

ARKELERİN BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI



Ali Arslan^{1a}, Gulten Ökmen^{1b*}

¹Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 48000, Kötekli, Muğla, Türkiye

* Corresponding Author:

E-mail: gultenokmen@gmail.com

(Received 10th November 2020; accepted 20th May 2021)

a:  ORCID 0000-0002-8722-591X, b:  ORCID 0000-0003-3207-6715

ÖZET

Arkeler sadece ekstrem ortamlarda yaşayabilen prokaryotik mikroorganizmalardır. Arkeler sıklıkla aşırı sıcaklık, tuzluluk ve pH habitatları ile ilişkili olduğu bilinen bir prokaryotik domaindir ve sürekli soğuk deniz sularında bunların varlığı iyi belgelenmiştir. Arkeler, Dünya üzerindeki yaşamın üç domain' inden biridir, baskın olarak dört ana şubeden oluşmuştur: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota ve Nanoarchaeota. İlk keşfedilen Arkeler ekstremofiller idi, bunlar dört temel fizyolojik gruba ayrılabilir. Bunlar halofiller, termofiller, alkalifiller ve asidofillerdir. Archaea domain'i özellikle potansiyel biyoteknolojik uygulamalar için kapsamlı araştırma altındadır. Çoğu arkenin ekstremofilik doğası, ekstrem çevrelerde yaşamak için fizyolojik adaptasyonlarını anlamaya yoğun çaba göstermiştir. Onların sıradışı özellikleri, bunları yeni farmasötikler, kozmetikler, besin takviyeleri, moleküler problemler, enzimler ve hassas kimyasallar gibi yeni biyoteknolojik süreçlerin ve endüstriyel uygulamaların gelişiminde potansiyel olarak değerli bir kaynak yapmaktadır. Bu derlemede, çeşitli Arke gruplarının biyoteknoloji uygulamalarından bahsedilmektedir. Özellikle Archaea enzimleri endüstri için çok önemli hale geldi. Ek olarak, Archaea geliştirmekte olan endüstrilerde bile kullanılmıştır. Bu yayının amacı biyoteknolojinin farklı alanlarında arkelerin uygulanmasına ilişkin literatürün analizi idi.

Anahtar kelimeler: *Arkeler, Biyoteknoloji, Endüstriyel uygulamalar, Enzim, Geliştirme*

ARCHAEA AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

ABSTRACT

Archaea are prokaryotic microorganisms which are able to live only in extreme environments. Archaea are a prokaryotic domain known to be often associated with habitats of extreme temperature, salinity and pH, and their presence in constantly cold marine waters is also well documented. Archaea, one of the three domains of life on Earth, is predominantly composed of four major phyla: the Euryarchaeota, the Crenarchaeota, the Korarchaeota and the Nanoarchaeota. The first-discovered Archaea were extremophiles, which can be divided into four main physiological groups. These are the halophiles, thermophiles, alkaliphiles, and acidophiles. The domain Archaea is particularly under extensive research for their potential biotechnological applications. The extremophilic nature of many archaea has stimulated intense efforts to understand the physiological adaptations for living in extreme environments. Their unusual properties make them a potentially valuable resource in the development of novel biotechnological processes and industrial applications as new pharmaceuticals, cosmetics, nutritional supplements, molecular probes, enzymes, and fine chemicals. In this review, the biotechnology applications of the various Arke groups are mentioned. Particularly Archaea enzymes have become very important to the industry. In addition, Archaea have been used even in emerging industries. Aim of this publication was analysis of literature on application of archaea in different areas of biotechnology.

Keywords: *Archaea, Biotechnology, Industrial applications, Enzyme, Cultivation*

GİRİŞ

Arkebakteriler 4 ana Filum'a ayrılmıştır. Bunlar, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* ve *Nanoarchaeota*'dır. *Euryarchaeota* grubu arkeler arasında farklı fizyolojik özellikleri içeren bir grubudur. Bu grubun çoğu da aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu gruba metanojenikler ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) dahildir. Arkebakterilerin kemoorganotrof, kemolitotrof ve ototrof oldukları bildirilmiştir [1-5].

Arkelerin Genel Özellikleri

Arkelerde hücre duvarı yapısı olan pseudopeptidoglikan polisakkarit, protein ve glikoprotein yapısında olabildikleri bilinmektedir. Pseudopeptidoglikan N-asetil glikozamin ve N-asetil talasaminuronik asitin tekrarlayan ünitelerinden oluşmuştur ve bu üniteler β -1,3 glikozidik bağı ile bağlanmıştır [1, 4, 5, 6](Tablo 1).

Biyoteknolojik Uygulamaları

Günümüzde gıda işleme, temizleme, biyosentetik süreçler ve çevresel biyoremediasyon gibi sektörlerde etkin biyokatalizörler giderek ilgi çekmektedir. Bu biyokatalizörler için kaynak çoğunlukla hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakterilerden sağlanmaktadır. Bu organizmaların enzimleri sıcaklık, tuzluluk, pH ve aşırı basınç altında kalmasından dolayı son zamanlarda biyoteknolojik çalışmalarda, ekstremofilik bakteri ve arkeler daha popüler hale gelmiştir [7, 8].

Birçok ilginç enzim ekstremofilik mikroorganizmalardan izole edilmeye başlanmıştır [9]. Bazı ekstremofilik mikroorganizmalar bilinmesine rağmen, ekstremofilleri araştırmada iki ana neden çalışmalara hız katmıştır.

- Şimdiye kadar araştırılmamış habitatların keşfine yol açması,
- Aşırı çevre ortamlarına adapte olmuş organizmaların endüstriyel amaç için daha geniş bir yelpazeye ve hizmet potansiyeline sahip olduğunun anlaşılmasıdır.

