



**TÜRKİYE’DEKİ FARKLI ORTAMLARDAN İZOLE
EDİLMİŞ HALOFİLİK PROKARYOTLARDA
HİDROLİTİK ENZİMLERİN TARANMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ELÇİN ŞEN
ESKİŞEHİR, 2019**

**TÜRKİYE’DEKİ FARKLI ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİŞ
HALOFİLİK PROKARYOTLARDA HİDROLİTİK
ENZİMLERİN TARANMASI**

ELÇİN ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

(İkinci Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Volkan KILIÇ)

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz, 2019

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1501F027 no.lu
proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elçin ŞEN'in "Türkiye'deki Farklı Ortamlardan İzole Edilmiş Halofilik Prokaryotlarda Hidrolitik Enzimlerin Taranması" başlıklı tezi 17/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	
Üye	: Prof.Dr. Meral Yılmaz CANKILIÇ	
Üye	: Doç. Dr. Gökâl İşCAN	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI
(Unvanı, Adı ve SOYADI)
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET
TÜRKİYE’DEKİ FARKLI ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİŞ
HALOFİLİK PROKARYOTLARDA HİDROLİTİK
ENZİMLERİN TARANMASI

ELÇİN ŞEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. M. Burçin MUTLU

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Volkan Kılıç

Bu çalışmada Sivas bölgesindeki Bingöl, Kemah, Fadlum gibi tuzla ve havuzlardan izole edilen halofilik mikroorganizmaların hidrolitik enzim potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 188 izolatin sırasıyla nükleaz taraması DNase test agar besi ortamına, proteaz taramasında %2 süt tozu içeren besi ortamına ve amilaz taraması % 0,5 nişasta içeren besi ortamına ekimi ile 37 °C ‘de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu koloni çevresindeki hidrolitik zon çaplarına göre enzim üretim potansiyelleri tespit edilmiştir. Tanımlanmamış olan izolatlar için DNA izolasyonu ve 16srRNA PCR ‘ı kurulumu ARDRA ile 7 farklı pattern elde edilmiş olup bir sonraki adım olan dizi analizi çalışmaları için hazırlanmıştır. Enzim taramaları sonucu zon çaplarına göre D85, 205y, F2S50 ve D63 mikroorganizmalar en yüksek enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar olarak tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların büyüme eğrileri ve en yüksek proteaz enzim aktivite saatleri tespit edilmeye çalışılmıştır. İleriki çalışmalarda tanımlanamayan izolatların dizi analizi ile tanımlanması, amilaz ve nükleaz enzimlerinin aktivitelerinin en yüksek olduğu saatlerinin tespit edilip büyük ölçekli endüstriyel üretim hedeflenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Enzim aktivitesi, Proteaz, Amilaz, Nükleaz, Halofilik Mikroorganizmalar, Enzim Aktivitesi.

ABSTRACT
SCREENING OF HYDROLYTIC ENZYME ISOLATED FROM
HALOPHILIC PROKARYOTES DIFFERENT ENVIRONMENTS IN TURKEY

ELÇİN ŞEN

Department of Biology

Programme in General Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programme

July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

(Co-Supervisor: Dr. Lecturer Volkan KILIÇ)

The aim of this study was to investigate the hydrolytic enzyme potentials of halophilic microorganisms isolated from salt and ponds such as Bingöl, Kemah, Fadlum, Sivas. A total of 188 isolates were incubated with nuclease screening in DNase test agar medium, 2% milk powder in the protease screening medium and incubation with medium containing amylase 0.5% starch at 37 ° C for 24 hours. Enzyme production potentials were determined according to hydrolytic zone diameters around the colony. DNA isolation and 16srRNA PCR for unspecified isolates were established and 7 different patterns were obtained by ARDRA and the next step was prepared for sequence analysis studies. D85, 205y, F2S50 and D63 microorganisms were determined as microorganisms with the highest enzyme activity according to the zone diameters. The growth curves of these microorganisms and the highest protease enzyme activity hours were determined. In future studies, the identification of unidentified isolates by sequence analysis, the peak activity of amylase and nuclease enzymes are determined and largescale industrial production is targeted.

Keywords: Enzyme Activity, Protease, Amylase, Nuclease, Halophilic Microorganisms, Enzyme Activity

TEŞEKKÜR

Araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen, birçok yönden örnek almaya çalıştığım değerli tez hocam Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU 'ya teşekkürü bir borç bilirim

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardım ve dayanışmalarından dolayı Seval ÇINAR, Nilgün POYRAZ ve Emine TÜRK'e;

Verdikleri her türlü maddi ve manevi destekle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme;

Tüm çalışmalarım süresince yaptığı yardımlar, fedakârlıklar ve özellikle de gösterdiği sabır dolayısıyla eşim Cevat ŞEN 'e teşekkürlerimi sunarım.

.../...../20.....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
(İmza)

.....
(Öğrencinin Adı ve SOYADI)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Halofilik mikroorganizmalar	1
1.1.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması.....	1
1.1.2. Halofilik mikroorganizmaların morfolojileri ve adaptif özellikleri.....	2
1.1.2.1. <i>Salt in stratejisi</i>	3
1.1.2.2. <i>Uyumlu çözünmüş madde (compatible solute) stratejisi</i>	3
1.2. Halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların biyoteknolojik potansiyelleri ve uygulama alanları	3
1.2.1. Özelleşmiş ürünler	4
1.2.1.1. <i>Bakteriyodopsin</i>	4
1.2.1.2. <i>Uyumlu çözünmüş madde</i>	5
1.2.2. Gıda endüstrisi.....	5
1.2.2.1. <i>Besinsel uygulamalar</i>	6
1.2.3. Çevresel uygulamalar.....	6
1.2.3.1. <i>Biyosümfaktan</i>	6
1.2.3.2. <i>Biyoremidasyon</i>	7
1.2.3.3. <i>Tabaklama (deri) endüstrisi</i>	7
1.2.3.4. <i>Tekstil endüstrisi</i>	7
1.2.3.5. <i>Ağır metal kirliliği</i>	8
1.2.4. Medikal uygulamalar.....	8
1.2.4.1. <i>Biyoplastikler</i>	8
1.3. Halofilik proteinlerin/enzimlerin adaptif özellikleri.....	9
1.3.1. Organik çözücülerde enzim fonksiyonları.....	10
1.4. Enzimlerin sınıflandırılması.....	11
1.4.1. Oksidoredüktazlar.....	12

1.4.2. Transferazlar	12
1.4.3. Hidrolazlar.....	12
1.4.4. Liyazlar.....	12
1.4.5. İzomerazlar.....	13
1.4.6. Ligazlar	13
1.5. Halofilik mikroorganizmaların enzimleri ve önemi	13
1.5.1. Halofilik proteazlar	15
1.5.2. Halofilik lipazlar.....	16
1.5.3. Halofilik amilazlar.....	17
1.5.4. Diğer halofilik enzimler	18
2. MATERYAL VE METOD.....	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Çalışmadan kullanılan besiyerleri	19
2.1.1.1. %12 MGM (<i>Modifiye geliştirme medium</i>).....	19
2.1.1.2. %23 MGM.....	19
2.1.1.3. <i>Nişasta %10 SW DNAz test agar with toluidine blue</i>	19
2.1.1.4. <i>%20 SW DNAz test agar with toluidine blue</i>	21
2.1.1.5. %12 MGM + %2 Skimmilk powder	21
2.1.1.6. %23 MGM + %2 skimmilk powder	22
2.1.1.7. %12MGM + %0,5 Nişasta	22
2.1.1.8. %23 MGM + %0,5 Nişasta	23
2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler	23
2.1.2.1. %30 Tuzlu su çözeltisi	23
2.1.2.2. TAE 50X	23
2.1.2.3. TBE 5X	24
2.2. Metod	25
2.2.1. Stokların canlandırılması	25
2.2.2. Canlandırılan stokların saflık kontrolü	25
2.2.3. Hidrolitik enzimlerin taranması.....	25
2.2.3.1. <i>Nükleaz taraması</i>	25
2.2.3.2. <i>Proteaz taraması</i>	25
2.2.3.3. <i>Amilaz taraması</i>	26
2.2.4. İdentifikasyon	26

2.2.4.1. Nükleik asit analizine dayalı testler	26
2.2.4.2. 16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ile Amplifikasyonu (İzolatların Archae –Bacteria Ayrımalarının Yapılması.....	26
2.2.4.3. İzolatlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA).....	27
2.2.5. Besi ortamında zon çapı karşılaştırması ile en yüksek proteolitik aktivite gösteren 4 mikroorganizmanın seçilmesi.....	28
2.2.6. Proteaz aktivitesi yüksek olan mikroorganizmaların büyüme eğrileri ve aktivitelerinin en yüksek olduğu saatin tespit edilmesi	28
2.2.6.1. <i>Salinivibrio costicola</i> büyüme eğrisi.....	28
2.2.6.2. <i>Preinoculum</i> (Öninokulum) kültürü hazırlama ve İnokülasyon.....	28
2.2.6.3. <i>Microbulbifer halophilus</i> büyüme eğrisi	28
2.2.6.4. Öninokulum Kültürü (<i>Preinoculum culture</i>) hazırlama ve İnokülasyon	29
2.2.6.5. <i>Halomonas organivorans</i> büyüme eğrisi	29
2.2.6.6. Öninokulum kültürü (<i>Preinoculum culture</i>) hazırlama ve İnokülasyon.....	30
2.2.6.7. F2S50 kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi	30
2.2.6.8. Öninokulum kültürü (<i>preinoculum culture</i>) hazırlama ve İnokülasyon	30
2.2.7. Proteaz enzim aktivitesinin ölçümü ve maksimum olduğu üreme saatinin belirlenmesi.....	30
3. BULGULAR	31
3.1. İzolatların Seçimi	31
3.2. Hidrolitik Enzimlerin Taranması.....	31
3.2.1. Nükleaz taraması sonuçları.....	31
3.2.2. Proteaz taraması sonuçları	31
3.2.3. Amilaz taraması sonuçları	32
3.3. İdentifikasyon	33
3.3.1. 16S rRNA geni amplifikasyon için izolatlardan ekstraksiyon ve	

16S rRNA PCR.....	33
3.3.2. İzolatlara ait 16 S rRNA geni amplifikasyon ürünlerin enzimatik kesimi (ARDRA).....	34
3.4. Besi Ortamında Zon Çapı Karşılaştırması ile En Yüksek Proteaz AktivitesGösteren 5 Mikroorganizmanın Seçilmesi.....	35
3.5. Proteaz Aktivitesi Yüksek Olan Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri ve Aktivite Grafiği	36
3.5.1. <i>Salinivibrio costicola</i> 'nın büyüme eğrisi	36
3.5.2. <i>Salinivibrio costicola</i> 'nın proteaz enzim aktivitesi grafiği	36
3.5.3. <i>Microbulbifer halophilus</i> 'un büyüme eğrisi.....	37
3.5.4. <i>Microbulbifer halophilus</i> enzim aktivite grafiği	37
3.5.5 <i>Halomonas organivorans</i> 'ın büyüme eğrisi	38
3.5.6. <i>Halomonas organivorans</i> proteaz enzim aktivite grafiği.....	38
3.5.7. F2S50 kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi.....	39
3.5.8. F2S50 kodlu mikroorganizmanın proteaz enzim aktivite grafiği.....	39
4. SONUÇ, TARTIŞMA, ÖNERİLER	40
KAYNAKÇA	44
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR / ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması, reaksiyon tipi ve endüstriyel enzimler	11
Tablo 1.2. Halofillerden elde edilen potansiyel kullanışlı enzimler	14
Tablo 1.3. Halofilik proteazlar	15
Tablo 1.4. Halofilik amilazlar	17
Tablo 1.5. Diğer halofilik enzimler.....	18
Tablo 1.6. Tablo1, Tablo2, Tablo 3'te araştırılan halofilik izolatların ve enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkla ilişkisi.....	19
Tablo 2.1. 16S rRNA gen amplifikasyonu için kullanılan primer ve dizileri.....	27
Tablo 2.2. 16S rRNA gen amplifikasyonu için reaksiyon şartları.....	27
Tablo 3.1. <i>Salinivibrio costicola</i> büyüme eğrisi.....	36
Tablo 3.2. <i>Salinivibrio costicola</i> proteaz enzim aktivitesi grafiği.....	36
Tablo 3.3. <i>Microbulbifer halophilus</i> büyüme eğrisi.....	37
Tablo 3.4. <i>Microbulbifer halophilus</i> enzim aktivite grafiği.....	37
Tablo 3.5. <i>Halomonas organivorans</i> büyüme eğrisi.....	38
Tablo 3.6. <i>Halomonas organivorans</i> proteaz enzim aktivite grafiği.....	38
Tablo 3.7. <i>F2S50</i> kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi.....	39
Tablo 3.8. <i>F2S50</i> kodlu mikroorganizmanın proteaz enzim aktivite grafiği.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. %10 ve üzeri tuz konsantrasyonlarında gelişebilen Halofilik mikroorganizmaların filogenetik dağılımı.....	2
Şekil 1.2. Doğada yaygın olarak bulunan ozmolitler glisin-betain, gliserolektoindir.....	5
Şekil 3.1. Nükleaz pozitif izolatlar sırasıyla 216y, 138y, 115y, 89y, 185y, 126y, 163y, 150y, 138y, 122y, 115y'dir. İzolatların etrafındaki beyaz zonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.....	31
Şekil 3.2. Proteaz pozitif izolatlar sırasıyla 187y, 115y, 138y, 126y, 136y, 89y, D63, D85, 205y, F2S50, F2S59. Mikroorganizma etrafında oluşan beyaz zonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.....	32
Şekil 3.3. Amilaz pozitif izolatlar sırasıyla 150y, 142y, 182y, 216y, 77y, 101y, 35p, 201y, 205y, BT2S27, BT2S28, BT2S29, BT2S30, B2S15, 196y'dir. İnkübasyonun ardından besiyeri yüzeyine damlatılan iyot sonrasında izolat çevresinde gözlenen beyaz zon pozitif olarak kabul edilmiştir.....	33
Şekil 3.4. 16S rRNA PCR jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.5. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünlerinin Mbo ve Hinf I enzimleri kullanarak elde edilen jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.6. Proteaz aktivitesi en yüksek 4 mikroorganizmanın aynı besi ortamında inhibisyon zonları arasındaki fark ifade edilmiştir. Mikroorganizmalar sırasıyla D85(<i>Salinivibrio costicola</i>) 205y (<i>Microbulbifer halophilus</i>), F2S50 ve D63(<i>Halomonas organivorans.</i>)'tür.....	35

1. GİRİŞ

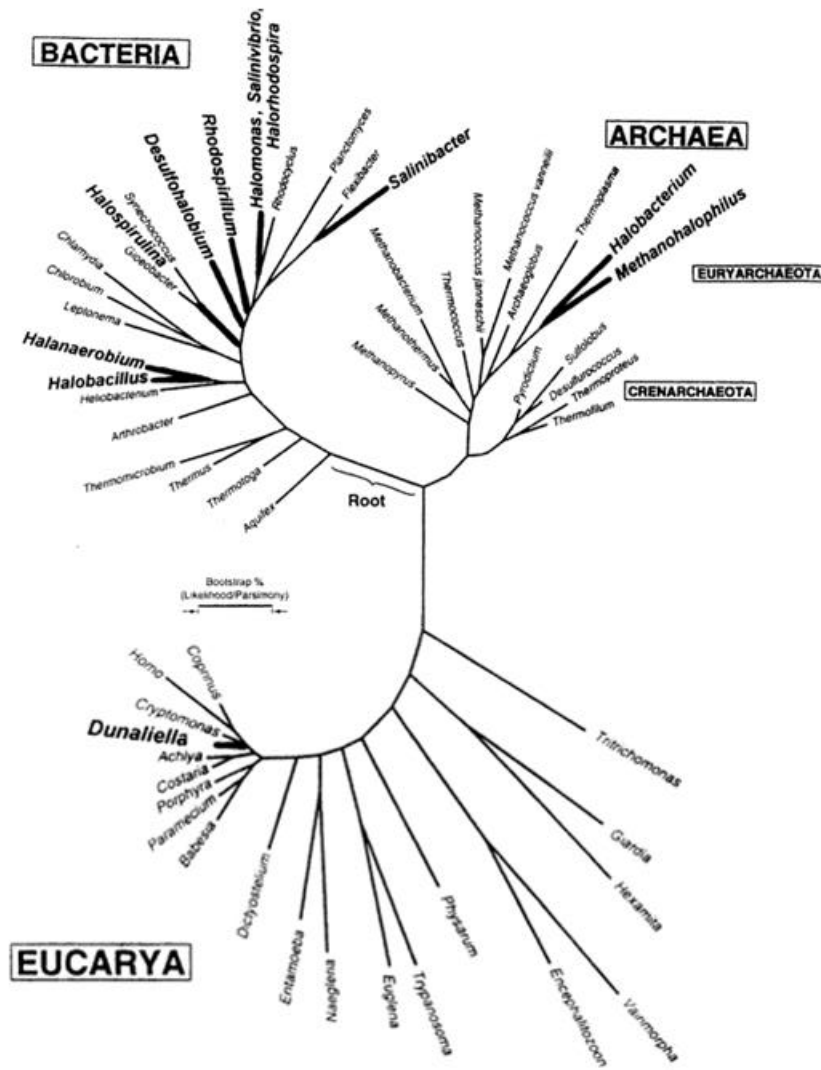
1.1. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofiller, gelişimleri için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan, tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmiş olan hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmaları içinde barındıran geniş bir gruptur (Mutlu, 2006).

