

**T.C.**  
**KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**



**TUZ GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN ARKELERİN**  
**(HALOBACTERIALES: HALOBACTERIACEAE)**  
**FİLOGENETİK TÜR TANIMLAMASI, KAROTENOİDLERİNİN**  
**ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**FEVZİYE İŞİL KESBİÇ**

**DOKTORA TEZİ**

**DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE**

**TEMMUZ - 2020**

**KASTAMONU**



## TAAHHÜTNAME

*Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.*

Fevziye Işıl KESBİÇ



## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### TUZ MADENİNDEN İZOLE EDİLEN ARKELERİN (HALOBACTERIALES: HALOBACTERIACEAE) FİLOGENETİK OLARAK TANIMLANMASI, KAROTENOİDLERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

FEVZİYE İŞİL KESBİÇ

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
DANIŞMAN: DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE

Bu çalışmada, Ankara, Konya ve Aksaray illerinin sınırları arasında bulunan Tuz Gölü'nün farklı noktalarından alınan tuz numunelerinden izole edilen halofilik arke suşlarının karotenoidlerinin belirlenmesi ve karotenoidlerinin sahip olduğu antioksidan aktivitelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. MAM JCM 168 besiyerinde kültüre edilen halofilik arke suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri, biyokimyasal ve filogenetik analizler ile tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 7 farklı halofilik arke suşu % 98 ve üzeri benzerlik oranıyla *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV-22B20, *Haloarcula salaria* HST01-2R, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316, *Haloterrigena thermotolerans* PR5, *Haloarcula japonica* JCM 7785 olarak tespit edilmiştir. Türlerin sahip olduğu majör karotenoid all-trans bakterioruberin olarak belirlenmiş ve bakterioruberin izomerlerinin yanısıra likopen, β-karoten ve IDR gibi farklı karotenoid tiplerine de rastlanmıştır. Türlerden ekstrakte edilen karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürme metoduyla analiz edilmiş ve türlere ait IC<sub>50</sub> değerleri *H. lipolyticum* JCM 13559, *H. sodomense* JCM 8880, *H. californiense* FV-22B20, *H. salaria* HST01-2R, *H. chaoviator* DSM 19316, *H. thermotolerans* PR5, *H. japonica* JCM 7785 için sırasıyla; 2,601 µg/mL; 0,904 µg/mL; 1,007 µg/mL; 1,927 µg/mL; 1,402 µg/mL; 1,284 µg/mL ve 1,474 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Tuz Gölü, Halofilik Arke, Karotenoid, Antioksidan, 16s rRNA, SEM, AFM.

Temmuz 2020, 101 Sayfa

Bilim Dalı: 923

## ABSTRACT

### PH.D THESIS

#### PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF ARCHAEA (HALOBACTERIALES: HALOBACTERIACEAE) ISOLATED FROM SALT LAKE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THEIR CAROTENOIDS

FEVZİYE İŞİL KESBİÇ

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING  
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NEJDET GÜLTEPE

In this study, it was aimed to determine the carotenoids of the halophilic archaea strains isolated from the salt samples, which are located between the borders of Ankara, Konya and Aksaray, and to determine the antioxidant activities of carotenoids. Antibiotic susceptibility tests, biochemical and phylogenetic analysis of halophilic archaea strains cultured on MAM JCM 168 medium were carried out. According to the results of the analysis, 7 different halophilic archaea strains has been identified as *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV-22B20, *Haloarcula salaria* HST01-2R, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316, *Haloterrigena thermotolerans* PR5 and *Haloarcula japonica* JCM 7785 with 98 % and above similarity ratio. The major carotenoid of the species has been identified as all-trans bacterioruberin and different carotenoid types such as lycopene,  $\beta$ -carotene and IDR have been found in addition to the bacterioruberin isomers. The antioxidant activities of carotenoids extracted from the species were analyzed by the DPPH radical scavenging method and IC<sub>50</sub> values of the species were 2,601  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ; 0,904  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ; 1,007  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ; 1,927  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ; 1,402  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , 1,284  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and 1,474  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *H. lipolyticum* JCM 13559, *H. sodomense* JCM 8880, *H. californiense* FV-22B20, *H. salaria* HST01-2R, *H. chaoviator* DSM 19316, *H. thermotolerans* PR5 and *H. japonica* JCM 7785, respectively.

**KEYWORDS:** Tuz Lake, Halophilic Archaea, Carotenoid, Antioxidant, 16S rRNA, SEM

July 2020, 101 Page  
Science Code: 923

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bana bu konuda çalışma imkanı veren, en başından beri güven ve anlayışıyla her zaman desteğini hissettiğim, tecrübe ve bilgileriyle katkıları benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE'ye teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda sağlamış oldukları destekleri sebebiyle Sayın Prof. Dr. Naci TÜZEMEN ve Sayın Prof. Dr. Savaş CANBULAT'a teşekkür ederim.

Mesleki ve akademik hayatımdaki değerli katkılarından ötürü Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Özgür ÖZTÜRK'e; desteklerinden dolayı başta Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Mahmut GÜR olmak üzere, en başından beri yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Cahit ÖREK, Dr. Şeydanur KAYA, Uzm. Biyolog Pınar BALOĞLU, Öğr. Gör. Merve ZURNACI, Gürsel BABACAN, Dr. Emre AYDİLEK ve Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nın kıymetli personeline ve ayrıca tez numunelerimin teminindeki kıymetli yardımlarından ötürü Dr. Öğr. Üyesi Burak Evren İNANAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi doktora tez sürecimde de her türlü desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Osman Sabri KESBİÇ'e; en değerli varlığım, sevgili oğlum Kemal Kerem KESBİÇ'e, hayatım boyunca her zaman bana güvenen, maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan kardeşim Elif MEYDANI, annem İkbal Şehbal MEYDANI ve babam Ziya MEYDANI'ye şükranlarımı sunarım.

Fevziye Işıl KESBİÇ

Kastamonu, 2020

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TAAHHÜTNAME</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>3</b>
2.1 Halofilik Arkeler.....	3
2.1.1 Sınıflandırmaları .....	3
2.1.2 Filogeni, Morfoloji ve Fizyolojileri .....	4
2.2 Karotenoidler .....	5
2.2.1 Kimyasal Yapıları .....	5
2.2.2 Haloarkeal Karotenoidler.....	7
2.2.3 Karotenoidlerin Antioksidan Aktiviteleri .....	8
2.2.4 Karotenoidlerin Biyolojik Kaynakları .....	10
2.2.5 Karotenoidlerin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	11
2.3 Haloarkeal Karotenoidlerin Biyoteknolojik ve Biyomedikal Önemi ....	13
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Tuz numuneleri .....	17
3.1.2 Besiyerleri .....	17
3.1.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	18
3.1.4 Gram Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....	19
3.1.5 Tetra metil $\rho$ -fenilen diamin dihidroklorid Çözeltisi .....	19
3.1.6 Hidrojen Peroksit Çözeltisi .....	19
3.1.7 İndol Testinde Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Besiyerleri .....	20
3.1.8 Nitrattan Gaz Oluşumu ve Nitrattan Nitrit Oluşumu Testinde Kullanılan Besiyerleri .....	20
3.1.9 Nitrattan Nitrit Oluşumu Testinde Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.1.10 Farklı Karbon Kaynakları .....	21
3.1.11 Minimum Magnezyum İhtiyacı .....	21
3.1.12 Kazein Hidrolizi.....	21
3.1.13 Jelatin Hidrolizi.....	21
3.1.14 Tween 80 Hidrolizi .....	22
3.1.15 Nişasta Hidrolizi .....	22
3.1.16 STE Tamponu .....	22
3.1.17 TE Tamponu .....	22
3.1.18 Tris Doyurulmuş Fenol .....	22
3.1.19 1X TBE Çözeltisi.....	23
3.1.20 Agaroz Jel .....	23

3.1.21	400X Syber Green Jel Boya Çözeltisi .....	23
3.1.22	Glutardialdehid Çözeltisi .....	23
3.1.23	PBS Çözeltisi .....	23
3.1.24	Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar .....	23
3.2	Yöntem .....	24
3.2.1	Numunelerin Laboratuvara Taşınması.....	24
3.2.2	Numunelerin Zenginleştirilmesi ve Arkelerin İzolasyonu.....	24
3.2.3	Biyokimyasal Testler .....	25
3.2.4	İzolatların Optimum Büyüme Koşullarının Belirlenmesi.....	27
3.2.5	İzolatların karbon kaynağı kullanımının belirlenmesi .....	28
3.2.6	İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi .....	28
3.2.7	Kazein hidrolizi testi .....	28
3.2.8	Jelatin hidrolizi testi.....	28
3.2.9	Nişasta hidrolizi testi.....	29
3.2.10	Tween 80 hidrolizi testi .....	29
3.2.11	Yağ Asidi Metil Esterleştirme (FAME) Analizleri.....	29
3.2.12	DNA İzolasyonu .....	31
3.2.13	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	31
3.2.14	Türlerin Taramalı Elektron Mikroskobu ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Görüntülemelerine Hazırlanması .....	33
3.2.15	Büyüme Eğrisinin Oluşturulması.....	35
3.2.16	İzolatlara Ait Karotenoidlerin Ekstraksiyonu .....	35
3.2.17	Total karotenoid miktarlarının hesaplanması.....	35
3.2.18	Karotenoid içeriklerinin ince tabaka kromatografisi ile belirlenmesi.....	36
3.2.19	Karotenoid içeriklerinin UV-VIS spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi.....	36
3.2.20	Karotenoid içeriklerinin HPLC ile belirlenmesi .....	37
3.2.21	Karotenoid içeriklerinin LC-MS/MS ile belirlenmesi .....	38
3.2.22	Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	39
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>40</b>
4.1	Arkelerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu .....	40
4.1.1	Arkelerin İzolasyonu.....	40
4.1.2	İzolatların Gram Boyama Sonuçları .....	40
4.1.3	İzolatların Fenotipik, Biyokimyasal Karakteristikleri ve Büyüme Gereksinimleri.....	40
4.1.4	İzolatların Filogenetik İdentifikasyonu.....	44
4.1.5	Türlere Ait Elektron Mikrografları .....	46
4.1.6	Türlere Ait Atomik Kuvvet Mikrografları .....	48
4.1.7	Türlere Ait FAME Analizleri.....	51
4.2	Büyüme eğrileri .....	53
4.3	İzolatların Karotenoid Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	56
4.3.1	İnce Tabaka Kromatografisi Analizleri .....	56
4.3.2	Karotenoidlerin UV-VIS Spektrofotometrik Analizleri .....	56
4.3.3	Karotenoidlerin Kromatografik Cihazlarla Saptanması.....	60
4.4	Türlere Ait Karotenoidlerin Antioksidan Aktiviteleri .....	73
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>88</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>90</b>

**ÖZGEÇMİŞ.....99**



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1	Bazı bakterioruberin izomerlerinin kimyasal yapıları; A)Trans bakterioruberin. B) 5Z bakterioruberin. C) 9Z bakterioruberin. D) 13Z bakterioruberin (Yachai, 2009).....	8
Şekil 3.1	Tuz numunelerinin alındığı istasyonlar.....	17
Şekil 3.2	Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (Shimadzu, QP- 2010 Ultra) .....	30
Şekil 3.3	Termal döngü cihazı (BIORAD, T100), elektroforez tankı ve güç kaynağı (BIORAD, Powerpack basic) .....	32
Şekil 3.4	Jel görüntüleme sistemi (BIORAD, Gel-Doc).....	32
Şekil 3.5	Taramalı elektron mikroskobu (FEI, Quanta FEG 250) .....	34
Şekil 3.6	Au-Pd kaplama cihazı (Cressington sputter coater, 108 Auto).....	34
Şekil 3.7	Atomik kuvvet mikroskobu (Bruker, Edge 3).....	34
Şekil 3.8	Spektral ince yapının elemanlarını gösteren spektrum örneği .....	37
Şekil 3.9	Cis pik intensite hesaplamasını gösteren spektrum örneği.....	37
Şekil 3.10	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Shimadzu, LC 20A Prominence) .....	38
Şekil 3.11	Sıvı kromatografisi kütle-kütle spektrometresi (Shimadzu, LC-MS 8040).....	39
Şekil 3.12	Mikro plaka okuyucu (BioTek, Epoch2).....	39
Şekil 4.1	İzolatlara ait jelatinaz testi görüntüsü.....	42
Şekil 4.2	TG3 ve SS1 kodlu izolatlara ait indol testi görüntüsü .....	42
Şekil 4.3	ES1 ve EST1 izolatlarına ait nitrattan nitrit oluşturma test görüntüleri .....	43
Şekil 4.4	EKT3 izolatına ait B 10 ve NV 30 test sonuçları.....	44
Şekil 4.5	İzolatlar ve benzerlik gösterdikleri türlere ait filogenetik ağaç.....	45
Şekil 4.6	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559'a ait elektron mikrografları.....	46
Şekil 4.7	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880'e ait elektron mikrografları .....	46
Şekil 4.8	<i>Halorubrum californiense</i> FV 22B20'ye ait elektron mikrografları..	47
Şekil 4.9	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R'te ait elektron mikrografları .....	47
Şekil 4.10	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316'ya ait elektron mikrografları ..	47
Şekil 4.11	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5'e ait elektron mikrografları .....	48
Şekil 4.12	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785'e ait elektron mikrografları .....	48
Şekil 4.13	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559'a ait AFM mikrografi .....	48
Şekil 4.14	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880'ye ait AFM mikrografi.....	49
Şekil 4.15	<i>Halorubrum californiense</i> FV-22B20'ye ait AFM mikrografi .....	49
Şekil 4.16	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R'ya ait AFM mikrografi.....	49
Şekil 4.17	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316'e ait AFM mikrografi .....	50
Şekil 4.18	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5'a ait AFM mikrografi.....	50
Şekil 4.19	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785'ya ait AFM mikrografi.....	50
Şekil 4.20	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	53
Şekil 4.21	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	53

Şekil 4.22	<i>Halorubrum californiense</i> FV_22B20 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	54
Şekil 4.23	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R türü günlere bağlı büyüme performansı.....	54
Şekil 4.24	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	55
Şekil 4.25	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	55
Şekil 4.26	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785 türü günlere bağlı büyüme performansı.....	56
Şekil 4.27	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	57
Şekil 4.28	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	57
Şekil 4.29	<i>Halorubrum californiense</i> FV 22B20'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	58
Şekil 4.30	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	58
Şekil 4.31	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	59
Şekil 4.32	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	59
Şekil 4.33	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum.....	60
Şekil 4.34	Bakterioruberin'e ait iyon spektrumu .....	61
Şekil 4.35	Monoanhidrobakterioruberin'e ait iyon spektrumu .....	61
Şekil 4.36	Bisanhidrobakterioruberin'e ait iyon spektrumu.....	61
Şekil 4.37	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	62
Şekil 4.38	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	64
Şekil 4.39	<i>Halorubrum californiense</i> FV 22B20'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	65
Şekil 4.40	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R' dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	67
Şekil 4.41	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	69

Şekil 4.42	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	70
Şekil 4.43	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması .....	72
Şekil 4.44	96 U plakalda DPPH reaksiyonu.....	73
Şekil 4.45	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559'a ait % RSA grafiği .....	74
Şekil 4.46	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880'e ait % RSA grafiği.....	74
Şekil 4.47	<i>Halorubrum californiense</i> FV22B20 'e ait % RSA grafiği .....	75
Şekil 4.48	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R'a ait % RSA grafiği.....	75
Şekil 4.49	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316'a ait % RSA grafiği.....	76
Şekil 4.50	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5'e ait % RSA grafiği.....	76
Şekil 4.51	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785'e ait % RSA grafiği.....	77



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Halofilik mikroorganizmalardan elde edilen karotenoidlerle ilgili alınan patentler.....	15
Tablo 3.1 MAM JCM 168 besiyeri .....	18
Tablo 3.2 Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotik tipleri ve konsantrasyonları .....	18
Tablo 3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü .....	33
Tablo 3.4 HPLC analizinde kullanılan gradient metot .....	38
Tablo 4.1 Biyokimyasal test sonuçları .....	41
Tablo 4.2 İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon çapları (mm) .....	43
Tablo 4.3 İzolatların NCBI veribankasına göre türlere benzerlik oranları.....	45
Tablo 4.4 İzolatlara ait FAME analiz sonuçları (ppm).....	51
Tablo 4.5 <i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559 karotenoid karakteristiği.....	62
Tablo 4.6 <i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880 karotenoid karakteristiği .....	64
Tablo 4.7 <i>Halorubrum californiense</i> FV 22B20 karotenoid karakteristiği.....	66
Tablo 4.8 <i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R karotenoid karakteristiği .....	67
Tablo 4.9 <i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316 karotenoid karakteristiği.....	69
Tablo 4.10 <i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 karotenoid karakteristiği .....	71
Tablo 4.11 <i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785 karotenoid karakteristiği .....	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
w/v	: Ağırlıkça Yüzde
$\beta$	: Beta
E	: Trans izomeri
Z	: Cis izomeri
$\alpha$	: Alfa

### Kısaltmalar

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
Au	: Altın
BABR	: Bisanhidrobakterioruberin
bp	: Baz çifti
BR	: Bakterioruberin
dk	: Dakika
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FAME	: Yağ asidi metil esterleri
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Demir klorür tetra hidrat
g	: Gram
GC-MS	: Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi
HepG2	: İnsan karaciğer kanser hücre hattı
HgCl	: Civa klorür
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
$\text{IC}_{50}$	: İnhibitör konsantrasyonu
IDR	: İsoptenildehidrorhodopin
KCl	: Potasyum klorür
$\text{KNO}_3$	: Potasyum nitrat
KPa	: Kilo pascal
L	: Litre
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
M	: Molar
mA	: Miliamper
MABR	: Monoanhidrobakterioruberin
MAM	: Modifiye agar medium
mAU	: Mili absorban ünitesi
$\text{MgCl}_2$	: Magnezyum klorür

<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	: Mangan klorür tetra hidrat
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>PBS</b>	: Fosfat tuzlu tampon
<b>Pd</b>	: Paladyum
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>rRNA</b>	: Ribozomal ribonükleik asit
<b>RSA</b>	: Radikal süpürme aktivitesi
<b>RT</b>	: Alıkonma zamanı
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskobu
<b>STE</b>	: Sodyum klorür tris edta
<b>sn</b>	: Saniye
<b>TE</b>	: Tris edta
<b>TLC</b>	: İnce tabaka kromatografisi
<b>U</b>	: Ünite
<b>UV</b>	: Ultra viyole
<b>V</b>	: Volt
<b>VIS</b>	: Görünür ışık

## 1. GİRİŞ

Arke alemine ait canlılar yapılan rRNA çalışmalarına kadar; prokaryotik olmaları, halkasal genoma sahip olmaları ve operonlarındaki gen organizasyonları sebebiyle bakteri olarak kabul edilmekteyken, Woese ve Fox (1977)'un yaptıkları çalışmayla biyokimyasal olarak ökaryot alemine bakteri aleminden daha yakın olduğunun tespit etmesiyle, arke, yaşamın üç aleminden biri olarak tanımlanmıştır. Arkeler yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek sıcaklık, asidik ve metanojenik ortamlar gibi ekstrem koşullarda yaşamaya adapte olmuş mikroorganizmalardır.

Halofilik mikroorganizmalar tuz gölleri, tuz madenleri, tuzlalar ve tuzlu topraklar gibi toplam tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu ortamlarda yaşamaya uyum sağlamış mikroorganizmalardır. Arke alemi altındaki halofilik mikroorganizmalara Halobacteriaceae, Methanospirillaceae ve Methanosarcinaceae olmak üzere üç farklı ailede rastlansa da, halofilik arkeler denildiğinde tüm üyeleri halofilik olan Halobacteriaceae ailesi anlaşılmaktadır.

Halobacteriaceae ailesi üyelerinin büyük çoğunluğu sahip oldukları karotenoidler sebebiyle pembe, turuncu ya da kırmızı pigmentlere sahip olup; geniş yayılım ve üreme gösterdikleri ortamlarda da renk değişimlerine sebebiyet vermektedirler. Sahip olduğu bu pigmentler, hücreleri güneş ışınları, radyasyon, sıcaklık ve tuzlalardaki buharlaşmaya karşı korur (Castillo vd., 2006).

Karotenoidler; bakteriler, arkeler, mantarlar, bitkiler ve algler gibi geniş çeşitlilikte organizmalardan elde edilebilen, çok çeşitli yapısal farklılık ve fonksiyona sahip olan, sarıdan turuncu ve kırmızıya kadar farklı renklere sahip olabilen en önemli doğal pigment kaynaklarıdır (Oliver ve Palou, 2000). Karotenoidlerin bilinen en önemli biyolojik aktiviteleri; provitamin A aktivitesi, antioksidant etki, hücresel iletişim, bağışıklık sistemini artırıcı etki, UV'ye karşı cilt koruyucu ve göz sağlığını koruyucu etkileridir (Wilska-Jeszka, 2007; Yağcılar, 2012). Bu sebeple karotenoidler endüstride yaygın olarak kullanılmakta olup özellikle kozmetik, yem, ilaç ve gıda endüstrilerinde renklendirici ve antioksidant olarak kullanım alanı bulmaktadır (Calegari-Santos vd., 2016). Kemosentez yoluyla üretilen sentetik karotenoidlerin

alerji, aşırı duyarlılık, intolerans ve çocukluk çağı hiperaktivitelerine sebep vermesine karşı artan endişeler, biyolojik kaynaklı karotenoidlerin üretimlerinin artırılmasına karşı olan ilgiyi beraberinde getirmiştir (Yachai, 2009). Karotenoidler; en çok bitkiler olmak üzere, mikroorganizma ve mantarlar tarafından da sentezlenmektedir. Ancak üretim süresi, üretim kolaylığı, üretim için gerekli alan ihtiyacı ve maliyet gibi parametreler göz önüne alındığında mikroorganizmalardan elde edilen karotenoidlerin avantajı ön plana çıkmaktadır. Ekstrem halofilik mikroorganizmaların aseptik olmayan koşullarda üreyebilmeleri ve karotenoidlerinin mekanik bir parçalamaya gerek olmadan hücreden ekstrakte edilebilir olması karotenoidlerin endüstriyel çapta üretiminde halofilik mikroorganizmaların bir alternatif sağlaması açısından önem teşkil edebileceği öngörülmektedir.

Karotenoidlerin çok sayıda konjuge çift bağ içermesi, radikal süpürücü olarak işlev görmelerini ve bu sayede reaktif oksijen ve azot gibi zararlı moleküllerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu görev almalarını sağlamaktadır (Miller vd., 1996; Squillaci, 2017) Halofilik organizmaların sahip olduğu karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin tespit edilmesinin gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde renk verici olarak kullanım alanlarını artıracakları düşünülmektedir.

Bu çalışmada Ankara, Konya ve Aksaray illerinin sınırları arasında bulunan Tuz Gölü'nün farklı noktalarından izole edilen halofilik mikroorganizmaların kültüre edilerek, halofilik arkelerin filogenetik olarak belirlenmesi, belirlenen bu suşların karotenoid içeriklerinin saptanmasıyla çıkarılan karotenoid profiline bağlı olarak in vitro antioksidan aktivitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1 Halofilik Arkeler

#### 2.1.1 Sınıflandırmaları

Canlılığın sınıflandırması, bakteriler ve ökaryotlar olarak yapılmakta iken Woese ve Fox (1977)'un ribozomal RNA dizileme temelli karakterizasyonu ile birlikte canlılık sınıflandırması; bakteri, ökaryot ve arke olmak üzere üç farklı alem olarak yapılmaya başlanmıştır. Arkeler; halkasal genomları, prokaryotik morfolojileri ve operonlarındaki gen organizasyonları sebebiyle uzunca bir zaman bakterilerle birlikte sınıflandırılmış ancak bu çalışmayla birlikte sahip olduğu rRNA filogenisi onların ayrı bir alem olarak sınıflandırılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bakteri ve arkelerin ayrımı günümüzde filogenetik bilgilerle birlikte fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik verilere de dayanmaktadır (Schleifer, 2008).

Archaea aleminin Euryarchaeota şubesinde ve Halobacteriales takımında sınıflandırılan ve hipersalin çevrelerde gelişim gösteren türler, halofilik arkeler olarak gruplandırılmaktadır. Halofilik arkeler, Halobacteriaceae ailesinde sınıflandırılmış olan aerobik ya da fakültatif aerobik, genellikle pembe-kırmızı pigmentli, 47 cins ve 165 türden ve ayrıca anaerobik koşullar altında metillenmiş aminlerden enerji elde edebilen, 4 cins ve 7 türle temsil edilen metanojenlerden oluşmaktadır. Ayrıca metagenomik çalışmalar NaCl doygunluğuna varan yüksek tuzlu çevrelerde Nanohaloarchaea olarak isimlendirilen ancak henüz hiçbir üyesinin kültüre edilemediği bir grubun varlığı ortaya konulmuştur (Oren, 2014).

Taxonomy of Halobacteriaceae Committee (Halobacteriaceae Sınıflandırma Komitesi) tarafından bir türün Halobacteriaceae'ye dahil edilebilmesi için gerekli olan standart parametreleri belirlemiş (Oren vd., 1997) ve zaman içerisinde bu standartlarda güncellemeler yapmıştır. Komite tarafından belirlenen minimum parametreler; koloni ve hücre morfolojisi, hareketlilik, pigmentasyon, gram boyama, büyüme için gerekli optimum NaCl ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ile sıcaklık ve pH aralıkları, nitrat varlığında anaerobik büyüme, nitratı nitrite indirgeme, nitrattan gaz

oluşumu, arjinin varlığında anaerobik büyüme, karbonhidratlardan asit üretme, tek karbon kaynağında büyüebilme, katalaz ve oksidaz aktiviteleri, indol oluşumu, nişasta, jelatin, kazein, Tween 80 hidrolizi, antibiyotik duyarlılıkları, polar lipit karakterizasyonu, DNA'nın G+C içeriği, 16S rRNA dizi analizi ve elektron mikroskopisi gibi analizlerdir (Oren vd., 1997).

Polar lipit analizleri bazı grupların farklılıklarını ortaya koymada önemli bir parametre olsa da Halobacteriaceae ailesinin çoğu üyesi arasında çok az fenotipik farklılık gözlenmesi, fenotipik farklılar temel alınarak tür tanımı yapılmasını zorlaştırmakta ve bazı türler yalnızca 16S rRNA dizi analizi temelli yaklaşımla belirlenebilmektedir (Oren, 2014).

### **2.1.2 Filogeni, Morfoloji ve Fizyolojileri**

Halofilik arkeler, yaşamda ekstrem tuzluluk şartlarında hayatta kalmaya özelleşmiş arke grubudur. Yüksek hücre içi potasyum konsantrasyonunu biriktirebilirler ve sahip oldukları proteinler kayda değer miktarda asidik aminoasitlerden oluşur. Tüm bu özelliklerin yanında, halofilik arkeler eşsiz C<sub>50</sub> karotenoid pigmentlerine sahiptirler ve bu moleküller doğal koşullarda organizmayı koruyucu özellik göstermekle birlikte kolonilere tipik kırmızı rengini de kazandıran pigmentlerdir. Halofilik arkeler solar tuzlular ve tuz gölleri gibi tuz konsantrasyonunun oldukça yüksek seviyelere çıktığı hipersalin çevrelerde yaşarlar. Bu çevrelerde hem güneş ışınları hem de tuz konsantrasyonu ısının 55 °C üzerindeki değerlere ulaşmasına sebep olur. Bu bakış açısıyla haloarkelerin yalnızca ekstrem halofiller değil aynı zamanda ılımlı termofiller de olduğu belirtilebilmektedir. Yüksek sıcaklık ve yüksek tuzluluk oksijen miktarını azalttığından yeterli havalandırma sağlandığında 45-50 °C sıcaklıkta oldukça yoğun büyüme performansı göstermektedirler (Juez, 2004).

Haloarkeler, ekstrem koşullara özellikle ekstrem tuzluluğa dayanıklılık gösterebilen mikroorganizmalar olup, bazı türleri hayatta kalabilmek için ihtiyaç duyduğu tuzluluğu tuz kristallerinin içerisinde uzun süre kalarak sağlamaktadır. Haloarkeler içerisinde 5 M'dan yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen ekstrem türler

olduğu gibi, *Haloferax* cinsine ait üyeler diğer gruplardan daha düşük konsantrasyonlarda yaşayabilmektedir (Torreblanca vd., 1986).

Düşük tuzluluk; hücre duvarı stabilitesi, protein stabilitesi ve fonksiyonlarını etkiler ve hücre lizisine sebep olabilir. Özellikle glikoproteinden oluşan hücre duvarına sahip basil ve pleomorfik türlerin hücre bütünlüğü, polisakkarit hücre duvarına sahip olan kokkal türlere kıyasla daha fazla etkilenmektedir. Ökaryot ve bakteri alemlerine dahil olan türlerde ana uyumlu çözünen olarak, organik maddelerin depolanmasına rağmen haloarkeler ozmotik basıncı dengeleyebilmek için ana uyumlu çözünen olarak yüksek konsantrasyonda hücre içi potasyum depolarlar. Hücre içi potasyum içeriği, hücre dışı sodyum konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Hücre içi iyonik potasyum, uygun katyon konsantrasyonu eksikliğinde proteinlerdeki asidik aminoasitlerin stabilitesini kaybetmesini engellemede önemli role sahiptir. Potasyum iyonu protein stabilizasyonunda ana katyon olarak görev alırken magnezyum gibi divalent katyonlar, spermidin gibi poliaminler ve gliserol gibi organik çözücülerin de stabilizasyona katkıda bulunduğu in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir (Lanyi, 1974)

Membran polar lipit kompozisyonları, uzun bir süredir haloarkeal cinslerin tanımlanmasında anahtar kemotaksonomik kriter olarak kullanılmaktadır. Haloarkelerin eter bağlı fosfolipitler olan fosfatidil gliserol ve fosfatidil gliserol fosfat metil estere sahip olduğu; bazı türlerin fosfatidil gliserol sülfat ve bir ya da daha fazla glikolipit veya sülfatlı glikolipitlere sahip olduğu, çoğu gliserol eter lipitlerin C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> (diftanil) izoprenoidleri, haloalkalifillerden bazılarının ise C<sub>20</sub>C<sub>25</sub> (fitanil-sesterfanil) ya da C<sub>25</sub>C<sub>25</sub> (disesterfanil) izoprenoid zincirlerinin mevcut olduğu ortaya konulmuştur (Fendrihan vd., 2006).

## **2.2 Karotenoidler**

### **2.2.1 Kimyasal Yapıları**

Karotenoidler, kırmızıdan sarıya çok geniş skalada renk tonlarına ayrıca yapısal ve fonksiyonel farklılıklara sahip; mikroorganizmalar, algler, mantarlar ve bitkiler tarafından çevresel stres parametrelerine karşı bir yanıt olarak sentezlenen ancak hayvanların gıdalar yoluyla elde etmesi gereken pigmentlerdir (Kläui, 1982).

Karotenoidler oksijene, ısıya ve ışığa duyarlı lipidik fraksiyonlarla ilişkili yağda çözünür molekül sınıflarıdır (Ciapara vd., 2004) ve bu poliizoprenoid bileşikler iki ana grup altında toplanabilir. Bunlardan ilki karbon ve hidrojen atomlarından oluşan karoten ya da hidrokarbon karotenoidler olup diğeri ise hidroksil, keto, epoksi, metoksi ve karboksilik asit gibi en az bir oksijen fonksiyonuna sahip oksijenlenmiş hidrokarbon türevleri olan ksantofillerdir (Kirti vd., 2014).

