



**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOFİLİK ARKELERDE AZOREDÜKTAZ AKTİVİTESİ VE**  
**KARAKTERİZASYONU**

**Mehmet Ali LEYLA**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY**  
**TEMMUZ-2019**



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFİLİK ARKELERDE AZOREDÜKTAZ AKTİVİTESİ VE  
KARAKTERİZASYONU

Mehmet Ali LEYLA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
TEMMUZ-2019

**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOFİLİK ARKELERDE AZOREDÜKTAZ AKTİVİTESİ VE**  
**KARAKTERİZASYONU**

**Mehmet Ali LEYLA**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Prof. Dr. Birgül ÖZCAN** danışmanlığında hazırlanan bu tez 30/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Birgül ÖZCAN**  
Başkan

Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ  
Üye

Doç. Dr. Muhsin AYDIN  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
Enstitü Müdürü

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

30.07.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülediğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Mehmet Ali LEYLA**

## ÖZET

### HALOFİLİK ARKELERDE AZOREDÜKTAZ AKTİVİTESİ VE KARAKTERİZASYONU

Azo boyaları bir yada daha fazla –N=N– grubu içeren aromatik bileşiklerdir. Bu boyalar tekstil, farmasötik ve gıda endüstrilerinde renklendirici olarak kullanılmakta ve aynı zamanda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Azoredüktazlar bir elektron vericisi kullanarak azo bağlarını yıkan enzimlerdir. Farklı mikroorganizma kaynaklı azoredüktazlarla azo boyalarının redüktif yıkıldığı gösterilmiş ancak yüksek halofilik karakterdeki azoredüktazlarla ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu tez kapsamında, 2 farklı haloarke azoredüktaz aktivitesi üzerine kültür koşullarının optimizasyonu ve ham enzim ekstraktlarının biyokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi substrat olarak mono azo boya Metil Red kullanılarak belirlenmiştir. Her iki izolat (E49 ve F23) için maksimum azoredüktaz aktivitesi sırasıyla 3.4-3 M NaCl, pH 7.5-7, 37 °C, maya özütü varlığında ve boya içermeyen ortam koşullarında tespit edilmiştir. E49 ve F23 haloarke ham ekstrakt azoredüktazlarının maksimum aktivitesini sırasıyla 3.5 M ve üzerindeki KCl, 4 M NaCl, 2 mM NAD(P)H ve pH 7’de gösterdiği bulunmuştur. Enzimlerin optimum sıcaklıkları E49 için 37 °C ve F23 için 75 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca E49 azoredüktazının 50 °C’de aktivitesinin %92’sini ve F23 azoredüktazının ise aktivitesinin 90 °C’de % 97’ni aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Her iki enzimin diazo boya Remazol Black B ve mono azo boya Metil Red’i substrat olarak kullanabildiği ve Hg<sup>+2</sup>, SDS, PMSF, Mg<sup>+2</sup> varlığında inhibe olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile ilk kez, termofilik ve ekstrem halofilik arkeal azoredüktaz aktivitesi ve karakterizasyonu belirlenmiştir.

2019, 53 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Halofilik arke, azoredüktaz aktivitesi, optimizasyon, karakterizasyon

## ABSTRACT

### ACTIVITY AND CHARACTERIZATION OF AZOREDUCTASES IN HALOPHILIC ARCHAEA

Azo dyes are aromatic compounds with one or more  $-N=N-$  groups. These dyes are used in various industries such as textile, pharmaceutical and food and also caused environmental pollution. Azoreductases reductively cleave azo linkages by using an electron donor. Azoreductases from different microorganisms have been shown to reduce azo dyes, but no studies have been found on extremely halophilic azoreductases. In this study, optimization of culture conditions on activities of two different haloarchaea azoreductases and biochemical characterizations of crude enzyme extracts were performed. Methyl Red, a mono azo dye, was used as a substrate for activities of azoreductases. Maximum azoreductase activities for both isolates (E49 and F23) were determined in the presence of 3.4-3 M NaCl and yeast extract, at pH 7.5-7, and 37 °C and dye-free conditions. It was found that E49 and F23 crude enzymes showed the maximum activities at 3.5 M and above of KCl, 4 M NaCl, 2 mM NAD(P)H, and pH 7. The optimum temperatures were found to be 37 °C and 75 °C for E49 and F23 respectively. E49 and F23 azoreductases were found to be stable at higher temperatures and retained 92 % and 97 % activities at 50 °C and 90 °C respectively. Both enzymes were also shown to be able to decolorize diazo-Reactive Black B and monoazo-Methyl Red as substrates. It is the first time that activities and characterisation of halophilic archaeal azoreductases have been studied.

2019, 53 pages

**Key Words:** Halophilic archaea, azoreductase activity, optimization, characterization

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a, çalışmalarım esnasında değerlendirmeleri ve önemli katkılarından dolayı Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ'a, laboratuvar ortamında her türlü desteği sunan arkadaşlarım Sevil Müge Can, Şaban TATLI ve Tanju ŞABANOĞLU'na, çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen annem Nazire LEYLA, babam Nihat LEYLA, kardeşlerim Feyyaz LEYLA ve Nizam Kırkıcı LEYLA'a ile teyzem Nesrin LEYLA'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Halofilik Arke İzolatları ve Besiyerleri.....	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Arke İzolatlarının Aktifleştirilmesi ve Azoredüktaz Aktivitesi Yönünden Taranması.....	11
3.2.2. Azoredüktaz Aktivite Tayini.....	12
3.2.3. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyonu.....	12
3.2.4. Haloarkeal Azoredüktaz'ın Ultra Membran Filtre İle Ekstraksiyonu.....	13
3.2.5. Azoredüktaz Karakterizasyonu.....	13
3.2.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	13
3.2.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine KCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	14
3.2.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	14
3.2.5.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	14
3.2.5.5. Enzim Aktivitesi Üzerine NADH ve NADPH Derişiminin Etkisi.....	14
3.2.5.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal ve İnhibitörlerin Etkisi.....	14
3.2.5.7. Enzim Aktivitesinin Farklı Boyalar Üzerinde Görülmesi.....	14
3.2.6. Bradford Protein Tayini.....	15
3.2.7. Azo Boya Standart Eğrileri.....	15
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	17
4.1. Azoredüktaz Aktivite Tarama Sonuçları.....	17
4.2. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Ortam Optimizasyonu Sonuçları.....	18
4.2.1. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	18
4.2.2. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	19
4.2.3. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	21
4.2.4. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	22
4.2.5. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Ortam Boya Konsantrasyonunun Etkisi.....	23
4.3. Haloarkeal Azoredüktazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	25
4.3.1. Azoredüktaz Aktivitesinin [NaCl] Optimizasyonu Sonuçları.....	25
4.3.2. Azoredüktaz Aktivitesi [KCl] Optimizasyonu Sonuçları.....	27
4.3.3. Azoredüktaz Aktivitesi pH Optimizasyonu Sonuçları.....	28
4.3.4. Azoredüktaz Aktivitesi Sıcaklık Optimizasyonu Sonuçları.....	29
4.3.5. Azoredüktaz Aktivitesi NADH VE NADPH Optimizasyonu Sonuçları.....	30
4.3.6. Metal İyonları ve İnhibitör Maddelerin Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Sonuçları.....	32
4.3.7. Farklı Azo Boyalarının Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	33



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR .....	38
ÖZGEÇMİŞ .....	45



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Çalışma kapsamında kullanılan azo boyaların kimyasal yapıları .....10
Şekil 3.2.	Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart eğrisi .....15
Şekil 3.3.	Reaktif Black B Standart Eğrisi .....16
Şekil 3.4.	Metil Red Standart Eğrisi .....16
Şekil 4.1.	F4A, E49, C36 ve F23 halofilik arke İzolatlarının 2 farklı azo boya varlığında azoredüktaz aktivite tarama sonuçları .....17
Şekil 4.2.	E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi . .....18
Şekil 4.3.	E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortam pH'na bağlı değişimi .....20
Şekil 4.4.	E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin üreme sıcaklığına bağlı değişimi .....21
Şekil 4.5.	E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki farklı karbon ve azot kaynaklarına bağlı değişimi .....22
Şekil 4.6.	E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki Metil red konsantrasyonlarına bağlı değişimi .....24
Şekil 4.7.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi .....26
Şekil 4.8.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin KCl konsantrasyonuna bağlı değişimi .....27
Şekil 4.9.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin pH'a bağlı değişimi .....28
Şekil 4.10.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi .....29
Şekil 4.11.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin NADH konsantrasyonuna bağlı değişimi .....31
Şekil 4.12.	E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesinin NADPH konsantrasyonuna bağlı değişimi .....31
Şekil 4.13.	E49 ve F23 azoredüktazlarının substrat olarak kullanılan farklı azo boya varlığındaki aktiviteyi .....34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1. Metal iyonları, deterjanlar ve farklı organik moleküllerin kısmi saflaştırılmış E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesi üzerine etkileri...32
- Çizelge 5.1. Maksimum haloarkeal azoredüktaz aktivitesinin belirlendiği optimum kültür koşulları .....36
- Çizelge 5.2. Haloarkeal azoredüktazların biyokimyasal özellikleri .....36



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

U	: Ünite
M	: Molar
mM	: Milimolar
L	: Litre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir
$\epsilon$	: Ekstinksyon katsayısı
$\Delta A$	: Absorbans farkı

### KISALTMALAR

rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
O.D.	: Optik yoğunluk
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
PMSF	: Fenilmetilsulfonyl florür
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

## 1. GİRİŞ

Azo boyalar dünya genelinde tekstil, boya, baskı, kozmetik ve farmasötik sanayinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu endüstrilerden kaynaklanan atık sular ekosistemlere azo boya girişinin temel kaynağını oluşturmaktadır. Nitro ve amin grubu içeren azo boyalar biyolojik sistemler için toksik ve mutajeniktir. Tipik bir azo boya kompleks yapısı içerisinde bir ya da daha fazla karakteristik azo bağı (-N=N-) içerir. Bu semi-kovalent özellikteki azo bağlantısı azo boyaları mikrobiyal yıkıma karşı daha dirençli hale getirmektedir. Endüstriyel atık sulardaki boyanın giderimi ve detoksifikasyonu için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtım işlemleri uygulanmaktadır. Ancak, kompleks aromatik yapıya sahip azo boyalar geleneksel arıtım yöntemleri ile etkili bir şekilde yıkılamamaktadır (Misal ve Gawai, 2018).

Bazı fizikokimyasal yöntemlerle azo boyaların renk giderimi yapılabilmektedir ancak bu metodlar hem pahalı yöntemler olup hem de arıtım sonrası yüksek miktarda sekonder atık açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu anlamda, doğa dostu, daha ekonomik ve daha az sekonder atık oluşturan biyolojik yöntemler önemli hale gelmektedir (Song ve ark., 2003; Chen, 2006; Misal ve Gawai; 2018). Bakteri, fungus, maya, alg gibi farklı taksonomik gruplarda yer alan mikroorganizmalar, aerobik ve anaerobik koşullarda azo boyaları yıkabilmektedir. Azo boyaların büyük bir kısmı geleneksel atık su arıtım tesislerinde oksijen varlığında yıkılamamaktadır. Ancak anaerobik koşullarda bazı mikroorganizmalar tarafından redüklenebilmektedir (Singh ve ark., 2015; Stolz, 2001). Oksijenin azo boyasından daha güçlü bir elektron alıcısı olması nedeniyle oksijen varlığında bakteriler ile azo boyaların giderimi etkin olamamaktadır (Stolz, 2001). Anaerobik biyolojik teknikler de uzun jenerasyon süresi ve yüksek hacimli reaktör gereksinimi sebebiyle dezavantajlı olabilmektedir (Abraham ve John, 2007). Azo boyaların biyolojik giderimi mikroorganizmaların ürettiği enzimlere dayanmaktadır. Bu enzimler azo bağ redüksiyonunun katalizi ile biyolojik yıkımın gerçekleşmesini sağlamaktadır. Azo bağı redüksiyonu azoredüktaz gibi enzimlerin aracılığı ile gerçekleştirilebilmektedir. Dolayısıyla azo boyaların dekolorizasyon ve degradasyonunda redüktif azo bağı yıkımı ve renksiz ürün oluşumunu sağlayan azoredüktazların rolü büyüktür (Tian ve ark., 2019).

Azoredüktazlar (E.C. 1.7.1.6) azo boyaları yıkan bakteri ve funguslarda eksprese edilen geniş bir enzim grubudur. Çeşitli aerobik ve anaerobik mikroorganizmalardan azoredüktazlar izole edilerek karakterize edilmiştir. Bu enzimler katalitik aktivite, kofaktör ihtiyacı ve biyofiziksel özellikleri yönünden farklılık göstermektedirler (Misal ve Gawai, 2018). Azo boyalar genellikle aril grupları işe bir arada bulunan bir azo (-N=N-) bağı içerirler. Azo bağları kimyasal olarak stabil olup azoredüktazlar aracılığı ile biyolojik olarak yıkılabilirler. Enzim, azo bağlarını redükleyerek renksiz aromatik aminlere dönüştürme yoluyla azo boyalarının renk giderimini gerçekleştirir (Pandey ve ark., 2007). Azoredüktazların büyük bir kısmı elektron vericisi olarak NAD(P)H kullanan FMN (Flavin mononükleotid) bağımlı flavoproteinlerdir. Bu redükleyici moleküller hücre zarının intraselüler ya da ekstraselüler bölgesinde azo bağının yıkımı aşamasında elektron vericisi olarak rol oynarlar. Reaksiyonun ilk aşamasında NAD(P)H-FMN kofaktörünü redüklemek için kullanılır ve katalitik merkezde FMNH<sub>2</sub> oluşmasına yol açar. Reaksiyon esnasında NAD(P)<sup>+</sup> açığa çıkar ve enzim FMNH<sub>2</sub>'i kullanılarak substratın redüksiyonu gerçekleştirir (Suzuki, 2019; Mendes ve ark., 2011; Bin ve ark., 2004).

Azoredüktazlar flavin bağımlı ve flavin bağımsız olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir (Chen ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005; Blumel ve Stolz, 2003). Flavın kofaktörü haricinde elektron vericisine (NAD(P)H) bağımlılık yönünden de azoredüktazlar farklılık göstermektedir. Farklı organizmalardan flavin içermeyen NAD(P)H bağımlı, flavin içeren NAD(P)H bağımlı ya da bağımsız azoredüktazlar tanımlanmıştır (Misal ve ark., 2015; Misal ve Gawai, 2018). Dolayısıyla flavin kofaktör içeriği ve nikotinamid bağımlılığı ya da tercihi yönünden azoredüktazlar 5 alt gruba ayrılabilir; flavin içeren-NADH bağımlı, flavin içeren-NADPH bağımlı, flavin içeren-NAD(P)H bağımlı, flavin içermeyen NAD(P)H bağımsız, flavin içeren-NAD(P)H bağımlı kinon oksidoredüktazlar (Misal ve Gawai, 2018). Ayrıca azoredüktazlar, gen dizileri ve yapısal farklılıkları nedeniyle anaerobik ya da aerobik özellikte de olabilmektedirler; oksijen toleransına göre oksijene-duyarlı ve oksijene-duyarsız azoredüktazlar (Chen ve ark., 2005; Nakanishi ve ark., 2001; Bürger ve Stolz, 2010).

Endüstriyel boyutta renklendirici olarak üretilip çevreye bırakılan azo boyalar önemli bir çevre kirleticisi haline gelmiştir. Azo gruplarını yıkabilen azoredüktaz üreticisi mikroorganizmalar azo boyaları içeren atık suların biyolojik arıtımında büyük bir öneme

sahip olmaktadır (Singh ve ark., 2015). Azo boya kirliliğinin önlenmesinde anahtar bir enzim olan bakteriyel azoredüktazlar ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Suzuki, 2019). Çevresel mezofil bakteri suşları haricinde rat karaciğer enzimi, sitokrom P450, tavşan karaciğer aldehit oksidazı ile intestinal ve halofilik/halotolerant mikroorganizma azoredüktazları ile azo boyaların enzimatik yıkımı gerçekleştirilmektedir (Chen, 2006; Asad ve ark., 2007; Suzuki, 2019). İntestinal azoredüktazlar azo boyaların büyük bir kısmını potansiyel genotoksik ürünlere dönüştürmeleri nedeniyle toksikolojik yönden de büyük ilgi çekmektedirler (Chen, 2006; Feng ve ark., 2012).