1.1.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması

Tuz tüm yaşam formları için gerekli olmasına rağmen, Halofiller (Yunanca *hal*, deniz veya tuz, *philos*, seven anlamında) gelişmek için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaçlarından dolayı sınıflara ayrılırlar (S. DasSarma ve P. DasSarma, 2012). Kushner 1985'te halofilleri gereksinim duydukları en uygun NaCl miktarlarına göre; halofilik olmayanlar %1'in altında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar; az halofiller %1-3 NaCl' ye ihtiyaç duyanlar; orta derece halofiller %3-15 arası NaCl'ye ihtiyaç duyanlar; aşırı (ekstrem) halofiller %15'den daha fazla NaCl'ye ihtiyaç duyanlar olarak 4 gruba ayırmıştır (Mutlu, 2006). Halotolerant mikroorganizmalar ise yüksek tuz konsantrasyonu varlığında ya da yüksek tuz konsantrasyonunun yokluğunda gelişebilirler (S. DasSarma ve P. DasSarma, 2012).

Aşırı derecede halofiller (ekstrem halofiller) Bacteria, Archaea ve Eukarya domaininden temsilcileri bulunmaktadır. Pratik olarak halofilik mikroorganizma 100g/l'den daha yüksek tuz konsantrasyonunda gelişim gösterebilen organizmalar olarak tanımlanabilir (Mutlu, 2006). Şekil 1.1.'de farklı domainlerde yer alan halofilik mikroorganizmalar filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 1.1. %10 ve üzeri tuz konsantrasyonlarında gelişebilen halofilik mikroorganizmaların filogenetik dağılımı (Oren, 2002).

1.1.2. Halofilik mikroorganizmaların morfolojileri ve adaptif özellikleri

Halofiller tipik olarak spor üretmeyen çubuk ya da kok morfolojisine sahip canlılardır. Koklar tek olarak ya da grup olarak meydana gelir. Bazı durumlarda, polar püskül ya da filagellası ile hareket ederler. Halofilik bakterilerin boyut ve şekilleri onları çevreleyen tuz konsantrasyonunun varlığına göre değişebilir. Tuz konsantrasyonu çeşitlendiğinde çubuk formlar uzamış veya soğan biçiminde ya da kok görünümünde bile olabilir. Halofilik Bacteria'nın kolonileri C-50 karetenoidin varlığına göre kırmızı ya da turuncu görülebilir.

Halofiller ortamlarındaki yüksek osmotik basınca karşı iki tip adaptasyon stratejisi geliştirmişlerdir. Bunlardan ilki, K^+ , Na^+ ya da Cl^- gibi inorganik iyonların yüksek konsantrasyonlarda hücre içinde biriktirilmesi yoluyla ozmozun

dengelemesidir. Bu strateji yüksek iyon konsantrasyonunda çalışabilen hücre içi enzim adaptasyonlarını gerektirmektedir. Bu mekanizma Archaea domaini içerisindeki *Halobacteriaceae* familyası üyelerinde, Bacteria domaininde *Halanaerobiales* grubu ve *Salinibacter* genusu üyelerinde filogenetik olarak ilişkili olmayan ekstrem halofiller içerisinde görülmektedir (Anton vd., 2002). İkinci strateji ise, “compatible solute” organik osmolitlerin biriktirilmesidir (DaCosta, Santos, ve Galinski, 1998)

1.1.2.1. Salt in stratejisi

Bu yaklaşım başlıca halofilik Archaea ve anaerobik halofilik Bacteria tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu strateji seçici K^+ iyonlarının sitoplazma içine akın etmesi ve genellikle eşleniği Cl^- iyonlarının birikmesiyle izotonik seviyenin dış ortamla ozmatik olarak eşleşmesi prensibine dayanır. Düşük su bağlama kapasitesinden dolayı potasyum iyonları sodyum iyonlarından daha fazla tercih edilir. Bu organizmaların membranları proton gradiyenti yaratarak sitoplazmadan Na^+ iyonlarını uzaklaştırmak için çok sayıda Na^+ / H^+ antiporterleri ile çevrilidir (Karan, Kumar, Sinha and Khare, 2012).

1.1.2.2. Uyumlu çözünmüş madde (compatible solute) stratejisi

Bu strateji yaygın olarak halotolerant ve ılımlı halofillerde gözlenmektedir. Bu durumda hücre içi tuz konsantrasyonu düştüğü halde, sitoplazma ile dış ortam arasında ozmatik denge hücre dışına iyonların aktif pompalanması ve düşük moleküler ağırlıklı compatible solute (uyumlu çözünmüş madde) gibi organik ozmatik bileşiklerin oluşturulmasıyla sürdürülmektedir. Yaygın olarak poliol (genellikle gliserol), şekerler (sükroz, trehaloz), aminoasit (prolin, glutamik asit) ve quaterner aminler (glisin betain, ektoin, hidroksiektoin) olmak üzere 4 tip molekül kullanılır (DaCosta, Santos, ve Galinski, 1998).

1.2. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyelleri ve Uygulama Alanları

Halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik öneme sahip mikroorganizmalardır. Yüksek tuz konsantrasyonuna adaptasyonda geliştirdikleri halotolerans özelliğe sahip enzimleri, ürettikleri organik ozmatik stabilize edici maddeleri sebebiyle onları biyoteknolojik bakımdan değerli hale getirmiştir.

1.2.1. Özelleşmiş ürünler

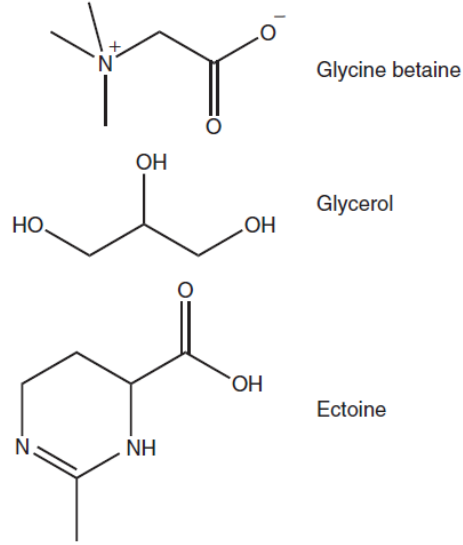
1.2.1.1. Bakteriyorodopsin

Bazı ekstrem halofilik Archaea membrana bağlı bakteriyorodopsin ya da halorodopsin olarak adlandırılan retinal pigmentler içerirler. Bakteriyorodopsin en çok tanımlanan ürünlerden biridir. Klorofil olmayan sistemde ışığı kimyasal enerjiye dönüştürme yeteneği ilk kez Haloarchaea'da keşfedilmiştir (DasSharma vd., 2010). Bakteriyorodopsin proton elektrokimyasal potansiyelinin transmembran gradiyentini kurmak için ışığı kullanan ve güneş enerjisini aktaran en basit biyolojik sistemdir. Moleküler ağırlığı 26.5 kDa'dur. Protonlar retinal kromofor yoluyla yakalanır. Retinal grup foton ile uyarıldıktan sonra konformasyonu değişir (Margesin and Schinner, 2001).

Bakteriyodopsin real time sürecinde ışık sensörü gibi ve diğer optik süreçlerde ışık modülatörü olduğu kadar yapay retina, foton değişimi, Fourier düzlem uzaysal filtre optik sınırlayıcı, halografik interferometri, halografik real-time gibi eşsiz özellikleri sebebiyle pek çok uygulama alanına sahiptir (Shakuri vd., 2016).

1.2.2.2. Uyumlu çözünmüş madde

Halofiller tuzcul çevrelerde hücre iç tuzlarını ozmotik olarak dengeleyecek şekilde biriktirerek ya da uyumlu çözünmüş madde diye adlandırılan biyomoleküllerin stabilitesini sürdürmekte kullanılan ozmolitleri biriktirerek hücre iç su kaybını önlemeye çalışırlar. Çoğu halofilik bakteri ve ökaryotlar yüksek tuz konsantrasyonuna karşı sitoplazma içinde yüksek konsantrasyonda çözücü biriktirirler. Bu ozmolitler genellikle glisin-betain, ve ektoin gibi aminoasitler (Şekil 1.2.'de sunulmaktadır) ya da şeker ve sükroz, trehaloz, ve gliserol gibi metabolik süreçlerde bozulmayan ve fizyolojik pH 'da net yüke sahip olmayan poliollerdir.



Şekil 1.2. Doğada yaygın olarak bulunan ozmolitler glisin-betain, gliserol, ektoindir.

Uyumlu çözünmüş madde (compatible solute), biyosentez, depo materyali ya da çevreden direk alınması yoluyla biriktirilir. Ektoin ve ektoin türevleri kozmetikte nemlendirici ve biyomoleküllerin (DNA, enzim, membran) stabilizatörü olarak kullanılmaktadır. Yaygın bir ozmolit olan glisin betain, besin takviyesi olarak önerilmiştir. *Halomonas boliviensis* sürekli kültürde ektoin üretimi için kullanılabileceği keşfedilmiştir. Yeşil alg, *Dunaliella salina* gliserolü yumuşatıcı, koruyucu ve iyi bir ticari besin kaynağıdır (DasSharma vd., 2010).

1.2.2. Gıda endüstrisi

Halofiller balık sosu, soya sosu ve diğer geleneksel fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Fermente balık sosu Güney Doğu Asya’da yaygın olarak kullanılan geleneksel bir sostur. Bu ürün 6-18 ay ortam sıcaklığında korunabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda (%20-30) tuz ve balığın karıştırılması ile oluşur. İşlem süresini aşağı indirmek, pH ve tuz konsantrasyonunu azaltmak için bazı çalışmalar yapılmıştır ancak peptitlerin denatüre olması, bazı patojen mikroorganizmaların gelişmesi ve lezzet kaybının ortaya çıkması sebebiyle bazı dezavantajlar oluşmuştur. Bu bakımdan fermente ürünlerde kullanılan halofilik mikroorganizmalar tarafından salınan tuza tolere proteazlar sayesinde proteinlerin hidrolize olması fermentasyon sürecini azaltarak balık soslarında kaliteyi arttırması bakımından önemli role sahiptir.

Gıda endüstrisinde daha modern uygulamalar ise doğal katkı maddeleri ve renklendiriciler (çoklu doymamış yağ asitleri ve β - karoten) ya da ekzopolisakkaritlerdir (Mohammadipannah, Hamedî ve Dehhagahi, 2015).

1.2.2.1. Besinsel uygulamalar

Yeşil tek hücreli alg *Dunaliella salina* ve *Dunaliella bardawil* 'in karoten için kültürel olarak geliştirilmesi halofilik alglerin başarılı bir uygulamasıdır. β - karoten pigmenti antioksidan, provitamin A (retinol) kaynağı olarak ve gıda renklendiricisi olarak yüksek talebe sahiptir. Antioksidan aktiviteleri sayesinde sağlıklı yiyeceklerde kullanımı bakımından popülerdir. *D.salina* ve *D. bardawil* uygun koşullarda yetiştirildiğinde yüksek miktarda β - karoten üretmektedir.

Bu pigment hücrenin tekli kloroplastının tilakoidleri arasında küçük kürecikler şeklinde konsantre halde bulunur. Pigment birikimini uyaran başlıca çevresel koşullar yüksek ışık yoğunluğu, yüksek tuzluluk ve besin kısıtlamasıdır (Kanekar vd., 2012).

1.2.3. Çevresel uygulamalar

Dünya çapındaki atık suların yaklaşık %5'i salin ve hipersalindir. Halofillerin bu çevrelerde büyüüp gelişebilmeleri biyoremediasyon için kullanım potansiyellerini göstermektedir (DasSharma vd., 2010).

1.2.3.1. Biyosüpfaktan

Süpfaktanlar birbiri ile karışmayan iki faz arasında birikerek yüzey ve ara yüzey gerilimini düşüren, ekstraselüler ya da hücre membranının bir bileşeni olarak prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalara tarafından farklı yapılarda sentezlenen yüzey aktif ajanlarıdır. Sentetik biyosüpfaktanlara göre düşük toksisite, yüksek biyoparçalanabilirlik, sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı, biyoyumluluk ve sindirebilirlik, maliyet, özgünlük gibi üstünlükleri vardır (Yüksel ve Akçelik, 2015). Biyosüpfaktanlar ise yağ ile kontamine olmuş toprak ve suları iyileştirmeyi geliştirmektedir. Halofilik/halotolerant mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosüpfaktanlar tuzlu çevrelerde yağ kirliliğinin iyileştirmesini hızlandırdıkları için önemli role sahiptirler (Margesin ve Schinner, 2001)

1.2.3.2. Biyoremidasyon

Hipersalin ortamlar diğer tüm ekosistemler gibi kirlilikten etkilenir. Endüstriyel atıkların yaklaşık %5'i tuzlu ve hipersalin çevreler olduğu tahmin edilmektedir. Ekstremofilik olmayan mikroorganizmalar organik kirleticilerin yüksek tuz konsantrasyonlarında uzaklaştırılmasında etkin bir şekilde gerçekleştirememektedir. Halofilik mikroorganizmalar metabolik olarak farklıdır ve aşırı tuzluluğa karşı adapte olmuşlardır. Bu mikroorganizmalar hipersalin ortamların ve salin atıkların iyileştirilmesi için iyi adaylardır (Borgne, Panigagua and Vazquez-Duhalt, 2008) Aşırı halofilik archea'nın hidrokarbonları metabolize edebileceği rapor edilmiştir. Halobacterium sp. % 30 NaCl içeren bir ortamda C10-C30 n-alkanları parçalamak için yüksek bir kapasite göstermiştir (Borgne, Panigagua and Vazquez-Duhalt, 2008).

