T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AŞIRI HALOFİL ARCHAEA SUŞLARININ α-AMİLAZ, GLUKOZ OKSİDAZ, β-GALAKTOSİDAZ VE AMİLOGLİKOSİDAZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

ÇİĞDEM SAĞER
(Kimya Öğretmeni)
(141100520040009)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR

İSTANBUL 2007

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AŞIRI HALOFİL ARCHAEA SUŞLARININ α-AMİLAZ, GLUKOZ OKSİDAZ, β-GALAKTOSİDAZ VE AMİLOGLİKOSİDAZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

ÇİĞDEM SAĞER
(Kimya Öğretmeni)
(141100520040009)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR

İSTANBUL 2007

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans çalışmam süresince, aktarmış olduğu birikimler, göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayıştan dolayı, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe OGAN'a, yaptığı teorik bilgi ve deneysel katkılar ile göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayış ile bu çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği bulunan ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Meral BİRBİR'e,

Bu çalışma esnasında laboratuarlarında bulunan hassas terazi, pH metre ve vakum etüvü cihazını kullanmama imkân tanıyan Organik Kimya A.B.D.'nın çok değerli öğretim üyeleri ve asistanlarına; her türlü bilgi ve yardımını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Serap DEMİR ve Özkan DANIŞ'a,

Kimya Bölümü'nün olanaklarını kullanımına açan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yurdun FIRAT'a,

Tüm eğitim ve özel yaşantım boyunca bana maddi ve manevi olarak hiçbir zaman desteğini ve ilgilerini eksik etmeyen, hayatımda büyük emekleri bulunan çok değerli ve sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

HAZİRAN, 2007 **ÇİĞDEM SAĞER**

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖNSÖZ ……...i

İÇİNDEKİLER……...ii

ÖZET…….....v

ABSTRACT……...vi

SEMBOL LİSTESİ……vii

KISALTMA LİSTESİ…...……...viii

ŞEKİL LİSTESİ…….....ix

TABLO LİSTESİ……..…x

BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ……..1

I.1. GİRİŞ……...1

I.2. AMAÇ…….....2

BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER……3

II.1. ARAŞTIRMA BÖLGESİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER…….3

II.1.1. Tuzlu Ortamlar……3

II.1.2. Araştırma Bölgelerinin Tanıtımı……...……4

II.1.2.1. Araştırma Bölgelerinin Özellikleri **…….4**

II.2. ARKEBAKTERİ HAKKINDA GENEL BİLGİ ……...5

II.2.1. Arkebakteri Enzimleri ve Biyoteknolojik Önemleri.....7

II.3. α-AMİLAZ, GLUKOZ OKSİDAZ, β-GALAKTOSİDAZ, AMİLOGLİKOSİDAZ ENZİMLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER…….....9

II.3.1. Mikrobiyal α-Amilaz Ailesine Genel Bir Bakış…..…...….9

II.3.2. Glukoz Oksidaz Enzimi……..…….10

II.3.3. β-Galaktosidaz Enzimi……..…….…….....10

II.3.4. Amiloglikosidaz Enzimi……..…….…....11

BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....12

III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ…….…….……....12

III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI …….……...……...13

III.2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar…….13

III.2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler..14

III.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

III.3.1. Kullanılan Besiyerleri ……..15

III.3.2. Kullanılan Çözeltiler ……..16

III.3.2.1. α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler……..**16**
III.3.2.2. Glukoz Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler……..**17**
III.3.2.3. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler……..**17**
III.3.2.4. Amiloglikosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler……..**17**

III.3.3. %25, %15 NaCI İçeren Besiyerlerinde Aşırı Halofil Arkebakterilerin Çoğaltılması……..……...17

III.4. ENZİM AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜLMESİ…….....……...18

III.4.1. α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi……....……...…18

III.4.2. Glukoz Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi……...19

III.4.3. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi…….....19

III.4.2. Amiloglikosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi……...20

III.5. α-AMİLAZ ENZİM AKTİVİTESİ SONUÇLARININ TEKRARLANABİLİRLİĞİ……20

BÖLÜM IV. SONUÇLAR……..…….……....21

IV.1. ENZİM AKTİVİTELERİ....……..…..22

IV.1.1. α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri…….....22

IV.1.2. Glukoz Oksidaz Enzim Aktivitesi…….....33

IV.1.3. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesi…….....33

BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER…….34

KAYNAKLAR…….…38

ÖZGEÇMİŞ ……..**48**

ÖZET

HALOFİL İZOLATLARIN α-AMİLAZ, GLUKOZ OKSİDAZ, β-GALAKTOSİDAZ VE AMİLOGLİKOSİDAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Günümüzde, endüstride uygulanan doğal olmayan ortamlarda etkin olan, yüksek tuz konsantrasyonlarında, yüksek ısıda veya organik çözücülerde etki edebilen enzimlere veya mikroorganizmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda ülkemizin zengin mikrobiyal biyoçeşitliliğinin avantajını kullanarak farklı tuzlu ortamlarda karbonhidrat sindirebilen enzimleri üreten aşırı halofil Arkebakteri izolatları incelenmiştir.

Tuz Gölü, Tuzköy, Kaldırım Tuzlası ve Kayacık Tuzlası araştırma bölgelerinden ayrımı yapılan 30 aşırı halofil izolatın α-amilaz, glukoz oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatların tamamı α-amilaz enzimi üretmiştir. Tuz Gölü izolatlarının α-amilaz aktivitesinin; 0,82-6,02 Ünite, Tuzköy Tuz Madeni izolatlarının; 1,62-5,77 Ünite, Kaldırım Tuzlası izolatlarının; 0,18-5,08 Ünite ve Kayacık Tuzlası izolatlarının; 1,46-3,28 Ünite arasında değiştiği saptanmıştır. Kalitatif olarak glukoz oksidaz ve β-galaktosidaz aktivitesi gösteren izolatların kantitatif olarak kayda değer miktarda glukoz oksidaz ve β-galaktosidaz enzimi üretmedikleri saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde önemli miktarda bir aktivite saptanmamıştır.

Aşırı halofil Arkebakterilerin enzim aktiviteleri üzerine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir ve bu suşların yüksek enzimatik aktiviteleri için optimal inkübasyon süresi tayin edilmiştir. Bu suşlar için yüksek enzimatik aktivite, %25 NaCI içeren besiyerinde ve 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir.

Tuz Gölü ve Tuzköy tuz madeni suşlarının en etkili karbonhidrat sindiren enzimlere sahip olduğu bulunmuştur.

HAZİRAN, 2007 **ÇİĞDEM SAĞER**

ABSTRACT

α-AMYLASE, GLUCOSE OXIDASE, β-GALACTOSIDASE AND AMYLOGLUCOSIDASE ACTIVITIES OF HALOPHILIC ISOLATES

Nowadays, industrial applications are demanding enzymes or microorganisms that can act in nonconventional media such as high salt concentration, high temperature or organic solvents. Taking the advantage of microbial biodiversity of our country, we examined extremely halophilic *Archaea* which can produce enzymes digesting carbonhydrates in different saline environments. The α-amylase, glucose oxidase, β-galactosidase and amyloglucosidase activities of 30 halophilic strains isolated from Tuz Lake, Tuzköy Salt Mine, Kaldırım and Kayacık Salterns were determined.

The effect of different salt concentrations and the optimal incubation time on enzymatic activities of extremely halophilic *Archaea* were determined. α-Amylase activities were found as; 0,82-6,02 and 1,62-5,77 units for Tuz Lake and Tuzköy Salt Mine, 0,18-5,08 and 1,46-3,28 units for Kaldırım and Kayacık Saltern isolates respectively. Although, all the isolates showed glucose oxidase and β-galactosidase activity qualitatively but they did not produce recordable amounts of glucose oxidase and β-galactosidase enzymes. Considerable amount of amyloglucosidase activity was not determined for the isolates. Highest enzymatic activities for the isolates were attained at growth medium containing 25% NaCI after four weeks of incubation time.

It was concluded that the strains of Tuz Lake and Tuzköy Salt Mine have the most potent carbohydrate degrading-enzymes.

JUNE, 2007 **ÇİĞDEM SAĞER**

SEMBOL LİSTESİ

α : Alfa

β : Beta

^{o}C : Santigrat Derece

m : Ağırlık

µ : Mikro

mL : Mililitre

U : Ünite

Km : Kilometre

km^2 : Kilometrekare

m^2 : Metrekare

g : Gram

L : Litre

M : Molar

µmol : Mikromol

nm : Nanometre

KISALTMA LİSTESİ

Abs **:** Absorbans

Akt. **:** Aktivite

Dak. **:** Dakika

BSA **:** Bovine Serum Albumin

diğ. **:** Diğerleri

ONPG **:** Orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid

AMG **:** Amiloglikosidaz

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO.

Şekil IV.1. Maltoz Standart Eğrisi……22

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO.

Tablo IV.1. Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri…….23

Tablo IV.2. Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Nişasta Sıvı Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Aktiviteleri……..…..24

Tablo IV.3. Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri.....25

Tablo IV.4. Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-amilaz ve Amiloglikosidaz Aktiviteleri…..……26

Tablo IV.5. α-Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği için Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri……..……...……...27

Tablo IV.6. α-Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği için Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri…….28

Tablo IV.7. α-Amilaz Enzim Aktivitelerinin Tekrarlanabilirliği için Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri…..……..29

Tablo IV.8. α-Amilaz Aktivitelerinin Tekrarlanabilirliği için Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Total Enzim Aktiviteleri……..30

Tablo IV.9. Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri suşlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Aktiviteleri…….30

Tablo IV.10. Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri …….31

Tablo IV.11. Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri……..…32

Tablo IV.12. Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri ……...…….33

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Bugün endüstride uygulanan doğal olmayan ortamlarda etkin olan, örneğin yüksek tuz konsantrasyonlarında, yüksek ısıda veya organik ortamlarda etki edebilen enzimlere veya mikroorganizmalara gereksinim duyulmaktadır. Ilımlı veya orta şiddetteki pH ve sıcaklıkta çalışabildiklerinden dolayı biyokatalizörler, kimyasal proseslere göre daha az atık ürettikleri için "yeşil kimya" olarak adlandırılırlar (Krieger ve diğ., 2004). Biyokatalizörlerin amacı genellikle normal metabolik yollar ile üretilemeyen bir bileşiği sentezlemek olduğundan bu işlemi yapabilecek biyokatalizörü bulmak hiç de kolay değildir. Bu biyokatalizörü bulmak iki yolla olabilir. Bu yollardan birincisinde; genellikle dünyamızda şimdiye kadar keşfedilmemiş biyoçeşitliliğine yönelinir ya da ikinci yol olarak bilinen; biyokatalizörün moleküler yöntemler kullanılarak iyileştirilmesi yoluna gidilir. Her iki yaklaşımda da istenen aktivitede, seçicilikte ve kararlılıktaki uygun biyokatalizörü bulmak için çok sayıda örneği taramak gerekir (Reymond, J. 2004).

Şu an bilinmekte olan mikroorganizmalar, türlerinin çok az bir kısmını temsil etmektedir. Örneğin tüm dünyadaki bakteri türlerinin sadece %0.2–0.6, mantarların %5'i, yosunların ise %24'ü bilinmektedir (Wubbolts, Bucke, Bielecki, 2000). Yeni doğal biyokatalizörlerin üretimi için ekstremofiller çok ilginç bir kaynaktır ve pratikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ekstremofillerin pek çoğu Arkebakteriye aittir ve bakterilerde bulunmayan pek çok enzim ve kofaktör içerirler. Pek çok hipertermofilik, halofilik, piesofilik, psikrofilik Arkebakteriler ekstrem şartlara

dayanabilen enzimler üretmektedirler. Gelişimleri için ekstrem şartlara ihtiyaç duyan mikroorganizmalar, ekstremofiller olarak adlandırılmaktadırlar. Bu mikroorganizmaların ürettikleri enzimler ise ekstremozimler olarak adlandırılan biyokatalizörlerdir ve ekstrem şartlar altında işlev gösterebilen proteinler olarak da ifade edilebilirler. Çeşitli biyoteknolojik proseslerde uygulama alanı bulan yüksek potansiyele sahip ekstremozimler; amilaz, selülaz, proteaz, pektinaz, keratinaz, lipaz, peroksidaz ve esteraz gibi enzimlerdir. Ekstremofillerin ve ekstremozimlerin, biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarının geliştirilmesi amacıyla dünya çapında oldukça büyük yatırımlar yapılmaktadır. Ekstremozimlerin, endüstriyel uygulamalarda oldukça ekonomik olması da dikkat çekmektedir. Önümüzdeki yıllarda, ekstremozimlerin, çok sayıda farklı biyokatalitik uygulamalarda kullanılabileceği tahmin edilmektedir (Gomes, Steiner, 2004).

