

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ TUZ KAYNAKLARINDAN AYRILMIŞ VE
TANIMLANMIŞ AŞIRI HALOFİL SUŞLARIN
PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE
ELEKTRİK AKIMI İLE KONTROLÜ**

**ZEKİYE BİLGE ÖZDOĞRU
(Kimya Öğretmeni)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

I.DANIŞMAN

Prof.Dr. Ayşe OGAN

II. DANIŞMAN

Prof.Dr. Meral BİRBİR

İSTANBUL 2007

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ TUZ KAYNAKLARINDAN AYRILMIŞ VE
TANIMLANMIŞ AŞIRI HALOFİL SUŞLARIN
PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE
ELEKTRİK AKIMI İLE KONTROLÜ**

**ZEKİYE BİLGE ÖZDOĞRU
(141100520040005)
(Kimya Öğretmeni)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**I.DANIŞMAN
Prof.Dr. Ayşe OGAN
II. DANIŞMAN
Prof.Dr. Meral BİRBİR**

İSTANBUL 2007

ÖNSÖZ

Tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde çok büyük emekleri olan, hoşgörülerini esirgemeyen, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşe OGAN'a ve Prof. Dr. Meral BİRBİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deney kısmındaki elektrokimyasal elektroliz düzeneğini dizayn eden ve çalışmamın elektrik akımı uygulama kısmını yürüten değerli hocam Yard. Doç. Dr. Yaşar BİRBİR'e teşekkür ederim.

Laboratuvar aşamasında bana her zaman destek olan Derya DEĞİRMENCİ ve Didem YAZI BERBER'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana her türlü imkanı ve yardımı sağlayan, ilgilerini eksik etmeyen sevgili aileme ve desteğini benden esirgemeyen sevgili eşime teşekkür ederim.

Haziran 2007

Z. Bilge ÖZDOĞRU

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
YENİLİK BEYANI.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
BÖLÜM I: GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM II: GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. TUZ HAKKINDA BİLGİ.....	3
II.1.1. Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası, Tuzköy Tuz Madeni.....	5
II.2. DERİ HAKKINDA BİLGİ.....	6
II.3. ARKEBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	9
II.4. PROTEAZ ENZİMİ.....	13

II.5. DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARI.....	15
BÖLÜM III: TEZ ÇALIŞMALARI.....	16
III.1. ARAŞTIRMA ARAÇLARI.....	17
III.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	17
III.1.1.1. Sıvı Jelatin Besiyeri.....	17
III.1.1.2. Katı Jelatin Besiyeri.....	17
III.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	18
III.1.2.1. %25 NaCl İçeren Tuzlu Su Çözeltisi.....	18
III.1.2.2. %1'lik Kazein Çözeltisi.....	18
III.1.2.3. %10'luk Trikloroasetik Asit Çözeltisi.....	18
III.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	18
III.1.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ.....	20
III.2.1. Proteolitik Aşırı Halofil Arkebakteri Kültürlerinin Hazırlanışı.....	20
III.2.2. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının Proteaz Aktivitelerinin Saptanması.....	20
III.2.3. Proteaz Üreten Aşırı Halofil Arkebakterilerin 0.5 A'lık Doğru Elektrik Akımı ile İnaktivasyonu ve Rf Değerlerinin Hesaplanması.....	21
III.2.4. 0.5 A Doğru Elektrik Akımı Uygulaması Öncesi ve Sonrası Proteaz Aktiviteleri.....	22
BÖLÜM IV: SONUÇLAR.....	23
BÖLÜM V: TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME.....	28
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÖZET

ÇEŞİTLİ TUZ KAYNAKLARINDAN AYRILMIŞ VE TANIMLANMIŞ AŞIRI HALOFİL SUŞLARIN PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE ELEKTRİK AKIMI İLE KONTROLÜ

Tuzda bulunan aşırı halofil arkebakteriler tarafından üretilen proteolitik enzimler tuzlanmış derilerde ciddi hasarlara yol açıp büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada, Tuz Gölü'nden (7), Tuz Gölü'nün tuzlaları olan Kaldırım Tuzlası'ndan (7), Kayacık Tuzlası'ndan (4) ve Tuzköy Tuz Madeni'nden (6) izole edilmiş olan 24 aşırı halofil arkebakteri suşunun proteaz aktiviteleri saptanmıştır. Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni suşlarının proteaz aktiviteleri sırasıyla 80.0-83.3, 81.1-83.8, 83.3-83.4, 82.0-83.4 Ünite olarak bulunmuştur. Salamura sıvılarında tuzda bulunan proteolitik arkebakterilerin derilere vereceği zararı önlemek için 0.5 A doğru elektrik akımının aşırı halofil arkebakteriler üzerine antibakteriyel etkisi bu çalışmada 20 dakika süre ile incelenmiştir. Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madeni'nin proteolitik suşları sıvı jelatin besiyerinde 0.5 A doğru elektrik akım ile 15 dakikada ölürken Kaldırım ve Kayacık Tuzlaları'nın proteolitik suşlarını öldürmek için 10 dakika yeterli olmuştur. Ayrıca test suşlarının proteaz aktiviteleri üzerine 0.5 A doğru elektrik akımının etkisi 20 dakika süre ile incelenmiştir. 0.5 A doğru elektrik akımının test suşlarının proteaz aktivitelerinde çok az bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı, deri endüstrisinde kullanılan tuzlu su çözeltilerindeki proteaz üreten suşların, tuzlu su çözeltilerine proteaz enzimlerini salgılamadan önce doğru elektik akım ile öldürülmeleri gereklidir.

Haziran 2007

Z. Bilge ÖZDOĞRU

ABSTRACT

DETERMINATION OF PROTEASE ACTIVITIES OF ISOLATED AND IDENTIFIED EXTREMELY HALOPHILIC STRAINS FROM VARIOUS SALT SOURCES AND THEIR CONTROL WITH ELECTRIC CURRENT

Proteolytic enzymes which are produced by extremely halophilic archaea in salt may cause serious damages on salted hides and may result in significant economic losses in leather industry. Hence, protease activities of 24 proteases producing extremely halophilic archaeal strains isolated from Tuz Lake (7), Kaldırım (7) and Kayacık (4) salterns of Tuz Lake and Tuzköy Salt Mine (6) were determined in this study. The protease activities of Tuz Lake, Kaldırım Saltern, Kayacık Saltern and Tuzköy Salt Mine strains were found as 80.0-83.3, 81.1-83.8, 83.3-83.4, 82.0-83.4 Units, respectively. In this study, antibacterial effect of 0.5 A direct electric current on extremely halophilic archaea was examined for 20 min to prevent proteolytic halobacterial damage, originating from salt used in brine solution on hides. Although proteolytic strains of Tuz Lake and Tuzköy Salt Mine in the liquid gelatin media were killed by 0.5 A direct electric current within 15 min, 10 min direct electric current treatment were enough to kill all proteolytic strains of Kaldırım and Kayacık Salterns. Also, the effect of 0.5A direct electric current on protease activities of the test strains was examined during 20 min treatment. It was found that 0.5A direct electric current caused a slight decrease on protease activities of the test strains. Therefore, it is necessary to kill protease producing strains in brine solution which is used in hide industry with direct electric current before the excretion of their accumulated proteases into the brine solution.

June 2007

Z. Bilge ÖZDOĞRU

YENİLİK BEYANI

ÇEŞİTLİ TUZ KAYNAKLARINDAN AYRILMIŞ VE TANIMLANMIŞ AŞIRI HALOFİL SUŞLARIN PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE ELEKTRİK AKIMI İLE KONTROLÜ

Bu çalışma, Tuz Gölü, Kaldırım ve Kaycık Tuzlası, Tuzköy Tuz Madeni gibi farklı tuz kaynaklarından izole edilen proteaz üreten aşırı halofil arkebakteri suşlarının proteaz aktivitelerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlendiği ilk detaylı orijinal çalışmadır. Elektrik akımı uygulanması esnasında bakterilerin proteolitik aktivitelerinin değişip değişmediği ilk defa bu çalışma ile incelenmiştir. Farklı tuz kaynaklarından izole edilen *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Natrinema* ve *Halobacterium* cinslerine ait aşırı halofil arkebakteri suşlarının proteolitik aktivitelerinin elektrik akımından çok fazla etkilenmedikleri saptanmıştır. Bu sebepten deri salamurasında kullanılacak olan tuzlu su çözeltilerindeki aşırı halofil arkebakteri suşları, proteaz enzimi üretmeden önce doğru elektrik akımı ile öldürülmelidir.

Haziran 2007

Prof. Dr. Ayşe OGAN

Z. Bilge ÖZDOĞRU

Prof. Dr. Meral BİRBİR

KISALTMALAR

A	: Amper
°C	: Santigrat derece
g	: Gram
dak	: Dakika
Kob	: Koloni oluşturma birimi
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
µA	: Mikroamper
rf	: Azaltma faktörü
nm	: Nanometre
V	: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil IV.1.: Sıvı Jelatin Besiyerindeki Proteolitik Aşırı Halofil Arkebakteri Karışımına 0.5 A Doğru Elektrik Akımının Etkisi.....	25
---	-----------

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo IV.1.: Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni'nden İzole Edilen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının Proteaz Aktiviteleri.....	24
Tablo IV.2.: 0.5 A Doğru Elektrik Akımının 20 Dakikalık Süre ile Uygulandığı Sıvı Jelatin Besiyerlerindeki Sıcaklık, Voltaj, ve Aşırı Halofil Arkebakterilerin Rf Değerleri.....	26
:	
Tablo IV.3.: 0.5 A Doğru Elektrik Akımı Uygulaması Öncesi ve Sonrası Proteaz Aktiviteleri	27

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvanlar kesilip derileri yüzüldükten sonra bakterilerin deriye zarar vermesini engellemek için deriler tuzlanır. Bu işlem deriler üzerinde mezofil bakterilerin gelişimini engellerken tuzda bulunan halofil arkebakterilerin gelişimine neden olmaktadır. Eğer tuzlanmış deriler uygunsuz şartlarda ve yüksek sıcaklıklarda uzun süre saklanırlarsa halofil arkebakteriler kolaylıkla gelişebilmekte ve derilere zarar vermektedir (Kallenberger ve diğ., 1986; Birbir ve Ilgaz, 1996). Halofil arkebakteriler deriler üzerinde kızıışmaya ve kıl gevşemesine neden olmaktadır. Özellikle halofil arkebakteri kıl köklerinde gelişebilmekte ve tüm kıl kökünün bozunmasına neden olarak deri yüzeyinde delik açabilmektedir (Didato ve diğ., 1999). Ayrıca bakteriyel gelişimden dolayı deri üzerinde düzensiz boyanma gözlenebilmektedir (Bitlisli ve diğ., 2004). Proteolitik aşırı halofil arkebakteri içeren tuz, tuzlama işleminde kullanılırsa, bu mikroorganizmalar derilerin yüzeylerinde hasara neden olmaktadır (Bailey ve Birbir, 1996).

Genelde tuz gölleri, tuzlulardan ve tuz madenleri gibi doğal tuz kaynaklarından elde edilen tuz işlenmeden deri tuzlamada kullanılmaktadır. Tuz gölleri ve tuzlular genellikle gram başına 10^5 - 10^6 koloni oluşturma birimi (kob) aşırı halofil arkebakteri içermektedir (Grant ve diğ., 2001; Oren, 2000). Daha önceki çalışmalarda saptandığı gibi aşırı halofil arkebakterilerin çoğunluğu proteolitik enzimler salgılar (Birbir, 2004; Bailey ve Birbir, 1993; Birbir, 1997; Norberg ve Hofstein, 1969). Halofil arkebakterilerden pek çok ekstraselüler proteaz izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Kamekura ve diğ., 1996; Gimenez ve diğ., 2000, Ryu ve diğ., 1994). Yapılan bir çalışmada, Tuz Gölü'nden toplanan tuz ve tuzlu su örneklerinden toplam olarak 50, Kaldırım Tuzlası tuz ve tuzlu su örneklerinden 20, Kayacık Tuzlası tuz örneklerinden

9, Tuzköy Tuz Madeni tuz örneklerinden 15 aŐı halofil arkebakteri ayrımı yapılmıştır. Tuz Gölü suşlarının %80'i, Kaldırım Tuzlası'nın %70'i, Kayacık Tuzlası suşlarının %78'i ve Tuzköy Tuz Madeni'nden ayrımı yapılan suşların %67'si proteolitik aktivite göstermiştir (Birbir, 2004).

Bu çalışmadaki amacımız Tuz Gölü'nden, Kaldırım Tuzlası'ndan, Kayacık Tuzlası'ndan ve Tuzköy Tuz Madeni'nden ayrılmış ve tanımlanmış aşırı halofil arkebakteri suşlarının proteaz aktivitelelerini belirlemek, 0.5 A doğru elektrik akımı ile bu suşları inaktive etmek ve 0.5 A doğru elektrik akımının suşların proteaz aktivitesi üzerine etkisini incelemektir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. TUZ HAKKINDA BİLGİ

Tuz, kimya sanayisinin temel bir hammaddesidir; ya saf ya da saflaştırılmış olarak katı durumunda ya da tuzlu su halinde elde edildiği bölgelerde gerekli tesisler kurularak salamura biçiminde kullanılır. Bileşiminde bulunan klordan dolayı pek çok üretimin temelini, sodyumdan dolayı da soda sanayisinin hammaddesini oluşturur. Tuz, yüksek derişimde mikrop öldürücü etki gösterdiğinden birçok besin sanayilerinde et, balık, peynir ve konserve yiyecek koruyucusu olarak kuru tuz veya salamura halinde kullanılır. Su arıtma aygıtlarında, kar ve buzların eritilmesinde ve deri sektöründe derilerin tuzlanması kullanılmaktadır (Büyük Larousse Sözlük ve Ansiklopedisi, 1992).

