

**Halofilik Mikroorganizmalar ile Biyoaktif  
Metabolit Üretimi**

Teslime SAĞIR  
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı

Şubat 2014

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu  
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1305F096**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Teslime Sağır'ın "Halofilik Mikroorganizmalar ile Biyoaktif Metabolit Üretimi" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 21.01.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	.....
Üye :	Doç. Dr. Gökalp İŞCAN	.....
Üye :	Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ	.....
Üye :	Yard. Doç. Dr. Yasemin ÇİMEN	.....
Üye :	Yard. Doç. Dr. Emel ERMİŞ	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR İLE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETİMİ

Teslime SAĞIR

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

II. Danışman: Doç. Dr. Gökalp İşcan

2014, 87 Sayfa

Ekstremofilik mikroorganizmalardan olan halofilik mikroorganizmalar aşırı tuzlu habitatlarda yaşayan canlılardır. Halofilik mikroorganizmaların ekstrem koşullarda yaşayabilmelerine olanak sağlayan farklı enzim sistemlerine sahip olmaları önemli biyoaktif maddelerin üretiminde de rol oynamaktadır. Çalışmamızda izole edilmiş bazı halofilik mikroorganizmaların ürettikleri uçucu sekonder metabolitleri kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle taranmıştır. Van Gölü sularından izole edilen ve moleküler yöntemlerle tür tayini yapılmış olan *Aspergillus tubingensis* mikrofungusu ile ilaç ve kozmetik sanayiinde geniş kullanımı olan terpen yapısındaki sedril metil eterin biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Biyotransformasyon sonucu elde edilen metabolitler izole edilerek saflaştırılmış ve 4 metabolitten biri kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle 3-hidroksi sedrol olarak tanımlanmıştır. Ayrıca metabolitlerin antikandidal, antibakteriyal ve antioksidan aktiviteleri, ilgili standartlarla ve substrat ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. 3-hidroksi sedrolün *Candida glabrata* ve *Candida albicans*'a karşı başlangıç maddesi olan sedril metil etere göre daha ekili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sedril metil eter, biyotransformasyon, sekonder metabolit, biyoaktivite

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### PRODUCTION OF BIOACTIVE METABOLITE BY HALOPHILIC MICROORGANISMS

Teslime SAĞIR

Anadolu University Graduate School of Sciences

Advance Technologies Program

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Co- Supervisor: Assistant Prof. Dr. Gökalp İŞCAN

2014, 87 pages

The halophilic microorganisms which are extremophiles live in extreme saline habitats. Different enzyme systems of halophilic organisms, which allow them to survive in extreme conditions have an important role in the production of bioactive substances. In our study, volatile secondary metabolites which are produced by some isolated halophilic microorganisms were screened with chromatographic and spectroscopic methods. Isolated from the waters of Van Lake and identified by molecular methods *Aspergillus tubigensis* microfungus carried out the biotransformation reactions of cedryl methyl ether which is in the structure of terpene and widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries. The metabolites which are obtained by biotransformation were isolated and purified. One of the four metabolites has been identified as 3-hydroxy cedrol by chromatographic and spectroscopic methods. Also anticandidal, antibacterial and antioxidant activities of metabolites were examined in comparison with relevant standards and substrate. 3-hydroxy cedrol was found to be more effective than cedryl methyl ether on *Candida albicans*, *Candida glabrata*.

**Key Words:** Cedryl methyl ether, biotransformation, secondary metabolites, bioactivity

## TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde bana yol gösteren, bilgileriyle yönlendiren ve desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya, tezim süresince bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımında her türlü desteklerini gördüğüm değerli yardımcı danışmanım Doç. Dr. Gökalp İŞCAN'a,

Metabolitin yapı tayininde büyük yardımları olan Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan KIRMIZIBEKMEZ'e, her türlü tecrübe ve desteklerini gördüğüm Anadolu Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Yard. Doç. Dr. Yasemin ÇİMEN'e,

Deneysel çalışmalarımı Farmakognozi Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Prof.Dr. Neş'e KIRIMER'e, türlü bilgilerini benimle paylaşan Uzm. Bio. Gamze GÖGER, Uzm. Bio. Fatih GÖGER, Uzm. Bio. Seval ÇINAR, Uzm. Bio. Ece Albayrak, Uzm. Bio. Nilgün KAVAK, Elçin Biter ve Cevat ŞEN'e,

Yapı tayini için Nükleer Manyetik Rezonans analizinin gerçekleştirilmesini sağlayan Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezine (AÜBİBAM),

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Sefa ERBAŞ, Beyda SARI, Fatma Dilek TEL, Özge TEKER, Ayşe Ümmühan ÇELİK, Sema EKİNCEK, Emine ERDAĞ, Müslime YAVUZ, Betül MÜJDECİ, Reyhan VAROL ve Elif ARICA' ya,

Beni bu zamana kadar destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük payı olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Teslime SAĞIR  
Şubat, 2014

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x

### 1. GİRİŞ 1

1.1. Halofilik Mikroorganizmalar.....	3
1.2. Halofilik Mikroorganizmaların Sistematiği.....	4
1.2.1. Halofilik <i>Archaea</i> .....	5
1.2.2. Halofilik <i>Bacteria</i> .....	8
1.2.3. Halofilik ve Halotolerant <i>Eucarya</i> .....	9
1.3. Tuzlu Çevrelere Adaptasyon.....	10
1.4. Halofilik Proteinler ve Pigmentler.....	12
1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemleri.....	13
1.6. Alkalifilik Mikroorganizmalar.....	15
1.7. Alkalifilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemleri.....	16
1.8. Sekonder Metabolitler.....	16
1.9. Mikrobiyal Transformasyon.....	19
1.10. Biyotransformasyon ve Enzimler.....	19
1.10.1. Oksidoredüktazlar.....	19
1.10.2. Transferazlar.....	20
1.10.3. Hidrolazlar.....	20
1.10.4. Liyazlar.....	20
1.10.5. İzomerazlar.....	20
1.10.6. Ligazlar.....	20
1.11. Terpenler.....	24
1.11.2. Sedril metil eter.....	27

<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>29</b>
2.1. Materyal	29
2.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler	29
2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	30
2.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	30
2.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	30
2.1.5. Sekonder metabolit taramalarında kullanılan mikroorganizmalar	32
2.1.6. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın temini	32
2.1.7. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar	33
2.2. Metod	33
2.2.1. Sekonder metabolit taramaları	33
2.2.1.1. Sekonder metabolitler için ön tarama deneyleri	34
2.2.2. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın moleküler tayini	35
2.2.2.1. Kültür bağımlı yöntemler	35
2.2.2.1.1. Genomik DNA ekstraksiyonu	35
2.2.2.1.2. PCR ile ITS bölgesinin çoğaltılması	36
2.2.2.1.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması	37
2.2.2.1.4. PCR ürünlerinden dizi analizi	38
2.2.3. Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmaları	39
2.2.3.1. Biyotransformasyon için ön tarama deneyleri	40
2.2.3.2. Biyotransformasyon için preparatif ölçekli deney	41
2.2.3.3. Kolon Kromatografisi ile metabolitlerin ayrımı	43
2.2.3.4. Flaş Kolon Kromatografisi ile metabolit ayrımı	43
2.2.4. Yapı Tayini	44
2.2.4.1. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GK/KS)	44
2.2.4.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)	45
2.2.5. Biyolojik aktivite çalışmaları	45
2.2.5.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	45

2.2.5.1.1. CLSI yöntemiyle antikandidal ve antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi .....	45
2.2.5.2. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi .....	46
2.2.5.2.1. 1-1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini sürpürücü etki tayini .....	46
2.2.5.2.2. DPPH radikalini sürpürücü etki yöntemi .....	46
2.2.5.2.3. ABTS Radikal Sürpürücü Etki .....	47
<b>3. BULGULAR</b>	<b>48</b>
3.1. Sekonder metabolit için ön tarama deneylerinde oluşan metabolitler..	48
3.2. Biyotransformasyon için kullanılan mikroorganizmanın farklı tuzluluklarda geliştirilmesi .....	48
3.3. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın tanımlanması.	51
3.3.1. Genomik DNA ekstraksiyonuna ait bulgular .....	51
3.3.2. ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonuçları .....	51
3.3.3. Saflaştırılmış PCR ürünleri .....	52
3.3.4. PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçları .....	53
3.4. Sedril Metil Eter'in Mikrobiyal Transformasyon Ürünleri .....	53
3.4.1. Sedril Metil Eter'in biyotransformasyonu ile elde edilen metabolitler .....	56
3.5. Biyolojik Aktivite Çalışma Sonuçları .....	62
3.5.1. Antikandidal aktivite sonuçları .....	62
3.5.2. Antibakteriyal aktivite sonuçları .....	62
3.5.3. Antioksidan aktivite sonuçları .....	63
3.5.3.1. 1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil (DPPH) radikalini sürpürücü etki sonucu .....	63
3.5.3.2. ABTS radikal sürpürücü etki sonucu .....	63
<b>4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>65</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Küçük alt ünite rRNA gen dizisine dayanarak oluşturulmuş evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaçtaki dağılımı .....	4
1.2. Güney Avustralya'ya ait tipik bir tuz gölü .....	6
1.3. Halofilik Archaea'ların hücre yapı ve şekilleri .....	6
1.4. Halofilik Archaea ait flagellum yapısı .....	7
1.5. Hücre içerisinde PHA oluşumu .....	8
1.6. Biyotransformasyonlarda kullanılan biyokatalizörler .....	21
1.7. İzopren (2-metil bütadien) yapısı .....	24
1.8. Mevalonik asit sentezi .....	25
1.9. Terpenlerin biyosentezi .....	26
1.10. 'Baş-kuyruk' esasına göre izoprenlerin bağlantışı ve sınıflandırılmaları .....	27
1.11. Sedril metil eter ve Sedrol .....	28
1.12. Bazı seskiterpenlere örnekler .....	28
2.1. Biyotransformasyon ön tarama çalışma protokolü .....	41
2.2. Metabolit İzolasyonuna Yönelik Preparatif Çalışma Şeması .....	42
2.3. Metabolit ayırımında kullanılan Kolon Kromatografisi.....	43
2.4. Flaş Kromatografisi ve sisteme ait gradient eğrisi ve fraksiyonlar .....	44
3.1. Tuzsuz malt ekstrakt broth içinde gelişen fungusu .....	48
3.2. Tuzsuz malt ekstrakt agarda gelişen fungus .....	48

3.3. %5 NaCl malt ekstrakt broth ortamında gelişen fungus .....	49
3.4. %5 NaCl malt ekstrakt agarda gelişen fungus .....	49
3.5. %10 NaCl malt ekstrakt broth ortamında gelişen fungus .....	49
3.6. %10 NaCl malt ekstrakt agarda gelişen fungus .....	49
3.7. %15 NaCl malt ekstrakt broth ortamında gelişim .....	50
3.8. % 15 NaCl malt ekstrakt agarda gelişim yok .....	50
3.9. Farklı tuzluluklarda gelişen fungusun biyotransformasyon ürünleri .....	50
3.10. Tuzsuz ortamda gelişen fungusun biyotransformasyon ürünleri .....	50
3.11. Fungusa ait genomik DNA jel görüntüsü .....	51
3.12. ITS primerleri ile elde edilmiş PCR ürünleri .....	52
3.13. Saflaştırılmış PCR ürünleri .....	52
3.14. Dizi analizi esnasında ITS1 primerleri ile yapılan okumalardan oluşan piklerin bir kısım görüntüsü .....	53
3.15. Biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstrenin İTK plağı .....	54
3.16. Kolon kromatografisiyle ayırt edilen metabolitler ve toplam ekstre .....	54
3.17. Kolondan ayrılan metabolitlerin İTK üzerindeki görüntüsü .....	55
3.18. Farklı oranda çözücü sistemiyle kolondan ayrılan metabolitlerin İTK görüntüsü .....	55
3.19. Substrat molekülü sedril metil eterin kütle spektrum .....	56
3.20. M1 metabolitine ait kütle spektrumu .....	56
3.21. M3 metabolitine ait kütle spektrumu .....	57

3.22. M4 metabolitine ait kütle spektrumu .....	57
3.23. İzole edilerek saflaştırılan 3-hidroksi sedrolün kromatogramı .....	58
3.24. 3- hidroksi sedrolün kütle spektrumu .....	59
3.25. Sedril metil eterin <i>Aspergillus tubingensis</i> ile biyotransformasyonu ile elde edilen metabolitler.....	59
3.26. 3-hidroksi sedrolün <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	60
3.27. 3-hidroksi sedrole ait <sup>13</sup> C NMR spektrumu .....	60
3.28. 3-hidroksi sedrole ait HMBC spektrumu .....	61
3.29. Antikandidal etki sonuçlarından bir plak örneği.....	62
3.30. Metabolitlerin ve standart maddenin DPPH* süpürücü etki için yapılmış İTK çalışması .....	63
3.31. Metabolitlerin ve standart maddenin ABTS süpürücü etki için yapılmış İTK çalışması .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Biyotransformasyon reaksiyonlarının tarihsel gelişimi.....	22
1.2. Terpenlerin sınıflandırılması .....	27
2.1. Sekonder metabolit taramalarında kullanılan mikroorganizmalar .....	32
2.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar .....	33
2.3. Fideli Taq 2X Master Mix ile Reaksiyon Kurulması.....	36
3.1. 3-hidroksi sedrole ait NMR verileri .....	61
3.2. Antikandidal Etki Sonuçları .....	62
3.3. Antibakteriyal Etki Sonuçları.....	63

## 1. GİRİŞ

Ekstremofilik mikroorganizmalardan olan halofilik mikroorganizmalar aşırı tuzlu habitatlarda yaşayan bir gruptur. Üremeleri için en az 1,5 M (yaklaşık % 9) NaCl' ye ihtiyaç duyarlar. Optimum üremeleri için 2- 4 M NaCl (%12-23) gereklidir. Bu organizmalar solar tuz buharlaştırma gölleri, doğal tuz gölleri veya yapay tuzlu habitatlar, tuzlanmış bazı gıdalarda (Et, Balık) yaşarlar. Halofilik mikroorganizmalar yaşamın 3 sahası olan *Archaea*, *Bacteria* ve *Eucarya* içerisinde dağılım göstermektedirler. Ekstrem şartlara uyum sağlayan halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik potansiyele sahip canlılardır. Ekstremofilik mikroorganizmalardan olan bir diğer grup ise alkalifillerdir. Alkalifiller ise pH aralığı 9,0-12,0 aralığında gelişim gösterebilmektedir. Bu organizmalar genellikle nötr topraklar, soda gölleri gibi ekstrem bazik ve tuzlu ortamlarda yaşam sürdürmektedirler.

Halofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların sahip oldukları enzimler ve yoğun tuz konsantrasyonlarına adapte olmalarını sağlayan yapılarından dolayı çeşitli biyoaktif metabolitler üretebilecekleri bilinmektedir. Bu çalışmada öncelikle mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitlerin çeşitli kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle taranması gerçekleştirilmiştir.

Sekonder metabolitler mikroorganizmaların üreme fazının sonuna yakın, çoğunlukla üremenin durağan fazında, yakınında veya içinde oluşan ürünlerdir. Bazı biyokatalizlerde istenilen ürün aktif üreme fazı sırasında değil yalnızca durağan fazda oluşur. Sekonder metabolitler mikroorganizmanın çoğalma ve üremeleri için gerekli değildir. Sekonder metabolitlerin oluşumu özellikle mikroorganizmanın üreme koşullarına bağlıdır.

Çalışmamızın ana konusunu oluşturan biyotransformasyon reaksiyonları ise biyokatalizörler aracılığıyla ortama sonradan ilave edilen substrattan yeni türevlerin sentezi işlemidir. Mikrobiyal biyotransformasyonda sıklıkla rastlanan en verimli dönüşümler oksidoredüktaz ve hidrolazların katalizlediği reaksiyonlar olup dehidrasyon, dehidrasyon gibi reaksiyonlara da

rastlanmaktadır. Karbon- karbon ve hetero- atom bağlarının oluşumlarının geleneksel kimyasal sentezlerle gerçekleştirilmesi zordur. Hücre sistemlerinin ucuz oluşu ve mikrobiyal hücrelerde rejenerasyon ile kofaktörün geri kazanımı kolay olduğundan kofaktöre ihtiyaç duyulmaması, seçici kimyasal türevlerin üretimi, biyodegradasyon gibi süreçler biyotransformasyonda avantaj sağlamaktadır. Mikrobiyal transformasyonun insan ve doğaya zararlı katalizörlerin kullanıldığı bir kaç ayrı basamakta ancak gerçekleştirilebilen geleneksel kimyasal sentez metotlarına göre bazı avantajları vardır. Kullanılan biyokatalizörler canlılar veya canlılardan elde edilen enzimler olduğundan doğaya dosttur. Çok kısa zamanda kimyasal sentezle imkânsız olan bazı reaksiyonlar tek basamakta kolayca gerçekleşebilir. Belki de en önemli avantajı stereospesifik maddelerin üretiminde büyük kolaylık sağlamasıdır. Bu sebeple biyotransformasyon enzimlerinin stereospesifik çalışması sayesinde günümüz biyoteknoloji ve ilaç sanayiinde oldukça yaygın ve verimli şekilde kullanılan yöntemler arasına girmiştir.

Çalışmamızın mikrobiyal biyotransformasyon için halofilik ve alkalifilik bir fungus olan *Aspergillus tubingensis* kullanılmıştır. *Aspergillus tubingensis*, sodalı ve tuzlu bir ortama sahip olan Van Gölü'nden izole edilmiştir. *Aspergillus tubingensis*'in tanımlanması işlemlerinde moleküler yöntemlerden PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve dizi analizi işlemleri uygulanarak tür düzeyinde belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Biyotransformasyonda substrat olarak sedril metil eter kullanılmıştır. Sedir ağacından elde edilmiş sedrol maddesinin kimyasal türevi olan sedril metil eter, yarı sentetik bir madde olup kozmetik sektöründe koku maddesi, alkolik losyon, ter önleyici, beyazlatıcı, yüzey temizleyici, şampuan ve sabun gibi endüstriyel alanlarda kullanılır.

Mikrobiyal transformasyon sonucu oluşan metabolitlerin antikandidal, antibakteriyel ve antioksidan etkilerine bakılmıştır. Substrat ve metabolitlerin biyoaktivitesi standart biyoaktif ajanlar ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitlerin saflaştırma işlemleri gerçekleştirilerek elde edilen metabolitlerin kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle tanımlanmasına çalışılmıştır. Bu amaçla Gaz Kromatografisi (GC),

Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (GC-MS), İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Kolon Kromatografisi, Flaş Kolon Kromatografisi ve proton ve karbon Nükleer Manyetik Rezonans ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR) teknikleri kullanılmıştır.

### 1.1. Halofilik Mikroorganizmalar

Ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan ve tuz seven organizmalar halofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Bir diğer tanımıyla sodyum klorürün doyma noktasına yakın ya da doyma noktasında olduğu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalardır.

Halofiller tuz gereksinimlerine göre sınıflandırılmışlardır. Az halofil olanlar % 2-5 NaCl aralığında optimal gelişme gösterirken ılımlı olan halofiller % 5-20 NaCl, ekstrem halofiller ise % 20-30 NaCl aralığında gelişme gösterirler. Halofilik mikroorganizmaların minimum optimum ve maksimum tuz konsantrasyonları ortam bileşenleri ve büyüme sıcaklığına bağlıdır.

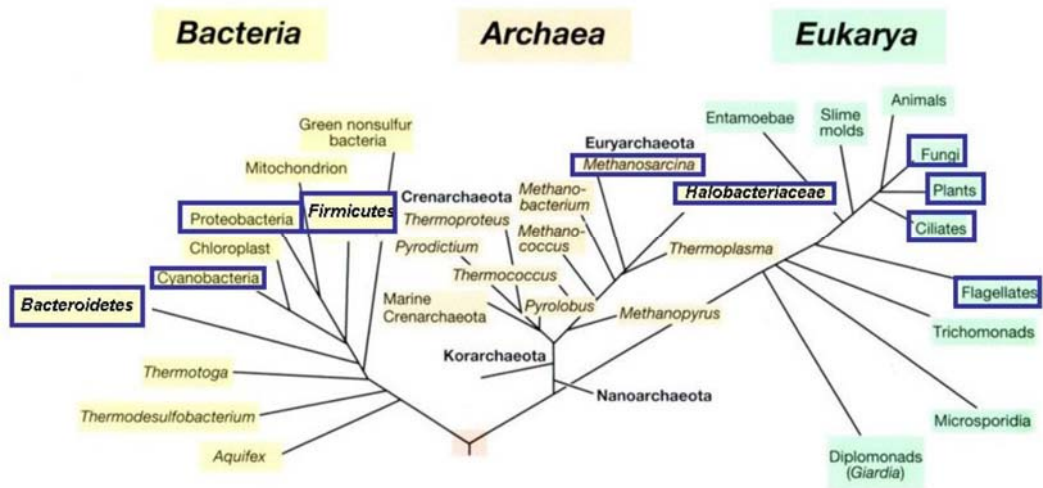
Bu tanımlamalar 30 yıl önce Donn Kushner tarafından yapılmıştır (Oren, 2008). Kushner (1978)'e göre Halofilik mikroorganizmalar; halofilik olmayanlar (0-1 M), az halofiller (0,2-2,0 M), ılımlı halofiller (0,4-3,5 M), ekstreme yakın halofiller (1,4-4,0 M), ekstrem halofiller (2,0-5,2 M), halotolerantlar (0->1 M) ve değişken halofiller (0->3 M) olarak sınıflandırılmışlardır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen, tuz yokluğunda da optimum büyüme gösteren organizmalar *halotolerant* adını alır. Tuz varlığında optimum gelişen, tuzun sıfır konsantrasyonundan doygunluk konsantrasyonlarına kadar büyüme yeteneğine sahip organizmalar *haloversatil* (euryhaline) olarak adlandırılmışlardır.

Ekstrem halofilik mikroorganizmalar düşük tuz konsantrasyonlarında gelişme gösteremezler; tuz konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda hücreler parçalanırlar. Hücresel yapıları (hücre duvarları, ribozomları, enzimleri)  $\text{Na}^+$  iyonları aracılığıyla stabilize edilir (<http://textbookofbacteriology.net /procaryotes. html>, 2012).

Ekstrem halofiller, deniz balığı, et ve sucuk gibi yüksek oranda tuzlanmış bazı gıdalarda, tuzlu alkalın habitatlarda, solar tuz buharlaştırma gölleri, doğal tuz gölleri ve yapay tuzlu habitatlar, bataklıklar, kaynak sularında ve tuzlu soğuk ortamlarda bulunurlar. Bu canlılar gelişimleri için çok yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyduklarından dolayı ekstrem halofil terimi kullanılmaktadır (Madigan ve ark., 2000). Halofiller yüksek tuz konsantrasyonunun yanı sıra değişken sıcaklık, pH, ağır metallerin bulunması, düşük oksijen gibi farklı ortam koşullarına da maruz kalabilmektedirler (Horikoshi, 2011).

## 1.2. Halofilik Mikroorganizmaların Sistematığı

Halofilik mikroorganizmaların dağılımları filogenetik yaşam ağacında rRNA küçük alt ünite dizilerinin incelenmesiyle halofillerin *Archaea*, *Bacteria* ve *Eucarya* domainlerinin her üçünde de bulunduğu görülmüştür (Oren, 2008). NaCl bakımından doygunluğa ulaşmış Ölü Deniz ve tuzlalar gibi çevrelerde halofilik *Archaea* domainine ait Halobacteriaceae ve tek hücreli ökaryotik alg olan *Dunaliella* bulunmuştur. *Bacteria* domainine ait *Salinibacter ruber* kaynak tuzlalarında ve alkalifilik anoksijenik fotosentetik *Halorhodospira* cinsi tuz konsantrasyonu 300 g/L' yi aşan sodalı göllerde bol miktarda keşfedilmiştir (Oren, 2003).



Şekil 1.1. Küçük alt ünite rRNA gen dizisine dayanarak oluşturulmuş evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaçtaki dağılımı. Mavi kutucuklar içindeki gruplar en az bir halofilik temsilciye sahiptir (Oren, 2008)



Halofilik mikroorganizmalar hipersalin ortamlarda bulunurlar. Bu bölgelerde ökaryotlardan *Dunaliella* (% 10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi organizmalar da yer alır. Bakteriler içerisinde ise *Salinibacter ruber* (% 20-30 w/v) en ekstrem halofilik bakteri olma özelliğine sahiptir ve *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi cinsler ise *Archaea* domaininde yer alır ve bunlar tuzun çökme noktasına yakın yoğunluklarda yaşayabilirler. Tamamen halofilik olan 3 filogenetik grup vardır: Arkeal domainde Halobacteriales ordosu Halobacteriaceae familyası üyeleri kırmızı, ekstrem halofilik, aerobik mikroorganizmalardan oluşur. *Bacteria* domaini Halanaerobiales ordosu temsilcileri obligat anaeroptur ve Halomonadaceae familyası orta derecede halofilik aeroplardan oluşur (Oren, 2003).