I.2. AMAÇ

Biz bu çalışmamızda ülkemizin zengin mikrobiyal biyoçeşitliliğine yönelerek biyoteknolojik önemlerinden ötürü aşırı tuzlu ortamlarda karbonhidrat sindirebilen enzimleri üreten Arkebakteri izolatlarını inceleyerek farklı tuz kaynaklarından ayırımı yapılan toplam 30 halofil izolatın α-amilaz, glukoz oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz aktivitelerini belirlemeği amaçlıyoruz. Besiyerlerinin tuz konsantrasyonlarını değiştirerek farklı tuz konsantrasyonunun bu enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkisini ve izolatlar için uygun inkübasyon süresini saptamaya çalışacağız. İzolatların enzim aktivite değerlerinin tekrarlanır olup olmadığını saptamak için farklı zamanlarda ekimler yaparak enzim aktivitelerini bölgelere göre ve birbirleri ile kıyaslamayı ve hangi bölgenin daha etkin karbonhidrat sindiren aşırı halofil Arkebakteri suşlarına sahip olduğunu belirlemeyi amaçlıyoruz.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. ARAŞTIRMA BÖLGESİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

II.1.1. Tuzlu Ortamlar

Türkiye gerek Akdeniz, gerekse Ege Denizi gibi tuzlu denizlerde sahilleri bulunması ve zengin kara ve kaynak tuzu rezervlerine sahip olmasından dolayı tuz potansiyeli yönünden zengin ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizde olduğu gibi dünyada da tuz üretimi deniz, göl ve kaya tuzlalarından sağlanmaktadır (İlter, 2000). Dünyamızın en büyük tuz kaynağı denizlerdir. Denizlerin tuzluluk oranları, coğrafik konumlarına ve tatlı su alıp almadıklarına göre değişir (Koday, 1999).

Tuzlu ortamlar dünyanın her tarafında yaygın olduğu halde çok fazla tuzlu ortamlar ise genelde yaygın değildir. Bu ortamların çoğu sıcak ve kuru ortamlardır. Tuz göllerindeki iyonlar oldukça değişken olabilir. Aşırı tuzlu göllerdeki iyonlar çevrenin topografisine, jeolojisine ve genel iklim durumlarına göre değişebilir. Utah'daki Büyük Tuz Gölü'nde genellikle konsantre olmuş deniz suyu bulunur. Bu sebepten çeşitli iyonların nispi oranları deniz suyundakine benzer, buna rağmen bu iyonların konsantrasyonları bu gölde daha yüksektir. Büyük Tuz Gölü'ndeki en yaygın katyon sodyum, en yaygın anyon ise kloriddir. Ortamın pH'ı alkali olduğundan önemli miktarda sülfat bu ortamda bulunur. Üretken ekosistemler olan tuz göllerinde Arkebakteriler sıklıkla bulunur. (Valera, 1988; Birbir ve Kallı, 2000).

II.1.2. Araştırma Bölgelerinin Tanıtımı

II.1.2.1. Araştırma Bölgelerinin Özellikleri

Tuz Gölü

Ülkemizde tuz elde edilen en önemli göl olan Tuz Gölü İç Anadolu Bölgesinde Ankara, Konya ve Aksaray illeri sınırları içerisinde yer almaktadır. Tuz Gölü 1660 km^2'lik yüzölçümüne sahip, kapalı bir havza olup Van Gölü'nden sonra Türkiye'nin ikinci büyük gölüdür (Koday 1999). Dünyadaki en önemli tuz göllerinden biridir ve bu bölgeden alınan tuz hemen hemen saf bir şekilde bulunur (İnandık 1955, Koday 1999, İlter 2000).

İklim özellikleri bakımından Tuz Gölü, bulunduğu bölgedeki şiddetli buharlaşma ve yıllık yağış miktarının yetersizliği nedeniyle yarı kurak iklim koşullarının etkisi altındadır. İç Anadolu'nun Konya-Niğde-Yozgat üçgeni içinde kalan alanlarında yarı kurak koşullar çok daha etkilidir. Yıllık indis değerlerine göre bu alanlar kuraklık sınırına daha yakındır (Koday, 1999). Tuz Gölü'ndeki tuzluluk oranı yazın %32,9 gibi çok yüksek bir orana ulaşmaktadır. Kimyasal bileşimi bakımından bu tuz saf yemeklik tuzdur (NaCl). Göldeki sodyum klorür oranı magnezyum klorür ve sodyum sülfat oranlarından çok yüksektir. Tuz Gölü yüzeyindeki 1.200 km^2'lik bir alanda tuz oluştuğu ve göldeki tuz miktarının 210 milyon ton olduğu ileri sürülmüştür. Göldeki NaCl oluşumu sebebinin, Neojen'den beri kapalı havza konumunda kalan göle uzun periyodik dönemler sonucunda gelen Na^+ ve Cl^- iyonlarının devamlı birikmesi, uygun jeokimyasal şartlar altında kaya tuzu çökmesinin başlaması ve tabandaki dom ve tuz duvarlarının tektonik hatlar boyunca tuzlu su getirmesi sonucu olduğu açıklanmıştır (Koday, 1999). Tuz Gölü'nün yüzey rezervi yılda 211.200.000 tondur (Elbek ve diğ., 1995; Uyanık, 2004). Tuzlu göl sularından tuz üretimi, suların güneş altında buharlaşması sonucu tuzun kristalleşmesi esasına dayanmaktadır (Uyanık, 2004).

Tuzköy Tuz Madeni

Örneklerin alındığı Tuzköy Tuz Madeni, Nevşehir'e 34 km, Tuzköy'e 2 km uzaklıktadır. Kaya tuzu %35 Na, %56 Cl, %1,6 SO_4 ve %6 oranında suda erimeyen madde içermektedir. Yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkarılan görünür tuz yaklaşık 60m derinde yer almaktadır. Muhtemel rezerv 96.384.456 ton, mümkün rezerv ise

956.411.250 ton NaCl olarak belirlenmiştir. İşletmede, yerkabuğu içinde birikim yapmış tuz, yeraltına inilerek oda-topuk yöntemi ile yer üstüne çıkarılmıştır. Tuzköy Tuz Madeni, topukların fazla yük sonucu çökmesi ve yeraltı suyunun bu çöküşü hızlandırması sonucunda kapatılmıştır (Çubuk ve diğ., 2000; Birbir ve diğ., 2004a).

Kaldırım Tuzlası

Kaldırım Tuzlası Tuz Gölü'nün en eski tuzlalarından birisidir. Kaldırım Tuzlası havuzlama sistemi projesi ile 12 km^2 alana sahip dört havuz yapılmış olup, üretim ve stoklama modernleştirilmiştir. Ülkenin ihtiyacına göre planlanan ve yıllar itibariyle artan miktarlarda tuz üretimi ve satışı yapılmaktadır (Uyanık, 2004).

Kayacık Tuzlası

Ankara'nın Şereflikoçhisar İlçe Merkezi'nin güneybatısında ve ilçe merkezine 13 km uzaklıkta bulunan tuzlanın kuzeydoğu kısmı küçük tepelerle çevrili olup, diğer yönleri de Tuz Gölü ile çevrili yarımada görünümündedir (Eryılmaz, 2003). Kuruluşu ile ilgili kesin bilgiler bulunmamakla birlikte, 1973 yılında tuz üretimine başlandığı bilinmektedir. 1.980.000 m^2 alanda faaliyet gösteren işletme, Hamzalı, Çavuş, Karamollauşağı köylerine ait arazi üzerinde bulunmaktadır. Tuzlanın yıllık tuz üretim kapasitesi 800.000 – 900.000 tondur. Kayacık Tuzlası, Tuz Gölü'ndeki tuzlalar içinde üretimi en fazla olan tuzladır (Uyanık, 2004; Birbir ve Elevi, 2005).

II.2. ARKEBAKTERİ HAKKINDA GENEL BİLGİ

Ribozomal RNA'daki ribonükleotid sırasına göre canlılar *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olmak üzere üç ana aleme ayrılırlar. Bu alemlerin her birinin pek çok fenotipik özellikleri bulunmaktadır. Filogenetik açıdan önemli olan fenotipik özellikler; hücre duvarı yapısı, lipidler, RNA polimeraz ve protein sentezindeki farklılıklardır (Balows ve diğ., 1981; Madigan, 2000; Birbir ve diğ., 2000).

Membran lipidlerinin kimyasal yapısı, *Bacteria*'dan *Archaea*'yı ayırt etmede kullanılır. *Bacteria* ve *Eukarya*'da hücre zarı lipidlerini meydana getiren yağ asitleri ve gliserol ester bağı ile birbirine bağlanırken *Archaea*'nın hücre zarı lipidleri ester bağı ile birbirine bağlanan uzun hidrokarbon zincirleri ve gliserolden oluşur (Hedrick ve diğ., 1991; Kates ve diğ., 1982; Kushner, 1985; Birbir ve diğ., 2000).

Son 20 yıldır halofil *Archaea*'nın çeşitli karbon kaynaklarını kullandığı açıklanmıştır. *Halobacterium saccharovorum, Haloferax, Haloarcula* gibi pek çok türün karbon ve enerji kaynakları olarak karbonhidratları kullandıkları bilinmektedir. Özellikle *Haloferax* cinsi gliserol, asetat ve diğer basit karbonhidratları kullanır (Oren, 1994; Javor, 1984; Birbir ve diğ., 2000; Birbir ve diğ., 2003).

Archaea'nın RNA polimeraz yapısı *Bacteria*'nınkinden daha komplekstir. Metanojenlerin ve halofiliklerin RNA polimerazı beş büyük, üç küçük olmak üzere sekiz polipeptidden oluşur. Aşırı sıcak ortamlarda gelişen *Archaea*'da on farklı polipeptidden oluşan daha kompleks bir RNA polimeraz bulunmaktadır (Madigan, 2000; Vreeland, 1993).

Archaea; *Crenarchaeota, Euryarchaeota* ve *Korarchaeota* olarak üç ana alt aleme ayrılır. *Euryarchaeota*, *Archaea*'nın fizyolojik olarak alt gruplarını içerir ve bunların çoğuda farklı aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu grubun içerisinde metanojenik *Archaea* (metan gazı üretenler) ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) gibi bakteriler bulunur. Aşırı halofillerin büyük bir kısmı zorunlu aeroplardır (Madigan, 2000; Spring ve diğ., 1996; Valera, 1981; Vreeland, 1993).

Halofil bakteri grupları, gelişmeleri için ihtiyaç duydukları tuz miktarına göre ayrılırlar. Araştırmacılar 0,2 M'dan daha az NaCI konsantrasyonunda gelişenleri "halofil olmayanlar", 0,2-0,5 M NaCI konsantrasyonunda gelişenleri "zayıf halofiller", 0,5-2 M NaCI konsantrasyonunda gelişenleri "orta halofiller", 2-5,2 M NaCI konsantrasyonunda gelişenleri ise "aşırı halofil" bakteriler olarak gruplandırmıştır (Kushawa ve diğ., 1974; Kushner, 1978; Kushner, 1985; Lodwick, 1994).