Kimyasal formülü NaCl olan tuz, kolayca ufalanabilen, kokusuz, suda çözünebilen bir maddedir. Tuz saf haldeyken %40 sodyum ve %60 klordan meydana gelmektedir. Yoğunluğu 2.10-2.55 g/cm³ arasında olup sertliği 2.52'dir. Ergime derecesi 800⁰C ve kaynama derecesi ise 1412⁰C'dir (Birbir ve Erdoğan, 2002).

Saf halde renksiz olan tuz, yataklarda çok defa gri, sarı hatta mavi renklidir. Tuzda %1-10 oranında yabancı madde bulunur. Bu yabancı maddeler esas itibariyle magnezyum ve kalsiyum sülfat ve bunların klorürleri ile diğer bazı maddelerdir. Denizlerden elde edilen tuzda %96-98 sodyum klorür vardır. Bazı tuz yataklarındaki tuz ise diğer tuzlarla ve çoğunlukla potasyum tuzları ile bulunur (Büyük Larousse Sözlük ve Ansiklopedisi, 1992).

Tuz genellikle toprak altı yataklarından (kaya ve kaynak tuzu), tuzlalardan (rafine tuz) elde edilir; kaya tuzu ise katı ya da çözelti halinde üretilir. Birinci

durumda tuz yatakları nadiren taş ocakları ve daha çok maden ocağı halinde işletilir. Maden filizi patlayıcı maddelerle parçalanarak hammadde veya kırma, öğütme ve eleme işlemlerinden sonra işlenecekleri yere sevk edilir. İkinci durumda ise tuz katmanları içine delikler açılır, içine tatlı su pompalanarak doymuş bir salamura elde edilir ve işleneceği fabrikaya sevk edilir (Büyük Larousse Sözlük ve Ansiklopedisi, 1992).

Türkiye’de kaynaklardan tuz çıkarılması Tekel tarafından gerçekleştirilmekte, çıkartılan yıkanmış tuz ise gıda ve sanayi alanında kullanılmak amacıyla işlenmek üzere özel kuruluşlara devredilmektedir. Türkiye’de kaya tuzu, kaynak tuzu, deniz ve göl tuzları üretilmektedir. Toplam tuz üretimi içinde kaya tuzları %6, kaynak tuzları %4 pay almakta, geri kalan üretim ise deniz ve göllerden sağlanmaktadır (Büyük Larousse Sözlük ve Ansiklopedisi, 1992).

Tuzlu ortamlar dünyanın her tarafında yaygın olduğu halde çok fazla tuzlu ortamlar ise genelde yaygın değildir. Bu ortamların çoğu sıcak ve kuru ortamlardır. Tuz göllerindeki iyonlar oldukça değişken olabilir. Aşırı tuzlu göllerdeki iyonlar çevrenin topografisine, jeolojisine ve genel iklim durumlarına göre değişebilir. Utah’daki Büyük Tuz Gölü’nde genellikle konsantre olmuş deniz suyu bulunur. Bu sebepten çeşitli iyonların nispi oranları deniz suyundakine benzer, buna rağmen bu iyonların konsantrasyonları bu gölde daha yüksektir. Büyük Tuz Gölü’ndeki en yaygın katyon Na^+ en yaygın anyon ise Cl^- ’dur. Ortamın pH’ı alkali olduğundan önemli miktarda sülfat bulunur. Bunun aksine Ölü Deniz gibi tuzlu ortamlarda sodyum oranının oldukça düşük olmasına rağmen çevredeki kayaların yüksek magnezyum mineraline sahip olması nedeniyle magnezyum miktarı yüksektir. Soda göllerinin kimyasal içeriği ile benzerdir fakat soda göllerini çevreleyen kayalardan dolayı soda göllerinde yüksek seviyede karbonat minerali bulunur. Soda göllerinin pH’ı oldukça yüksek olup 10-12 arasındadır (Valera, 1988; Birbir ve Kallı, 2000).

Türkiye gerek Akdeniz gerekse Ege Denizi gibi tuzlu denizlerde sahilleri bulunması ve zengin kara ve kaynak tuzu rezervlerine sahip olması nedeniyle tuz potansiyeli yönünden zengin ülkeler arasında yer almaktadır (İlter, 2000).

Tuz göllerinin bir kısmı, eski deniz yatakları olabileceği gibi bazıları da geniş yer çöküntülerinde, civar bölgelerdeki kaya tuzlarından geçerek, bu çukurlarda toplanan tuzlu sulardan meydana gelirler. Yaz aylarında yüksek bir yoğunluk kazanan sular buharlaşarak sanki deniz sularının toplama havuzları gibi bir tuz tavası

haline gelirler. İç Anadolu'da bulunan Tuz Gölü dünyadaki en önemli tuz göllerinden biridir. Bu göllerden alınan tuz hemen hemen saf bir şekilde bulunur (İnandık, 1955; Koday, 1999; İlter, 2000).

II.1.1 TUZ GÖLÜ, KALDIRIM TUZLASI, KAYACIK TUZLASI, TUZKÖY TUZ MADENİ

1660 km² lik yüzölçümü ile Türkiye'nin ikinci büyük gölü olan Tuz Gölü İç Anadolu Bölgesi'nde Ankara, Konya ve Aksaray il sınırları içinde yer almaktadır. Yağış alanı 11.900 km² olan Tuz Gölü dışarıya akıntısı olmayan kapalı bir havzadır. Yaz ve kış ayları arasında 1-1.5 metrelik seviye farkı gösteren Tuz Gölü'nün büyük bir kısmı sığdır. Bu sığ kısımlar yaz aylarında şiddetli buharlaşmadan dolayı tamamen kuruyarak 5-30 cm kalınlıkta tuz tabakası oluşturur Tuz Gölü'ndeki tuzluluk oranı yazın %32.9 gibi en yüksek orana ulaşmaktadır. Kimyasal bileşimi bakımında bu tuz saf yemeklik tuzdur. Bu göldeki sodyum klorür oranı magnezyum klorür ve sülfat oranlarında çok yüksektir. Göldeki tuz birikiminin birçok faktöre bağlı olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (İnandık, 1955; Koday 1999).

Tuz Gölü'nün tuzlarından biri olan Kaldırım Tuzlası'nın bulunduğu alandaki toplam tuz kalınlığı her yıl yaklaşık 30 cm'ye ulaşmaktadır. Bu kalınlık, buharlaşma miktarına bağlı olarak bazı yıllar birkaç santimetre artmakta, göl suyunun tatlılaşmasına bağlı olarak da bazı yıllar azalabilmektedir (Koday,1999).

Kayacık tuz işletmesinde ham tuz üretimi beş havuzda yapılmaktadır. Bu havuzların toplam alanı 10.86 km²'dir. Kayacık Tuzlası'nın yıllık tuz rezervi 1.650.720 tondur ve 2002 yılında 628.300 ton ham tuz üretimi gerçekleşmiştir (Birbir ve Elevi, 2005).

Tuzköy Tuz Madeni, Nevşehir'e 34 km, Tuzköy'e de 2 km uzaklıktadır. Kaya tuzu; %35 Na, %56 Cl,%1.6 SO₄ ve %6 oranında suda erimeyen madde içermektedir. Yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkarılan görünür NaCl yaklaşık 60 m derinde yer almaktadır (Birbir ve Eryılmaz, 2006).

II.2. DERİ HAKKINDA BİLGİ

Deri ürünleri sektörünün ana hammaddesi deri, dünyada her zaman en özellikli ürünlerden biridir. Deriyi farklı kılan, hammaddesinin yani hayvan derisinin özgün yapısı ve işlenme sürecidir. Söz konusu derinin giysilik veya ayakkabılık deri eşyada kullanılabilecek bir malzeme hale getirilmesi süreci uzun, zahmetli ve özen gösterilmesi gereken bir süreçtir. Türkiye deri sanayi, çok eski ve köklü bir yapıya sahip olmasına karşın, Cumhuriyetin ilk yıllarında babadan oğla geçen ve lonca karakterini koruyan bir iş kolu olarak varlığını sürdürmüştür. Ancak kalkınma planlarında sektörle ilgili belirlenen çeşitli özendirici tedbirler sayesinde yavaş yavaş kabuk değiştirmiştir (www.turkishleather.com).

Türkiye deri sektörü bugün Tuzla, Menemen ve Çorlu bölgelerinde arıtma tesisine sahip üç deri organize sanayi bölgesi, Bursa, Uşak, Gerede, Gaziantep'teki deri üretim tesisleri, konfeksiyon atölyeleri ve fabrikalarıyla çağların ötesinden gelen dev bir üretim koludur. Türk deri ve kürk giyim eşyası ihracatının yöneldiği en büyük pazarlar %22,4 ile Rusya, %21.7 ile Almanya, %13,1 ile Fransa, %8.7 ile ABD ve %5,1 ile İspanya'dır (www.turkishleather.com).

Türkiye küçükbaş deri işleme sanayinde ürün kalitesi, kapasitesi, teknolojisi açısından dünyada ön sıralardadır. Ülkemiz; 2002 yılı verilerine göre dünyada deri ve deri ürünleri ihracatını yapan ülkeler arasında 21. sırada, ithalatını yapan ülkeler arasında ise 29. sıradadır (Özçörekçi, 2004).

Ülkemizde her yıl yaklaşık 2 milyon büyükbaş hayvan kesilmektedir ve bu miktarda da deri elde edilmektedir. Bir derinin tamamından yararlanmak için, onun kesiksiz, deliksiz olmasına dikkat etmek şarttır. Her kesik ve delik maddi kayıp demektir. Bir sığır derisinden beş çift ayakkabı yapılıyorsa, kesik ve yanlış yüzme yüzünden en az bir çift ayakkabılık deri ziyan edilmiş olur. Bu da ülkemizdeki kesilen sığır sayısı ile mukayese edilirse çok büyük bir zarar demektir. Hayvan vücudunu örten deri yüzüldükten sonra dayanıklılığını kaybeder (www.tarim.gov.tr).

Deriler ağırlıklarının yarısından fazla su içerir. 10 kiloluk bir derinin, 6.5 kilosu sudur. Mikroplar ise böyle sulu, ıslak ortamı çok severler. Ayrıca, deriler kanla ve pisliklerle de bulaşık olduğundan, mikropların da hücumuna uğrayınca çok fazla zarar görürler. Önce kokuşur, etrafa çürük yumurta ve pis koku yayarlar. Sonra da derinin yapısında bozulma başlar, deri dayanıklılığını iyice kaybeder. Bu yüzden

hayvan kesilip deriler yüzüldükten sonra derileri iyi korumak gerekir. Derileri hemen tuzlamak doğru değildir. Bir ham deri tabaklanmış haliyle bozulmadan saklanabilmeli, tabakhanelere gelinceye kadar da yolda harap olmamalıdır. Bizim ülkemizde en çok uygulananlar, hava kurusu, tuzlu kuru ve tuzlu yaş (tuzlu salamura) muhafaza yöntemleridir (www.tarim.gov.tr).

Kurutma yöntemiyle muhafaza, çok eski zamanlardan beri uygulanan bir muhafaza yöntemidir. Bu yöntemde amaç, derilerin doğrudan doğruya havayla kurutulması, derideki rutubetin iyice ve çabuk bir şekilde uzaklaştırılmasıdır. Ancak bu iş basit gözükürse de kolay değildir. Derileri kuruturken çok titiz davranmak şarttır. Bu yöntemle daha çok koyun, keçi, kuzu, oğlak, tavşan, tilki ve benzeri kürk hayvanlarının derileri korunur. Bunu sığır derilerinde uygulamak iyi değildir. Rutubetli bölgelerde kurutma işlemi zor ve zaman alan bir iştir. Kurutmanın uzun sürmesi ise derilerde kokuşmayı geliştirir. Ağır derilerde bu tehlike daima mevcuttur (www.tarim.gov.tr).

Özellikle tuz kullanarak derilerin korunmasını sağlamak en iyi muhafaza yöntemidir. Derinin, yaş deri ağırlığının %30-50'si oranında ve 2-4 mm. çapında tanelere sahip tuzun, et yüzüne tuzlanmamış alan kalmayacak şekilde uygulanması gerekmektedir (www.kkgm.gov.tr).

Tuzun mikropları öldürücü etkisi varsa da, derilerin muhafazasında daha çok nem çekici özelliğinden yararlanır. Deriye serpiyen tuz derinin suyunu alarak ıslanır ve derinin üstünde tuzlu su oluşur. Bu tuzlu su deri tarafından emilir. Tuz derinin suyunu emer, tekrar tuzlu su olarak deriye verir. Böylece deri tuzu almaya, kendi suyunu da dışarı vermeye başlar. Burada daima deriye verilen tuzlu su az, deriden alınan su çok olur. Böylece bu alış veriş günlerce devam eder ve deri tuzunu almış, suyunu yani rutubetin büyük bir kısmını vermiş olur. Bu iş 21 günde tamamlanır. Derinin su oranı tuzun etkisiyle düşürülmüş ve mikropların istediği sulu ıslak ortam yok edilmiş olur. Derinin içerdiği su azaltılmış, mikropların faaliyeti önlenmiş olur. Bu yöntemle eğer derilerin tekrar fazla rutubet alması önlenirse 1-2 ay hatta üç ay muhafaza edilirler (www.kkgm.gov.tr).

