

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR OLAN
Pseudomonas halophila DSM 3050 VE
Haloarcula hispanica ATCC 33960'da
GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST)
ENZİMİNİN OPTİMİZASYONU VE
SPESİFİK AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ

Ayşe ÇAKIR
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak-2012

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından Hızlı Destek Programı (1002)
kapsamında desteklenmiştir. Proje No: 210T135

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Çakır'ın “Halofilik mikroorganizmalar olan *Pseudomonas halophila* DSM 3050 ve *Haloarcula hispanica* ATCC 33960’da glutatyon S-transferaz (GST) enzimin optimizasyon ve spesifik aktivitesinin belirlenmesi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 27.12.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yard. Doç. Dr. Elif ÖZTETİK	
Üye :	Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye :	Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ	
Üye :	Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN	
Üye :	Yard. Doç. Dr. S. Belgin İŞGÖR	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR OLAN *Pseudomonas halophila* DSM 3050 VE *Haloarcula hispanica* ATCC 33960'da GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN OPTİMİZASYONU VE SPESİFİK AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe ÇAKIR

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Elif ÖZTETİK
II. Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

2012, 93 sayfa

Bu çalışmada halofilik bakteri *Pseudomonas halophila* DSM 3050 ve halofilik arke *Haloarcula hispanica* ATCC 33960'da GST aktivitesinin karakterizasyonu yapılmıştır. GST enzim aktivitesinin belirlenmesi, substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) varlığında spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. %25 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde gelişen *P. halophila* için pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu, 50 µg protein, 1.0 mM CDNB, 4.0 mM kofaktör glutatyon (GSH) ve 25°C enzim maksimum aktivite gösterdiği optimum koşullar olarak belirlenmiştir. *H. hispanica* için ise maksimum aktivite alınan koşullar %25 tuz konsantrasyonu, pH'sı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu, 50 µg protein, 1.0 mM CDNB, 1.0 mM GSH ve 25°C olarak gözlenmiştir. Optimize koşullar altında mikroorganizmaların GST aktiviteleri ölçülmüştür. *P. halophila* GST spesifik aktivitesinin ortalama 53.48 nmol/dk/mg ve *H. hispanica* GST spesifik aktivitesinin ortalama 19.68 nmol/dk/mg olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ANOVA, Duncan ve student-t testleri yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek enzimin CDNB ve GSH'a karşı kinetik özellikleri belirlenmiştir. *P. halophila* GST aktivitesinin CDNB'ye karşı K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.52 mM, 80.65 nmol/dk/mg ve GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.89 mM, 81.30 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. *H. hispanica*'da CDNB'ye karşı GST aktivitesinin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.46 mM ve 27.93 nmol/dk/mg; GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0.13 mM ve 22.03 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri de çizilmiş ve bu grafiklerden elde edilen sonuçların Lineweaver-Burk grafiğinden alınan sonuçlar ile uyumlu oldukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas halophila*, *Haloarcula hispanica*, GST, CDNB, GSH, optimizasyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

**DETERMINATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE SPECIFIC
ACTIVITY AND OPTIMIZATION OF ENZYME IN HALOPHILIC
MICROORGANISMS *Pseudomonas halophila* DSM 3050 AND
Haloarcula hispanica ATCC33960**

Ayşe ÇAKIR

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Elif ÖZTETİK

Co-supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

2012, 93 pages

In this study, characterizations of GST activities in halophilic bacterium *Pseudomonas halophila* DSM 3050 and halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 were carried out. Determination of GST enzyme activity was conducted spectrophotometrically in presence of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. Optimum conditions for maximum activity were determined as 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5), 50 µg protein, 1.0 mM CDNB, 4.0 mM cofactor glutathione (GSH) and 25°C for *P. halophila* growing at medium with a salt concentration of 25%. Optimum conditions obtained for maximum activity of *H. hispanica* were observed as 25% salt concentration, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 50 µg protein, 1.0 mM CDNB, 1.0 mM GSH and 25°C. Cytosolic GST activities of both microorganisms were measured under optimized conditions. The average activity of *P. halophila* and *H. hispanica* was determined as 53.48 nmol/dk/mg and 19.68 nmol/dk/mg, respectively. The results were analyzed statistically by ANOVA, Duncan and student-t tests. Kinetic properties of the enzyme against CNDB and GSH were determined by drawing Lineweaver-Burk plot. K_m and V_{max} values of *P. halophila* GST activity against CDNB were calculated as 0.52 mM, 80.65 nmol/dk/mg and against GSH they were found as 1.89 mM, 81.30 nmol/dk/mg, respectively. K_m and V_{max} values of *H. hispanica* GST activity towards CDNB were determined as 0.46 mM and 27.93 nmol/dk/mg and towards GSH they were calculated as 0.13 mM ve 22.03 nmol/dk/mg, respectively. Hanes-Woolf and Eadie-Hofstee plots were also drawn and it was seen that the results from these plots were in co-relation with the results acquired from Lineweaver-Burk plot.

Keywords: *Pseudomonas halophila*, *Haloarcula hispanica*, GST, CDNB, GSH, optimization

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez çalışma konumun belirlenmesi ve tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif ÖZTETİK'e ve ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmada kullanılan organizmaları temin ederek bölümümüz kültür koleksiyonunda yer almalarını sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Burçin MUTLU'ya;

Deneysel çalışmalarındaki ve tez yazım aşamasındaki yardımlarından ve manevi desteklerinden dolayı Dr. Ayşe AK, arkadaşlarım Sinem DABAĞOĞLU ve Mehmet YAŞAR, lisans öğrencileri Narin ULUDAĞ ve Emel KENÇ'e;

Yüksek lisans sürecimde verdikleri manevi desteklerinden dolayı tüm laboratuvar arkadaşlarım ve ev arkadaşşıma;

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Ayşe ÇAKIR

Ocak, 2012

Babama...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Halofil Kavramı.....	2
1.2. Hipersalin Ortamlar.....	3
1.3. Halofilik Mikroorganizmalarda Osmotik Adaptasyon.....	5
1.4. Halofilik Enzimler.....	6
1.4.1. Halofilik arkelerin enzimlerinin ‘halofilik’ özellikleri.....	7
1.4.2. Halofilik bakterilerin enzimlerinin ‘halofilik’ özellikleri.....	8
1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Açıdan Önemi.....	9
1.5.1. Halofilik arkeler ile ilgili biyoteknolojik uygulamalar.....	10
1.5.2. Halofilik bakteriler ile ilgili biyoteknolojik uygulamalar.....	12
1.6. <i>Pseudomonas halophila</i> ’nın Taksonomisi.....	15
1.7. <i>Pseudomonas halophila</i> ’nın Genel Özellikleri.....	15
1.8. <i>Haloarcula hispanica</i> ’nın Taksonomisi.....	16
1.9. <i>Haloarcula hispanica</i> ’nın Genel Özellikleri.....	16
1.10. Glutatyon S-transferaz Enzim Ailesi.....	17
1.10.1. Bakteriyel GST’ler.....	18
1.10.1.1. Bakteriyel GST’lerde sınıflandırma ve filogenetik ilişkiler.....	19
1.10.1.2. Bakteriyel GST’lerin işlevleri.....	23

2. MATERİYAL VE METOT	26
2.1. MATERİYAL.....	26
2.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	26
2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	26
2.1.2.1. %20 Deniz Suyu (SW) (g/l).....	26
2.1.2.2. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l).....	27
2.1.2.3. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l).....	27
2.1.2.4. %20 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri.....	28
2.1.2.5. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri.....	28
2.1.2.6. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri.....	29
2.1.3. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar.....	29
2.2. METOT.....	30
2.2.1. Mikroorganizmaların çoğaltılması.....	30
2.2.2. Mikroorganizmaların Modifiye Gram boyama yöntemiyle boyanması.....	30
2.2.3. Mikroorganizmalardan enzim ekstraksiyonu.....	30
2.2.3.1. <i>Pseudomonas halophila</i> 'dan enzim ekstraksiyonu.....	30
2.2.3.2. <i>Haloarcula hispanica</i> 'dan enzim ekstraksiyonu.....	31
2.2.4. Mikroorganizmaların toplam protein içeriklerinin belirlenmesi.....	31
2.2.5. Mikroorganizmaların GST aktivitelerinin belirlenmesi.....	33
2.2.6. İstatistiksel analiz.....	35
3. BULGULAR	36
3.1. Mikroorganizmaların Gram Reaksiyonları.....	36
3.2. Mikroorganizmaların Toplam Protein İçeriklerinin Tayini.....	36
3.3. <i>Pseudomonas halophila</i> GST Aktivitesinin Karakterizasyonu.....	37
3.3.1. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	37
3.3.2. Enzim miktarının <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	39
3.3.3 pH'nın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	41

3.3.4. Sıcaklığın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	43
3.3.5. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	45
3.3.6. Kofaktör redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	49
3.4. <i>Haloarcula hispanica</i> GST Aktivitesinin Karakterizasyonu.....	53
3.4.1. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	53
3.4.2. Enzim miktarının <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	56
3.4.3. pH'nın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	58
3.4.4. Sıcaklığın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	60
3.4.5. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	62
3.4.6. Kofaktör redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	66
4. TARTIŞMA	70
5. SONUÇLAR	80
6. KAYNAKLAR	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. 16S rRNA gen dizisine dayalı evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaç içindeki dağılımı.....	3
2.1. BSA için standart kalibrasyon eğrisi.....	32
3.1. Mikroorganizmaların modifiye gram boyama sonrası ışık mikroskopundaki (100x) görüntüleri.....	36
3.2. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	38
3.3. Enzim miktarının <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	39
3.4. pH'nın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	41
3.5. Sıcaklığın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	43
3.6. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	46
3.7. Substrata (CDNB) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	46
3.8. Substrata (CDNB) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği.....	47
3.9. Substrata (CDNB) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği.....	47
3.10. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisi.....	50
3.11. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	50
3.12. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği.....	51
3.13. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği.....	51
3.14. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	54
3.15. Enzim miktarının <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	56

3.16. pH'nın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	58
3.17. Sıcaklığın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	60
3.18. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	63
3.19. Substrata (CDNB) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	63
3.20. Substrata (CDNB) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği.....	64
3.21. Substrata (CDNB) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği.....	64
3.22. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisi.....	67
3.23. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	67
3.24. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği.....	68
3.25. Kofaktöre (GSH) karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Sitozolik GST sınıfları ve biyolojik fonksiyonları.....	19
2.1.	Amonyum Sülfat Tamponu (pH 7.4).....	31
2.2.	Alkalın bakır reaktifi.....	32
2.3.	Lowry yöntemi ile total protein tayini.....	33
2.4.	GST optimizasyonunda kullanılan parametreler.....	34
2.5.	Spektrofotometrik GST enzim aktivitesi deneyi koşulları.....	34
3.1.	Tuz konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin istatistiksel analizi.....	38
3.2.	Enzim miktarının <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	40
3.3.	Enzim miktarının <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	40
3.4.	pH'ın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	42
3.5.	pH'ın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	42
3.6.	Sıcaklığın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	44
3.7.	Sıcaklığın <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	44
3.8.	Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre CDNB'ye karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin kinetik parametreleri.....	45
3.9.	Substrat (CDNB) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	48
3.10.	CDNB konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	48
3.11.	Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre GSH'a karşı <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesinin kinetik parametreleri.....	49

3.12. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	52
3.13. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun <i>Pseudomonas halophila</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	52
3.14. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	55
3.15. Besiyeri tuz konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	55
3.16. Protein konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	56
3.17. Protein konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	56
3.18. pH'ın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	59
3.19. pH'ın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	59
3.20. Sıcaklığın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	61
3.21. Sıcaklığın <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	61
3.22. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre CDNB'ye karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin kinetik parametreleri.....	62
3.23. CDNB konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	65
3.24. CDNB konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	65
3.25. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre GSH'a karşı <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesinin kinetik parametreleri.....	66
3.26. GSH konsantrasyonunun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi.....	69

3.27. GSH konsantrasyonun <i>Haloarcula hispanica</i> GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi.....	69
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5'GMP	: 5'guanilik asit
BSA	: Sığır serum albumin
C	: Sitozin
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
cGST	: Sitozolik glutatyon S-transferaz
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat penta hidrat
Cu-OOH	: Kümen hidroperoksit
DCMD	: Diklorometan dehalojenaz
DCNB	: 1,2-dikloro-4-nitrobenzen
DDT	: Dihiothreitol
DHAR	: Glutatyon-bağımlı dehidroaskorbat redüktaz
EA	: Etakrinik asit
FDNB	: 1-floro-2,4-dinitrobenzen
g/l	: Gram/litre
G	: Guanin
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-transferaz
HCCA	: 2-hidroksikromen-2-karboksilik asit
K	: Potasyum
KCl	: Potasyum klorür
kD	: Kilo dalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
KOH	: Potasyum hidroksit
M	: Molar
MAA	: Maleilasetoasetat

MAPEG	: Eikozanoid ve glutatyon metabolizması proteinleri
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂ .6H ₂ O	: Magnezyum klorür hekza hidrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
mM	: Milimolar
MP	: Maleilpirüvat
Na	: Sodyum
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaBr	: Sodyum bromür
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
nmol	: Nanomol
PHA	: Poli-β-hidroksi alkonat
PNCB	: <i>p</i> -nitrobenzil klorid
SOD	: Süperoksit dismutaz
SW	: Deniz suyu
TCHQD	: Tetrakloro-hidrokinon dehalojenaz
V_{max}	: Maksimum hız
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
ζ	: Zeta
θ	: Teta
λ	: Lambda
μ	: Mu

μm	: Mikrometre
σ	: Sigma
τ	: Tau
φ	: Phi
χ	: Chi
ω	: Omega

1. GİRİŞ

Hayvan, bitki ve bakterilerin detoksifikasyon mekanizmalarında önemli rol oynayan glutatyon *S*-transferazlar (GST'ler), glutatyonun (GSH) çok sayıda aktif molekülün elektrofilik merkezleri ile konjugasyonunu katalizleyen multifonksiyonel bir enzim ailesidir (Jung ve ark. 1996). GSH serbest radikallerin, elektrofilik bileşiklerin ve metallerin toksik etkilerini gidererek, redoks ortamının devamını sağlamaya (Schafer ve Buettner 2001) ve hücreleri çevresel streslerden korumaya yardımcı olmaktadır (Dickinson ve Forman 2002).

Bakteriyel GST'ler ksenobiyotiklerin biyodegradasyonu, kimyasal ajanlara ve oksidatif strese karşı savunma ve antimikrobiyal ilaç dirençliliği gibi çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır. Detoksifikasyondaki rollerinin yanı sıra diklorometanın biyotransformasyonu, lignin ve atrazin degradasyonu ve pentaklorofenolün indirgeyici deklorinasyonu gibi birçok metabolik süreçte yer almaktadır (Allocati ve ark. 2009).

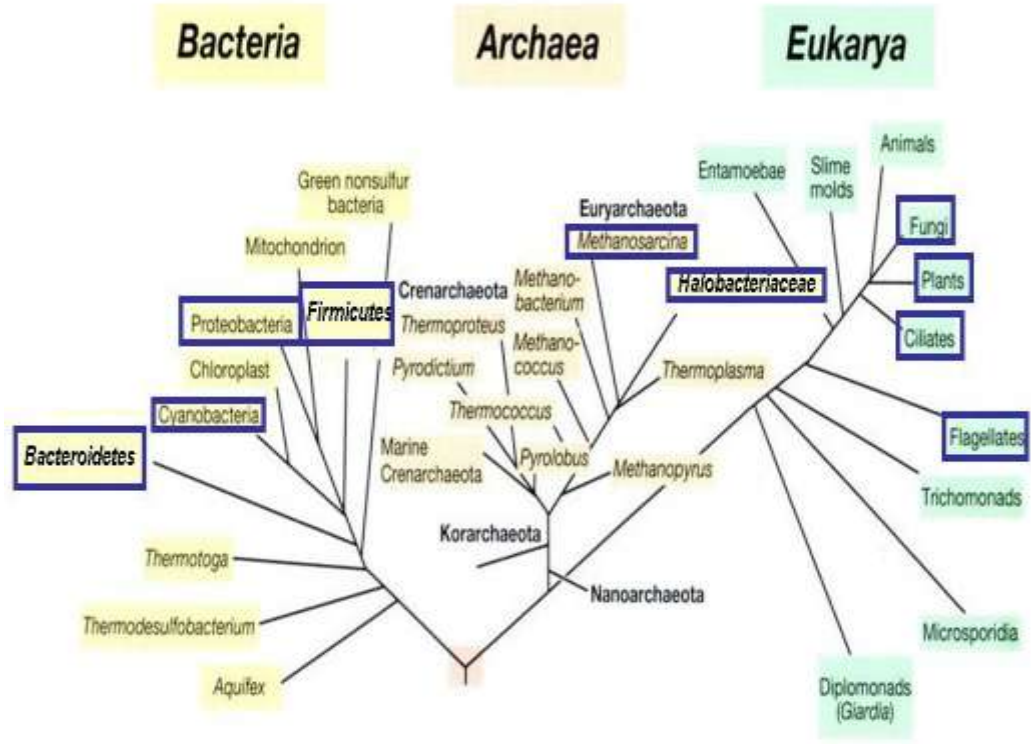
Halofilik mikroorganizmalar, osmotik dengeyi korumadaki yetenekleri sayesinde yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşama uyum sağlamışlardır. Çevre ile izotonik hale gelene kadar sodyum klorür ve potasyum klorür gibi tuzları hücrelerinde biriktirirler. Bu nedenle halofillerin proteinleri çok yüksek tuz konsantrasyonlarıyla başa çıkabilmelidir (Danson ve Hough 1997; Demirjian ve ark. 2001). Bu çevresel strese adapte olmuş enzimler hücre yüzeylerinde nispeten fazla miktarda negatif yüklü aminoasit bulundurarak presipitasyona engel olurlar. Dolayısıyla düşük tuz konsantrasyonuna sahip ortamda halofilik enzimlerin çözünürlükleri genellikle düşüktür (Madern ve ark. 2000).

1.1.Halofil Kavramı

Halofilik teriminin kesin bir tanımı yoktur. Deniz kökenli olup ‘halophilus’ (ya da halophila, halophilum) spesifik epitetine sahip olan ancak deniz suyundan daha yüksek tuz konsantrasyonlarına toleranslı olmayan oldukça fazla sayıda bakteri vardır. *Aestuariusbacter halophilus*, *Algoriphagus halophilus* (*Hongiella halophila*), *Arcobacter halophilus*, *Microbacterium halophilum*, *Terribacillus halophilus* bu bakterilere örnek olarak verilebilir. Oren (2008), deniz mikroorganizmalarını tanımlamak için spesifik epitet olan halophilus’un kullanılmamasını, bu sıfatın aşırı tuz konsantrasyonlarına sahip ortamlardaki yaşama adapte olmuş gerçek halofiller için kullanılmasını önermiştir. Gelişim için gerekli olan minimum tuz konsantrasyonu, optimum tuzluluk ve tolere edilen tuz miktarının üst limiti, halofilin ne olduğunu keskin sınırlarla tanımlamayı neredeyse imkansız kılar. Ayrıca minimum, optimum ve maksimum tuz konsantrasyonları genellikle diğer ortam bileşenlerine ve büyüme sıcaklığına bağlı olarak değişebilmektedir.

En yaygın kullanılan halofil tanımları yaklaşık otuz yıl önce Kushner (1978) tarafından formüle edilmiştir: Aşırı halofiller (2.5-5.2 M tuzda en iyi gelişim gösterenler), sınıra yakın aşırı halofiller (1.5-4.0 M tuzda en iyi gelişim gösterenler), ılımlı halofiller (0.5-2.5 M tuzda en iyi gelişim gösterenler) ve mutlak bir tuz ihtiyacı göstermeyen fakat oldukça yüksek tuz konsantrasyonlarında iyi bir gelişim sergileyen halotolerant mikroorganizmalar (2.5 M ve daha yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterenler aşırı halotolerant olarak kabul edilirler). Bu bilgiler ışığında halofil mikroorganizmalar, 50 g/l (0.85 M NaCl) ya da daha yüksek tuz konsantrasyonlarında en iyi şekilde gelişim gösteren ve en az 100 g/l (1.7 M NaCl) tuza toleransı olan mikroorganizmalardır (Oren 2008).

16S (küçük alt ünite) rRNA dizisine göre oluşturulan yaşamın filogenetik ağacı içerisinde halofillerin dağılımı incelendiğinde halofil temsilcilerinin üç alemde de bulunduğu görülmektedir (Oren 1999).



Şekil 1.1. 16S rRNA gen dizisine dayalı evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaç içindeki dağılımı. En az bir halofilik temsilciye sahip gruplar mavi kutularla işaretlenmiştir (Oren 2008).

1.2. Hipersalin Ortamlar

Yeryüzünde halofilik mikroorganizma çeşitliliğini destekleme yeteneğine sahip birçok hipersalin (aşırı tuzlu) ortam bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri Büyük Tuz Gölü, Lut Gölü, solar tuzlalar ve alkalın hipersalin göllerdir. Ayrıca yeraltı kristal kaya tuzu depoları ve tuz madenleri de bu tip mikroorganizmalar için benzersiz nişlerdir (Vreeland ve ark. 1998; Vreeland ve ark. 2000; Stan-Lotter ve ark. 2004). Türkiye'deki hipersalin ortamlara Tuz gölü, Ankara; Acı Göl, Denizli; Çamaltı Tuzlası, İzmir; Tuzla Gölü, Kayseri; Seyfe Gölü, Kırşehir; Salda Gölü, Burdur; Bolluk ve Meke Gölü, Konya örnek olarak verilebilir.

Dünya üzerindeki salin ve hipersalin habitatların özelliklerindeki çeşitlilik, mevcut koşullar altındaki yaşama adapte olmuş mikrobiyal kominitelerde de büyük bir çeşitliliğe neden olmaktadır. Hipersalin ortamların çoğu deniz suyunun buharlaşması ile oluşur ve ‘talassohalin’ adını alır. Bunların tuz bileşimi deniz suyu ile benzerdir: Sodyum ve klorür hakim iyonlardır, pH’ları nötr ile hafif alkali arasındadır. Buharlaşma devam ettiğinde, kalsiyum sülfat ve diğer minerallerin çökmesinden dolayı iyonik kompozisyonda bazı değişiklikler meydana gelir. NaCl bakımından doymuş haldeki talassohalin sular barındırdıkları çok sayıdaki pigmentli mikroorganizma nedeniyle parlak kırmızı renge boyanırlar (Oren 2002a).

İyonik bileşimi deniz suyundan büyük ölçüde farklılık gösteren ‘atallassohalin’ hipersalin ortamlar da talassohalin ortamlara benzer bir mikroorganizma popülasyonuna sahiptir. Bu yapıdaki ortamlara en iyi örnek iki değerlikli katyon (yaklaşık olarak 1.9 M Mg^{+2} ve 0.4 M Ca^{+2}) içeriğinin tek değerlikli katyonlardan (1.6 M Na^{+} ve 0.14 M K^{+}) fazla olduğu ve nispeten düşük pH değerine (yaklaşık 6.0) sahip Lut Gölü’dür (Oren 2002a). Mikrobiyal yaşam yüksek tuz konsantrasyonları ile oldukça yüksek pH değerlerinin kombine halde bulunduğu ortamlara da uyum sağlamıştır. 11 ya da daha yüksek pH değerlerine ve 300 g/l’yi aşan tuz konsantrasyonlarına sahip olan Afrika, Hindistan, Çin ve diğer ülkelerdeki alkalın soda göllerinde çok sayıda canlı barınmaktadır. Tunus’taki tuz gölünden anaerobik *Halothermothrix orenii*’nin izolasyonu ile mikroorganizmaların eş zamanlı olarak yüksek tuz konsantrasyonu (200 g/l’den fazla) ve yüksek sıcaklığa (68°C’den fazla) dahi dayanıklı oldukları görülmüştür (Cayol ve ark. 1994).

1.3. Halofilik Mikroorganizmalarda Osmotik Adaptasyon

Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar, yüksek tuz konsantrasyonunda yaşamlarına devam edebilmek için dış ortam ile en azından izotonik bir sitoplazma sağlamak zorundadırlar; bir turgor basıncı sağlandığında sitoplazma en azından bir miktar hiperosmotik olmalıdır (Oren 2002a).

Osmotik dengeyi sağlamak için esas olarak iki farklı strateji bulunmaktadır (Ma ve ark. 2010). İlk seçenek olan ‘high-salt-in’ yüksek hücre içi iyonik konsantrasyonun (dominant katyon olarak Na^+ ’dan ziyade K^+) korunması ve yüksek tuz varlığında fonksiyon gösterebilmek için hücre içi enzimatik mekanizmaların tümünün adaptasyonunu kapsar ve Halobacteriaceae familyasındaki halofilik Arkea ile Haloanaerobiales takımındaki halofilik bakteriler tarafından kullanılır. Bu strateji çok az miktarda esneklik ve değişen koşullara adapte olabilme yeteneği sağlar. Enzimler ve proteinler aktivite ve kararlılıkları için devamlı olarak yüksek tuz varlığına ihtiyaç duyarlar (Oren 1999; Margesin ve Schinner 2001; Oren 2008; Shivanand ve Mugeraya 2011).

‘Low-salt, organic-solutes-in’ stratejisi enzimatik aktiviteyi çok fazla inhibe edici etkiye sahip olmayan organik uyumlu çözünenlerin biyosentezine ve/veya hücrelerde biriktirilmesine dayanır (Ma ve ark. 2010). ‘Uyumlu çözünen’ suda çözünen şekerler, amino asitler, betainler, ektoinler ve bunların türevlerini içeren, hücrede yüksek bir konsantrasyonda biriken, çok zayıf bir enzim inhibitörü olan ve enzimleri inhibisyona karşı koruyan düşük molekül ağırlıklı çözünenlere verilen isimdir (Ventosa ve ark. 1998; Roberts 2005; Shivanand ve Mugeraya 2011). Uyumlu organik çözünenlerin diğer çözünenlerle karşılaştırıldıklarında en önemli özellikleri, metabolik prosesler üzerinde inhibe edici etki yaratmamalarıdır. Organik çözünenlerin konsantrasyonları, hücrelerin bulunduğu tuz konsantrasyonuna göre düzenlenir ve dış ortamın tuzluluğu değiştiği anda hızlıca ayarlanır. Bu strateji çoğu halofilik ve halotolerant bakteri temsilcisinde ve halofilik metanojenik arkelerde görülmektedir (Oren 2002b).