Ksenobiyotiklerin çevreden etkin bir şekilde uzaklaştırılmasında mikrobiyal enzim temelli teknolojiler büyük öneme sahip olmaktadır (Stolz, 2001; Burger ve Stolz, 2010; Oturkar ve ark., 2013; Misal ve Gawai, 2018). Farklı mikrobiyal oksidaz ve redüktazların kullanımı ile deneysel koşullarda tam boya gideriminin gerçekleştiği bildirilmiştir (Lang ve ark., 2013; Oturkar ve ark., 2013). İlk azoredüktaz bir *Pseudomonas* suşundan (KF46) Zimmerman ve arkadaşları tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Zimmerman ve ark., 1982). Takip eden sonraki yıllarda farklı ekolojik isteklere sahip mikroorganizmalardan kofaktör içeriği, oksijen duyarlılığı ve elektron verici özelliklerine göre farklı karakterlerde azoredüktazlar saflaştırılmıştır (Suzuki, 2019).

Doğa dostu ve düşük maliyetli biyolojik arıtım yöntemleri ile boyaların tam mineralizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Çeşitli mikroorganizmaların azo boyalarda renk giderimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Ancak, %3,5-20 arasında değişen oranlarda tuz içeren tekstil atık sularındaki azo boyalarının dekolorizasyonu halofilik olmayan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilememekte ya da oldukça sınırlı düzeyde kalmaktadır (Tian ve ark., 2019; He ve ark., 2017). Halofilik ve/veya halotolerant mikroorganizmalar ile tuz engelinin önüne geçilebilmektedir. Azo boyalarda renk giderimi gerçekleştiren çeşitli halofilik mikroorganizmalar izole edilerek tanımlanmıştır (Tian ve ark., 2019; Guadie ve ark., 2018; Castillo-Carvajal ve ark., 2014; Singh ve ark., 2015). Halofilik mikroorganizmalardan günümüze kadar sadece *Halomonas elongata* ve *Halomonas* sp. GT suşundan azoredüktaz aktivitesi ve karakterizasyonu ile ilgili iki adet çalışma yer almaktadır (Tian ve ark., 2019; Eslami ve ark., 2016).

Halofilik arkeler *Halobacteriaceae* familyası altında yer alan ve üremeleri için en az 1.5 M NaCl gerektiren ekstrem halofilik prokaryotlardır (Ozcan ve ark., 2007). Yüksek

tuz içeren ortamlarda gelişen ekstrem halofilik mikroorganizmalar ekstrem halofilik karakterdeki enzim kaynaklarıdır (Margesin ve Schinner, 2001). Endüstriyel proseslerin büyük bir kısmı oldukça ekstrem fizikokimyasal koşullara sahip olduğu için ekstremofillerin ürettiği enzimler bu anlamda önem kazanmaktadır. Dolayısıyla yüksek tuz içeren tekstil atık sularındaki azo boyaların gideriminde ekstrem halofilik arkeal azoredüktazların rolü büyük olacaktır.

Yüksek tuz konsantrasyonuna adapte olmuş halofilik arke kaynaklı azoredüktazlar ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Halofilik arke redüktazlarının özellikle aerobik koşullarda bakteriyal atağa karşı dirençli olan toksik azo boyalarının redüksiyonunu yüksek tuz konsantrasyonlarında gerçekleştirecek potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

Bu amaçla tez çalışmasında; daha önce azo boya varlığında dekolorizasyon aktivitesi gösterdiği belirlenen 4 halofilik arke suşu azoredüktaz aktivitesi yönünden taranarak yüksek aktivite gösterdiği belirlenen 2 arkeal izolat kullanılarak, birinci aşamada azoredüktaz aktivitesi üzerine kültür koşullarının etkisi, ikinci aşamada ise ultra membran filtre ile ham ekstrakt düzeyinde elde edilen haloarkeal azoredüktazların karakterizasyonu yapılmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bakteriyel azoredüktazlar ile ilgili çalışmalar mevcut olmasına rağmen halofilik ya da halotolerant azoredüktazlar ile ilgili günümüze kadar yapılmış sadece iki çalışma mevcuttur. Ancak halofilik arkeler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

*Halomonas elongata* IBRC-M10216 (DSM 2581) suşundan azoredüktaz geni izole edilerek klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ekprese edilmiştir. Büyüklüğü 22 kDa olan rekombinant proteinin NADH bağımlı olduğu optimum aktivitesini pH 6'da gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin maksimum aktivitesini tuz içermeyen ortamda gösterdiği ve artan tuz ortamında ise aktivitesinin düştüğü belirtilmiştir. Azoredüktazın % 15 tuz konsantrasyonunda neredeyse hiç aktivite göstermediği bildirilmiştir (Eslami ve ark., 2016).

Kaidehi ve ark. (2018) *Halogeometricum borinquense* A ve *Haloferax mediterranei* B haloarkeal suşları için optimum ortam koşullarını 2,4-3,5 M NaCl, pH 7 ve *Halogeometricum borinquense* A için 45 °C, *Haloferax mediterranei* B için ise 40-50 °C aralığında olduğunu belirtmiştir.

Tian ve ark. (2019) yapmış oldukları çalışmada %10 NaCl içeren ortamda Asit Brilliant G azo boyasını yıkan halofilik bir bakteri olan *Halomonas* sp. GT suşunu izole etmiş ve halotolerant azoredüktazını klonlayarak karakterize etmişlerdir. Rekombinant azoredüktazın ilk 3 saat içerisinde %1 NaCl'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği 6. saatten sonra aktivitesinin hızla düştüğünü ve %1'den daha yüksek tuz konsantrasyonlarında ise oldukça düşük aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin NaCl içermeyen ortamda daha yüksek aktivite göstermesi nedeniyle halofilik değilde halotolerant olduğu, 10-30 °C arasında en yüksek aktivitesini gösterdiğini ve 30°C'den sonra aktivitenin hızla düştüğü ve enzimin pH 7 değerinde maksimum aktivitesini gösterdiği bildirilmiştir.

Nonhalofilik bakterilerin azoredüktazı ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Proteobakteri sınıfına ait *Pigmentiphaga kullae* K24 suşundan aerobik azoredüktaz klonlanarak karakterize edilmiştir. Yaklaşık olarak 21 kDa olan proteinin NAD(P)H bağlanma bölgesi içerdiği bildirilmiştir (Blumel ve ark., 2001; Blumel ve Stolz; 2003).

Moutaouakkil ve ark. (2003) *Enterobacter agglomerans* kaynaklı saflaştırılmış 29 kDa büyüklüğündeki NADH bağımlı azoredüktazın optimum aktivitesini pH 7 ve 40 °C'de gösterdiği ve artan NADH yoğunluğunda enzim aktivitesinin arttığını belirtilmişlerdir.

*Rhodobacter sphaerodites* AS1.1737 suşundan izole edilerek klonlanan azoredüktazın Metil Red varlığında maksimum aktivitesini pH 8, 40 °C'de gösterdiği ve oksijene duyarsız olduğu bildirilmiştir.  $Mg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ 'nin azoredüktaz aktivitesini arttırdığı,  $Cu^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  'nin ise inhibe ettiği belirtilmiştir (Bin ve ark., 2004).

Chen ve ark. (2004) *Enterococcus faecalis*'den FMN ve NADH bağımlı ve aerobik 23 kDa büyüklüğünde bir azoredüktazı klonlayarak karakterize etmişlerdir. Enzimin sülfat grubu içeren ve içermeyen azo boyaları dekolorize edebildiği bildirilmiştir.

Maier ve ark. (2004) tekstil atık suyundan izole ettikleri *Bacillus* sp. SF suşunun NADH bağımlı ve 61 kDa büyüklüğündeki azoredüktazını çalışmışlardır. Enzimin farklı substratlar için belirlenen optimum pH değerlerinin Mordant Black 9, Mordant Brown 96 ve Reaktif Black B için 7, Direct Blue 71 için 8 ve tüm boyalar için optimum sıcaklığın 80 °C olduğu bildirilmiştir.

Nachiyar ve Rajakumar (2004) *Pseudomonas aeruginosa*'dan saflaştırdıkları oksijene duyarsız, intraselüler azoredüktazı karakterize ettikleri çalışmada, 29 kDa büyüklüğündeki enzimin maksimum aktivitesini pH 7 ve 35 °C'de gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca enzim aktivitesinin  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  varlığından etkilenmediği ama  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  varlığında tamamen inhibe edildiğini bildirilmiştir.

Chen ve ark. (2010) moleküler büyüklüğü 22 kDa ve elektron donorü olarak hem NADH hem de NADPH kullanabilen *Pigmentiphaga kullae* K24 kaynaklı azoredüktazın optimum aktivitesini pH 6 ve 45°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir.

Matsumoto ve ark. (2010) termofilik *Geobacillus stearothermophilus* suşundan FMN ve NADH bağımlı azoredüktazı *Escherichia coli*'de klonlayarak aktivite sıcaklık derecesi üzerinden karakterize etmişlerdir. Homodimer yapıda ve 23 kDa büyüklüğündeki enzimin Metil Red boyasını optimum 85 °C'de yıktığı, aktivitesini 65 °C'de 1 saat ve 30 °C'de 1 ay koruduğu bildirilmiştir.

*Pseudomonas aeruginosa*'dan saflaştırılan rekombinant NADH bağımlı paAzoR1, paAzoR2 ve paAzoR3 azoredüktazların 2,5 M NaCl konsantrasyonlarında aktivitesinin % 40'ını koruduğu bildirilmiştir (Ryan ve ark., 2010).

Alkalifilik bir bakteri olan *Bacillus badius*'dan NADH bağımlı, oksijene duyarlı olmayan azoredüktazı saflaştırılarak karakterize edildiği çalışmada, enzimin optimum pH'ının 7.4 ve sıcaklığının ise 60 °C olduğu bildirilmiştir. Moleküler büyüklüğü 43 kDa olan enzimin 85 °C' e kadar stabilitesini koruduğu rapor edilmiştir (Misal ve ark., 2011)

Moleküler büyüklüğü yaklaşık 27 kDa oksijene duyarsız intraselüler *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazının saflaştırıldığı ve % 5'e varan tuz varlığında aktivitesinin belirlendiği çalışmada, maksimum aktivitenin pH 6.5 ile 7.4 arası, 37 °C ve tuz içermeyen ortamda gerçekleştiği bildirilmiştir. Azoredüktaz aktivitesinin K<sup>+</sup> ve EDTA varlığında arttığı, Ba<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup>'nin aktiviteyi etkilemediği, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> varlığında % 80 oranında aktivite gösterdiği ve Co<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup> varlığında ise enzimin güçlü bir şekilde inhibe olduğu belirtilmiştir (Cui ve ark., 2012).

Morisson ve ark. (2012) yüksek azoredüktaz aktivitesi gösteren *Clostridium perfringens*'den NADH ve FAD (Flavin adenin dinükleotid) varlığında yüksek aktivite gösteren azoredüktazı klonlayarak karakterize etmişlerdir. Rekombinant enzimin maksimum aktivitesinin oda sıcaklığı, pH 9 ve anaerobik koşullarda gösterdiği tespit edilmiştir.

Aerobik bir bakteri olan *Brevibacillus laterosporus* TISTR 1911'den oksijene duyarsız FMN bağımlı 23 kDa büyüklüğündeki azoredüktaz klonlanarak *Escherichia coli*'de eksprese edilmiştir. Nikel şelat kolonunda immobilize edilen rekombinant proteinin 3 saat içerisinde Metil Orange'ı tamamen yıktığı ve 9 döngü boyunca yıkım aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Lang ve ark., 2013).

*Norcadia* spp kaynaklı azoredüktaz'ın karakterize edildiği çalışmada, maksimum aktivitenin pH 7 ve sıcaklığın ise 40°C'de gerçekleştiği bildirilmiştir (Shah 2014).

Shah (2014) *Bacillus* sp. ETL-A ve *Pseudomonas* sp. ETL-B suşlarına ait azoredüktazların substrat olarak Orange 16 varlığında optimum aktivitelerini pH 7.2 ve 37 °C'de gösterdiklerini açıklamıştır.

*Geobacillus thermoglucosidasius* C56-Y593 suşundan azoredüktaz *Escherichia coli*'de klonlanmış ve rekombinant proteinin maksimum aktivitesini pH 5.5 ve 40 °C'de gösterdiği ve 65 °C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil kaldığı bildirilmiştir. Enzimin 1 mM

EDTA, Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Co<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> varlığında aktivitesini büyük oranda koruduğu, Mg<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> varlığında ise aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (Gao ve ark., 2015).

Qi ve ark. (2017) tarafından, *Rhodococcus opacus* ICP suşunun oksijene duyarsız azoredüktazının düşük pH 4 ve 50 °C'de yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Roopa ve Usha (2017) *Aeromonas Punctata* kaynaklı 65 kDa büyüklüğündeki azoredüktaz enzimi ile yaptıkları çalışmalar sonucunda optimum enzim aktivitesini 7.4 ve 30 °C'de gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

*Choromobacterium violaceum*'dan saflaştırılan azoredüktazın maksimum aktivitesini 35 °C'de ve pH 7.2'de gösterdiği, üre varlığında enzim aktivitesinin düştüğü ve NADH-FAD bağımlı olduğu bildirilmiştir (Verma ve ark., 2019).

Mikroorganizmaların azoredüktaz ile azo boyaları dekolorize ettikleri kültür ortam koşullarının optimizasyonu ile ilgili çalışmalar aşağıda verilmiştir.

*Kocuria rosea* MTCC 1532 suşunun Metil Orange azo boyasını 30 °C, pH 6,8 ve maya özütü varlığında en iyi derecede dekolorize ettiği rapor edilmiştir (Parshetti ve ark., 2010).

Tamboli ve ark. (2010) *Sphingobacterium* sp. ATM suşunun Direct Blue GLL azo boyasını maksimum derecede dekolorize ettiği optimum ortam koşullarını; pH 7, 50 °C ve karbon kaynağı olarak melas içerdiğini belirtmiştir.

Bin ve ark. (2012) tekstil atık suyundan izole ettikleri halotolerant *Staphylococcus cohnii* suşunun Asit Red B boyasının optimum 50 g/L tuz içeren kültür ortamında pH 7 ve 30 °C'de dekolorize edebildiğini gözlemlemişlerdir.

Nikhil ve ark. (2012) DN1 izolatının maksimum azoredüktaz aktivitesi göstereceği optimum kültür koşulunun 200 mg/L Reaktif Red HE8b içerdiğini 40 °C, pH 6,5 olduğunu ve karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığını açıklamışlardır.

Tuzlu atık suda Asit orange 10 azo boyasının *Bacillus firmus* ile dekolorizasyonu üzerine yapılan çalışmada en iyi azoredüktaz aktivitesinin görüldüğü ortam koşullarının % 0-6 arası NaCl, pH 7 ve 30 °C olduğu saptanmıştır (Ogugbue ve ark., 2012).

*Providencia* sp. SRS82 suşunun Asit Black 210 boyasını dekolorize edebildiği optimum ortam koşulları 30 °C, pH 8 ve % 2,5 NaCl olarak belirlenmiştir (Agrawal ve ark., 2014).

