ml olarak standart yöntemde gözlenmiştir.

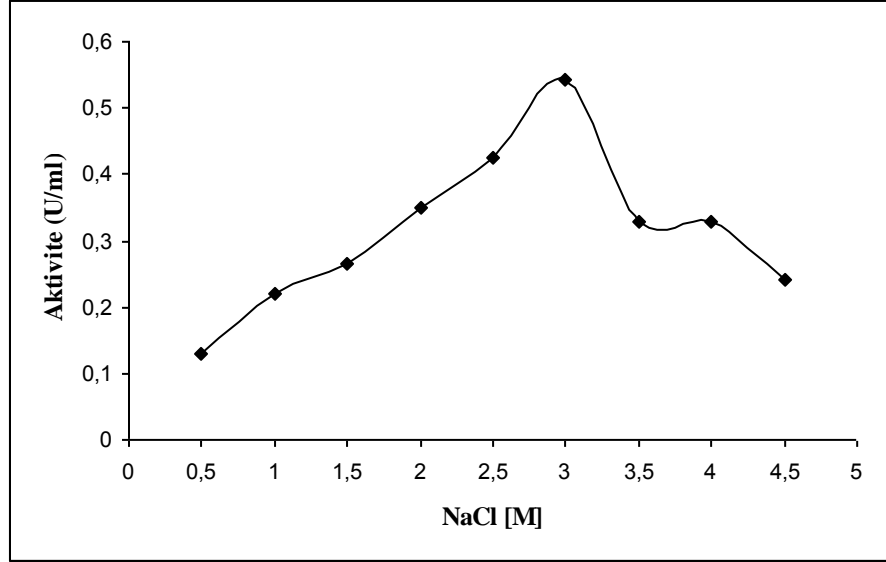
4.1.7. Ortam Koşullarının Optimizasyon Sonuçları

Altı halofilik arke izolatı için en yüksek enzim aktivitesinin sağlandığı optimum immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra, her bir izolat için en yüksek enzim aktivitesinin belirlendiği ortam koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

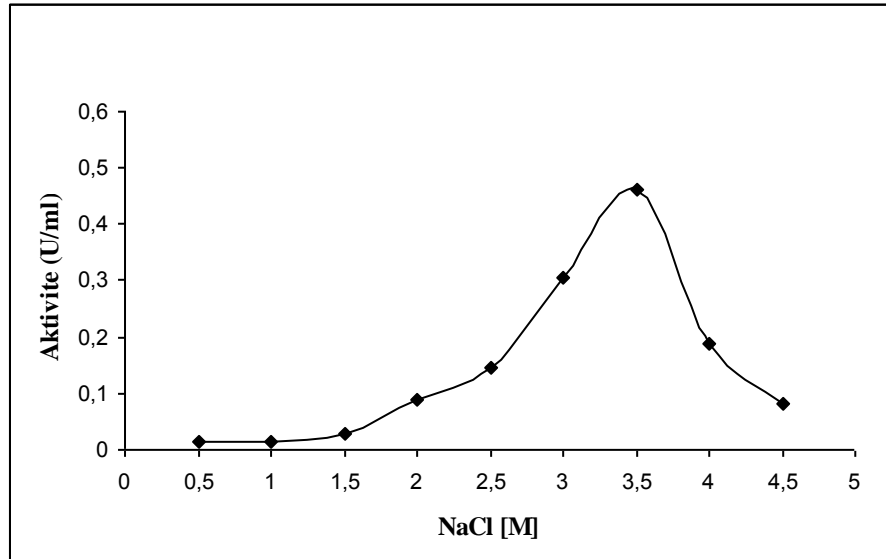
4.1.7.1. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Optimum immobilizasyon yöntemiyle immobilize edilmiş hücrelerin 9 farklı NaCl derişimi içeren ortamda inkübe edilmesiyle belirlenen enzim aktivite sonuçları

Şekil 4.68.- 4.73.'de verilmiştir. Buna göre, B45 ve A138 izolatu için en yüksek lipaz aktivitesi sırasıyla 3,5M tuz derişiminde 0.4619 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$, 3M tuz derişiminde 0.5439 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

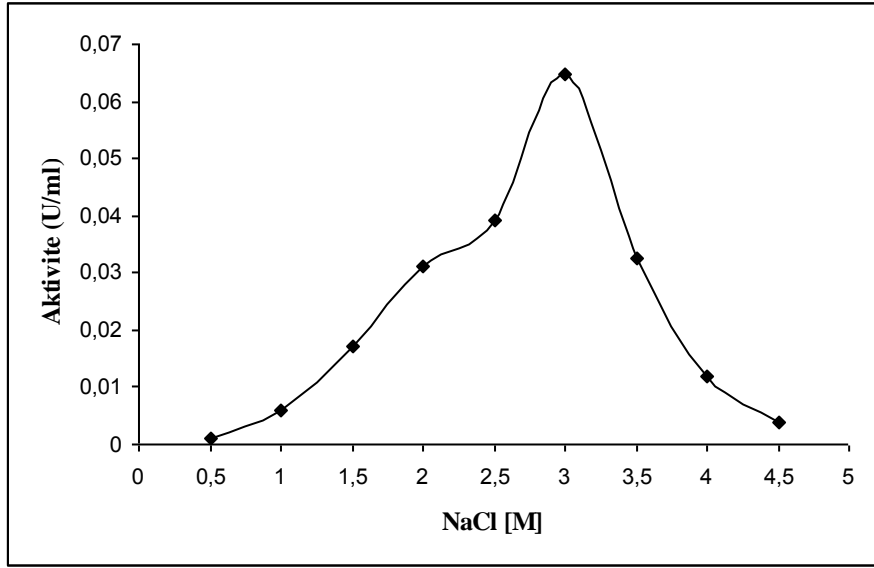


Şekil 4.68. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla tuz derişimine bağı lipaz aktivitesi değişimi

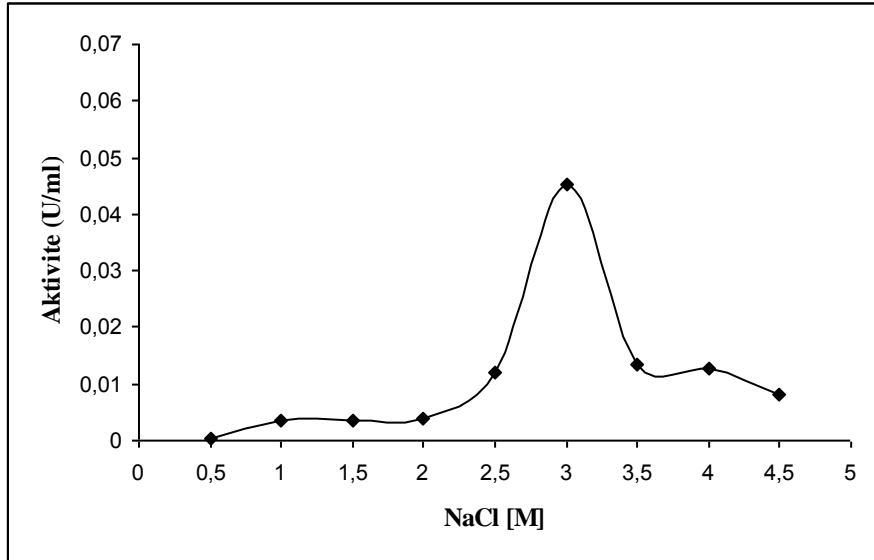


Şekil 4.69. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla tuz derişimine bağı lipaz aktivitesi değişimi

D83A ve B45 izolatu için en yüksek proteaz aktivitesi 3M tuz derişiminde sırasıyla 0.0451 μ mol tirozin/dk.ml, 0.0647 μ mol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

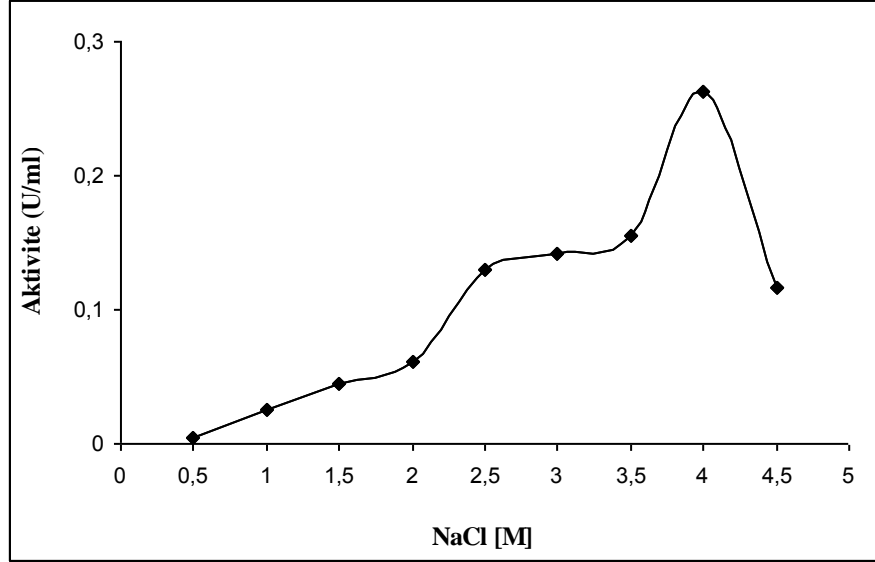


Şekil 4.70. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonuyla tuz derişimine bağı proteaz aktivitesi değişimi

