

## Kozluk (Batman) Tuzla Gözü Tuzlasından İzole edilen Ekstraselüler İnulinaz Enzimi Üreten *Salinivibrio* T1 İzolatının Karakterizasyonu

Kerem Özdemir<sup>1\*</sup>, Erdal Ögün<sup>1</sup>, Metin Ertaş<sup>1</sup>, Necati Özok<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, VAN

<sup>2</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, VAN

\* [keremozdemir@hotmail.com](mailto:keremozdemir@hotmail.com)

**Özet:** Bu araştırmanın materyalini; Güneydoğu Anadolu bölgesinde, Kozluk (Batman) Tuzla Gözü tuzlasından toplanan tuzlu toprak örnekleri oluşturdu. Tuzlu toprak örneklerinden izole edilen, *Salinivibrio* T1 izolatının, inulinaz enzimi üretimi yönünden pozitif olduğu tespit edildi. Bu izolatın inulinaz enzimi üretme yeteneği, içerisinde %1 oranında inulin bulunan halofil agarda test edildi. *Salinivibrio* T1 izolatının, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine ve 16S rDNA gen bölgesinin diziliş analizine göre *Salinivibrio costicola* türüne ait olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** İnulinaz, Halofilik, *Salinivibrio*, Tuzla Gözü

### Characterization of *Salinivibrio* T1 Isolate Producing Extracellular Inulinase Enzyme Isolated from Kozluk (Batman) Tuzla Gozu

**Abstract:** The material of this research; in the Southeastern Anatolia region, Kozluk (Batman) formed saline soil samples collected from Tuzla Gözü Saltern. *Salinivibrio* T1 isolate, isolated from saline soil samples, was found to be positive for inulinase enzyme production. The ability of this isolate to produce the inulinase enzyme was tested in halophile agar with 1% inulin. It was determined that *Salinivibrio* T1 isolate belongs to *Salinivibrio costicola* strain according to the morphological, physiological and biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rDNA gene region.

**Keywords:** Inulinase, Halophilic, *Salinivibrio*, Tuzla Gozu

#### Giriş

Halofilik mikroorganizmaların habitatları tuzcul ortamlardır. Halofilik prokaryotlar içerisinde hem bakterilere hem de arkebakterilere ait türler bulunur. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuzlarda ve tuzlu topraklarda yayılış gösterirler. Hafif derecede halofiller 0.2-0.85M (%-2-5), ılımlı halofiller 0.85-3.4M (%5- 20) ve ekstrem halofiller ise üremeleri için 3.4-5.1M (%20-30) NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar (DasSarma ve Arora, 2001; Rothschild ve Mancinelli 2001; Grant, 2004).

Halofilik bakteriler yüksek miktarda tuz içeren ortamlara iki strateji ile adapte olurlar. Bu stratejilerin ilki sitoplazmada KCl'ün molar konsantrasyonunu artırılmasıdır. Tuz biriktirme stratejisi daha çok Halobacteriaceae familyasında görülmekle beraber bu familya ile sınırlı değildir. İkinci strateji sitoplazmada

hücre içi osmotik basıncı yükselten tuz hariç osmolitlerin (organik compatible solutes) sentezi veya biriktirilmesi stratejisidir (Roberts, 2005; Empadinhas ve Costa, 2008; Oren, 2008).

*Salinivibrio* cinsi, Proteobacteria filumunun Gammaproteobakteri sınıfına ait Vibrionaceae familyasına dahildir. *Salinivibrio* cinsi, daha önce *Vibrio costicola* olarak sınıflandırılan *Salinivibrio costicola*'yı fizyolojik ve moleküler özelliklerinden dolayı *Vibrio* genusunun diğer türlerinden ayırt etmek için oluşturulmuştur (Mellado ve ark., 1996).

Halofilik enzimler yüksek tuz konsantrasyonunda aktivite gösteren biyoteknolojik öneme sahip enzimlerdir. İlave olarak bu enzimler geniş pH aralığında ve nisbeten uzun sıcaklık periyotlarında aktivite gösterebilirler. Halofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrolazların bazıları amilazlar,

proteazlar, selülozlar, lipazlar, ksilanazlar, DNazlar, pullunazlar, pektinazlar ve inulinazlardır (Delgado-García ve ark., 2012; Yin ve ark., 2015). Halofilik proteinler, halofilik olmayan homologlarına göre, daha fazla glutamik asit ve aspartik asit, kompozisyonuna sahip olduğu bildirilmiştir (Lanyi, 1974; Madern ve ark., 2000).