Aşırı halofil Arkebakteriler (*Halobacteriaceae* familyası), tuz konsantrasyonunun 250-300 g/L'yi aştığı tuzlu ortamlarda baskın olarak bulunan, kırmızı pigmentasyon oluşturan heterotrofik organizmalardır. Parlak kırmızı rengin gelişiminin tuzlu ortamlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Aşırı halofil terimi mikroorganizmanın, hem tuzlu ortamlarda geliştiğini hem de mikroorganizmanın tuza çok fazla gereksinim duyduğunu belirtmek için kullanılır. Bazen bu tuz gereksinimi tuzun doygunluk noktasına kadar olabilir. Aşırı halofillerin gelişmesi için en az 1,5 M NaCl (yaklaşık %9) ve çoğu türlerin optimal gelişmesi için ise 2-4 M NaCl (%12-23) gerekmektedir (Boone ve diğ., 2001; Madigan, 2000). Hemen hemen tüm aşırı halofiller 5,5 M NaCl'de gelişirler (NaCl doygunluğunun limiti %32'dir). Buna rağmen bazı türler bu tuzlulukta çok yavaş gelişirler. Utah'daki Büyük Tuz

Gölü'nde, Ölü Deniz'de, Magadi Gölü'nde ve Kenya'daki diğer soda göllerinde bu mikroorganizmalara rastlanmıştır. Ayrıca tuzlanmış balık veya hayvan derilerinde de gözlenmiştir (Valera, 1988; Bailey ve Birbir, 1993; Quesada ve diğ., 1983; Bailey ve Birbir, 1996; Forsyth ve Kushner, 1970; Oren, 1994a; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve diğ., 1984; Birbir ve diğ., 1996; Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir, 1997).

Halobacterium hücresinin hücre duvarı glikoproteinden oluşur ve Na^+ iyonları ile stabilize edilir. Na^+ iyonları *Halobacterium*'un hücre duvarının dış yüzeyine bağlanarak hücre yapısının korunmasını sağlar. Eğer ortamda yeterli miktarda Na^+ iyonu yok ise hücre duvarı parçalanır ve hücre patlar. *Halobacterium*'un hücre duvarında glikoprotein yapısında negatif yüklü aspartat ve glutamat gibi asidik aminoasitler bulunur. Bu aminoasitlerin karboksil gruplarının sebep olduğu negatif yükler, Na^+ iyonu ile kaplanır. Na^+ iyonu sulandırılarak uzaklaştırıldığında, bu proteinlerin negatif yüklü kısımları birbirini iterek hücrenin patlamasına neden olur.

Halobacterium'un sitoplazmik proteinleri oldukça asidiktir ve aktiviteleri için K^+ iyonu gereklidir. Ayrıca ribozom yapısının bozulmaması için de yüksek seviyelerde K^+ iyonuna ihtiyaç vardır. Kısacası hücresel yapının bozulmaması için, dış ortamlarda fazla miktarda Na^+ iyonuna, iç ortamlarda ise K^+ iyonuna ihtiyaç vardır (Jones ve diğ.; 1987; Madigan, 2000).

II.2.1. Arkebakteri Enzimleri ve Biyoteknolojik Önemleri

Günümüzde aşırı halofil Arkebakteriyel enzimler hakkında biyoteknolojik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu cinslerin aşırı tuzlu ortamlarda aktif olması, uzun süre enzimlerin doğal koşullarda kararlı kalması, yüksek ısılara sıcaklıklara dayanıklı olmaları ve fazla miktarlarda organik çözücü içeren ortamlar gibi düşük su içeren ortamlarda katalitik aktivitelerini koruyabilmeleri, bu bakterilerin enzimlerinin ileride biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Halofilik Arkebakteriler ürettikleri enzimlerden, glikoprotein ve bakteriyorodopsin içermelerinden, nanoteknolojik potansiyellerinden ötürü ilgi çekicidirler. Halofil Arkebakteri tarafından salınan polisakkaritler benzin katkı maddeleri olarak kullanılabilirler (Eichler, 2001). Bu bakterilerin yan ürünleri kadar varlıkları da ekonomik olarak değerlidir (Oren, 1999; Aizenshtat ve diğ., 1999; Birbir, 2003).

Oksijen konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda *Halobacterium Salinarum* gibi bazı aşırı halofiller, bakteriyorodopsin olarak adlandırılan mor bir protein

sentezleyerek, bu proteini kendi membranı içine yerleştirirler. Bu retinal molekül ışığı absorblayarak proton motiv kuvvetin oluşmasını kataliz eder ve böylece düşük oksijen konsantrasyonlu durumlarda bakteriyorodopsin sentezi başlar ve mikroorganizmanın rengi portakal ya da kırmızımsı renkten daha kırmızımsı mor renge dönüşür. *Halobacterium Halobium*'un mor membranında protein pompası olarak görev alan bakteriyorodopsinin keşfi ile halofil arkebakteriler pek çok kimyasal çalışmanın merkezine yerleşmiştir (Jones ve diğ., 1987; Kates ve diğ., 1982; Vreeland, 1993; Oren, 1994; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve diğ., 1984).

Arkebakterilerin biyoteknolojik önemi her geçen gün artmaktadır. Örneğin; bazı aşırı arkebakterilerin tuzlu besinler, özellikle de salamura balıkların, etlerin üzerinde yaşaması besin endüstrisi açısından önemlidir. *Halobacterium* ve *Halococcus* türleri proteinleri parçalayan hücre dışı enzimler salarak besin maddesinde bozulmaya yol açmaktadırlar (www.ucmp.berkeley.edu/archaea).

Halofil Arkebakteride bulunan enzimler yüksek tuz konsantrasyonunda aktif, kararlı ve çözünür olmalıdır. Genelde tuz, enzimlerin çözünürlüğünü arttırmakta ve katlanmış yapının kararlılığını bozmaktadır fakat halofil enzimler, halofil bakterilerin sitoplazmasındaki KCI konsantrasyonlarından dolayı hem çözünür hem de kararlı kalabilirler. Bu mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmalarında enzim ile çözücünün etkileşimleri ve üç boyutlu yapılar çok önemlidir. Halofil Arkebakterilerden elde edilen bazı enzimlerin aktiviteleri, tuz konsantrasyonunun arttırılmasıyla artarken bazı enzimlerinki de düşmektedir. Bu tür enzimler karmaşık bir protein yapısına sahiptirler ve çözücü tabakası ile etkileşirler (Madern ve diğ., 2000).

Aşırı tuzlu ortamlarda çok fazla besin kaynağı bulunmadığından ortamda bulunan az miktarda besinin tam parçalanabilmesi için halofil mikroorganizmalar çeşitli enzimler salgılamaktadır. Açığa çıkarılan glukoz da bu mikroorganizmalar tarafından tek karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Birbir ve diğ., 2004a). Enzim çalışma çözeltilerinde halofil enzimlerin çalışabilmesi için mutlaka bir miktar tuz gereklidir. Eğer ortamda tuz bulunmazsa enzim aktivitesini kaybetmektedir. Yapılan çalışmalarda enzim aktivitesi için en ideal tuz konsantrasyonunun 4 M NaCI olduğu saptanmıştır (Gözüaçık, 2004).

II.3. α-AMİLAZ, GLUKOZ OKSİDAZ, β-GALAKTOSİDAZ, AMİLOGLİKOSİDAZ ENZiMLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

II.3.1. Mikrobiyal α-Amilaz Ailesine Genel Bir Bakış

α-Amilazlar nişastanın ve glikojenin α-1,4-glikozit bağlarına etki ederek onları maltoz ve dekstrinlere parçalar. α-Amilazın sistematik adı 1,4- glukanohidrolaz (EC.3.2.1.1) olup (www.worthington-biochem.com), molekül ağırlıkları çeşitli kaynaklara göre değişmektedir. 45.000-54.000 dalton arasında değişen molekül ağırlıkları bildirilmiştir (Cozzone ve diğ., 1970). Hidroliz ürünleri α konfigürasyonundadır. Aktivite tüm canlı varlıklarda görülmektedir. (www.worthington-biochem.com).

α-Amilaz tükürük, insan pankreası, *Pseudomonas* ve *Aspergillus* mikroorganizmalarından kristalleştirilmektedir. Amilazlar, endo-amilazlar ve ekzo-amilazlar olmak üzere iki grupta toplanırlar. Endo-amilazlar, çok yavaş olarak hidroliz olayına katılırlar. Nişasta moleküllerinin iç bölgelerini gelişigüzel hidrolizlerler. Bir seri üç veya daha fazla α-1,4 bağlı glukoz birimlerini içeren ürünler açığa çıkarırlar. Buna, özellikle klorür ve bazı iyonlar da aktivatör olarak etki eder. Ekzo-amilazlar, nişastanın amiloz kısmını maltoza kadar hızlı bir şekilde hidroliz ederler. Nişastanın indirgen olmayan uç bölgelerinde etkindirler. İndirgen olmayan uçlarda maltoz birimlerini ayırırlar (www.aof.edu.tr/kitap/IOLTP/ünite 03 pdf.; Gupta ve diğ., 2003).

Tüm amilaz enzimlerinin etkisiyle oluşan ürünler, çözünebilen nişasta (dekstrin) ve maltozdur. α-Amilazlar; hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen fakat özellikle küflerden elde edilen enzimlerdir. Küflerden ve bakteriyel kaynaklardan elde edilen bu enzimler endüstriyel sektörlerdeki uygulamalara hakim olmuşlardır (Pandey ve diğ., 2000). Amilazlar, endüstriyel enzim pazarında %25'lik paya sahip bir enzim sınıfıdır (Sindu ve diğ., 1997; Rao ve diğ., 1998). α-Amilazların kararlılığı kapsamlıca çalışılmış; pH ve sıcaklık çok önemli rol oynamıştır. Enzim mühendisliği, enzimlerin kararlılığını geliştirebilmektedir ve bu sayede enzimlerin endüstriyel kullanımları gün geçtikçe daha da artmaktadır (Reddy, 2003).

II.3.2. Glukoz Oksidaz Enzimi

Glukoz oksidaz (β-D-glukoz: oksijen 1-oksidoreduktaz, EC 1.1.3.4); glukoz oksidasyonunu katalizleyerek D-glukano-1,5-lakton ve hidrojen peroksit üretimini sağlamaktadır (http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_oxidase).

Glukoz oksidazın molekül ağırlığı 160 KDa olarak bildirilmiştir. İki özdeş alt üniteden oluşmakta ve her alt ünite 1 mol demir ve 1 mol flavin-adenin dinükleotit (FAD) içermektedir (Tsuge ve diğ.,1975). *Aspergillus niger*'den elde edilen glukoz oksidazın ideal çalışma şartları için optimal pH'ın 5.5 olduğu ve ayrıca geniş bir pH (4-7) aralığında çalışılabileceği bildirilmiştir (Bright ve Appleby, 1969). Bu enzim, β-D-glukoz için oldukça spesifiktir ve Ag^{+}, Hg^{+2}, Cu^{+2} inhibitördür (Nakamura ve Ogura, 1968). FAD bağlayıcı birkaç nükleotit tarafından da engellendiği gösterilmiştir (Swobada, 1969). Kuru preparatları, düşük sıcaklıklarda yıllarca kararlı kalabilmektedir (www.worthington-biochem.com).

Glukoz oksidaz enzimi bir katalizör olarak çalışmak için, bir kofaktöre olan flavin adenin dinükleotid (FAD)'e ihtiyaç duymaktadır. Glukoz oksidaz enzimi, glukoz ölçen biyosensörlerde çok kullanılmaktadır. Ticari uygulamalarda genellikle *Aspergillus niger*'den elde edilen şekli kullanılmıştır. Ayrıca glukoz oksidazın balın içinde doğal koruyucu olarak davrandığı gözlenmiştir. Antimikrobiyal ajan olarak davranan ve balın yüzeyinde bulunan glukoz oksidaz enzimi, atmosferik oksijeni hidrojen perokside indirgemektedir (http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_oxidase).

Glukoz oksidazın enzimatik reaksiyonunda substrat miktarı arttıkça, oluşan ürün miktarının da arttığı gözlenmiştir. Glukoz oksidaz, glukoz ile spesifik olarak reaksiyon vermektedir (http://jchemed.chem.wise.edu.).

II.3.3. β-Galaktosidaz Enzimi

β-Galaktosidaz (EC 3.2.1.23), β-galaktozidlerin monosakkaritlere hidrolizini katalizleyen bir hidrolaz enzimdir (http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-galactosidase).