Tablo 1. Arkeler, bakteriler ve ökaryotlar arasındaki temel benzerlik ve farklar [1]

Özellikler	Bakteriler	Arkeler	Ökaryotlar
Hücre Duvarı	Peptidoglikandan oluşur.	Peptidoglikandan oluşmaz; diğer maddelerden oluşabilir.	Selüloz, kitin vb.
Lipidler	Yağ asitleri mevcuttur, ester bağları ile bağlanırlar.	İsoprenler mevcuttur, eter bağları ile bağlanırlar.	Yağ asitleri mevcuttur, ester bağları ile bağlanırlar.
RNA polimeraz	Tek bir küçük enzim, 4 alt üniteden oluşur.	Tek bir büyük enzim, birçok alt üniteden oluşur.	Üç büyük enzim, birçok alt üniteden oluşur.
Protein Sentezi	İlk aminoasiti Formilmetiyonin	İlk aminoasiti Metiyonin	İlk aminoasiti Metiyonin

Son yıllarda biyoteknolojide uygulama alanı bulan arkelere yönelik çalışmalar hız kazanmış olup, bunlar arasında aşırı halofiller, hipertermofiller, termoasidofilik arkeler ve psikrofiller bulunmaktadır. Bu organizmaların en önemli özelliği enzim sistemlerinin ekstrem çevre koşullarında çalışabilmesidir. Biyoteknolojik uygulamalarda en uygun enzimlerin ve en iyi çevresel koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için iki ana strateji vardır;

- Günümüzde bilinen enzimlerin genetik mühendisliği için optimize edilmesi ve önceden karakterize edilmemiş mikroorganizmaların yeni faaliyetler için taranması,
- Ekstremofil enzimler, zorlu çevresel ortamlarda stabilitesini koruyabildiğinden biyoteknolojide umut verici görülmektedirler [10] (Tablo 2).

Tablo 2. Genom dizileri tamamlanmış Arke grupları [11]

Filum	Türler	Genom Uzunluk (Mb)	Kaynak
Crenarchaeota			
Desulfurococcales	<i>Aeropyrum pernix KI</i>	1.6	[12]
Sulfolobales	<i>Sulfolobus solfataricus P2</i>	2.9	[13]
	<i>Sulfolobus tokadii</i>	2.7	[14]
Euryarchaeota			
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM4304</i>	2.1	[15]
Halobacteriales	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	2.0	[16]
Methanobacteriales	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum H</i>	1.7	[17]
	<i>Methanococcus jannaschii DSM2661</i>	1.6	[18]
Methanococcales	<i>Methanosarcina acetivorans C2A</i>	5.7	[19]
	<i>Methanopyrus kandleri</i>	1.7	[20]
Methanopyrales	<i>Pyrococcus horikoshii (shinkaj) OT3</i>	1.7	[21]
	<i>Thermoplasma acidophilum DSM 1728</i>	1.5	[22]
Thermoplasmatales	<i>Thermoplasma volcanium GSS1</i>	1.5	[23]

Halofilik Arkeler

Ekstrem çevre koşullarına sahip habitatlarda genellikle arkeler bulunmakta olup, ayrıca tuz doymunluğuna yakın sularda yaşamak ve güneş enerjisini kullanmak için de uzmanlaşmışlardır. Halofilik mikroorganizmalar hücre yapısını korumak için “uyumlu çözünenler” salgılamakta ve çeşitli biyokimyasal stratejiler geliştirmektedirler [24]. Günümüzde bu maddelerin endüstriyel öneme sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, halofilik mikroorganizmaların balık soslarının fermantasyonunda, tuzlu atık suların ve organik kirleticilerin iyileştirilmesi ile de grede edilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir [25].

Halofilik arkeler tarafından üretilen uyumlu çözünenler mannosil gliserat ve gliserol fosfat olup, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* ve *Archaeoglobus fulgidus'* dan tespit edilenler bulunmaktadır. Aşırı halofil *Halobacterium cutirubrum'* dan elde edilen eter lipidleri için patent alınmıştır. Bu eter lipidlerinin halofilik arkelerde yaygın olduğu

düşünülmektedir. Birçok alkalifil aynı zamanda halofilik şartlar altında yaşamını sürdürmekte ve deterjan, tekstil ve diğer sanayilerde kullanılan birçok enzim tuzlu alkali göllerde gelişen mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bu enzimlerin, enzim teknolojisi için avantajları şunlardır:

- Yüksek tuz ve ısı toleransına sahiptirler,
- Daha az polar redüktlerin kullanımını sağlayan katalitik bir çevre oluştururlar,
- Hidrolitik reaksiyonların potansiyel geri dönüşümünü sağlarlar.

Tüm bu avantajlar, endüstriyel biyokatalizörler için güçlü aday olmalarını sağlamaktadır [26].

Alkalişilik Arkeler

pH değerleri 9-12 arasında çok iyi büyüyen ya da 6.5 gibi nötre yakın pH değerinde yavaş büyüyen mikroorganizmalardır. Bu tür habitatlara en güzel örnek, soda çölleri ve soda gölleridir. Son derece alkali bir göl olan, Kenya'daki Magadi ve Mısır' da Wadi Natrun' da pH' sı 10,5-12,0 olan Dünya' nın en stabil ortamına birer örnektir [27]. Alkol dehidrojenaz üretimi etanol kullanımında anahtar bir enzimdir. Haloalkalofilik arke *Natronomonas pharaonis* tarafından üretilen bu enzimi kodlayan gen klonlanmış ve *Escherichia coli*' de eksprese edilmiştir [28].