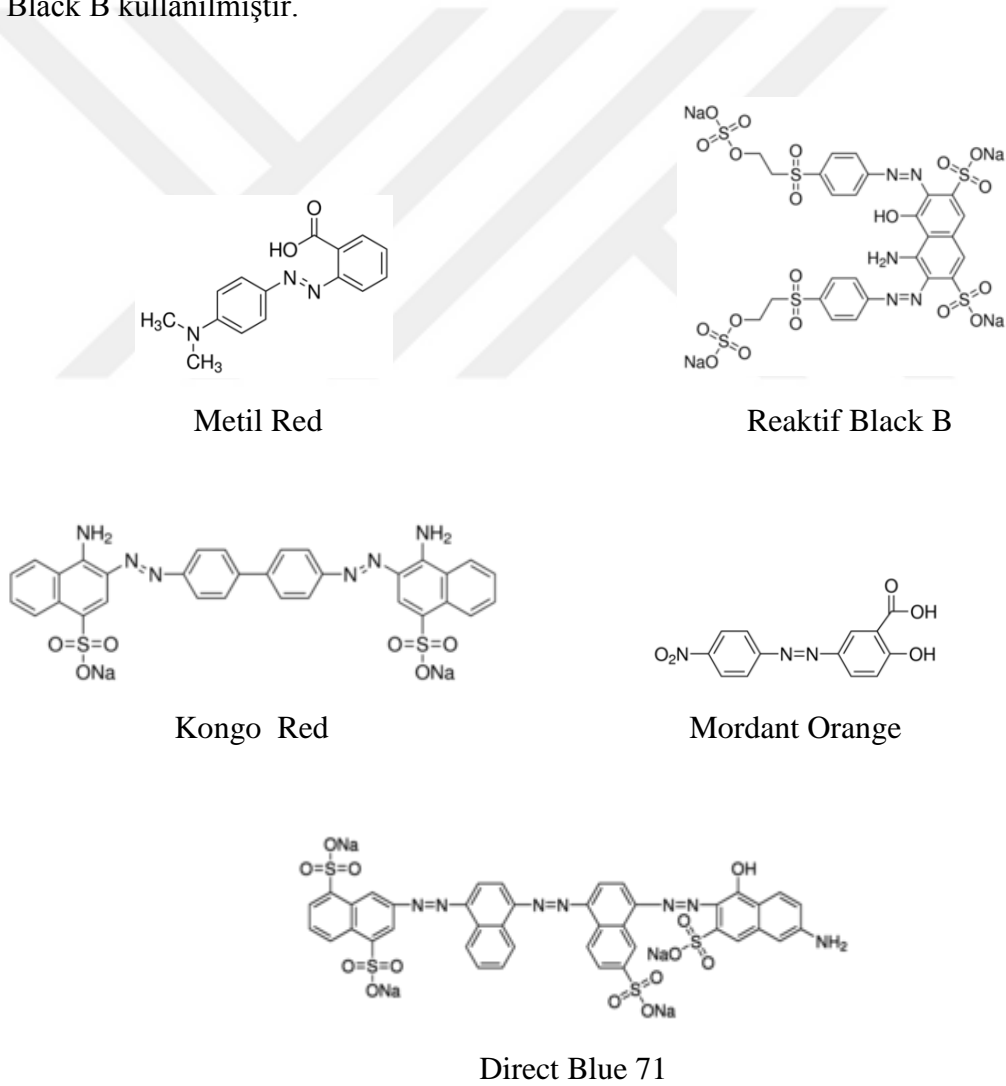
Sahasrabudhe ve ark. (2014) *Enterococcus faecalis* YZ66 suşunun Direct Red 81 boyasını pH 7 ve 40 °C kültür koşullarında en iyi oranda dekolorize edebildiğini bildirmişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez kapsamında, Sigma ve Merck'ten temin edilen NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, KCl, FeSO<sub>4</sub>, HCl, NaOH, Maya Özü, Yağsız Süt Tozu, Sıgır Özü, Trizma, Kazamino Asit, Nişasta, Glisin, Glukoz, Etanol (%96), Merkптоetanol, Triton X-100, Fenil Metil Sülfonil Florür (PMSF), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), HgCl<sub>2</sub>, Sodyum Deoksikolat, NADH, NADPH, Metil Red, Brilliant Blue G, Kongo Red, Mordant Orange, Direct Blue 71, Serum Albümin, Amicon Ultra-15 (30 Kd) ve Sırma Kimya'dan temin edilen Reaktif Black B kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan azo boyaların kimyasal yapıları (Anonymous, 2019)

Bu çalışmada, etüv, otomatik pipet, pH metre, hassas terazi, otoklav, laminar kabin, vorteks, çalkalamalı inkübatör, santrifüj, buz makinesi, sonikatör, spektrofotometre ve su banyosu kullanılmıştır.

### **3.1.1. Halofilik Arke İzolatları ve Besiyerleri**

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında bulunan ve yüksek NaCl içeren kompleks besiyeri kullanılarak Türkiye'nin farklı tuzlu alanlardan izole edilmiş halofilik arke izolatları, kullanılmıştır.

İzolatlarının aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla pH'ı 7,4 olan Sehgal-Gibbons (SG-g/L) besiyeri (NaCl 200; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 20; KCl 3,5; Sodyum sitrat 3,3; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,023; Maya Özütü) kullanılmıştır (Ozcan ve ark., 2007).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Arke İzolatlarının Aktifleştirilmesi ve Azoredüktaz Aktivitesi Yönünden Taranması**

Prof. Dr. Birgül Özcan'ın laboratuvarında gerçekleştirilen önceki çalışmalar kapsamında mono azo boya içeren katı besiyerinde geliştirilerek renk giderim yetenekleri taranmış 121 arke izolatı arasından yüksek renk giderimi gösteren 4 arke suşu (F4A, C36, E49 ve F23) seçilerek çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Suşlar ardışık pasajlarla % 20 NaCl içeren kompleks SG sıvı ortamında, 120 rpm çalkalama hızında ve 37 °C'de geliştirilerek üreme periyodu tüm çalışma süresince senkronize edilmiştir. Sıvı ortamda geliştirilen arkeal suşların intraselüler azoredüktaz aktivite taraması diazo özellikteki Reaktif Black B ve mono azo özellikteki Metil Red boyalarını ihtiva eden reaksiyon ortamlarında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Azoredüktaz Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi tayini Acikgoz ve Ozcan (2016)'dan modifiye edilerek yapılmıştır. Azoredüktaz aktivitesini belirlemek amacıyla eksponansiyel fazdaki arke kültürleri +4 °C'de 15 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücre peleti Tris-HCl tamponu ile 2 kez yıkanarak KCl içeren tamponda süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonu +4 °C'de sonikatör kullanılarak lize edilmiş ve ardından +4 °C'de 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant çalışma boyunca enzim kaynağı olarak kullanılmıştır

Kalyani ve ark. (2009)'dan modifiye edilen yöntemi ile Azoredüktaz aktivitesi belirlenmiştir. Rutin azoredüktaz aktivitesi tayininde substrat olarak Metil Red kullanılmıştır. Aktivite tayini pH'ı 7,5 olan ve 0.09 mM Metil Red, 3 M KCl ve NADH içeren ortamın enzimle 37 °C'de inkübe edilmesi sonucu reaksiyon karışımındaki boya gideriminin 430 nm'de absorbansının ölçülmesiyle yapılmıştır. Bir ünite enzim, dakikada bir µmol Metil Red boyasını enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Azoredüktaz aktivitesi aşağıdaki denkleme göre tanımlanmıştır;

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\epsilon}\right) \times V_{\text{reaksiyon ort.}}}{V_{\text{enzim}} \times \text{Zaman}} \quad (3.1)$$

$$\text{Metil Red } \epsilon_{430} = 10.694 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

### 3.2.3. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyonu

Optimum azoredüktaz aktivitesini belirlemek amacıyla NaCl konsantrasyonu, pH, sıcaklık, azot ve karbon kaynakları ve azo boya (Metil red) etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar kademeli olarak optimize edilen koşullar üzerinden yürütülmüştür. Çalışma periyodu boyunca kültürler 120 rpm hızda çalkalamalı olarak 7 gün boyunca geliştirilmiştir.

Besiyeri NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 1,5; 2; 2,5; 3; 3,4; 3,5 ve 4 M NaCl içeren SG sıvı besiyeri kullanılmıştır.



Besiyeri pH'ının azoredüktaz akitivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla suşlara ait optimum NaCl konsantrasyonu içeren ve pH'ı 6; 7; 7,5; 8 ve 9 olan SG besiyerleri kullanılmıştır.

Maksimum azoredüktaz aktivitesi üzerine ortam sıcaklığının etkisinin belirlenmesi aşamasında optimum NaCl ve pH'ya sahip besiyerine izolatlar ekilerek 20, 30, 37, 40, 45 ve 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Optimum NaCl, pH ve sıcaklıkta geliştirilen arkeal suşların maksimum azoredüktaz aktivitesi göstereceği karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi amacıyla % 0,5 oranında Sığır Özü, Glukoz, Kazamino Asit, Maya Özü, Üre, Yağsız Süt Tozu, Glisin ve Nişasta içeren SG besiyerleri kullanılmıştır.

#### **3.2.4. Haloarkeal Azoredüktaz'ın Ultra Membran Filtre İle Ekstraksiyonu**

Azoredüktaz karakterizasyonunda kullanılmak üzere izolatlara ait ham enzim ekstraktları Amicon Ultra-15 filtrasyon membran kullanılarak elde edilmiştir. Filtrasyon aşamasında başlangıç hacmi korunmuştur.

#### **3.2.5. Azoredüktaz Karakterizasyonu**

Ultra filtre kullanılarak ham halde ekstrakte edilen azoredüktaz enzimlerinin karakterizasyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda NaCl, KCl, NADH, NADPH, boya, metal iyonları ve farklı organik moleküller kullanılmış ve farklı sıcaklık ve pH koşulları çalışmıştır. Karakterizasyon çalışmalarının büyük kısmı kademeli olarak optimize edilen koşullar üzerinden yürütülmüştür.

##### **3.2.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi**

F23 ve E49 izolatlarının azoredüktaz aktiviteleri üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisini gözlemlemek amacıyla finalde 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ve 4 molarlık derişimlere sahip reaksiyon ortamları kullanılmıştır.

### **3.2.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine KCl Konsantrasyonunun Etkisi**

Finalde 0,6; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ve 4 M KCl içeren ortam kullanılarak aktivite tayin edilmiştir.

### **3.2.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Maksimum enzim aktivitesini tayin etmek amacıyla optimum tuz konsantrasyonuna sahip reaksiyon ortamlarının pH'ı asetik asit, sodyum sitrat ve trizma tamponları kullanılarak 4; 5; 6; 7; 7,5; 8 ve 9'a ayarlanmıştır.

### **3.2.5.4 Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi, optimum tuz ve pH'a sahip reaksiyon karışımları hazırlanarak su banyosunda 4; 10; 20; 30; 37; 40; 45; 50; 60; 70; 75; 80 ve 90 °C'de inkübasyona bırakılarak çalışılmıştır.

### **3.2.5.5. Enzim Aktivitesi Üzerine NADH ve NADPH Derişiminin Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine NADH ve NADPH konsantrasyonu etkisinin belirlenebilmesi için optimum tuz ve pH koşullarında, 0,5; 1; 1,5 ve 2 mM elektron vericisi eklenmiş reaksiyon ortamları optimum sıcaklık derecelerinde inkübe edilmiştir.

### **3.2.5.6 Enzim Aktivitesi Üzerine Metal ve İnhibitörlerin Etkisi**

Metal ve farklı organik moleküllerin aktivite üzerine etkisi optimum tuz, pH ve 1 mM elektron vericisi içeren reaksiyon ortamının 37 °C'de inkübe edilmesiyle belirlenmiştir.

### **3.2.5.7. Enzim Aktivitesinin Farklı Boyalar Üzerinde Görülmesi**

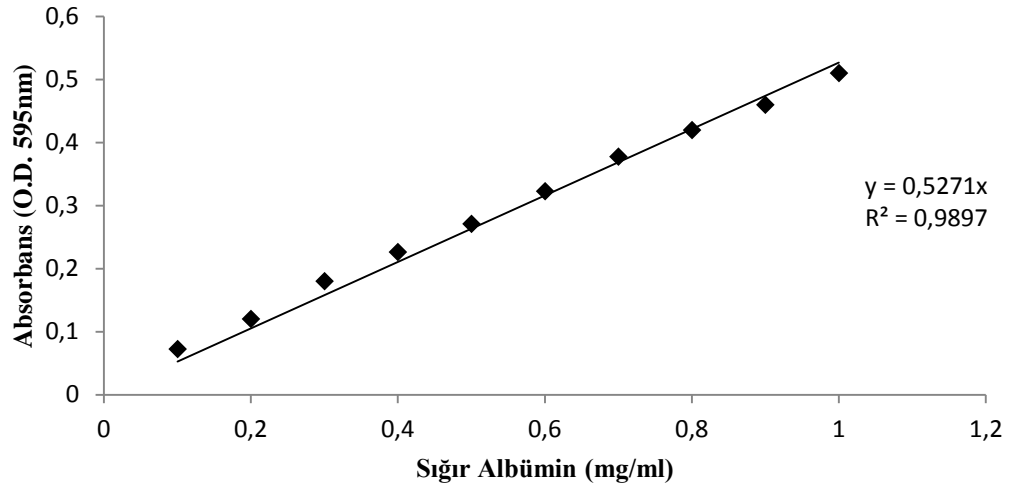
Halofilik arke azoredüktazlarının farklı azo boya üzerindeki aktivite etkinliği, optimum tuz, pH ve 1 mM elektron vericisi içeren reaksiyon ortamlarına 0,09 mM olarak

eklenen mono azo boyalardan Metil Red ve Mordant Orange, diazo boyalardan Kongo Red ve Reaktif Black B ve triazo boyalardan Direct Blue 71 eklenerek 37 °C'de belirlenmiştir.

### 3.2.6. Bradford Protein Tayini

Enzim ekstraktlarındaki (intraselüler süpernatant ve ultra membran filtrat) protein miktarı tayini Bradford (1976)'a göre yapılmıştır. Hazırlanan pretein ayracından 2.5 ml protein içeren örneklerden 50 µl tüp içerisinde karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon somnrası 595 nm'de köre karşı absorbans alınmıştır. Kör için 50 µl 3 M KCl, Trizma (Tris-HCl) tamponu kullanılmıştır.

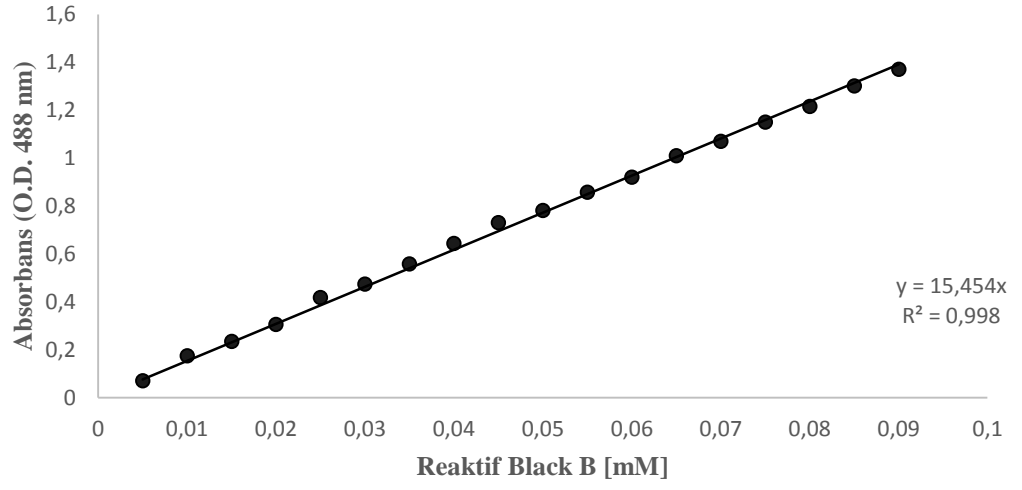
Örnekleredeki protein miktarının hesaplanması için sığır albümin çözeltisi ile standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri 0.1-1 mg/ml sığır albümin çözeltisi içeren tüplere Bradford protein ayracından ilave edilip 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Sığır albümin çözeltilerinin absorbans değerlerine karşılık gelen standart grafik çizilmiştir.