Tuzla muhafazada kullanılacak tuzun kalitesi önemlidir. Tuz çok ince veya çok iri olmamalıdır, büyükbaş hayvan derilerinin tuzlanmasında kullanılacak tuzun 2-4 mm, küçükbaş hayvan derilerinin tuzlanmasında kullanılacak tuzların 1-2 mm çapında tane büyüklüğüne sahip olması gerekir. İnce (sofra tuzu gibi) tuzlar, deriden

çok su alıp bir anda eriyeceğinden ya akıp gider deriye giremez ya da özellikle sıcak tuzlanan derilerde bir tabaka teşkil edip kabuk bağlar; su alış verişi olmaz. İri tuz ise bunun aksine gereği gibi zamanında eriyip islanamaz ve derinin su alıp verme işi gecikir; mikroplar zaman kazanmış olurlar. Üstelik iri tuz derinin et yüzünde tuz yanığı meydana getirir. Kirli tuz mikroplarla bulaşık olur, bu yüzden temiz tuz kullanmak şarttır. Tercihen kaya tuzu kullanılmalıdır. Koruma etkinliğinin arttırılabilmesi için kullanılacak tuz antiseptik özelliği bulunan naftalin, borik asit ve sodyum karbonat ile belirli oranlarda karıştırılarak kullanılır (www.ist-vho.org.tr; www.kkgm.gov.tr).

Araştırmacılar deriden izole edilen bakterilerin çoğunlukla proteolitik, lipolitik ve sakkarolitik aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir (Didato ve diğ., 1999). Uygun olmayan taşıma ve depolama koşullarında bu mikroorganizmalar gelişerek deride bozulmaya sebep olmaktadır (Kallenberger ve Lollar, 1986; Birbir ve diğ., 1996). Derinin et yüzeyindeki halofil arkebakterilerin yoğun olarak gelişmesinden dolayı kırmızı lekeler oluşmaktadır. Deri endüstrisinde bu olay “kızışma” olarak bilinmektedir. Bu duruma halofil arkebakterilerin enerji metabolizmasına katılan ve “bakteriyoruberin” olarak adlandırılan kırmızı ile portakal renkli karotenoidler sebep olmaktadır (Madigan ve Martingo, 2006). Buna ek olarak yetersiz olarak tuzlanmış ve tuzlu suyla korunmuş deriler üzerinde kıl dökülmesi de görülebilir. Tuzun içerisindeki proteolitik bakteriler derinin kıl folikülleri içerisinde gelişebilirler ve derinin sırça yüzeyi üzerinde tüm foliküllere zarar vererek deride deliklerin oluşmasına neden olabilirler (Didato ve diğ., 1999). Ayrıca deri üzerinde gelişen mikroorganizmalar deride zarar oluşturarak derinin homojen bir biçimde boyanmasını engelleyebilirler (Bitlisli ve diğ., 2004).

Yapılan bir çalışmada, aşırı halofil mikroorganizmalarla inoküle edilmiş tuzlu suda salamura olmuş sığır derisinin yarısı 4 hafta diğer yarısı ise 7 hafta süreyle 3 farklı sıcaklıkta, 4 °C, 21 °C ve 41 °C’de depo edilmişlerdir. Çalışmanın sonunda sadece 41°C’de 7 hafta süreyle depo edilen derilerin tabaklandıktan sonraki yüzeylerinde zarar tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta ve uzun süre tuzla muhafaza edilen derilerde kızışma görüldüğü açıklanmıştır (Bailey ve Birbir, 1996).

Tuz Gölü’nden, Kaldırım Tuzlası’ndan, Kayacık Tuzlası’ndan ve Tuzköy Tuz Madeni’nden izole edilen 94 aşırı halofil bakterinin çoğunun kollajeni ve lipidleri sindirdiği tespit edilmiştir (Birbir, 2004). Araştırmacı bu kaynaklardan alınan işlem

görmemiş tuz hiçbir muameleden geçirilmeden doğrudan derilerin korunmasında kullanıldığında bu mikroorganizmaların derinin kollajenini sindirerek derinin kalitesini düşüreceğini açıklamıştır. Bu sebepten derilerin korunması işleminde deri zararını önlemek için tuz doğrudan kullanılmadan önce halofil bakteri popülasyonu ve bunların proteolitik ve lipolitik aktiviteleri açısından kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Birbir, 2004).

Derilerde salamura işleminde sırasında arkeobakterilerden dolayı olan hasarı önlemek için pek çok çalışmada etkili bakterisitler (Vivian, 1969; Hendry ve diğ., 1971; Weiss ve Thornton, 1984; Mitchell, 1987; Kallenberger ve Lollar, 1986), safra tuzları (Vreeland ve Bailey, 1999) ve halosinler (Birbir ve diğ., 2004) tavsiye edilmiştir.

II.3. ARKEBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Ribozomal RNA'daki ribonükleotid sırasına göre canlılar *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olmak üzere üç ana aleme ayrılırlar. Bu alemlerin her birinin pek çok fenotipik özelliği bulunmaktadır. Filogenetik açıdan önemli olan fenotipik özellikler; hücre duvarı yapısı, lipidler, RNA polimeraz ve protein sentezindeki farklılıklardır (Balows ve diğ., 1981; Madigan ve Martingo, 2006).

Arkeobakteride pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein ve glikoproteinden yapılmış olan çeşitli tipte hücre duvarı yapıları bulunmaktadır. Pseudopeptidoglikanın yapısında tekrarlanan üniteler halinde N-asetilglukozamin ve N-asetilaminuronik asit vardır. Bu üniteler arasında β -1,3 glikozidik bağ bulunur (Madigan, 2006; Valera, 1988; Vreeland, 1993).

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

Arkeobakteriler; *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* ve *Korarchaeota* olarak üç ana alt aleme ayrılır. *Euryarchaeota* arkeobakterilerin fizyolojik olarak farklı gruplarını içerir ve bunların çoğu da farklı aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu grubun içerisinde

metanojenik arkebakteriler (metan gazı üretenler) ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) gibi bakteriler bulunur. Aşırı halofillerin büyük bir kısmı zorunlu aeroplardır. Arkebakterilerin bazıları kemoorganotrof bazıları kemolitotrof ve bazıları da ototroftur (Madigan ve Martingo, 2006; Munson, 1997; Spring ve diğ., 1996; Valera, 1981; Vreeland, 1993). *Crenarchaeota*, bilinen tüm canlılardan daha yüksek sıcaklıklarda yaşayan türleri içerse de, toprağın içinde ve daha ılımlı sıcaklıklarda birçok türü keşfedilmiştir. *Korarchaeota* grubunda ise bildiğimiz anlamda herhangi bir üyesi daha henüz canlı olarak izole edilememiştir. Sadece arkebakterilerin habitatlarından izole edilen nükleik asit dizilerine (PCR metoduyla amplifiye edilip elektroforez yöntemiyle jelde yürütülerek) ve aminoasit dizilerine göre farklı bir grup oluşturulmuş ve *Korarchaeota* adını almıştır (www.ucmp.berkeley.edu/archaea).

Halobacteriaceae familyasında 18 farklı cins bulunur, bunlar: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natranobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* ve *Natronorubrum* (www.the-icsp.org/taxa/halobacterlist.htm).

Bizim çalışmamızın konusu olan aşırı halofil arkebakteriler *Halobacteriaceae* familyasından olup tuz konsantrasyonunun 250-300g/l'yi aştığı tuzlu ortamlarda baskın olarak bulunan, kırmızı pigmentasyon oluşturan heterotrofik organizmalardır. Parlak kırmızı rengin gelişiminin tuzlu ortamlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Aşırı halofil terimi mikroorganizmanın, hem tuzlu ortamlarda geliştiğini hem de mikroorganizmanın tuza çok fazla gereksinim duyduğunu belirtmek için kullanılır. Bazen bu tuz gereksinimi tuzun doygunluk noktasına kadar olabilir. Aşırı halofillerin gelişmesi için en az 1.5 M NaCl (yaklaşık %9) ve çoğu türlerin optimal gelişmesi için ise 2-4 M NaCl (%12-23) gerekmektedir. Hemen hemen tüm aşırı halofiller 5.5 M NaCl'de gelişirler (NaCl doygunluğunun limiti %32'dir). Buna rağmen bazı türler bu tuzlulukta çok yavaş gelişirler. Utah'taki Büyük Tuz Gölü'nde, Ölü Deniz'de, Magadi Gölü'nde ve Kenya'daki diğer soda göllerinde bu mikroorganizmalara rastlanmıştır. Ayrıca tuzlanmış balık ve hayvan derilerinde de gözlenmiştir (Valera, 1988; Bailey ve Birbir, 1993; Quesada ve diğ., 1983; Bailey ve Birbir, 1996; Forsyth ve Kushner, 1970; Oren, 1994; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve diğ., 1984; Birbir ve diğ., 1996; Birbir ve İlğaz, 1996; Birbir, 1997).

Halofil bakteri grupları, gelişmeleri için ihtiyaç duydukları tuz miktarına göre ayrılırlar. Araştırmacılar 0.2 M'dan daha az NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "halofil olmayanlar", 0.2-0.5 M NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "zayıf halofiller", 0.5-2 M NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "orta halofiller", 2-5.2 M NaCl konsantrasyonlarında gelişenleri ise "aşırı halofil" bakteriler olarak gruplandırmışlardır (Kushawa ve diğ., 1974; Kushner, 1978; Kushner, 1985; Lodwick, 1994).

Aşırı halofillerde su dengesinin sağlanması çok önemlidir. Bazı mikroorganizmalar düşük su aktiviteli ortamlarda hücre içerisinde organik bileşikler sentezleyerek veya depolayarak kendilerini aşırı hipertonic ortamlardaki basınca dayanıklı hale getirirler. Aşırı halofil arkebakterilerde bu bileşikler ektoin, K⁺, glycine ve betaindir. Bu bileşikler sayesinde hücre yüksek basınçlı durumlarda bile susuz kalmaz ve hücrenin kendi içinde yoğunluğu daha fazla olduğundan çevresinden devamlı olarak su alabilir. Yani hücrenin iç yoğunluğu sentezlenen bu bileşikler ile artırılır (Madigan ve Martingo, 2006; Valera, 1988; Vreeland, 1993).

Halobacterium hücresinin hücre duvarı glikoproteinden oluşur ve Na⁺ iyonları ile stabilize edilir. Na⁺ iyonları *Halobacterium*'un hücre duvarının dış yüzeyine bağlanarak hücre yapısının korunmasını sağlar. Eğer ortamda yeterli miktarda Na⁺ iyonu yok ise hücre duvarı parçalanır ve hücre patlar. *Halobacterium* hücre duvarında glikoprotein yapısında negatif yüklü aspartat ve glutamat gibi asidik aminoasitler bulunur. Bu aminoasitlerin karboksil gruplarının sebep olduğu negatif yükler, Na⁺ iyonu ile kaplanır. Na⁺ iyonu sulandırılarak uzaklaştırıldığında, bu proteinlerin negatif yüklü kısımları birbirlerini itererek hücrenin patlamasına sebep olur. *Halobacterium*'un sitoplazmik proteinleri oldukça asidiktir ve bunların aktivitesi için K⁺ iyonu gereklidir. *Halobacterium*'un ribozom yapısının bozulmaması için de yüksek seviyelerde K⁺ iyonuna ihtiyaç vardır. Kısacası hücresel yapının bozulmaması için, dış ortamlarda fazla miktarda Na⁺ iyonuna iç ortamlarda ise K⁺ iyonuna ihtiyaç vardır (Jones ve diğ., 1987; Madigan ve Martingo, 2006).

Aşırı halofil arkebakterilere taksonomik ve fizyolojik açıdan bakıldığında, Gram negatif boyandıkları ve ikiye bölünme ile çoğaldıkları görülür. Dinlenme safhaları yoktur ve spor oluşturmazlar. Çoğu halofil bakteriler hareketsizdir fakat bir kaç türü kirpik ile zayıf olarak hareket eder (Grant ve diğ., 2001).

Aşırı halofil arkebakterilerin bazı türleri ışık vasıtasıyla ATP sentezi yapabilirler. Bu olay klorofil pigmenti ile gerçekleşmediğinden fotosentez değildir. Halofil arkebakteriler klorofil içermeyen, ışık enerjisi dönüşüm sistemine sahip tek organizmadır (Greene ve Lanyi, 1979; Kushner, 1985; Madigan ve Martingo, 2006; Valera, 1988; Tu ve Huttchinson, 1984; Stoeckenius, 1985).

Halofil arkebakterilerdeki pigmentasyon bakteriyoruberinler olarak adlandırılan kırmızı ve portakal renkli olan C₅₀ karotenoidlerinden dolayıdır. Bu pigmentler enerji metabolizmasına katılır. Oksijen konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda *Halobacterium salinarum* ve bazı diğer aşırı halofiller, bakteriyorodopsin olarak adlandırılan mor bir protein sentezleyerek, bu proteini kendi membranı içine yerleştirirler. Bu retinal molekül ışığı absorblayarak proton motiv kuvvetin oluşmasını kataliz eder ve böylece düşük oksijen konsantrasyonlu durumlarda bakteriyorodopsin sentezi başlar ve mikroorganizmanın rengi portakal ya da kırmızımsı renkten daha kırmızımsı mor renge dönüşür (Jones ve diğ., 1987; Kates ve diğ., 1982; Atlas, 1997; Madigan ve Martingo, 2006; Vreeland, 1993; Oren, 1994; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve diğ., 1984). *Halobacterium halobium*'un mor membranında protein pompası olarak görev alan bakteriyorodopsinin keşfi ile halofil arkebakteriler pek çok biyokimyasal çalışmanın merkezine yerleşmiştir. Bakteriyorodopsinin ve ışık varlığında klor pompası olarak görev yapan halorodopsinin avantajları; organizmanın doğrudan ışığı kullanarak biyoenerjik işlemi yürütmesini sağlamaktadır (Oren, 1999; Schobert ve Lanyi, 1982).