### 1.2.1. Halofilik *Archaea*

*Archaea* domaininde halofilik mikroorganizmalar 3 familyada bulunur: Halobacteriaceae, Methanospirillaceae ve Methanosarcinaceae. Methanospirillaceae ve Methanosarcinaceae deniz tuzluluğu ve hipersalin şartlara adapte olmuş organizmalar ve halofilik olmayan türleri içermektedir. Tek familyası Halobacteriaceae ile Halobacteriales ordosu tamamen halofillerden oluşur. Halobacteriaceae familyası son araştırmalara göre 38 cins içermektedir. Halobacteriaceae'ye ait türlerin sınıflandırılması hücre morfolojisi, gelişim özellikleri, kemotaksonomik yapıları ve nükleik asit dizi bilgisini değerlendiren polifazik yaklaşımı temel almaktadır. 16S rDNA dizilerinin karşılaştırılması Halobacteriaceae'de türlerin sınıflandırılmasına oldukça katkıda bulunmuştur (Oren 2003).

Birçok Halobakteri sahip oldukları C<sub>50</sub> karetenoidlerden (Bakteriyoruberinleri oluştururlar) dolayı kırmızı veya turuncu pigmentler olarak görülürken bazı türleri renksiz gaz vezikülleriyle beyaz veya pembe pigmentli olarak görülürler (Oren 2003). Karetenoidler gün ışığının zararlı etkilerine karşı halofilik mikroorganizmalarda koruma görevi üstlenirler (Dundas ve Larsen, 1962). Bazı türler ise alkaline ortamlarda gelişme gösterebilirler ve haloalkalifilik adını alırlar (Horikoshi, 2011). Oksijenik ve anoksijenik fototrofların primer üretimi sonucu oluşan organik maddeler

*Archaea* domainine ait mikroorganizmaların gelişmesini sağlamaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).



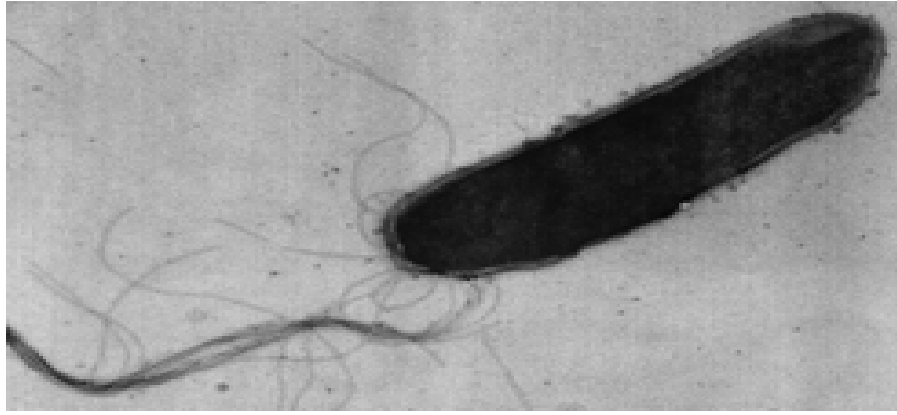
**Şekil 1.2.** Güney Avustralya'ya ait tipik bir tuz gölü. Halofilik mikroorganizmaların aşırı üremesi sonucu pigmentasyondan kaynaklanan pembe renk oluşumları (MDS, 2004).

Sitoplazmik membran ve lipidleri proteinlerden yapılmıştır. Besinlerin ve diğer bileşiklerin, iyonların dışarı ve içeri transferi, dış çevre hakkında bilgi alan sensörleri, solunum elektron transportu için gerek duyulan tüm fonksiyonları barındıran yapıdır. Bunlara ek olarak halofilik arkea membranlarında retinal iyon pompası bakteriorodopsin ve halorodopsin bulunabilir. Hücre duvarları diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi halofilik arkeaların da şekli hücre duvarları tarafından belirlenmektedir. Halobacteriaceae familyasının türleri farklı farklı şekillere sahiptirler. Çubuk şekilli, küre ve buna ek olarak yassı pleomorfik türler bulunmaktadır. Ayrıca henüz yeni kültüre alınmış kare şekilli tür dışında üçgen ve paralel kenar şeklinde hücreleri olan türler de mevcuttur (Oren, 2003).



**Şekil 1.3** Halofilik Archaea'ların hücre yapı ve şekilleri

Ekstraselüler kapsülleri belirli halofilik *Archaea* türleri hücre duvarı dışında polisakkarit yapıda bir kapsül biriktirmektedir. *Haloferax* cinsi tarafından bol miktarda ekzopolisakkarit salgılanmaktadır. Flagelları ise *Halobacteriales*'in birçok üyesi flagellumlarının yardımı ile hareketlidir. Halobakteriyal flagella bakteri flagellasından farklı olarak sağa dönümlü heliks yapıdadır. Halofilik arkea flagellumunun saat yönündeki rotasyonu hücrenin ileri doğru hareketiyle, saat yönü tersine rotasyon ise geriye doğru hareket ile sonuçlanmaktadır (Oren, 2002).

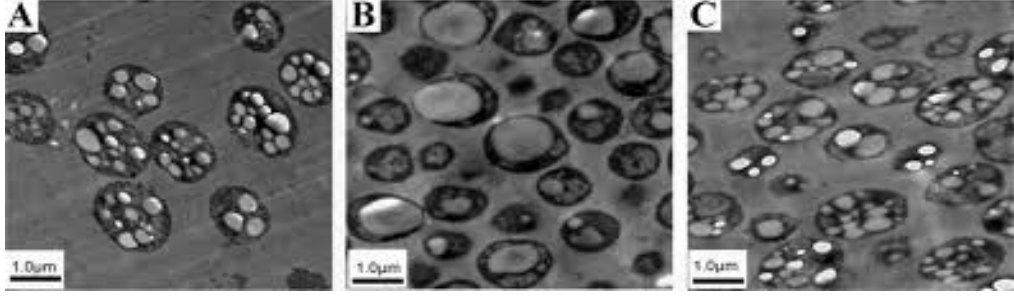


Şekil 1.4. Halofilik Archaea ait flagellum yapısı

Fitokristalin yapıları ise alışılmadık hücre içi organel *Halobacterium salinarum* sitoplazması içinde görülmüştür. Organel genelde hücre membranı ile ilişkili olarak membrana yakın bulunmaktadır. Benzer yapılar *Halorubrum saccharovorum*, *Haloarcula hispanica*, *Haloferax volcanii* ve *Natromonas pharaonis* 'te görülmüştür.

Gaz vezikülleri, *Halobacterium salinarium*, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum vacuolatum* ve *Halogeometricum borinquense*'de rapor edilmiştir. Buna ek olarak Walsby'nin "yassı kareleri" içinde de mevcuttur. Gaz vezikülleri protein alt ünitelerinden yapılmış silindirik yapılardır (Oren, 2003).

Depo materyaller olarak ise bazı Halobacteriaceae üyeleri çok miktarda PHA (polihidroksialkonat) polimeri üretirler. Özellikle *Haloferax mediterranei* ve *Haloarcula marismortui* PHA biriktirmektedir (Margesin ve Schinner, 2001).



Şekil 1.5. Hücre içerisinde PHA oluşumu

### 1.2.2. Halofilik *Bacteria*

Halofilik *Bacteria* aerobik ve anaerobik kemoheterotroflar, fotoototrofik ve fotoheterotrofik türler ve kemolitotroflar gibi çeşitli fizyolojik özelliklere sahiptir (Olivier ve ark., 1994). Fotosentetik *Bacteria* yüksek tuz konsantrasyonlarında oksijenik ve anoksijenik ortamlarda bulunmuştur. Halofilik bakterilerin tuz konsantrasyonu 2M' a kadar olan ortamlarda baskın olarak buldukları gösterilmiştir (Rodriguez- Valera ve ark., 1981).

Fotosentetik mor non-sülfür bakterisi *Rhodothalassium salexigensis* periyodik olarak 10,5 nm aralıklarla alt ünitelerden meydana gelen S-tabakası ile çevrilidir. Hücre duvarında lipopolisakkarit bulunmaz. *Actinopolyspora halophila* peptidoglukan hücre duvarına sahiptir. Ekstraselüler kapsül açısından *Halomonas eurihalina* ilginç özellikte bir ekzopolisakkarit üretir. % 42 karbonhidrat ve %15'i proteindir. Kalan kısmının yapısı ise bilinmemektedir. Polimer özellikle asidik pH'da oldukça vizkoz, ve termostabildir. Son zamanlarda diğer bir ekzopolisakkarit üreticisi olarak tanımlanan bakteri *Halomonas maura*'dır. Flagella ile hareket, farklı halofilik bakteri gruplarında oldukça yaygındır. Özellikle kalın, kalkanlı polar flagella haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterisi *Halorhodospira abdelmalehii*'de gözlenir. Sitoplazmik membran ve lipidleri pek çok halofilik bakteri türünde bulunan temel polar lipidler fosfotidilkolin (PC) ve fosfotidiletanolamin (PE) dir. İlave olarak kardiolipin (CL) ve glikolipidler gibi diğer tip lipidler bulunabilir. Genellikle tuzluluk arttığı zaman negatif yüklü fosfolipidler (PC, CL), nötral fosfolipidlerin düzeyine kadar artmaktadır. Çubuk şekilli gram negatif halofilik bakteriler membran lipidlerinde genellikle düz zincirli doymuş

ve tekli doymamış yağ asitlerini (C16:0, 16:1 ve özellikle 18:1) içerirler. İntraselüler fotosentetik membranların çok farklılık gösteren tipleri halofilik anoksijenik fotosentetik bakteriler arasında görülmektedir. Gaz veziküllerine Halofilik *Bacteria*'da nadiren rastlanır. Hafif derecede halofilik olan *Ectothiorhodospira vacuolata* gaz vezikülleri üretmesiyle karakterizedir. Isıya toleranslı olan endosporlar bazı halofilik bakteri grupları için üretilmektedir. *Clostridium halophilum*, *Halanaerobiaceae*, *Halobacteriodaceae*, *Orenia* türleri, *Bacillaceae*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus* ve *Salibacillus* üyelerinde endospor oluşumu görülmektedir (Oren, 2003; Ventosa, 2004).

### 1.2.3. Halofilik ve Halotolerant *Eucarya*

Hipersalin tuzluların pek çoğunda birincil üreticiler çift flajelli tekhücreli yeşil alg *Dunaliella* genusudur. Ölü denizde yüksek seviyede  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  *Dunaliella spp.*'ya inhibitör bir etki yapar. *Dunaliella salina* ve *Asteromonas gracilis* doymuş tuz konsantrasyonunda gelişebilirler. Algler çözünür madde (compatible solute) olarak polyol kullanırlar. *Dunaliella salina*'da osmotik strese karşı gliserol sentezlenir (DasSarma, 2001). Halofilik veya halotolerant algal cins *Dunaliella* türleri sert bir hücre duvarına sahip değildir. Çevrelerindeki tuzluluk değişimine reaksiyon olarak hücreler büzülebilir ve şişebilir. Hücreyi çevreleyen sitoplazmik membran büyük moleküllerin endositolik olarak alınmasına olanak sağlar. Ayrıca *Dunaliella* hücreleri hücre inklüzyonları içerir (Oren 2003).

Ekstrem halofilik *Archaea* yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilirken, ökaryotik mikroorganizmalar aksine yüksek intraselüler iyon konsantrasyonlarını tolere edememektedirler. Tuza duyarlılıkları bakımından *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida versatilis*, *Pichia guilliermondii* gibi bazı ökaryotik organizmalarla çalışmalar yapılmıştır. Son zamanlarda hipersalin tuzlardan siyah maya türleri izole edilmiştir. Bu mayalar *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis*, *Trimmatostroma salinum* ve halotolerant *Aureobasidium pullulans* tarafından ökaryotik halofillerin yeni grubu olarak temsil edilmiştir (Kogej ve ark., 2005). *Debaryomyces hansenii* deniz suyundan izole edilmiş halotolerant bir maya

olup aerobik şartlarda büyüme tuzluluğu 4,5 mol/L'ye kadardır. Logaritmik faz boyunca çözünür madde olarak gliserol ve stasyonere fazda ise arbutol üretir. Nötrale asidik pH ve orta dereceli sıcaklıkta aerobik koşullarda en iyi büyüme gösterirler (Das Sarma, 2001).

Funguslar yüksek tuz veya şeker konsantrasyonlarıyla yiyecek koruyucu kontaminantlar olarak biliniyorlardı. İlk kez hipersalin çevrelerde keşfedilene kadar önceleri gıda kaynaklı kontaminantlar olarak bilinmekteydi. Birçok fungusun halofilik prokaryotlardan farkı halofiliklerden ziyade ekstrem halotolerant olmaları, yaşamlarını sürdürebilmeleri (*Wallemia* spp. hariç) için tuzla ihtiyaç duymamalarıdır. Wallemiales ordosu içinde tek cins *Wallemia* tanınıyordu. Ancak tatlı, tuzlu ve kurumuş gıdalardan ve Akdeniz, Karayip ve Ölü Deniz gibi hipersalin buharlaşma havuzundan izolatların taksonomik analizleri yapıldığında bu cinse ait 3 tür olduğu kararlaştırılmıştır: *W. ichthyophaga*, *W. muriae*, *W. sebi*. Yapılan araştırmalarda *W.ichthyophaga* en halofilik ökaryot olarak tanımlanmış, % 9 NaCl olmadan gelişme gösterememekte ve % 30 NaCl' ye kadar büyüme göstermekteyken, *W. muriae* % 4- 25 NaCl aralığında, *W. sebi* ise % 27 NaCl' ye kadar büyüme gösterdiği belirlenmiştir (Kuncic ve ark., 2010).

Günümüzde ekstremotolerant fungal türlere Arktik buzullar ve Antartik kayalar, derin deniz suları gibi ekstrem soğuk çevrelerde rastlanılmaktadır. Funguslar yaşamları için tuz varlığına ihtiyaç duymazken, yüksek tuz varlığını (% 0- % 30 NaCl) tolere edebilmektedirler. Günümüzde birkaç *Alternaria* ve *Fusarium* türleri buzullardan ve tuzlu kaynaklardan izole edilmişlerdir (Sepcic ve ark., 2011).

### 1.3. Tuzlu Çevrelere Adaptasyon

Halofilik mikroorganizmalar temel olarak yüksek tuz içeren ortamlara adaptasyon için iki strateji geliştirmişlerdir. Halofilik arkealar, sitoplazmalarını ozmotik dengede tutmak için ortamda bulunan tuzu depolarlar. Osmoregülasyonun bu mekanizması ortamda yüksek miktarda tuz varlığında hücre içi enzimler ile bazı özel adaptasyonları gerektirir. Diğer yonteme göre ise, halofilik ya da halotolerant bakterilerin hücre içi tuz konsantrasyonları

düşüktür ve hücre içi enzimlerin özel bir tuz toleransları yoktur. Dış ortam ile ozmotik dengeyi ortamda çözünmüş olarak bulunan yüksek konsantrasyonlu çeşitli organik ozmotik bileşenleri depo ederek devam ettirirler (DasSarma, 2001).

Düşük-tuz; organik çözünür madde biriktirme stratejisi (Compatible Solute Stratejisi): Bu stratejide hücreler sitoplazmalarında ozmotik potansiyeli organik çözünenlerle dengeleyerek düşük tuz konsantrasyonu içerir. Bu işlemi çözücülerini alarak veya sentezleyerek yaparlar. Çözünenler gliserol, şekerler ve türevleri, aminoasitler ve türevleri, glisin, betain, ektoin olabilir. Fazla enerji gerektiren bir işlemdir. Enerji hem sentez hem de aynı zamanda çözünür tuzları dışarı pompalama için kullanılır. Hücreler dış ortamla ozmotik olarak eş değer iç konsantrasyona sahip olabilirler (DasSarma, 2001).

Yüksek-tuz biriktirme stratejisi (Salt-in Stratejisi): Bunu potasyum klorid'in yüksek konsantrasyonlarını biriktirerek sağlarlar. Potasyum iyonları hücreye uniport sistem aracılığıyla pasif olarak girer. Sodyum iyonları dışarı pompalanır. Klorür sodyum iyonları ise co-transport yoluyla zar potansiyeli karşı hücreye girer. Hücresel proteinlerin stabilite ve aktivite bakımından KCl ya da diğer tuzların molar konsantrasyonlarına ihtiyaç vardır (Ma ve ark., 2010). Hücre içerisine yüksek oranda K iyonları aktarılır ve hücre içine aktarılan  $K^+$  konsantrasyonu hücre dışı  $Na^+$  konsantrasyonundan oldukça yüksek bir hal alır.  $K^+$  iyonları hücrenin su dengesini sağlamada, hücrenin dehidrasyonunu ve osmotik basıncın yükselmesini engellemede görev alır. Yüksek iyonik kuvvette proteinler kümeleşme eğilimi gösterdiğinden aktivite ve stabilite özelliklerini kaybederler. Bu nedenle hücresel mekanizmaları ortama adaptasyonu sağlama eğiliminde olur. Halofilik enzimler oldukça polar yüzeye sahip olduklarından yüksek oranda asidik amino asitler içermektedirler (Falb, 2005).

Bakteriyorodopsin (BR) ya da rodopsin gibi mor membrana sahip bazı türler de BR protein gradienti oluşturarak Na iyonlarının hücre dışına pompalanması hücre içine K iyonlarının alınmasını sağlayarak osmotik basıncın dengelenmesini sağlar. Hipersalin ortamda yaşayan mikroorganizmalar sahip oldukları renkli karotenoidler UV'den korunmalarını

sağlarken, renksiz mutantlar UV' ye duyarlıdır. Göl sularında yüzeyde oluşan buharlaşmayla tuz molekülleri biraraya gelerek yüzeyden diplere çökme eğilimi gösterirler. Göl diplerine çökerken kristal büyüme gerçekleştirirler. Halofiller kristal oluşurken bu sıvı inkluzyonlarda uzun yıllar boyunca kalabilmektedirler (<http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/hypersaline>, 2012).

#### 1.4. Halofilik Proteinler ve Pigmentler

*Halobacterium salinarum* enzimleri KCl konsantrasyonlarında aktiftir. Suksinat dehidrojenaz, malat dehidrojenaz ve izositrat dehidrojenaz optimal aktivite için 3-4 M veya daha fazla KCl'e ihtiyaç duyar. Halobacteriales'in protein ve enzimleri 1-2 M NaCl'den daha az tuz varlığında denatüre olurlar. Asidik aminoasit içerirler. Hidrofobik aminoasit içeriği düşüktür. Termofilik özellik gösterirler. *Dunaliella* kloroplastlarında yer alan enzimler ve sitoplazmik enzimler tuza duyarlıdır. Düşük intracellülar iyonik konsantrasyon içerir ve ozmotik solut olarak gliserol biriktirir. Bazı enzimler gliserol ile stabilize ve stimüle edilir. Algal karotenoidlerden *Dunaliella*'nın belli strainleri  $\beta$ -karoten biriktirebilir. Oksijenik ve anoksijenik fotosentetik bakteri pigmentlerine sahip *Cyanobacteria* hipersalin suların ve yüzey sedimentlerin renklenmesine katkıda bulunur. Anoksijenik mor bakteriler hipersalin soda göllerinde bulunabilir. Aerobik heterotrofik arkea ve bakteri karotenoidlerine sahip Halobacteriaceae'nin pek çok temsilcisinde hücre membranındaki yüksek karotenoid içeriği sayesinde kırmızı-turuncu renklenme olur. Tuzlalardaki kırmızımsı-pembe renklenmeye arkeal karotenoidler sebep olur. Retinal pigmentler (Halorodopsin, bakteriorodopsin, sensör rodopsin) ise Halobacteriaceae familyasında bulunur. *Halobacterium salinarum* mor pigmentli bakteriorodopsin üretir. Halorodopsinin yapısı bakteriorodopsine benzer. Sensör rodopsin fototaksiste ışık duyarlılığında rol alır. İlk kez fotoaktif *Halorhodospira halophila*' da sarı protein belirlenmiştir. Bu protein pek çok anoksijenik fototrofik bakteride bulunur ( Oren, 2003).



### 1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemleri

Ekstrem yaşam şartlarında mezofilik mikroorganizmaların gelişimleri sınırlıyken, halofilik mikroorganizmaların bu yaşam ortamlarına adapte olmalarından dolayı bu organizmaların hücresel yapılarındaki farklılıklar dikkat çekmiştir. Bu farklılıklardan yola çıkılarak biyoteknolojik olarak uygulamaları üzerine çalışmalar önem kazanmıştır. Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında basit besiyerlerinde kolay üretilebilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler. Halofilik mikroorganizmaların ürettiği bakteriyorodopsinin teknik alanlarda uygulamalarının bazılarında holografik depo materyali, uzaysal ışık modülatörleri, optik hesaplama ve optik hafıza olarak kullanımları örnek olarak verilebilir. Bakteriyorodopsin ışık aracılığı ile membrandan iyonların geçişine olanak sağlayan retinal bir pigmenttir. Bakteriyorodopsin dışarıya elektron pompalayarak enerji elde edilmesini sağlar. Güneş enerji sistemi dönüşümünde, fotoalgılayıcı kromoprotein film, veri stok sistemleri, güç jenerasyonu gibi kullanımlarda bu pigmentten patent alınmıştır (Ang ve ark. 1980). Petrolün mikrobiyolojik geri kazanımı konusunda bu mikroorganizmalara ait biyosümfektanlar ve ekzopolisakkaritler oldukça ilgi çekmektedir. Halofilik poliizoprenoidler sentetik kauçuk yapımında kullanılmıştır. İzoprenoidlerin kanser ilacı Taxolün üretiminde ilk adım olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Katalitik güce sahip doğal biyokatalizör olan enzimlerin uygulamaları rekabetçi biyosümfelerde biyoteknoloji araştırmalarının önde gelen alanlarından biridir. Aşırı yüksek yoğunluklardaki tuzlu ortamda aktif olan yeni izomerazlar ve hidrolazlar halofilik enzimlere örnek olarak verilebilir. Halofilik arkealara ait ekstreozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdır. Yani termotolerant özelliklere de sahiptirler. Bunun yanında halofilik enzimler tuzla zenginleştirilmiş koruma kalkanına sahiptir. Laboratuvar kullanımı açısından halofilik arkea *Halococcus* cinsine ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine dair patent alınmıştır. Çeşitli

geleneksel fermente yiyeceklerin üretiminde kullanılır. Mezofilik organizmalarda standart koşullarda enzimler aktifken, ekstrem koşullara maruz kalan organizmaların da enzimlerinin etkileri görülmektedir. Endüstriyel uygulamalarda tuzcul ortamlarda aktivite gösteren halofilik amilaz enzimi sakarifikasyon işlemlerinde etanol üretiminde, nişasta hidroliz işlemlerinde deterjan formülasyonlarında kullanılır. Kitinaz enzimi oligosakkarit sentezinde, kitin atık arıtımında, kitinin biyodönüşümünde, glutaminaz enzimi antilösemik ajan ve gıda tatlandırıcı olarak, nükleaz enzimi tatlandırıcı ajan guanilik asidin üretiminde, proteaz enzimi tripeptid (Ac-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) sentezinde, balık sosu yapımı, deterjan formülasyonunda, ksilanaz enzimi ise kâğıt endüstrisinde selülozun biyodegradasyonunda kullanılır (Oren, 2008). Halofilik mikroorganizmalar çevresel atıkları degrade edicidirler. Petrol kirliliğini iyileştirmede önemli rol oynayan halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar yüzey gerilimini azaltıp hidrofobik hidrokarbonların çözünürlüğünü arttırarak degradasyonu sağlarlar. Petrol endüstrisinde çevresel kirletici olarak bulunan bileşenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonlar, toksik ve karsinojenik etkiye sahiptir. Hipersalin çevrelerden elde edilen halofilik mikroorganizmalardan *Haloferax mediterranei*'nin PHA (polisiklik aromatik hidrokarbon) degrade ettiği bulunmuştur (Litchfield, 2011). Zeytin yağı elde etme sürecinde oluşan atıksularda polifenolik bileşikler, polialkoller, toksik aromatik bileşikler açığa çıkarmaktadırlar. Fenolik bileşiklerden olan tirozol, zeytinyağı atık sularının ana fenolik bileşiğidir. *Halomonas* sp. HTB24 suşlarından tirozolün iki doğal antioksidan olan hidroksitirozol ve 3,4 dihidroksifenilasetik asite dönüştürdüğü rapor edilmiştir (Liebgot ve ark., 2007). İlk kez haloarkealarda polihidroksialkanat üretimi gerçekleştirildiğini Fernandez-Castillo ve arkadaşları (1986) rapor etmişlerdir. Daha sonraları farklı halofillerin farklı suşlarında PHA üretimi araştırmaları yaygınlaşmıştır. 1996 yılında Escalona ve arkadaşları *Haloferax mediterranei*'den polihidroksialkanatın ticari üretim için patent yayınlamışlardır.  $\beta$ -karoten antioksidant ve yiyecek renklendirici olarak kullanılır. *Halobacteria* familyasından bir türe ait 84 kDa'lık bir protein kanser hastalarında myc onkogene karşı üretilen antikorları saptamak amacıyla kullanılmaktadır. *Halobacterium* GRB-1, ökaryotik tip DNA topoizomerazları

ve girazları etkileyen yeni anti-tümör taramasında kullanılabilen bir plazmid içermektedir. Lipozomlar, tıpta ve kozmetikte bileşiklerin vücuttaki spesifik bir hedef bölgeye aktarımı için kullanılır (Margesin ve Schinner, 2001).