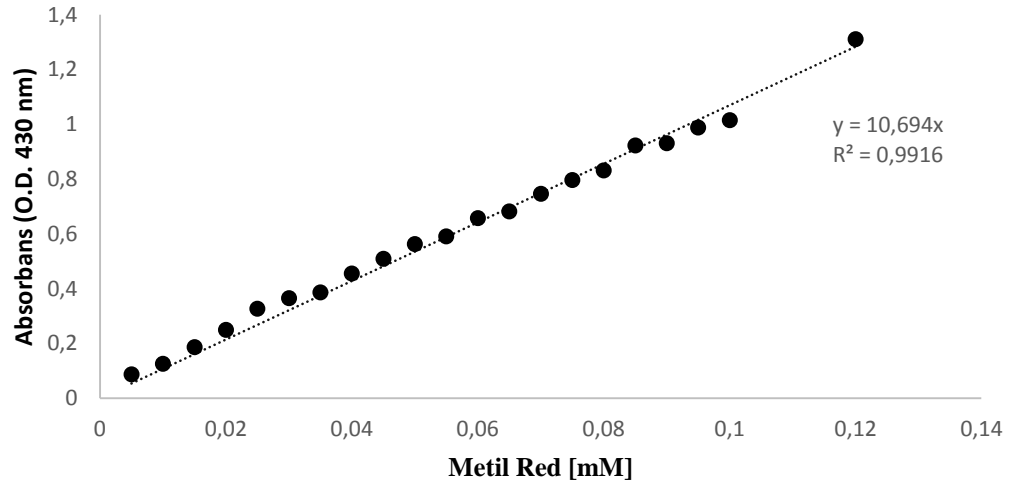
Şekil 3.2. Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart eğrisi

### 3.2.7. Azo Boya Standart Eğrileri

Enzimatik aktivite hesaplamalarında kullanılmak üzere Metil Red ve Reaktif Black B boyalarına ait standart eğriler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.3. Reaktif Black B standart eğrisi

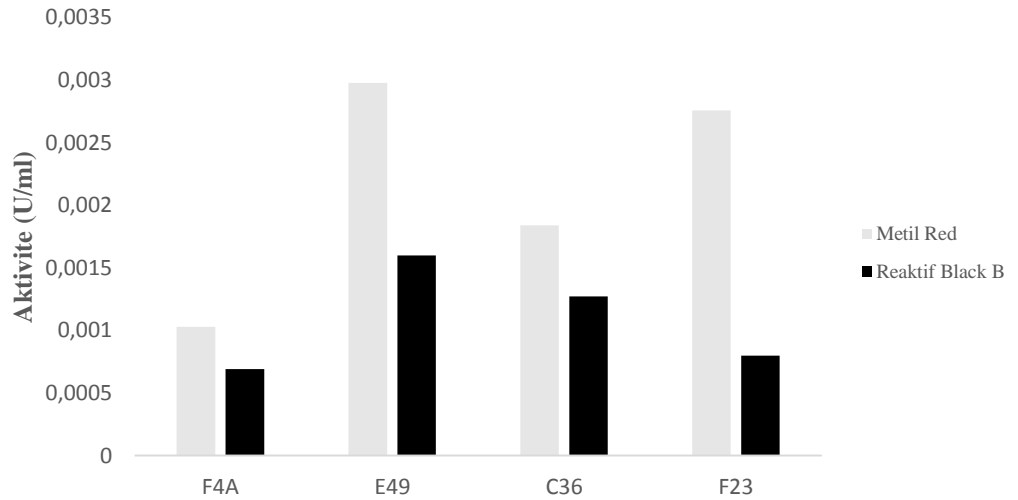


Şekil 3.4. Metil Red standart eğrisi

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Azoredüktaz Aktivite Tarama Sonuçları

Kayseri Tuzla Gölü (E49), Konya Boluk Gölü (F23 ve F4A) ve Burdur Salda Gölü'nden (C36) izole edilmiş ekstrem halofilik arke izolatlarının önceki çalışmalarda azo boya dekolorizasyon yetenekleri belirlenmiş olup, çalışma süresince %20 NaCl içeren kompleks besiyerinde aktifleştirilerek geç eksponansiyel faza ulaşacak şekilde kültürlerinin senkronizasyonu yapılmıştır. İzolatlardan elde edilen hücre ekstraktları (ham enzim kaynağı) 50 ppm Metil Red ve ya Reaktif Black B ve 3 M KCl içeren reaksiyon ortamında azoredüktaz aktivitesi yönünden taranmıştır. Tarama sonucunda izolatların Metil Red varlığında daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiş olup, Metil Red varlığında en yüksek aktiviteyi gösteren E49 ve F23 izolatları ile tez çalışmasına devam edilmiştir. (Şekil 4.1)



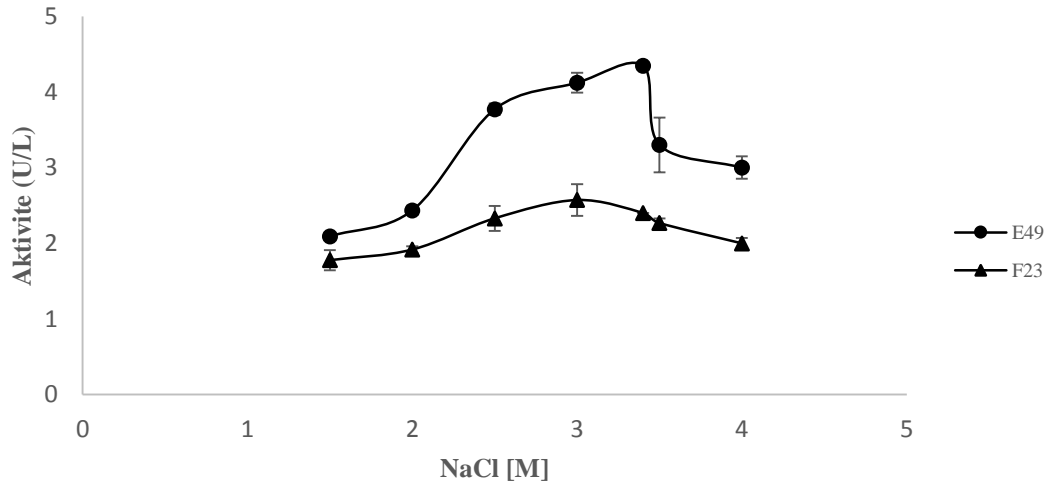
Şekil 4.1. F4A, E49, C36 ve F23 halofilik arke İzolatlarının 2 farklı azo boya varlığında azoredüktaz aktivite tarama sonuçları

## 4.2. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Ortam Optimizasyonu Sonuçları

E49 ve F23 izolatlarının azoredüktaz aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonu, pH sıcaklık ve çeşitli karbon ve azot kaynaklarının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilerek en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği koşullar saptanmıştır.

### 4.2.1. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Yedi farklı NaCl konsantrasyonu (1,5; 2; 2,5; 3; 3,4; 3,5 ve 4 M ) pH 7,4 ve 37 °C’de üretilen arkeal izolatların azoredüktaz aktivite sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi E49 için 3,4 M, F23 için 3 M NaCl’de saptanmıştır. Her bir izolatın optimum tuz konsantrasyonundaki aktivitesi 4,348 U/L ve 2,572 U/L olarak belirlenmiştir. Yapı ve fonksiyonlarını sürdürmek için buldukları ortamlarda yüksek iyonik şiddete ihtiyaç duymaları sebebiyle halofilik arkelerin enzimleri de halofilik karakter gösterdiği bilinmektedir (Ozcan ve ark., 2009).



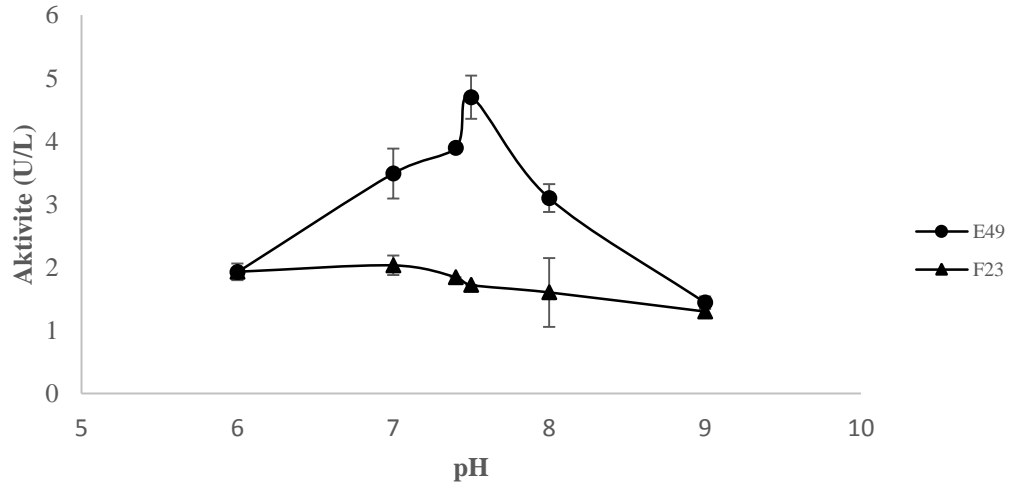
Şekil 4.2. E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi

15 halofilik arke suşu ile yapılan azo boya (Asit Blue ve Reaktif Black B) renk giderimi çalışmasında 5 M NaCl’e kadar renk gideriminin gerçekleştiği ve optimum dekolizasyonun 2,5-3,4 M NaCl’de gerçekleştiği bildirilmiştir (Kaidehi ve ark., 2018). Asad ve ark. (2007) halofilik ve halotolerant 2 farklı bakteri suşunun % 20’nin üzerinde

NaCl içeren ortamda azo boyalarda renk giderimini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Halofilik bir bakteri olan *Halomonas* GTW suşunun % 15 NaCl'de azo boya renk giderimi gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Guo ve ark., 2008). % 10 NaCl içeren ortamda üretilen *Shewanella* sp. IFN4 suşunun % 1 NaCl varlığında en yüksek aktiviteyi gösterdiği artan tuz konsantrasyonlarında aktivitenin hızla düştüğü ve % 6 NaCl varlığında aktivite göstermediği bildirilmiştir (Imran ve ark., 2016a). Cui ve ark., 2012). *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazını saflaştırdıkları çalışmalarında tuzun aktivite üzerine etkisini gözlemleyebilmek için % 0-5 arasında konsantrasyonlara sahip reaksiyon ortamlarında en yüksek aktivitenin tuzsuz ortamda gerçekleştiğini belirtmiştir. *Bacillus firmus* ile yapılan azoredüktaz renk giderimi çalışmasında optimum tuz konsantrasyonu belirlenmiş ve renk giderim oranının % 0-6 NaCl içeren kültür ortamında yüksek olduğu ancak % 6'nın üzerindeki tuz konsantrasyonunda inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir (Ogugbue ve ark., 2012). *Providencia* sp. SRS82'nin Asit Red 210 boyasını dekolorize ettiği ve maksimum dekolorizasyonu % 2,5 NaCl konsantrasyonunda gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Agrawal ve ark., 2014). Başlıca *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Lactococcus*, ve *Dysgonomonas* cinslerine ait üyelerin yer aldığı bakteri konsorsiyumunun Metanil Yellow azo boyasını optimum % 1 NaCl koşullarında dekolorize ettiği bildirilmiştir (Guo ve ark., 2019)

#### **4.2.2. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Optimum NaCl konsantrasyonu, 37°C ve 6 farklı pH'a (6, 7, 7.4, 7.5, 8 ve 9) sahip kültür ortamlarında üretilen hücrelere ait azoredüktaz aktivitelerindeki değişimler Şekil 4.3'de verilmiştir. En yüksek enzim aktivitelerinin belirlendiği pH, E49 izolatu için 7.5 ve F23 izolatu için 7 olup, aktiviteleri sırasıyla 4,699 U/L ve 2,034 U/L olarak saptanmıştır.



Şekil 4.3. E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortam pH'na bağlı değişimi

*Halogeometricum* sp. A ve *Haloferax* sp. B halofilik arke suşlarının azo boyalarda renk giderimini optimum pH 7'de gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada *Halogeometricum borinquense* A suşunun maksimum renk giderimini pH 7'de gösterdiği ve alkali ya da asidik kültür koşullarının üreme ve renk giderim oranını düşürdüğü belirtilmiştir (Kaidehii ve ark. (2018). Guo ve ark. (2008) yüksek tuz konsantrasyonunda Reaktif Brilliant Red azo boyasını dekolorize eden *Halomonas* GTW izolatı ile maksimum renk gideriminin pH 7,5'te gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bin ve ark. (2012) izole ettikleri halotoletant *Staphylococcus cohnii* suşunun Asit Red azo boyası renk gideriminin optimum pH 7 olduğunu tespit etmişlerdir.

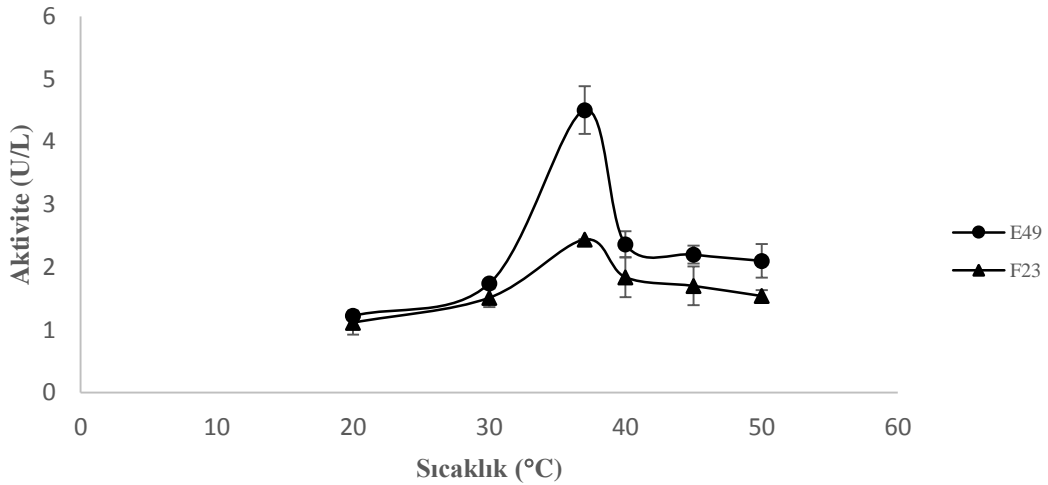
Non-halofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda ise; Saratale ve ark. (2009) *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168 suşunun diazo boya giderimini optimum pH 7 kültür ortamında gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Parshetti ve ark. (2010) *Kocuria rosea* MTCC 1532 suşu ile Metil Orange azo boyasının dekolorizasyonu çalışmasında optimum renk gideriminin maya özütü varlığında pH 6,8 gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çeşitli endüstriyel boya renk gideriminde başarılı olabilmeye yeteneğine sahip *Enterococcus faecalis* YZ 66 suşunun Direct Red 81 azo boyasını % 100 olarak 90 dakika içerisinde pH 7'de dekolorize edebildiği bildirmiştir (Sahasrabudhe ve ark., 2014). *Bacillus firmus* bakterisinin Asit Orange 10 azo boyasını optimum pH 7'de dekolorize ettiği belirtilmiştir (Ogugbue ve ark., 2012). *Providencia* sp. SRS82 suşunun Asit Black 210 triazo



boyasında maksimum renk giderimini pH'ı 8 olan kültür ortamında gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Agrawal ve ark., 2014). Guo ve ark. (2019) tarafından bakteriyel konsorsiyumun azo boyasını optimum 4-7 aralığındaki pH'da dekolorize ettiği belirtilmiştir.

