

ÖZET

Doktora Tezi

Haloferax alexandrinus'dan (EURYARCHAEOTA-ARCHAEA) ASİMİLE EDİCİ NİTRAT REDÜKTAZ'IN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Volkan KILIÇ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2010, 78 sayfa

Bu tezde halofilik arkeal olan *H. alexandrinus*'da asimile edici nitrat redüktaz (NAS) enziminin saflaştırılması ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

H. alexandrinus Nas enziminin nitrat ve metil viyolojen için Km değerleri sırasıyla 0,045 mM ve 0,0065 mM olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH'sı 9.5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak saptanmıştır. Enzimin izoelektrik noktası 5.3 olarak belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonunun artışına paralel olarak Nas enziminin aktivitesinde arttığı gözlenmiş ve maksimum aktivitenin 3 M NaCl konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir.

Farklı tuz konsantrasyonları ile yapılan çalışmada *H. alexandrinus* Nas enziminin aktivitesinin KCl ile NaCl'ye göre %100'ün üzerinde arttığı, ancak MgCl₂ ve AlCl₃ ile yapılan karşılaştırmada ise enzimin inhibe olduğu tesbit edilmiştir.

H. alexandrinus Nas enziminin aktivitesinin siyanür, azid, EDTA ve sülfid ile azaldığı, DTT'nin ise etkilemediği tesbit edilmiştir.

Saflaştırma basamaklarından sonra enzim 70 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile yapılan çalışma sonucunda ise saflaştırılan *H. alexandrinus* Nas'ının moleküler ağırlığının 72±1.8 kDa ve monomer olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Haloferax alexandrinus*, asimile edici nitrat redüktaz, Halofil, Arke

ABSTRACT

PhD Thesis

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ASSIMILATIVE NITRATE REDUCTASE FROM *Haloferax alexandrinus*

Volkan KILIÇ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department

Supervisor: Prof. Dr: H. Mehtap KUTLU

2010, 78 pages

The present thesis focuses on the purification and determination of biochemical properties of assimilative nitrate reductase (Nas) enzyme.

K_m values for *H. alexandrinus* Nas enzyme for nitrate and methyl viologen were 0,045 and 0,0065 mM. The optimal pH for the enzyme was 9.5 and the temperature was 50 °C. Isoelectric point of the enzyme was determined as 5.3. Nas activity increased directly proportional to the NaCl concentration and maximum activity was determined at 3 M NaCl concentration.

The study was carried on with different concentrations of NaCl and *H. alexandrinus* Nas enzyme activity was found to be increased over 100% with KCl when compared to NaCl. MgCl₂ and AlCl₃ salts inhibited the enzyme activity.

Nas activity of *H. alexandrinus* decreased by cyanide, azide, EDTA and sulphite but it was not effected by DTT.

The enzyme was purified 70 fold at the end of purification steps. It was found to be a monomer with 72 ± 1.8 kDa molecular weight by SDS-PAGE analysis.

Keywords: *Haloferax alexandrinus*, Assimilatory nitrate reductase, Halophile, Archaea

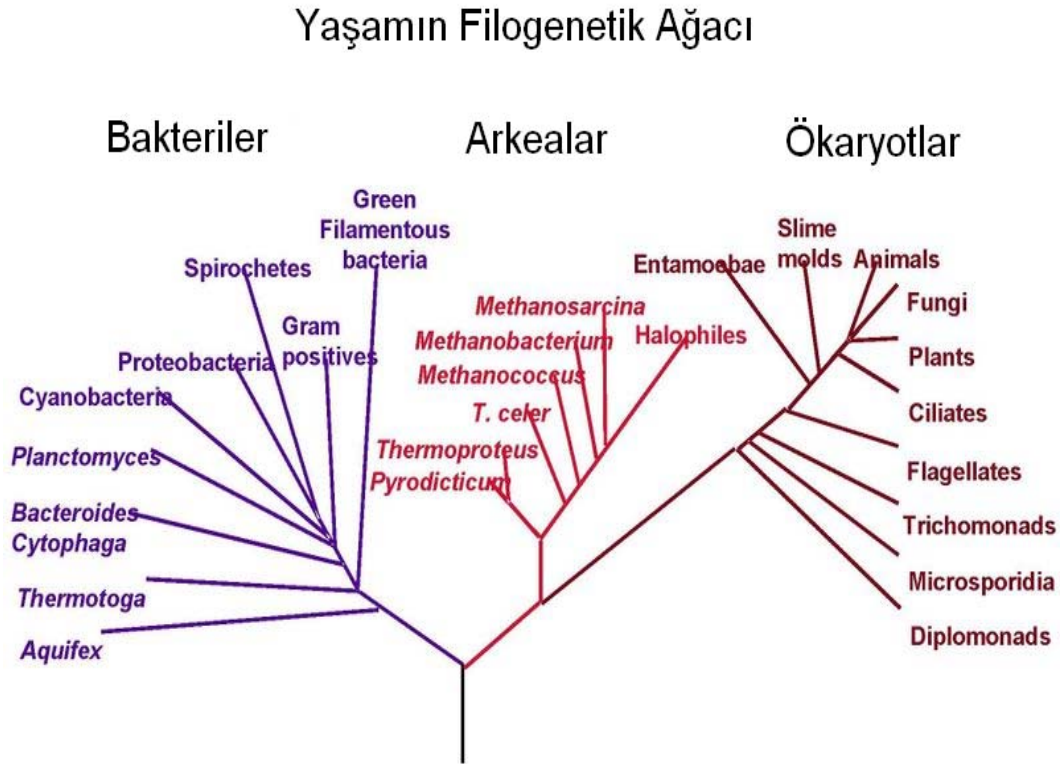
1. GİRİŞ

1.1. Canlıların Sınıflandırılması

Geçmişte canlılar klasik olarak bitki ve hayvanlar olmak üzere 2 gruba ayrılıyordu. Ancak Heackel 1866 yılında bu ayrımı değiştirmiş olup her iki kategoriye yerleştirilmemiş olan ve hem hayvan hem de bitkilerden ayrılan özelliklere sahip olan tek hücreli basit protistlerin bu iki gruba dahil olmadığını ortaya koyarak canlıları 3'e ayırmıştır. Daha sonraları 1938 de Chatton canlıları prokaryotlar (nukleusa sahip olmayanlar) ve ökaryotlar (hücresel çekirdeğe sahip olan organizmalar) olarak 2 kategoriye ayırmış fakat bu kabul görmemiştir. İleri sürdüğü bu ayırma karşı çıkılma nedeni temelde prokaryot ve ökaryot kavramının sitolojik temele dayalı olmasıydı. Aynı yıl Coeplanland bakterilerin dahil olduğu yeni bir alemin varlığını ortaya koymuş ve canlıları 4 dala ayırmıştır. 1959 da Whittaker mantar adında yeni bir alemin varlığını ortaya koymuştur. Whittaker'in yaptığı bu sınıflandırma temel alınarak canlılar monera, protista, hayvanlar, bitkiler ve funguslar olmak üzere 5 alem altında toplanmıştır. Bu sınıflandırma yakın zamana kadar en çok kabul gören yaşamın temel organizasyon şeması olmuştur (Woese ve ark. 1990, Woese 1999).

20. yüzyılın başlarında bakterilerin sınıflandırılması mikrobiyologlar için bir sorun haline gelmeye başlamıştır. Bu yüzden moleküler yapılar ve dizilerin, klasik fenotipik özelliklere göre evrimsel ilişkileri daha iyi ortaya çıkardığı görülmüştür. Bakterilerin filogenetik olarak düzenlenmesi ve saf kültürlerin elde edilmesi amacıyla mikrobiyal biyoçeşitliliğin analiz edilebilmesi için yeni teknikler geliştirilmiştir. Bundan dolayı taksonların tanımlanmasında temel alınan organizmal→hücresel seviye, moleküler düzeye (16S ve 18S rRNA dizi karşılaştırmaları) kaydırılmıştır. Sınıflandırmada klasik fenotipik kriterlerin yerini ribozomal RNA sekansların analizine dayanan moleküler kriterler almıştır. Bu sekansları yaşamın evrimsel tarihinin mükemmel belirteçleri kılan ise tüm organizmalarda korunuyor olmalarıdır. Yaklaşık 10 yıl boyunca farklı Moleküler karşılaştırmalar sonucu dünyadaki yaşam, 1977 yılında Carl Woese tarafından 3 ana gruba ayrılmıştır: Bakteriler, Ökaryotlar ve Arkeler. Bu sınıflandırmada herbir

kategori "Domain" olarak adlandırılmış olup her bir domain 2 ya da daha fazla alem içermektedir. Arke, Bakteri ve Ökaryotlara bağlı farklı alemler bulunduğu için daha esnek ve daha açıklayıcı olmalarından dolayı en üst hiyerarşi seviyesini adlandırmak amacıyla en yüksek taksona Domain adının verilmesi önerilmiştir (Woese ve ark. 1990, Woese ve Fox, 1977).



Şekil 1.1: Ribozomal küçük alt birimde bulunan 16S ve 18S rRNA dizilerine göre oluşturulmuş filogenetik ağaç (Woese 1999).

Bu filogenetik ağaç sadece tek tip bir molekülün sekans analizleri sonucunda ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte günümüzde gen ailelerinin filogenetik çalışmaları sonucunda bu grupların kökeninin bakteriler olduğu anlaşılmıştır (Brown ve Doolittle, 1995).

1.2. Arkelerin Sınıflandırmadaki Yeri ve Özellikleri

1977'de Carl Woese ve George Fox, prokaryotları 16S rRNA dizilerine göre sınıflandırdıkları filogenetik ağaçdaki diğer bakterilerden ayrı kümelenmelerinden dolayı arkeleri tanımlamışlardır. Bu iki canlı grubu başlangıçta birer âlem veya alt âlem olarak görülmüş, Arkebakteriler ve Öbakteriler olarak adlandırılmışlardır. Woese bu grupların canlıların temel düzeyde birbirinden farklı birer kolu sayılması gerektiğini savunmuştur. Daha sonra bu kavramı daha belirginleştirmek için grupları arkeler ve bakteriler olarak yeniden adlandırmış ve bunların, ökaryotlar ile beraber canlıların üç domaini oluşturduğunu öne sürmüştür.

Arke domaini *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* ve *Korarchaeota* olmak üzere üç filumdan oluşmaktadır. *Crenarchaeota* alemi içerisinde *Thermoproteus*, *Pyrolobus* ve *Pyrodictum* gibi hiper termofilik cinsleri içerirken, *Euryarchaeota* filumu içerisinde *Methanococcus*, *Methanobacterium* gibi metanojenik ve *Halobacterium*, *Haloferax* gibi ekstrem halofiller ve *Thermoplasma* cinsine ait termofilik arkealar yer almaktadır. *Korarchaeota* filumu içerisinde ise henüz kültüre alınamayan ancak izolasyon, üretim ortamı ve kültür şartları ve metabolik özelliklerinin benzerliklerinden dolayı hipertermofilik olabilecekleri düşünülen üyeleri bulundurur (Woese ve Wolfe 1985, Madigan ve ark. 2000, Wolfgang ve Klenk 2001).

Euryarchaeota filumunda sadece *Halobacteriales* ordosu ve *Halobacteriaceae* familyası bulunmaktadır (Grant ve ark. 2001). *Halobacteriales*, *Euryarchaeota* filumu içerisinde *Methanomicrobiales/Methanosarcinales*'e (metanojenlere) yakın bir dallanma göstermektedir (Oren 2001, Woese 1999).

Halofilik arkelerin prokaryotik, ancak bakteri sınıflamasına girmeyen canlılar olduğu belirtilmiştir (Shand ve Perez 1999). Arkeler, prokaryotlara dahil ve halofilik, metalojen ve sülfotermofilik organizmaları içeren bakteri ve ökaryotlardan farklı bir gruptur. Bakteri ve ökaryotlarla benzer karakterler ve moleküler mekanizmalar göstermekle birlikte gliserolipit yapıları bakımından farklıdırlar. Fizyolojik özelliklerinin çoğu evrimsel tarihte dünya sıcak ve anaerobikken ortaya çıktığını göstermektedir.

Moleküler biyolojide temel rolü olan genetik transkripsiyon ve translasyon mekanizmaları bakterilere pek benzemeyip, çoğu bakımdan ökaryotlara benzemektedir. Örneğin arke translasyonu ökaryotik-benzeri başlatma (*initiation*) ve uzatma (elongasyon) faktörleri kullanır. Transkripsiyonda ökaryotlardaki gibi TATA-bağlanma proteinleri ve TFIIB rol oynar. Çoğu arke tRNA ve rRNA genlerinde arkelere özgü intronlar bulunur ki bunlar ne ökaryotik intronlara, ne de bakteriyal intronlara benzer (Lake 1988, Giovannoni ve Stigl 2005). Onları farklı kılan çeşitli başka özellikler de vardır. Bakteri ve ökaryotlarda olduğu gibi arkeler de gliserollü fosfolipitlere sahiptirler. Ancak arke lipitlerinin üç özelliği değişiktir (Howland, 2000).

Arke lipitlerindeki gliserolün stereokimyası bakteri ve ökaryotlardakinin tersidir. Bu, farklı bir biyosentetik yol olduğuna işarettir. Çoğu bakteri ve ökaryotun hücre zarları gliserol-lipit esterlerinden oluşur, oysa arkelerin zarları gliserol-lipit eterlerinden oluşur. Bakterilerde eter bağlantılı lipitler olsa dahi bunlardaki gliserol stereokimyası bakteriyel biçimdedir. Arke lipitleri izoprenoid yan zincirlerden kurulmuştur. Bu beş karbonlu bileşik bakteri ve ökaryotlardaki bazı vitaminlerde yer almasına rağmen, yalnızca arkeler onu lipitlerinin inşasında kullanırlar. Çoğunlukla bu lipitler 20 karbonlu (4 monomerden oluşmuş) veya 40 karbonlu (8 monomer) olurlar. Kırk karbonlu lipitlerin uzunluğu hücre zarının kalınlığı kadar olduğu için bazı arkeaların hücre zarında bu lipit zincirinin iki ucunda gliserol fosfat grupları bağlıdır, zar başka canlı türlerinde olduğu gibi iki lipit tabakasından değil, tek bir tabakadan oluşur. Tek tabakalı zar özellikle termofilik arkelerde yaygındır (Howland, 2000). Arke hücre duvarları da bakteri ve ökaryotlarda ender görülen özelliklere sahiptir. Örneğin, çoğu arkenin hücre duvarı S-tabakası olarak adlandırılan yüzey proteinlerinden oluşur. S-tabakası bakterilerde de görülür, bazı canlılarda hücre duvarının tek bileşenidir (örneğin *Planctomyces*) veya peptidoglikanlı canlılarda bir dış tabaka oluşturur. Metanojenlerin bir grubu haricinde arkelerde peptidoglikan duvar yoktur. Metanojenlerde olan peptidoglikan dahi bakterilerdekinden çok farklıdır.

Arke hücrelerin çapları 0.1 μm ile 15 μm 'nin üstü arasında değişir. Bazıları öbikleşir veya 200 μm 'ye varan iplikçikler oluşturabilir. Çok çeşitli şekillere sahip olabilirler, küresel, çubuk, spiral, yumrulu, yassı kare şekilli veya dikdörtgen

olabilirler. Çizelge 1.1’de Bakteri, arke ve ökaryotlar arasındaki bazı karakteristik farklılıklar özetlenmiştir (Madigan ve ark. 2000, Woese 1999).

Çizelge 1.1. Bakteri, Arke ve Ökaryotlar arasındaki farklılıklar

ÖZELLİKLER	BAKTERİLER	ARKELER	ÖKARYOTLAR
Moleküler Özellikler			
Halkasal kromozom yapısı	+	+	-
Plazmid bulunuşu	+	+	Nadir
Ribozom sedimentasyon sabiti	70 S	70 S	80 S
Ribozomal RNA sedimentasyon sabitleri	16S, 23S, 5S	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5.85S, 5S
RNA polimeraz sayısı	1adet (4 alt birim)	Birkaç adet (Herbiri 8-12 alt birim)	3 adet (Herbiri 12-14 alt birim)
Trinskripsiyon faktörü (EF-2) gerekliliği	-	+	+
Promotör yapıları	TATAAT (Pribnow) kutusu (-10 ve -35 sekansları)	TATA kutusu (-38 ve -25 sekansları)	TATA kutusu (-30 ve -25 sekansları)
Metabolik Özellikler			
Azot fiksasyonu	+	+	-
Denitrifikasyon	+	+	-
Metan oluşturma	-	+	-
Klorofille fotosentez	+	-	+
Kemolitotrofik metabolizma	+	+	-
Sitolojik Özellikler			
Prokaryotik hücre yapısı	+	+	-
Histon proteinleri	-		+ ³
Başlangıç amino asiti	<i>N</i> -formilmetiyonin	Metiyonin	Metiyonin
5'CAP ve poli-A uzantısı	-	-	+

1.2.1. Arkelerin Yaşam Yerleri

Çoğu arke ekstremofildir. Bazısı yüksek sıcaklıklarda, geyzerlerde veya deniz dibi sıcak su kaynaklarında oluşu gibi, çoğu zaman 100 °C'nin üstünde yaşarlar. Diğerleri çok soğuk ortamlarda, veya aşırı tuzlu, asit veya alkali ortamlarda bulunurlar. Buna karşın başka arkeler ılıman şartlarda yaşarlar (mezofil), bataklık, deniz suyu, toprak ve atık sularda bulunmuşlardır. Çoğu metanojenik bakteri geviş getiren hayvanların, insanların ve termitlerin sindirim sisteminde bulunur. Arkeler genelde diğer organizmalar için zararsızdır ve hastalık etmeni olarak bilineni yoktur. Arkeler tercih ettikleri habitatlarına göre üç gruba ayrılırlar. Bunlar tuzsevenler (halofiller), metanojenler ve ısısevenlerdir (termofiller). Halofiller aşırı tuzlu ortamlarda yaşar. Metanojenler anaerobik ortamda yaşarlar ve metan üretirler. Bunlar tortu tabakalarında ve hayvanların bağırsaklarında bulunurlar. Termofiller sıcak su kaynakları gibi yüksek sıcaklıklı yerlerde yaşarlar. Bu gruplar mutlaka moleküler genetik yöntemlerle belirlenmiş filojenilere uymayabilirler, tüm arkeleri kapsamayabilirler ve birbirlerini dışlamayabilirler. Yine de, daha ayrıntılı çalışmalara başlangıç olarak faydalı sayılırlar. Bu organizmaların biyolojik analizleri göstermiştir ki yayılışları ve ekolojik çeşitlilikleri sanıldığından daha fazladır (Oren 2002).



Şekil 1.2. Halofillerin doğal yaşam ortamı olan tuz göllerinin kuşbakışı ve uydu görüntüleri . Kırmızı renkli alanlar halofillerin bulunduğu yerleri göstermektedir.

1.3. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofiller, gelişmek için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna gereksinim duyan ve bu tipteki tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmiş olan, hem prokaryotik hemde eukaryotik temsilcileri bulunan geniş bir gruptur. Kushner 1985 de halofilleri gelişebilmek için ihtiyaç duydukları optimal NaCl miktarına göre sınıflandırmıştır.

- a) Halofilik olmayanlar, gelişebilmek için %1 in altında NaCl ye ihtiyaç duyanlardır
- b) Az halofiller, %1-3 arasında ihtiyaç duyanlar
- c) Orta derecede halofiller, %3-5 arasında NaCl ihtiyaç duyanlar
- d) Aşırı halofiller, gelişebilmek için %15 den daha fazla NaCl'ye ihtiyaç duyarlar (Mutlu 2006, Kushner, 1985)

Aşırı derecede halofiller (ekstrem halofiller) arasında arke, ökaryot ve bakteri olarak bilinen 3 domainin de temsilcileri bulunmaktadır.

Pratik olarak halofilik bir mikroorganizma 100g/l'den daha yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterebilen organizma olarak tanımlanabilir.