Deniz tuzlarında aşırı halofil prokaryotlar bulunmaktadır. Deniz tuzları deniz suyu ile doldurulan küçük kapalı havzalardır. Bu ortamlardaki deniz suyu buharlaştığından ortamdaki NaCl ve diğer tuzların yoğunluğu artar. Tuzdaki tuzluluk oranına yaklaşıncaya, suyun rengi halofil arkebakterilerin yoğun olarak gelişmesinden dolayı mor renge döner. Halofil bakterilerin kırmızı rengi karotenoidlerden ve diğer pigmentlerin varlığından dolayıdır (Madigan ve Martingo, 2006; Valera, 1988).

Tuzlu ortamların kırmızı rengi, yalnızca bakteriyoruberin içeren halofil arkebakterilerden değil, halofil yeşil bir alg olan *Dunaliella*'nın kırmızımsı turuncu renkli yüksek içerikli β-karotene sahip olmasından dolayıdır. Her iki durumda da karotenoid pigmentler, hücrelerin fotooksidatif hasara karşı korunmasında rol oynar. *Haloferax mediterranei*'de ışığın etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, yüksek tuz

konsantrasyonlarında gelişen hücrelerin az ışığa maruz bırakıldıklarında az karotenoid içerdiğini göstermiştir. *Halobacteria* ve *Dunaliella*'daki karotenoid pigmentlerin yerleşiminde farklılıklar bulunmaktadır. Kırmızı renkli arkebakterilerde C₅₀ karotenoidleri hücre membranına yayılmış haldedir. *Dunaliella*'da ise β-karoten kloroplastın tilakoidler arası bölgesinde bulunan globüllere yerleşik durumdadır. Yerleşimdeki bu farklılık pigmentlerin gözle görülebilir özelliklerini etkiler (Oren, 1994; Tonosaki ve diğ., 1984; Stoeckenius, 1985).

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

Çeşitli halofil arkebakterilerin diğer halofil arkebakterilerin büyümesini inhibe eden ve tuza ihtiyaç duyan bakteriyosinleri (halosinler) ürettiği bulunmuştur. Halosinlerin iyonik dengesizliğe ve hücre ölümüne yol açtığı bilinir. Birçok halofil arkebakteri halosin salgılar ve en az 15 halosin grubu tespit edilmiştir. *Haloferax mediterranei* tarafından salgılanan ve *Halobacterium halobium*'u inhibe eden Halosin H4 ayrıntılı olarak incelenmiştir (Oren, 1994; Birbir ve diğ., 2004).

II.4. PROTEAZ ENZİMİ

Halofil arkebakterilerin derilerde bozunmaya yol açan en önemli ekstraselüler enzimlerinden biri olan proteazlar, proteinlerin hidrolizini katalizleyen parçalayıcı enzimlerdir ve proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizler.

Proteazlar, hem fizyolojik hem de ticari alandaki uygulamalarıyla ilgili olarak önemli bir enzim sınıfıdır. Proteazlar; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere 3 farklı kaynaktan elde edilirler. En iyi bilinen bitkisel kökenli proteazlar; papain, keratinaz, bromelain ve fisindir. Hayvansal kökenli proteazlar ise tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların günümüz dünyasının taleplerini karşılamadaki yetersizliği, mikrobiyal proteazlarda her geçen gün artan bir ilgiye sebep olmuştur (Rao ve diğ., 1998).

Mikrobiyal proteazlar; geniş biyokimyasal çeşitliliğe ve genetik manipulasyonlara açık olan mükemmel enzim kaynaklarıdır. Dünya çapındaki enzim satışlarının %40'ını oluşturmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalar için tasarlanan hemen hemen bütün özelliklere sahip olmaları, hızlı büyümeleri ve yetişmeleri için sınırlı alan gereksinimleri onların bitkisel ve hayvansal proteazlara tercih edilmesine sebep olmaktadır. Mikrobiyal proteazlar; bakteri, mantar, virüs ve son zamanlarda çalışılmakta olan, bizim de çalışmamızda yer alan arkebakteri kaynaklıdır (Rao ve diğ., 1998).

Proteazlar, aktif bölgelerine bağlı olarak ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar diye ikiye ayrılırlar. Ekzopeptidazlar, substratın amino yada karboksil uçlarının yakınındaki peptid bağlarını kırar. Endopeptidazlar ise substrat uçlarının uzağındaki iç bölgedeki peptid bağlarını kırar. Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruplara göre de serin proteaz, aspartik proteaz, sistein proteaz ve metaloproteaz olmak üzere dörde ayrılmaktadır. Ayrıca aktiviteleri için ATP gerekli olan ATP'ye bağlı proteazlar da vardır (Rao ve diğ., 1998).

Proteazlar; protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlemesi, tümör büyümesi ve çoğalması, zimojenlerin aktivasyonu, öncü proteinlerden aktif peptidin ve hormonların salınımı, membrana salgı proteinlerinin taşınması, iltihaplanma gibi çok çeşitli kompleks fizyolojik fonksiyonları yerine getirmektedir. Hücre içi proteazlar, metabolizmanın düzenlenmesinde kritik bir rol oynarken, hücre dışı proteazlar hücrenin absorpsiyonu için büyük proteinlerin küçük moleküllere hidrolizini katalizler. Proteazlar, deterjanlarda, tıbbi uygulamalarda, deri, gıda ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rao ve diğ., 1998).

Halobakteriler proteinlerden, peptidlerden ve amino asitlerden yararlanmak için hızlı ve verimli bir metabolizma geliştirmiştir. Halofil gurubundan birçok hücre dışı proteaz izole edilmiş ve sınıflandırılmıştır. Bu enzimler aktivite ve kararlılık için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyacı olan serin proteazlardır (Izotova ve diğ., 1983; Stepanov ve diğ., 1992).

Araştırmacılar, proteaz üreten aşırı halofil arkebakterinin işlenmiş deri yüzeylerinin süet tarafında açık renkli lekelerle neden olduğunu göstermişlerdir (Bitlisli ve diğ., 2004). Elektron mikroskop çalışmaları, aşırı halofil arkebakterinin

kollagen liflerini tahrip ettiğini ve üç hafta içerisinde süngerimsi keseciklerin oluşmasına neden olduğunu göstermiştir (Vreeland ve diğ., 1998).

II.5. DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARI

Pek çok araştırmacı, gıda sanayi gibi çeşitli endüstrilerde, tıpta ve endüstriyel uygulamalarda mikroorganizmaların doğru akımla öldürülmesi ile ilgili pek çok çalışma yapmıştır. Sıvıdan geçen düşük seviyeli alternatif akım ile sütün ve içme suyunun sterilize edilebildiği gösterilmiştir (Anderson ve Finkelstein, 1919; Beattle ve Lewis, 1925; Prescott, 1927). Doğru ve alternatif elektrik akımlarının sentetik idrarda (Davis ve diğ., 1991), suda (Patermarakis, 1990), tuz çözeltilerinde (Pareilleux ve Sicard, 1970) ve insan derisi üzerinde (Bolton ve diğ., 1980; Davis ve diğ., 1994; Liu ve diğ., 1997) bakterisit etkisi olduğu gösterilmiştir. Bakterilerin doğru elektrik akımla öldürülmesi tıpta da görülen bir uygulamadır, düşük seviyeli elektrik uygulaması kataterlere yapışan mikroorganizmaların öldürülmesi için de kullanılmıştır (Liu ve diğ., 1993).

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

Çalışmamız şu aşamalardan oluşmuştur:

1. Proteolitik aşırı halofil arkebakteri kültürlerinin hazırlanışı,
2. Farklı kaynaklardan elde edilen aşırı halofil arkebakteri suşlarının proteaz aktivitelerinin saptanması,
3. Proteaz üreten aşırı halofil arkebakterilerin 0.5 A'lık doğru elektrik akımı ile inaktivasyonu ve rf değerlerinin hesaplanması,
4. 0.5 A doğru elektrik akımı uygulaması öncesi ve sonrası proteaz aktivitelerinin ölçülmesi.

III.1. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

III.1.1. Kullanılan Besiyerleri

III.1.1.1. Sıvı Jelatin Besiyeri

CaCl ₂ .6H ₂ O.....	0.2 g
KCl.....	2 g
Maya özütü.....	5 g
Tripton.....	5 g
Jelatin.....	20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20 g
NaCl.....	250 g
Distile su.....	1000 g
pH	7.0

121 °C'de otoklavda 15 dak. steril edilmiştir.

III.1.1.2 Katı Jelatin Besiyeri

CaCl ₂ .6H ₂ O.....	0.2 g
KCl.....	2 g
Maya özütü.....	5 g
Tripton.....	5 g
Jelatin.....	20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20 g
Agar.....	20 g
NaCl.....	250 g
Distile su.....	1000 g
pH	7.0

121 °C'de otoklavda 15 dak. steril edilmiştir.

III.1.2. Kullanılan Çözeltiler

III.1.2.1. %25 NaCl İçeren Steril Tuzlu Su Çözeltisi

NaCl.....25 g
Distile su.....100 ml

III.1.2.2. % 1'lik Kazein Çözeltisi

Kazein.....1 g
0.01 N NaOH.....50 ml
Distile su.....40 ml
Tris.....5 ml
H₃PO₄.....5 ml
pH.....7.8

III.1.2.3. % 10'luk Trikloroasetik Asit Çözeltisi

Trikloroasetik asit.....10 ml
Distile su.....100 ml

III.1.3. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	: Shimadzu Uv- Visible, Double Beam Spektrophotometer Uv-1601, Japonya
Spektrofotometre Küvetleri	: Helma, Japonya
Hassas Terazi	: Sartorius Analitik Terazi, Dijital, Almanya.
Su Banyosu	: Clifton Digital Shaker Bath, 0-100 ⁰ C İngiltere.

Vorteks Karıştırıcı	: Fisons Whirli Mixer, İngiltere.
Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı	: Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı, Hs31 İngiltere.
pH Metre	: Sartorius Professional Meter PT-10 P, Almanya; LCS LD 108 Dijital pH metre, Almanya.
Etüv	: Gen Lab Midi/2/Al, 0-100 ⁰ C İngiltere, Nuve En500 etüv.
Otomatik Pipetler	: Volac Digital mikropipeter, İngiltere
Hamilton Pipetler	: Hamilton, ABD.
Otoklav	: Web MLW otoklav, Almanya.
Buzdolabı	: Arçelik, Türkiye.
Distile Su Cihazı	: GFL

III.1.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum klorür, magnezyum klorür, potasyum klorür, maya özütü, agar, kalsiyum klorür, tripton, jelatin, tris, sodyum hidroksit, hidrojen fosfat, trikloroasetik asit, kazein.

III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

III.2.1. Proteolitik Aşırı Halofil Arkebakteri Kültürlerinin Hazırlanışı

Katı jelatin besiyeri kaynatılarak eritilmiş ve pH 7.0'a ayarlanmıştır. 121⁰C'de 15 dakika otoklavda steril edilerek aseptik koşullarda steril petrilere dökülmüştür. Tuzköy Tuz Madeni'nden, Tuz Gölü'nden, Tuz Gölü'nün tuzlaları olan Kaldırım Tuzlası'ndan ve Kayacık Tuzlası'ndan ayrımı yapılan aşırı halofil arkebakteri izolatları katı jelatin besiyerine azaltma yöntemiyle ekilerek 40⁰C'de 21 gün süre ile bekletilmiştir (Birbir ve Sesal, 2003; Birbir ve diğ., 2001; Birbir ve diğ., 2004).

Tuz Gölü'nün 3., 4., 6. ve 7. bölgelerinden izole edilen 7; Kaldırım Tuzlası'nın 1., 3., ve 4. bölgelerinden izole edilen 7; Kayacık Tuzlası'nın 3. ve 4. bölgelerinden izole edilen 4; Tuzköy Tuz Madeni'nin 1., 2. ve 3. bölgelerinden izole edilen 6 izolatla çalışılmıştır.

III.2.2. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının Proteaz Aktivitelerinin Saptanması

Katı jelatin besiyerinde üreyen pozitif proteaz aktivitesi gösteren farklı kaynaklara (Tuz Gölü, Kaldırım ve Kayacık Tuzlaları, Tuzköy Tuz Madeni) ait aşırı halofil arkebakteri suşlarından steril öze ile koloniler alınarak ayrı ayrı steril 600 ml'lik sıvı jelatin besiyerlerine ekilmiştir. Bu besiyerleri 40⁰C'de etüvde 21 gün boyunca bekletilmiş ve aşırı halofil arkebakteri suşların üremesi sağlanmıştır. Sonra da bu suşların proteaz aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca her tuz kaynağından yüksek proteaz aktivitesi gösteren iki suş karıştırılarak proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

Suşların proteaz aktiviteleri, Drapeau (1974) tarafından belirtilen kazein sindirme metoduna göre ölçülmüştür. Bir ünite proteaz aktivitesi; 37⁰C sıcaklıkta, pH 7.8'de, A₂₈₀'de dakikada 0.001 absorbans değişikliği yapan asit çözünen fregmanların çıkmasına neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Proteaz

aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (www.worthington-biochem.com/STAMP/default.html).

$$\ddot{U}nite = [A_{280} (\ddot{o}rnek) - A_{280} (kör)] / 10$$

Her bir tube 5 ml %1 kazein cozeltisinden koyup 37⁰C’de su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 20 µl halofil arkebakteri kültüründen eklenip vorteksle karıştırılmıştır. 10 dakika sonra da 5 ml TCA (Trikloroasetik asit) konulup reaksiyona son verilmiştir. Tüpler tekrar karıştırılıp 10 dakika sonunda süzülmüştür. Spektrofotometrede süzüntülerin 280 nm’de absorpsanları olculmuştur. Kör olarak kazein dışındaki tampon cozeltisi kullanılmıştır.