### 1.6. Alkalifilik Mikroorganizmalar

Alkalifilik mikroorganizmalar, ortam pH değeri 9,0 veya daha fazla değerinde gelişebilen ekstremofilik mikroorganizmalardandır. Genel olarak pH değeri 10,0 civarında optimum büyüme gösterirler. Alkalifilik mikroorganizmalar sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, potasyum karbonat içeren alkalın besiyerlerinde izole edilebilmektedir. Gelişmeleri için Horikoshi I ve II besiyerleri yaygın kullanılmaktadır. Alkalifiller nötrofilik mikroorganizmalardan farklı olarak pH değerleri 10,0 civarında optimal gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. *Micrococcus sp.* strain 3122'den  $\alpha$ -galaktosidaz iç pH nötr civarı olduğunda 7,5 optimal katalitik pH değerine sahiptir. Bu sayede hücre içi sitoplazmik pH değerini hücre içi enzimlerin optimal pH değerlerinden tahmin etmek mümkündür (Horikoshi, 2006). Hücre duvarları peptidoglikan yapıda ve bazı türler peptidoglikana ilave olarak asidik polimerler (glutamik asit, glutonik asit gibi) içermektedir. Peptidoglikan olmayan asidik polimerler sodyum ve hidronyum iyonlarını adsorbe kabiliyeti kazandırabilmekte ve hücrelerin alkalın ortamda büyümelerini sağlamaktadırlar (Horikoshi, 2006). Alkalifilik mikroorganizmalar gelişimleri için  $\text{Na}^+$  iyonlarına ihtiyaç duyarlar.  $\text{Na}^+$  iyonunun varlığı membranlar yoluyla etkili çözünen taşınımı için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Kemiozmotik teoride hücrelerdeki proton itici kuvvet, aktif transport zinciriyle veya ATPaz ile ATP metabolizmasından oluşan  $\text{H}^+$  ile oluşturulmaktadır.  $\text{H}^+$  daha sonra çeşitli substratların birlikte taşınımı ile hücrelerin içine yeniden birleştirilir.  $\text{Na}^+$  bağımlı taşıma sistemlerinde  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter sistemiyle  $\text{Na}^+$  ile değiştirilir. Oluşan sodyum itici güç ile hücre içine substratlar da hareket eder (Horikoshi, 2006).

## 1.7. Alkalifilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemleri

Alkalifilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin bazı alanlarında çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu uygulamalarda bazı enzimler sıklıkla kullanılmaktadır. 1971 yılında Horikoshi *Bacillus sp.* strain 221' de alkalın serin proteaz üretimini bildirmiştir. Deterjan endüstrisinde alkalifilik enzimler sıklıkla kullanılır. Ayrıca pH 8-10 arasında dehairing işlemlerinde kullanılmaktadırlar (Horikoshi, 1999). Nişasta degrades eden enzimlerden ilk alkalın amilaz enzimi Horikoshi-II besiyerinde *Bacillus sp.* strain A-40-2 tarafından üretilmiştir. Nakamura ve arkadaşları 1976 da alkalın pullulanazı keşfetmiştir. Pullulanazlar glukoz ve maltoz verimini artırır. Alkalın selülozlar gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, kimya, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ve atıkların giderimi, genetik mühendisliği gibi alanlarda kullanılmaktadırlar. Horikoshi ve arkadaşları ekstraselüler alkalın CMCazlar üreten bakteriyel izolatlar (*Bacillus sp.* strain N4) bulmuşlardır. Bushan ve arkadaşları (1994) katı faz fermentasyonundan alkalifilik *Candida* türlerinden lipaz üretildiğini bulmuşlardır. Kağıt ve kağıt hamuru, gıda ve hayvan yemi endüstrisi gibi alanlarda ksilanaz temel endüstriyel enzim olarak kullanılmaktadır. Bu enzim aynı zamanda tek hücre proteini, sıvı ya da gaz yakıt üretimi, çözücü ve şeker gruplarının üretimi gibi genel uygulamalarda kullanılmaktadır ( Beg ve ark., 2001). Tsujibo ve arkadaşları (1992) alkalifilik *Nocardopsis albus subsp. prasina* OPC-131' den kitinaz izole etmişlerdir. Kitinazlar arıtım, gıdalarda ve ilaçlarda kıvam artırıcı ve koruyucu olarak kullanılırlar.

## 1.8. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler bitki ve mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli temel besin maddelerinin dışında, ortama adaptasyon, üreme ve savunma gibi çeşitli amaçlarla ürettikleri doğal kimyasallardır. Bitki, mikroorganizma bazen de hayvansal orijinli bu maddeler ilaç, gıda ve kozmetik sanayinde kullanıma sahip önemli kimyasalların doğal kaynaklarıdır. Endüstriyel olarak, temelde iki tip metabolit olan primer ve

sekonder metabolitlerin oluşumu mikrobiyal üremenin eksponansiyel fazında gözlemlenirken bazı ürünlerin mikrobiyal üremenin eksponansiyel faz sonrasında oluştuğu gözlenmiştir. Sekonder metabolitler endüstride daha kararlı ürün ve daha az enerji gerektirdiği için tercih edilmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010). Mikrobiyal sekonder metabolitler çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Antibiyotik, anti-migren, anti-kanser ajanı, feromon, pigment, enzim inhibitörleri olarak işlev görmektedirler (Demain, 1998). Günümüzde biyoaktif metabolit üreticileri olarak siyanobakteriler, bakteriler, deniz omurgasızları, endofitik funguslar, bitkiler kullanılmaktadır (Bérdy, 2005). Aktif metabolit üretimi için kullanılan mezofilik mikroorganizmaların enzim aktiviteleri yeterli olmayabilir. Bu nedenle ekstrem koşullara uyum sağlayan mikroorganizmaların endüstriyel anlamda biyokataliz reaksiyonlarında etkili olduğu belirlenmiştir (Demirjian ve ark., 2001).

Sekonder metabolit terimi ilk kez bitki fizyologları tarafından kullanılmıştır (Zahner, 1979). Sonraları bakteri, arke, aktinomisetler ve fungus gibi canlılar tarafından da sentezlendiği görülmüştür. Sekonder metabolitler ekonomik açıdan değerli olan mikrobiyal üremenin durağan fazında ortaya çıkarlar (Madigan ve Martinko, 2010). Mikrobiyal sekonder metabolitler antibiyotik, pigment, toksin, feromon, enzim inhibitörü, immünomodülatör ajanlar, reseptör antagonistleri ve agonistleri, pestisidler, antitümör ajanları, hayvan ve bitkilerin büyüme promotorlarını oluştururlar. Antibakteriyal proteinler olan bakteriyosinler mikroorganizmalara karşı bakterisidal aktivite gösterirler. Gram negatif bakterilerde 10 kDa'dan daha az küçük bakteriosinler üretilirken gram pozitif bakterilerde 10<sup>6</sup> kDa'dan daha fazla bakteriosin üretirler (Demain, 1998). Mikrobiyal sekonder metabolit üreten funguslardan *Aspergillus fumigatus*' un poliketidler, alkaloidler ve seskiterpenler gibi metabolitleri içeren 226'dan fazla metabolit ürettiği belirlenmiştir (Frisvad ve ark., 2009). Ürettiği metabolitlerden gliotoxinin *Candida albicans* ve *Candida neoformans*' a karşı toksik olduğu belirlenmiştir (Coleman ve ark., 2011).

*Streptomyces viridifaciens*, tetrasiklin ve klorotetrasiklin gibi maddeleri üretmişlerdir (Robinson ve Nigam, 2001). 1896'da Gosio *Penicillium glaucoma*'dan ilk kristal fungal ürün olan mikofenolik asidi keşfetmiştir.

Sekonder metabolitler antimikrobiyal, antitümör ve antiviral aktivitelerde antibiyotik olarak mikroorganizmalardan izole edilmişleridir (Bérdy, 2005). *Bacillus subtilis* tarafından üretilen iturin antifungal antibiyotik olarak belirlenmiştir. *Fusarium oxysporum*, *F.moniliforme* *Aspergillus niger*, *A.flavus* gibi bitki paojenlerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Latoud ve ark., 1987). *Bacillus spp.*, *B. subtilis* MTCC 2423 tarafından üretilen sürfaktin suyun yüzey gerilimini  $72 \text{ nM/m}^3$  den  $27 \text{ nM/m}^3$  e düşürdüğü belirlenmiştir (Ohno ve ark., 1992). Sürfaktin bazı bakterilerin protoplast, eritrosit ve sferplast yapılarını liziz edici olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Robinson ve Nigam, 2001). *Gibberella fiji kuori* ve *Fusarium moniliforme* tohum çimlenmesini teşvik edici madde olan giberillik asidin üretilmesini sağlamışlardır (Balakrishman ve Panday, 1996). Halofilik mikroorganizmalar gelecekte umut verici bioaktif metabolit üreticileri olarak görülmektedirler (Canovas ve ark., 1998). Üç yeni siklopeptid (halolitoralin A-C) deniz sedimentlerinden köken alan *Halobacillus litoralis* YS3106'den izole edilen bu maddeler orta derecede antifungal aktivite göstermişlerdir (Yang ve ark., 2002). Ekzopolisakkarit üreticisi *Halomonas stenophila* strain B100 halofilik bakterisinin insan T kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Ruiz-Ruiz ve ark., 2011). Halofilik *Dunaliella salina* ve *Dunaliella bardawil*'den beta karoten elde edilmiştir. Beta karoten provitamin A kaynağı ve gıda renklendirici ajan olarak kullanılır (Oren A., 2010). Fernandez- Castillo ve arkadaşları (1986), *Haloferax mediterranei* ve *Haloferax volcanii*'nin polyhidroksialkanat (PHA) ürettiğini belirlemişlerdir. PHA doğada kısa zamanda parçalanabilen plastik olarak kullanılır. Cameotra ve Makkar (1998), Halobacteria tarafından terapötik antimikrobiyal ajan, tarımsal antimikrobiyaller, kişisel bakım ürünleri, yiyecek endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel süreçlerde kullanılan biyosüpfaktanların üretildiğini rapor etmişlerdir.

Halofilik bakteriler tarafından üretilen bakteriorodopsin pigmenti güneş enerjisinin dönüşümünde kullanılmasıyla patent alınmıştır (Ang ve Sammells, 1980). Ayrıca fotosentetik kromoprotein film (Miyasaka, 1992) fotoakımın üretilmesinde kullanılmıştır (Koyakama ve ark., 1994). Hidrokarbon degradasyonu gibi kirleticilerin giderilmesi yeteneğine sahip oldukları

bulunmuştur (Emerson ve ark., 1994). Denizlerdeki atık kirliliğinin iyileştirilmesini sağlamışlardır (Woolard ve Irvine, 1995). Deniz suyu kökenli *Fusarium* türlerinde poliketid furielins, sesterterpen neomagnicols ve magnicols, siklik pentadepsipeptid sansalvamid, N- metil sansalvamid gibi küçük sitotoksik organik moleküllere sahip olduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde deniz suyu kökenli *Cladosporium sp.* içerisinde de sitotoksitesi tanılanmış moleküllerden makrolid sporiolid belirlenmiştir. Aynı zamanda gıda kaynaklı *Wallemia spp.* içerisinde de izo-karyofilenler, walleminol ve walleminone, azasteroidler UCA 1064-B gibi sitotoksik bileşenler bulunduğu belirtilmiştir (Sepcic, 2011).

### 1.9. Mikrobiyal Transformasyon

Biyotransformasyon veya diğer adıyla mikrobiyal transformasyon, biyokatalizörler (mikroorganizma, enzim, bitki doku kültürü vb.) aracılığıyla kültür ortamına sonradan ilave edilen substrattan yeni türevler elde edilmesi işlemidir. Burada amaç; mikroorganizmaların gelişebildiği ve canlılıklarını sürdürdükleri besi ortamlarına prekürsörlerin ilavesiyle oksidasyon, redüksiyon, dekarboksilasyon, hidroliz vb. reaksiyonlar ile yeni biyoaktif metabolitlerin sentezlenmesidir. Kullanılan başlangıç maddesi doğal bir madde ise biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen metabolitler de doğal kabul edilmektedir. Mikrobiyal transformasyon reaksiyonlarında genellikle aromatik bileşikler, terpenler, heterosiklik bileşikler, alkaloidler ve karbonhidratlar substrat maddeleri olarak kullanılırlar (İşcan, 2009).

### 1.10. Biyotransformasyon ve Enzimler

Tüm biyotransformasyon reaksiyonları temelde enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Enzimler başlıca 6 ana gruba ayrılmışlardır.

#### 1.10.1. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, C-C, C-H veya C=C bağlarına oksijen eklenmesi ya da hidrojenin koparılması işlemlerini gerçekleştiren enzimleridir.

### 1.10.2. Transferazlar

Fonksiyel grupların transferini sağlarlar.

### 1.10.3. Hidrolazlar

Glikozit, peptit, ester, amit gruplarını ve benzer şekilde C-N bağlarını hidroliz eden enzimlerdir.

### 1.10.4. Liyazlar

Genelde H-X tipinde fonksiyonların C=C, C=O ve C=N çifte bağlarına katılımını veya çıkışını sağlayan reaksiyonları kataliz ederler.

### 1.10.5. İzomerazlar

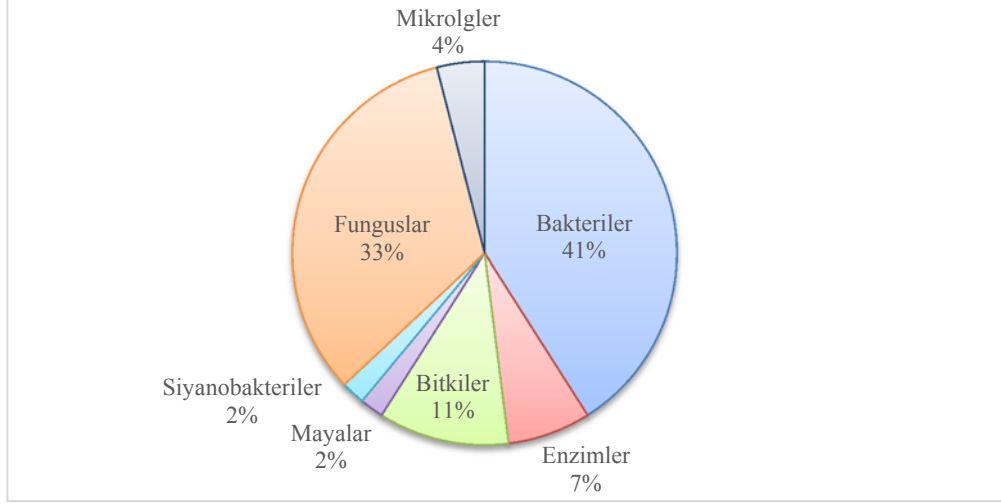
Bu tip enzimler çifte bağ yer değişimi, *Z/E* ve *cis/trans* izomerizasyon, rasemizasyon ve epimerizasyonlarını kataliz ederler.

### 1.10.6. Ligazlar

ATP enerjisi sayesinde C-O, C-S, C-N ve C-C gibi katılımları kataliz ederler (Demirci, 2000).

Mikrobiyal transformasyon konusunda yapılan çalışmalar incelendiğinde en çok kullanılan biyokatalizörler (Şekil 1.6.); mikroorganizmalar, canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri, canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri, insan, saflaştırılmış veya saflaştırılmamış enzimlerdir (Houjin ve ark. 2006).





Şekil 1.6. Biotransformasyonlarda kullanılan biyokatalizörler

Biyotransformasyon ile ilk olarak M.Ö 5000 yılında karşılaşıldığı düşünülmektedir. Tarihte Mezopotamya, Mısır, Meksika ve Sudan’da biyotransformasyon çalışmaları yapılmıştır. Bizden öncekiler *Acetobacter*’i ve beraberinde şekeri alkole ve asetik asite dönüştürmek için kullanmışlardır. Çizelge 1.1. biyotransformasyonun tarihsel gelişimindeki önemli olayları göstermektedir (Ghisalba ve ark., 2010).

Hücre kültürleri veya saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon süreçleri 1862 yılında *Bacterium xylium* ile alkol oksidasyonu ile asetik asit üretimi gerçekleştirilmiş, 1880 yılında *Acetobacter aceti* ile glukozun, glukonik aside oksidasyonu sağlanmıştır. 1921 yılında mayalar ile asetaldehit ve benzaldehitten açiloin üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücre sistemleri ucuz oluşu ve mikrobiyal hücrelerde rejenerasyon ile kofaktörün geri kazanımı kolay olduğundan kofaktöre ihtiyaç duyulmaması, seçici kimyasal türevlerin üretimi, biyodegradasyon avantaj sağlarken, biyotransformasyon sonunda yan ürünlerin ortaya çıkması, araç teçhizat gerekliliği, büyük hacimde çalışılırken ortaya çıkan teknik aksaklıklar dezavantaj sağlamaktadır. (Xu ve ark., 2007).

**Çizelge 1.1.** Biyotransformasyon reaksiyonlarının tarihsel gelişimi

Yıl	Yapılan Çalışmalar
M.Ö 5000	Yiyeceklerin saklanması, Antik Mısır'da alkollü içecekler ve sirke üretimi
M.Ö 800	Peynir üretmek için kimoziinle Kazein hidrolizi. Peynir üretimi için kullanılan mide enzimleri Homeros'un İlyada destanında geçmektedir.
1670	Etanolün asetik asite endüstriyel biyooksidasyonu için olan "Orleans" işlemi
1680	Antoni van Leeuwenhoek, mikroskopla mikroorganizmaları ilk gören kişi.
1833	Payen ve Persoz arpanın çimlenmesi ve enzimlerin temel prensiplerinin formülize
1874	Christian Hansen tarafından enzim laboratuvarı ve şirketi kuruldu.
1878	Kühne "enzim" terimini ortaya koydu.
1890	Takamine bakteriyel amilazları izole etti.
1894	Emil Fischer enzim katalizinin temellerini ayrıntılarının orta koydu
1897	Buchner, şekeri alkole dönüştüren maya enzimlerini keşfetti.
1897	Eduard Buchner, hücresiz preparatlar ile fermantasyonu yayınladı
1899	Berzalius, diastaz ile nişasta hidrolizinin katalitik reaksiyonlarını onayladı.
1907	Röhm, bronzlaşma (pankreas özütüyle amonyum tuzlarının karışımı) için "Oropon" isminde bir şirket kurdu
1930	Reichstein, Vitamin C sentezi için "srobit"i "sorboz" biyooksidasyonu
1940	İnvertaz kullanarak sükröz evirme gerçekleşti
1950	Steroidlerin biyodönüşümü
1969	Immobilize bir enzimin (aminoasilaz) ilk endüstriyel kullanımı
1970	Penisilinin, 6-aminopenisilanik aside hidrolizi
1985	Akrilamid üretimi için enzimatik süreç
1990	Domuz insülininin proteazıyla (tripsin) insan insülinine hidrolizi
1995	Nikotinamid biyotransformasyonu

Biyotransformasyon beş farklı yöntemle gerçekleştirilebilir:

**Büyüyen hücrelerle biyotransformasyon:** Mikroorganizmaların çoğalmasıyla birlikte enzimlerin miktarı da artar. Üremenin durağan fazında substrat eklenir. Substrat mikroorganizmanın üremesini inhibe edici etki gösterebildiğinden mikroorganizmaların belli bir derişime ulaştıktan sonra substrat eklenmesi daha uygun olacaktır (Karadeniz, 2007).

**Önceden çoğaltılmış hücrelerle biyotransformasyon:** Optimum şartlarda büyüme gösteren mikroorganizmalar filtrasyon veya santrifüj yardımıyla biyokütleleri ayrılırlar. Bu biyokütleler tampon çözelti içeren ortama aktarılır. Bu yöntemle mikroorganizmalar çoğalırken substratın olumsuz etkileri giderilebilir, her adım optimize edilebilir, ortamdan ürünün ayrılması daha kolaydır (Karadeniz, 2007).

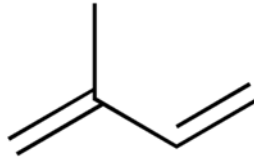
**Tutuklanmış hücrelerle biyotransformasyon:** Tutuklanmış hücreler biyotransformasyon işlemlerinde tepkime ortamından kolayca uzaklaştırılıp tekrar kullanılabilirler. Serbest hücrelerle biyotransformasyon işlemlerine göre daha kararlı özelliğe sahiptirler. Tutuklanma ek maliyet ve difüzyon sınırlamaları yöntemin dez avantajını oluşturur (Karadeniz, 2007).

**Saf enzimlerle biyotransformasyon:** Saf enzimlerle (hücrelerden izole edilen) gerçekleşen biyotransformasyon süreçlerinde enzimler substrat molekülünde eşdeğer gruplardan hedef bölgeyi seçerek tepkimeye girmeleri istenilen tepkimeye özgü olacağından yan tepkimelerin olmaması, belirli pH aralıklarında aktif olmaları, mikroorganizmalara göre çözücü toleranslı olmaları, tepkimenin işletim ve kontrolünün kolay olması bu süreçlerin avantajlarını oluşturur. Enzim saflaştırma işleminin zaman alıcı olması, ticari saf enzim ücretlerinin pahalılığı, bazı enzimlerin koenzim ve kofaktör gereksinimlerinden maliyetin artmasına neden olmaları dezavantajlı bir durumdur (Karadeniz, 2007).

**Çok fazlı sistemlerle biyotransformasyon:** Yüksek derişime sahip substrat veya ürünlerle çalışmak mümkündür. Substrat ve ürün inhibisyonu azaltılırken tepkime hızı yükselir, substrat veya ürün hidrolizi önlenmiş olur. Biyokatalizör ya da ürün uzaklaştırması kolay olur (Karadeniz, 2007).

## 1.11. Terpenler

Terpenler, izopren türevi doğal maddelerdir. İzopren molekülünün kimyasal yapısı 5 karbonlu 2-metil butadien'dir. İzopren molekülünde konjuge halde 2 adet çift bağ vardır. Konjuge bağ taşıyan izopren molekülleri başka moleküller ile veya kendi aralarında yüksek reaksiyon yapabilme yeteneğine sahiptir.