Asidofilik Arkeler

Doğal asidik ortamlarda, insan yapımı asidik ortamlarda, pirit cevherlerinde, solfatara alanlarında, derin deniz volkanik delikleri gibi bölgelerde bu arkeler bulunmakta ve asidofilik adı verilmektedir. Büyüme, pH < 3'ten düşük olduğu şartlarda optimum olarak gerçekleşir [29]. Bu arkelerin hücre zarının yüksek geçirgen bir zar olduğu ve zarın yapısında tetra-eter bağlı lipidlerin bulunduğu bilinmekte ve bu bileşikler *Thermoplasma acidophilum*' da tespit edilmiştir [30]. Aşırı termoasidofillerin optimum gelişim sıcaklığı 60°C ve üzeri olup, optimum pH'ı ise 4 ve altındaki değerlere sahip olan karakteristik mikroorganizmalardır. Bugüne kadar incelenen birçok termoasidofil türlerin çoğunun Sulfolobales ve Thermoplasmatales takımlarına ait olduğu bildirilmiştir [31]. Aşırı termoasidofil türlerden biri olan *Acidianus infernus* 95°C ve pH 1' de gelişebilmektedir. Öte yandan, *Picrophilus* türleri, pH 0' dan düşük değerlerde ve 65°C' ye kadar ulaşan sıcaklıklarda gelişebilen en asidofilik organizmalardır [32].

Metanojenik Arkeler

Metanojenez olayı sindirim sistemleri, rumen, pirinç tarlaları, petrol kuyuları, depolama, ve ekstrem habitatlar gibi çok sayıda anaerobik ortamda yaygın bir süreçtir [33]. Bu süreç, kirlenmiş petrol hidrokarbonlarının mineralizasyon işlevinde rol oynayabileceğini göstermektedir [34]. Günümüzde hem kimyasal hem biyolojik süreçler olan biyoetanol, biyodizel, biyobutanol, biyometan ve biyohidrojen üretimi yaygın olarak araştırılmaktadır. Biyohidrojen üretimi için bazı heterotrofik hipertermofillerin moleküler hidrojen üretmedeki yetenekleri yararlı bulunmuştur [35].

Termofilik Arkeler

1981 yılından bu yana bilinmekte olan hipertermofiller $\geq 80^\circ\text{C}$ ' de optimum gelişmektedir. Hayatın üst sıcaklık sınırını temsil ederler [36] ve temelde anaerobik ortamlarda, genelde inorganik redoks reaksiyonları ile enerji elde eden cinsleri kapsamaktadırlar, bunlar *Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Aquifex*, *Thermocrinis* ve diğer arke temsilcilerinden hipertermofil olan yaklaşık 50 yeni türlerdir [32], ve bunlar

arasında, karakterize edilen cinsleri *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermofilum*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Thermosphaera*, *Ignicoccus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Methanothermus*, *Methanopyrus* ve *Nanoarchaeum*’ dur.

Yakın zamanda Karl Stetter ve meslektaşları Dünya' nın en küçük mikroorganizması olan, *Nanoarchaeum equitans*' ı keşfetmiş ve yeni bir filum olarak Nanoarchaeota ortaya atılmıştır [32]. Bu ekstremofil 120m derinlikteki hidrotermal deliklerde bulunmakta, 100°C' e yakın sıcaklıklarda gelişebilmekte ve genomu 500 kilobazdan daha az olan küçük bir arkedir.

Korarchaeota' ya ait 16S rRNA genleri Yellowstone Milli Parkı Kaplıcaları gibi yüksek sıcaklıklarda çoğaltılmış, ayrıca Doğu Pasifiğin derin deniz hidrotermal deliklerinden de izole edilmişlerdir [37]. Bunların ısı, basınç, deterjan ve çözücülere karşı yüksek kararlılıkları olduğu belirlenmiştir [38]. Isıya karşı kararlı prokaryot olarak bilinen bu arkeler, son derece yüksek sıcaklık sınırlarında gelişebilir ve eter-bağlı lipitler içermekte, ayrıca ökaryotik transkripsiyon içermektedir.

Tablo 3. Arkelerin ürünleri ve endüstriyel uygulamaları [39]

Fenotip	Ortam Şartları	Ürün	Uygulama
Termofiller	Yüksek sıcaklık (45- 110 °C)	Amilazlar	Tatlandırıcılar için Glukoz, Fruktoz
		Ksilinazlar	Kağıt ağartması
		Proteazlar	Piştirme, Mayalama, Deterjan
		DNA Polimerazlar	Genetik Mühendislik
Psikrofiller	Düşük sıcaklık (> 15°C)	Proteazlar	Peynir Olgunlaştırma Süt üretimi
		Dehidrogenazlar	Biyosensör
		Amilazlar	Detarjanlarda polimer degradesyonu
Asidofiller	Düşük pH (0-4)	Sülfür Oksidasyonu	Kömürde kükürt giderme
Alkolofiller	Yüksek pH (8-11)	Sellülazlar	Detarjanlarda polimer degradesyonu
Halofiller	Yüksek tuz konsantrasyonu	Bütün Organizmalar	Biyopolimer
Barofiller	Yüksek basınç	Bütün Organizmalar	Nişasta granülleri ve jellerin oluşumu
Metalofiller	Yüksek metal konsantrasyonu	Bütün Organizmalar	Biyoremidasyon ve Biyomineralizasyon
Radyofiller	Yüksek radyasyon seviyeleri	Bütün Organizmalar	Radyonüklidle kirlenmiş alanların biyoremidasyonu

Günümüzde arkelerin enzimlerinin kullanılabilirliğine yönelik sınırlamaları aşmak için ve belirli bir amaç için yeni biyokatalizörlerin tasarlanabilmesi için moleküler biyolojinin potansiyelinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda ekstremofilik enzimleri kodlayan genlerin aşırı üretimini sağlamak ve ticari uygulamaları için uygun olan özelliklerini değiştirmek amacıyla mezofilik konakçılarda klonlanmasına başlanmıştır [39]. Bu amaç için kullanılan organizmalar *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve mayalardır. Günümüzde saflaştırılan arkeal metabolitlerin ve enzimlerinin endüstriyel kullanımları Tablo 3’de özetlenmiştir.