Karotenoid molekülünün şekli izomerik formuyla (cis ya da trans) ilişkilidir ve bu formlara sahip olması karotenoidin çözünürlük ve absorpsiyon özelliklerini değiştirir (Kirti vd., 2014). Lipidofilik olan karotenoidler; hidrofobisite açısından suda, sıcaklık artışıyla bile ya hiç çözünememe ya da çok az miktarda çözünmeleriyle ekstrem hidrofobik moleküller sınıfına girmektedirler (Wisniewska ve Subczynsk, 1998). Karotenoidlerin fonksiyonları; moleküler büyüklüklerine, çözünebilirliklerine, konjuge çift bağ sayılarına ve fonksiyonel grup ya da halkasal sonlarının olup olmamasına bağlıdır (Naziri vd., 2014). Karotenoidlerin trans formu cis formuna göre çok daha rijittir ve kristalize hale geçme ya da çökelmeye karşı büyük bir eğilime sahiptir. Likopen gibi halkasal olmayan karotenoidler esnek son gruplarıyla oldukça uzun ve lineer moleküllerdir (Britton, 1995). Karotenoidlerin çoğu likopen den sentezlenir. Vitamin A'nın öncüsü olan  $\beta$ -karoten biyosentezi her iki ucun  $\beta$  siklizasyonu ve reaksiyonun likopen  $\beta$  siklaz ile katalizlenmesiyle direkt olarak likopen den yapılır (Egorova ve Antranikian, 2008).

Dokuzdan daha uzun olan polien konjuge bağ çifti, karotenoidlerin pigmentasyon özelliklerinden sorumludur ve bağlar arası elektron geçişinin enerjisi 400-500 nm arasında absorpsiyona karşılık gelmekte olup bu da karotenoidlerin yoğun şekilde sarı, kırmızı ve turuncu rengini ortaya çıkarmaktadır. Konjugasyonun kapsamı ve fonksiyonel grupların varlığı ya da yokluğu bu moleküllerin renginin derinliğini belirlemektedir (Kirti vd., 2014).

Karotenoidlerin pek çoğu moleküllerinde 40 karbon atomu ve değişken sayılarda hidrojen atomu içeren izoprenoidlerdir. Biyosentezleri iki  $C_{20}$ -geranilgeranil difosfat molekülünün uç uca birleşmesiyle olur. Molekülün bir ya da her iki ucunda hidrojen halkası görülebilir. Karotenoidlerin bir alt grubu olan karotenler, hidrokarbonlar

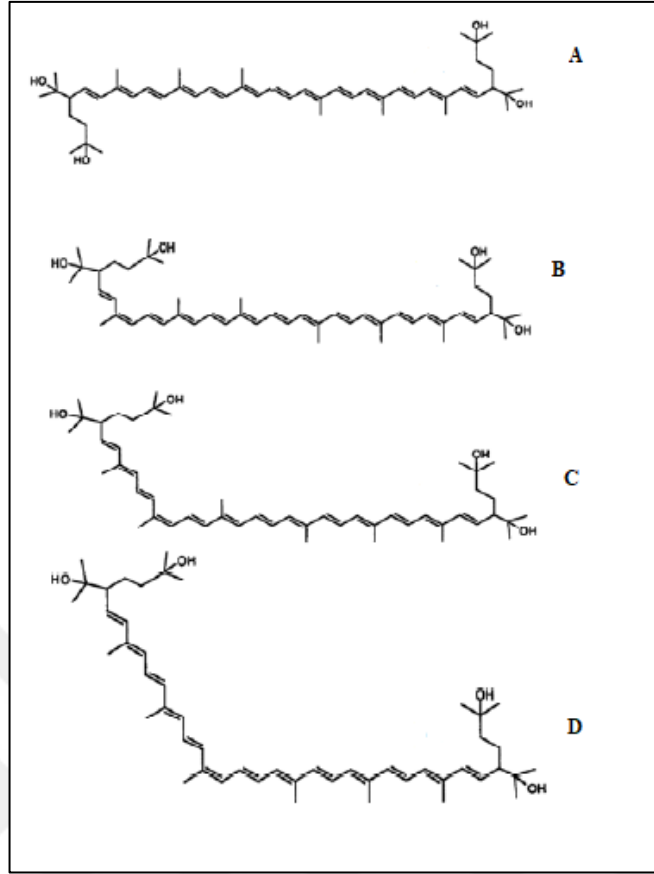
olduğundan oksijen molekülü içermezler. Likopen ve  $\beta$ -karoten temel bir  $C_{40}$  karbon iskelet yapısı gösterir. Molekülün bir ya da her iki ucunda olan halkasal yapı yedi farklı bitiş grubunun ( $\Psi$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$ ,  $\Phi$ , ve  $\chi$ ) görülmesine yol açar. Ayrıca hidrojenlenme seviyesindeki değişimler ve oksijen içeren fonksiyonel grupların eklenmesi de temel yapının modifikasyonu ile beraber 750'den fazla moleküle sahip bir grubu meydana getirmiştir (Britton, 1995; Kirti vd., 2014).

### 2.2.2 Haloarkeal Karotenoidler

Halofilik arkelerden 40 karbona sahip karotenoidlerin yanında temel karotenoidler olarak; özellikle bakterioruberin ve onun türevleri olan monoanhidrobakterioruberin ve bisanhidrobakterioruberin gibi 50 karbon atomuna sahip karotenoidler (Kelly vd., 1970), bunların yanında düşük miktarda 3,4-dehidro monoanhidrobakterioruberin, haloksanin, 3,4-epoksi monoanhidrobakterioruberin, (Ronnekleiv vd., 1995; Bidle vd., 2007) ile 45 karbon atomuna sahip 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopin de sentezlenmektedir (Fang vd., 2010).

Halofilik arkelerde membran stabilizasyonu, moleküllerinde polar uca sahip olan ve membran stabilizasyonu için uygun uzunlukta olan  $C_{50}$  karotenoidleri ile sağlanmaktadır.  $C_{50}$  karotenoidlerinin molekül uzunluğuyla ilgili olarak özellikle arkeal fitanil lipitlerle  $C_{40}$  karotenoidlerinden daha iyi bağlanma oranı gösterdiği saptanmıştır (Ourisson ve Nakatani, 1989; Kirti vd., 2014).

Bir  $C_{50}$  karotenoidi olan bakterioruberin 4 hidroksi grubuna sahip olmasıyla hücre membranında tıpkı bir 'perçin' gibi görev yapmakta ve hücre zarının sertliğini ve mekanik dayanıklılığını sağlamaktadır (Lazrak vd., 1988). Ayrıca bakterioruberinin membran akışkanlığı üzerine etkileri bilinmektedir. Suyu karşı bariyer görevi görerek ve oksijen ile diğer moleküllere karşı geçirgenlik sağlayarak organizmanın hipersalin ya da düşük sıcaklık koşullarında hayatta kalmasını sağlamaktadır (Strand vd., 1997; Fong vd., 2001). Tüm bunlara ilave olarak bakterioruberin 13 çift konjuge bağa sahiptir ve bu sayede hidroksil serbest radikal temizleyici olarak işlev görerek haloarkeleri oksijen hasarına (Saito vd., 1997), yüksek ışık şiddetine, UV ışınlarına ve  $H_2O_2$  maruziyetine (Shahmohammadi vd., 1998) karşı korur.



Şekil 2.1 Bazı bakterioruberin izomerlerinin kimyasal yapıları; A) Trans bakterioruberin. B) 5Z bakterioruberin. C) 9Z bakterioruberin. D) 13Z bakterioruberin (Yachai, 2009)

### 2.2.3 Karotenoidlerin Antioksidan Aktiviteleri

Konjuge çift bağ sistemi, karotenoid moleküllerine sağlam ve lineer iskelet yapısını kazandırırken, bu molekülleri potansiyel antioksidanlar haline getiren yüksek indirgenme potansiyeli sağlar. Karotenoidlerin antioksidan olarak etkisi, oksitleyici maddeler ve peroksi radikalleriyle tepkimeye girmesiyle değerlendirilir. Bu özellikler karotenoidlerin stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Gruszecki ve Strzalka, 2005).

Karotenoidlerin antioksidan olarak görev yapabildiği çeşitli mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar karotenoid moleküllerinin ışığın ve oksijenin zararlı etkilerine karşı koruyucu ajan olarak ya da hücrelerde üretilen kimyasal moleküllere karşı reaktif olan ve oksidatif hasara yol açabilen bileşiklere karşı süpürücü etki gösterebilme özellikleri olarak özetlenebilir. Homojen bir çözeltide reaksiyon mekanizmalarının hem reaksiyona giren serbest radikalın hem de karotenoidin yapısına bağlı olduğu

bilinmektedir. Karotenoidler radikallerin aktivitelerini; elektron transfer ederek, radikale bağlanarak ve daha az görülen bir mekanizma olan hidrojen vererek inhibe ederler (Han vd., 2012).

Reaktif oksijen çeşitli metabolik proseslerin sonucu olarak ya da toksik maddelere maruz kalma neticesinde ksenobiyotik oluşumuna bağlı olarak hücre içinde üretilir. Reaktif oksijenin DNA'yı parçaladığı, lipidleri peroksidize ettiği, enzim aktivitesini bozduğu, polisakkaritleri depolimerize ettiği ve hücreyi öldürdüğü bilinmektedir. Karotenoidler bu radikalleri süpürmekte, ayrıca nükleus hasarı ve hücre hasarı engellemektedir.

Serbest radikaller; metabolik süreçlerin, nitrojen dioksit ile ozon gibi çevresel kirleticilerin, ağır metallerin, halojenlenmiş hidrokarbonların, iyonlaştırıcı radyasyonun ve sigara dumanının yan ürünüdür. Bunlar hücre membranının, nükleik asitlerin ve proteinlerin elektron yoğun bölgelerinde hem yapısal hem de fonksiyonel bozulmalara sebep olabilir. Peroksi radikallerinin reaksiyon seçiciliği ve biyolojik sistemlerde yayılabilme özelliğine sahip olması onları diğer radikal tiplerinden daha tehlikeli hale getirir. Peroksi radikallerin kalp hastalıklarına, kansere ve yaşlanma sürecine sebep olduğu bilinmektedir (Edge vd., 1997). Karotenoidler bu serbest radikalleri de süpürme özelliğine sahiptir (Yachai, 2009).

DPPH radikal süpürme aktivitesi, karotenoidlerin antioksidan aktivite tespitiyle ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir metottur (Yachai, 2009; Squillaci vd., 2017). Antioksidan madde, kararlı serbest radikal olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ile reaksiyona girer ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazine dönüştürür. Koyu menekşe rengine sahip olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil'in reaksiyon tamamlandığında renk giderimi gerçekleşir. Renk gideriminin derecesi antioksidan maddenin hidrojen kaybetme yeteneği doğrultusunda radikal süpürme potansiyelini de belirlemiş olur (Yachai, 2009).

Karotenoidlerin antioksidan özellikleri direkt olarak moleküler yapıları ile ilişkilidir. Karotenoidlerin yapılarının karşılaştırılmasıyla ilgili testler; konjuge çift bağ sayılarının uzunluğu ve yapısına kimyasal bir grubun ekli olup olmaması gibi temel

iki yapısal özelliğın süpürme yeteneklerini etkilediğini ortaya koymuştur. Bu nedenle 13 konjuge çift bağı sahip olan bakterioruberin, 11 konjuge çift bağı olan astaksantin ve 10 konjuge çift bağı olan luteinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Aynı zamanda, astaksantin ve luteinin yapısında her iki terminal halkada bir hidroksil grubu bulunurken, bakterioruberinde 4 hidroksil grubu bulunması da bakterioruberinin yüksek antioksidan aktivite göstermesinin bir diğer sebebi olarak değerlendirilmektedir (Yachai, 2009). Ksantofil; özellikle serbest radikal temizleyici, reaktif oksijen ve nitrojen oksidatif tiplerinin potansiyel süpürücüsüyken astaksantin ve kantaksantin,  $\beta$ -karotenden daha iyi bir antioksidan ve serbest radikal süpürücüsüdür (Vilchez vd., 2011; Rodrigo-Banos vd., 2015).

Son yıllarda, reaktif oksijen kaynaklı oksidatif stres mekanizmalarının nasıl çalıştığı ve oksidatif stresle mücadele için uygun stratejilerin araştırılması, tıbbi araştırmaların önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir. Ayrıca karotenoidlerin antioksidan ajanlar olarak işlev görmeleri, ilaç ve gıda katkısı olarak kullanım alanı bulmalarında önemli rol oynamıştır (Squillaci vd., 2017).

#### **2.2.4 Karotenoidlerin Biyolojik Kaynakları**

Pattnaik vd. (1997)'nin 'biocolors' olarak isimlendirdiği gibi, doğa; meyveler, sebzeler, kökler, mineraller, bitkiler, mikroalgler ve daha pek çok biyolojik kaynaklı materyallerden elde edilen sınırsız bir renk çeşitliliğe sahiptir. Karotenoidler, flavonoidler (antosiyeninler) ve bazı tetrapiroller (klorofiller ve fikobiliproteinler) doğal türevli pigmentleri temsil edilmektedir. Bu pigmentler arasında mikroorganizmalar tarafından üretilen en önemlileri; karotenoidler, melaninler, flavinler, fnazinler, kinonlar ve bakteriyoklorofillerdir.

Kimyasal sentez karotenoidlerin en önemli üretim metotlarından biridir. Ancak son zamanlarda sentetik türevli pigmentlerin toksik, karsinojenik ve teratojenik özellikleriyle ilgili çalışmalardan alınan sonuçlar ve ayrıca yüksek maliyet, yan ürün oluşumu ve zararlı çevresel etkiler sentetik üretimin yerini güvenli bir alternatif olan doğal mikrobiyal kaynakların almasına sebep olmuştur (Kirti vd., 2014; Naziri vd. 2014).

Mikroorganizmalar, ilaç tasarımı, gıda ve yem katkıları gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilen eşi bulunmaz doğal kaynaklardır. Mikroorganizmaların yanı sıra pek çok bitki ve hayvanın; sarı, turuncu, kırmızı ve mor renkte olmasına sebebiyet veren doğal ürünlerin en önemli gruplarından biri 750'den fazla doğal pigmentten oluşan karotenoidlerdir.

Hayvanlar karotenoid üretmezler ve beslenme vasıtasıyla almak zorundadırlar. Likopen,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein, zeaksantin ve  $\beta$ -kriptoksantin insan plazmasında çok rastlanan karotenoidlerdir (Naziri vd., 2014).

Günümüzde karotenoid üretiminde kullanılan pek çok mikroorganizma türü bulunmaktadır; *Dunaliella salina*  $\beta$ -karoten (Venkatesh vd., 2005); *Phaffia rhodozyma* (Jacobson vd., 2002) ve *Haematococcus pluvialis*, astaksantin (Boussiba, 2000); *Chlorella zofingiensis*, astaksantin ve kantaksantin (Pelah vd., 2003) üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizma türleridir (Yachai, 2009).

İdeal pigment üretimi yapan mikroorganizma geniş aralıkta karbon ve azot kaynaklarını kullanabilir olmalı; pH, sıcaklık ve minerallere karşı toleransı yüksek ve renk verimi makul seviyede olmalıdır. Hücre biyokütlesinden kolay ekstrakte edilme, toksik ve patojenik olmama da tercih edilen özelliklerdendir. Mikrobiyal pigmentler sentetik ve inorganik boyalara göre pek çok avantaja sahiptir. Bunlardan en önemlileri; diğer kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha verimli bir proses olan fermentasyonla üretilebilir olmaları, mikroorganizmaların genlerinin kolaylıkla manipüle edilebilir olması, düşük maliyetle büyümeleri ve çok geniş çeşitlilikte renk tonları üretebilir olmalarıdır (Kirti vd., 2014).

### **2.2.5 Karotenoidlerin Endüstriyel Kullanım Alanları**

Karotenoidler renk kaynağı, yem katkısı, antioksidan, anti tümör ajan olarak, kalp hastalıklarını engelleyici, vitamin A öncül maddesi ve in vitro antibadi üretiminde artırıcı olarak geniş kullanım alanına sahiptir. Ayrıca gıda, medikal, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde boya ve fonksiyonel bileşen olarak rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlileri  $\beta$ -karoten, astaksantin, lutein, kantaksantin ve likopendir.

Karotenoidler kümes hayvanlarında derinin ya da yumurta sarısının, akvakültür koşullarında yetiştirilen balıkların etinin ve eklembacaklıların kabuklarının renklendirilmesinde kullanılmaktadır (Wilska-Jeszka, 1997).

Karotenoidler ayrıca insan beslenmesinde, gıdaların renklendirilmesi ve ayrıca vitamin ile gıda katkı maddesi olarak da kullanım alanına sahiptir. Karotenoidlerin vitamin ve gıda katkı maddesi olarak kullanımına karşı artmakta olan bir ilgi söz konusudur. Pek çok epidemiyolojik ve klinik çalışma karotenoidlerin kanser başta olmak üzere birçok kronik hastalığı anlamlı şekilde azalttığını ortaya koymuştur (van Poppel ve Goldbohm, 1995).

Sentetik gıda renklendiricilerinin; alerji, hipersensitivite, intolerans ve çocukluk çağı hiper aktivite gibi istenmeyen yan etkilerinin ortaya çıkması tüm dünyada artan bir endişeye sebep olmuş ve bunun sonucu olarak da biyolojik kaynaklı karotenoidlerin kullanımını artmıştır (Pollock ve Warner, 1990).

Büyüyen karotenoid pazarı, insanların gıda içerikleri konusunda endişe duyar hale gelmesiyle sentetik ve doğal karotenoid arasında kalma ile karşı karşıya gelmiştir. Avrupada gıda takviyelerinin günlük diyetlerde yer almaya başlamasıyla doğal karotenoidler sentetik karotenoidlerin yerini almıştır (Yachai, 2009).

Son yıllarda karotenoidler nutrasötik alanlarda önem kazanmıştır. Kantaksantin gibi bu pigmentlerin kanser ve kalp hastalıklarının önlenmesi, in vitro antibadi üretimini artırma ve vitaminler için öncü bileşen olma gibi fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gözlenmiştir. Kantaksantin ayrıca önemli bir anti oksidan aktiviteye sahip olduğu bu sebeple gıda ve yem katkısı, kozmetik ve farmosötik alanlarında önemli etkileri olduğu rapor edilmiştir (Egorova ve Antranikian, 2008).

### 2.3 Haloarkeal Karotenoidlerin Biyoteknolojik ve Biyomedikal Önemi

Halofilik arkelerden karotenoid üretiminin tespit edildiği çalışmalar yarım yüzyıl öncesine dayanırken son zamanlarda doğal kaynaklı karotenoid üretimi endişesiyle bu çalışmalar artarak önem kazanmaktadır. Halofilik arkelerin karotenoid üretimine önem verilmesinin en önemli sebepleri pek çok haloarkeanın yüksek karotenoid üretme yeteneğine sahip olması, haloarkelerden karotenoid üretme proseslerinin nispeten hızlı, kolay ve ucuz olması, haloarkelerden karotenoid üretiminin genetik modifikasyonlarla hatta besin içeriği, pH, sıcaklık gibi kültür koşullarının değişimiyle artırılabilir olması, karotenoidlerin farmasötik, kozmetik ve gıda pazarları tarafından talep edilir olması olarak sıralanabilir (Rodrigo-Baños vd., 2015).

Kırmızı ekstrem halofilik arkeler asiklik C<sub>50</sub> bakterioruberin türevleri ve 3-hidroksi ekinenon, trans-astaksantin ve kantaksantin gibi ketokarotenoid türevleri üretmektedir (Calo vd., 1995; Asker ve Ohta, 1999). Ekstrem halofilik mikroorganizmaların aseptik olmayan koşullarda büyüebilmesi ve karotenoidlerinin hiçbir mekanik parçalama olmaksızın direkt olarak hücreden ekstrakte edilebilmesi gibi önemli özellikleri, kontaminasyon riski yüksek olan ve pigment ekstraksiyonu zahmetli olan diğer tüm türlere göre daha fazla tercih edilmesine sebep olmuştur (Asker vd., 2002).

Halofilik bir arke türü olan *Haloferax alexandrius*'un kantaksantin üretimiyle ilgili yapılan çalışmada % 25 tuzluluk oranına sahip besiyerinde üretilen suşun yüksek pigment üretimi (2,19 µg/L) saptanmıştır. Ayrıca 3-hidroksi ekinenon ve trans-astaksantin gibi karotenoidlerin de arkeler tarafından sentezlendiği belirlenmiştir (Asker, 2002; Egorova ve Antranikian, 2008).

Halofilik bir arke türü olan *Haloferax mediterranei* ATCC 33500'in C<sub>50</sub> karotenoid üretim miktarının besinsel faktörlere bağlı değişiminin belirlenmesi esnasında bisanhidrobakterioruberin, monoanhidrobakterioruberin ve bakterioruberinin yanısıra, C<sub>45</sub> karotenoidi olan 2-isopentenyl-3,4-dehidrorhodopin karotenoidlerinin de varlığı saptanmıştır (Fang vd., 2010).

*Halobacterium salinarum* NRC-1 ve R1, *Halorubrum sodomense*, *Haloarcula vallismortis* (Jehlicka vd., 2013) ve *Haloarcula japonica* ile yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -bakterioruberinin majör karotenoid olduğu tespit edilmiş, *H. japonica*'nın aynı zamanda monoanhidrobakterioruberin, bisanhidrobakterioruberin ve isopentenildehidrorhodopin sentezlediği de tespit edilmiştir (Yatsunami vd., 2014).

*Halorubrum sp.* TBZ126 türünün de temel karotenoidleri bakterioruberin, likopen ve  $\beta$ -karoten olarak saptanırken, *Halococcus morrhuae* ve *Halobacterium salinarum* tarafından sentezlenen en yoğun karotenoidin all-trans-bakterioruberin olduğu belirlenmiştir (Naziri vd., 2014).

Haloarkelerin karotenoid üretimindeki yüksek başarısı ve haloarkeal pigmentlerin umut vadeden özelliklerine rağmen biyomedikal, biyoteknoloji, eczacılık ve kozmetik gibi alanlarda pigment olarak kullanım potansiyelleri hakkında bilgiler çok fazla olmamakla beraber son zamanlarda bu konuyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

En temel haloarkeal karotenoid olan bakterioruberinin  $\beta$ -karoten gibi ticari olarak temin edilebilen karotenoidlere kıyasla daha yüksek antioksidant aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Yatsunami vd., 2014).

*Haloplanus vescus* ve *Halogeometricum limi*'den ekstrakte edilen karotenoidlerin; insan hepatoma HepG2 hücrelerinde azalmaya sebep olduğu ayrıca *Haloferax volcanii*, *Halogranum rubrum*, *Halopelagius inordinatus* ve *Halogeometricum rufum*'dan elde edilen karotenoid ekstraktlarının serbest radikal söndürücü aktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Hou ve Cui, 2018). Bu çalışmalar haloarkeal karotenoidlerin alternatif bir antihemolitik, antikanser ve antioksidan kaynak olarak kullanabileceklerini göstermektedir.

*Halobacterium halobium*'dan ekstrakte edilen karotenoidlerin yine insan hepatoma HepG2 hücrelerinde azalmaya sebep olduğu ve arkeal karotenoidlerin araşidonik asit ve hidrojen peroksit oksidatif stresine karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir (Abbes vd., 2013).

*Haloferax volcanii*'den ekstrakte edilen bakterioruberin karotenoidinin sperm hücrelerinin canlılığı üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiş olup bu sonuç haloarkeal karotenoidlerin biyomedikal ve veterinerlik alanlarındaki kullanım potansiyellerini göstermektedir (Zalazar vd., 2018).

*Halobacterium salinarum* HM3'den elde edilen bakterioruberin surimi jellere uygulanmış, yüksek ısı ve ışığa rağmen stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca bakterioruberinin antioksidan özelliğinin surimi jellerin depolanması esnasında oluşan lipit oksidasyonunu engellediği tespit edilmiştir (Yachai, 2009).

Halofilik arkeal karotenoidlerin son yıllarda önem kazanması biyoteknolojik öneme sahip bu pigmentlerle ilgili pek çok patenti beraberinde getirmiş olup ilgili patentler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Halofilik mikroorganizmalardan elde edilen karotenoidlerle ilgili alınan patentler

Patent Numarası	Patentin Konusu	Yayınlanma Tarihi	Referans
US20150202237A1	Tümör küçülmesinde halobakteriyal ekstraktların radyasyonla birlikte kullanımı	23.07.2015	Kuchina, 2015
EP2712919B1	Değerli maddelerin üretimi için halofilik mikroorganizmaların kullanımı	08.11.2017	Herwig vd., 2017
WO2012169623	50 Karbonlu karotenoidlerin üretim metodu	13.12.2012	Umeno vd., 2012
US20180042971A1	Radyasyon kaynaklı cilt dokusu hasarını tedavi etmede halofilik bakterilerin kullanımı	15.02.2018	Kuchina, 2018
CN110144315A	<i>Halorubrum sp.</i> HRM-150 karotenoid üretim metodu	20.08.2019	Liyang, 2019
US7939220B2	Proton translokasyonlu retinal protein	10.05.2011	Oesterhelt vd., 2011
US20190209516A1	Gastrointestinal sistemde mikrobiyal bileşimi etkileyen mikrobiyal karotenoidler	05.09.2019	Possemiers vd., 2019
JP2018528174A	Antiviral etkiye sahip karotenoid kompozisyonlarının	27.09.2018	Kalo vd., 2018

Kelly vd. (1970)'nin de belirttiği gibi bakterioruberin halofilik arkelerin karakteristik karotenoididir. Britton vd. (2012) bakterioruberin ve turevlerinin gosterdiği spektral piklerin 467, 493 ve 527 nm'de neredeyse ozdeş olarak maksimum absorpsiyon özelliği gosterdiklerini bildirmiştir. Asker ve Ohta (1999) da kırmızı halobakteri suşlarında maksimum absorpsiyon oranlarının karakteristik şekilde 493 ve 527 nm'de görüldüğünü ve bunlara geniş bir omuzla 467 nm'deki pikin de eşlik ettiğini belirtmişlerdir. Bu karotenoidlere ait saf bir referans standart madde olmadığından karşılaştırmalı bir çalışma yapmak mümkün olmamakla beraber yapılan çalışmanın sonuçlarıyla literatürde rapor edilen sonuçlar güçlü şekilde birbirini desteklemektedir (Abbes vd., 2013).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Tuz numuneleri

Halofilik arkelerin izole edildiği tuz numuneleri Tuz Gölü'nün sınırları olan Eskil (Aksaray) ( $38^{\circ}33'08.7''N$   $33^{\circ}22'54.1''E$ ), Şereflikoçhisar (Ankara) ( $38^{\circ}55'15.6''N$   $33^{\circ}16'12.5''E$ ) ve Tuzyaka (Konya) ( $38^{\circ}46'09.1''N$   $33^{\circ}33'16.7''E$ ) ilçelerinden olmak üzere üç istasyondan alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tuz numunelerinin alındığı istasyonlar

##### 3.1.2 Besiyerleri

Çalışmada halofilik arkelerin izole edilmesinde Molten Agar Medium JCM 168 besiyeri kullanılmıştır (Enache ve Kamekura, 2013). Besiyeri içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 MAM JCM 168 besiyeri

Bileşen	Miktar (g)
Kazaminosit	5
Sodyum glutamat	1
Maya özütü	5
Trisodyum sitrat	3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	29,5
KCl	2
NaCl	175,5
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,036
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00036

Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine 20 g/L katılaştırıcı ajan (Agar, Bacto) (Besiyeri içeriği 1000 mL'ye tamamlanmış ve besiyeri pH'sı 7-7,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dk boyunca sterilize edilmiştir.

### 3.1.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde 6 mm çapında antibiyotik diskler kullanılmıştır. Disklerin isim ve konsantrasyonları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotik tipleri ve konsantrasyonları

Sıra No	Kod	Antibiyotik	Konsantrasyon/ Disk
1	A 10	Amfisilin	10 µg
2	B 10	Basitrasin	10 µg
3	E 15	Eritromisin	15 µg
4	NV 30	Novobiyosin	30 µg
5	P 10	Penisilin G	10 U
6	S 10	Streptomisin	10 µg
7	T 30	Tetrasiklin	30 µg
8	C 30	Kloramfenikol	30 µg
9	VAN 30	Vankomisin	30 µg
10	CTX 30	Cephotaxime	30 µg

### **3.1.4 Gram Boyamada Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.1.4.1 Kristal viyole boya çözeltisi**

Kristal viyole boya çözeltisinin hazırlanmasında 0,25 g kristal viyole 20 mL % 95'lik etanol içerisinde çözündürülüp; 0,8 g amonyum oksalat ve 10 g sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek iki çözelti karıştırılmış ve çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

#### **3.1.4.2 Lugol çözeltisi**

Lugol çözeltisinin hazırlanmasında 0,34 g iyot, 0,66 g potasyum iyodür ve 10 g sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

#### **3.1.4.3 Safranin boya çözeltisi**

Safranin boya çözeltisinin hazırlanmasında 0,25 g safranin 10 mL % 95 etanol içerisinde, 10 g sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek çözeltiler karıştırılmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

#### **3.1.4.4 Asetik asit çözeltisi**

Asetik asit çözeltisinin hazırlanmasında 2 mL asetik asit üzerine distile su ilave edilerek çözelti 100 mL'ye tamamlanarak % 2'lik asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

### **3.1.5 Tetra metil p-fenilen diamin dihidroklorid Çözeltisi**

Oksidaz testinde kullanılmak üzere, 1 g tetra metil p-fenilen diamin dihidroklorid 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

### **3.1.6 Hidrojen Peroksit Çözeltisi**

Katalaz testinde kullanılmak üzere 3 mL hidrojen peroksit 100 mL distile su içerisinde çözündürülerek % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlanmıştır.

### **3.1.7 İndol Testinde Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Besiyerleri**

#### **3.1.7.1 Tripton içeren sıvı besiyeri**

İndol testi için, kültürlerin büyütülmesinde kullanılan MAM JCM 168 besiyeri içeriğine % 1 oranında tripton ilave edilmiştir.

#### **3.1.7.2 Kovaks ayracı**

Kovaks ayracının hazırlanmasında; 5 g  $\rho$ -dimetil aminobenzaldehit, 75 mL bütil alkol içerisinde çözülüp su banyosunda ısıtılmıştır. Çözeltinin üzerine 25 mL % 37'lik hidroklorik asit ilave edilerek kovaks ayracı hazırlanmıştır.

### **3.1.8 Nitrattan Gaz Oluşumu ve Nitrattan Nitrit Oluşumu Testinde Kullanılan Besiyerleri**

#### **3.1.8.1 Potasyum nitrat içeren sıvı besiyeri**

Nitrattan nitrit oluşumu ve nitrattan gaz oluşumu testleri için, kültürlerin büyütülmesinde kullanılan MAM JCM 168 besiyeri içeriğine % 1 oranında potasyum nitrat ilave edilmiştir.

### **3.1.9 Nitrattan Nitrit Oluşumu Testinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.1.9.1 Tromsdorf ayracı**

Tromsdorf ayracının hazırlanmasında; 20 mL çinko klorür distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve kaynar haldeki 4 g nişasta içeren 150 mL distile su içerisine ilave edilmiştir. Çözelti saf su ile seyreltilip 2 g potasyum iyodür ilave edilmiş, çözelti hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp filtre edilmiş ve kullanım için karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

### **3.1.9.2 Alfa naftol çözeltisi**

Alfa naftol çözeltisinin hazırlanmasında; 5 g alfa naftol, 100 mL % 95'lik etanol içerisinde çözündürülerek çözelti hazırlanmıştır.

### **3.1.10 Farklı Karbon Kaynakları**

Kültürlerin farklı karbon kaynağı kullanımlarının test edilmesinde besiyerine % 1 oranında; D-galaktoz, laktoz, D-fruktoz, maltoz, mannitol, sukroz, trehaloz ve glikoz ilave edilmiştir.

### **3.1.11 Minimum Magnezyum İhtiyacı**

İzolatların gelişim gösterebilmek için ihtiyaç duyduğu minimum magnezyum miktarının tespit edilmesinde % 0, % 0,05 ve % 0,1 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren besiyerleri kullanılmıştır.

### **3.1.12 Kazein Hidrolizi**

Kazein hidrolizi testinde besiyeri otoklavlandıktan sonra % 1 oranında yağsız süt 0,22 µm şırınga filtreden geçirilerek besiyerine ilave edilmiştir. Besiyeri bileşimine kazaminoasit dahil edilmemiş ve maya özütü miktarı % 0,1'e düşürülmüştür.

