

PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF TWO EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM RAW HIDE AND INVESTIGATION OF THEIR LIPOLYTIC ACTIVITIES

IDENTIFICAREA FILOGENETICĂ A DOUĂ ARCHAEE EXTREM HALOFILE IZOLATE DIN PIEI CRUDE ȘI INVESTIGAREA ACTIVITĂȚILOR LIPOLITICE ALE ACESTORA

Gözde TURHAN BİLGİ¹, Binnur MERİÇLİ YAPICI^{2*}, Sadi Turgut BİLGİ³

¹Biology Department, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Canakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, gzdtrhn@hotmail.com

²Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, byapici@comu.edu.tr

³Department of Midwifery, School of Health, Canakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, stbilgi@comu.edu.tr

PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF TWO EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM RAW HIDE AND INVESTIGATION OF THEIR LIPOLYTIC ACTIVITIES

ABSTRACT. This research serves two different purposes. Primarily, two extremely halophilic archaeons were isolated from salted raw hide samples and were phylogenetically identified by 16S rRNA sequence analyses. It was determined that isolate 1 shared similarities with *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 with *Haloarchaeon* 129. These results were substantiated by some phenotypic analyses. Both strains displayed Gram-negative reactions and they were susceptible to the antibiotics bacitracin and novobiocin. It was qualitatively determined that they have lipolytic activity. Secondly, esterase and lipase enzyme activity conditions of the two archaea were also determined in the current study to evaluate industrial applicability of these enzymes. For the identification of quantitative esterase and lipase activities of both strains, p-nitrophenyl butyrate and p-nitrophenyl laurate substrates were used, respectively, and their activities were measured on a daily basis. After the quantitative and qualitative determination of esterase and lipase activities, esterase and lipase activities were determined at different temperatures (4-60°C), pH levels (4-11pH) and in NaCl concentrations (0-5.5M). According to daily enzyme activity results, the highest esterase and lipase values for isolate 1 were found to be 4 U/ml and 1 U/ml, respectively, on the 4th day and for isolate 2 to be 2.7 U/ml and 1.9 U/ml, respectively, on the 3rd day. Furthermore, the maximum esterase activity for isolate 1 was elicited at 35°C, pH 8 and in 2.5 M NaCl, and for isolate 2 at 35°C, pH 7 and in 3 M NaCl. Moreover, the maximum lipase activity for isolate 1 was explored at 40°C, pH 7.0 and 2.0-3.5 M NaCl, and for isolate 2 at 35°C, pH 7.5 and in 2 M NaCl. Optimal conditions for both extreme halophilic Archaea was determined as the data may be considered for the production of industrial enzymes. Therefore, this research is an exemplary study as well as a small-scaled survey which includes the two goals mentioned above and only focuses on two archaea on salted raw hides.

KEY WORDS: salted hides, halophilic archaea, halophilic esterase, halophilic lipase

IDENTIFICAREA FILOGENETICĂ A DOUĂ ARCHAEE EXTREM HALOFILE IZOLATE DIN PIEI CRUDE ȘI INVESTIGAREA ACTIVITĂȚILOR LIPOLITICE ALE ACESTORA