Glukohidrolizasyon enzimleri

Karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan birçok arkeal enzim, özellikle glikozil hidrolaz ailesinden olanlar, endüstriyel biyoteknoloji sektörünün özel ilgi alanına girmektedir. Nişastalı gıda sanayii süreçlerinde termostabil enzimler gerekmektedir. Bunu sağlayan arkeler nişastayı dekstrin, glikoz, fruktoz ve trehaloz gibi daha değerli ürünlere dönüştürmek için gereklidir [38]. Örneğin amilaz ve pullulanazlar gibi yeni, aşırı termostabil ve nişasta hidrolizi yapan enzimlerin bulunması, endüstriyel nişastanın biyolojik dönüşüm sürecine büyük katkı sağlayacaktır.

Günümüzde *Pyrococcus woesei* rekombinant β -galaktosidaz enzimi çalışmaları sonucunda, düşük laktozlu süt ve peynir altı suyu gibi ürünlerin üretimi geliştirilmiştir. Diğer bir çalışmada rekombinant α -amilaz ve β -galaktosidaz preparasyonu için *Pyrococcus woesei* genleri *E. coli*'ye klonlanarak ekspresyonu daha da kolaylaştırılmıştır [7].

Termostabil amilazlar, pullulanazlar ve glukozidaz enzimleri sinerjik etki göstererek şeker şurubu, jelatin-benzeri özellikleri ve yağ oluşumu, dokulaştırıcı, aroma stabilize ediciler ve prebiyotik olarak kullanılabilen dekstrinlere sahip yeni nişasta bazlı malzemelerin üretiminde maliyeti düşürme avantajına sahiptirler. En son ekstremofil arkeler tarafından nişasta parçalayan çeşitli enzimler rapor edilmiştir. Bunlar 80 ile 100°C arasındaki bir sıcaklıkta çalışmaktadır. Özellikle *Pyrococcus* sp. ekstraselüler α -amilaz yüksek sıcaklıklarda termal kararlılığının olması (aktivitesini 130°C' de bile korumakta), bu enzimleri endüstriyel boyutta ideal bir aday yapmıştır [38].

Proteaz ve Peptidaz enzimleri

Dünya çapında üretilen proteolitik enzimlerin miktarı, diğer biyoteknolojik enzimlerin herhangi birinden daha fazladır. Deterjan ve alkali koşullarda denatürasyona karşı serin alkali proteazlar beyazlatma amacı ile deterjanlara katkı maddesi olarak girmektedir. Deri sanayi yüksek keratinolitik ve elastolitik faaliyetler için proteinleri kullanmaktadır. Ekstrem koşullar altında reaksiyonları katalize edebilecek proteazların keşfedilmesi endüstriyel açıdan önem arz etmektedir [39, 40].

Yüksek tuz konsantrasyonları metaller için aşındırıcı etki göstermektedir, bu nedenle tuz konsantrasyonunun etkisini azaltmak amacı ile salgılanan organik çözücüler aynı zamanda halofilik enzimin stabilizasyonunda da büyük rol oynamaktadır. Bu özelliğin sentetik reaksiyonlarda çok yararlı olacağı düşüncesi yaygın bir kanıdır [41]. Biyoteknolojik açıdan ilgi çekici birçok serin proteaz bulunmuş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bunlar arasında 95°C' de 4 saatlik bir yarı ömür gösteren *Desulfurococcus* cinsi ile ilişkili serin proteaz buna güzel bir örnek olmuştur [42]. *Staphylothermus marinus*' tan izole edilen bir serin proteazın son derece termostabil olduğu bulunmuştur.

Bu enzim, 135°C' de 10 dakika inkübasyon sonrasında bile kalıcı bir aktivite göstermiştir [43].

Pyrobaculum aerophilum' dan klonlanmış bir serin proteaz [44], birden çok proteolitik aktiviteye sahip *Pyrococcus furiosus'* dan saptanmıştır. *P. furiosus'* dan elde edilen bir serin proteaz ise, 105°C' de 20 dakika yarılanma ömrü ile son derece stabil olarak belirlenmiştir. Proteazlar, aynı zamanda termoasidofilik arke *Sulfolobus solfataricus* ve *Sulfolobus acidocaldarius* türlerinde de karakterize edilmiştir. Serin proteazlara ilave olarak, diğer tip enzimler de ekstremofillerden tespit edilmiştir. Psikrofilik enzimler ise endüstriyel, zirai ve tıbbi uygulamalar için geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Isıya kararlı proteazların özellikle deterjan sanayinde, ayrıca biyoteknolojik açıdan önemi de bulunmaktadır. Bu ekstremofilik arkelerden elde edilen proteazlar da deterjan ve denatüre edici maddelerin yüksek konsantrasyonlarının varlığında, serin türüne benzer şekilde, yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu rapor edilmiştir [38]. Proteazların aynı zamanda organik çözücüler ile uyumlulukları, ters reaksiyonu kullanarak peptid sentezini gerçekleştirmeleri de önemlidir [38]. Günümüzde karakterize edilen en son proteaz, *Thermococcus kodakarensis'* ten elde edilmiştir [45].