#### **3.1.12.1 Frazier ayracı**

Kazein hidrolizi testinde zonların ayırt edilmesinde kullanılan Frazier ayracının hazırlanmasında 15 g HgCl<sub>2</sub>, 20 mL HCl içerisinde çözülmüş ve 100 mL distile su ilave edilmiştir.

### **3.1.13 Jelatin Hidrolizi**

Jelatin hidrolizi testinde besiyeri bileşimine % 1 jelatin ilave edilmiş, besiyeri bileşimine kazaminoasit eklenmemiş ve maya özütü % 0,1 olacak şekilde ilave edilmiştir.

### **3.1.14 Tween 80 Hidrolizi**

Tween 80 hidrolizi testinde besiyerine % 1 oranında Tween 80 ilave edilmiştir. Besiyeri bileşimine kazaminoasit dahil edilmemiş ve maya özütü % 0,1 olacak şekilde ilave edilmiştir.

### **3.1.15 Nişasta Hidrolizi**

Nişasta hidrolizi testinde besiyeri içeriğine % 1 oranında nişasta ilave edilmiş, kazaminoasit kullanılmamış ve maya özütü miktarı % 0,1 olacak şekilde ilave edilmiştir.

### **3.1.16 STE Tamponu**

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere STE tamponunun hazırlanmasında; 0,584 g sodyum klorür, 0,121 g tris ve 0,029 g EDTA 90 mL steril ultra saf su içerisinde çözülmüş, pH hidroklorik asit ile 8'e ayarlanıp çözelti hacmi steril ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **3.1.17 TE Tamponu**

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere TE tamponunun hazırlanmasında; 0,121 g tris ve 0,029 g EDTA 90 mL steril ultra saf su içerisinde çözülmüş, pH hidroklorik asit ile 8'e ayarlanıp çözelti hacmi steril ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **3.1.18 Tris Doyurulmuş Fenol**

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere trisle doyurulmuş fenol hazırlanmasında, kristal haldeki fenol 65 °C'lik su banyosunda çözülmüştür. Fenol üzerine eşit hacimde 0,5 M Tris-Cl pH 8 ilave edilerek 60 dk karıştırılmış ve 4 °C'de bir süre bekletilerek çözeltinin iki faza ayrılması sağlanmıştır. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem 0,1 M Tris-Cl ile pH değeri >7,8 olana kadar tekrarlanmış ve üst fazın % 90'ı uzaklaştırılarak çözelti 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.19 1X TBE Çözeltisi**

10 mL 10X TBE çözeltisi 100 mL'ye kadar distile su ile tamamlanarak hazırlanan çözelti agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.20 Agaroz Jel**

İzole edilen DNA'ların saflık kontrolü için % 1, PZR ürünlerinin saflık kontrolü için % 1,8'lik agaroz jel ultra saf su içerisinde kaynatılarak çözülmüştür.

### **3.1.21 400X Syber Green Jel Boya Çözeltisi**

40 µL 10 000 X Syber Green (Thermo Scientific) 1000 µL dimetil sülfoksit içerisinde çözülerek 400 X Syber Green jel boya çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan boya ışık almayacak şekilde -20 °C'de saklanarak agaroz jel uygulamalarında DNA ve PZR ürünlerinin UV lamba altında görünür hale getirilmesinde kullanılmıştır.

### **3.1.22 Glutardialdehid Çözeltisi**

İzolatların elektron mikroskobu görüntülemelerine hazır hale getirilmesinde kullanılmak üzere % 25'lik glutardialdehid'den 8 mL alınarak 100 mL'ye distile su ile tamamlanmış ve çözelti % 2'lik hale getirilmiştir.

### **3.1.23 PBS Çözeltisi**

İzolatların yağ asidi kompozisyonlarının belirlenmesinde hücre pelletlerinin yıkanmasında kullanılan fosfat buffer salin çözeltisinin hazırlanmasında; 1,1 g dipotasyum hidrojen fosfat, 0,32 g potasyum dihidrojen fosfat ve 8,5 g sodyum klorür 1 litre ultra saf su içerisinde çözülerek pH 7,2 ye ayarlanmıştır.

### **3.1.24 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar**

Çalışmada; otoklav (Jeitech, ST- 50G), saf su cihazı (Human, Power2), elektroforez güç kaynağı (Biorad, Powerpack basic), jel görüntüleme cihazı (Biorad, Geldoc),

thermalcyclers (Biorad, T100), ışık mikroskobu (Leica), soğutmalı santrifüj (Hermle, Z326-K), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Misung, MS-300HS), derin dondurucu (Bosch), -86 °C derin dondurucu (WTW), inkübatör (Nüve FN 120), soğutmalı inkübatör (Velp, FOC120i), orbital çalkalayıcı (Biosan-PSU10i), hassas terazi (Sartorius, CPA225D), mikropipetler (Isolab ve Brand), multiparametre ölçer (WTW, Multi 9420), spektrofotometre (WTW, PhotoLab 7600), elektron mikroskobu (FEI Quanta Feg 250), AFM (Bruker, Edge3), mikroplaka okuyucu (Biotek, Epoch2), HPLC (Shimadzu, LC20 A-Prominence), LC-MS/MS (Shimadzu, LC-MS- 8040), GC-MS (Shimadzu, QP-2010 Ultra) ve Au-Pd kaplama cihazı (Cressington, Sputter Coater 108 Auto) kullanılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Numunelerin Laboratuvara Taşınması**

Numuneler aseptik koşullar altında steril şişeler içerisine alınmış ve kodlanarak soğuk zincirle laboratuvara ulaştırılmıştır.

### **3.2.2 Numunelerin Zenginleştirilmesi ve Arkelerin İzolasyonu**

Tuz numuneleri 10 g olacak şekilde tartılarak steril % 10 NaCl çözeltisinde birkaç saat 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Zenginleştirme sağlanan numunelerden dilüsyonlar hazırlanmış ve her birinden önceden hazırlanmış MAM JCM 168 katı besiyerlerine 100 µL ekim yapılmıştır. Petriler nem kaybının sebep olduğu tuz kristallenmelerini önlemek için ağzı kilitli poşetlerde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 7-10 gün sonunda üreyen farklı renk ve morfolojik görüntüye sahip olan kolonilerden yine MAM JCM 168 katı besiyerine pasaj yapılmış ve inkübasyon sonunda kodlanan izolatların bulunduğu petriler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3 Biyokimyasal Testler**

#### **3.2.3.1 Gram boyama**

660 nm'de yaklaşık 1 absorbans değerine sahip kültürlerden lam üzerine ince bir tabaka halinde sürülmüş ve havada kurutulan preparatlar % 2 asetik asitle 5 dk muamele edilmiştir. Süre sonunda yıkamadan havada kurutulan preparatlar 3 dk kristal viyole çözeltisiyle boyanmış ve süre sonunda % 10 NaCl ile yıkanmıştır. Yıkanan preparatlar 1 dk boyunca lugol çözeltisinde muamele edilmiş ve süre sonunda % 10 NaCl ile yıkanan preparatlar 6 saniye boyunca % 95'lik etanolde tutulmuştur. Son aşama olarak safranin çözeltisinde 30 saniye boyanan preparatlar yıkanmış, havada kurutulmuş ve ışık mikroskopunda (Leica) incelenmeye hazır hale getirilmiştir (Dussault, 1955).

#### **3.2.3.2 Oksidaz testi**

7 gün boyunca MAM JCM 168 agar besiyerinde 37 °C'de inkübe edilen taze kültürler % 1'lik Tetrametil  $\rho$ -fenilen diamin dihidroklorid emdirilen filtre kağıdına öze ile sürülmüş, 10-30 saniyelik reaksiyonda mavi renk oluşturan örnekler oksidaz pozitif, 30-60 saniyede mavi renk oluşturan örnekler zayıf oksidaz pozitif, 60 saniye sonrasında mavi renk oluşturanlar ya da renk değişimi olmayan örneklerse oksidaz negatif olarak belirlenmiştir (Oren vd., 1997).

#### **3.2.3.3 Katalaz testi**

7 gün boyunca MAM JCM 168 agar besiyerinde 37 °C'de inkübe edilen taze kültürlerden öze ile alınarak lam yüzeyine sürülmüş ve üzerine % 3'lük hidrojenperoksit çözeltisi damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlenen örnekler için izolatlar katalaz pozitif, gaz çıkışı gözlenmeyen örnekler için izolatlar katalaz negatif olarak belirlenmiştir (Oren vd., 1997).

#### **3.2.3.4 İndol testi**

İzolatlar % 1 tripton içeren MAM JCM 168 sıvı besiyerine ekilerek 7 gün boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüplerin üzerine 0,5 mL Kovaks ayracı ilave edilmiş ve tüpün üst kısmında kırmızı halka oluşan tüplere ait izolatlar indol pozitif, renk değişimi olmayan tüplere ait izolatlar ise indol negatif olarak belirlenmiştir (Oren vd., 1997).

#### **3.2.3.5 Nitrattan gaz oluşturma testi**

İzolatlar % 1'lik KNO<sub>3</sub> içeren ve içine durham tüpleri atılan MAM JCM 168 sıvı besiyerinde 37 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda durham tüplerinde gaz kabarcığı oluşumu gösteren tüplere ait izolatların nitrattan gaz oluşturma özelliğinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Oren vd., 1997).

#### **3.2.3.6 Nitrattan nitrit oluşturma testi**

İzolatlar % 1'lik KNO<sub>3</sub> içeren MAM JCM 168 sıvı besiyerinde 37 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiş ve 7. gün tüplerden 1 mL örnek alınarak üzerlerine 3 damla Tromsdorf ayracı ve 3 kısım sülfürik asit ile 1 kısım su içeren 1 damla sülfürik asit çözeltisi eklenmiştir. Koyu mavi- siyah renk oluşturan örnekler için izolatlar nitrit pozitif olarak değerlendirilmiş, nitrit negatif olan tüplere 1 damla α-naftol ve 2 damla konsantre sülfürik asit damlatılmıştır. Reaksiyon sonucunda koyu mavi-siyah renk oluşturan örnekler için izolatlar nitrat pozitif olarak belirlenmiştir (Oren vd., 1997).

### **3.2.4 İzolatların Optimum Büyüme Koşullarının Belirlenmesi**

#### **3.2.4.1 İzolatların pH toleranslarının belirlenmesi**

pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 olarak ayarlanan MAM JCM 168 agar besiyerlerine inoküle edilen izolatlar 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda izolatların farklı pH'a sahip besiyerlerinde üreme durumları değerlendirilmiştir.

#### **3.2.4.2 İzolatların NaCl toleranslarının belirlenmesi**

% 0, % 1, % 3, % 5, % 10, % 15, % 20, % 25 NaCl içeren pH değeri 7,2'ye ayarlanmış olan MAM JCM 168 agar besiyerine inoküle edilen izolatlar 10 gün 37 °C'de inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda izolatların farklı tuz konsantrasyonlarına sahip petrillerdeki büyüme durumları değerlendirilmiştir.

#### **3.2.4.3 İzolatların sıcaklık toleranslarının belirlenmesi**

MAM JCM 168 agar besiyerine inoküle edilen izolatlar 4, 10, 20, 25, 40, 50 ve 55 °C inkübasyon sıcaklıklarında 10 gün süreyle inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda izolatların farklı sıcaklık koşulları altındaki üreme durumları değerlendirilmiştir.

#### **3.2.4.4 İzolatların üreyebildiği en düşük maya özütü konsantrasyonunun belirlenmesi**

% 0, % 0,01 ve % 0,1 g maya özütü içeren MAM JCM 168 agar besiyerinde 37 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilen izolatların inkübasyon süresi sonunda farklı maya konsantrasyonlarındaki üreme durumları değerlendirilmiştir (Oren vd., 1997).

#### **3.2.4.5 İzolatların minimum magnezyum ihtiyacının belirlenmesi**

İzolatların ihtiyaç duyduğu minimum magnezyum miktarlarının belirlenmesinde izolatlar % 0; % 0,05 ve % 0,1 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içeren besiyerlerine pasaj yapılmış ve

37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Süre sonunda izolatların gelişim gösterdikleri petri ler tespit edilerek türlere ait minimum magnezyum ihtiyaçları saptanmıştır.

### **3.2.5 İzolatların karbon kaynağı kullanımının belirlenmesi**

% 1 oranında D-galaktoz, laktoz, D-fruktoz, maltoz, mannitol, sukroz, trehaloz ve glikoz karbonhidratları ilave edilmiş MAM JCM 168 agarlı besiyeri içeren petri ler 37 °C'de 7 günlük inkübasyon sonunda izolatların üreme durumlarına göre karbon kaynağı kullanımları değerlendirilmiştir (Oren vd., 1997).

### **3.2.6 İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi**

MAM JCM 168 sıvı besiyerinde 37 °C'de 160 rpm'de 7 gün inkübe edilmiş taze kültürlerden agar besiyerine 100 µL dilüsyon plak yöntemiyle inoküle edilmiş ve her petri ye 2 farklı antibiyotik disk belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. 7 gün 37 °C'de inkübasyon sonunda antibiyotik diskler etrafında zon oluşumları dikkate alınarak izolatların antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik özellikleri tespit edilmiştir (Oren vd., 1997).

### **3.2.7 Kazein hidrolizi testi**

İzolatların sahip olduğu kazeinaz enziminin test edilmesinde % 1 yağsız süt içeren besiyerlerine pasaj yapılmış ve 37 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kolonilerin etrafında gözlenen proteoliz zonu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Oren vd., 1997).

### **3.2.8 Jelatin hidrolizi testi**

İzolatların sahip olduğu jelatinaz enzimlerinin test edilmesinde % 1 jelatin içeren besiyerlerine pasaj yapılmış ve 37 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyini örtecek şekilde Frazier ayracı dökülmüş ve koloniler etrafında zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Frazier, 1926).

### **3.2.9 Nişasta hidrolizi testi**

İzolatların sahip olduğu amilaz enziminin test edilmesinde % 1 nişasta ilave edilen besiyerlerine pasaj yapılmış ve 37 °C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyini örtecek kadar lugol çözeltisi dökülmüş ve zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Prescott vd., 2005) .

### **3.2.10 Tween 80 hidrolizi testi**

İzolatların sahip olduğu esteraz enziminin test edilmesinde % 1 Tween 80 ilave edilmiş besiyerlerine pasaj yapılmış ve 37 °C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni etrafında gözlenen zonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Oren vd., 1997).

### **3.2.11 Yağ Asidi Metil Esterleştirme (FAME) Analizleri**

İzolatların sahip olduğu yağ asidi kompozisyonlarının belirlenmesi için 50 mL sıvı besiyeri içeren 250 mL erlenlere inoküle edilen izolatlar 37 °C’de 7 gün inkübasyona tabi tutulduktan sonra 50 mL kültür sıvı azotla soğutulmuştur. 20 000 rpm’de 15 dk santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti PBS ile yıkanmıştır. 2 000 rpm’de santrifüj yapıldıktan sonra PBS uzaklaştırılmış ve hücre pelletinin üzerine pelletin 3 katı kadar metanol ilave edilerek ultrasonik banyoda hücrelerin parçalanması sağlanmış ve üzerine metanol miktarı kadar kloroform ilave edilmiştir. 4 °C’de 45 dk boyunca yavaşça karıştırılan örnekler 2 000 rpm devirde santrifüj edildikten sonra süpernatant amber şişeye aktarılmıştır. Hücre pelleti tekrar metanol-kloroform ile muamele edilmiş ve önceki ekstraksiyon işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen ikinci ekstrakt da ilkiyle birleştirilmiş ve üzerlerine soğuk aseton ilave edilerek protein çökmesi için örnekler -86 °C derin dondurucuda 1 gece bekletilmiştir. Çökelen proteinleri uzaklaştırmak için örnekler 2 000 rpm’de santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak azot altında kurutulup sonraki işlemlerde kullanılabilecek kadar -86 °C derin dondurucuda saklanmıştır (Hamerly vd., 2015).

İzolatlara ait ekstraktların yağ asidi kompozisyonlarının belirlenebilmesi için yağ asidi metil esterleştirme (FAME) metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre

ekstraktların üzerine esterleştirmeyi kolaylaştırmak için 400 µL BF<sub>3</sub>-metanol ilave edilmiş ve karışım 60 °C'de 15 dk bekletilmiştir. Karışımın üzerine reaksiyonu durdurmak için sırasıyla 200 µL ultra saf su, 200 µL doymuş NaCl çözeltisi ve 500 µL hekzan ilave edilmiştir. Karışım vortekslenildikten sonra 15 dk dinlendirilmiş ve hekzanlı üst faz başka bir tüpe alınmıştır. Alt faza 500 µL hekzan ilave edilmiş tekrar bir süre bekletilerek hekzanlı üst faz daha öncekiyle birleştirilmiş ve azot altında kurutulduktan sonra 100 µL hekzan ilave edilerek gaz kromatografisi kütle spektrometrisi cihazında izolatlara ait yağ asidi kompozisyonları tespit edilmiştir (Hamerly vd., 2015).



Şekil 3.2 Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (Shimadzu, QP- 2010 Ultra)

İzolatlara ait yağ asidi kompozisyonlarının belirlenmesinde Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA cihazı kullanılmış olup cihazda taşıyıcı gaz olarak helyum gazı ve kolon olarak RTX-2330 kapiler kolon (60 m; 0,25 mm; 0,20 µm) kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 100 °C, enjeksiyon sıcaklığı 250 °C, arayüz sıcaklığı 250 °C, iyon kaynağı sıcaklığı 200 °C, basınç 90 kPa, enjeksiyon hacmi ise 2 µL olarak verilmiştir. Fırın sıcaklık programı: 100 °C'de 5 dk, 100 °C'den 240 °C'ye 4 °C/dk artışla, 240 °C'de 15 dk olarak kurulmuştur. Analiz kantitatif olarak gerçekleştirilmiş ve referans madde olarak USP FAME mix standardı kullanılmıştır.

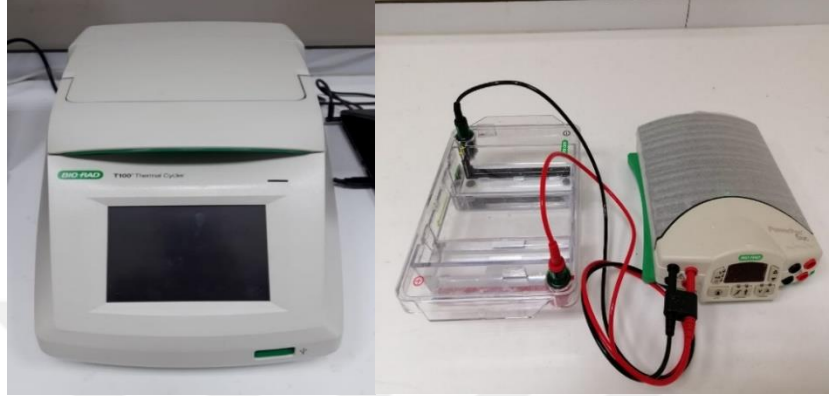
### 3.2.12 DNA İzolasyonu

MAM JCM 168 agar besiyerinde üretilen suşlardan öze ile 1 mL STE tamponu içerisine alınarak vortekslenmiş ve homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonu 8 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 400 µL STE ile iki kez aynı yöntemle yıkanmış, son süpernatant da uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 200 µL TE tamponu ile tekrar süspansiyon edilmiş ve 100 µL tris ile doyurulmuş fenol ilave edilerek vortekslenmiştir. 13 000 rpm devirde 5 dk 4 °C'de santrifüj edilen süspansiyon iki faza ayrılmış ve üst fazdan 160 µL yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 40 µL TE tamponu ve 100 µL kloroform eklenerek 13 000 rpm devirde 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiş ve kloroformla ekstraksiyon işlemi lizatin rengi açılana kadar devam etmiştir. Üst fazdan 160 µL yeni bir tüpe alınmış üzerine 40 µL TE tamponu ve 5 µL RNaz enzimi (10 mg/mL) ilave edilmiş ve 37 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 100 µL kloroform ilave edilmiş ve 13 000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilerek saf DNA içeren üst faz temiz bir tüpe alınmıştır ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Neumann vd., 1992). DNA saflıkları % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 80 V, 100 mA'de 60 dk yürütülerek kontrol edilmiştir.

### 3.2.13 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu kurulumunda izolatların bakteri ve arke ayrımının tespit edilmesi için tüm izolatlar iki farklı primer grubuyla reaksiyona sokulmuştur. Arkeal türlerin 16S gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlamada ileri primer olarak Arc7f' 5'-TTCYGGTTGATCCYGCC-3', geri primer olarak Arc1384r' 5'-CGGTGTGTGCAAGGAGCA-3'; Bakteriyal türlerin 16S gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlamada ileri primer olarak Bac 8f' 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', geri primer olarak Bac 1493r' 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3' kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyon protokolü Tablo 3.3'de verilmiştir. Reaksiyon DNAz ve RNAz içermeyen steril 0,2 µL'lik tüplere hazırlanmış ve reaksiyon son hacmi steril ultra saf su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyonda, Ampliqon marka Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED karışımı kullanılmıştır. BIORAD T100 PZR (Termal döngü) cihazına

yerleştirilen tüpler için uygulanan sıcaklık değeri, döngü sayısı ve sürelerini gösteren gradient protokolü Tablo 3.3’de verilmiştir. Reaksiyon sonrasında 5 µL PZR ürünü % 1,8’lik agaroz içeren jelde 80 V, 100 mA’de 60 dk yürütölmüş ve bantlar BIORAD Gel-Doc jel görüntöleme sisteminde kontrol edilmiştir.



şekil 3.3 Termal döngü cihazı (BIORAD, T100), elektroforez tankı ve güç kaynağı (BIORAD, Powerpack basic)



şekil 3.4 Jel görüntöleme sistemi (BIORAD, Gel-Doc)

Tablo 3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü

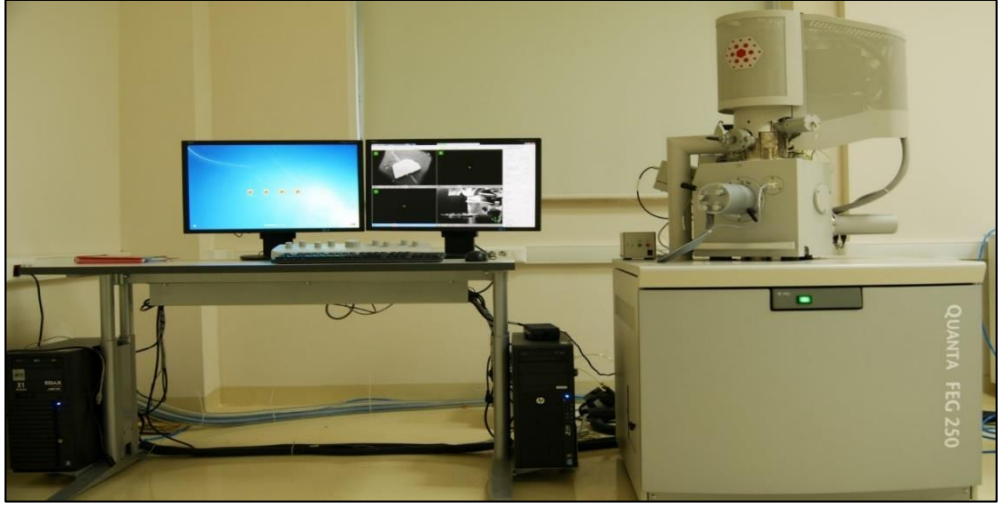
Reaksiyon İçeriği	İlk Konsantrasyon	Reaksiyondaki Hacim	Son Konsantrasyon
TaqDNA polimerase 2x master mix	2X	25 µL	1X
İleri primer	1 µM	2,5 µL	0,05 µM
Geri primer	1 µM	2,5 µL	0,05 µM
DNA	-	2,5 µL	-
Steril ultra saf su	-	17,5 µL	-
Toplam reaksiyon hacmi	-	50 µL	-

*Termal döngü protokolü*

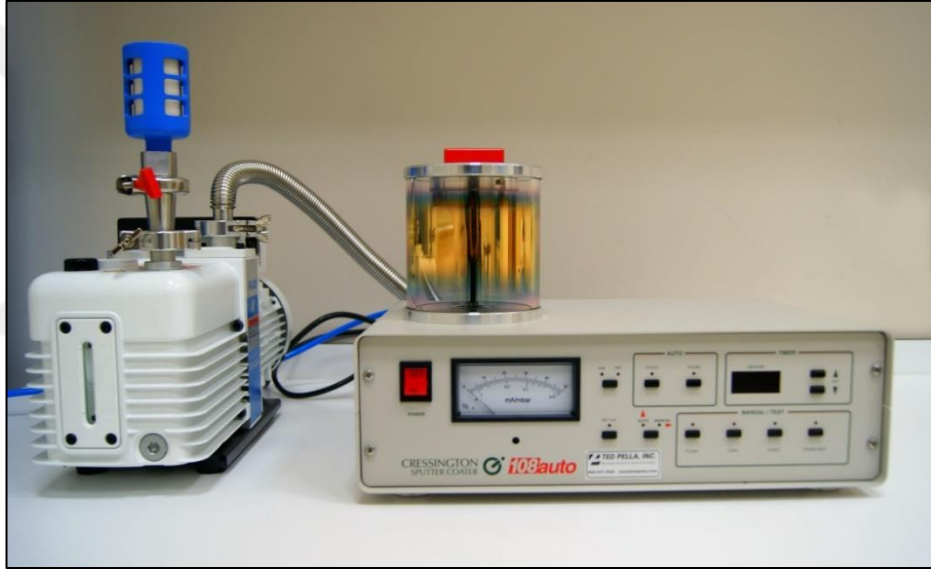
Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
98 °C	3 dk	1
98 °C	10 sn	30
61 °C	30 sn	30
72 °C	30 sn	30
72 °C	5 dk	1
4 °C	-	∞

### 3.2.14 Türlerin Taramalı Elektron Mikroskobu ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Görüntülemelerine Hazırlanması

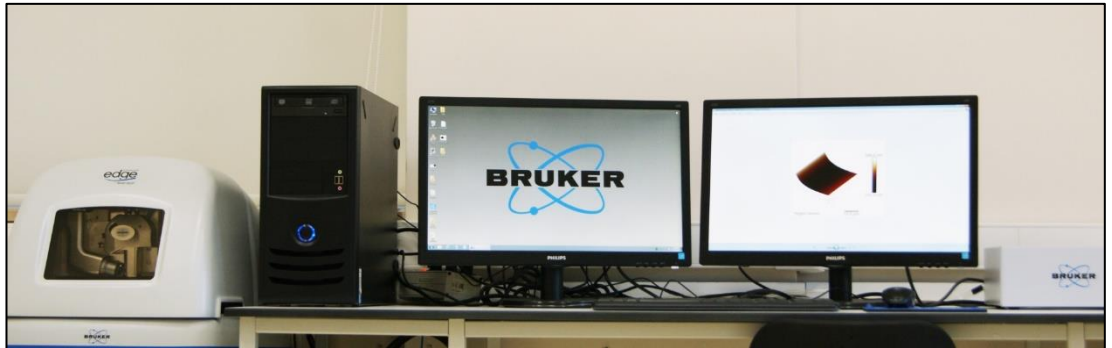
7 gün boyunca 37 °C’de inkübe edilmiş taze kültürler agar yüzeyinden alınarak lamel yüzeyine ince bir tabaka halinde sürülmüş ve havada kuruması beklendikten sonra % 2’lik glutardialdehit çözeltisi içerisinde bir gece boyunca muamele edilmiştir. Çözelti içerisinde çıkartılıp havada kurumaya bırakılan preparatlar suyun tamamen uzaklaştırılması için % 30, % 50, % 70 ve % 90’lık aseton serisinde sıra ile 10 dk, % 100’lük aseton içerisinde 30 dk takip işlemine tabi tutulmuş ve sonra tekrar havada kurumaya bırakılmıştır (Braganca & Furtado, 2009). Preparatlar Cressington Sputter Coater Au-Pd kaplama cihazına yerleştirilmiş ve 40 mA 60 saniye kaplanarak iletken hale getirildikten sonra beklemeden FEI Quanta FEG 250 SEM cihazına yerleştirilerek görüntülenmiştir. Aynı preparatlar AFM görüntülemeleri için Bruker Edge3 AFM cihazında kullanılmıştır.



Şekil 3.5 Taramalı elektron mikroskobu (FEI, Quanta FEG 250)



Şekil 3.6 Au-Pd kaplama cihazı (Cressington sputter coater, 108 Auto)



Şekil 3.7 Atomik kuvvet mikroskobu (Bruker, Edge 3)

### 3.2.15 Büyüme Eğrisinin Oluşturulması

İzolatlara ait büyüme grafiklerinin oluşturulmasında, 50 mL MAM JCM 168 sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik erlenmayerlere inoküle edilen izolatlar 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edilmiş ve günlük olarak 1 mL alınarak 10 000 rpm devirde 10 dk 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletleri üzerine 2 mL % 20 NaCl ilave edilmiş ve vorteks cihazında çalkalanarak UV-VIS spektrofotometrede 660 nm'de absorpsiyon okuması yapılmıştır.

### 3.2.16 İzolatlara Ait Karotenoidlerin Ekstraksiyonu

Haloarke türlerinden karotenoid ekstraksiyonunda Squillaci vd. (2017)'nin metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. En yüksek biyokütle miktarının elde edilmesi ve potansiyel hücre lizizi nedeniyle pigment kaybının engellenmesi için hücreler durağan fazın başında toplanmıştır. Kültürler 9 000 rpm'de 60 dk 4 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletleri PBS ile yıkanmış ve 2 g yaş numune üzerine 4 mL % 0,5 BHT içeren metanol ilave edilerek 9 000 rpm devirde 60 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pembe renkli ekstrakt amber tüpte muhafaza edilmiştir. Ekstraktlar plakalara yüklenmiş ve mikropilaka okuyucuda 490 nm'de absorpsiyon okuması yapılmıştır.

### 3.2.17 Total karotenoid miktarlarının hesaplanması

Türlere ait total karotenoid miktarları sönm katsayısı ( $A_{1cm}^{%1}$ ; extinction coefficient) metoduyla hesaplanmıştır.

$$x = \frac{A \times y \times 10^6}{A_{1cm}^{%1} \times 100} \quad (3.1)$$

Denklemden x, mikrogram cinsinden total karotenoid miktarını; A, 490 nm'deki absorpsiyon değerini; y, mililitre cinsinden solüsyon miktarını temsil etmektedir.  $A_{1cm}^{%1}$  değeri, belli bir dalga boyunda belli bir solventin %1'lik konsantrasyonunun 1 cm'lik kuartz küvette spektrum ölçümündeki sönmünü ifade etmektedir. Toplam

karotenoid miktarının tespitinde  $A_{1cm}^{1\%}$  değeri olarak 2 500 kullanılmıştır (Britton, 1985)

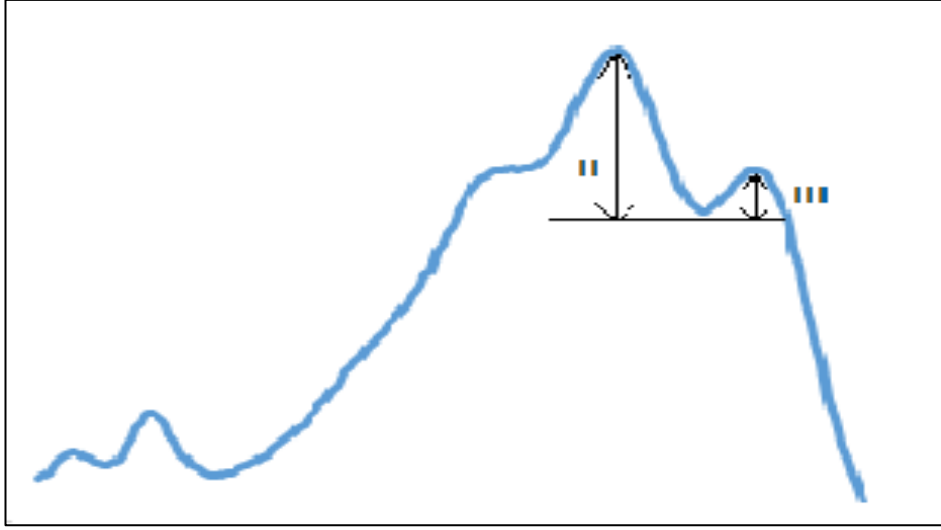
### **3.2.18 Karotenoid içeriklerinin ince tabaka kromatografisi ile belirlenmesi**

Halofilik arkeal karotenoidlerin ince tabaka kromatografisiyle ayrımının gerçekleştirilmesi için 0,5 mm 20x20 cm silika jel plakalar kullanılmıştır. Plakalara yüklenen örnekler 93:7 (kloroform: metanol) mobil fazı ile yürütülmüş ve elde edilen spotlar kazınarak % 0,25 BHT içeren metanolde ekstrakte edilerek geri kazanılmıştır.