β-Galaktosidaz, tetramer bir yapı oluşturan büyük (120 kDa,>1000 amino asit) bir proteindir. Enzimin hücredeki fonksiyonu; laktozu, glukoz ve galaktoza ayırmaktır ve ancak bu şekilde laktoz karbon-enerji kaynağı olarak kullanılabilmektedir. Sentetik bileşim o-nitrofenil-β-D-galaktozid (ONPG) substrat olarak kabul edilmiş, galaktoz ve sarı renge sahip o-nitrofenol oluşturmak için kullanılmıştır. Reaksiyonda sarı renk oluşumu; enzim konsantrasyonunu belirlemek

için kullanılmıştır. β-Galaktosidaz'ın her ünitesi beş domainden oluşmaktadır. Bunlardan üçüncüsü aktif olan kısımdır. β-Galaktosidaz'ın aktif kısmı, onun disakkarit substratının hirolizini katalizlemektedir. Enzimin optimal aktivitesi için hem potasyum iyonları (K^{+1}) hem de magnezyum iyonları (Mg^{+2}) gereklidir (http//www.answers.com/topic/beta-galactosidase). β-Galaktosidaz enzimi için optimum pH aralığı; 6-8 olarak bildirilmiştir. Ayrıca enzim, 5ºC' de 4-6 ay boyunca kararlılığını koruyabilmektedir (http://www.worthington-biochem.com).

II.3.4. Amiloglikosidaz Enzimi

Amiloglikosidaz (EC 3.2.1.3)'ın diğer bir ismi 1,4-α-Glukan Glukohidrolazdır. Polisakkaritlerin α-1,4- ve α-1,6-D-glukoz bağlarını hidrolizler. İndirgen olmayan uçta glukoz moleküllerini açığa çıkarır. Amiloz ve amilopektinin tamamına yakını glukoza hidrolizlenirken maltozun tamamı hidrolizlenir. Amiloglikosidaz, maltozdan glukoz oluşumunu sağlar. Oluşan glukoz, glukoz tayin metotları kullanılarak tayin edilmektedir (http://www.biopract.de).

Amiloglikosidazlar, çeşitli küflerden (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Endomyces* sp., gibi) ve özellikle Japon fermantasyon endüstrisi tarafından yüksek oranda ürün eldesi amacıyla seçilmiş örneklerden elde edilmektedir (Manners, 1971). *Aspergillus niger*'den elde edilen amiloglukosidaz (AMG) en ekonomik endüstriyel enzimlerden biridir. Günümüzde, ekonomik sebeplerden dolayı glukoz yaygın olarak nişastanın üzerine α-amilaz ve AMG'nin enzimatik hidrolizi ile elde edilmektedir (Milosević ve diğ., 2005). Nişastadan şeker eldesi, 45-60ºC sıcaklık aralığında, pH=3,3-4,4'de amiloglikosidazın özelliklerine bağlı olarak, 96 saate kadar zaman alabilmektedir. Bazı amiloglikosidaz preparatları transglukosidaz aktivitesi de gösterebilmektedirler (Manners, 1971).

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1.ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

Aşırı halofil Arkebakteri kültürlerinin hazırlanması

↓

%25 ve %15 tuz içeren nişasta besiyerlerinde çoğaltılması

↓

Elde edilen suşların üç, dört ve beş hafta gibi farklı zaman dilimlerinde optimal şartları saptayabilmek için enzim aktivitelerinin ölçülmesi

↓

İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

↓

Farklı tuz konsantrasyonlarının (%25 ve %15) enzim aktivitesi üzerine etkisi

III.2.ARAŞTIRMA ARAÇLARI

III.2.1.Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Santrifüj	**:**a. SIGMA 3K 30 Laboratory Centrifuge, Soğutmalı Yüksek Devirli Santrifüj, (ABD).
	b.DENLEY BS 400 Masaüstü Santrifüj, (İngiltere).
Spektrofotometre	**:** SHIMADZU UV - VISIBLE, DOUBLE BEAM SPEKTROPHOTOMETER UV1601, (Japonya).
Spektrofotometre Küvetleri	**:** HELMA, 1 mL ve 3mL'lik (Japonya).
Hassas Terazi	**:** SARTORIUS ANALİTİK TERAZİ, Dijital, (Almanya).
Su Banyoları	**:**a. CLIFTON DIGITAL SHAKER BATH, 0-100 ºC, (İngiltere).
	b. GRANT INSTRUMENTS LTD 6G, -20-100ºC, Sirkülatör, (İngiltere).
Derin Dondurucu	**:** VESTEL, Çekmeceli Tipi, (-18ºC), (Türkiye)
Buzdolabı	: ARÇELİK, (Türkiye).
Vorteks Karıştırıcı	**:** FISONS Whirli Mixer, (İngiltere).
Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı	**:**a. JANKER&KUNTEL, Laboteknik IKA-Magnetik Strirrer (Japonya).
	b.CHILTREN Isıtıcılı Magnetik Karıştırıcı, HS31 (İngiltere).
pH Metre	**:** LCS LD 108 Dijital pH Metre, (Almanya).
Etüv	**:**a.GEN LAB MIDI/2/AL, (0-100ºC), (İngiltere). b.NUVE EN500 ETUV.

Otomatik pipetler	**:** VOLAC DIGITAL MICROPIPET (ABD).
Hamilton Pipetler	**:** HAMILTON, 50 µL, 25 µL ve10µL'lik (ABD).
Otoklav	**:** WEB MLW OTOKLAV (Germany).

III.2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Potasyum Klorür (KCI), Magnezyum Sülfat ($MgSO_4.7H_2O$), Kalsiyum Klorid ($CaCI_2.6H_2O$), Nişasta, Sodyum Klorür (NaCI), Magnezyum Klorid ($MgCI_2.6H_2O$), Merkaptoetanol, Tris Hidroklorik Asit, Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Disodyum Monohidrojen Fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum Hidroksit (NaOH), Dinitrosalisilik Asit Renk Reaktifi, Maltoz, USA firmasının enzimatik glukoz tayin kiti, 50 mM Fosfat Tampon, $MnCI_2$, β-Merkaptoetanol, Potasyum Fosfat (K_3PO_4), Borik Asit, Maya Özütü, Sodyum-Potasyum Tartarat Tetrahidrat, o-diyanisidin, Peroksidaz, ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid).

III.3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

III.3.1. Kullanılan Besiyerleri

III.3.1.1. α-Amilaz, Glukoz oksidaz, β-Galaktosidaz ve Amiloglikosidaz Üretmek İçin %25, %15 NaCI İçeren Besiyerleri

%25 NaCI İçeren Nişasta Besiyerinin Hazırlanışı

$CaCI_2.6H_2O$	0,2 g
KCI	2g
Nişasta	20g
$MgSO_4.7H_2O$	20g
NaCI*	250g
Distile su	1000mL
pH	7.0

* % 15 NaCI içeren nişasta besiyeri hazırlanırken 150 gram NaCI kullanıldı.

%25 NaCI İçeren Laktoz Besiyerinin Hazırlanışı

% 0,5 Maya Özütü	5g
KCI	2g
$MgCI_2\ 6H_2O$	20g
NaCI	250g

pH=7.5 Sterilizasyon işleminden sonra %1 oranda (10g) steril laktoz ilave edildi (Birbir ve diğ.; 2004).

III.3.2. Enzim Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

III.3.2.1 α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

a. Sodyum Fosfat Tamponu

KH_2PO_4	13,609 g
Na_2HPO_4	17,799 g
Distile su	100 mL
NaCl	11,25 g
pH	6,9

Hazırlanan 100 mL'lik KH_2PO_4 çözeltisinden 5 mL, 100 mL'lik Na_2HPO_4 çözeltisinden 20 mL ve 11,25 g NaCl ile 250 mL' lik toplam hacimde 0,02 M Sodyum Fosfat Tamponu, 0,006 M sodyum klorür ile hazırlandı.

b. 2 N Sodyum Hidroksit Çözeltisi

NaOH	4 g
Distile su	50 mL

c. Dinitrosalisilik Asit Renk Reaktifi

3,5- Dinitrosalisilik Asit	1 g
Sodyum-potasyum tartarat tetrahidrat	30 g
2 N NaOH	20 mL

Toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

d. %1'lik Nişasta Çözeltisi

Nişasta	1 g
0,002 M sodyum-fosfat tamponu	100 mL

e. Maltoz Stok Çözeltisi

Maltoz	0.18 g
Distile su	100 mL

III.3.2.2. Glukoz Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

- 0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu, pH=6,0
- %1 o-diyanisidin
- Peroksidaz
- %18' lik Glukoz
- Diyanisidin Tampon Karışımı: 0,1 mL %1' lik o-diyanisidin, 12 mL 0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu, pH 6,0.

III.3.2.3. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

- 0.3 M Sodyum fosfat tamponu (0,003 M magnezyum klorid ile), pH 7,5
- 1,0 M Merkaptoetanol
- 0,014 M o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid (ONPG)

III.3.2.4. Amiloglikosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Kullanılan reaktifin içeriği; Fosfat tamponu (pH=7,5), glukoz oksidaz, peroksidaz, 4-aminoantipiridin, fenol, EDTA, sodyum azid, reaktif olmayan surfaktantlar.

III.3.3. %25, %15 NaCI İçeren Besiyerlerinde Aşırı Halofil Arkebakteri' lerin Çoğaltılması

Tuz Gölü, Tuzköy Tuz madeni, Kaldırım ve Kayacık Tuzlalarından elde edilerek tanımlanan aşırı halofil Arkebakteri izolatları katı nişasta besiyerlerinde 40^0C de 10 gün süre ile çoğaltıldı (Birbir ve diğ., 2004a). Besiyerinde üreyen bu izolatlardan iki üç koloni alınarak %25 ve %15 NaCI içeren steril 100 mL sıvı nişasta besiyerlerine ekimleri yapıldı**.** Bu besiyerlerinde üreyen izolatlar 40ºC' deki etüvde 3, 4 ve 5 hafta bekletildi daha sonra izolatların 3,4 ve 5. haftalarda α-amilaz, glukoz oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri aşağıda belirtildiği gibi tayin edildi ve sonuçlar ünite cinsinden hesaplandı.

III.3.4. Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

III.3.4.1. α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Maltoz standart eğrisi için; hazırlanmış olan maltoz stok çözeltisinden on ayrı tüpe 0,3 ile 5 µmol/mL arasında maltoz dilüsyonları hazırlandı. Her tüpte toplam hacim 1 mL olacak şekilde ve çift seri olarak hazırlandı. Daha sonra her tüpe 1 mL dinitrosalisilik asit renk reaktifi eklendi. Tüpler, kaynayan su banyosunda 5 dakika bekletildi ve ardından tüplerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Her tüpe 10 mL distile su ilave edildi ve vorteks karıştırıcısı ile karıştırıldı. Daha sonra, çift yollu UV Visible spektrofotometresinde 540 nm'de suya karşı absorbansları ölçüldü. Absorbans değerlerine karşı konsantrasyon (µmol/mL) değerleri grafiğe geçirilerek maltoz standart eğrisi elde edildi.

α-Amilaz aktivitesi tayini için; numaralandırılmış ve çift seri olarak hazırlanmış tüplere aşırı halofil Arkebakterilerin geliştiği nişasta besiyerinden 0,5 mL konuldu. 0,5 mL distile su ilave edilerek 25ºC' de 3-4 dakika inkübe edildi. Ardından 0,5 mL nişasta çözeltisi eklendi ve 3 dakika, 25ºC su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 1'er mL dinitrosalisilik asit renk reaktifi ilave edildi. Tüpler kaynayan su banyosunda 5 dakika bekletildi ve ardından tüpler oda sıcaklığına gelene kadar beklendi. Sonra her tüpe 10 mL distile su ilave edildi. Ardından tüpler vorteks karıştırıcısı ile karıştırıldı ve 540 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen maltoz değerleri, maltoz standart eğrisinden okunarak aşağıda formüle göre total amilaz aktivitesi hesaplandı.

$$Aktivite(U^*) = \frac{\text{Serbest bırakılan maltoz miktarı (µmol/mL)}}{\text{3 dakika}}$$

(www.worthington- biochem.com/AA/default.html, erişim tarihi: 17.11.2004)

**Ünite:* 25ºC' de ve pH=7'de nişasta ile α-amilazın etkileşimi sonucu çözünür nişastadan açığa çıkan maltoz miktarı (1µmol maltoz /dk).