III.2.3. Proteaz Üreten Ařırđ Halofil Arkebakterilerin 0.5 A’lik Doğru Elektrik Akımı ile İnaktivasyonu ve Rf Değerlerinin Hesaplanması

Bu calışmada her kaynaktan iki izolat olmak üzere yüksek proteaz aktivitesi gösteren 600 ml sıvđ jelatin besiyerinde üremiş olan izolatlar (10⁶ kob/ml) kullanılmıştır. Yüksek proteaz aktivitesi gösteren aynı tuz kaynağına ait iki farklı izolattan 100’er ml alınarak steril bir beherde birleştirilip iyice karıştırılmıştır. Bu sıvđ jelatin besiyerlerinin sıcaklığı 20⁰C’ye getirilmiş ve bu besiyerlere 20 dakika boyunca 0.5 A’lik doğru elektrik akımı uygulanmıştır. Bu calışmada kullanılan elektrokimyasal elektroliz düzeneği, iki platin tel elektrottan oluşmuştur. Her iki elektrot da 1 mm capında ve 80 mm uzunluğunda olup aralarında 40 mm boşluk bırakılmıştır. Elektrotlar, 0-60 V arasında otomatik değişebilir cıkış voltajına ve 0 ile 6 A kullanıcı-secimli akım değerine sahip doğru akım kaynağına (Kenwood, PD56-10AD, Japan) bağlanmıştır. Elektrik uygulamasının öncesinde 1, 3, 5, 10, 15, 20 dakikalarında sıvđ jelatin besiyerinden 0.1 ml alınarak 9.9 ml %25 steril tuzlu suyla karıştırılmıştır. Bu seyreltme işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır (seyreltme faktoru 10⁻⁴). Doğrudan ve tüm seyreltme faktörlerinden 100 µl alınarak 1, 3, 5, 10,

15, 20 dakika sonunda jelatin agar besiyerine steril cam baget yardımıyla aseptik şartlar altında plağa yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Aynı sürelerde sıvı jelatin besiyerinin sıcaklık ve voltaj değişimleri ölçülmüştür. Ekim yapılan petriyerler 40°C'de 2 ay boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda jelatin agar besiyerinde üreyen koloniler sayılarak seyreltme katsayısı ile çarpılmış ve 1 ml'deki toplam bakteri sayısı hesaplanmıştır. Her bir uygulama için Log₁₀ azaltma faktörü (rf) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Park ve diğ., 2003; Birbir ve Birbir, 2006).

$$rf = \log_{10}n_c - \log_{10}n_d$$

n_c = Deney öncesi sıvı jelatin besiyerindeki aşırı halofil arkebakteri sayısı (kob/ml)

n_d = Deney sonrası sıvı jelatin besiyerindeki aşırı halofil arkebakteri sayısı (kob/ml)

III.2.4. 0.5 A Doğru Elektrik Akımı Uygulaması Öncesi ve Sonrası Proteaz Aktiviteleri

Bu çalışmada her kaynaktan iki izolat olmak üzere yüksek proteaz aktivitesi gösteren 600 ml jelatin sıvı besiyerinde üremiş olan (10⁶ kob/ml) izolatların hem ayrı olarak hem de karışımlarına (200ml) 20 dakika süre ile 0.5 A'lık doğru elektrik akımı verilmiştir. Sıvı jelatin besiyerlerinden 1, 3, 5, 10, 15, 20 dakika sonunda 1'er ml alınarak proteaz aktiviteleri ölçülmüştür (Drapeau, 1974).

Bu çalışmadaki tüm deneyler çift çalışılarak yapılmıştır.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

Aşırı halofil arkebakteri suşları, pH'ı 7 olan %25 tuz içeren sıvı jelatin besiyerinde üretilerek kazein sindirme metodu ile spektrofotometrik olarak proteaz aktiviteleri ölçülmüştür. Bu çalışmada, Tuz Gölü'nün, Kaldırım Tuzlası'nın, Kayacık Tuzlası'nın ve Tuzköy Tuz Madeni'nin hem aynı hem de farklı bölgelerinden izole edilen aşırı halofil arkebakteri izolatları ile çalışılmıştır. Tuz Gölü'nün 3., 4., 6. ve 7. bölgelerinden izole edilen 7 izolatın proteaz aktiviteleri 80.0-83.3 Ünite, Kaldırım Tuzlası'nın 1., 3. ve 4. bölgelerinden izole edilen 7 izolatın proteaz aktiviteleri 81.1-83.8 Ünite, Kayacık Tuzlası'nın 1. ve 2. bölgelerinden izole edilen 4 izolatın proteaz aktivitesi 83.3-84.4 Ünite, Tuzköy Tuz Madeni'nin 1., 2. ve 3. bölgelerinden izole edilen 6 izolatın proteaz aktiviteleri ise 82.0-83.4 Ünite olarak ölçülmüştür. Çalıştığımız izolatlar arasında en düşük proteaz aktivitesi 1TL7 izolatına ait olup 80.0 Ünitedir, en yüksek değer ise 2KS3 izolatına aittir ve 83.8 Ünitedir. Hem farklı hem de aynı bölgeden izole edilen aşırı halofil arkebakteri izolatlarının proteaz aktivitelerinin birbirine yakın değerler olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo IV.1'de verilmiştir.

Tablo IV.1.: Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni'nden İzole Edilen Aşırı Halofil Arkebakteri Suşlarının Proteaz Aktiviteleri

Suşun İzole Edildiği Tuz Kaynağı	Suş Adı	Proteaz Aktivitesi (Ünite)
Tuz Gölü	1TL3	82.1
	1TL4	83.3
	2TL4	83.2
	3TL4	83.3
	2TL6	82.6
	4TL6	83.0
	1TL7	80.0

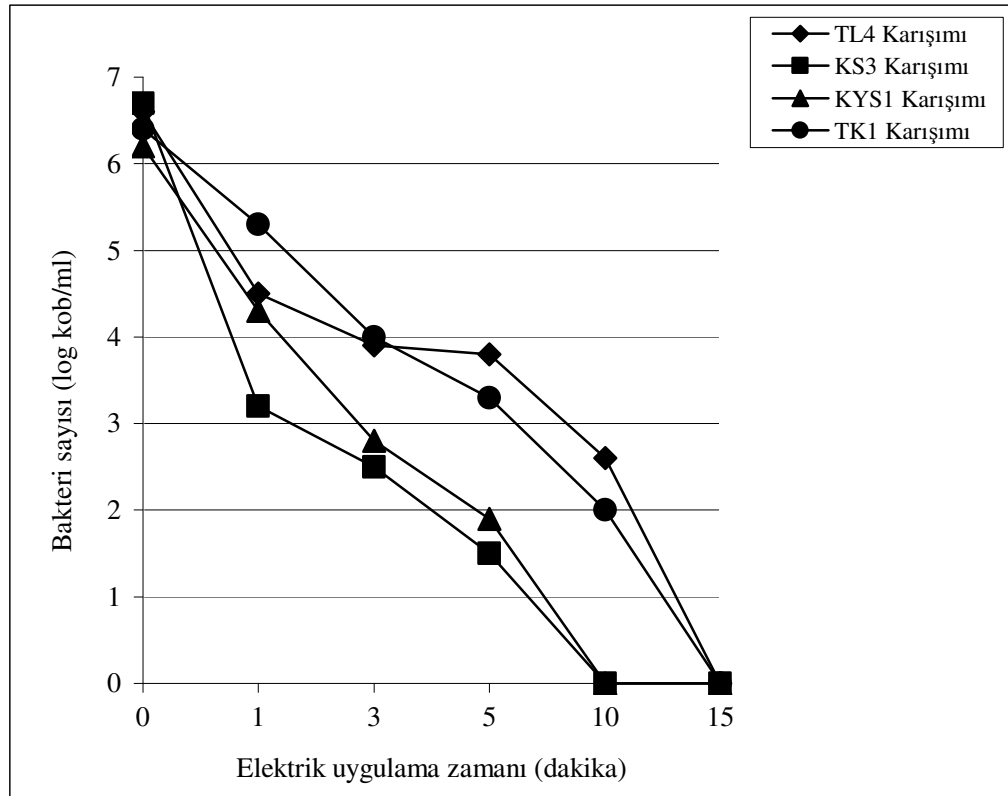
Kaldırım Tuzlası	1KS1	82.0
	2KS1	82.6
	1KS3	83.7
	2KS3	83.8
	2KS4	82.1
	3KS4	83.6
	4KS4	81.1

Kayacık Tuzlası	1KYS1	83.4
	2KYS1	83.4
	3KYS1	83.3
	1KYS2	83.3

Tuzköy Tuz Madeni	2TK1	83.4
	3TK1	83.3
	4TK1	83.0
	2TK2	83.2
	2TK3	83.2
	3TK3	82.0

0.5 A doğru elektrik akımının karışık aşırı halofil arkebakteri popülasyonuna olan etkisi Şekil IV.1’de gösterilmiştir. Akım uygulamasının başlaması ile Tuz Gölü (6,602 log kob/ml) ve Tuzköy Tuz Madeni (6.447 log kob/ml) proteolitik izolatları karışımı bakteri sayısı yavaş yavaş azalmış 15 dakika sonunda tamamen sıfırlanmıştır. Kaldırım (6.672 log₁₀ kob/ml) ve Kayacık (6.230 log₁₀ kob/ml) Tuzlaları proteolitik izolatları karışımlarının bakteri sayılarını sıfırlamak için 10 dakika yeterli olmuştur.

Şekil IV.1.: Sıvı Jelatin Besiyerindeki Proteolitik Aşırı Halofil Arkebakteri Karışımına 0.5 Amper Doğru Elektrik Akımının Etkisi



Ayrıca, karışık aşırı halofil arkebakterilere 20 dakika 0.5 A doğru elektrik akımı uygulaması süresince sıcaklık, voltaj ve rf değerleri ölçülmüştür. Dört farklı karışıma 0.5 A doğru elektrik akımı uygulanması sırasında, deney öncesi 20⁰C olan sıcaklık, bakteri popülasyonu tamamen öldüğünde Tuz Gölü'nün ve Kayacık Tuzlası'nın proteolitik izolatlarının karışımının sıcaklığı 29⁰C'ye çıkarken Kaldırım Tuzlası'nın proteolitik izolatları karışımının 25⁰C'ye, Tuzköy Tuz Madeni'nin proteolitik izolatları karışımının 27⁰C'ye çıkmıştır. Gerilim seviyeleri, bakteri popülasyonunun azalması ile doğru orantılı olarak düşme göstermiş bakteriler öldüğünde ise artmaya başlamıştır. Rf değerleri ise bakterilerin ölümü ile en yüksek değere ulaşmıştır. Bu değere, Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madeni proteolitik suşları karışımları için 15 dakika, Kaldırım ve Kayacık proteolitik suşları karışımı için ise 10 dakikada ulaşılmıştır. Bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo IV.2'de gösterilmiştir.

Tablo IV.2.: 0.5 A Doğru Elektrik Akımının 20 Dakikalık Süre ile Uygulandığı Sıvı Jelatin Besiyerlerindeki Sıcaklık, Voltaj ve Aşırı Halofil Arkebakterilerin Rf Değerleri

Uygulama Süresi (dak)	Tuz Gölü'nün Proteolitik Suşları Karışımı (6.602)*			Kaldırım Tuzlası'nın Proteolitik Suşları Karışımı (6.672)			Kayacık Tuzlası'nın Proteolitik Suşları Karışımı (6.230)			Tuzköy Tuz Madeni'nin Proteolitik Suşları Karışımı (6.447)		
	Voltaj	°C	rf	Voltaj	°C	rf	Voltaj	°C	rf	Voltaj	°C	rf
Deney Öncesi	-	20	-	-	20	-	-	20	-	-	20	-
1	4.5	20	2.125	5.0	20	3.502	5.0	20	1.929	4.5	20	1.146
3	4.4	24	2.699	4.8	22	4.128	4.8	21	3.385	4.4	21	2.406
5	4.3	25	2.757	4.6	23	5.195	4.7	22	4.330	4.2	22	3.146
10	4.2	26	4.034	5.0	25	6.672	5.0	29	6.230	4.0	24	4.493
15	4.5	29	6.602	5.0	27	6.672	5.0	31	6.230	4.5	27	6.447
20	4.9	31	6.602	5.0	31	6.672	5.0	33	6.230	4.9	30	6.447

* = Arkebakteri sayılarının deney öncesi Log₁₀ değerleri

Seçtiğimiz sekiz izolatuñ ayrı ayrı ve karışımlarına 0.5 A'lik doğru elektrik akımı uygulaması sırasında 1., 3., 5., 10., 15. ve 20. dakika sonunda proteaz aktiviteleri ölçülmüştür. Deney sonunda proteaz aktivitelerinde çok az bir düşme görülmüştür. Bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo IV.3'te verilmiştir.