### **3.2.19 Karotenoid içeriklerinin UV-VIS spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi**

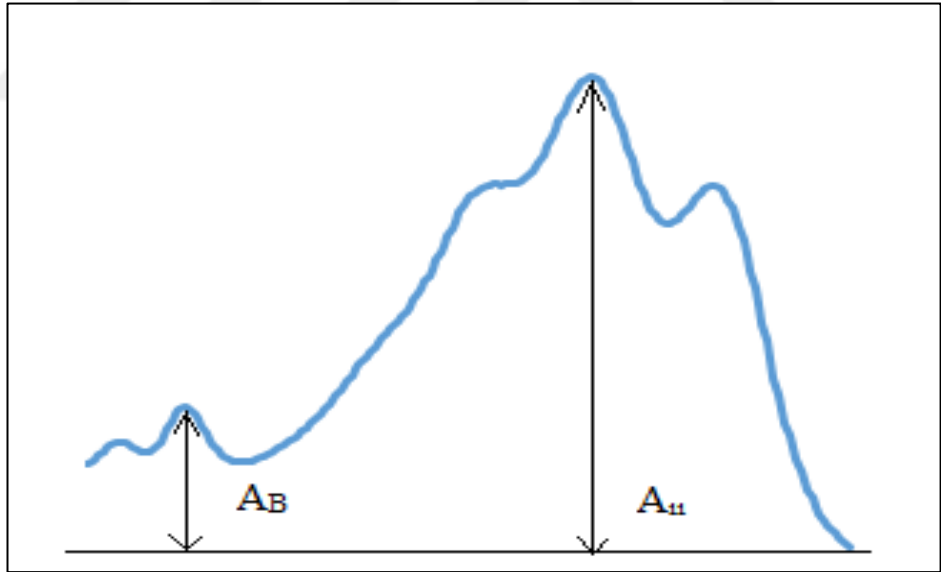
Türlerden ekstrakte edilen karotenoidler ve ince tabaka kromatografisiyle ayrılan ve geri kazanımı gerçekleştirilen spotların mikropilaka okuyucuda 300-600 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılarak kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerden elde edilen spektrumların analizinde spektral ince yapısı (%III/ II) ve cis pik intensiteleri ( $\%A_B/A_{II}$ ) oransal hesaplamaları kullanılmış ve elde edilen değerler literatürdeki verilerle karşılaştırılmıştır.

Spektral ince yapı ve cis pik intensite hesaplamaları maksimum dalga boyu değerleri baz alınarak yapılır. %III/ II değeri, en yüksek dalga boyu absorpsiyon piki (III) ile orta absorpsiyon pikinin (II), bu iki pik arasındaki minimum noktanın başlangıç noktası olarak alınarak birbirine oranlanması ve 100 ile çarpılması ile elde edilen değerdir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Spektral ince yapının elemanlarını gösteren spektrum örneği

$\% A_B/A_{II}$  değeri, en yüksek cis pikinin sahip olduğu absorpsiyon değerinin ( $A_B$ ) orta absorpsiyon piki değerine ( $A_{II}$ ) oranlanması ve sonucun 100 ile çarpılması ile elde edilen değerdir (Britton, 1995) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Cis pik intensite hesaplamasını gösteren spektrum örneği

### 3.2.20 Karotenoid içeriklerinin HPLC ile belirlenmesi

Her bir spotun sıvı kromatografisi yöntemiyle analizi Shimadzu LC-20A Prominence HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizde piklerin tespitinde PDA dedektör kullanılmış olup, piklerin ayrılması Agilent C18 (5  $\mu$ m; 4,6 x 150 mm) kolon ile gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerin kolon boyunca ilerlemesinde 1:9 (su:metanol) (A)

ve 1:9 (etil asetat:metanol) (B) mobil fazları kullanılmış olup uygulanan gradient metot Tablo 3.4’de verilmiştir.



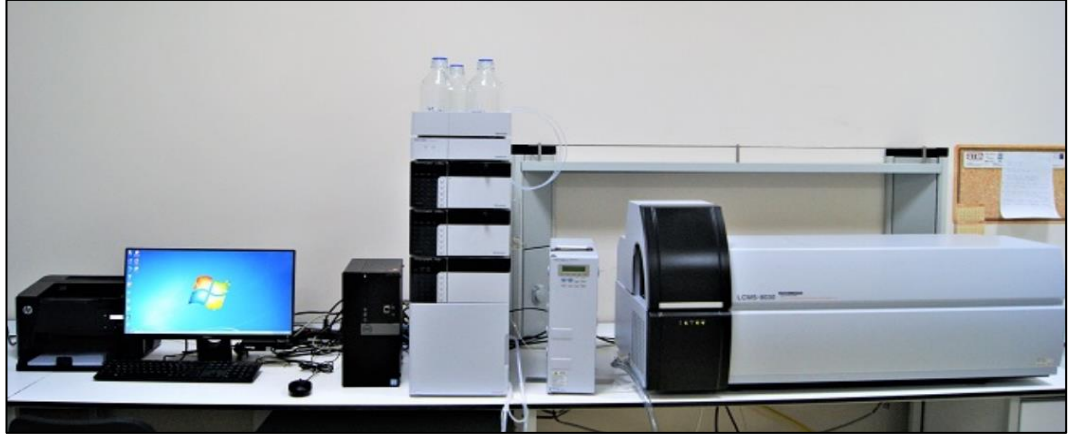
Şekil 3.10 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Shimadzu, LC 20A Prominence)

Tablo 3.4 HPLC analizinde kullanılan gradient metot

<b>Dk</b>	<b>Mobil Faz A (%100)</b>	<b>Mobil Faz B (%100)</b>
0,01'	100	0
45'	0	100
55'	0	100
60'	100	0

### 3.2.21 Karotenoid içeriklerinin LC-MS/MS ile belirlenmesi

Spotlara ait kütle spektrumlarının belirlenmesinde Shimadzu 8040 LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Analizde kütle taramaları 1:9 (su:metanol) (A) ve 1:9 (etil asetat:metanol) (B) mobil fazları kullanılmış olup analiz süresi 1 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11 Sıvı kromatografisi kütle-kütle spektrometresi (Shimadzu, LC-MS 8040)

### 3.2.22 Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde DPPH radikal süpürme aktivitesi metodu kullanılmıştır. 50 mL sıvı besiyerinde 7 gün boyunca 37 °C’de inkübe edilen kültürler 9 000 rpm’de 60 dk 4 °C’de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletler PBS ile yıkanmış ve santrifüj edildikten sonra Azot gazı altında kurutulmuştur. Karotenoid ekstraktlarından seyreltmeler oluşturulmuş ve 150 µL örnek günlük taze olarak hazırlanan 1 350 µL 60 µM DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Örnekler mikropłaka kuyucuklarına yüklenmiş ve 30 dk sonunda metanol körüne karşı 580 nm’de absorbans okuması yapılmıştır. Ayrıca 150 µL metanol ile 1 350 µL DPPH çözeltisi de karıştırılarak kuyulara yüklenmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak örneklere ait DPPH radikal süpürme aktivitesi yüzde olarak hesaplanmıştır (Jimenez-Escrig vd., 2000).

$$RSA (\%) = \left( 1 - \frac{\text{Örnek Absorbans (nm)}}{\text{Negatif Kontrol Absorbans (nm)}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$



Şekil 3.12 Mikro plaka okuyucu (BioTek, Epoch2)

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Arkelerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu**

#### **4.1.1 Arkelerin İzolasyonu**

Halofilik arke izolatlarının elde edilmesi için Tuz Gölü'nün üç istasyonundan alınan tuz ve tuzlu su örnekleri kullanılmıştır. Tuz Gölü'nün Eskiil (Aksaray), Şereflikoçhisar (Ankara) ve Tuzyaka (Konya)'ya olan sınırlarından alınan tuz ve tuzlu su örneklerinden yapılan inokülasyonlarda morfolojik özellikleri farklı koloniler dikkate alınarak seçilen izolatlarla çalışma sürdürülmüştür.

#### **4.1.2 İzolatların Gram Boyama Sonuçları**

Yapılan Gram boyama sonuçlarına göre izolatların tamamının Gram negatif boyandığı tespit edilmiştir.

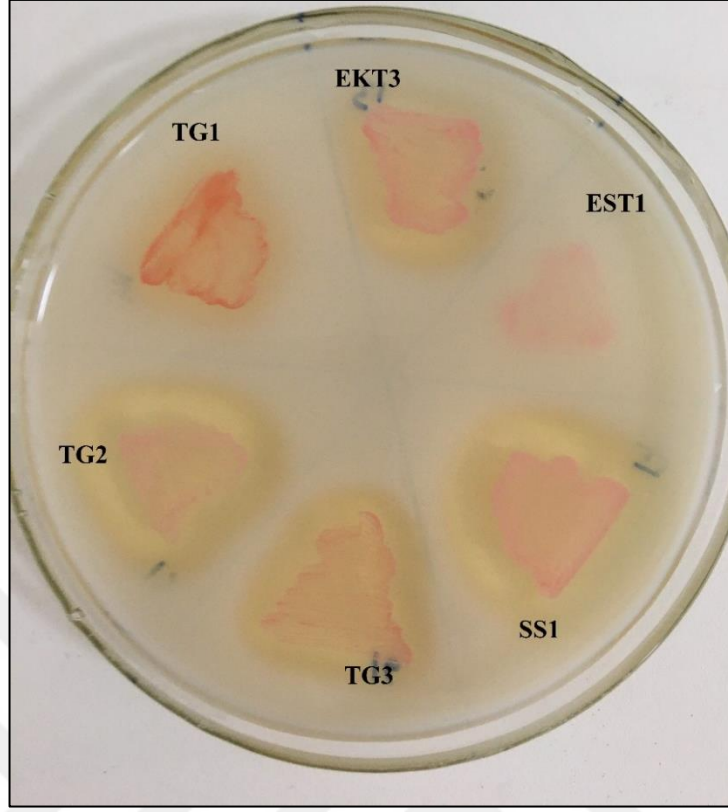
#### **4.1.3 İzolatların Fenotipik, Biyokimyasal Karakteristikleri ve Büyüme Gereksinimleri**

Yapılan biyokimyasal testlere göre izolatların sahip olduğu fenotipik karakteristikleri ile büyüme gereksinim testlerinin sonuçlarını gösteren bilgiler Tablo 4.1'de verilmiştir.

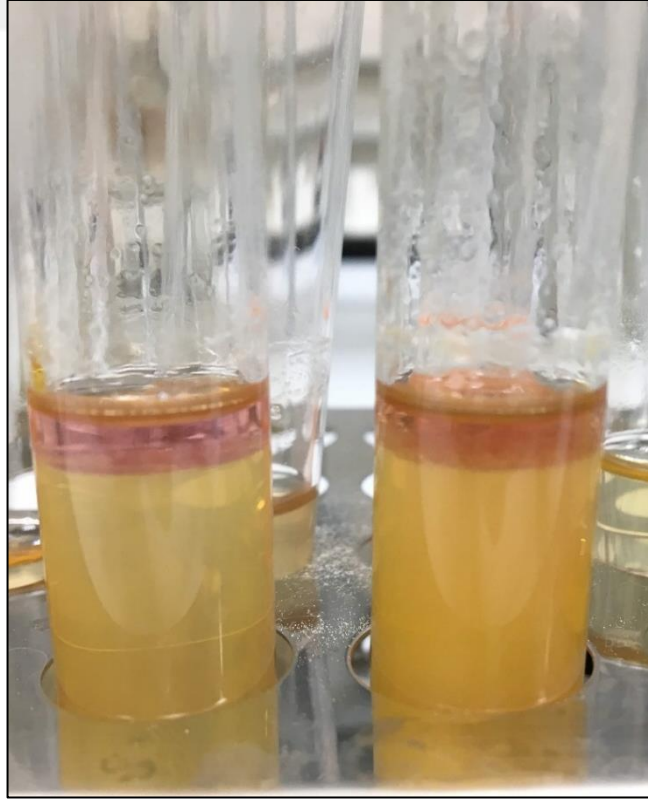
Tablo 4.1 Biyokimyasal test sonuçları

	ES1	EST1	EKT3	TG1	TG2	TG3	SS1
Koloni rengi	Kırmızı	Koyu Pembe	Kırmızı	Koyu Pembe	Kırmızı	Kırmızı	Koyu Pembe
Hücre boyutu (nm)	830	960	1067	1169	998	890	1249
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-
NaCl toleransı (%)	10-30	10-30	15-30	15-30	15-30	10-30	15-30
pH toleransı	6-8	6-8	6-7	6-8	6-7	6-7	6-8
Sıcaklık toleransı (°C)	30-50	30-50	30-50	25-50	30-50	30-50	25-50
Minimum Maya İhtiyacı	0,01	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1
Minimum Mg İhtiyacı	% 0,05	% 0,05	% 0,05	% 0,05	% 0,05	% 0,05	% 0,05
Oksidaz	+	-	-	-	+	-	+
Katalaz	-	-	-	+	+	+	-
İndol	-	-	-	-	-	+	+
Nitrattan Gaz	+	-	-	+	-	-	-
Nitrattan Nitrit	+	-	+	+	-	-	+
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	+	Z	Z	Z	Z	Z
Maltoz	+	Z	+	+	Z	Z	+
Fruktoz	+	Z	+	+	Z	Z	+
Mannitol	+	+	+	+	Z	Z	+
Trehaloz	+	+	+	+	Z	Z	+
Galaktoz	+	Z	+	+	Z	Z	+
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin Hidrolizi	-	-	+	+	+	+	+
Nişasta Hidrolizi	-	-	-	+	-	-	-
Kazein Hidrolizi	-	+	+	-	-	+	+
Tween 80 Hidrolizi	-	-	+	+	-	-	+

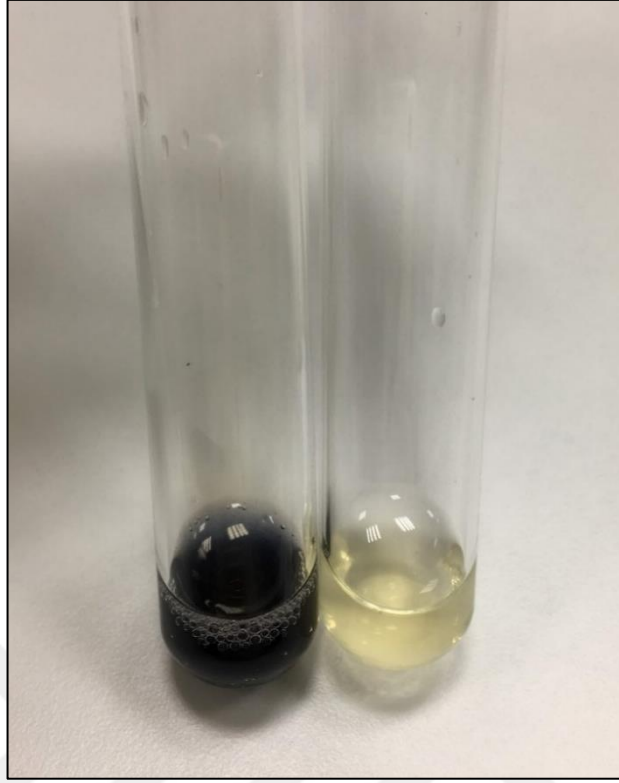
ES1: *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, EST1: *Halorubrum sodomense* JCM 8880, EKT3: *Halorubrum californiense* FV\_22B20, TG1: *Haloarcula salaria* HST01-2R, TG2: *Halorubrum chaoviator* DSM 19316, TG3: *Haloterrigena thermotolerans* PR5, SS1: *Haloarcula japonica* JCM 7785, Z: Zayıf üreme



Şekil 4.1 İzolatlara ait jelatinaz testi görüntüsü



Şekil 4.2 TG3 ve SS1 kodlu izolatlara ait indol testi görüntüsü



Şekil 4.3 ES1 ve EST1 izolatlarına ait nitrattan nitrit oluşturma test görüntüleri

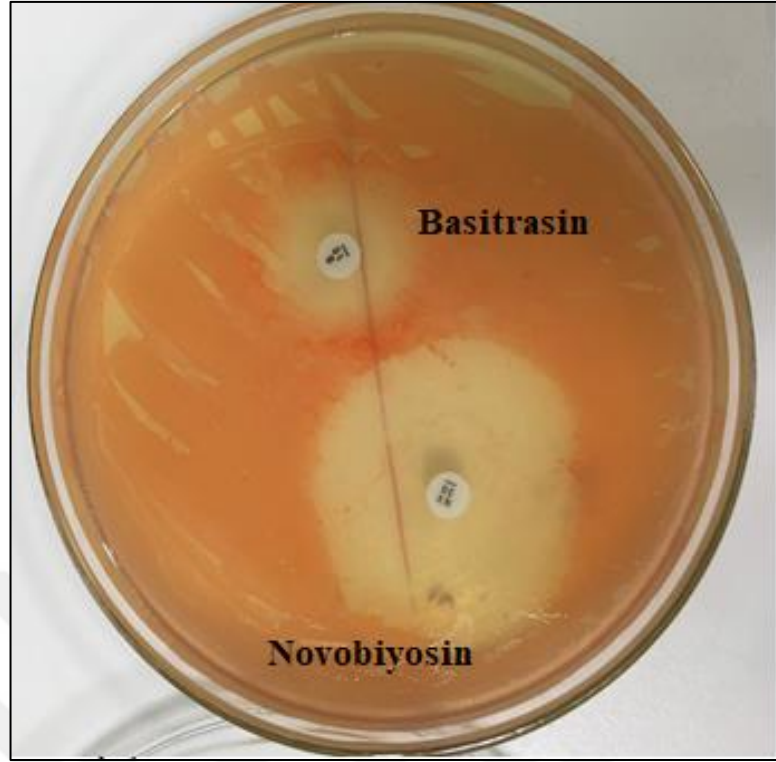
#### 4.1.3.1 İzolatların antibiyotik duyarlılıkları

Çalışmada kullanılan tüm izolatların novobiyosin ve basitrasin antibiyotiklerine duyarlı, kullanılan diğer antibiyotiklere karşı dirençli oldukları saptanmıştır. İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon çapları (mm) Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)

	ES1	EST1	EKT3	TG1	TG2	TG3	SS1
<b>A 10</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>B 10</b>	34	35	20	50	25	50	33
<b>E 15</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>NV 30</b>	55	50	40	50	50	55	53
<b>P 10</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>S 10</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>T 30</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>C 30</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>VAN 30</b>	D	D	D	D	D	D	D
<b>CTX 30</b>	D	D	D	D	D	D	D

Zon çapı hesaplamaları zon ve diskler birlikte ölçülerek yapılmıştır. D, antibiyotiklere karşı dirençliliği temsil etmektedir.



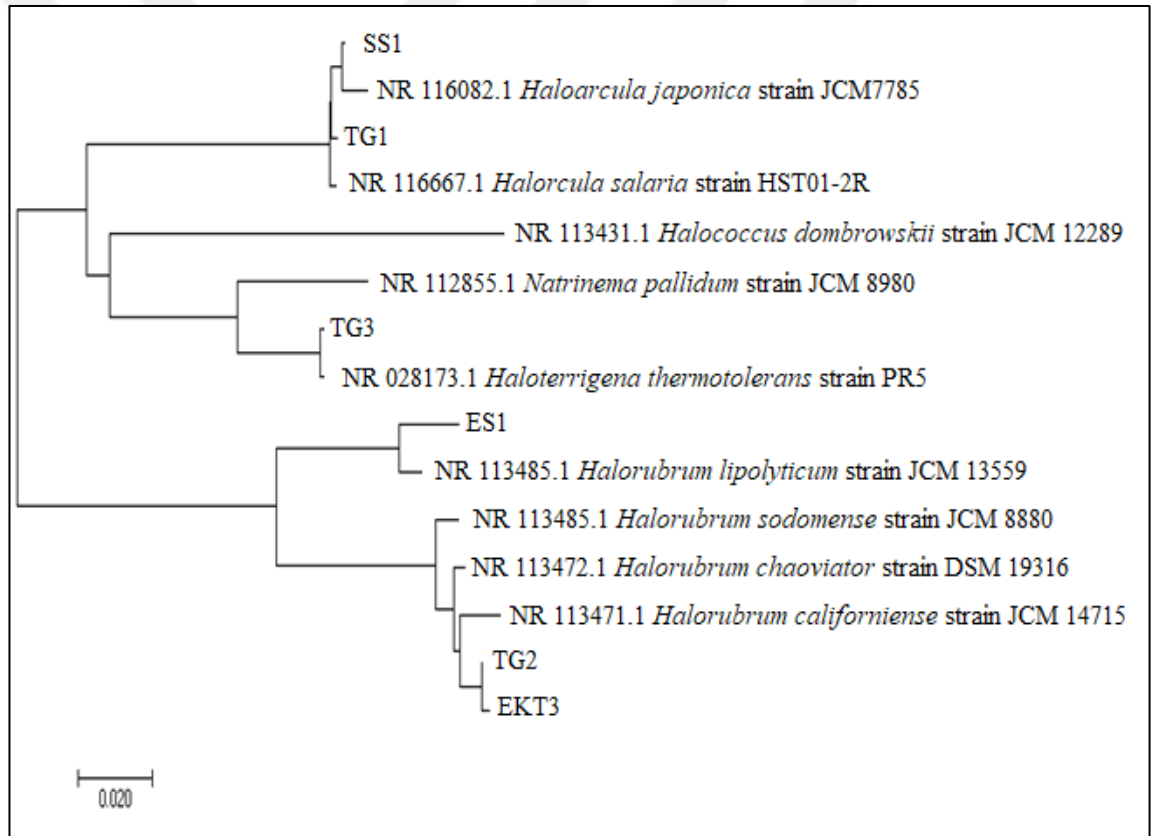
Şekil 4.4 EKT3 izolatına ait B 10 ve NV 30 test sonuçları

#### 4.1.4 İzolatların Filogenetik İdentifikasyonu

İzolatların DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonuyla 16S rDNA bölgelerinin çoğaltılmasının ardından özel bir firmadan hizmet alımıyla PZR ürünlerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Chromas isimli programda kontrol edilmiş ve Bioedit isimli programda ileri ve geri okumalar hizalanarak gen dizisinin son hali elde edilmiştir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) internet sitesinin “Nucleotide Blast” bölümünde rRNA/ITS-16S ribozomal RNA dizileri veritabanı kullanılarak türlerin benzerlik oranları saptanmıştır. İzolatlara ait 16S gen dizilerinin benzerlik gösterdikleri türler ve benzerlik oranları Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3 İzolatların NCBI veribankasına göre türlere benzerlik oranları

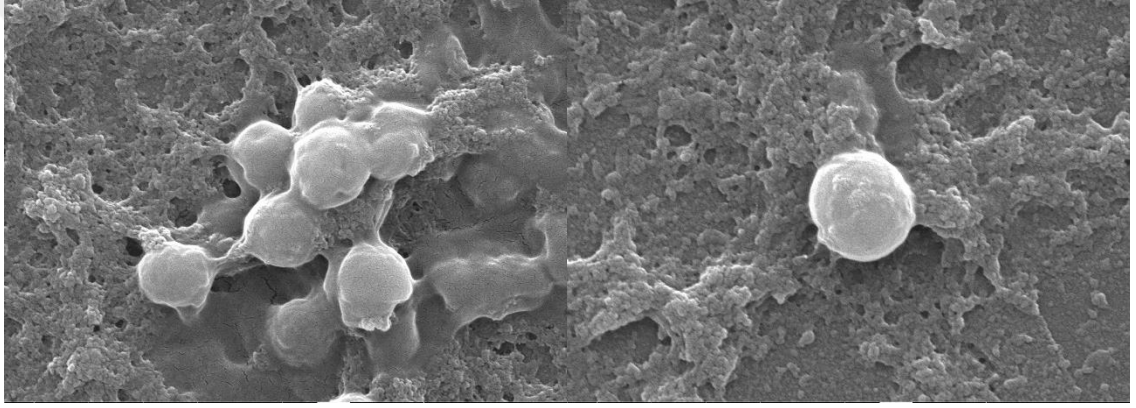
	<b>Tür İsmi</b>	<b>Benzerlik Oranı</b>	<b>Erişim Numarası</b>
<b>ES1</b>	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559	%98	NR_113480.1
<b>EST1</b>	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880	%99	NR_113485.1
<b>EKT3</b>	<i>Halorubrum californiense</i> FV_22B20	%98	NR_113471.1
<b>TG1</b>	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R	%99	NR_116667.1
<b>TG2</b>	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316	%99	NR_113472.1
<b>TG3</b>	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5	%99,5	NR_028173.1
<b>SS1</b>	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785	%99	NR_116082.1



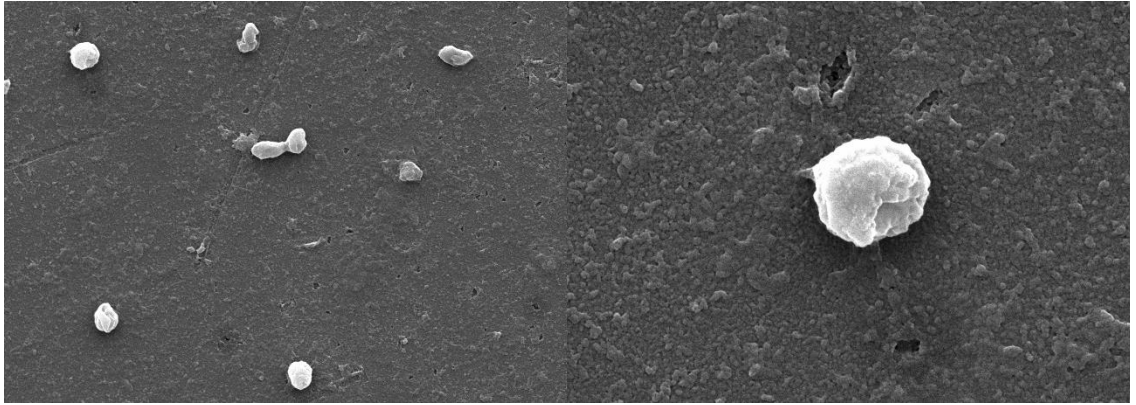
Şekil 4.5 İzolatlar ve benzerlik gösterdikleri türlere ait filogenetik ağaç

#### 4.1.5 Türlerine Ait Elektron Mikrografları

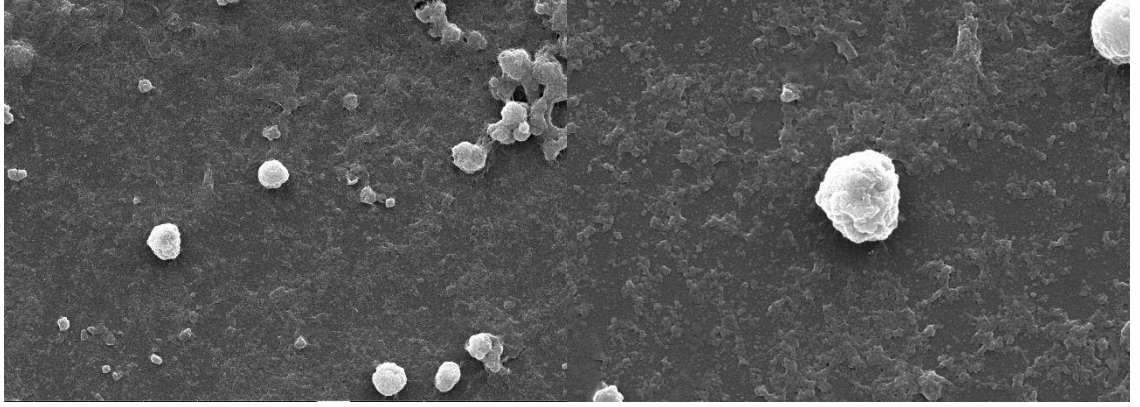
Suşların taramalı elektron mikroskopunda (SEM) çekilen görüntüleri Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12’de verilmiştir. Elektron mikrografları türlerin morfolojik karakteristiklerini ayrıntılı olarak göstermektedir. Buna göre *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV 22B20, *Haloarcula salaria* HST01 2R ve *Halorubrum chaoviator* DSM 19316 türlerinin kok biçimli, *Haloterrigena thermotolerans* PR5’in oval, *Haloarcula japonica* JCM 7785’nin ise trigon benzeri biçimli olduğu gözlemlenmiştir.