1.2.3.3. Tabaklama (deri) endüstrisi

Tabaklama süreci boyunca soyulmuş hayvan derileri korunması amacıyla ilk olarak sodyum kloride emdirilir. Daha sonra tuz deri tabaklamada su içinde bekletilerek uzaklaştırılır. Genellikle su buharlaşma yolu ile uzaklaştırılır ve kalan tuz işlem görmedikçe kullanışsızdır. Eğer uygun metotlar organik yükü azaltmak için geliştirilirse, tuz buharlaşma süresinde tuz üretilmesi derinin yüzeyinin temizlenmesi ve diğer tabaklama süreçlerinde yeniden kullanılabilir.

Halofiller tabaklama atık suyunun iyileştirilmesinde anaerobik ve aerobik incelemeler gibi birçok çalışmada kullanılmıştır. Ektrem halofilik arkealar diğer halofilik arkeaları büyümesini engellemek ya da öldürmek için antimikrobiyal kimyasallar olan halosinler üretirler ve tabaklama endüstrisinde kullanılabilir (Sivaprakasam vd., 2008)

1.2.3.4. Tekstil endüstrisi

Tekstil endüstrisi fazla miktarda azo boyaları, fenol ve toksik anyonların bulunduğu kirlenmiş atık sular üretir. Bu atıklar %15-%20 tuz konsantrasyonuna sahiptir. *Salinicoccus irranensis* ve *Halomonas* türleri gibi ılımlı halofiller bu atık sulardan izole edilmiştir ve azo boyalarının rengini gidermekte ve birincil karbon ve enerji kaynağı olarak fenolü kullanabilmektedir (Guo vd., 2007).

1.2.3.5. Ağır metal kirliliği

Deniz suyunun buharlaşmasıyla oluşan hipersalin çevreler de sıklıkla ağır metaller bulunur. Bu yüzden birçok halofilik mikroorganizma ağır metallere karşı tolerans geliştirmiştir. Örneğin, *Halobacterium sp.* NRC-1 arseniğe dirençli olduğu ve arsenik temizlemek için potansiyel kullanıma sahip olduğu belirtilmiştir. Halofilik kromatı indirgeyen tabaklama atıklarından izole edilen *Nesterenkonia sp.* MF2 600mM chromatı tolere ettiği gözlemlenmiştir (Wang vd., 2004).

1.2.4. Medikal uygulamalar

1.2.4.1. Biyoplastikler

Biyoplastikler stres koşullarında mikroorganizmanın canlılığını sürdürebilmesi için hücre içinde depo bileşeni olarak biriktirdikleri polimerlerdir (Dinigüzel, 2007). Bu polimerler doğrusal kısa zincirli C-hidroksi yağ asit monomerleri içeren tekrarlanan hidrofobik ünitelerden oluşan polimerlerdir. Bu depo materyalinin bakterilerde, insandaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı düşünülmektedir. (Dinigüzel, 2007).

PHA'ların biriktirildiği granüllerin büyüklüğü, sayısı, monomer kompozisyonu, makromoleküler yapısı ve fizokimyasal özellikleri mikroorganizmaya göre değişiklik göstermektedir. Polimerin molekül ağırlığı bakterinin türüne, büyüme koşullarına, hücrenin yaşam döngüsüne göre değişmektedir. Yaklaşık 60,000-2,000,000 Da arasında moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir. Hücre içinde sıvı dış ortamda katı olan bu polimerler organik çözücülerle hücreden ayrıldıklarında hemen kristalleşmektedirler.

PHA'ların farklı tipleri olmasına karşın en geniş kapsamlı çalışılan PHB'dir. PHB'nin neme dirençli olması, suda çözünmemesi, oksijene karşı dayanıklı olması gibi avantaj özellikleriyle farklılık gösterir (Dinigüzel, 2007).

PHA'lar biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu ve suya karşı dirençli olmasından dolayı termoplastiklerin yerine kullanılabilir (DasSharma vd., 2010).

1.3. Halofilik Proteinlerin /Enzimlerin Adaptif Özellikleri

Ekstremofilik mikroorganizmaların enzimleri genellikle kimyasal reaksiyonları standart olmayan koşullarda katalizler. Çökmeyi, presipitasyonu ve denatürasyonu teşvik eden böyle koşullarda çoğu ekstremofilik olmayan enzimlerin aktivitesi sıklıkla yeterli hidrasyonun yokluğundan dolayı indirgenir (Karan, Capes, and DasSarma, 2012). Ekstremofillerden elde edilen enzimlerin bazıları poliektremofilite yani yüksek tuzluluk, alkalın pH, düşük sıcaklık ve susuz ortamlar gibi birden daha fazla ekstrem koşullarda stabilite ve aktivitesini koruyabilme özelliğine sahiptir (Karan, Capes, and DasSarma, 2012).

Ekstremofillerden bir grup olan halofiller proteinlerinin yapılarını ve fonksiyonlarını kritik bir şekilde etkileyen tuzlu ortamlarda yaşamaktadırlar. Tuz hidrofobik etkileşimi zenginleştirmesinden, iyonların hidrasyonunu arttırmasından, serbest su moleküllerinin kullanılabilirliğini azaltmasından ve moleküler arası elektrostatik etkileşimi engellemesinden dolayı proteinlerin çökmesine neden olur (Karan vd., 2012). Bu yüzden halofilik proteinler yüksek tuz varlığında fonksiyonlarını ve doğal yapılarını sürdürebilmek için adapte olmak zorundadırlar.

İyonlar solüsyon içinde etraflarını çevreleyen su molekülleri ile hidrasyon tabakası yaratmak için etkileşirler. Bu etkileşim ile su moleküllerine bağlanan iyonlar çözülebilir hale gelir. Hücre içinde iyon konsantrasyonu arttığında da kullanılabilir su miktarı az bulunur. Halofilik proteinler çökmelerini engellemek için hidrasyon tabakası oluşturmaya ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden yüzeylerindeki hidrofobik aminoasit sayısını azaltıp, hidrofilik aminoasit sayısını arttırmaya adapte olmuşlardır. Daha küçük hidrofobik aminoasitlerin (Gly, Ala, Val) oranındaki artışın daha büyük hidrofobik aminoasit kalıntıları ile karşılaştırıldığında halofilik enzimlerde diğer bir adaptif özellik olarak gözlenmektedir. Bu yüzden halofilik proteinler i) yüzeylerinde yüksek aminoasit içeriğine ii) düşük lizin içeriğine iii) nispeten protein çekirdeğindeki düşük hidrofobiklik ve iv) tuz köprülerindeki artış gibi özelliklere sahiptir (Karan vd., 2012).

Halofilik proteinlerin yüzeyi yüksek miktarda negatif yüklü olduğundan stabilizasyonları için pozitif yüke ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden potasyum hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Potasyum iyonları sodyum iyonları ile karşılaştırıldığında doğal olarak az su bağlama özelliğine sahip olduğu için ek bir

avantajdır ve hücre sodyum iyonu yerine potasyum iyonlarını biriktirmeyi tercih eder (Karan vd., 2012).

Halofilik proteinler, tuz köprüleri oluşturmak için ters yönde yüklü komşu kalıntılar ile sıklıkla etkileşim kurarlar ve bu tuz köprüleri protein katlanmasında, yapısında ve oligomerizasyonunda önemli rol oynarlar. Örneğin *H. marismortui* inin malat dehidrogenazın kristal yapısı halofil olmayan yüksek tuz konsantrasyonlarında enzim stabilesini attıran homologları ile karşılaştırıldığında tuz köprülerinin sayısının arttığı gösterilmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında genellikle halofilik proteinlerde fonksiyon ve doğal yapı arttırılır (Karan vd., 2012).

Gerçek şudur ki, halofilik olmayan proteinlerle karşılaştırıldığında, halofilik enzimlerde oldukça büyük boyutta ve sırada çoklu hidrasyon tabakası bulunur. Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktiviteyi yükseltmek ve yüklü aminoasit sayısını özellikle de protein yüzeyindeki aminoasit kalıntılarını arttırmak halofilik proteinlerde gözlemlenir (Karan vd., 2012).

Ekstrem halofilik *Halobacterium sp.* NRC1 ve diğer türler üzerindeki biyoinformatik çalışmalar, halofilik mikroorganizmalarının genomlarından tahmin edilen genel protein özellikleri olan temel kalıntılar (basic residue) üzerinde asidik sayısının (glutamik asit ve daha az derecede aspartik asit) arttığını göstermiştir. Glutamat kalıntıları diğer tüm aminoasitlere göre üstün su bağlama kapasitesine sahiptir ve genellikle halofilik proteinlerin yüzeyinde fazla miktarda bulunur. Rapor edilen %20-%23'ten fazla asidik aminoasitler, özgün aminoasitlerin yüksek bir kısmını oluşturmaktadır.

Birçok çalışmaya dayanarak yüzey negatif yüklerinin protein yüzeyinin yüksek tuzluluk koşullarında halofilik proteinlerin fonksiyonunu geliştirmek için genel bir strateji olduğu görülmektedir. Ancak, bu mekanizma evrensel olmayabilir ve ilave araştırmalar ile fonksiyon ve aktivitesi hakkında daha fazla görüş sağlanmaya devam edilmesi gerekir (Karan vd., 2012).

1.3.1. Organik çözücülerde enzim fonksiyonu

Reaksiyon karışımında organik çözücüler hidrofobik substratın çözünürlüğünü azaltırlar. Organik çözücülerde enzim aktivitesinin kaybının ana sebebi çok önemli su moleküllerinin kaybıdır. Düşük su içeriği protein oluşumunu, hareketliliğini, K_m ve V_{max} değerlerini etkiler. Su kaybı protein alt üniteleri arasında dış yüzey üzerinde

hidrojen bağ oluşumunu bozar ve proteinlerin içindeki aktif bölge etkileşimini zayıflatır. Organik çözücülerin varlığı ortamın hidrofobikliğini arttırdığından dolayı hidrofobik çekirdek için önemli kuvvetin bozulmasına sebep olur. Susuz sistemlerde enzimler enzim yüzeyi ve aktif bölgenin hidrasyonu iyi sağlanırsa aktif olabilir (Karan vd., 2012).

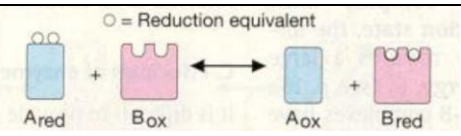
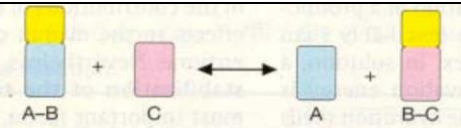
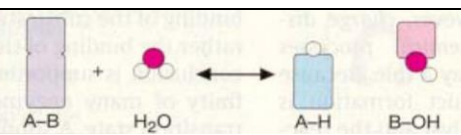
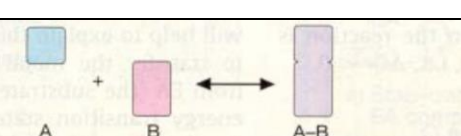
1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

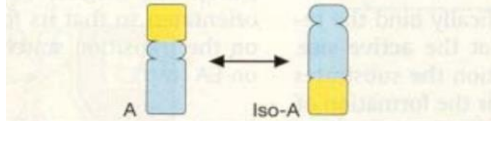
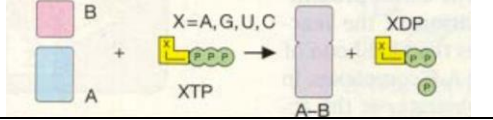
Enzimler spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandıran, substratlar için yüksek derecede spesifiteye sahip olan sulu çözeltilerde düşük sıcaklıklarda ve pH' da bile fonksiyon gösteren biyolojik katalizörlerdir.

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır ve 12.000 ila 1.000.000 üzerine kadar değişen molekül ağırlığına sahiptir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlı olup bir enzim denatüre olursa ya da alt ünitelerine ayrılırsa katalitik aktivitesi kaybolur.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılır, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır (Tablo 1.1. 'de sunulmuştur.) (Ası, 1999)

Tablo: 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması, reaksiyon tipi ve endüstriyel enzimler

	Sınıf	Reaksiyon tipi	Endüstriyel enzimler
1	Oksidoredüktazlar		Katalaz, glukoz oksidaz, lakkaz
2	Transferazlar		Glukoziltransferaz
3	Hidrolazlar		Amilaz, Selüloz, Lipaz Manannaz, Pektinaz, Fitaz, Proteaz , Pullulanaz, Ksilinaz
4	Liyazlar		pectat liyaz, Alfa-asetolactat dekarboksilaz

5	İzomerazlar		Glukoz izomeraz
6	Ligazlar		

1.4.1. Oksidoredüktazlar

Bu enzimler bir molekülden diğer moleküle elektron transferini kapsayan redoks reaksiyonlarını katalizler. Biyolojik sistemlerde sık sık bir substrattan hidrojen atomlarının uzaklaştırılmasını görürüz. Böyle reaksiyonları katalizleyen bu tip enzimlere dehidrogenazlar olarak isimlendirilir. Örneğin, alkol dehidrogenazlar A'nın hidrojenin alıcısı olduğu reaksiyonları katalizler.

Oksidoredüktazlara diğer bir örnekte dioksijen ile çeşitli substratların oksidasyonunu katalizleyen oksidazlar ve lakkazlar ve hidrojen peroksit ile oksidasyonu katalizleyen peroksidazlardır (Novazymes, 2013).

1.4.2. Transferazlar

Bu sınıfın enzimleri atom gruplarını bir molekülden diğerine ya da aynı molekülün bir pozisyonundan diğer pozisyonuna transferini katalizler. Yaygın tipleri açıltransferazlar ve glikoziltransferazlardır (Novazymes, 2013).

1.4.3. Hidrolazlar

Hidrolazlar su ile substratın parçalanmasını katalizler. Reaksiyonlar proteazlar ile proteinlerdeki peptit bağlarının, karbohidrazlar ile karbonhidratlardaki glikozidik bağlarının, lipazlar ile lipidlerdeki ester bağlarının kırılmasını içerir. Genel olarak hidrolazlar ile büyük moleküller küçük moleküllere yıklır (Novazymes, 2013).

1.4.4. Liyazlar

Liyazlar çift bağ grubunun eklenmesi ya da grupları uzaklaştırarak çift bağ oluşumu katalizler. Böylece bağlar hidrolizisin farklı bir mekanizması ile kırılır (Novazymes, 2013)

1.4.5. İzomerazlar

İzomerazlar aynı molekül içinde atomların yeniden düzenlenmesini katalizler. Örneğin glukoz izomeraz glukozu früktoza dönüştürür (Novazymes, 2013).

1.4.6. Ligazlar

Ligazlar biyosentetik reaksiyonlarda kovalent bağlarla birlikte moleküle katılırlar. Böyle reaksiyonlar difosfat bağının ATP ile hidroliziyle aynı anda gerçekleşen enerji girişi gerekmektedir ve bu tip enzimlerin ticari olarak uygulaması zordur. (Novazymes, 2013).