III.3.4.2. Glukoz Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bir peroksidaz sistem içinde, 460 nm' de gözlenen absorbans değerlerinde, orto-dianisidinin oksidasyonuyla birlikte ortaya çıkan bir artış ile reaksiyon hız derecesi belirlenebilmektedir (www.worthington-biochem.com/GOP/default.html, erişim tarihi: 28.03.2007).

Spektrofotometre 460 nm' ye ve 25ºC' ye ayarlandı. Küvete, 2,5 mL diyanisidin tampon karışımı, 0,3 mL %18' lik glukoz, 0,1 mL peroksidaz eklendi. Spektrofotometre 3-5 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından 0,1 mL aşırı halofil Arkebakterilerin geliştiği nişasta besiyerinden eklendi ve 460 nm' de gözlenen absorbans değerleri artışı 4-5 dakika süresince kaydedildi. Aşağıda verilen formüle göre hesaplama yapıldı.

$$\ddot{U}nite = \frac{\Delta A_{460/dak.}}{11.3 \text{ x mL reaksiyon karışımı}}$$

(www.worthington- biochem.com/GOP/default.html, erişim tarihi: 28.03.2007).

III.3.4.3. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Numaralandırılmış ve çift seri olarak hazırlanan tüplere aşağıda miktarları belirtilmiş olan çözeltiler konuldu. Spektrofotometre 405 nm ve 25ºC' ye ayarlandı. Aşağıda belirtilen miktarlar spektrofotometrenin küvetine pipet yardımı ile konuldu.

0,3 M sodyum fosfat tamponu	1,0 mL
1,0 M merkaptoetanol	0,3 mL
0,014 M ONPG	0,5 mL
Distile su	1,1 mL

Spektrofotometre'de 25ºC' de 3-5 dakika bekletildikten sonra sıvı laktoz besiyerinden 0,1 mL küvete konuldu ve 405 nm'deki absorbans değerleri 4-5 dakika boyunca gözlemlendi ve kaydedildi.

Bir ünite, 25ºC ve pH=7'de, bir mikromol orto-nitrofenil-β-D-galaktopranozidin hidrolizine yol açmaktadır (www.worthington-biochem.com/BG/default.html, erişim tarihi: 23.03.2004).

III.3.4.4. Amiloglikosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Amiloglukosidazın etkisi ile nişastadan açığa çıkan glukozun ölçümü için glukoz reaktifi kullanıldı. Örnekteki oluşan glukoz, enzimatik yolla, glukonik asit ve hidrojen perokside oksitlendi. Hidrojen peroksit, fenol ve 4-aminoantipirin ile birleşerek renkli kompleks (kuinonemin) oluştu. Fotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, glukoz konsantrasyonu ile orantılı idi.

Test tüpleri numaralandırıldıktan sonra mikropipetler yardımıyla her tüpe 1000 µL reaktif konuldu. Ardından aşırı halofil Arkebakterinin geliştiği sıvı nişasta besiyerinden 10 µL eklendi, diğer bir tübe ise glukoz standart çözeltisi konuldu ve tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika 37ºC su banyosunda bekletildi. Ardından 490 nm' de tüplerin absorbansları ölçüldü. Glukoz konsatrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Glukoz konsantrasyonu} = \frac{\text{Abs. (örnek)}}{\text{Abs. (standart)}} \times \text{standart konsantrasyonu (100mg/mL)}$$

Sonuçlar 55.5 ile çarpılarak aktivite; Ünite (µmol glukoz/dakika) cinsinden hesaplandı.

Bir enzim ünitesi; nişastadan dakikada bir µmol glukoz açığa çıkaran amiloglukosidaz miktarıdır (http://www.biopract.de).

III.3.5. α-Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Aşırı halofil Arkebakteri izolatlarını kullanarak yapmış olduğumuz ilk ekimlerde, uygun inkübasyon süresinin ve besiyerinin uygun tuz konsantrasyonunun saptanmasının ardından sonuçların tekrarlanır olup olmadığını araştırmak amacıyla aşırı halofil Arkebakteri izolatlarını kullanarak yeniden ekimler yapıldı. Aşırı halofil Arkebakteri izolatları katı nişasta besiyerlerinde 40^0C de 10 gün süre ile çoğaltıldı (Birbir ve diğ., 2004a) ve besiyerinde üreyen izolatlardan iki üç koloni alınarak %25 NaCI içeren steril 100 mL sıvı nişasta besiyerlerine ekimleri yapıldı**.** Bu besiyerlerinde üreyen izolatlar 40ºC' deki etüvde 4 hafta bekletildi.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

Tuz Gölü, Tuzköy, Kaldırım Tuzlası ve Kayacık Tuzlası araştırma bölgelerinden ayrımı yapılan 30 aşırı halofil izolat %25 ve %15 NaCI içeren sıvı nişasta besiyerlerinde çoğaltılmıştır. Aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının, α-amilaz, glukoz oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatların tamamı α-amilaz enzimi üretmiştir. Kalitatif olarak glukoz oksidaz ve β-galaktosidaz aktivitesi gösteren izolatların kantitatif olarak kayda değer miktarda glukoz oksidaz ve β-galaktosidaz enzimi üretmedikleri saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde önemli miktarda bir aktivite saptanmamıştır.

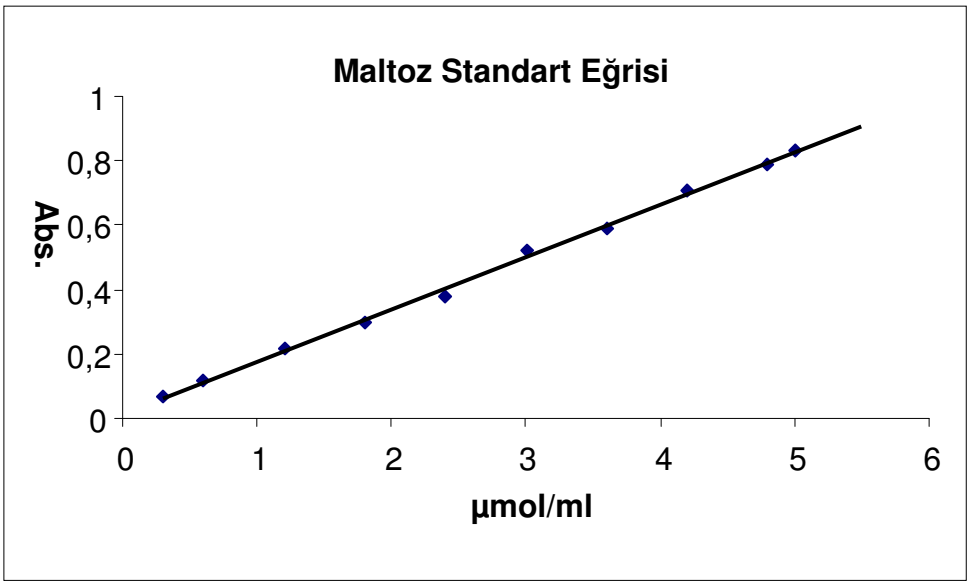
Bu çalışmada kullanılan suşların daha önce yapılan çalışmalarda tiplendirmeleri yapılmıştır. Buna göre; Tuzköy Tuz madeninden izole edilen suşların; 1TK2: *Halobacterium*, 4TK3, 4TK1, 2TK3, 3TK1, 3TK3: *Haloarcula,* 2TK1: *Natrinema* cinslerine (Birbir, M.; ve diğ., 2004), Kaldırım tuzlasından izole edilen suşların; 1KT4, 1KT1, 2KT1: *Haloarcula* , 8KT4, 8KT1, 9KT1, 9KT4, 10KT4, 4KT2: *Natrinema*, 3KT1, 1KT2: *Halorubrum* cinslerine, Tuz Gölü'nden izole edilen suşların; 5TG6, 1TG8: *Halorubrum,* 3TG6 , 1TG5, 4TG6, 1TG3, 2TG6 : *Haloarcula,* 7TG9: *Natrinema*, 2TG9: *Halobacterium* cinslerine (Birbir, M.; ve diğ., 2007), Kayacık Tuzlasından izole edilen suşların; 2KYT1, 1KYT2: *Haloarcula* cinslerine ait olduğu fenotipik karakteristiklerine, polar lipid içeriklerine, antibiyotik hassasiyetlerine ve filogenetik analizlerine göre saptanmıştır (Birbir, M.; ve diğ., 2007).

IV.1. ENZİM AKTİVİTELERİ

IV.1.1. %25 ve %15 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerlerinde Üreyen Halofil Arkebakteri' nin α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri

α-Amilaz enzim aktivitesi tayini için sıvı nişasta besiyerlerine ekimleri yapılan aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının, belirlenen inkübasyon süreleri sonunda 540 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen maltoz değerleri, maltoz standart eğrisinden okunarak total amilaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

α-Amilaz aktivitesi tayini için gerekli olan maltoz standart eğrisi Şekil IV.1'de verilmiştir.



Şekil IV.1. Maltoz Standart Eğrisi

Tuz Gölü, Tuzköy, Kaldırım Tuzlası ve Kayacık Tuzlası araştırma bölgelerinden elde edilen, %25 ve %15 NaCI içeren sıvı nişasta besiyerlerinde üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo IV.1 – IV.12' de verilmiştir.

Tablo IV.1. Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**İnkübasyon Süresi ve Enzim Aktivitesi (Ünite)***		
		3 Hafta	4 Hafta	5 Hafta
1TK2	α-amilaz	0,09	2,59	0,30
	Amiloglikosidaz	277,5	180,9	—
4TK2	α-amilaz	0,09	3,91	0,96
	Amiloglikosidaz	343,9	218,2	324,12
4TK1	α-amilaz	0,05	2,80	0,13
	Amiloglikosidaz	254,6	116,1	177,6
2TK3	α-amilaz	0,53	2,49	0,80
	Amiloglikosidaz	330,7	236,9	648,2
3TK1	α-amilaz	0,04	4,09	2,45
	Amiloglikosidaz	290,7	204,4	164,3
2TK1	α-amilaz	0,07	1,9	0,14
	Amiloglikosidaz	205,4	—•	266,4
3TK3	α-amilaz	0,07	3,06	0,15
	Amiloglikosidaz	313,6	264,8	230,9

__• : Aktivite saptanamadı.

*Ünite: α-Amilaz enzimi için; µmol maltoz/dakika, amiloglikosidaz enzimi için; µmol glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır.

Tuzköy araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.1' de Tuzköy Araştırma Bölgesinden izole edilen suşlar için saptanan α-amilaz enzim aktivitesi ortalaması 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla; [0,13 ± 0,17], [2,98 ± 0,79] ve [0,70 ± 0,84] ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde; diğer mikroorganizmalardan elde edilen sonuçlara göre (Trinder, P., 1969; Kaplan, L.; Pesce A. J., 1989) yüksek bir aktivite saptanmamıştır.