Her iki adaptasyon stratejisinde de hücre içi sodyum konsantrasyonu mümkün olduğunca düşük seviyede tutulur. Hem hücre içi uygun iyonik dengenin sağlanmasında, hem de pH düzenlenmesinde sitoplazmik membrandaki dışa bağımlı sodyum pompaları son derece önemlidir. Model organizma olan *Escherichia coli*'de sodyum/proton antiporterlarının mekanizması derinlemesine çalışılmıştır ve halofilik mikroorganizmaların metabolizmalarının anlaşılmasını kolaylaştırmada önemli sonuçlara ulaşılmıştır (Shivanand ve Mugeraya 2011).

1.4. Halofilik Enzimler

Halofilik mikroorganizmalardaki proteinlerin en önemli özellikleri yüksek tuz konsantrasyonunda aktif, kararlı ve çözünebilir olmalarıdır. Molar konsantrasyonlardaki tuz proteinler ve diğer makromoleküller için genellikle tahrip edici etkiye sahiptir: Hidrofobik etkileşimleri arttırdığı için tersiyer yapının kümelenmesi ya da çökmesine neden olur ve yük perdelenmesi nedeniyle molekül içi veya moleküller arası esansiyel etkileşimlere engel olur. Tuz iyon hidrasyonu yüzünden esansiyel biyolojik proseslerin devamı için gerekli olan miktarın altındaki serbest suyun kullanılabilirliğini engeller (Madern ve ark. 2000). Bu nedenle yüksek tuz konsantrasyonunda yaşayabilmek için enzimatik sistemlerin tümünün özel adaptasyonlar geliştirmiş olması gerekmektedir. Ancak bu adaptasyonları kazanmış hücreler bütünlük ve canlılıklarını korumak için sürekli olarak yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamda bulunmak zorundadırlar (Eisenberg 1995; Mevarech ve ark. 2000).

Proteinlerin halofilik karaktere sahip olduklarını belirlemedeki temel faktörlerden biri de asidik grupların fazlalığıdır. Protein yüzeyinde asidik gruplar fazla olduğundan yan gruplar birbirini iterek yapıyı kararsız hala getirir. Yalnızca yüksek konsantrasyonda katyon eklendiğinde negatif yükün perdelenir ve böylece proteinler yapısal kararlılık ve enzimatik aktivite için gerekli olan uygun konformasyona sahip olabilirler. Düşük tuz konsantrasyonunda proteinlerin kararsız duruma geçmesindeki temel faktör protein yüzeyindeki asidik gruplar arasındaki itici etkileşimlerdir. Bu elektrostatik etkileşimler yüksek tuz konsantrasyonunda dahi kararsızlığın devam etmesine neden olabilir (Oren 2002b).

1.4.1. Halofilik arkelerin enzimlerinin ‘halofilik’ özellikleri

Halobacteriales’in enzimlerinin çoğu 1.0-2.0 M’den daha az tuz konsantrasyonuna sahip solüsyonlarda denatüre olurlar. Bu enzimlerin bazıları KCl varlığında NaCl varlığında olduğundan daha aktiftirler. Bu durum K^+ ’nın hücre içinde dominant katyon olduğu bulgusunu desteklemektedir. Gliserol dehidrojenaz ve sitrat sentetaz gibi enzimler K^+ ’ı Na^+ ’dan daha fazla tercih ederken malat dehidrojenaz, laktat dehidrojenaz ve fumarat dehidrojenaz gibi enzimler ise NaCl ile de KCl’de olduğu kadar fonksiyon gösterebilirler (Lanyi 1974).

Halobacterium proteinleri genellikle yüksek asidite gösterirler, aktivite ve yapısal kararlılıkları için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. Ancak bu özelliklerin bakteriorodopsin ve halorodopsinde olduğu gibi bazı istisnaları mevcuttur. *Haloferax mediterranei* ve *Haloferax marismortui*’nin ribuloz bifosfat karboksilaz enzimi de bu genel özelliklere sahip olmaması nedeniyle halofilik enzim olarak değerlendirilemez (Oren 2002b).

Halobacteriales’in proteinlerinin çoğu fazla miktarda glutamat ve aspartat gibi asidik amino asitleri ve az miktarda da lizin ve arjinin gibi bazik amino asitleri içerir (Dennis ve Shimmin 1997). *Halobacteriaceae* proteinlerinin diğer bir belirgin özelliği, hidrofobik amino asit gruplarının azlığıdır. Bu eksiklik genellikle hidrofobik amino asitler olan serin ve treonin miktarını fazla olması ile dengelenir (Lanyi 1974).

‘Hiposalin’ şartlar altında halofilik arkeler tuz eksikliğinden kaynaklanan protein hasarını tamir edilmesine yardımcı, şaperon benzeri bir enzim üretebilir. Bu enzim aktivite ve kararlılığı için yüksek tuza ihtiyaç duymaz ve düşük tuza maruz kalmış hücrelerde birikir (Franzetti ve ark. 2001). Tuz miktarının çok fazla olması da proteinler üzerinde olumsuz etkiye sahip olabilir. Molar miktarda tuz enzimlerin hidrofobik çekirdeğini katı hale getirebilir ve böylece proteinin katalitik aktivitesi için gerekli olan dinamik dalgalanmalar ve esnekliği yok edebilir (Oren 2002b).

1.4.2. Halofilik bakterilerin enzimlerinin ‘halofilik’ özellikleri

Aerobik halofilik Bakteriler, non-halofiller ile aşırı halofilik arkeler arasında yer alır. Yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebilir ve bazen de gelişim için tuza ihtiyaç duyar. Osmotik denge, tuz hücrelerden mümkün olduğunca uzak tutularak ve organik osmotik çözünenler kullanılarak sağlanır. Bununla birlikte birçok halofilik bakteride hücre içi tuz konsantrasyonu oldukça yüksek olabilir. Bu nedenle en azından bazı durumlarda yüksek tuz konsantrasyonuna adaptasyon gereklidir (Oren 2002b).

Halofilik bakteri enzimlerinin tuz ile ilişkisi ele alındığında üç farklı enzimatik aktivite kategorisi bulunmaktadır:(i) ortamdaki tuz konsantrasyonuna maruz kalmayan gerçek hücre içi enzimler, (ii) hem hücre içine hem de dış ortama karşı duyarlı olabilen ve taşıyıcı proteinleri içeren membran-bağımlı aktiviteler, (iii) dış hipersalin koşullara direkt olarak maruz kalan hücre dışı enzimler. Hücre içi enzimler (izositrat dehidrojenaz, malat dehidrojenaz ve 2-okzoglutarat dehidrojenaz gibi) düşük tuz konsantrasyonunda optimum fonksiyon gösterirken, membran enzimleri (laktat dehidrojenaz ve sitokrom oksidaz gibi) tuz varlığında daha aktiftir (Oren 2002b).

Halofilik bakterilerin ekstraselüler enzimleri hücre içi tuz konsantrasyonu çok düşük olsa dahi hücre dışındaki yüksek tuz konsantrasyonunda fonksiyon göstermeye adapte oldukları için halofilik proteinler olarak düşünülebilirler. Bu tip ekstraselüler enzimler aynı zamanda ileri derecede asidik amino asit özelliği gösterirler. Örneğin *Halomonas meridina*’nın α -amilaz enziminin %12.4 asidik gruba karşılık yalnızca %5.5 bazik grup içerdiği bulunmuştur (Coronado ve ark. 2000). Bu fazla miktardaki negatif yük non-halofilik α -amilaz’ınkinden daha yüksektir, ancak hala *Naatronococcus* tarafından üretilen arkeal ekzoenzimden düşüktür.

Enzim tuz adaptasyonuna ilişkin şaşırtıcı bir örnek *Halomonas elongata* fosfatazlarında gözlenmiştir. Bu organizma hücre zarında hem alkalik, hem de asidik fosfatazları içerir. 50 mM gibi düşük tuzda gelişen hücrelerde fosfataz aktivitesinin çok düşük olduğu saptanmıştır. 1.4 M ve 3.4 M gibi daha yüksek tuzlulukta gelişen kültürlerde ise her iki enzimin aktivitesi optimum olarak bulunmuştur. Bu enzimler ortamdaki NaCl konsantrasyonuna adaptasyon sağlamışlardır. Bu tip bir adaptasyon daha fazla aydınlatılamamıştır (Bylund ve ark. 1990). İstisnai bir başka örnek aerobik halofilik bakteri *Salinibacter ruber*'de görülmüştür. Bu aşırı halofilik organizmanın sitoplazması halofilik arkeler ile karşılaştırılmış ve hücre içi potasyum içeriğinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu organizmanın yığın (bulk) proteini yüksek asidik amino asit, düşük bazik amino asit, düşük hidrofobik amino asit ve yüksek serin içeriğine sahiptir. Tuza bağımlılık gösteren dört sitoplazmik enzim aktivitesi test edilmiş ve yüksek tuz konsantrasyonu varlığında Halobacteriaceae proteinleri ile benzer adaptasyon gösterdikleri bulunmuştur (Oren 2002b).

1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Açıdan Önemi

Halofilik mikroorganizmalar, biyoteknolojide birçok uygulama alanına sahiptirler. Ancak termofiller ve alkalifiller gibi diğer ekstremofil mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında halofillerin biyoteknolojik proseslerde nispeten daha az yer buldukları görülmektedir (Oren 2010).

İlk olarak, halotoleransları sayesinde halofillerin enzimleri düşük su aktivitesi gerektiren enzimatik transformasyonlarda kullanılabilirler. İkinci olarak, halofiller tarafından üretilen bazı organik osmotik stabilizatörler önemli uygulamalarda kullanılabilirler. Üçüncü olarak, halofilik mikroorganizmaların ürettikleri bileşiklerden bazıları eşsizdir ve canlı dünyasında başka hiçbir yerde bulunmazlar. Bunların yanında halofiller, halofilik olmayan organizmalar için de geçerli olan belirli ürünlerin biyoteknolojik üretimlerinin geliştirilmesinde farklı avantajlara sahiptirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarındaki kontaminasyon riski, düşük tuz konsantrasyonlarındakinden daha azdır. Ancak bunun yanında halofillerin düşük kütlede üretim gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Oren 2002b).

1.5.1.Halofilik arkeler ile ilgili biyoteknolojik uygulamalar

i. Halofilik arkeler, solar radyasyona engel olarak sıcaklığı ve dolayısıyla evaporasyonu arttırmaktadır. Bu nedenle, tuzla-kristalizasyon göllerinde tuz üretiminin arttırılmasında kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür (Jones ve ark.1981; Grant ve ark. 1998; Litchfield 2002).

ii. Halofilik mikroorganizmaların ürettiği ışık güdümlü bir proton pompası olan bakteriyorodopsin holografik depo materyali, uzaysal ışık modülatörleri, optik hesaplama ve optik hafıza teknolojilerinde kullanılabilir. 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 (Hough ve Danson 1989; Margesin ve Schinner 2001).

iii. *Haloferax* ve *Haloarcula* cinslerine ait bazı türlerin, ürettikleri ekzopolisakkarit yoluyla vizkozite stabilizasyonunda jelleştirme ajanı ve emülsifiyer olarak ve petrolün mikrobiyolojik geri kazanımını arttırmada kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Ventosa ve Nieto 1995; Parolis ve ark. 1996; Margesin ve Schinner 2001).

iv. Bazı halofilik arkelerin poli- β -hidroksi alkonat (PHA) ürettikleri belirtilmiştir (Lillo ve Rodriguez-Valera 1990; Hezayen ve ark. 2000). PHA geri dönüşümlü plastiklerin üretiminde kullanılabilmektedir. Bu termoplastikler yüksek dayanıklılık ve düşük erime noktası gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren 2002b). Halofilik arkeler henüz ticari olarak PHA üretiminde kullanılmamakla birlikte, bu amaçla kullanılmakta olan bazı organizmalardan daha avantajlı özelliklere sahiptir. Örneğin *Haloferax mediterranei* ucuz bir substrat olan nişasta üzerinde gelişebilmektedir. Ayrıca devamında gelen prosesler ve saflaştırma, suda lizis olan hücrelerde diğerlerine göre nispeten daha basittir. Organizmanın yüksek genomik kararlılığı ve kontaminasyon riskinin düşük olması da diğer bir avantajıdır (Ventosa ve Nieto 1995).

v. İlaç ve kozmetiklerin yapısında kullanılan lipozomların yapımında halofilik arkelerin esterazlara karşı yüksek kimyasal kararlılığa sahip olan eter bağlı lipitleri kullanılmaktadır. Amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi yüksek tuzlulukta işlevsel olan ekzoenzimler yüksek tuz konsantrasyonunda makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilir (Chaga ve ark. 1993; Ventosa ve Nieto 1995; Margesin ve Schinner 2001).

vi. Biyoteknolojik açıdan kullanışlı olan diğer biyomalzemeler ise halofilik enzimlerdir. Aşırı tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda aktif olan izomerazlar ve hidrolazlar bu halofilik enzimlere örnek olarak verilebilir (Margesin ve Schinner 2001). Halofilik enzimlerin kararlılığı, aktivitesi ve çözünürlüğünü belirlemeye yönelik çalışmalar yoğun olmasına karşın, halofilik mikroorganizmalara ait ekstremozimlerin potansiyel kullanımına dair gelişim henüz yeterli değildir. Halofilik arkelere ait ekstremozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı da dayanıklıdır. Yani termotolerant özellikleri de vardır. Bunun yanında halofilik enzimler düşük su aktivitesi ve yüksek organik çözücü içeren ortamlarda katalitik aktivitelerini sürdürmektedirler. Tüm bu özellikleri nedeni ile birçok uygulama için ilgi çekici hale gelmektedirler. Halofilik arkelere ait amilaz, proteaz ve nükleazlar gibi potansiyel uygulama alanına sahip enzimlerin aktiviteleri karakterize edilmiş ancak bu tip enzimler için ticari uygulamalar henüz gerçekleştirilmemiştir (Oren 2010).

vii. Hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip halofilik arkeler petrol kazalarında dökülen petrolün bioremediyasyonunda kullanılabilir (Bertrand ve ark. 1990; Emerson ve ark. 1994).

viii. *Halobacterium salinarum* NRC-1 suşunun lipit içermeyen protein yapısında zara sahip, 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 düşünülmektedir (Stuart ve ark. 2001).

ix. Halosinlerin tuzlanmış yiyeceklerin veya derilerin tabaklanması esnasında meydana gelen bakteriyel bozunumun kontrolü amacıyla kullanılabilecekleri ve halosin HalH7'nin memelilerde de halobakterilerdekine benzer bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Litchfield 2002).

x. *H. salinarum*'daki 84 kD luk bir protein kanser hastalarının serumlarındaki insan *c-myc* onkogen ürününe karşı antikor elde etmek için antijen olarak kullanılmış ve bu proteinin bazı kanser tiplerinin saptanmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (Rodriguez-Valera 1992).

1.5.2. Halofilik bakteriler ile ilgili biyoteknolojik uygulamalar

Halofilik bakteriler de arkeler gibi birçok biyoteknolojik uygulama alanına sahiptir. Bu organizmaların çoğu ozmoprotektanlar, enzimler, polimerler gibi endüstriyel öneme sahip çeşitli bileşikler üretir. Bunların gelişimleri de genellikle kolaydır ve besin ihtiyaçları çoğunlukla basittir.

i. Özellikle Uzak Doğu'da fermente yiyeceklere lezzet vermesi için kullanılmaktadırlar. Ayrıca besin endüstrisi ile ilişkili olarak, RNA'dan tatlandırıcı ajanlar olan 5'guanilik asit (5'GMP) ve 5'-inosinik asit ticari olarak üretilmektedir. Bunun için *Micrococcus varians*'ın halofilik nükleazlarından faydalanılmaktadır (Yohoi ve Onishi 1990).

ii. Pestisit, ilaç, yağ üretimi ve gaz geri dönüşüm proseslerinde oluşan endüstriyel atık sular genellikle yüksek konsantrasyonda toksik organik bileşikler ve tuz içerirler. Bazen yüksek miktarlarda toksik inorganik bileşikler de bünyelerinde taşırlar. Bu atık sular genellikle hipersalin özelliktedir ve geleneksel biyolojik atık uygulamaları bu tip toksik maddelerle başa çıkmak için yeterli değildir. Halofilik bakterilerin biyodegradatif potansiyeline dayanan prosesler bu probleme bir çözüm sağlamaktadır (Oren 2002b).

Yüksek tuzlu atık sularda havalandırmayı sağlamak için dönen disklerin veya filtrelerin kullanıldığı lağım prosesinin modifikasyonu ile özel bir proses geliştirilmiştir ve ortam şartları halofilik bakterilerin gelişimi için uygun hale getirilmiştir. Yapılan bir deneyde prosesi stimule etmek için ortama halofilik arke olan *H. salinarum* da eklenmiş ancak bu organizmanın tuz gereksinimi daha yüksek olduğu için istenilen sonuç elde edilememiştir (Dinçer ve Kargı 2001).

iii. Halofilik bakteriler tarafından yüksek tuzlu ortamda parçalanan toksik bileşikler arasında formaldehit ve fenol gibi aromatik bileşikler ve organofosfor bileşikleri yer almaktadır. Fenol içeren hipersalin atık suların biyodegradasyonunda bu bakterilerden yararlanılmaktadır (Woolard ve Irvine 1994).

iv. Halofilik bakterilerin tuzlu ortamlardan fosfatın uzaklaştırılması için kullanılması düşünülmektedir. Bu yaklaşım, kimyasal yaklaşımlara alternatif olarak geliştirilebilir ve ayrıca onlardan daha ucuzdur (Ramos-Cormenzana 1989).

v. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gibi hidrokarbon degrade etmekte özelleşmiş halofilik bakteriler yüksek tuzlu ortamlardaki petrol hidrokarbonlarını degrade edebilirler (Gauthier ve ark. 1992). Antarktika'daki Organik Göl'den izole edilen ılımlı halofilik bakterilerin hekzadekan ve fenantren gibi hidrokarbonları degrade ettikleri bulunmuştur (McMeekin ve ark. 1993).

vi. Bazı halofilik bakteriler ağır metal iyonlarına karşı oldukça yüksek toleransa sahiptirler. Hem yüksek tuz hem de yüksek cıva, kadmiyum, bakır ve çinko gibi ağır metal konsantrasyonlarını tolere edebilme özellikleri bu bakterilerin hipersalin ortamlardaki ağır metallerin biyotransformasyonu ve biyoremedisyonu için kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Oren 2002b).

vii. Uyumlu çözünenlerden ektoin ve hidroksiektoin gibi tetrahidropirimidinler DNA, enzimler, membranlar ve hatta tüm hücreyi yüksek tuz, termal denatürasyon, kuruma ve donmaya karşı koruduğu ve kararlı hale getirdiği için son yıllarda özel bir dikkat konusu haline gelmişlerdir (Margesin ve Schinner 2001). Laktat dehidrojenaz ve fosfofruktokinaz gibi kararsız enzimler bu çözünenlerin koruyucu etkilerinin araştırılması için model olarak kullanılmıştır (Lippert ve Galinski 1992).

viii. Ektoin ve türevleri kozmetikte yaşlılık, kuruma ve tahrişlere karşı nemlendirici olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca UV radyasyonuna maruz kalan ciltlerde hücreleri güneş yanığına karşı korurlar (Oren 2002b).

ix. Bakteriyel ekzopolimerler sürfaktan aktiviteleri ve biyoemulsifiyer özellikleri nedeniyle petrol geri dönüşümünde kullanılabilirler. Petrol birikintilerinde koşullar genellikle salin ve hipersalin olduğu için tuza dayanıklı sürfaktanların kullanımı avantaj sağlar (Oren 2002b).

1.6. *Pseudomonas halophila*'nın Taksonomisi

Domain: Bacteria

Filum: Proteobacteria

Sınıf: Gammaproteobacteria

Takım: Pseudomonadales

Aile: Pseudomonadaceae

Cins: Pseudomonas

Tür: *Pseudomonas halophila*

1.7. *Pseudomonas halophila*'nın Genel Özellikleri

Tek veya çiftler halinde bulunabilen çomak şeklindeki hücreler 0.8-1.0x1.5-5.0 pm boyutlarında ve polar bir kamçı ile hareketlidir. 0.02-3.3 M NaCl içeren besiyerinde gelişim görülür. Optimum NaCl konsantrasyonu 0.8 M'dır. Sıcaklık 4-37°C'dir. Optimum büyüme 28°C'de olur. Gelişme için pH aralığı 4.5-9.6 ve optimum pH 7.0'dir. Zorunlu aerobiktirler. Arabinoz, sellobiyoz, fruktoz, galaktoz, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol, sorbitol, sukroz, trehaloz ve ksilozda asit üretimi olmadan kemoorganotrofik gelişim gösterirler. Asetat, kaproat, sitrat, laktat, pelargonat, propionat, piruvat, suksinat, alanin, glutamat, eskulin, etanol ve gliserolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Katalaz ve sitokrom oksidaz pozitifler. Jelatinaz ve ureaz pozitifler. Nişasta veya selüloz hidrolizi, indol veya sülfid üretimi, arjinin dihidrolaz reaksiyonu, lizin ve ornitin dekarboksilaz aktiviteleri negatiftir. Ampisilin, kloramfenol, eritromisin, nalidiksik asit ve penisilin G'ye duyarlıdır. Utah'taki (ABD) Büyük Tuz Gölü'nün kuzey kolundan izole edilen *P. halophila*'nın DNA'sının G+C mol yüzdesi 57'dir (Garritty ve ark. 2005).

1.8. *Haloarcula hispanica*'nın Taksonomisi

Domain: Archaea

Filum: Euryarchaeota

Sınıf: Halobacteria

Takım: Halobacteriales

Aile: Halobacteriaceae

Cins: Haloarcula

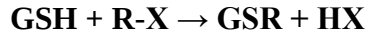
Tür: *Haloarcula hispanica*

1.9. *Haloarcula hispanica*'nın Genel Özellikleri

Küçük, düzensiz, çomaklar halinde olan hücreler 0.5-1.0x0.3µm uzunluğunda ve polar kirpikle hareketlidir. 2.5-5.2 M NaCl içeren besiyerinde gelişme görülür. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.5-4.2 M'dır. Minimum Mg⁺² konsantrasyonu 0.005 M'dır. Sıcaklık 25-50°C'dir. Optimum büyüme 35-40°C'de olur. Gelişme için pH aralığı 6-8 ve optimum pH 7.0'dır. Nitrat varlığında fakültatif anaerobiktirler. Karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli bileşikleri (glukoz, laktoz, sukroz, gliserol, mannitol, sorbitol, asetat, sitrat, laktat, malat, piruvat, suksinat, arjinin, glutamin ve lizin) kullanırlar. Şekerlerden asit üretirler. Nişasta ve kazeini sindirirler. Nitrat gaz üretimiyle indirgenir. Yalnızca yüksek konsantrasyonda basitrasine hassastır. İspanya'daki deniz tuzlarından izole edilen *H. hispanica*'nın DNA'sının G+C yüzdesi 67.2'dir (Boone ve ark. 2001).

1.10. Glutasyon S-transferaz Enzim Ailesi

Glutasyon S-transferazlar endojen ve ekzojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz II detoksifikasyon süperenzim ailesidir.(Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005; Oakley 2005; Öztetik 2008).



GST ilk defa, sıçan karaciğer sitoplazmasında glutasyonun 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve bromosülfotalein'e bağlanmasını sağlayan katalitik aktivitenin keşfi (Booth ve ark. 1961; Combes ve Stakelum 1961) ile bulunmuş ve sonraki yıllarda enzimin biyolojik fonksiyonu, aktivitesi, gen regülasyonu ve ekspresyonu üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Tüm GST'lerin ortak özelliği tripeptit glutasyon aracılığıyla birçok hidrofobik toksik bileşiğin elektrofilik gruplarına saldırarak hücreden atılmalarını sağlama yetenekleridir. GST'ler aynı zamanda farklı hücre fonksiyonlarında da görev alırlar ve çok sayıda endojen ve ekzojen bileşiğe non-katalitik olarak bağlanma yeteneğine sahiptirler (Hayes ve ark. 2005). GST'ler hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunurlar. GST'ler sitozolik GST'ler, mitokondriyal GST'ler, mikrozomal GST'ler ve bakteriyel fosfomisin-rezistans proteinleri olmak üzere en az dört protein ailesine ayrılırlar (Armstrong 2000; Hayes ve ark. 2005). Sitozolik GST'ler kimyasal, fiziksel ve yapısal özelliklerine bağlı olarak birçok farklı alt gruba ayrılmıştır (Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005). Kappa sınıfı GST'ler olarak da bilinen mitokondriyal GST'ler ökaryotlarda bulunan çözünebilir enzimlerdir (Robinson ve ark. 2004). Üçüncü GST ailesi eikozanoid ve glutasyon metabolizması proteinleri (MAPEG) denilen membran-bağımlı transferazlardan oluşur ancak bunlar çözünebilir GST'ler ile benzerlik göstermezler (Jakobsson ve ark. 1999). Prokaryotlarda bu üç ailenin temsilcileri de mevcuttur. Dördüncü aile ise yalnızca prokaryotlarda bulunur (Allocati ve ark. 2009).

1.10.1. Bakteriyel GST'ler

Bakterilerde GST varlığı ilk defa bundan 30 yıl önce Shishido'nun *E. coli* suşunda GST aktivitesi varlığını göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Shishido (1981) *E. coli*'nin nükleofillerini zararlı elektrofilik bileşiklerle konjugasyondan koruyan GST'ye sahip olduğunu bildirmiştir. Daha sonraki yıllarda insan, bitki patojenleri ve toprak bakterilerinin de dahil olduğu birçok aerobik prokaryotta enzimin geniş ölçüde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Allocati ve ark. 2009).

Prokaryotlardaki GST'lerin sınıflandırması yeni tanımlanan GST'ler nedeniyle sürekli olarak değişmektedir (Oakley 2005). Düşük dizi benzerliğine rağmen tüm GST'ler N-terminal ve C-terminal domainden oluşan korunmuş iki-domainli bir yapıya sahiptir (Vuilleumier 1997). Aktif bölge, iki komşu monomerin arayüzünde yerleşmiş olan iki bağlanma alt bölgesinden oluşur. G alt bölgesi GSH'a ve H alt bölgesi ise hidrofobik elektrofillere bağlanır (Rossjohn ve ark. 1998).