1.3.1. Halofilik Arke

Halofilik arkelerin taksonomik sıralaması aşağıdaki gibidir (Brenner ve ark. 2001, Grant ve ark.. 2001):

Domain	Archaea
Filum II	Euryarchaeota
Sınıf III	Halobacteria
Ordo I	Halobacteriales
Familya I	Halobacteriaceae

Arke domaini içindeki halofilik organizmalar Halobacteriaceae, Methanospirillaceae ve Methanosarcinaceae olmak üzere 3 familyada bulunurlar:

Methanospirillaceae ve Methanosarcinaceae tuzlu ve aşırı tuzlu şartlara uyum sağlamış organizmaları olduğu kadar halofilik olmayan organizmaları da içermektedirler. Bunlardan bazıları 300 gr/lt tuz konsantrasyonlarında dahi gelişebilmektedirler. Halobacteriales takımı içindeki tek familya Halobacteriaceae tamamıyla halofillerden oluşmuştur. Tüm mikroorganizmalar içinde en çok tuza ihtiyaç duyan ve tuza en toleranslı olanlar bu familya içinde yer almaktadır.

1.3.2. Halobacteriales Takımı

Halobacteriales takımı nitrat varlığında veya yokluğunda fakültatif anaerob ya da aeroburlar. Bazı strainler arjinin varlığında fermentasyon yaparlar. Bu mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli olan minimum tuz konsantrasyonu 1.5 M NaCl'dir. Çoğu straini 3.5-4.5 M NaCl'de daha iyi gelişebilmektedir. Bir çok türün kolonileri C₅₀ karetenoidlerinin varlığından dolayı farklı kırmızı tonlarına sahiptir.

Büyümeleri için gerekli optimum sıcaklık 35-50 °C'dir. Kemoorganotroftirler, karbonhidrat veya aminoasitleri karbon kaynağı olarak kullanırlar. Doğada tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu çevrelerde, tuz ve soda gölleri gibi yerlerde bulunurlar. Aynı zamanda toprak altındaki tuz madenlerinde de bulunabilirler (Bone ve ark, 2001).

1.3.3. Haloferax Cinsi

Haloferax türlerinin hücreleri basil, disk veya kupa şeklindedir. Hücre boyutu 1-3 x 2-3 µm'dir. Hareketsiz veya hareketlidirler. Koloniler mukoid görünümlüdür. Anaerob koşullar altında nitrat indirgenebilir. Optimum tuz konsantrasyonu 2.5 M NaCl olmasına rağmen 1.5-4.5 M NaCl içeren ortamlarda da gelişirler. Gelişmeleri için sıcaklık aralığı 30-55 °C, olup optimum gelişme sıcaklığı 35 °C'dir. Gelişmeleri için pH aralığı 5-8 arasındadır. Optimum pH ise 7'dir. Bu organizmaların gelişmeleri için Mg⁺² ihtiyacı 0.01-0.04 M'dir (Boone, 2001).

Bir çok substratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığından kemoorganotroftur ve şekerlerden asit oluştururlar (Boone, 2001). Tüm örnekler penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli, anisamisin, basitrasin, novobiosin ve vibrostat ayıraçlarına karşı duyarlıdır. Diğer organizmalar gibi *Haloferax* türleride , Ölü deniz'den, Akdeniz tuzlarından izole edilmiştir (Rodriguez-Valera 1985).

1.3.4. *Haloferax alexandrinus*

Haloferax alexandrinus ilk kez Asker ve Ohta tarafından (2002a) Mısır'ın İskenderiye (Alexandria) şehrindeki tuzlalardan izole edilmiştir. Ülkemiz'de de Tuz Gölü'nde bu türün tesbit edildiği bildirilmiştir (Mutlu 2008).

Bu türün standart büyüme ortamında gelişen kolonileri dairesel, konveks, düz ve kırmızı renklidir. Hücreler gram boyama olarak negatif boyanmaktadır ve pleomorfik (düzensiz kok, kısa ve uzun basil, kare, üçgen ve oval) şekilli olabilmektedir. Zorunlu bir aerobtur. Nitrat veya DMSO gibi alternatif elektron alıcılarını kullanarak veya L-arginini fermente ederek anaerobik olarak gelişim göstermezler. Bununla birlikte nitrat ve nitritin gaz üretimi saptanmaksızın aerobik olarak indirgedikleri bilinmektedir (Asker ve Ohta 2002).

Ekstrem olarak halofilik yapıdadırlar. Optimum gelişim 250 gr/lt tuz konsantrasyonlarında gelişme meydana gelmektedir ve magnezyum sülfata yüksek derecede bağımlıdır (40 gr/lt). Magnezyum sülfatın 409 gr/lt'ye kadar yükselen konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmektedirler. Hücreler suda parçalanır. 250 gr/lt tuz konsantrasyonunda gelişim sıcaklık aralığı 20-55 °C arasındadır. pH aralığı 5.5-7.5 olup optimum olarak pH 7.2 de gelişim göstermektedir. Hücreler aerobik olarak amonyum kloriti ve glikoz, gliserol veya süksinat gibi basit bir karbon kaynağını içeren ortamda gelişmektedirler. Gelişim şekerlerin veya gliserollerin varlığında gerçekleşiyorsa tamponlanmayan ortamda asidifikasyon yani asitlenme meydana gelir. Tween 80 ve jelatin hidrolize edilmekte ve tiosülfattan sülfite üretebilmektedirler. Katalaz ve oksidaz pozitif , arginin, dihidroksilaz ve üreaz negatiftir. β -galaktozidaz ve fosfataz pozitifdir. Lizin de karboksilaz ve ornitindekarboksilaz negatiftir. Bu suş aminoasitler ve

yeast extract gibi çeşitli kompleks karbon ve azot kaynaklarını kullanabilmektedir. Pepton, kazain ve nişastayı kullanamamaktadır. (Asker ve Ohta, 2002a)

1.4. Arkelerin Biyoteknolojik Önemleri

Son zamanlarda arke üyelerinin biyoteknolojik potansiyelleri pek çok endüstriyel işlemlerde rol alabilmelerine olanak sağlayan bazı ortak özellikleri nedeniyle artmaktadır. Aşırı derecede halofilik arkeler, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan bir çok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunlar gibi kendilerine özgü olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmelerine yol açmaktadır. Örneğin gelişim ortamlarındaki yüksek tuz konsantrasyonları nedeniyle sterilizasyon prosedürlerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu durum diğer organizmalarla kontaminasyonu önlemektedir. Bununla birlikte saf suda kolaylıkla kendiliğinden parçalanabilmeleri nedeniyle hücre parçalayıcı işlemlere gerek duyulmamaktadır (Asker ve Ohta, 2002a, Asker 2002b, Litchfield 2002).

Potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahip olan kırmızı halofilik arkelerin, tuzla-kristalizasyon göllerinde solar ısınmayı ve evaporasyonu arttırarak tuz üretiminin arttırılmasında kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür (Jones ve ark. 1981, Grant ve ark. 1998, Litchfield 2002). Bakteriyorodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması ve ultrahızda ışık saptanması gibi alanlarda da potansiyel olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kushner 1985, Hough ve Danson 1989, Margesin ve Schinner 2001).

Ayrıca *Haloferax* ve *Haloarcula* cinslerine ait bazı türlerin, ürettikleri ekzopolisakkarit yoluyla vizkozite stabilizasyonunda, jelleştirme ajanı, emülsifiyer olarak ve petrolün mikrobiyolojik geri kazanımını arttırmak için kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Ventosa ve Nieto 1995, Parolis ve ark 1996, Margesin ve Schinner 2001). Bazı halofilik arkelerin poli- β -hidroksi alkonat

(PHA) ürettikleri belirtilmiştir (Lillo ve Rodriguez-Valera 1990, Hezayen ve ark. 2000). Yağsız katkı maddesi olarak gliserol dieter lipidlerin besin katkı maddesi olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Post ve Collins 1982). İlaç ve kozmetiklerin yapısında kullanılan lipozomlar'ın yapımında halofilik arkelerin esterazlara karşı yüksek bir kimyasal stabiliteye sahip olan eter bağı lipidleri kullanılmaktadır. Amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi yüksek tuzlulukta işlevsel olan ekzoenzimleri, yüksek tuz konsantrasyonunda makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Chaga ve ark.. 1993, Ventosa ve Nieto 1995, Margesin ve Schinner 2001).

Düşük su aktivitesine adapte olan halofilik enzimlerin, endüstriyel organik sentezlerdeki yüksek özgülükleri, stereoözgülükleri ve etkinliklerinden dolayı önemleri artmaktadır (Hough ve Danson 1989, Danson ve Hough 1997, Sellek ve Chaudhuri 1999). Diğer yandan hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip halofilik arkeler petrol kazalarında dökülen petrolün bioremediasyonunda kullanılabilirler (Bertrand ve ark. 1990, Emerson ve ark. 1994). İnsektisit, lindan, DDT veya triklorofenoller gibi halojenli organik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında üreyebilen halofilik arkelerin patentli proseslerde de kullanıldığı belirtilmiştir (Margesin ve Schinner 2001).

H. salinarum NRC-1 suşunun, lipid içermeyen protein yapısında zara sahip olan ve suya geçirgen olmayıp gazlara geçirgen olan, yüksek oranda stabilite gösteren ve proteolitik yıkıma dayanıklı non-toksik gaz keseciklerinin epitop düzenlenmesi amacıyla yeni bir sistem olarak geliştirilmesi düşünülmüştür (Stuart ve ark. 2001). Halosinlerin, tuzlanmış yiyeceklerin veya derilerin tabaklanması esnasında meydana gelebilen bakteriyel bozunumun kontrolü amacıyla kullanılacakları ve bunlardan HalH7 halosininin halobakterilerdeki gibi memelilerde de benzer etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Litchfield 2002). *H. salinarum*'daki 84 kD luk bir protein, kanser hastalarının serumlarındaki insan c-myc onkogen ürününe karşı antikor elde etmek için bir antijen olarak kullanılmış ve bu proteinin bazı kanser tiplerinin saptanmasında kullanılabilceği belirtilmiştir (Rodriguez-Valera 1992).

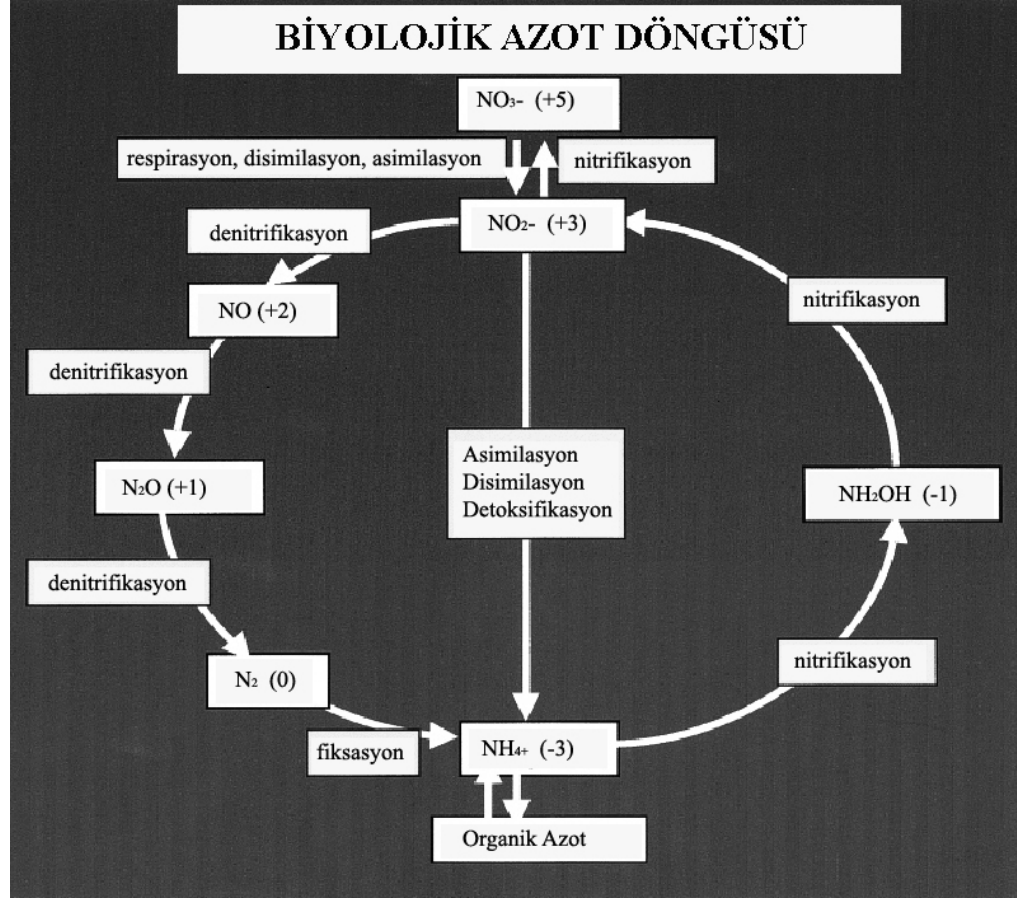
Nitratın redüksiyonu yer altı sularının kirlenmesini ve süzülmeyle önlemede merkezi rol oynar. Nitratın diyetle yüksek alınımı karsinojenik N-nitrozamin bileşiklerinin oluşumu ile kansere neden olur. Besin kaynaklı patojenler (*E. coli*,

Salmonella gibi) anaerobik koşullar altında nitrata kullanırlar. Bu yüzden besin anaerobik olarak paketlenmiş olsa bile bu tür patojenlerin insan vücuduna girme ihtimali vardır. Bu nedenle nitrat ve nitritin nasıl kullanıldığı sadece çevresel anlamda dikkate değer olmayıp insan sağlığı ile de yakından ilişkilidir. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin nitrat metabolizması ve nitrat redüktaz enzimlerinin karakterizasyonunun ortaya konması gerekmektedir. Nitrat redükleyici bakterilerin yer altı suları, içme ve kullanma suları gibi çeşitli su kaynaklarındaki nitrat oranının düşürülmesinde kullanılabilir. Asimile edici nitrat redüktaz enziminin karakterizasyonu gelecekteki bu ve benzeri çalışmalar için bir ön basamak olacaktır. Bu çalışmada Woese tarafından önerilen isimlendirme kullanılarak arke domainine dahil olan bir organizma olan *Haloferax alexandrinus* ile çalışılmıştır.

1.5. Nitrat Asimilasyonunun Biyolojik Azot Döngüsü'ndeki Yeri

Azot nükleik asit ve proteinler gibi makromoleküllerin yapısına katılan temel bir element olması nedeniyle yaşamsal öneme sahiptir (Moreno-Vivian ve ark., 1999). Yapay gübreleme bir yana bırakılacak olursa tek azot kaynağı atmosferdir. Atmosferde %79 oranında azot vardır. Bu haliyle atmosfer ekosistem için önemli bir azot kaynağı olarak düşünülebilir. Bununla beraber havadaki azottan doğrudan yararlanabilen çok az canlı organizma vardır Bazı bakteriler ve mavi yeşil algler atmosferdeki azotu tesbit ederler. Azot biyosferde farklı oksidasyon basamaklarında olabilir. Farklı azot türleri arasındaki dönüşümler prokaryot ve ökaryotların katıldığı reaksiyonlarla bu elementin biyokimyasal döngüsünü oluşturur ve bu döngüde bakteriler önemli bir rol üstlenmiştir. Nitrata indirgenmesi bu döngüde özellikle önem taşımaktadır. Tarımda yüksek düzeyde gübreleme uygulanması toprakta ve yer altı sularında yüksek düzeyde nitrat birikimine neden olmakta ve bu durum halk sağlığı üzerinde olumsuz etkiler bırakmaktadır. Metahemoglomeni, mide kanseri ve gangstointestinal sistemde bulunan bakteriler tarafından yüksek düzeyde endojen nitroz bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır.

Yaşayan organizmalar için azot hayati öneme sahip bir element olduğundan uygun azot kaynağına erişilebilirlik doğal çevrede ve tarımda üretimi sınırlandırmaktadır. Azot çeşitli +5 (nitrat) den -3 (amonyak) e kadar farklı yükseltgenme basamaklarında bulunabilir. Fakat biyolojik bileşiklerde tam olarak indirgenmiş seviyededir. Global biojeokimyasal azot döngüsünde küçük miktardaki fiske olmuş veya bileşik oluşturmuş azot atmosferik azotla sürekli bir değişim içerisinde. Azot döngüsü hem yükseltgeyici hem indirgeyici işlemleri içerir ve bu işlemlerde prokaryotlar baskın rol oynar (Şekil 1.3). Azot fiksasyonu ve nitrat asimilasyonu gibi asimile edici ara yollar hücrel materyale dönüştürülebilen glutamin sentetaz ve glutamat sentaz yoluyla sentezlenen amonyağı üretirler. Bununla birlikte azot fiksasyonu sadece serbest yaşayan ve simbiyotik diazotofik prokaryotlar tarafından yürütülürken asimile edici nitrat redüksiyonu bakteri, fungus, alg ve yüksek bitkiler tarafından gerçekleştirilir. Hemen hemen tüm yaşayan organizmalar amonyağı karbon iskelete dönüştürebilmektedirler. Diğer yandan bazı prokaryotlar metabolik enerjiyi azotlu bileşikleri içeren nitrifikasyon ve denitrifikasyon gibi redoks işlemleri ile elde ederler. Ototrofik nitrifikasyon amonyağın hidrosilamin yoluyla nitrite oksidatif çevirimini içeren 2 basamaklı bir işlemdir ve amonyak okside edici bakteriler tarafından gerçekleştirilir. Nitritin nitrate yükseltgenmesi ise nitrit okside edici kemolitoototrofik bakterilerce gerçekleştirilir. Denitrifikasyon nitratın nitrit, NO, N₂O ve N₂'ye başarıyla indirgenmesi bir solunum işlemidir. Yoğunlukla anaerobik koşullarda ve pek çok fakültatif bakteride gerçekleşir. Bazı heterotrofik bakteriler nitrifikasyon ve aerobik denitrifikasyonu amonyağı daha sonra N₂'ye indirgenen nitrite yükseltgemek yoluyla birleştirirler. Amonifikasyon nitratın amonyağına disimile edici indirgenmesidir. Son olarak anaerobik amonyak oksidasyonu nitritin indirgenerek ve amonyak yükseltgenerek N₂'nin üretildiği bir reaksiyondur. Bu işlem deniz ortamlarında ekolojik öneme sahiptir ve plaktomisetesin bakteriyal komüniteleri tarafından gerçekleştirilir.



Şekil 1.3. Biyolojik Azot Döngüsü (Richardson 2001)

Bakteriler tüm azot döngüsü ara yollarında yer alırlar ve inorganik azot metabolizmaları biyokimyasal ve genetik kısmı yaygın olarak çalışılmıştır. Bakteri ve ökaryotlardan farklı olarak arkeler 2 büyük alt bölüme ayrılırlar. Crenarchaeota ağırlıklı olarak hipertermofilleri ve anaerobik olanları içerir ve Euryarchaeota ise metanojen ve ekstrem halofilleri içerir. Genelde arkeal replikasyon, transkripsiyon ve translasyon bakterial işlemlere göre ökaryotlarınkiyle daha ilişkilidir. Fakat arkeal merkezi metabolizma bileşenleri bakterial proteinlerle daha yakından ilişkilidir. Amonyak asimilasyonuna ek olarak arke üyeleri azot döngüsünün tüm redükleyici arayollarını yani nitrat solunumu ve denitrifikasyon gibi disimile edici veya azot fiksasyonu ve nitrat asimilasyonu gibi asimile edici arayollarını yürütürler. Çünkü arke ekstrem çevrelerdeki baskın mikrobiyal popülasyondur. Yüksek tuzlu sular ve sıcak su kaynakları gibi ekstrem çevrelerde baskın türdür ve bu ekstrem çevrelerde bu azot döngüsünü ayakta tutarlar.

Bunun yanı sıra özellikle nitrat redüksiyonu ile ilgili olarak arkedeki inorganik azot metabolizması hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Arke genom sekans projeleri yeni bilgiler ortaya koysada arkedeki inorganik azot metabolizması hala araştırmaya açık bir konudur.

1.6. Nitrat Metabolizmasının Önemi

Bakterilerde nitrat redüksiyonu ile ilgili genetik çalışmalar beklenmeyen şekilde biojeokimyasal azot döngüsünde önemli rol oynayan bu işlemlerin karmaşıklığını ortaya koymuştur. Prokaryotik nitrat redüksiyonu 3 farklı amaçla gerçekleşmektedir:

Azotun gelişim için kullanılması nitrat asimilasyonu, metabolik enerjinin üretilmesi (nitrat solunumu) ve redoks dengesinin sağlanması amacıyla fazla redükleyici gücün ortadan kaldırılması (nitrat disimilasyonu).