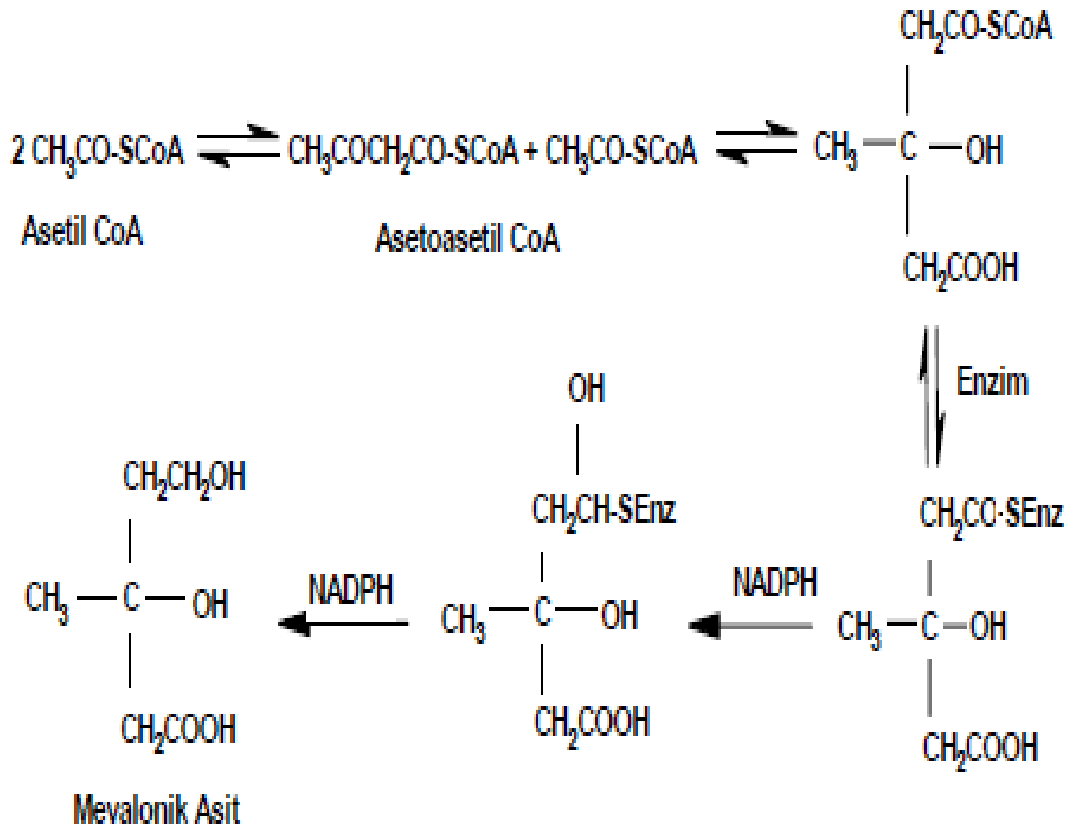
Şekil 1.7. İzopren (2-metil bütadien) yapısı

İzopren türevleri ile ilgili ilk çalışmalar 19. yüzyılın başlarında başlamıştır. 1818'de Labillardiere terementi ile araştırmalar yaparken karbon: hidrojen oranı 5:8 olan bir bileşiği bulmuştur. 1826'da Faraday kauçuk ile terementi arasındaki benzerliği araştırırken kauçuğun formülünü, C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> olarak tespit etmiştir. 1860'da Williams, kauçuğun 300-350°C'de pirolizi sonucu elde ettiği aynı yapıya "izopren" adını vermiştir. 1884-1887 yılları arasında bu konuda araştırmalarını sürdüren Otto Wallach "izopren kuralı"nı açıklamaya çalışmıştır. "Terpen" terimi ilk defa Kekule tarafından terementi yağındaki C<sub>10</sub>H<sub>18</sub> formülüne uyan hidrokarbonlar için kullanılmıştır (Demirci, 2000).

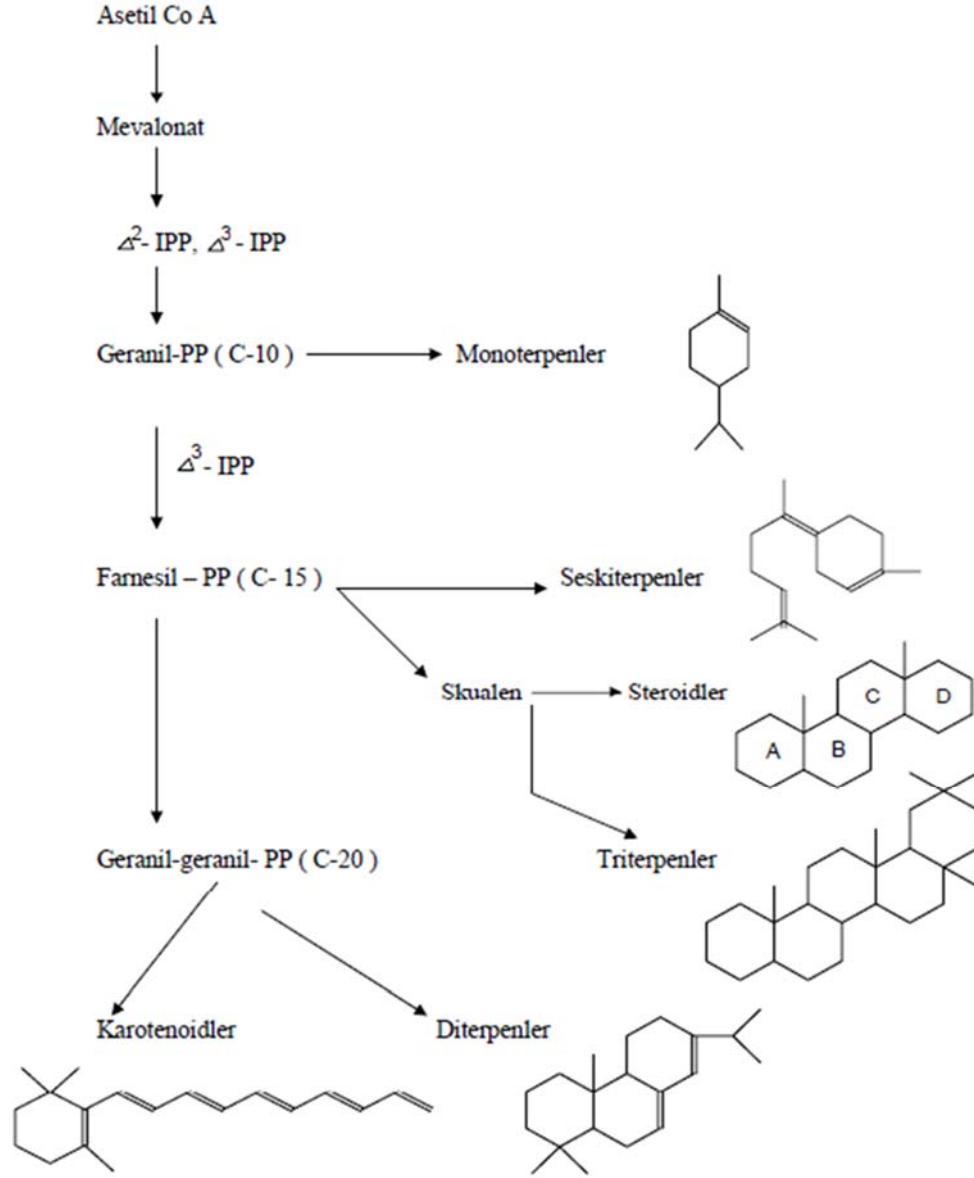
Terpenler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, gıda, kozmetik, zirai mücadele alanında kullanılan doğal bileşiklerdendir (Rowe, 2005). Doğada 40.000 civarında terpen ve terpen türevi bileşen bulunduğu tahmin edilmektedir (Springob ve Kutchan, 2008).

Mevalonik asit terpenlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır. Terpenler, yapısal olarak isopentenil difosfat (IPP) ve dimetilallildifosfat (DMAPP) mevalonat yolağında açığa çıkan izopren birimlerinden oluşurlar. Terpenler, bitkilerin sitosollerinde asetil mevalonik asit (MVA) yolağında koenzim-A (asetil Co-A)'dan, plastidlerinde ise deoksiksilozfosfat (DXP) yolağında pirüvat ve gliseraldehit-3-fosfattan başlayarak meydana gelir.

Hemiterpenler ve tetraterpenler DXP yolağından; triterpenler, steroidler ve bazı seskiterpenler MVA yolağından türevlenir. Her iki metabolik yolda da açığa çıkan ve baş-kuyruk esasına uygun olarak birleşen izopren üniteleri çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarla terpenleri oluşturur (Springob ve Kutchan, 2009). Ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşikler de olabilirler. Bunlar terpenoid olarak adlandırılırlar. Mono ve seskiterpenler uçucu yağların temel bileşenleridir (Umay, 2007).



Şekil 1.8. Mevalonik asit sentezi



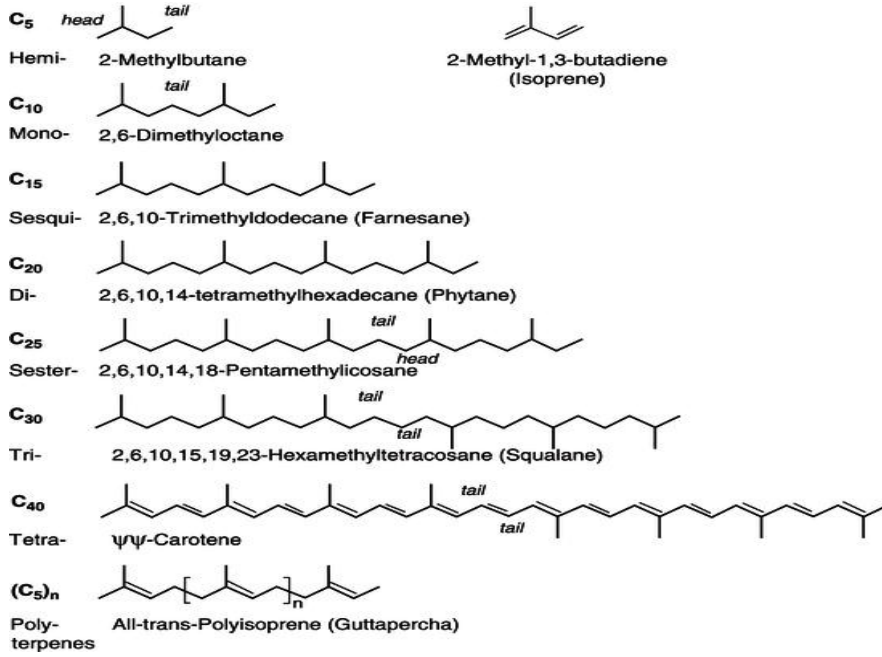
Şekil 1.9. Terpenlerin biyosentezi

### 1.11.1. Terpenlerin sınıflandırılması

Terpenler izopren birimlerinin iki, üç, dört, beş, altı, sekiz ve daha fazla sayıda bir araya gelmesiyle açık zincirli veya halkalı şekilde meydana gelir. Terpen bileşiklerinin ana iskeleti 5 karbonlu izopren ünitelerinden olduğundan sınıflandırmaları Otto Wallach'ın oluşturduğu "izopren kuralı"na göre yapılır (Başer ve Demirci, 2007).

**Çizelge 1.2.** Terpenlerin sınıflandırılması

Sınıf	İzopren Sayısı	C Atomu Sayısı
Hemiterpen	1	5
Monoterpen	2	10
Seskiterpen	3	15
Diterpen	4	20
Sesterterpen	5	25
Triterpen	6	30
Tetraterpen	8	40
Politerpen	8>	40>

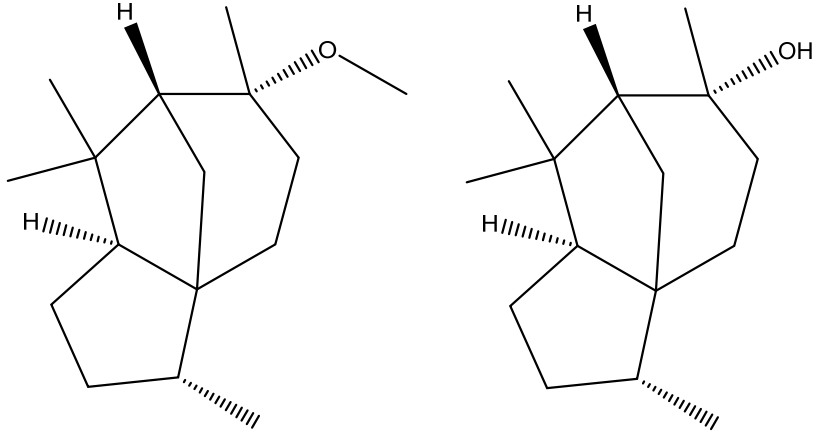


**Şekil 1.10.** ‘Baş-kuyruk’ esasına göre izoprenlerin bağlanması ve sınıflandırılmaları

### 1.11.2. Sedril metil eter

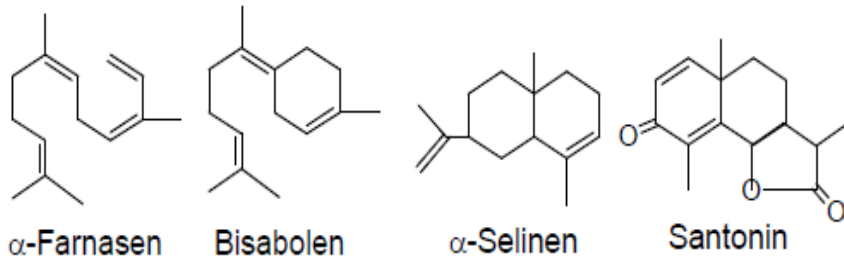
Bu çalışmada biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere doğal bir madde olan, Sedrolün metillenmesi ile elde edilen ve yarı sentetik özellikte olan seskiterpen yapısındaki sedril metil eter molekülü kullanılmıştır. Bu madde, kolay temin edilebilen kozmetik sektörde koku maddesi, alkolik

losyon, ter önleyici, beyazlatıcı, yüzey temizleyici, şampuan ve sabun gibi endüstriyel alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.11. Sedril metil eter ve Sedrol

Sedramber, Sedrol metil eter, Metil sedril eter olarak da isimlendirilen maddenin ( $C_{16}H_{28}O$ ) molekül ağırlığı 236.39292 g/mol'dür. Substrat molekül olarak seçilen sedril metil eter 15 karbonlu terpen türevi bileşiklerdendir. Seskiterpenlerin, antimikrobiyal, antitümör ve sitotoksik aktiviteleri bilinmektedir (Başer ve Kıırmer, 2005). Monosiklik, bisiklik, trisiklik yapıda bulunabilirler. Farnasen ve farnesol, alifatik yapıdaki seskiterpenlere; bisabolen ve zingiberen monosiklik seskiterpenlere; selinen bisiklik seskiterpenlere; santonin trisiklik seskiterpenlere örnek oluşturular (Kieslich, 1976).



Şekil 1.12. Bazı seskiterpenlere örnekler



## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler

- Etil asetat (Carlo Erba)
- Diklorometan (Merck)
- Aseton (Merck)
- *n*- heksan (Merck)
- Anisaldehit (Fluka)
- Glasiyel asetik asit (Merck)
- Sülfürik asit (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- 1,1- Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) (Merck)
- 2,2- Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) (Merck)
- Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (Sigma)
- Ketokonazol (Sigma)
- Kloramfenikol (Sigma)
- Trifenil tetrazolyum klorür (Sigma)
- Askorbik asit (Merck)
- Susuz sodyum sülfat (Merck)
- Sodyum klorür (Fluka)
- Magnezyum klorür hekza hidrat (Merck)
- Magnezyum klorür hepta hidrat (Merck)
- Potasyum klorür (Merck)
- Sodyum bromür (Fluka)
- Sodyum bikarbonat (Fluka)
- Kalsiyum klorür (Fluka)
- Tris Base
- Tris Klorür
- Cedryl Methyl Ether (Sigma)

- Resazurin mavisi (Sigma)

### 2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- İnce Tabaka Kromatografi plakları (TLC- Silicagel 60 GF254, MERCK)
- Plastik kapaklı petri (ISOLAB)
- Cam Pastör Pipetleri
- Otomatik pipetör (1000, 100, 10 mikrolitre)
- 96 kuyucuklu mikrolaka
- Vakumlu filtrasyon sistemi (Sartorius)
- Drummond kılcal borular

### 2.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

- Steril Kabin (Healforce)
- Vorteks karıştırıcı (IKA)
- Ultrasonik Banyo (Bandalin- Sonorex)
- Otoklav (Hirayama)
- Vakumlu sentrifügal yoğunlaştırıcı (Labconco)
- UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV 1700 Pharma Spec)
- Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (Shimadzu)
- pH metre (WTW Inolab)
- Santrifüj (Sigma)
- Bakteriyolojik Etüv (MMM Incucell)
- Çalkalamalı İnkübatör (New Brunswick Scientific)
- Ultra derin dondurucu (New Brunswick Scientific)
- Rotavapor (Buchi)
- Otomatik multikanal pipetör (Eppendorf)

### 2.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

#### %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

Tuzlu su .....	600 ml
Saf su.....	367 ml
Pepton.....	5 gr
Maya Özütü.....	1 gr

Karıştırma işlemi çözünene kadar uygulanıp 1 M Tris-Base ile pH 7,5'e ayarlanır. Son hacim 1000 ml distile su ile tamamlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith, 2009).

#### **% 23 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)**

Tuzlu su.....	767 ml
Saf su.....	200 ml
Pepton.....	5 gr
Maya Özüü.....	1 gr

Çözününceye kadar karıştırılır 1 M Tris-Base ile pH' ı 7,5'e ayarlanır. 1 litreye tamamlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

#### **%30 Tuzlu su stok solüsyonu (Salt Water) (g/l)**

NaCl.....	240 gr
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	30 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	35 gr
KCl.....	7 gr
NaBr.....	0,8 gr
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,2 gr

Çözünene kadar karıştırma işlemi uygulanır. 1 M Tris-Base ile pH 7,5' e ayarlanır. 5 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ilave edildikten sonra son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Rodriguez-Valera, 1985).

#### **TAE 50X**

Tris base.....	242 gr
Asetik asit.....	57,1 ml
EDTA (0.5 M pH 8).....	100 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 8' e ayarlanarak oada sıcaklığında saklanır. 1 X solüsyon çalışmak için 50 X solüsyonunu 50:1 oranında seyreltilerek kullanılabilir. TAE 1X 40 mM tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA içermelidir (Sambrook ve ark. 1989).

**Hazır besi ortamları:** Deney esnasında kullanılan (Mueller- Hinton Broth, Mueller- Hinton Agar, Patates Dekstroz Agar, Malt Ekstrakt Agar, Malt Ekstrakt Broth) gibi hazır besi ortamları ambalajlarına uygun olarak hazırlanmıştır. Agar besi ortamları 121°C’de ve 1,1 atmosfer basınç altında steril hale getirilmiş laminar akışlı steril kabinde, steril petrilere yaklaşık 15 mL kadar dökülerek agarların soğuması beklenmiştir. +4°C buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Sıvı besiyerleri ise erlen içerisinde pamukla kapatılmış şekilde sterilize edilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmişlerdir.

### **Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640)**

Ambalajda yer alan uygulanma şekline göre distile su ile hazırlanan RPMI 1640 besiyeri 3-[N-morpholino] propansulfonik asid (MOPS) ile tamponlanarak pH 7’ ye getirilip 0,1 M NaOH ilave edilmiş steril 0,2 µm gözenekli filtreden geçirilmiş + 4°C’ de antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmaları için saklanılmıştır (Pfaller ve ark., 1997).

#### **2.1.5. Sekonder metabolit taramalarında kullanılan mikroorganizmalar**

Sekonder metabolit taraması yapılan Çizelge 2.1’de bulunan örneklerden T seri mikroorganizmalar, T1, T2, T3, T4, T7, T24, T26, T27, 101, 105 ve 111 kodlu örnekler Tunceli izolatları olup C seri mikroorganizmalar Çamaltı tuzlasından izole edilmiş örneklerdir.

**Çizelge 2.1.** Sekonder metabolit taramalarında kullanılan mikroorganizmalar

C26- C52	<i>Haloarcula sp.</i>
C28 –C29-C37	<i>Halobacterium piscisalsi</i>
C43	<i>Halorubrum sp.</i>
C23-C24-C27	<i>Haloferax sp.</i>
T1, T2, T3, T4, T7, T24, T26, T27, 101, 105, 111	

#### **2.1.6. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın temini**

Van Gölü, Edremit bölgesinden alınan su örneğinden ekim yapılmış ve saf koloni oluşturulmuştur. Saf olarak elde edilen fungusun daha farklı

tuzluluklarda gelişimleri gözlenmiş, mikroskobik olarak incelenmesiyle cins düzeyinde tayini yapılmıştır. Tür düzeyinde tayini için moleküler yöntemlerden DNA ekstraksiyonu, PCR, PCR ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizi şeklinde işlemler uygulanmıştır.

### 2.1.7. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Antimikrobiyal etki testlerinde kullanılan mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma / Kaynak
<i>Candida albicans</i> / ATCC 90028
<i>Candida glabrata</i> / ATCC 60625
<i>Candida tropicalis</i> / NRRL Y-12968
<i>Candida utilis</i> / NRRL Y- 900
<i>Escherichia coli</i> / NRRL B- 3008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / ATCC 27853
<i>Salmonella typhimurium</i> / ATCC 13311
<i>Bacillus cereus</i> / NRRL B- 3711

## 2.2. Metod

### 2.2.1. Sekonder metabolit taramaları

Sekonder metabolit tarama işlemleri Çizelge 2.1.'de belirtilen mikroorganizmalar için ön tarama deneyleri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sekonder metabolit varlığını tespit etmek amacıyla 20 tane mikroorganizma 2 gruba ayrılarak (bakteri-arke) farklı farklı zamanlarda örnekler alınarak etil asetat ile ekstre edilmiştir. Grupta yer alan halofilik bakterilerin ve arkelerin gelişim süreleri farklılık gösterdiğinden farklı zamanlarda çalışılmıştır. Ön tarama deneylerinde belirli günlerde hazırlanan

numuneler ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi kütle spektrometresi sistemleri aracılığıyla analiz edilmiştir.

Mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Bakteriler % 18 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum) besiyerinde ve arkeler ise % 23 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum) ortamlarında geliştirilmişlerdir. Mikroorganizmaların stoklanması için 1 ml % 15 gliserol içeren eppendorf tüplerde -85° C' de saklanmıştır.

### 2.2.1.1.Sekonder metabolitler için ön tarama deneyleri

Ön tarama deneyleri için Çizelge 2.1.'de yer alan mikroorganizmalar sekonder metabolit tarama işlemlerinde kullanılmıştır.

***Mikroorganizmaların geliştirilmesi:*** Çizelgede yer alan mikroorganizmalardan ilk olarak 11 adet bakteri izolatu ele alınmış, 37°C 150 rpm' de 11 adet bakteri için steril 100'er ml erlenler içerisine 50'şer ml %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum) besi ortamına 1'er ml bakteri aşılansarak 5-7 gün arasında çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Negatif kontrol amaçlı kullanılmak üzere steril 100 ml erlen içerisine sadece 50 ml %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum) ilave edilmiş diğer bakterilerle aynı şartlarda inkübatöre yerleştirilmiştir. Arke grubu için aynı inkübasyon şartları altında negatif kontrol grubu olarak steril 100 ml erlen içerisine 50 ml %23 MGM besi ortamı ve 9 adet arke %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum) besi ortamında 7-14 gün arasında çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır (İşcan, 2009).

***Sekonder metabolitler için ekstraksiyon işlemi:*** Sekonder metabolit taraması için kullanılan mikroorganizmalar için 1., 4., 7., 10. ve 13. günlerde metabolit varlığını gözlemek için ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için steril uçlu pipetler aracılığıyla 50 ml ekimi yapılmış sıvı besi ortamlarındaki mikroorganizmalardan 3 ml kadar alınıp tüplere aktarılmıştır. Deney tüplerine 2 ml Etil Asetat (EtOAc) ilave edilerek vortekste 1 dakika kadar karıştırılması sağlanmıştır. Vakumlu hızlı yoğunlaştırıcı ile EtOAc

ekstreden uzaklaştırılmıştır. Metabolit varlığı İnce Tabaka Kromatografisi ile incelenmiştir. İTK sistemi için 0,25 mm kalınlığındaki silika jel kaplı hazır tabakalara ekstraler spotlanıp hekzan-etil asetat (3:1, 4:1, 9:1) çözücü sistemlerinde yürütülmüştür. Silika jel tabakanın kurumasıyla UV lambası altında 254/364 nm dalga boyunda oluşan lekeler işaretlenerek UV ışınması olmayan metabolitleri tespit etmek için anisaldehit- sülfürik asit veya vanilin-sülfürik asit gibi reaktifler püskürtülmüş ve renklenme için 110 °C'de 2 dk. ısıtılmıştır. Isıtma işleminden sonra kontrol gruplarının oluşturduğu spotlarla ekstrelerin oluşturduğu spotlar karşılaştırılmış farklı olan spot metabolit olarak düşünülmüştür. Metabolitin varlığı belirlendikten sonra uçucu özellikteki metabolitlerin varlığını taramak için GK-KS sistemi ile analiz edilmiştir (İşcan, 2009).

### **2.2.2. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın moleküler tayini**

Van Gölü Edremit bölgesinden alınan su örneğinden Malt Ekstrakt Agarda ekim yapılmış ve gelişen kültürden saf koloni oluşturulmuştur. Saf koloni üzerinde mikroskopik incelemeler yapılarak cins düzeyinde tayini gerçekleştirilmiştir. Tür düzeyinde tayini için moleküler analizler uygulanmıştır.