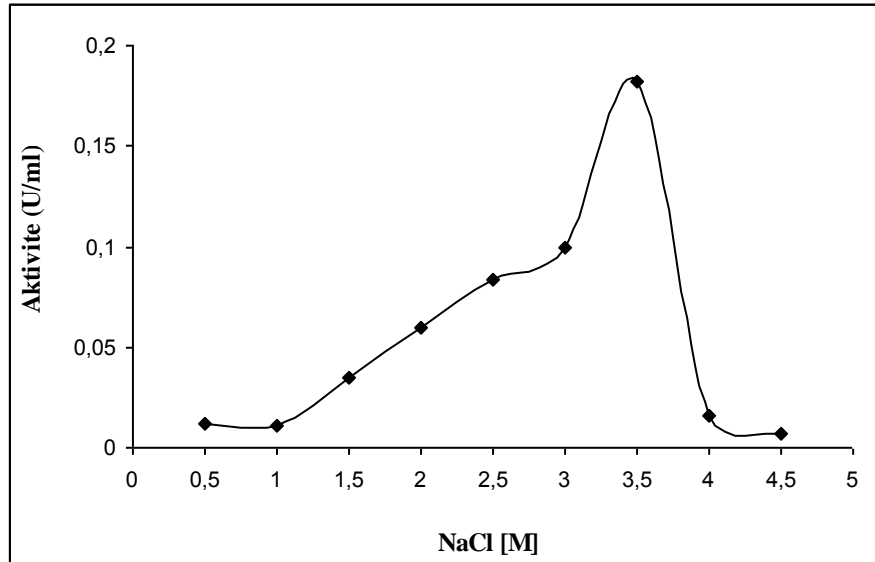


Şekil 4.71. D83A izolatının Celite 281'e immobilizasyonuyla tuz derişimine bağı proteaz aktivitesi değişimi

A235 ve SD23 izolatı için en yüksek amilaz aktivitesi sırasıyla 4M tuz derişiminde 0.2631 μmol glukoz/dk.ml 3,5 M tuz derişiminde 0,1819 μmol glukoz/dk.ml olarak bulunmuştur.



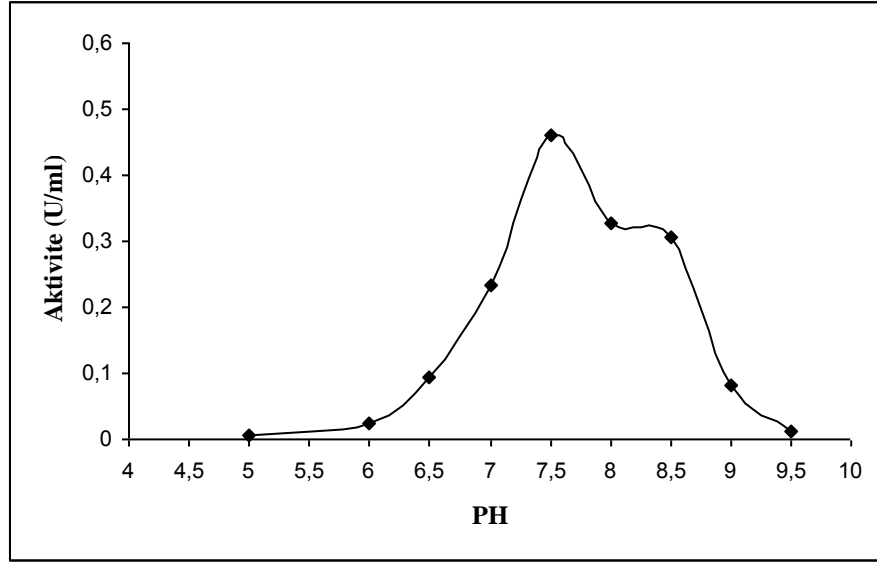
Şekil 4.72. A235 izolatının Celite 281'e immobilizasyonu ile tuz derişimine bağı amilaz aktivitesi değişimi



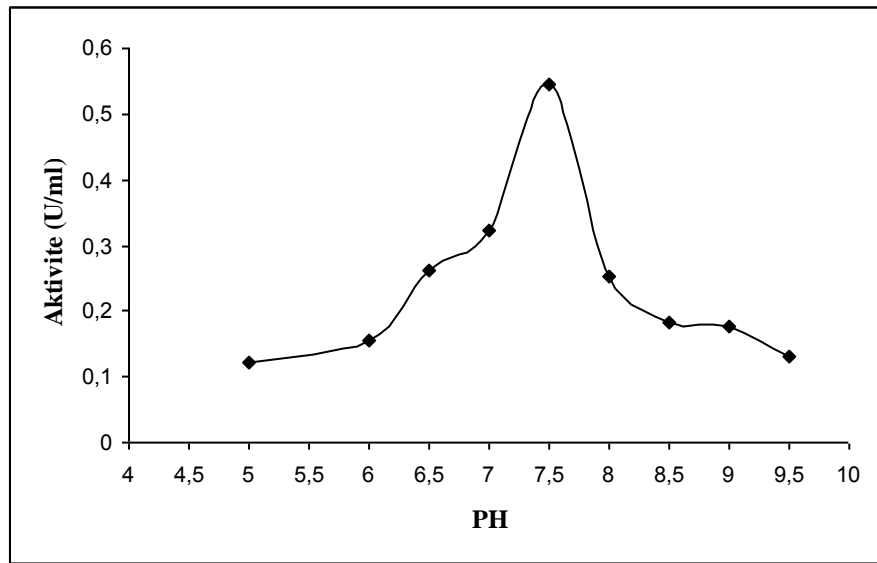
Şekil 4.73. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonu ile tuz derişimine bağı amilaz aktivitesi değişimi

4.1.7.2. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin PH'ya Bağlı Değişimi

Optimum immobilizasyon yöntemiyle immobilize edilmiş ve optimum NaCl konsantrasyonu belirlenmiş 9 farklı pH değeri içeren ortamda inkübe edilmesiyle belirlenen enzim aktivite sonuçları Şekil 4.74.- 4.79.'da verilmiştir. Buna göre, B45 ve A138 izolatu için en yüksek lipaz aktivitesi sırasıyla pH 7.5'da 0.4619 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$, 0.5439 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

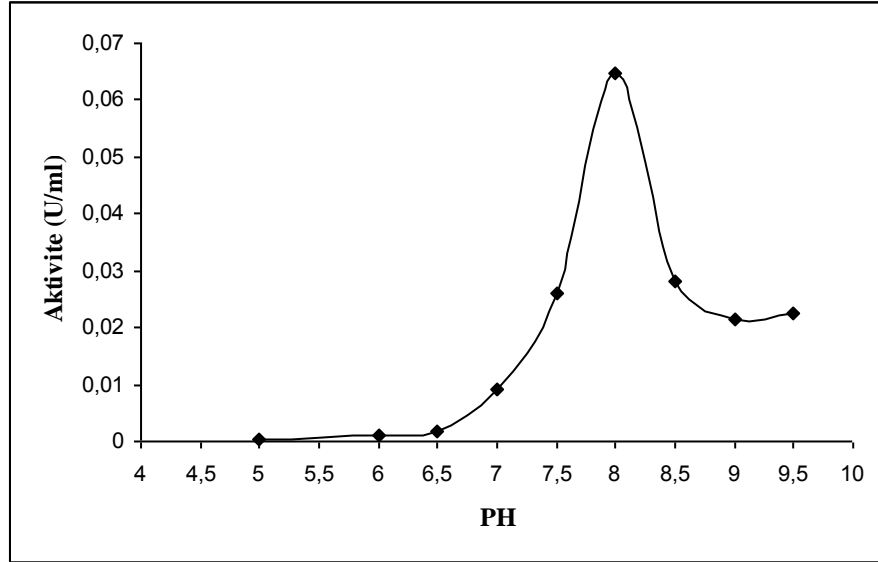


Şekil 4.74. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi

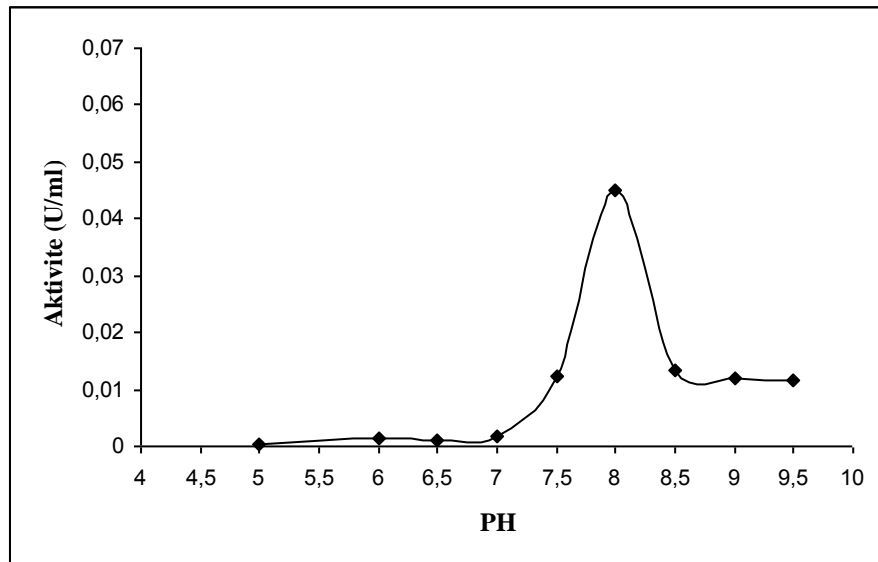


Şekil 4.75. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi

D83A ve B45 izolatı için en yüksek proteaz aktivitesi pH 8'de sırasıyla 0.0451 μmol tirozin/dk.ml, 0.0647 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