Prokaryotlarda nitratın nitrite iki elektron indirgenmesini katalizleyen 3 tip nitrat redüktaz mevcuttur. Bunlar, Sitoplazmik sentezleyisi Nas, membran bağımlı solunumsal redüktaz Nar ve periplazmik yıkımlıyıcı Nap nitrat redüktazlardır. Tüm bunlar aktif merkezlerinde bir molubdenum kofaktöre sahiptirler.

Nas, sitoplazmik bölgelerde yer alır ve azot sentezinde görev yapar.

Nar, membranın sitoplazmik yüzeyine bağlı genellikle 3 alt üniteden oluşan ve anaerobik nitrat solunumunda görev yapan bir enzimdir.

Nap ise 2 alt üniteden oluşmaktadır. Periplazmik bölgede yer alır ve aktivitesi membran bağımlı tetrahem sitokrom yoluyla Quinon oksidasyonuna bağlıdır.

Nas, Nar ve Nap sistemleri farklı fizyolojik fonksiyonları yerine getirir görünsede organizmalar arasında bazı farklılıklar mevcuttur. Bu enzimler farklı metabolik koşullar altında belirli roller üstlenir. Solunumsal, yapıcı ve yıkıcı ara yollar bazı durumlarda bağlantılı olabilir. Nitratın indirgenmesinden oluşan nitrit farklı tipte nitrit redüktazlar tarafından amonyağa veya nitrik oksite indirgenebilir. Nitrat asimile edici bakterilerin sitoplazmasında NADH veya ferrodoksin bağımlı asimile edici nitrit redüktazlar tarafından amonyak üretilir.

Bir besin maddesi olarak görev almasının yanı sıra nitrat anaerobik solunum için etkili bir elektron alıcısıdır. *Haloferax mediterranei*, *H. denitrificans* ve *H. volcanii* nitratı azota indirgeyebilmektedirler (Bonete ve ark. 2004). Çeşitli halofilik disimile edici nitrat redüktazlar tanımlanmıştır. *H. mediterranei* aynı zamanda aerobik gelişimleri süresince nitratı ve nitriti tek azot kaynağı olarak kullanabilir. Nitrat asimile edici nitrat ve nitrit redüktazlar tarafından nitrite ve amonyuma dönüştürülmektedir.

1.7. Hücrelerde Nitratın Nitrit ve Amonyaga Dönüştürülmesi

Azotun asimilatif indirgenmesinde ilk basamak azotlu bileşiklerin hücre içine alınmasıdır. Temel olarak NO₃ hücrelere basit difüzyon ile giriş yapar. Fakat bazı siyanobakteriler NO₃'e karşı geçirgen değildir. Bazı siyanobakteriler NO₃'den yararlanabilmek için ATP enerjisini kullanmak zorundadır. Bu durum NO₃'ün aktif taşınımının varlığını öne sürmüştür. 1989 yılında nitrat redüktaz enziminin NO₃ taşıyıcısı yaptığına dair bir model ortaya konulmuştur. Bu model daha sonra membran bağımlı *Chlorella sorokiniana*'nın nitrat redüktazının chlorella anti nitrat redüktazı immungloblin G fragmenti ile inhibe olması ve hücreye NO₃ girişinin engellenmesi ile desteklenmiştir. Synechococcus ile yapılan daha sonraki çalışmalar hücreye NO₃ girişinde rol alan membran bağımlı 45 kDa lık bir proteinin varlığını göstermiştir. Bu taşıyıcı proteinler ATP kullanılarak besinlerin ve çözünebilen diğer maddelerin taşınımını sağlamaktadır. (Rodriguez ve ark, 1992)

Hücreye NO₂ girişi ise aktif ve pasif taşıma olmak üzere 2 şekilde gerçekleşir. Pasif taşımada NO₂ hücreye nitrozoksit formunda girer. Bu taşınım alkalın pH larda gerçekleşir. (Flores ve ark., 1987).

H. mediterranei de nitratın amonyağa asimilatif indirgenmesi gelişim için nitratı kullanan diğer organizmalarda olduğu gibi 2 basamakta gerçekleşir.

1. Nitratın nitrite indirgenmesi: 2 elektronun hareketi ile gerçekleşen reaksiyon nitrat redüktazın katalizi ile meydana gelir.(NAS)



Bu reaksiyonu katalizleyen 4 farklı nitrat redüktaz vardır (Solomonson ve Barber 1990, Moreno-Vivian ve ark. 1999). Bunlar ökaryotlardaki asimilatif nitrat redüktazlar ve 3 farklı bakteriyal enzimdir:

NAS: Azot asimilasyonunda görev alan ve sitoplazmada yer alan enzimlerdir. NH_4^+ tarafından inhibe olurlar (Moreno-Vivian ve ark. 1999).

NAR: Membran bağlı solunumsal nitrat redüktazlardır. 3 kompleks alt üniteden oluşurlar ve merkezi bölgeleri sitoplazmada yer alır. (Zumft, 1997; Blasco ve ark. 2001).

NAP: Periplazmada yer alan non-asimilatif enzimlerdir. sitoplazmik membrana bağlı sitokrom tetra hem tarafından Quinonun oksidasyonuna bağlı 2 alt üniteden oluşmaktadır (Berks ve ark. 1995)

Ökaryot nitrat redüktazları aktif merkezlerinde molübdenum kofaktör içerdiklerinden molibdo enzimler adını alırlar. Molübdenum C, N ve S nin redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.

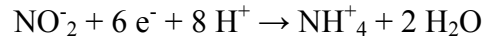
Ökaryot NAS'ı elektron vericisi olarak piridin nükleotidleri kullanan homodimerlerdir. Her monomer 100-200 kDa lık polipeptidlerden oluşur. 3 prostetik gruba sahiptir. Flavin adenin dinükleotid (FAD), sitokrom b557 ve molibdenum kofaktördür. Bu gruplar ökaryot türlerinde korunmuş olan 3 fonksiyonel domainde yer alır (Campbell ve Kinghorn., 1990). Bu enzimler fiziksel olarak bağımsız elektron transferinde rol alan 2 aktif merkeze sahiptir. İlk aktif merkezde NADPH veya NADH elektronları enzimin FAD grubuna verir. İkinci aktif merkezde ise redükte olan MoIV 2 elektronu NO_3^- e tranfer ederek onu NO_2^- ye indirger. (Campbell, 2001).

Bakteriyal NAS 2 farklı tipte olabilir. Bunlar Ferrodoksin (Fd) veya flavodoksin bağımlı ve NADPH bağımlı enzimlerdir. Siyanobakterilerdeki Fd-NAS 75-85 kDa lık monomerlerdir (Mikami ve Ida. 1984, Rubio ve ark 1996). *Azotobacter vinelandii* NAS'ı ise flavodoksin kullanan 105 kDa lık bir polipeptitdir (Gangesweran 1996). Diğer yandan *Klebsiella pnemoni* (Lin ve ark. 1994) ve *Rhodobacter capsulatus* (Blasco ve ark. 1997) NADPH-NAS'ı 45 kDa lık diaforaz aktivitesine ve 4Fe-4S merkezi ile Molibdenum kofaktör kompleksi içeren 95 kDa lık bir alt üniteden oluşan heterodimerlerdir.

Arkelerde, Martinez-Espinosa ve ark. (2001) *H. mediterranei* ile yapmış oldukları çalışma dışında purifiye edilmiş asimile edici nitrat redüktaz bulunmamaktadır. Sadece asimilatif olmayan *Haloferax volcanii* (Bickel-Sandkötter ve Ufer 1995), *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio ve ark., 1992), *Haloferax denitrificans* (Hochstein ve Lang 1991), *Halobacterium* sp. (Werber ve Mevarech 1978), *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu ve ark., 2000), *Pyrobaculum aerophilum* (Volkl ve ark., 1993) ve *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk ve ark., 1997) ile nitrat redüktaz çalışmaları bulunmaktadır. *Haloferax denitrificans* (Hochstein ve Lang 1991) purifiye enzimi 60 ve 116 kDa lık alt ünitelerden oluşan bir dimerdir. *H. volcanii* (Bickel-Sandkötter ve Ufer 1995) nitrat redüktazı ise 100, 61 ve 31 kDa'dan oluşan 3 alt ünitelerden oluşmaktadır. *Haloarcula* enzimi 63 kDa'lık bir polipeptid zincirinden oluşan homotetromerdir. *H. mediterranei*'den saflaştırılan asimilatif olmayan nitrat redüktaz 170 kDa'lık moleküler ağırlığa sahiptir (Alvarez-Ossorio ve ark., 1992).

II. Nitritin Amonyaka indirgenmesi:

6 elektron hareketinin gerçekleştiği reaksiyon nitrit redüktaz tarafından gerçekleştirilir.



NH_4^+ , *Klebsiella oxytoca* da (Lin ve ark. 1994) NADH bağımlı asimilatif nitrit redüktaz tarafından, siyanobakteri (Luque ve ark. 1993) ve bitkilerde (Campbell ve Kinghorn 1990) ise ferrodoksin kullanan asimilatif nitrit redüktaz tarafından sitoplazmada üretilmektedir. Anaerob olarak gelişen denitrifiye organizmalarda NH_4 üretimi bir detoksikasyon işlemi gibi gerçekleşmektedir (Harborne ve ark. 1992). Bu amonyak asimile edilebilse de işlem NO_2 nin asimile edici olmayan indirgenmesi olarak adlandırılır (Stewart 1994). Tanımlanan tüm bu işlemlerde nitrit redüktaz tek bir polipeptid olsada 61-64 kDa lık ve 25-35 kDa'lık asimilatif heterodimerik asimilatif nitrit redüktazlarda tanımlanmıştır (Sengupta ve ark. 1996). Analiz edilmiş olan tüm sitoplazmik nitrit redüktazlar bir sirohemo molekülü ve 4Fe-4S merkezine sahiptir. Enzimler FAD'ın yanı sıra

NADH'a da bağımlıdır. Elektron verici olarak Ferrodoksin kullanan nitrit redüktazların yapısı ökaryot, siyanobakteri, deniz yosunları ve bitkiler de oldukça korunmuştur (Fernandez ve ark., 1998).

NO₃ asimilasyonu farklı azot kaynakları tarafından düzenlenmektedir (Tapia ve ark. 1995) Siyanobakterilerde (Guerrero ve ark. 1987) CO₂ fiksasyonu yoluyla, deniz mikroalglerinde (Viñegla ve ark. 2000) UV radyasyonu dozuyla ilişkilidir. Bu düzenlenme NO₃ taşınımı (Raju ve ark. 1996) ve nitrit-nitrat redüktazların hücresel düzeylerinin transkripsiyonel kontrolü ile gerçekleşir (Franco ve ark. 1984). NO₃'ü asimile eden tüm organizmalarda asimilasyonun NH₄ ile inhibe olduğu gözlenmiştir (Guerrero ve ark. 1981). Bu demektir ki NO₃ ve NH₄ ün varlığında NO₃ NH₄ tamamen kaybolmadan kullanılamaz. NH₄, NO₃'ün alınımını inhibe etmekle kalmayıp nitrat ve nitrit redüktazların sentezinide baskılamaktadır (Guerrero ve ark. 1987).

1.8. Halofilik Asimile Edici Nitrat Redüktazların Biyokimyasal Özellikleri

Nitrat asimilasyonu biyokimyasal düzeyde Martinez Espinosa ve ark tarafından çalışılmıştır. Bakterilerde nitrat redüktazların 3 alt grubu bulunmuştur. Bu gruplar katalitik Bis molibdopterin guanidin di nükleotid alt ünitesine bağlanan elektron transfer kofaktörlerinin yapısı ve sayısı açısından ve her bir enzimin elektron vericilerinin (ferrodoksin veya flavodoksin bağımlı NAS ve NADPH bağımlı enzim) doğası açısından farklılık gösterir. *H. mediterranei* enzimi NADPH veya NADH'den elektron kullanmaz. Halofilik Nas ferrodoksini kullanma yeteneğindedir ve bu protein haloarkeadaki nitrat asimilasyonundaki elektron vericisi olabilir. Ferrodoksin haloarkeanın farklı türlerinden izole edilmiştir. Tüm nitrat redüktazlar gibi halofilik Nas indirgenmiş violojenleri elektron vericisi olarak kullanabilir. Metil violojen Nas için invitroda en iyi elektron vericisidir. *Haloferax mediterranei* de Nas siyanür ve azid tarafından inhibe edilir. Ancak klorat ve sülfitten etkilenmez. *H. mediterranei* 'nin nitrat redüktaz enziminin aktivitesinin hipersalin koşullarda arttığı gözlenmiştir. Ancak yapısal stabilitesi için yüksek tuz konsantrasyonları gerekli değildir. Artan tuz konsantrasyonu aktivite için gerekli olan optimum sıcaklığı üst seviyeye çeker.

H. mediterranei 'nin asimile edici enzimi nitrat için 0.95 mM Km ye sahiptir ve 3.1 M tuz konsantrasyonunda 80 °C de optimum sıcaklığa sahiptir. 1.3 M tuz konsantrasyonunda ise 60 °C optimum sıcaklığa sahiptir. Aktivite bakteriyal NAS da olduğu gibi nitrat tarafından indüklenir ve amonyak tarafından baskılanır.

1.9. Halofilik Nitrat Asimilasyonunun Özellikleri

Halofilik asimile edici arayolda asimile edici nitrat redüktazlar katalizörlüğünde nitratın nitrite indirgenmesinden sonra asimile edici nitrit redüktaz nitritin amonyağa dönüşümünü katalizler. Amonyak ise glutamin sentetaz ve glutamat dehidrogenaz aktiviteleri yoluyla makro moleküllere dönüştürülür. Nitratın ve nitritin katalitik indirgenmesindeki redükleyici güç ferrodoksin tarafından sağlanmaktadır. Fotosentetik organizmalar, ökaryotlar (bitki ve algler) ve prokaryotlar (siyanobakteriler gibi) da ferrodoksin asimile edici nitrat arayolunda elektron vericisidir.

H. mediterranei aerobik olarak minimal ortamda farklı nitrat veya nitrit konsantrasyonlarında geliştirildiğinde asimile edici nitrat ve nitrit redüktazların her ikisinde indüklendiği görülmüştür. Bu enzimler kompleks (maksimal besi yeri) kültür ortamında indüklenmemektedir. 100 ve 25 mM KNO₃ arası konsantrasyonunda gelişim özellikleri aynıdır fakat 5 ve 0.5 mM gibi düşük konsantrasyonlarında gelişimi farklı olduğu gözlenmiştir.

5 mM konsantrasyonda kültür gelişebilmekte fakat hücreler arası ortama nitrit salınımı gerçekleşmemektedir. 0.5 mM KNO₃ konsantrasyonda ise *H. mediterranei* gelişmemektedir.

Nitrit pek çok organizma için toksiktir. Bununla birlikte *H. mediterranei* 2 mM kadar olan KNO₃ konsantrasyonunda gelişebilmektedir. 2 mM konsantrasyonunda veya üstünde ortamdaki nitritin kaybı nedeniyle gelişim sınırlanmaktadır.

1.10. Enzim Saflaştırma Yöntemleri

Saflaştırma işleminin ilk aşaması üretilen enzimin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Enzimler hücre içerisinde yada hücre dışında sentezlenebilirler. Eğer enzim sentezlendikten sonra hücre dışına salınan bir enzim ise hücreler santrifüj işlemi ile uzaklaştırılır ve saflaştırma işlemi sıvı fazda devam edilir.

Ancak saflaştırmak istenen enzim sentezlendikten sonra hücre içerisinde kalıyor ise bu durumda hücrenin parçalanması ve enzimin sıvı faza aktarılması sağlanır (Kazan, 1997). Nitrat redüktaz enzimi de sentezlendikten sonra hücre içerisinde kaldığı için nitrat redüktaz içeren hücrelerin parçalanması gerekmektedir (Martinez-Espinosa ve ark, 2001, Cabello ve ark 2004).

Bu amaç için farklı hücre tiplerine göre bir çok parçalama yöntemleri mevcuttur. Bu parçalama yöntemlerinden bazıları enzimler, homojenizatör, basınç ve ses dalgalarıdır (Kazan, 1997).

Nitrat redüktaz enzimi içeren halofilik arke hücreleri genellikle ultrasonik ses dalgaları ile parçalanır (Martinez-Espinosa ve ark, 2001., Gangeswaran ve ark., 2003) Titanyumdan yapılmış olan proba verilen mekanik enerji solüsyon içerisinde düzenli titreşimler oluşturur. Bu titreşimler süspansiyon içinde negatif ve pozitif basınçlar oluşturur. Bu basınç farklılıklarının oluşturduğu mikro hava kabarcıkları sıvının her yerinde çok hızlı bir şekilde hareket ederler ve bir süre sonrada patlarlar. İşte bu patlamalar yoğun bölgesel şok dalgaları ve sıvı akımlarının oluşmasına neden olur. Hava kabarcıklarının parçalanması sırasında ses enerjisinin mekanik parçalama enerjisine dönüşümü gerçekleşir ve ortamda bulunan hücreler parçalanır (Kazan, 1997).

Bu aşamadan sonra lizise olmuş hücre kısımları (membran, partiküller) uzaklaştırılır. Bu işlem için yüksek hızda santrifüjler ve filtrasyon kullanılır. Ancak santrifüjler daha iyi bir ayırma sağlar. Nitrat redüktaz ham ekstresini elde etmek için santrifüjde 90.000-110.000 g'de en az 1 saat döndürmek gereklidir. Bu yolla berrak bir ham ekstre elde edilir (Kazan, 1997, Martinez-Espinosa ve ark, 2001., Gangeswaran ve ark., 2003, Pino ve ark., 2006).

Bu aşamaya kadar yapılan işlemler protein yada enzimin açığa çıkarılması işlemidir. İleri safılıkta bir saflaştırma yapmak için kromatografik yöntemler kullanılır. Proteinlerin her biri protein büyüklüğü, şekli, toplam yükleri sahip olduğu hidrofobik gruplar gibi kendi karakteristik özelliklerine sahiptir. Bu özellikler göz önüne alınarak proteinlerin saflaştırılmasında değişik kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. İyon değiştirici kromatografisi proteinleri yüklerine göre ayırır. Jel filtrasyon kromatografisi proteinleri büyüklüklerine ve şekillerine göre ayırır. Affinite kromatografi ise, proteinleri kullanılan liganta bağlanabilme kapasitesine göre ayırır.

Nitrat redüktaz enziminin saflaştırılmasında daha çok jel filtrasyonu ve iyon değiştirici kromatografi kullanılmaktadır (Yoshimatsu ve ark. 2000, Martinez-Espinosa ve ark. 2001, Gangeswaran ve ark. 1993). Genelde nitrat redüktaz enziminin saflaştırılmasını ilk ve son basamaklarını jel filtrasyonu uygulaması oluşturur. Burada amaç dekstran esaslı materyaller kullanarak makromoleküllerin molekül büyüklükleri esasına göre bir ayırımını sağlamaktır. Yöntemin prensibi oldukça basittir. Kolon küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip inert jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde gözeneklerden büyük moleküller sadece tanecikler arası boşluklardan geçerek kolondan hızla ilerler. Gözenek boyutlarından küçük moleküller gözenek içerisine difüzyonla girer ve molekül küçüldükçe artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar. İyon değiştirmede kullanılan iyonejik gruplar ya pozitif yüklü (anyon değiştirici) ya da negatif yüklü (katyon değiştirici) olurlar. Nitrat redüktaz negatif yüklü olduğu için protein saflaştırılmasında anyon değiştirici olarak genellikle dietilaminoetil (DEAE) grubu kullanılır. Elüsyon işlemi sırasında en çok tuz solüsyonları kullanılır. Genellikle KCl veya NaCl den oluşan lineer bir gradient oluşturulur. Tuz iyonları proteinle yer değiştirerek onun tekrar bağlanmasını engellerler. Tuz konsantrasyonu arttıkça protein bantı daralarak kolondan aşağı doğru ilerler ve düzgün bir bant olarak kolondan çıkar (Kazan, 1997).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1. Mikroorganizma

Bu çalışmada mikroorganizma olarak *Haloferax alexandrinus* (JCM 10717) kullanılmıştır. Kültür ilk kez Asker ve Ohta tarafından 2002 yılında izole edilmiştir. Kültür Japan Collection of Microorganisms RIKEN BioResource Center'den liyofilize olarak temin edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri Difco, Sigma, Merck ve Fluka'dan temin edilmiştir.