DNA enzimleri

Moleküler biyolojide en önemli gelişmelerden biri, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesidir. Termotabil DNA polimerazlar, PCR ve moleküler biyoloji uygulamaları çok önemlidir. Örneğin DNA çoğaltma, klonlama, sıralama veya etiketleme gibi işlemlerde. Örneğin, *Pwo* polimerazı *Pyrococcus woesei'* den, *Pfu* polimerazı *Pyrococcus furiosus'* dan, Deep Vent polimerazı *Pyrococcus* suşu GB-D'den, Vent polimerazı *Thermococcus litoralis'* den elde edilmiş olup, Taq polimerazdan daha düşük hata oranına sahip olduğu raporlanmıştır [38].

Esteraz ve lipaz enzimleri

Esterazlar biyoteknolojide organik bileşiklerin biosentezinde uygulama bulması nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Bu enzimler, esterlerin hidrolitik ayrılmasını katalize ederler. *Pyrococcus furiosus'* a ait esteraz ve lipaz genleri *E. coli* içersine klonlanmış ve fonksiyonel özellikleri tespit edilmiştir [46].

Lipazlar (karboksil ester hidrolazlar) hayvanlar, bitkiler, fungus ve bakteriler tarafından üretilen, doğal olarak her zaman görülebilen enzimler olup, son yıllarda halofil arkeler sayesinde lipolitik enzimler daha fazla dikkat çekmiştir. Örneğin *Haloarcula marismortui'* nin genomu sekanslanmış ve olası esteraz ile lipazı kodlayan genler bulunmuş ve son zamanlarda yapılan genomik çalışmalar ile sonuçlar teyit edilmiştir. *Haloarcula marismortui'* nin hücre içi ve dışı esteraz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir [47]. Arke enzimlerinin günümüze kadar bilinen en termotabil ve termoaktif esteraz oldukları bildirilmektedir [48].

Arkaeozomlar

Lipozomlar bazı aşular, enzimler ve ilaçlar için bir taşıma aracı olarak kullanılabilen, iki tabakalı veziküllerdir. Spratt tarafından tanıtılmış olan "Archaeosome" arkelere özgü eter lipidlerden oluşan lipozomal veziküllerdir [49]. Arkaeozomların kullanım alanları arasında damar içine, oral ve deri altına verilmesi uygun bulunduğundan, arkaeozomların güvenli ve toksik olmadığı kabul görmüştür [50]. Homojen lipozomlar, fosfolipazların meydana getirdiği saldırılara karşı dirençlidir ve hava ortamında 60 gün korunabilmektedirler [51].

Biosurfaktantlar

Biosurfaktant üreten halofil mikroorganizmalar, kirli yağ içeren tuzlu ortamların hızlı bir şekilde iyileştirilmesinde önemli rol oynayabilirler [52]. Banat ve diğerleri (52), pilot bölge olan denizlerde hidrokarbon kirliliğinin kontrolünü sağlamak için kendi kendine yeten sistemler geliştirmişlerdir.

Biyoliçing

Lovley [53] maden işleme alanlarında bulunan asidofil uygulamalarını gözden geçirmiştir. Norris ve arkadaşları [54] yaptığı çalışmada, Crenarchaeota' nın çeşitli endüstriyel uygulamalar için benzersiz kükürt metabolizmasına sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Mineral sülfidi oksitleyen termofilik arkeler, farklı doğal ve endüstriyel ortamlardan izole edilmiştir. Bu mikroorganizmaların sülfid cevherlerinden metal çıkarılmasında büyük potansiyele sahip oldukları rapor edilmiştir [55].

Arkelerin ekzopolisakkarit ve lipid metabolitleri

Arkeal biyokütlelerin potansiyel kullanımlarının yanı sıra, doğal ve modifiye edilmiş arkeal enzimler de endüstriye çok büyük imkanlar sunmaktadır. Bu enzimlerin biyoteknolojik değerlerinin ortaya konulması ile birlikte molekül dizilerinin ve kristalografik çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu sayede arkeal enzimler geleneksel enzimlerin yerini alabilecektir. Bundan başka ekzopolisakkaritlerinin, özel lipidlerinin ve metabolitlerinin endüstriyel anlamda potansiyel kullanımı da mümkündür (Tablo 4).

Biomining (metal kurtarma)

Arkelerin giderek artan biyoteknolojik öneminin ana nedeni, metaller ile “biomining” (metal kurtarma) yapabilesidir. Termal yerlerde metal kurtarma uygulaması sonucunda bu işlemin madencilikteki önemi giderek artırmıştır. Bu tür ortamlarda, ağır metallere organik ve inorganik karbon dahil etme yeteneği aynı zamanda mikroorganizmaya yüksek düzeyde tolerans yeteneği de sağlamaktadır [31].