#### 4.2.3. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

E49 ve F23 izolatlarının maksimum enzim aktivitelerinin belirlendiği NaCl ve pH koşullarında hazırlanan kültür ortamlarının farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyonları sonucunda gözlenen azoredüktaz aktivite sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir. Her iki izolata ait maksimum azoredüktaz aktivitesinin 37°C olduğu ve aktivitelerin E49 için 4,504 U/L ve F23 için 2,439 U/L olduğu tespit edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklıkları genel olarak 35-50°C aralığında değişen halofilik arkeal enzimlerin termostabil karakterdedir (Shand ve Perez, 1999; Ozcan ve ark., 2009).



Şekil 4.4. E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin üreme sıcaklığına bağlı değişimi

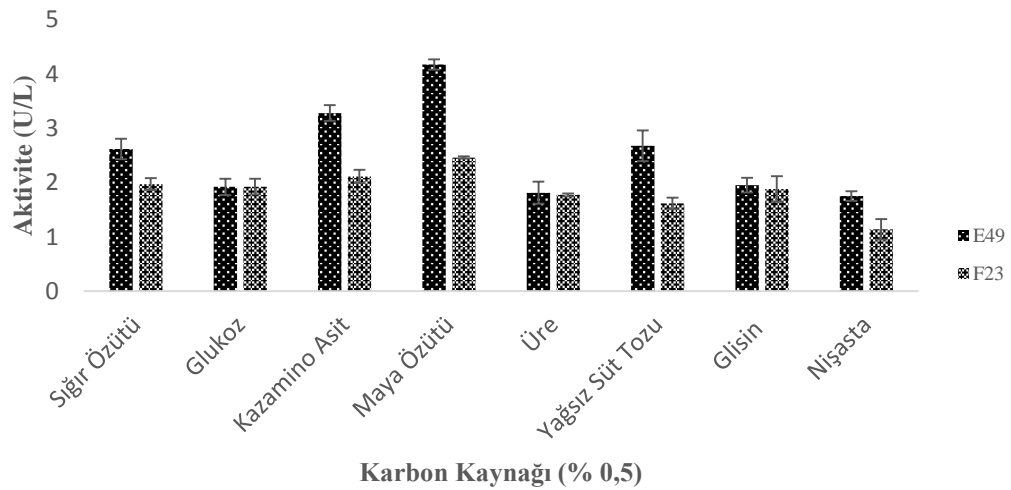
Halofilik arke suşları ile yapılan azo boya renk giderim çalışmasında optimum sıcaklık derecelerinin *Halogeometricum borinquense* A için 45°C, *Haloferax mediterranei* B 40-50 °C aralığında olduğu bildirilmiştir (Kiadehii ve ark., 2018). Asad ve ark. (2007) izole ettikleri 3 farklı halofilik bakteri suşunda (A3, Gb, D2) Reaktif Black

B boyası ile yapılan renk giderim çalışmasında, D2 suşunda 25-40 °C arasında dekolorizasyonun oranının değişmediği, diğer iki suşta en iyi giderimin 25-30 °C arasında olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada halofilik bakteri suşu GTW'nin azo boyalar varlığında renk giderimini maksimum 30 °C'ye kadar gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Guo ve ark., 2008).

Halofilik olmayan mikroorganizmalarla ilgili yapılan çalışmalarda; DN1 izolatu ve *Enterococcus faecalis* YZ 66 suşunun 40 °C'de, *Providencia* sp. SRS82 ve *Kocuria rosea* MTCC 1532'nin 30°C, gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Nikkil ve ark., 2012; Sahasrabudhe ve ark., 2014; Parshetti ve ark., 2010; Agrawal ve ark., 2014).

#### 4.2.4. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Haloarke izolatların azoredüktaz enzim aktiviteleri üzerine farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisi optimum NaCl, pH ve sıcaklığa sahip kültür ortamlarına % 0.5 oranında farklı karbon ve azot kaynakları (Maya özütü, Sığır özütü, Yağsız süt tozu, Kazamino asit, Üre, Glisin ve Nişasta) eklenerek belirlenmiştir (Şekil 4.5). Çalışmalar sonucunda izolatların en yüksek enzim aktivitelerini maya özütü varlığında gösterdikleri saptanmıştır (E49; 4,173 U/L ve F23; 2,462 U/L).



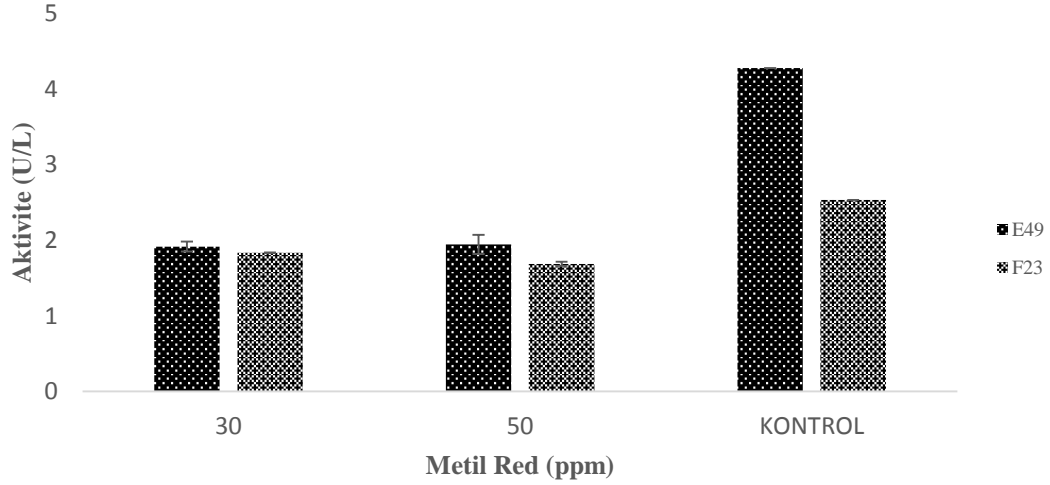
Şekil 4.5. E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki farklı karbon ve azot kaynaklarına bağlı değişimi

Çeşitli besinlerin *Halogeometricum borinquense* A ve *Haloferax mediterranei* B halofilik arke suşlarında azo boya dekolorizasyonuna etkisinin belirlendiği çalışmada en yüksek boya gideriminin karbon kaynağı olarak glikoz ve sükroz, azot kaynağı olarak maya özütünün olduğu bildirilmiştir (Kiadehii ve ark. 2018). Asad ve ark. (2007) tarafından da halofilik bakteri suşlarında kültür ortamına eklenen maya özütünün azo boya renk giderim oranını arttırdığı belirtilmiştir. Non-halofiliklerle ilgili yapılan çalışmalarda; DN1 izolatının farklı karbon kaynakları (galaktoz, fruktoz, laktoz, dekstroz, maltoz, nişasta ve ksiloz) varlığında maksimum azo boya renk giderimi laktoz varlığında gözlemlenmiştir (Nikhil ve ark., 2012). *Shewanella* sp. suşunda glukozun dekolorizasyonu inhibe ettiği ve *Shewanella* sp. IFN4 suşuyla birlikte en iyi renk gideriminin maya özütü varlığında gerçekleştiği belirtilmiştir (Khalid ve ark., 2008; Imran ve ark., 2016b). Gliserol, glukoz, nişasta, melas, kızarmış yağ, peynir altı suyu ve üre gibi farklı karbon ve azot kaynaklarının *Sphingobacterium* sp. ATM suşunun azo boya renk giderimi üzerine etkisi çalışılmış olup en iyi dekolorizasyonun melas varlığında saptandığı rapor edilmiştir (Tamboli ve ark., 2010). Yine Parshetti ve ark. (2010), *Kocuria rosea* MTCC 1532 suşu ile Metil Orange azo boyasının dekolorizasyonu çalışmasında optimum renk gideriminin maya özütü varlığında gerçekleştiğini bildirmiştir. Maya özütü ve ürenin bakteriyel konsorsiyumun azo boyası renk giderimini arttırdığı belirtilmiştir (Guo ve ark., 2019). Pepton, sığır özütü, üre, maya özütü gibi organik azot kaynaklarının mikroorganizmalar ile azo boyalarının indirgenmesi için gerekli olan elektron vericisi kaynağı olarak (NADH) kullanıldığı ve bu nedenle etkili renk giderimi sağlanabildiği belirtilmiştir (Chang ve ark., 2000). Çalışma kapsamına dahil ettiğimiz her iki halofilik arke izolatında da maya özütü başta olmak üzere organik azot kaynakları varlığında yüksek renk giderim oranlarının elde edilmiş olması indirgen güç (NAD(P)H) üretimine bağlı azoredüktaz aktivitesi artışı ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

#### **4.2.5. Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Ortam Boya Konsantrasyonunun Etkisi**

Halofilik arke izolatlarının azoredüktaz aktivitesi yönünden optimum (NaCl, pH, sıcaklık ve azot kaynağı) koşulların sağlandığı kültür ortamında azoredüktaz aktivitesi üzerine Metil Red'in iki farklı konsantrasyonunun (30 ve 50 ppm) etkisi belirlenmiştir

(Şekil 4.6). Sonuç olarak her iki izolatın maksimum enzim aktivitesini boyasız ortamda gösterdiği saptanmış olup değerler E 49 için 4,278 U/L ve F23 için 2,533 U/L olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. E49 ve F23 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin kültür ortamındaki Metil Red konsantrasyonlarına bağlı değişimi

Haloarke suşları *Halo geometricum borinquense A* ve *Haloferax mediterranei B*'nin ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarındaki (400, 600, 800, 1000, 2000 ve 5000 mg/l) Reaktif Black B'nin suşların üreme ve dekolorizasyon aktivitesini olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir (Kaidehii ve ark. 2018). Asad ve ark. (2007) halofilik/halotolerant bakteri suşlarının 1000 ppm azo boya konsantrasyonunda renk giderimi gerçekleştirdiklerini ve 5000 ppm ve üzerindeki boya konsantrasyonunu tolere edebildiklerini tespit etmiştir. Azo boya Asit Red 21'in farklı konsantrasyonlarında üretilen *Providencia* sp. SRS82 suşunun maksimum boya giderimini 750 ppm'de gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Agrawal ve ark., 2014). Dave ve Dave (2009) *Bacillus thuringiensis*'in 500 ve 1000 ppm Asit Red 119 içeren ortamda sırasıyla % 60 ve % 36 oranında dekolorizasyon yapabildiğini göstermişlerdir. Ozdemir ve ark. (2008) *Vibrio harveyi* TEMS1 suşunun 100 ve 400 ppm Asit Black 210 içeren ortamda 24 saat sonucunda % 94 ve % 60 oranında boyayı dekolorize ettiği rapor edilmiştir. *Bacillus firmus*'un kültür ortamına eklenen 5-500 ppm aralığındaki Asit Orange 10 boyasını optimum 5 ppm konsantrasyonda gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Ogugbue ve ark.,

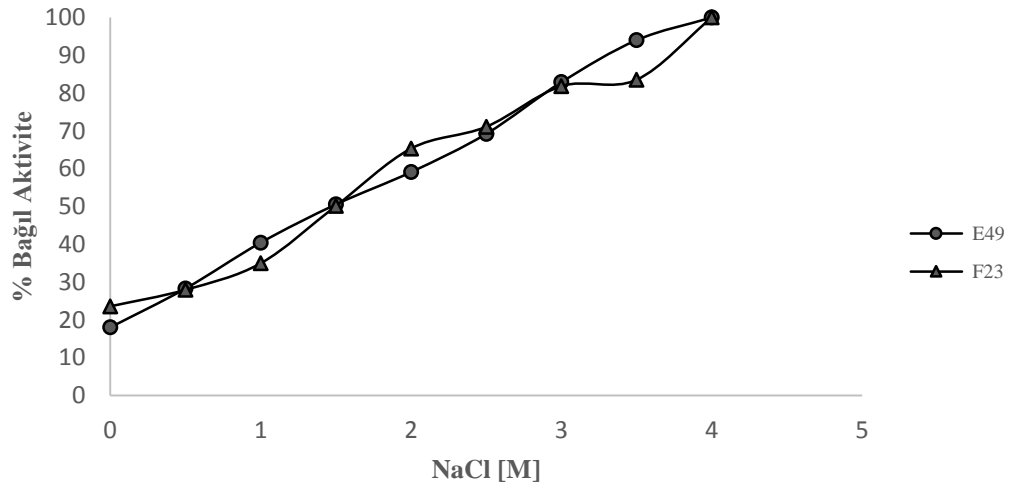
2012). *Staphylococcus cohnii* suşunun spesifik dekolorizasyon oranının kültür ortamında bulunan boya konsantrasyonu bağlı değişimi incelenmiş ve 100-900 ppm aralığında boya içeren besiyerleri ile yapılan çalışma sonucunda boya konsantrasyonu arttıkça spesifik dekolorizasyon oranının arttığı tespit edilmiştir (Yan ve ark., 2012). Genel olarak artan ortam boya konsantrasyonunda, mikrobiyal dekolorizasyonun azalmasıyla ilgili olarak azoredüktazların aktif bölgelerine boya moleküllerinin bağlanması ve bu bölgelerin tıkanmasına bağlı aktivite kaybı nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (Kalyani ve ark., 2009; Saratale ve ark., 2009). Ayrıca Sülfonik asit içeren azo boyalarının yapısındaki aromatik halkalar nedeniyle mikroorganizma gelişimini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Chen ve ark. 2003; Kalyani ve ark., 2009).

### **4.3. Haloarkeal Azoredüktazın Biyokimyasal Karakterizasyonu**

İzolat hücrelerinin sonikasyonu ve sonikasyon+Ultra membran filtrasyonu (30 kDa) ile ham enzim ekstraktları elde edilmiştir. Her iki aşamada protein tayini yapılmış ve spesifik aktivite sonuçları belirlenmiştir. Spesifik aktivite sonuçları üzerinden ultramembran filtrasyon ile saflaştırma işleminin gerçekleşmediği tespit edilmiştir. İzolatlara ait ultra membran filtrasyonu ile elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılarak E49 ve F23'e ait azoredüktazların biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır.

#### **4.3.1. Azoredüktaz Aktivitesinin [NaCl] Optimizasyonu Sonuçları**

E49 ve F23 izolatlarının en yüksek azoredüktaz aktivitesini belirlemek amacıyla 9 farklı NaCl konsantrasyonunda hazırlanan reaksiyon ortamlarından alınan sonuçlara göre hem E49 hem de F23 enzimlerinin maksimum aktivitelerini 4 M NaCl'de gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.7).