Ökaryotik GST'lerin çoğu katalitik aktivite sırasında bir elektrofilik substrata konjuge olmuş tek bir GSH tüketir. Bakteriyel GST'ler detoksifikasyon ve katabolik yollarda geniş ölçüde görev alırlar. Ayrıca GSH kullanımı ile ilgili önemli çeşitlilik gösterirler. Örneğin; maleilasetoasetat (MAA) ve maleilpirüvat (MP) izomerazları gibi enzimler GSH'ı kullanır fakat tüketmezler. *Sphingomonas chlorophenolica*'daki tetrakloro-hidrokinon dehalojenaz (TCHQD) gibi bazı bakteriyel GST'ler ise iki GSH tüketmektedir. İlk GSH bir disülfid oluşumuna yol açan dehalojenasyon basamağında kullanılır. İkinci GSH ise bir disülfid köprülü ürün olan GSSG oluşumuna yol açan serbest enzimi tekrar elde etmek için kullanılır. Tüm bu GST'lerin GSH konjugasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Ancak yapısal temelleri bu güne kadar tam olarak anlaşılamamıştır (Allocati ve ark. 2009).

1.10.1.1. Bakteriyel GST'lerde sınıflandırma ve filogenetik ilişkiler

Kanonikal GST'ler olarak da adlandırılan sitozolik GST'ler (cGST) aerobik yaşam formlarında bulunan (Çizelge 1.1) homodimerik veya heterodimerik enzimlerdir. cGST'ler GSH konjugasyonu yoluyla birçok elektrofilik substratı metabolize ederler. Oksidatif strese karşı hücreleri korur, peroksidaz ve izomeraz aktivitesi gösterir ve ilaç dirençliliğinin gelişmesine katkıda bulunurlar (Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005).

Memeli türlerinde GST'ler oldukça iyi tanımlanmış ve yedi sınıfa ayrılmıştır: Alfa, mu, pi, sigma, teta, omega ve zeta (Hayes ve ark. 2005). Diğer sınıflar memeli olmayan türlerle sınırlıdır: Beta, chi, delta, pi ve tau (Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005; Wiktelius ve Stenberg 2007). Genel olarak kabul edilen görüşe göre cGST'ler sınıflandırılırken %40'tan fazla dizi benzerliğine sahip protein içerenler aynı sınıfa dahil edilir, %25'ten az dizi benzerliği olması durumunda farklı sınıflara atanırlar. N-terminal bölge GSH ile etkileşim içinde olan aktif bölgeyi içine aldığı ve evrensel olarak korunduğu için yalnızca bu bölge dikkate alındığında benzerlik artar (Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005; Frova 2006). Amino asit dizisi benzerliğinin yanında immünolojik özellikler, kinetik özellikler ve kristal yapılar da destekleyici veriler olarak kullanılabilir (Sheehan ve ark. 2001; Hayes ve ark. 2005).

Çizelge 1.1. Sitozolik GST sınıfları ve biyolojik fonksiyonları (Chronopoulou ve Labrou 2009'dan modifiye edilmiştir)

Organizma	Sınıf	Fonksiyon	Aktif Bölge
Memeli	<i>Alfa</i> ^a (α)	İzomeraz aktivitesi, ilaç metabolizması, peroksidaz aktivitesi, detoksifikasyon.	Tirozin
	<i>Mu</i> ^a (μ)	İlaç metabolizması.	Tirozin
	<i>Phi</i> ^a (ϕ)	İlaç metabolizması.	Tirozin
	<i>Teta</i> (θ)	Hepatokarsinogenezisin önlenmesi, endüstriyel bileşiklerin metabolizması.	Serin
	<i>Zeta</i> (ζ)	a-haloasit metabolizmasının katalizlenmesi.	Serin
	<i>Omega</i> (ω)	Oksidatif stres	Sistein
	<i>Sigma</i> (σ)	Prostaglandin sentezi	Tirozin

Çizelge 1.1. (Devam) Sitozolik GST sınıfları ve biyolojik fonksiyonları (Chronopoulou ve Labrou 2009'dan modifiye edilmiştir)

Bakteri	<i>Beta^a (β)</i> (Diğer GST'ler de mevcut olabilir)	Organik bileşiklerin katabolizması	Sistein
	<i>Chi (χ)</i>		Bilinmiyor
Bitki	<i>Phi^a (φ)</i>	Detoksifikasyon fonksiyonu, oksidatif strese karşı, sinyal fonksiyonu, flavonoidlerin katalitik olmayan bağlanması, ara metabolizmaya katılma.	Serin
	<i>Tau^a (τ)</i>		Serin
	<i>Teta (θ)</i>		Serin
	<i>Zeta (ζ)</i>		Serin
	<i>Lambda^a (λ)</i>		Sistein
	<i>Glutasyon-bağımlı dehidroaskorbat redüktazlar (DHAR)</i>		Sistein
Mantar	<i>Alfa (α)</i>		Bilinmiyor
	<i>Mu (μ)</i>		Bilinmiyor
	<i>Gama (γ)</i>		Bilinmiyor
Böcek	<i>Delta^a (δ)</i>	Çevresel ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu.	Serin
	<i>Epsilon^a (ε)</i>	İnsektisit detoksifikasyonu, peroksidaz aktivitesi, oksidatif stres.	Serin
	<i>Teta (θ)</i>	Bilinmiyor	Serin
	<i>Sigma (σ)</i>	Muhtemelen oksidatif stres ürünlerine karşı. Kas fonksiyonunda rol oynayabilir.	Tirozin
	<i>Zeta (ζ)</i>	Tirozin degradasyon yolağı.	Serin
	<i>Omega (ω)</i>	Net değil (muhtemelen oksidatif strese karşı).	Sistein

*organizmaya spesifik sınıflar

Bakterilerde dört farklı cGST sınıfı tanımlanmıştır: Beta, chi, teta ve zeta (Sheehan ve ark. 2001; Vuilleumier 1997; Rossjohn ve ark. 1998; Wiktelius ve Stenberg 2007). Beta sınıfı cGST'ler birçok bakteriden izole edilerek karakterize edilmiştir (Iizuka ve ark. 1989; Piccolomini ve ark. 1989; Nishida ve ark. 1994; Hofer ve ark. 1994; Zablotowicz ve ark. 1995; Jung ve ark. 1996; Favaloro ve ark. 1998; Travensolo ve ark. 2008). Bunlar model substrat olan CDNB ile konjugat oluşturabilir ve GSH afinite matriksine bağlanabilirler. Tüm beta sınıfı enzimler GSH bölgesinde sistein gruplarının bulunması ile karakterize edilir (Rossjohn ve ark. 1998). Bu sınıfa ait ilk cGST *Proteus mirabilis* suşunda (PmGST) tanımlanmıştır. PmGST diğer sınıflara ait GST'lerden ayrılmasına neden olan biyokimyasal ve yapısal özellikler sergiler ve beta sınıfının prototipi olarak tanımlanmıştır (Di Ilio ve ark. 1988; Mignogna ve ark. 1993; Sacchetta ve ark. 1993; Aceto ve ark. 1995; Perito ve ark. 1996; Allocati ve ark. 1997; Casalone ve ark. 1998; Allocati ve ark. 1999; Allocati ve ark. 2000; Allocati ve ark. 2002; Allocati ve ark. 2005; Allocati ve ark. 2006). Beta sınıfına ait fonksiyonel ve yapısal olarak karakterize edilmiş diğer örnekler sırasıyla *E. Coli* (EcGST) ve toprak bakterileri olan *Ochrobactrum anthropi* (OaGST) ve *Burkholderia xenovorans*'tır (BxGST, BphK olarak da bilinir) (Hofer ve ark. 1994; Nishida ve ark. 1994; Favaloro ve ark. 1998; Nishida ve ark. 1998; Bartels ve ark. 1999; Favaloro ve ark. 2000; Gilmartin ve ark. 2003; Tamburro ve ark. 2004; Gilmartin ve ark. 2005; Fortin ve ark. 2006; Tocheva ve ark. 2006; Federici ve ark. 2007; Allocati ve ark. 2008).

Bakterilerdeki teta sınıfı enzimler fakültatif metilotrofik bakteriler tarafından üretilen iki diklorometan dehalojenaz (DCMD) ile temsil edilir (Scholtz ve ark. 1988; La Roche ve Leisinger 1990; Bader ve Leisinger 1994; Stourman ve ark. 2003). Bunlar ökaryotik teta sınıfı GST'ler ile yüksek oranda amino asit dizisi benzerliği gösterirler. Aynı zamanda DCMD ile reaktivite gösterme, CDNB ile aktivite göstermeme ve GSH afinite matriksine bağlanamama gibi özellikleri de ökaryotlarla benzerdir (Bader ve Leisinger 1994).

Anandarajah ve ark. (2000) çoklu dizi uyumuna dayanarak TCHQD'yi zeta sınıfına dahil etmişlerdir. TCHQD pentaklorofenolün biyodegradasyonunun iki basamağında rol alır ve aynı zamanda izomeraz aktivitesine sahiptir (McCarthy ve ark. 1996; Anandarajah ve ark. 2000; Copley 2000; Kiefer ve ark. 2002).

Yakın geçmişte, chi sınıfı adında yeni bir cGST sınıfı önerilmiştir (Wikteliuss ve Stenberg 2007). *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (TeGST) ve *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (SeGST)'dan iki siyanobakteriyel cGST saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. TeGST ve SeGST cGST'nin tipik yapısal özelliklerini göstermesine rağmen siyanobakteriyel GST'lerin özellikle sisteinden tamamen yoksun olmaları nedeniyle beta sınıfı GST'lerden farklı bir evrimsel yola sahip oldukları ve dolayısıyla bu enzimlerin beta sınıfına dahil edilmemesi gerektiğini savunulmuştur (Allocati ve ark. 2009).

Ökaryotik organizmalar gibi bakteriler de büyük ölçüde farklılık gösteren dizilere ve fonksiyonları tam olarak bilinmeyen çoklu GST genlerine sahiptirler (Vuilleumier ve Pagni 2002). *E. coli* genomunda beta sınıfı GST'ye (Nishida ve ark. 1998) ek olarak katlanma açısından cGST'lere benzerlik gösteren bir RNA polimeraz (Oakley 2005) ve altı GST homoloğu belirlenmiştir (Rife ve ark. 2003). Bu genlerden ikisinin ürünleri olan YfcF ve YfcG GST- ve GSH-bağımlı peroksidaz aktivitesi gösterir ve oksidatif strese karşı savunmada rol oynar (Kanai ve ark. 2006). *Pseudomonad*'lar 10'dan fazla GST genine sahiptir (Vuilleumier ve Pagni 2002). *Proteus mirabilis*'te üç ve *P. vulgaris*'te dört farklı GST tanımlanmıştır (Di Ilio ve ark. 1988; Hong ve ark. 2003). Gram negatif bakteri *Shewanella oneidensis*'in genomik analizleri sonucu altı GST-benzeri gene sahip olduğu bulunmuştur (Remmerie ve ark. 2008). Bu GST ürünlerinden ikisi DCMD'ler ile yüksek derecede dizi benzerliği göstermektedir (Allocati ve ark. 2009).

Kappa sınıfı GST'ler memeli mitokondrilerinden izole edilerek tanımlanmış çözünebilir dimerik proteinlerdir (Robinson ve ark. 2004; Hayes ve ark. 2005). Bakteriyel 2-hidroksikromen-2-karboksilik asit (HCCA) izomeraz, naftalin degradasyon yolağında yer alan GSH-bağımlı bir enzimdir (Eaton 1994; Robinson ve ark. 2004; Thompson ve ark. 2007). HCCA izomeraz GSH bölgesinde korunmuş bir serin grubuna sahip olması ve CDNB'ye karşı katalitik aktivite göstermesi sebebiyle kappa sınıfı enzimlere büyük oranda benzerlik gösterir (Thompson ve ark. 2007).

MAPEG ailesi farklı biyolojik fonksiyonları ile oldukça geniş ve sık rastlanan bir gruptur (Jakobsson ve ark. 1999; Jakobsson ve ark. 2000). Ökaryotik MAPEG ailesi en az altı üyeden oluşur. MAPEG üyeleri trimerler halinde düzenlenmiştir (Molina ve ark. 2008). MAPEG üyeleri aynı zamanda *E. coli*, *Vibrio cholerae* ve *Synechocystis sp.* gibi bazı bakterilerde de tanımlanmıştır (Jakobsson ve ark. 1999). Bunlardan bazıları çoklu MAPEG paralogları içerirler. Memeli ve memeli olmayan formlarla karşılaştırıldığında uzak akrabalık ilişkileri gösterirler. Bakteriyel MAPEG proteinleri biri *E. coli* ve *V. cholerae* proteinleri, diğeri ise *Synechocystis sp.* proteini olmak üzere iki alt aile halinde gruplandırılmıştır. *E. coli* ve *Synechocystis sp.* MAPEG proteinleri klonlanmış ve ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bunların bakterilerdeki fizyolojik rolleri ile ilgili bugüne kadar yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır (Allocati ve ark. 2009).

1.10.1.2. Bakteriyel GST'lerin işlevleri

Bakteriyel GST'ler farklı detoksifikasyon proseslerinde özelleşmişlerdir. GSH konjugasyonu yoluyla çok sayıda molekülü detoksifiye yeteneğine sahiplerdir. Oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında ve antimikrobiyal ajanların detoksifikasyonunda aktif rol oynarlar. Bazıları bazal metabolizmada ve bakteriyel hücrelerin karbon kaynakları ile beslenmesinde görev alırlar (Allocati ve ark. 2009). Bakteriyel GST'ler aynı zamanda toluen, ksilen, fenol ve atrazin gibi bazı monosiklik aromatik bileşikler (Santos ve ark. 2002) ile çevre ve insan sağlığına zararlı bir kimyasal sınıfı olan polisiklik aromatik karbonların degradasyonunda görev alırlar (Mueller ve ark. 1990; Hofer ve ark. 1994; Wang ve ark. 1996; Kanaly ve Harayama 2000; Xia ve ark. 2005; Cavalca ve ark. 2007).

i. Oksidatif ve ksenobiyotik stres

Beta sınıfı GST'ler farklı ksenobiyotiklerin toksik etkilerine karşı gerçekleştirilen detoksifikasyon reaksiyonlarında yer alırlar (Allocati ve ark. 1994; Favaloro ve ark. 2000; Allocati ve ark. 2003; Tamburro ve ark. 2004). Bir *P. mirabilis* suşunda yapılan bir çalışmada PmGST'nin hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif strese karşı hücreleri korumada rol aldığı rapor edilmiştir. Bakteriyel hücreler hidrojen peroksit maruz bırakıldıklarında protein ekspresyonu ve mRNA transkripsiyon seviyelerinde artış gözlenmiştir (Allocati ve ark. 2003).

ii. Dehalojenasyon

Mikrobiyal dehalojenazlar alifatik ve aromatik klorlu ksenobiyotiklerin biyodegradasyonunda anahtar bir rol oynar (Copley 1998; Janssen ve ark. 2005). Halojenli bileşikler endüstride geniş ölçüde kullanılırlar ve çevresel kirleticilerin önemli bir grubunu oluştururlar. Bakteriyel GST'ler kofaktör olarak GSH'ı kullanarak farklı reaksiyonlar katalizler: DCMD'ler diklorometanın hidrolitik deklorinasyonunu katalizlerken TCHQD'lar indirgeyici bir dehalojenasyon reaksiyonunu katalizler (Allocati ve ark. 2009).

iii. Atrazin metabolizması

GST'ler farklı herbisit sınıflarını detoksifiye etme yeteneğine sahiptir. Atrazin biyodegradasyonunun ilk basamağında atrazin-GSH konjugasyonu yoluyla, üretilen klor atomunun uzaklaştırılmasını sağlarlar (Prade ve ark. 1998; Labrou ve ark. 2005). Deklorinasyon işleminin ardından dealkilasyon işlemi ile izopropilamin ve etilamin gruplarının uzaklaştırılır (Abel ve ark. 2004). Bakterilerde atrazin mikrobiyal bir birlik veya tek bir mikroorganizma tarafından degrade edilebilir (de Souza ve ark. 1998; Smith ve ark. 2005).

iv. İzopren metabolizması

İzopren kullanan bakteri *Rhodococcus* sp. AD45'ten iki GST izozimi saflaştırılmış ve fonksiyonel özellikleri karakterize edilmiştir. İki izozimin de ozon, organik peroksidazlar ve karbonik monoksit oluşumunda rol oynayan izopren metabolizmasında yer aldığı ve bunların genlerinin izopren gen takımında lokalize oldukları görülmüştür (van Hylckama ve ark. 2000).

v. Lignin degradasyon yolağı

Sphingomonas paucimobilis SYK-6'da yeryüzündeki karbon döngüsü için temel bir basamak olan lignin degradasyonu prosesinde yer alan ligE, ligF ve ligG genleri tanımlanmıştır (Masai ve ark. 1993; Masai ve ark. 1999; Masai ve ark. 2003). *Sph. paucimobilis* β -aril eteri de içine alan çok sayıda lignin bileşiğini degrade etme yeteneğine sahiptir. β -aril eter ayrılması lignin degradasyonu için temel basamaklardan biridir. Çünkü bu moleküller arası bağ en çok ligninde bulunur. LigE ve LigF GSH kullanarak β -aril bağını koparan enantiyoselektif GST'lerdir. LigG ise LigF tarafından üretilen konjugattan GSH'ın ayrılmasını katalizleyen bir GST liyazdır (Masai ve ark. 1999; Masai ve ark. 2003).

vi. Naftalin metabolizması

Yapısal olarak memeli kappa sınıfı enzimleri ile ilişkili olan HCCA izomeraz, naftalin degradasyon yolağında görev alan GSH-bağımlı bir enzimdir (Eaton 1994; Robinson ve ark. 2004; Thompson ve ark. 2007). HCCA izomeraz aynı zamanda naftalin sülfonat ve antrasen katabolizmasında da yer alır (Kim ve ark. 1997; Keck ve ark. 2006). Naftalin metabolizması bir üst yolak ve bir alt yolaktan meydana gelir. Üst yolakta naftalin altı adımda salisilata metabolize olur. HCCA izomeraz bu yolakta dördüncü enzimdir ve HCCA ile *trans-o*-hidroksibenziliden pirüvik asit arasındaki *cis-trans* izomerizasyonunu katalizler (Allocati ve ark. 2009).

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. MATERİYAL

2.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

1-kloro-2,4-dinitrobenzen, redükte glutatyon, sodyum karbonat, bakır sülfat, sodyum hidroksit, potasyum-sodyum tartarat tetrahidrat, potasyum dihidrojen fosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum asetat, hidroklorik asit, etanol, sığır serum albümin, asetik asit, Tris bazı, Ciocalteu's Folin fenol ayırıcı Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, A.B.D.'den temin edilmiştir. Potasyum hidroksit, amonyum sülfat, magnezyum sülfat hepta hidrat, sodyum hidroksit, yeast ekstrakt, agar agar, magnezyum klorür hekza hidrat, sodyum bromid, sodyum bikarbonat, kalsiyum klorür ve sodyum klorür Merck, Darmstadt, Almanya'dan satın alınmıştır.

2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. %20 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,52 g/l
HNaCO ₃	0,134 g/l
KCl.....	4,0 g/l
CaCl ₂	0,578 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	35,594 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	26,653 g/l
NaCl.....	156 g/l
Yeast Ekstrakt.....	0,8-4 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.2.2. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,65 g/l
NaHCO ₃	0,167 g/l
KCl.....	5,0 g/l
CaCl ₂	0,723 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49,492 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34,567 g/l
NaCl.....	195 g/l
Yeast Ekstrakt.....	1-5 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.2.3. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,78 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
KCl.....	6,0 g/l
CaCl ₂	0,868 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59,39 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	41,48 g/l
NaCl.....	234 g/l
Yeast Ekstrakt.....	1,2-6 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.2.4. %20 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri

NaBr.....	0,52 g/l
NaHCO ₃	0,134 g/l
KCl.....	4,0 g/l
CaCl ₂	0,578 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	35,594 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	26,653 g/l
NaCl.....	156 g/l
Yeast Ekstrakt.....	0,8-4 g/l
Agar agar.....	12 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.2.5. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri

NaBr.....	0,65 g/l
NaHCO ₃	0,167 g/l
KCl.....	5,0 g/l
CaCl ₂	0,723 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49,492 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34,567 g/l
NaCl.....	195 g/l
Yeast Ekstrakt.....	1-5 g/l
Agar agar.....	15 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.2.6. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri

NaBr.....	0,78 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
KCl.....	6,0 g/l
CaCl ₂	0,868 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59,39 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	41,48 g/l
NaCl.....	234 g/l
Yeast Ekstrakt.....	1,2-6 g/l
Agar agar.....	18 g/l

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, KOH yardımıyla pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera, 1985).

2.1.3. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada bir Bakteria ve bir Arkea domainine ait olmak üzere iki adet mikroorganizma kullanılmıştır. Bunlardan halofilik bakteri *Pseudomonas halophila* DSM 3050 izolatu Josefa Anton'dan, halofilik arke *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 izolatu ise Michael Dyall Smith'den Yard. Doç. Dr. M. Burçin Mutlu tarafından kişisel girişimlerle temin edilmiş olup bölümümüz kültür koleksiyonunda bulunmaktadır.

2.2. METOT

2.2.1. Mikroorganizmaların çoğaltılması

P. halophila ve *H. hispanica* izolatları deniz suyu (SW) katı besiyerine ekilerek 37°C'deki inkübatörde 1 hafta boyunca inkübasyona bırakılmış ve stok kültürler elde edilerek +4°C'de saklanmıştır. Bu stok kültürlerden sıvı besiyeri ortamına aktarılan mikroorganizmalar 37°C'deki çalkalamalı inkübatörde 150 rpm. de 1 hafta inkübasyona bırakılarak protein ve enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere çoğaltılmıştır.

2.2.2. Mikroorganizmaların Modifiye Gram boyama yöntemiyle boyanması

Gram boyama Dussault (1955) yöntemine göre yapılmıştır. 7 gün boyunca sıvı besiyerinde geliştirilmiş kültürlerden hazırlanan preparatlar %2 asetik asitle 5 dk fiske edildikten sonra %0,25 kristal viyole boyasıyla 3 dk boyanmış, 1 dk lügol ile muamele edilmiştir. %95'lik etanol ile 10-15 sn dekolorizasyon işleminin ardından safraninle 30 sn boyanmıştır. Kurutulan preparatlar immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Ara yıkama işlemleri %25 NaCl çözeltisi ile yapılmıştır.

2.2.3. Mikroorganizmalardan enzim ekstraksiyonu

2.2.3.1. *Pseudomonas halophila*'dan enzim ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonu için dondurma-çözme yöntemi (Koval ve Sprott 2007) kullanılmıştır. Bir haftalık gelişim süresi sonunda (7. gün) sıvı besiyeri kültürleri 10000 rpm 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti 1:2 oranında 2.5M soğuk amonyum sülfat tampon solüsyonu (Çizelge 2.1) ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon halindeki hücreler 1 gün süre ile -80°C'de dondurulmuştur. 1 gün sonunda 4°C'de çözündürülerek 10000 rpm 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Enzim ve total protein tayininde süpernatant kısmı kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Amonyum sülfat tamponu (pH 7.4)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	330.35 g/l
NaH_2PO_4	4.05 g/l
Na_2HPO_4	4.63 g/l

2.2.3.2. *Haloarcula hispanica*'dan enzim ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonu için dondurma-çözme yöntemi (Koval ve Sprott 2007) kullanılmıştır. Bir haftalık gelişim süresi sonunda (7. gün) sıvı besiyeri kültürleri 10000 rpm 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti 1:2 oranında soğuk steril ultra saf su ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon halindeki hücreler 1 gün süre ile -80°C'de dondurulmuştur. 1 gün sonunda 4°C'de çözündürülerek 10000 rpm 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Enzim ve total protein tayininde süpernatant kısmı kullanılmıştır.

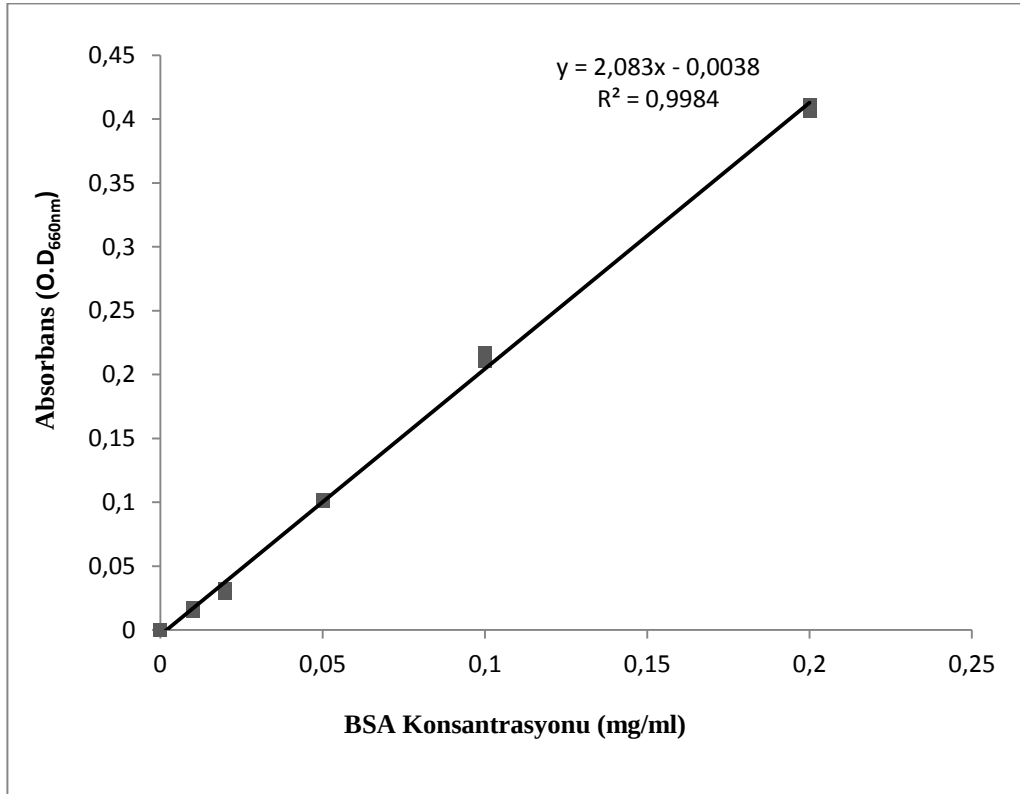
2.2.4. Mikroorganizmaların toplam protein içeriklerinin belirlenmesi

Hazırlanan ham ekstraktlardaki protein konsantrasyonları, standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak, alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturması esasına dayanan Lowry ve ark. (1951) yöntemine göre belirlenmiştir. %20, 25 ve 30 tuz konsantrasyonlarında gelişen mikroorganizmaların ekstraksiyonu ile elde edilen süpernatant protein tayininde kullanılmak üzere seyreltilmiştir. Arke için sırasıyla 1:50, 1:75 ve 1:100 seyreltme oranları kullanılmıştır. Bakteri %30 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde üreme göstermemiştir. %20 ve 25 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde gelişim gösteren bakteri için sırasıyla 1:50 ve 1:75 seyreltme oranları kullanılmıştır. Daha sonra %2 bakır sülfat, %2 sodyum potasyum tartarat ve 0.1 N NaOH içeren %2 sodyum karbonat sırasıyla 1:1:100 oranında karıştırılarak alkalik bakır reaktifi (Çizelge 2.2) hazırlanmıştır.