Sıvı Maksimal Besi Yeri

Yeast Extract	10 gr
Casamino asid	7.5 gr
NaCl	250 gr
MgSO ₄ 7.H ₂ O	20 gr
KCl	2 gr
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3 gr
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05 gr
MnSO ₄ .H ₂ O	0.2 mg

Yeast extract ve Casamino acid dışındakiler hazırlandıktan sonra besi yerinin pH'sı 7.4'e 1 M'lık KOH veya NaOH ile ayarlanır ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edilir Yeast extract ve casamino acid filtreden geçirildikten sonra besiyerine ilave edilir.. Katı besiyerinin hazırlanması için ise %2'lik agar ilavesi yapılır (Asker ve Ohta 2002).

Minimal Besi Yeri

Glukoz	5 gr
KNO ₃	10 gr
NaCl	250 gr
MgSO ₄ 7.H ₂ O	20 gr
KCl	2 gr
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3 gr
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05 gr
MnSO ₄ .H ₂ O	0.2 mg

Distile su ile 1 litreye tamamlanır ve pH 7.4'e 1 M'luk KOH veya NaOH ile ayarlanır ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edilir (Asker ve Ohta, 2002).

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma, Fluka ve Merck tarafından temin edilmiştir.

2,5 M Amonyum Sülfat Tamponu

Amonyum Sülfat	330.35 gr
Sodyum dihidrojen fosfat	4.05 gr
Disodyum hidrojen fosfat	4.63 gr

pH 7.4'e ayarlanır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Hücre Yıkama Tamponu

NaCl	250 gr
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3 gr
KCl	2 gr

Distile su ile 1 litreye tamamlanır.

4.26 M NaCl (50 mM fosfat tampon içinde)

NaCl	250 gr
Sodyum dihidrojen fosfat	4.05 gr
Disodyum hidrojen fosfat	4.63 gr

pH 7.4'e ayarlanır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır

200 mM Metil Viyolojen (MV)

Metil viyolojen	0,51 gr
Distile su	10 ml

Metil viyolojen aşırı toksik bir maddedir. Çalışırken mutlaka eldiven ve yüz maskesi kullanılmalıdır. Hazırladıktan sonra 4 °C'de saklanır.

1.5 M Potasyum Nitrat

Potasyum Nitrat	7.58 gr
Distile su	50 ml

1.2 M Sodyum Karbonat (pH=9.0)

Sodyum Karbonat	6.35 gr
Distile su	50 ml

340 mM Sodium Dithionite

0.1 M sodyum bikarbonat içinde

Sodium bicarbonate	0,84 gr
--------------------	---------

%1'lik Sülfanilamid

3 N HCl	100 ml
Sülfanilamid	1 gr

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochloride (NEDA)

NEDA	0.02 gr
Distile su	100 ml

1.5 M Tris Baz (pH=8.8)

Tris Baz	181.65 gr
----------	-----------

800 ml'de çözülür ve HCl ile pH 8.8'e ayarlanır ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdı ile filtre edilir. Koyu renkli şişede saklanır.

1 M Tris Baz (pH=6.8)

Tris Baz	121.1 gr
----------	----------

800 ml'de çözülür ve HCl ile pH 6.8'e ayarlanır ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdı ile filtre edilir. Koyu renkli şişede saklanır.

SDS Stok (%10)

SDS	10 gr
-----	-------

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdı ile filtre edilir.

Amonyum Persülfat (%10)

Amonyum Persülfat 100 mg

Distile su ile 1 ml'ye tamamlanır. Kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

SDS-Elektroforez Tamponu (10x)

Tris Baz	30.3 gr
Glisin	144.2 gr
SDS	10 gr

Önce tris baz ve glisin distile su içinde çözülür. Sonra SDS'i ilave ederek tekrar çözülür ve distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

Protein Yükleme Tamponu

Gliserol	0.8 ml
%10 SDS	1.6 ml
β -merkaptoetanol	0.4 ml
1 M Tris Baz (pH=6.8)	0.5 ml
% 0.05 Bromfenol mavisi	0.2 ml
Distile su	4.5 ml

Standart Protein Karışımı

Elektroforez için standart protein karışımı sigma'dan temin edilmiştir. Molekül ağırlıkları Aprotinin (6,500 Dalton), α -Lactalbumin (14,200 Dalton) Trypsin inhibitor (20,000 Dalton), Trypsinogen (24,000 Dalton), Carbonic anhydrase (29,000 Dalton), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000 Dalton), Ovalbumin (45,000 Dalton), Glutamic dehydrogenase (55,000 Dalton), Albumin (66,000 Dalton), Fructose-6-phosphate Kinase (84,000 Dalton),

Phosphorylase B (97,000 Dalton), β -Galactosidase (116,000 Dalton), Myosin (205,000 Dalton)'dir.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Liyofilize Kültürün Geliştirilmesi

Liyofilize haldeki kültürden bir miktar alınarak sıvı maksimal besi yerine (25 ml) ekim yapılmıştır. Kültür 37 °C, 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi 8-9 gündür.

Bu gelişen kültürden agarlı besi yerine çizgi ekim yapılarak petriyerler 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Deneyler için gerekli kültür stok haline getirilmiştir).

2.2.2. Hücrelerin Gram Boyama ile Boyanması

Katı besiyerinden alınan hücreler lam üzerinde yayılmıştır ve havada kurutulmuştur. Hücrelerin üzerine fiksasyon amaçlı %2'lik asetik asit damlatılmıştır. Daha sonra kristal viyolete damlatılıp ve 1-2 dakika beklenmiştir. Sonra preparat distile su ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardından preparatın üzerine lugol damlatılıp 1-2 dakika beklenmiştir. Tekrar distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra % 100'lük alkol ile renksiz sıvı akana kadar renk giderilmiştir. Ardından tekrar distile su ile yıkanmıştır. Sonra safranin damlatılıp ve 20-30 saniye kadar beklenmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra 100'lük objektifte imersiyon yağı ile gözlemlenmiştir.

2.2.3. *Haloferax alexandrinus*'un Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

2.2.3.1. Maksimal Besi Ortamında Hücre Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

Haloferax alexandrinus petrisinden tek bir koloni alınarak 1 litre maksimal besiyerine ekim yapıp, 37 °C ve 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden belirli aralıklarla 500 µl örnek alınıp spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis 2101PC) 600 nm'de ölçüm yapılmıştır.

2.2.3.2. Minimal Besi Ortamında Hücre Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

Hücreler ilk önce maksimal besiyerinde stasyoner fazın başına kadar büyütülmüştür. Bu kültürden 1 ml alınıp 1 litrelik minimal besiyerine ekim yapılmıştır. Bu kültürden belirli aralıklarla 500 µl örnek alınıp spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılmıştır.

2.2.3.3. Nitrat Redüktaz Aktivitesinin Maksimum Olduğu Üreme Fazının Belirlenmesi

Maksimal besiyerinde stasyoner faza kadar büyütülen hücrelerden 1 lt'lik minimal besiyerine 1 ml ekim yapılmıştır ve 37 °C, 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli aralıklarla kültürden 15 ml örnek alınmıştır. Alınan bu örnekten hem hücre yoğunluğu hem de enzim aktivitesi ölçülmüştür.

2.2.4. Enzim Ekstraksiyonu

Sıvı minimal besiyerinde büyütülen hücreler 8000 g de 15 dakika santrifüj (Beckman Coulter Avanti J-30I) edilerek bir araya toplanmıştır. Toplanan hücreler yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Tekrar 8.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır..

Daha sonra hücreler 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 mM sodium fosfat tampon içinde olacak şekilde pH 7,3) içerisinde, sonikatörde (Sonics and Material Vibra Cell VCX 400) $+4^\circ\text{C}$ de 3'er dakika boyunca 8 kez tekrarlanarak parçalanmıştır. Parçalanmış hücre özütü $+4^\circ\text{C}$ 'de 106,000 g' de 60 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant deneylerde kullanılmak üzere temiz bir tüpe aktarılmış ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.2.5. Nitrat redüktaz (Nas) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi:

Nas enzim aktivitesi, nitratın enzim tarafından nitrite indirgenmesiyle oluşan nitritin diazo-coupling metodu ile spektrofotometrede 540 nm de ölçülmesiyle belirlenmiştir.

250 μl 'lik deney karışımının içeriği:

120 mM Na_2CO_3 (pH:9)
 1 M NaCl
 4 mM Metil viyolojen (MV)
 30 mM KNO_3
 50 μl enzim
 17mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

Deney karışımında KNO_3 substrat olarak görev yapmaktadır. MV ise elektron vericisidir.

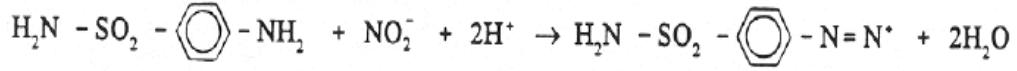
Reaksiyon karışımı yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bu karışıma sodyum dithionite (DT) en son ilave edilmiştir (DT kofaktördür, aynı zamanda da reaksiyon başlatıcı olarak görev yapar.).

Örnekler 40°C de 2 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra deney karışımına 17 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (DT) ilave edilerek reaksiyon başlatılır. Reaksiyon 40°C de 20 dk bekletilmiştir. 20 dk sonunda hızlı karıştırma ile DT'nin tamamı okside edilmiş ve reaksiyon sonlandırılmıştır.

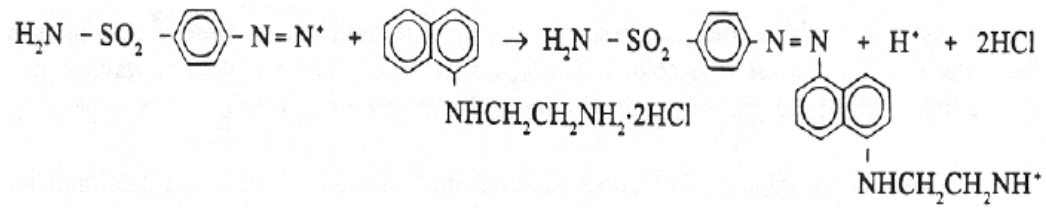
Reaksiyon bitiminde karışıma 1 ml Sülfanilamid (SULFAve Daha sonra onunda üzerine 1 ml N-(1-naftiletilediamindihidroklorid) (NEDA) ilave

edilmiştir. Bu karışım 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir (Snell ve Snell 1949).

Daha sonra oluşan kırmızı mor renk spektrofotometrede 540 nm'de ölçülmüştür.



Sülfanilamid (SULFA) nitrit 4 sülfamilbenzendiazonyum tuzu



Diazonyum tuzu NEDA kırmızı-mor azo boyası

***Nitrat redüktaz (Nas) spesifik aktivitesi; 1 dk da toplam proteinin miligramı başına düşen nitrit (NO₂) miktarının mikromol cinsinden ifadesidir.

2.2.6. Besiyeri İçeriğindeki Nitrat ve Nitrit Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

2.2.6.1. Besiyerindeki Nitrat Miktarının Belirlenmesi

Belirli aralıklarla kültür yoğunluğu ölçülürken aynı zamanda besiyerindeki nitratın azalan miktarda ölçülmüştür.

İlk önce 1ppm, 1,5ppm, 2,5ppm, 5ppm, 7 ppm ve 10 ppm'lik nitrat standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standartların her birine 1'er ml 1N HCl ilave edilmiştir. Her bir standartın absorbansları 220 nm'de (nitrat için) ve 275 nm'de (organik madde için) ölçülmüştür. Daha sonra 220 nm'de elde ettiğimiz değerden 275 nm'deki değer çıkarılır. Elde edilen absorbans değeri ile kullanılan nitrat derişimleri grafikte yerine konarak nitrat için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Sıvı besiyerinden alınan kültür 8000 g de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve hücrelerden arınmış olan sıvı besiyeri elde edilmiştir. Bu besiyerinden 1 ml alınıp ve üzerine 1 ml 1 N HCl ilave edilmiştir. Bu hazırlanmış olan örnek 220 nm ve 275 nm dalgaboylarında ayrı ayrı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değeri kalibrasyon grafiğinde yerine konularak besiyerindeki nitrat miktarı hesaplanmıştır.

2.2.6.2. Besiyerindeki Nitrit Miktarının Belirlenmesi

Belirli aralıklarla kültür yoğunluğu ölçülürken aynı zamanda besiyerindeki nitritin artan miktarda ölçülmüştür.

İlk önce 1ppm; 1,5ppm; 2,5ppm; 5ppm ; 7 ppm ve 10 ppm'lik nitrit standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standartların her birine ilk önce 1 ml sülfanilamid daha sonrada 1 ml NEDA eklenmiştir. 20 dakika sonra 540 nm'de ölçüm yapılmıştır. Her nitrit standartına karşılık gelen absorbans değeri grafikte yerine konulmuştur ve nitrit için bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Sıvı besiyerinden alınan kültür 8000 g de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Buradan alınan besiyerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NEDA eklenmiştir. Daha sonra örnek spektrofotometrede 540 nm'de besiyerindeki nitrit konsantrasyonunun değeri absorbans olarak ölçülmüştür. Bu değer grafikte yerine konularak nitrit miktarı hesaplanmıştır.

Besiyerindeki nitrit miktarlarında, yukarıda belirtilen diazo-coupling yöntemi ile ölçülmüştür.

2.2.7. Haloferax alexandrinus NAS Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.7.1. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun ve İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Nas enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunu etkisini belirlemek için başlangıç konsantrasyon olarak 0.5 M olarak belirlenip 1.0, 2.0 ve 3.0 M'lık

NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesine bakılmış ve NaCl'nin aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Nas enzim aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için başlangıç sıcaklık derecesi 20 °C olarak belirlenip 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C ve 90 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmış ve inkübasyon sıcaklığının aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2.2.7.2. Nas Enzim Aktivitesinin İnkübasyon Süresine Bağlı Değişimi

Nas enzim aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimini belirlemek için 0. dakikadan başlayarak 5, 10, 15, 20, 30, 45., 60., 75. ve 90. dakikalarda enzim aktivitesi ölçülmüştür.

2.2.7.3. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Nas enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için sodyum karbonat ve tris tamponları kullanılarak enzimin optimum pH'sı belirlenmiştir. pH değerleri 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 arasında taranmıştır.

2.2.7.4. Nas Enziminin İzoelektrik Nokta'sının Belirlenmesi

Nas enziminin izoelektrik pH'sını belirlemek için 2.5-7.5 arasında 0.2 pH aralığında bir seri tampon hazırlanmıştır. Bu hazırlanan tamponlara Nas enziminin sulu çözeltisi eklenmiştir. 30 dakika sonra oda sıcaklığında çökelti miktarına bakılmıştır. Her tüp için çökelti olup olmadığı +, ++, +++ gibi ifade edilerek, en çok çökelti olan tüp, Nas enziminin izoelektrik noktası olarak kaydedilmiştir.

2.2.7.5. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Tuzların (KCl, MgCl₂, AlCl₃) Etkisi

Nas enzim aktivitesi üzerine farklı tuzların etkisini belirlemek için KCl, MgCl₂, AlCl₃ tuzlarının 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M'lık konsantrasyonları belirlenmiş ve

bu konsantrasyonlardaki NAS enzim aktivitesine bakılmıştır ve NaCl ile karşılaştırılmıştır.

2.2.7.6. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Azid'in Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine azid'in etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* Nas'ının azide olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum azid stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.7.7. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Siyanür'ün Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının siyanüre olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum siyanür stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.7.8. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine EDTA'nın Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının EDTA'ya olan duyarlılığı saptanmıştır. EDTA stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.7.9. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine DTT'nin Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine DTT'nin etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının DTT'ye olan duyarlılığı saptanmıştır. DTT stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak

şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.7.10. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Sülfid'in Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine sülfidin etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının Azide olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum Azid stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.8. Nas Enziminin Kinetik Aktivitesinin Analizi

Haloferax alexandrinus NAS'ın KNO₃ ve MV için Vmax ve Km değerlerin belirlemek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis-Menten ve Line Wearver-Burke grafiğinde gösterilmiştir.

2.2.9. Saflaştırma

2.2.9.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması

Sıvı minimal besiyerinde büyütülen hücreler 8000 g de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Toplanan hücreler yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Tekrar 8.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pelet kısmındaki hücrelerin üzerine 2,5 M (NH₄)₂SO₄ (50 mM sodium fosfat tampon içinde olacak şekilde pH 7,3) eklenmiştir ve sonikatörde +4°C'de 3'er dakika boyunca 8 kez tekrarlanarak parçalanmıştır. Parçalanmış hücre özütü +4 °C'de 106,000 g' de 60 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım saflaştırma basamakları için +4 °C'de saklanmıştır.

2.2.9.2. Sefaroz 4B Kolonu

Sefaroz 4B kolonu bir jel geçirgenlik kromatografisidir. Kolon 70×10^3 - 20×10^6 dalton büyüklüğündeki moleküllerin ayırımını sağlar. Makromolekülleri molekül büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktır. Çalışma prensibi kolon küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek kolondan hızla ilerler; küçük moleküller ise gözenek içerisine difüzyonla girer ve molekül küçüldükçe artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar.

Dolgu maddesi kolona paketlenir. Kolon boyutu 2.5x30 cm'dir. Kolondan 2.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM fosfat tampon pH (7.3) geçirilerek kolon dengelenmiştir. 110 ml örnek kolondan 48 ml/saat hızında geçirilmiştir. Örnek geçirildikten sonra aynı hızda 100 ml, 2.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM fosfat tampon geçirilerek yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından 2.5 M-0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM fosfat tampon azalan bir gradient oluşturacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Gradientin toplam hacmi 1 litredir. Örnekler 12 ml olacak şekilde toplanmıştır.

Aynı zamanda bu işlemler otomize edilmiş Amersham AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. 280 nm de protein absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen protein absorbansları sonucunda ortaya çıkan piklerin 3 er adet önünden ve arkasından alınan tüplerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

2.2.9.3. DEAE (Dietilaminoetil) selüloz kolonu

DEAE selüloz kolonu bir İyon değiştirici kolonudur. Proteinleri asit ve baz özelliklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kolon içine pH= 7 de pozitif yük taşıyan bir selüloz türevi olan DEAE- selüloz (dietil aminoetil selüloz) konur. Bu bileşiğe negatif yük taşıyan proteinler bağlanırken diğer proteinler kolondan çıkar. Daha sonra kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilerek kolon materyaline geçici olarak bağlanmış olan bu proteinler kolonun dolgu maddesinden ayrılarak kolondan çıkmaya başlarlar. Fraksiyon

toplayıcısı ile küçük miktarlar halinde tüplerde toplanan proteinler asidik yada bazik özelliğine göre diğer proteinlerden ayrılmış olur. Bu tip kromatografi özellikle molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmak için kullanılmaktadır (Cutler 2004).

DEAE selüloz kolonu (1x6 cm) 2 kolon hacmi kadar 2.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM fosfat tampon pH (7.3) ile dengelenmiştir. Daha sonra 48 ml örnek yüklendikten sonra aynı tampon ile yıkanmıştır. Enzim 30ml/saat akış hızı ile 4.26 M NaCl içeren 50 mM fosfat tampon pH 7.3 ile toplanmıştır. Örnekler 2 ml olacak şekilde toplanmıştır (Martinez-Espinosa 2001).

Aynı zamanda bu işlemler otomize edilmiş Amersham AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. 280 nm de protein absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen protein absorbansları sonucunda ortaya çıkan piklerin 3 er adet önünden ve arkasından alınan tüplerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

2.2.9.4. Sefakril S-300 Kolonu

Bu kolonda jel geçirgenlik kolonudur. Sefakril kolonu 2000-400000 Da arasındaki proteinlerin ayrımı için uygun bir kolon dolgu maddesidir (Cutler 2004). Kolon 2 M NaCl içeren 50 mM fosfat tampon pH 7.3 ile dengelenmiştir. Kolon hacminin %2 si kadar örnek yükledikten sonra 30ml/saat akış hızı ile aynı tampon ile yıkanmıştır. Fraksiyonlar 2 ml olacak şekilde toplanmıştır (Martinez-Espinosa 2001).

Aynı zamanda bu işlemler otomize edilmiş Amersham AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. 280 nm de protein absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen protein absorbansları sonucunda ortaya çıkan piklerin 3 er adet önünden ve arkasından alınan tüplerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

2.2.9.5. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Ham ekstre ve saflaştırma basamaklarında elde edilen protein örneklerinin miktarı Bradford yöntemi ile ölçülmüştür. Standart olarak Bovine serum albumin kullanılmıştır (Bradford 1976).