Tablo IV.3.: 0.5 A Doğru Elektrik Akımı Uygulaması Öncesi ve Sonrası Proteaz Aktiviteleri

Uygulama zamanı (dak)	1TL4	3TL4	TL4 Karışımı	1KS3	2KS3	KS3 Karışımı	2KYS1	3KYS1	KYS1 Karışımı	2TK1	3TK1	TK1 Karışımı
Deney öncesi	83.3*	83.3	83.0	83.7	83.8	83.5	83.4	83.3	83.0	83.4	83.3	83.1
1	82.9	82.2	82.7	83.6	83.0	82.0	83.0	83.0	82.3	83.1	81.1	82.0
3	82.8	82.2	82.4	83.0	82.9	81.7	82.5	82.7	81.9	83.0	80.8	81.1
5	82.7	81.5	82.0	82.6	82.5	81.6	82.1	82.4	81.9	82.5	80.5	81.0
10	82.4	81.5	81.3	81.6	80.1	81.0	81.5	82.0	81.5	82.4	80.4	80.8
15	82.3	81.3	81.2	80.3	80.0	80.5	81.0	81.3	81.0	82.2	80.0	80.0
20	82.1	81.0	81.1	80.2	80.0	80.4	81.0	81.2	81.0	82.1	80.0	80.0

* = Proteaz aktiviteleri Ünite cinsinden verilmiştir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

Tuzun içerisindeki aşırı halofil arkebakteri sayıları ideal gelişme ortamı bulunduğu zaman artabilir. Kan, gübre ve organik madde içeren tuzlanmış deriler halofil arkebakteriler için ideal bir gelişme ortamıdır. Bailey ve Birbir (1993), tuzlu suyla korunmuş derilerin 1 gramındaki halofil arkebakteri sayılarının 10^5 - 10^8 kob/g olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar ABD'den toplanan 131 adet tuzlu suyla korunmuş derilerin %98'inin aşırı halofil bakteri içerdiğini belirtmişlerdir. Bu derilerden 332 aşırı halofil bakteri suşu izole edilmiş ve bu suşların %94'ünün proteaz pozitif olduğu açıklanmıştır (Bailey ve Birbir, 1993). Diğer bir çalışmada ise 35 adet Fransız ve Rus derilerinin %91'inin aşırı halofil bakteri içerdiği saptanmıştır. İncelenen derilerden 85 aşırı halofil bakteri suşu izole edilmiş ve bu suşların %67'sinin de proteaz pozitif olduğu gösterilmiştir (Birbir, 1997). Bitlisli ve arkadaşları (2004), tuzlanmış koyun derilerinde 10^6 - 10^7 kob/g halofil bakteri bulduklarını açıklamışlardır. Bu halofil bakterilerin %53-74'ünün proteolitik aktivite, %47-62'sinin ise lipolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Bitlisli ve diğ., 2004). Araştırmacılar derilerin aşırı halofil bakteri içermeyen tuzla muhafaza edildiğinde ve buzdolabı ısısında depolanıp taşındığında derilerde zarar oluşamayacağını ancak deriler işlem görmemiş tuzla korunduklarında ve oldukça yüksek depolanma ısılarında olduğunda veya nemli atmosferde depolandıklarında deriler üzerinde aşırı halofil arkebakterilerin gelişerek derilerde zararlar oluşturacaklarını bildirmişlerdir (Bailey ve Birbir, 1996). Proteolitik aşırı halofil bakterileri içeren tuz, deri korunmasında kullanıldığı zaman bu mikroorganizmalar yüksek ısılarda depolanan derilerin sırça yüzeyini sindirerek oldukça önemli ölçüde zarara yol açarlar (Bailey ve Birbir, 1996). Araştırmacılar 41°C 'de 7 hafta

depolanmış tuzlu suyla korunmuş derilerde sırça hasarı görülebileceğini yaptıkları çalışmalar ile ispatlamışlardır ve aşırı halofil bakterilerin sebep olduğu süet görünümündeki sırça zararının çıplak gözle ve elektron mikroskopuyla kolayca görülebildiğini belirtmişlerdir (Bailey ve Birbir, 1996). Ayrıca diğer araştırmacılar tuzlanmış koyun derilerinde mikroorganizma faaliyetinden dolayı işlenmiş çift taraflı derilerin süet yüzeyinde açık lekeli, kusurlu bölgelerin oluştuğunu bildirmişlerdir ve deriler üzerinde böyle bölgelerin %35 oranında bulunduğunu saptamışlardır (Bitlisli ve diğ., 2004).

Vreeland ve arkadaşları (1998), 2 saat süre ile tuzla korunmuş derilerde kızışmaya yol açan olaylar dizisini incelemişlerdir. Elektron mikroskobu ile yapılan araştırma sonuçları kızışma olayının gözle fark edilmeden önce halofil bakteri hasarının deri yüzeyinde oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca halofil bakterilerin dermis tabakasındaki kıl foliküllerine yerleşerek 3 hafta içinde zarar oluşturduğu saptanmıştır. Halofil bakterilerin kollagen liflerini tamamen harap ettiği ve deri içinde süngere benzer veziküller ürettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, derilerin tuzlu suyla korunmaları esnasında bakterisitler kullanmışlardır (Vivian ve diğ., 1969; Hendry ve diğ., 1971; Birbir ve diğ., 2001). Etkili bakterisitler (Birbir ve diğ., 2001; Weiss ve diğ., 1984; Mitchell ve diğ., 1987), safra tuzları (Vreeland ve diğ., 1999), aşırı halofil bakteriler tarafından üretilen halosinler gibi doğal antimikrobiyal maddeler (Birbir ve diğ., 2004) derilerin tuzlu suyla korunmaları esnasında olan halobakteriyel zararı önlemek için önerilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda bakterisitlerin kullanımında sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunlar bakterisitlerin toksik etkilerinden, devamlı ve gelişigüzel kullanımlarına bağlı olarak bakterilerin direnç geliştirmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bakterisitler yağ emülsiyonu olduklarından dolayı oldukça yüksek miktarda tuz içeren salamura sıvılarında bakterisitlerin yapıları bozulmaktadır. Bu sebepten halofil bakteriler üzerine etkili olamamaktadırlar (Kallenberger ve diğ., 1985). Bu nedenle, deri korunmasında kullanılan tuzlu su çözeltileri içerisinde gelişen aşırı halofil bakterileri inaktive etmek için oldukça ucuz, etkili ve kolay uygulanabilen bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok araştırmacı, çeşitli alanlarda farklı mikroorganizma türlerini inaktive etmek için doğru elektrik akımını kullanmıştır. Yapılan çalışmalarda *E. coli*, *P. aeruginosa* IFO 2689 (Tokuda ve Nakanishi, 1995), *E. coli* IFO 3301 (Venkitanarayanan ve diğ., 1999), kükürdü okside eden bakteriler, *Thiobacillus*

ferrooxidans, asidofilik heterotrof *Acidiphilium SJH* (Jackman ve diğ., 1999), *L. monocytogenes* (Ye ve diğ., 2001), *Vibrio parahaemolyticus* (Park ve diğ., 2004) gibi farklı mikroorganizmaları öldürmek için çeşitli seviyelerde doğru elektrik akımı kullanılmıştır. Perkütan paslanmaz çelik implantlardaki enfeksiyonları önlemek için paslanmaz ameliyat aletlerine tutunan stafilokokları ayırabilmek için elektrik akımının etkili olduğunu bildirmişlerdir. 60 ile 100µA doğru akım ve 60 ile 100µA'in blok akımları 200 dakika süre ile etüvde inkübe edilen *S.epidermidis* biyofilminin ayrılması için 360 dakika ayrı ayrı uygulanmıştır. Aynı deney şartları altında 100µA doğru akımın %78'lik bir ayrılmaya sebep olurken 100µA blok akım sadece %31 ayrılmaya neden olmuştur (Borden ve diğ., 2004). Aktive edilmiş biyofilmlerdeki nitrifikasyon yapan bakteriler poliprilen paketleme sistemi üzerine immobilize edilmişlerdir ve bu bakteriler 2.5-5 A/m² doğru elektrik akımı ile inaktive edilmiştir (Li ve diğ., 2001).

Halobacterium halobium, *Natronococcus occultus*, *Natrialba magadii*, *Haloferax volcanii*, *Halobacterium salinarium*, *Haloferax mediterranei* ve *Haloarcula marismortui* gibi pek çok halofil arkebakterinin hücre dışı ortama proteolitik enzimleri salgıladığı bilinmektedir (Norberg ve Hofstein, 1969; Izotova ve diğ., 1983; Kamekura ve diğ., 1996; Kim ve Dordick, 1997; Studdert ve diğ., 1997; Marhuenda-Egea ve diğ., 2001; Elsztein ve diğ., 2001; Studdert ve diğ., 2001; Stepanov ve diğ., 1992).

Araştırmacılar 172 P1 suşu tarafından üretilen subtilisin benzeri olan bu halofil proteazı (halolisin) saflaştırıp sınıflandırmışlardır ve halolisinin genini klonlayıp başka bir halofil bakteri olan *Haloferax volcanii*'de tanımlayarak nükleotid dizisini tayin etmişlerdir (Kamekura ve Seno, 1990; Kamekura ve diğ., 1992). Halofil arkebakteri olan *Natrialba magadii*'den salgılanan bir serin proteaz logaritmik üreme fazının sonunda izole edilmiştir. Bu proteazın jelatin ve kazein gibi büyük proteinleri hidrolize ettiği açıklanmıştır (Gimenez ve diğ., 2000). Ryu ve arkadaşları (1994) aşırı halofil *Halobacterium halobium* tarafından salgılanan hücre dışı proteazı izole edip kısmen saflaştırmışlardır. Franzetti ve arkadaşları (2002) da tetrahedral yapıda olan bir proteaz kompleksini aşırı halofil arkebakteri olan *Haloarcula marismortui*'den izole etmişlerdir.

Birbir (2004), Tuz Gölü'nden, Kaldırım Tuzlası'ndan, Kayacık Tuzlası'ndan ve Tuzköy Tuz Madeni'nden izole ettiği aşırı halofil arkebakterilerin büyük bir çoğunluğunun proteaz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada kullanılan suşların daha önce yapılan çalışmalarla *Haloarcula* (3TL4, 2KYS1, 3TK1), *Halorubrum* (1TL4, 1KS3), *Natrinema* (2KS3, 2TK1) ve *Halobacterium* (3KYS1) cinslerine ait olduğu fenotipik karakteristiklerine, polar lipid içeriklerine, antibiyotik hassasiyetlerine ve filogenetik analizlere göre saptanmıştır (Birbir ve diğ., 2004; Birbir ve diğ., 2007).

Dört farklı kaynaktan elde edilen test suşlarının yaptığımız deneyler sonucunda proteaz aktivitelerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür (Tablo IV.1). Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni suşlarının proteaz aktiviteleri sırası ile; 80.0-83.3, 81.1-83.8, 83.3-84.4, 82.0-83.4 Ünite bulunmuştur. Test suşlarının proteaz aktiviteleri sonuçlarına göre bu suşların izole edildikleri kaynağın proteaz aktivitesi açısından çok önemli olmadığı ve her bir suşun potansiyel proteolitik aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo IV.1). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda proteaz aktiviteleri de bizim bulduğumuz aktivitelerle paralellik göstermektedir (Dodia ve diğ., 2006, Vidyasagar ve diğ., 2006, Karbalei-Heidari ve diğ., 2007).

Birbir ve Birbir, (2006) 0.5 A seviyesindeki doğru elektrik akımının Tuz Gölü'nden izole edilen farklı türde proteaz ve lipaz üreten aşırı halofil arkebakterileri 20 dakikada öldürdüğünü tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda sıvı jelatin besiyerindeki aşırı halofil arkebakterileri öldürmek için 0.5A doğru elektrik akımı kullanılmıştır. Araştırmacılar, Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni'nden alınan tuz örneklerinde aşırı halofil arkebakteri sayısının 10^3-10^5 kob /ml, 10^5 kob /ml, 10^5 kob /g, 10^5-10^6 kob /g olduğunu tespit etmişlerdir (Bibir ve Sesal, 2003; Birbir ve diğ., 2001; Birbir ve diğ., 2004). Bu nedenle sıvı jelatin besiyerindeki aşırı halofil arkebakteri sayısı yüksek bir popülasyon sayısına ayarlanmıştır (10^6 kob/ml).

0.5 A doğru elektrik akımı ile 5 dakikalık bir uygulamadan sonra Tuz Gölü'nün karışık proteolitik suşları için rf değerleri çok düşük ($2.76 \log_{10}$), Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni'nin karışık proteolitik suşları için orta ($4.33-3.15 \log_{10}$), Kaldırım Tuzlası'nın karışık proteolitik suşları için oldukça yüksek ($5.20 \log_{10}$) olarak bulunmuştur (Tablo IV.2). Karışık proteolitik suşların 0.5 A doğru elektrik

akımla muamelesi sonuçlarına göre Kaldırım Tuzlası'nın suşlarının rf değerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kaldırım Tuzlası'nın karışık proteolitik suşları 23°C'de 5 dakikalık doğru akım uygulamasından sonra rf değeri 5.2 log₁₀ kob/ml olurken Kayacık Tuzlası'nın suşlarının rf değerinin 4.33 log₁₀ kob/ml olduğu belirlenmiştir (Tablo IV.2). 10 dakika 0.5 A doğru elektrik akımına maruz bırakılan Tuz Gölü'nün karışık proteolitik suşlarının rf değerinin 4.03 log₁₀ kob/ml, Tuzköy Tuz Madeni'nin karışık proteolitik suşlarının rf değerinin ise 4,49 log₁₀ kob/ml olduğu görülmüştür (Tablo IV.2). Bu sonuçlara göre, Kaldırım ve Kayacık Tuzlası'nın suşları 0.5 A doğru elektrik akımının öldürücü etkisine karşı daha duyarlı bulunmuştur.