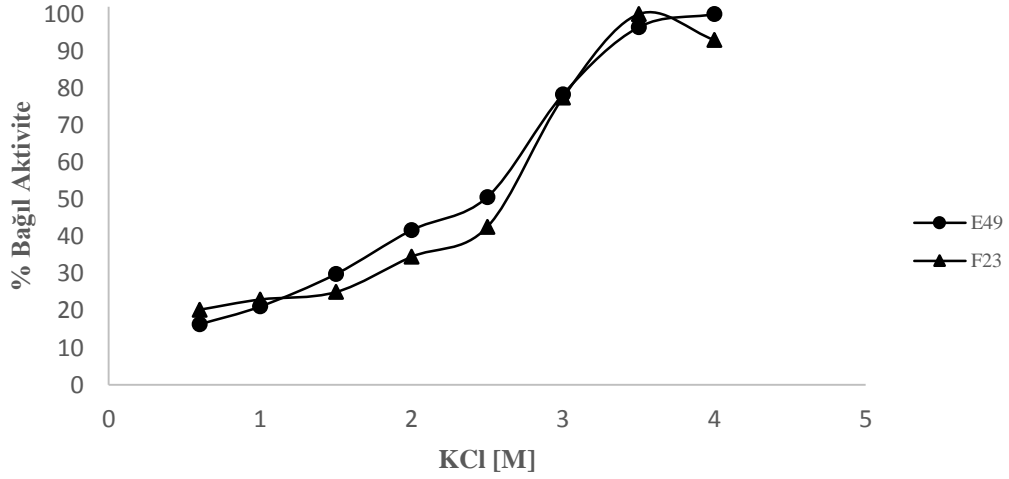
Şekil 4.7. E49 ve F23 azoredüktaz aktivitelerinin NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi

Halofilik *Halomonas* sp. GT suşundan elde edilen rekombinant azoredüktaz ile yapılan çalışmada, enzimin maksimum aktivitesini % 1 NaCl'de ilk 3 saat içerisinde gösterdiği ve 6. Saatten sonra hızla aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Tian ve ark., 2019). Yine halofilik bakteri olan *Halomonas elongata* IBRC-M10216 (DSM 2581) suşundan klonlanarak *Escherichia coli*'de ekprese edilen rekombinant azoredüktazın en yüksek aktivitesini tuzsuz ortamda gösterdiği ve aktivitesinin artan NaCl konsantrasyonlarında azaldığı ve % 15 NaCl'de durduğu bildirilmiştir (Eslami ve ark., 2016). Nokta mutasyonlar gerçekleştirilen ve bakteride ekprese edilen mutant *Halomonas elongata* azoredüktazının % 5 NaCl'i tolere edebildiği gösterilmiştir (Nakhaee ve ark., 2018). *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazı saflaştırılmış ve % 2'e kadar artan NaCl ortamında % 70'in üzerinde aktivite gösterdiği ve %5 NaCl'de aktivitesinin %35'e düştüğü belirtilmiştir (Cui ve ark., 2012).

Yüksek NaCl konsantrasyonlarına (1M-doygun) üreyebilen halofilik arkelere ait enzimler de stabilizasyonu ve aktivitesi için yüksek tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duymaktadır (Bonete ve Espinoza, 2011). Çalışmalarımız sonucunda olası membran bağımlı (Imran ve ark., 2016a) haloarkeal azoredüktazların yüksek NaCl varlığında aktivite gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.7).

#### 4.3.2. Azoredüktaz Aktivitesi [KCl] Optimizasyonu Sonuçları

E49 ve F23 izolatlarının intraselüler azoredüktazlarının KCl konsantrasyonuna bağlı olarak gösterdikleri maksimum enzim aktiviteleri Şekil 4.8’de verilmiş olup E49 için optimum KCl konsantrasyonu 4 M, F23 için ise 3.5 M olarak tespit edilmiştir.

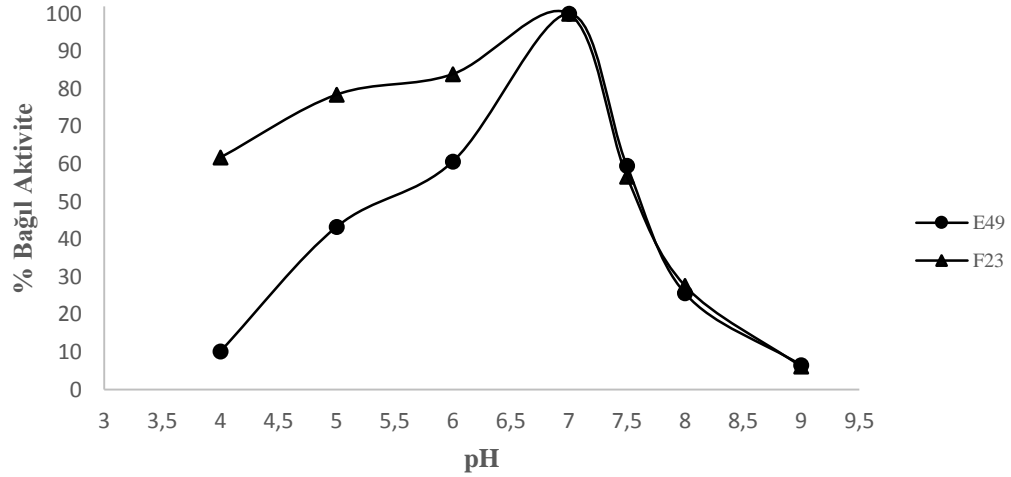


Şekil 4.8. E49 ve F23 azoredüktaz aktivitelerinin KCl konsantrasyonuna bağlı değişimi

Halofilik arkeler, ortamlarındaki yüksek miktarda bulunan NaCl ve diğer tuzlara karşı ozmotik dengeyi sağlamak amacıyla hücre içerisinde yüksek miktarda KCl biriktirirler (Salt-in stratejisi). Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun büyük kısmını KCl ve daha az olmak üzere NaCl oluşturmaktadır. Bu nedenle halofilik arke intraselüler enzimleri yüksek KCl konsantrasyonlarında aktif ve stabil kalabilmektedirler (Danson ve Hough, 1998; Oren ve Mana, 2002; Bonete ve Espinoza, 2011). İntraselüler haloarkeal enzimlerin yüksek NaCl/KCl ya da yalnızca KCl konsantrasyonlarında aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Fu ve Oriol, 1998; Danson ve Hough, 1998; Ortega ve ark., 2011; D’Souza ve ark., 1997). İzolatlara ait azoredüktazların hem NaCl hem de KCl varlığında yüksek aktivite göstermesi nedeniyle membran bağımlı proteinler olabileceği düşünülmektedir.

### 4.3.3. Azoredüktaz Aktivitesi pH Optimizasyonu Sonuçları

Farklı pH'ların izolatların azoredüktaz aktiviteleri üzerine etkisi belirlenmiştir. Her iki izolat enziminin en yüksek aktiviteyi pH 7'de gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. E49 ve F23 azoredüktaz aktivitelerinin pH'a bağlı değişimi

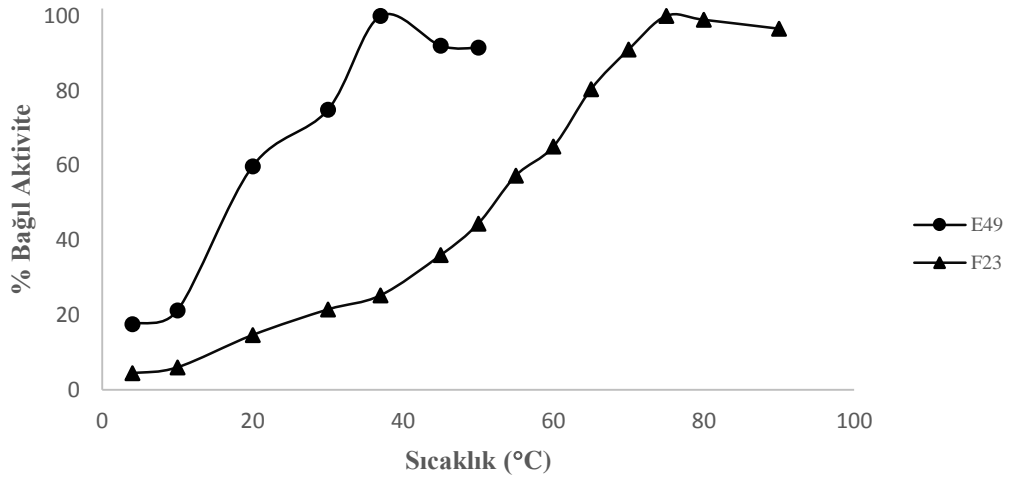
Halofilik *Halomonas elongata* ve *Halomonas* sp. GT bakteriyel suşlarına ait rekombinant azoredüktazların maksimum enzim aktivitesini sırasıyla pH 6 ve 7'de gösterdikleri bulunmuştur (Eslami ve ark., 2016; Tian ve ark., 2019). Saflaştırılmış halotolerant *Bacillus megaterium* azoredüktazının optimum pH'nın 7 olduğu bildirilmiştir (Khan, 2011). *Bacillus* sp. SF suşunun alkalifil karakterdeki azoredüktazının pH 8-9'da en yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Maier ve ark., 2004). *Clostridium perfringens* kaynaklı azoredüktazın maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değeri 9 olarak tespit edilmiştir (Morisson ve ark., 2012). DN1 azoredüktazının maksimum aktivite gösterdiği pH'nın 6 olduğu belirtilmiştir (Nikkil ve ark., 2012). Cui ve ark. (2012) saflaştırdıkları *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazının maksimum aktivitesini pH 5,4-7,5 aralığında gösterdiğini bildirmişlerdir. Saranraj ve ark. (2004) bakteri konsorsiyumuna ait (*Bacillus odysey*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* sp. ve *Nocardiopsis alba*) azoredüktazın maksimum aktivitesini pH 7'de gösterdiğini belirtmişlerdir. Maier ve ark. (2004) tekstil atık suyundan izole ettikleri *Bacillus* sp. SF azoredüktazının maksimum aktivitesini Mordant



Black için pH 9, Mordant Brown 96 ve Reaktif Black B için pH 7, Direct Blue 71 için pH 8 olarak tespit etmişlerdir.

#### 4.3.4. Azoredüktaz Aktivitesi Sıcaklık Optimizasyonu Sonuçları

Haloarke izolatlarının maksimum azoredüktaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 3 M KCl ve pH 7’de alınan aktivite sonuçları Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Optimum sıcaklık dereceleri E49 azoredüktazı için 37 °C ve F23 azoredüktazı için 75 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca yüksek termofilik özellik gösterdiği belirlenen F23 azoredüktazının 80 ve 90 °C’de dahi aktivitesini sırasıyla % 99 ve % 97 oranında koruduğu belirlenmiştir. Termofilik özellikteki E49 azoredüktazının ise 45 ve 50 °C’de aktivitesinin % 92’ni koruduğu tespit edilmiştir.



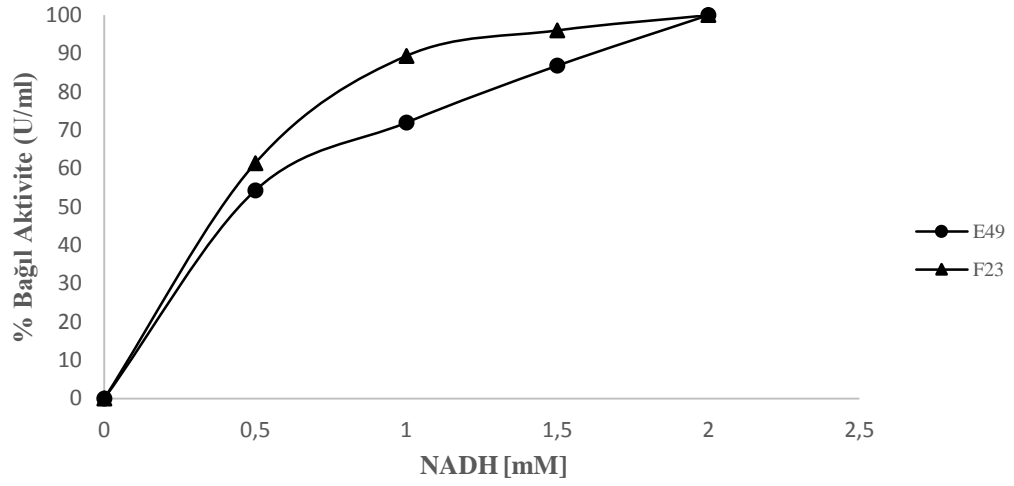
Şekil 4.10. E49 ve F23 azoredüktaz aktiviteilerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Rekombinat halofilik *Halomonas* sp. GT suşu azoredüktazının maksimum aktivitesini 10-30 °C aralığında gösterdiği ve 30 °C’den sonra aktivitesinde hızla düşüş olduğu belirtilmiştir (Tian ve ark., 2019). Nakhaee ve ark. (2018) *Halomonas elongata* kaynaklı mutant ve rekombinat azoredüktaz termal stabilitesinin 50 °C’ye kadar arttığını bildirmişlerdir. Saflaştırılmış halotolerant *Bacillus megaterium* azoredüktazının 30-45 °C aralığında maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Khan, 2011). Alkali termofilik *Bacillus* sp. den saflaştırılan azoredüktazın 80 °C’ye kadar maksimum aktivite gösterdiği

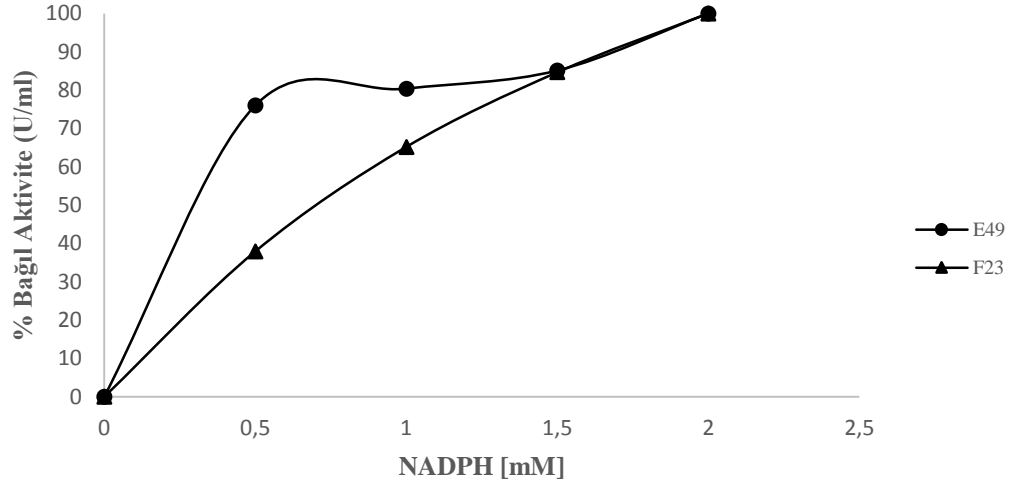
bildirilmiştir (Maier ve ark., 2004). *Enterobacter agglomerans*'dan saflaştırılan azoredüktazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için yapılan çalışmada reaksiyon karışımlarındaki enzimlerin 5-70 °C aralığındaki ortamlarda 10 dakika inkübe edildikten sonra elde edilen sonuçlara göre 5-35 ° C arasında yüksek aktivitesinin etkilenmediği, termal inaktivasyonun 40 °C üzerindeki değerlerde başladığı ve 60 °C'de hiç aktivite göstermediği belirtilmiştir (Moutaouakkil ve ark., 2003). *Clostridium perfringens*'den klonlanarak karakterize edilen rekombinant azoredüktaz enzimin maksimum aktivitesini oda sıcaklığında gösterdiği tespit edilmiştir (Morisson ve ark., 2012). Alkalifilik bir bakteri olan *Bacillus badius*'dan saflaştırılan azoredüktazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 60 °C olduğu ve termostabilitesini 85 °C'e kadar koruyabildiği gözlemlenmiştir (Misal ve ark., 2011). Bin ve ark. (2004) *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 suşundan izole ederek klonladıkları azoredüktazın optimum aktivitesini 40 °C'de gösterdiğini ifade etmişlerdir. Nachiyar ve Rajakumar (2004) *Pseudomonas aeruginosa*'dan saflaştırdıkları azoredüktaz enziminin maksimum aktiviteyi 35° C'de gösterdiğini belirtmişlerdir. Bakteri azoredüktazları ile yapılan diğer çalışmalarda da optimum sıcaklık derecelerinin 30-40 °C arasında olduğu bildirilmiştir (Niikil ve ark., 2012; Saranraj ve ark., 2004).