2.2.10. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Bu çalışmada NAS'ın moleküler ağırlığını belirlemek için Laemmli'nin tanımladığı SDS-PAJE yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970). %12'lik poliakrilamid jel konsantrasyonu kullanılmıştır. Molekül ağırlığını karşılaştırmak için 200.000-6500 dalton arasında proteinler içeren standart protein karışımı (Sigma S8445) kullanılmıştır.

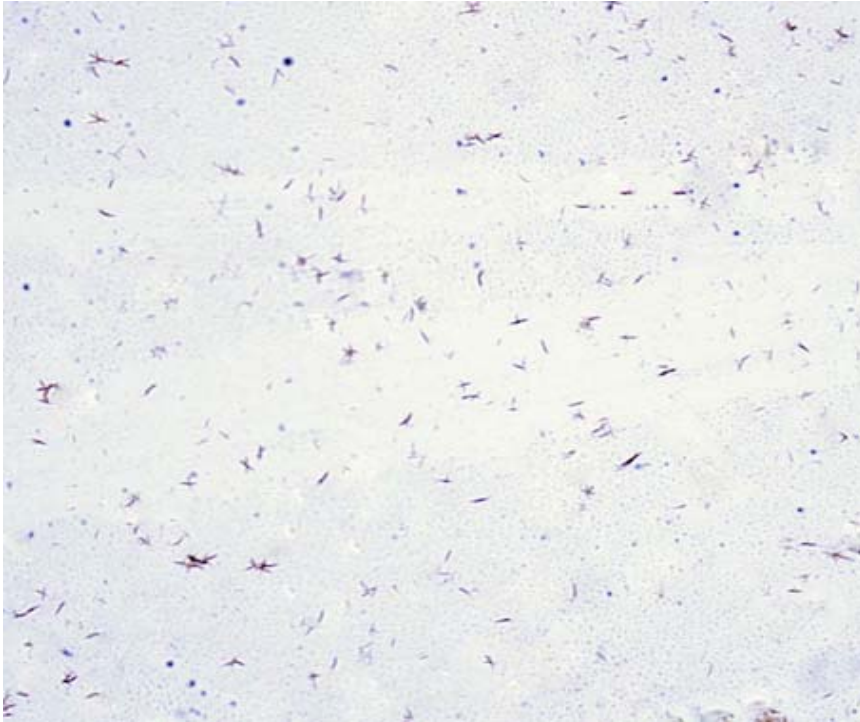
Elektroforez olarak Bio-Rad mini protean II cell kullanılmıştır. Akım 90 Volt'ta 2 saat boyunca sürdürülmüştür.

Jel coomassie brilliant blue boyası ile boyandıktan sonra, fazla boyanın uzaklaştırılması için yapılan yıkamanın ardından jelin Uvi-Tec jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekilmiş ve analizi yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hücreslerin Gram Boyama İle Boyanması

Hücresler gram boyama ile boyandığında gram negatif olarak boyandıkları gözlenmiştir. 100x lik büyütmede hücreler pembe renkte oldukları gözlenmiştir. Çubuk ve kok şeklinde örneklerin olduğu gözlenmiştir. Başka bir hücre grubu ile kontaminasyon gözlenmemiştir.

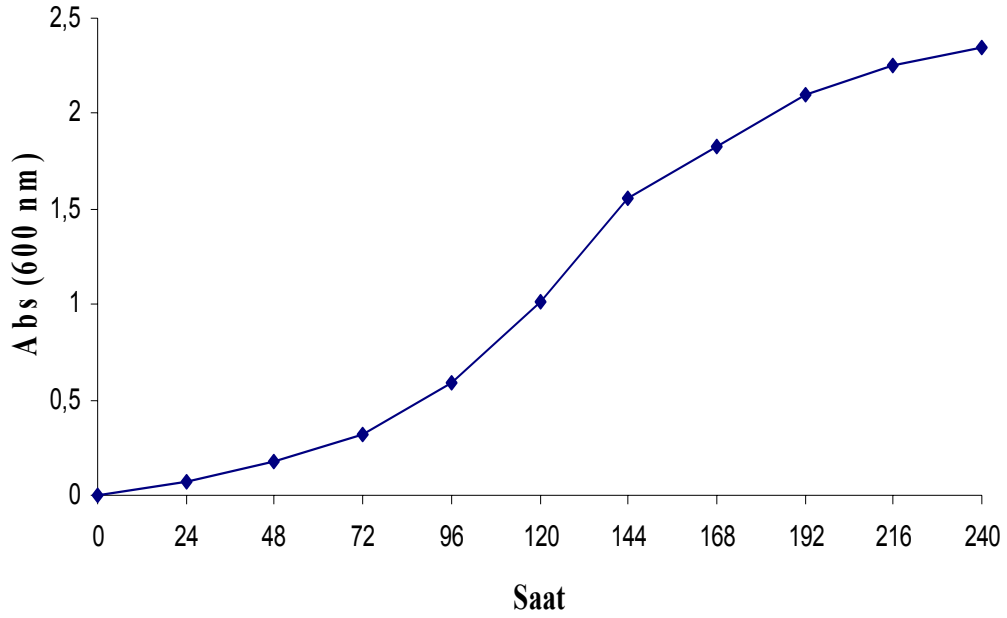


Şekil 3.1. *H. alexandrinus* 100x'lik büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüsü

3.2. Haloferax alexandrinus'un Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

3.2.1. Maksimal Besi Ortamında Hücre Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

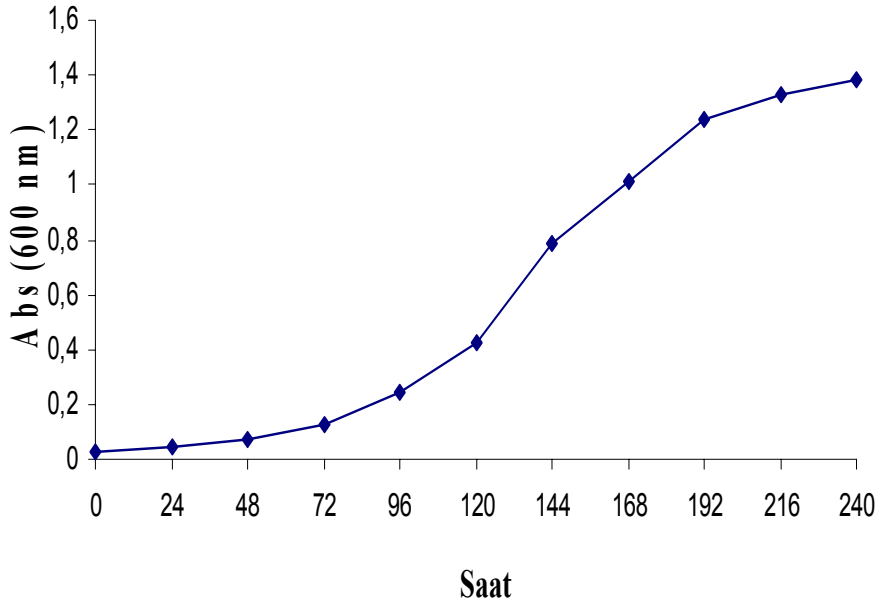
Kültürden 10 gün boyunca örnek alınıp spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldüğünde zamana bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. 144. saat'ten sonra azalan bir artış gözlenmiştir. 10. gün sonunda kültürün absorbansı 2,35'e kadar ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Maksimal besi ortamındaki hücrelerin zamana bağlı artan yoğunluğu

3.2.2. Minimal Besi Ortamında Hücre Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

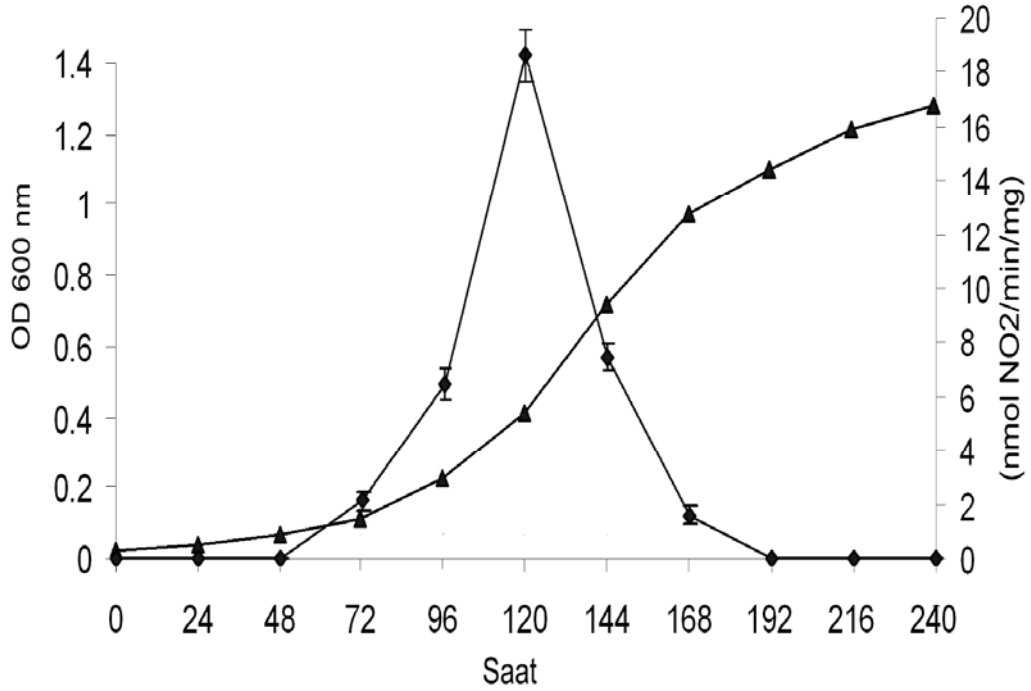
Kültürden 10 gün boyunca her gün örnek alınıp spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldüğünde zamana bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. 144. saat'ten sonra azalan bir artış gözlenmiştir. 10. günün sonunda kültürün yoğunluğu 1,38'e kadar ölçülmüştür.



Şekil 3.3. Minimal besi ortamındaki hücrelerin zamana bağlı artan yoğunluğu

3.2.3. Nas Enzim Aktivitesinin Maksimum Olduğu Üreme Fazının Belirlenmesi

Asimilatif nitrat redüktaz aktivitesinin maksimum olduğu üreme fazını belirlemek için 10 gün boyunca hergün alınan örneklerden hem hücre büyüme eğrisi çıkarılmış hem de hangi üreme fazında enzim aktivitesinin maksimum düzeyde olduğu tesbit edilmiştir. Enzim aktivitesi 48. saatten 192. saatin sonunu kadar varolmasına rağmen maksimum aktivite 120 saatte en üst seviyede olarak bulunmuştur. Bu üreme fazı 0,475 OD (600 nm) olarak tesbit edilmiştir. Tüm deney aşamaları için gerekli hücre büyümesi bu faz yada yakın değerlere kadar gerçekleştirilmiştir.

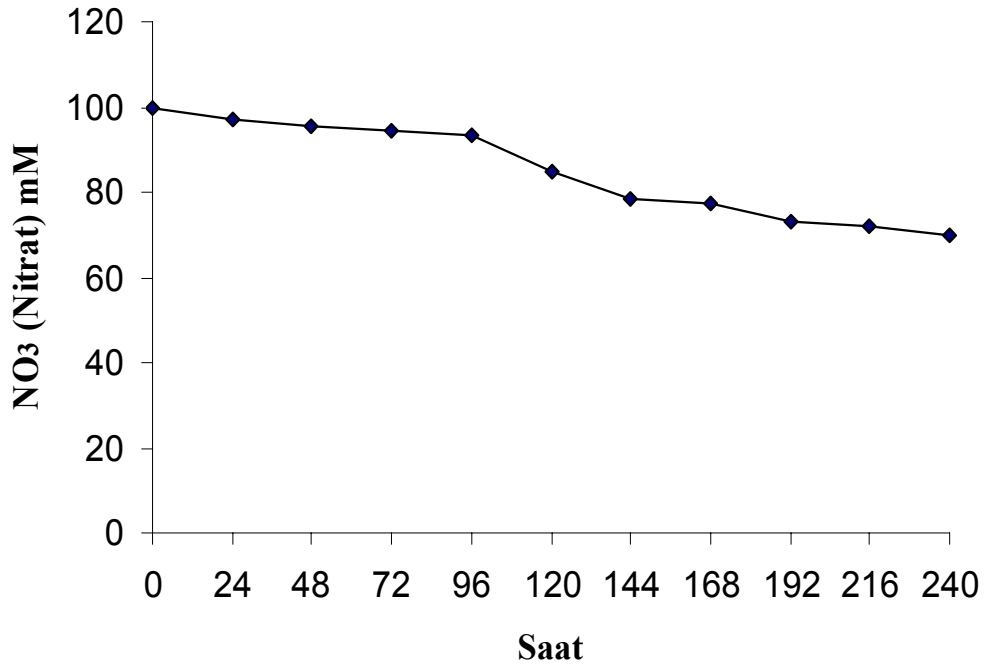


Şekil 3.4. Kültür gelişimine bağlı olarak değişen Nas enzim aktivitesi (Nas enzim aktivitesi ◆) (Hücre büyüme eğrisi ▲)

3.3. Besiyeri İçeriğindeki Nitrat ve Nitrit Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

3.3.1. Besiyerindeki Nitrat Miktarının Belirlenmesi

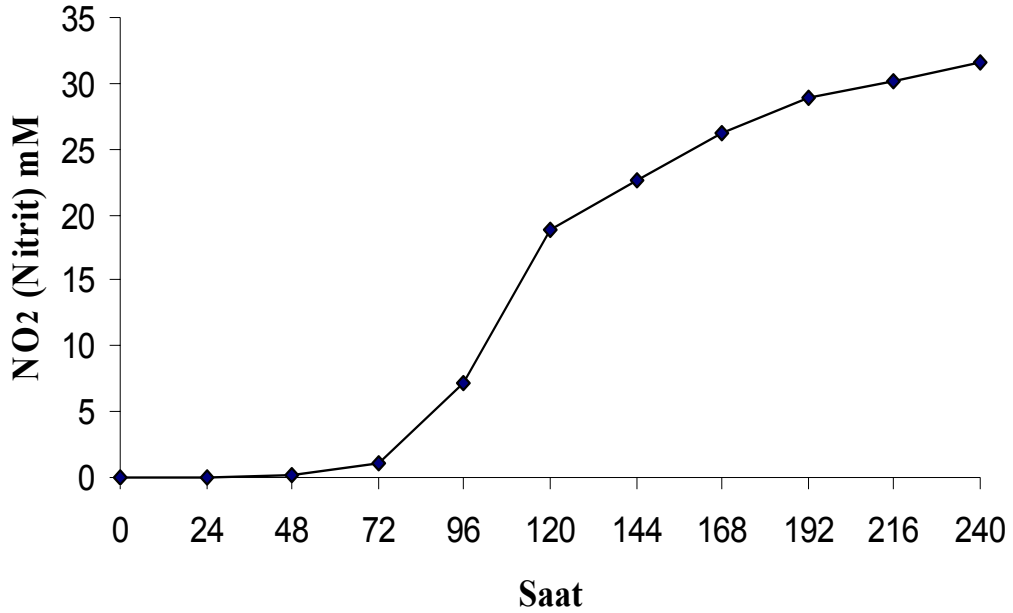
Hücrelerin üreyebilmesi için minimal besi ortamına eklenen nitrat (KNO_3) 10 gün boyunca ölçümü yapıldı. Ölçümler sonucunda nitratın kullanıldığı, başlangıçta 100 mM olan nitrat konsantrasyonunun 10. gün sonunda yaklaşık 70 mM'a kadar düştüğü gözlenmiştir. En büyük azalma 96-120. saatler arasında gerçekleşmiştir.



Şekil 3.5. Zamana bağlı olarak besiyerindeki azalan nitrat konsantrasyonu grafiği

3.3.2. Besiyerindeki Nitrit Miktarının Belirlenmesi

Hücrelerin üreyebilmesi için minimal besi ortama eklenen nitrat'ın (KNO_3) asimilatif nitrat redüktaz (Nas) tarafından nitrite dönüştürülüp dönüştürülmediğinin tesbiti için minimal besi ortamından 10 gün boyunca örnek alınıp nitrit ölçümü yapıldı. Ölçümler sonucunda ilk 2 gün boyunca ortamda nitrit tesbit edilemedi. 72. saatten sonra ortamda nitrit artışı başladığı ve en büyük artışın 96. saat ile 120. saatler arasında olduğu tesbit edilmiştir.

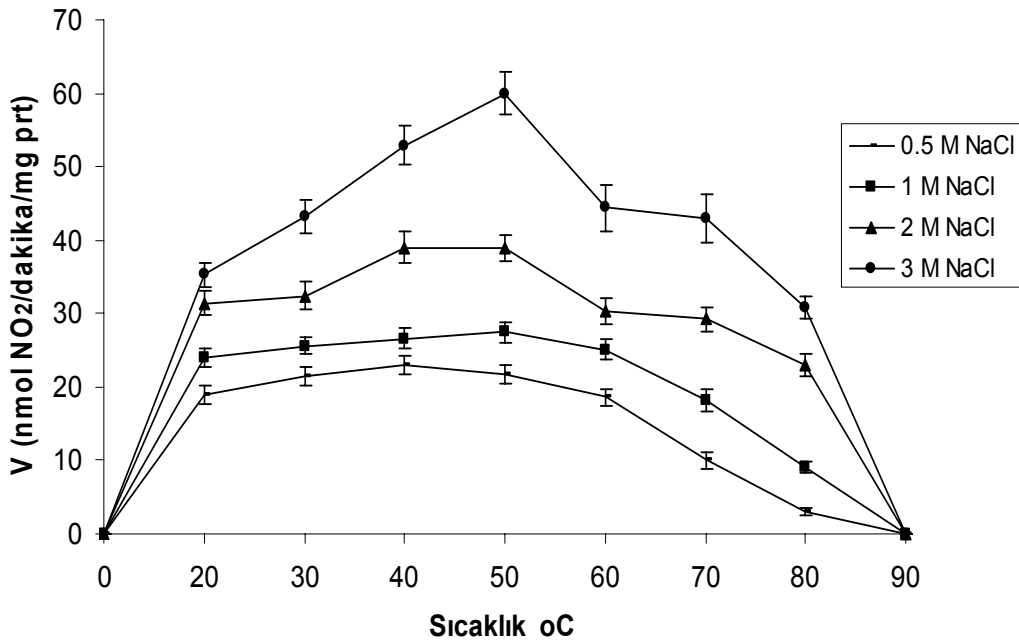


Şekil 3.6. Zamana bağlı olarak besiyerindeki artan nitrit konsantrasyonu grafiği

3.4. *Haloferax alexandrinus* Nas Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun ve İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Nas aktivitesi üzerine hem NaCl konsantrasyonlarının hem de inkübasyon sıcaklığının etkilerini belirlemek için 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 M'lık tuz konsantrasyonları ve her biri 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda enzim aktiviteleri ölçülmüştür. 3.0 M'lık tuz konsantrasyonunda enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. 0,5 M'lık tuz konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin daha düşük olduğu ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda sıcaklık verileri karşılaştırıldığında maksimum aktivite 50 °C olarak belirlenmiştir. 1.0 M, 2.0 M ve 3.0 M'lık tuz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi 50 °C'ye kadar artmaktadır. Enzim aktivitesi 50 °C'den itibaren ise düşüş göstermektedir. 0,5 M'lık tuz konsantrasyonunda ise 40 °C'den itibaren düşüş göstermektedir.