REZUMAT. Acest studiu de cercetare are două scopuri distincte. În primul rând, două Archaea extrem halofile au fost izolate din probe de piele crudă și au fost identificate filogenetic prin analize de secvență ARNr 16S. S-a determinat faptul că izolatul 1 are similitudini cu tulpina *Halomicrobium zhouii* 144, iar izolatul 2 cu tulpina *Haloarchaeon* 129. Aceste rezultate au fost confirmate prin câteva analize fenotipice. Ambele tulpini au prezentat reacții Gram-negative și au fost sensibile la bacitracină și novobiocină. S-a determinat calitativ faptul că au activitate lipolitică. În al doilea rând, condițiile de activitate a esterazei și lipazei la cele două Archaea au fost determinate în studiul de față pentru a evalua aplicabilitatea industrială a acestor enzime. Pentru identificarea activităților cantitative ale esterazei și lipazei la ambele tulpini, s-au utilizat substraturii pe bază de p-nitrofenil butiric, respectiv p-nitrofenil laurat, iar activitățile acestora au fost măsurate zilnic. După determinarea cantitativă și calitativă a activităților esterazei și lipazei, s-au observat activitățile esterazei și lipazei la diferite temperaturi (4-60°C), nivel de pH (4-11) și concentrații de NaCl (0-5,5 M). Conform rezultatelor activității zilnice ale enzimelor, cele mai mari valori ale esterazei și lipazei pentru izolatul 1 s-au dovedit a fi de 4 U/ml, respectiv 1 U/ml, în cea de-a patra zi, iar pentru izolatul 2 valorile au fost de 2,7 U/ml, respectiv 1,9 U/ml, în cea de-a treia zi. Mai mult, activitatea maximă a esterazei pentru izolatul 1 a avut loc la 35°C, pH 8 și 2,5 M NaCl, iar pentru izolatul 2, la 35°C, pH 7 și 3 M NaCl. Activitatea maximă a lipazei pentru izolatul 1 a avut loc la 40°C, pH 7,0 și 2,0-3,5 M NaCl, iar pentru izolatul 2, la 35°C, pH 7,5 și 2 M NaCl. S-au determinat condițiile optime pentru ambele Archaea extrem halofile pentru ca datele să poată fi luate în considerare pentru producția de enzime industriale. Prin urmare, această cercetare este un studiu exemplar cu domeniu de aplicare restrâns, care include cele două obiective menționate mai sus și se concentrează doar pe două Archaea izolate din piei brute sărate.

CUVINTE CHEIE: piei sărate, Archaea halofile, esterază halofilă, lipază halofilă

L'IDENTIFICATION PHYLOGÉNÉTIQUE DE DEUX ARCHÉES EXTRÊMEMENT HALOPHILES ISOLÉES DE LA PEAU ET L'INVESTIGATION SUR LEURS ACTIVITÉS LIPOLYTIQUES

RÉSUMÉ. Cette recherche a deux objectifs différents. Principalement, deux archées extrêmement halophiles ont été isolées d'échantillons salés de peau crue et ont été identifiées phylogénétiquement par des analyses de séquences d'ARNr 16S. On a été déterminé que l'isolat 1 partageait des similitudes avec la souche *Halomicrobium zhouii* 144 et l'isolat 2 avec la souche *Haloarchaeon* 129. Ces résultats ont été confirmés par certaines analyses phénotypiques. Les deux souches ont présenté des réactions Gram-négatives et ont été sensibles aux antibiotiques bacitracine et novobiocine. On a déterminé qualitativement qu'ils ont une activité lipolytique. Deuxièmement, les conditions d'activité enzymatique de l'estérase et de la lipase des deux archées ont également été déterminées dans l'étude actuelle pour évaluer l'applicabilité industrielle de ces enzymes. Pour l'identification des activités quantitatives de l'estérase et de la lipase des deux souches,

* Correspondence to: Binnur MERİÇLİ YAPICI, Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, byapici@comu.edu.tr

on a utilisé des substrats de p-nitrophényl butyrate et respectivement de p-nitrophényl laurate et leurs activités ont été mesurées quotidiennement. Après la détermination quantitative et qualitative des activités de l'estérase et de la lipase, on a observé les activités de l'estérase et de la lipase à différentes températures (4-60°C), pH (4-11) et concentration de NaCl (0-5,5 M). Selon les résultats quotidiens de l'activité enzymatique, on a trouvé que les valeurs les plus élevées d'estérase et de lipase pour l'isolât 1 ont été 4 U/ml et 1 U/ml, respectivement, le 4ème jour et pour l'isolât 2 les valeurs ont été 2,7 U/ml et respectivement 1,9 U/ml, le 3ème jour. De plus, l'activité estérase maximale pour l'isolât 1 a été provoquée à 35°C, pH 8 et 2,5 M NaCl, et pour l'isolât 2, à 35°C, pH 7 et 3 M NaCl. L'activité lipase maximale pour l'isolât 1 a été explorée à 40°C, pH 7,0 et 2,0-3,5 M NaCl, et pour l'isolât 2, à 35°C, pH 7,5 et 2 M NaCl. Les conditions optimales pour les deux archées extrêmement halophiles ont été déterminées car les données peuvent être considérées pour la production d'enzymes industrielles. Par conséquent, cette recherche est une étude exemplaire ainsi qu'une enquête à petite échelle qui comprend les deux objectifs mentionnés ci-dessus et se concentre uniquement sur deux archées sur les peaux crues salées.