Tablo IV.2. Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Nişasta Sıvı Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**İnkübasyon Süresi ve Enzim Aktivitesi (Ünite)**		
		3 Hafta	4 Hafta	5 Hafta
1KT4	α-amilaz	0,20	3,62	0,24
	Amiloglikosidaz	326,9	292,5	371,9
8KT4	α-amilaz	0,06	2,49	0,12
	Amiloglikosidaz	258,4	—	—
8KT1	α-amilaz	0,06	2,76	1,34
	Amiloglikosidaz	235,7	—	—
9KT1	α-amilaz	0,04	1,41	0,42
	Amiloglikosidaz	220,5	—	—
3KT1	α-amilaz	0,09	2,98	2,08
	Amiloglikosidaz	193,9	506,3	2477,5
1KT1	α-amilaz	0,15	5,08	3,42
	Amiloglikosidaz	254,8	—	186,5
9KT4	α-amilaz	0,06	2,64	2,24
	Amiloglikosidaz	212,8	—	—

10KT4	α-amilaz	0,04	0,42	0,19
	Amiloglikosidaz	239,4	144	—
2KT1	α-amilaz	0,12	3,47	0,2
	Amiloglikosidaz	201,5	—	—
1KT2	α-amilaz	0,05	2,97	1,03
	Amiloglikosidaz	490,4	613,1	745,9
4KT2	α-amilaz	0,18	3,84	0,68
	Amiloglikosidaz	209	—	—

Kaldırım Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.2' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla; [0,09 ± 0,06], [2,76 ± 1,33] ve [1,09 ± 1,08] ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde; diğer mikroorganizmalardan elde edilen sonuçlara göre (Trinder, P., 1969; Kaplan, L.; Pesce A. J., 1989) yüksek bir aktivite saptanmamıştır. Diğer suşlara ait amiloglikosidaz enzim aktivite değerlerinden farklı olarak; 3KT1 suşana ait aktivite değeri, 5 haftalık inkübasyon süresi sonunda 2477,5 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.3. Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi ölçülen enzim**	**İnkübasyon Süresi ve Enzim Aktivitesi (Ünite)**		
		3 Hafta	4 Hafta	5 Hafta
5TG6	α-amilaz	0,14	3,12	0,31
	Amiloglikosidaz	900,9	1662,7	1616,2
3TG6	α-amilaz	0,15	5,9	3,9
	Amiloglikosidaz	338,2	311,1	239,8

1TG5	α-amilaz	0,06	3,11	0,48
	Amiloglikosidaz	285,1	362,3	461,8
4TG6	α-amilaz	0,13	4,70	5,2
	Amiloglikosidaz	292,6	292,5	128,76
1TG3	α-amilaz	0,04	0,82	0,26
	Amiloglikosidaz	302,2	144	164,3
1TG8	α-amilaz	0,08	2,51	0,15
	Amiloglikosidaz	397,2	422,6	444
2TG6	α-amilaz	0,28	5,6	0,28
	Amiloglikosidaz	—	—	—
7TG9	α-amilaz	0,52	2,16	0,92
	Amiloglikosidaz	205,3	—	—
2TG9	α-amilaz	0,05	2,19	1,06
	Amiloglikosidaz	273,7	—	—

Tuz Gölü araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.3' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla [0,16 ± 0,15], [3,35 ± 1,71] ve [1,40 ± 1,84] ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde; diğer mikroorganizmalardan elde edilen sonuçlara göre (Trinder, P., 1969; Kaplan, L.; Pesce A. J., 1989) yüksek bir aktivite saptanmamıştır. Diğer suşlara ait amiloglikosidaz enzim aktivite değerlerinden farklı olarak; 5TG6 suşana ait aktivite değeri, 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda 1662,7 ve 5 haftalık süre sonunda 1616,2 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.4. Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 3, 4 ve 5 Haftalık İnkübasyon Süreleri Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının α-amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**İnkübasyon Süresi ve Enzim Aktiviteleri (Ünite)**		
		3 Hafta	4 Hafta	5 Hafta
2KYT1	α-amilaz	0,11	3,28	0,21
	Amiloglikosidaz	262,3	—	159,9
1KYT2	α-amilaz	0,04	1,46	0,46
	Amiloglikosidaz	273,6	—	—

Kayacık Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.4' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 3, 4 ve 5 haftalık inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla [0,08 ± 0,05], [2,37 ± 1,29] ve [0,34 ± 0,18] ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde; diğer mikroorganizmalardan elde edilen sonuçlara göre (Trinder, P., 1969; Kaplan, L.; Pesce A. J., 1989) yüksek bir aktivite saptanmamıştır.

Tablo IV.5. α-Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği için Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCl İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**Enzim Aktivitesi (Ünite)**
1TK2	α- amilaz	2,01
4TK3	α- amilaz	5,77

4TK1	α- amilaz	3,11
2TK3	α- amilaz	4,40
3TK1	α- amilaz	4,12
2TK1	α- amilaz	1,62
3TK3	α- amilaz	5,04

Tuzköy araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.5' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 3,72 ± 1,54 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.6. α-Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği için Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**Enzim Aktivitesi (Ünite)**
1KT1	α- amilaz	3,68
2KT1	α- amilaz	3,52
3KT1	α- amilaz	1,24
8KT1	α- amilaz	4,43
9KT1	α- amilaz	3,65
1KT4	α- amilaz	5,04
8KT4	α- amilaz	1,56
9KT4	α- amilaz	1,14
10KT4	α- amilaz	0,18

Kaldırım Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz total enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.6' da verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 2,72 ± 1,70 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.7. α-Amilaz Enzim Aktivitelerinin Tekrarlanabilirliği için Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**Enzim Aktivitesi (Ünite)**
5TG6	α- amilaz	2,6
3TG6	α- amilaz	6,02
1TG5	α- amilaz	4,4
4TG6	α- amilaz	5,11
1TG3	α- amilaz	3,3
1TG8	α- amilaz	2,44
1TG9	α- amilaz	2,21
2TG6	α- amilaz	4,12
7TG9	α- amilaz	2,35
2TG9	α- amilaz	2,06

Tuz Gölü araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkeabakteri suşlarının α-amilaz total enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.7' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 3,60 ± 1,39 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.8. α-Amilaz Aktivitelerinin Tekrarlanabilirliği için Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %25 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz Total Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	Aktivitesi ölçülen enzim	Enzim Aktivitesi (Ünite)
2KYT1	α- amilaz	2,76
1KYT2	α- amilaz	2,65

Kayacık Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %25 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkeabakteri suşlarının α-amilaz total enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.8' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 2,71± 0,08 ünite olarak saptanmıştır.

Tablo IV.9. Tuzköy Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri suşlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Aktiviteleri

Arkebakteri Suşları	Aktivitesi Ölçülen Enzim	Enzim Aktivitesi (Ünite)
2TK1	α-amilaz	2,10
	Amiloglikosidaz	—
4TK1	α-amilaz	2,54
	Amiloglikosidaz	—
2TK3	α-amilaz	2,33
	Amiloglikosidaz	—

Tuzköy araştırma bölgesinden elde edilen ve %15 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkeabakteri suşlarının α-amilaz total enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.9' da verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 2,32 ± 0,22 ünite olarak hesaplanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde aktivite saptanmamıştır.

Tablo IV.10. Kaldırım Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**Enzim Aktivitesi (Ünite)**
1KT4	α-amilaz	1,9
	Amiloglikosidaz	—
8KT4	α-amilaz	2,1
	Amiloglikosidaz	—
8KT1	α-amilaz	2,1
	Amiloglikosidaz	—
9KT1	α-amilaz	2,0
	Amiloglikosidaz	—
1KT1	α-amilaz	1,76
	Amiloglikosidaz	
9KT4	α-amilaz	1,70
	Amiloglikosidaz	
10KT4	α-amilaz	1,72
	Amiloglikosidaz	
2KT1	α-amilaz	3,4
	Amiloglikosidaz	
1KT2	α-amilaz	2,4
	Amiloglikosidaz	155,2
4KT2	α-amilaz	1,6
	Amiloglikosidaz	

Kaldırım Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %15 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.10' da verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 2,07 ± 0,53 ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde ise; yüksek oranda bir aktivite saptanmamıştır.

Tablo IV.11. Tuz Gölü Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının α-Amilaz ve Amiloglikosidaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	**Aktivitesi Ölçülen Enzim**	**Enzim Aktivitesi (Ünite)**
5TG6	α-amilaz	2,2
	Amiloglikosidaz	35,8
3TG6	α-amilaz	2,4
	Amiloglikosidaz	119,3
1TG5	α-amilaz	1,7
	Amiloglikosidaz	
4TG6	α-amilaz	2,9
	Amiloglikosidaz	—
1TG3	α-amilaz	2,2
	Amiloglikosidaz	29,9
1TG8	α-amilaz	2,07
	Amiloglikosidaz	
1TG9	α-amilaz	1,45
	Amiloglikosidaz	
7TG9	α-amilaz	2,2
	Amiloglikosidaz	—

Tuz Gölü araştırma bölgesinden elde edilen ve %15 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tablo IV.11' de verilen α-amilaz aktivite değerlerinin ortalaması 2,14 ± 0,44 ünite olarak saptanmıştır. Amiloglikosidaz enzimi için yapılan ölçümlerde ise suşların büyük çoğunluğunda kayda değer bir aktivite saptanmamıştır.

Tablo IV.12. Kayacık Tuzlası Araştırma Bölgesinden Elde Edilen ve %15 NaCl İçeren Nişasta Besiyerinde 4 Haftalık İnkübasyon Süresi Sonunda Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri suşlarının α-Amilaz Enzim Aktiviteleri.

Arkebakteri Suşları	Aktivitesi Ölçülen Enzim	Enzim Aktivitesi (Ünite)
2KYT1	α-amilaz	1,9
1KYT2	α-amilaz	1,7

Kayacık Tuzlası araştırma bölgesinden elde edilen ve %15 NaCl içeren nişasta besiyerinde 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda üreyen aşırı halofil Arkebakteri suşlarının α-amilaz enzim aktiviteleri ünite olarak hesaplanmıştır. Tablo IV.11' de verilen α-amilaz enzim aktivite değerlerinin ortalaması 1,80 ± 0,14 ünite olarak saptanmıştır.

IV.1.2. %25 NaCI İçeren Sıvı Nişasta Besiyerlerinde Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının Glukoz Oksidaz Aktivitesi

% 25 NaCI içeren sıvı nişasta besiyerlerinde üreyen aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının glukoz oksidaz enzim aktiviteleri incelendiğinde kaydadeğer bir aktivite saptanmamıştır.

IV.1.3 %25 NaCI İçeren Sıvı Laktoz Besiyerlerinde Üreyen Aşırı Halofil Arkebakteri İzolatlarının β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesi

% 25 NaCI içeren sıvı laktoz besiyerlerinde üreyen aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının β-galaktosidaz enzim aktiviteleri incelendiğinde kaydadeğer bir aktivite saptanamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda kalitatif olarak β-galaktosidaz enzim aktivitesi gösteren aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının (Birbir, M.; ve diğ., 2007), kantitatif olarak β-galaktosidaz enzim aktivitesi göstermediği saptanmıştır.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER

Halofilik Arkebakteriler ürettikleri enzimlerden, glikoprotein ve bakteriyorodopsin içermelerinden, nanoteknolojik potansiyellerinden ötürü ilgi çekicidirler. Halofil Arkebakteri tarafından salınan polisakkaritler benzin katkı maddeleri olarak kullanılabilirler (Eichler, 2001). Bu bakterilerin yan ürünleri kadar varlıkları da ekonomik olarak değerlidir (Oren, 1999; Aizenshtat ve diğ., 1999; Birbir, 2003).

Aşırı tuzlu ortamlarda çok fazla besin kaynağı bulunmadığından ortamda bulunan az miktarda besinin tam parçalanabilmesi için halofil mikroorganizmalar çeşitli enzimler salgılamaktadır. Açığa çıkarılan glukoz da bu mikroorganizmalar tarafından tek karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Birbir ve diğ., 2004a). Enzim çalışma çözeltilerinde halofil enzimlerin çalışabilmesi için mutlaka bir miktar tuz gereklidir. Halofil proteinleri halofil olmayan homolog proteinlerden ayırt eden özelliği; bu proteinlerin düşük tuz çözeltileri içerisinde oldukça kararsız olmalarıdır. Eğer ortamda tuz bulunmazsa enzim aktivitesini kaybetmektedir. Çözünürlüklerini ve konformasyonlarını ancak yüksek tuz konsantrasyonları içerisinde koruyabilmektedirler. Düşük tuz konsantrasyonlarında halofil proteinlerin çözünürlüğü genellikle düşüktür (Danson ve Hough, 1997; Mevarech ve diğ., 2000).

Halofiller tuzun neden olduğu osmotik basınca farklı yollarla karşı koyabilir. Örneğin *Halobacteriaceae* K^+ biriktirebilirken diğerleri glisin, betain, şeker, poliol, amino asit ve ektoinler gibi maddeleri biriktirerek tuzlu çevreden ileri gelen osmotik

basınca direnebilirler. Bu maddeler aynı zamanda ısı, basınç gibi etkenlere karşı durmalarına da yardımcı olur (Danson ve Hough, 1997; Da Costa ve diğ., 1998).

Halofiller, ekstrem halofil enzimlerin en önemli kaynağıdır. *Haloferax, Halobacterium, Halorhabdus, Marinococcus, Micrococcus, Natronococcus, Halobacillus* cinslerinin ksilinaz, amilaz, proteaz ve lipazlar gibi enzimleri ürettiği saptanmıştır (Adams ve diğ., 1995; Eichler, 2001; Selek ve Chaudhuri, 1999; Oren, 2002; Danson ve Hough, 1997; Mevarech ve diğ., 2000).