1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Enzimleri ve Önemi

Halofilik enzimler düşük konsantrasyonlarında aktif oldukları için özel olarak ilgilenilen enzimlerdir. Halofilik mikroorganizmaların proteinlerinin çözücü ile maruz kalan yüzeyleri negatif yüklü kalıntılara sahiptir. Bu negatif yükler su moleküllerini çeker ve bu yüzden proteinleri sulu tutar böylece prespite olmazlar. Negatif zincirle arasında hidrojen bağlarının oluşması su moleküllerinin stabil hidrasyon tabakasının oluşmasına yol açtığı gösterilmiştir (Karan vd., 2012).

Haloenzimlerle bu kadar ilgilenilmesinin sebebi onların eşsiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerin bazıları; i) yüksek tuz konsantrasyonunda optimum aktivite ve stabilite ii) yapılarını korumada tuzun rolü iii) denatürasyona karşı yüksek direnç iv) az suda ya da susuz ortamda kataliz yetenekleridir. Yaygın olarak çalışılan halofilik enzimler amilaz, proteaz, nükleaz, selülaz, kitinaz, ksilinaz, esteraz ve lipazdır (Tablo 1.2.'de sunulmaktadır.) (Karan vd., 2012).

Yüzey aktif madde, oksidan ve deterjan stabil yetenekleri olan Hindistan'ın güney kıyılarından deniz sedimentlerinden toplanan Haloalkalifilik marin *Saccharopolyspora* sp. strain A9 farklı tuz konsantrasyonlarında çalışılmış ve maksimum aktiviteyi %11 NaCl konsantrasyonun da gözlenmiştir (Chakraborty vd., 2011).

Ekstrem tuzluluktaki yerlerden izole edilen ve 16SrRNA analizi sonucu *Chromohalobacter* sp. strain TVSP101 olarak isimlendirilen halofilik mikroorganizmanın halofilik proteazı ultrafiltrasyon, etanol prespitasyonu ve hidrofobik etkileşime dayanan kolon kromotografisi ile saflaştırılmıştır. Proteaz enziminin

moleküler ağırlığı 66 kDa olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılmış enzim tuza bağımlı olup, optimum stabilitesi 4,5 M NaCl olup, maksimum aktivitede optimum sıcaklık 75°C'dir (Vidyasagar vd., 2009).

Tablo 1.2. *Halofillerden elde edilen potansiyel kullanışlı enzimler (Karan, Kumar, Sinha and Khare, 2012, s. 562)*

Enzimler	Mikroorganizmalar	Uygulama amacı	Referans
Amilaz	<i>Saccharopolyspora</i> sp. A9	Deterjan formülasyonu	Chakraborty ve ark. (2011)
	<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	Nişasta hidrolizi	Shafi ei ve ark. (2010)
	<i>Chromohalobacter</i> sp. TVSP 101	Nişasta hidrolizi	Prakash ve ark. (2009)
	<i>Bacillus</i> sp. strain TSCVKK	Deterjan formülasyonu	Kiran and Chandra (2008)
Kitinaz	<i>Virgibacillus</i> sp. <i>Terribacillus</i> sp. <i>Salinivibrio</i> sp.	Tuz stabili	Rohban ve ark.2009)
Selülaz	<i>Marinobacter</i> sp. MSI032	Alkalın, pH stabili	Shanmughapriya ve ark. (2009)
Esteraz	<i>Virgibacillus</i> sp. <i>Halobacillus</i> sp.	Tuz stabili	Rohban ve ark. (2009)
	<i>Haloarcula</i> sp.	Alkalın ve tuz stabili	Camacho ve ark. (2009)
B-galaktosidaz	<i>Haloferax alicantei</i>	Tuz stabili	Holmes ve ark. (1997)
Lipaz	<i>Salicola</i> strain IC10	Alkalın, Tuz stabili	Moreno ve ark. (2009)
	<i>Natronococcus</i> sp.	Tuz ve termal stabili	Boutaiba ve ark. (2006)
Proteaz	<i>Halobacterium</i> sp.	Alkalın, tuz stabili, balık sosu hazırlanmasında	Akolkar ve ark. (2010)
	<i>Geomicrobium</i> sp.	Alkalın, tuz ve çözücü stabili	Karan ve ark. (2011)
	<i>Halobacterium</i> sp.	Çözücü stabili, çürüme önleyici, kaplama	Akolkar ve ark. (2008)

Proteaz	<i>Halobacterium halobium</i>	Çözücü stabili, peptit sentezleyici	Ryu ve ark. (1994)
Nükleaz	<i>Bacillus</i> sp.	Alkalın, tuz ve sıcaklık stabili	Onishi ve ark. (1983)
	<i>Micrococcus</i> sp.	Alkalın, tuz stabili	Kamekura ve Onishi (1974)
Ksilinaz	<i>Thalassobacillus</i> sp. <i>Gracilibacillus</i> sp.	Tuz stabili	Rohban ve ark. (2009)
	<i>Halophilic bacterium</i> CL8	pH, tuz ve sıcaklık stabili	Wejse ve ark. (2003)

1.5.1. Halofilik proteazlar

Mikrobiyal proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük 3 grubundan birini temsil eden, dünyadaki tüm enzim satışlarının yaklaşık olarak %60'ından sorumlu olan en değerli hidrolitik enzimlerden biridir (Amoozegar vd. , 2007).

Ticari proteazlar çoğunlukla mezofilik organizmalardan elde edilir. Halofillerden elde edilen proteazlar peptit bağları sentezleyerek yüksek tuzlulukta stabil olma avantajına sahiptir. Bu özelliği kullanarak, *Halobacterium* sp' den elde edilen halofilik proteazlar balık sosu hazırlamada kullanılmıştır.

Tablo 1.3. Halofilik proteazlar

Halofiller	Halofilik enzimler	Enzimatik karakterizasyon	Yeni özellikler	Referans
<i>Geomicrobium</i> sp. EMB2	Serin proteaz	pH opt 10.0. T opt 50°C, Mw 38 kDa	Organik çözücülerde ve deterjanlarda stabil	Karan ve Khare (2010)
<i>Virgibacillus</i> sp. SK33	Serin proteaz	pH opt 7.5. T opt 55 m°C, Mw 32 kDa	4.0 M NaCl' ye kadar ve organik çözücülerde stabil	Sinsuwan ve ark. (2010)
<i>Bacillus mojavensis</i> A21	İki serin proteaz BM1 ve BM2	BM1 için pH opt 8.0–10.0, T opt 60°C, Mw 29 kDa 15.5 kDa BM2 pH 10.0	Deterjanda stabil	Haddar ve ark. (2009)
<i>Haloalkaliphilic bacterium</i> sp. AH-6	Serin proteaz	pH opt 9.0–11.0. T opt 37°C, Mw 40 kDa	pH 8.0–13.0 aralığında stabil	Dodia ve ark. (2008)
<i>Salinivibrio</i> sp. strain AF-2004	Serin metalloproteaz	pH opt 8.5. T opt 55°C, Mw 29 kDa	Organik çözücülerde stabil	Karbalaei- ve ark. (2007)

Haloalkaliphilic <i>Bacillus</i> sp.	Serin proteaz	pH opt 10.0–11.0. T opt 37°C, Mw 29 kDa	Yüzey etkinleştirici ve deterjanlarda stabil	Gupta ve ark. (2005)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain CP76	Metalloproteaz	pH opt 8.5. T opt 55°C, Mw 38 kDa	0–4.0 M NaCl’ de stabil	Sanchez-Porro ve ark. (2003)
<i>Natrialba magadi</i>	Serin proteaz	pH opt 8.0. T opt 60°C, Mw 45 kDa	pH 6.0–12.0 ve 1–3.0 M NaCl’ de stabil	Giménez ve ark. (2000)
<i>Halobacterium halobium</i> (ATCC 43214)	Proteaz	pH opt 10.0. T opt 30°C, Mw 66 kDa	4.0M NaCl ’de stabil	Ryu ve ark. (1994)
<i>Halobacterium mediterranei</i>	Serin proteaz	pH opt 8.0–8.5. T opt 55°C, Mw 41 kDa	2.0-5.0 M NaCl aralığında aktif	Stepanov ve ark. (1992)
<i>Halobacterium halobium</i>	Serin proteaz	pH opt 8.0–9.0. T opt 37°C, Mw 41 kDa	Yüksek tuz konsantrasyonlarında stabil	Izotova ve ark. (1983)

1.5.2. Halofilik lipazlar

Halofilik kaynaklardan izole edilen tuz stabil lipazların karakterizasyonu ve izolasyonu son yıllarda büyüyen bir ilgi alanı haline gelmiştir. Böyle enzimlerin kullanılabilirliği düşük su aktivitesi olduğu kadar yüksek tuz konsantrasyonlarında da aktiviteye gerek duyulan endüstriyel süreçler için olanak sağlamaktadır. Ancak, bu enzimlerin yüksek üretim fiyatlarından dolayı endüstriyel kullanımında var olan sınırlama artan modern moleküler teknolojiler ile üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır (Karan vd.,2012).

İspanya tuzlularından ılımlı halofilik ve halotolerant öbakteri tarafından üretilen hidrolazlar izole edilmiştir ve sadece 892 strainden %23’ü ekstraselüler lipolitik aktivite göstermiştir (Sanchez-Porro vd., 2003).

Lipaz ve proteaz aktivitesi gösteren ekstrem halofilik izolat *Salicola* strain IC10, biyoteknolojik uygulamalar için bir markerdir. Bu strain %15-20 NaCl, pH 8.0 ve 37 C ‘de optimum koşullar altında gelişmektedir (Moreno vd., 2009).

Arkea ile ilgili bir başka çalışmada, 118 halofilik strain lipolitik aktivite için taranmıştır. 18 strain rhodamin agar besisi tabağında pozitif bulunmuştur. En yüksek lipaz aktivitesi pH 8, sıcaklık 45-65 °C ‘de ve 3.5-4.0 M NaCl tuzlulukta belirlenmiştir. Bu sonuçlar halofilik arkeal gruplarda tuza bağımlı ve termostabil lipazların varlığını belirtmiştir (Özcan vd., 2009)

1.5.3. Halofilik amilazlar

Amilazlar biyoteknolojinin çeşitli sektörlerinde potansiyel uygulamalarda bulunduğu için en önemli enzimler arasındadır. Bu polimer parçalayan ekstraselüler halofil kaynaklı enzimler yüksek tuzlulukta birçok enzimatik dönüşümü inhibe eden zorlu endüstriyel süreçlerde kullanışlıdır. Halofilik proteazlar ve lipazlar gibi, biyoproseslerde halofilik amilazların kullanımı yüksek tuz konsantrasyonunda optimal aktivite elde etmede avantaj sağlar. Ekstrem halofilik arkea olan *Haloarcula* sp. strain S-1'den elde edilen organik çözücülere toleransı olan amilaz benzen, tolüen ve kloroform gibi birçok organik çözücülerde stabil ve aktif kalabilmekteyken etil alkol ve aseton gibi çok daha polar çözücülerin varlığında aktivitesini kaybetmektedir (Fukushima, 2005).

Halofillerden çalışılan bazı amilazlar Tablo 1.4. 'de verilmiştir. Halofilik amilaz aktivitesi genellikle optimum 6.5-7.5 aralığındadır. Halofilik amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık 45 °C -65°C'dir.

Tablo 1.4. Halofilik amilazlar

Halofiller	Enzimatik karakterizasyon	Yeni özellikler	Referans
<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	pH opt 7.5, T opt 45°C, nişasta parçalama. Mw 100 kDa (SDS), 106 kDa (gel filtrasyon)	SDS ve yüzey temizleyicide 0-4.0M NaCl, optimum 0.5M NaCl ya da 1.0M KCl 'de stabil	Shafi ei ve ark. (2010)
<i>Chromohalobacter</i> sp. TVSP 101	pH opt 9.0, T opt 65°C, Mw amilaz I 72 kDa and amilaz II 62 kDa T 1/2 80°C = 1sa,	%0-%20 (w/v) NaCl'de stabil	Prakash ve ark. (2009)
<i>Bacillus</i> sp. strain TSCVKK	pH opt 7.5, T opt 55°C	Çeşitli yüzey temizleyicilerde ve deterjanlarda stabil, Maksimum stabilite %10 NaCl	Kiran ve Chandra (2008)
<i>Haloferax mediterranei</i>	pH opt 7.0–8.0, T opt 50°C–60°C	2.0-4.0 NaCl optimum 3.0 NaCl'de stabil	Pérez-Pomares ve ark. (2009)
<i>Halobacillus</i> sp. strain MA-2	pH opt 7.5–8.5, T opt 50°C	Maksimum stabilite %5 NaCl	Amoozegar ve ark. (2003)
<i>Haloferax mediterranei</i>	pH opt 7.5, T opt 65°C	%25 NaCl 'ye kadar tolerans, T _{opt} %5 NaCl	Mijts ve Patel (2002)
<i>Bacillus dipsosauri</i>	pH opt 6.5, T opt 60°C	60°C'ye kadar stabil	Deutch (2002)

<i>Micrococcus halobius</i> ATCC 21727	pH opt 6.0–7.0 in 0.25 M NaCl veya 0.75 M KCl at 50–55°C, Mw 89 kDa	Aktivitesi distile suya karşı diyaliz ile kayboluyor	Onishi ve Sonoda (1979)
<i>Acinetobacter</i> sp.	pH opt 7.0 in 0.2–0.6 M NaCl veya KCl 50°C–55°C, Mw amilaz I 55 kDa ve amilaz II 65 kDa	Aktivitesi distile suya karşı diyaliz ile kayboluyor	Onishi ve Hidaka (1978)

1.5.4. Diğer halofilik enzimler

Proteazlar, lipazlar ve amilazların yanında karboksilesteraz, selülaz, ksilinaz, nükleaz ve β -galaktosidaz gibi hidrolazlarda halofillerde çalışılmıştır. Tablo 1.5.'te çalışılan diğer halofilik enzimler, enzimlerin karakterizasyonu ve özellikleri anlatılmıştır.