Çizelge 2.2. Alkalın bakır reaktifi

%2 CuSO ₄ .5H ₂ O	1ml
%2 Na/K tartarat	1 ml
%2 Na ₂ CO ₃ (0,1 N NaOH)	100 ml

1 mg/ml stok BSA hazırlanarak 0.01 – 0.2 mg/ml BSA aralığında standart kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.1) oluşturmak için kullanılmıştır. Kör, standart ve örnek tüpleri Çizelge 2.3’te anlatıldığı gibi hazırlanarak vorteks ile karıştırılmış ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından her test tüpüne 0.25 ml 1 N Folin reaktifi eklenmiş ve hızlı bir şekilde (8 saniye içerisinde) vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir tüpte oluşan renk yoğunluğu 660 nm’de ölçülmüştür.



Şekil 2.1. BSA için standart kalibrasyon eğrisi

Çizelge 2.3. Lowry yöntemi ile total protein tayini

KÖR	0.5 ml dH ₂ O		2.5 ml Alkalın Bakır Reaktifi
STANDART	0.5 ml BSA (0.01 - 0.2 mg/ml)		2.5 ml Alkalın Bakır Reaktifi
ÖRNEKLER	<u>Örnek</u>	<u>dH₂O</u>	2.5 ml Alkalın Bakır Reaktifi
	0.1 ml	0.4 ml	
	0.25 ml	0.25 ml	
	0.5 ml	-----	

2.2.5. Mikroorganizmaların GST aktivitelerinin belirlenmesi

Üç farklı tuz konsantrasyonunda geliştirilen mikroorganizmalar enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Glutasyon S-transferaz aktivitesi ölçümleri, kofaktör GSH ve substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) varlığında Habig ve ark. (1974) yönteminin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi elde etmek için gereken optimum koşulları belirlemek üzere yedi farklı parametre (Çizelge 2.4) kullanılmıştır. Substrat CDNB'ye karşı GST aktivitesi Çizelge 2.5'te verilen koşullar altında konjugasyon ürün oluşumunun izlenmesi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2.4. GST optimizasyonunda kullanılan parametreler

Besiyeri tuz konsantrasyonu (%)	20, 25, 30
Tampon solüsyonları (50mM)	Sodyum asetat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, Tris-HCl
pH değerleri	5.5 [#] , 6.0 [#] , 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5*
Sıcaklık (°C)	15, 20, 25, 30, 35
Protein konsantrasyonları (µg)	25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150
Final CDNB Konsantrasyonları (mM)	0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.65, 0.75, 0.85, 1.0, 1.5, 2.0
Final GSH Konsantrasyonları (mM)	0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0*, 6.0*

[#]*P. halophila* GST aktivitesi optimizasyonunda kullanılan ilave pH değerleri

**H. hispanica* GST aktivitesi optimizasyonunda kullanılan ilave pH değerleri

•*P. halophila* GST aktivitesi optimizasyonunda kullanılan ilave final GSH konsantrasyonları

Çizelge 2.5. Spektrofotometrik GST enzim aktivitesi deneyi koşulları

Substrat	Stok [Substrat] (mM)	Final [Substrat] (mM)	Final [GSH] (mM)	Final [Tampon] (mM) 'pH'	λ_{max} (nm)	ϵ ($\mu M^{-1}cm^{-1}$)
CDNB	20.0	1.0	1.0* 4.0 [#]	50.0 '6.5' [#] '9.0'*	340	0.0096

[#]*P. halophila* için kullanılan değerler

**H. hispanica* için kullanılan değerler

Reaksiyon ortamına enzim kaynağının eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Enzim içermeyen reaksiyon karışımı kör (non-enzimatik reaksiyon) olarak kullanılmıştır. Substrat CDNB'ye karşı GST aktivitesi 340 nm'de 3 dakika boyunca konjugasyon ürünü oluşumunun gözlenmesi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. CDNB-GSH konjugatının molar absorptivite katsayısı ($0.0096 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak reaksiyon oranı hesaplanmış ve bir dakikada oluşan ürün miktarı nmol cinsinden bulunmuştur. Enzimin CDNB ve GSH'a karşı maksimum hızını (V_{max}) ve bu hızın yarısı hıza karşılık gelen CDNB ve GSH konsantrasyonunu (K_m) hesaplamak için Lineweaver-Burk Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerinden yararlanılmıştır.

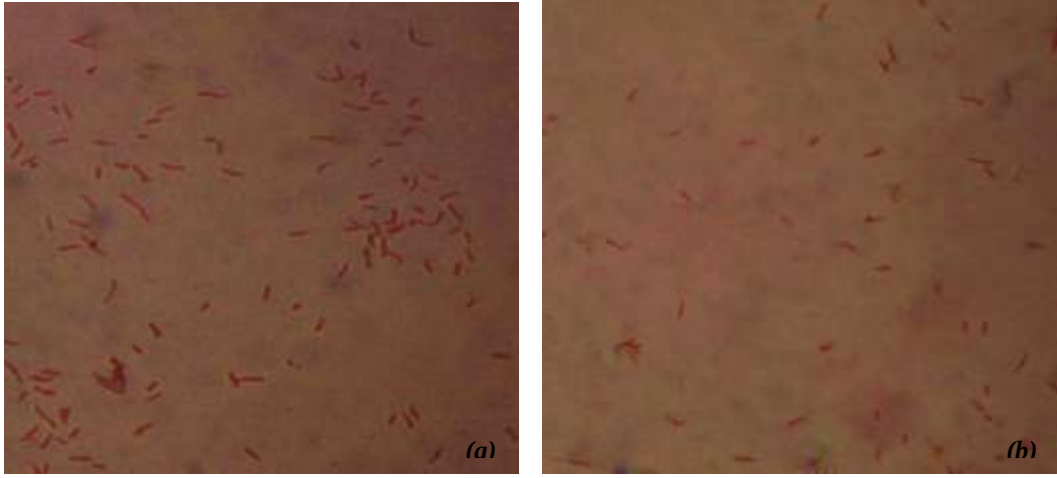
2.2.6. İstatistiksel analiz

Her parametrenin farklı değerleri için kendisi dışındaki diğer altı parametrenin optimum değerleri sabit tutularak birbirinden bağımsız 6 ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farklılıklar SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak student-t testi (örnek eşleme testi) ve ANOVA metodu (tek yönlü varyans analizi) yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için Duncan testi (çoklu karşılaştırma testi) kullanılmıştır. Analizler %5 anlam düzeyine göre yapılmış ve %5'ten düşük olasılık ($p < 0.05$) gösteren değerler arasındaki farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Mikroorganizmaların Gram Reaksiyonları

Pseudomonas halophila ve *Haloarcula hispanica* modifiye Gram boyama sonucunda kırmızı-pembe renge (Gram negatif) boyanmıştır. Her iki mikroorganizma da çomak şekline sahiptir. Şekil 3.1’de boyama sonrası Gram negatif boyanmış çomak şeklindeki hücrelerin immersiyon objektifi ile ışık mikroskopundaki görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.1. Mikroorganizmaların modifiye gram boyama sonrası ışık mikroskopundaki (100x) görüntüleri (a)*Pseudomonas halophila* ve (b) *Haloarcula hispanica*

3.2. Mikroorganizmaların Toplam Protein İçeriklerinin Tayini

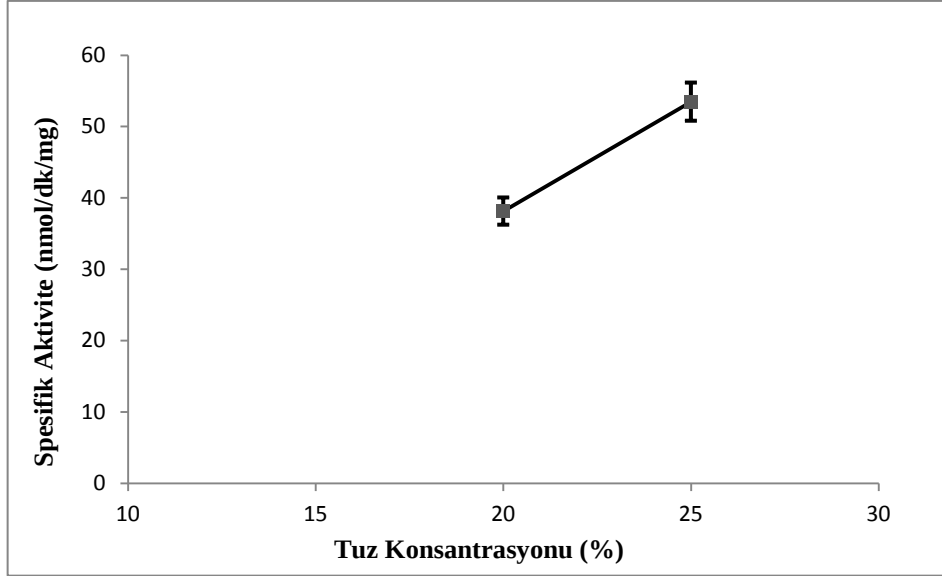
Hücrelerin toplam protein içeriklerinin belirlenmesi standart olarak sığır serum albüminin (BSA) kullanıldığı Lowry ve ark. yöntemine (1951) göre gerçekleştirilmiştir. %20 ve %25 tuz konsantrasyonunda üreyen *P. halophila*’nın toplam protein içeriği sırasıyla 7,42 mg/ml ve 14,43 mg/ml olarak bulunmuştur (bu mikroorganizma %30 tuz konsantrasyonunda ürememiştir). %20, %25 ve %30 tuz konsantrasyonunda üretilen *H. hispanica*’nın toplam protein içeriğinin ise sırasıyla 8,57 mg/ml, 14,95 mg/ml ve 18,16 mg/ml olduğu saptanmıştır.

3.3. *Pseudomonas halophila* GST Aktivitesinin Karakterizasyonu

P. halophila ekstraktlarındaki glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi, Habig ve ark. (1974) yönteminin modifiye edilmesiyle, substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak ve 340 nm'deki tiyoeter oluşumunun izlenmesi esasına dayanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ANOVA, Dancon ve Student-t testleri yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiş, maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar saptanmıştır. Optimum koşullar altında *P. halophila* DSM 3050 suşunun GST spesifik aktivitesinin 53.48 nmol/dk/mg olduğu belirlenmiştir.

3.3.1. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

Tuz konsantrasyonunun GST aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla *P. halophila* kültürleri %20, %25 ve %30 tuz konsantrasyonlarındaki sıvı besiyerlerinde bir hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 7. günün sonunda enzim ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. %30 tuz konsantrasyonunda gelişim gözlenmediği için enzim aktivitesi belirlenememiştir. %20 ve %25 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerlerinde gelişen *P. halophila* GST aktivitesine ait grafik Şekil 3.2'de verilmiştir. Sonuçlar student-t testi yardımıyla istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Çizelge 3.1). %95 güvenle %20 ve %25 tuz konsantrasyonundaki enzim aktiviteleri arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. %25 tuz konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.2. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 4 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

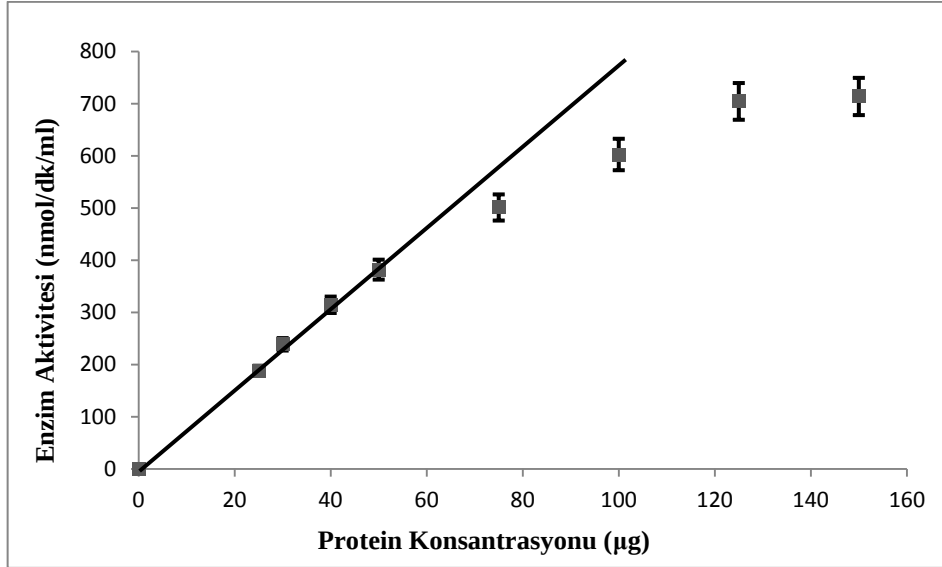
Çizelge 3.1. Tuz konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin istatistiksel analizi

Student-t Testi								
	Eşlerin farklılıkları					t	df	Önem düzeyi (p)
	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	95% güvenle fark aralığı				
				Alt	Üst			
%20-%25	-19,097	10,909	4,454	-30,545	-7,648	-4,288	5	,008*

*p<0.05

3.3.2. Enzim miktarının *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

GST aktivitesine enzim miktarının etkisi 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki final protein konsantrasyonu 25 µg ile 150 µg arasında değiştirilerek belirlenmiştir. Protein miktarının GST enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.3'te gösterilmiştir. 50 µg protein konsantrasyonuna kadar aktivitenin enzim miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu konsantrasyon optimum olarak kabul edilerek çalışmanın devamında 50 µg protein konsantrasyonu rutin olarak kullanılmıştır. ANOVA metodu kullanılarak %5 anlam düzeyine göre yapılan tek yönlü varyans analizleri sonucunda farklı enzim miktarlarında ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.2). Duncan testi sonucunda GST aktivitesi bakımından 7 farklı grup oluşmuştur (Çizelge 3.3).



Şekil 3.3. Enzim miktarının *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 4 mM GSH ve pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.2. Enzim miktarının *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Gruplar arasında	7943,977	7	1134,854	482,891	,000*
Grup içinde	94,005	40	2,350		
Toplam	8037,982	47			

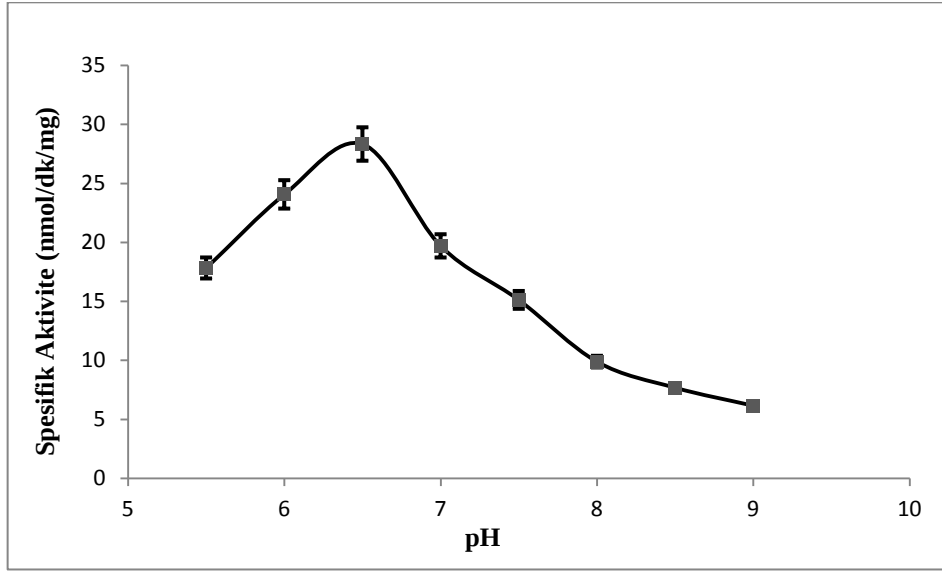
*p<0.05

Çizelge 3.3. Enzim miktarının *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST Aktivitesi								
Duncan								
Protein konst.	Örnek sayısı	Homojen gruplar						
		1	2	3	4	5	6	7
25 µg	6	12,5900						
30 µg	6		15,9633					
40 µg	6			21,0267				
50 µg	6				25,5367			
75 µg	6					33,5050		
100 µg	6						40,2933	
125 µg	6							47,1017
150 µg	6							47,7333
Önem düzeyi		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,480

3.3.3. pH'nın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

GST aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek üzere 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki 50 mM Tris-HCl tampon solüsyonunun pH'sı 5.5 ile 9.0 arasında değiştirilmiştir. Aktivitenin pH 5.5'ten pH 6.5'e kadar arttığı, daha sonra pH 9.0'a kadar giderek azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.4). Maksimum aktiviteyi bulmak için optimum pH olarak belirlenen pH 6.5 bu çalışmada rutin olarak kullanılmıştır. ANOVA metoduyla yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda farklı pH değerlerinde ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.4). Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için yapılan Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 6 grup oluşmuştur (Çizelge 3.5).



Şekil 3.4. pH'nın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 4 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.4. pH'ın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Gruplar arasında	2628,708	7	375,530	84,312	,000*
Grup içinde	178,161	40	4,454		
Toplam	2806,870	47			

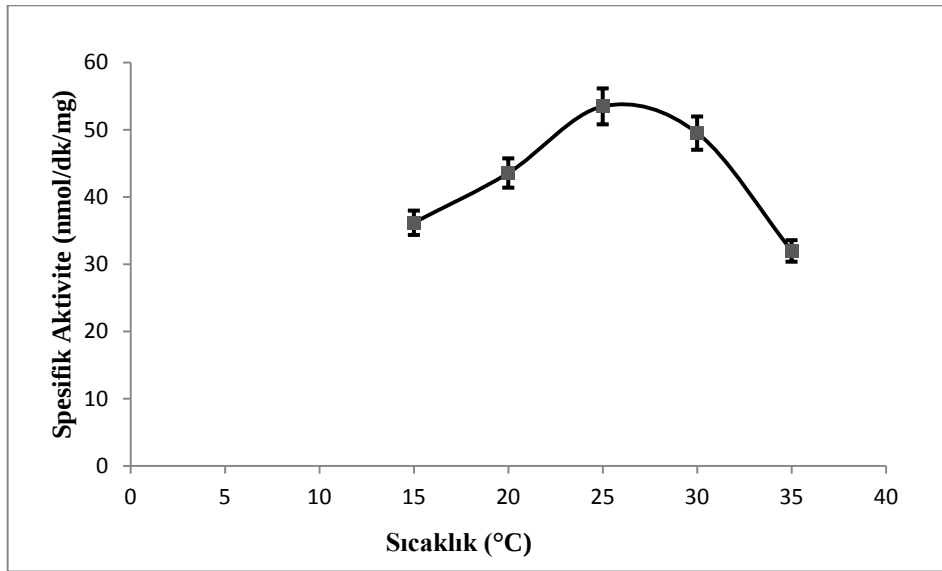
*p<0.05

Çizelge 3.5. pH'ın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST Aktivitesi							
Duncan							
pH	Örnek sayısı	Homojen Gruplar					
		1	2	3	4	5	6
9.0	6	6,1600					
8.5	6	7,6917	7,6917				
8.0	6		9,8917				
7.5	6			15,1217			
5.5	6				17,8267		
7.0	6				19,7050		
6.0	6					24,0650	
6.5	6						28,3350
Önem Düzeyi		,216	,079	1,000	,131	1,000	1,000

3.3.4. Sıcaklığın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

15-35°C arasındaki sıcaklık değerlerinde GST aktiviteleri ölçülerek sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi tayin edilmiştir. Enzim aktivitesi 15°C'den 25°C'ye kadar artmış ve daha sonra 30 ve 35°C'de giderek azalmıştır. Sıcaklığın *P. halophila* GST aktivitesine etkisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve farklı sıcaklıklarda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farklılıkların anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.6). Duncan testi sonucunda GST aktivitesi bakımından 3 farklı grup oluşmuş (Çizelge 3.7) ve en yüksek aktivitenin gözlemlendiği 25°C optimum sıcaklık olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Sıcaklığın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 4 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.6. Sıcaklığın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Gruplar arasında	2246,533	4	561,633	22,837	,000*
Grup içinde	614,833	25	24,593		
Toplam	2861,367	29			

*p<0.05

Çizelge 3.7. Sıcaklığın *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

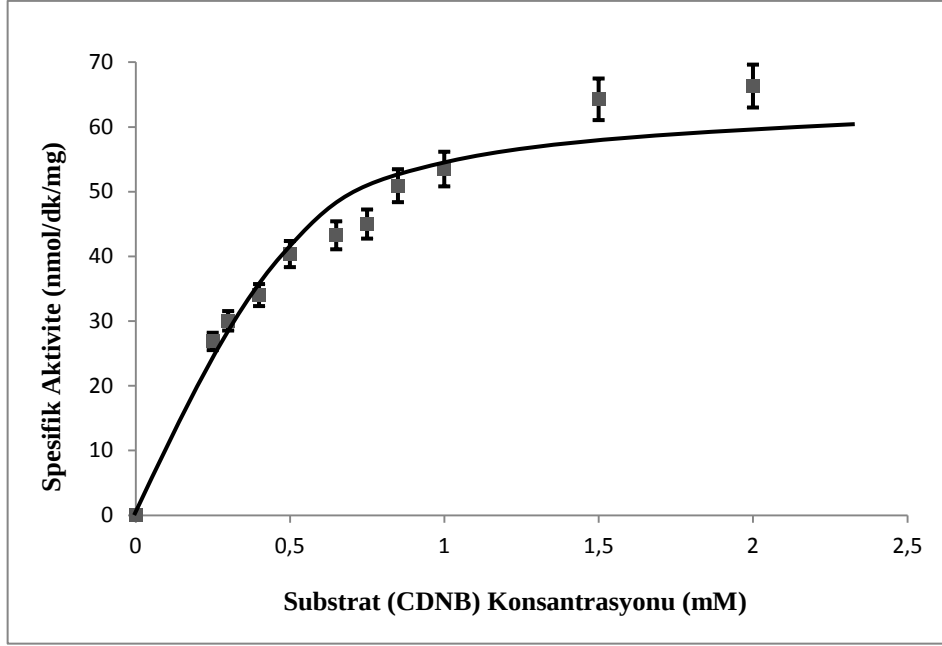
GST Aktivitesi				
Duncan				
Sıcaklık	Örnek sayısı	Homojen Gruplar		
		1	2	3
35 °C	6	31,5000		
15 °C	6	32,3333		
20 °C	6		43,0000	
30 °C	6			49,0000
25 °C	6			53,0000
Önem Düzeyi		,773	1,000	,175

3.3.5. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

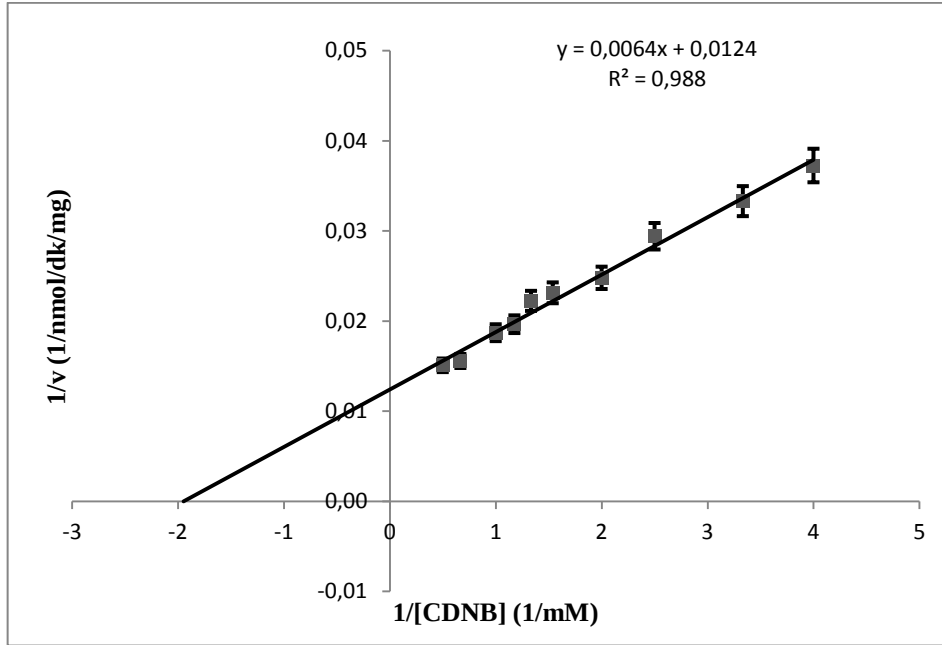
GST aktivitesine substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) etkisi reaksiyon karışımı içindeki final CDBN konsantrasyonu 0.25 mM ile 2.0 mM arasında değiştirilerek belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi Şekil 3.6’da gösterilmiştir. GST aktivitesinin yaklaşık 1.0 mM CDBN konsantrasyonunda doyuma ulaştığı gözlenmiş ve çalışmanın devamında bu değer optimum konsantrasyon olarak kullanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 3.7) çizilerek CDBN’ye karşı GST aktivitesinin K_m değeri 0.52 mM ve V_{max} değeri 80.65 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametrelere destekleyici veriler elde etmek üzere Hanes-Woolf (Şekil 3.8) ve Eadie-Hofstee (Şekil 3.9) grafikleri de çizilmiştir. Bu üç grafiğe göre hesaplanan CDBN’ye karşı *P. halophila* GST aktivitesine ait kinetik parametreler Çizelge 3.8’de verilmiştir. ANOVA metodu kullanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda farklı CDBN konsantrasyonlarında ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farklar anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 3.9). Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 5 grup oluşmuştur (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.8. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre CDBN’ye karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin kinetik parametreleri