#### **2.2.2.1. Kültür bağımlı yöntemler**

##### **2.2.2.1.1. Genomik DNA ekstraksiyonu**

ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılması için mevcut izolattan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için Zymo ZR Fungal/Bakteriyal DNA kiti kullanılmıştır. Protokolde 200 µL steril distile su içinde resüspanse edilmiş fungal hücreler özel bir lizis tüpe aktarılmıştır. Ardından protokole ek olarak sıvı azot ve sıcak su uygulaması yapıp şoklama etkisiyle fungal hücrelerin hücre duvarları yıkılmaya çalışılmıştır. Bu işlem 5-6

defa uygulanmıştır. Tüpe 750 µL lizis solüsyonu aktarılıp, vortekste 5 dk kadar karıştırılmıştır. Lizis tüp mikrosantrifüjde 10.000 g' de 1 dk. santrifüj edilmiştir. 400 µL süpernatant toplama tüpüne yerleştirilmiş olan filtreye aktarılarak 7000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen filtrata 1200 µL Fungal/ Bacterial DNA bağlayıcı solüsyon eklenmiştir. Bu karışımdan 800 µL toplama tüpüne yerleştirilmiş kolonuna aktarılarak 10.000 g' de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü boşaltılıp geriye kalan karışım da kolona aktarılıp işlem tekrar edilmiştir. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen kolona 200 µL DNA ön yıkama solüsyonu eklenip 10.000 g' de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µL fungal/bacterial DNA yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 g' de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Kolon 1,5 ml hacimli steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak 100 µL DNA elüsyon tamponu eklenerek 10.000 g' de 30 saniye santrifüj edildikten sonra ultra saf DNA hazır hale getirilmiştir.

#### 2.2.2.1.2. PCR ile ITS bölgesinin çoğaltılması

DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen ultra saf DNA ile spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR için ITS1 ve ITS4 primerleri, template, Fideli Taq 2X Master Mix bileşenlerden hazırlanan PCR karışımı kullanılmıştır.

**Çizelge 2.3.** Fideli Taq 2X Master Mix ile Reaksiyon Kurulması

İÇERİK	25 µL reaksiyon	25 µL reaksiyon	25 µL reaksiyon
Fidelitaq 2X Master Mix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
ITS1	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
ITS 4	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Template DNA	1 µL	3 µL	0,5 µL
PCR için uygun Su	6,5 µL	4,5 µL	7 µL

DNA kalıplarından 3 farklı miktarda (0,5 µL,1 µL,3 µL) PCR kurulmuştur.



Protokol döngüsü ITS1-ITS4 için;

95°C	2 dk (Denatürasyon)	
95°C	30 saniye	} 30 Döngü
55°C	30 saniye	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	

PCR reaksiyonu için Techne Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. %1'lik agaroz jel hazırlanarak içerisine 2 µL Gel Red boyası eklenmiştir. Jel, elektroforeze yerleştirildikten sonra 2,5 µL kadar PCR ürünleri yükleme (Fermentas 6X Loading Dye Solution) boyasıyla beraber jele yüklenmiştir. Üzerine 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu eklenmiş, 5V/cm akım uygulanmıştır. PCR ürünlerinin boyutunu gözlemleyebilmek için Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder kullanılmıştır. PCR ürünleri 90 V 40 dakika jelde yürütülmüştür.

#### 2.2.2.1.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırma işleminde Wizard SV Jel ve PCR Saflaştırma kiti kullanılmıştır. Protokole göre PCR reaksiyonu sonucunda çıkan örneklerden 90 µL kadar PCR ürünü bir tüpte toplanarak eşit hacimde membran bağlayıcı solüsyon ilave edilip vorteksleme işlemi uygulanmıştır. Toplama tüpüne SV minikolonlar yerleştirilmiştir. PCR ürünü ve membran bağlayıcı solüsyon karışımı mini kolona aktarılmıştır. 16.000 g' de 1 dakika kadar santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası toplama tüpüne toplanan sıvı uzaklaştırılmış, mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilerek önceden etanol eklenmiş membran yıkama solüsyonundan 700 µL aktarılmıştır. 16.000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki toplanan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Etanol eklenmiş membran yıkama solüsyonundan 500 µL eklenmiş ve 16.000 g' de 5

1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki toplanan sıvı kısım uzaklaştırılarak mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Boş olan toplama tüpü ve mini kolon etanolün uzaklaştırılması için 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra mini kolon 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Nükleaz içermeyen sudan 50 µL kadarı minikolona aktararak oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek, mini kolon uzaklaştırılmıştır. DNA 4°C veya – 20°C'de muhafaza edilerek DNA dizi analizi için hazır hale getirilmiştir.

#### 2.2.2.1.4. PCR ürünlerinden dizi analizi

PCR ürünlerinin baz dizileme işlemi için Beckman Coulter GenomaLab™ DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır. Beckman dizi analizi kitine göre uygulama yapılmıştır.

Dizi analizi öncesinde PCR hazırlığı

Kalıp DNA.....2 µL

Primer.....0,65 µL

Mix.....6 µL

Ultra Saf Su.....1,35 µL

**NOT:** PCR tüplerinde buharlaşma olmaması için mineral yağ kullanılmıştır.

ITS1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak ayrı ayrı reaksiyonlar kurulmuştur.

Kullanılan reaksiyon şartları:

96°C	20 saniye	} 30 Döngü
50°C	20 saniye	
60°C	4 dakika	

Amplifikasyon sonrası bağlanmamış primer ve dNTP'lerin uzaklaştırılması gerektiğinden PCR ürünleri steril ependorflara aktarılarak her örneğe 5,5 µL stop solüsyonu eklenmiştir. Stop solüsyonu için;

100 mM Na- EDTA (pH:8).....	20 µL
3 M.....	20 µL
Glikojen.....	10 µL (-20°C' de)
H <sub>2</sub> O.....	50 µL

PCR reaksiyonu 10 µL olduğu için üzerine 10 µL manyetik boncuk (Agencourt Clean SEQ Beckman Coulter ) eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 55 µL % 73'lük izopropanol eklenerek 10 dk arayla karıştırılarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında ependorflar manyetik ortama yerleştirilerek 3-5 dk arasında bekletilmiştir. Sıvı kısım tüpten uzaklaştırılarak 200 µL % 73'lük izopropanol eklenmiştir. 3 dk bekledikten sonra alkolün eklenmesi işlemi tekrar edilmiştir. 10 -20 dk alkolün uçması için beklenmiş, ardından 40 µL SLS ( Sample Loading Solution) eklenerek boncukların tam çözünmesi sağlanmıştır. (SLS kit solüsyonudur ve içerisinde formamid bulunmaktadır). DNA boncuklardan ayrılıp SLS solüsyonuna geçmiştir. Sıvı kısımdan 35 µL alınıp mikrolatellere yüklenmiştir. Örneklerde buharlaşmayı önlemek için üzerine mineral yağ damlatılmıştır. Ayırma plağına buffer (GenomeLab™ Separation Çözeltisi) konularak örneğin bulunduğu plate cihaza yerleştirilmiştir. Sistemi çalıştırmada gerekli ayırma jeli (GenomeLab™ Separation Gel LPAI) ve hazırlanan örnekler Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazına örnek isimleri girilerek analiz yapılmıştır.

### 2.2.3. Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmaları

Biyotransformasyon için Van Gölü sularından temin edilen fungus, sedril metil eter ile 15 gün boyunca çalkalamalı etüvde etkileştirilmiştir. Uygulama aşaması ön tarama deneyleri ve preparatif ölçekli deney olmak üzere iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Biyotransformasyonun ön tarama deneylerinde metabolit varlığının gözlemlenmesiyle preparatif ölçekte deney setleri

kurulmuştur. Preparatif ölçekli deneyde metabolitler biyolojik aktivite testleri için flaş kromatografisi ve kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

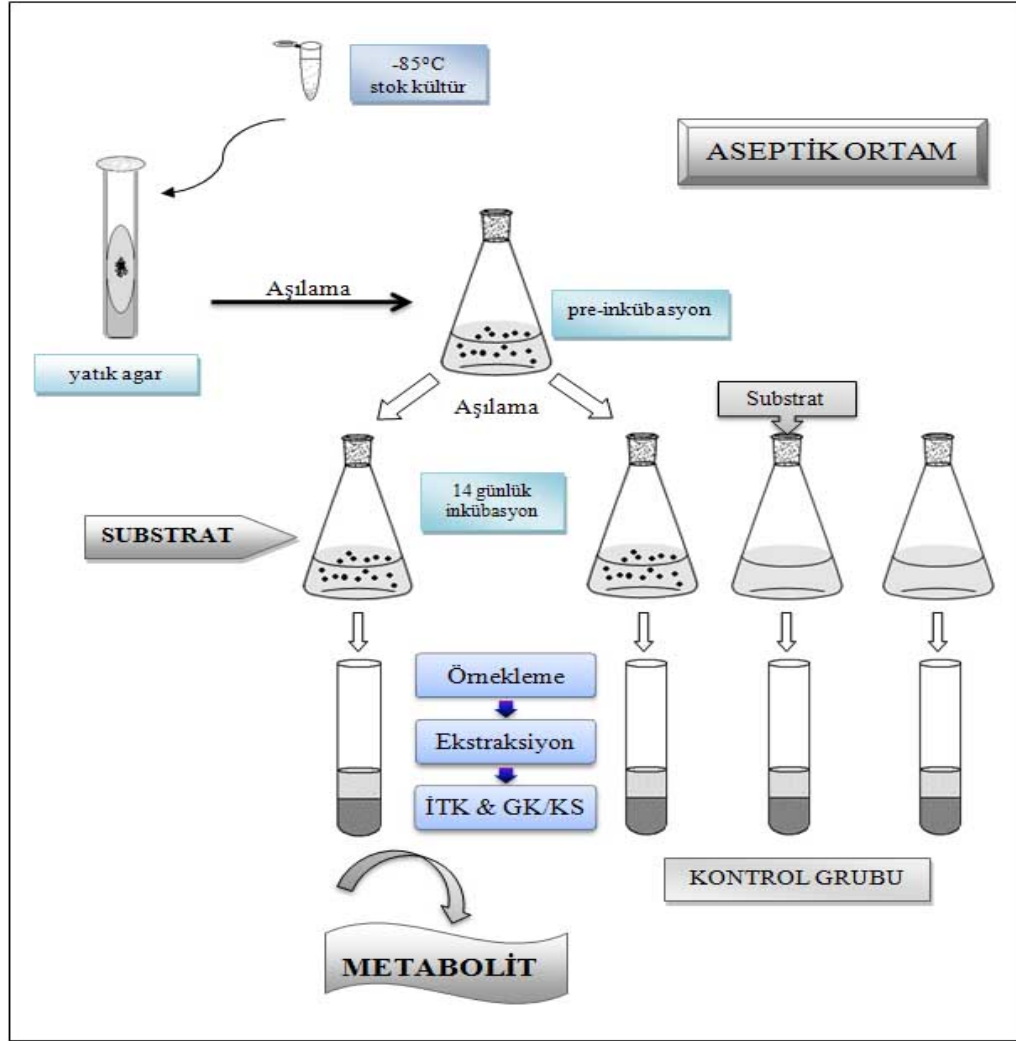
### 2.2.3.1. Biyotransformasyon için ön tarama deneyleri

Biyotransformasyon çalışması için Van Gölü Edremit bölgesinden temin edilen su örneğinden izole edilmiş fungus kullanılmıştır.

**Mikroorganizmanın geliştirilmesi:** % 0 NaCl, % 5 NaCl, % 10 NaCl ve % 15 NaCl eklenmiş, Malt Ekstrakt Broth sıvı besiyerlerini steril 100'er ml erlenler içerisine 50'şer ml kadar aktarılıp fungusun ekimleri yapılarak çalkalamalı inkübatörde 25°C - 28°C 3-5 gün gelişmeye bırakılmıştır. % 0 NaCl, % 5 NaCl, % 10 NaCl ve % 15 NaCl ilave edilmiş Malt Ekstrakt Agar katı besi ortamları steril petrilere aktarılmış bu besiyerlerine fungusun ekimleri yapılmış ve 25°C - 28°C' de 3-5 gün arasında inkübasyona bırakılmıştır.

**Örnekleme ve Metabolit Takibi:** Biyotransformasyon işlemi için inkübasyona bırakılmış 50 ml erlende fungusun gelişimi görüldükten sonra aseptik şartlarda 50 µl sedril metil eter ilave edilmiştir. Biyotransformasyon işlemi için 1.gün, 4.gün, 7.gün, 10. gün ve 13., günlerinde metabolit dönüşümü olup olmadığını gözlemlemek üzere sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi için steril kesik uçlu pipetler aracılığıyla 50 ml ekimi yapılmış sıvı besi ortamından 3 ml kadar alınıp tüplere aktarılmıştır. Deney tüplerine 2 ml EtOAc ilave edilerek vortekste 1 dakika kadar karıştırılması sağlanmıştır. Ardından 4000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi uygulanmış, süpernatant ekstre olarak ayrılmıştır. Vakumlu hızlı yoğunlaştırıcı (Labconco-Speedvac) ile EtOAc ekstreden uzaklaştırılmıştır. Metabolit varlığı İnce Tabaka Kromatografisi ile gözlemlenmiştir. İTK sistemi için 0,25 mm kalınlığındaki silika jel kaplı hazır alüminyum plaklar kullanılmış, hekzan-etil asetat (9:1, 4:1, 3:1 ve 1:1) çözücü sistemlerinde yürütülmüştür. Silika jel plağı tamamen kurutulduktan sonra UV lambası altında 254/364 nm dalga boyunda oluşan metabolitler işaretlenerek UV ışınması olmayan metabolitleri tespit etmek için anisaldehit- sülfürik asit veya vanilin- sülfürik asit gibi reaktifler

uygulanıp (110 °C- 2 dk) plak ısıtılmıştır. Isıtma işleminden sonra kontrol gruplarının oluşturduğu spotlarla ekstrelerin oluşturduğu spotlar karşılaştırılmış farklı olan spot metabolit olarak düşünülmüştür. Metabolitin varlığı belirlendikten sonra numune hazırlanarak GK-KS sistemi ile analizi yapılmıştır.



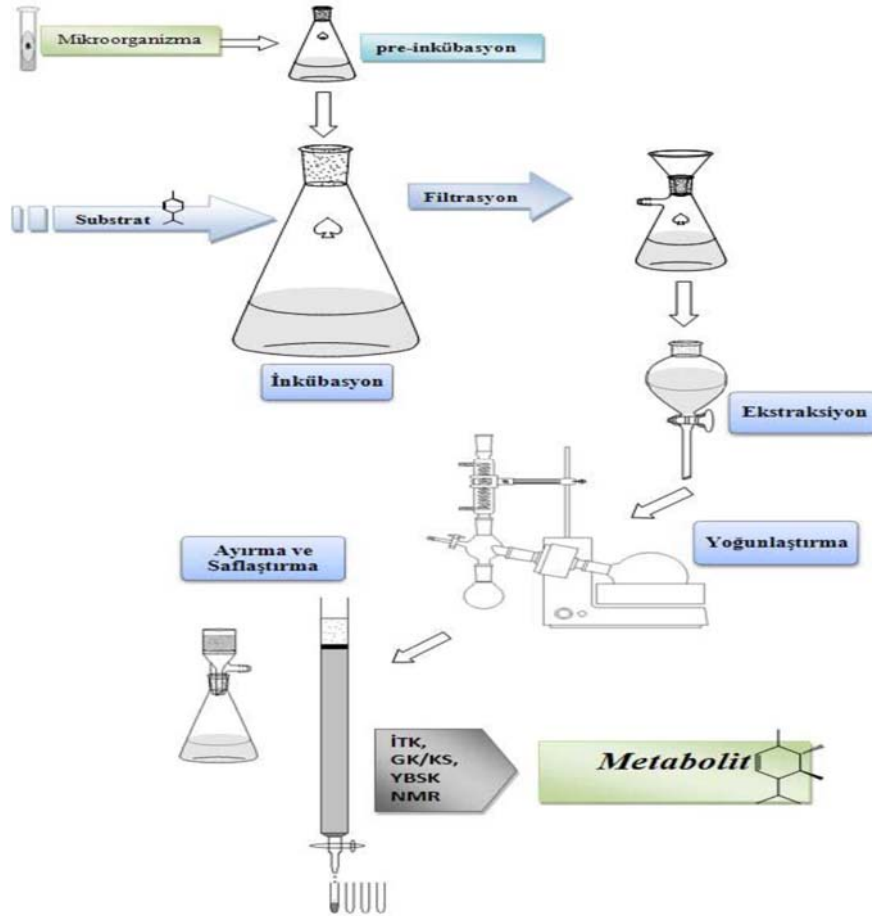
Şekil 2.1. Biyotransformasyon ön tarama çalışma protokolü

### 2.2.3.2. Biyotransformasyon için preparatif ölçekli deney

Ön tarama deneylerinde GK/KS ve İTK sistemleriyle metabolit olduğu düşünülen kültürlerden, yapı tayini ve metabolitlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla büyük hacimlerde çalışma yapılmıştır. 2 litrelik erlene 1 litre besiyeri hazırlanmış bu ortama fungusun ekimi yapıp 25°C 120 rpm' de

çalkalamalı inkübatörde 4-5 gün süreyle gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu tamamen geliştiği gözlenen fungusun kültürü içerisine 1 ml sedril metil eter ilave edilmiştir. İnkübasyon 14 gün boyunca devam ettirilmiştir.

**Sonlandırma ve Ekstraksiyon:** İlk aşamada yapılan ön tarama deneylerinde metabolit oluşumunun en yüksek seviyede gözlendiği gün, biyotransformasyon işlemi sonlandırılmış, besi ortamı ise EtOAc ile ekstre edilmiştir. Süzme işlemi vakum aracılığıyla, içerisine filtre kağıdı yerleştirilmiş Buchner hunisi ile misellerden kurtarılmış ayrılan besiyeri hacmi kadar EtOAc aracılığıyla ayırma hunisinde 3 defa ekstre edilmiştir. Ayrılan fazlar susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  'tan geçirilerek alçak basınç altında  $40\text{ }^\circ\text{C}$  de yoğunlaştırılmış, küçük bir silika jel taşıyan kolondan geçirilmiştir. Metabolit varlığı İTK-GK/KS sistemiyle doğrulanmıştır. Elde edilen total ekstratlar kolon kromatografisi ve flaş kolon kromatografisi teknikleriyle fraksiyonlarına ayrıldıktan sonra hedef metabolit ayrımı için izolasyonlar yapılmıştır.



Şekil 2.2.. Metabolit İzolasyonuna Yönelik Preparatif Çalışma Şeması

### 2.2.3.3. Kolon Kromatografisi ile metabolitlerin ayrımı

Biyotransformasyon sonrası elde edilmiş ekstrelerden metabolitlerin ayrılması için kolon *n*-hekzandan geçirilmiş silika jel ile yaş usulde doldurulmuştur. Ekstre ve kullanılacak silika jel miktarına göre 10x70 cm ebatlarında kolonlar kullanılmıştır. Kuru ekstre temiz flakona alınarak etil asetat ile çözülmüş, bir miktar silika ile karıştırılarak, çözücüsü tamamen uçurulana kadar etüvde bekletilmiştir. Kuru karışım kolona yüklenmiş ve üzeri cam pamuğu ile örtülmüştür. *n*-Hekzan'dan başlatılarak etil asetat ile gradient elüsyonu yapılmış (1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1) ve 10 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Kolon sırasıyla EtOAc, MeOH ve Aseton ile yıkanmıştır. Fraksiyonlardaki metabolit varlığının kontrolü eş zamanlı olarak İTK ile sağlanmıştır. Aynı spotların görüldüğü fraksiyonlar birleştirilip çözücüler düşük vakum altında yoğunlaştırılmışlardır (İşcan, 2009).

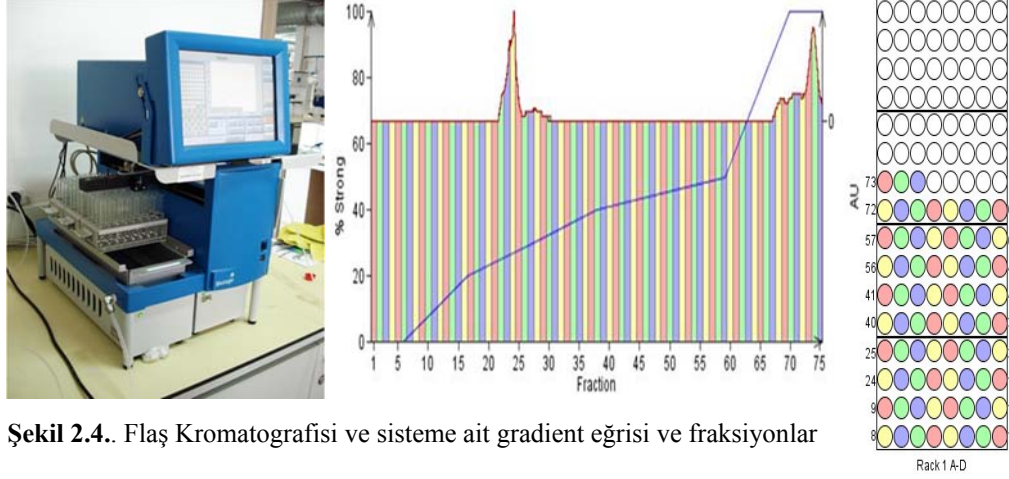


Şekil 2.3. Metabolit ayrımında kullanılan Kolon Kromatografisi

### 2.2.3.4. Flaş Kolon Kromatografisi ile metabolit ayrımı

Önceden şartlandırılmış olan flaş kromatografisi hazır kolonlarına (Biotage, silika jel) ekstreler aktarıldıktan sonra *n*-Hekzan- EtOAc (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4) çözücü sistemiyle gradient uygulanmış

fraksiyon otomatik sistem ile kolektörde toplanmıştır. Her bir fraksiyon 3 ml olacak şekilde toplanmıştır.



Şekil 2.4.. Flaş Kromatografisi ve sisteme ait gradient eğrisi ve fraksiyonlar

## 2.2.4. Yapı Tayini

### 2.2.4.1. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GK/KS)

Sedril metil eter ve biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GK/KS) sistemi aracılığıyla analiz edilmiştir.

<b>Sistem</b>	: Shimadzu GC 2010
<b>Kolon</b>	: CP-Sil 5 CB (25 m x 0.25 mm çap, 0.25 µm film kalınlığı)
<b>Sıcaklık Programı</b>	: 60°C- 10 dak // 4°C/dak// 260°C- 5 dak
<b>Enjektör</b>	: 250°C
<b>Taşıyıcı gaz</b>	: Helyum (1 ml/dak)
<b>Split oranı</b>	: 50:1
<b>İyonizasyon enerjisi</b>	:70 eV
<b>Kütle Aralığı</b>	:m/z 35-450
<b>Kütüphane</b>	: TBAM Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams LIBR (TP), MassFinder 3.1 Kütüphane tarama Yazılımları



#### 2.2.4.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) ve  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektrumları, Bruker DPX FT NMR sistemi ile alınmıştır. Çözücü olarak dötero-kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) kullanılmıştır. Kimyasal kayma değerleri ppm olarak verilmiştir.

#### 2.2.5. Biyolojik aktivite çalışmaları

##### 2.2.5.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Biyotransformasyon işlemi için kullanılan substrat sedril metil eter ve biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin antimikrobiyal aktivite testleri standart antimikrobiyallerle karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemleri için önceden belirtilen mikroorganizmalar kullanılmıştır.

##### 2.2.5.1.1. CLSI (Klinik Laboratuvar Standart Enstitüsü) yöntemiyle antikandidal ve antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi

Her iki aktivite için mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı mikroorganizma kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Antikandidal aktivite için *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* kullanılmıştır. Antibakteriyal aktivite için *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* mikroorganizmaları kullanılmıştır.

**Minimal İnhibitör Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi:** İzole edilerek saflaştırılan M1, M2, Substrat ve antimikrobiyal ajanlar DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. Antibakteriyal ve antikandidal etkilerin belirlenmesinde kısmen modifiye edilmiş sırasıyla CLSI (eski adıyla NCCLS) M7-A7 ve M27-A2 mikro-broth dilüsyon protokolleri kullanılmıştır (Rex ve ark., 2008; Wikler ve ark., 2006).