Özellikle karbonhidratları sindiren enzimleri salgılayan pek çok halofil mikroorganizma bildirilmiştir. Gıda ve nişasta işleme endüstrisinde biyoteknolojik olarak çok değerli bir enzim olan α-amilaz salgılayan halofil bakteriler ile ilgili yayınlara rastlanmasına rağmen aşırı halofil Arkebakteri ile ilgili yayın sayısı oldukça azdır. *Micrococcus halobius* (Onishi ve Sonada, 1979), *Halobacterium halobium* (Good ve Hartman, 1970, Patel ve diğ., 1993), *Halobacterium sodomense* (Oren, 1983), *Natronococcus* sp. Strain Ah-36 (Kobayashi ve diğ.,1992) türlerinin α-amilaz salgıladığı saptanmıştır (Khire, 1994; Kobayashi ve diğ.,1992; Patel ve diğ., 1993; Ventosa ve diğ., 1998). Yukarıda bahsedilen enzimler detaylı bir şekilde incelenmiş ve uygulamaları yapılmıştır. Hepsinin ortak özelliği enzimatik aktivite ve kararlılık gösterebilmeleri için 1-4 M NaCI gibi yüksek oranda tuza gereksinim duymalarıdır (Mevarech ve diğ., 2000).

Bugün endüstride uygulanan doğal olmayan ortamlarda etkin olan, örneğin yüksek tuz konsantrasyonlarında, yüksek ısıda veya organik ortamlarda etki edebilen enzimlere veya mikroorganizmalara gereksinim duyulmaktadır (Krieger ve diğ., 2004).

Bu çalışmamızda ülkemizin zengin mikrobiyal biyoçeşitliliğine yönelerek biyoteknolojik önemlerinden ötürü aşırı tuzlu ortamlarda karbonhidrat sindirebilen enzimleri üreten aşırı halofil Arkebakteri izolatları araştırılmıştır.

Halofil Arkebakteri' den elde edilen selülaz enzimi için daha önce yapılmış olan bir çalışmada (Gözüaçık, 2004), enzim çalışma şartları olarak uygun pH ve sıcaklık; pH=7 ve 25ºC olarak bulunmuştur. Bu çalışmamızda da aynı enzim çalışma şartları sağlanmıştır. Tuz Gölü, Tuzköy Tuz Madeni, Kaldırım Tuzlası ve Kayacık Tuzlası araştırma bölgelerinden elde edilen halofil izolatların α-amilaz, glukoz oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz enzim aktiviteleri saptanmıştır. Bu amaçla; Tuz Gölü (10), Tuzköy Tuz Madeni (7), Kaldırım Tuzlası (11) ve Kayacık Tuzlası' ndan (2), ayırımı yapılan toplam otuz halofil izolatın, α-amilaz, glukoz

oksidaz, β-galaktosidaz ve amiloglikosidaz aktiviteleri saptanmıştır. Aktivitesi tespit edilen enzimler içerisinde yalnızca α-amilaz ve amiloglikosidaz için aktivite değerleri saptanmıştır. Glukoz oksidaz ve β-galaktosidaz için kayda değer bir aktivite saptanmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda kalitatif olarak β-galaktosidaz ve glukoz oksidaz enzim aktivitesi gösteren aşırı halofil Arkebakteri izolatlarının (Birbir, M.; ve diğ.,2007), kantitatif olarak β-galaktosidaz ve glukoz oksidaz enzim aktivitesi göstermediği saptanmıştır.

α-Amilaz üreten izolatlar için uygun inkübasyon süresi saptanmaya çalışıldı. İzolatların tamamının 3. haftada kayda değer miktarda enzim üretmediği, enzim üretimi için uygun inkübasyon süresinin 4 hafta olduğu, 5. haftada enzim aktivitesinin oldukça azaldığı görülmüştür. Tablo IV.1, IV.2, IV.3 ve IV.4' de görüldüğü gibi α-Amilaz enzim aktivitesi ortalama değerleri Tuzköy araştırma bölgesi için; [2,98 ± 0,79], Tuz Gölü için; [3,35 ± 1,71], Kaldırım Tuzlası için; [2,76 ± 1,33], Kayacık Tuzlası için; [2,37 ± 1,29] ünite olarak saptanmıştır. Daha sonra izolatların α-amilaz aktivite değerlerinin tekrarlanır olup olmadığını saptamak için farklı zamanlarda farklı izolatlardan ekimler yapılarak en uygun inkübasyon süresi olarak saptanan 4 haftalık süre sonunda aktivitelerine tekrar bakıldığında aktivite değerlerinde belirgin bir fark olmadığı görülmüştür. α-Amilaz aktivite değerleri; Tuzköy: [3,72 ± 1,54], Tuz Gölü: [3,60 ± 1,39], Kaldırım Tuzlası: [2,72 ± 1,70] ve Kayacık Tuzlası için: [2,71 ± 0,08] ünite olarak saptanmıştır. Tablo IV.5, IV.6, IV.7 ve IV.8' i incelendiğimizde ve ham amilaz aktivite değerlerini Tablo IV.1, IV.2, IV.3 ve IV.4' deki aktivite değerleri ile karşılaştırdığımızda 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda aktivite değerlerinin farklı araştırma bölgeleri için çok fazla bir değişiklik göstermediği saptanmıştır.

α-Amilaz ve amiloglikosidaz üreten izolatların enzim üretimlerine tuz konsantrasyonunun etkisini araştırmak amacı ile nişasta içeren sıvı besiyerlerinin tuz konsantrasyonları %25' den %15' e düşürüldüğünde ve uygun inkübasyon süresi olan 4. haftanın sonunda aynı izolatlar için yapılan α-amilaz ölçümleri sonucunda araştırma bölgelerine ait aktivite değerleri; Tuzköy; [2,32 ± 0,22], Tuz Gölü; [2,14 ± 0,44], Kaldırım Tuzlası; [2,07 ± 0,53] ve Kayacık Tuzlası için; [1,80 ± 0,14] ünite olarak saptanmıştır. Besiyerlerinin düşük tuz konsantrasyonunun bu enzimlerin aktivitelerini düşürdüğü saptanmıştır.

Araştırma bölgeleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında; Tuz gölü araştırma bölgesinden elde edilen izolatlar (n=10) ile yapılan çalışmalarda α-amilaz enzim

aktivite değerlerinin diğer araştırma bölgelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca Tuzköy araştırma bölgesinden elde edilen izolatlar ile yapılan çalışmalarda α-amilaz enzim aktivite değerlerinin de Kaldırım Tuzlası araştırma bölgesindekine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kayacık Tuzlasından elde edilen α-amilaz aktivitesi gösteren izolatların sayısı çok az olduğundan (n=2) değerlendirmeye alınmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre araştırma bölgelerini kıyasladığımızda; en yüksek α-amilaz aktivitesini Tuz Gölü ve Tuzköy araştırma bölgelerinden izole edilen izolatların gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçların tekrarlanırlılığı açısından yapılan birinci ve ikinci ekimlerde Tuzköy araştırma bölgesinden elde edilen izolatların ikinci ekimlerde daha yüksek aktivite değerleri gösterdiği saptanmıştır (p=0,065). Diğer sonuçlara bakıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Pomares ve diğ., (2003), *Haloferax mediterranei* 'nin α-amilaz aktivitesini 0,5 ünite olarak bildirmiştir. Bu değer bizim bulduğumuz α-amilaz aktivite değerlerine göre oldukça düşüktür. Değerlerimizi *Halobacillus*'dan elde edilen ham enzim aktiviteleri (Amoozegar, Malekzadeh, Khurseed, 2002) ile kıyasladığımız zaman benzer aktivite değerleri saptanmıştır.

α-Amilazlar; hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal alanlarda dünya çapında yayılmış ve endüstriyel sektörlerdeki uygulamalara hakim olmuşlardır (Pandey ve diğ., 2000). Amilazlar, endüstriyel enzim pazarında %25'lik paya sahip bir enzim sınıfıdır (Sindu ve diğ., 1997; Rao ve diğ., 1998). Sonuçlarımıza göre; ülkemizin farklı tuz kaynaklarından elde edilen izolatların α-amilaz aktivitelerinin yüksek bulunması endüstriyel olarak çok değerli bir enzim olan α-amilazın bu kaynaklardan izole edilebileceğini ve tuz içeren sıra dışı ortamlarda bu enzimin kullanılabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Adams, M. W. W.; Perler, F. B.; Kelly, R. M.: "Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis", *Bio/technology*, 13 **(1995)** 662–668.

[2] Amoozegar, M. A.; Malekzadeh, F.; Malik, Khursheed A.: "Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp.strain MA-2", *Journal of Microbiological Methods,* 52 **(2003)** 353-359.

[3] Atalay, A.: "Deneysel Biyokimya, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları Ders Kitapları Dizisi: 5" **(1978).**

[4] Bailey, D.G.; Birbir, M.:"A Study of the Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine-Cured Cattle Hides" *The Journal of the American Leather Chemists Association*, 88 **(1993)** 285-293.

[5] Bailey, D.G.; Birbir, M.: "The Impact of *Halophilic* Organisms on the Grain Quality of Brine Cured Hides", *Journal American Leather Chemists Association*, 91 **(1996)**47,51.

[6] Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H.: "The Prokaryotes", Springer-Verlag, Volume 1, **(1981)** Chapter 34, 768.

[7] Birbir, M.; Elevi, R.: "Kaldırım ve Kayacık Tuzlalarından İzole Edilen Aşırı Halofil Bakterilerin Biyokimyasal Testleri ve Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları", *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı,* Fen Bilimleri, Proje No: Fen BSE-072/171001, **(2005).**

[8] Birbir, M.:"Investigation of Salt-cured France and Russian Hides for Halophilic Bacteria", *J. Turk Microbiol. Soc.* 27 **(1997)** 68-73.

[9] Birbir, M.; Çalli, B.; Mertoğlu, B.; Bardavid Elevi, R.; Oren, A.; Ogmen, M.N.; Ogan, A.: "Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the Adjenct Kaldırım and Kayacık Salterns", *World J. Microbiol. And Biotechnol*., 23 **(2007)** 309-316.

[10] Birbir, M.; Ogan, A.; Çallı, B.; Mertoğlu, B.: "Enzymatic Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzköy salt mine Turkey", *World Journal of Microbiology&Biotechnology,* 20 **(2004a)** 613-621.

[11] Birbir, M.; Ilgaz, A.: "Isolation and Identification of *Bacteria* Adversely Affecting Hide and Leather Quality" , *Journal of the Society of Leather Technologist and Chemist*, 80 **(1996),** 147-153.

[12] Birbir, M.; Kallı, N.: "Şereflikoçhisar Tuz Gölü'ndeki Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu", Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu, Proje No:6 FEN, **(2000).**

[13] Birbir, M.: "Biotechnological Potentials of Extremely Halophilic Bacterial Community Isolated From Tuz Lake, Turkey", *Microbiologia Balkanica,* **(2003).**

[14] BioMaxima Sp. z o. o. ul. Mireckiego 29-31, 20-460 Lublin, 1-033-ENG/5-10 **(2005)**.

[15] Boone, D.R.; Csatenholz, R.W.; Garrity, G.M.: "The *Archaea* and the Deeply Branching and Prototrophic *Bacteria*", *In Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology;* Boone, D.R.; Castenholz, R.W.; Garrity, G.M. Eds.: Springer-Verlag, New York, **(2001)** 294-335.

[16] Cozzone, P.; Pasero, L.; Beaupoil, B.; Marchis-Mouren, G.: Characterization of Porcine Pancreatic Isoamylases Chemical and Physical Studies, *Biochem Biophys Acta,* 207-490, **(1970).**

[17] Çubuk, Y.; Parlak, P., Yılmaz, H.: "Nevşehir İli Gülşehir İlçesi Tuzköy Beldesi Kaya Tuzu Hakkında Teknik Heyet Raporu", Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü Teknik Heyet Raporu **(2000).**

[18] Da Costa, M. S.; Santos, H. ; Galinski, E. A.: "An overview of the role and diversity of compatible solutes", *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 61* **(1998)** 117–153.