İnülin fruktanlar olarak bilinen, karbonhidratların bir sınıfına ait doğal bir polisakkarittir. İnülin, soğan, sarımsak, pırasa, hindiba gibi birçok bitkide bulunan oligomerdir (Saeed ve ark., 2015). Bitki kökenli bir yedek polisakkarit olan inülin, öncelikli olarak  $\beta$ -(2,1)-glikosid bağı ile birbirine bağlanmış çoklu D-fruktofuranoz birimlerinden ve  $\alpha$ - (1,2) -glikozidik bağı ile bağlanmış glukoz rezidülerinden oluşan bir zincirdir (Shen ve ark., 2015).

İnülin, etanol, glukonik asit, sorbitol ve diğer önemli kimyasalların üretiminde hammadde olarak kullanılır (Rawat ve ark., 2017). Ayrıca inülin, jel, kıvam verici ve tatlandırıcı özelliklerinden dolayı, gıda sanayisinde de kullanılmaktadır (Yabancı, 2010).

İnulinazlar, bazı bitkilerin dokularınca ve funguslar, mayalar ve bakteriler gibi çeşitli mikroorganizmalarca sentezlenmektedir. Mikrobiyal ve bitkisel inulinazlar, inülini, fruktoz ya da diğer oligosakkaritlere hidrolize ederler. EkzoİNULINAZLAR ( $\beta$ -D-fructopyranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.80) uçtaki  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1)-fruktofuranosidik bağları parçalar (Aşan Özüsağlam, 2009). Bu özelliklerinden dolayı ekzoİNULINAZLAR, inülinin etkili bir şekilde hidrolize ederek, % 90-95 kadar fruktoz veriminin elde edilmesini sağlarlar (Shen ve ark., 2015).

Mikroorganizma kaynaklı inulinazlar, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir kabiliyetlere sahip olduklarından araştırmacıların son yıllarda fazlaca ilgisini

çekmektedir (Gong ve ark., 2014). Son yıllarda inulinaz enzimi ile ilgili araştırmalar; ekstrem şartları tolere edebilen endüstriyel uygulamalarla uyumlu yeni inulinaz kaynaklarının tespitine odaklanmıştır (Rawat ve ark., 2017). Mikrobiyal inulinazın kaynağını bakteriler, küfler, mayalar ve aktinomycetlerin oluşturduğu rapor edilmiştir (Kango and Jain, 2011).

Literatürde inulinaz enzimi üreten mikroorganizmaların tespiti ile ilgili çeşitli araştırmalar mevcuttur. *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 ve *Paenibacillus* sp. (Schneider ve ark., 2004); *Marinimicrobium* sp. LS-A18 (Li ve ark., 2012); RCRI4 izolatı (Tarhriz ve ark., 2011); *Marine bacterium* MU-31 (Meenakshi ve ark., 2013); *Nocardia* sp. DN-K15 (Lu ve ark., 2014) ve *Arthrobacter* sp. HJ7 (Shen ve ark., 2015) türlerinin ekstraselüler inulinaz enzimi ürettikleri tespit edilmiştir. İlave olarak bazı halofilik bakterilerin de ekstraselüler inulinaz enzimi ürettiği bildirilmiştir (Rohban ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2010; Jayachandra ve ark., 2012a; Babavalian ve ark., 2013, 2014; Biswas ve Paul, 2013).

Ülkemizde bakteriler tarafından üretilen inulinaz enzimi üretimi ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Ancak *Rhizoctonia solani* (Ertan ve ark., 2003a); *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 ve *Trichoderma viride* (Ertan ve ark., 2003b); *Geotrichum candidum* (Erdal ve ark., 2011; Canli ve Kurbanoglu, 2012); *Aspergillus wentii* (Karatop ve Sanal, 2013) ve *Rhodotorula glutinis* (Tasar ve ark., 2015) türlerine ait mikrofungusların inulinaz enzimi üretimi ile ilgili çeşitli araştırmalar mevcuttur.