Antibakteriyal aktivite testi için önceden belirlenmiş bakteriler MHA (Müller Hinton Agar) besi ortamında antikandidal aktivite için *Candida* suşları PDA (Potato Dekstrose Agar) besi ortamına ekimleri yapılmış ve 24 saat boyunca 37°C’ de gelişmeye bırakılmıştır. Deney sırasında bakteri türleri için Mueller Hinton Broth, *Candida* türleri için RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürleri McFarland 0,5 standardına göre hazırlandıktan sonra sırasıyla 1:100 ve 1:20 oranında tuzlu suda (% 0,5) seyreltilerek kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında tüm numuneler çift katlı seri dilüsyonları şeklinde seyreltilmiştir. 24 saat 37°C’de inkübasyon sonunda üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK (mg/ml) değeri olarak belirlenmiştir. Görsel değerlendirme rezazurin mavisi eklendikten sonra 3 saat inkübasyon sonrasında yapılmıştır.

#### **2.2.5.2. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

##### **2.2.5.2.1. 1-1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) radikalini sürüpürücü etki tayini**

Ön tarama deneyi olarak metabolitlerin ve standart maddenin DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemek amacıyla metabolitlerden 2 mg/mL, standart maddeden 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda numuneler hazırlanmış 10 µL kadar İTK plaklarına spotlanarak DPPH reaktifi üzerlerine püskürtülmüştür.

Etki gösteren metabolitler UV spektroskopik mikrodilüsyon yöntemiyle kantitatif olarak inhibisyon konsantrasyon C vitamini standart maddesiyle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

##### **2.2.5.2.2. DPPH radikalini süpürücü etki yöntemi**

Metabolitler ve standart madde MeOH’da çözülmüş, 2 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının ilk sütununa sırasıyla 200 µL metabolit ve standart maddeler ilave edilmiştir.

Geriye kalan tüm kuyucuklara 100 µL MeOH ilave edilmiş son sütundaki kuyucuk tamamıyla boş bırakılmıştır. Boş bırakılan kısım kontrol grupları için kullanılmıştır. İlk kuyucuktan itibaren kontrol kuyucuklarına kadar seyreltme işlemi yapılmıştır. Daha sonra 5 dakika boyunca vorteksleme işlemi yapılmıştır. DPPH çözeltisi ise 80 µg/mL (2 mg DPPH, 25 mL MeOH'da çözülmüştür) konsantrasyon olarak son kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µL DPPH ilave edilmiştir. Son sütunda kalan kuyucuklar kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak kuyucuklarından bir tanesi sadece 200 µL DPPH, diğer bir boş kuyucuğa 200 µL MeOH, bir diğer kuyucuğa ise 100 µL MeOH ve 100 µL DPPH karışımı, pozitif kontrol olarak C vitamini kullanılmıştır. Karanlık ortamda 30 dakika kadar bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 517 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

#### **2.2.5.2.3. ABTS Radikal Süpürücü Etki**

Metabolitlerin ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalini süpürmesi ve standart olan bütillenmiş hidroksitoluenin etkisine bakılarak karşılaştırma yapılmıştır. 7mM ABTS ve 2,5 mM sodyum persülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle mavi yeşil renk oluşumu sağlanmış ön tarama deneyi ile metabolit ve standartın etkileri gözlemlenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Sekonder metabolit için ön tarama deneylerinde oluşan metabolitler

Mevcut 20 halofilik bakterinin temel besi ortamında ürettikleri sekonder metabolitlerin saptanması için belirli günlerde örnekler alınarak GK/KS'de kontrol edilmiştir. Tüm bakterilerin kültürlerine ait ekstrelerde dikkate değer nitelikte uçucu organik bir maddeye rastlanılmamıştır.

#### 3.2. Biyotransformasyon için kullanılan mikroorganizmanın farklı tuzluluklarda geliştirilmesi

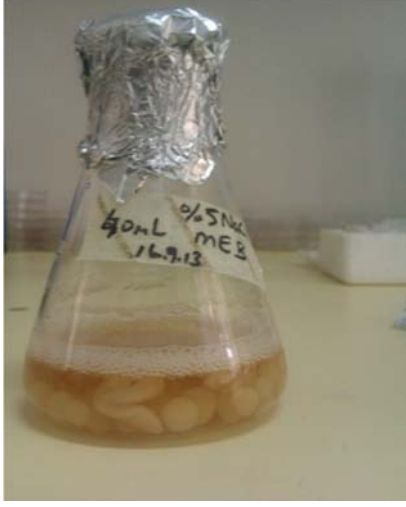
Biyotransformasyon için tuzsuz, %5 NaCl, %10 NaCl, %15 NaCl tuzluluklardaki besi ortamlarında fungusun mikrobiyal gelişimi gözlenmiş ve % 15 tuzlulukta fungusun Malt Ekstrakt Agar ve Malt Ekstrakt Broth içinde gelişme gözlenmediği maksimum % 10 tuzlulukta gelişim gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Tuzsuz malt ekstrakt broth içinde gelişen fungus



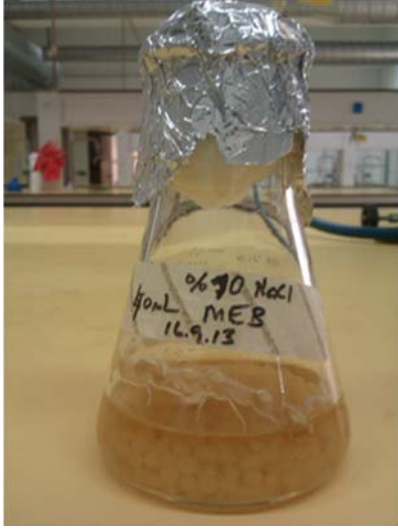
Şekil 3.2. Tuzsuz malt ekstrakt agarda gelişen fungus



Şekil 3.3. %5 NaCl malt ekstrakt  
broth ortamında gelişen fungus



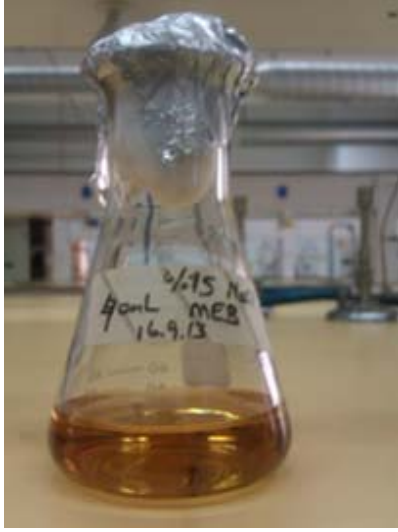
Şekil 3.4. %5 NaCl malt ekstrakt agarda  
gelişen fungus



Şekil 3.5. %10 NaCl malt ekstrakt  
broth ortamında gelişen  
fungus



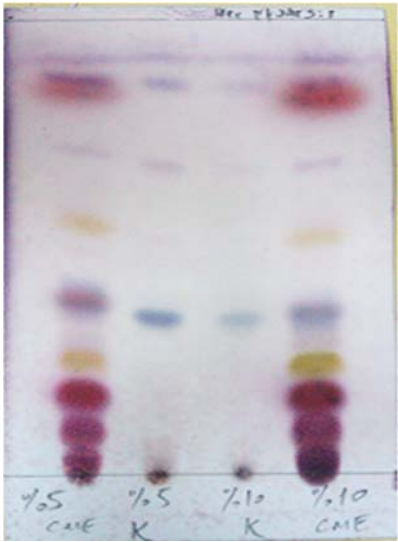
Şekil 3.6. %10 NaCl malt ekstrakt  
agarda gelişen fungus



Şekil 3.7. %15 NaCl malt ekstrakt broth ortamında gelişim yok



Şekil 3.8. % 15 NaCl malt ekstrakt agarda gelişim yok



Şekil 3.9. Farklı tuzluluklarda gelişen fungusun biyotransformasyon ürünleri



Şekil 3.10. Tuzsuz ortamda gelişen fungusun biyotransformasyon ürünleri

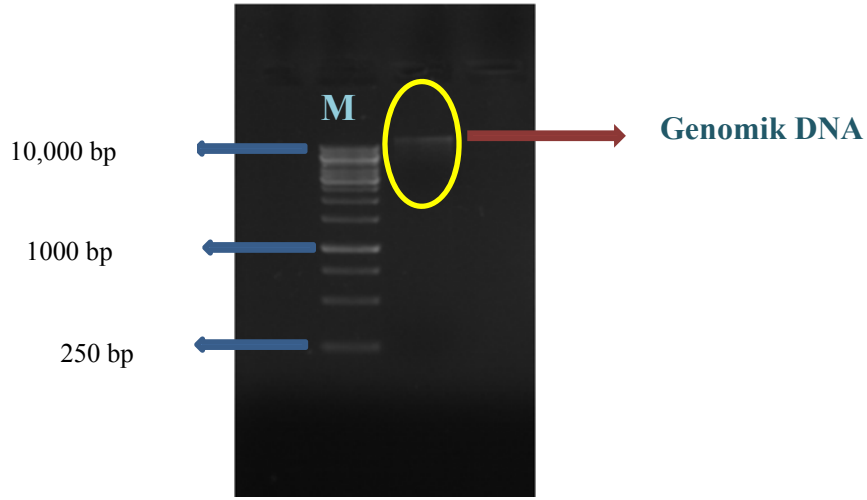
Tuzsuz ortam, %5 NaCl, %10 NaCl içerikli farklı tuzluluklarda gelişen halofilik ve alkali özellikteki fungusun sedril metil eteri biyotransformasyonu sonucu metabolit oluşumlarında farklılık görülmediği tespit edilmiştir.

### 3.3. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmanın tanımlanması

Van Gölü, Edremit bölgesinden temin edilen su örneğinden ekimi yapılan mikroorganizmanın moleküler yöntemler sonucu tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3.1. Genomik DNA ekstraksiyonuna ait bulgular

ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılması için DNA ekstraksiyonu Zymo ZR Fungal/ Bakteriyal DNA kiti aracılığıyla yapılmış fungustan total DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, genomik DNA'ya ait görüntü Şekil 3.11'de verilmiştir.

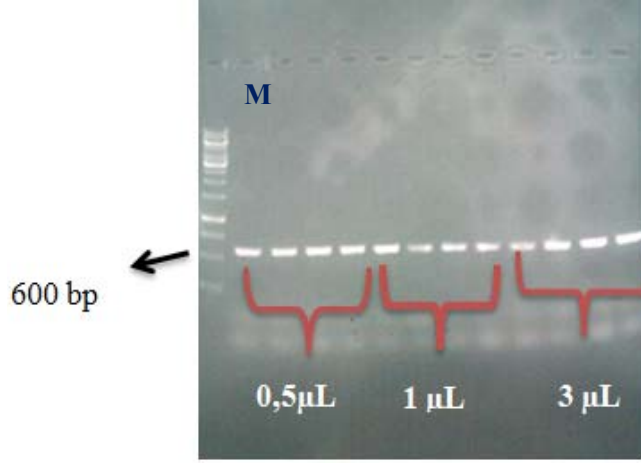


Şekil 3.11. Fungusa ait genomik DNA jel görüntüsü

(M: Thermo scientific 1 kb büyüklüğünde marker.)

#### 3.3.2. ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonuçları

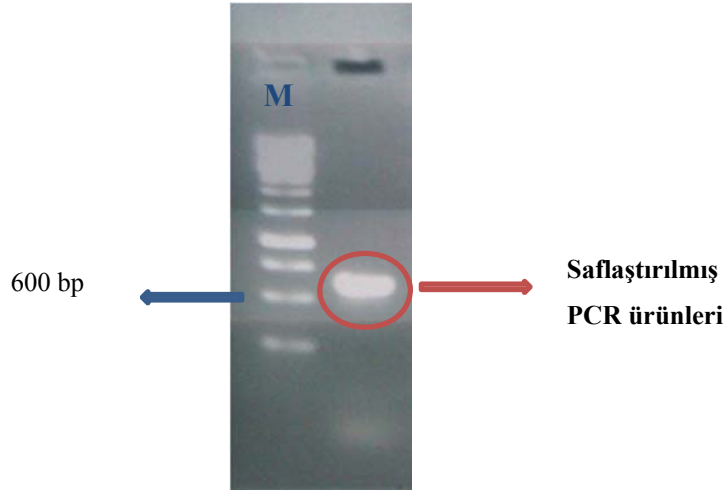
ITS bölgesinin çoğaltılması için ITS 1 ve ITS 4 primerleri, kalıp DNA, Fidelity Taq 2X Master Mix ile PCR karışımı hazırlanmış, PCR için toplamda 25  $\mu\text{L}$ ' lik reaksiyonlar kurulmuştur. Her reaksiyon için farklı miktarlarda kalıp DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler Şekil 3.12'deki gibidir. Elde edilen PCR ürünlerinden 0,5 $\mu\text{L}$ , 1 $\mu\text{L}$  ve 3 $\mu\text{L}$  kadar jele yüklenmiştir.



**Şekil 3.12.** ITS primerleri ile elde edilmiş PCR ürünleri  
(M: Thermo scientific 1 kb büyüklüğünde marker)

### 3.3.3. Saflaştırılmış PCR ürünleri

Saflaştırma işlemi gerçekleştirilen aynı mikroorganizmaya ait farklı miktarlardaki çoğaltılmış PCR ürünleri bir araya getirilmiş, saflaştırma sonrası jele yüklenerek saflaştırma işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuca göre PCR ürünlerinin saflaştırıldığı ve baz uzunluğunun yaklaşık 600 bp olduğu belirlenmiştir.



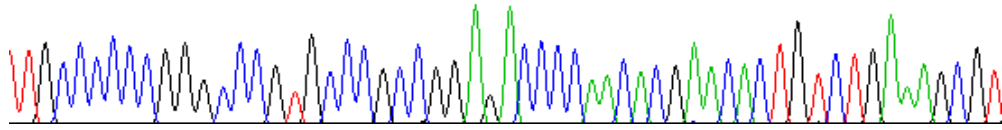
**Şekil 3.13.** Saflaştırılmış PCR ürünleri  
(M: Thermo scientific 1 kb büyüklüğünde marker)



### 3.3.4. PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçları

Van Gölü sularından izole edilmiş fungus için yapılan tekrarlı dizi analizi işlemlerinde sonuç alınmadığından dizi analizi kısmına kadar deneysel aşamalar gerçekleştirilmiş dizi analizi için Refgen Ltd.Şti.'ne dizi analizi gerçekleştirilmesi için ilgili örnekler gönderilmiştir. Elde edilen dizi analizi bilgilerine göre NCBI “National Center for Biotechnology Information”, ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), genbankasındaki verilerle BLAST programı üzerinden %99 benzerlikle en yakın temsilcisi *Aspergillus tubingensis* olduğu belirlenmiştir. İlgili gen bankası referans numarası: [KF747363.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF747363.1)

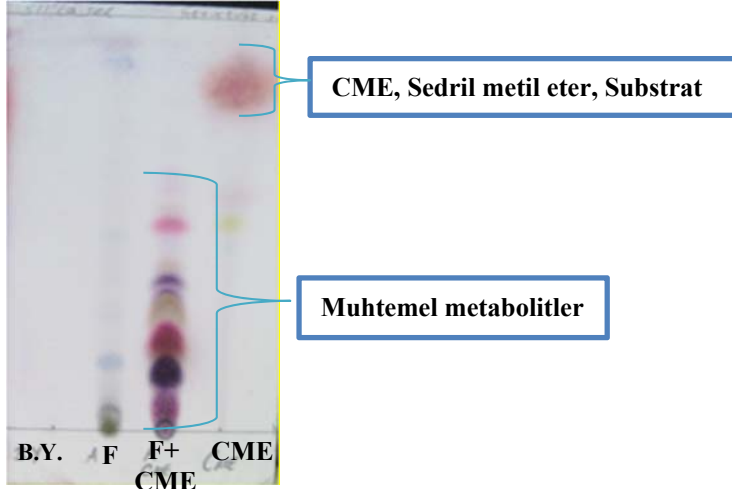
110 120 130 140 150 160  
:TGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGT



Şekil 3.14. Dizi analizi esnasında ITS1 primerleri ile yapılan okumalardan oluşan piklerin bir kısım görüntüsü

### 3.4. Sedril Metil Eter'in Mikrobiyal Transformasyon Ürünleri

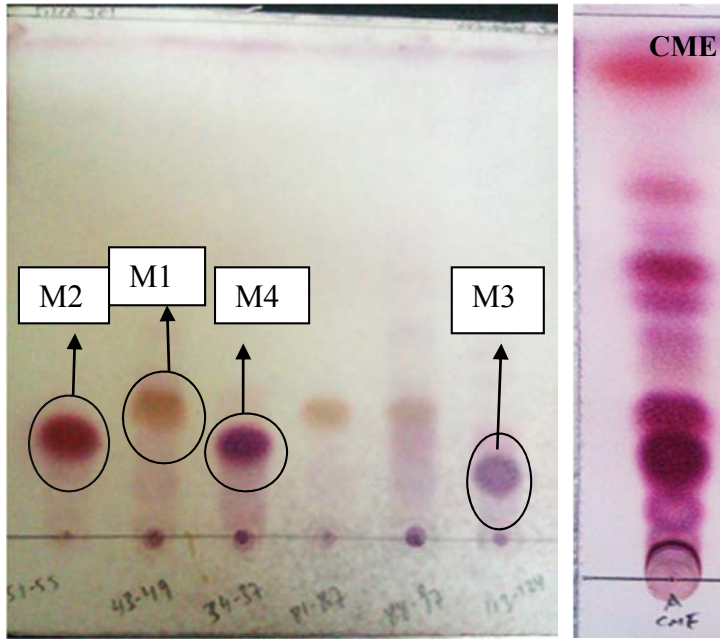
Sedril metil eter materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde *Aspergillus tubigensis* ile 14 gün boyunca etkileştirilmiş ve belirli günlerde örnekleme yapılarak İTK aracılığıyla metabolit oluşumu kontrol edilmiştir. Metabolit varlığı saptanan reaksiyon ortamları preparatif miktarlarda tekrar hazırlanarak, daha yüksek verimle metabolit eldesi yoluna gidilmiştir. Total ekstratlar kolon kromatografisi ve flaş kromatografisi gibi yöntemlerle ayrılmıştır. Ayrımı yapılan metabolitler tekrar GK/KS sistemine verilerek metabolitlerin spektrumları ve spektral verileri elde edilmiştir.



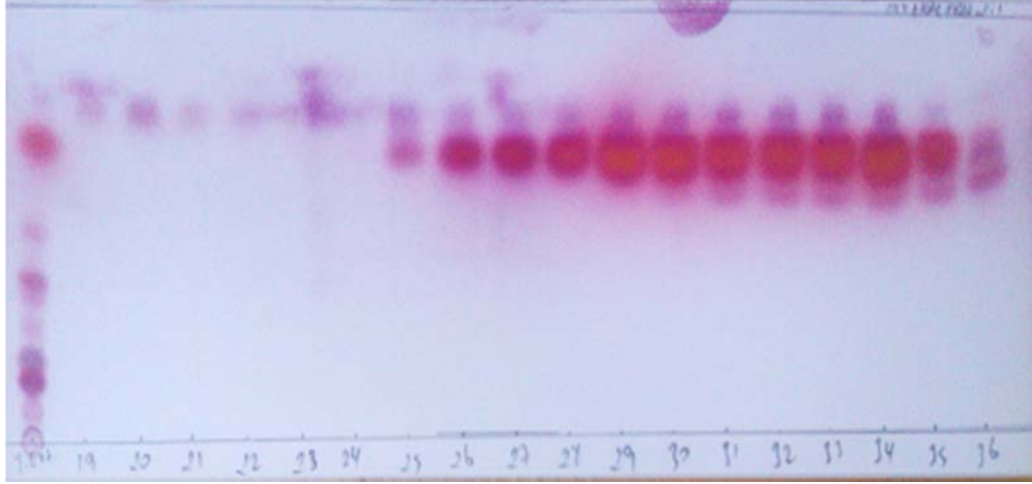
Şekil 3.15. Biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstrenin İTK plağı

B.Y.:Besî Yeri, F: Fungus (*Aspergillus tubingensis*), CME:Sedril metil eter (Substrat)

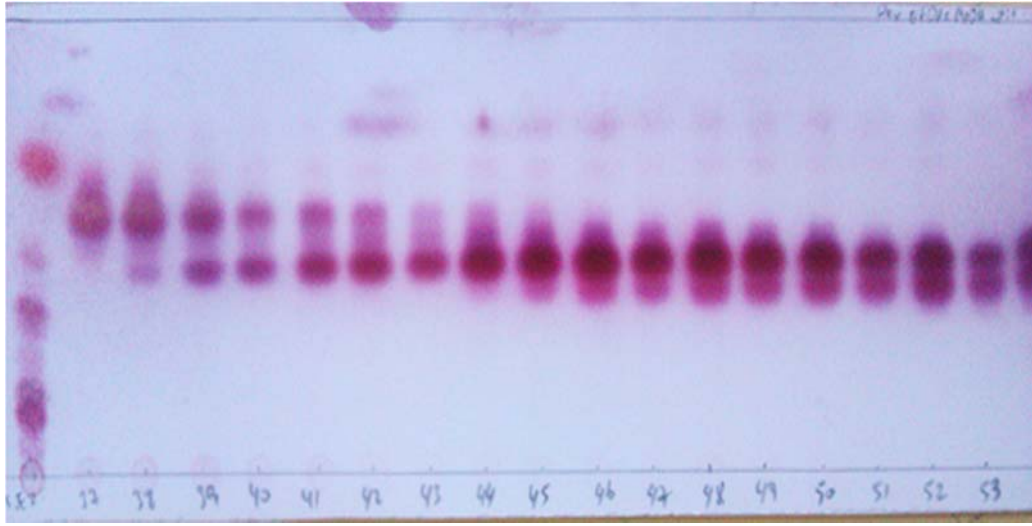
*Aspergillus tubingensis*'in sedril metil eter ile biyotransformasyonu sonucu toplamda 4 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar flaş kolon kromatografisi ve kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Metabolitler M1, M2, M3, M4 şeklinde kodlanmıştır. Miktar bakımından en verimli elde edilen M2'nin yapı tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.16. Kolon kromatografisiyle ayırt edilen metabolitler ve toplam ekstre



Şekil 3.17. Kolondan ayrılan metabolitlerin İTK üzerindeki görüntüsü

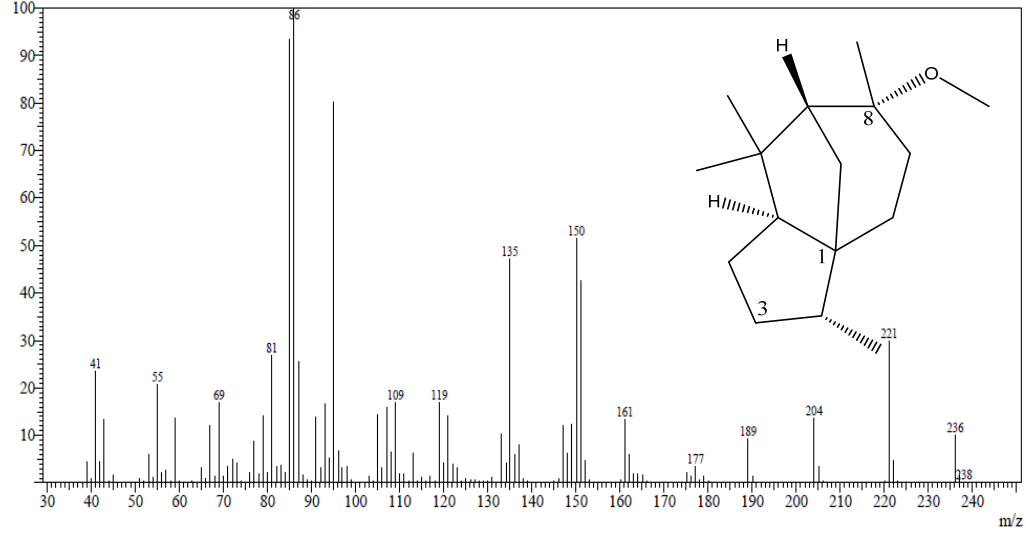


Şekil 3.18. Farklı oranda çözücü sistemiyle kolondan ayrılan metabolitlerin İTK görüntüsü

### Sedril Metil Eter (CME)

$C_{16}H_{28}O$  [Sinonimleri; Sedramber, Metil sedril eter, Sedrol metil eter, (3R,6R,7R,8aS)-6-methoxy-3,6,8,8-tetramethyloctahydro-1H-3a,7 methanoazulene)], Kaynama noktası: 259 °C, yoğunluk: 0,976, Refraktif indeks: 1,49

**EI/MS m/z:** 236 (M<sup>+</sup>,1), 221 (31), 204 (14), 189 (11), 150 (51), 135 (46), 95 (89), 86 (100), 81 (26), 69 (17), 55 (20), 41 (23).