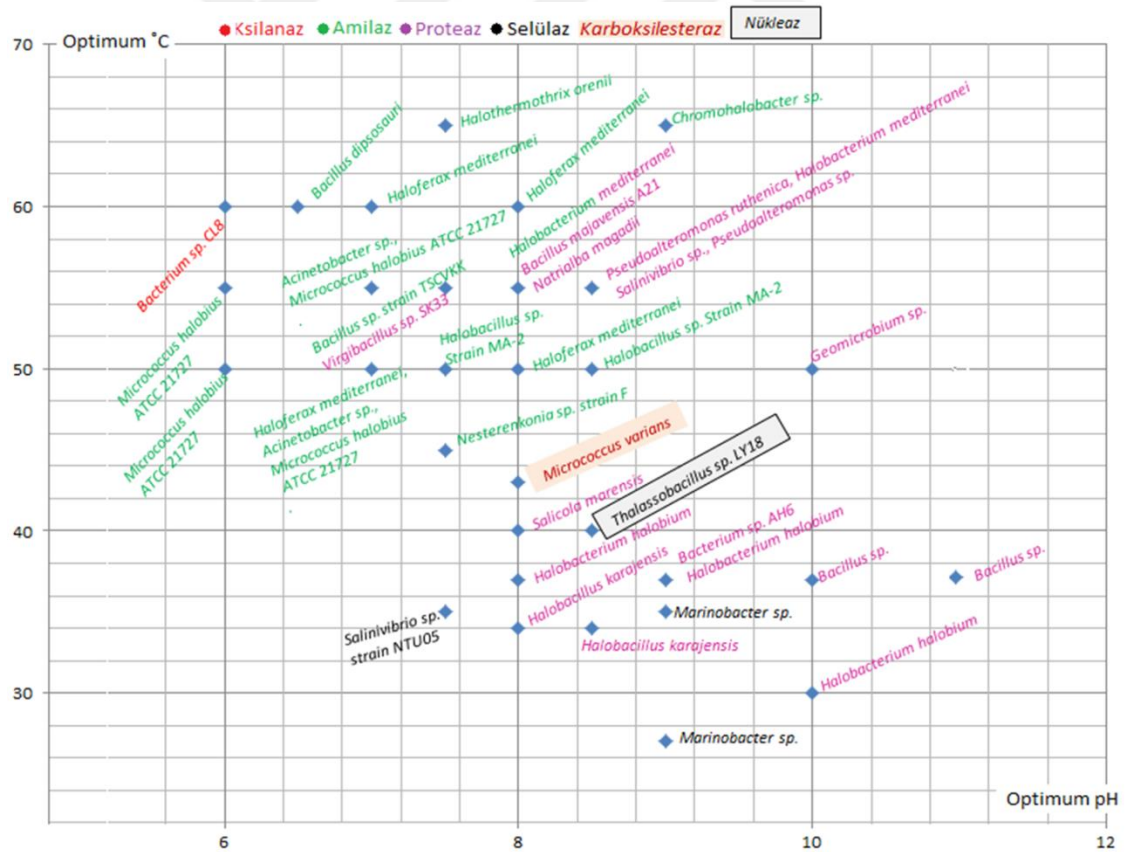
Tablo 1.5. Diğer halofilik enzimler

Halofiller	Halofilik enzimler	Enzimatik karakterizasyon	Yeni özellikler	Referans
<i>Thalassobacillus</i> sp. strain DF-E4	Karboksil esteraz	pH opt 8.5, T opt 40°C, Mw 45 kDa	pH 6.0-10.0 aralığında, sıcaklık 45 °C'nin altında stabildir. 50°C 'de aktivitesinin %36'sını, 80 °C'de tamamen inaktive olmaktadır.	Lv ve ark. (2010)
<i>Marinobacter</i> sp. MSI032	Selülaz	pH opt 9.0, T opt 27– 35°C, Mw 68 kDa	pH 12'ye kadar olan stabilitesi ile doğal alkalin	Shanmughapriya ve ark. (2009)
<i>Salinivibrio</i> sp. strain NTU05	Selülaz	pH opt 7.5, T opt 35°C, Mw 68 kDa and pHopt 9.0, Topt 27–35°C, Mw 68 kDa	10°C ve 40°C aralığında yüksek derecede stabil %100 aktivitesini pH 7.0 ve 8.0 'de 24 saat sürdürmektedir. %0 NaCl 'de %90 aktiftir ancak NaCl konsantrasyonu artıkça aktivitesini kaybeder.	Wang ve ark. (2009)
<i>Halophilic bacterium</i> , CL8	Ksilinaz 1 Ksilinaz 2	Ksilinaz 1 için pH opt 6.0, T opt 60°C Mw 43 kDa ve ksilinaz 2 için 65°C, Mw 62 kDa	Ksilinaz 1 97 dk. 60°C 'de stabildir. Ksilinaz 2 192 dk. at 60°C 'de stabil pH 4.0– 11.0	Wejse ve ark. (2003)
<i>Haloferax Alicantei</i>	B-galaktosidaz	Optimum 4M NaCl 180±20 kDa	Tuz yokluğunda sorbitolde stabildir.	Holmes ve ark. (1997)

Halophilic <i>Bacillus</i> sp.	Nükleaz (Dnaz ve RNaz aktivitesi)	DNA için pH opt 8.5, T opt 50°C and RNA için 60°C. Maksimum aktivite 1.4–3.2M NaCl ya da 2.3–3.2 M KCl varlığındadır. Mw 138 kDa'dur.	Su ve düşük tuzluluktaki solüsyona karşı diyalizle aktivitesini kaybeder.	Onishi ve ark. (1983)
<i>Micrococcus varians</i>	Nükleaz (Dnaz ve RNaz aktivitesi)	pH opt 8.0, T opt 43°C. 2.9 M NaCl ya da 2.1 M KCl, varlığında maksimum aktiviteye sahiptir. Mw 105 kDa	Düşük tuzluluktaki solüsyona karşı diyaliz ile aktivitesini kaybeder.	Kamekura ve Onishi (1974)

Özet olarak tablolarda anlatılan tüm halofilik mikroorganizmalar ve enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkla olan ilişkisi gösterilmektedir.

Tablo 1.6. Tablo 1.1., Tablo 1.2., Tablo 1.3'te araştırılan halofilik izolatların ve enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkla ilişkisi



2. MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. %12 MGM (*Modifiye Geliştirme Medium*)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	400 ml
Saf su	567 ml
Pepton	5 gr
Yeast extract	1gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.2. %23 MGM (*Modifiye Geliştirme Medium*)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	767 ml
Saf su	200 ml
Pepton	5 gr
Yeast extract	1gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.3. %10 SW DNaz test agar with toluidine blue

%30'luk tuzlu su çözeltisi	333,3
Saf su.....	567ml
DNaz test agar.....	42,1gr
Pepton.....	5 gr
Yeast extract	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Rodríguez-Valera 1985).

DNase Test Agar with Toluidine Blue içeriği

Pankreatik sindirilmiş kazein	15.0 g
Papaic Digest of Soybean Meal	5.0 g
NaCl.....	5.0 g
Deoksiribonükleik asit	2.0 g
Agar	15.0 g
Toluidine Blue O	0.1 g

2.1.1.4. %20'SW DNAz test agar with toludine blue

%30'luk tuzlu su çözeltisi	666,6 ml
Saf su.....	200ml
DNase test agar.....	42,1gr
Pepton.....	5 gr
Yeast extract	1 gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Rodríguez-Valera 1985).

2.1.1.5 %12 MGM + %2 Skim Milk Powder

%30'luk tuzlu su çözeltisi	200ml
Saf su	283,5ml
Pepton	2,5 gr
Yeast Ekstrakt.....	0,5gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 250ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Corral vd., 2018)

Skim Milk Powder.....20gr

Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 5 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Daha sonra steril edilmiş %12MGM besiyeri ile steril edilmiş %2'lik süt tozu birleştirilir.

2.1.1.6. %23 MGM besiyeri + %2 Skim Milk Powder

%30'luk tuzlu su çözeltisi383,5ml

Saf su100ml

Pepton2,5 gr

Yeast extract0,5 gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 250ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Corral ve ark. (2018).

Skim Milk Powder.....20 gr

Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 5 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Daha sonra steril edilmiş %12 MGM besiyeri ile %2'lik süt tozu birleştirilir.

2.1.1.7. %12 MGM +%0,5 Nişasta

%30'luk tuzlu su çözeltisi400ml

Saf su567ml

Pepton5 gr

Yeast extract1 gr

Nişasta5 gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Kumar vd., 2012).

2.1.1.8. %23 MGM + %0,5 Nişasta

%30'luk tuzlu su çözeltisi	767ml
Saf su	200ml
Pepton	5 gr
Yeast extract	1 gr
Nişasta	5 gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Kumar vd., 2012).

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.1.2.1. %30 Tuzlu su çözeltisi

MgSO ₄ 7H ₂ O.....	35 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	30 gr
NaBr.....	0,8 gr
HNaCO ₃	0,2 gr
KCl.....	7 gr
CaCl ₂	0,5 gr
NaCl.....	240 gr

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith, 2004).

2.1.2.2. TAE 50X (bir litre için)

Tris-base.....	242 gr
Asetik asit	57,1 ml
EDTA(0,5 M pH.8)	100 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989)

2.1.2.3. TBE 5X

Tris-base.....54 gr
Borik asit27,5 gr
EDTA(0,5 M pH.8)20 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır
(Sambrook ve ark. 1989).



2.2. METOD

2.2.1. Stokların canlandırılması

Sivas bölgesindeki Bingöl, Kemah, Fadlum gibi tuzla ve havuzlardan izole edilen 188 izolat %12 MGM ve %18 MGM besiyerlerine ekim yapılarak stoklar canlandırılmıştır.

2.2.2. Canlandırılan stokların saflık kontrolü

Canlanan izolatlar besiyerlerinde kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilip, kontaminasyon olan izolatlardan saf koloniler elde edilmiştir.

2.2.3. Hidrolitik enzimlerin taranması

2.2.3.1. Nükleaz taraması

Canlanan izolatlardan bakteriler %12 MGM + DNase test agar besiyerine, Arkealar ise %23 MGM + DNase test agar besiyerine ekim yapılmış, 37° C 'de 2 gün inkübasyonun ardından üremiş izolat çevresinde daha açık renk zon pozitif olarak kabul edilmiştir. Nükleaz enzimi üreten mikroorganizmalar besiyeri substratı olan deoksiribonükleik asiti parçalar, agar tabağı üzerinde toluidine mavisi rengi açılır ve mikroorganizma kolonisi etrafındaki açık renkler pozitif olarak kabul edilmiştir (Babavalian vd.,2013).

2.2.3.2. Proteaz taraması

Canlanan izolatlardan bakteriler % 12 MGM + % 2 Skim Milk Powder besiyerine, Arkealar ise %23 MGM +% 2 Skim Milk Powder besiyerine ekim yapılmış, 37° C 'de 2 gün inkübasyonun ardından süttozunun içindeki kazeini proteaz enzimi üreterek parçalayan izolatların çevresinde oluşan beyaz zon proteaz aktivitesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Corral vd., 2018).

2.2.3.3. Amilaz Taraması

Canlanan izolatlardan bakteriler % 12 MGM + % 0,5 Nişasta besiyerine, Arkealar ise % 23 MGM + % 0,5 Nişasta besiyerine ekim yapılmış, 37 C°'de 2 gün inkübasyonun ardından üremiş izolatlar üzerine İyot damlatılarak beyaz zon pozitif olarak kabul edilmiştir (Kumar vd., 2012).

2.2.4. İdentifikasyon

2.2.4.1. Nükleik asit analizine dayalı testler

2.2.4.1. 16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada aktivite gösteren ve tanımlanmayan mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için, ya agar ortamında geliştirilen kültürden tek koloni alınarak 200 µl steril distile su içinde ya da 200 µl sıvı kültür 12.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan pelet steril distile su içinde resüspanse edildikten sonra kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre duvarı gibi hücre materyallerinin dibe çökmesi sağlanır. Yeni bir steril tüpe aktarılarak PCR için 3-5 µl template olarak kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Mutlu, 2006, s.98.).

2.2.4.2. 16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu (İzolatların Archaea –Bacteria Ayrımının Yapılması)

Bacteria spesifik primeri kullanılarak, 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla sırasıyla, izolatların DNA ekstraksiyonundan elde edilen 1-1,5 µl template, 1 µl ileri primer (27 F /Bacteria ,1 µl geri primer (1492R/Bacteria), 12,5 µl MgCl₂, KCl, deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP,dTTP), Taq DNA polimeraz içeren Master Mix, 9,5 µl ultra saf su ile toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyonlar kurulur. 16S rRNA geni amplifikasyonlarında Bacteria için kullanılan spesifik primerler Tablo1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. 16S rRNA gen amplifikasyonu için kullanılan primer ve dizileri

1492 r Geri primer	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Universal	[Lane, DJ., 1991]
27 F İleri primer	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	Bacteria	[Lane, DJ., 1991]

Reaksiyonlar için Bio-Rad Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Bacteria 16S rRNA genlerinin amplifikasyonu için uygulanan reaksiyon şartları Tablo 1.3’de verildiği gibidir.

Tablo 2.2. 16S rRNA gen amplifikasyonu için reaksiyon şartları

	Bacteria	
İlk denatürasyon	94°C -3 dk.	30 X
Denatürasyon	94°C -30 sn.	
Bağlanma	56°C - 1 dk.	
Uzama	72°C - 1 dk.	
Son uzama	72°C – 10 dk.	
	4°C – süresiz	

Elde edilen PCR ürünle %1’lik agaroz jellerde gözlenmiştir (Anton ve ark., 1999).

2.2.4.3. İzolatlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf* I (New England Biolabs Cat no R01555) ve *Mbo* I (New England Biolabs Cat no R0147S) enzimleri kullanılmıştır.

Her bir reaksiyon için 5 U enzim, 10 µl PCR ürünü, restriksiyon enzimine uygun buffer ve steril distile su (20 µl toplam hacim olacak şekilde) kullanılmıştır. Karışım 37°C’ de bir gece inkübe edilmiş ve analiz amacıyla 0.5X TBE (Tris- Borik asit-EDTA) tamponu içindeki %2’lik agaroz jele yüklenerek 5 V/cm elektrik akımı uygulanarak 4 saat yürütülmüşlerdir. ARDRA jellerinde marker olarak 1 Kb Plus DNA ladder ile birlikte 50 bp DNA Ladder (Invitrogen) kullanılmıştır (Mutlu, 2006, s.105). ARDRA sonucu elde edilen farklı patternler dizi analizi için seçilmiştir.

2.2.5. Besi ortamında zon çapı karşılaştırması ile en yüksek proteolitik aktivite gösteren 4 mikroorganizmanın seçilmesi

188 izolat içerisinde % 2 süt tozu içeren besiyerinde substratı parçalayıp inhibisyon zonu oluşturan 22 proteaz pozitif izolattan, zon çaplarına göre proteaz enzim aktivitesi en iyi 4 mikroorganizma seçilmiştir.

2.2.6. Proteaz aktivitesi yüksek olan mikroorganizmaların büyüme eğrileri ve aktivitelerinin en yüksek olduğu saatin tespit edilmesi

2.2.6.1. *Salinivibrio costicola*'nın büyüme eğrisi

Salinivibrio costicola sıvı kültüründen 50 ml %12 MGM sıvı besiyerine 1 ml inokülasyon yapılarak 37 °C ve 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden 2 saat arayla 500 µl örnek alıp 600 nm' de ölçüm yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır.

2.2.6.2. *Öninokulum kültürü hazırlama ve inokülasyon*

%12 MGM katı besiyerinde *Salinivibrio costicola* 37°C 24 saat inkübasyonun ardından, 50 ml %12 MGM içeren sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12. saatinde mikroorganizma durgun fazda iken 600 nm absorbansta OD değeri $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak kontrol edildikten sonra bazal besiyeri ve süt tozu besiyerine 1'er ml inokülasyon yapılmıştır.

Bazal besiyeri yeast extract 10gr/L; pepton 10gr/L; D-glukoz 10g/L ve NaCl 100gr/L olarak hazırlandı. Süt tozu ilaveli besiyeri içeriği; süt tozu 20gr /L, yeast extract 5 gr /L, %12 MGM olarak hazırlandı. 37°C 120 rpm 'de inkübasyonun ardından 2 saatte bir kültürden numune alınıp enzim aktivitesi değerlerine bakılmıştır.