Bu araştırmada; Kozluk (Batman) Tuzla Gözü tuzlasından izole edilen inulinaz enzimi üreten *Salinivibrio* T1 izolatının karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Tuzlu toprak örneklerinden halofilik bakterilerin izolasyonu

Tuzlu toprak örnekleri Kozluk(Batman) Tuzla Gözü Tuzlasından toplandı. Halofilik bakterilerin izolasyonu için, tuzlu toprak örneklerinden dilüsyon hazırlandı. Halofil agar plakların yüzeyine eğri cam çubuk yardımıyla, 10<sup>4</sup>lük seyreltmelerden, 100µl yayıldı. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip üreyen koloniler, muhtemel halofilik bakteri kolonileri olarak değerlendirildi (Collins, 2004).

### İnulinaz enzimi üreten halofilik izolatların belirlenmesi

İzolatlar içerisinde %1 oranında inulin bulunan halofil agara, platin öze yardımı ile yoğun bir şekilde ekildi. Petri kapları 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde lügol çözeltisi ilave edildi. Lügol ilavesinden sonra, kolonilerin etrafındaki şeffaf bir zonun oluşumu, inulin hidrolizi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Li ve ark., 2011).

### İnulinaz enzimi üreten izolatların identifikasyonu

Bakteriyel izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* eserinin ikinci cildi referans alındı (George ve ark., 2005).

## Moleküler karakterizasyon

### Genomik DNA İzolasyonu

Genomic DNA izolasyonu için, Tryptic Soy Both (TSB) içerisinde 30°C'de 24 saat inkübe edilen kültür 2dk santrifüj edildi. Bakteriyel lizis TE

tampon içerisinde %10 SDS ve 20 mg/ml proteinaz K ilave edilerek ve 1 saat 37°C'de inkübe edilerek gerçekleştirildi. NaCl (5M) ve CTAB/NaCl ilave edildi ve 65°C'de 24 10 dk inkübe edildi. DNA, fenol/kloroform/izoamil alkol kullanılarak ekstrakte edildi (Gomaa and Momtaz, 2007; William ve ark., 2012).

### Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması

16S rDNA bölgesinin 1428 bazlık bölgesi uygun universal primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi. Bu amaçla Bacteria domaini için spesifik 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' ve 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' primerleri kullanıldı. PCR karışımı, 50 µl polimeraz tampon içerisinde her tampondan 30 pikomol, kromozomal DNA'dan 10ng ve 200 µM dNTPs ve 2.5 ünite Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Tüm amplifikasyon koşulları 94 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyon, 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 50 °C'de 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 10 sn uzamadan oluşan 30 döngülük amplifikasyon ve 72 °C'de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde programlandı. PCR işlemi tamamlandıktan sonra, PCR karışımının bir kısmı, agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülendi (Nikiforov ve Howles, 2001).

### 16S rRNA gen bölgesinin dizi ve filogenetik analizi

İzole edilen T1 izolatının 16S rDNA dizisi için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanında bulunan mevcut türler ile karşılaştırıldı. Test organizması ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Neighbor-

Joining algoritması kullanılarak oluşturuldu. Filogenetik analizde bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak MEGA 7 (Kumar ve ark., 2008) paket programında gerçekleştirilmiştir. *Vibrio cholerae* cinsi dış grup olarak kullanıldı. *Salinivibrio* grubunu temsil eden çalışma izolatu ve ilgili tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbor-Joining matrisiyle oluşturulan filogenetik ağaç oluşturuldu. Neighbor-Joining yöntemi için evrimsel uzaklık matrisi olan Jukes ve Cantor (1969) algoritması ile hesaplama yapıldı.

## Bulgular

### İnülaz enzimi üreten izolatların belirlenmesi

Tuzlu toprak örneklerinden izole edilen sadece bir izolat, inülaz enzimi yönünden pozitif bulundu ve *Salinivibrio* T1 izolatu olarak adlandırıldı (Şekil 1).



Şekil 1. TSA ortamında *Salinivibrio* T1 izolatının inülaz üretimi.