#### **4.3.5. Azoredüktaz Aktivitesi NADH VE NADPH Optimizasyonu Sonuçları**

E49 ve F23 izolatlarına ait azoredüktaz aktivitesi üzerine NADH ve NADPH konsantrasyonunun etkisini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışma kapsamında her iki izolat azoredüktazının 2 mM NADH/NADPH varlığında maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. NADH/NADPH yokluğunda aktivite gözlenmemesi heriki haloarkeal azoredüktazının NADH/NADPH bağımlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11. E49 ve F23 azoredüktaz aktivitelerinin NADH konsantrasyonuna bağlı değişimi



Şekil 4.12. E49 ve F23 azoredüktaz aktivitelerinin NADPH konsantrasyonuna bağlı değişimi

Eslami ve ark. (2016) tarafından *Halomonas elongata* IBRC-M10216 (DSM 2581) azoredüktazının elektron vericisi olarak hem NADH hem de NAPH kullandığı ve bir elektron vericisi olmadan aktivite gösteremediği belirlenmiştir. Halofilik *Halomonas* sp. GT suşuna ait azoredüktazın NADH bağımlı olduğu Tian ve ark. (2019) tarafından bildirilmiştir. *Halomonas elongata* suşuna ait mutant ve rekombinat azoredüktazın NADH varlığında aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Nakhaee ve ark., 2018). Halofilik organizmaları yanısıra non-halofilik azoredüktazlarının da elektron vericisi çeşitliliği ve

bağımlılığı ile ilgi farklı sonuçların yer aldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Escherichia coli* CD-2'den saflaştırılan azoredüktazın elektron vericisi olarak NAD(P)H kullanabildiği, *Bacillus badius*'un oksijene duyarlı azoredüktazının NADH bağımlı olduğu bildirilmiştir (Misal ve ark., 2011; Cui ve ark., 2012)

#### 4.3.6. Metal İyonları ve İnhibitör Maddelerin Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Sonuçları

Reaksiyon ortamına eklenen metal iyonları ve olası inhibitör özellikteki farklı organik moleküllerin E49 ve F23 haloarkeal izolatlarının azoredüktaz enzim aktivitesi üzerine aktivasyon-inhibasyon etkisi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Metal iyonları, deterjanlar ve farklı organik moleküllerin kısmi saflaştırılmış E49 ve F23 azoredüktaz aktivitesi üzerine etkileri

Metal, organik molekül	Rezidual Aktivite Üzerinden % Aktivasyon/İnhibisyon Değerleri			
	% İnhibisyon		% Aktivasyon	
	E49	F23	E49	F23
Merkaptoetanol	-	-	71	77
Tween 80	-	-	54	70
EDTA	23	-	-	83
PMSF	-	-	65	237
Mg <sup>+2</sup>	-	-	52	73
Sodium Deoksikolat	64	-	-	37
Hg <sup>+2</sup>	-	-	10	54
Üre	53	-	-	82
SDS	-	-	72	28
Triton X-100	-	11	25	-

Her iki suşa ait enzimlerde, Merkaptoetanol, Tween 80, PMSF, Mg<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup> ve SDS varlığında aktivitenin 0.1-2.4 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca Triton X-100 varlığında aktivitesini kaybeden F23 azoredüktazı PMSF varlığında 2.3 kat aktivite artışı göstermiştir. Genel olarak PMSF ve Hg<sup>+2</sup> gibi organik kimyasal ve ağır metal kaynaklı proteaz inhibisyonu nedeniyle azoredüktaz proteolizisinin azaldığı ve bu durumun azoredüktaz aktivitelerini arttırabileceği düşünülmektedir.

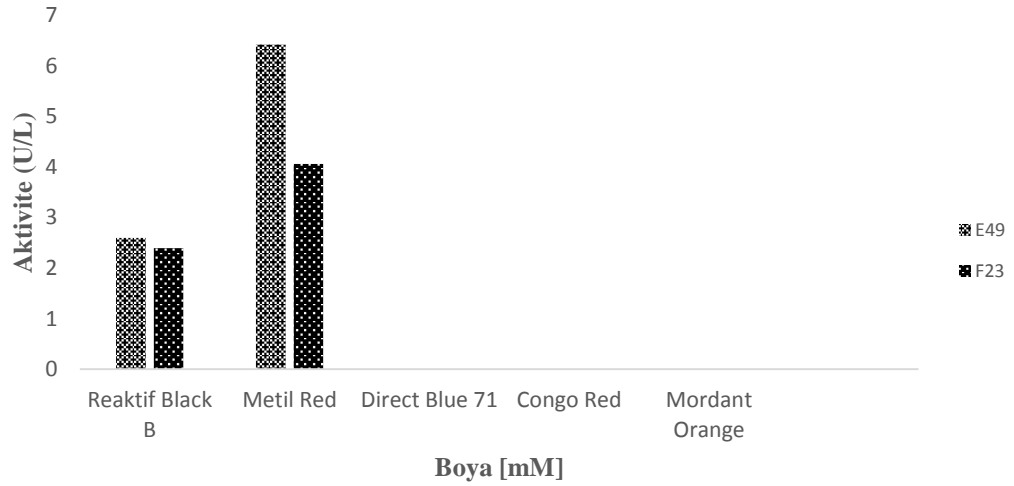
Halofil ve halotolerant mikroorganizma azoredüktaz aktivitesi ve metal iyonları ve olası inhibitör özelliğe sahip organik moleküllerin etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya ratlanmamış olup, non halofiliklerdeki sonuçlar aşağıda verilmiştir. Metil Red

varlığında *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 rekombinat azoredüktaz aktivitesinin  $Mg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  ile arttığı,  $Cu^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  ile enzimin inhibe olduğu bildirilmiştir (Bin ve ark., 2004). Nachiyar ve Rajakumar (2004) *Pseudomonas aeruginosa*'dan saflaştırulmuş azoredüktaz aktivitesinin  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  varlığından etkilenmediği ama  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  varlığında tamamen inhibe edildiğini bildirilmiştir. *Shewanella* sp. IFN4 suşunun 10 mg/l'e kadar Reaktif Black B boyasını  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ , Fe ve  $Mn^{+2}$  varlığında dekolorize edebildiği bildirilmiştir.  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Co^{+2}$ 'nun ise dekolorizasyon oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Imran ve ark., 2016a). Cui ve ark. (2012) tarafından saflaştırılan *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazının aktivitesinin  $K^{+}$  ve EDTA varlığında arttığı,  $Co^{+2}$  ve  $Hg^{+2}$  varlığında ise proteinin inhibe olduğu ve aktivitenin azaldığı belirtilmiştir. Metal iyonları içeren boyalı atık suda azo boyalarının biyodegradasyonunun baskılandığı Cui ve ark. (2012) tarafından bildirilmiştir. *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-Y593 suşu azoredüktazı enziminin 1 mM EDTA,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Li^{+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  varlığında aktivitesini büyük oranda koruduğu,  $Mg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  varlığında ise aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (Gao ve ark., 2015). *Enterobacter agglomerans*'dan saflaştırılan azoredüktaz aktivitesini  $Fe^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$ 'un güçlü  $Mn^{+2}$ 'nin ise zayıf bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Moutaouakkil ve ark., 2003). Metal iyonları mikrobiyal üremeyi inhibe ve/veya proteini denatüre ederek dekolorizasyon aktivitesini düşürmektedir (Imran ve ark., 2016a; Sharma ve ark., 2008).

#### 4.3.7. Farklı Azo Boyalarının Azoredüktaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Mono azo Metil Red ve Mordant Orange, diazo Reaktif Black B, Kongo Red ve triazo Direct Blue 71 boyları varlığında E49 ve F23 azoredüktaz aktivite sonuçları Şekil 4.13'de verilmiştir. Her iki enzimin azo boyalardan Kongo Red, Mordant Orange ve Direct Blue 71'i substrat olarak kullanmadığı ve mono azo boyalardan Metil Red'i en iyi substrat olarak kullandığı tespit edilmiştir.

Farklı boyalar için farklı azoredüktazların spesifite gösterebileceği ve enzim substrat tercihlerinin boyların kimyasal yapılarına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007; Moutaouakkil ve ark., 2003; Imran ve ark., 2016a).



Şekil 4.13. E49 ve F23 azoredüktazlarının substrat olarak kullanılan farklı azo boya varlığındaki aktiviteleri

*Halomonas elongata* azoredüktazının hem Metil Red hem de Reaktif Black B boyar maddelerini redükleyebildiği bildirilmiştir (Eslami ve ark., 2016). *Halomonas* sp. GT suşunun da Metil red boyasını substrat olarak kullandığı belirtilmiştir (Tian ve ark., 2019). Moutaouakkil ve ark. (2003) *Enterobacter agglomerans* azoredüktazının geniş bir substrat spesifitesi gösterdiğini, enzimimn en fazla ilgisinin Metil Red ve azalan miktarlarda sırasıyla Disperse Yellow, Trypan Blue, Amaranth ve Orange G'ye karşı olduğunu tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. SF suşu azoredüktazının monoazo Mordant Black 9 ve Mordant Brown 96, diazo Reaktif Black B ve triazo olan Direct Blue 71 boyaları üzerinde aktivite gösterebildiğini belirtilmiştir. (Maier ve ark., 2004). Cui ve ark. (2012) saflaştırılmış *Escherichia coli* CD-2 azoredüktazının substrat olarak Metil Red'i kullandığını bildirmiştir. *Clostridium perfringens* azoredüktazının Direct Blue boyasını redükleyebildiği Morrison ve John (2015) tarafından bildirilmiştir. *Bacillus badius* azoredüktazının substrat spesifikliğini belirlemek için eşit konsantrasyonlara sahip 14 azo boya kullanmış olup maksimum enzim aktivitesinin sadece Amaranth varlığında gözlemlendiği belirtilmiştir (Cui ve ark., 2012).

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Azo boyalar bir ya da daha fazla azo bağı ( $R_1-N=N-R_2$ ) ile karakterize edilen aromatik bileşikleridir. Dünya genelinde her yıl üretilen 800.000 tondan fazla boyanın %60-70'ni azo boyalar oluşturmaktadır (Moutaouakkil ve ark., 2003). Çok sayıda farklı çeşidinin olması, doğal boyalarla karşılaştırıldığında sentez kolaylığı sunması ve daha az maliyetli olması endüstriyel alanda azo boyaların daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (Chang ve ark., 2004). Endüstriyel ve ticari alanda daha fazla tercih edilen ve çevreye salınımı en fazla olan azo boyaların çevre dostu olduğu söylenemez.

İçerdiği azo ve sülfür grupları nedeniyle kalıcı olup parçalanmaya karşı dirençli olan ksenobiyotik azo boyların atık sulardan uzaklaştırılmasında bazı fiziksel ve kimyasal metodlar uygulanabilmektedir. Ancak bu yöntemler aşırı miktarda kimyasal ve fazla enerji gerektirdiğinden dolayı yüksek maliyetli olmakta ve boya çeşitlerinin büyük bir kısmına uygulanamamaktadır. Bunların yanı sıra düşük verim alınması ve uygulama sonrasında açığa çıkan organik metabolitlerin de ikinci bir kirlilik sorununa sebep olmaması için kompleks prosedürden geçiriliyor olması ve atık miktarının fazla olması ekonomik açıdan fiziksel ve kimyasal yöntemleri pratik kılmamakta hatta olanaksız hale getirebilmektedir (Forgacs ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004). Boyalı atık suların arıtımında diğer bir yaklaşım ise maliyet etkin çevre dostu mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Ayrıca mikrobiyal dekolorizasyon ve degradasyon aktiviteleri ile azo boyalarının mineralizasyonu sonucunda toksik olmayan son ürünlerin açığa çıkması ve fiziksel ve kimyasal metodlara kıyasla daha az çamur üretilmesi ve daha az su kullanılması açısından da avantaj sağlamaktadır (Banat ve ark., 1996; Rai ve ark., 2005). Azo boyalarının bakteriyel degradasyonu, ancak ilk aşamada azo bağının redüklenmesi ile mümkün olabilmektedir. Azo bağının redüktif yıkımı azo boyalarının degradasyonunda anahtar role sahip olan azo redüktaz enzimi ile gerçekleşmektedir. Son yıllarda farklı bakteri türlerinden çeşitli ekstrem halofilik özellik göstermeyen azoredüktazlar izole edilmiştir.

Yüksek tuz konsantrasyonlarına adapte olmuş aerobik halofilik bakteri ya da arkeler yüksek oranda tuz içeren boyalı endüstriyel atıkların renk giderimi aşamasında kullanım potansiyeline sahip olan organizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Halofilik

mikroorganizma azoredüktazı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması tez çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Çalışma kapsamında iki farklı azo boya Metil Red ve Reaktif Black B kullanılarak 4 halofilik arke suşu (E49, F4A, C36 ve F23) azoredüktaz aktiviteleri yönünden taranmış ve en yüksek enzim aktivitesi gösteren iki suşla (E49 ve F23) çalışmaya devam edilmiştir. Çalışmanın ilk kapsamında her iki organizma ham enzim ekstraktlarındaki azoredüktaz aktivitesi üzerine kültür ortam koşullarının etkisi belirlenerek ortam koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Kültür ortam koşullarının optimizasyon sonuçları Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Maksimum Haloarkeal azoredüktaz aktivitesinin belirlendiği optimum kültür koşulları

Enzim kaynağı	[NaCl]	pH	°C	Karbon ve azot kaynakları	[Metil Red]
E49	3,4 M	7,5	37	Maya özütü	--
F23	3,0 M	7	37	Maya özütü	--

İkinci aşamada ise Ultra membran filtre ile elde edilen E49 ve F23 ham azoredüktaz ekstraktlarından enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Haloarkeal azoredüktazlara ait biyokimyasal özellikler Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Haloarkeal azoredüktazların biyokimyasal özellikleri

Enzim kaynağı	[NaCl]	[KCl]	pH	°C	[NADH/NADPH]	Metal iyonları/ İnhibitörler		Substrat
						Aktivasyon	İnhibisyon	
E49	4 M	4 M	7	37	2/2 mM	SDS, Merkaptoetano 1, Tween 80, PMSF, Mg+2, Hg+2, Triton X-100	Sodyum deoksikolat , EDTA, üre	Metil Red, Reaktif Black B
F23	4 M	3,5 M	7	75	2/2 mM	SDS, Merkaptoetano 1, Tween 80, PMSF, Mg+2, Hg+2, Sodyum deoksikolat, EDTA, üre	Triton X- 100	Metil Red, Reaktif Black B



Çizelge 5.1 ve 5.2'den de görüldüğü üzere haloarkeal suşlara ait NAD(P)H bağımlı azo redüktazlar, ekstrem tuz konsantrasyonları, nötral pH ve yüksek sıcaklık derecelerinde aktivite göstermektedir. Ayrıca enzimler farklı bakteri kaynaklı azo redüktazları inhibe eden  $Hg^{+2}$  dahil olmak üzere çok sayıda olası inhibitör özellikli organik maddelere karşı dirençlidir.