MOTS CLÉS: peaux salées, archées halophile, esterase halophile, lipase halophile

INTRODUCTION

The primary raw materials of the leather industry are hides and skins [1]. Autolytic destruction starts after 5-6 hours following the flaying if they are not well protected [2-6]. Therefore, raw hides or skins should be conserved with salt before transferred to tannery for processing [7-9]. Although this method limits the microbial growth, it does not provide sufficient protection [10, 11]. Halophiles, which need a high amount of salt concentration to live in and have developed different strategies with this property to survive in salt-loving environment, are members of a large group and have representatives in all three domains known as Bacteria, Archaea and Eukaryotes [12]. Halophiles were classified by Kushner [13] according to their need for optimal amount of NaCl.

In leather industry, microbiological research is scarce. Most studies are related to bacteria and fungi. But in recent years, attention is drawn to the presence of Archaea in raw hides. Different types of halophilic archaea with hydrolytic activity have been identified on salted raw hides and skins. For example, in the study by Bilgi *et al.* [14], 186 extremely halophilic archaea, which need 15% or higher salt were shown to exhibit proteolytic (107 strains) and lipolytic (70 strains) activity, were isolated from salted skins or hides.

Furthermore, industrial enzymes are usually obtained from microorganisms. The comparison between microbial enzymes and other enzymes originating from plants or animals revealed that microbial enzymes have high catalytic activities, do not generate undesirable by-products, are more stable and inexpensive, and can be obtained in large quantities [15]. Many studies in the field related to industrial enzymes of biotechnology are being

INTRODUCERE

Principala materie primă a industriei de pielărie este pielea de origine animală [1]. Distrugerea autolitică a acesteia începe după 5-6 ore de la jupuire în cazul în care pieile nu sunt bine protejate [2-6]. Prin urmare, pieile crude necesită conservare cu sare înainte de a fi transferate la tăbăcărie pentru prelucrare [7-9]. Această metodă limitează creșterea microbiană, însă nu oferă o protecție suficientă [10, 11]. Halofilele, care au nevoie de o cantitate mare de sare pentru a supraviețui și au dezvoltat diferite strategii pe baza acestei proprietăți pentru a supraviețui într-un mediu sărat, fac parte dintr-o grupă mare și au reprezentanți în toate cele trei domenii cunoscute sub numele de *Bacteria*, *Archaea* și *Eucaria* [12]. Halofilele au fost clasificate de către Kushner [13] în funcție de nevoia lor de cantitate optimă de NaCl.

În industria de pielărie, cercetarea microbiologică este limitată. Cele mai multe dintre studii se concentrează pe bacterii și fungi. Însă în ultimii ani, atenția s-a îndreptat asupra prezenței Archaea pe piei brute. Diferite tipuri de Archaea halofile cu activitate hidrolitică au fost identificate pe piei brute sărate. De exemplu, în studiul efectuat de Bilgi și colab. [14], s-a dovedit că 186 Archaea extrem halofile, care au nevoie de sare în concentrație de 15% sau mai mult, prezintă activitate proteolitică (107 tulpini) și lipolitică (70 tulpini) și au fost izolate din piei sărate.