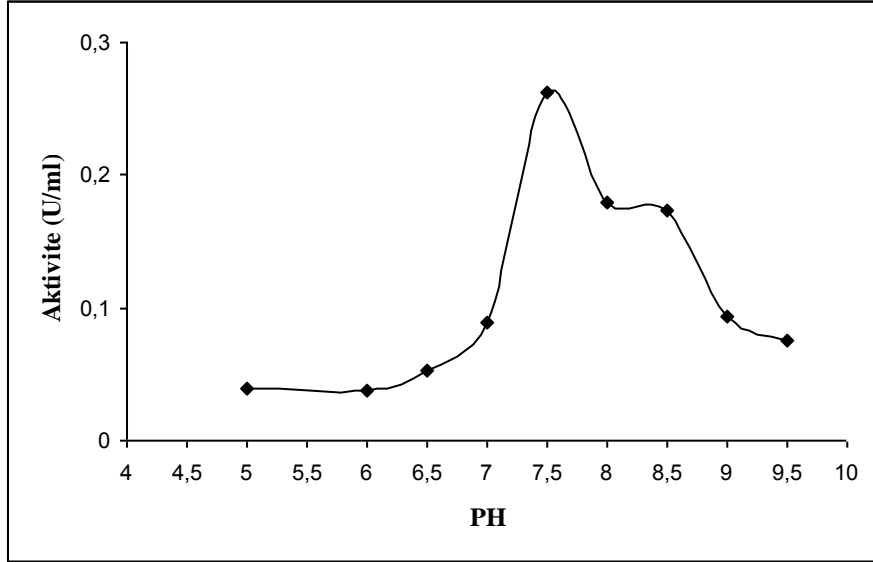


Şekil 4.76. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi

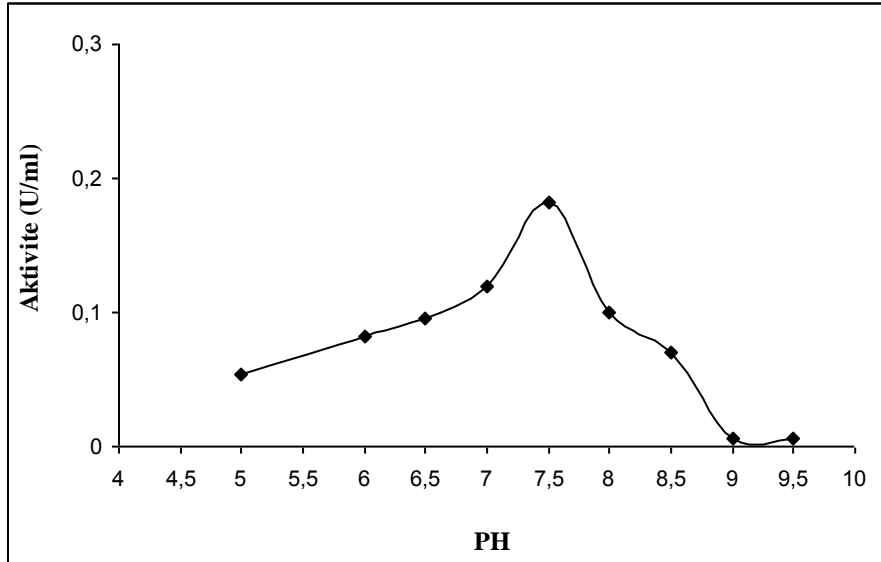


Şekil 4.77. D83A izolatının Celite 281'e immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi

A235 ve SD23 izolatu için en yüksek amilaz aktivitesi pH 7,5’da sırasıyla 0,2631 μmol glukoz/dk.ml 0,1819 μmol glukoz/dk.ml olarak bulunmuştur.



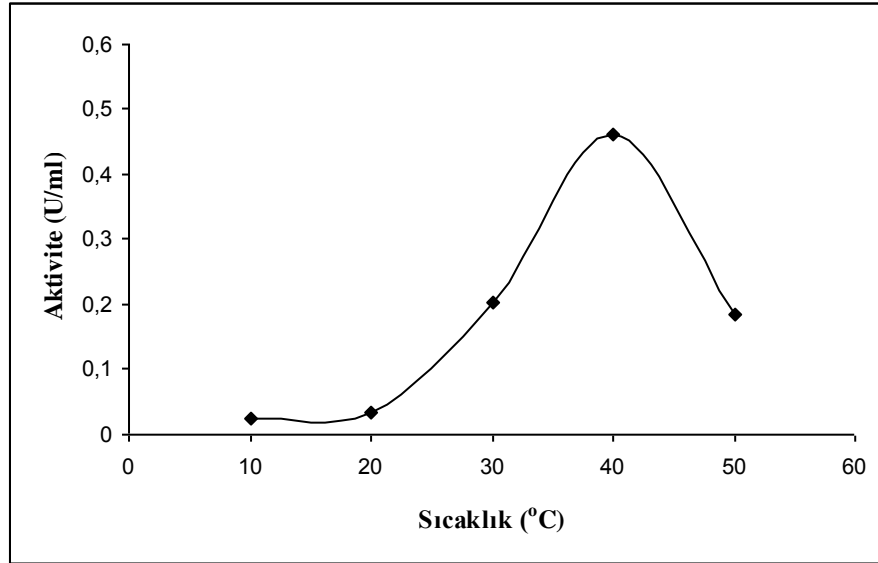
Şekil 4.78. A235 izolatının Celite 281’e immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi



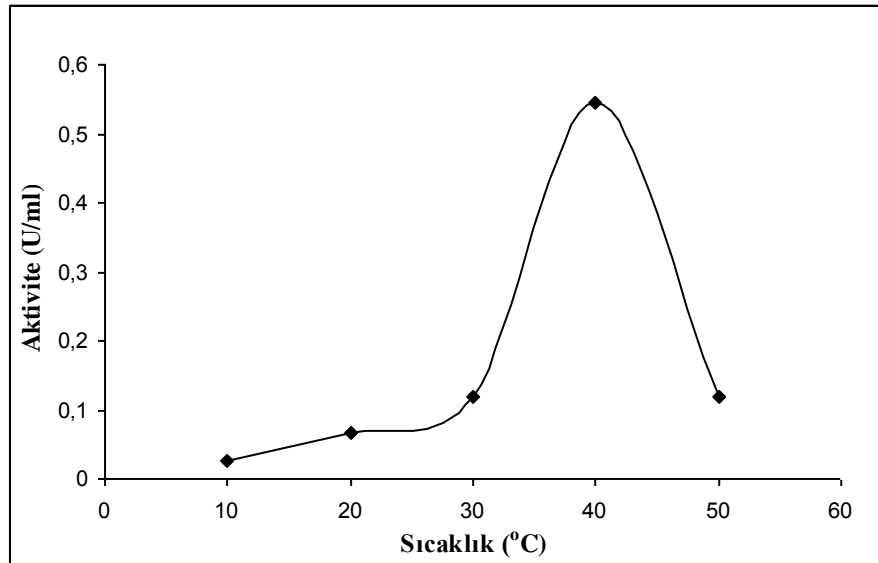
Şekil 4.79. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonu ile pH değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi

4.1.7.3. Lipaz, Proteaz ve Amilaz Aktivitesinin Sıcaklığa Bağlı Değişimi

Optimum immobilizasyon yöntemiyle immobilize edilmiş, optimum NaCl konsantrasyonu ve pH değeri belirlenmiş beş farklı sıcaklık değerinde inkübe edilmesiyle belirlenen enzim aktivite sonuçları Şekil 4.80.- 4.85.'de verilmiştir. Buna göre, B45 ve A138 izolatı için en yüksek lipaz aktivitesi sırasıyla 40°C'de 0.4619 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$, 0.5439 $\mu\text{mol pNP/dk.ml}$ olarak belirlenmiştir.