Şekil 3.7. Nas enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun ve inkübasyon sıcaklığının etkisi

3.4.2. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Tuzların (KCl, MgCl₂, AlCl₃) Etkisi

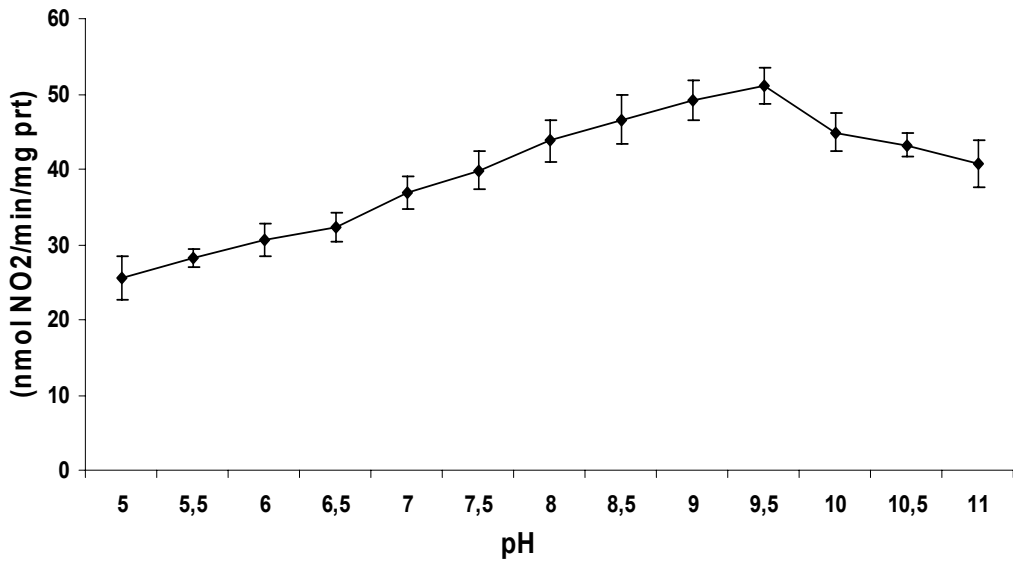
Nas enzim aktivitesi üzerine farklı tuzların etkisini belirlemek için KCl, MgCl₂, AlCl₃ tuzlarının 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 M'lık konsantrasyonları belirlenmiş ve bu konsantrasyonlardaki NAS enzim aktivitesine bakılmıştır ve NaCl ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmada KCl'nin artan konsantrasyonlarıyla beraber enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiş, ayrıca tüm konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi NaCl'ye göre daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. MgCl₂ ve AlCl₃'ün konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin gözlenemediği tesbit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Nas enzim aktivitesi üzerine farklı tuzların etkisi

TUZ Konsantrasyonu	NaCl	KCl	MgCl₂	AlCl₃
0,5 M	3.22 (mU/mg protein)	9.66 (mU/mg protein)	0	0
1 M	11.8 (mU/mg protein)	22 (mU/mg protein)	0	0
1,5 M	19.3 (mU/mg protein)	43.5 (mU/mg protein)	0	0
2 M	33.8 (mU/mg protein)	66.05 (mU/mg protein)	0	0

3.4.3. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Nas enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için sodyum karbonat ve tris tamponları kullanılarak enzimin optimum pH'sı belirlenmiştir. pH değerleri 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 arasında taranmıştır. En yüksek aktivite pH 9.5'de belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Nas enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.4.4. Nas Enziminin İzoelektrik Noktasının'sının Belirlenmesi

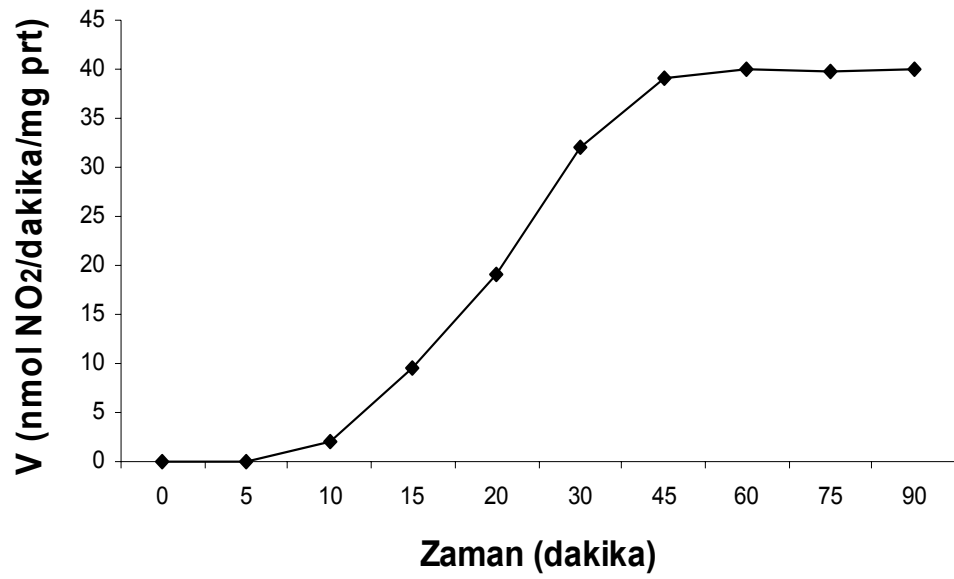
Nas enziminin izoelektrik nokta'sını belirlemek için 2.5-7.5 pH aralığında tamponlar hazırlanmış ve tamponlara eklenen enzimden sonra tamponlardaki proteinin çökeltme oranlarına bakılmıştır. En az çökeltme olan tüpten en çok çökeltme olan tüpler arasında +, ++, +++ şeklinde puanlamalar verilmiştir. Yapılan deneyde en çok çökeltme 5.3 pH'da gerçekleşmiştir ve bu sonuç izoelektrik nokta'yı göstermektedir.

Çizelge 3.2: Nas enziminin farklı pH lardaki çökeltme durumu

pH	2,5	2,7	2,9	3,1	3,3	3,5	3,7
Çökeltme oranı	+	+	+	+	+	+	+
pH	3,9	4,1	4,3	4,5	4,7	4,9	5,1
Çökeltme oranı	+	+	+	++	++	++	+++
pH	5,3	5,5	5,7	5,9	6,1	6,3	6,5
Çökeltme oranı	+++++	+++	++	++	+	+	+
pH	6,7	6,9	7,1	7,3	7,5		
Çökeltme oranı	+	+	+	+	+		

3.4.5. Nas Enzim Aktivitesinin İnkübasyon Periyoduna Bağlı Değişimi

Nas enzim aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimini belirlemek için 0. dakikadan başlayarak 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 ve 90. dakikalarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. İnkübasyon süresinin artışına paralel olarak enzim aktivitesinin 45. dakikaya kadar artış göstermiş ve 45. dakikadan sonra enzim aktivitesinin sabit olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. NAS enzim aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi

3.4.6. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Azid'in Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine azid'in etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* Nas'ının azide olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum azid stoğundan 0.1, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Normal Nas aktivitesini (40 nmol NO₂/dakika/mg protein) %100 olarak kabul ettiğimizde azid'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitenin düştüğü tesbit edilmiştir. 1 mM'lık düzeyinin aktiviteyi %90 oranında inhibe ettiği tesbit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Nas enzim aktivitesi üzerine azid'in etkisi

Azid Konsantrasyon	Sodyum Azid Aktivite (%)
0,1 mM	80%
0,5 mM	45%
1 mM	10%

3.4.7. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Siyanür'ün Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının siyanüre olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum siyanür stoğundan 0.1, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Normal Nas aktivitesini (40 nmol NO₂/dakika/mg protein) %100 olarak kabul ettiğimizde siyanürün artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitenin düştüğü, 1 mM'lık siyanür konsantrasyonunda aktivitenin hemen kaybolduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Nas enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisi

Siyanür Konsantrasyon	Sodyum Siyanür Aktivite (%)
0.1 mM	52%
0.5 mM	18%
1 mM	2%

3.4.8. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine EDTA'nın Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının EDTA'ya olan duyarlılığı saptanmıştır. EDTA stoğundan 0.1, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Normal Nas aktivitesini (40 nmol NO₂/dakika/mg protein) %100 olarak kabul ettiğimizde EDTA'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitenin düştüğü tesbit edilmiştir. 1 mM'lık konsantrasyonda aktivite kaybı %52 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.5. Nas enzim aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

EDTA Konsantrasyonu	EDTA Aktivite (%)
0.1 mM	91%
0.5 mM	72%
1 mM	%48

3.4.9. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine DTT'nin Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine DTT'nin etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının DTT'ye olan duyarlılığı saptanmıştır. DTT stoğundan 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Normal Nas aktivitesini (40 nmol NO₂/dakika/mg protein) %100 olarak kabul ettiğimizde EDTA'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitede bir değişiklik olmadığı ve DTT'nin enzimi inhibe etmediği gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Nas enzim aktivitesi üzerine DTT'nin etkisi

DTT Konsantrasyonu	DTT Aktivite (%)
0.1 mM	100%
0.5 mM	100%
1 mM	98%

3.4.10. Nas Enzim Aktivitesi Üzerine Sülfid'in Etkisi

NAS enzim aktivitesi üzerine sülfid'in etkisi belirlenirken, normal enzim aktivitesine karşı *Haloferax alexandrinus* NAS'ının Azide olan duyarlılığı saptanmıştır. Sodyum sülfid stoğundan 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlar olacak şekilde enzim reaksiyon karışımına eklenerek enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. . Normal Nas aktivitesini (40 nmol NO₂/dakika/mg protein) %100 olarak kabul ettiğimizde sülfid'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitede düşüş görülmüştür. 1mM'lık konsantrasyonda aktivite kaybı %30 olarak bulunmuştur.

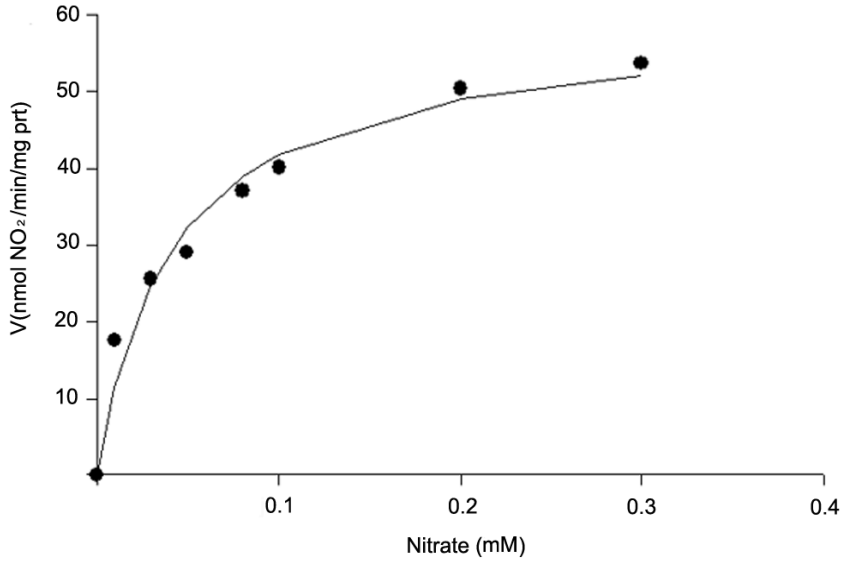
Çizelge 3.7. Nas enzim aktivitesi üzerine sülfid'in etkisi

Sülfid Konsantrasyonu	Sülfid Aktivite (%)
0.1 mM	95%
0.5 mM	86%
1 mM	70%

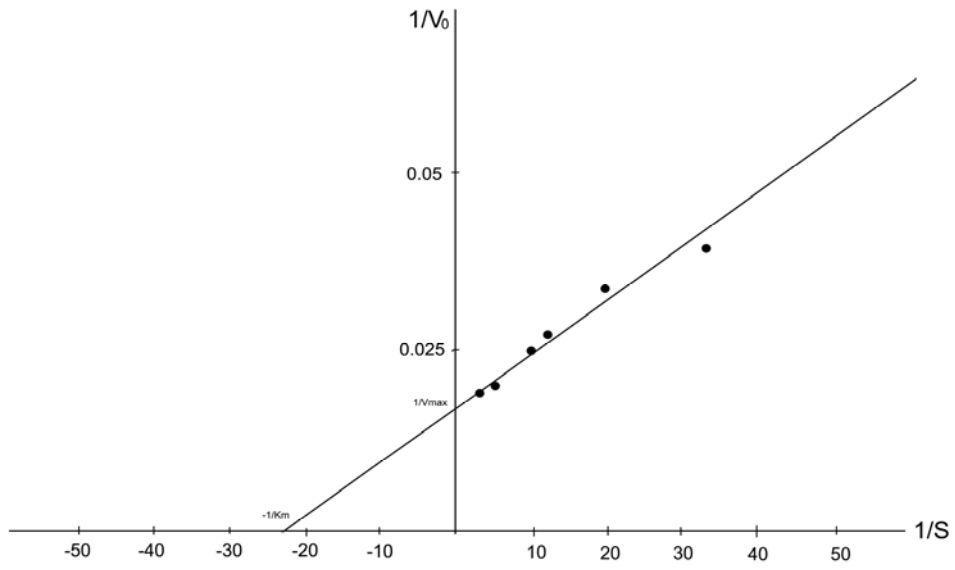
3.5. Nas Enziminin Kinetik Aktivitesinin Analizi

Haloferax alexadrinus Nas'ının KNO_3 ve metil viyolojen (MV) için K_m değerlerini belirlemek amacıyla değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis-Menten ve Line Wearver-Burke grafiğinde gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre Nas'ın KNO_3 için V_{max} değeri 61,1 nmol NO_2 /dakika/mg protein, K_m değeri $0,045 \pm 0,0144$ mM olarak bulunurken, MV için V_{max} değeri 19,01 nmol NO_2 /dakika/mg protein, K_m değeri $0,0065 \pm 0,001$ mM olarak bulunmuştur.

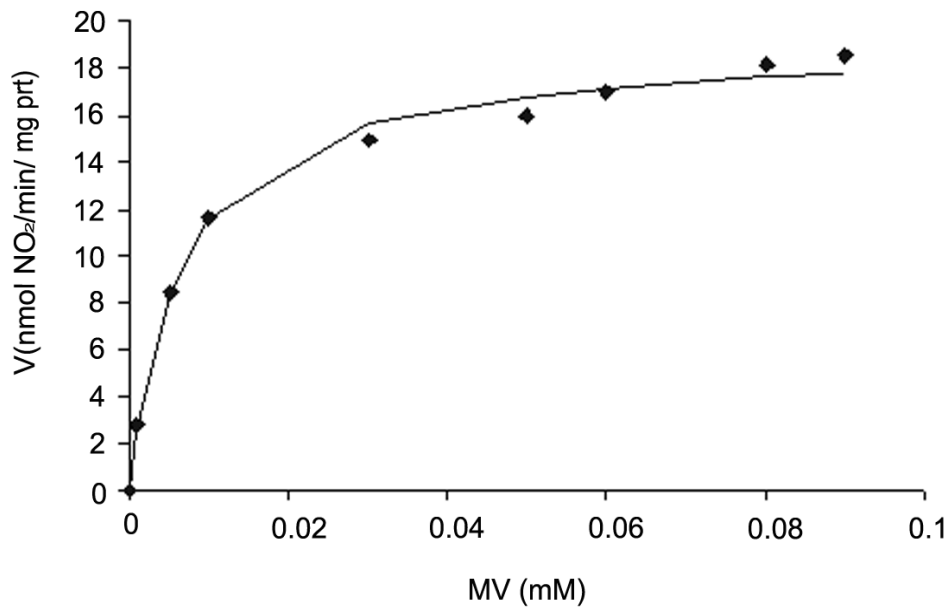
*** Enzim Ünitesi: 1 dakikada 1 μmol nitrati standart koşullarda ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.



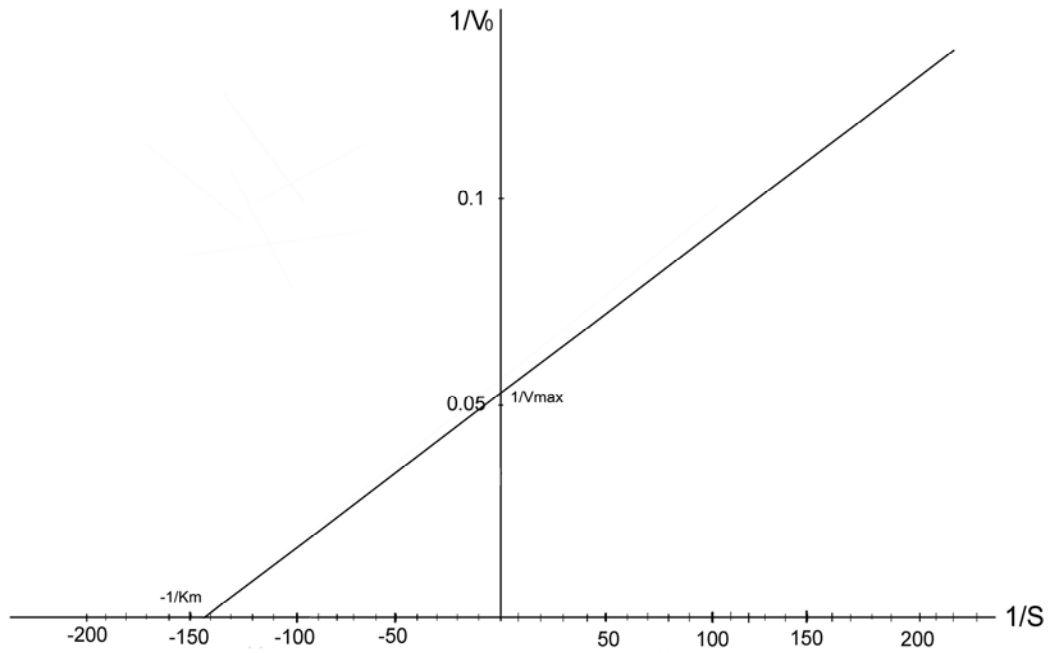
Şekil 3.10. Nas Enziminin KNO_3 için Michaelis-Menten hız grafiği



Şekil 3.11. Nas Enziminin KNO_3 için Line-Weaver Burke hız grafiği



Şekil 3.12. Nas Enziminin MV için Michaelis-Menten hız grafiği



Şekil 3.13. Nas Enziminin MV için Line-Weaver Burke hız grafiği

3.6. Saflaştırma

3.6.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması

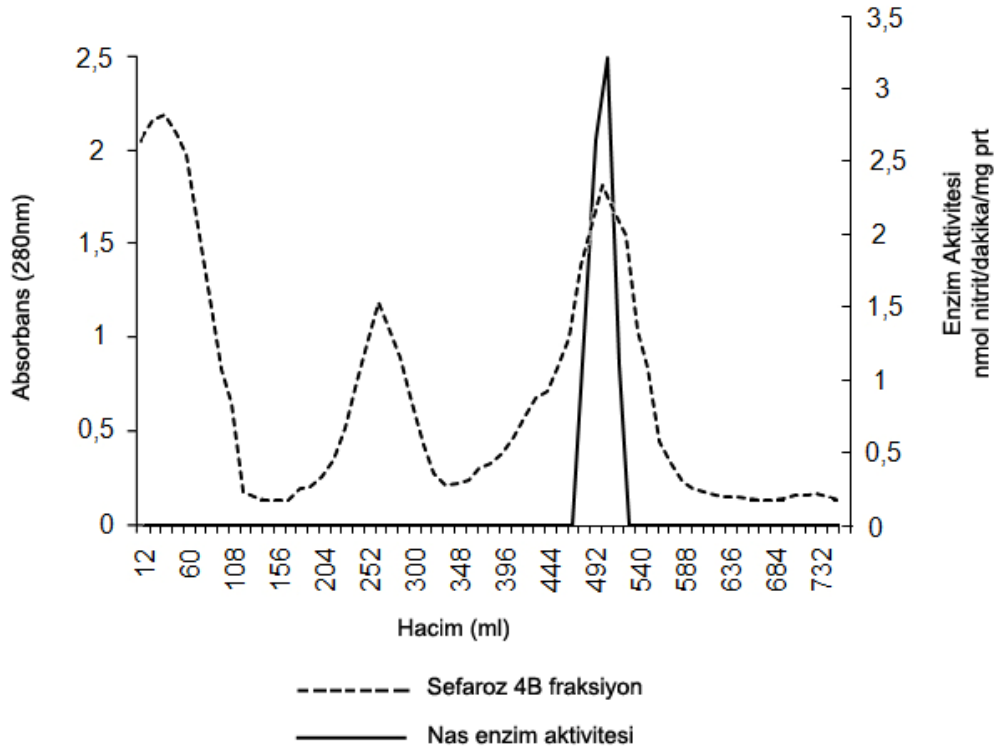
Hücreler minimal besiyerinde en yüksek nas enzim aktivitesi gösterdikleri hücre yoğunluğu olan 0,475-0,5 absorbansa kadar üretildikten sonra, santrifüj edilip besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler daha sonra ultra ses dalgaları ile sonikatörde parçalanmış ve 106.000 g de +4 °C'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant ham enzim olarak kullanılmıştır.