Kültivasyonu

Büyük ölçekli arkeal kültürlerin kurulması oldukça zordur. Hipertermofilik arkeler için orta buharlaşma kültürleri yapılmalı ve mayalandırma işlemi gerçekleştirilmelidir. Alkalifiller, asidofiller ve halofillerin gelişimi için gerekli olan besi ortamına göre korozyona karşı dayanıklı malzemeler kullanılmalıdır. Buna ek olarak, arkeal enzimlerin temelde sentezlenme seviyesi, bir laboratuvar ölçeğinde saflaştırılması ve karakterizasyonu için yeterli olsa da, endüstriyel amaç için bu düşük seviye olarak kabul edilmektedir [68, 69, 63, 60]. Düşük sıcaklıklarda şekilsel esnekliğe sahip psikrofillerin sahip olduğu enzimler tarafından kullanılan modifikasyonlar, termofil proteinler ile stabilite çalışanlarda başarı göstermemiştir [65]. Biyoteknolojik süreçlerde arkeler ile yapılan çalışmalarda başarı elde edilebilmesi için yeni stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Bunlar;

- Arkeal biyokütle, enzim ve metabolitlerinin üretimi için yeni fermantasyon süreçlerine ihtiyaç duyulmaktadır.
- Büyük ölçekli üretimi için klonlama ve sentezleme stratejileri geliştirilmelidir.
- Arkeal enzim veya özel metabolitlerinin sanayi potansiyelinin belirlenmesi gereklidir.

Arkelerin biyoteknolojisine yönelik çalışmaların artmasına bağlı olarak, biyoreaktör ve biyolojik süreçlerine yönelik tasarımların yapılması giderek verimliliğinin de artmasına katkı sunacaktır. Ekstremofillerin gelişimi için gereken ekstrem çevre koşullarında, kirlilik problemleri çok düşük seviyededir. Bu nedenle, sürekli kültür yaklaşımı bilim adamlarının yaygın olarak kabul ettiği bir noktadır (Tablo 5) [70].

Tablo 4. Ekstremofil Arkelerin başlıca enzimleri ve uygulama alanları [84]

Arke grupları	Enzim ve diğer biyomoleküller	Uygulama ve ürün	Kaynak
Termofiller (50- 110 °C)	Amilazlar Glikozidazlar	Nişasta prosesleri	[56]
		Glukoz	[11]
		Fruktoz	[57]
		Trehaloz	[11]
		Sütte laktoz sindirimi	[56]
	Lipazlar Ksilinazlar Proteazlar DNA Polimerazlar	Enzim	[58]
		Atık su uygulamaları	[59]
		Deterjan	[9]
		Kağıt ağartma	[60]
		Gıda prosesleri	[61]
Psikrofiller (0- 20 °C)	Proteazlar Lipazlar	Deterjanlar	[62]
		çinde polimer degrade eden ajanlar	[69]
		Lipazlar	[66]
	Dehidrogenazlar	Biyosensör	[62, 65, 66]
Alkalifiller (pH:9)	Sellülazlar Proteazlar Amilazlar Lipazlar Siklodekstrinler	Deterjanlar	[62]
		çinde polimer degrade eden ajanlar	[27]
		Gıda katkı maddeleri	
Halofiller (% 3- 20)	Uyumlu çözünen, Membranlar	İlaç, kozmetik katkı maddesi	[67]

Tablo 5. Arkelerin biyoreaktör ölçeğinde kültivasyonu: sürekli ve yüksek hücre yoğunluğu fermantasyonu [11]

Mikroorganizmalar	T_{opt} (°C)	Kültivasyon Modu	Kaynak
<i>Metallosphaera sedula</i>	74	Sürekli	[71]
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	65	Sürekli büyümeyi sınırlayıcı faktör olarak H ₂	[72]
<i>Methanococcus jannaschii</i>	85	Ortam optimizasyonu CSTR	[73]
<i>Methanococcus jannaschii</i>	80–85	Sürekli	[74]
<i>Pyrococcus abyssi</i> ST549	95	Sürekli	[75]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	Diyaliz	[76]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	Sürekli	[77]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	Nişasta bazlı ortamda kümelenme	[78]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	98	Sürekli	[71]
<i>Sulfolobus shibatae</i>	75	Diyaliz	[76]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> Gθ	75	Mikrofiltrasyon	[70]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4	87	Kesilmiş süt bazlı ortamda kümelenme	[79]
<i>Thermococcus barosii</i>	82,5	-	[80]
<i>Thermococcus litoralis</i>	85–88	Kümelenme ve sürekli	[81]

Sonuç olarak, bilim adamlarının ilgisi fazla miktarda biyokütle ve metabolit üretimi için yenilikçi biyoreaktörlerin tasarımına odaklanmıştır. Ayrıca arke enzimlerinin mezofilik organizmalara klonlanması ve hücrede ifade tekniklerinin geliştirilmesi üzerine birtakım stratejiler geliştirilmiş ve bunlar çeşitli uygulamalarda ortaya konmaya başlanmıştır [64, 82, 83].

KAYNAKLAR

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006): Brock Biology of Microorganisms. In: Williams, S. T., Sharpe, M. E, Holt, J. G. (eds.) Pearson Education International. Eleventh Edition, New Jersey.
- [2] Munson, M. A., Nedwell, D. B., Embley, T. M. (1997): Phylogenetic diversity of archaeal sediment samples from coastal salt marsh. Applied and Environmental Microbiology 63(12): 4729-4733.
- [3] Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A., Schleifer, K. H. (1996): *Halobacillus* gen. nov. with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov. and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 492-496.
- [4] Valera, F. R., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1981): Variation of environmental features and microbial populations with salt concentration in a multi-pond saltern. Microbiol Ecology 7: 235-243.
- [5] Vreeland, R. H. (1993): Taxonomy of Halophilic Bacteria, In: Vreeland, R. H., Hochstein, L. I. (eds.) The Biology of Halophilic Bacteria. CRS Press. Boca Raton, pp. 105-134.
- [6] Birbir, M., Kalli, N. (2000): Şereflikoçhisar Tuz Gölü'ndeki aşırı halofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu. Proje No:6 FEN.