Sıvı jelatin besiyerine 0.5 A doğru elektrik akımı uygulaması sırasında gerilim seviyeleri ve sıcaklık değişimleri de ölçülmüştür. Deney öncesinde tüm karışımların sıcaklığı 20°C iken 15 dakika sonunda Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madeni proteolitik suşları karışımlarının sıcaklıkları sırasıyla 29°C ve 27°C'ye; 10 dakika sonunda ise Kaldırım Tuzlası'nın ve Kayacık Tuzlası'nın proteolitik suşları karışımlarının sıcaklıkları ise sırasıyla 25°C ve 29°C'ye çıkmıştır (Tablo IV.3). Gerilim seviyeleri, karışımlardaki bakteriler tamamen ölene kadar azalmış, daha sonra da artmaya başlamıştır (Tablo IV.3). Bu önemli bulgu deri endüstrisinde, salamura sıvılarındaki bakterilerin öldükleri zamanları tayin etmede kullanılabilir.

Ayrıca çalışmamızda, Tuz Gölü (1TL4, 3TL4 ve karışımı), Kaldırım (1KS3, 2KS3 ve karışımı) ve Kayacık (2KYS1, 3KYS1 ve karışımı) Tuzları ve Tuzköy Tuz Madeni'nin (3TK1, 2TK1 ve karışımı) aynı bölgelerinden izole edilen proteolitik aşırı halofil arkebakterilerin ürettikleri proteaz üzerine 0.5 A doğru elektrik akımının etkisi 20 dakika süre ile incelenmiştir. Uygulama sırasında 0.5 A doğru elektrik akımının bu suşların proteaz aktivitesini çok az düşürdüğü saptanmıştır. Bu nedenle, bu mikroorganizmaların proteazlarını deri salamura sıvılarına salgılamadan önce öldürülmeleri gerektiği gözlenmiştir (Tablo IV.3).

Elektrik akımından sonra bakterisit etkinin H₂O₂, oksitleyici radikaller ve klor moleküllerinden ötürü olduğu bildirilmiştir (Prescott, 1927; Pareilleux, 1970). Doğru elektrik akımı NADH gibi koenzimlerin ve enzimlerin oksitlenmelerine neden olmakta, membranın hasar görmesi ile çok gerekli olan sitoplazmik bileşenler dışarıya çıkmakta ve solunum zincirinin hızı azalmaktadır (Patermarakis ve Fountoukidis, 1990).

Bu çalışmamızda, sıvı jelatin besiyerine elektrik akımı verilmesi ile klor gazı açığa çıkmıştır. Proteolitik aşırı halofil arkebakteri suşlarının inaktivasyonuna da klor moleküllerinin yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar daha önce yapılan araştırma sonuçlarını doğrulamıştır (Anderson ve Finkelstein, 1919).

Sonuç olarak, bu metod test edilen sıvı jelatin besiyerindeki aşırı halofil arkebakterileri 10 ile 15 dakikada öldürmüştür. Sonuçlar doğru elektrik akımının deri endüstrisinde salamura sıvısında proteolitik aşırı halofil arkebakteri suşlarının inaktivasyonu için alternatif bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Tüm mikroorganizmaları tamamen öldürmesi, mutant veya dirençli suş oluşturmaması, ucuz, kolay ve basit olması, antibakteriyel maddelere göre diğer mikroorganizmalara tutunmuş veya kümelenen mikroorganizmalara daha hızlı difüze olması, aşırı halofil arkebakteri suşları için rf değerinin 7 log₁₀'dan fazlasına ulaşabilmesi (Birbir ve Birbir, 2006), geri dönüşümsüz öldürme etkisine sahip olması bu metodun salamura sıvısının dezenfeksiyonu için önemli olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Anderson, A.K.; Finkelstein, R.: “A Study of the Electropure Process of Treating Milk”, *J. Dairy Sci.*, 2 (1919) 374-406.
- [2] Atlas, R.M.: “Archaeal Diversity”, *Principles of Microbiology*, 2nd Edition, Von Hoffmann Press, Inc., USA, (1997) 1057-1091.
- [3] Bailey, D.G.; Birbir, M.: “A Study of the Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine-cured Cattle Hides”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 88 (1993) 285-293.
- [4] Bailey, D. G.; Birbir, M.: “The Impact of Halophilic Organisms on the Grain Quality of Brine Cured Hides”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 91 (1996) 47-51.
- [5] Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H.: “The Prokaryotes”, Springer-Verlag, 1 (1981) 768.
- [6] Beattle, J. M.; Lewis, F. C.: “The Electric Current (Apart from the Heat Generated), a Bacteriological Agent in the Sterilization of Milk and Other Fluids”, *J. Hyg.*, 24 (1925) 123-127.
- [7] Birbir, M.; Bailey, D.G.: “Controlling The Growth of Extremely Halophilic Bacteria on Brine Cured Cattle Hides”, *JSLTC*, 84 (2000) 201-204.

- [8] Birbir, M.; Bailey, D.; “Halophilic “Bacteria on Brine Cured Hides”, *Amer. Leather Chem. Ass. Res. Liaison Comm.*, USDA, ARS, Eastern Regional Research Center, Philadelphia, USA, 4-5 May, **(1993)**.
- [9] Birbir, M.; Sesal, C.: “Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Tuz Lake in Turkey”, *Turk. J. Biol.*, 27 (7) **(2003)** 7-22.
- [10] Birbir, M.; Çalli, B.; Mertoğlu, B.; Bardavid Elevi, R.; Oren, A.; Ogmen, M.N.; Ogan, A.: “Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldırım and Kayacık Salterns”, *World J Microbiol. and Biotechnol.*, 23 **(2007)** 309-316.
- [11] Birbir, M.; Eryılmaz, S.; Ogan, A.; “Prevention of Halophilic Microbial Damage on Brine Cured Hides by Extremely Halophilic Halocin Producer Strains”, *JSLTC*, 80 **(2004)** 99-104.
- [12] Birbir, M.; Ogan, A.; Çalli, B.; Mertoğlu, B.: “Enzymatic Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey”, *World J. Microbiol. and Biotechnol.*, 20 **(2004)** 613-621.
- [13] Birbir, M.: “Examination of Proteolytic and Lipolytic Bacteria in Salt Used in Hide Conservation”, I. National Leather Symposium, Proceedings Book, **(2004)** 39-49.
- [14] Birbir, M.: “Investigation of Salt-cured France and Russian Hides for Halophilic Bacteria”, *J. Turk. Microbiol. Soc.*, 27 **(1997)** 68-73.
- [15] Birbir, M.; Elevi, R.; Sesal, C.; Vreeland, R. H.; Oren, A.: “Characteristics of Extremely Halophilic Bacteria Isolated from the Kaldırım and Kayacık Salterns of Şereflikoçhisar Salt Lake in Türkiye”, *International Conference on Halophilic Microorganisms*, Sevilla, Spain, September 23-27, **(2001)**.

- [16] Birbir, M.; Ilgaz, A.: “Isolation and Identification of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality”, *J. Soc. Leather Tec. Chem.*, 80 (1996) 147-153.
- [17] Birbir, M.; Kallenberger, E. W.; Ilgaz, A.; Bailey, D.G.: “Halophilic Bacteria Isolated from Brine-cured Cattle Hides”, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 80 (1996) 87-90.
- [18] Birbir, Y.; Birbir, M.: “Inactivation of Extremely Halophilic Hide-Damaging Bacteria via Low Level Direct Electric Current”, *J. Electrostat.*, 64 (12) (2006) 791-795.
- [19] Birbir, M.; Erdoğan, H.: “Doğal Tuzlu Ortamlarda Bulunan Halofil Bakterilerin İzolasyon Tekniklerinin Araştırılması”, *Biyoteknolojide Termofilik ve Halofil Bakteriler Sempozyumu, İzmir, British Council, Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ebiltem), Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, 27 Şubat- 01 Mart, (2002).*
- [20] Birbir, M.; Kallı, N.: “Şereflikoçhisar Tuz Gölündeki Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu” , *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu, Proje No: 6 FEN, (2000).*
- [21] Birbir, M.; Elevi, R.: “Kaldırım ve Kayacık Tuzlarından İzole Edilen Aşırı Halofil Bakterilerin Biyokimyasal Testleri ve Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları”, *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı, Fen Bilimleri, Proje No: Fen BSE-072/171001, (2005).*
- [22] Birbir, M.; Eryılmaz, S.: “ Halosin Üreten Aşırı Halofilik Bakterilerin Tespiti ve Bu Türler ile Farklı Enzimler Üreten Aşırı Halofilik Bakterilerin Kontrolü”, *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı, Fen Bilimleri, Proje No: Fen 125/081104, (2006).*

- [23] Bitlisli, B. O.; Karavana, H.A.; Basaran, B.; Sari, O.; Yasa, I.; Birbir, M.: “The Effect of Conservation Defects on the Suede Quality of Double-Face”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 99 (2004) 494-501.
- [24] Bolton, L.; Foleno, B.; Means, B.; Petrocelli, S.: “Direct-current Bactericidal Effect on Intact Skin”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 18 (1980) 137-141.
- [25] Borden, A.J. van der; Werf, H. van der; Mei, H.C. van der; Busscher, H.J.: “Electric Current-Induced Detachment of Staphylococcus Epidermis Biofilms from Surgical Stainless Steel”, *Appl. Environ. Microbiol.*, (2004) 6871-6874.
- [26] Büyük Larousse Sözlük ve Ansiklopedisi, İnterpress Basın ve Yayıncılık A. Ş., İstanbul, 23 (1992) 11774-11776.
- [27] Davis, C.P.; Shirtliff, N.M.; Trieff, N.M.; Hoskins, S.L.; Warren, M.M.: “Quantification, Qualification and Microbial Killing Efficiencies of Antimicrobial Chlorine-based Substances Produced by Iontophoresis”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (12) (1994) 2768-2774.
- [28] Davis, C. P.; Wagle, N.; Anderson, M.D.; Warren, M. M.: “Bactericidal and Fungal Killing by Iontophoresis with Long-lived Electrodes”, *Antimicrob. Agents Chem.*, 35 (1991) 2131-2134.
- [29] Didato, D.; Browen, J.; Hurlow, E.; “Microorganism Control During Leather Manufacture”, *Leather Technologists Pocket Book Chapter 20*. (M.K. Leafe ed.), The Society of Leather Technologists and Chemists, East Yorkshire , England, (1999) 339-352.
- [30] Dodia, M.S.; Rupal, H.J.; Rajesh K. Patel.; Satya, P.S.: “Characterization and Stability of Extracellular Alkaline Proteases from Halophilic and Alkaliphilic Bacteria Isolated from Saline Habitat of Coastal Gujarat, India”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (2006) 276-282.

- [31] Drapaeu, G.: “Protease from *Staphylococcus aureus*”, *Methods in Enzymology*, 45 B (ed. L. Lorand), Academic Press NY, (1974) 469.
- [32] Elsztein, C.; Seitz, M.K.H.; Sanchez, J.L.; De Castro, R.E.; “Autoproteolytic Activation of the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus occultus* Extracellular Serine Protease”, *J. Basic Microb.*, 41 (6) (2001) 319-327.
- [33] Forsyth, M.P.; Kushner, D.J.: “Nutrition and Distribution of Salt Response in Populations of Halophilic Bacteria”, *Canadian Microb.*, 16 (1970) 253-261.
- [34] Franzetti, B.; Schoehn, G.; Hernandez, J.F.; Jaquinod, M.; Ruikrog, R.W.H.; Zaccai, G.: “Tetrahedral Aminopeptidase: A Novel Large Protease Complex from Archaea”, *The EMBO Journal*, 21 (2002) 2132-2138.
- [35] Gimenez, M.I.; Studdert, C.A.; Sanchez, J.J.; De Castro R.E.: “Extracellular Potease of *Natrialba magadii*: Purification and Biochemical Characterization”, *Extromophiles*, 4 (3) (2000) 181-188.
- [36] Grant, W. D.; Kamekura, M.; Mcgenity, T. J.; Ventosa, A.: “Class III *Halobacteria* Class. Nov. Order I. *Halobacteriales*”in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria* vol. 1, D. R. Boone, and G.M. Garrity, Eds. New York: Springer-Verlag, (2001) 294-334.
- [37] Greene, R.V.; Lanyi, J.K.: “Proton Movements in Response to Light-Driven Electrogenic Pump for Sodium Ions in *Halobacterium halobium* Membranes”, *J.Biological Chem.*, 254 (1979) 10986-10994.
- [38] Hedrick, D.B.; Guckert, J.B.; White, D.C.: “Archaeobacterial Ether Lipid Diversity Analyzed by Supercritical Fluid Chromatography: Integration with a Bacterial Lipid Protocol”, *J. Lipid Res.*, 32 (1991) 659-666.