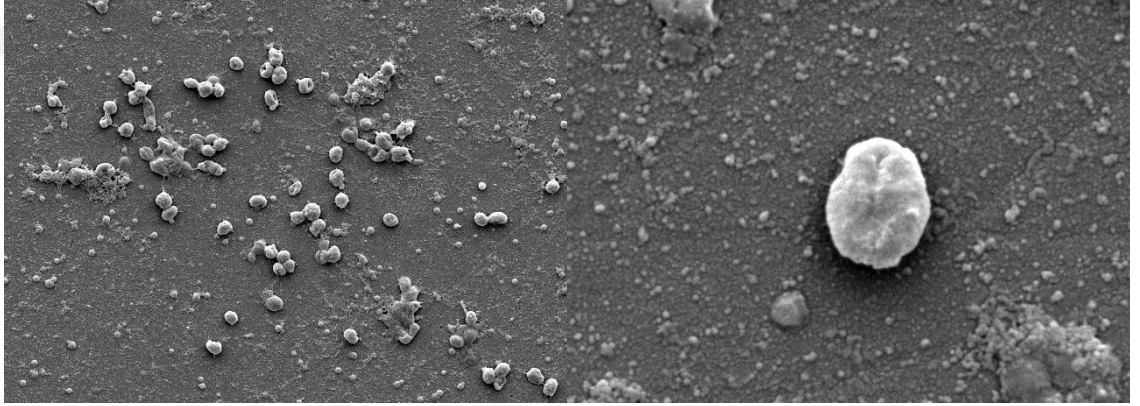
Şekil 4.6 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559’a ait elektron mikrografları



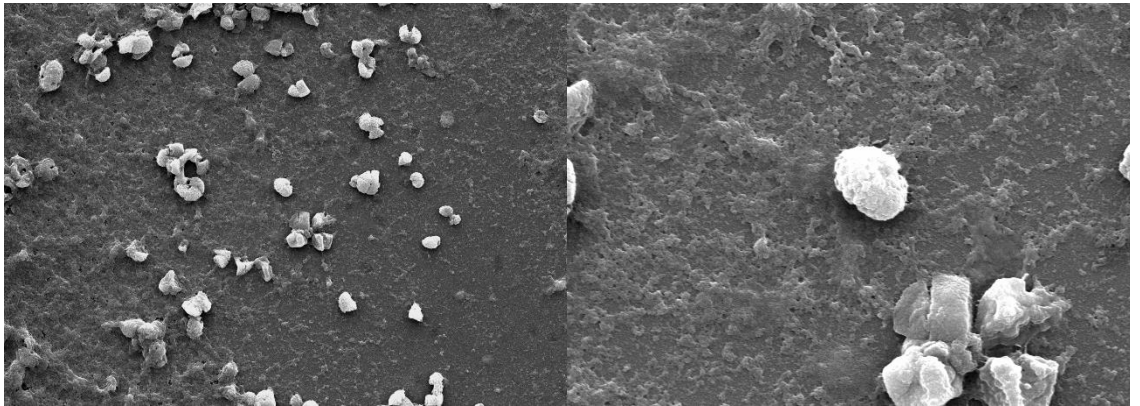
Şekil 4.7 *Halorubrum sodomense* JCM 8880’e ait elektron mikrografları



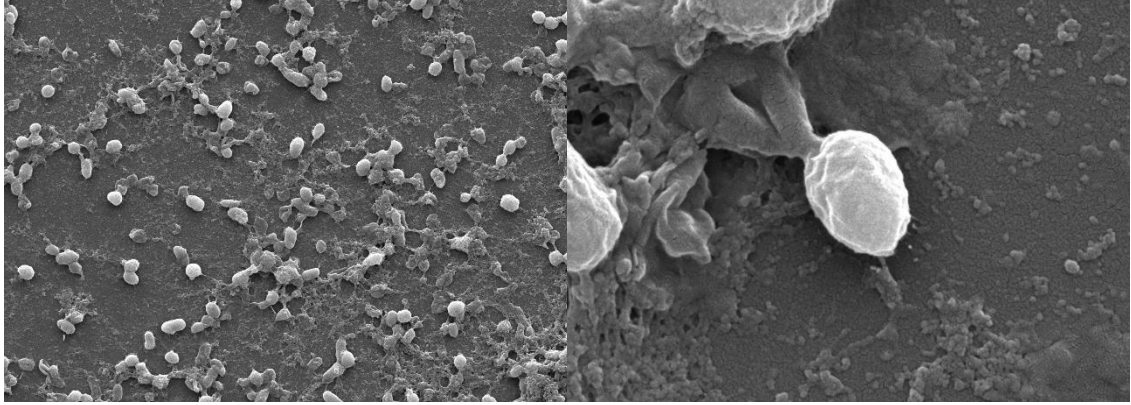
Şekil 4.8 *Halorubrum californiense* FV 22B20'ye ait elektron mikrografları



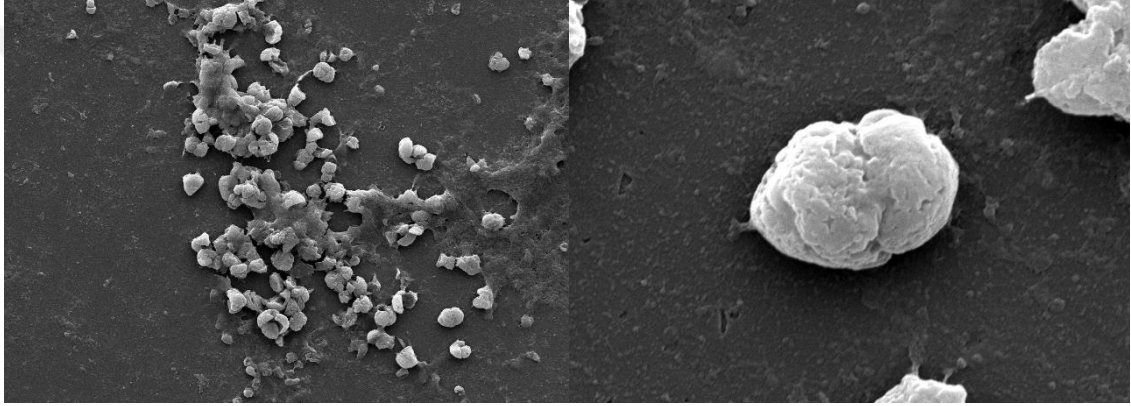
Şekil 4.9 *Haloarcula salaria* HST01-2R'te ait elektron mikrografları



Şekil 4.10 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316'ya ait elektron mikrografları



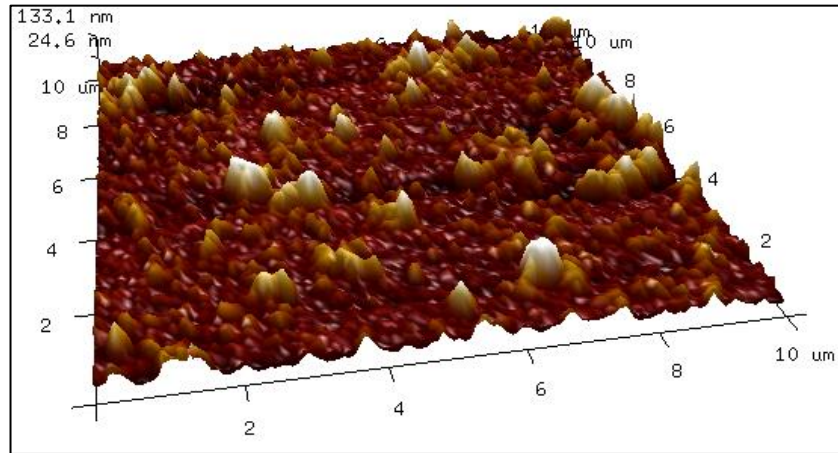
Şekil 4.11 *Haloterrigena thermotolerans* PR5'e ait elektron mikrografları



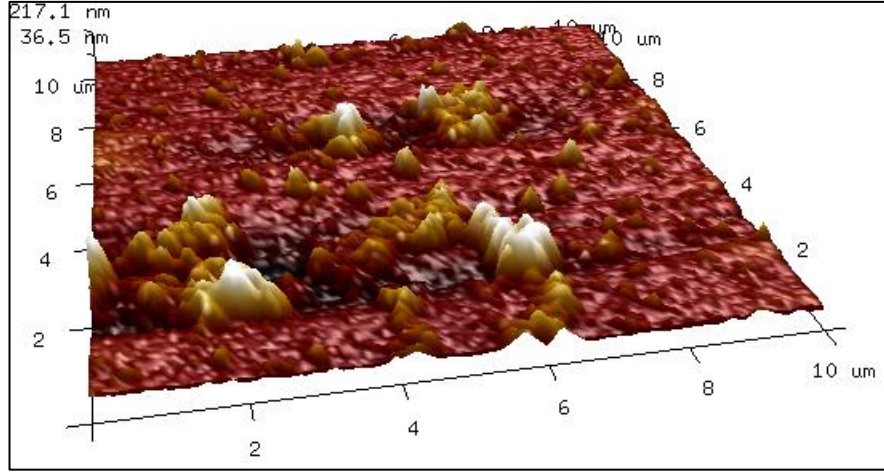
Şekil 4.12 *Haloarcula japonica* JCM 7785'e ait elektron mikrografları

#### 4.1.6 Türlerine Ait Atomik Kuvvet Mikrografları

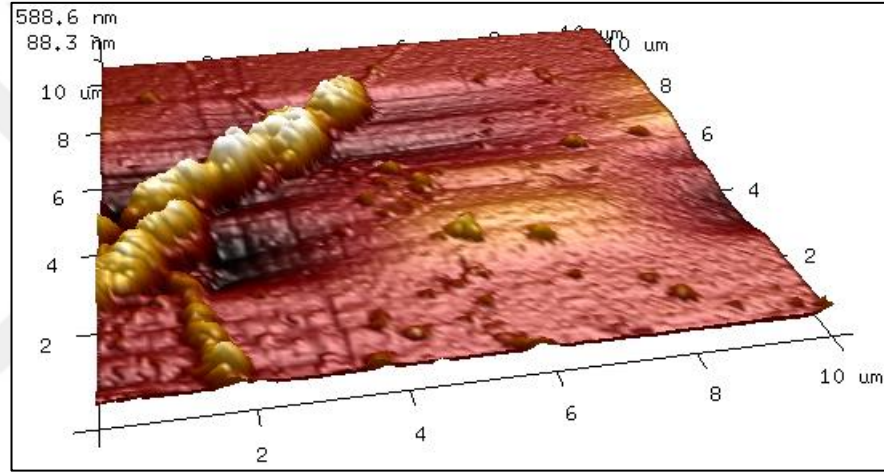
Suşların atomik kuvvet mikroskopunda (AFM) çekilen görüntüleri Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19'da verilmiştir.



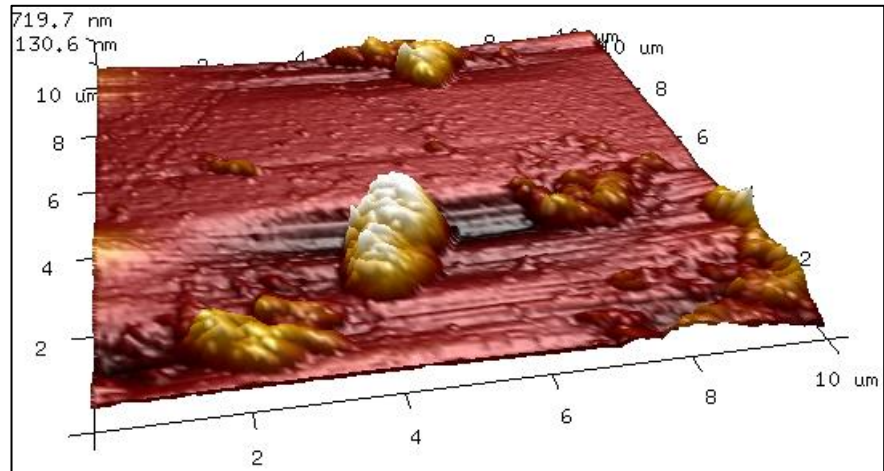
Şekil 4.13 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559'a ait AFM mikrografı



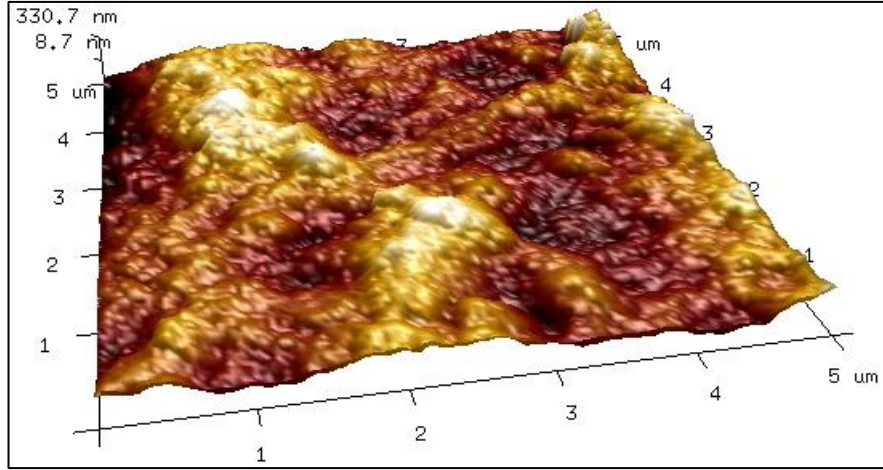
Şekil 4.14 *Halorubrum sodomense* JCM 8880'ye ait AFM mikrografı



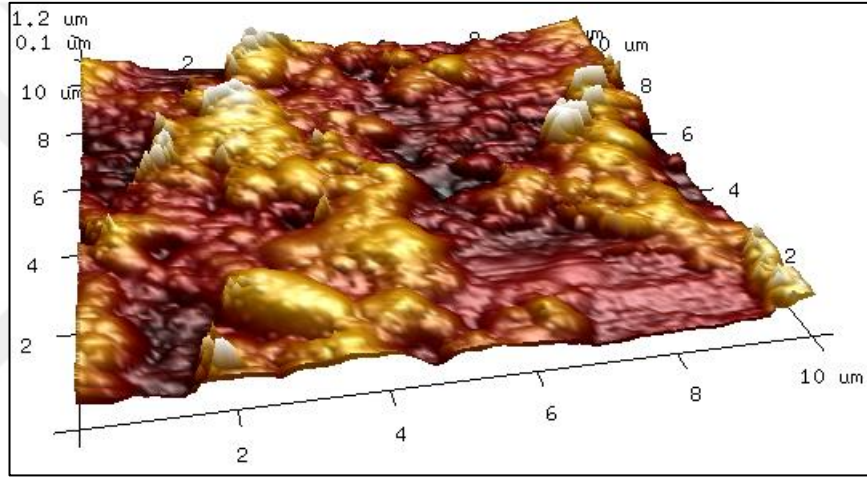
Şekil 4.15 *Halorubrum californiense* FV-22B20'ye ait AFM mikrografı



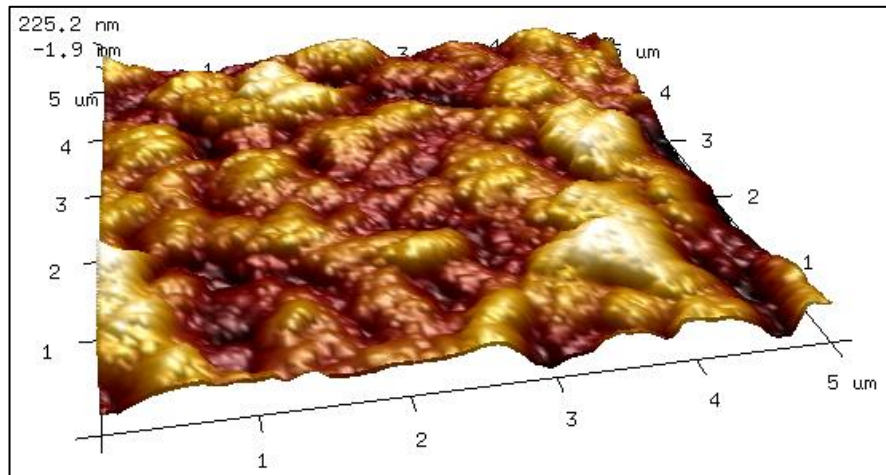
Şekil 4.16 *Haloarcula salaria* HST01-2R'ya ait AFM mikrografı



Şekil 4.17 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316'e ait AFM mikrografi



Şekil 4.18 *Haloterrigena thermotolerans* PR5'a ait AFM mikrografi



Şekil 4.19 *Haloarcula japonica* JCM 7785'ya ait AFM mikrografi

#### 4.1.7 Türlerine Ait FAME Analizleri

Tablo 4.4 İzolatlara ait FAME analiz sonuçları (ppm)

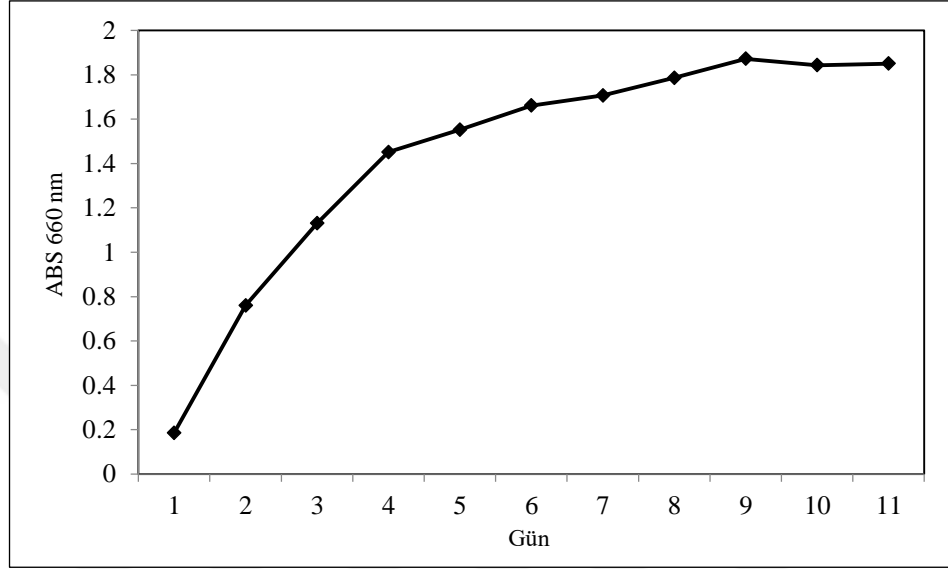
Yağ Asidi	<i>Halorubrum lipolyticum</i> JCM 13559	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880	<i>Halorubrum californiense</i> FV22B20	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5	<i>Haloarcula japonica</i> JCM 7785	
Oktanoik asit	C8:0	0,647	0,71	0,552	0,664	0,62	0,735	0,692
Dekanoik asit	C10:0	1,49	1,331	1,156	1,483	1,31	1,595	1,482
Dodekanoik asit	C12:0	1,997	1,786	1,485	1,923	1,662	2,053	1,847
Tridekanoik asit	C13:0	1,551	1,356	1,331	1,35	1,45	1,362	1,371
Tetradekanoik asit	C14:0	6,14	5,677	2,643	4,732	3,633	5,879	3,547
Palmitik asit	C16:0	56,753	60,615	15,068	39,54	26,244	59,108	38,62
Heptadekanoik asit	C17:0	4,42	8,033	2,804	8,242	3,452	6,123	4,521
Oktadekanoik asit	C18:0	281,106	416,538	101,337	251,11	174,496	441,159	109,42
Eikosanoik asit	C20:0	4,969	8,662	3,189	5,082	4,301	7,985	4,025
Heikosanoik asit	C21:0	1,647	1,687	1,623	1,641	1,642	1,683	1,632
Dokosanoik asit	C22:0	2,117	3,639	1,823	2,142	2,064	2,936	2,214
Trikosanoik asit	C23:0	1,56	1,626	1,539	1,561	1,555	1,623	1,448
Tetrafosanoik asit	C24:0	1,58	2,078	1,486	1,662	1,588	1,995	1,674
<b>Toplam Doymuş Yağ Asidi</b>		<b>365,977</b>	<b>513,738</b>	<b>136,036</b>	<b>321,132</b>	<b>224,017</b>	<b>534,236</b>	<b>172,493</b>
Eikosatrienoik asit (ETE)	C20:3	1,453	2,494	1,412	1,65	1,514	3,534	1,352
Eikosapentaenoik asit (EPA)	C20:5	T.E	T.E	T.E	1,159	T.E	T.E	T.E
Heneikosapentonoik asit (HPA)	C21:5	T.E	0,8	0,793	T.E	T.E	0,798	T.E
Dokosaheksaenoik asit (DHA)	C22:6	T.E	T.E	0,714	T.E	0,716	T.E	T.E

Tablo 4.4'ün devamı

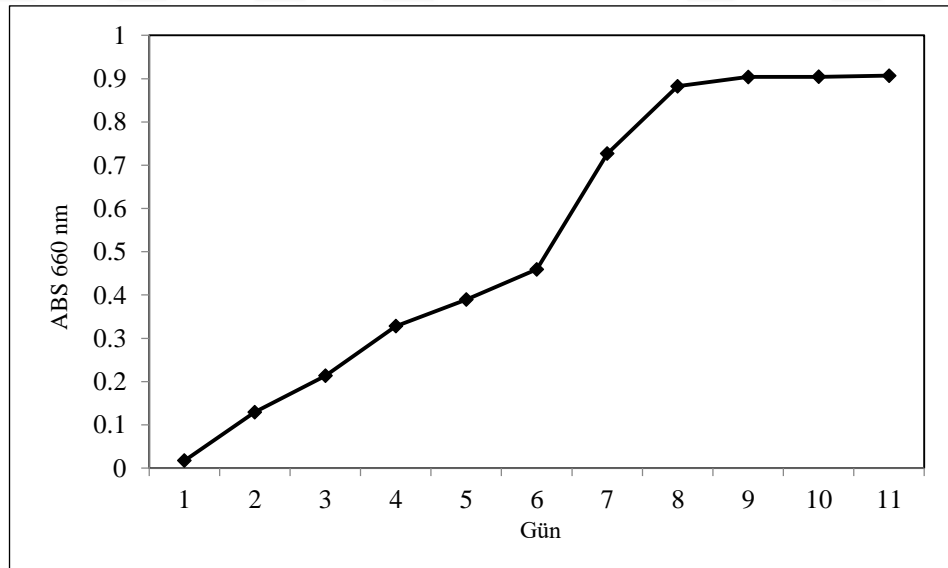
<b>Toplam ω-3 Grubu Yağ Asidi</b>		<b>1,453</b>	<b>3,294</b>	<b>2,919</b>	<b>2,809</b>	<b>2,23</b>	<b>4,332</b>	<b>1,352</b>
Linoleik asit (LA)	C18:2	1,993	1,972	1,872	1,939	1,894	1,964	1,881
α-linolenik asit (ALA)	C18:3	1,49	1,436	T.E	1,51	1,435	1,433	1,427
Araşidonik asit	C20:4	2,491	3,401	1,578	1,473	2,096	5,526	2,14
<b>Toplam ω-6 Grubu Yağ Asidi</b>		<b>5,974</b>	<b>6,809</b>	<b>3,45</b>	<b>4,922</b>	<b>5,425</b>	<b>8,923</b>	<b>5,448</b>
Palmiteloik asit	C16:1	2,583	1,512	1,171	1,214	1,403	1,587	1,524
<b>Toplam ω-7 Grubu Yağ Asidi</b>		<b>2,583</b>	<b>1,512</b>	<b>1,171</b>	<b>1,214</b>	<b>1,403</b>	<b>1,587</b>	<b>1,524</b>
Oleik asit	C18:1	1,795	2,003	1,415	1,742	1,459	1,803	1,672
Gondoik asit	C20:1	1,892	2,057	1,453	2,365	1,438	2,389	2,457
Nernovik asit	C24:1	1,322	1,002	0,881	1,284	0,968	0,97	0,745
<b>Toplam ω-9 Grubu Yağ Asidi</b>		<b>5,009</b>	<b>5,062</b>	<b>3,749</b>	<b>5,391</b>	<b>3,865</b>	<b>5,162</b>	<b>4,874</b>
<b>Toplam Doymamış Yağ Asidi</b>		<b>12,436</b>	<b>15,165</b>	<b>10,118</b>	<b>13,122</b>	<b>11,52</b>	<b>18,417</b>	<b>11,674</b>

## 4.2 Büyüme eğrileri

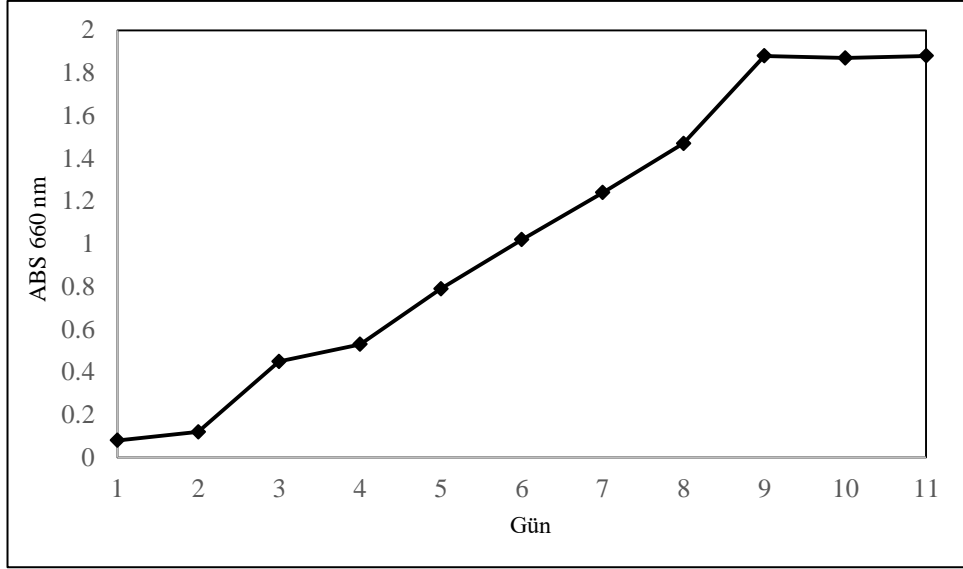
Türlerin zamana bağlı büyümeleri Şekil 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25 ve 4.26'da verilmiştir.



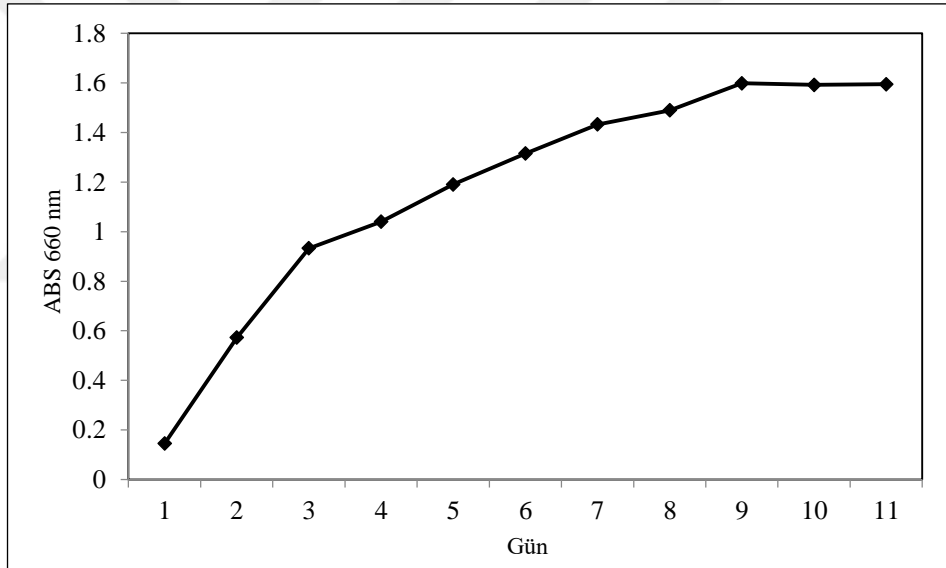
Şekil 4.20 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559 türü günlere bağlı büyüme performansı



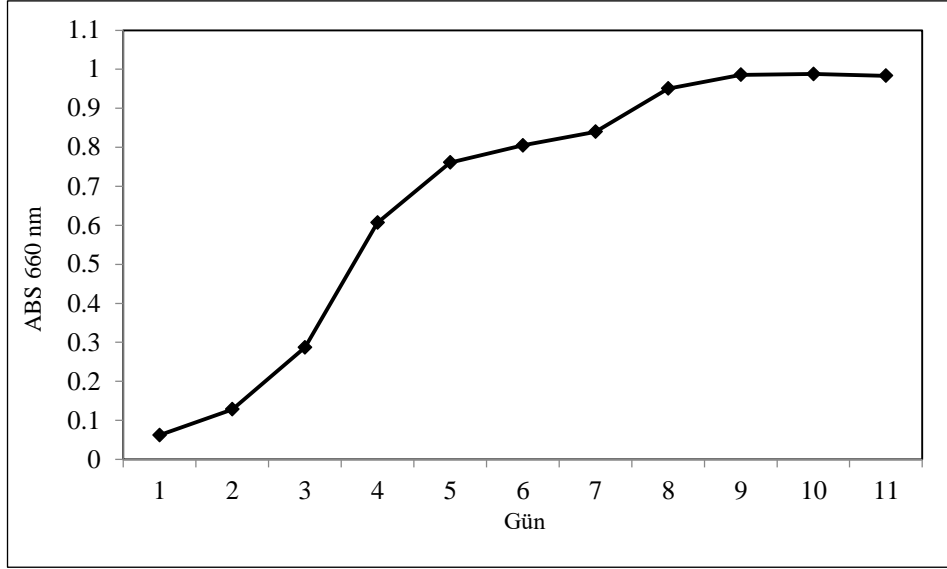
Şekil 4.21 *Halorubrum sodomense* JCM 8880 türü günlere bağlı büyüme performansı



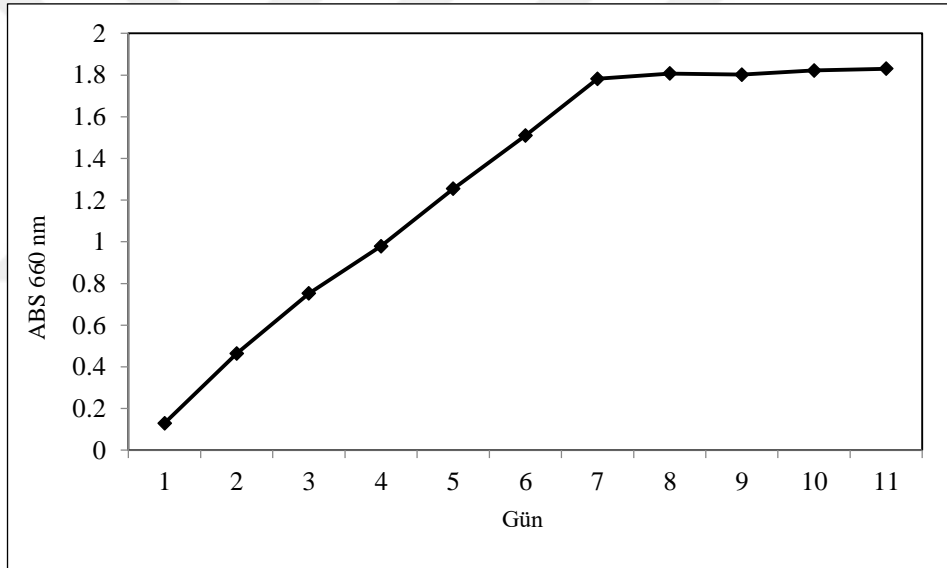
Şekil 4.22 *Halorubrum californiense* FV\_22B20 türü günlere bağlı büyüme performansı



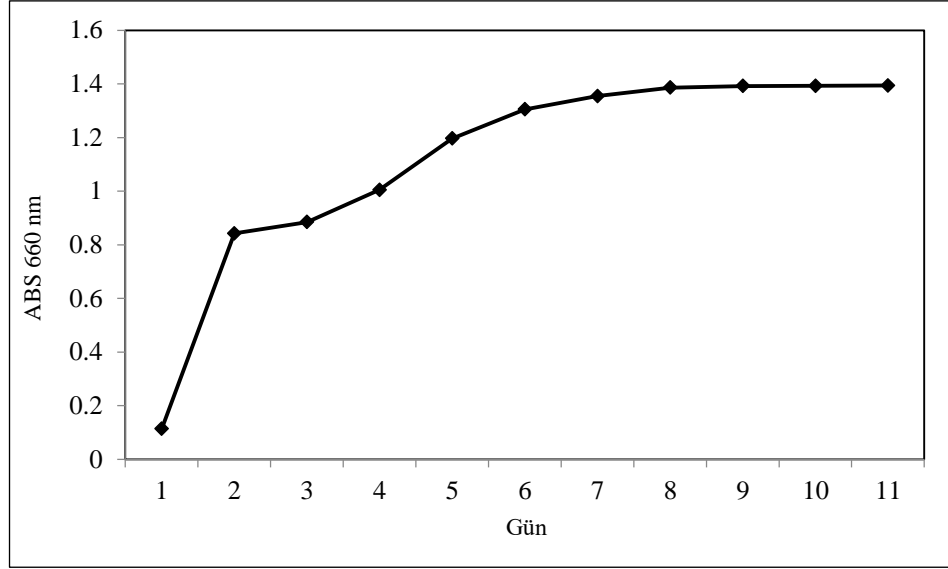
Şekil 4.23 *Haloarcula salaria* HST01-2R türü günlere bağlı büyüme performansı



Şekil 4.24 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316 türü günlere bağlı büyüme performansı



Şekil 4.25 *Haloterrigena thermotolerans* PR5 türü günlere bağlı büyüme performansı



Şekil 4.26 *Haloarcula japonica* JCM 7785 türü günlere bağlı büyüme performansı

### 4.3 İzolatların Karotenoid Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi

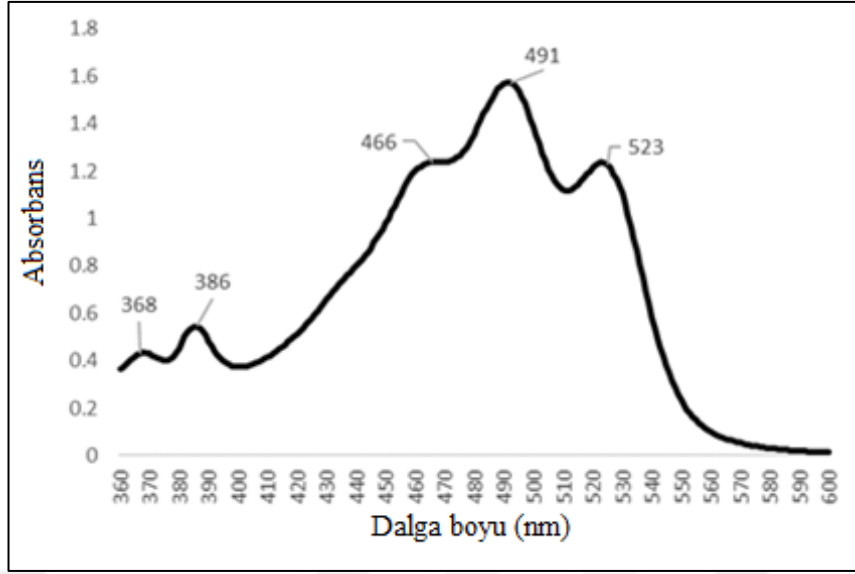
#### 4.3.1 İnce Tabaka Kromatografisi Analizleri

Türlerden elde edilen metanolik ekstraktlar ince tabaka kromatografisinde yürütülmüştür. Spotlar görünür ışıkta incelenmiş ve her bir spot kazanarak geri kazanımı gerçekleştirilmiştir. Tür bazında elde edilen spot sayılarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

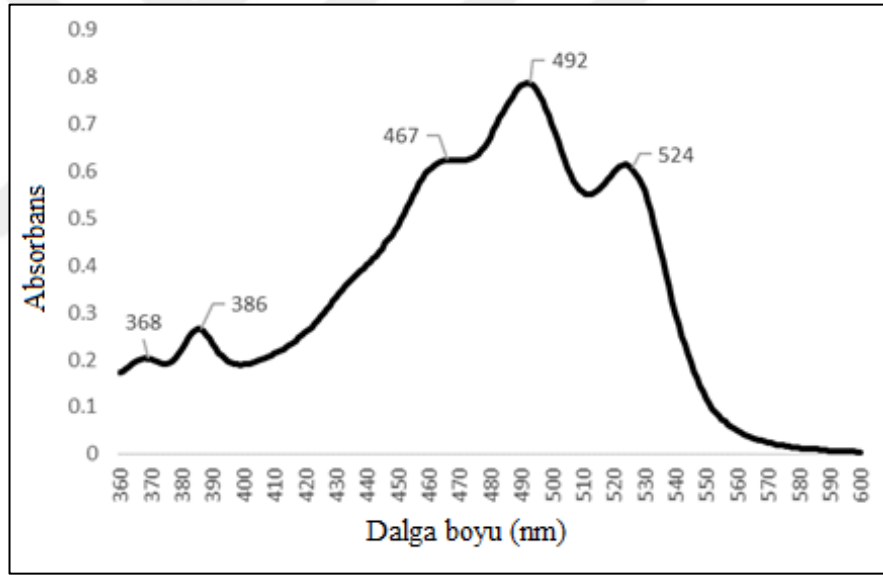
#### 4.3.2 Karotenoidlerin UV-VIS Spektrofotometrik Analizleri

Türlere ait karotenoid ekstraktları ve ince tabaka kromatografisinden geri kazanılan spotlar multiplaka okuyucuda 300-700 nm dalga boyu aralığında taratılmış ve tüm spotlarda bakterioruberin karotenoidine ait olan 2 cis pik, 3 ana pik içeren karakteristik bir spektrum elde edilmiştir. Bu şekilde kontrolü gerçekleştirilen her bir ekstrakt ve spot kromatografik cihazlarda analiz edilmiştir.