2.2.6.3. *Microbulbifer halophilus*'un büyüme eğrisi

Microbulbifer halophilus sıvı kültüründen 50 ml %12 MGM sıvı besiyerine 500 µl inokülasyon yapılarak 37 °C ve 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden 2 saat arayla 500 µl örnek alıp 600 nm' de ölçüm yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır

2.2.6.4. Öninokulum Kültürü hazırlama ve İnokülasyon

%12 MGM katı besi ortamında *Microbulbifer halophilus* 37°C 24 saat inkübasyonun ardından, 50 ml %12 MGM içeren sıvı besi ortamına inoküle edilerek 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12. saatinde mikroorganizma durgun fazda iken 600 nm absorbansta OD değeri $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak kontrol edildikten sonra bazal besi ortamı ve süt tozu besi ortamına 1’er ml inokülasyon yapılmıştır.

Bazal besi ortamı yeast extract 10gr/L; Pepton 10gr/L ; D-glukoz 10g/L ve NaCl 100gr/L olarak hazırlandı. Süt tozu ilaveli besi ortamı içeriği; süt tozu 20gr /L, yeast extract 5 gr /L, %12 MGM ‘dir. 37°C 120 rpm ‘de inkübasyonun ardından 2 saatte bir kültürden numune alınıp enzim aktivitesi değerlerine bakılmıştır.

2.2.6.5. Halomonas organivorans’ın büyüme eğrisi

Halomonas organivorans sıvı kültüründen 50 ml %12 MGM sıvı besi ortamına 500 µl inokülasyon yapılarak 37 °C ve 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden 2 saat aralıklarla 500 µl örnek alıp 600 nm’ de ölçüm yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır.

2.2.6.6. Öninokulum kültürü hazırlama ve İnokülasyon

%12 MGM katı besi ortamında *Halomonas organivorans* 37°C 24 saat inkübasyonun ardından, 50 ml %12 MGM içeren sıvı besi ortamına inoküle edilerek 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12. saatinde mikroorganizma durgun fazda iken 600 nm absorbansta OD değeri $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak kontrol edildikten sonra bazal besi ortamı ve süt tozu besi ortamına 1’er ml inokülasyon yapılmıştır.

Bazal besi ortamı yeast extract 10gr/L; pepton 10gr/L ; D-glukoz 10g/L ve NaCl 100gr/L olarak hazırlandı. Süt tozu ilaveli besi ortamı içeriği; süt tozu 20gr /L, yeast extract 5 gr /L, %12 MGM ‘dir. 37°C 120 rpm ‘de inkübasyonun ardından 2 saatte bir kültürden numune alınıp enzim aktivitesi değerlerine bakılmıştır.

2.2.6.7. F2S50 kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi

F2S50 kodlu sıvı kültüründen 50 ml %12 MGM sıvı besi ortamına 500 µl inokülasyon yapılarak 37 °C ve 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden 2 saat aralıklarla 500 µl örnek alıp 600 nm’ de ölçüm yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır.

2.2.6.8. Öninokulum kültürü hazırlama ve İnokülasyon

%12 MGM katı besi ortamında F2S50 kodlu mikroorganizmanın 37°C 24 saat inkübasyonun ardından, 50 ml %12 MGM içeren sıvı besi ortamına inoküle edilerek 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12. saatinde mikroorganizma durgun fazda iken 600 nm absorbansta OD değeri $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak kontrol edildikten sonra bazal besi ortamı ve süt tozu besi ortamına 1’er ml inokülasyon yapılmıştır.

Bazal besi ortamı yeast extract 10gr/L; pepton 10gr/L ; D-glukoz 10gr/L ve NaCl 100gr/L olarak hazırlandı. Süt tozu ilaveli besi ortamı içeriği; süt tozu 20gr /L, yeast extract 5 gr /L, %12 MGM ‘dır. 37°C 120 rpm ‘de inkübasyonun ardından 2 saatte bir kültürden numune alınıp enzim aktivitesi değerlerine bakılmıştır.

2.2.7. Proteaz enzim aktivitesinin ölçümü ve maksimum olduğu üreme saatinin belirlenmesi

50 mM Tris-HCl (pH 8, 37 °C) tampon içinde hazırlanmış %1 kazein çözeltilisinden test tüpü ve kör tüpüne 1900 µl aktarılır. İnkübasyondaki kültürden 100 µl enzim örneği alınarak test tüpüne ilave edilir. Tüpler çalkalamalı su banyosunda 10 dakika 37 °C 200 rpm de inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından test tüpüne 3 ml %5 TCA (pH 8), kör tüpüne ise kültürden alınan enzim örneği ve TCA aynı anda ilave edilir reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra test tüpleri ve kör tüpleri 4 °C 14.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra süpernatat kısmı 0,45µl selüloz asetat membran filtreden geçirilerek ayrılır. Elde edilen filtrat iyice temizlenen quartz küvetlerine yaklaşık 2 ml kadar aktarılır (Johnvesly and Naik, 2001). Köre karşı 280 nm dalga boyunda okuma yapılır. Bu aşamalar ve ölçümler her iki saatte bir alınan örnek ve mikroorganizma için tek tek yapılmıştır. Elde edilen verilen Excel ile grafiğe dönüştürülmüştür.

3. BULGULAR

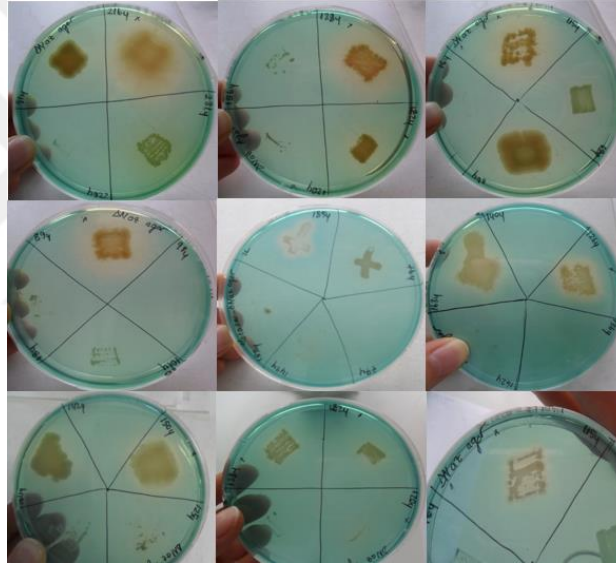
3.1. İzolatların Seçimi

Stoklardan toplamda 188 izolat uygun besi ortamlarında canlandırılmıştır.

3.2. Hidrolitik Enzimlerin Taraması

3.2.1. Nükleaz taraması

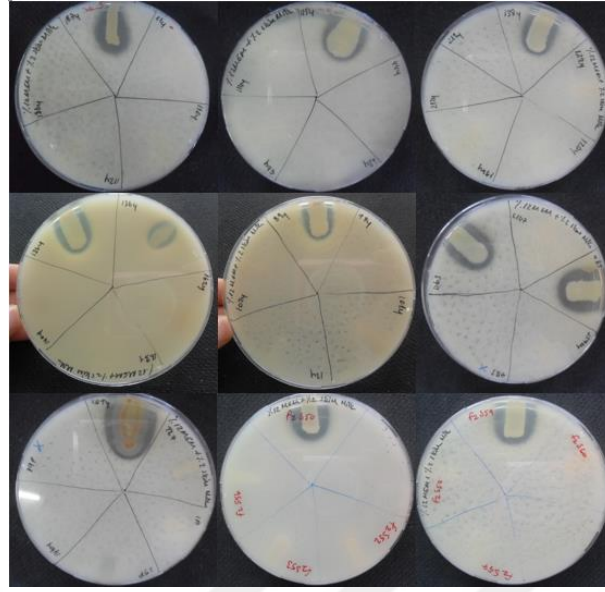
Toluidine Blue boyalı DNaz test agar besiyerine ekilen 188 adet izolattan nükleaz aktivitesi pozitif olan 42 izolattan bir kısmı Şekil 3.1’de sunulmaktadır.



Şekil 3.1. Nükleaz pozitif izolatlar sırasıyla 216y, 138y, 115y, 89y, 185y, 126y, 163y, 150y, 138y, 122y, 115y’dir. İzolatların etrafındaki beyaz zonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Proteaz taraması

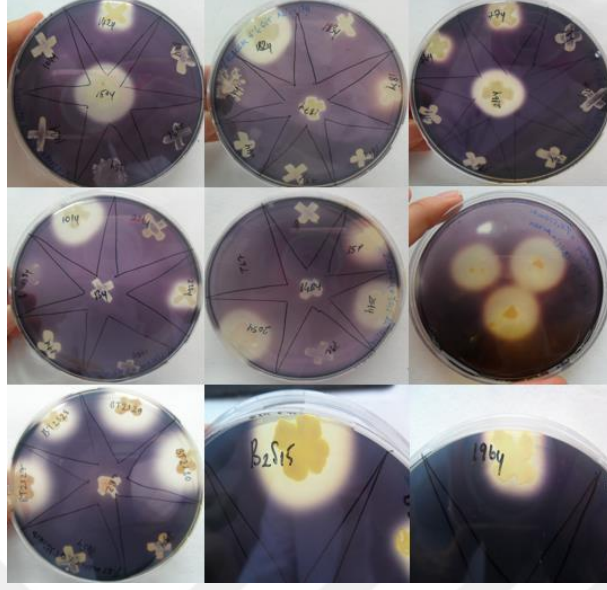
Substrat olarak % 2 süt tozu bulunan besiyerlerinde üretilen proteaz enzimi sayesinde 172 izolattan 16’sı pozitif olup Şekil 3.2’ de sunulmaktadır.



Şekil 3.2. *Proteaz pozitif izolatlar sırasıyla 187y, 115y, 138y, 126y, 136y, 89y, D63, D85, 205y, F2S50, F2S59. Mikroorganizma etrafında oluşan beyaz zonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.*

3.2.3. Amilaz Taraması

Canlanan izolatlardan bakteriler % 12 MGM + % 0,5 Nişasta besiyerine, arkealar ise % 23MGM +% 0,5 Nişasta besiyerine ekim yapılmış, 37° C ‘de 2 gün inkübasyonun ardından üremiş izolatlar üzerine iyot damlatılarak beyaz zon pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.3).

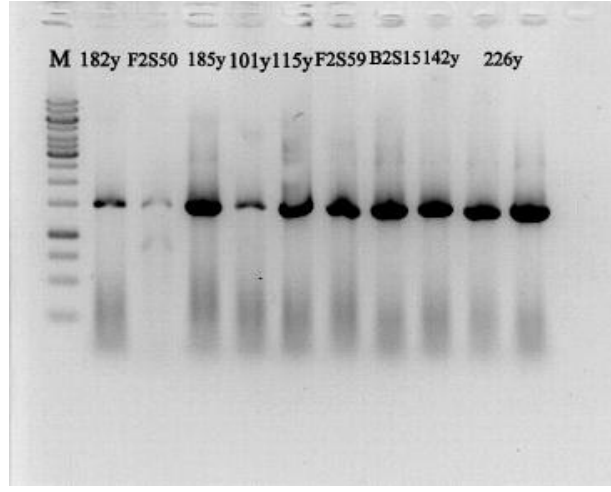


Şekil 3.3. Amilaz pozitif izolatlar sırasıyla 150y, 142y, 182y, 216y, 77y, 101y, 35p, 201y, 205y, BT2S27, BT2S28, BT2S29, BT2S30, B2S15, 196y'dir. İnkübasyonun ardından besiyeri yüzeyine damlatılan iyot sonrasında izolat çevresinde gözlenen beyaz zon pozitif olarak kabul edilmiştir

3.3. İdentifikasyon

3.3.1. 16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu ve 16S rRNA PCR

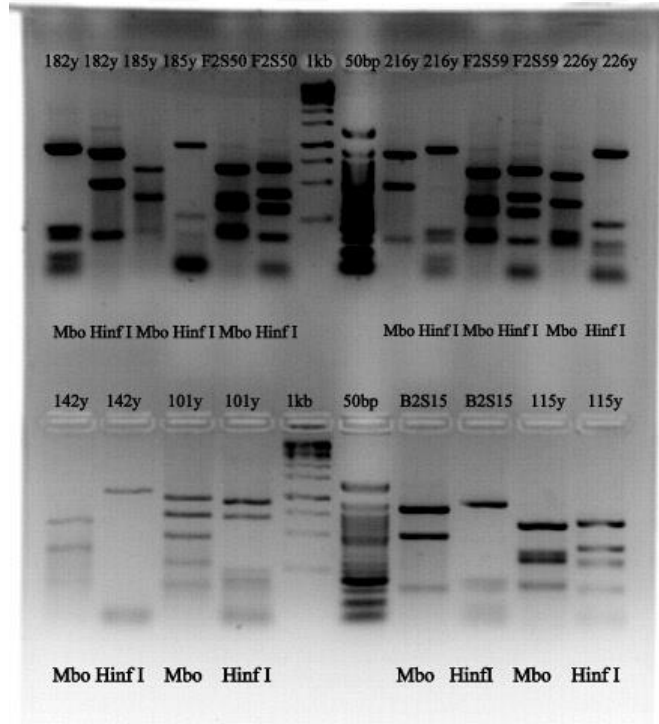
Nükleaz, proteaz ve amilaz taramaları sonucu en iyi izolatlar seçilmiştir. Seçilen izolatlar arasında tür tayini yapılmamış izolatların DNA ekstraksiyonları yapıp Bacteria spesifik primerleri kullanarak 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlar sırasıyla 182y, F2S50, 185y, 101y, 115y, F2S59, B2S15, 142y ve 226y olup, agoroz jel elektroforezi ile yürütülerek UV görüntüleme sonucu jel görüntüsü Şekil 3.4'de sunulmaktadır.



Şekil 3.4. 16S rRNA PCR jel görüntüsü

3.3.2. İzolatlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

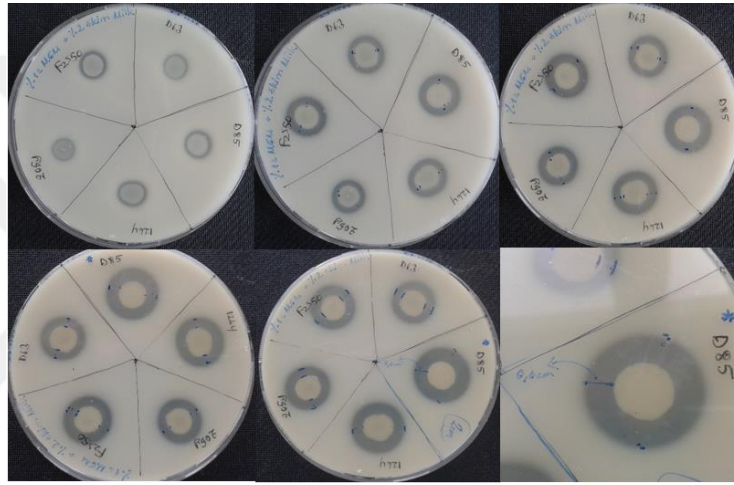
Aktivitesi iyi olan izolatlar arasında tanımlanmamış mikroorganizmaların ARDA profilleri çıkartılarak aynı patternler belirlenip dizi analizi öncesi ön eleme yapılmıştır. ARDRA profillerine göre 216y, B2S15 ve 182y, F2S50 ve F2S59, 142y, 101y, 185y, 226y, 115y olmak üzere 7 farklı profil gözlenmiştir (Şekil 3.5). ARDRA ile izolat sayısı azaltılmış ilerde dizi analizi için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.5. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünlerinin Mbo ve Hinf I enzimleri kullanarak elde edilen jel görüntüsü

3.4. Besi Ortamında Zon Çapı Karşılaştırması ile En Yüksek Proteaz Aktivitesi Gösteren 4 Mikroorganizmanın Seçilmesi

Yapılan taramalar sonucu nükleaz, proteaz ve amilaz enzimleri için en iyi aktiviteye sahip mikroorganizmalar belirlenmiş olup, proteaz enzimiyle çalışmalara devam edilmiştir. Proteaz enzimi üretme potansiyeli en yüksek olan halofilik mikroorganizmalar sırasıyla D85(*Salinivibrio costicola*), 205y (*Microbulbifer halophilus*), F2S50 ve D63(*Halomonas organivorans*) (Şekil 3.6’da sunulmaktadır).