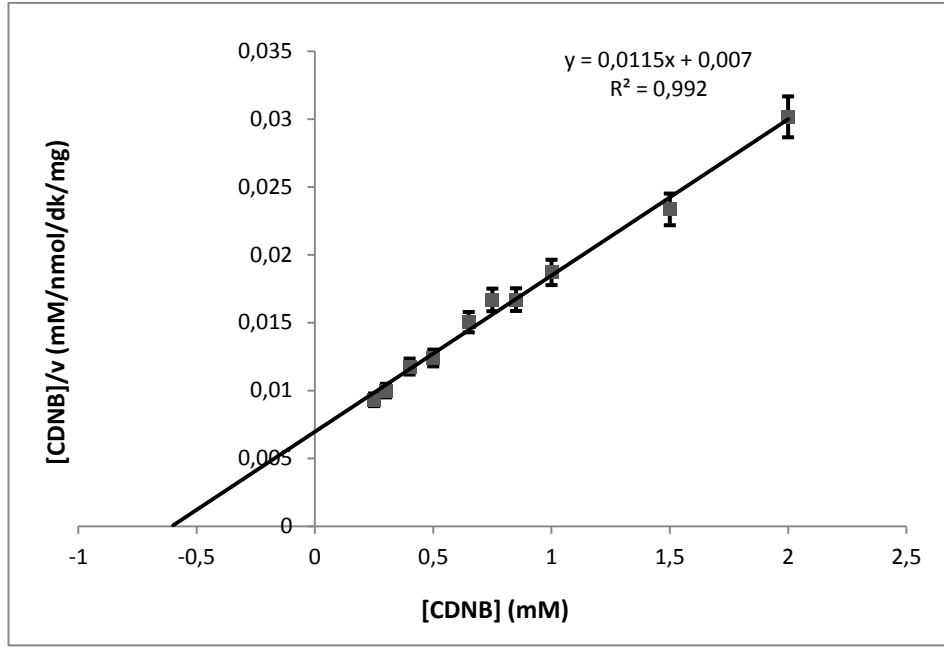
Hesaplama Metodu	K_m	V_{max}	R^2
Lineweaver-Burk	0.52 mM	80.65 nmol/dk/mg	0.99
Hanes-Woolf	0.61 mM	86.96 nmol/dk/mg	0.99
Eadie-Hofstee	0.54 mM	82.98 nmol/dk/mg	0.95



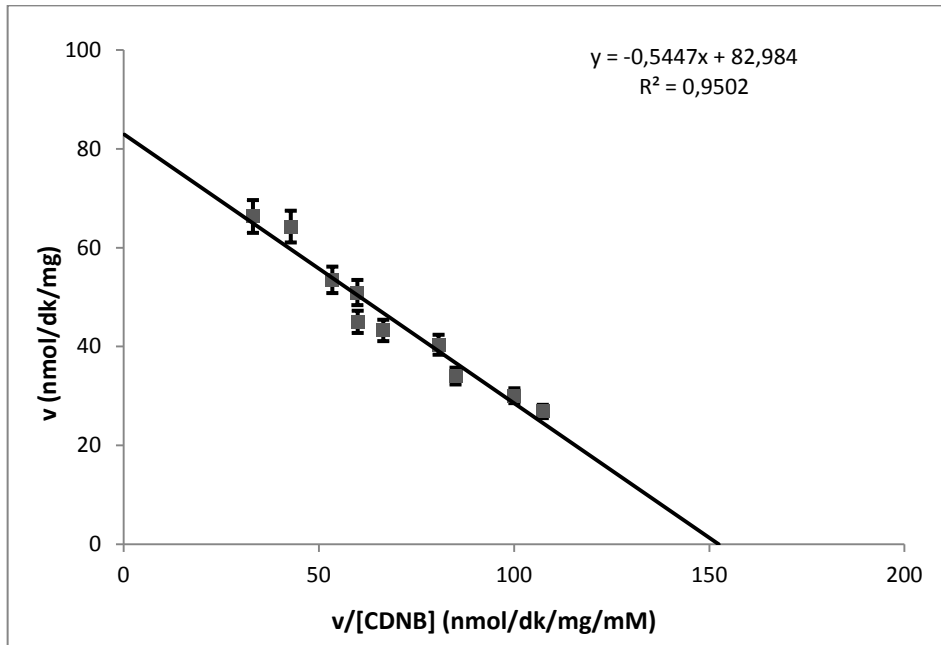
Şekil 3.6. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 4 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.



Şekil 3.7. Substrata (CDNB) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.8. Substrata (CDNB) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği



Şekil 3.9. Substrata (CDNB) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği

Çizelge 3.9. CDNB konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Gruplar arasında	9771,245	9	1085,694	55,206	,000*
Grup içinde	983,320	50	19,666		
Toplam	10754,564	59			

*p<0.05

Çizelge 3.10. CDNB konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

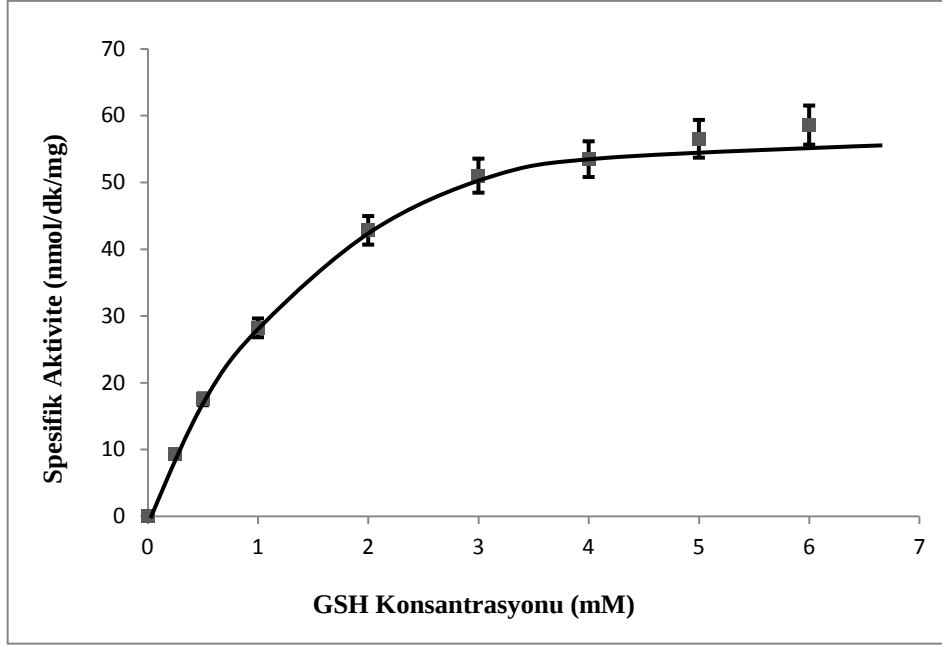
GST Aktivitesi						
Duncan						
CDNB Konsantrasyonu	Örnek sayısı	Homojen Gruplar				
		1	2	3	4	5
0.25 mM	6	26,8466				
0.30 mM	6	30,0383	30,0383			
0.40 mM	6		33,9450			
0.50 mM	6			40,3500		
0.65 mM	6			43,2850		
0.75 mM	6			44,9866		
0.85 mM	6				50,9150	
1.0 mM	6				53,3650	
1.5 mM	6					64,2633
2.0 mM	6					66,3116
Önem Düzeyi		,218	,133	,092	,343	,427

3.3.6. Kofaktör redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi

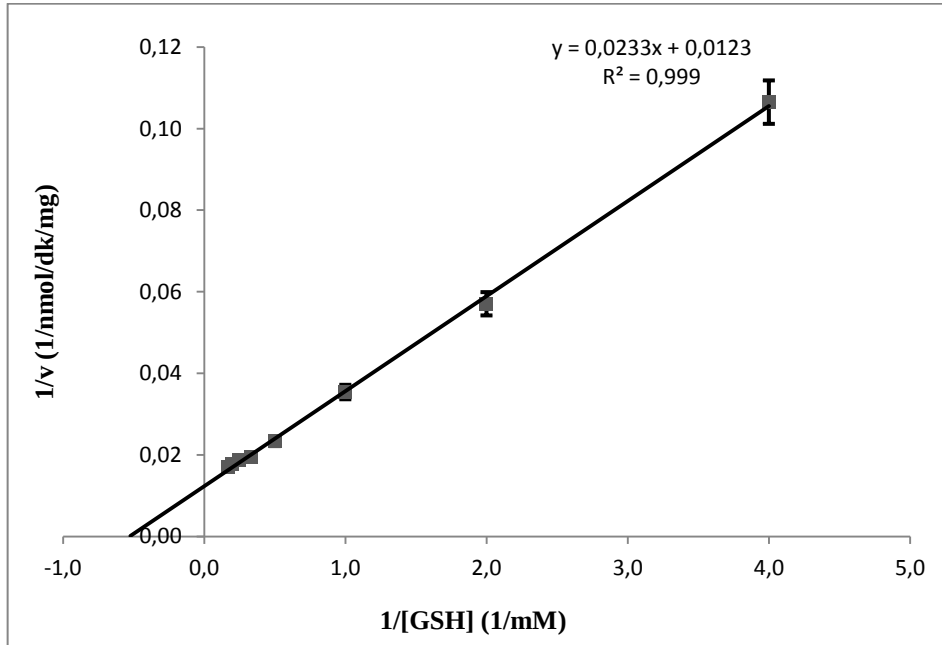
GST aktivitesine redükte glutatyonun (GSH) etkisi 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki final GSH konsantrasyonu 0.25 mM ile 6.0 mM arasında değiştirilerek ölçülmüştür. GSH konsantrasyonunun GST aktivitesine etkisi Şekil 3.10'da gösterilmiştir. GST aktivitesinin yaklaşık 4.0 mM GSH konsantrasyonunda doyuma ulaştığı gözlenmiş ve bu konsantrasyon çalışmanın devamında optimum olarak kabul edilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 3.11) çizilerek GSH'a karşı GST aktivitesinin K_m değeri 1.89 mM ve V_{max} değeri 81.30 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametrelere destekleyici veriler elde etmek üzere Hanes-Woolf (Şekil 3.12) ve Eadie-Hofstee (Şekil 3.13) grafikleri de çizilmiştir. Bu üç grafiğe göre hesaplanan GSH'a karşı *P. halophila* GST aktivitesine ait kinetik parametreler Çizelge 3.11'de gösterilmiştir. ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda farklı GSH konsantrasyonlarında ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 3.12). Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 7 grup oluşmuştur (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.11. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre GSH'a karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin kinetik parametreleri

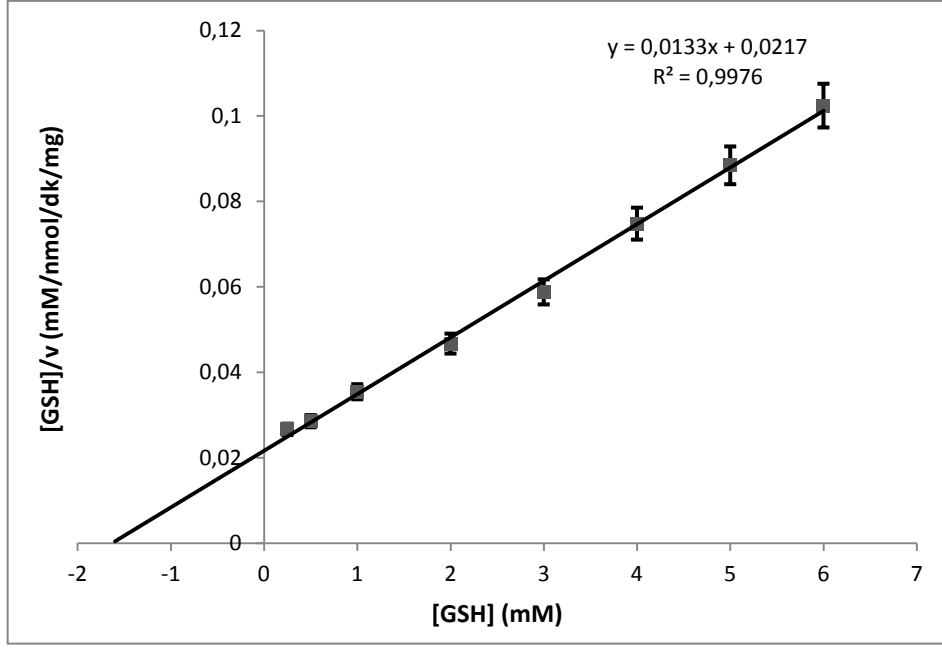
Hesaplama Metodu	K_m	V_{max}	R^2
Lineweaver-Burk	1.89 mM	81.30 nmol/dk/mg	0.99
Hanes-Woolf	1.63 mM	75.19 nmol/dk/mg	0.99
Eadie-Hofstee	1.75 mM	77.59 nmol/dk/mg	0.99



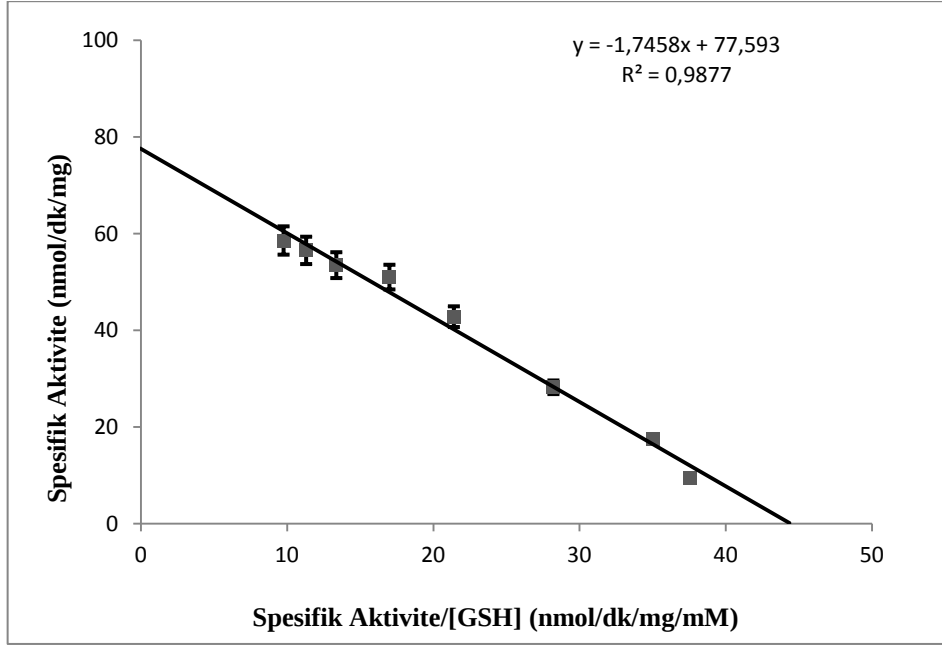
Şekil 3.10. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.



Şekil 3.11. Kofaktöre (GSH) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.12. Kofaktöre (GSH) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği



Şekil 3.13. Kofaktöre (GSH) karşı *Pseudomonas halophila* GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği

Çizelge 3.12. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Önem Düzeyi (p)
Gruplar arasında	15162,477	7	2166,068	692,356	,000*
Grup içinde	125,142	40	3,129		
Toplam	15287,619	47			

*p<0.05

Çizelge 3.13. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun *Pseudomonas halophila* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

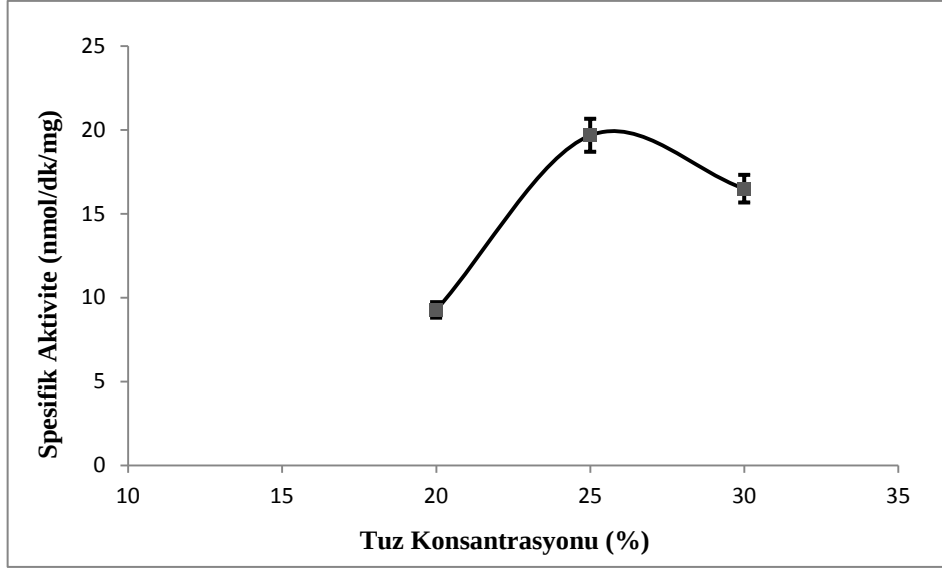
GST Aktivitesi								
Duncan								
GSH Konst.	Örnek sayısı	Homojen Gruplar						
		1	2	3	4	5	6	7
0.25 mM	6	9,3850						
0.50 mM	6		17,5200					
1.0 mM	6			28,2200				
2.0 mM	6				33,7816			
3.0 mM	6					51,0150		
4.0 mM	6						53,4850	
5.0 mM	6							56,5800
6.0 mM	6							58,5816
Önem Düzeyi		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,057

3.4. *Haloarcula hispanica* GST Aktivitesinin Karakterizasyonu

H. hispanica ekstraktlarındaki glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi, Habig ve ark. (1974) yönteminin modifiye edilmesiyle, substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak ve 340 nm'deki tiyoeter oluşumunun izlenmesi esasına dayanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ANOVA ve Duncan testleri yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiş, maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar saptanmış ve *H. hispanica* ATCC 33960 suşunun GST spesifik aktivitesinin 19.67 nmol/dk/mg olduğu belirlenmiştir.

3.4.1. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

Tuz konsantrasyonunun GST aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla *H. hispanica* kültürleri %20, %25 ve %30 tuz konsantrasyonlarına sahip sıvı besiyerlerinde bir hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 7. günün sonunda ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Farklı tuz konsantrasyonuna sahip besiyerlerinde gelişen *H. hispanica* GST aktivitesine ait grafik Şekil 3.14'te verilmiştir. En yüksek GST aktivitesinin gözlemlendiği %25 tuz konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre analiz edilmiş ve GST aktiviteleri arasındaki farklar anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 3.14). Duncan testi sonucunda GST aktivitesi bakımından 3 farklı grup elde edilmiştir (Çizelge 3.15).



Şekil 3.14. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 1 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.14. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	341,688	2	170,844	36,744	,000*
Grup içinde	69,743	15	4,650		
Toplam	411,431	17			

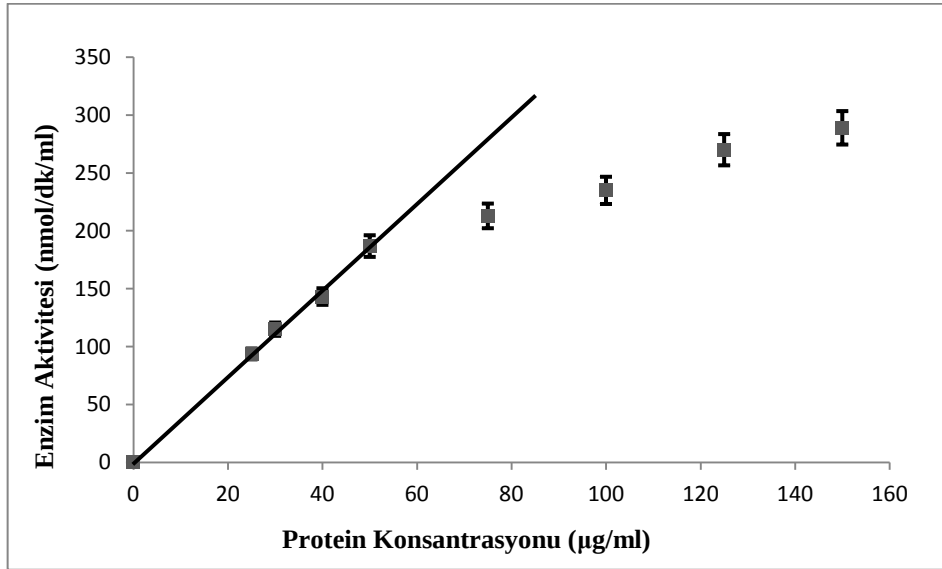
*p<0.05

Çizelge 3.15. Besiyeri tuz konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST aktivitesi				
Duncan				
Tuz Konsantrasyonu	Örnek sayısı	Homojen gruplar		
		1	2	3
% 20	6	9,2617		
% 30	6		16,4917	
% 25	6			19,6750
Önem düzeyi		1,000	1,000	1,000

3.4.2. Enzim miktarının *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

GST aktivitesine enzim miktarının etkisi 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki final protein konsantrasyonu 25 µg ile 150 µg arasında değiştirilerek belirlenmiştir. Protein miktarının GST enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.15'te gösterilmiştir. 50 µg protein konsantrasyonuna kadar aktivitenin enzim miktarı ile orantılı olarak arttığı gözlenmiş ve bu konsantrasyon optimum olarak kabul edilerek çalışmanın devamında 50 µg protein konsantrasyonu rutin olarak kullanılmıştır. ANOVA metodu kullanılarak %5 anlam düzeyine göre yapılan analizler sonucunda farklı enzim miktarlarında ölçülen GST aktivitesi arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.16). Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için yapılan Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 6 grup oluşmuştur (Çizelge 3.17).



Şekil 3.15. Enzim miktarının *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 1 mM GSH ve pH'sı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.16. Protein konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	5192,648	7	741,807	84,870	,000*
Grup içinde	349,619	40	8,740		
Toplam	5542,267	47			

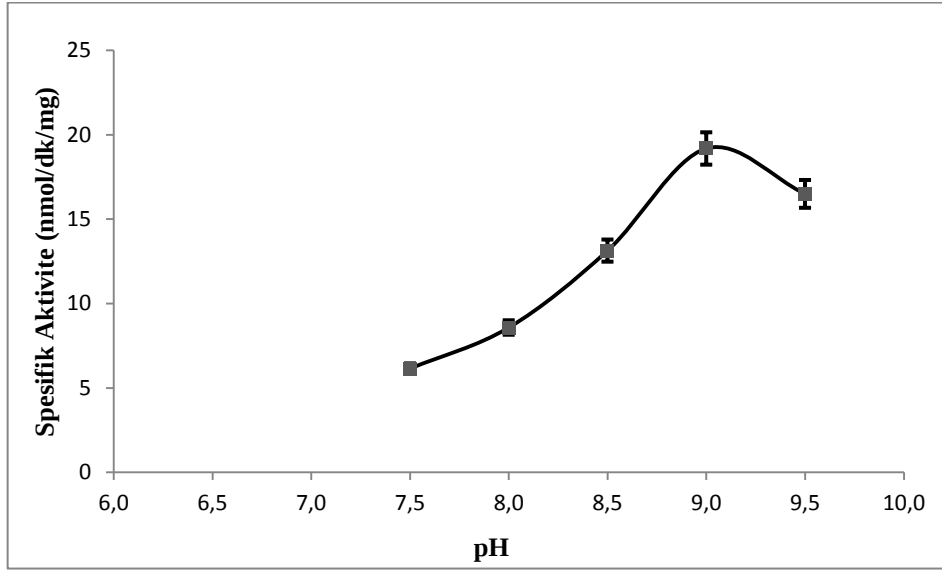
*p<0.05

Çizelge 3.17. Protein konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST aktivitesi							
Duncan							
Protein Konsantrasyonu	Örnek sayısı	Homojen gruplar					
		1	2	3	4	5	6
25 µg	6	6,8083					
30 µg	6	9,0117					
40 µg	6		12,6700				
50 µg	6			19,1800			
75 µg	6				24,1633		
100 µg	6					28,7467	
125 µg	6						33,4450
150 µg	6						35,9400
Önem düzeyi		,204	1,000	1,000	1,000	1,000	,152

3.4.3. pH'nın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

GST aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek üzere, 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki 50 mM Tris-HCl tampon solüsyonun pH'sı 6.5 ile 9.5 arasında değiştirilmiştir. pH 6.5 ve 7.0'da aktivite gözlenmemiştir. Aktivitenin pH 7.5'ten pH 9.0'a kadar arttığı, daha sonra giderek azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.16). Maksimum aktiviteyi bulmak için optimum pH olarak belirlenen pH 9.0 bu çalışmada rutin olarak kullanılmıştır. ANOVA metodu kullanılarak yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda farklı pH değerlerinde ölçülen GST aktiviteleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.18). Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için yapılan Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 5 grup oluşmuştur (Çizelge 3.19).