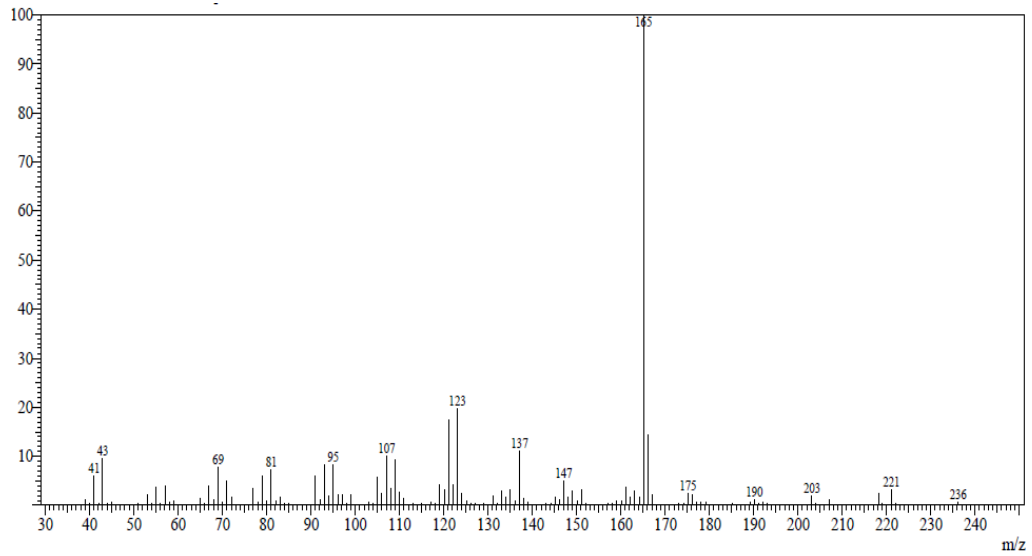


**Şekil 3.19.** Substrat molekülü sedril metil eterin kütle spektrumu

### 3.4.1. Sedril Metil Eter'in biyotransformasyonu ile elde edilen metabolitler

#### *M1 Metaboliti*

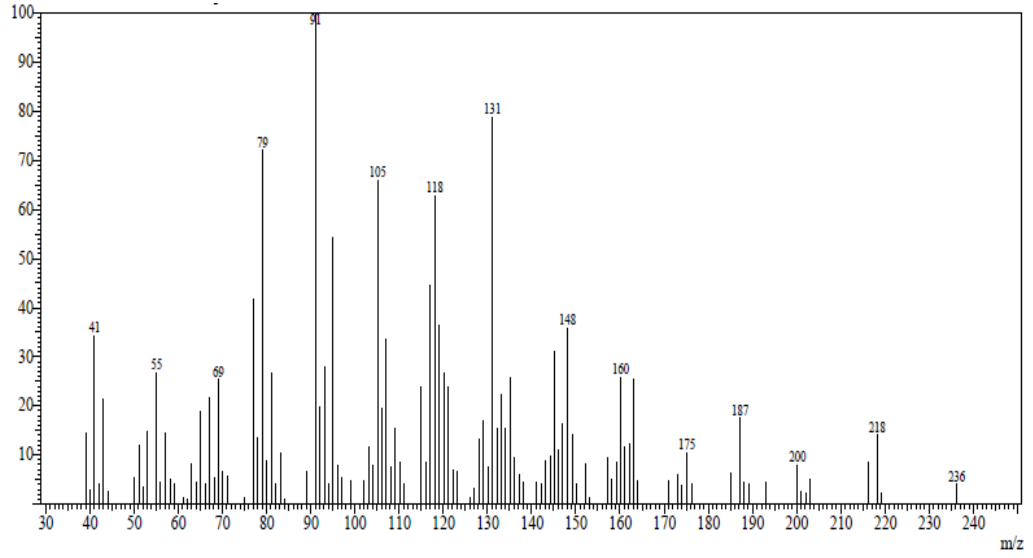
**EI/MS m/z:** 236 (M<sup>+</sup>,1), 221 (3), 203 (2), 165 (100), 137 (11), 123 (23), 107 (11), 69 (8), 43(11).



**Şekil 3.20.** M1 metabolitine ait kütle spektrumu

### ***M3 Metaboliti***

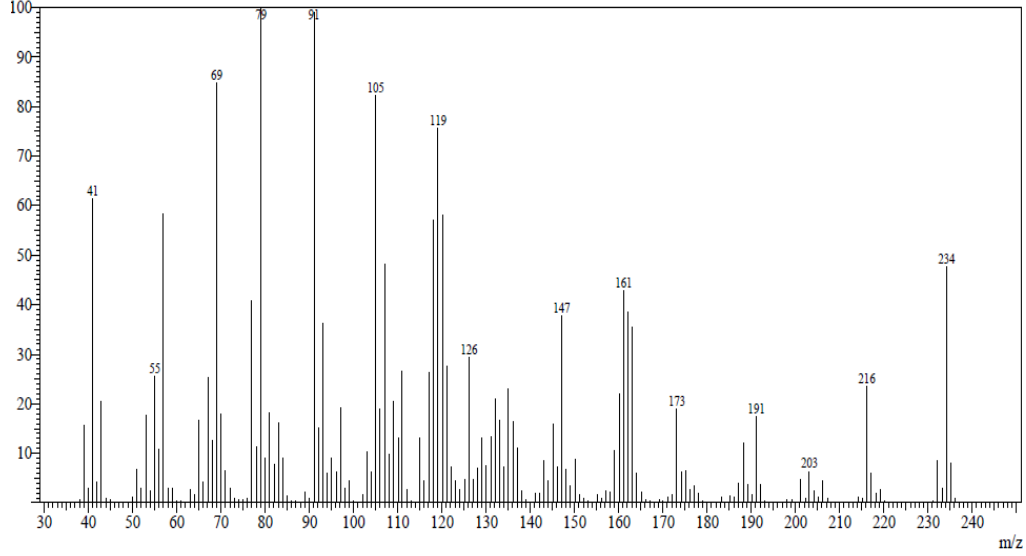
EI/MS m/z: 236 (M<sup>+</sup>,1), 218 (14), 200 (8), 187 (17), 160 (26), 148 (37), 131 (79), 118 (63), 105 (66), 91 (100), 79 (70), 69 (25), 55 (28), 41 (34).



Şekil 3.21. M3 metabolitine ait kütle spektrumu

### ***M4 Metaboliti***

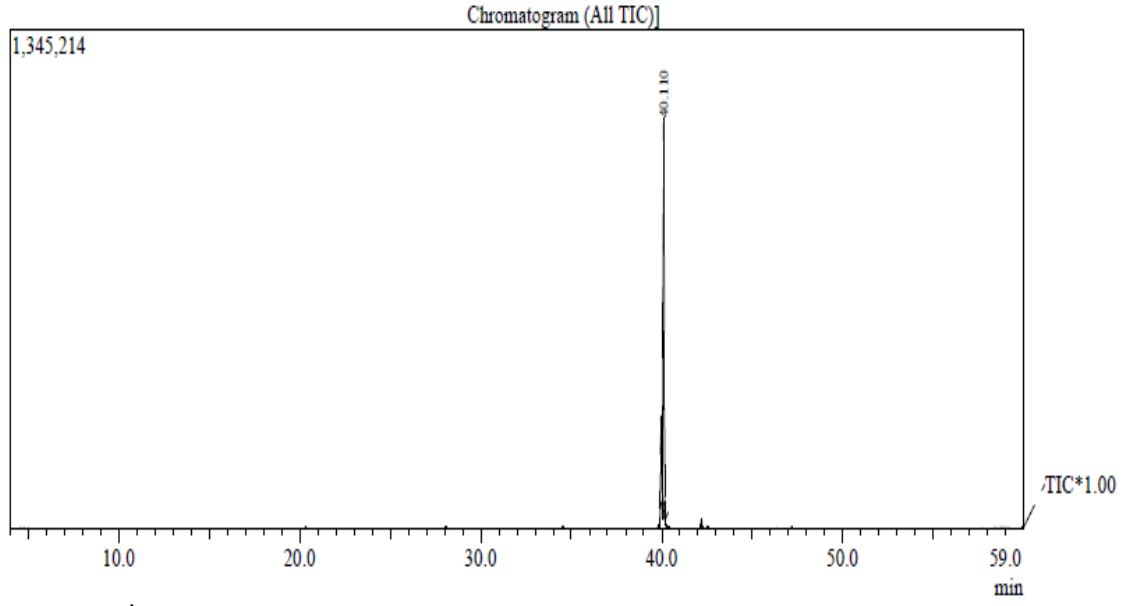
EI/MS m/z: 234 (M<sup>+</sup>,1), 216 (23), 203 (8), 191 (17), 173 (18), 161 (43), 147 (38), 119 (77), 105 (84), 91 (100), 79 (100), 69 (85), 41 (62).



Şekil 3.22. M4 metabolitine ait kütle spektrumu

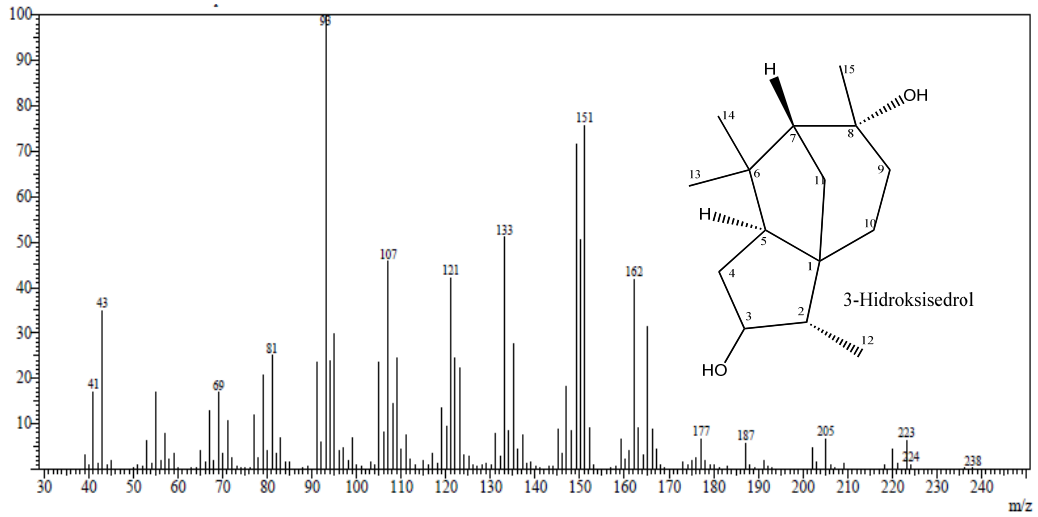
### ***M2 Metaboliti (3-Hidroksi sedrol)***

M2 kodlu metabolit, yapılan GK/KS ve NMR analizlerinin sonucunda, literatür verileriyle de karşılaştırılarak 3-Hidroksi sedrol olarak tanımlanmıştır. Molekül ağırlıkları dikkate alındığında bir metil grubunun koptuğu (-15), buna ilave olarak ayrı bir karbona bir hidroksil grubu eklendiği (+17) tahmin edilmiştir. M2'ye ait spektral veriler Şekil 3.11-3.16'de verilmiştir. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) analizine göre 12, 13, 14 ve 15 nolu metil karbonlarına bağlı protonların etkileştiği karbonlardan yola çıkılarak yerleri ana iskelette belirlenmiş ayrıca sedril metil eterin  $^1\text{H}$  NMR spektrumundaki metoksil grubuna ait proton sinyalinin (3.2 ppm,  $-\text{OCH}_3$ ) kaybolduğu tespit edilmiştir. 3 nolu karbona bağlı olan ve 3.63 ppm de  $^1\text{H}$ 'lık sinyalin hidroksile komşu proton olduğu tahmin edilmiştir. Elde edilen  $^{13}\text{C}$  ve  $^1\text{H}$  NMR verilerinin 3-Hidroksi sedrol'ün literatürden elde edilen spektral verileri ile uyum içinde olması sonucunda M2 metabolitinin 3-Hidroksi sedrol olduğu anlaşılmıştır (Miyazawa 1995; Skeya, 2000).

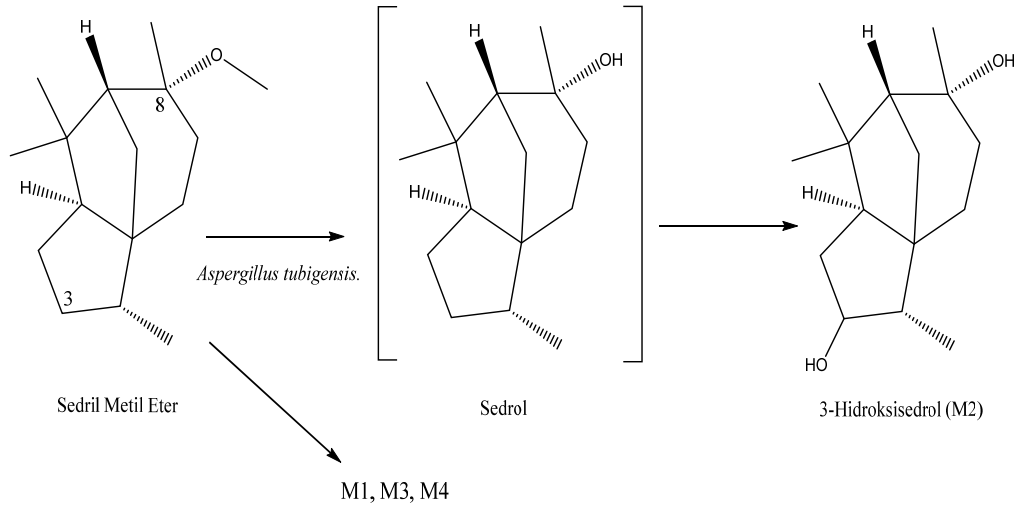


Şekil 3.23. İzole edilerek saflaştırılan 3-hidroksi sedrolün kromatogramı

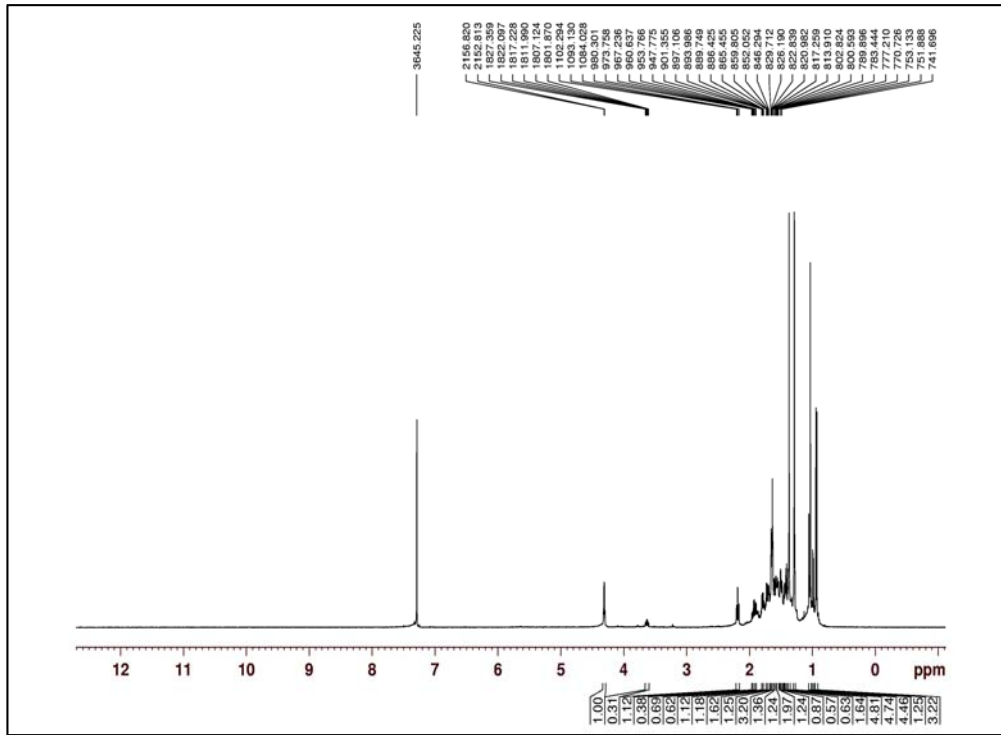
**EI / MS m/z:** 238 ( $M^+$ , 1), 224 (2), 223 (7), 205 (7), 187(7), 162 (42), 151 (77), 133 (54), 121 (42), 107 (46), 93 (100), 81 (25), 69 (17), 43 (35), 41 (17).



Şekil 3.24. 3- hidroksi sedrolün kütle spektrumu

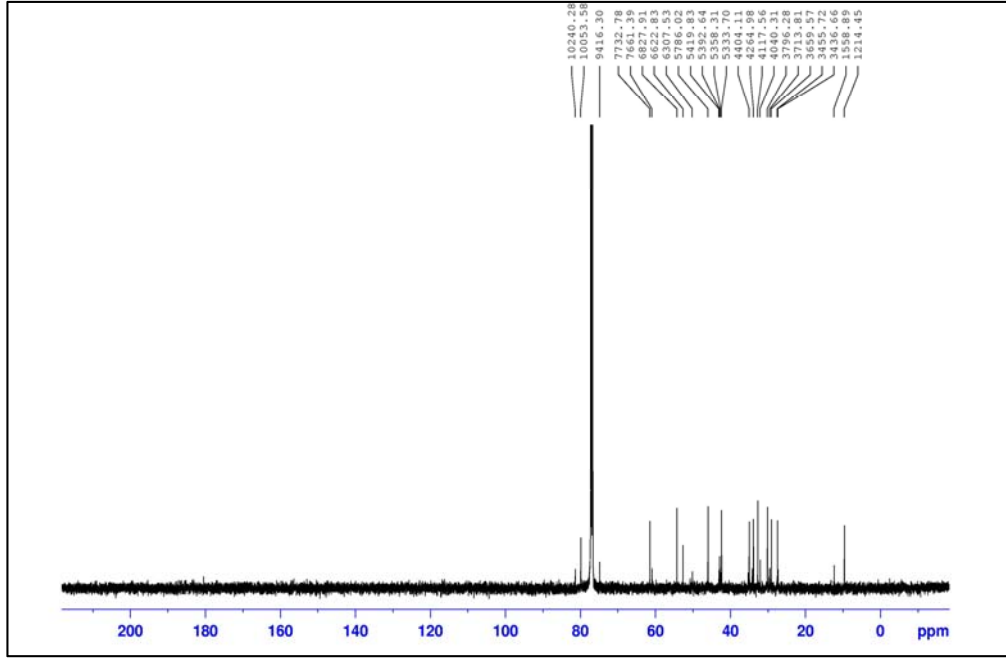


Şekil 3.25. Sedril metil eterin *Aspergillus tubingensis* ile biyotransformasyonu ile elde edilen metabolitler

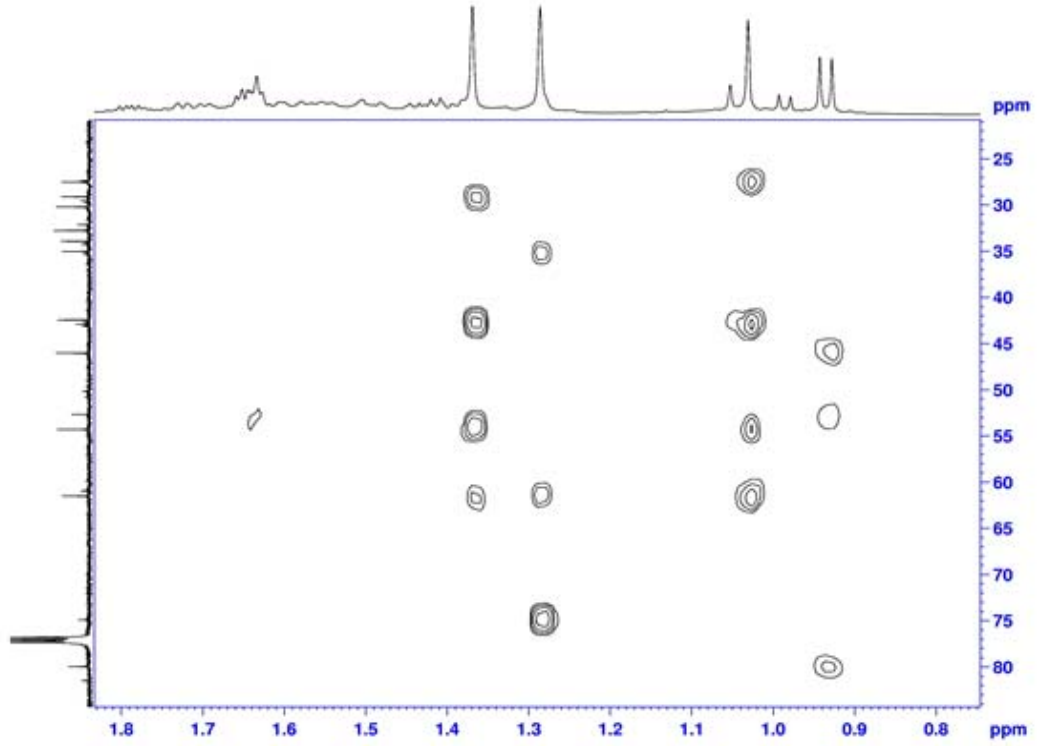


Şekil 3.26. 3-hidroksi sedrolün  $^1\text{H}$  NMR spektrumu





Şekil 3.27. 3-hidroksi sedrole ait  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil 3.28.. 3-hidroksi sedrolün  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektrumu

Çizelge 3.1. 3-hidroksi sedrole ait NMR verileri

C	$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) $\delta$	$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) $\delta$	HMBC $\delta$
1	a	52.9	-
2	a	46.3	-

3	3.63, 1H, dt	80.4	-
4	a	34.1	-
5	a	54.6	-
6	a	42.6	-
7	a	61.9	-
8	a	75.3	-
9	a	35.2	-
10	a	32.9	-
11	a	43.1	-
12	0.94 3H, d	9.7	46.3, 52.9, 80.4
13	1.03 3H, s	27.6	27.6, 42.6, 54.6, 61.9
14	1.37 3H, s	29.3	29.3, 42.6, 54.6, 61.9
15	1.29 3H, s	30.4	35.2, 61.9, 75.3

a: 0.9-2.2 ppm (12H)

### 3.5. Biyolojik Aktivite Çalışma Sonuçları

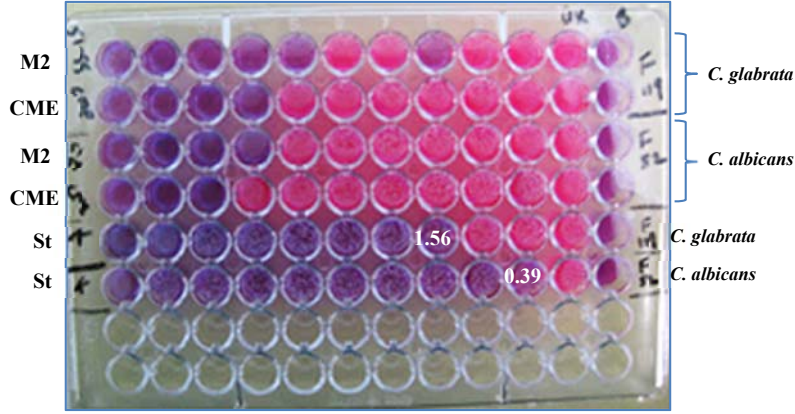
#### 3.5.1. Antikandidal aktivite sonuçları

Biyotransformasyon deneyi sonunda elde edilen madde miktarlarına göre metabolitlerin antikandidal aktiviteleri gerçekleştirilmiştir. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognози bölümünden temin edilen 4 adet *Candida* türüne karşı numunelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları  $\mu\text{g/mL}$  olarak verilmiştir (Çizelge 3.2.).