- [7] Synowiecki, J., Grzybowska, B., Zdzieblo, A. (2006): Sources, properties and suitability of new thermostable enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(3): 197-205.
- [8] Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M. (2009): Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36: 105-110.
- [9] Ispida, M. (1997): Highly efficient production of enzymes of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*: a practical method to over express GC-rich genes in *Escherichia coli*. *Extremophiles* 1: 157-162.
- [10] Oren, A. (2002): Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 1: 56-63.
- [11] Schiraldi, C., Giulliano, M., Rosa, M. D. (2002): Perspectives on the biotechnological applications of archaea. *Archaea* 1: 75-86.
- [12] Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H. (1999): Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Research* 6(2): 83-101.
- [13] She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F. (2001): The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7835-7840.
- [14] Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H. (2001): Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Research* 8(4): 123-140.
- [15] Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F. (1997): The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-370.
- [16] Wailap, V. N., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G. *et al.*, (2000): Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 12176-12181.
- [17] Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C. (1997): Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* H: functional analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology* 179: 7135-7155.
- [18] Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J. (1996): Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073.
- [19] Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A. *et al.*, (2002): The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Research* 12: 532-542.
- [20] Slesarev, A. I., Mezhevaya, K. V., Makarova, K. S. *et al.*, (2002): The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4644-4649.
- [21] Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H. (1998): Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Research* 5(2) : 55-76.
- [22] Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., and Baumeister, W. (2000): The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407: 508-513.
- [23] Kawashima, T., Amano, N., Koike, H. (2000): Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26): 14257-62.
- [24] Tehei, M., Franzetti, B., Maurel, M. C., Vergne, J., Hountondji, C., and Zaccari, G. (2002): The search for traces of life: the protective effect of salt on biological macromolecules. *Extremophiles* 6: 427-430.
- [25] Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M. L., Rebib, H., Cayol, J. C., Ollivier, B., and Boudabous, A. (2009): Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology* 2009: 1-17.

- [26] Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A. and Ventosa, A. (2010): Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied Environmental Microbiology* 76(21): 6971-6981.
- [27] Horikoshi, K. (1999): Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(4): 735-750.
- [28] Cao, Y., Liao, L., Xu, X., Oren, A., Wang, C., Zhu, X., and Wu, M. (2008): Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*. *Extremophiles* 12(3): 471-476.
- [29] Baker-Austin, C., and Dopson, M. (2007): Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* 15(4): 165-171.
- [30] Shimada, H. (2002): Complete polar lipid composition of *Thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Bacteriology* 184(2): 556-563.
- [31] Auernik, K. S., Maezato, Y., Blum, P. H., Kelly, R. M. (2008): The genome sequence of the metal mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Applied Environmental Microbiology* 74: 682-692.
- [32] Huber, H., Stetter, K. O. (2006): Thermoplasmatales. In: Dworkin, M. Falkow, S. Rosenberg, E. Schleifer, K. Stackebrandt, E. (eds.) *The Prokaryotes*. Springer. pp. 101-112.
- [33] Garcia, J. L., Patel, B. K. C., and Ollivier, B. (2000): Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.
- [34] Chapelle, F. H., Bradley, P. M., Lovley, D. R., O'Neill, K., and Landmeyer, J. E. (2002): Rapid evolution of redox processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Ground Water* 40: 353-360.
- [35] Atomi, H., Sato, T., and Kanai, T. (2011): Application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 618-626.
- [36] Zillig, W., Stetter, K. O., Schafer, W., Janekovic, D., Wunderl, S., Holz, F., and Palm, P. (1981): Thermoproteales: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Icelandic solfataras. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Serie B-Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Preventive Medizin* C2: 205-227.
- [37] Auchtung, T. A., Takacs-Vesbach, C. D., Cavanaugh, C. M. (2006): 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota". *Applied Environment Microbiology* 72(7): 5077-5082.
- [38] Egorova, K., and Antranikian, G. (2005): Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8: 649-655.
- [39] Alquéres, S. M. C., Almeida, R. V., Clementino, M. M., Vieira, R. P., Almeida, W. I., Cardoso, A. M., Martins, O. B. (2007): Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 398-405.
- [40] Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999): Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 711-729.
- [41] Kim, J., Dordick, J. S. (1997): Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile. *Biotechnology and Bioengineering* 55(3): 471-479.
- [42] Hanzawa, S., Hoaki, T., Jannasch, H. W., Maruyama, T. (1996): An extremely thermostable serine protease from a hyperthermophilic archaeon *Desulfurococcus* strain SY, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Marine Biotechnology* 4: 121-126.
- [43] Mayr, J., Lupas, A., Kellermann, J., Eckerskorn, C., Baumeister, W., Peters, J. (1996): A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface of the layer of the archaeon *Staphylothermus marinus*. *Current Biology* 6: 739-749.
- [44] Voelkl, P., Markiewicz, P., Stetter, K. O., Miller, J. H. (1995): The sequence of a subtilisin-type protease (aerolysin) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* reveals sites important to thermostability. *Protein Science* 3: 1329-1340.