Şekil 3.16. pH'nın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 1 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.18. pH'ın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	734,295	4	183,574	74,074	0,000*
Grup içinde	61,956	25	2,478		
Toplam	796,252	29			

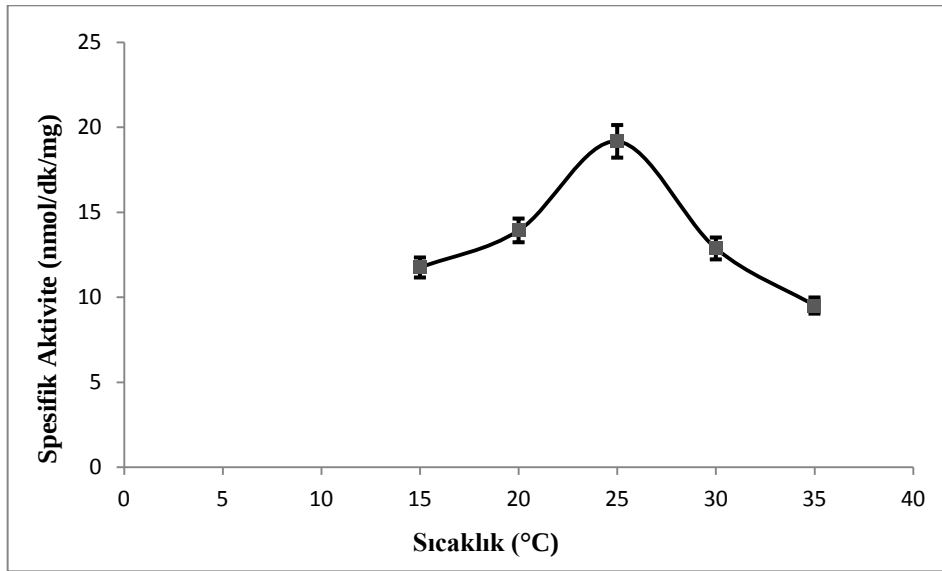
*p<0.05

Çizelge 3.19. pH'ın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST aktivitesi						
Duncan						
pH	Örnek sayısı	Homojen gruplar				
		1	2	3	4	5
7.5	6	6,2033				
8.0	6		8,5733			
8.5	6			13,1300		
9.5	6				16,4917	
9.0	6					19,6750
Önem düzeyi		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

3.4.4. Sıcaklığın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

15-35°C arasındaki sıcaklık değerlerinde GST aktivite ölçülerek sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 15°C'den 25°C'ye kadar artmış ve daha sonra 30 ve 35°C'de giderek azalmıştır. Sıcaklığın *H. hispanica* GST aktivitesine etkisi Şekil 3.17'de gösterilmiştir. Sonuçlar ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve farklı sıcaklıklarda ölçülen enzim aktivite arasındaki farkların anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.20). Duncan testi sonucunda GST aktivitesi bakımından 3 farklı grup oluşmuş (Çizelge 3.21) ve en yüksek aktivitenin gözlemlendiği 25°C optimum sıcaklık olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.17. Sıcaklığın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 1 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

Çizelge 3.20. Sıcaklığın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	345,434	4	86,358	22,463	,000*
Grup içinde	96,112	25	3,844		
Toplam	441,546	29			

*p<0.05

Çizelge 3.21. Sıcaklığın *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

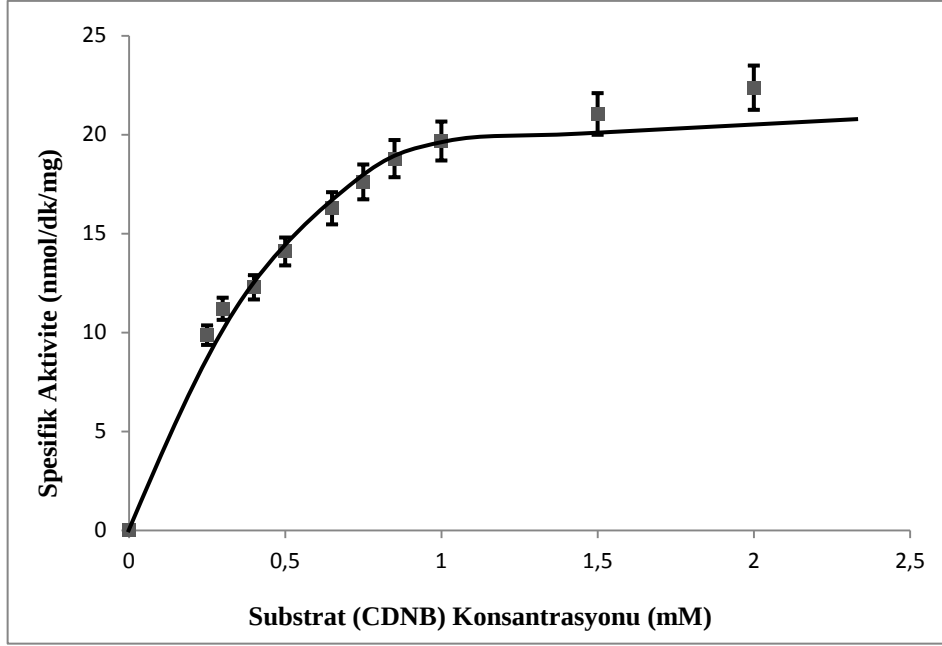
GST aktivitesi				
Duncan				
Sıcaklık	Örnek sayısı	Homojen gruplar		
		1	2	3
35 °C	6	9,5200		
15 °C	6	11,7583	11,7583	
30 °C	6		12,8783	
20 °C	6		13,9433	
25 °C	6			19,6750
Önem düzeyi		,059	,079	1,000

3.4.5. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

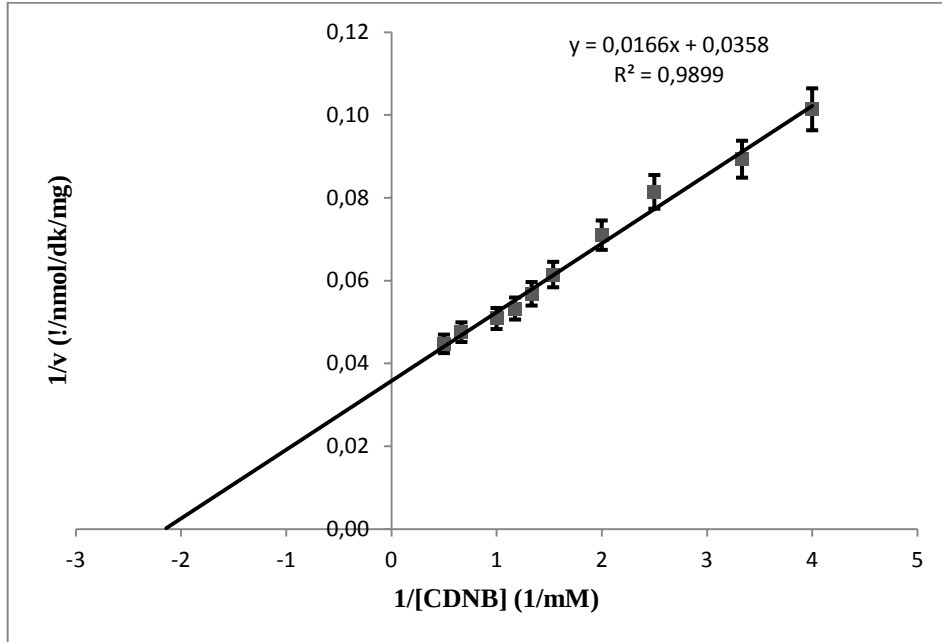
GST aktivitesine substrat CDNB'nin etkisi reaksiyon karışımı içindeki CDNB konsantrasyonu 0.25 mM ile 2.0 mM arasında değiştirilerek belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi Şekil 3.18'de verilmiştir. GST aktivitesinin yaklaşık 1.0 mM CDNB konsantrasyonunda doyuma ulaştığı gözlenmiş ve çalışmanın devamında bu değer optimum konsantrasyon olarak kullanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 3.19) çizilerek CDNB'ye karşı GST aktivitesinin K_m değeri 0.46 mM ve V_{max} değeri 27.93 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametrelere destekleyici veriler elde etmek üzere Hanes-Woolf (Şekil 3.20) ve Eadie-Hofstee (Şekil 3.21) grafikleri de çizilmiştir. Bu üç grafiğe göre hesaplanan CDNB'ye karşı *H. hispanica* GST aktivitesine ait kinetik parametreler Çizelge 3.22'de gösterilmiştir. ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda farklı CDNB konsantrasyonlarında ölçülen GST aktiviteleri farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 3.23). Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 6 grup oluşmuştur (Çizelge 3.24).

Çizelge 3.22. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre CDNB'ye karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin kinetik parametreleri

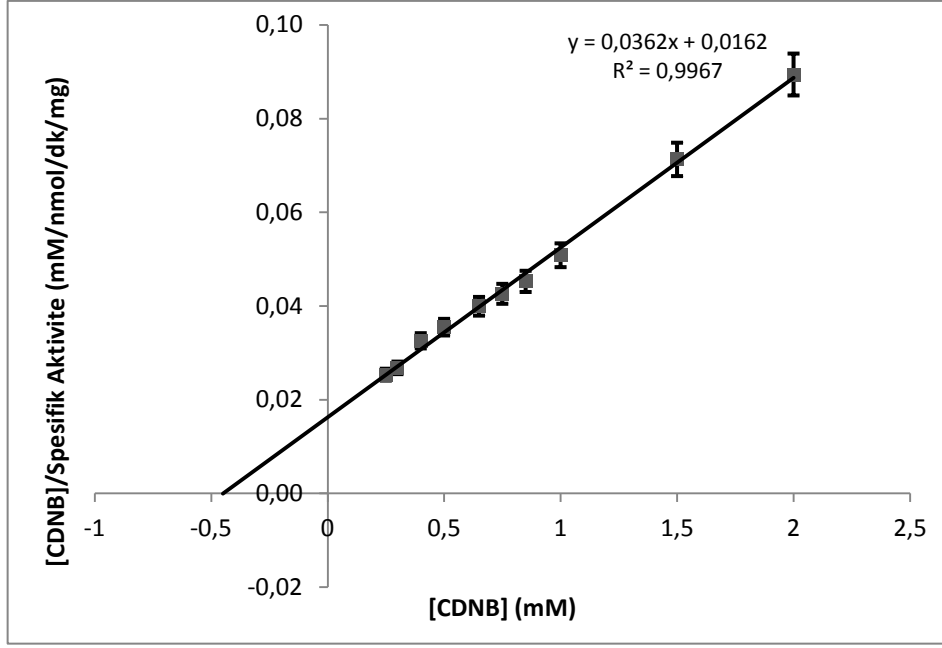
Hesaplama Metodu	K_m	V_{max}	R^2
Lineweaver-Burk	0.46 mM	27.93 nmol/dk/mg	0.99
Hanes-Woolf	0.45 mM	27.62 nmol/dk/mg	0.99
Eadie-Hofstee	0.46 mM	27.95 nmol/dk/mg	0.97



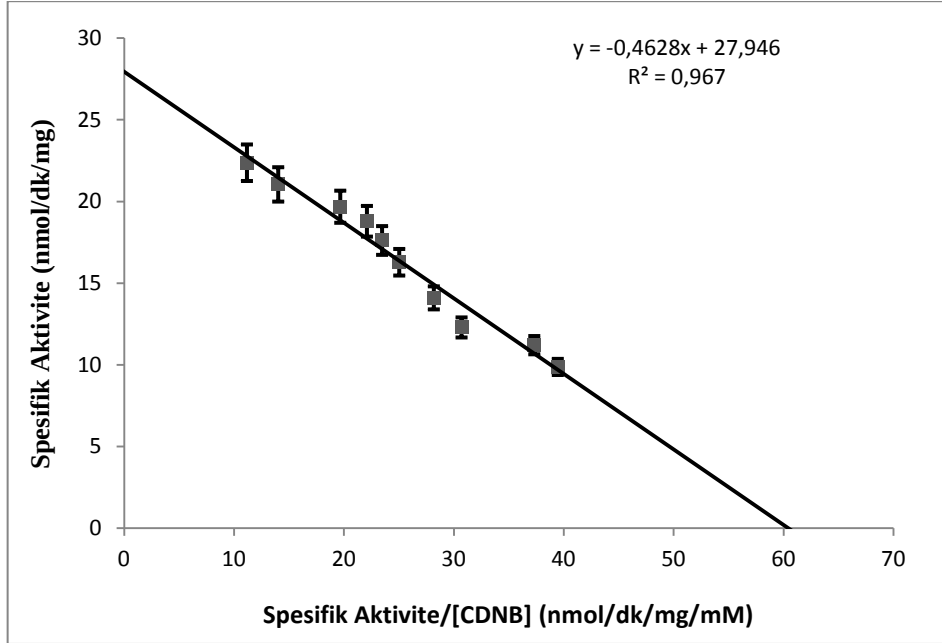
Şekil 3.18. Substrat (CDNB) konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM GSH, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'ı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.



Şekil 3.19. Substrata (CDNB) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.20. Substrata (CDNB) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği



Şekil 3.21. Substrata (CDNB) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği

Çizelge 3.23. CDNB konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	770,611	9	85,623	17,937	,000*
Grup içinde	238,678	50	4,774		
Toplam	1009,290	59			

*p<0.05

Çizelge 3.24. CDNB konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

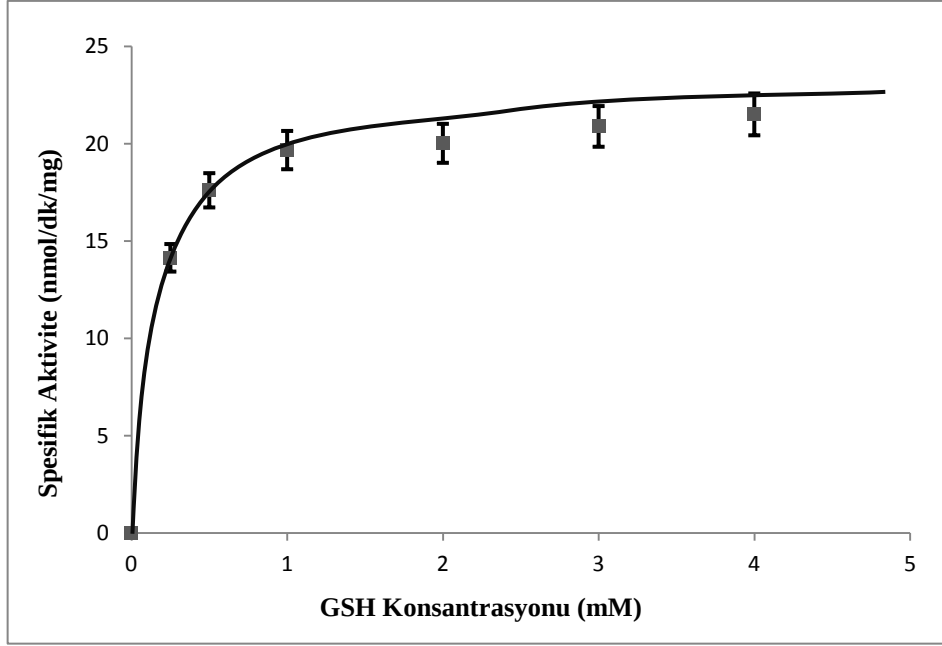
GST aktivitesi							
Duncan							
CDNB Konsantrasyonu	Örnek sayısı	Homojen gruplar					
		1	2	3	4	5	6
0.25 mM	6	9,8650					
0.30 mM	6	11,2033	11,2033				
0.40 mM	6		13,2867	13,2867			
0.50 mM	6			14,0967	14,0967		
0.65 mM	6				16,2783	16,2783	
0.75 mM	6					17,6100	17,6100
0.85 mM	6					18,2850	18,2850
1.0 mM	6						19,6767
1.5 mM	6						20,0417
2.0 mM	6						20,3717
Önem düzeyi		,294	,105	,524	,090	,139	,054

3.4.6. Kofaktör redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi

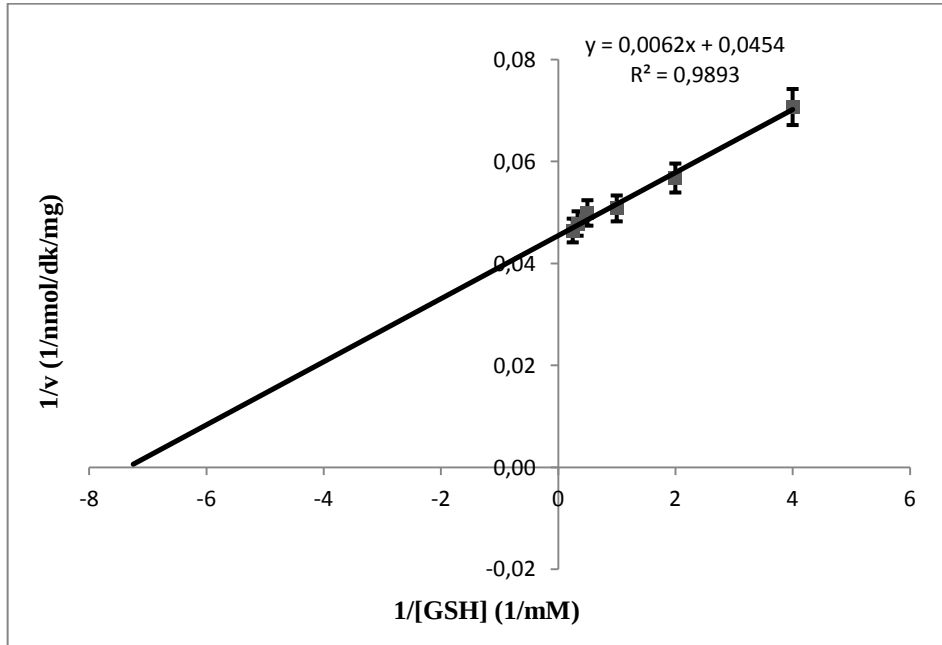
GST aktivitesine redükte glutatyonun (GSH) etkisi, 1.0 ml reaksiyon karışımı içindeki GSH konsantrasyonu 0.25 mM ile 4.0 mM arasında değiştirilerek ölçülmüştür. GSH konsantrasyonunun etkisi Şekil 3.22’de gösterilmiştir. GST aktivitesinin yaklaşık 1.0 mM GSH konsantrasyonunda doyuma ulaştığı gözlenmiş ve bu konsantrasyon çalışmanın devamında optimum olarak kabul edilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 3.23) çizilerek GSH’a karşı GST aktivitesinin K_m değeri 0.13 mM ve V_{max} değeri 22.03 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametrelere destekleyici veriler elde etmek üzere Hanes-Woolf (Şekil 3.24) ve Eadie-Hofstee (Şekil 3.25) grafikleri de çizilmiştir. Bu üç grafiğe göre hesaplanan GSH’a karşı *H. hispanica* GST aktivitesine ait kinetik parametreler Çizelge 3.25’te gösterilmiştir. ANOVA metoduyla %5 anlam düzeyine göre yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda farklı CDNB konsantrasyonlarında ölçülen GST aktiviteleri farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 3.26). Duncan testi sonucunda birbirinden farklı 4 grup oluşmuştur (Çizelge 3.27).

Çizelge 3.25. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerine göre GSH’a karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin kinetik parametreleri

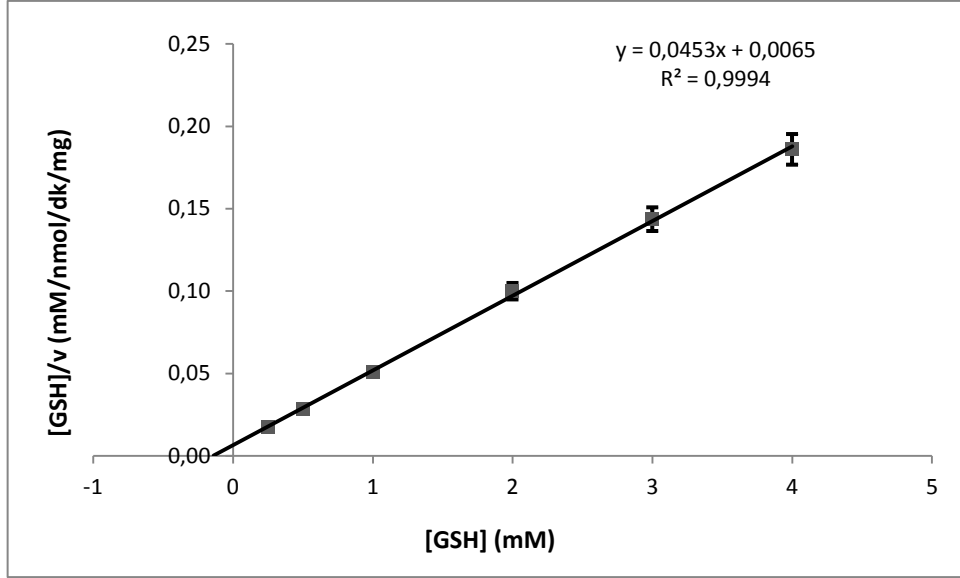
Hesaplama Metodu	K_m	V_{max}	R^2
Lineweaver-Burk	0.13 mM	22.03 nmol/dk/mg	0.99
Hanes-Woolf	0.12 mM	22.08 nmol/dk/mg	0.99
Eadie-Hofstee	0.13 mM	21.96 nmol/dk/mg	0.98



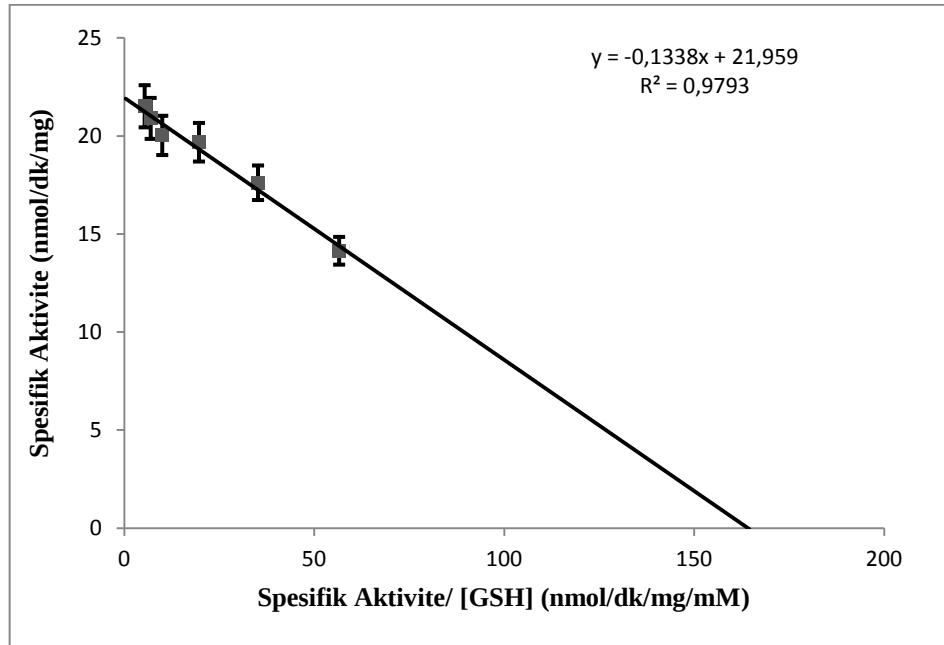
Şekil 3.22. Kofaktör (GSH) konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisi. Hücreler %25 tuz konsantrasyonunda geliştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 1 mM CDNB, 50 µg hücre ekstraktı ve pH'sı 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu içermektedir. Reaksiyon 25°C'de 3 dakika yürütülmüştür. Her bir nokta 6 ölçüm sonucun ortalamasıdır.



Şekil 3.23. Kofaktöre (GSH) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.24. Kofaktöre (GSH) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Hanes-Woolf grafiği



Şekil 3.25. Kofaktöre (GSH) karşı *Haloarcula hispanica* GST aktivitesinin Eadie-Hofstee grafiği

Çizelge 3.26. GSH konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin tek yönlü varyans analizi

ANOVA					
GST Aktivitesi					
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
Gruplar arasında	193,459	5	38,692	10,022	,000*
Grup içinde	115,816	30	3,861		
Toplam	309,276	35			

*p<0.05

Çizelge 3.27. GSH konsantrasyonunun *Haloarcula hispanica* GST aktivitesine etkisinin çoklu karşılaştırma testi

GST aktivitesi					
Duncan					
GSH Konsantrasyonu	Örnek sayısı	Homojen gruplar			
		1	2	3	4
0.25 mM	6	14,5450			
2.0 mM	6	16,1067	16,1067		
3.0 mM	6	16,5483	16,5483		
0.50 mM	6		17,6133	17,6133	
1.0 mM	6			19,6767	19,6767
4.0 mM	6				21,5100
Önem düzeyi		,105	,220	,079	,117

4. TARTIŞMA

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler) tipik olarak glutasyon (GSH) konjugasyonunu kapsayan bir reaksiyonla birçok elektrofilik bileşiğin uzaklaştırılmasını sağlayan bir enzim ailesidir (Armstrong 1997). GST'ler farklı reaksiyon tiplerinde yer alırlar. Genellikle substrat ve GSH'nin sülfür atomu arasında bir tiyoeter bağı oluşumu vasıtasıyla bir elektrofilik merkez içeren bileşikler ile redükte glutasyonun (GSH) konjugasyonunu katalizlerler (Mannervik ve ark. 1985). Konjugasyon reaksiyonlarının yanında GST izozimlerinin çoğu organik hidroperoksitlerin indirgenmesi ve çeşitli doymamış bileşiklerin izomerizasyonu gibi diğer GSH-bağımlı katalitik aktivitelerde yer alırlar. GST aynı zamanda karsinogenlerin uzaklaştırılması, hidrofobik ligandların hücre içi transportu ve sinyal dönüşüm yollarının düzenlenmesi gibi non-katalitik fonksiyonlarda da rol oynar (Adler ve ark. 1999; Cho ve ark. 2001).

Ökaryotik GST'ler halojenli aromatik ve alifatik bileşikler, α,β -doymamış karbonil bileşikleri, izotiyosiyanatlar ve protein disülfidleri gibi çok sayıda elektrofilik bileşiğin glutasyon ile konjugasyonunu sağlar (Hayes ve Pulford 1995). Bugüne kadar çalışılmış bakteriyel GST'ler ise bu tip kimyasallara karşı oldukça düşük bir aktivite gösterirler. Bunun yerine konukçu bakteriler tarafından gelişim için kullanılan kimyasalların degradasyon yollarındaki spesifik reaksiyonları katalizlerler (Vuilleumier 1997). Bunun dışında oksidatif ve ksenobiyotik strese karşı savunmada, naftalin ve izopren metabolizması ile lignin degradasyonunda görevlidirler (Allocati ve ark. 2009). Çok hücreli canlılardaki kadar fazla olmamakla birlikte bazı zararlı kimyasalların degradasyonunda da rol oynadıkları bilinmektedir (Mueller ve ark. 1990; Hofer ve ark. 1994; Wang ve ark. 1996; Kanaly ve Harayama 2000; Xia ve ark. 2005; Cavalca ve ark. 2007).