[19] Danson, M. J.; Hough, D. W.: "The structural basis of protein halophilicity", *Comp. Biochem. Physiol. 117* **(1997)** 307–312.

[20] Eichler, J.: "Biotechnological uses of archaeal extremozymes", *Biotechnology advances*, 19, **(2001)** 261-278.

[21] Elbek, Y.; Atılgan, Y.; Güzel, K.: "Şerefli Koçhisar", Berter Reklam Yayıncılık, Başak Ofset, Şerefli Koçhisar, Türkiye, **(1995).**

[22] Eryılmaz, S.: "Halosin ve Farklı Enzimler Üreten Aşırı Halofilik Bakteriler Üzerinde Çalışmalar", *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, **(2003).**

[23] Forsyth, M.P.; Kushner, D.J.: "Nutrition and Distribution of Salt Response in Populations of *Halophilic Bacteria*", Canadian Journal of Microbiology, 16 **(1970)** 253-261.

[24] Gomes, J.; Steiner, W.: "Extremophiles and Ekstremozymes", Food Technol. Biotechnol.42(4) 223-235 **(2004).**

[25] Gözüaçık, A.; "Aşırı Halofil Archaea'nın Çeşitli Polimerik Destek Maddelerine İmmobilizasyonu ve Selülaz Aktivitelerinin Tayini", *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, **(2002).**

[26] Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B.: "α-amylases: a biotechnological perspective", *Process Biochem.*, 38: 1599-1616 **(2003).**

[27] Hedrick, D.B.; Guckert, J.B., White, D.C.: "Archaeabacterial Ether Lipid Diversity Analyzed by Supercritical Fluid Chromatography: Integration With a Bacterial Lipid Protocol", *Journal of Lipid Research*, 32 **(1991)** 659-666.

[28] Holmes, Melissa L.; Scopes, R.K.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Englert, C.; Pfeifer, F.; Dyall-Smith, M.L.: "Prufication and analysis of an extremely halophilic β-galactosidase from *Haloferax alicantei*", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology, Volume 1337, Issue 2, **(1997)**, 276-286.

[29] Hough, D.W.; Danson, M.J.; "Extremozymes", *Curr. Opin. Chem. Biol. 3* **(1999)** 39–46.

[30] İlter, M.: "Dünyada ve Türkiye' de Tuz", **(2000)** 1-21.

[31] İnandık, H.: "Türkiye Gölleri", *İstanbul Üniversitesi Yayını* No: 44, Baha Matbaası, İstanbul, **(1955)** 51-54.

[32] Javor, B. J.: "Growth Potential of Halophilic *Bacteria* Isolated from Solar Salt Environments: Carbon Sources and Salt Requirements", *Applied and Enviromental Microbiology*, 48 **(1984)** 352-360.

[33] Jones, W.J.; Nagle, D.P.; Whitman, W.B.: "Methanogens and the Diversity of *Archaeabacteria", Microbiological Reviews,* **(1987)** 135-177.

[34] Kaplan L.; Pesce A. J.: Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation. The C.V. Mosby Company, St. Louis **(1989)**.

[35] Karlson P.: "Tıp Fenciler İçin Biyokimya, Ed: Telefoncu A., Sernet Matbaası, Kırklareli **(1992)**.

[36] Kates, M.; Kushwaha, S.C.; Sprott, G.D.: "Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic *Bacteria*", *Methods in Enzymology*, 88 **(1982)** 98-111.

[37] Khire, J. M.: "Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt-pan.", Lett. Appl. Microbiol. 19, 210-212 **(1994).**

[38] Kobayashi, T., Kanai, H., Hayashi, T., Akiba, T., Akaboshi, R., Horokoshi, K., (**1992**). Haloalkaliphilic maltotriose-forming α-amylase from the archaeabacterium *Natronococcus* sp. Strain Ah-36. J. Bacteriol. 174, 3439-3444.

[39] Koday, S.: "Tuz Gölü Tuzlaları", Marmara Coğrafya Dergisi, 2 **(1999)** 128-149.

[40] Krieger, N.; Steiner, W.; Mitchell, D.: Foreword, *Food Technol. Biotechnol.* 42(4) 219-221 **(2004).**

[41] Krieger, N.; Bhatnagar, T.; Baratti, J.C.; Baron, A.M.; De Lima, V.M.; Mitchell, D.: *Food Technol. Biotechnol.* 42 **(2004)** (279-286).

[42] Kushawa, S.C.; Gochnauer, M.B.; Kushner, D.J.; Kates, M.: "Pigments and Isoprenoid Compounds in Extremely and Moderately Halophilic Bacteria", *Canadian Microb*., 20 **(1974)** 241-245.

[43] Kushner, D.J. "Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria", In *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Pres, London, **(1978)**, 317-368.

[44] Kushner, D. J. : "The *Bacteria*", In The *Halobacteriaceae*, Chapter 3, Vol VIII, Academic Pres, Inc., London **(1985)** 171-213.

[45] Lodwick, D.; Mc Genity, T.J.; Grant, W.D.: "The Phylogenetic Position of the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronobacterium magadii,* Determined from its Ribosomal RNA Sequence", *Syst.of App. Microb*., 17 **(1994)** 402-404.

[46] Madern, D.; Ebel, C.; Zaccai, G.: "Halophilic adaptation of enzymes", *Extremophiles*, 4 **(2000)** 91-98.

[47] Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J.: "Prokaryotic Diversity: *Archaeabacteria", In Brock Biology of Microorganisms,* 9th Edition, Prentice Hall International, Inc., NewJersey, **(2000)** 546-552.

[48] Manners, D. J.; Department of Brewing and Biological Sciences, Heriot-Watt University, Edinburg *EH*1 1*HX*, U.K. **(1971).**

[49] Milosević, N.; Prodanovic, R.; Jovanovic, S.; Novaković, I.; Vujćić, Z.: "Preparation and characterization of two types of covalently immobilized amyloglucosidase", J. Serb. Shem. Soc. 70 (5) 713-719 **(2005)** JSCS-3306.

[50] Mevarech, M.; Frolow, F.; Gloss, L. M.: "Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt", *Biophys. Chem.* 86 **(2000)** 155–164.

[51] Oren, A.: "Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria"**,** *FEMS Microbiol. Ecol*. 39 **(2002)** 1–7.

[52] Oren, A.: "The ecology of the extremely *halophilic archaea*", FEMS Microbiology Reviews, 13 **(1994a)** 415-440.

[53] Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol V.T.; Singh, D.; Mohan, R.: Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31:135-52, **(2000).**

[54] Patel, S.; Jain, N.; Madamwar, D.: "Production of α-amylase from *Halobacterium halobium*", World J. Microbiol. Biotechnol., 9, 25-28, (**1993).**

[55] Pérez- Pomares, F.; Bautista, V.; Ferrer, J.; Pire, C.; Marhuenda-Egea, F. C.; Bonete, M. J.: "Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei",* 7: 299-306, **(2003)**.

[56] Reymond, Jean-Louis : "Spectrophotometric Enzyme Assays for High-Throughput Screening", *Food Technol. Biotechnol*, 42 **(2004)** 265-269.

[57] Quesada, E.; Ventosa, A.; Valera, F.R.; Megias, L.; Cormenzana, A.R.: "Numerical Taxonomy of Moderately *Halophilic* Gram-Negative *Bacteria* from Hypersaline Soils", *Journal of General Microbiology*, 129, 2649-2657, **(1983).**

[58] Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Gathe, M.S.; Deshpande, V.V.: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Micrbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 597-635 **(1998).**

[59] Sellek, G. A.; Chaudhuri, J. B.; " Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles", *Enzyme Microb. Technol. 25* **(1999)** 471–482.

[60] Sindhu, G.S.; Sharma P.; Chakrabarti T.; Gupta, J.K.: Strain improvement for the production of a thermostable α-amylase. Enzyme Microb. Technol. 24: 584-589 **(1997).**

[61] Spring, S.; Ludwig, W.; Marquez, M. C.; Ventosa, A.; Schleifer, K. H.: "*Halobacillus* gen. Nov., with Descriptions of *Halobacillus* litoralis sp. nov. and *Halobacillus* trueperi sp. Nov., and Transfer of Sporosarcina *Halophila* to *Halobacillus* comb. nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 **(1996)** 492-496.

[62] Stoeckenius, W. : "The Rhodopsin-Like Pigments of *Halobacteria*: Light Energy and Signal Transducers in an *Archaebacterium"*, *Biochemical Sciences*, 10 **(1985)** 483-486.

[63] The Society for Applied Microbiology, "Characterization of a salt-tolerant extracellular α-amylase from *Bacillus dipsosauri*" *Letters in Applied Microbiology*, **35**, 78-84 **(2002)**.

[64] Tonosaki, A.; Tokunaga, F.; Washioka, H.; Kataoka, M.; Hisatomi, O.: "Fine structure of the red membrane of *Halobacterium halobium (RI)*", *Biomedical Research,* 5 **(1984)** 1-8.

[65] Trinder P.: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem. 6, 24-27 **(1969)**.

[66] Uyanık, E.: "Kişisel Görüşme" (Kaldırım Tuz İşletmesi) **(2004).**

[67] Valera, F.R.: "In *Halophilic Bacteria*", Vol 1-2., CRS Press, Baco Raton, **(1988).**

[68] Valera, F.R.: Ventosa, A.; Juez, G.; Imhoff, J.F.: "Variation of Environmental Features and Microbial Populations with Salt Concentration in a Multi-pond Saltern", *Microbiol Ecology*, 7 **(1981)** 235-243.

[69] Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., (**1998**). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 504-544.

[70] Vidyasagar, M.; Prakash, S.; Litchfield, C.:: "Prufication and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101", 2, 51-57 **(2006)**.

[71] Vreeland, R.H.: "Taxonomy of *Halophilic Bacteria*", In *The Biology of Halophilic Bacteria*, Vreeland, R.H.; Hochstein L.I.: Eds.; FI: CRS Pres, Baco Raton, **(1993)** 105-134.

[72] Whaler, D.; Reymond, Jean-Louis : *Curr. Opin. Biotechnol.* 5 **(2001)** 152-158.

[73] Wubbolts, M. G.;Bucke, C.; Bielecki, S.: "How to Get the Biocatalyst", In: *Applied Biocatalysis,* 2nd ed., Straathof, A. J. J.; Adlercreutz, P.(Eds.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam **(2000)** pp. 153–297.

[74] http://www.aof.edu.tr/kitap/IOLTP/ünite 03 pdf (Erişim Tarihi: Nisan **2007**).

[75] http://www.answers.com/topic/beta-galactosidase (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[76] http://www.answers.com/topic/glucose-oxidase (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[77] http://www.bioline.org.br/request?jb03116 (Erişim Tarihi: Nisan **2005**).

[78] www.google.com: "phosphate buffer calculator" (Erişim Tarihi:17 Mart **2006**).

[79] http://jchemed.chem.wisc.edu/ICEsoft/CCA/CCA5/MAIN/2BIOCHEM (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[80] http://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_(A_better_Miller) (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[81] www.ucmp.berkeley.edu/archaea (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[82] http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-galactosidase (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[83] http://wikipedia.org/wiki/Glucose_oxidase (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[84] http://www.worthington-biochem.com/GOP/default.html (Erişim Tarihi: Mart **2007**).

[85] http://www.worthington-biochem.com/AA/default.html (Erişim Tarihi: Kasım **2004**).

[86] http://www.worthington-biochem.com/BG/default.html (Erişim Tarihi: Mart **2004**).

ÖZGEÇMİŞ

28.06.1979 tarihinde Hatay'ın merkez ilçesi Antakya'da dünyaya geldim. İlköğretimimi İnönü İlkokulu'nda, hazırlık ve orta öğretimimi Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra ardından lise eğitimime Gaziantep Vehbi Dinçerler Fen Lisesi'nde başladım. İki yıllık eğitim süresinin ardından lise eğitimimi Antakya Özel Ata Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2001 yılında mezun oldum. Ardından bir yıl kadar özel bir dershanede kimya öğretmenliği görevinde bulundum. 2002 yılında bir devlet okuluna sınıf öğretmeni olarak atandım. 2004 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladım ve halen yüksek lisans eğitimime ve öğretmenlik mesleğime devam etmekteyim.