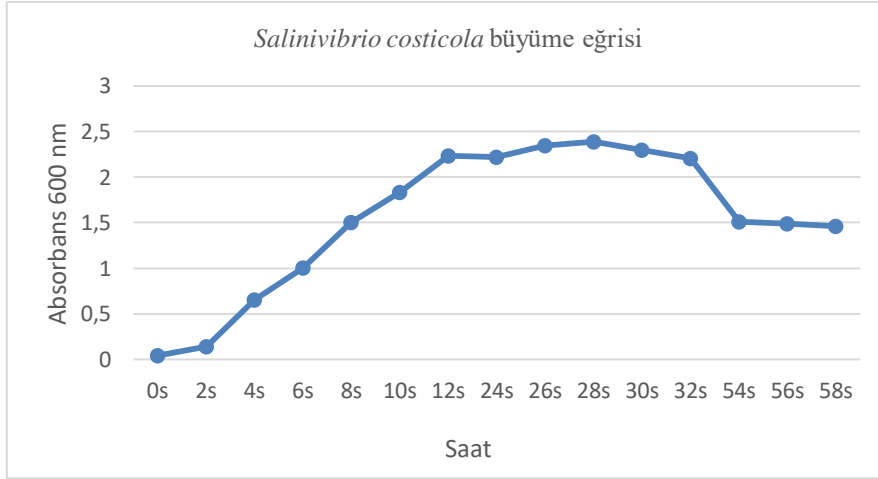


Şekil 3.6. Proteaz aktivitesi en yüksek 4 mikroorganizmanın aynı besiy ortamında inhibisyon zonları arasındaki fark ifade edilmiştir. Mikroorganizmalar sırasıyla D85(*Salinivibrio costicola*), 205y (*Microbulbifer halophilus*), F2S50 ve D63 (*Halomonas organivorans*.)’tür.

3.5. Proteaz Aktivitesi Yüksek Olan Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri ve Aktivite Grafiği

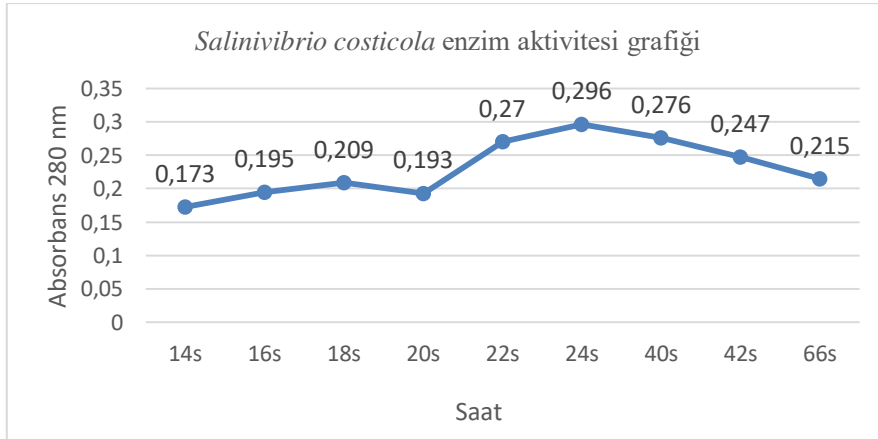
3.5.1. *Salinivibrio costicola*'nın büyüme eğrisi

Tablo 3.1. *Salinivibrio costicola* büyüme eğrisi



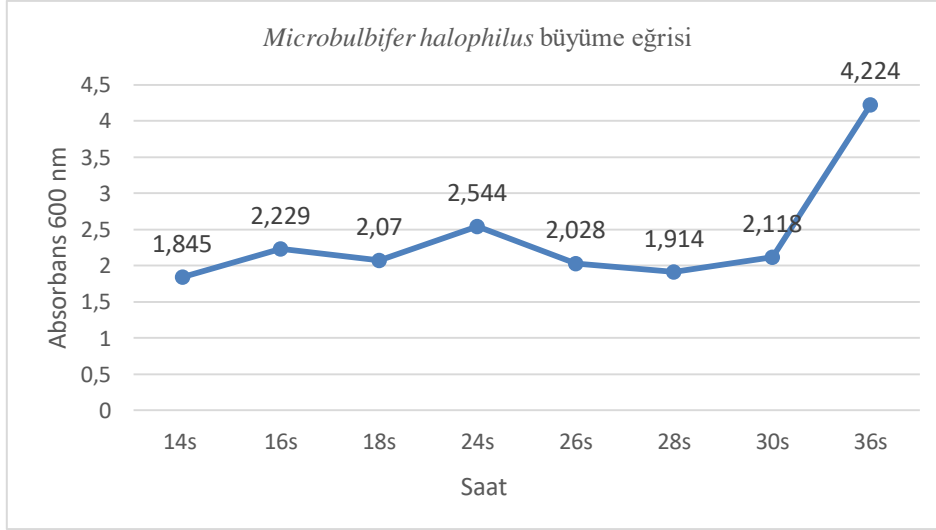
3.5.2. *Salinivibrio costicola*'nın proteaz enzim aktivitesi grafiği

Tablo 3.2. *Salinivibrio costicola* proteaz enzim aktivitesi grafiği



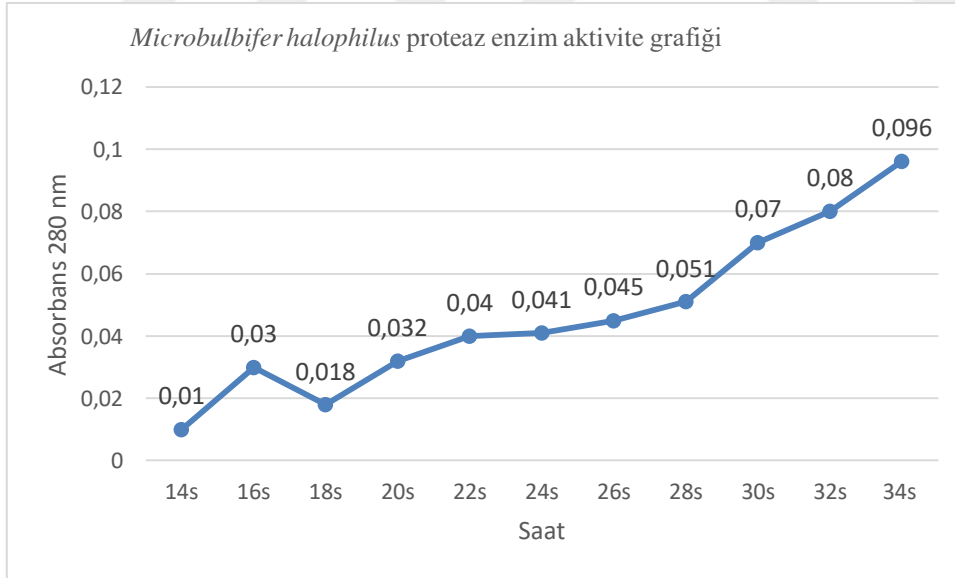
3.5.3. *Microbulbifer halophilus*'un büyüme eğrisi

Tablo 3.3. *Microbulbifer halophilus* büyüme eğrisi



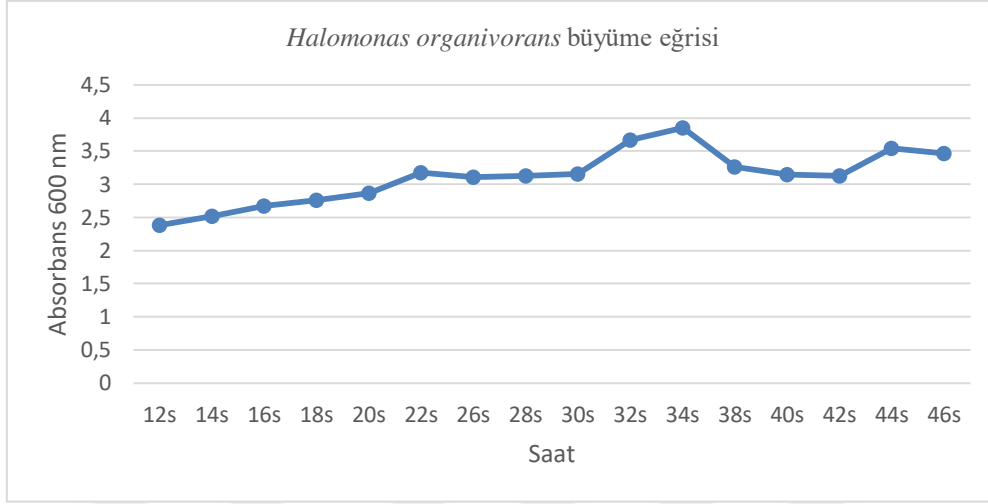
3.5.4. *Microbulbifer halophilus* enzim aktivite grafiği

Tablo 3.4. *Microbulbifer halophilus* enzim aktivite grafiği



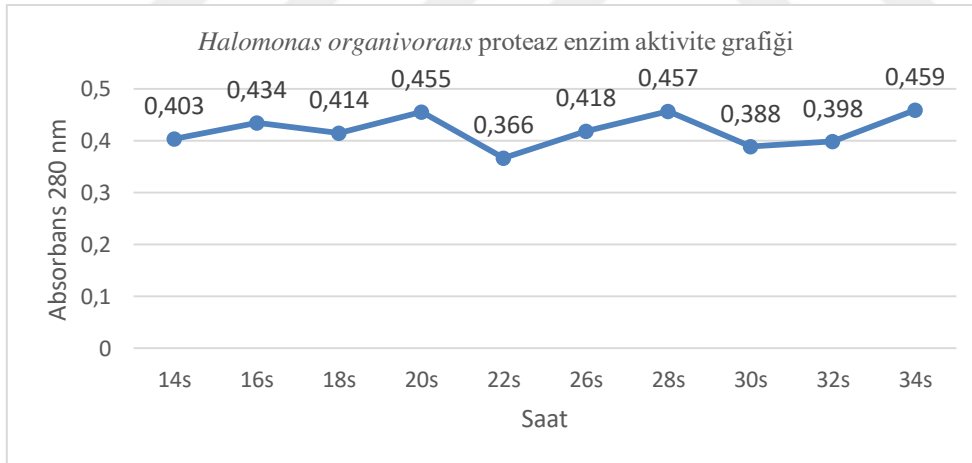
3.5.5. *Halomonas organivorans*'ın büyüme eğrisi

Tablo 3.5. *Halomonas organivorans* büyüme eğrisi



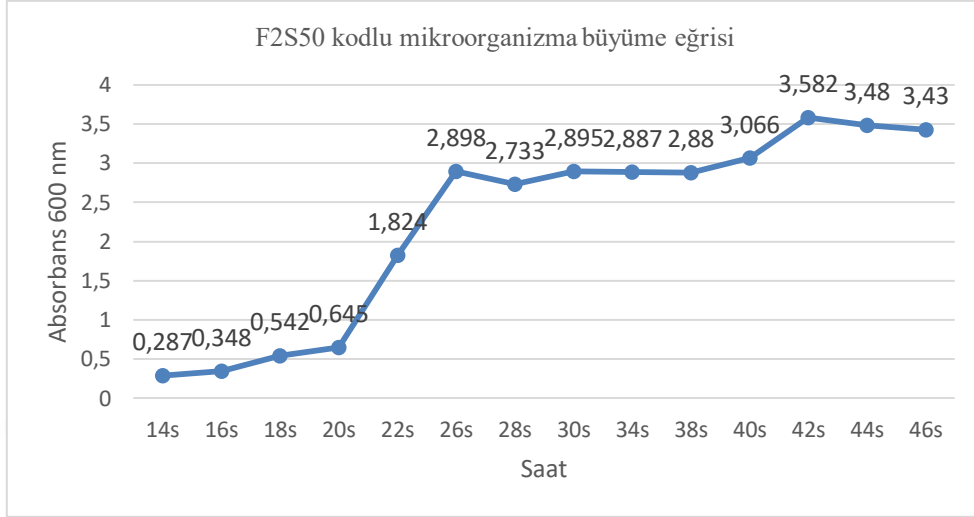
3.5.6. *Halomonas organivorans* proteaz enzim aktivite grafiği

Tablo 3.6. *Halomonas organivorans* proteaz enzim aktivite grafiği



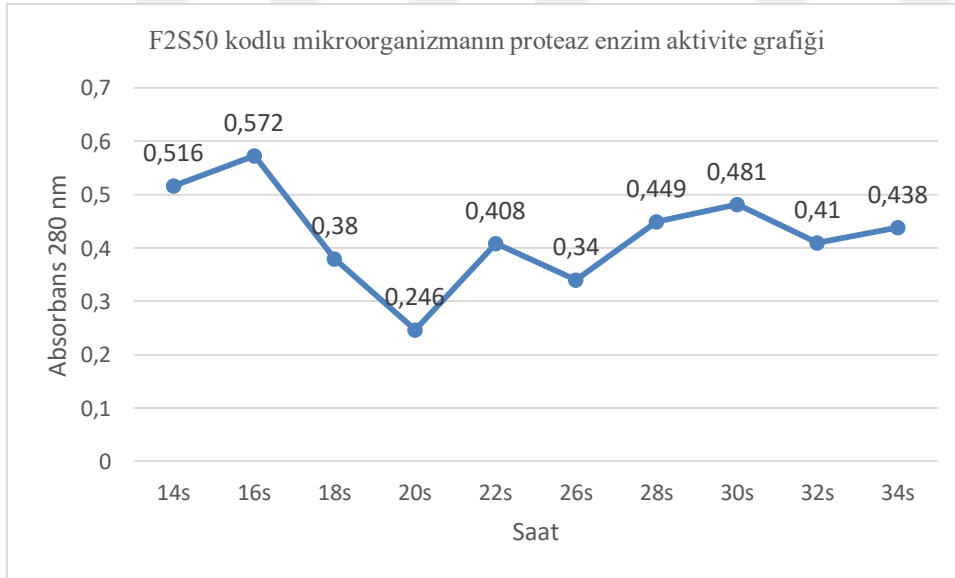
3.5.7. F2S50 kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi

Tablo 3.7. F2S50 kodlu mikroorganizmanın büyüme eğrisi



3.5.8. F2S50 kodlu mikroorganizmanın proteaz enzim aktivite grafiği

Tablo 3.8. F2S50 kodlu mikroorganizmanın proteaz enzim aktivite grafiği



TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamak için çeşitli stratejiler geliştirmesi bakımından ilgi çekici organizmalardır. Aşırı tuzluluğa karşı dayanıklı enzimleri, bu tuzlukta yaşamak için geliştirdikleri stratejiler, özel proteinlerinin varlığı sebebiyle biyoteknolojik olarak çok önemli mikroorganizmalardır. Bu nedenle aşırı halofilik ve ılımlı halofilik mikroorganizmaların tanımlanması, biyoteknolojik potansiyellerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Türkiye'nin farklı tuzluları ve tuz göllerinden elde edilen mikroorganizmaların enzim potansiyellerinin ortaya konması ileriki çalışmaların için de ışık tutacak niteliktedir.