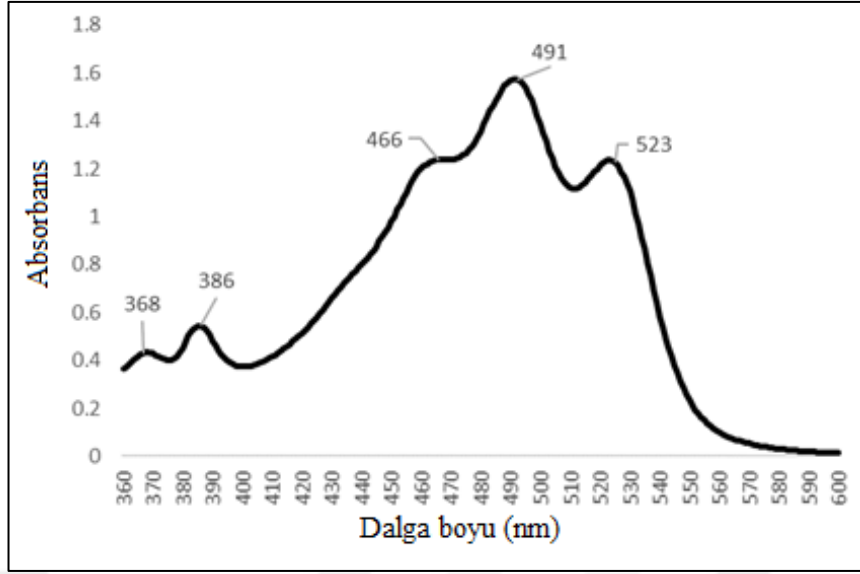
Türlerden elde edilen karotenoid ekstraktları, sönüm katsayısı ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ; extinction coefficient) metoduyla hesaplanmıştır. Buna göre, *H. lipolyticum*, *H. sodomense*, *H. californiense*, *H. salaria*, *H. chaoviator*, *H. thermotolerans* ve *H. japonica* için elde edilen toplam karotenoid miktarları; 43,09; 15,53; 22,60; 37,69; 17,65; 22,81 ve 22,24  $\mu\text{g/g}_{(\text{kuru hücre})}$  olarak bulunmuştur.



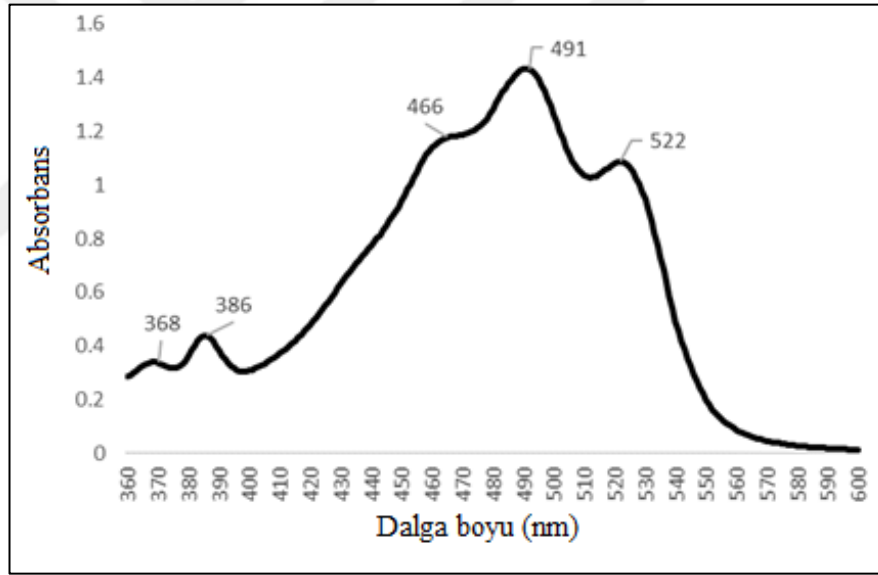
Şekil 4.27 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum



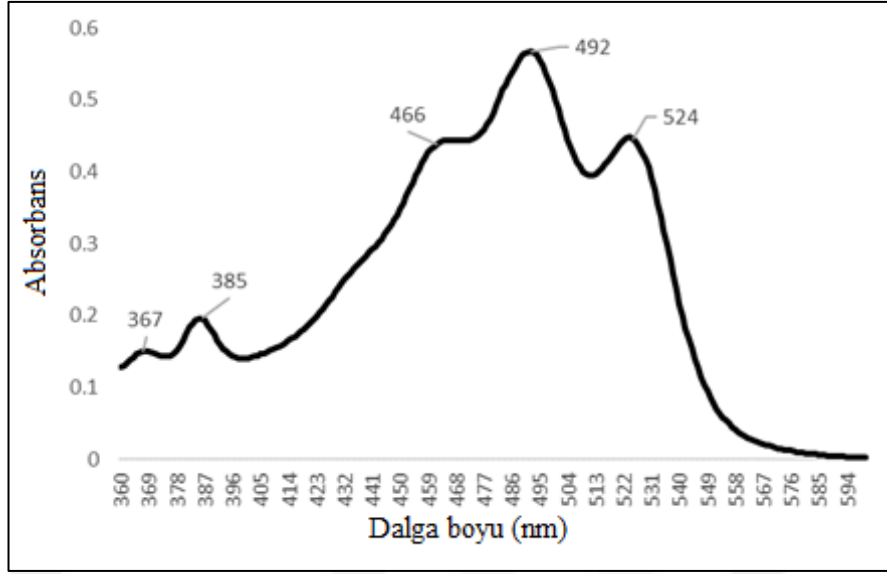
Şekil 4.28 *Halorubrum sodomense* JCM 8880'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum



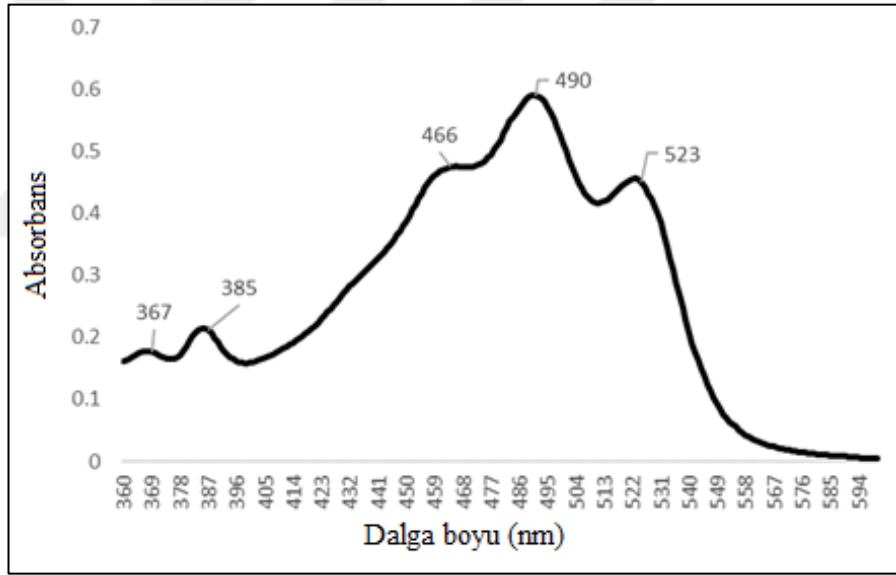
Şekil 4.29 *Halorubrum californiense* FV 22B20'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum



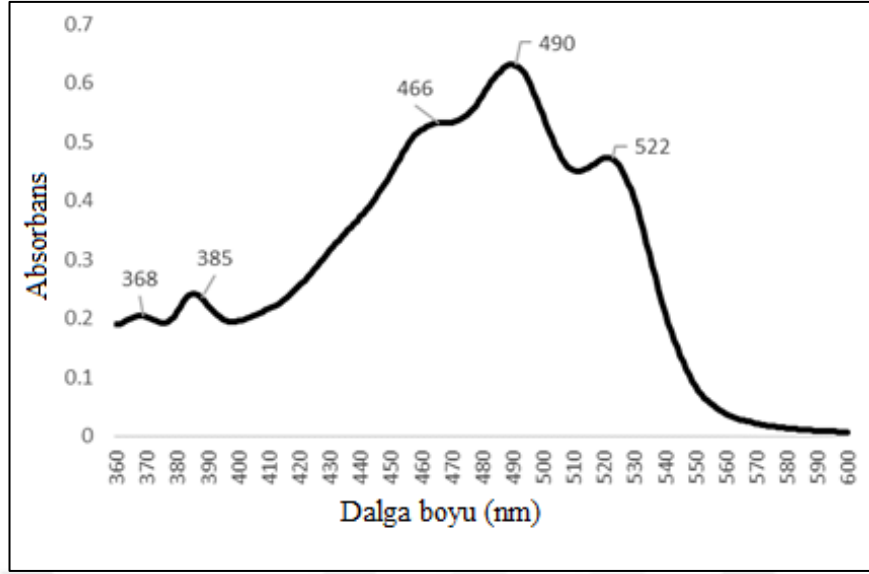
Şekil 4.30 *Haloarcula salaria* HST01-2R'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum



Şekil 4.31 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum



Şekil 4.32 *Haloterrigena thermotolerans* PR5'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum

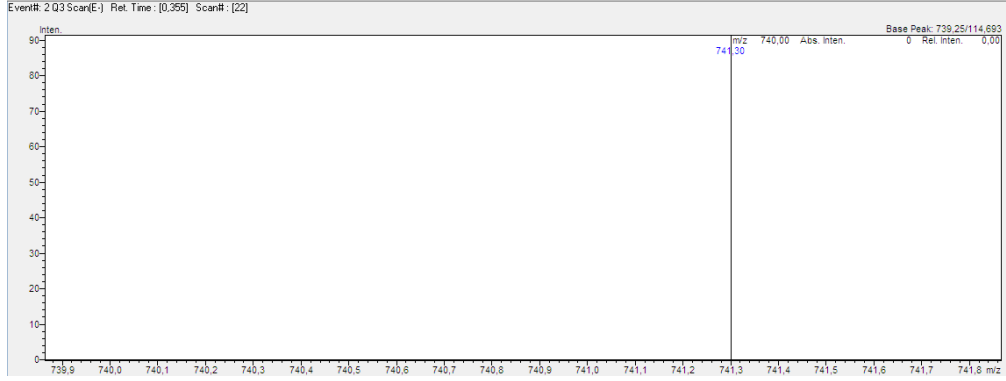


Şekil 4.33 *Haloarcula japonica* JCM 7785'den elde edilen karotenoid ekstraktının 300-600 nm arasında taratılmasıyla elde edilen spektrum

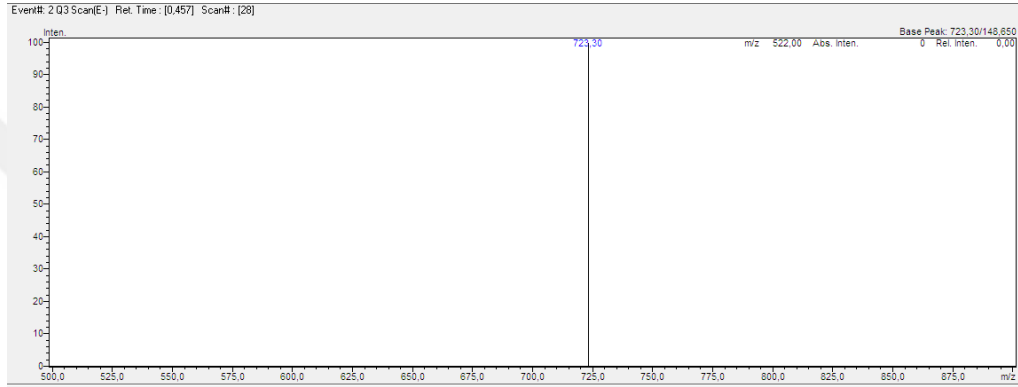
#### 4.3.3 Karotenoidlerin Kromatografik Cihazlarla Saptanması

Türlere ait karotenoid çeşitlerinin tespitinde HPLC ve LC-MS/MS cihazları ile ince tabaka kromatografisi birlikte kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile ayırımı gerçekleştirilen spotlar tek tek kazınarak geri kazanılmış ve HPLC cihazında her spot ayrı ayrı okutularak spotların sıvı kromatografide verdiği pikler PDA dedektör ile tespit edilmiştir. Buna göre her spotta birden fazla pik olduğu gözlenmiş, başka bir deyişle ince tabaka kromatografisinde bazı karotenoidlerin birlikte yürüdüğü saptanmıştır. Ayrıca her bir ekstrakt HPLC cihazında analiz edilmiş ve her bir pikin sahip olduğu dalga boyu spektrumu çıkartılarak maksimum noktalar tespit edilmiş ve bu değerlerle birlikte spektrumlara ait % III/ II ve %  $A_B/A_{II}$  oranları karotenoid türlerinin tespitinde kullanılmıştır.

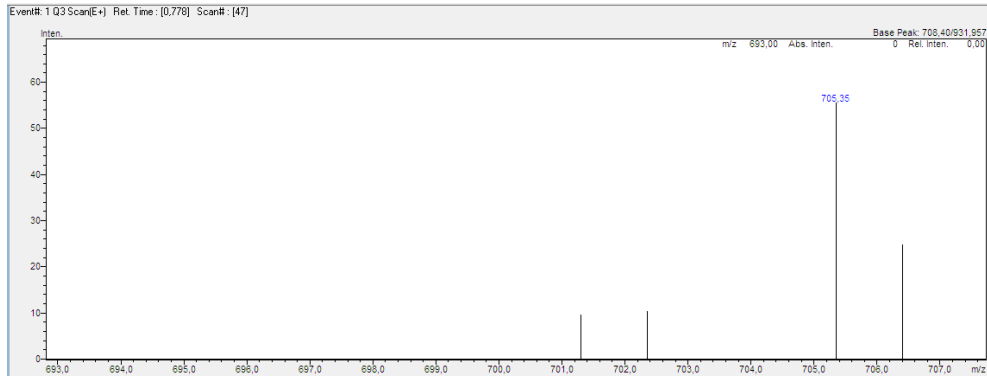
Spotlara ait ekstraktlar LC-MS/MS cihazında karotenoidlerin kütle taramaları yapılarak incelenmiştir.



Şekil 4.34 Bakterioruberin'e ait iyon spektrumu

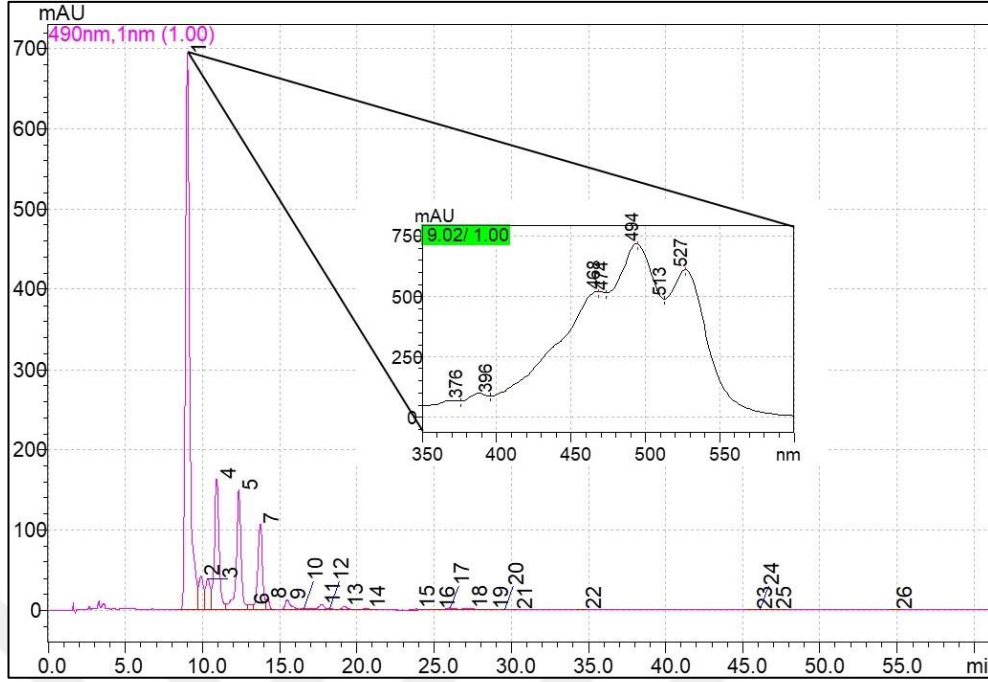


Şekil 4.35 Monoanhidrobakterioruberin'e ait iyon spektrumu



Şekil 4.36 Bisanhidrobakterioruberin'e ait iyon spektrumu

İnce tabaka kromatografisi, spektral karakteristikleri de sıvı kromatografi analizleri birlikte değerlendirildiğinde elde edilen karotenoid çeşitleri Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.37 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.5 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559 karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369,96; 387; 468,96; 495; 527	52,64	13,62	9,008	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	367; 383; 461; 483; 516	31,92	28,20	9,895	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	367; 383; 460; 483; 516	27,50	60,89	10,326	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	368; 384; 465; 491; 523	50,79	18,7	10,912	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	368; 386; 461; 488; 519	48,63	30,74	12,344	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	367; 386; 462; 486; 524	31,82	49,44	13,013	9 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
7	368; 384; 461; 488; 519	36,18	79,66	13,726	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
8	368; 384; 464; 490; 522	28,39	106	14,181	13 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
9	368; 387; 468,9	60,08	24,17	15,482	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
10	368; 387; 461; 486; 514	19,76	35,60	16,575	3'4'Dihidro MABR	Ronnekleiv vd., 1995
11	368; 383; 490; 522	34,25	25,17	17,704	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
12	387; 486; 509	26,38	29,45	18,258	Z BABR	Mandelli vd., 2012
13	387; 486; 519,8	38,44	38,15	19,183	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017

Tablo 4.5'in devamı

14	368; 384; 486; 519,8	29,41	81,62	20,6	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
15	368; 387; 467; 486; 524	48,53	31,26	23,832	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
16	368; 387; 462; 486; 519	11,46	37,23	25,13	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
17	387; 485; 513	30,52	29,31	26,007	Haloksanthin	Ronnekleiv, 1994
18	446; 472; 501	31,38	-	27,24	Likopen	Ronnekleiv vd., 1995
19	446; 472; 501	30,28	-	28,573	Likopen	Ronnekleiv vd., 1995
20	446; 472; 501	32,56	-	29,594	Likopen	Ronnekleiv vd., 1995
21	446; 472; 501	35,50	-	30,137	Likopen	Ronnekleiv vd., 1995
22	441; 464; 496	-	-	34,596	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002
23	441; 464; 496	-	-	45,691	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002
24	441; 464; 496	-	-	46,109	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002
25	441; 464; 496	-	-	46,887	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002
26	441; 464; 496	-	-	54,736	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002



Şekil 4.38 *Halorubrum sodomense* JCM 8880'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.6 *Halorubrum sodomense* JCM 8880 karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369; 387; 467; 495; 527	50,97	16,61	10,900	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	368; 387; 460; 487; 516	40,78	36,90	11,733	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	366; 383; 461; 487; 516	23,25	75,25	12,119	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	368; 386; 465; 490; 523	53,69	20,64	12,768	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	368; 386; 461; 487; 519	45,63	35,45	14,057	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 460; 487; 519	39,65	83,63	15,351	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	371; 388; 468; 496; 526	50,86	20,56	15,701	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
8	387; 482; 512	20,36	42,98	16,903	3'4'Dihidro MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	365; 387; 490; 523	40,56	46,66	19,079	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
10	368; 387; 460; 521	46,78	39,21	20,440	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017
11	368; 386; 459; 488; 519	32,96	85,60	21,797	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
12	373; 387; 468,96; 495; 527	55,60	22,63	24,831	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995

Tablo 4.6'nin devamı

13	366; 387; 464; 488; 519	23,96	37,96	26,117	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
14	368; 387; 467; 488,8; 518,56	42,36	42,62	27,354	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
15	368; 387; 487; 518	26,55	87,90	28,563	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017
16	446; 472; 501			29,702	Likopen	Ronnekleiv vd., 1995



Şekil 4.39 *Halorubrum californiense* FV 22B20'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.7 *Halorubrum californiense* FV 22B20 karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369; 388; 468; 495; 527	51,10	13,90	10,024	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	383; 461; 487; 517	16,25	30,65	10,944	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	383; 461; 487; 517	14,54	65,98	11,351	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	386; 461; 487; 523	47,89	25,35	12,131	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	369; 386; 461; 487; 519	44,65	36,45	13,585	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 461; 487; 519	33,65	85,78	14,897	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	369,96; 383/386; 461; 487; 523	27,03	92,82	15,324	13 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
8	369; 389; 469; 495; 527	45,40	20,54	16,491	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	369; 389; 456; 487; 514	39,63	36,45	18,677	3'4'Dihidro MABR	Ronnekleiv vd., 1995
10	363,79; 383,54; 461; 487; 523	35,98	25,56	20,072	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
11	369; 386; 461; 487; 519	40,56	36,98	21,448	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017
12	368; 386; 461; 487; 519,8	26,34	82,45	24,541	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
13	363; 383; 487; 523	10,65	75,35	25,863	-	
14	396,96; 389,72; 466; 495; 527	50,23	20,12	27,087	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
15	363,79; 389,72; 487; 519,8	36,98	30,15	28,343	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
16	363,79; 386; 487; 519,8	35,65	38,79	29,440	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
17	369,9; 384,78; 487; 518	20,54	78,45	35,360	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017
18	446; 472; 502	-	-	36,667	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995



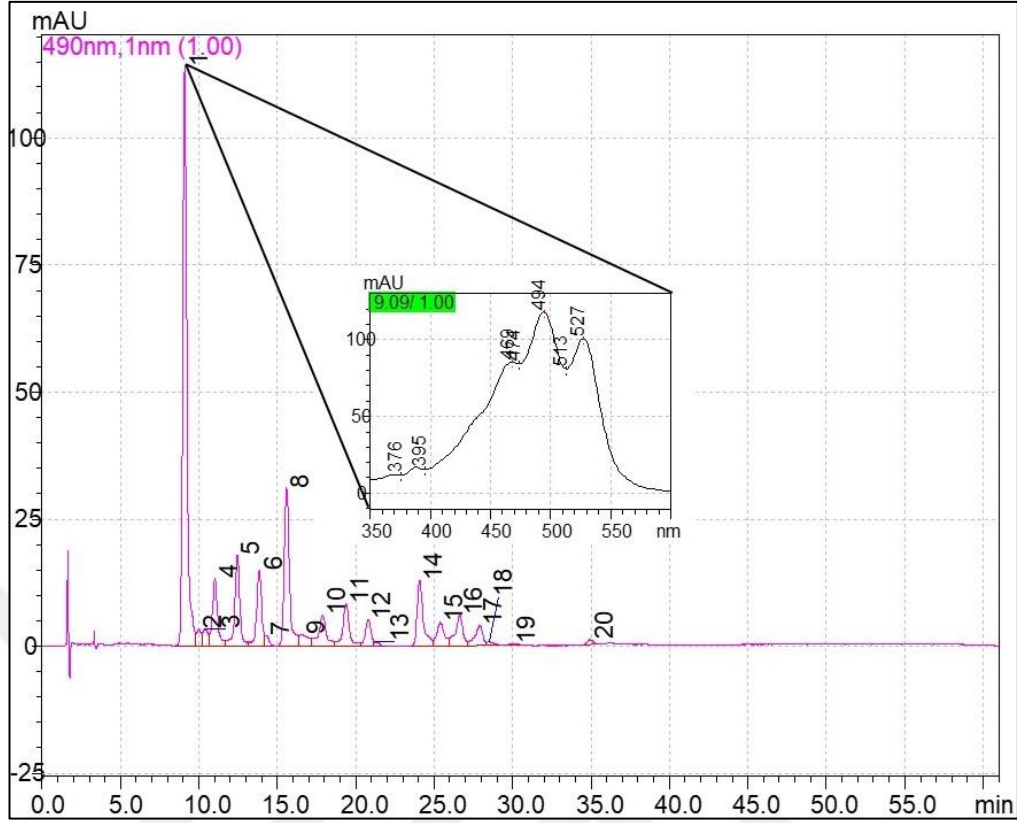
Şekil 4.40 *Haloarcularia salaria* HST01-2R' dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.8 *Haloarcularia salaria* HST01-2R karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369,96; 387; 467; 495; 527	52,62	16,08	9,029	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	367; 384; 485; 517	18,11	38,22	9,943	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	367; 383; 488; 517	13,19	57,27	10,360	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	368; 384; 491; 523	47,02	23,55	10,950	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	368; 386; 488; 519	47,24	34,95	12,376	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 488; 519	35,85	83,12	13,757	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	368; 384; 490; 523	28,50	107,63	14,208	13 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
8	369; 387; 495; 527	47,25	19,27	15,509	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	367; 384; 482; 514	19,84	40,47	16,456	3'4'DihidroM ABR	Ronnekleiv vd., 1995
10	367; 387; 490; 523	41,61	26,24	17,747	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
11	368; 386; 486; 519	43,21	53,39	19,222	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017

Tablo 4.8'in devamı

12	368; 384; 486; 518	33,87	87,44	20,623	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
13	366; 384; 486; 523	15,91	99,19	21,115	-	
14	387; 493; 527	51,53	23,85	23,844	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
15	367; 384; 485; 513	20,42	42,75	24,288	Haloksantin	Ronnekleiv, 1994
16	387; 486; 519	18,20	32,50	25,150	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
17	387; 485; 513	20,17	47,49	25,952	Haloksantin	Ronnekleiv, 1994
18	387; 485; 518	33,95	39,64	26,387	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
19	387; 485; 513	5,26	75,96	27,637	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017
20	444; 471; 501	-	-	28,294	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
21	444; 471; 501 (439; 467; 496)	-	-	29,743	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
22	439; 467; 496	-	-	30,722	$\gamma$ karoten izomeri	Asker vd., 2002
23	392; 485; 514	41,07	24,96	34,631	IDR	Ronnekleiv vd., 1995
24	448; 475; 506	-	-	35,339	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
25	446; 472; 504	-	-	35,919	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995



Şekil 4.41 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.9 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316 karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369; 388; 468; 495; 527	53,37	14,21	9,083	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	383; 461; 487; 517	17,24	33,30	9,984	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	383; 461; 487; 517	14,31	61,89	10,397	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	386; 461; 487; 523	47,94	22,35	11,021	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	369; 386; 461; 487; 519	43,85	32,55	12,448	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 461; 487; 519	32,4	82,72	13,839	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	369,96; 383/386; 461; 487; 523	16,77	90,50	14,298	13 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
8	369; 389; 469; 495; 527	47,69	18,88	15,589	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	369; 389; 456; 487; 514	40,33	38,06	16,567	3'4'DihidroMA BR	Ronnekleiv vd., 1995
10	363,79; 383,54; 461; 487; 523	34,33	27,53	17,884	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
11	369; 386; 461; 487; 519	38,14	35,84	19,374	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017

Tablo 4.9'un devamı

12	368; 386; 461; 487; 519,8	25,35	80,18	20,804	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
13	363; 383; 487; 523	7,69	75,99	21,163	-	
14	396,96; 389,72; 466; 495; 527	49,21	22,78	24,067	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
15	363,79; 389,72; 487; 519,8	34,29	32,30	25,392	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
16	363,79; 386; 487; 519,8	30,35	38,01	26,621	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
17	369,9; 384,78; 487; 518	16,50	77,05	27,9	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017
18	435; 461; 487	-	-	28,521	$\beta$ karoten izomeri	Britton,1985
19	435; 461; 487	-	-	29,984	$\beta$ karoten izomeri	Britton,1985
20	435; 461; 487	-	-	34,928	$\beta$ karoten izomeri	Britton,1985



Şekil 4.42 *Haloterrigena thermotolerans* PR5'dan elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.10 *Haloterrigena thermotolerans* PR5 karotenoid karakteristiği

Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369; 387; 467; 495; 527	56,55	12,56	11,018	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	368; 387; 460; 487; 516	42,87	35,30	11,864	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	366; 383; 461; 487; 516	22,21	76,26	12,21	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	368; 386; 465; 490; 523	55,76	14,53	12,895	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	368; 386; 461; 487; 519	47,56	34,12	14,188	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 460; 487; 519	36,54	80,25	15,483	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	371; 388; 468; 496; 526	47,36	18,75	15,895	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
8	365; 387; 490; 523	39,85	45,23	19,195	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	368; 387; 460; 521	45,26	40,73	20,56	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017
10	368; 386; 459; 488; 519	35,84	87,90	21,926	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017
11	373; 387; 468,96; 495; 527	50,20	25,68	24,942	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
12	366; 387; 464; 488; 519	25,63	35,96	26,285	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
13	368; 387; 467; 488,8; 518,56	42,60	40,96	27,462	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
14	368; 387; 487; 518	27,56	82,63	28,655	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017