### *Salinivibrio* T1 izolatının morfolojik ve fizyolojik ve Biyokimyasal özellikleri

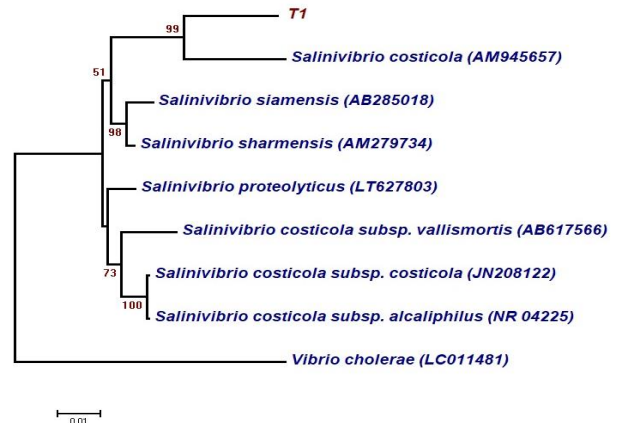
*Salinivibrio* T1 izolatının, fakültatif anerob, endosporsuz, gram negatif kıvrık çomak morfolojiye sahip olduğu belirlendi. *Salinivibrio* T1 izolatının, oksidaz ve katalaz pozitif, sitrat, nitrat ve Voges-Proskauer negatif, hareketli, %0-20 NaCl

konsantrasyonunda, 10°C–45°C ve 7.0-7.5 pH aralığında ürettiği belirlendi. Ayrıca kazein, asparagin ve ürik asidi hirolize ettiği belirlendi. İlave olarak glukoz, fruktoz, maltoz ve mannoz şekerinden asit oluştururken galaktoz, xyloz, laktoz, arabinoz ve sukroz şekerlerinden asit oluşturmadığı tespit edildi (Çizelge 1; Şekil 2).



Şekil 2. *Salinivibrio* T1 izolatının bazı biyokimyasal özellikleri.

### 16S rRNA gen bölgesinin dizi ve filogenetik analiz sonuçları



Şekil 3. T1 izolatının ve *Salinivibrio* cinsinin diğer tür ve alttürler arasındaki filogenetik konumu (16S rRNA gen dizisi karşılaştırmasına dayanan Neighbor-Joining filogenetik ağacı).

Çizelge 1. *Salinivibrio* T1 izolatının morfolojik ve fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.

Koloni Pigmentasyonu	krem
Hücre Morfolojisi	kıvrık çomak
Gram Boyama Özelliği	negatif
Oksijen Tercihi	fakültatif anaerob
Hareket	+
NaCl yokluğunda Üreme	+
%20 NaCl kons. üreme	+
Optimum NaCl kons.	%2.5-10'de
Optimum üreme sıcaklığı	35°C
Optimum pH	7.0-7.5
Hareket	+
Katalaz	+
Oksidaz	+
Asit Oluşturma	
D-Fruktoz	+
D-Galaktoz	-
D-Glukoz	+
D-Maltoz	+
D-Mannoz	+
D-Mannitol	-
D-Xyloz	-
Laktoz	-
L-Arabinoz	-
Sukroz	-
Hidroliz	
Asparagin	+
Eskulin	-
Kazein	+
Nişasta	-
Tween 80	-
Ürik asit	+
İndol oluşumu	-
Nitrat redüksiyonu	-
Sitrat kullanımı	-
Voges-Proskauer	-

## Sonuç ve Tartışma

Ekstrem enzimler; tarımsal, kimyasal ve farmasötik uygulamaları içeren, birçok endüstriyel prosteşte büyük bir ekonomik potansiyele sahiptir (Kumar ve ark., 2010). Başlangıçta, *Aspergillus*, *Penicillium* ve bazı mayalar (*Kluyveromyces* spp.) başlıca inulaz kaynağı olarak belirlenmiştir. Ancak ekstremofilik prokaryotlardan üretilen

üretilen inulazların tespit edilmesi ile bu listedeki tür sayısı oldukça genişlemiştir. Ekstremofilik inulazlar çeşitli endüstrilerde ortam şartlarına oldukça dirençlidirler (Rawat ve ark., 2017).

Çeşitli araştırmacılar tarafından, halofilik ve halotolerant bakteri suşları tarafından inulinaz enziminin üretildiği belirtilmiştir. Bu araştırmalardan bazıları; *Gracilibacillus*, *Halomonas*, *Virgibacillus*, *Halobacillus*, *Halovibrio* ve *Salinicoccus* (Rohban ve ark., 2009); *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* AK5 (Kumar ve ark., 2010); *Salinicoccus* sp. JAS4 (Jayachandra ve ark., 2012b); *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Salinicoccus*, *Marinococcus*, *Nesterenkonia* ve *Halomonas* (Babavalian ve ark., 2013); Halotolerant *Arthrobacter* sp. HJ7 (Shen ve ark., 2015); genusuna ait türlerin inulinaz enzimi üretimi ile ilgili araştırmalardır. Bu araştırmada, *Salinivibrio* T1 izolatının kalitatif olarak, inulinaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Literatür araştırmalarında *Salinivibrio* türlerden inulinaz enzimi üretimi ile herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çınar ve Mutlu (2017), *Salinivibrio* genusunu Sivas İli sınırları içerisinde bulunan, Cedit ve Tuzlagözü tuzlasından izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırma; *Salinivibrio* türlerden inulinaz enzimi üretiminin tespiti ile ilgili araştırma bölgemizde ilk araştırmadır. Araştırma bu yönü ile milli gen kaynaklarımızın tespiti açısından önemlidir.