**Çizelge 3.2.** Antikandidal Etki Sonuçları (MİK,  $\mu\text{g/mL}$ ) **St:** Ketokonazol **CME:** Sedril metil eter

Mikroorganizma	CME	M1	M2	St
<i>Candida glabrata</i>	250	62,5	125	1.56
<i>Candida albicans</i>	500	250	250	0.39
<i>Candida utilis</i>	250	125	250	0.78
<i>Candida tropicalis</i>	250	250	250	0.78

500 250 125



Şekil 3.29. Antikandidal etki sonuçlarından bir plak örneği

### 3.5.2. Antibakteriyal aktivite sonuçları

Standart suşlardan belirlenmiş 4 farklı bakteri mikrodilüsyon yöntemiyle numunelerin ve izole edilen metabolitin minimum inhibisyon konsantrasyonları  $\mu\text{g/mL}$  olarak Çizelge 3.3. de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Antibakteriyal Etki Sonuçları (MİK,  $\mu\text{g/mL}$ ) (CME: Sedril metil eter)

St: Kloramfenikol,

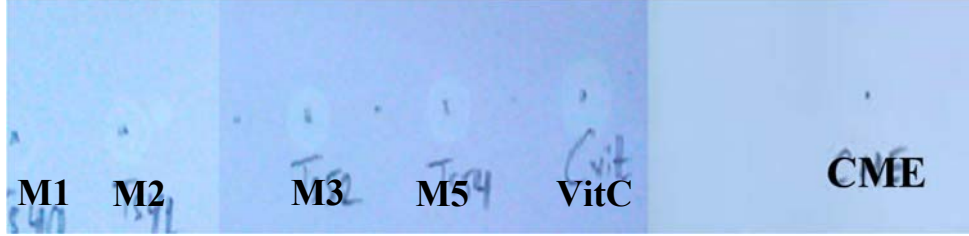
Mikroorganizma	CME	M1	M2	St
<i>Escherichia coli</i>	500	500	500	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	500	500	8
<i>Salmonella typhimurium</i>	250	500	500	8
<i>Bacillus cereus</i>	500	500	500	8

### 3.5.3. Antioksidan aktivite sonuçları

#### 3.5.3.1. 1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki sonucu

Metabolitlerin ve standart maddenin DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemek amacıyla metabolitler ve substrattan 2 mg/mL konsantrasyonda numuneler hazırlanmış ve 10  $\mu\text{L}$  kadar İTK plaklarına uygulanarak DPPH reaktifi üzerlerine püskürtülmüştür. Standart antioksidan ajan olan Askorbik asit (C vitamini) kullanılmıştır. Kalitatif olarak DPPH radikalini süpürücü

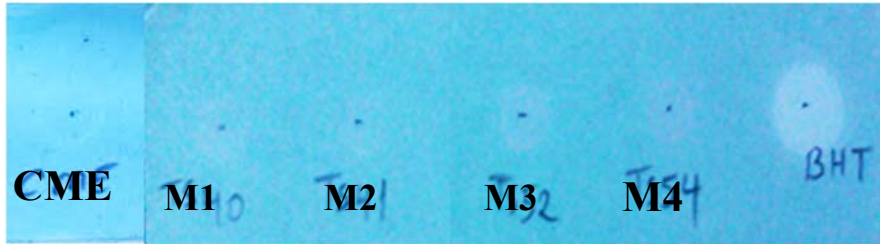
etkisine bakılmış özellikle standart C vitaminine göre etkileri karşılaştırıldığında M3 ve M5 nolu metabolitler dışında diğer metabolitlerin ve sedril metil eterin dikkat çekici etki bir göstermedikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.30. Metabolitlerin ve standart maddenin DPPH' süpürücü etki için yapılmış İTK çalışması

### 3.5.3.2. ABTS radikal süpürücü etki sonucu

Metod kısmında anlatıldığı üzere metabolitlerin ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalini süpürmesi ve standart antioksidan olan bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) etkisine bakılarak karşılaştırma yapılmıştır. 7mM ABTS ve 2,5 mM sodyum persülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle mavi yeşil renk oluşumu sağlanmış ön tarama deneyi ile metabolit ve standartın etkilerine bakıldığında metabolitlerin ve substratın renkte soldurma yapmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle kantitatif ölçüme gerek duyulmamıştır.



Şekil 3.31. Metabolitlerin ve standart maddenin ABTS süpürücü etki için yapılmış İTK çalışması

#### 4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Çizelge 2.1’de listelenen halofilik mikroorganizmaların muhtemel uçucu özellikte sekonder metabolit tarama işlemleri İTK ve GK/KS sisteminde incelenmiştir. Gaz kromatografisi sistemi genellikle 300°C’ye kadar buharlaşabilen uçucu bileşiklerin teşhisinde kullanıldığından, bu özelliklere sahip olmayan maddeler teşhis edilememiştir.

Literatürde halofilik fungusların biyotransformasyon süreçlerinde kullanıldıkları görülmektedir. *Fusarium lateritium*’un petrol degrede edici hidrokarbon yıkıcı özellikte olduğu belirtilmiştir (Obuekwe ve ark., 2005). *Gymnascella morismortui*’nin sentetik boya degrede edici olduğu bulunmuştur (Molitoris ve ark., 2000). Alkalifilik fungus olan *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 ham petrolün biyotransformasyonu işlemlerinde kullanılmıştır (Briceno ve ark., 2013). Halofilik ve alkalifik funguslar kataliz reaksiyonlarında kullanıldıkları belirlenmiştir. Bu bakımdan salin ve alkali ortam olan Van Gölü sularından izole edilerek moleküler yöntemlerle tanımlanan *Aspergillus tubingensis*, biyotransformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Substrat maddesi olarak seçilen, yarı sentetik sedril metil eter, kozmetik sektöründe koku maddesi, alkolik losyon, ter önleyici, beyazlatıcı, yüzey temizleyici, şampuan ve sabun gibi endüstriyel alanlarında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bir seskiterpen türevi olan bu substrat, doğada çok yaygın bulunan Sedrol isimli seskiterpenin metillenmesi ile elde edilen yarı sentetik bir maddedir. Sedril metil eterin *Asperillus tubingensis* ile biyotransformasyonu bu çalışmayla ilk kez yapılmış olup, kültürün ekstraksiyonu, fraksiyonlanması ve saflaştırılması ile %89-98 arasında saflıkları değişen M1, M2, M3 ve M4 olmak üzere 4 madde elde edilmiştir. Bu maddelere ait GK/KS analiz sonuçları bulgular kısmında verilmiştir.

Bu metabolitlerden M2 kodlu maddenin GK/KS ve proton ve karbon NMR analizleri yapılarak, literatür verileriyle de karşılaştırılarak yapı tayini gerçekleştirilmiş olup, maddenin 3-hidroksi sedrol olduğu ortaya konmuştur. Aynı maddenin Skeya’ nın (2000) *Beauveria sulfurescens*, *Cephalosporium amphidicola*, *Aspergillus niger* ve *Bacillus cereus* ile sedrolün mikrobiyal

biyotransformasyonu gerçekleştirdiği çalışmada da elde ettiği belirlenmiştir. Tüm spektral veriler bu çalışmada da sedrolen elde edilen 3-hidroksi sedrol verileriyle uyum içerisinde. Madde miktarının yüksek olduğu M1 ve 3-hidroksi sedrol (M2) metabolitleri ile biyoaktivite çalışmaları yapılmıştır. CLSI'nin standart protokolleri kullanılarak substrat ve transformasyonla elde edilen metabolitlerin standart antimikrobiyal ajanlar şahitliğinde, antikandidal ve antibakteriyel etkileri ortaya konmuştur. Antikandidal etki testinin sonuçlarına göre M1 ve M2 metabolitinin özellikle *C. albicans* ve *C. glabrata*'ya karşı 62,5 ile 250 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı suşlara karşı substratın (sedril metil eter) çok daha zayıf etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur. Molekül yapısı incelendiğinde bu etki artışının moleküle fungus tarafından eklenen -OH grubundan ileri geldiği düşünülmektedir. Yapılan antibakteriyel etki testlerinde ise substrat ve metabolitlerin aynı konsantrasyonlarda (250 ile 500 µg/ml arasında) etkili oldukları belirlenmiştir. Standart antibakteriyel olan kloramfenikole karşı oldukça zayıf etkileri olduğu belirlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada, sedrolün transformasyonu ile elde edilen 3-hidroksi sedrolün antibakteriyel etkileri ortaya konmuş, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* adlı patojenlere karşı substrat olarak kullanılan Sedrol ile eşdeğer etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, sonuçlarımıza paralel şekilde 3-hidroksi sedrol'ün, substratına göre *Candida glabrata* patojeni üzerine iki kat daha etki gösterdiği bildirilmiştir (Skeya, 2000).

Bir başka çalışmada da Sedrol'ün *Neurospora crassa* fungusu ile yapılan biyotransformasyonu ile elde edilen, 12-, 10- ve 3-hidroksi sedrol türevlerinin dikkate değer antimikrobiyal ve antioksidan etkiler göstermediği bildirilmiştir (Kıran ve ark., 2010).

Radikal süpürücü etki deneyleri sonucunda molekülün 2 mg/ml konsantrasyonda DPPH ve ABTS radikallerini süpürücü etkisi görülmemiştir. Metabolitler İTK-otografik olarak uygulanmış, standart antioksidan ajanlarla karşılaştırılmıştır. Yapılan kalitatif değerlendirmeler sonunda metabolitler (M1-M4), standart ajanlar olan BHT ve askorbik asit kadar etki göstermemiştir. Bu sebeple kantitatif aşamaya geçilmemiştir. Literatür bilgileri hidroksi

fenollerin güçlü antioksidan moleküller olduğunu ve bu etkilerinin hidroksil gruplarının elektron verici özelliklerinde sağladığını bildirmektedir (Moalin ve ark., 2011). Bu hali ile fenolik olmayan ve iki hidroksil grubu taşıyan 3-hidroksi sedrol'ün elektron verici gücünün düşük olduğu, molekül formülü üzerinden de öngörülebilmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda çalışma imkânı ise elde edilen metabolitin miktarı düşünüldüğünde mümkün olmamıştır. Spektrofotometrik olarak yapılan ölçümlerde başlangıç konsantrasyonu olan 2 mg/mL ile IC<sub>50</sub> değeri hesaplamak mümkün olamamıştır. Sonuç olarak tüm metabolitlerin IC<sub>50</sub> değerleri 2 mg/mL'den büyüktür. Van Gölü su örneğinden izole edilen fungusun uygun besi ortamında gelişimi sağlanarak morfolojik tayinle cins düzeyinde *Aspergillus* olduğu belirlenmiş moleküler tanılama yapmak amacıyla tür düzeyinde tespit için rDNA (ITS) analizi yapılmıştır. ITS bölgesi (Internal transcribed spacer) daha çok funguslara ait korunmuş bölge olarak belirlenmiş evrensel fungal barkod dizisini içermektedir. Moleküler sistematikte türler arası tiplendirmede kullanımının daha yararlı olduğu belirtilmiştir. Fungal dizilerin tanılanmasında spesifik olarak sıklıkla ITS1 ve ITS 4 primerleri standart olarak kullanılmıştır. Yapılan moleküler analiz sonucu halofilik fungusun *Aspergillus tubingensis* olduğu belirlenmiştir. *Aspergillus tubingensis* yeni enzim ve metabolitlerin bulunmasında dikkat çekmektedir. *A. tubingensis* mitokondriyal genomunda (mtDNA tip 2b) oksidatif fosforilasyonla ilgili proteinleri kodlayan 14 tipik gen içerdiği görülmüştür (Juhász ve ark., 2008). *A. tubingensis*'in ekstraselüler β-glukozidaz enzimini salgıladığı ilk kez rapor edilmiştir (Decker ve ark., 2000).

Sonuç olarak;

- 1) Sekonder metabolit taramalarında GK/KS sisteminde herhangi bir ürüne rastlanılmamıştır. Bundan dolayı taraması yapılan mikroorganizmaların GK/KS'de tespit edilebilecek uçucu organik bir madde içeriğine sahip olmadıkları anlaşılmış, ancak farklı kromatografik ve spektrometrik yöntemler kullanılarak daha ayrıntılı tarama işlemleri yapılmasına ihtiyaç vardır. Dolayısıyla aynı izolatlar

tekrar kültüre alınarak, yapılacak ekstraksiyonlar ile elde edilecek ekstraktların LC/MS vb. sistemlerle kontrol edilerek, biyolojik aktiviteye sahip maddelerin taranması planlanmaktadır.

- 2) Bu çalışmada Van Gölü sularından izole edilen fungus için morfolojik ve moleküler analizleri ile tür tayini yapılmıştır.
- 3) Biyotransformasyon işlemi için substrat olarak sedir ağacından izole edilen sedrolün kimyasal işlemle türevlendirilerek yarı sentetik hali olan sedril metil eter kullanılmıştır.
- 4) Biyotransformasyon sonucu 4 adet metabolit elde edilmiştir. M1, M2, M3, M4 kodlu maddelerden M2 kodlu maddenin yapı tayini kromatografik ve spektroskopik analizler sonunda 3-hidroksi sedrol olduğu tespit edilmiştir. Diğer metabolitlerin daha verimli üretimlerinin gerçekleştirilmesi ve yapılarının aydınlatılması planlanmaktadır.
- 5) Elde edilen metabolitler miktar bakımından yeterli olmadığından antimikrobiyal aktivite açısından sadece M1 ve M2 kodlu maddelerin etkinliği gözlemlenmiştir.
- 6) Antimikrobiyal ve antikandidal aktiviteleri sonucu metabolit 1 ve 2'nin sedril metil eter ile karşılaştırıldığında patojen bakteriler üzerinde aynı derecede etkili olduğu anlaşılmış, ancak *Candida glabrata* ve *C. albicans* üzerinde substrattan 2-4 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir.
- 7) ABTS ve DPPH radikal süpürücü etkilerine bakıldığında substrat dahil olmak üzere, M1, M2, M3, M4 metabolitlerinin standart maddelere göre zayıf etki gösterdiği belirlenmiştir.

Gelecekte yapılması planlanan çalışmalar;

Sekonder metabolit taramaları GK/KS sistemi ile taranmış fakat herhangi bir uçucu metabolit varlığına rastlanılmamıştır. Mevcut mikroorganizmalarda muhtemel sekonder metabolitlerin taranması için LC/MS/MS gibi spektroskopik yöntemler kullanılarak, kıymetli kimyasalların ortaya konması hedeflenmektedir. Biyotransformasyon işlemi için halofilik *Aspergillus tubigenis* büyük hacimde çalışıldığından biyotransformasyon



sonucu elde edilen metabolit miktarlarının fazla olduğu görülmüştür. Yapılan ilk çalışmalar büyük hacimde olduğundan metabolitlerin aktivitelerini gözlemek için daha fazla deneme imkânı sağlamıştır. Aktivite değerlendirme işlemleri için antikandidal, antibakteriyal, antioksidan aktiviteleri dışında da diğer aktivite testleri uygulanacaktır. Ekstrem koşullarda yaşama kabiliyetine sahip mikroorganizmaların izolasyonlarına devam edilerek, ürettikleri sekonder metabolitler taranacak veya bu canlıların ticari önemi olan biyodönüşüm reaksiyonlarında kullanılabilirliği araştırılacaktır. Bu şekilde yeni ilaç, gıda veya kozmetik alanında kullanılacak biyoaktiviteye sahip yeni hammaddelerin keşfi mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Ang, P.G.P., Sammells, A. F. (1980), *Conversion of solar energy to chemical and electrical energy*, US Patent No: 4,215,172.
- Balakrishnan, K., Panday, J.R. (1996). “Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation”. *J.Sci.Ind. Res.* **55**, 365-372.
- Başer, K.H.C., ve Kırmıner N. (2005), *Farmakognozi 3 Ders Notları*, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.
- Başer, K.H.C., ve Demirci, F. (2007), “Chemistry of Essential Oils Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability”, *Springer*, Almanya.
- Berdy, J. (2005). “Bioactive Microbial Metabolites”, *J. Antibiot.* **58**, (1): 1–26.
- Briceno- Naranjo, L.,Pernia B., Guerra M., Demey, R. J., Sisto De A., Inojosa, Y., Gonzalez, M., Fusella, E., Freitas, M., Yegres, F. (2013), “Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil” *Microbial Biotechnology*, Volume 6, Issue 6, p:720-730.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. (1998), “Synthesis of biosurfactants in extreme conditions”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**:520–529.
- Canovas, D., Vargas C., Calderon M.I., Ventosa A., Nieto, J.J. (1998), “Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043”, *System Appl. Microbiol.*, **21**:487–497.
- Coleman, J.J, Ghosh, S., Okoli I., Mylonakis, E. (2011), “Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites” *PLoS ONE* **6(9)**: e25321. doi:10.1371/journal.pone.0025321.
- DasSarma, S. (2001), *Halophiles*, Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group.
- Decker, C., Visser, J., Schreier, P. (2001), “ $\beta$ -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of

four  $\beta$ -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance”, Vol. 55, 2, pp 157-163.

Demain, L. (1998), “Induction of microbial Secondary metabolism”, *Internatl. Microbiol.* 1:259–264.

Demirci, F. (2000), *Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.

Demirjian, D.C., Moris-Varas F., and Cassidy, C.S. (2001), “Enzymes from extremophiles”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:144–151.

Dundas, I.D., Larsen H. (1962), “The physiological role of carotenoid pigments of *Halobacterium salinarum*”, *Arch Mikrobiol* 44:233-239.

Dyall-Smith, M. (2004), *Halohandbook*, [www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook)

Emerson, D., Chauhan, S., Oriol, P., Breznak, J.A. (1994), “*Haloferax* sp. D1227 a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compound”, *Archiv Microbiol*, 161:445–452.

Escalona, A.M., Valera, F.R., Gomis, A.M. (1996), *Procedure for the extraction of polyhydroxyalkanoates for halophilic bacteria which contain them*, US Patent 5,536,429.

Falb, M. (2005), *Computational Genome and Pathway Analysis of Halophilic Archaea*, Lisans Tezi, Ludwig Maximilian Üniversitesi, Münih, Kimya ve Eczacılık Fakültesi.

Fernandez-Castillo R., Rodriguez-Valera F., Gonzalez-Ramos J., Ruiz-Berraquero F. (1986), “Accumulation of poly( $\gamma$ -hydroxybutyrate) by halobacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:214–216.

Ghisalba, O., Meyer, H.P., Wohlgemuth R., Flickinger M. (Ed.) (2010), *Industrial Biotransformation*, Encyclopedia of industrial biotechnology bioprocess, bioseparation, cell technology, Wiley, New York.

Horikoshi, K.(Ed.) (2011). *Extremophiles Handbook* . Springer.

- Houjin, L., Wenjian, L., Chuang, C., Yipin, Z., Yongcheng, L. (2006), “Biotransformation of limonen by marine bacteria”, *Chin. J. Anal. Chem.*, 34 (7), 946-950.
- Juhas, A., Pfeiffer, I., Keszthelyi, A., Kucsera, J., Vagvölgyi, C., Hamari, Z. (2008)., “Comparative analysis of the complete mitochondrial genomes of *Aspergillus niger* mtDNA type 1a and *Aspergillus tubingensis* mtDNA type 2b”, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 281, 1.
- Karadeniz, F., *Rasemik 1-fenil 1-propanolün Lipaz Katalizörlüğünde Enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu*, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2007.
- Kıran, İ., Durceylan, Z., Kırimer, N., Başer, K.H, Noma Y., Demirci, F., “Biotransformation of alpha-cedrol and caryophyllene oxide by the fungus *Neurospora crassa*”, *Natural product communications* 5:4 2010 Apr pg 515-8.
- Kieslich, K. (1976), “Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds”, *Georg Thieme Verlag*, Almanya.
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A., Gunde, N. (2005), “The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11):6600.
- Koyakama, K., Yamaguchi, N., Miyasaka, T. (1994), “Antibody-mediated bacteriorhodopsin orientation for molecular device architectures”. *Science*, 265:762–765.
- Kuncic, M.K., Gunde, N. C., Kogej T., Drobne D. (2010), “Morphological Response of the Halophilic Fungal Genus *Walleimia* to High Salinity”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(1):329.
- Kushner, D. J., (Ed.) (1978), *Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. in Microbial life in extreme environments*, Academic Press, Ltd. London, United Kingdom, pp 317–368.
- Liebott, P.P., Labat, M., Casalot, L., Amouric, A., Lorquin, J. (2007), “Bioconversion of tyrosol into hydroxytyrosol and 3,4-

- dihydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions by the new *Halomonas* sp. strain HTB24”, *FEMS Microbiol Lett* **276**, 26–33.
- Litchfield, D.C. (2011), “Potential for industrial products from the halophilic Archaea”, *J Ind Microbiol Biotechnol.* **38**:1635–1647.
- Ma, Y., Galinski, E.A., Grant, W.D., Oren, A., Ventosa, A. (2010), “Halophiles 2010: Life in Saline Environments”, *Applied and environmental microbiology*, Nov., p. 6971–6981.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye.
- Margesin, R., Schinner F. (2001), “Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology”, *Extremophiles*, **5**:73–83.
- Miyasaka, T. (1992), *Photoelectric transducer having photosensitivity chromoprotein Wlm, i.e. bacteriorhodopsin, US Patent 5,107,104.*
- Miyazawa, M., Nankai H., Kameoka H. (1995), “Biotransformation of (+)-cedrol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*”, *Phytochemistry*, Vol. 40, No. 1, pp 69-72.
- Moalin, M., Strijdonck van P.F.G., Beckers M., Hagemen j. G., Borm, J. P., Bast, A., Haenen, M.M.R., G. (2011), “A Planar Conformation and the Hydroxyl Groups in the B and C Rings Play a Pivotal Role in the Antioxidant Capacity of Quercetin and Quercetin Derivatives”, *Molecules*, 16, 9636-9650; doi:10.3390/molecules16119636.
- Molitoris, H.P., Buchalo, A.S., Kurchenko, I., Nevo, E., Rawal, B.S., Wasser, S.P., Oren, A. (2000), “Physiological diversity of the first filamentous fungi isolated from the hypersaline DeadSea” In: *Aquatic Mycology across the Millennium*, Fungal Diversity **5**: 55-70.
- Obuekwe, C.O., Badrudeen, A.M., Al-Saleh, E., Mulder, J.L. (2005), “Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress”, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **56**, 197-205.
- Ohno, A., Takashi, A., Shoda, M. (1992), “Production of a lipopeptid antibiotic surfactin with recombinant *B.subtilis*”, *Biotechnol Lett.*, **14**, 1165-1168.

- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L., Mah, R.A. (1994), ‘‘Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments’’, *Microbiological reviews*.
- Oren, A. (2002), ‘‘Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications’’, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**, 56–63.
- Oren, A. (2003), *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Kluwer Academic Publishers, Boston, London, Dordrecht.
- Oren, A. (2008), ‘‘Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity’’, *Saline Systems*, **4**:2.
- Pfaller, M. A., Chaturvedi, V., Espinel –Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Goseyi, L. L., Odds, F.C., Rex, J.H., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Walsh, T. J. ve Warnock, D. W. (1997), ‘‘National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard’’, *NCCLS document M27-A.National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
- Rex, H.J., Alexander, D.B., Skaggs A.B., Brown, D.S., v.,Chaturvedi, Ghannoum, A.M., Ingrof, E.A., Knapp, C.C., Zeichner, O.L., Pfaller, A.M., Sheen, J.D., Walsh, J.T., (2002), ‘‘Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard’’, Third Edition, *Clinic and Laboratory Standards Institute*.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J. F. (1985), ‘‘Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern’’, *Microb. Ecol.*, **11**:107-115.
- Rowe, D. J.,(2005) ‘‘Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances’’, *Taylor and Francis*.
- Ruiz–Ruiz, C., Srivastava, G.K., Carranza, D., Mata, J.A., Llamas, I.,Santamaría, M., Quesada E. (2011). ‘‘An exopolysaccharideproduced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human Tleukaemia cells’. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**:345–355.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York
- Sepcic, K., Zalar, P., Gunde N., C. (2011), “Low Water Activity Induces the Production of Bioactive Metabolites in Halophilic and Halotolerant Fungi”, *Marine Drugs*, **9**, 43-58; doi:10.3390/md9010043.
- Skeya, Ş., *Sedrol’ün Biotransformasyonu*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir, Eylül 2000.
- Springob, K., Kutchan, T.M. (2009), “Introduction to the different classes of natural products”, *Natural Products: Synthesis, Function and Application*, Springer Dordrecht Heidelberg, London New York.
- Umay, A. (2007), *Lavandula stoechas, Melissa officinalis ve Tribulus terrestris Bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması*, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Adana.
- Ventosa, A., (Ed.) (2004), *Halophilic Microorganisms*, Springer.
- Wikler, A.M., Cockerill, R. F., Craig, A.W., Dudley, N.M., Eliopoulos, M.G., Hecht, W.D., Hindler, F. J. (2006), “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard”, Seventh Edition.
- Woolard, C.R., Irvine R.L. (1995) “Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor”. *Wat Res*, **29**:1159–1168.
- Xu, P., Hua, D., Ma, C. (2007), “Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production”, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. **25** No.12.
- (<http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/hypersaline>, 2012)
- (<http://textbookofbacteriology.net/procaryotes.html>, 2012).