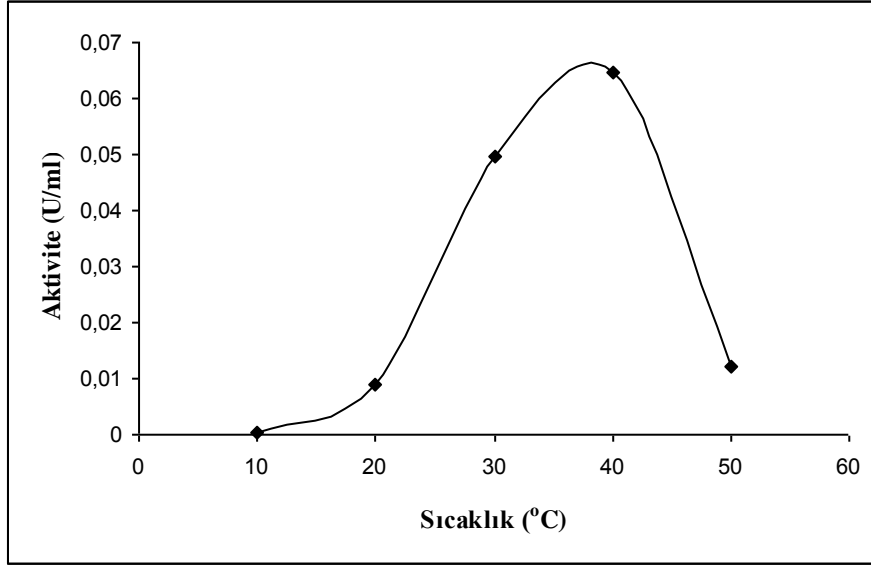


Şekil 4.80. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi

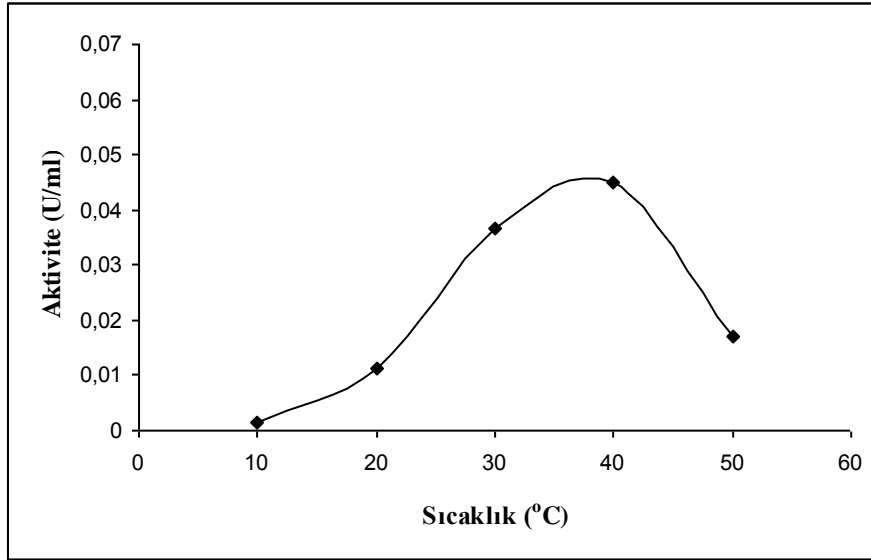


Şekil 4.81. A138 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı lipaz aktivitesi değişimi

D83A ve B45 izolatu için en yüksek proteaz aktivitesi 40°C’de sırasıyla 0.0451 μmol tirozin/dk.ml, 0.0647 μmol tirozin/dk.ml olarak belirlenmiştir.

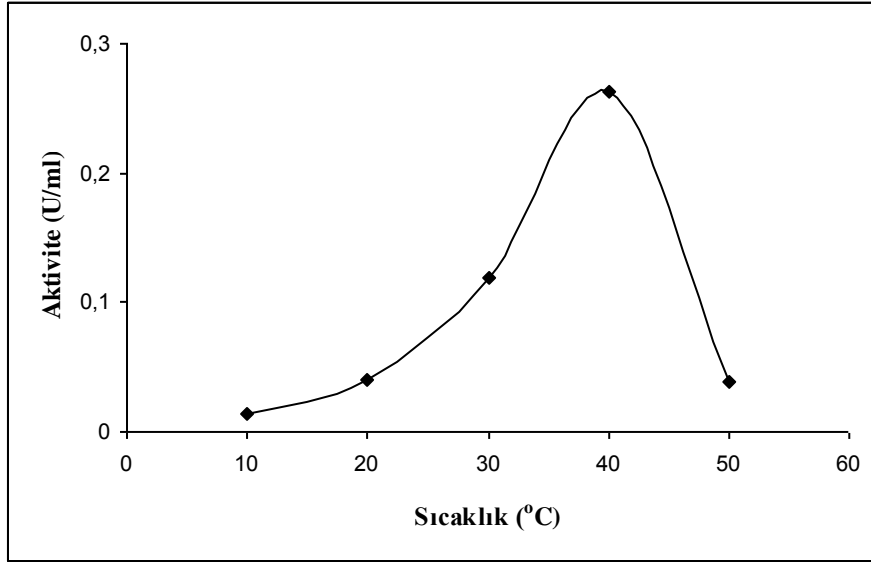


Şekil 4.82. B45 izolatının kitosan desteğine immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi

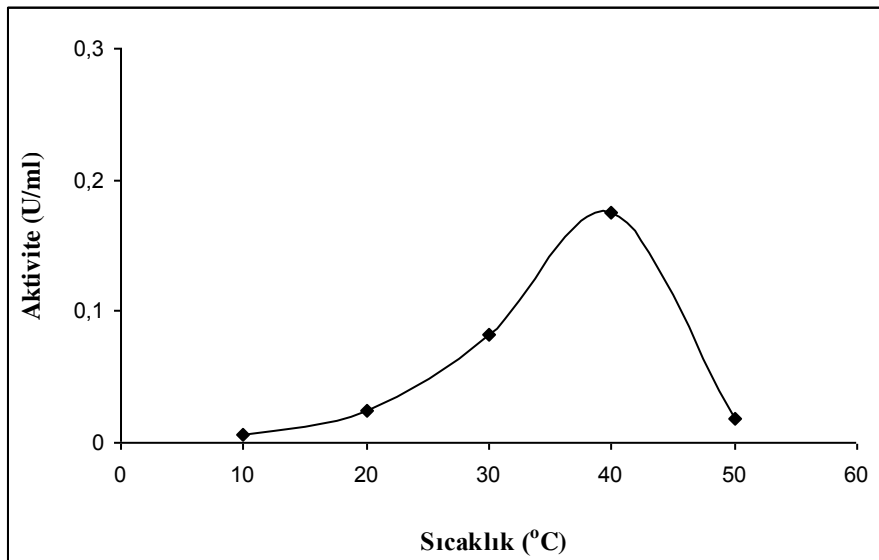


Şekil 4.83. D83A izolatının celite 281’e immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı proteaz aktivitesi değişimi

A235 ve SD23 izolatı için en yüksek amilaz aktivitesi pH 40°C’de sırasıyla 0,2631 μmol glukoz/dk.ml 0,1819 μmol glukoz/dk.ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4.84. A235 izolatının celite 281’e immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi



Şekil 4.85. SD23 izolatının kalsiyum aljinata immobilizasyonu ile sıcaklık değişimine bağlı amilaz aktivitesi değişimi

4.2. Tartışma

Mikroorganizmalar en önemli enzim kaynaklarıdır ve biyoteknolojide kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mezofilik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Ancak, endüstriyel işlemler sırasında gerekli olan yüksek iyonik şiddet, pH ve sıcaklık gibi koşullar mezofilik enzimlerin stabilitelerini sınırladığı için, ekstremofil arkelerin ürettiği ekstremozimlere ilgi artmıştır (Hough ve Danson, 1999; Eichler, 2001). Ekstremofil organizmalardan, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişen halofilik arkeler, en önemli ekstrem halofilik enzim kaynaklarıdır. Endüstriyel işlemler sert koşullarda gerçekleştirildiğinden dolayı, sıcak ve yüksek tuz derişimi, organik solventler gibi düşük su aktivitesine sahip olan ekstrem koşullarda optimum aktivite gösterebilen halofilik arkelerin enzimleri endüstriyel anlamda büyük önem kazanmaktadır (Gomes ve Steiner 2004).

Lipaz, proteaz ve amilaz endüstriyel öneme sahip enzimlerdir ve küresel enzim pazarının önemli bir kısmını oluştururlar (Sangeetha ve ark. 2010). Mikroorganizma kaynaklı lipaz, proteaz ve amilaz enzimleri gıda, tekstil, deterjan, ilaç sanayi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Karbalaeei-Heidari ve ark. 2009; Shafiefi ve ark. 2011; Gupta ve ark., 2004). Bu çalışmada, lipaz, proteaz ve amilaz aktivitesine sahip 6 farklı halofilik arke izolatu, hücre immobilizasyonu ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla araştırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında, halofilik arke hücreleri 7 farklı destek materyaline 3 farklı yöntemle immobilize edilmiş ve immobilize edilen hücrelerin lipaz, proteaz ve amilaz aktiviteleri ve en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği inkübasyon zamanları belirlenmiştir (Çizelge 4.2.). İzolatların immobilizasyon yöntemlerine göre enzim aktiviteleri dikkate alındığında en yüksek aktivite B45, A138, D83A, A235, izolatları için adsorpsiyon ve SD23 izolatu için hapsetme yönteminde bulunmuştur.