16S rDNA dizilerinin analizi (Şekil 3), T1 izolatının ve *Salinivibrio costicola* türü ile sıkı bir kümelenme göstermesini ve *Salinivibrio* cinsinin diğer üyelerinden farklı bir küme oluşturduğunu açıkça ortaya koymuştur. Sekans verilerini analiz etmek için T1 izolatının ve *Salinivibrio costicola* türü ile oluşturduğu kümelenmenin bütün durumlarda tutarlı kalması ve diğerlerinden daha derine dallanmış

olması nedeniyle benzer sonuç vermiştir. Filogenetik analiz ile T1 izolatının Vibrionaceae ailesinin bir üyesi ve en yakın akrabası *Salinivibrio costicola* türü olarak ortaya çıkmıştır. GenBank'daki diğer *Salinivibrio* cinsi üyeleri ile 16S rRNA geni ile karşılaştırılması ile suşun % 99 *Salinivibrio costicola* türüne benzer olduğunu ortaya konmuştur. Biyokimyasal ve 16S rDNA analizi sonucunda T1 suşu *Salinivibrio costicola* türü olarak teşhis edilmiştir.

### Kaynaklar

- Aşan Özusağlam, M., 2009. İnulinaz Enziminin Önemi. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 10;2: 327-334.
- Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Moghaddam, M.M., Shakeri, F., 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*, 82;4: 466-474.
- Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Zahraei, S., Rohban, R., Shakeri, F., Moghaddam, M.M., 2014. Comparison of bacterial biodiversity and enzyme production in three hypersaline lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran-Bidgol. *Indian journal of microbiology*, 54;4: 444-449.
- Biswas, J., Paul, A.K., 2013. Production of Extracellular Enzymes by Halophilic Bacteria Isolated from Solar Salterns. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4;4: 30-36.
- Canli, O., Kurbanoglu, E.B., 2012. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid state fermentation using leek as substrate. *Toxicology and industrial health*, 28;10: 894-900.
- Collins, C.H., L, P.M, Grange J.M., Falkinham J.O., 2004. Collins and Lyne's Microbiological methods., Eighth Edition, Arnold, London.
- Çınar, S., Mutlu, M. B., 2017. Sivas'ın Solar Tuzlalarındaki Mikrobiyal Toplulukların Kültür-Bağımlı Karakterizasyonu. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 1-1.
- DasSarma, S. , Arora, P., 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92;13: 2575-2580.
- Empadinhas, N., da Costa, M.S., 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology* 11;3: 151-61.
- Erdal, S., Canli, O., Algur, O.F. 2011. Inulinase production by *Geotrichum candidum* using Jerusalem artichoke as sole carbon source. *Romanian Biotechnological Letters*, 16;4: 6375-6382.
- Ertan, F., Aktaç, T., Kaboglu, C., Ekinci, F., Bakar, E., 2003a. Determination of optimum cultivation conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6;16: 1386-1388.