De asemenea, enzimele industriale sunt de obicei obținute din microorganisme. Compararea dintre enzimele microbiene și alte enzime de origine vegetală sau animală a arătat că enzimele microbiene au activități catalitice ridicate, nu generează produse secundare indezirabile, sunt mai stabile și ieftine și pot fi obținute în cantități mari [15]. Multor studii referitoare la enzimele industriale din domeniul biotehnologiei li se

attached more importance due to the gradual development of enzyme technology, diversified usages and very high economic value of the products. Lipases are widely used in fields such as clinical biotechnology, detergent industry, biodiesel production, taste and flavor industry and food industry. Lipase enzyme can also be used in the leather industry to prepare pelts for processes such as tanning and dyeing by removing skin fats [16]. In literature, there is little research on the examination of lipase from extremely halophilic archaea on the leather. Therefore, investigation of the lipase enzyme obtained from different microorganisms such as archaea and determination of the activity conditions are of great importance.

Leather processing steps are home to a wide variety of microorganisms classified into the three domains of life such as Bacteria, Archaea and Eukaryotes. Therefore, identification of the microbial diversity and their products in these environments can make significant contributions to the humanity, which cannot be predicted in advance.

In this study, only two of the Extremely Halophilic Archaea, which have lipolytic activity and are able to survive on salted raw hides were phylogenetically identified by 16S rRNA gene sequence analyses. Additionally, lipolytic activities of archaea were investigated in different environmental conditions such as temperature, pH value and salt content.

MATERIAL AND METHODS

Two lipolytic halophilic Archaea isolates which were previously isolated from salted raw hides were used in the present research. SW 25 medium was used for culture isolation, activation and phenotypic tests. This medium was composed of 833.4 ml/l SW 30 solution, 5 g/l yeast extract, and 20 g/l agar. SW 30 solution contains 234 g/l NaCl, 39 g/l MgCl₂, 61 g/l MgSO₄, 1 g/l CaCl₂, 6 g/l KCl, 0.25 g/l NaHCO₃, and 0.7 g/l NaBr. Media were adjusted to pH 7.5 with 1N NaOH [17]. Dussault [18] Gram staining was performed for determination of Gram reactions and of cell morphology of the isolates. To test antibiotic susceptibilities of the isolates, disc diffusion method was applied and antibiotics such as Ampicillin 10 µg (A 10), Bacitracin 10 µg (B 10), Erythromycin 15 µg (E 15), Novobiosin 30 µg

acordă o importanță mai mare datorită dezvoltării treptate a tehnologiei enzimatică, utilizărilor diversificate și valorii economice foarte ridicate a produselor. Lipazele sunt utilizate pe scară largă în domenii cum ar fi biotehnologia clinică, industria detergenților, producția de biodiesel, industria aromelor și industria alimentară. Lipaza poate fi, de asemenea, utilizată în industria de pielărie la pregătirea pieilor gelatină pentru procese precum tăbăcirea și vopsirea prin îndepărtarea grăsimilor pielii [16]. În literatura de specialitate, există puține cercetări privind examinarea lipazei din Archaea extrem halofile din piele. Prin urmare, investigarea lipazei obținute din diferite microorganisme, cum ar fi Archaea, și determinarea condițiilor de activitate ale acesteia sunt foarte importante.

Etapile de prelucrare a pielii favorizează apariția unei mari varietăți de microorganisme clasificate în cele trei domenii ale vieții, și anume *Bacteria*, *Archaea* și *Eucaria*. Prin urmare, identificarea diversității microbiene și a produselor rezultate în aceste medii poate aduce contribuții semnificative umanității, care nu pot fi prezise în avans.

În acest studiu s-au identificat filogenetic prin analize de secvență a genei ARNr 16S doar două dintre Archaea extrem halofile, care au activitate lipolitică și sunt capabile să supraviețuiască pe pieile crude sărate. În plus, activitățile lipolitice ale Archaea au fost investigate în diferite condiții de mediu, cum ar fi temperatura, valoarea pH-ului și conținutul de sare.