Adsorpsiyon yönteminde B45 izolatu için en yüksek lipaz ve proteaz aktivitesi ve A138 izolatu için en yüksek lipaz aktivitesi kitosan desteği ile immobilizasyon yönteminde saptanmıştır. D83A izolatu için en yüksek proteaz ve A235 izolatu için en yüksek amilaz aktivitesi Celite 281 ile immobilizasyon yönteminde bulunmuştur. Adsorpsiyon yönteminde hücreler zayıf fizikokimyasal güçlerle-van der Waals yada elektrostatik etkileşim- destek materyaline tutunmaktadır (Krekeler ve ark. 1991). Zayıf etkileşimlerin yanı sıra, por içeren, hidrofilik ve toksik olmayan, pürüzlü ve düzensiz

Çizelge 4.2. Halofilik arke hücrelerinin immobilizasyon yöntemi, enzim aktivitesi ve inkübasyon periyodu

ENZİM İzolat	İmmobilizasyon Yöntemi													
	Adsorpsiyon				Hapsetme				Çapraz bağlama					
	Celite 281		Kitosan		Agar		Kalsiyum aljinat		Aljinat-kitosan		Çap. bağ. aljinat		Çap. bağ. kitosan	
	S*	U/ml	S	U/ml	S	U/ml	S	U/ml	S	U/ml	S	U/ml	S	U/ml
LİPAZ														
B45	72	0.0356	96	0.3372	168	0.0824	144	0.273	72	0.0024	96	0.0105	72	0.0162
A138	96	0.0826	120	0.3289	192	0.0259	168	0.1468	192	0.0046	72	0.0305	24	0.0219
PROTEAZ														
D83A	168	0.0478	168	0.059	168	0.0341	144	0.0145	120	0.0006	120	0.0006	144	0.0009
B45	168	0.0646	168	0.0249	144	0.0252	168	0.0089	168	0.0005	120	0.0014	144	0.0016
AMİLAZ														
A235	120	0.154	48	0.0831	168	0.1048	168	0.1302	72	0.0119	144	0.031	48	0.0075
SD23	144	0.0518	168	0.0162	168	0.1056	168	0.1819	144	0.0193	120	0.0088	144	0.0145

S*: saat

yüzeyle sahip maddelerin, mikroorganizmaların adsorpsiyonla immobilizasyonu için ideal destek materyali olduğu belirtilmiştir (Durham ve ark., 1994). Çalışmamızda kullandığımız Celite ve kitosan bu özelliklere sahip destek yapılarıdır (Durham ve ark., 1994, Aranaz ve ark., 2009).

Helander ve ark. (2001), kitin türevli bir β -1,4-*N*-asetilglukozamin polimeri olan kitosanın bakteri hücrelerini adsorplayabildiğini bildirmişlerdir. Kitosan üzerindeki pozitif yüklerden dolayı, elektrostatik olarak negatif yüklü moleküllerle etkileşime giren bir polimerdir (Masotti ve ark. 2007). Çalışma kapsamında kullanılan halofilik arke hücrelerinin kitosan desteğine adsorpsiyonunun gerçekleşmesinde, kitosanın pozitif yüklü amino grupları ile halofilik arke hücre duvarının dış yüzeyindeki negatif yüklü glikoprotein ve sülfat molekülleri (Litchfiel ve ark. 1999; Kubata ve ark., 2005) arasındaki etkileşimin rolü olduğu düşünülmektedir.

Celite, SiO₂'den (silika) oluşan gözenekli yapıya sahip diatome partikülleridir. Kimyasal olarak inert olması ve birbiriyle bağlantılı por yapısına sahip olması, Celite'i, hücrelerin fiziksel adsorpsiyonu için uygun bir molekül haline getirmektedir (Chang ve ark. 2007). Çalışmamızda, toksik olmayan Celite'in özel por yapısına bağlı olarak, halofilik arke hücrelerinin yüksek oranda destek materyaline immobilize olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez kapsamında en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği immobilizasyon yöntemleri arasında 2. sırada kalsiyum aljinata hapsetme yöntemi gelmektedir. SD23 izolatında en yüksek amilaz aktivitesi, hücreler kalsiyum aljinat kürelerine hapsedildiğinde saptanmıştır. Kalsiyum aljinat küresi yapımında kullanılan sodyum aljinat, β -D Mannuronik asit ve α -L Gluronik asitten meydana gelmiş non-toksik bir polisakkarit olup, biyomoleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için uygun bir moleküldür (Mattiasson, 1983).

Literatürde halofilik arke hücrelerinin immobilizasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Tapingkae ve ark. (2010), *Natrinema gari* BCC 24369 suşunu farklı destek materyallerine adsorpsiyon, hapsetme ve çapraz bağlama yöntemiyle immobilize ederek, histamin yıkımını belirledikleri çalışmada en yüksek histamin yıkımının Celite 545'e adsorpsiyonla immobilize edilen hücrelerde saptandığını

belirtmişlerdir. Vidyasagar ve ark. (2006) *Halogeometricum sp.* TSS101 suşunu kalsiyum aljinata hapsederek proteaz aktivitesini belirledikleri çalışmada, immobilize arke hücrelerinin 10 tekrar boyunca yüksek düzeyde proteaz ürettiğini rapor etmişlerdir. *Halobacterium sp.* JS hücrelerinin farklı destek materyallerine hapsetme yoluyla immobilize edilmesiyle, proteaz üretiminin incelendiği diğer bir çalışmada, en yüksek aktivitenin kalsiyum aljinata immobilizasyonda alındığı belirtilmiştir (Vijayanand ve ark. 2012).

Çalışmamızda agar ortamına hapsedilen halofilik arke izolatlarında yüksek lipaz, proteaz ve amilaz aktivitesi gözlenmemiştir. Agar çözeltisine yüksek miktarda tuz eklenmesi agarın donma derecesini yükselttiği için immobilizasyon çalışmasında sıcaklığı 50 °C olan agar çözeltisi kullanılmıştır. Sıcak agarın, arke hücrelerini termal şoka sokarak hasar görmelerine neden olduğu düşünülmektedir. *Ralstonia pickettii* ile yapılan agara hapsetme çalışmasında da benzer sonuç alındığı bildirilmiştir (Hemachander ve ark., 2001).

Bu çalışmada, izolatların immobilizasyon yöntemlerine göre enzim aktiviteleri dikkate alındığında, adsorpsiyon ve hapsetme yöntemine göre çapraz bağlama yönteminde enzim aktivitelerinde yüksek miktarda azalma gözlenmiştir. Aktivite miktarındaki düşüşün, çapraz bağlama yöntemlerinde kullanılan glutaraldehitin arke hücreleri üzerindeki toksik etkisine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Benzer sonuçların *Natrinema gari* ile yapılan çapraz bağlama ile hücre immobilizasyon çalışmalarında da ortaya çıktığı bildirilmiştir (Tapingkae ve ark., 2010). Ayrıca, arke hücrelerinin yanı sıra bakteri hücrelerinin immobilizasyonu çalışmalarında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. *Teredinobacter turnirae* hücrelerinin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehidin proteaz aktivitesinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Elibol ve Moreira 2003). Immobilize edilmiş *Erwinia sp.* D12 hücrelerinde izomaltoz üretiminin azalmasının nedeni olarak glutaraldehitin toksik etkisine işaret edilmiştir (Kawaguti ve ark., 2006).

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, immobilize edilmiş hücrelerle serbest hücrelerin enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3.). Immobilize edilmiş hücrelerde serbest hücrelere göre enzim aktivitesinde minimum 2 maksimum 10 kat olacak şekilde bir artış saptanmıştır.