Günümüze kadar keşfedilen enzimlerin büyük bir kısmı düşük sıcaklıkta, düşük tuzlulukta ve kısıtlı pH aralığında çalışmaktadır. Bu enzimler endüstrinin ihtiyacı olan geniş pH aralığı, yüksek tuzluluk ve yüksek sıcaklık koşullarında istenen verimi sağlayamamaktadır. Bu yüzden talebi karşılamak için bu enzimleri üretecek mikroorganizmaların keşfi ve yeni enzimlerin çalışılmasına olanak sağlamıştır (ezgi yardımcı, tez tartışma).

Bu tez çalışmasında Sivas bölgesindeki Bingöl, Kemah, Fadlum gibi tuzla ve havuzlardan izole edilen izolatların ekstraselüler nükleaz, proteaz ve amilaz enzimi üretim yetenekleri belirlenmiştir. Taramalar nükleaz, proteaz ve amilaz enzimlerinin substratlarının besi yerine ilavesiyle enzim-substrat ilişkisi baz alınarak yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren izolatın enzim aktivitesi artırılması amacıyla kültür koşulları optimize edilmeye çalışılmıştır. Aktivite gösteren ve tanımlanamayan türlerin de 16s rRNA gen amplifikasyonu yapılarak tür tayini yapılmıştır.

Nükleaz taramasında mikroorganizmalar DNaz test agara ekim yapılmış olup inkübasyon sonunda koloni çevresinde oluşan açık renk ihibisyon zonu aktivite olduğunu göstermiştir ve bu yöntemle aktivitesi yüksek olan mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Kanlayakrit ve ark. (2001) nitrojen kaynağı olarak kullanılan kazamino asit ve yeast extract mini kavanoz fermentörde thai sosundan elde edilen halotolerant bütretim akteri *Pseudomonas sp.* No. 3241 tuz olmadan maksimum büyüme ve ribonükleaz aktivitesi göstermiştir.

Babavalian ve ark. (2013) DNaz aktivesi %10 NaCl ve 0.008 g/L toluidine blue içeren 42 g/L DNaz test agar medium kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. 34C 4

günlük inkübasyonun ardından 1N HCl ile yıkanmıştır. Kolonilerin çevresindeki inhibisyon zonları DNaz aktivitesi olduğunu göstermiştir.

Proteaz taramasında %2 skim milk powder ortamında İnokülasyon yapılarak 37°C’ de 2 gün inkübasyona bırakılarak İnokülasyon sonrası koloni çevresindeki inhibisyon zonuna göre aktivite gösteren türler seçilmiştir.

Kumar ve ark., (2012), izolatların proteolitik taramalarında 10.0 g/L jelatin içeren besi yerleri kullanmıştır. Asidik civa klorür ile muamele sonucu jelatin etrafında şeffaf zon gösteren izolatlar seçilerek proteaz üreten bakteri olarak adlandırıldı.

Chuprom ve ark. (2016), halofilik proteaz üreticisi olan *Halobacterium sp.* Strain LBU50301 tuz ile fermente edilmiş balık örneklerinden izole edilmiş ve 16S rDNA gen analizi yapılmıştır. Süt tozu (%0,8 (w/v) 1000 mL pH8.0) ilaveli besi yerinde birincil tarama gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı fermentasyonda halofilik proteaz üretimi gerçekleştirilmiştir.

Corral ve ark. (2018), %10 NaCl ve %2 süt tozu içeren marine agar besiyerinde saf bakteriyal izolatlar 37°C ‘de 48 saat inkübasyonun ardından, koloni çevresindeki en yüksek hidroliz zon çapı ölçülerek seçim yapılmıştır. Seçilen izolatlar 37°C 120 rpm’ de pH 7,35 ‘e ayarlanarak 24 saat inkübe edilmiştir.

Amilaz taramasında mikroorganizmalar %0,5 nişasta ilaveli besiyerlerine ekim yapılarak 37°C’ de 2 gün inkübasyonun ardından iyot çözeltisi damlatılarak inhibisyon zonuna sahip mikroorganizmalar amilaz üretim yeteneği pozitif olarak kabul edilmiştir.

Bajpai ve ark. (2015), *Haloferax sp.* HA10 %1 nişasta ile 3M NaCl konsantrasyonuna sahip besi ortamında 37°C pH 7 ‘de maksimum amilaz aktivitesi göstermiştir. Amilaz üreten strainlerin taranmasında nişastalı agar tabaklarına ekim yapılmış, inkübasyonun ardından iodine solüsyonu (%2 I₂ ve %0,2 KI) ile muamele sonrasında koloni çevresindeki zon çapına göre yapılmıştır.

Salgaonkar ve ark. (2018), amilolitik aktiviteyi belirlemek için %0,2 çözünebilir nişasta ilaveli besi ortamında 37C inkübasyonun ardından I₂ (0.3% I₂–0.6% KI) solüsyonu ile zon çapı büyüklüklerine bakarak belirlemişlerdir.

188 adet hem archea hem bacteria domaininden halofilik mikroorganizmaların nükleaz, proteaz ve lipaz taramaları yapılmıştır. Tanımlanamayan ve aktiviteleri yüksek izolatlar için de DNA izolasyonu yapıp 16srRNA PCR’ı ile DNA miktarı artırılıp ARDRA ile 7 farklı pattern elde edilmiştir. Bu 7 farklı pattern daha sonra yapılacak olan dizi analizi çalışmalarında yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Nükleaz, amilaz ve proteaz enzim yeteneklerine göre tarama yapılan organizmalar içerisinde en yüksek zon çapına sahip olan halofilik mikroorganizmalar belirlenmiştir. halofilik mikroorganizmalar sırasıyla D85 (*Salinivibrio costicola*), 205y (*Microbulbifer halophilus*), 126y (*Salinivibrio sp.*) , F2S50 ve D63 (*Halomonas organivorans*)’tür. Çalışmalara proteaz enziminin aktivite çalışmaları ile devam edilecektir.

Salinivibrio costicola sıvı besiyerinde geliştirilerek her 2 saatte olmak üzere besi ortamından örnekleme yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu saati belirlemek için belirli saatlerde örnekler alınıp enzim aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucu 24. saat *Salinivibrio costicola* için proteaz aktivitesinin en yüksek olduğu saat olarak tespit edilmiştir.

Microbulbifer halophilus sıvı besi ortamında geliştirilerek her 2 saatte olmak üzere besi ortamından örnekleme yapılarak büyüme eğrisi çıkartılmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu saati belirlemek için belirli saatlerde alınan örnekler ile aktivite ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucu *Microbulbifer halophilus*’un 34.saatten sonra aktivitesinin artacağı düşünülmüştür. Daha sonraki çalışmalardan örnekleme saatleri daha da arttırılarak en yüksek aktivite saatine ulaşılması düşünülmüştür.

F2S50 kodlu halofilik mikroorganizma sıvı besi ortamından geliştirilerek her 2 saatte bir yapılan ölçümlerle büyüme eğrisi çıkartılmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu saati belirlemek için belirli saat aralıklarında örneklemeler yapılarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucu F2S50 kodlu mikroorganizmanın 16.saatte en yüksek aktiviteye ulaştığı görülmüştür. Ölçümler 34. saate kadar alındığından aktivitenin daha yüksek olabileceği düşünülerek daha sonraki çalışmalarda 34. Saatten sonrası da aktivite analizi yapılması düşünülmüştür.

Halomonas organivorans sıvı besi ortamından her 2 saatte alınan örnekleme ile büyüme eğrisi çıkartılmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu saati belirlemek için belirli saat aralıklarında örneklemeler yapılarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucu *Halomonas organivorans* 34.saatte en yüksek aktiviteye ulaştığı görülmüştür.

Sivas bölgesindeki Bingöl, Kemah, Fadlum gibi tuzla ve havuzlardan izole edilen 188 izolat içerisinde yapılan aktivite çalışmaları sonucu en yüksek proteaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar ve saatleri tespit edilmiş olup, literatüre ve daha sonraki araştırma konularına katkı sağlamıştır. Proteaz enziminin yüksek

tuzlulukta ve yüksek pH değerinde aktivite değerlerinin iyi olması endüstride kullanım potansiyeli açısından önemli bir üstünlük sağlayacağı düşünölmektedir. Tez çalışması sonrasında eldeki bu veriler ışığında seçilen mikroorganizmalar ile enzim üretimi yapılarak enzim saflaştırma çalışmalarıyla enzim karakterizasyonu belirlenip endüstriyel açıdan üretim gerçekleştirilerek enzim piyasasına katkı sağlaması düşünölmektedir.



KAYNAKÇA

- Amoozegar, M., Fatemi , A., Karbalaee-Heidari, H. and Razavi M. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004, *Microbiological Research*, 369—377.
- Anton, J., Oren,A., Benlloch , S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., Rosello-Mora, R.(2002). *Salinibacter ruber* gen.nov.,sp. nov., a novel extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 485–491.
- Asl,T. (1999), Tablolarla Biyokimya cilt 2, Ankara
- Babavalian, H., Amoozegar, M., Pourbabaee, A., Moghaddam, M., Shakeri ,F. (2013). Isolation and Identification of Moderately Halophilic Bacteria Producing Hydrolytic Enzymes from the Largest Hypersaline Play a in Iran. *Microbiology*, 466-474.
- Bajpai, B., Chaudhary, M. and Saxena, J. (2015). Production and Characterization of α -Amylase from an Extremely Halophilic Archaeon, *Haloferax* sp. HA10 Food Technology, Biotechnology. 11–17.
- Chakrabortya, S., Khopadea, A., Biaob,R., Jian , W., Liub, X., Mahadika,K., Chopadec, B., Zhangb, L., Kokarea,C. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable-amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68 (2011) 52–58.
- Corral, J., Villalobos, S., Bargan,L., Figueroa, J., Vasquez-Murrieta, M., Alvarado, M., Chavez, L.(2018). Isolation of moderately halophilic bacteria in saline environments of Sonora State searching for proteolytic hydrolases. *Open Agriculture*. 2018; 3: 207–213.
- Chuprom, J., Bovarnreungroja, P., Ahmadb, M., Kantachotea, D., Dueramae, S.(2016). Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology. *Biotechnology Reports* . 17–28
- Dinigüzel, Ö. (2007) Türkiye’den PHB üreticisi halofilik bakterilerin izolasyonu. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara : Ankara Üniversitesi.

- DasSharma, P., Coker J., Valeria, H., DasSharma S. (2010). Halophiles, Industrial Applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. 1-9.
- DasSarma, S. and DasSarma, P. (2012). Halophiles. *John Wiley & Sons.*, 1-11
- Da Costa, M., Santos, H. and Galinski E. (1998). An Overview of the Role and Diversity of Compatible Solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 61, 118-149
- Dyall-Smith, M. (2004), Halohandbook, [www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook)
- Fukushima,T., Mizuki, T., Echigo, A. Inoue,A. and Usami, R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*, Volume 9,85-89.
- Guo, J., Zhou,E., Wang,D., Tian,C., Wang,P., Uddin, M. (2008). A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Springer , Biodegradation* . 15-19.
- Johnvesly, B. and Naik, G. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*. 139–144.
- Kanekar, P., Kanekar,S., Kelkar, A., Dhakephalkar, P. (2012). Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. *Environmental Management: Microbes and Environment*. 1-33.
- Karan, R., Kumar, S., Sinha R. and Khare S.K. (2012). Halophilic Microorganisms as Sources of Novel Enzymes . *Microorganisms in Sustainable Agriculture 555 and Biotechnology*. 555-579.
- Karan, R., Capes, M. and DasSarma, S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity, *aquatic biosystems*, 3-15.
- Kumar, S., Karan, r., Kapoor,S., Singh, S., Khare, S.(2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1595-1603.
- Le Borgne, S., Paniagua D. and Vazquez-Duhalt , R. (2008) Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea . *Journal of Molecular Microbiolgy and Biotechnology* 2008;15:74–92.

- Margesin, R., ve Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Ekstremophiles* ,5:73–83.
- Mohammadipanah, F., Hamed, J. and Dehhagdi , M. Halophilic Bacteria: Potentials and Applications in Biotechnology. *Development and Biodiversity* . 277-321.
- Moreno, M., Garcia, M., Ventosa, A. & Mellado, E. (2009). Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase-and protease producing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecolgy* 68, 59–71
- Mutlu, M. (2006). Tuz Gölü Bakterilerinin Mevsimsel Dağılımı ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi. Eskişehir : Anadolu Üniversitesi
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28-56-63.
- Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., and Caliskan, M. (2009). Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Volume 36,105-110.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J. F. (1985), Variation of environmental features and microbial populations with salt concentration in a multi-pond saltern , *Microb. Ecol.* 11:107-115.
- Salgaonkar, B., Sawant, D., Harinarayanan, S., Bragança, J. (2018). Alpha-amylase Production by Extremely Halophilic Archaeon *Halococcus* Strain GUVSC8. *Biosynthesis Nutrition Biomedical Research Article* . 1-34.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Porro, C., Martin. S, Mellado, E. and Ventosa, A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. 295–300
- Shakuri ,S. , Latifi, A., Mirzaei, M., Khodi, S. (2016) Isolating Two Native Extreme Halophilic Bacterial Strains Producing Bacteriorhodopsin Protein from Aran-Bidgol Lake. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, Volume 3, 447-451.

Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., Rajakumar, S.(2008). Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*. 17.

Yüksel, F. ve Akçelik, M. (2015). Mikrobiyal biyosümfektanlar: yüzey aktif bileşikler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3). 1-9.

Vidyasagar,M., Parakash,S., Mahajan,V., Shouche,Y., Sreeramulu,K. (2009). Purification and characterization of an extreme halotermophilic protease from a halophilic chromohalobacter sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology* . 40:12-19

Wang,G., Kennedy, S., Fasiludeen, S., Rensing, C., DasSarma, S.(2004). Arsenic Resistance in *Halobacterium* sp. Strain NRC-1 Examined by Using an Improved Gene Knockout System *Journal of bacteriology*. May 2004, p. 3187–3194.

<https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document library/Brochures Downloads/General-materials/Enzymes at work.pdf>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: ELÇİN ŞEN

Yabancı Dil: İNGİLİZCE

Doğum Yeri ve Yılı: BALIKESİR/ 1990

E-Posta: elcin.biter@hotmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

□ 2007-2012 Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

□ 2013-2019 Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji

Bilim Dalı, Genel Biyoloji Anabilim Dalı

□ 2013-2016 Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğrenci İşçi

□ 2016 Anadolu Üniversitesi Bibam DNA Laboratuvarı

Yayımları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

□ Haziran,2014 Arş.Gör.Dr.Ertorun N.,Şen C.,Biter E.,Bazı Hydraenidae (Insecta:

Coleoptera) Türlerinin Moleküler ve Morfolojik Analizleri,22.Ulusal Biyoloji Kongresi

□Haziran, 2012 Çitgöl Termal Kaplıcası Prokaryotik Populasyonlarının Moleküler

Karakterizasyonu

.

.