MATERIAL ȘI METODE

În cadrul prezentei cercetări s-au utilizat două izolate Archaea halofile lipolitice care au fost izolate anterior din piei brute sărate. Mediul SW 25 a fost utilizat pentru testele de izolare a culturii, de activare și fenotipice. Acest mediu a fost compus din 833,4 ml/l SW 30 soluție, 5 g/l extract de drojdie și 20 g/l agar. Soluția SW 30 conține 234 g/l NaCl, 39 g/l MgCl₂, 61 g/l MgSO₄, 1 g/l CaCl₂, 6 g/l KCl, 0,25 g/l NaHCO₃, și 0,7 g/l NaBr. S-a ajustat pH-ul mediilor la 7,5 cu NaOH 1N [17]. S-a efectuat colorația Gram Dussault [18] pentru a determina reacțiile Gram și morfologia celulară a izolatelor. Pentru a testa sensibilitatea izolatelor la antibiotice, s-a aplicat metoda de difuziune a discurilor și s-au utilizat

(NV 30), Penicillin G 10 U (P 10), Streptomycin 10 µg (S 10), Tetracycline 30 µg (T 30), Vancomycin 30 µg (VAN 30), Chloramphenicol 30 µg (C 30), and Cefotaxime 30 µg (CTX 30) were used [19-21].

The genomic DNA isolation of two Archaea isolates was performed by using the modified version of the Dyll-Smith [22] method and Geneon® Bacterial DNA isolation kit. For Genomic DNA isolation, 1.5 ml of the culture samples ($OD_{600} \sim 1$) grown in SW-25 liquid medium was transferred into sterile microcentrifuge tubes and centrifuged at +4°C at 10.000xg for 10 min. After removing the supernatants of the samples, 400 µl of sterile cold ultra-pure water was added in the tubes and the resultant mixture was shaken for a short time to disintegrate the cells. Samples were centrifuged at +4°C, 10.000xg for 3 min to remove supernatants, and genomic DNA isolation was performed in line with the instructions of the commercial kit. 0.8% agarose gel (80 V, 100 mA, 1 hour) was prepared with 1X TAE for control and Syber® Green I and 6X gel loading dye was used to load the samples onto the gel.

The distinction between Archaea and Bacteria was made by 16S rRNA molecular Polymerase Chain Reaction (PCR) with used bac27f/bac1492r and arc7f/arc1384r primers [23, 24]. For the configuration of Polymerase Chain Reaction (PCR), Geneon® Maximo TaqDNA Polymerase kit was used. This PCR program consisted of 30 repetitive cycles with a strand separation step at 94°C for 45s, an annealing step at 53°C of 45s, and an elongation step for 1m at 72°C. PCR samples were made to move forward on 1.7% agarose gel to check. *Haloferax sp.* HSC4 was used for Archaea and *Salinibacter ruber* for Bacteria for a positive control. Chromatograms of the sequence analyses were viewed and edited via Chromas®. Forward and reverse sequences were aligned on the NCBI's (National Center of Biotechnology Information) website, and then 16S rRNA gene sequences were obtained by removing the shared parts. These sequences were analyzed by using nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> and compared with existing 16S rRNA sequences in the GenBank database.

antibiotice cum ar fi: ampicilină 10 µg (A 10), bacitracină 10 µg (B 10), eritromicină 15 µg (E 15), novobiocină 30 µg (NV 30), penicilină G 10 U (P 10), streptomycină 10 µg (S 10), tetraciclină 30 µg (T 30), vancomicină 30 µg (VAN 30), cloramfenicol 30 µg (C 30), cefotaxim 30 µg (CTX 30) [19-21].