Halofilik arkeler düşük su aktivitesine sahip ve yüksek iyonik şiddete aktivite gösteren enzimleri nedeniyle biyoteknolojik yönden büyük ilgi çekmektedir. Bu nedenle azo boya renk giderim çalışmalarında halofilik arke azoredüktazları ve hücrelerinin kullanılmasının büyük avantaj sağlayacağı açıktır. Halofilik organizmalar ve özellikle ekstrem halofilik arkeler yüksek oranda tuz içeren boyalı endüstriyel atıklardaki boyar maddelerin redüksiyonunu sağlayacak azoredüktaz kaynağı olma yönünden büyük potansiyele sahiptirler. Bunlara rağmen ekstrem halofilik arke azoredüktazları ve azo boya giderimi ile ilgili çalışmanın yapılmadığı görülmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile ilk kez halofilik arkelerde azoredüktaz enzim aktivitesi belirlenmiş olup, NAD(P)H bağımlı haloarkeal azoredüktazların yüksek tuz (NaCl/KCl) konsantrasyonlarında ve yüksek sıcaklık derecelerinde aktivite gösterdikleri ortaya konmuştur. Çalışma kapsamında ham haldeki enzim ekstraktlarından haloarkeal azoredüktazların biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak büyük biyoteknolojik potansiyele sahip ekstrem enzimlerin daha detaylı karakterize edilebilmeleri için saflaştırılmaları önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abraham, K.J., John,G.H., 2007. Development of a classification scheme using a secondary ant teriary amino acid analysis of azoreductase gene. **J. Med. Biol. Sci.**, 1: 1-5.
- Acikgoz, E., Ozcan, B., 2016. Phenol biodegradation by halophilic archaea. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 107: 140-146.
- Agrawal, S., Tipre, D., Patel, B., Dave, S., 2014. Optimization of triazo Acid Black 210 dye degradation by *Providencia* sp. SRS82 and elucidation of degradation pathway. **Process Biochemistry**, 49: 110-119.
- Anonymous. 2019. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Eriřim: Temmuz 2019.
- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Sarbolouki, M.N., Dstgheib, S.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. **Bioresour. Technol.**, 98: 2082-2088.
- Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., 1996. Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A review. **Bioresour. Technol.**, 58: 217.
- Bin, Y., Jiti, Z., Jing, W., Cuihong, D., Hongman, H., Zhiyong, S., Yongming, B., 2004. Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737. **FEMS Microbiol Lett**, 236: 129-136.
- Blumel, S., Mark, B., Busse, H.J., Kampfer, P., Stolz, A., 2001. *Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 1867-1871.
- Blumel, S., Stolz, A., 2003. Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 62: 186-190.
- Bonete, M.J., and Martinez-Espinosa, R.M., 2011. Enzymes from halophilic archaea: open questions. **Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends**, 359-371.
- Bürger, S., Stolz, A., 2010. Characterization of the flavin-free oxygen-tolerant azoreductase from *Xenophilis azovorans* KF46F in comparison to flavin-containing azoreductase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 87: 2067-2076.
- Cao, X., Di, M., Wang, J., 2017. Expansion of the active site of the azoreductase from *Shewanella oneidensis* MR-1. **J. Mol. Graph. Model**, 78: 213-220.
- Castillo-Carvajal, L., Sanz-Martin, J., Barragan-Huerta, B., 2014. Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 21: 9578-9588.
- Chang, J.S. and Kuo T.S., 2000. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. **Bioresour. Technol.**, 75: 107-111.

- Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J., Hwang, S.C.J., 2003. Decolorization of the textile azo dyes by newly isolated bacterial strains. **J. Biotechnol.**, 101: 57-68.
- Chen, H., Wang, R.F., Cerniglia, C.E., 2004. Molecular cloning, overexpression, purification and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. **Protein Expr. Purif.**, 34: 302-310.
- Chen, H., Hopper, S.L., Cerniglia, C.E., 2005. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus* a tetrameric NADH dependent flavoprotein. **Microbiology**, 151: 1433-1441.
- Chen, H., 2006. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. **Curr. Protein Peptide Sci.**, 7: 101-111.
- Chen, H., Feng, J., Kweon, O., Xu, H., Cerniglia, C.E., 2010. Identification and molecular characterization of a novel flavin-free NADPH preferred azoreductase encoded by *azoB* in *Pigmentiphaga kullae* K24. **BMC Biochemistry**, 11: 13.
- Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wang, C., Zhao, M., 2012. Purification and characterization of an azoreductase from *Escherichia coli* CD-2 possessing quinone reductase activity. **Process Biochemistry**, 47: 544-549.
- Dave, S.R., Dave, R.H., 2009. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* for acid red 119 dye decolourisation. **Bioresour Technol**, 100: 249-53.
- Danson, M., Hough, D.W., 1997. The structural basis of protein halophilicity. **Comp. Biochem. Physiol.**, 117A (3): 307-312.
- D'Souza, S.E., Altekar, W., D'Souza, S.F., 1997. Immobilization of *Haloferax mediterranei* aldolase by cross-linking in a proteinic matrix: stability and halophilic characteristics. **World J. Microbiol. biotechnol.**, 13: 56-564.
- Eslami, M., Amoozegar, M.A., Asad, S., 2016. Isolation, cloning and characterization of an azoreductase from the halophilic bacterium *Halomonas elongata*. **Int. J. Biol. Macromol.**, 85: 111-116.
- Feng, J., Cerniglia, C.E., Chen, H., 2012. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Front Biosci**, 1: 568-586.
- Forgacs, E., Cserháti, T., Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, 30: 953-971
- Fu, W., Oriel P., 1998. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax sp.* D1227. **Extremophiles**, 2: 439-436.
- Guadie, A., Gessesse, A., Xia, S., 2018. *Halomonas sp.* Strain A55, a novel dye decolorizing bacterium from dye-uncontaminated Rift Valley soda lake. **Chemosphere**, 206: 59-69.

- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Salah Uddin, M., 2008. Anovel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. **Biodegradation**, 19: 15-19.
- Guo, G., Fang, T., Wang, C., Huang, Y., Tian, F., Cui, Q., Wang, H., 2015. Isolation and characterization of two novel halotolerant catechol 2, 3-dioxygenases from a halophilic bacterial consortium. **Sci. Rep.** 5: 17603.
- Guo, G., Tian, F., Zhang, C., Liu, T., Yang, F., Hu, Z., Liu, C., Wang, S., Ding, K., 2019. Performance of a newly enriched bacterial consortium for degrading and detoxifying azo dyes. **Water Sci. Technol.**, 79 (11): 2036-2045.
- He, H., Chen, Y., Li, X., Cheng, Y., Yang, C., Zeng, G., 2017. Influence of salinity on microorganism in activated sludge processes: a review. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 119: 520-527.
- Imran, M., Negm, F., Hussain, S., Ashraf, M., Ahmad, Z., Arshad, M., Crowley, D.E., 2016a. Characterization and purification of membrane-bound azoreductase from azo dye degrading *Shewanella* sp. strain IFN4. **CSAWAC**, 44 (11): 1429-1598.
- Imran, M., Arshad, M., Negmd, F., Khalid, A., Shaharoon, B., Hussain, S., Nadeem, S.M., Crowley, D.E., 2016b. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. strain IFN4. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124: 42-49.
- Kaidehi, M.S.H., Amoozegar, M.A., Asad, S., Siroosi, M., 2018. Exploring the potential of halophilic archaea for the decolorization of azo dyes. **Water Science & Technology**, vol. 77 (6): 1602-1611.
- Khalid, A., Arshad, M., Crowley, D. E., 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions. **Appl.Microbiol.Biotechnol.**, 79: 1053-1059.
- Khan, J.A., 2011. Azo dye biodegradation by azoreductase from *Bacillus megaterium*. **Advanced. Biotech.**, 10: 21-27.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S. and Jadhav, J.P., 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1.J. **Hazard. Meter.**, 163: 735-742.
- Lang, W., Sirisansaneeyakul, S., Ngiwsara, L., Mendes, S., Martins, L.O., Okuyama, M., Kimura, A., 2013. Characterization of a new oxygen-insensitive azoreductase from *Brevibacillus laterosporus* TISTR1911: toward dye decolorization using a packed-bed metal affinity reactor. **Bioresour. Technol.**, 150: 298-306.
- Liu, Z., Chen, H., Shaw, N., Hopper, S.L., Chen, L., Chen, S., Cerniglia, C.E., Wang, B., 2007. Crystal structure of an aerobic FMN-dependent azoreductase (AzoA) from *Enterococcus faecalis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 463: 68-77.

- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaca-Paulo, A., and Gübitz, M.G., 2004. A new alkali thermostabil azoreductase from *Bacillus sp.* strain SF. **App. Environ. Microbiol.**, 70: 837-844.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 3127-3133.
- Matsumoto, K., Mukai, Y., Ogata, D., Shozui, F., Nduko, J.M., Taguchi, S., Ooi, T., 2010. Characterization of thermostable FMN-depnt NADH azoreductase from the moderate thermophilw *Geobacillus stearothermophilus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 86: 1431-1438.
- Mendes, S., Pereira, L., Batista, C., Martins, L.O., 2011. Molecular determinants of azo reduction activitiy in the strain *Pseudomonas putida* MET94. **Appl Microbiol Biotechnol**, 92: 393-405.
- Misal, S.A., Lingojar, D.P., Shinde, R.M., Gawai, K.R., 2011. Purification and characterization of azoreductase from alkaliphilic strain *Bacillus badius*. **Process Bichemistry**, 46: 1264-1269.
- Misal, S.A., Humne, V.T., Lokhande, P.D., Gawai ,K.R., 2015. Biotransformation of nitro aromatic compounds by flavin-free NADH-azoreductase. **J. Bioremed. Biodeg.** 6: 2-6.
- Misal, S.A., Gawai, K.R., 2018. Azoreductase: a key player of xenobiotic metabolism. **Bioresour. Bioprocess.**, 5: 17.
- Morrison, J.M., Wright, C.M., John, G.H., 2012. Identification, isolation and characterization of a novel azoreductase from *Clostridium perfringens*. **Anaerobe** 18: 229-234.
- Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Dzayri, F.Z., Talbi, M., Lee, K., Blaghen, M., 2003. Purification and partial characterization of azoreductase of *Enterobacter agglomerans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, 413: 139-146.
- Nachiyar, C.V. and Rajakumar, G.S., 2004. Purification and characterization of an oxygen insensitive azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 503–509.
- Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N., Kitade, Y. 2001. Putative ACP phophodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. **J. Biol. Chem.**, 276: 46394-46399.
- Nakhaee, N., Asad, S., Khajeh, K., Arab, S.S., Amoozegar, M.A., 2018. Improving the thermal stability of azoreductase from *Halomonas elongata* by introducing a disulfide bond via site-directed mutagenesis. **Biotechnol Appl Biochem.**, 65(6): 883-891.

- Nikhil, B.S., Dimple V.R., Nishant, J.S., 2012. Decolorization, degradation and azoreductase study by bacterial transformation of reactive red HE8b. **International Journal of Research in BioSciences**, 1(1): 29-41.
- Ogugbue, C.J., Morad, N., Sawidis, T., Oranusi, N.A., 2012. Decolorization and partial mineralization of a polyazo dye by *Bacillus firmus* immobilized within tubular polymeric gel. **Biotech.**, 2: 67-68.
- Oren, A., Mana, L., 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. **Extremophiles**, 6: 217–223.
- Ortega, G., Láin, A., Tadeo, X., López-Méndez, B., Castaño, D., Millet, O., 2011. Halophilic enzyme activation induced by salts. **Sci. Rep.**, 1: 6.
- Oturkar, C.C., Othman, M.A., Kulkarni, M., Madamwar, D., Gawai, K.R., 2013. Synergistic action of flavin containing NADH dependent azoreductase and cytochrome P450 monooxygenase in azoaromatic mineralization. **RSC adv**, 3: 3062-3070.
- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., Cokmus, C., 2007. Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17(6): 985-992.
- Ozcan, B., Özyılmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 36: 105-110.
- Ozdemir, G., Pazarbasi, B., Kocyigit, A., Omeroglu, E.E., Yasa I., Karaboz I., 2008. Decolorization of Acid Black 210 by *Vibrio harveyi* TEMS1, a newly isolated bioluminescent bacterium from Izmir Bay, Turkey. **World J Microbiol Biotechnol**, 24: 1375–81
- Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes- a Review. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 59: 73-84.
- Parshetti, G.K., Telke, A.A., Kalyani, D.C, Govindwar, S.P., 2010. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. **Journal of Hazardous Materials**, 17: 503-509.
- Popli, S., Patel, U.D., 2015. Destruction of azo dyes by anaerobic-aerobic sequential biological treatment: a review. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, 12: 405-420.
- Rai, H.M., Bhattacharya, J., Singh, T.K., Bansal, P.V., Banerjee, C., 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry a review of emerging techniques with reference to biological treatment. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, 35: 219-238.
- Rathod, J., Dhebar, S., Archana, G., 2017. Efficient approach to enhance whole cell azo dye decolorization by heterologous overexpression of *Enterococcus* sp. L2

- azoreductase (azoA) and Mycobacterium vaccae formate dehydrogenase (fdh) in different bacterial systems. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 124: 91-100.
- Roopa, K.B. and Usha, M., 2017. Partial Purification and Assay of Azoreductase and Laccase in the Degradation of Reactive Black 5 Dye from *Aeromonas Punctata*. S. **International Journal of Latest Research in Engineering and Technology**, 3(7): 16-19.
- Ryan, A., Laurieril, N., Westwood, I., Wang, C., Lowe, E., Sim, E., 2010. A Novel Mechanism for Azoreduction. **J. Mol. Biol.**, 400: 24-37.
- Sahasrabudhe, M.M, Saratale, R.G., Saratale, G.D., Pathade, G.R., 2014. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye C.I. Direct Red 81 by *Enterococcus faecalis* YZ 66. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, 12: 151.
- Saranraj, P., Stella, D., Sivasakthivelan, P., 2004. Separation, purification and characterization of dye degrading enzyme azoreductase from bacterial isolates. **Central European Journal of Experimental Biology**, 3 (2): 19-25.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P., 2009. Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. **Bioresource Technology**, 17: 3897-3905.
- Shah, M.P., 2014. Eco-Friendly Treatment of Acid Red by an Application of *Pseudomonas spp.* **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, Vol. 2, No. 2: 62-68.
- Shand, R.F., Perez, A.M., 1999. Haloarcheal Growth Phsiology. **Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments**, 411-424.
- Sharma, A.K., Singh, I., 2008. Spectrophotometric trace determination of Iron in food, milk and tea samples using a new bis-azo dye as analytical reagent. **Food Anal. Methods**, 2: 221-225.
- Singh, R.L., Singh, P.K., Singh, R.P., 2015. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – a review. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 104: 31-31.
- Song, Z.Y., Zhou, J.T., Wang, J., Yanm. B., Du, C.H., 2003. Decolorization of azo dyes by rhodobacter sphaeroides. **Biotechnol. Lett.**, 25: 1815-1818.
- Stolz, A., 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Appl. Microbol. Biotechnol.**, 59: 69-80.
- Suzuki, H., 2019. Remarkable diversification of bacteria azoreductases: primary sequences, structures, substrates, physiological roles, and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103: 3965-3968.
- Tamboli, D.P., Kurade, M.B., Waghmode, T.R., Joshi, S.M., Govindwar, S.P., 2010. Exploring the ability of *Sphingobacterium* sp. ATM to degrade textile dye

- Direct Blue GLL, mixture of dyes and textile effluent and production of polyhydroxyhexadecanoic acid using waste biomass generated after dye degradation. **Journal of Hazardous Materials**, 182: 169-176.
- Tian, F., Guo, G., Zhang, C., Yang, F., Hua, Z., Liu, C., Wang, S., 2019. Isolation, cloning and characterization of an azoreductase the effect of salinity on its expression in a halophilic bacterium. **Int. Journal of Biological Macromolecules**, 123: 1062-1069.
- Qi, J., Paulb, C.E., Hollmannb, F., Tischlera, D., 2017. Changing the electron donor improves azoreductase dye degrading activity at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, 100: 17–19
- Qui, J., Schlömann, M., Tischler, D., 2016. Biochemical characterization of an azoreductase from *Rhodococcus opacus* 1CP possessing methyl red degradation ability. **J. Mol. Catal. B enzym**, 130: 9-17.
- Yan, B., Du, C., Xu, M., Liao, W., 2012. Decolorization of azo dyes by a salt-tolerant *Staphylococcus cohnii* strain isolated from textile wastewater. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, 6: 804-814.
- Verma, K., Saha, G., Kundu, L.M., Dubey, V.K., 2019. Biochemical characterization of a stable azoreductase enzyme from *Chromobacterium violaceum*: Application in industrial effluent dye degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 121: 1011-1018.
- Zhang, F., Yediler, A., Liang, X., and Kettrup, A., 2004. Effect of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products a comparative study using hydrolysed CI reactive red 120. **Dyes pigments**, 60: 1-7.
- Zimmerman, T., Kulla, H.G., Leisinger, T., 1982. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. **Eur. J. Biochem.**, 129: 197-203.



## ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1989 yılında Hatay'da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Hatay'da tamamladı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Hatay Mustafa Kemaş Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında 2013 yılında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