- [39] Hendry, M.F.; Cooperand, D.R.; Woods, D.R.; “The Microbiology Curing and Tanning Process”, Part IV, The Laboratory Screening of Antiseptics, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 66 (1971) 31.
- [40] İltter, M.: “Dünyada ve Türkiye’de Tuz”, (2000) 1-21.
- [41] İnandık, H.: “Türkiye Gölleri”, *İstanbul Üniversitesi Yayını* No:44, Baha Matbaası, İstanbul, (1955) 51-54.
- [42] Izotova, L.S.; Strongin, A.Y.; Chekulaeva, L.N.; Sterkin, V.E.; Ostoslavskaya, V.I.; Lyublinskaya, L.A.; Timokhina, E.A.; Stepanov, V.M.: “Purification and Properties of Serine Protease from *Halobacterium-Halobium*”, *J. Bacteriol.*, 155 (2) (1983) 826-830.
- [43] Jackman, A.S.; Maini, G.; Sharman, A.K.; Knowles, C.J.: “The Effects of Direct Electric Current on Viability and Metabolism of Acidophilic Bacteria”, *Enzyme Microb. Technol.*, 24 (1999) 316-324.
- [44] Jones, W.J.; Nagle, D.P.; Whitman, W.B.: “Methanogens and the Diversity of Archaeabacteria”, *Microbiological Rev.*, (1987) 135-177.
- [45] Kallenberger, W. E.; Lollar, R. M.: “Halophilic Bacteria Thrive in Seasonal Cycles”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 81 (1986) 248-265.
- [46] Kallenberger, W. E.: “Halophilic Bacteria in Hide Curing. Division of Graduate Studies and Research of the University of Cincinnati”, *PhD Thesis*, Department of Basic Science Tanning Research of The Collage of Arts and Science, (1985) 1-79.
- [47] Kamekura, M.; Seno, Y.: “A Halophilic Extracellular Protease from a Halophilic Archaeobacterium Strain 172 P1”, *Biochem. Cell.Biol.*, 68 (1990) 352-359.

- [48] Kamekura, M.; Seno, Y.; DyalSmith, M.L.: "Halolysin R₄, a Serine Proteinase from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*; Gene Cloning, Expression and Structural Studies", *BBA-Protein Struct. M.*, 1294 (2) (1996) 159-167.
- [49] Kamekura, M.; Seno, Y.; Holmes, M.L.; DyalSmith, M.L.; "Molecular Cloning and Sequencing of the Gene for A Halophilic Alkaline Serine Protease (halolysin) from an Unidentified Halophilic Archaea Strain(172P1) and Expression of the Gene in *Haloferax volcani*", *J. Bacteriol.*, 174 (3) (1992) 736-742.
- [50] Karbalaei-Heidari, H.R.; Ziaee, A.A.; Schaller, J.; Amoozegar, M.A.: "Purification and Characterization of an Extracellular Haloalkaline Protease Produced by The Moderately Halophilic Bacterium, *Salinivibrio* sp. Strain Af-2004", *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2) (2007) 266-272.
- [51] Kates, M.; Kushwaha, S.C.; Sprott, G.D.: "Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria", *Methods in Enzym.*, 88 (1982) 98-111.
- [52] Kim, J.; Dordick, J. S.: "The Unusual Salt and Solvent Dependence of a Protease from an Extreme Halophile", *Biotechnol. Bioeng.*, 55 (1997) 471-479.
- [53] Koday, S.: "Tuz Gölü Tuzlaları", *Marmara Coğrafya Dergisi*, 2 (1999) 128-149.
- [54] Kushawa, S.C.; Gochnauer, M.B.; Kushner, D.J.; Kates, M.: "Pigments and Isoprenoid Compounds in Extremely and Moderately Halophilic Bacteria", *Canadian Microb.*, 20 (1974) 241-245.

- [55] Kushner, D. J.: "Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria", In *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press, London, (1978), 317-368.
- [56] Kushner, D.J.: "The Bacteria", In *The Halobacteriaceae*, Academic Press, Inc., London, 8 (3) (1985) 171-213.
- [57] Li, X-G.; Cao, H-B.; Wu, J-C.; Yu, K-T.: "Inhibition of the Metabolism of Nitrifying Bacteria by Direct Electric Current", *Biotechnol. Lett.*, 23 (2001) 705-709.
- [58] Liu, W. K.; Brown, M. R. W.; Elliot, T. S. J.: "Mechanism of the Bactericidal Activity of Low Amperage Electric Current (DC)", *J. Antimicrob. Chemother.*, 39 (1997) 687-695.
- [59] Liu, W.K.; Tebbs, S.E.; Byrne, P.O.; Elliot, T.S.: "The Effects of Electric Current on Bacteria Colonizing Intravenous Catheter", *J. Infect.*, 27 (3) (1993) 261-269.
- [60] Lodwick, D.; McGenity, T.J.; Grant, W.D.: "The Phylogenetic Position of the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronobacterium magadii*, Determined from its Ribosomal RNA Sequence", *Syst. of App. Microb.*, 17 (1994) 402-404.
- [61] Madigan, T.; Martingo, J.M.: "Prokaryotic Diversity: The Archaea in: Biology of Microorganisms", 11th ed. Pearson Education Inc., (2006) 419-446.
- [62] Marhuenda-Egea, F.C.; Píera-Velázquez, S.; Cadenas, C.; Cadenas, E.: "Stability of an Extreme Halophilic Alkaline Phosphatase from *Halobacterium salinarum* in Non-Conventional Medium", *J. Biotechnol.*, 87 (3) (2001) 255-261.
- [63] Mitchell, W.: "Prevention of Bacterial Damage on Brine Cured and Fresh Cattle Hides", *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 82 (1987) 372.

- [64] Munson, M. A.; Nedwell, D. B.; Embley, T. M.: "Phylogenetic Diversity of Archaeobacteria in Sediment Samples from Coastal Salt Marsh", *App. Environ. Microb.*, 63 (1997) 4729-4733.
- [65] Norberg, P.; V. Hofstein, B.: "Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria", *J. Gen. Microbiol.*, 55 (1969) 251-256.
- [66] Oren, A.: "Bioenergetic Aspects of Halophilism", *Microbio. and Molecular Bio. Rev.*", 63 (1999), 334-348.
- [67] Oren, A.: "Characterization of the Halophilic Archaeal Community in Saltern Crystallizer Ponds by Means of Polar Lipid Analysis", *Inter.l J. Salt Lake Res.*, 3 (1994) 15-29.
- [68] Oren, A.: "Solar Salt Plants", In *Microbiology. and Biochemistry of Hypersaline Environment*, Oren, A. Ed.; CRC Press, Boca Raton, (2000) 39-52.
- [69] Özçörekçi, M: "Dünyadaki Genel Eğilimler ve Deri ve Deri Ürünleri Sanayimizin Geleceği", I Ulusal Deri Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümü ve Detek,7-8 Ekim, İzmir, Türkiye, (2004) 1-20.
- [70] Parailleux, G.; Sicard, N.: "Lethal Effects of Electric Current on *Escherichia coli*", *App. Microb.*, 19 (1970) 421-424.
- [71] Park, J-C.; Lee, M.S.; Han, D-W.; Lee, D.H.; Park, B.J.; Lee, I.S.; Uzawa, M.; Aihara, M.; Takatori, K.: "Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in Effluent Seawater by Alternating-current", *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2004) 1833-1835.

- [72] Park, J-C.; Lee, M.S.; Lee, D.H.; Park, B.J.; Han, D-W.; Uzawa, M.; Takatori, K.: “Inactivation of Bacteria in Seawater by Low-amperage Electric Current”, *App. Environ. Microb.*, 69 (2003) 2405-2408.
- [73] Patermarakis, G.; Fountoukidis, E.; “Disinfection of Water by Electrochemical Treatment”, *Water Res.*, 24 (1990) 1491-1496.
- [74] Prescott, S. C.: “The Treatment of Milk by an Electrical Method”, *Amer. J. Public Health*, 17 (1927) 221-223.
- [75] Quesada, E.; Ventosa, A.; Valera, F.R.; Megias, L.; Cormenzana, A.R.: “Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-Negative Bacteria from Hypersaline Soils”, *J. General Microb.*, 129 (1983) 2649-2657.
- [76] Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V.: “Molecular and Biotechnological Aspects of an Extracellular Protease from An Extreme Halophile”, *Enzyme Microbial. Technol.*, 62 (1998) 597-635.
- [77] Ryu, K.; Kim, J.; Dordick, J.S.: “Catalytic Properties and Potential of an Extracellular Protease from an Extreme Halophile”, *Enzyme Microb. Tech.*, 16 (4) (1994) 266-275.
- [78] Schobert, B.; Lanyi, J.K.: “Halorhodopsin is a Light-driven Chloride Pump”, *J. Biological Chem.*, 257 (1982), 10306-10313.
- [79] Spring, S.; Ludwig, W.; Marquez, M.C.; Ventosa, A.; Schleifer, K.H.: “*Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.”, *Inter. J. Syst. Bacterio.*, 46 (1996) 492-496.

- [80] Stepanov, V.M.; Rudenskaya, G.N.; Revina, L.P.; Gryaznova, Y.B.; Lysogorskaya, E.N.; Filippova, I.Y.; Ivanova, I.I.: "A Serine Proteinase of an Archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei* a Homologue of Eubacterial Subtilisins", *Biochem. J.*, 285 (1992) 281-286.
- [81] Stoeckenius, W.: "The Rhodopsin-like Pigments of Halobacteria: Light Energy and Signal Transducers in an Archaeobacterium", *Biochem. Sci.*, 10 (1985) 483-486.
- [82] Studdert, C.A.; De Castro, R.E.; Seitz, K.H.; Sanchez, J.J.: "Detection and Preliminary Characterization of Extracellular Proteolytic Activities of the Haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*", *Arch. Microbiol.*, 168 (6) (1997) 532-535.
- [83] Studdert, C.A.; Seitz, M.K.H.; Gil, M.I.P.; Sanchez, J.J.; De Castro, R.E.: "Purification and Biochemical Characterization of the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus occultus* Extracellular serine protease", *J. Basic Microb.*, 41 (6) (2001) 375-383.
- [84] Tokuda, H.; Nakanishi, K.: "Application of Direct Current to Protect Bioreactor Against Contamination", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 18 (2) (1995) 185-212.
- [85] Tonosaki, A.; Tokunaga, F.; Washioka, H.; Kataoka, M.; Hisatomi, O.: "Fine Structure of the Red Membrane of *Halobacterium halobium* (R1)", *Biomedical Res.*, 5 (1984) 1-8.
- [86] Tu, S.I.; Huttchinson, H.: "Temperature Dependence of Light-Induced Reconstituted Purple Membrane", *Archives of Biochem. and Biophysics*, 228 (1984) 609-616.
- [87] Valera F.R.: In *Halophilic Bacteria*, CRS Press, Baco Raton, (1988) 1-2.

- [88] Valera, F.R.; Berraquero, F.R.; Cormenzana, A.R.: “Characteristics of the Heterotrophic Bacterial Populations in Hypersaline Environments of Different Salt Concentrations”, *Microbial Eco.*, 7 (1981) 235-243.
- [89] Venkitanarayanan, K.S.; Zike, G.O.I.; Hung, Y.; Doyle, M.P.: “Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on Plastic Kitchen Cutting Boards by Electrolyzed Oxidizing Solution”, *J. Food . Prot.*, 62 (1999) 857-860.
- [90] Vidyasagar, M.; Prakash, S.; Lütchfield, C.; Sreemulu, K.: “ Purificaion and Characterization of a Thermostable, Haloalkaliphilic Extracellular Serine Protease from The Extreme Halophilic Archaeon *Halogeometricum borinnquense* Strain TSS101”, *Archaea*, 2 (2006) 51-57.
- [91] Vivian, G.W.: “The Preservation of Hides and Skins Against Bacterial Damage”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 64 (10) (1969) 489.
- [92] Vreeland, R. H.; Angelini, S.; Bailey, D.G.; “Anatomy of Halophile Induced Damage to Brine Cured Cattle Hides”, *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 93 (1998) 121-131.
- [93] Vreeland, R.H.; Bailey, D.G.: “Methods of Using Bile Salt to Inhibit Red Heat in Stored Brine Cured Hides and Skins”, Patent number 5945027, Docket number 22497, serial number 8906333, Agricultural Research Service, (1999).
- [94] Vreeland, R.H.: “Taxonomy of Halophilic Bacteria”, In *The Biology of Halophilic Bacteria*, Vreeland, R.H.; Hochstein L.I. Eds.; FI CRS Press, Baco Raton, (1993) 105-134.
- [95] Weiss, E.F.; Thornton, R.L.: “Growth and Control of Microbiological Activity During Hide Curing Process”, Buckman Laboratories Inc., (1984) 18.

- [96] Ye, I.; Yang, H.; Kim, H.K.; Li, Y.: “ Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Recirculated Brine for Chilling Thermally Processed Bacon Using an Electrochemical Treatment System”, *J. Food Sci.*, 66 (2001) 729-733.
- [97] www.ist-vho.org.tr (Erişim tarihi: Mart 2007)
- [98] www.kkgm.gv.tr (Erişim tarihi: Mart 2007)
- [99] www.tarim.gov.tr (Erişim tarihi: Mart 2007)
- [100] www.the-icsp.org/taxa/halobacterlist.htm (Erişim tarihi: Haziran 2007)
- [101] www.turkishleather.com (Erişim tarihi: Mart 2007)
- [102] www.ucmp.berkeley.edu/archaea (Erişim tarihi: Mart 2007)
- [103] www.worthington-biochem.com/STAMP/default.html (Erişim tarihi: Ekim 2005)

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Mersin’de doğdum. İlk öğrenimimi Cebesoy İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise öğrenimimi Kurttepe Adana Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 1999 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi’nde Kimya Öğretmenliği eğitimime başladım. 2004 yılında buradan mezun olduktan sonra yine aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bölümü Yüksek Lisans Programına başladım ve halen devam etmekteyim.