3.6.2. Sefaroz 4B Kolonu

Kolon boyutu 2.5x30 cm'dir. Kolondan 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tampon pH (7.3) geçirilerek kolon dengelenmiştir. 110 ml örnek kolondan 48 ml/saat hızında geçirilmiştir. Örnek geçirildikten sonra aynı hızda 100 ml, 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tampon geçirilerek yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından 2.5 M-0.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tampon azalan bir gradient oluşturacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Gradientin toplam hacmi 1

litredir. Fraksiyonlar 12 ml olacak şekilde toplanmıştır. İstenilen nitrat redüktaz enzimi 552 ml’de gelmeye başlamıştır ve yaklaşık 36 ml toplanmıştır.

Yukarıdaki işlemler AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. Her fraksiyon için 280 nm de protein absorbansı ölçülmüş ve 60. ml, 264. ml, 504. ml’lere denk gelen tüplerden yüksek protein absorbansı ölçülmüştür (Şekil 3.14). En yüksek absorbans değerlerine sahip tüplerin 3 er önden ve arkadan alınan tüplerde yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 480-516 ml arasında tüplerde enzim aktivitesi tesbit edilmiştir. Toplanan enzim fraksiyonu 48 ml’dir. Diğer pik oluşturan tüplerde ise enzim aktivitesi tesbit edilememiştir. Bu toplanan enzim fraksiyonu daha sonra DEAE-selüloz kolonuna aktarılmıştır.



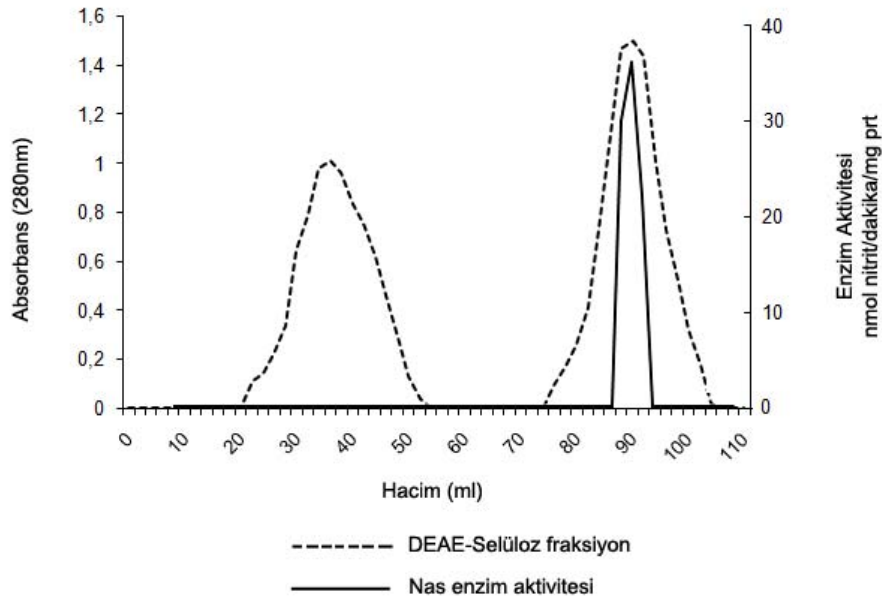
Şekil 3.14. Sefaroz 4B Kromatogramı.

3.6.3. DEAE-Selüloz Kolonu

DEAE selüloz kolonu (1x6 cm) 2 kolon hacmi kadar 2.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM fosfat tampon pH (7.3) ile dengelenmiştir. Daha sonra 48 ml örnek

yüklendikten sonra aynı tampon ile yıkanmıştır. Enzim 30ml/saat akış hızı ile 4.26 M NaCl içeren 50 mM fosfat tampon pH 7.3 ile toplanmıştır. Fraksiyonlar 2 ml olacak şekilde toplanmıştır. Nitrat redüktaz enzimi elüsyon işlemi başladıktan sonra 7. tüpten itibaren gelmeye başlamıştır. Yaklaşık 6 ml örnek toplanmıştır.

Yukarıda anlatılan işlemler AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. Her fraksiyon için 280 nm de protein absorbansı ölçülmüş 36. ml olduğu 18. tüpte elde edilen ilk pik 2.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile yapılan yıkama sonucu elde edilen piktir. Sonraki pik ise 76. ml den itibaren başlayan protein absorbansı 90. ml de en üst seviyeye ulaşıyor. Nas enzim aktivitesi ise 88. ml den itibaren başlıyor ve toplam 6 ml nas enzimi içeren fraksiyon toplanmıştır. Elde edilen toplam enzim fraksiyonu sefakril S-300 kolonuna aktarılmıştır.

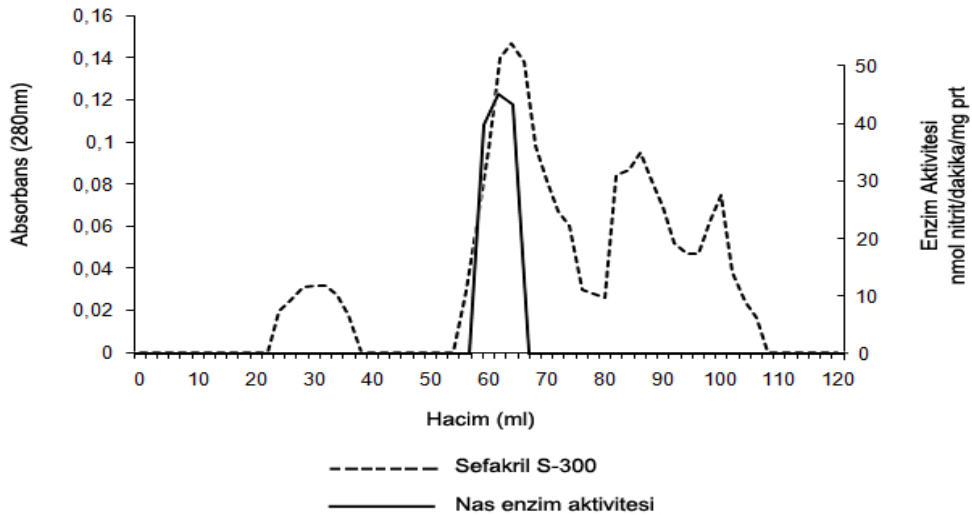


Şekil 3.15. DEAE-selüloz kromatogramı.

3.6.4. Sefakril S-300 Kolonu

Kolon 2 M NaCl içeren 50 mM fosfat tampon pH 7.3 ile dengelenmiştir. Kolon hacminin %2 si (DEAE kolonundan elde edilen enzim fraksiyonu 6 ml) kadar örnek yükledikten sonra 30ml/saat akış hızı ile aynı tampon ile elüsyon işlemi başlatılır. Fraksiyonlar 2 ml olacak şekilde toplanmıştır.

Yukarıda anlatılan işlemler AKTA Prime Plus cihazında da tekrarlanmıştır. Her fraksiyon için 280 nm de protein absorbansı ölçülmüş ve 4 adet pik elde edilmiştir. Fraksiyonlarda 58. ml'den itibaren nas enzim aktivitesi belirlenmiştir ve 3 tüpte toplam 6 ml örnek toplanmıştır..



Şekil 3.16. Sefakril S-300 Kolonu Kromatogramı.

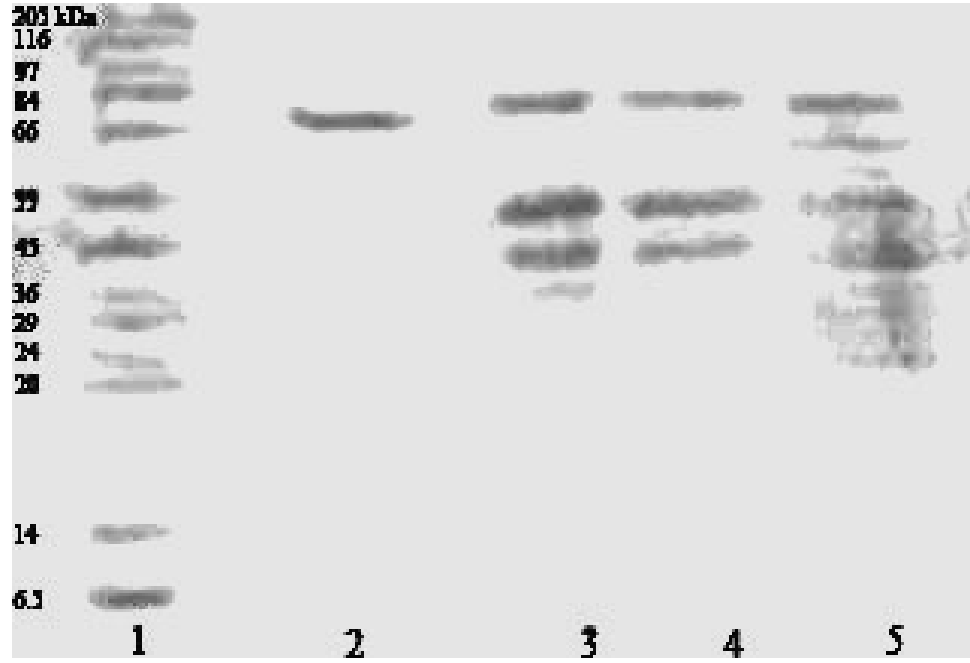
Tüm saflaştırma basamaklarının ardından ilk elde edilen homojenat örneğinden itibaren her bir saflaştırma basamağında saflaştırma derecesi artmaktadır. Son Sefakril S-300 kolonunun ardından örnek 69.7 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Enzimin saflaştırma basamakları

Adım	Hacim (ml)	Protein (mg/ml ⁻¹)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (mU/mg ⁻¹ protein)	İyileştirme (%)	Saflaştırma Derecesi
Homojenat	110	9	3,24	3.30x10 ⁻³	100	1
Sefaroz-4B	48	2,1	0,62	6.15x10 ⁻³	19,3	1,86
DEAE-selüloz	6	2,7	0,43	2,65x10 ⁻²	13,3	8,03
Sefakril S-300	1	0,7	0,16	0,23	4,93	69,7

3.7. SDS-PAGE ve Molekül Ağırlığının Tesbiti

Bu çalışmada NAS'ın moleküler ağırlığını belirlemek için Laemmli'nin tanımladığı SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Ayırım için %12'lik jel konsantrasyonu kullanılmıştır. Molekül ağırlığını karşılaştırmak için 205.000-6500 dalton arasında moleküler ağırlığa sahip proteinler içeren standart protein karışımı (Sigma S8445) kullanılmıştır. Her bir saflaştırma basamaklarından sonra elde edilen fraksiyon örneklerinden SDS-PAGE'ye yükleme yapılmıştır. Şekil 3.12.'de görüldüğü gibi saflaştırma basamaklarından sonra örnek tek bir bant olarak elde edilmiştir. *H. alexandrinus* Nas enziminin moleküler ağırlığı 72±1.8 kDa olarak bulunmuştur.



Şekil 3.17. *H. alexandrinus*'dan saflaştırılmış Nas Enziminin SDS-PAGE görüntüsü. 1. Standart protein markör, 2. Sefakril'den kolonundan elde edilen protein, 3. DEAE-selüloz kolonundan elde edilen protein, 4. Sefaroz 4B kolonundan elde edilen protein, 5. Ham ekstre

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nitrat redüksiyonu azot döngüsünde tarımsal, çevresel ve halk sağlığı açısından önemli rol oynayan bir işlemdir. Bakteri, fungi, algler ve yüksek bitkiler tarafından gerçekleştirilen asimile edici nitrat redüksiyonu her yıl 10^4 megaton inorganik azotun dönüşümünü sağlamaktadır (Moreno-Vivian ve ark. 1999). Nas azot asimilasyonunun anabolik arayolunda yer alan ilk enzimdir. Pek çok bakterinin bu enzimleri kodlayan Nas genlerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Gonzales ve ark. 2006). Bununla birlikte birçok arkea da nitratı asimile edici veya solunumsal arayollarla indirgeyebilmektedir (Moreno-Vivian ve ark. 1999).

Hipersalin çevrelerde yaşayan halofiller tuzun denatüre edici etkilerine dayanıklı olup birçok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmayı içermekte, çevresel ozmatik basıncı dengelemektedir. Özel karakterleri ve geniş çaplı kültürlerinin yapılabilmesi halofilik organizmaları biyoteknolojik açıdan da değerli kılmaktadır (DasSarma ve Arora 2001). Haloarkeal nitrat asimilasyonu biyokimyasal düzeyde ilk olarak Martinez-Espinosa ve ark. (2001) tarafından *Haloferax mediterranei*'de çalışılmıştır. Bu çalışma dışında halofilik arkeadaki nitrat asimilasyonu hakkında sınırlı bilgiler mevcuttur. Bir çok arkea nitratı asimile edici ve solunumsal arayollarla indirgeyebilse de anaerobik koşullarda gerçekleşen disimile edici nitrat redüksiyonu nitrat asimilasyonundan daha sıklıkla gerçekleşen bir işlemdir. Bu anlamda bu tez çalışması zorunlu aerob halofilik bir organizma olan *Haloferax alexandrinus* da nitrat asimilasyonunun biyokimyasının aydınlatılması açısından ayrı bir önem taşımaktadır.

Halobacteriacea üyeleri kırmızı renkli hücrelerle karakterizedir. Bu renk temel olarak bakterioruberinlerin varlığına bağlı olarak oluşmaktadır (Asker ve Ohta 2002a). Çalışmamızdaki ışık mikroskopik incelemelerde *H. alexandrinus* kırmızı renkli basil ve koklar olarak gözlenmiş gram boyama yöntemiyle gram negatif özellikte olduğu görülmüştür (Şekil 3.1).

H. alexandrinus'un maksimal besi ortamındaki kültür gelişim süresi Asker ve Ohta'nın tesbit ettiği gibi çalışmamızda da 7 günlük süre içerisinde gerçekleşmiştir (Şekil 3.2). 600 nm'de yapılan ölçümlerde kültür yoğunluğu takip edilmiş, kültür minimal besi ortamına aktarıldığında gelişim süresinin

değişmediği ancak kültür yoğunluğunun % 50 azalmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bunun nedeni maksimal besiyerinde aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve proteinlerin bulunmasıdır.

Minimal besiyerinden belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde Nas enzim aktivitesi takip edilmiş ve enzim aktivitesinin 5. günde gelişimin eksponansiyel fazında maksimuma ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 3.4). 5. günden itibaren enzim aktivitesinde azalma gözlenmektedir. Bu azalma besiyerindeki artan nitrit konsantrasyonuna bağlı olarak Nas enziminin kademeli olarak inhibe olmasından ileri gelmektedir. Nitrit, Nas enziminin bir inhibitörü olarak McDonald ve Coddington (1974) tarafından rapor edilmiştir.

Çalışmamızda minimal besiyerindeki nitrit miktarının zamana bağlı olarak arttığı, başlangıçta 0 olan nitritin kültür gelişimi sonlandığında 30 mM olduğu belirlenmiştir. Maksimum nitrit artışının 96 ile 120. saatler arasında 11 mM olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6). Bu süreler içindeki Nas enzim aktivitesinin maksimum olduğu gözlenmiştir.

Minimal besiyerindeki nitrat konsantrasyonunun ise nitrit konsantrasyonu ile ters orantılı olacak şekilde zamana bağlı olarak azaldığı, nitratın mikroorganizma tarafından aktif olarak kullanıldığı belirlenmiştir. 96 ve 120 saatler arasındaki nitrat konsantrasyonu 9 mM azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.5). En çok azalmanın başladığı 96-120. saatler arasında nas enzim aktivitesinin maksimum olduğu gözlenmiştir.

Minimal besiyerindeki azalan nitrat konsantrasyonu ve artan nitrit konsantrasyonu *H. alexandrinus*'un nas enziminin mevcut olduğunu ve enzimin aktif olduğunu göstermektedir.

Maksimum enzim aktivitesindeki hücre yoğunluğu 0,475 abs (600 nm'de) olarak belirlenmiştir. Bu değer Martinez-Espinosa ve ark. tarafından *H. mediterranei* için 0,9 abs (600 nm'de) olarak rapor edilmiştir. Bu farklılık göz önüne alındığında *H. alexandrinus*'un *H. mediterranei*'ye oranla daha düşük bir gelişim potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Bu iki türün aynı ekosistemde bir arada yaşadığı düşünüldüğünde *H. mediterranei*'nin baskın tür olduğu ve ortamda bulunan nitratı daha yoğun olarak tükettiği düşünülebilir. Bu durumda *H. alexandrinus*'un daha az miktarda nitrat kullanarak hayatta kalmayı başarabilmesi

gerekmektedir. Bu iki organizmanın benzer fizyolojik yapıya sahip olduğu düşünüldüğünde *H. alexandrinus*'un yaşamsal gereksinimi olan molekülleri sentezleyebilmek için ortamdaki nitratı daha aktif olarak kullanabilmesi bunun içinde substratına olan ilgisi *H. mediterranei*'ninkine oranla çok daha yüksek olan bir Nas enzimine sahip olması gerekmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu hipotezi hem ortaya çıkarır hem de doğrular niteliktedir. *H. alexandrinus* nitrat redüktazının Km değerleri nitrat ve MV için sırasıyla 0,045 mM ve 0.0065 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.12). Bu değerler *H. mediterranei* Nas'ının Km değerlerinin nitrat için yaklaşık 1/20 sı MV için ise 1/10'ü kadardır. Bu düşük Km değerleri *H. alexandrinus* Nas'ının *H. mediterranei*'ye oranla substratına olan ilgisi daha yüksek bir enzim olduğunun bir göstergesidir. Farklı organizmalarda çalışılmış olan diğer bazı nitrat redüktazlarda nitrat için belirlenen Km değerleri 0.1 ve 1.6 mM aralığındadır (Moreno-Vivian ve ark 1999, Alvarez-Ossorio ve ark 1992, Bickel Sandkötter ve Ufer 1995, Ken-Ichi ve Hochstein 1996). Çalışmamızda elde edilen bu değerler saflaştırılmış enzim ile çalışılarak belirlenmiştir.

Kinetik çalışmalar sonucu çizilen Michaelis-Menten grafiğinde enzimin hiperbolik bir eğri izlediği saptanmıştır (Şekil 3.10 ve şekil 3.12). Böyle bir eğri, *Haloferax mediterranei*'de de tesbit edilmiştir (Martinez-Espinosa, 2001.).

Enzimin biyokimyasal parametreleride saflaştırılmış enzim kullanılarak çalışılmıştır. Enzimin maksimum aktiviteyle çalışıldığı optimal koşulların belirlenebilmesi için değişen sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında aktivite takip edilmiştir. Çapraz olarak çalışılan sıcaklık ve tuz parametrelerinden elde edilen bulgular göz önüne alındığında artan tuz konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.7). Sıcaklık artışına bağlı olarak ise 1.0 M, 2.0 M ve 3.0 M'lık tuz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi 50 °C'de maksimuma ulaşmıştır. Ancak 0,5 M'lık tuz konsantrasyonunda enzim aktivitesi 40 °C'de maksimum olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7). Bu durumda artan tuz konsantrasyonu artan sıcaklık değerlerine karşı enzim aktivitesi için koruyucu bir rol oynamaktadır. Martinez-Espinosa ve ark. çalışmalarında *H. mediterranei* Nas'ı için optimum sıcaklığı 3.1 ve 2.2 M tuz konsantrasyonlarında 80 °C olarak belirlemişlerdir. 1.3 ve 0.9 M'lık tuz

konsantrasyonlarında ise maksimum aktivite 60 °C sıcaklıkta gözlenmiştir. Bu durumda yüksek tuz konsantrasyonlarında Nas enziminin aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda dahi korunabildiği çalışmamızdaki bulgularla örtüşecek şekilde Martinez-Espinosa ve ark. (2001) tarafından da rapor edilmiştir. *H. alexandrinus* Nas enzim aktivitesi 0.5 ve 3 M'lık tuz konsantrasyonları arasında çalışılmış artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak enzim aktivitesinde arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.7).