Yüksek tuz konsantrasyonlarındaki yaşama adaptasyon sağlamış, hipersalin ortamlarda düşük kontaminasyon riski taşıyan ve bu nedenle birçok uygulama alanına sahip halofilik mikroorganizmalar ve bunların enzimlerine olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Halofilik mikroorganizmalarda çalışılmış detoksifikasyon enzimlerine katalaz, katalaz-peroksidaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, askorbik asit oksidaz ve çeşitli dehidrojenazlar örnek olarak verilebilir. (Bonete ve ark. 2003; Zamocky 2004; Chiang ve Chou 2008; Mishra ve ark 2009; Confalonieri ve Sommer 2011; Focardi ve ark. 2012).

Yüksek kararlılıkları ve geniş bir yelpazade katalizledikleri reaksiyonlar sayesinde bakteriyel GST'ler gelecek için oldukça ümit vadeden biyoteknolojik bir kaynak oluşturmaktadır. Örneğin, biyoremediyasyon alanında kontamine olmuş ortamların temizlenmesinde kullanılan geleneksel fizikokimyasal uygulamalara ekonomik bir alternatif olarak kullanılabilirler (Allocati ve ark. 2009).

Bakterilerin genetik manipölasyonlara nispeten açık olması ve hızlı bir şekilde gelişmelerinin gelecekte biyoteknolojik uygulamalarda büyük avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Kurtovic ve ark. (2008) tarafından kullanılan DNA shuffling (DNA karışımı) tekniğini kullanarak farklı memeli türlerinden altı alfa sınıfı GST'yi hibritlemiş ve zararlı kimyasallara karşı gelişmiş katalitik aktivitelere ve değişik substrat seçiciliğine sahip şimerik enzimler elde etmişlerdir.

GST'lerin biyoteknolojik uygulamalarına diğer bir örnek olarak farklı enzimatik aktiviter ile protein füzyon tekniği verilebilir. Örneğin, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz ile üç-fonksiyonlu enzim aktivitesi üretilmiş ve rekombinant şimerik enzimin reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Yan ve ark. 2008). Bu yaklaşımın ilaç sektöründe ve çevresel alanda çeşitli uygulamalara sahip olacağı düşünülmektedir (Allocati ve ark. 2009).

Diğer bir potansiyel uygulama biyosensörlerin hazırlanmasına dayanır. Bu algılama sistemleri çevre kirliliğine sahip ortamların kontrolünde geniş ölçüde kullanılır. Biyosensörler ucuz, kolay kullanımlı, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip geleneksel metotlar ile rekabet edebilecek nitelikte sistemlerdir. Örneğin, bir memeli GST'si kontamine sulardaki kaptanın (GST'nin güçlü bir inhibitörü) saptanması için optikal bir biyosensör geliştirilmesinde kullanılmıştır (Choi ve ark. 2003).

Çevresel toksik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında komple bir metabolik yolağa sahip tek bir bakteri suşunun kullanılabilir. Örneğin Rui ve ark. (2004) *E. coli*'deki bir metabolik yolağı klorlu etenlerin degradasyonunda kullanmışlardır.

GST enzimlerinin yapısal ve fonksiyonel analizleri yapılan prokaryotik organizmalar arasında *Issatchenkia orientalis* (Tamaki ve ark. 1989), *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* (Piccolomini ve ark. 1989), *Escherichia coli* (Rossjohn ve ark., 1998), *Pseudomonas sp.* (Jung ve ark. 1996), *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella planticola*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas campestris* (Zablotowicz ve ark. 1995), *Proteus mirabilis* (Nishida ve ark., 1998; Allocati ve ark. 2006), *Rhodococcus sp* (van Hylckama ve ark. 2000), *Sphingomonas paucimobilis* (Masai ve ark. 2003), *Ochrobactrum anthropi* (Favaloro ve ark. 2000; Tocheva ve ark., 2006; Federici ve ark. 2007), *Burkholderia xenovorans*, *Agrobacterium tumefaciens* (Kosloff ve ark. 2006), *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus elongatus* (Wikteliu ve Stenberg 2007), *Shewanella oneidensis* (Remmerie ve ark. 2008) sayılabilir.

Gram-negatif bakterilerde GST'lerin varlığı, yapısal ve katalitik özellikleri ile ilgili sahip olunan bilgi oldukça fazla olmasına rağmen Gram-pozitif bakterilerde GST'lerin tanımlanması ve karakterizasyonuna ilişkin yalnızca birkaç çalışma vardır. Örneğin rizosfer bakterilerden *Arthrobacter spp.* ve *Bacillus spp.*'de CDNB ve GSH ile çok düşük konjugasyon aktivitesi gösteren GST enzimi tespit edilmiştir (Zablotowicz ve ark. 1995).

Yakın bir tarihe kadar aerobik Arkea'da ana tiyol olarak glutatyon bulunmadığı bu nedenle GST yokluğunun beklenen bir durum olduğu (Fahey ve Sundquist 1991) düşünülmekte idi. Ayrıca, termofilik arkeler *Pyrococcus furiosus* ve *Sulfolobus solfataricus*'ta NADPH-bağımlı glutatyon redüktaz bulunmadığının rapor edilmesi (Guagliardi ve ark. 1995) üzerine Arkea'da glutatyon ya da redoks peptitlerinin de var olmadığı kanısı oluşmuştu (Ladenstein ve Ren 2008).

Coker ve ark. (2007) halofilik bir arkea olan *Halobacterium sp.* NRC-1 straininde yüksek ve düşük tuz konsantrasyonunun gen ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmak üzere mikroarray analizleri gerçekleştirmiş ve tuz stresi koşullarında gelişimin potasyum, fosfat ve demir taşıyıcıları gibi birçok iyon taşıyıcısı ve stres proteinlerinin gen kodlarında modülasyona neden olduğunu bulmuşlardır. Düşük tuz koşulları altında süperoksit dismutaz'ı (SOD) kodlayan *sod1* ve *sod2* genleri gibi glutatyon S-transferazı kodlayan *gst* geninin de up-regüle (1.5 kat) olduğu görülmüştür. Bu bulgular ozmotik stres altındaki haloarkelerde reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında GST'nin rol aldığını göstermektedir (Coker ve ark. 2007).

Allocati ve ark. (2011) tarafından çok yakın bir tarihte yayınlanan çalışma Arkea'da GST'lerin dağılımı ile ilgili yapılmış ilk ve en önemli çalışma olarak kabul edilmektedir. Araştırmacılar Halobacteria'da bir kaç GST geni bulmuşlar, yeni tanımlanmış genler ve bilinen GST genleri arasındaki evrimsel ilişkileri ortaya koymuşlardır. Euryarchaeota filumundan Halobacteria'ya ait 11 ve bir Crenarchaeota üyesinde 1 GST geni tanımlanmıştır. Tanımlanan dizilerin Gram-negatif bakterilerde bulunan bilinen GST'lerden farklı bir dağılım gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmanın en önemli verisi Arkea genomlarında tanımlanan putatif GST'lerin %91'inin Xi sınıfına atanmasıdır. Xi sınıfı mayalardaki Gto2'nin özellikle N-terminal domain bakımından dizi olarak homoloğu olan bir sınıftır.

Birçok bakteride ve hemen hemen ökaryotların tamamında GSH (γ -glutamil-sisteinil-glisin) redoks hemoastazını sağlamak ve toksik kimyasallara karşı korunmada temel düşük-molekül-ağırlıklı tiyol olarak bulunur. GSH iki enzimatik proses aracılığıyla glutamattan sentezlenir. İlk enzim γ -glutamil-sistein sentetaz (GshA) ATP tüketimiyle L-sisteini L-glutamata bağlayarak dipeptit L- γ -glutamil-L-sistein (γ -GC) oluşumunu sağlar. İkinci enzim olan glutamat sentetaz (GshB) ise glisini ekleyerek tripeptit glutatyonu oluşturur. GSH sentezi öncelikli olarak ökaryotlarda ve siyanobakteriler, mor bakteriler ve gram negatif bakterilerde bulunurken arkeler ve amitokondriyal ökaryotlarda bulunmaz (Kim ve ark 2008).

Arkea oksidatif strese karşı savunmada rol oynayan γ -glutamil sistein ve CoA gibi GSH'a alternatif tiyoller sentezler. Özellikle Halobacteria'da γ -glutamil sistein temel düşük-moleküler-ağırlıklı tiyol olarak bulunur ve GSH ile benzer fonksiyon gösterir. GSH sentezi ile ilişkili genlerin varlığını araştırmak için putatif (varsayımsal) GST genlerini kodlayan arkeal genomları analiz edilmiştir. 12 genomun 5'inde glutamat-sistein ligaz tanımlanırken hiçbir genomda GSH sentetaz geni tanımlanmamıştır. Ayrıca 7 arkeal türünün GSH biyosentezinde yer alan herhangi bir gene sahip olmadığı görülmüştür (Allocati ve ark. 2011).

Çok sayıda Arkea'nın GST-içeren genomlarında yalnızca γ -glutamil-sisteinin bulunması kodlanan GST enzimlerinin işlevsel olmayacağı anlamına gelmemektedir. Bazı GST izozimlerinin klasik CDNB konjugasyon aktivitesi için ko-substrat olarak γ -glutamil sisteini kabul ettiği bilinmektedir (Sugimoto ve ark. 1985).

Arkea'da Xi sınıfı GST'lerin egemen olduğunun bilinmesinin, gelecekte bu domainden üyelerin klonlanması ve enzimatik yeteneklerinin karakterize edilmesi için büyük bir ilgiye neden olacağı düşünülmektedir. Ayrıca γ -glutamil sistein ligaz genini içeren ve glutatyon sentetaz genine sahip olmayan genomların büyük ölçüde analiz edilmesi, bu GST'lerin ko-substrat olarak GSH yerine γ -glutamil sistein'i tercih edip etmedikleri ve bunu molekülü hangi ölçüde kullandıklarının belirlenmesi açısından ilgi konusu olacaktır.

Yapılan bu çalışma halofilik mikroorganizmalarda GST enziminin optimizasyonu açısından bakıldığında özgün bir çalışmadır. Ayrıca özellikle Arkea'da GST enziminin varlığının gösterilmesi bakımından Coker ve ark (2007) ve Allocati ve ark. (2011) yaptıkları çalışmaları destekler niteliktedir.

Bu çalışmada, Bakteria (*Pseudomonas halophila* DSM 3050) ve Arkea (*Haloarcula hispanica* ATCC 33960) domainlerine ait iki ekstremofil mikroorganizma kullanılarak halofilik mikroorganizmalardaki GST aktivitesi test edilmiştir. Besiyeri tuz konsantrasyonu, tampon solüsyonu, pH, sıcaklık, protein, CDNB ve GSH konsantrasyonlarının farklı değerleri kullanılarak enzimin optimum aktivite gösterdiği koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Besiyeri tuz konsantrasyonunun GST enzim aktivitesine etkisi belirlenirken mikroorganizmalar %20, %25 ve %30 olmak üzere üç farklı tuz konsantrasyonunda inkübasyona bırakılmıştır. Ancak *P. halophila*'nın %30 tuz konsantrasyonunda gelişme göstermediği görülmüş dolayısıyla *P. halophila* için yalnızca iki tuz konsantrasyonundaki GST aktiviteleri birbiri ile karşılaştırılabilmiştir. Takip eden çalışmalarda bu bakterinin gelişme gösterdiği bilinen %20'ten daha düşük tuz konsantrasyonlarında da GST aktivitesinin izlenmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların ekstraksiyonunda öncelikle 20mM Tris-HCl, 1mM Dihiothreitol (DDT) ve 1 mM fenilmetilsulfonil fluorin içeren soğuk lizis tampon solüsyonu (pH 7.4) ile süspanse edilmiş hücrelerin mikro uç kullanılarak sonikasyonla parçalanması esasına dayanan Ogunseitan metodu (1998) kullanılmıştır.

Ancak GST aktivitesini belirlemek üzere yapılan deneyler sonucu enzim aktivitesi gözlenememesi nedeniyle bu ekstraksiyon metodunun yetersiz olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle ekstraksiyon işlemi için dondurma-çözme yöntemi (Koval ve Sprott, 2007) kullanılmıştır. Bu yöntemde bir hafta boyunca sıvı besiyerinde geliştirilen hücreler santrifüjle toplandıktan sonra soğuk amonyum sülfat tamponu (pH 7.4) ile süspanse edilmişlerdir.

P. halophila ekstraksiyonunda amonyum sülfat tampon solüsyonu enzim aktivitesi ölçümlerinde olumlu sonuçlar verirken *H. hispanica*'da bu solüsyon kullanılarak gerçekleştirilen parçalama işlemi sonrası enzim aktivitesi gözlenememiştir. Bu nedenle *H. hispanica* ekstraksiyonunda saf su içerisindeki halofilik hücrelerin membranlarının osmotik basınçtan dolayı parçalanması fikrinden yola çıkarak hücreler soğuk steril ultra saf su ile süspanse edilmiştir. Böylece ekstraksiyonda başarı sağlanmış ve bu mikroorganizmada da enzim aktivitesi izlenebilmiştir.

Ayrıca bir gün süre ile -80°C'de dondurulup bir gün sonunda +4°C'de çözündürülen örnekler rutin olarak 10000 rpm 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek enzim ve protein tayininde kullanılacak olan hücre içeriği elde edilmiştir. Ancak %20 tuz içeren besiyerinde gelişen *H. hispanica*'nın dondurma-çözme işleminden sonraki santrifüjünde pelet ve süpernatant ayırımı sağlanamamıştır. Bu problemin aşılması için santrifüj hızının arttırılmasına gerek duyulmuştur. Santrifüj işlemi 10000 rpm yerine 20000 rpm'de yapıldığında hücre ekstresi başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

Final konsantrasyonları 50 mM (van Hylckama Vlieg ve ark. 1998; van Hylckama Vlieg ve ark. 1999; Lushchak ve ark. 2001) olan sodyum asetat, sodyum fosfat, potasyum fosfat ve Tris-HCl tampon solüsyonları kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu solüsyonlardaki maksimum aktivite değerleri karşılaştırıldığında *P. halophila* için Tris-HCl tamponunun sodyum asetat tamponundan yaklaşık %82, sodyum fosfat tamponundan %61 ve potasyum fosfat tamponundan yaklaşık %46 daha yüksek GST aktivitesine izin verdiği görülmüştür. *H. hispanica*'da sodyum asetat tamponu kullanıldığında aktivite gözlenememiştir. Potasyum fosfat ve sodyum fosfat tamponları kullanıldığında ise GST aktivitesinde Tris-HCl tamponuna göre sırasıyla %35 ve %43 düşüş olduğu kaydedilmiştir. Bu nedenle çalışmanın devamında rutin olarak Tris-HCl tamponu kullanılmıştır.

pH'in GST enzim aktivitesini belirlemek üzere Tris-HCl tamponunun pH'sı 6.5 ile 9.0 arasında değiştirilmiştir. *P. halophila* GST aktivitesinin pH 6.5'da maksimum düzeyde olduğu, pH arttıkça aktivitenin azaldığı görülmüştür. Bunun üzerine daha düşük pH değerlerinde (pH 5.5 ve 6.0) de enzim aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *P. halophila* GST aktivitesinin pH 6.5'e kadar arttığı ve daha sonra pH 9.0'a kadar bir düşüş yaşadığı gözlenmiştir. *H. hispanica*'da ise enzim aktivitesi pH 6.5'tan 9.0'a kadar artmıştır. Maksimum aktiviteyi belirlemek için pH 9.5'te de enzim aktivitesi ölçülmüş ve bu pH değerinde GST aktivitesinin pH 9.0'a göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. *P. halophila*'da GST enziminin maksimum aktivitesinin pH 6.5'te olması enzimin aktif merkezinin nötr amino asitlerce zengin olduğunu göstermektedir. *H. hispanica*'da ise pH 9.0'da maksimum aktivite görülmesinin enzimin aktif merkezinde bazik amino asitlerin yoğun olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

15-35°C arasında gerçekleştirilen ölçümler sonucunda her iki mikroorganizmada da GST enziminin oda sıcaklığında (25°C) maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çoğu halofilik mikroorganizmanın, özellikle halofilik arkelerin, enzimlerinin yüksek tuz konsantrasyonu ile eş zamanlı olarak yüksek sıcaklıklarda da aktif oldukları bilinmektedir (Oren 2002b). Takip eden çalışmalarda bu özellikten faydalanılarak aktivite ölçümünde reaksiyon karışımına artan konsantrasyonlarda NaCl, KCl, MgCl gibi tuzlar eklenerek, yüksek sıcaklıkla birlikte bu tuzların GST enzim aktivitesine etkisi araştırılabilir.

Çalışmamızda substrat olarak GST izozimlerinin yaygın bir substratı olan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), 1-floro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), etakrinik asit (EA), *p*-nitrobenzil klorid (PNBC) ve kümen hidroperoksit (Cu-OOH) gibi GST substratların da kullanılması ve enzimin hangi substratta maksimum aktivite gösterdiğinin tespit edilmesi uygun olacaktır.

Parametrelerin GST aktivitesi üzerindeki etkisini istatistiksel olarak değerlendirmek için ANOVA testi kullanılmış ve %5 anlam düzeyine göre tek yönlü varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir parametre için alınan sonuçlar anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. Ayrıca hangi değerin farklı olduğunu ortaya çıkarmak için çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testi yapılmıştır. Ancak *P. halophila*'da besiyeri tuz konsantrasyonu için yalnızca iki farklı aktivite değeri bulunduğundan istatistiksel analizlerde bu testler yerine student-t testi kullanılmıştır.

Enzim kinetiği değerlendirmelerinde Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılmıştır. Bu grafiğe göre belirlenen K_m ve V_{max} değerlerinin doğruluğunu test etmek amacıyla ayrıca Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilmiş ve Lineweaver-Burk grafiğinde olduğu gibi doğrusal grafikler elde edilmiştir. Bu grafiklere göre hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerinin Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanılarak elde edilenlerle uyumlu ve bu değerleri destekleyici nitelikte oldukları görülmüştür.

Bu çalışmada saflaştırma işlemi için uygun koşullar sağlanamadığından GST enzimi saflaştırılmamış olup direkt olarak hücre ekstraktından yapılan ölçümlerle enzim aktivitesi belirlenmiştir. K_m ve V_{max} 'da reaksiyon ortamındaki diğer hücre içi moleküllerin etkisiyle bazı sapmalar meydana gelmiş olabilir. Ancak elde edilen değerler en azından enzimin kullanılan substrat ve kofaktöre karşı afinitesinin değerlendirilmesinde yol gösterebilmektedir.

P. halophila GST aktivitesinin yaklaşık 1.0 mM CDNB ve 4.0mM GSH konsantrasyonunda doyuma ulaştığı tespit edilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla hesaplanan CDNB'ye karşı GST aktivitesinin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.52 mM ve 80.65 nmol/dk/mg; kofaktör GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 1.89 mM ve 81.30 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri ile hesaplanan sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *P. halophila* GST enziminin CDNB'ye karşı GSH'dan daha yüksek bir afinite gösterdiği açıkça görülmektedir.

H. hispanica enzim aktivitesi yaklaşık 1.0mM CDNB ve 1.0mM GSH konsantrasyonunda doyuma ulaşmıştır. Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla CDNB'ye karşı GST aktivitesinin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.46 mM ve 27.93 nmol/dk/mg; kofaktör GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0.13 mM ve 22.03 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri ile hesaplanan sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *P. halophila*'nın aksine *H. hispanica*'da GST enziminin GSH'a karşı afinitesinin CDNB'den daha yüksek olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ

Halofilik bakteri *P. halophila* DSM 3050 ve halofilik arke *H. hispanica* ATCC 33960'da GST aktivitesinin varlığı ve enzimin optimum aktivite gösterdiği koşulların belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışmada her iki organizmada da substrat CDNB'ye karşı GST aktivitesi gözlenmiş ve kullanılan yedi parametrenin optimum değerleri tespit edilmiştir.

P. halophila sitozolik GST aktivitesi karakterizasyonundan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, %25 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde üreyen bakterilerin %20'de üreyenlere göre daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. pH'sı 6.5 olan 50 mM Tris-HCl tamponunda 50 µg proteine kadar ürün oluşumunun doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Maksimum reaksiyon hızı 25°C'de saptanmıştır. Enzim aktivitesinin yaklaşık 1.0 mM substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) konsantrasyonunda doyuma ulaştığı belirlenmiştir. Doyuma ulaşılan kofaktör (GSH) konsantrasyonunun 4.0 mM olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen optimum değerler esas alınarak enzim aktivitesi ölçülmüş ve *P. halophila* DSM 3050 straininin GST spesifik aktivitesinin ortalama 53.48 nmol/dk/mg olduğu belirlenmiştir. Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilerek CDNB'ye ve GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri saptanmıştır. Grafikler yardımıyla K_m (CDNB) sırasıyla 0.52 mM, 0.61 mM ve 0.54 mM; V_{max} (CDNB) sırasıyla 80.65 nmol/dk/mg, 86.96 nmol/dk/mg ve 82.98 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla K_m (GSH) 1.89 mM, 1.63 mM ve 1.75 mM; V_{max} (GSH) 81.30 nmol/dk/mg, 75.19 nmol/dk/mg ve 77.60 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur.

H. hispanica sitozolik GST aktivitesi optimizasyonu çalışmaları sonucunda bu mikroorganizmanın %25 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde ürediğinde GST aktivitesinin denenen diğer konsantrasyonlara göre maksimum düzeyde olduğu görülmüştür. pH'sı 9.0 olan Tris-HCl tamponunda gerçekleşen reaksiyonda 50 µg proteine kadar ürün oluşumunun doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. En yüksek reaksiyon hızı 25 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Enzim aktivitesi yaklaşık 1.0 mM substrat (CDNB) ve 1.0 mM kofaktör (GSH) konsantrasyonunda doyuma ulaşmıştır. Belirlenen bu optimum değerler esas

alınarak enzim aktivitesi ölçülmüş ve *H. hispanica* ATCC 33960 straininin GST spesifik aktivitesinin ortalama 19.67 nmol/dk/mg olduğu belirlenmiştir. Lineweaver-Burk Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilerek CDNB'ye ve GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri saptanmıştır. Grafikler yardımıyla K_m (CDNB) sırasıyla 0.46 mM, 0.45 mM ve 0.46 mM; V_{max} (CDNB) sırasıyla 27.93 nmol/dk/mg, 27.62 nmol/dk/mg ve 27.95 nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. GSH'a karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla K_m (GSH) 0.13 mM, 0.12 mM 0.13 mM; V_{max} (GSH) 22.03 nmol/dk/mg, 22.08 nmol/dk/mg ve 21,96 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Abel, E.L., Opp, S.M., Verlinde, C.L., Bammler, T.K. ve Eaton, D.L. (2004), "Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases," *Toxicol. Sci.*, **80**, 230–238.
- Aceto, A., Dragani, B., Allocati, N., Angelucci, S., Bucciarelli, T., Sacchetta, P. Di Ilio, C. ve Martini, F. (1995), "Analysis by limited proteolysis of domain organization and GSH-site arrangement of bacterial glutathione transferase B1-1," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **27**, 1033–104.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis R.J. ve Ronai, Z. (1999), "Regulation of JNK signaling by GSTp," *EMBO Journal*, **18**, 1321–1334.
- Allocati, N., Cellini, L., Aceto, A., Iezzi, T., Angelucci, A., Robuffo, I. ve Di Ilio, C. (1994), "Immunogold localization of glutathione transferase B1-1 in *Proteus mirabilis*," *FEBS Lett.*, **354**, 191–194.
- Allocati, N., Aceto, A., Cellini, L., Masulli, M., Dragani, B., Petruzzelli, R. ve Di Ilio, C. (1997), "Effect of anaerobic environment on the glutathione transferase isoenzymatic pattern in *Proteus mirabilis*," *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**, 157–162.
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M.W. ve Di Ilio, C. (1999), "Functional analysis of the evolutionary conserved praline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1," *FEBS Lett.*, **445**, 347–350.
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Polekhina, G., Rossjohn, J., Parker, M.W. ve Di Ilio, C. (2000), "Evaluation of the role of two conserved active-site residues in Beta class glutathione S-transferases," *Biochem. J.*, **351**, 341–346.
- Allocati, N., Masulli, M., Casalone, E., Santucci, S., Favalaro, B., Parker, M.W. ve Di Ilio, C. (2002), "Glutamic acid 65 is an essential residue for catalysis in *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1," *Biochem. J.*, **363**, 189–193.
- Allocati, N., Favalaro, B., Masulli, M., Alexeyev, M.F. ve Di Ilio, C. (2003), "*Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in the protective mechanisms against oxidative and chemical stresses," *Biochem. J.*, **373**, 305–311.
- Allocati, N., Masulli, M., Pietracupa, M., Favalaro, B., Federici, L. ve Di Ilio, C. (2005), "Contribution of the two conserved tryptophan residues to the catalytic and structural properties of *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1," *Biochem. J.*, **385**, 37–43.
- Allocati, N., Masulli, M., Pietracupa, M., Federici, L. ve Di Ilio, C. (2006), "Evolutionarily conserved structural motifs in bacterial glutathione transferase are involved in protein folding and stability," *Biochem. J.*, **394**, 11–17.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Favalaro, B. ve Di Ilio, C. (2008), "Cysteine 10 is critical for the activity of *Ochrobactrum anthropi* glutathione transferase and its mutation to alanine causes the preferential binding of glutathione to the H-site," *Proteins*, **71**, 16–23.

- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. ve Di Ilio, C. (2009), "Glutathione transferases in bacteria," *FEBS Journal*, **276**, 58–75.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. ve Di Ilio, C. (2011), "Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and Archaea," *Biochimie*, **xxx**, 1-9, doi:10.1016/j.biochi.2011.09.008.
- Anandarajah, K., Kiefer, P.M.Jr., Donohoe, B.S. ve Copley, S.D. (2000), "Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol," *Biochemistry*, **39**, 5303–5311.
- Armstrong, R.N. (1997), "Structure, catalytic mechanism, and evolution of glutathione transferases," *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 2-18.
- Armstrong, R.N. (2000), "Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily," *Biochemistry*, **39**, 13625–13632.
- Bader, R. ve Leisinger, T. (1994), "Isolation and characterization of the *Methylophilus* sp. strain DM11 gene encoding dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase," *J. Bacteriol.*, **176**, 3466–3473.
- Bartels, F., Backhaus, S., Moore, E.R., Timmis, K.N. ve Hofer, B. (1999), "Occurrence and expression of glutathione S-transferase-encoding bphK genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria," *Microbiology*, **145**, 2821–2834.
- Bertrand, J.C., Almallah, M., Acquaviva, M. ve Mille, G. (1990), "Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium," *Letters in Applied Microbiolgy*, **11**, 260-263.
- Bonete, M.J., Perez-Pomares, F., Diaz, S., Ferres, J. ve Oren, A. (2003), "Occurrence of two different glutamate dehydrogenase activities in the halophilic bacterium *Salinibacter ruber*," *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**, 181-186.
- Boone, D.R., Casstenholz, R.W. ve Garrity, G.M. (Eds.). (2001), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," 2nd edn, Springer, New York.
- Booth, J., Boyland, E., ve Sims, P. (1961), "An enzyme from ra liver catalyzing conjugation with glutathione," *Biochem. J.*, **79**, 516-524.
- Bylund, J.E., Dyer, J.K., Feely, D.E. ve Martin, E.L. (1990), "Alcaline and acid phosphatases from the extensively halotolerant eubacterium *Halomonas elongata*," *Curr. Microbiol.*, **20**, 125-131.
- Casalone, E., Allocati, N., Ceccarelli, I., Masulli, M., Rossjohn, J., Parker, M.W. ve Di Ilio, C. (1998), "Site-directed mutagenesis of the *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1 G-site," *FEBS Lett.*, **423**, 122–124.
- Cavalca, L., Guerrieri, N., Colombo, M., Pagani, S. ve Andreoni, V. (2007), "Enzymatic and genetic profiles in environmental strains grown on polycyclic aromatic hydrocarbons," *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**, 315–325.
- Cayol, J.L., Ollivier, B., Patel, B.K.C, Prensier, G., Guezennec, J. ve Garcia, J.L. (1994), "Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 534–540.
- Chaga, G., Porath, J. ve Illéni, T. (1993), "Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*," *Biomedical chromatography*, **7**, 256-261.

- Chiang, M.L. ve Chou, C.C. (2008), "Expression of superoxide dismutase, catalase and thermo stable direct hemolysin by, and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked *Vibrio parahaemolyticus*," *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 268-274.
- Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K.W. ve Park, J. (2001), "Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1," *J. Biol. Chem.*, **276**, 12749-12755.
- Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H. ve Lee, W.H. (2003), "Optical biosensor consisting of glutathione S-transferase for detection of captan," *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1461-1466.
- Chronopoulou, E.G. ve Labrou, N.E. (2009), "Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology," *Recent Patents on Biotechnology*, **3**, 211-223.
- Coker, J.A., DasSarma, P., Kumar, J., Muller, J.A., DasSarma, S. (2007), "Transcriptional profiling of the model Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: responses to changes in salinity and temperature," *Saline Systems*, **3**, 6 doi:10.1186/1746-1448-3-6.
- Combes, B., ve Stakelum, G.S. (1961), "A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione," *J. Clin. Invest.*, **40**, 981-988.
- Confalonieri, F. ve Sommer, S. (2011), "Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation," *Journal of Physics: Conference Series*, **261**, 012005, doi: 10.1088/1742-6596/261/1/012005.
- Copley, S.D. (1998), "Microbial dehalogenases: enzymes recruited to convert xenobiotic substrates," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 613-617.
- Copley, S.D. (2000), "Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach," *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 261-265.
- Coronado, M.J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J.J. ve Ventosa, A. (2000), "The α -amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization," *Microbiology UK*, **146**, 861-868.
- Danson, M. ve Hough, D.W. (1997), "The structural basis of protein halophilicity," *Comp. Biochem. Physiol.*, **117**, 307-312.
- de Souza, M.L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M.J. ve Wackett, L.P. (1998), "The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved," *J. Bacteriol.*, **180**, 1951-1954.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. ve Cassidy, C.S. (2001), "Enzymes from extremophiles," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 144-151.
- Dennis, P.P. ve Shimmin, L.C. (1997), "Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 90-104.
- Di Ilio, C., Aceto, A., Piccolomini, R., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G. ve Federici, G. (1988), "Purification and characterization of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*," *Biochem. J.*, **255**, 971-975.

- Dickinson, D.A. ve Forman, H.J. (2002), "Glutathione in defense and signaling," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, 488–504.
- Dinçer, A.R. ve Kargi, F. (2001), "Performance of rotating biological disk system treatin saline wastewater," *Process Biochem.*, **36**, 901-906.
- Eaton, R.W. (1994), "Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and trans-o-hydroxybenzylidene pyruvate hydratase aldolase from the NAH7 plasmid," *J. Bacteriol.*, **176**, 7757–7762.
- Eisenberg, H. (1995), "Life in unusual environments – progress in understanding the structure and function of enzymes for extreme halophilic bacteria," *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 1-5.
- Emerson, D., Chauhan, S., Oriel, P. ve Breznak, J.A. (1994), "*Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds," *Arch. Microbiol.*, **161**, 445-452.
- Fahey, R.C. ve Sundquist, A.R. (1991), "Evolution of glutathione metabolism," *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, **64**, 1–53.
- Favaloro, B., Melino, S., Petruzzelli, R., Di Ilio, C. ve Rotilio, D. (1998), "Purification and characterization of a novel glutathione transferase from *Ochrobactrum anthropi*," *FEMS Microbiol. Lett.*, **160**, 81–86.
- Favaloro, B., Tamburro, A., Trofino, M.A., Bologna, L., Rotilio, D. ve Heipieper, H.J. (2000), "Modulation of the glutathione S-transferase in *Ochrobactrum anthropi*: function of xenobiotic substrates and other forms of stress," *Biochem. J.*, **346**, 553–559.
- Federici, L., Masulli, M., Bonivento, D., Di Matteo, A., Gianni, S., Favaloro, B., Di Ilio, C. ve Allocati, N. (2007), "Role of Ser11 in the stabilization of the structure of *Ochrobactrum anthropi*," *Biochem. J.*, **403**, 267–274.
- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., Di Biasio, P. ve Focardi, S.E. (2012), "Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. TA-04," *Int. Biodeter. Biodegr.*, **66**, 63-70.
- Fortin, P.D., Horsman, G.P., Yang, H.M. ve Eltis, L.D. (2006) "A glutathione S-transferase catalyzes the dehalogenation of inhibitory metabolites of polychlorinated biphenyls," *J. Bacteriol.*, **188**, 4424–4430.
- Franzetti, B., Schoehn, G., Ebel, C., Gagnon, J., Ruigrok, R.W.H. ve Zaccai, G. (2001), "Characterization of a novel complex from halophilic archaeobacteria, which displays chaperone-like activities in vitro," *J. Biol. Chem.*, **276**, 29906-29914.
- Frova, C. (2006), "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives," *Biomol. Eng.*, **23**, 149–169.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. ve Bertrand, J.C. (1992), "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 568-576.
- Garrrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R. ve Staley, J.T. (Eds). (2005), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," 2nd edn., Springer, New York.
- Gilmartin, N., Ryan, D., Sherlock, O. ve Dowling, D. (2003), "BphK shows dechlorination activity against 4- chlorobenzoate, an end product of bph-promoted degradation of PCBs," *FEMS Microbiol. Lett.*, **222**, 251–255.

- Gilmartin, N., Ryan, D. ve Dowling, D.N. (2005), "Analysis of the C-terminal domain of *Burkholderia* sp. Strain LB400 BphK reveals a conserved motif that affects catalytic activity," *FEMS Microbiol. Lett.*, **249**, 23–30.
- Grant, W.D, Gemmell, R.T. ve McGenity, T.J. (1998), "Halobacteria: the evidence for longevity," *Extremophiles*, **2**, 279-287.
- Guagliardi, A., de Pascale, D., Cannio, R., Nobile, V., Bartolucci, S., Rossi, M. (1995), "The purification, cloning, and high level expression of a glutaredoxin-like protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*," *J. Biol. Chem.*, **270**, 5748–5755.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. ve Jakoby, W.B. (1974), "Glutathione S-transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation," *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Hayes, J.D. ve Pulford, D.J. (1995), "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 445–600.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. ve Jowsey, I.R. (2005), "Glutathione transferases," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51–88.
- Hezayen, F.F., Rehm, B. H.A., Eberhardt, R. ve Steinbüchel, A. (2000), "Polymer production by two newly isolated remely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 319-325.
- Hofer, B., Backhaus, S. ve Timmis, K.N. (1994), "The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes," *Gene*, **144**, 9–16.
- Hong, G., Chien, Y.C. ve Chien, C.I. (2003), "Separation of glutathione transferase subunits from *Proteus vulgaris* by two-dimensional gel electrophoresis," *Curr. Microbiol.*, **47**, 352–354.
- Hough, D.W. ve Danson, M.J. (1989), "Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential," *Letters in Applied Microbiology*, **9**, 33-39.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. ve Kimura, A. (1989), "Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*," *B. J. Bacteriol.*, **171**, 6039–6042.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A. ve Persson, B. (1999), "Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane-associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism," *Protein Sci.*, **8**, 689–692.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A. ve Persson, B. (2000), "Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **161**, S20–S24.
- Janssen, D.B., Dinkla, I.J.T., Poelarends, G.J. ve Terpstra, P. (2005), "Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities," *Environ. Microbiol.*, **7**, 1868–1882.
- Jones, G., Ewing, C.M. ve Melvin, M.V. (1981), "Biotechnology of solar saltfield," *Hidrobiologia*, **82**, 391-406.

- Jung, U., Cho, Y.S., Seong, H.M., Kim, S.J., Kim, Y.C. ve Chung, A.S. (1996), "Characterization of a novel glutathione S-transferase from *Pseudomonas* sp. DJ77," *J. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 111–115.
- Kanai, T., Takahashi, K. ve Inoue, H. (2006), "Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress," *J. Biochem.*, **140**, 703–711.
- Kanally, R.A. ve Harayama, S. (2000), "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria," *J. Bacteriol.*, **182**, 2059–2067.
- Keck, A., Conradt, D., Mahler, A., Stolz, A., Mattes, R. ve Klein, J. (2006), "Identification and functional analysis of the genes for naphthalene sulfonate catabolism by *Sphingomonas xenophaga* BN6," *Microbiology*, **152**, 1929–1940.
- Kiefer, P.M.Jr., McCarthy, D.L. ve Copley, S.D. (2002), "The reaction catalyzed by tetra-chloro-hydroquinone dehalogenase does not involve nucleophilic aromatic substitution," *Biochemistry*, **41**, 1308–1314.
- Kim, E., Zylstra, G.J., Freeman, J.P., Heinze, T.M., Deck, J. ve Cerniglia, C.E. (1997), "Evidence for the role of 2-hydroxychromene- 2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae* B1," *FEMS Microbiol. Lett.*, **153**, 479–484.
- Kim, E.K., Cha, C.J., Cho, Y.J., Cho, Y.B. ve Roe, J.H. (2008), "Synthesis of γ -glutamylcysteine as a major low-molecular-weight thiol in lactic acid bacteria *Leuconostoc* spp.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 1047–1051.
- Kosloff, M., Han, G.W., Krishna, S.S., Schwarzenbacher, R., Fasnacht, M., Elsliger, M.A., Abdubek, P., Agarwalla, S., Ambing, E. ve Astakhova, T. (2006), "Comparative structural analysis of a novel glutathione S-transferase (Atu5508) from *Agrobacterium tumefaciens* at 2.0 Å resolution," *Proteins*, **65**, 527–537.
- Koval, S.F. ve Sprott, G.D. (2007), "Cell Fractionation," *Methods for General and Molecular Microbiology* (Ed: Reddy, C.A.), A.S.M. Press, Washington, D.C., 108-137.
- Kurtovic, S., Shokeer, A. ve Mannervik, B. (2008), "Diverging catalytic capacities and selectivity profiles with haloalkane substrates of chimeric alpha class glutathione transferases," *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 329–341.
- Kushner, D.J. (1978), "Life in high salt and solute concentrations," *Microbial Life in Extreme Environments* (Ed: Kushner, D.J.), Academic Press, London, 317-368.
- La Roche, S. ve Leisinger, T. (1990), "Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione S-transferase supergene family," *J. Bacteriol.*, **172**, 164–171.
- Labrou, N.E., Karavangeli, M., Tsaftaris, A. ve Clonis, Y.D. (2005), "Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides," *Planta*, **222**, 91–97.
- Ladenstein, R. ve Ren, B. (2008), "Reconsideration of an early dogma, saying; there is no evidence for disulfide bonds in proteins from archaea," *Extremophiles*, **12**, 29-38.

- Lanyi, J.K. (1974), "Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria," *Bacteriol. Rev.*, **38**, 272-290.
- Lillo, J.G. ve Rodriguez-Valera, F. (1990), "Effects of culture conditions on poly (β -hydroxybutiric acid) production by *Haloferax mediterranei*," *Appl. And Environ. Microbiol.*, **56**, 2517-2521.
- Lippert, K. ve Galinski, E.A. (1992), "Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 61-65.
- Litchfield, C.D. (2002), "Halophiles," *J. Industrial microbiol. and biotechnol.*, **28**, 21-22.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951), "Protein measurement with the Folin-Phenol reagents," *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A. ve Hermes-Lima, M. (2001), "Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **280**, 100-107.
- Ma, Y., Galinski, E.A., Grant, W.D., Oren, A. ve Ventosa, A. (2010), "Halophiles 2010: Life in Saline Environments," *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6971-6981.
- Madern, D., Ebel, C. ve Zaccai, G. (2000), "Halophilic adaptation of enzymes," *Extremophiles*, **4**, 91-98.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warholm, M. ve Jörnvall, H. (1985), "Identification of tree classes of cytosolic glutathione transferase common to several mamalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 7202-7206.
- Margesin, H. ve Schinner, F. (2001), "Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology," *Extremophiles*, **5**, 73-83.
- Masai, E., Katayama, Y., Kubota, S., Kawai, S., Yamasaki, M. ve Morohoshi, N. (1993), "A bacterial enzyme degrading the model lignin compound *b*-etherase is a member of the glutathione S-transferase superfamily," *FEBS Lett.*, **323**, 135-140.
- Masai, E., Katayama, Y., Nishikawa, S. ve Fukuda, M. (1999), "Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 364-373.
- Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y. ve Fukuda, M. (2003), "Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of *b*-aryl ether," *J. Bacteriol.*, **185**, 1768-1775.
- McCarthy, D.L., Navarrete, S., Willett, W.S., Babbitt, P.C. ve Copley, S.D. (1996), "Exploration of the relationship between tetra-chloro-hydroquinone dehalogenase and the glutathione S-transferase superfamily," *Biochemistry*, **35**, 14634-14642.
- McMeekin, T.A., Nichols, P.A., Nichols, S.D., Juhasz, A. ve Franzmann, P.D. (1993), "Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic saline lakes," *Experientia*, **49**, 1042-1046.
- Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L.M. (2000), "Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt," *Biophysical Chemistry*, **86**, 155-164.

- Mignogna, G., Allocati, N., Aceto, A., Piccolomini, R., Di Ilio, C., Barra, D. ve Martini, F. (1993), "The amino acid sequence of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*, a prototype of a new class of enzymes," *Eur. J. Biochem.*, **211**, 421–425.
- Mishra, R.R., Dangar, T.K., Rath, B. ve Thatoi, H.N. (2009), "Characterization and evaluation of stress and heavy metal tolerance of some predominant Gram negative halotolerant bacteria from mangrovesoils of Bhitarkanika, Orissa, India," *Afr. J. Biotechnol.*, **8**, 2224–2231.
- Molina, D.M., Eshaghi, S. ve Nordlund, P. (2008), "Catalysis within the lipid bilayer-structure and mechanism of the MAPEG family of integral membrane proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 1–8.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O. ve Pritchard, P.H. (1990), "Isolation and characterization of a fluoranthene- utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1079–1086.
- Nishida, M., Kong, K.H., Inoue, H. ve Takahashi, K. (1994), "Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. The conserved tyrosyl residue near the N-terminus is not essential for catalysis," *J. Biol. Chem.*, **269**, 32536–32541.
- Nishida, M., Harada, S., Noguchi, S., Satow, Y., Inoue, H. ve Takahashi, K. (1998), "Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106," *J. Mol. Biol.*, **281**, 135–147.
- Oakley, A.J. (2005), "Glutathione transferases: new functions," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 716–723.
- Ogunseitan, O.A. (1998), "Extraction of Proteins from Aquatic Environments," *Molecular Microbial Ecology Manual* (Ed: Ackkermans A.D.L, Elsas, J. D. ve Bruijn, F. J.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Oren, A. (1999), "Bioenergetic aspects of halophilism," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 334–348.
- Oren, A. (2002a), "Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**, 56–63.
- Oren, A. (2002b), "Halophilic microorganism and their environments," Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Oren, A. (2008), "Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity," *Saline Systems*, **4**:2, doi:10.1186/1746-1448-4-2.
- Oren, A. (2010), "Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms," *Environ. Tech.*, **31**, 825–834.
- Öztetik, E. (2008), "A Tale of Plant Glutathione S-Transferases: Since 1970," *Bot. Rev.*, **74**, 419–437.
- 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.
- Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Dragani, B., Polsinelli, M., Aceto, A. ve Di Ilio, C. (1996), "Molecular cloning and expression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*," *Biochem. J.*, **318**, 157–162.

- Piccolomini, R., Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A. ve Cellini, L., Ravagnan, G. ve Federici, G. (1989), "Glutathione Transferase in Bacteria: Subunit Composition and Antigenic Characterization," *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 3119-3125.
- Prade, L., Huber, R. ve Bieseler, B. (1998), "Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants," *Structure*, **15**, 1445–1452.
- Ramos-Cormenzana, A. (1989), "Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms," *Microbiology of extreme environments and its potential for microbiology* (Ed: Da Costa, M.C., Duarte, J.C. ve Williams, R.A.D.), Elsevier Applied Science, London.
- Remmerie, B., Vandenbroucke, K., De Smet, L., Carpentier, W., De Vos, D., Stout, J., Van Beeumen, J. ve Savvides, S.N. (2008), "Expression, purification, crystallization and structure determination of two glutathione S-transferase- like proteins from *Shewanella oneidensis*," *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **64**, 548–553.
- Rife, C.L., Parsons, J.F., Xiao, G., Gilliland, G.L. ve Armstrong, R.N. (2003), "Conserved structural elements in glutathione transferase homologues encoded in the genome of *Escherichia coli*," *Proteins*, **53**, 777–782.
- Roberts, M.F. (2005), "Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms," *Saline Syst.*, **1**, 1–30.
- Robinson, A., Huttley, G.A., Booth, H.S. ve Board, P.G. (2004), "Modelling and bioinformatics studies of the human kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases," *Biochem. J.*, **379**, 541–552.
- 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" *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology* (Ed: Danson M.J., Hough, D.W. ve Lunt, G.G.), The Biochemical Society, Portland Press, London.
- Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S.C., Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C. ve Parker, M.W. (1998), "A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications," *Structure*, **15**, 721–734.
- Rui, L., Kwon, Y.M., Reardon, K.F. ve Wood, T.K. (2004), "Metabolic pathway engineering to enhance aerobic degradation of chlorinated ethenes and to reduce their toxicity by cloning a novel glutathione S-transferase, an evolved toluene-o-monooxygenase, and gamma-glutamylcysteine synthetase," *Environ. Microbiol.*, **6**, 491–500.
- Sacchetta, P., Aceto, A., Bucciarelli, T., Dragani, B., Santarone, S., Allocati, N. ve Di Ilio, C. (1993), "Multiphasic denaturation of glutathione transferase B1-1 by guanidinium chloride. Role of the dimeric structure on the flexibility of the active site," *Eur. J. Biochem.*, **215**, 741–745.
- Santos, P.M., Mignogna, G., Heipieper, H.J. ve Zennaro, E. (2002), "Occurrence and properties of glutathione S-transferases in phenol-degrading *Pseudomonas* strains," *Res. Microbiol.*, **153**, 89–98.

- Schafer, F.Q. ve Buettner, G.R. (2001), "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple," *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1191–212.
- Scholtz, R., Wackett, L.P., Egli, C., Cook, A.M. ve Leisinger, T. (1988), "Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium," *J. Bacteriol.*, **170**, 5698–5704.
- Sheehan, D., Meade, G., Vivienne, M.F. ve Dowd, C.A. (2001), "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily," *Biochem. J.*, **360**, 1-16.
- Shishido, T. (1981), "Glutathione S-transferase from *Escherichia coli*," *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2951–2953.
- Shivanand, P. ve Mugeraya, G. (2011), "Halophilic bacteria and their compatible solutes—osmoregulation and potential applications," *Current science*, **100**, 1516-1521.
- Smith, D., Alvey, S. ve Crowley, D.E. (2005), "Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 265–273.
- Stan-Lotter, H., Gruber, C., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Radax, C., Weidler, G. ve Busse, H.J. (2004), "*Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*," *Extremophiles*, **8**, 431- 439.
- Stourman, N.V., Rose, J.H., Vuilleumier, S. ve Armstrong, R.N. (2003), "Catalytic mechanism of dichloromethane dehalogenase from *Methylophilus* sp. strain DM11," *Biochemistry*, **42**, 11048–11056.
- Stuart, E.S., Morshed, F., Sremac, M. ve DasSarma. S. (2001), "Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic archaea," *J. Biotech.*, **88**, 119-128.
- Sugimoto, M., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., T.Y. Aw. Reeve, J.Jr.,Kaplowitz, N. (1985), "Gamma-glutamylcysteine: a substrate for glutathione S-transferases," *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3643-3647.
- Tamaki, H., Kumagai, H. ve Tochikura, T. (1989), "Purification and Properties of Glutathione Transferase from *Issatchenkia orientalis*," *J. Bacteriol.*, **171**, 1173-1777.
- Tamburro, A., Robuffo, I., Heipieper, H.J., Allocati, N., Rotilio, D., Di Ilio, C. ve Favalaro, B. (2004), "Expression of glutathione S-transferase and peptide methionine sulfoxide reductase in *Ochrobactrum anthropi* is correlated to the production of reactive oxygen species caused by aromatic substrates," *FEMS Microbiol. Lett.*, **241**, 151–156.
- Thompson, L.C., Ladner, J.E., Codreanu, S.G., Harp, J., Gilliland, G.L. ve Armstrong, R.N. (2007), "2-Hydroxychromene- 2-carboxylic acid isomerase: a kappa class glutathione transferase from *Pseudomonas putida*," *Biochemistry*, **46**, 6710–6722.
- Tocheva. E.I., Fortin, P.D., Eltis, L.D. ve Murphy, M.E.P. (2006), "Structures of ternary complexes of BphK, a bacterial glutathione S-transferase that reductively dechlorinates polychlorinated biphenyl metabolites," *J. Biol. Chem.*, **281**, 30933–30940.

- Travensolo, R.F., Garcia, W., Muniz, J.R., Caruso, C.S., Lemos, E.G., Carrilho, E. ve Araújo, A.P. (2008), "Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione S-transferase from *Xylella fastidiosa*," *Protein Expr. Purif.*, **59**, 153–160.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Kingma, J., van den Wijngaard, A.J. ve Janssen, D.B. (1998), "A Glutathione S-Transferase with Activity towards *cis*-1,2-Dichloroepoxyethane Is Involved in Isoprene Utilization by *Rhodococcus* sp. Strain AD45," *Appl. Environ. Microb.*, **64**, 2800-2805.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Kingma, J., Kruizinga, W. ve Janssen, D.B. (1999), "Purification of a Glutathione S-Transferase and a Glutathione Conjugate-Specific Dehydrogenase Involved in Isoprene Metabolism in *Rhodococcus* sp. Strain AD45," *J. Bacteriol.*, **181**, 2094-2101.
- van Hylckama, V.J.E., Leemhuis, H., Spelberg, J.H. ve Janssen, D.B. (2000), "Characterization of the gene cluster involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45," *J. Bacteriol.*, **182**, 1956–1963.
- Ventosa, A. ve Nieto, J.J. (1995), "Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. ve Oren, A. (1998), "Biology of moderately halophilic aerobic bacteria," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 504–544.
- Vreeland, R.H., Piselli, A.F., Jr. McDonnough, S. ve Meyers, S.S. (1998), "Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation," *Extremophiles*, **2**, 321-331.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D. ve Powers, D.W. (2000), "Isolation of a 250 million year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal," *Nature*, **407**, 897-900.
- Vuilleumier, S. (1997), "Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?" *J. Bacteriol.*, **179**, 1431–1441.
- Vuilleumier, S. ve Pagni, M. (2002), "The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 138–146.
- Wang, Y., Lau, P.C. ve Button, D.K. (1996), "A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil pseudomonads," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2169–2173.
- Wiktelijs, E. ve Stenberg, G. (2007), "Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates," *Biochem. J.*, **406**, 115–123.
- Woolard, C.R. ve Irvine, R.L. (1994), "Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of a halophilic bacteria," *Water Environ. Res.*, **66**, 230-235.
- Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z.M., Liu, J., Ye, Y.F. ve Duan, X.J. (2005), "Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4," *Biodegradation*, **16**, 393–402.
- Yan, F., Yang, W.K., Li, X.Y., Lin, T.T., Lun, Y.N., Lin, F., Lv, S.W., Yan, G.L., Liu, J.Q., Shen, J.C., Mu, Y. ve Luo, G.M. (2008), "A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity," *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 869–872.

- Yohoi, H. ve Onishi, H. (1990), "Ca-enzyme complex of halophilic nuclease-H oh halophilic *Micrococcus varians* subsp. *Halophilus* for 5'-nucleotide production by RNA degradation," *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **54**, 2573-2578.
- Zablotowicz, R.M., Hoagland, R.E., Locke, M.A. ve Hickey, W.J. (1995), "Glutathione S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1054-1060.
- Zamocky, M. (2004), "Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases," *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3297-3309.