- Ertan, F., Ekinçi, F., Aktaç, T., 2003b. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*. Pakistan Journal of Biological Sciences 6;15: 1332-1335.
- George, M.G., Julia, A.B., Timothy, G.L., 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. In Volume 2: The Proteobacteria (pp. 552-556). Springer-Verlag, Berlin.
- Gomaa, O.M., Momtaz, O.A., 2007. 16S rRNA characterization of a *Bacillus* isolate and its tolerance profile after subsequent subculturing. Arab Journal of Biotechnology, 10: 107-116.
- Gong, Y., Yu, J., Liu, Q., Chen, J., Yu, C., 2014. Research advance on inulinase produced by microorganism. Journal of Food Safety and Quality, 5;7: 2146-2150.
- Jayachandra, S.Y., Parameshwar, A.B., Mohan, R.K., Sulochana, M.B., 2012a. Characterization of extracellular hydrolytic enzymes producing extremely halophilic bacterium *Virgibacillus* sp. World Journal of Science and Technology, 2;2: 23-26.
- Jayachandra, S.Y., Kumar, A., Merley, D.P., Sulochana, M.B., 2012b. Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* sp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. Recent Research in Science and Technology, 4;4: 46-49.
- Jukes T.H., Cantor C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Karatop, R., Sanal, F., 2013. A Potential Resource in Fructose Production from Inulin: *Aspergillus wentii* Inulinase. Journal of Cell and Molecular Biology, 11;1/2: 21.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefing in Bioinformatics, 9;4: 299-306.
- Kumar, S.A., Arunasri, R., Jayachandra, Y., Sulochana, M.B., 2010. Screening Of Extracellular Hydrolytic Enzymes From *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Strain AK 5. Bioscan, 5;1: 97-99.
- Lanyi, J.K., 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriological Reviews, 38;3: 272.
- Li, A.X., Guo, L.Z., Fu, Q., Lu, W.D., 2011. A simple and rapid plate assay for screening of inulindegrading microorganisms using Lugol's iodine solution. African Journal of Biotechnology, 10;46: 9518-9521.
- Li, A.X., Guo, L.Z., Lu, W.D., 2012. Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28;1: 81-89.
- Lu, W.D., Li, A.X., Guo, Q.L., 2014. Production of novel alkalitolerant and thermostable inulinase from marine actinomycete *Nocardiopsis* sp. DN-K15 and inulin hydrolysis by the enzyme. Annals of Microbiology, 64;2: 441-449.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G., 2000. Halophilic adaptation of

- enzymes. *Extremophiles*, 4;2: 91-98.
- Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Manivasagan, P., Arumugam, M., Balasubramanian, T., 2013. Purification and characterization of Inulinase from marine bacterium, *Bacillus cereus* MU-31. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42;4: 510-515
- Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J., Ventosa, A., 1996. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46;3: 817-821.
- Nikiforov, Y.E., Howles, P.N., 2001. Polymerase chain reaction. In *Morphology Methods* (pp. 181-207). Humana Press.
- Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4;1: 2.
- Rawat, H.K., Soni, H., Treichel, H., Kango, N., 2017. Biotechnological potential of microbial inulinases: recent perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57;18: 3818–3829
- Roberts, M.F., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1;5: 1-30.
- Rohban, R., Amoozegar, M.A., Ventosa, A., 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36;3: 333-340.
- Saeed, M., Yasmin, I., Pasha, I., Randhawa, M.A., Khan, M.I., Shabbir, M.A., Khan, W.A., 2015. Potential application of inulin in food industry: A review. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 25;3: 110-116.
- Schneegurt, M. A. (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. In *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (pp. 35-58). Springer, Dordrecht.
- Schneider, A.L., Gern, R.M., Ninow, J.L., Furlan, S.A., Jonas, R., 2004. Characterization Of Microbial Inulinases. In: *Biotechnological Advances and Applications in Bioconversion of Renewable Raw Materials*. GBF and InWEnt, Germany. ISBN ISBN 3-925 268-25-0
- Shen, J., Zhang, R., Li, J., Tang, X., Li, R., Wang, M., Zhou, J., 2015. Characterization of an exo-inulinase from *Arthrobacter*: a novel NaCl-tolerant exo-inulinase with high molecular mass. *Bioengineered*, 6;2: 99-105.
- Tarhriz, V., Mohammadzadeh, F., Hejazi, M.S., Nematzadeh, G., Rahimi, E., 2011. Isolation and characterization of some aquatic bacteria from Qurugol Lake in Azerbaijan under aerobic conditions. *Advances in Environmental Biology*, 3173-3179.
- Tasar, O.C., Erdal, S., Algur, O.F, 2015. Utilization of Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) for Inulinase Production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45;6: 596-604.
- William, S., Feil, H., Copeland, A., 2012. Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. *Sigma*, 50; 6876.
- Yabancı, N., 2010. İnülin ve Oligofruktozların İnsan Sağlığı ve



Beslenmesi Üzerine  
Etkileri. Akademik Gıda, 8;1: 49-  
54.

Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., Chen, G.Q.,  
2015. Halophiles, coming stars for  
industrial  
biotechnology. Biotechnology  
Advances, 33;7:1433-1442.