Değişen pH konsantrasyonlarında enzim aktivitesi takip edildiğinde maksimum aktivitenin pH 9.5'de meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3.8). Bu durum *H. alexandrinus* Nas'ının aktif merkezinde bazik karakterli aminoasitlerin varlığının bir göstergesidir. 5-11 arasında ölçülen pH değerlerinde aktivite pH 9.5'e kadar arttığı daha sonra azaldığı belirlenmiştir. *H. mediterranei* Nas'ı için optimal pH 9 olarak belirtilmiştir (Martinez-Espinosa ve ark. 2001). *Aspergillus nidulans* Nas'ı ise 7.5-8.0 arasında geniş bir optimum pH aralığına sahiptir (McDonald ve Coddington 1974). Yine *Rhodobacter capsulatus* Nas enziminin optimum pH değeri 9.5 olarak bulunmuştur (Pino ve ark. 2006). Bu veriler gösteriyor ki diğer türlerdeki Nas enzimlerinin aktif bölgelerinde bazik aminoasitler yer almaktadır.

H. alexandrinus'un izoelektrik nokta'sı ölçüldüğünde en çok çökelmenin pH 5.3'de gerçekleştiği tesbit edilmiştir (Çizelge 3.2). Proteinler amfoterik elektrolitlerdir. Protein molekülündeki serbest amino ve serbest karboksil grupları elektroliz edilebilir. Bu noktada protein negatif yüklü bir anyondur. Diğer yandan solüsyonun pH sı izoelektrik noktasından düşükse karboksil grubunun elektrolizi inhibe olur ve amino grubu elektroliz edilir. Bu noktada protein pozitif yüklü bir katyondur. Solüsyon belli bir pH değerinde olduğunda protein molekülündeki pozitif yüklerin sayısı negatif yüklerin sayısına eşittir. Bu nokta proteinin izoelektrik noktasıdır. Proteinin viskozitesi ve çözünübilirliği izoelektrik noktada azalır. Dolayısıyla pH 5.3 de Nas enziminin çözünübilirliği azalmış ve çökmüştür. Bu sonuçla proteinin aminoasit zincirinde asidik aminoasitlerin daha çok olduğu sonucuna varılabilir. Arkelerin halofil türlerinde asimile edici nitrat redüktaz enziminin izoelektrik pH'sı makalelerde bildirilmemekle birlikte, diğer canlı türlerinin asimile edici nitrat redüktaz türlerinin izoelektrik pH'ları 4.3-5.7

aralığında bildirilmektedir (Hipkin ve ark. 1986, Alef ve Klemme, 1979, Seki-Chiba ve Ishimoto 1977).

Haloferax alexandrinus Nas'ının inkübasyon periyoduna bağlı değişimi incelendiğinde, inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak enzim aktivitesinde 45. dakikaya kadar arttığı saptanmış ve daha sonra sabit olarak devam etmiştir (Şekil 3.9). Bu durum *Haloferax mediterranei* de 60. dakikaya kadar, *Azotobacter vinelandii*'de benzer sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Martinez-Espinosa ve ark. 2001, Gangeswaran ve ark. 1993). Bu sonuçlar, *H. alexandrinus* Nas enziminin diğer türlerle karşılaştırıldığında daha aktif olduğunu göstermektedir.

Paggi ve ark. (2007) farklı tuzların *Rhodobacter sphaeroides* nitrat redüktaz aktivitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında monovalent kationların (Na^+ , K^+) enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu, divalent kationların (Mg^{+2} , Ca^{+2}) ise inhibitör rolü oynadığını belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarda bu bulgularla paralel niteliktedir. Çalışılan KCl, MgCl_2 ve AlCl_3 tuzlarındaki enzim aktivitesi NaCl ile karşılaştırıldığında KCl kullanıldığında enzim aktivitesinin ortalama % 100'ün üzerinde arttığı, MgCl_2 ve AlCl_3 tuzları ile ise aktivitenin inhibe olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1). KCl için aynı benzer sonuçları Martinez-Espinosa ve ark. (2001) *H. mediterranei* içinde bulmuşlardır.

Enzim aktivitesi üzerine çeşitli inhibitörlerin (azid, siyanür, EDTA, DTT ve sülfid) etkileride araştırılmıştır. 1 mM'lık azid konsantrasyonunda %90'lık bir aktivite azalması gözlenirken (Çizelge 3.3). 1 mM'lık siyanür konsantrasyonunda %98'lik bir aktivite kaybı ile Nas enzimi neredeyse tamamen inhibe olmuştur (Çizelge 3.4). 1 mM'lık EDTA konsantrasyonunda ise % 52'lik bir aktivite kaybına neden olmuştur (Çizelge 3.5). McDonald ve Coddington (1974) *Aspergillus nidulans* asimile edici nitrat redüktazı için siyanür ve azidin sırasıyla %100 ve %90 oranında inhibitör etki gösterdiklerini ve nitritinde %50 inhibisyona neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra Martinez-Espinosa ve ark. (2001) *H. mediterranei* Nas'ının azid tarafından %79 ve siyanür tarafından ise %100 inhibe edildiğini, EDTA'nın ise % 43'lük bir aktivite kaybına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. 1 mM'lık DTT kullanıldığında enzim aktivitesinde

herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.6). *H. mediterranei* enzimide DTT inhibisyona uğramamaktadır. Ancak *H. mediterranei* Nas'ı sülfid tarafından inhibe edilmezken (Martinez-Espinosa ve ark. 2001) *H. alexandrinus* Nas'ı sülfid ile %30 oranında inhibe olmaktadır (Çizelge 3.7).

H. alexandrinus Nas enzimi sefaroze 4B, DEAE-selüloz ve sefakril S-300 kolonlarından geçirilerek saflaştırılmıştır. Bu işlemlerin sonucunda ilk olarak jel geçirgenlik kromatografisi olan sefaroze 4B kolonunda Nas enzimi 1.86 oranında moleküler büyüklüğüne göre saflaştırılmıştır. Sefaroze 4B kolonundan elde edilen örnek ikinci olarak iyon değiştirici kolon olan DEAE-Sellüloz kolonuna yüklenmiş ve moleküler yüklerine göre 8.03 oranında saflaştırılmıştır. Bu kolondan elde edilen örnek jel geçirgenlik kromatografisi olan ancak Sefaroze 4B'ye göre hassasiyeti daha iyi olan Sefakril S-300 kolonuna yüklenmiş ve ham ekstreye oranla 69.7 kat saf olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.8). *H. mediterranei* de yapılan benzer saflaştırmada 177 kat saf olarak elde edilmiştir (Martinez-Espinosa ve ark. 2001). *Haloarcula marismortui* de ise yaklaşık 40 kat saf elde edilmiştir (Yoshimatsu ve ark 2000). Elde edilen bu saf örnek kullanılarak enzimin moleküler özellikleri belirlenmiştir. SDS-PAGE analizleri sonucunda enzimin 72±1.8 kDa moleküler ağırlığında bir monomer olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.17). Nitrat redüktazlarla yapılan diğer çalışmalarda farklı türlerde farklı ağırlıklarda ve farklı yapılarda nitrat redüktazlar saflaştırılmıştır. Bunlardan bazıları, *H. mediterranei*'de heterodimerik (105 ve 50) (Martinez-Espinosa ve ark 2001), *Haloarcula marismortui*'de homotetramerik (63 kDa) (Yoshimatsu ve ark 2000), *Plectonema boryanum*'da (Ida ve Makami, 1983) monomerik 80 kDa ağırlığında asimile edici nitrat redüktazlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasının sonunda elde edilen bulgular ile *H. alexandrinus* Nas'ının biyokimyasal ve moleküler özellikleri ilk kez ortaya konmuştur. *H. alexandrinus* Nas'ı *H. mediterranei*'den sonra biyokimyasal ve moleküler özellikleri ortaya konan ikinci halofilik arkeal asimile edici Nas'ıdır. Bunun yanı sıra bu çalışma *H. alexandrinus* enziminin *H. mediterranei* enzimine oranla daha aktif bir enzim olduğunu ortaya koymaktadır. Kolay kültüre edilebilme özellikleri ve endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyeli ele alındığında halofilik asimile edici nitrat redüktazların karakterizasyonu önem taşımaktadır. Saflaştırılan ve

karakterize edilen enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanımına yönelik çalışmalar yapılması yararlı olacaktır. Bunun yanı sıra izole edilen yeni türler üzerinde de çalışmalar yapılarak daha yüksek aktiviteye sahip ve farklı koşullarda dayanıklılık gösteren enzimlerin izolasyonu önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Alef, K. Ve Klemme J.H., (1979) Assimilatory Nitrate Reductase of *Rhodopseudomonas capsulata* AD2: a molybdo-hemeprotein., *Z. Naturforsch C.* 34(1-2): 33-37.
- Alvarez-Ossorio, M., Muriana, F.J.G., De Le Rosa, F.F. ve Relimpio, A.M. (1992), Purification and Characterization of Nitrate Reductase from the Halophile Archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *Z. Naturforsch.* **47c**, 670-676.
- Asker, D. Ve Ohta, Y., (2002a), *Haloferax alexandrinus* sp. Nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt), *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**, 729-738
- Asker, D., Awad, T., Ohta, Y., (2002b) Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TM^T an extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon, *Jornal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 93, No:1, 37-43,
- Berks, B.C., Richardson, D.J., Reilly, A., Willis, A.C. ve Ferguson, S.J. (1995), The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.*, **309**, 983-992.
- Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M. and Mille, G. (1990), Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology*, 11; 260-263.
- Bickel Sandkötter, S. ve Ufer, M. (1995), Properties of a Dissimilatory Nitrate Reductase from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*. *Z. Naturforsch.* **50 c**, 365-372.
- Blasco, R., Castillo, F. y Martinez-Luque, M. (1997), The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus EIF1*, is a flavoprotein. *FEBS Lett.* **414**, 45-49.
- Bonete, M.J., Marhuenda-EGEA, F.C., Pire, C., Ferrer, J., Martinez-Espinosa, R.M., (2004), Nitrate Assimilation in Halophilic Archaea, *Halophilic Microorganisms*, Ed. Ventosa A.,

- Boone, D.R., Casstenholz, R. W. Ve Garrity, G. M. (eds.). (2001), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. Edn. New York. Springer
- Bradford, M., (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, D. J., Staley, J. T. ve Krieg, N. R. (2001), Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.I, The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, Garrity, G. M. (Man. Ed.), 2nd Ed. New York, Springer.
- Brown, J.R. ve Doolittle, W.F. (1995), Root of the universal tree of life based on ancient aminopacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**, 2441-45.
- Cabello, P., Roldan, M.D. ve Moreno-Vivian, C. (2004), Nitrate reduction and nitrogen cycle in archaea, *Microbiology*, Vol 150, s 3527-3546,
- Campbell, W.H. (2001), Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. *Cell Mol Life Sci* 58, 194-204.
- Campbell, W.H. ve Kinghorn, J.R. (1990), Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 315-319.
- Chaga, G, Porath, J. and Illéni, T. (1993), Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. *Biomedical chromatography*, 7; 256-261.
- Cutler, P. (2004), *Protein Purification Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 244, s 512, Humana Pres, New York.
- Danson, M. and Hough, D. W. (1997), The structural basis of protein halophilicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A (3); 307-312
- DasSarma, S. ve Arora, P. (2001), Halophiles, *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net.
- Doolittle. W. F. (1992), What are the archaebacteria and why are they important? *Biochemical Society Symposium* 58: 1-6.

- Emerson, D., Chauhan, S., Oriol, P. and Breznak, J. A. (1994), *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. Arch. Microbiol., 161; 445-452.
- Fernández, E., Galvan, A. ve Quesada, A. (1998), Nitrogen assimilation and its regulation. pp. 637-659. Editado por Rochaix, J.D. En: The molecular biology of chloroplast and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Franco, A.R., Cárdenas, J. ve Fernández, E. (1984), Ammonium (methylammonium) is the co-repressor of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett. **176**, 453-456.
- Gangeswaran, R., Lowe, D.J. ve Eady, R.R. (1993), Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*, Biochem. J., 289, 335-342.
- Giovannoni, S.J. ve Stingl, U. (2005), Molecular diversity and ecology of microbial plankton. Nature 437: 343-348.
- Gonzalez, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D. ve Moura, J.J.G., (2006), Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction, Journal of Inorganic Biochemistry, 100, 1015-1023.
- Grant, W. D, Gemmell, R.T. ve McGenity, T. J. (1998), Halobacteria: the evidence for longevity. Extremophiles, 2; 279-287.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. ve Ventosa, A. (2001), Order I. Halobacteriales In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.I, The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Garrity, G. M. (Man. Ed.), 2nd Ed. New York, Springer,
- Guerrero, M.G. ve Lara, C. (1987), Assimilation of inorganic nitrogen. pp. 163-186. Editado por Fay, P. En: The cyanobacteria. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. ve Losada, M. (1981), The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. **32**, 169-204.
- Harborne, N.R., Griffiths, L., Bushy, S.J.W. ve Cole, J.A. (1992), Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon. Mol. Microbiol. **6**, 2805-2813.

- Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A., Eberhardt, R. and Steinbüchel, A. (2000), Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54; 319-325.
- Hipkin, C.R., Ali, A.H., ve Cannons, A., (1986), Structure and Properties of Assimilatory Nitrate Reductase from the Yeast *Candida nitratophila*, *Journal of General Microbiology*, 132, 1997-2003.
- Hochstein, L.I. ve Lang, F. (1991), Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 380-385.
- Hough, D. W. and Danson, M. J. (1989), Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. *Letters in Applied Microbiology*, 9; 33-39.
- Hough, D. W. ve Danson, D. J. (1999), Extremozymes. *Curr. Opin. In Chem. Biology*, 3; 39-46.
- Howland, John L. (2000), *The Surprising Archaea: Discovering Another Domain of Life*. Oxford: Oxford University Press
- Ida, S. ve Mikami, B., (1983), Purification and Characterization of Assimilatory Nitrate reductase from the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*, *Plant and Cell Physiology*, Vol: 24, No. 4, sf. 649-658
- Jaffe, W.G., (1943), A simple method for the approximate estimation of the isoelectric point of soluble proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 185-186.
- Jones, G., Ewing, C. M. ve Melvin, M. V. (1981), Biotechnology of solar saltfield. *Hidrobiologia*, 82; 391-406.
- Kazan, D., (1997), *Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar*, Lisans Üstü Yaz Okulu, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Grubu, sayfa 151-186.
- Ken-Ichi, I. ve Hochstein, L.I., (1996), The purification and properties of a copper nitrite reductase from *H. denitrificans*., *Curr. Microbiol.*, 32, 72-76.

- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E. ve Ketchum, K.A. (1997), The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 365-370.
- Kushner, D. (1985), The Halobacteriaceae...(Ed: Woese, C.R. and Wolfe, S. (ed), The bacteria. Vol 8, 171-214 Academic press. London
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lake, J.A. (1988), Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. *Nature* 331: 184–186.
- Lillo, J. G. and Rodriguez-Valera, F. (1990), Effects of culture conditions on poly (β - hydroxybutiric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 56 (8); 2517-2521.
- Lin, J.T., Goldman, B.S. ve Stewart, V. (1994), The nasFEDCBA operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **176**, 2551-2559.
- Litchfield, C. D. (2002), Halophiles. *J. Industrial microbiol. And biotechnol.*, 28; 21-22.
- Luque, I., Flores, E. ve Herrero, A. (1993), Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1201-1205.
- Madigan MT, Martinko JM ve Parker J (2000), *Biology of Microorganisms*. Pentice- Hall International, London, s 681-685.
- Margesin, H. and Schinner, F. (2001), Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5; 73-83.
- Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C. ve Bonete, M. J., (2001), Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterisation, *FEMS Microbiology Letters*, Vol 204, 381-385.
- McDonald, D.W. ve Coddington, A., (1974), Properties of the Assimilatory Nitrate Reductase from *Aspergillus nidulans*, *Eur. J. Biochem*, 46, 169-178.

- Mikami, B. ve Ida, S. (1984), Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Biochim. Biophys. Acta **791**, 294-304.
- Moreno-Vivian, C., Cabello P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. ve Castillo F., (1999), Procaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases, Journal of Bacteriology, vol. 181., No 21, p. 6573-6584
- Mutlu, M. B (2006), Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Mutlu, M. B., Martínez-García, M.; Santos, F., Peña., A., Guven, K.; Antón, J., (2008), Procaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey, FEMS Microbiology Ecology, Vol. 65, Number 3, p. 474-483.
- Oren, A. (2001),. The Order Halobacteriales. In: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Oren. A. (2002). Halophilic microorganism and their environments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Paggi, R.A., De Castro, R.E., Kerber, N.L., ve Garcia, A., (2007), Effect of salts on the activity of nitrate reductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SW, Journal of Basic Microbiology, 35, 1, 47-52.
- Parolis, H., Parolis, L. A. S., Boan, I. F., Rodriguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M. C., Jansson, P. E. ve Sutherland, I. W. (1996), The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). Carbohydr. Res., 295, 147-156.
- Pino, C., Olmo-Mira, A., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Castillo, F., Roldan, M.D., ve Moreno-Vivian, C., (2006), The Assimilatory Nitrate Reduction

System of the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*,
Biochemical Society Transactions, 34:127-129.

- Post, F. J. and Collins, N. F. (1982), A preliminary investigations of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. J. Food Biochem., 6; 25-38.
- Raju, K.S., Sharma, N.D. ve Lodha, M.L. (1996), Inhibition of assimilatory nitrate uptake by ammonium ions in *Azorhizobium caulinodans* IRBG46. J. Plant Biochem. Biotech. **5**, 119-121.
- Richardson, D.J., (2001), Introduction: nitrate reduction and the nitrogen cycle, Cell., Mol. Life Sci., **58**, 163-164
- 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.
- Rodriguez-Valera, F. (1992), Biotechnological potential of halobacteria In: The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology, Danson M. J., Hough, D. W. and Lunt, G. G. (Ed.), The Biochemical Society, Portland Press, London.
- Rubio, L.M., Herrero, A. ve Flores, E. (1996), A cyanobacterial narB gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. Plant Mol. Biol. **30**, 845-850.
- Seki-Chiba S.. ve Ishimoto, M., (1977), Studies on Nitrate Reductase of *Clostridium perfringens*, J. Biochem. Vol. 82, No. 6, 1663-1671.
- Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. (1999), Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. Enzyme and Microbial Biotech., 25; 471-482.
- Sengupta, S., Shaila, M.S. ve Rao, G.R. (1996), Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. Biochem. J. **331**, 147-155.
- Shand, R. F. ve Perez, A. M. (1999), Haloarchaeal growth physiology IN: J. Seckbah (Ed.) Enigmatic microorganisms and life in extreme environments, Kluwer Academic Publisher Dordrecht, 414-424
- Snell, C.D. ve Snell, C.T. (1949), Colorimetric Methods of Analysis, 2, p. 802-807. Van Nostrand, New York.

- Solomonson, L.P. ve Balber, M.J. (1990), Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **41**, 225-253.
- Stewart, V. (1994), Regulation of nitrate and nitrite reduction in enterobacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **66**, 37-45.
- Stuart, E. S., Morshed, F, Sremac, M. and DasSarma, S. (2001), Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic archaea. *J. Biotech.*, 88; 119- 128.
- Tapia, M.I., Llama, M.J. ve Serra, J.L. (1995), Active glutamine synthetase is required for ammonium- or glutamine-promoted prevention of nitrate and nitrite reduction in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Physiol. Plantarum* **94**, 241-246.
- Ventosa, A. ve Nieto, J. J. (1995), Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11; 85-94.
- Viñepla, B., Maestre, C. y Figueroa, F.L. (2000), Effect of ultraviolet radiation on nitrate reductase activity in marine microalgae. pp. 337. Editado por Cánovas, F.M. En: *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular*. Servicio de Publicaciones e intercambio científico de la Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Volkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S. ve Trincone, A. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2918-2926.
- Werber, M.M. ve Mevarech, M. (1978), Induction of a dissimilatory reduction pathway of nitrate in halobacterium of the Dead Sea. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 60-65.
- Woese C. ve Fox G. (1977), "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.". *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (11): 5088–90.
- Woese, C. R. (1999), *Prokaryote Systematics. The evolution of a science in: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications*, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).

- Woese, C.R ve Wolfe, R.S (1985), *The Bacteria, A Treatise on Structure and Function*, Vol. VIII, Academic Pres, Orlando, FL
- Woese, C.R., KANLER, O. ve WHEELIS M.L. (1990), Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4576-4579.
- Wolfgang, L. ve Klenk H-P. (2001), Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.I, The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, Garrity, G. M. (Man. Ed.), 2nd Ed. New York, Springer.
- Yoshimatsu, K., Sakurai, T. ve Fujiwara, T. (2000), Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a dinitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. *FEBS Lett.* **470**, 216-220.
- Zumft, W.G. (1997), *Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616.