Şekil 4.43 *Haloarcula japonica* JCM 7785’den elde edilen karotenoid ekstraktına ait HPLC kromatogramı ve all-trans bakterioruberin pikine ait spektrum taraması

Tablo 4.11 *Haloarcula japonica* JCM 7785 karotenoid karakteristiği

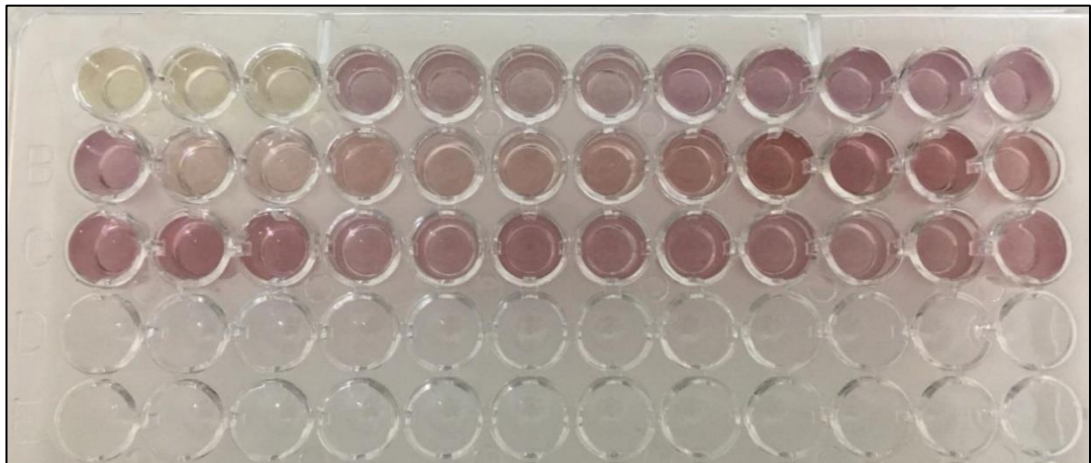
Pik	ABS Maksimum (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Rt	Karotenoid	Referans
1	369; 387; 467; 495; 527	51,68	16,96	9,026	All E BR	Mandelli vd., 2012
2	368; 387; 460; 487; 516	26,87	35,39	9,956	9Z, 9'Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
3	366; 383; 461; 487; 516	20,91	59,23	10,359	15 Z BR	Squillaci vd., 2017
4	368; 386; 465; 490; 523	45,73	23,35	10,950	5 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
5	368; 386; 461; 487; 519,8	47,39	33,16	12,383	9 Z BR	Squillaci vd., 2017
6	368; 384; 460; 487; 519,8	35,71	84,42	13,767	13 Z BR	Squillaci vd., 2017
7	368; 384; 464; 490; 523	25,69	108,76	14,220	13 Z BR	Ronnekleiv vd., 1995
8	371; 388; 468; 496; 526	45,55	20,58	15,519	All E MABR	Ronnekleiv vd., 1995
9	387; 482; 512	25,67	39,75	16,494	3'4'DihidroM ABR	Ronnekleiv vd., 1995
10	365; 387; 490; 523	40,29	38,68	17,771	5 Z MABR	Ronnekleiv vd., 1995
11	368; 387; 460; 521	43,62	39,37	19,237	9 Z MABR	Squillaci vd., 2017
12	368; 386; 459; 488; 519	36,48	90,07	20,632	13 Z MABR	Squillaci vd., 2017

Tablo 4.11'in devamı

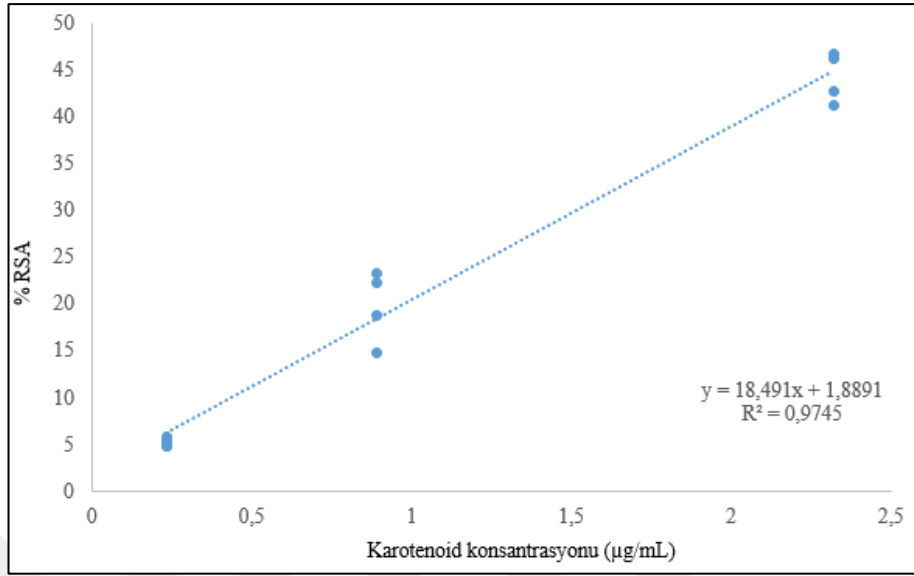
13	373; 387; 468,96; 495; 527	51,05	23,58	23,869	All E BABR	Ronnekleiv vd., 1995
14	366; 387; 464; 488; 519	22,51	32,86	25,182	9Z, 9Z' BABR	Ronnekleiv vd., 1995
15	368; 387; 467; 488,8; 518,56	40,54	41,96	26,412	9Z BABR	Squillaci vd., 2017
16	368; 387; 487; 518	28,99	86	27,683	13 Z BABR	Squillaci vd., 2017
17	445; 471; 502	25,80	-	29,784	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
18	387; 485; 512	31,05	46,59	34,661	IDR	Ronnekleiv vd., 1995
19	445; 472; 502	25,95	-	35,943	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
20	445; 467; 501	28,36	-	45,68	Likopen izomeri	Ronnekleiv vd., 1995
21	441; 464; 486	-	-	46,875	-	
22	437; 464; 485	-	-	54,885	-	

#### 4.4 Türlerle Ait Karotenoidlerin Antioksidan Aktiviteleri

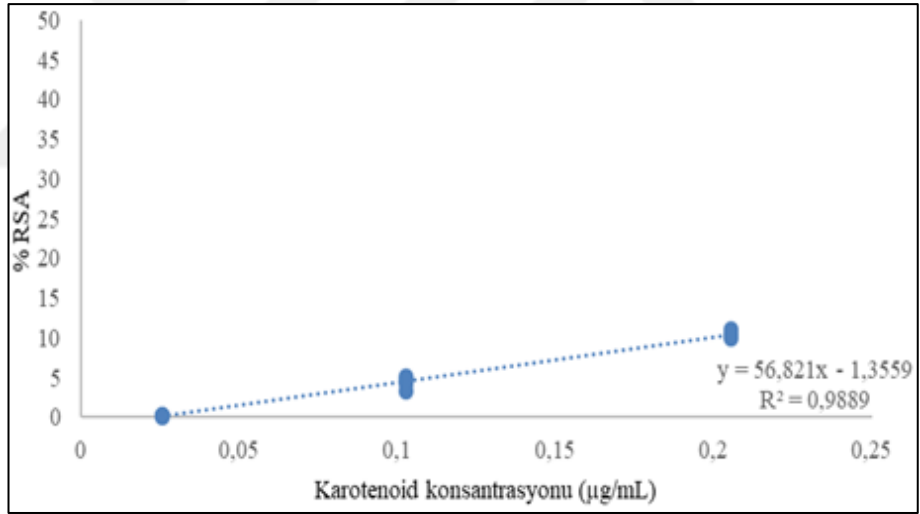
*H. lipolyticum* JCM 13559, *H. sodomense* JCM 8880, *H. californiense* FV 22B20, *H. salaria* HST01 2R, *H. chaoviator* DSM 19316, *H. thermotolerans* PR5 ve *H. japonica* JCM 7785'dan ekstrakte edilen karotenoidlerin antioksidan aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmada elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla; 2,601 µg/mL; 0,904 µg/mL; 1,007 µg/mL; 1,927 µg/mL; 1,402 µg/mL; 1,284 µg/mL ve 1,474 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Karotenoid ekstraktlarının % RSA'ları Şekil 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50'de verilmiştir.



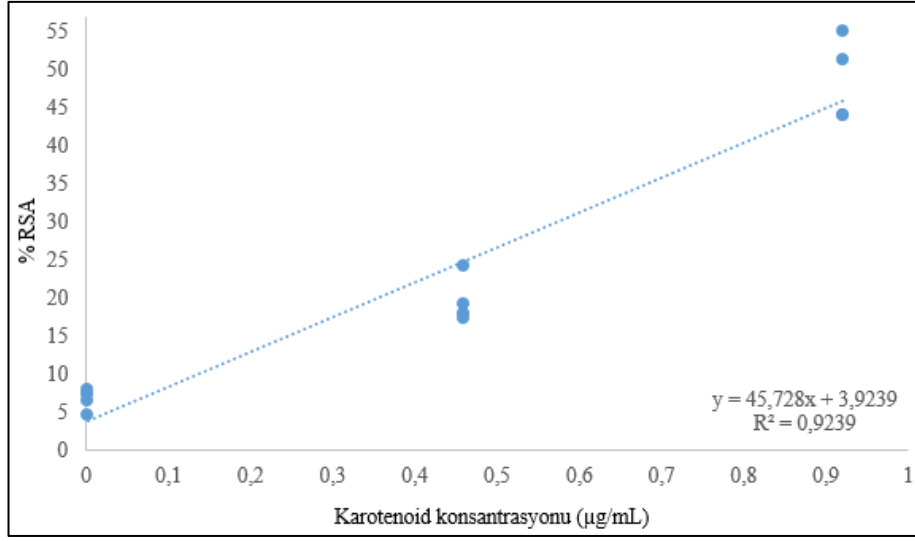
Şekil 4.44 96 U plakalda DPPH reaksiyonu



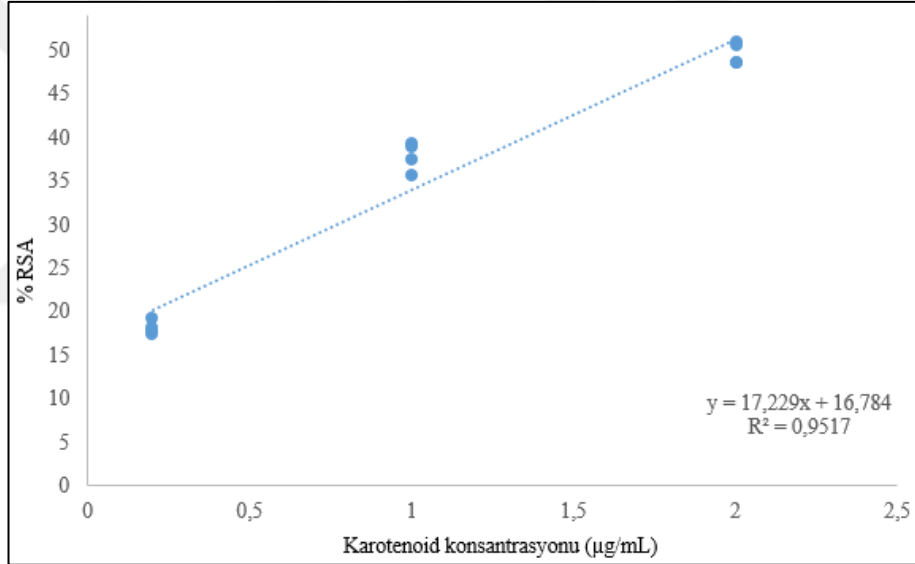
Şekil 4.45 *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559'a ait % RSA grafiği



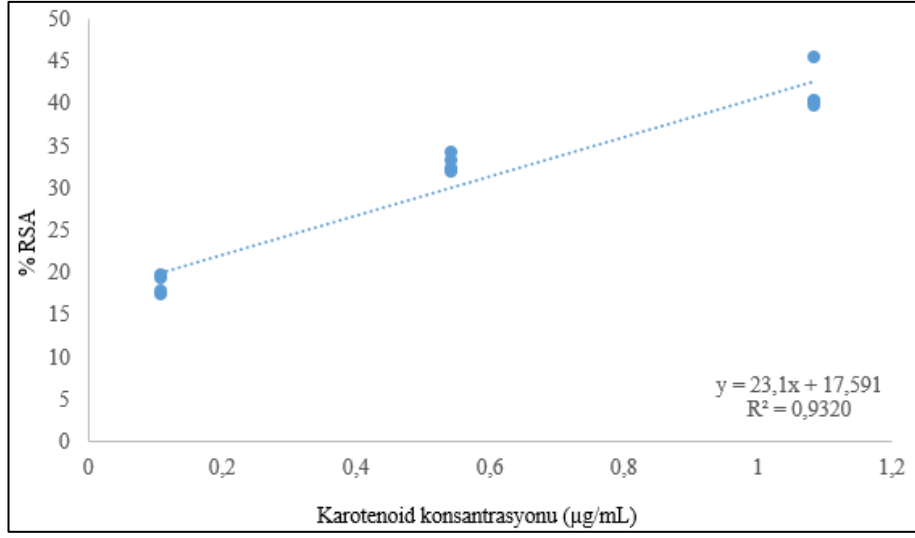
Şekil 4.46 *Halorubrum sodomense* JCM 8880'e ait % RSA grafiği



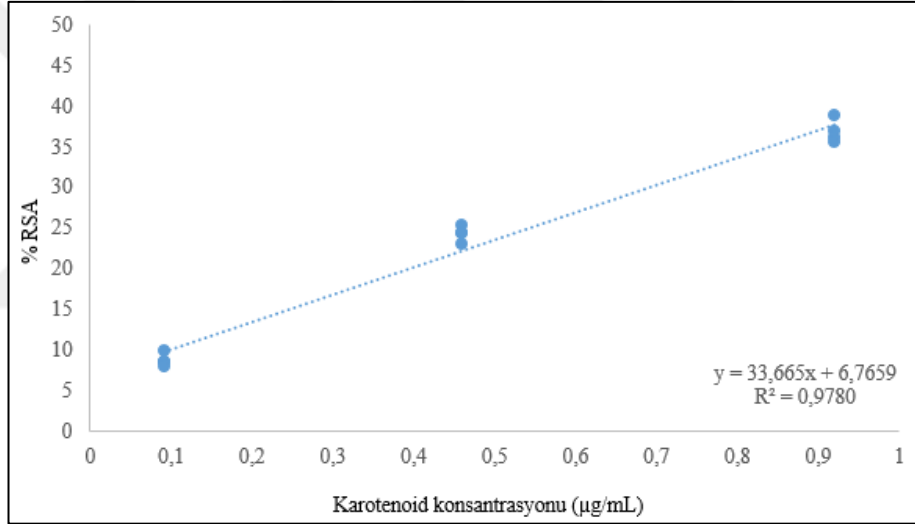
Şekil 4.47 *Halorubrum californiense* FV22B20 'e ait % RSA grafiği



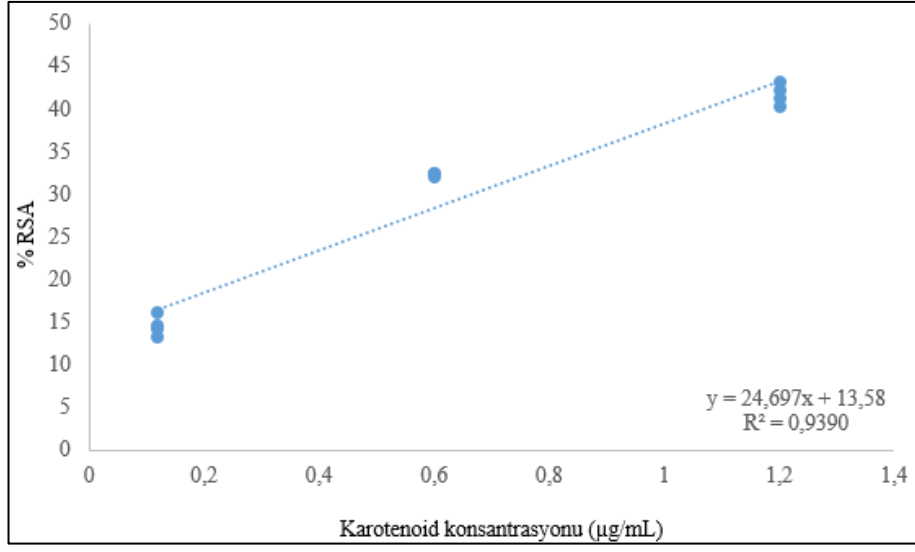
Şekil 4.48 *Haloarcula salaria* HST01-2R'a ait % RSA grafiği



Şekil 4.49 *Halorubrum chaoviator* DSM 19316'a ait % RSA grafiği



Şekil 4.50 *Haloterrigena thermotolerans* PR5'e ait % RSA grafiği



Şekil 4.51 *Haloarcula japonica* JCM 7785'e ait % RSA grafiği

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ankara, Konya ve Aksaray illerinin sınırları arasında bulunan Tuz Gölü'nün 3 noktasından alınan tuz numunelerinden 7 farklı halofilik arke türünün izolasyonu gerçekleştirilmiş; izolatların biyokimyasal testleri, antibiyotik duyarlılık testleri, nitel hidrolitik enzim testleri, iki boyutlu (SEM) ve üç boyutlu (AFM) görüntülemeleri ve üremeleri için gerekli optimum ortam koşullarının tespitinin yanı sıra yağ asidi metil ester analizleriyle kemotaksonomik, 16S rRNA dizi analiziyle filogenetik olarak identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Koloni renkleri pembeden kırmızıya değişiklik gösteren türler sıvı besiyerinde büyütülerek karotenoidleri ekstrakte edilip, sahip oldukları total karotenoid miktarları ve bu karotenoidlerin çeşitleri TLC, HPLC, LC-MS/MS ve UV-VIS spektral analizleriyle tespit edilmiştir. Ayrıca, türlerden elde edilen karotenoid ekstraktları DPPH yöntemiyle antioksidan analizlerine tabi tutulmuş ve sahip oldukları radikal süpürme aktiviteleri belirlenmiştir.

Çalışmada farklı besiyeri denemeleri yapıldıktan sonra halofilik arkelerin gelişimine en uygun besiyeri olarak MAM JCM 168 besiyeri seçilmiş ve kültürler çalışma süresince analizler için sıvı ve katı besiyerlerine inokulasyonlar yapılarak arkeler üretilmiştir. Uzun süreli saklama için ise suşlar gliserolle muamele edilerek derin dondurucuya kaldırılmıştır (Xin vd., 2000).

Tuz Gölü'nün değişik noktalarından temin edilen tuz örneklerinden izole edilen farklı pigmentasyona sahip koloniler, arkeal türlerin tespit edilmesi amacıyla antibiyogram testine tabi tutulmuştur.

Arkelerin tespitinde antibiyotik testleri sıklıkla kullanılan erişilebilirliği kolay yöntemler arasındadır. Arkelerin antibiyotiklere verdiği cevaplar üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Albuquerque vd. (2012), halofilik arke izolatlarının basitrasin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğunu tespit etmiş, Holmes ve Dyall-Smith (1991) ise halofilik arkelerin büyük çoğunluğunun basitrasin ile birlikte novobiyosin antibiyotiklerine karşı da duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Kaya tuzundan izole

edilen ve halofilik bir arke türü olan *Halococcus salsus* ile ilgili yapılan bir çalışmada, novobiyosin ve basitrasin antibiyotiklerine karşı duyarlı; amfisilin, kanamisin, penisilin G, vankomisin, neomisin, siproflaksin, kloramfenikol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2018). Çalışmada kullanılan arke izolatlarının mevcut literatür çalışmalarına benzer olarak; novobiyosin ve basitrasin antibiyotiklerine karşı duyarlı, sefotaksim, penisilin G, amfisilin, vankomisin, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı dirençli bulunduğu görülmüştür. Bu nedenle izolatların Arke domainine dahil oldukları öngörülmüş ve halofilik arkelerin antibiyotik duyarlılıklarıyla ilgili elde edilen veriler literatürle uyumlu bulunmuştur.

Arke izolatlarının DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bakteri-arke ayrımı polimeraz zincir reaksiyonuyla da desteklenmiştir. Arke domainine ait olan türlerin 16S rRNA geni dizi analizi yapılmış ve türlerin filogenetik olarak benzer olduğu türler ve benzerlik oranları tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Tuz Gölü'nün Aksaray sınırları içerisinde bulunan kıyılarından (Eskil bölgesi) alınan tuz örneklerinden izole edilmiş olan *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV\_22B20 türlerinin ilk kez izole edilip kültüre alındığı yerlerin sırasıyla Xin-Yang Tuz Gölü- Çin (Cui vd., 2006); Lut Gölü-İsrail (Oren, 1983); solar tuz tesisi, Kaliforniya- Amerika (Pesenti vd., 2008) olduğu görülmektedir. Türlerin daha önce izole edildikleri habitatlara bakıldığında her izolasyon bölgesinin hipersalin bölgeler olduğu dikkat çekmektedir. Dolayısıyla bu türlerin tuz gölü ekosistemi türleri arasında olduğu, göçmen kuşlar ve benzeri farklı yollarla kaynaklar arasında transfer yoluyla yayılım gösterdiği düşünülmektedir. Tuzyaka'dan izole edilmiş olan *Haloarcula salaria* HST01-2R, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316 ve *Haloterrigena thermotolerans* PR5 türleri ilk kez sırasıyla; Thai balık sosundan (Namwong vd., 2011); Baja-Kaliforniya, tuz göleti-Avustralya, Naksos Adası- Yunanistan (Mancinelli vd., 2009) ve Porto Riko (Montalvo-Rodriguez vd., 2000)'dan izole edilmişken, çalışmada Şereflikoçhisar'dan izole edilmiş olan *Haloarcula japonica* JCM 7785, ilk kez Takashina vd. (1990) tarafından Japonya'da tuzlu topraklardan izole edilmiştir.

Önceki çalışmalarda bildirildiği üzere, bu çalışmada izole edilen türlerin yurtdışında çeşitli bölgelerde yapılan çalışmalarda da tuz göletleri, tuzlu topraklar, tuzlu soslara ve tuz tesisleri gibi yüksek konsantrasyonda tuz içeren ortamlardan izole edildikleri görülmüştür. Ülkemizdeki tuz kaynaklarında yapılan çalışmalarda ise *H. thermotolerans*'ın bu çalışmada türlerin izole edildiği Tuz Gölü ile aynı bölgede bulunan Seyfe Gölü'nden de izole edildiği bildirilmiştir (Özcan vd., 2007). Kemp vd. (2018), öne sürdükleri hipotezde tuz göllerindeki mikrobiyotanın göçmen kuşların hareketliliğiyle kaynaklar arasında taşınabileceğini rapor etmişlerdir. Her iki gölde de *H. thermotolerans*'ın tespit edilmesinin hipotezde öne sürülen yolla gerçekleştiği düşünülmektedir. Tuz Gölü'nde yapılan diğer bir çalışmada ise *H. thermotolerans* (benzerlik oranı: %91), *H. sodomense* (benzerlik oranı: %97) (Mutlu, 2006), *H. salaria* (benzerlik oranı: %94) (İspirli vd., 2019) ve *H. californiense* (benzerlik oranı: %92) (Mutlu vd., 2008) türleri rapor edilmiştir. Gaziantep kaynaklı tuzlanmış ham derilerde de *H. thermotolerans*'ın tespit edildiği bildirilmiştir (Bilgi, 2012). Bu durumun deri işleme sürecinde kullanılan tuzların mikrobiyal yükünden kaynaklandığı bilinmektedir. Yapılan literatür taraması neticesinde bu çalışmada elde edilen *H. lipolyticum*, *H. japonica* ve *H. chaoviator* türlerinin ülkemizde daha önce izole ve tanımlanmadığını bildirir bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu çalışma bu bakımdan ilk kayıttır.

Çalışmada tüm izolatların Gram boyamaları sonucunda Gram negatif özellik gösterdikleri tespit edilmiştir. Dussault (1955) halofilik arkelerin çoğunlukla gram negatif, nadiren gram değişken boyandığını belirtirken, halofilik arkelerle yapılan çalışmaların pek çoğu bu veriyi destekler niteliktedir (Rodriguez-Valera vd., 1980; Pesenti vd., 2008).

Halofilik arkelerin büyüme gösterdiği sıcaklık aralıklarının tespit edildiği çalışmalarda, çoğu halofilik arkenin 35-50 °C arası sıcaklıkta optimum gelişim gösterdikleri belirtilmiştir (Shand ve Perez, 1999). *Halorubrum californiense*'nin identifikasyonu ile ilgili yapılan çalışmada ise türün 25-42 °C arasında üreme gösterdiği rapor edilmiştir (Pesenti vd., 2008). Montalvo-Rodriguez vd. (2000) *Haloterrigena thermotolerans* türünün 50 °C' de optimum üreme gösterdiğini, Takashina vd. (1990) *Haloarcula japonica* için optimum üreme gösterdiği sıcaklık

aralığının 42-45 °C olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada izolatların 35-40 °C arasında optimum üreme gösterdikleri; *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV\_22B20, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316, *Haloterrigena thermotolerans* PR5'nin 30-50 °C arasında; *Haloarcula salaria* HST01-2R ve *Haloarcula japonica* JCM 7785'nin ise 25-50 °C aralığında gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Halofilik arkelerin aynı zamanda termofilik özellik gösterdikleri de bilinmektedir. Bu sebeple çalışmada elde edilen veriler literatürle kıyaslandığında benzer sonuçlara ulaşıldığı izole edilen halofilik arke türlerinin termofilik/termotolerans özellik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Türlerin NaCl toleransının belirlendiği testte; *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Haloterrigena thermotolerans* PR5'in % 10-30 NaCl içeren besiyerinde; *Halorubrum californiense* FV 22B20, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316 ve *Haloarcula salaria* HST01-2R'nin ise % 15-30 NaCl içeren besiyerinde gelişim gösterdikleri saptanmıştır. *Haloterrigena thermotolerans*'ın gelişme gösterdiği optimum tuz konsantrasyonunun farklı çalışmalarda % 11,7-23,37 aralığında olduğu belirtilmiştir (Montalvo-Rodriguez vd., 2000; Bilgi, 2012). Bu çalışmada ise *Haloterrigena thermotolerans*'ın daha geniş bir aralık olan % 10-30 NaCl içeren besiyerinde gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. *Haloarcula japonica* ve *Halorubrum californiense*'nin % 14,61-29,22 aralığında; *Halorubrum lipolyticum*'un % 9,93-28,05 aralığında NaCl içeren besiyerinde gelişim gösterdiği farklı çalışmalarda tespit edilmiştir (Takashina vd., 1990; Cui vd., 2006; Pesenti vd., 2008). Literatürde bildirilen değerlerin, çalışmada elde edilen verilerle büyük ölçekte örtüştüğü görülmüştür. Oren (1983) *Halorubrum sodomense*'nin; Takashina vd. (1990) *Haloarcula japonica*'nın; Montalvo-Rodriguez vd. (2000) ise *Haloterrigena thermotolerans*'ın gelişim gösterebildikleri optimum pH değerinin 7-7,5 olduğunu; Cui vd. (2006) *Halorubrum lipolyticum*'un 7,5; Namwong vd. (2011) ise *Haloarcula salaria*'nın 7 pH değerinde optimum üreme gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bahsi geçen türlerin bu çalışmada da benzer pH değerlerinde üredikleri saptanmıştır.

*Halorubrum californiense* ve *Halorubrum chaoviator*'un ise 7-8,5 pH değerlerinde optimum gelişim gösterdikleri (Pesenti vd., 2008; Mancinelli vd., 2009)

belirtmesine rağmen, elde ettiğimiz izolatların gelişim gösterdiği en yüksek pH değeri 7 olarak saptanmıştır. Bu durumun çalışmalarda kullanılan pH metre cihazlarının kalibrasyon farklılığı ve/veya türlerin izole edildiği saha koşullarının çeşitliliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada *Halorubrum chaoviator* ve *Haloterrigena thermotolerans*'a ait oksidaz ve katalaz testi; *Halorubrum lipolyticum* ve *Haloarcula japonica*'nın oksidaz testi ve *Haloarcula salaria*'nın katalaz testi sonuçlarının literatürde elde edilen test sonuçlarıyla desteklendiği (Cui vd., 2006; Pesenti vd., 2008; Mancinelli vd., 2009), diğer sonuçların ise farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Türlere uygulanan indol testi sonuçlarına göre *H. lipolyticum*, *H. sodomense*, *H. salaria*, *H. chaoviator* ve *H. japonica*'nın Pesenti vd. (2006) ve Takashina vd. (1990) ile uyumlu olduğu fakat *H. californiense* ve *H. thermotolerans*'a ait sonuçların Montalvo-Rodriguez vd. (2000) ve Pesenti vd. (2008)'nin bildirmiş olduğu sonuçlardan farklı olduğu bulunmuştur.

*H. sodomense* ve *H. japonica* türleri nitrattan gaz üretmekte, *H. thermotolerans*'a türü ise nitrattan gaz üretmemektedir (Montalvo-Rodriguez vd., 2000; Pesenti vd., 2008). *H. sodomense* ve *H. thermotolerans* türlerinden elde edilen sonuçlar mevcut literatür ile aynı olup bu çalışmada *H. japonica* türünün mevcut literatürden farklı olarak nitrattan gaz üretmediği bulunmuştur. Bu durum türlerin verdiği biyokimyasal reaksiyonlardaki farklılıkların; yaşadıkları çevre ve çevreye bağlı abiyotik faktörler, besin elementlerinin durumu ve bunların sonucunda ortaya çıkabilecek biyotik faktörlere bağlı çeşitli adaptasyon ve/veya mutasyon faktörlerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Söz konusu üç tür dışında kalan izole edilen diğer dört türün nitrattan gaz üretimi ile ilgili mevcut çalışmaya rastlanılamamıştır.

Nitrata nitrite indirgeme testi sonuçlarına göre *H. salaria* ve *H. thermotolerans*'a ait verilerin literatürdeki verilerden farklılık gösterdiği tespit edilmiş olup diğer türlere ait nitrata nitrite indirgeme sonuçları önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Takashina vd., 1990; Montalvo-Rodriguez vd., 2000; Cui vd., 2006; Pesenti vd., 2008).

Türlerin tek karbon kaynağında üreme potansiyellerinin tespitinde glikoz, laktoz, maltoz, fruktoz, mannitol, trehaloz, galaktoz ve sakkaroz şekerleri kullanılmış olup, türlere ait tek karbon kaynağında üreme sonuçları literatürdeki verilerle uyumlu bulunmuştur (Takashina vd., 1990; Montalvo-Rodriguez vd., 2000; Cui vd., 2006; Pesenti vd., 2008; Mancinelli vd., 2009; Namwong vd., 2011).