Çizelge 4.3. İmmobilize ve serbest hücrelerde enzim aktivite değerleri

İzolat-enzim	İmmobilize hücre	Serbest hücre	İmmobilizasyon verimi (kat)
A138-lipaz	0.3289 U/ml	0.0316 U/ml	10
B45-lipaz	0.3371 U/ml	0.038 U/ml	9
D83A-proteaz	0.0451 U/ml	0.0063 U/ml	8
B45-proteaz	0.0646 U/ml	0.0233 U/ml	3
A235-amilaz	0.1543 U/ml	0.0692 U/ml	2
SD23-amilaz	0.1819 U/ml	0.1176 U/ml	2

İmmobilize edilmiş hücrelerde serbest hücrelere göre enzim aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarla da ortaya konmuştur (Scannell ve ark. (2000), Angelova ve ark. (2000), Elibol ve Moreira (2003), Saude ve Junter (2002), Pereira ve ark. (2003), Adinarayana ve ark.(2004), Anisha ve Prema (2008), Kumaravel ve Gopal (2010), Beshay ve arkadaşları (2011), Vijayanand ve ark. (2012)). Halofilik arke *Natrinema gari* ile yapılan immobilizasyon çalışmasında serbest hücrelere göre celite'e immobilize edilmiş hücrelerde histamin degradasyonunun %94 oranında arttığı belirtilmiştir (Tapingkae ve ark. 2010). Mikrobiyal hücreler bir desteğe immobilize edildiğinde pH, sıcaklık, organik solvent veya toksik maddeler gibi çevrenin zararlı etkilerinden korunabilmekte ve enzim aktivitesinde artış meydana gelmektedir (Park ve Chang 2000). Ayrıca immobilize hücrelerin korunaklı mikro çevrelerinde substrata daha etkili ulaştıkları düşünülmektedir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında her bir izolata en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği immobilizasyon yöntemi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda B45 izolata hariç diğer 5 izolata standart yöntemde en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. B45 izolataında ise, lipaz aktivitesi yönünden asetik asitle muamele edilen kitosanda standart yöntemde göre daha yüksek sonuç elde edilmiştir. Kitosan, pKa (6.4) değerinin altındaki düşük pH derecelerinde pozitif yüklenir (Aranaz ve ark. 2009). Pozitif yük oranındaki artışa bağlı

olarak arke hücrelerinin daha fazla kitosan yüzeyine tutunduğu düşünülmektedir. Strand ve ark. (2003) kitosan yüzeyine *E. coli* hücrelerinin adsorpsiyonunun pH'ya bağlı olarak arttığını belirtmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında immobilize edilen hücrelerin lipaz, proteaz ve amilaz enzim aktiviteleri üzerine NaCl, pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.4.). Immobilize edilmiş arke hücrelerinin her üç enzim yönünden genel olarak 3-4 M NaCl, pH 7.5-8 ve 40 °C'de en yüksek aktiviteyi gösterdikleri saptanmıştır. Farklı nötrofilik halofilik arke suşlarından izole edilerek karakterize edilen lipaz, proteaz ve amilaz enzimlerinin nötr pH, 2.5 M'in üzerinde NaCl ve 40 °C üzerindeki sıcaklık derecelerinde optimum aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Litchfield, 2011).

Çizelge 4.4. Immobilize hücrelerde enzim aktivitesi için optimum NaCl, pH ve sıcaklık

İzolat-enzim	NaCl [M]	pH	Sıcaklık (°C)
A138-lipaz	3	7.5	40
B45-lipaz	3.5	7.5	40
D83A-proteaz	3	8	40
B45-proteaz	3	8	40
A235-amilaz	4	7.5	40
SD23-amilaz	3.5	7.5	40

Sonuç olarak; hücre immobilizasyonu, ekstraselüler enzimlerin üretilmesi, biyokütlenin ortamdan kolayca ayrılması ve tekrar kullanılabilmesi, sürekli sistemlerde kullanılabilmesi gibi büyük avantajlar sunmaktadır (Zhang ve ark., 1989; Galazzo ve Bailey, 1990). Ancak, immobilizasyondaki dezavantajların minimize edilmesi için uygun immobilizasyon yöntemlerinin ve destek materyallerinin belirlenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ekstremozimler ekstrem koşullarda yürütülen endüstriyel işlemler için uygun katalizörlerdir. Ekstrem halofilik organizmaların enzimleri tuzla zenginleştirilmiş koruma kalkanına sahiptir. Tuzlar, su aktivitesini azalttığı için halofilik organizmaların enzimleri, düşük su aktivitesine sahip organik çözücülerin bulunduğu ortamlarda dahi aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Haloarkeal enzimler halofilik özelliklerinin yanı sıra termofilik özellik de göstermektedirler. Bu enzimlerle ilgili stabilite, aktivite ve çözünürlüğe yönelik çalışmaların yoğun olmasına karşı, potansiyel kullanımlarına dair çalışmaları henüz yeterli düzeye ulaşmamıştır. Arkelerden elde edilen enzimler endüstriyel koşullara benzerlik gösteren ekstrem çevre şartlarında yüksek aktivite gösterebilmektedirler. Ancak hücrelerin çoğalma hızlarının düşük olması ve enzim saflaştırılmasında yaşanan zorluklar arkelerden enzim üretimini kısıtlamaktadır. Araştırmalar, farklı mikroorganizmalar için hücre immobilizasyon tekniği ile enzim üretim verimliliğinin büyük ölçüde arttığını ortaya koymaktadır. Günümüzde, enzim üretimi için hücre immobilizasyon yöntemleri endüstriyel olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak, arke enzimlerinin aktivitesi için de, immobilize hücrelerin kullanılmasının serbest hücrelerin kullanılmasından daha verimli olduğu belirtilmiştir. İmmobilize hücrelerin başlıca avantajı, bu hücrelerin biyodönüşüm sonucunda ortamdan kolayca ayrılabilmesi ve tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Ayrıca, immobilize hücreler ortamdan ayrıldıkları için reaksiyon ortamı kirlenmemektedir. İmmobilize hücreler sürekli sistemde çalışmaya çok uygundur ve substrat, biyokütle oluşumu için harcanmayacağından daha yüksek hacimsel verimlilik değerleri elde edilebilmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada altı farklı halofilik arke izolatu yedi farklı destek materyaline üç farklı immobilizasyon yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen arke izolatlarının en yüksek lipaz, proteaz ve amilaz aktivitesi gösterdiği immobilizasyon yöntemleri belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi, 5 izolat için adsorpsiyonla immobilizasyon yönteminde, 1 izolat için ise kalsiyum aljinata hapsetme yönteminde saptanmıştır. Adsorpsiyonla immobilize edilen hücrelerde enzim aktivitesinin serbest hücreye göre 10 kat arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, arke izolatlarının çeşitli yöntemlerle immobilizasyonları yapılmış, ancak hücrelerin immobilizasyon verimliliği yapılmamıştır. Çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonda glutaraldehitin toksik etkisinden dolayı enzim aktivite sonuçları çok düşük alınmış, ancak glutaraldehitin uygun konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmaları yapılmamıştır. İmmobilize edilen hücrelerin sürekli reaktör koşullarında kullanımı ve tekrar kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır. Endüstriyel öneme sahip haloarke hücrelerinin immobilize edilerek enzim aktivite yeteneklerinin artırılması için yukarıda belirtilen çalışmaların yapılması önerilir.

KAYNAKÇA

- Adinarayana, K., Bapi Raju, K.V.V.S.N., Ellaiah, P., 2004. Investigations on alkaline protease production with *B. Subtilis* PE-11 immobilized in calcium alginate gel beads. **Process Biochemistry** 39, 1331-1339.
- Aira, S., Kilal, K., ve Imanaka, A., 1983. Cloning and Expression of Thermostable α -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1059-1065.
- Akolkar, A., Bharambe, N., Trivedi, S. and Desai, A., 2008. Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1(1). **Letters in Applied Microbiology** ISSN 0266-8254.
- Akolkar, A., Desai, J., 2010. Catalytic and thermodynamic characterization of protease from *Halobacterium* sp. SP1(1). **Research in Microbiology** 161, 355e362.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Slokoska, L. S., 2000. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. **Enzyme and Microbial Technology** 26 , 544-549.
- Anisha, G.S., Prema, P., 2008. Cell immobilization technique for the enhanced production of a -galactosidase by *Streptomyces griseoalbus*. **Bioresource Technology** 99, 3325-3330.
- Aparna, V., Akolkar, A., Desai, J., 2010. Catalytic and thermodynamic characterization of protease from *Halobacterium* sp. SP1(1). **Research in Microbiology** 161, 355-362.
- Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Volcani, B. E. and Ventosa, A., 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea water, determined on the basis of their 16 S rRNA sequences. **Appl. And Environ. Mic.**, 62(10): 3779-3786.
- Aranaz, I., Mengíbar M., Haris, R., Paños, Í., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, 3, 203-230.
- Bagal, R., and Madamwar, D., 1996. Continuous Production of Halophilic Through Whole Cell Immobilizationx-Amylas *Halobacterium salinarium*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol 62.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R., 1999. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry detergent Additive. **Process Biochemistry** 35 , 213-219.
- Beshay, U., El-Enshasy, H., Ismail, IM., Moawad, H., Abd-El-Ghany, S., 2011. Beta-glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices. **Pol J Microbiol** 60(2): 133-8.
- Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, L., Fardeau, M.F., Ollivier, B., Baratti, J.C., 2005. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production. **FEMS Microbiology Letters** 248, 133-140.
- Bickerstaff, G. F. 1995. **Impact of genetic technology on enzyme technology**. Genet Engineer Biotechnologist 15, 13-30.
- Bickerstaff, G. F., 1997. **Immobilization Enzymes and Cells**. Human Pres Inc.

- Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., 2006. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. **BMC Genomics** 7: 169.
- Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 41 21-26
- Britton, K.L., Baker, P.J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D.J., Bonete, M.J., Ferrer, J., Pire, C., Esclapez, J., Rice, D.W. 2006. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103:4846-4851
- Cabral, J M S and Kennedy, J. F., 1991. **Covalent and coordinatton immobilization of proteins, in Protean Immobilization** (Taylor, R F , ed.), Marcel Dekker, NewYork, 73-138.
- Camacho, R.M., Mateos, J.C., González-Reynoso, O., Prado, L.A., Córdova, J., 2009. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 36:901-909.
- Camacho, R.M., Mateos-Díaz, J.C., Diaz-Montañó, D.M., González- Reynoso, O., Córdova, J., 2010. Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp.NRC-1. **Extremophiles** 14:99–106.
- Carrara, C. R., & Rubiolo, A. C., 1994. Immobilization of b-galactosidase on chitosan. **Biotechnology Progress**, 10, 220-224.
- Castillo, A. M., Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A. 2007. *Halorubrum ejinorensis* sp. Nov., isolated from Lake Ejnor, Inner Mongolia, China. **Int. J. Of Syst. And Evolut. Microbiol.**, 57; 2538-2542.
- Chang , S.F., Chang , S.W., Yen, Y.H., Shieh, C.J., 2007. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. **Applied Clay Science** 37 67–73.
- Danson, M.J., Hough, D.W., 1998. Structure , function and stability of enzymes from the *Archaea* . **Trends Microbiol** 6:307 -14.
- De Souza, M.P., Magalhães, O.P., 2010. Application Of Microbial α -Amylase in Industry. **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 850-861.
- Durham, D.R., Marshall, L.C., Miller, J.G. and Chmurny A. B., 1994. Characterization of Inorganic Biocarriers That Moderate System Upsets during Fixed-Film Biotreatment Processes. **Applied And Environmental Microbiology**, Sept. 1994, p. 3329-3335.
- Eicher Jerry, 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances** 19 (2001) 261-278
- Elibol, M., Moreira, A. R., 2003. Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. **Process Biochemistry** 38 1445-1450.
- Falb, M., Muller, K., Konigsmaier, L., 2008. Metabolism of *halophilic archaea*. **Extremophiles** 12: 177-196.
- Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, K. J., Cameron, E. D., Stevenson, P. L., McMeekin, A. T., and Burton, H. R., 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a *halophilic bacterium* isolated from Deep Lake, Antarctica. **Aust. J. Mar. Freshwater Res.** 38, 409-417

- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., Usami, R., 2004. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a *Haloarchaeon*, *Haloarcula* sp. strain S-1 **Extremophiles** 9:85–89 DOI 10.1007/s00792-004-0423-2
- Galazzo, L.J., Bailey, J.E., 1990. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology** Volume 12, Issue 3, March 1990, Pages 162-172.
- Garrett, RA and Klenk, H. P., 2007. **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, Oxford.
- Gimenez, I. M., Studdert, A. C., Sanchez, J. J., De Castro, E. R., 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. **Extremophiles** 4: 181-188.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. **Food Technol. Biotechnol.** 42 (4) 223-235.
- Good, W.A., Hartman, P.A., 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. **J Bacteriol** 104:601–603.
- Göksungur, Y and Güvenç, U. 2002. Kalsiyum Aljinatta Hücre İmmobilizasyonu ve biyoteknolojideki Uygulamaları. **Gıda** 27(6): 511-518.
- Göksungur, Y., Gündüz, M. And Harsa, Ş., 2005. Optimization of lactic acid production from whey by *L casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 80:1282-1290.
- Gönen, F., 2006. **Atık sulardaki tekstil boya maddeleri ve metal iyonlarının tekli ve ikili karışımlarının serbest ve tutuklanmış mikroorganizma sistemleri ile kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmesi**, (Doktora Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenitty, T. J. and Ventosa, A., 2001. **Order I. Halobacteriales In: Bergey's manual of systematic bacteriology V.I, the Archaea and deeply branching and phototrophic bacteria**, Garrity, G. M. (man.Ed.) 2nd Ed. New York, Springer, ISBN: 0387987711.
- Guo, X.F., Kikuchi, K., Matahira, Y., Sakai, K., Ogawa, K., 2002. Water-soluble chitin of low degree of deacetylation. **J. Carbonhydr. Chem.**, 21, 149-161.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem.**, 38: 1599-1616.
- Halander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 71, 235-244.
- Hartmann, R., Sickinger, H., D. and Oesterhelt, D., 1980. Anaerobic growth of *halobacteria*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77 (6): 3821-3825.
- Hemachander, C., Bose, N., Puvanakrishnan, R., 2001. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. **Process Biochem** 36:629-33.
- Hough, D. W. and Danson, M. J., 1999. Extremozymes. **Current Opinion in Chemical Biology** 1999, 3:39–46
- <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>.
- Hutcheon, G.W., Vasisht, N., Bolhuis, A., 2005. Characterization of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. **Extremophiles** 9:487–495.

- Ihara, K., Watanabe, S., Tamura, T., 1997. **Int.J.of Syst. And Evolut. Bacteriol.**, 47; 73-77
- Ízotova, L.S., Strongin, A.Y., Chekulaeva, L.N., Sterkin, V.E., Osto-slavskaya, V.I., Lyublinskaya, L.A., Timokhina, E.A., Stephanov, V.M., 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. **J Bacteriol** 155:826-830.
- Jaeger, K-E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol** 13:390–397.
- Juez, G., Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Kushner, D.J., 1986. *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec, nov., Two New Species of Extremely Halophilic Archaeobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**. Volume 8, Issue 1-2, Pages 75-79.
- Kadziola, A., Sùgaard, M., Svensson, B. and Haser R., 1998. Molecular Structure of a Barley α -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis. **J. Mol. Biol.** 278, 205±217.
- Kanlayakrit, W., Preeyanuch, B., Takuji, O., Masatoshi, G., 2004. Production and characterization of protease from an extremely halophilic *Halobacterium* sp. PB407. **Kasetsart J** (Nat Sci) 38:15-20.
- Karbalaei-Heidari, H.R., Amoozegar, M.A., Mahbod Hajighasemi, M., Ziaee, A., Ventosa, A., 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 36:21-27.
- Kashmiri, M.A., A. Adnan and B.W. Butt., 2006. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. **African Journal of Biotechnology**, 5(10): 878-882.
- Kawaguti, H.Y., Manrich, E., Sato, H.H., 2006. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia* sp. Cells. **Electronic Journal of Biotechnology**. Vol.9 No.5.
- Khare, S. K. & Nakajima, M., 2000. Immobilisation of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. **Food Chemistry**, 68, 153-157.
- Kierstan, M.P.J. and Coughlan, M.P. 1985. **Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment**. pp. 39-48.
- Kobayashi, T., Kanai, H., Aono, R., Horikoshi, K. and Kudo, T., 1994. Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of the α -Amylase Gene from the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus* sp. Strain Ah-36. **J Bacteriol** 176:5131-5134
- Krekeler, C., Ziehr, H. and Klein, J., 1991. Influence of physicochemical bacterial surface properties on adsorption to inorganic porous supports. **Applied Microbiology and Biotechnology** Volume 35, Number 4, 484-490.
- Kubota, M., Matsui, M., Chiku, H., Kasashima, N., Shimojoh, M. and Sakaguchi, K., 2005. Cell Adsorption and Selective Desorption for Separation of Microbial Cells by Using Chitosan-Immobilized Silica. **Applied And Environmental Microbiology**, Vol. 71, No. 12, p. 8895-8902.
- Kumaravel, V.,Gopal, SR.,2010. Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* MBL27 cells for enhanced antimicrobial protein production using calcium alginate beads. **Biotechnol Appl Biochem** 57(3): 97-103.