- [45] Foophow, T., Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S. (2010): Crystal structure of a subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis* requirement of a C-terminal beta-jelly roll domain for hyperstability. *Journal of Molecular Biology* 400(4): 865-877.
- [46] Alquéres, S. M. C., Almeida, R. V., Clementino, M. M., Vieira, R. P., Almeida, W. I., Cardoso, A. M., Martins, O. B. (2006): Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1128-1136.
- [47] Camacho, R. M., Mateos, J. C., Gonzalez-Reynoso, O., Prado, L. A., and Cordova, J. (2009): Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 901-909.
- [48] Ikeda, M., and Clark, D. S. (1998): Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 624-629.
- [49] Sprott, G. D., Tolson, D. L., Patel, G. B. (1997): Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiol Letters* 154(1): 17- 22.
- [50] Patel, G. B., Zhou H., KuoLee, R., Chen, W. (2004): Archaeosomes as adjuvants for combination vaccines. *Journal of Liposome Research* 14(3): 191-202.
- [51] Choquet, C. G., Patel, G. B., Ekiel, I., and Sprott, G. D. (1999): Formation of stable liposomes from lipid extracts of archaeobacteria. Patent US5989587, 1999, November 23.
- [52] Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000): Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 495-508.
- [53] Lovley, D. R. (2001): Bioremediation: Anaerobes to the rescue. *Science* 239: 1444-1446.
- [54] Burton, N. P., and Foulis, N. A. M. (2000): Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4: 71-76.
- [55] Norris, P. R. (1990): Acidophilic Bacteria and Their Activity in Mineral Sulfides Oxidation. In: Ehrlich, H. L., Brierey, C. L. (eds.) *Microbial Mineral Recovery*. McGaw-Hill. New York, pp. 3-27.
- [56] Lernia, D. (1998): Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch. *Extremophiles* 2: 409-416.
- [57] Miura, Y. (1999): High level production of thermostable α -amylase from *Sulfolobus solfataricus* in high cell density culture of the food yeast *Candida utilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 129-134.
- [58] dePascale, D. (2002): A novel thermophilic chimeric enzyme for trehalose production. *Extremophiles* 6(6):463-468.
- [59] Becker, P. (1997): Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 184-190.
- [60] Madigan, M. T., and Mairs, B. L. (1997): Extremophiles. *Scientific American* 276(4): 82-87.
- [61] Pennisi, E. (1997): Industry, extremophiles begin to make their mark. *Science* 276: 705-706.
- [62] Hough, D. W., and Danson, M. J. (1999): Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 39-46.
- [63] Herbert, R. A. (1992): A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnology* 10: 395-401.
- [64] Schiraldi, C., Acone, M., Giuliano, M., Di Lernia, I., Maresca, C., Carteni, M., and DeRosa, M. (2001): Innovative fermentation strategies for the production of extremophilic enzymes. *Extremophiles* 5: 193-198.
- [65] Russell, N. J. (2000): Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* 4: 83-90.
- [66] Gomes, J. (2000): Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles* 4: 227-235.

- [67] Sauer, T., and Galinski, E. A. (1998): Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 306-313.
- [68] Kelly, R. M., and Deming, J. W. (1988): Extremely thermophilic archaeobacteria: biological and engineering considerations. *Biotechnology Progress* 4: 47-61.
- [69] Cowan, D. A. (1992): Enzymes from thermophilic Archaeobacteria: Current and Future Application in Biotechnology. In: Danson, J., Hough, D. W., and Lunt, G. G. (eds.) *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology (Biochem. Soc. Symp. 58)*. Portland Press. London, pp. 149-169.
- [70] Schiraldi C., Marulli F., Lernia I. D., Martino, A., and DeRosa, M. (1999): A microfiltration bioreactor to achieve high cell density in *Sulfolobus solfataricus* fermentation. *Extremophiles* 3: 199-204.
- [71] Rinker, K. D., Han, C. J., and Kelly, R. M. (1998): Continuous culture as a tool for investigating the growth physiology of heterotrophic hyperthermophiles and extreme thermoacidophiles. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85(1): 118S-127S.
- [72] Schill, N. A., Liu, J. S., and Stockar, U. V. (1999): Thermodynamic analysis of growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biotechnology and Bioengineering* 64: 74-81.
- [73] Mukhopadhyay, B., Johnson, E. F., and Wolfei, R. S. (1999): Reactor- scale cultivation of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* to high cell densities. *Applied and Environment Microbiology* 65: 5059-5065.
- [74] Tsao, J. H., Kaneshiro, M. K., Yu, S., and Clark, D. S. (1994): Continuous culture of *Methanococcus jannaschii*, an extremely thermophilic methanogen. *Biotechnology and Bioengineering* 43: 258-261.
- [75] Godfroy, A., Raven, N. D., and Sharp, R. J. (2000): Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiology Letters* 186: 127-132.
- [76] Krahe, M., Antyanikian, G., and Markl, H. (1996): Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Review* 18: 271-285.
- [77] Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., and Sharp, R. (1992): Continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 263-267.
- [78] Raven, N., and Sharp, R. (1997): Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1. *FEMS Microbiology Letters* 146: 135-141.
- [79] Romano, I., Calandrelli, V., Pagnotta, E., and DiMaso, R. (1992): Whey as medium for biomass production of *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnology and Technology* 6: 391-392.
- [80] Duffaud, G. D., d'Hennezel, O. B., Peek, A. S., Reysenbach, A. L., and Kelly, R. M. (1998): Isolation and characterization of *Thermococcus barossi*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 40-49.
- [81] Rinker, K. D., and Kelly, R. M. (2000): Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnology and Bioengineering* 69: 537-547.
- [82] Nordberg-Karlsson, E., Holst O., and Tocaj, A. (1999): Efficient production of truncated thermostable xylanases from *Rhodothermus marinus* in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 598-606.
- [83] Schiraldi, C., Martino, A., Acone, M., DiLernia, I., DiLazzaro, A., Marulli, F., Generoso, M., Carteni, M., and DeRosa, M. (2000): Effective production of a thermostable α -Glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli* exploiting a microfiltration bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 70: 670-676.
- [84] Schiraldi, C., DeRosa, M. (2000): The production of biocatalyst and biomolecules from extremophiles. *Trends in Microbiology* 20(12): 515-521.