Çalışmada *H. californiense*, *H. salaria*, *H. chaoviator*, *H. thermotolerans* ve *H. japonica* türlerinin jelatinaz enzimleri aracılığıyla besiyerine ilave edilmiş jelatini parçaladıkları tespit edilmiştir. Nişasta hidrolizi yalnızca *H. salaria* türünde gözlemlenmiş ve türün amilaz enzimi ürettiği saptanmıştır. *H. sodomense*, *H. californiense*, *H. thermotolerans* ve *H. japonica* türlerinin kazeinaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca *H. californiense*, *H. salaria*, *H. thermotolerans* ve *H. japonica*'nın esteraz enzimleri salgılayarak Tween 80'i parçaladıkları tespit edilmiştir. Endüstrinin pek çok alanında kullanılan enzimler günümüzde büyük oranda mikroorganizma kaynaklıdır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin düşük maliyetle üretilebilmeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere nazaran daha stabil olmaları tercih edilme sebeplerindedir (Kıran vd., 2006). Ekstrem mikroorganizmalardan elde edilen ve ekstremozimler olarak adlandırılan enzimler; tekstil, farmasötik, deterjan, gıda ve tarım kimyasalları gibi pek çok endüstride kimyasal katalizörlerin yerine tercih edilmektedir (Eichler, 2001; Mehta vd., 2006). Esterazlar deterjan, kağıt, kozmetik ve gıda katkısı olarak (Meghji vd., 1990); proteazlar tekstil, gıda ve içecek endüstrisi, ekmek ve pasta ürünleri, farmasötik ve tıbbi uygulamalar ile atıkların temizlenmesinde (Kumar ve Takagi, 1999); jelatinazlar yem ve gıda katkısı uygulamalarında (Birbir ve Sesal, 2003); amilazlar ise deterjan, gıda, kağıt ve farmasötik endüstrilerinde (Sivaramkrishnan vd., 2006) kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada türlerin sahip olduğu esteraz, amilaz, kazeinaz ve jelatinaz enzim aktivite sonuçları göz önünde bulundurulduğunda daha sonra yapılacak olan çalışmalarla türlere ait enzim kapasitelerinin nicel olarak incelenmesinin türlerin endüstriyel potansiyellerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada modifiye edilerek kullanılan Squillaci vd., (2017) karatenoid ekstraksiyon metodunda araştırmacılar ilk metanol ekstraksiyonu sonucunda UV-VIS

spektrofotometre spektrum ölçümünde karakteristik bakterioruberin spektrumu elde edemediklerinden ikinci bir ekstraksiyon yaptıklarını bildirmişlerdir. İlk ekstraksiyon sonucunda ekstraktın açık pembe, biyokütlenin koyu pembe; ikinci ekstraksiyon sonucunda ise ekstraktın koyu pembe, biyokütlenin ise renksiz olması karotenoid dışındaki içeriklerin ikinci ekstraksiyonda giderildiğinin göstergesidir.

Ancak bu çalışmada ekstraksiyon işleminden önce hücre pelleti PBS ile yıkanmış ve ilk ekstraksiyon sonrasında ekstrakt koyu pembe olarak elde edilirken, hücre pelletinde tam renk giderimi elde edilmiş, ayrıca karakteristik bakterioruberin spektrumu elde edilmiştir. İlk ekstraksiyonda sonuç alınabilmesinin nedeni olarak, ekstraksiyon öncesi PBS ile yıkama sonucunda kontaminant protein kalıntılarının giderilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu sayede ilk ekstraksiyon sonucunda ortaya çıkan karotenoidlerin kaybı da engellenmiştir.

Karotenoid ekstraksiyonu gerçekleştirilen önceki çalışmalarda ise, ekstrem halofilik arkelere olan *Halobacterium salinarum*, *Haloarcula hispanica*, *Haloferax mediterranei*, *Haloferax alexandrius* ile *Halorubrum sp.* TBZ126 türlerinden 0,7 ila 11,28 µg/mL toplam karotenoid elde edilmiş olup (Calo vd., 1995; Yachai, 2009; Naziri vd., 2014), *H. japonica* türünden ise 335 µg/g toplam karotenoid elde edilmiştir (Yatsunami vd., 2014). Bu çalışmada izolasyon ve identifikasyonu yapılan bu 7 türden 2,05 ila 23,16 µg/mL karotenoid ekstrakte edilmiştir. Bu sonuçlar diğer diğer çalışmalardaki sonuçlardan daha yüksektir. Bu farklılıkların çalışmada kullanılan ekstraksiyon metodundaki modifikasyonlardan, tür farklılıklarından ve özellikle karotenoid ekstraksiyonun tek adımda yüksek verimle gerçekleştirildiğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen karotenoid türlerinin kromatografik yöntemlerle kıyaslanabileceği referans standart maddelerin mevcut olmaması ve kütle spektrometrik analizlerin izomerler arası farklılığı ortaya koymada yetersiz kalması sebebiyle türlerin karotenoid içeriklerinin belirlenmesinde spektrum temelli analizler olan spektral ince yapı, cis pik intensiti analizleri ve daha önce rapor edilmiş veriler birlikte değerlendirilmiştir (Ronnekleiv ve Liaaen Jensen, 1992; Asker vd., 2002; Mandelli vd., 2012; Squillaci vd., 2017).

All-trans'ı temsil eden maksimum absorbans noktasından 3-11 nm arası kayma cis izomerlerinin varlığının tespitinde kullanılmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre; all-trans bakterioruberin (BR), tüm türler için majör karotenoid olarak tespit edilmiş olup, monoanhidrobakterioruberin (MABR), bisanhidrobakterioruberin (BABR) ve bunların izomerleri de kullanılan yöntemlerin limitleri dahilinde tespit edilmiştir. Türlerden ekstrakte edilen karotenoid kompleksleri içerisinde bakterioruberin türevleri ve izomerleri haricinde düşük miktarlarda likopen,  $\beta$ -karoten ve  $\gamma$  karoten izomerleri gibi farklı karotenoidlere de rastlanmıştır.

Yapılan çalışmada *H. lipolyticum*'dan ekstrakte edilen karotenoidlerde majör bakterioruberin izomerlerinin yanısıra yine bir C<sub>50</sub> karotenoidi olan haloksantin, ayrıca C<sub>40</sub> karotenoidleri olan likopen ve  $\gamma$  karoten izomerleri de tespit edilmiştir. Türe ait yoğun kırmızı pigmentin bu ilave karotenoidlerden özellikle koyu kırmızı renge sahip olduğu bilinen likopen kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *H. sodomense* ve *H. californiense*'de likopen; *H. salaria*'da haloksantin, 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopin (IDR), likopen ve  $\gamma$ -karotene ve ayrıca *H. chaoviator*'de  $\beta$ -karoten; *H. japonica*'da likopen ve bir C<sub>45</sub> karotenoidi olan IDR'ye rastlanmıştır.

*Halorubrum sp.* TBZ126'nın karotenoid üretiminin analiz edildiği bir çalışmada kromatografik ve kütle spektrometrik analizlerle bakterioruberin, likopen ve  $\beta$ -karoten karotenoidleri tespit edilmiş ancak tespit edilen karotenoidlerin özellikle BR izomerleriyle ilgili ayrıntılı veriye rastlanmamıştır (Naziri vd., 2014). İzole edilen 4 türün *Halorubrum* cinsine ait olduğu göz önünde bulundurulduğunda benzer sonuçlar elde edildiği söylenebilmekle beraber, bu çalışmada izomerlerin de tespit edilmiş olması cinse ait türlerin karotenoid içeriklerini önemli ölçüde aydınlatmaktadır.

Yatsunami vd., (2014) *H. japonica*'nın karotenoid identifikasyonunda; BR, MABR, BABR, IDR, likopen ve fitoeni tespit etmiş ve bunların HPLC kromatogramında 4 adet pik ile saptandığını bildirmişlerdir. Benzer olarak bu çalışmada da BR, MABR, BABR ve bunların izomerlerinin yanı sıra likopen ve IDR saptanmıştır. Elde edilen bu karotenoidlerin HPLC kromatogramında 22 adet pik ile belirlenmiş olması çalışmada izole ve tanımlanmış türlerin karotenoid kapasitesinin üstünlüğünü göstermektedir.

*H. lipolyticum*, *H. sodomense*, *H. californiense*, *H. salaria*, *H. chaoviator*, *H. thermotolerans* ve *H. japonica*'dan ekstrakte edilen karotenoidlerin 60 mM DPPH giderimi için antioksidan aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmada elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla; 2,601 µg/mL; 0,904 µg/mL; 1,007 µg/mL; 1,927 µg/mL; 1,402 µg/mL; 1,284 µg/mL ve 1,474 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Türlerden ekstrakte edilen karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri arasındaki fark önemsiz bulunmakla beraber, en yüksek antioksidan aktivitenin en düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olan *H. sodomense* türünden ekstrakte edilen karotenoidlerde olduğu ölçümlerle belirlenmiştir.

*Haloterrigena turkmenica*'nın karotenoid içeriklerinin tespit edilmesi ve karotenoidlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışmada 100 mM DPPH giderimi için IC<sub>50</sub> değeri 4,49 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Squillaci vd., 2017). Bu çalışmada türlerden ekstrakte edilen karotenoidlerin antioksidan aktivitesinin tespitinde 60 mM DPPH radikali kullanılmıştır. IC<sub>50</sub> değerinde farklılığın kullanılan radikalın molaritesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yachai (2009), ekstrem halofilik bir arke türü olan *Halobacterium salinarum*'dan ekstrakte edilen bakterioruberinin antioksidan aktivitesini belirlediği çalışmasında, türden izole ettiği karotenoidin artan konsantrasyonuyla birlikte DPPH radikal süpürme aktivitesinin de arttığını tespit etmiştir. Ayrıca bakterioruberine ait antioksidan aktiviteyi; lutein, astaksantin, β-karoten ve likopenin antioksidan aktiviteleriyle de kıyaslamıştır. Çalışmanın sonucuna göre en düşük IC<sub>50</sub> değerine bir diğer deyişle en yüksek antioksidan aktiviteye bakterioruberinin sahip olduğunu belirlemiş ve bu verinin sebebini bakterioruberinin 13 çift konjuge çift bağa sahip olmasıyla ilişkilendirmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda izole edilen türlerden ekstrakte edilen majör karotenoidin bakterioruberin olması elde edilen yüksek antioksidan aktiviteyi açıklar niteliktedir. Ayrıca artan karotenoid konsantrasyonuyla birlikte antioksidan aktivitenin de artış göstermesi çalışmaya ait verileri destekler niteliktedir.

*Haloarcula japonica*'nın karotenoidlerinin antioksidan aktivitesinin belirlendiği çalışmada majör karotenoid olarak bakterioruberin tespit edilmiş ve bakterioruberinin antioksidan aktivitesini  $\beta$ -karoten ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda hesaplamalı verileri destekler şekilde bakterioruberinin  $\beta$ -karotenden çok daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit edilmiştir (Yatsunami vd., 2014).

Çalışmamızda tüm türlerde majör karotenoid olarak bakterioruberin tespit edilmiş olması türlerin antioksidan aktivitelerinin endüstriyel ölçekli olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Arkelerde yağ asitleri ökaryot ve prokaryotlarda alışlagelmişin aksine membranda bulunmazlar, arke membranlarında yağ asitleri yerine terpenoidler bulunur (Koga vd., 1998). Yağ asitlerinin arkelerdeki varlığı ve işlevine ilişkin yapılan çalışmaların sınırlı olması sebebi ile yağ asitlerinin arkelerdeki kullanımını henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Öte yandan, palmitik asidin (C16:0) halofilik arkelerde bulunan ve  $Cl^-$  iyonu regülasyonundan sorumlu halorhodopsinin fonksiyonel bütünlüğü için çok önemli olduğu ve çalışmadaki arkeler gibi halofilik arke türü olan *Halobacterium salinarum* hücreleri tarafından, ilave yağ asitleri olmayan bir kültür ortamında büyütüldüğünde bile sentezlenebildiği gösterilmiştir (Corcelli vd., 1996). Yapılan çalışmalarda palmitik ve stearik asit gibi çift sayılı yağ asitlerinin arkelerde membran proteinlerinin bir parçası olduğu bildirilmiştir (Pugh ve Kates 1994). Bununla birlikte farklı arke türlerinin yağ asitleri üzerine yapılan araştırmalarda arkelerin uzun zincirli (C14 sonrası) yağ asitlerini yoğunlukla barındırdıkları bildirilmiştir (Falb vd., 2008; Slobodkina vd., 2009). Benzer bulgular yapılan çalışmada da tespit edilmiş olup yağ asitleri sonuçlarına göre, tüm izolatlarda tespit edilen yağ asitlerinin büyük kısmının palmitik (C16:0) (%13,03±3,53) ve oktadekanoik (C18:0) (% 73,06±6,40) asitlerden oluştuğu görülmüştür.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tuz Gölü'nün 3 farklı istasyonundan alınan örneklerin arkeal biyotaları ve bunların karotenoidlerinin belirlenmesi üzerine gerçekleştirilen analizleri kapsayan tez çalışması sonucunda;

- Araziden alınan numuneler içerisinde *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559, *Halorubrum sodomense* JCM 8880, *Halorubrum californiense* FV\_22B20, *Haloarcula salaria* HST01-2R, *Halorubrum chaoviator* DSM 19316, *Haloterrigena thermotolerans* PR5 ve *Haloarcula japonica* JCM 7785 olmak üzere 7 halofilik arke türünün kültüre edilip, biyokimyasal analizler ve 16s rRNA teknikleri kullanılarak tanımlanmış,
- Tanımlanan türlerin taramalı elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu mikrograflarına göre farklı morfolojik yapı ve boyutlara sahip oldukları belirlenmiş,
- Tez çalışmasında tanımlanan türlerin yağ asidi metil ester yöntemi ile tanımlanan yağ asidi içeriklerinin türler arasında anlamlı farklılıklar içermediği ve yağ asitlerinin büyük kısmının palmitik (C16:0) (%13,03±3,53) ve oktadekanoik (C18:0) (% 73,06±6,40) asitlerden oluştuğu tespit edilmiş,
- Karotenoid içeriklerinin kümülatif analizinde birim kuru hücre başına en yüksek karotenoid içeriğinin *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559 (43,09 µg/g(kuru hücre)), en düşük içeriğin ise *Halorubrum sodomense* JCM 8880 (15,53 µg/g(kuru hücre)) türlerinde olduğu ölçülmüş,
- Ekstraksiyon işleminden önce hücre pelleti PBS ile yıkanmış ve bu sayede tek ekstraksiyon basamağıyla karakteristik bakterioruberin spektrumu elde edilmiş,

- Türlerle ait karotenoidlerin kalitatif değerlendirmeleri neticesinde majör karotenoid türünü all-trans bakterioruberin ve diğer bakterioruberin izomerlerinin oluşturduğu ayrıca bazı türlere ait karotenoidlerin likopen,  $\beta$ -karoten ve  $\gamma$ -karoten izomerlerine sahip olduğu tespit edilmiş,
- *H. lipolyticum* JCM 13559, *H. sodomense* JCM 8880, *H. californiense* FV 22B20, *H. salaria* HST01 2R, *H. chaoviator* DSM 19316, *H. thermotolerans* PR5 ve *H. japonica* JCM 7785'dan ekstrakte edilen karotenoidlerin antioksidan aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmada elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla; 2,601  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,904  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,007  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,927  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,402  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,284  $\mu\text{g/mL}$  ve 1,474  $\mu\text{g/mL}$  olduğu bu verilere dayanarak en yüksek antioksidan etkiyi *H. sodomense* JCM 8880'den ekstrakte edilen karotenoidlerin gösterdiği hesaplanmıştır.

Çalışma verilerinin değerlendirilmesi neticesinde kurgulanabilecek sonraki çalışmalarda,

- Tanımlanan türlerden endüstriyel boyutta karotenoid üretimi için kültür kondüsyonunun belirlenmesi,
- Ekstrakte edilen karotenoidlerin gıda, kozmetik vb. endüstrilerde biyolojik menşei karotenoid ve antioksidan katkı olarak kullanılabilirliklerinin kapsamlı araştırılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1-8.
- Albuquerque, L., Taborda, M., La Cono, V., Yakimov, M., & da Costa, M. S. (2012). *Natrinema salaciae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. *Systematic and applied microbiology*, 35(6), 368-373.
- Asker, D., & Ohta, Y. (1999). Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(6), 617-621.
- Asker, D., Awad, T., & Ohta, Y. (2002). Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TMT: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(1), 37-43.
- Bidle, K. A., Hanson, T. E., Howell, K., & Nannen, J. (2007). HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*, 11(1), 49-55.
- Bilgi, S. T. (2012). Ham derilerden izole edilen halofilik arkelerin hidrolitik enzim kapasitelerinin belirlenmesi, fenotipik ve filogenetik olarak tanımlanması. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Çanakkale.
- Birbir, M., & Sesal, C. (2003). Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 27(1), 7-22.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., & Richmond, A. (2000). *U.S. Patent No. 6,022,701*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Braganca, J., & Furtado, I. (2009). Haloarchaea associated with salt crystals obtained from solar salterns of Goa, India. *American Society for Microbiology*.
- Britton, G. (1985). General carotenoid methods. *Methods in enzymology* (Vol. 111, pp. 113-149). Academic Press.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Eds.). (1995). *Carotenoids: Spectroscopy. Vol. 1B*. Birkhäuser Verlag.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Eds.). (2012). *Carotenoids: handbook*. Birkhäuser.
- Calegari-Santos, R., Diogo, R. A., Fontana, J. D., & Bonfim, T. M. B. (2016). Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions. *Current microbiology*, 72(5), 641-651.

- Calo, P., De Miguel, T., Sieiro, C., Velazquez, J. B., & Villa, T. G. (1995). Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. *Journal of applied bacteriology*, 79(3), 282-285.
- Castillo, A. M., Gutiérrez, M. C., Kamekura, M., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, V. D. & Ventosa, A. (2006). *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(4), 765-770.
- Chen, S., Sun, S., Xu, Y., & Liu, H. C. (2018). *Halococcus salsus* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from rock salt. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(12), 3754-3759.
- Corcelli, A., Lobasso, S., Colella, M., Trotta, M., Guerrieri, A., & Palmisano, F. (1996). Role of palmitic acid on the isolation and properties of halorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1281(2), 173-181.
- Cui, H. L., Tohty, D., Zhou, P. J., & Liu, S. J. (2006). *Halorubrum lipolyticum* sp. nov. and *Halorubrum aidingense* sp. nov., isolated from two salt lakes in Xin-Jiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1631-1634.
- Dussault, H. P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 70(4), 484.
- Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Egorova, K. & Antranikian, G. (2008). Biotechnology. Garrett, R. A., & Klenk, H. P. (Eds.), *Archaea: evolution, physiology, and molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology advances*, 19(4), 261-278.
- Enache, M., & Kamekura, M. (2013). Halophilic archaea in the Neogene salt massif from Slănic Prahova, Romania. *Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*, 29, 237-243.
- Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer, F., Bornberg-Bauer, E., & Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12(2), 177-196.
- Fang, C. J., Ku, K. L., Lee, M. H., & Su, N. W. (2010). Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource technology*, 101(16), 6487-6493.

- Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., & Stan-Lotter, H. (2006). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. In *Life in Extreme Environments* (pp. 125-140). Springer, Dordrecht.
- Fong, N., Burgess, M., Barrow, K., & Glenn, D. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5-6), 750-756.
- Frazier, W. C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 302-309.
- Gruszecki, W. I., & Strzałka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 108-115.
- Han, R. M., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2012). Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules*, 17(2), 2140-2160.
- Herwig, C., Loranft, B. & Porqueras, E. M. (2017). *European Patent Application No. EP2712919B1*.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M., & Argüelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 41-45.
- Holmes M. L. & Dyll-Smith M. L. (1991). Mutations in DNA Gyrase Result in Novobiocin Resistance in Halophilic Archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 173: 642-648.
- Hou, J., & Cui, H. L. (2018). In vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from halophilic archaea. *Current microbiology*, 75(3), 266-271.
- İspirli, N. H., Gulluce, M., Karadayi, M., & Demir, A. Y. (2019). Culturable bacteriorhodopsin-producing haloarchaea of Tuz Lake (Turkey). *Geomicrobiology Journal*, 36(9), 831-836.
- Jacobson, G. K., Jolly, S. O., Sedmak, J. J., Skatrud, T. J., & Wasileski, J. M. (2002). *U.S. Patent No. 6,413,736*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Jehlička, J., Edwards, H. G. M., & Oren, A. (2013). Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, 99-103.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., & Saura-Calixto, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1686-1690.

- Juez, G. (2004). Extremely halophilic archaea: insights into their response to environmental conditions. A. Ventosa (Eds.), *Halophilic microorganisms* (pp. 243-253). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kalo, E., Havas, F., Von Oppen-Bezalel, L., Ben-Chitrit, O., & Perry, I. (2018). *Japan Patent Office Patent no. 2018.9.27*. Chiyoda-ku Tokyo 100-8915, Japan
- Kelly, M., Norgard, S., & Liaaen-Jensen, S. (1970). Bacterial carotenoids. 31. C<sub>50</sub>-carotenoids. Carotenoids of *Halobacterium salinarium*, especially bacterioruberin. *Acta chem. scand.*, 24, 2169-2182.
- Kemp, B. L., Tabish, E. M., Wolford, A. J., Jones, D. L., Butler, J. K., & Baxter, B. K. (2018). The biogeography of great salt lake halophilic archaea: testing the hypothesis of avian mechanical carriers. *Diversity*, 10(4), 124.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., & Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Advances in Biology*, 2014.
- Kläui, H. (1982). Industrial and commercial uses of carotenoids. G. Britton & T. W. Goodwin (Eds.), *Carotenoid chemistry and Biochemistry* (pp. 309-328). Pergamon.
- Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M., & Sone, N. (1998). Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent. *Journal of molecular evolution*, 46(1), 54-63.
- Kolbe, M., Besir, H., Essen, L. O., & Oesterhelt, D. (2000). Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science*, 288(5470), 1390-1396.
- Kuchina, N. (2015). *U.S. Patent Application No. 14/666,823*.
- Kuchina, N. (2018). *U.S. Patent Application No. 15/796,897*.
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17(7), 561-594.
- Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 38(3), 272.
- Lazrak, T., Wolff, G., Albrecht, A. M., Nakatani, Y., Ourisson, G., & Kates, M. (1988). Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 939(1), 160-162.

- Liying, S., Wei, X., Zhenqian, W., Meriong, G., Wanlong, L. & Beini, R. (2019). *China Patent Application No. CN110144315A*.
- Mancinelli, R. L., Landheim, R., Sanchez-Porro, C., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Legat, A., ... & Stan-Lotter, H. (2009). *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 8), 1908.
- Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1781-1790.
- Meghji, K., Ward, O. P., & Araujo, A. (1990). Production, purification, and properties of extracellular carboxyl esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(12), 3735-3740.
- Mehta, V. J., Thumar, J. T., & Singh, S. P. (2006). Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, 97(14), 1650-1654.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242.
- Montalvo-Rodriguez, R., Lopez-Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A., & Kamekura, M. (2000). *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 1065-1071.
- Mutlu, M. B. (2006). Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı. Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Eskişehir.
- Mutlu, M. B., Martínez-García, M., Santos, F., Peña, A., Guven, K., & Antón, J. (2008). Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS microbiology ecology*, 65(3), 474-483.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2011). *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(2), 231-236.
- Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B. M., Nazemyieh, H., Hejazi, M. A., & Hejazi, M. S. (2014). Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(1), 61.

- Neumann, B. R., Pospiech, A., & Schairer, H. U. (1992). Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends in genetics: TIG*, 8(10), 332-333.
- Oesterhelt, D., Hampp, N., & Pfeiffer, M. (2011). *U.S. Patent No. 7,939,220*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of chromatography A*, 881(1-2), 543-555.
- Oren, A. (1983). *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(2), 381-386.
- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18(5), 825-834.
- Oren, A., Ventosa, A., & Grant, W. D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 47(1), 233-238.
- Ourisson, G., & Nakatani, Y. (1989). Bacterial carotenoids as membrane reinforcers: a general role for polyterpenoids: membrane stabilization. In *Carotenoids* (pp. 237-245). Springer, Boston, MA.
- Özcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., & Cokmus, C. (2007). Diversity of halophilic Archaea from six hypersaline environments in Turkey. *J Microbiol Biotechnol*, 17(5), 745-752.
- Pattnaik, P., Roy, U., & Jain, P. (1997). Biocolours: new generation additives for food. *Indian food industry*, 16(5), 21-25.
- Pelah, D., Sintov, A. and Cohen, E. (2003). Astaxanthin and canthaxanthin accumulation in the salt stressed fresh-water algae *Chlorella zofingiensis* under limited light conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 483-486.
- Pesenti, P. T., Sikaroodi, M., Gillevet, P. M., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A., & Litchfield, C. D. (2008). *Halorubrum californiense* sp. nov., an extreme archaeal halophile isolated from a crystallizer pond at a solar salt plant in California, USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(12), 2710-2715.
- Pollock, I., & Warner, J. O. (1990). Effect of artificial food colours on childhood behaviour. *Archives of disease in childhood*, 65(1), 74-77.
- Possemiers, S., Duysburgh, C., Pinheiro, I., Bolca, S., Van Den Abbeele, P., & Marzorati, M. (2019). *U.S. Patent Application No. 16/311,431*.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2005). *Microbiology. ke-6. Mc. New York (GB): Grow-Hill*.

- Pugh, E. L., & Kates, M. (1994). Acylation of proteins of the archaebacteria *Halobacterium cutirubrum* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1196(1), 38-44.
- Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vilchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1980). Short communication isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *Microbiology*, 119(2), 535-538.
- Ronnekleiv, M. (1995). Bacterial carotenoids 53\* C50-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. *Biochemical systematics and ecology*, 23(6), 627-634.
- Ronnekleiv, M., & Liaaen-Jensen, S. (1992). Bacterial carotenoids 52. Cso-Carotenoids 22. Naturally occurring geometrical isomers of bacterioruberin. *Acta Chem. Scand*, 46, 1092-1095.
- Saito, T., Miyabe, Y., Ide, H., & Yamamoto, O. (1997). Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin. *Radiation Physics and Chemistry*, 50(3), 267-269.
- Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.
- Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., Yamamoto, O., & Ide, H. (1998). Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. *Journal of radiation research*, 39(4), 251-262.
- Shand, R. F., & Perez, A. M. (1999). Haloarchaeal growth physiology. In *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments* (pp. 411-424). Springer, Dordrecht.
- Slobodkina, G. B., Kolganova, T. V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron (III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(11), 2880-2883.
- Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., & Morana, A. (2017). Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: Identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933-945.
- Strand, A., Shivaji, S., & Liaaen-Jensen, S. (1997). Bacterial carotenoids 55. C50-carotenoids 25. revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus*. *Biochemical systematics and ecology*, 25(6), 547-552.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006).  $\alpha$ -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 173-184.
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W. D., & Horikoshi, K. (1990). *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium. *Systematic and applied microbiology*, 13(2), 177-181.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., & Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1-2), 89-99.
- Umeno, T., Kobayashi, M., Misawa, N. & Takaichi, S. (2012). *Worldwide Application No. WO2012169623A1*
- van Poppel, G., & Goldbohm, R. A. (1995). Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1393S-1402S.
- Venkatesh, N. S., Balaji, R., & Satnyamurthy, P. (2005). *U.S. Patent No. 6,936,459*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., & Vega, J. M. (2011). Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319-333.
- Wilska-Jeszka, J. (2007). Food colorants. *Chemical and functional properties of food components*, 245-274.
- Wisniewska, A., & Subczynski, W. K. (1998). Effects of polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1368(2), 235-246.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K. I., Kamekura, M., & Nakase, T. (2000). *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 1297-1303.
- Yachai, M. (2009). Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Doktora Tezi, *Prince of Songkla University*. Tayland.
- Yağcılar, Ç. (2012). Bitkisel kaynaklı karotenoidlerin (Kırmızıbiber, ham hurma yağı, havuç) japon balığının pigmentasyonu ve büyümesi üzerine etkileri. Doktora Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Tekirdağ.

Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., ... & Sekine, M. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in microbiology*, 5, 100.

Zalazar, L., Pagola, P., Miró, M. V., Churio, M. S., Cerletti, M., Martínez, C., & De Castro, R. (2019). Bacterioruberin extracts from a genetically modified hyperpigmented *Haloflexax volcanii* strain: Antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells. *Journal of applied microbiology*, 126(3), 796-810.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fevziye Işıl KESBİÇ  
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul / 20.05.1989  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : ikesbic@kastamonu.edu.tr



### Eğitim Durumu

Lise : İstanbul, Bahçelievler Anadolu Lisesi, 2007  
Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, 2011  
Yüksek Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, 2014

### Mesleki Deneyim

İş Yeri : Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı,  
2015-<.>

### Yayın Listesi :

#### **SCI-SCI expanded kapsamında taranan dergilerde yayınlanmış yayınlar**

Gürelli, G., Lyons, E. T., & Kesbiç, F. I. (2019). Hindgut Ciliate Composition of Thoroughbred Mares in Kentucky, USA, and Binary Fission in *Polymorphella ampulla*. *Zootaxa*, 4646(2), 369-384.

Acar, U., Kesbic, O. S., Yilmaz, S., Kesbic, F. I., & Gultepe, N. (2018). Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) Meal as an Alternative Major Protein in Feeds for Rainbow Trout Juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(5), 383-390.

#### **Diğer uluslararası indeksler tarafından taranan dergilerde yayınlanmış yayınlar**

Kesbiç, F. I., & Yapıcı, B. M. (2017). Investigation of extracellular protease activity of two different extremely halophilic archaea isolated from raw hide. *Revista de Pielarie Incaltaminte*, 17(4), 255.

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler**

Gürelli, G., Lyons, E. T., & **Kesbiç, F. I.** (2019). Hindgut ciliate fauna of throughbred mares in Kentucky USA and binary fission in *Polymorphella ampulla*. VIII European Congress of Protistology-ISOP Joint Meeting. Roma/Italy

İçli, N., & **Kesbiç, F. I.** (2018). The Comparison Of The Microbiological Characteristics of the Tarhana s Produced By Different Traditional Method. The 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus. Kyrenia/Cyprus

**Kesbiç, F. I.**, & Mutlu, E. (2018). Assessing the Water Quality of Brook Soğanlı Karabük. International Ecology 2018 Symposium. Kastamonu/Turkey

**Kesbiç, F. I.**, & Gültepe, N. (2017). Essential Oil Components and Fatty Acid Analysis Using Different Solvents of St. John’s Wort Oil Obtained by Different Methods. II. International Academic Research Congress. Antalya/Turkey.

Gültepe, N., Kesbiç, O. S., Acar, Ü., & **Kesbiç, F. I.** (2017). Replacement of Anchovy Meal by Gibel Carp *Carassius gibelio* Meal in Rainbow Trout *Onchorhynchus mykiss* Diet. World Aquaculture 2017. Cape Town/ South Africa

**Kesbiç, F. I.**, & Gültepe, N. (2017). Nutritional and Microbiological Quality of Cheeses From Local Markets in Kastamonu. II. International Academic Research Congress. Antalya/Turkey

Gültepe, N., Kesbiç, O. S., Acar, Ü., **Kesbiç, F. I.**, & Yalçın, F. (2017). Effects of Orange *Citrus sinensis* Peel Essential Oil on the Growth Performance of Rainbow Trout *Onchorhynchus mykiss* Juveniles. LAQUA 2017. Mazatlan/Mexico

Gültepe, N., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., **Kesbiç, F. I.**, & Yalçın, F. (2016). Kısa Dönem Beslemede Portakal Kabuğu Esansiyelyağlarının Gökkuşığı Alabalığı

*Oncorhynchus mykiss* Yavrularına Etkileri. Uluslararası Türk Dünyası'nda İlimi Araştırmalar Sempozyumu. Karakol/ Kyrgyzstan

Kesbiç, O. S., Acar, Ü., **Kesbiç, F. I.**, Yanar, B. A., Bulut, M., Gültepe, N., & Yiğit, M. (2014). Evaluation of Dietary Protein and Lipid Requirements of Two Banded Seabream *Diplodus vulgaris* Juveniles Cultured in a Recirculating Aquaculture System. Aquaculture Europe 2014. San Sebastián/ Spain

Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yanar, B. A., **Kesbiç, F. I.**, Gültepe, N., & Türker, A. (2014). Dietary Tribulus terrestris Extract Enhances Growth and Biochemical Variables of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. Presented at the Aquaculture Europe 2014. San Sebastián/ Spain.

Demir, O., Türker, A., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yanar, B. A., & **Kesbiç, F. I.** (2014). Effects of Dietary Fish Oil Replacement by Unrefined Peanut Oil on the Growth Serum Biochemical Parameters of Mozambique Tilapia Fingerlings *Oreochromis mossambicus* AQUACYPRUS2014: 1st International Symposium on Aquatic Sciences and Technology. Kyrenia/Cyprus

#### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler**

Doğanay, D., Meriçli Yapıcı, B., **Kesbiç, F. I.**, & Bilgi, S. T. (2012). Bazı Ticari Biyosidlerin Kıl Giderme ve Kireçlik Basamağından İzole Edilen Alkalifilik Bakteriler Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. İzmir.