- Leigh, J.A., Albers, S.V., Atomi, H. and Allers, T., 2011. Model organisms for genetics in the domain *Archaea*: methanogens, *Halophiles*, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. **FEMS Microbiol Rev** 35, 577-608.
- Litchfield, D. C., 2011. Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 38:1635–1647.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles** 4:91-8.
- Mancinelli, R. L., and Hochstein L. I., 1986. The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, 35: 55-58.
- Manikandan, M., Lejla, P., Vijayaraghavan, K., 2009. Purification and biological characterization of a halophilic thermostable protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007. **World J Microbiol Biotechnol** 25:2247-2256.
- Mansour, E. H. and Dawoud, F. M., 2003. Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an adsorption procedure. **J Sci Food Agric** 83 :446-450.
- Margesin, R., Schiner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles** 5:73-83.
- Marhuenda-Egea, F.C. and Bonete, M. J., 2002. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Current Opinion in Biotechnology* 13:385-389.
- Masotti, A., Marino, F., Ortaggi, G. and Palocci, C., 2007. **Fluorescence and Scanning Electron Microscopy of Chitosan/DNA Nanoparticles for Biological Applications. Modern Research and Educational Topics in Microscopy.** A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.).
- Mattiasson, B., 1983. Application of aqueous two-phase systems in biotechnology. **Trends Biotechnol.** 1: 15-20.
- Mevarech, M., Frolow, F. & Gloss, L.M., 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. **Biophys Chem** 86: 155-164
- Müller-Santos, M., De Souza, E.M., Pedrosa, F., Mitchell, D.A., Longhi, S., Carrière, F., Canan, S., Krieger, N., 2009. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. **Biochim Biophys Acta**, 1791:719-729
- Norberg, P. and Hofsten, B. V., 1969. Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria. **J. gen. Microbiol**, 55, 251-256.
- Norton, C. F., Mcgenity, T. J. and Grant, W. D., 1993. Archaeal halophiles (*halobacteria*) from two British salt mines. **Journal of General Microbiology**, 139, 1077-1081.
- Nuttall, S. D., Dyal-Smith, M. L., 1993. HF1 and HF2: Novel Bacteriophages of *Halophilic Archaea*. **Virology volume** 197, issue 2 pages 678-684.
- Oren, A. and Rodriguez-Valera, F. 2001. The contribution of halophilic bacteria to the coloration of saltern crystallizer ponds. **FEMS Microbiology Ecology**, 36: 123-130
- Oren, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. **Microbiol Mol Biol R**, 63: 334-348.
- Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems** 4: 2.
- Oren, A., 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. **Environ Technol** 31: 825-834.

- Oren, A., 2012. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 62, 263-271.
- Oren, A., and Gurevich, P., 1993. Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the Dead Sea. **FEMS microbiology Ecology**, 12: 249-256.
- Oren, A., and Litchfield, D. C., 1999. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 173: 353-358.
- Oren, A., and Trüper, H. G., 1990. Anaerobic growth of halophilic *archaeobacteria* by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine N-oxide. **FEMS Microbiol. Letters**, 70: 33-36.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S. & Galinski, E.A., 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. **Extremophiles** 6: 491-498.
- Oren, A., Ventosa, A. and Grant, W. D. 1997. Proposal of minimal standarts for the description of new taxa in the order *Halobacteriales*. **Int. J. Syst. Bacteriol** 47, 233-238.
- Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., Caliskan, M. 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. **Microbiology**, 75(6); 739-746.
- Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cihan, A.C., Cokmus, C., and Caliskan, M., 2012. Characterization of lipolytic activity of *Archaeal* isolates and their phylogenetic analysis.” **Microbiology**, 81, no:2(3).
- Park, J.K. and Chang, H.N., 2000. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances** 18, 303-319.
- Paul, S. Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T., Dutta, C., 2008. Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. **Genome Biol**, 9:R70.
- Pereira, E. B., Zanin, J. M., & Castro, H. F., 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 20, 343-355.
- Pfeiffer, F., Broicher, A., Gillich, T., Klee, K., Mejia, J., Rampp, M. & Oesterhelt, D., 2008. Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. **Arch Microbiol** 190: 281-299.
- Rao, JL, Satyanarayana, T., 2009. Hyperthermostable, Ca(2⁺)-independent, and high maltose-forming alpha-amylase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*: whole cell immobilization. **Appl Biochem Biotechnol** 159(2): 464-7.
- Rao, L., Zhao, X., Pan, F., Li, Y., Xue, Y., Ma, Y., Lu, J.R., 2009. Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration. **PLoS One**, 9:e6980.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62:597-635.
- Robinson, J.L., Pyzyna, B., Atrasz, R.G., 2005. Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family halobacteriaceae) as revealed by arrhenius plots. **J Bacteriol** 187: 923–929

- Rosevear, A., 1984. Immobilised biocatalysts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Volume 34, Issue 3, pages 127-150, September 1984.
- Saude, N., Junter, G. A., 2002. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Process Biochemistry** 37, 895-900.
- Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E.K., 2000. Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. **Journal of Applied Microbiology**, 89, 573-579.
- Schiraldi, C., Giuliano, M. and De Rosa, M., 2002. Perspectives on biotechnological applications of archaea. **Archaea** 1, 75-86.
- Seitz, K. H., Studdert, C., Sanchez, C. And De Castro, R., 1997. Intracellular proteolytic activity of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. Effect of starvation. **J. Basic Microbiol.** 37 5,313-322.
- Sellek, G.A., Chaudhuri, J.B., 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enz Microbial Technol** 25:471-482.
- Singla, A.K., Chawla, M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. **J. Pharm. Pharmacol.**, 53, 1047-1067.
- Solimagn, S . H . & Truperh, G., 1982. *Halohactrium pharaonis* sp. nov., a new extremely haloalkaliphilic archaebacterium with low magnesium requirement. **Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene (Abteilung Originale C)** 3, 3 18-329.
- Sopa, J., Baumann, A., Brenneis, M., Dambeck, M., Hering, O. & Lange, C., 2008. Genomics and functional genomics with **Haloarchaea**. **Arch Microbiol** 190: 197-215.
- Studdert, C., De Castro, R. E., Seitz, K. H., Sánchez, J. J., 1997. Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic activities of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. **Arch Microbiol** 168 : 532-535
- Swalsgood, H. E.,1985. **Immobilization of enzymes and some applications in the food Industry, m Enzymes and Immobilized Cells zn Bzotechnology** (Laskin, A I, ed.) Benjamin Cummmgs, London, pp. 1-24.
- Tadeo, X., López-Méndez, B., Trigueros, T., Laín, A., Castaño, D., Millet, O., 2009. Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea. **PLoS Biol**, 7:e1000257.
- Takeo, K., Yamaoka, Y., & Sasaki, K., 2005. Treatment of oil-containing sewage wastewater using immobilised photosynthetic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, 1385-1391.
- Tapingkae, W., Parkin, K., L., Tanasupawat, S., Kruenate, J., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2010. Whole cell immobilisation of *Natrinema gari* BCC 24369 for histamine degradation. **Food Chemistry** 120, 842-849.
- Tindall, B.J., Ross, H.N.M., Grant, W.D., 1984. *Natronobacterium* gen. nov. and **Natronococcus** gen. nov., Two New Genera of Haloalkaliphilic Archaeobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**. Volume 5, Issue 1, April 1984, Pages 41-57.
- Vidyasagar, M., Prakash, S.B. ve Sreeramulu, K., 2006. Optimization of culture conditions for the production of haloalkaliphilic thermostable protease from an

- extremely halophilic archaeon **Halogeometricum** sp. TSS101. **Letters in Applied Microbiology** ISSN 0266-8254.
- Vihinen, M., & Mantsala, P., 1989. Microbial amylolytic enzymes, Crit. Rev. **Biochem. Mol. Biol.** 24, 329-418.
- Vijayanand, S., Hemapriya, J., Selvin, J., Kiran, S., 2012. Operational Stability and Reusability of *Halobacterium* sp. JS Cells Immobilized in Various Matrices for Haloalkaliphilic Protease Production. **International Journal of Microbiological Research** 3 (1): 01-06.
- Waino, M., Ingvorsen, K., 2003. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. **Extremophiles** 7:87-93.
- Woese, C. R. & Fox, G. E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proc Natl Acad Sci U S A** 74, 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. And Wheelis, M. L., 1990. **Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc.**
- Woodward, J.,1985. **Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling**
- Yildiz, E., Ozcan, B., Caliskan, M. 2012. Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of *Halophilic Archaea* from Salt Mine, in Central Anatolia (Turkey). **Polish journal of Microbiology**, 61-2 (Basım aşamasında)
- Zhang, Z., Zhang, Y., Ma, W., Russell, R., Shakhsher, Z.M., Grant, C. L., Seitz, W. R., Sundberg, D. C., 1989. Poly(vinyl alcohol) as a substrate for indicator immobilization for fiber-optic chemical sensors. **Anal. Chem.**, 61 (3), pp 202-205.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikirlerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan danışman hocam Prof. Dr. Mahmut ÇALISKAN'a ayrıca tezimin başlangıcından sonuna kadar her konuda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen sorularımı sabırla cevaplayan değerli hocam Doç. Dr. Birgül ÖZCAN'a, manevi desteğini esirgemeyen ve özellikle santrifüj esnasında bana laboratuvarını açan sevgili hocam Doç. Dr. Zehra AYHAN'a, immobilizasyon ve enzim aktivite hesaplamalarında önerilerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ'a deneylerimde yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Eaylettin ÖZTÜRK, Evrim YILDIZ, Eda AÇIKGÖZ, Yıldız İNEL, Tanju YILDIZ, Yağmur Al, Ümit TOR, Didem AYTİŞ'a,

Deneyletim esnasında ve sonrasında manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım F.Ceyda DUDAK, Yunus Bakihan ÇAMURDAN, Kıvılcım BAŞ, Tarık ÖZBEK, Filiz YENİ, Murat ÇELEBİ ve Özgür GÖKÇE' ye teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kardeşim ve arkadaşım Doç. Dr. Serpil EROĞLU'na ve aileme teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında doğdum. İlk ve orta eğitimimi Ankara'da tamamladım. 2000 yılında, Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2006 yılında bu bölümden mezun oldum. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisansa başladım. Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.