S-a izolat ADN-ul genomic din două izolate Archaea utilizând versiunea modificată a metodei Dyll-Smith [22] și kitul de izolare a ADN-ului bacterian Geneon®. Pentru izolarea ADN-ului genomic, s-a transferat 1,5 ml din probele de cultură ($OD_{600} \sim 1$) cultivate în mediu lichid SW-25 în tuburi de microcentrifugare sterile și s-au centrifugat la +4°C la 10,000xg timp de 10 min. După îndepărtarea supernatanților probelor, s-au adăugat 400 µl de apă rece sterilă ultra-pură în tuburi, iar amestecul rezultat a fost agitat timp de o perioadă scurtă pentru a dezintegra celulele. Probele au fost centrifugate la +4°C, 10,000xg timp de 3 min, pentru a îndepărta supernatanții, iar izolarea ADN-ului genomic a fost realizată în conformitate cu instrucțiunile kitului comercial. S-a preparat 0,8% gel de agaroză (80 V, 100 mA, 1 oră), având ca martor 1X TAE, folosind Syber® Green I și 6X colorant de încărcare în gel pentru a încărca probele pe gel.

Distincția dintre Archaea și bacterii s-a realizat prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) moleculară a ARNr 16S cu primeri bac27f/bac1492r și arc7f/arc1384r [23, 24]. Pentru configurarea reacției de polimerizare în lanț (PCR), s-a folosit kitul Geneon® Maximo TaqDNA Polymerase. Acest program PCR a constat din 30 de cicluri repetitive cu o etapă de separare a fibrelor la 94°C timp de 45 s, o etapă de maleabilizare la 53°C timp de 45 s, și o etapă de alungire de 1 m la 72°C. Probele PCR au fost verificate prin migrare în 1,7% gel de agaroză. S-a utilizat *Haloferax sp.* HSC4 ca martor pozitiv pentru Archaea și *Salinibacter ruber* ca martor pozitiv pentru bacterii. Cromatogramele analizelor de secvență au fost vizualizate și editate utilizând programul Chromas®. Secvențele directe și inverse au fost comparate cu cele regăsite pe site-ul NCBI (Centrul Național de Informare în Biotehnologiei), și apoi s-au obținut secvențele genei ARNr 16S prin îndepărtarea părților comune. Aceste secvențe au fost analizate cu ajutorul programului Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponibil la <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> și s-au comparat cu

Esterase test [25-27] and lipase test [28, 26] were applied in screening qualitatively extracellular hydrolytic enzyme. Inoculated isolates were incubated for 7 days at 37°C on SW-25 agar containing 1% Tween 80. Opaque zone observed around the colony was considered as positive esterase activity [25-27]. For lipase activity, inoculated isolates were incubated for 7 days at 37°C on modified rhodamine B lipase agar. After the incubation, plates were examined under 350 nm ultraviolet (UV) light. Bright orange-red colonies were evaluated as positive lipase activity [26, 28, 29].

After the isolates were cultured in SW-25 broth medium at 37°C at 150 rpm, the liquid samples were taken daily. 1% Tween 80 and olive oil were added to medium as inducing agent. The samples were centrifuged at 10.000xg for 10 min and then supernatants were used as the enzyme source. Esterase and lipase activities were measured at 410 nm of UV spectrophotometer using p-Nitrophenyl butyrate (pNPB) and p-nitrophenyl laurate (pNPL), respectively [30]. Both of 10 mM pNPB and pNPL were dissolved in 2-propanol for substrate solution. Buffer solution was prepared in pure water and meanwhile 100 mM Tris HCl, 0.5% Triton X-100, 2 M NaCl at pH 7.5 were added. Substrate mixture was prepared by adding 1 ml substrate solution into 9 ml buffer solution (1:9,v/v) and preheating was carried out at 37°C for 5 minutes. The solution was freshly prepared each time.

Firstly, reactions of esterase and lipase activity were performed with 0.8 ml of pNP substrate mixture and 0.2 ml of enzyme source for 10 min at 37°C. Secondly, 0.5 ml of Na₂CO₃ (0.5 M) was used as reaction stopper and finally the samples were centrifuged at 10.000 x g for 10 min. The same procedure was applied for the blind tube without the enzyme source. The enzyme amount producing 1 µmol p-Nitrophenol per minute under aforementioned reaction conditions was identified as the 1 unit of milliliter (U/ml) enzyme activity [30, 31]. Different temperatures (4-60°C), pH (3.0-12.0 pH) and NaCl (0.5-5M) conditions were modified in reactions to determine their effects on enzyme activities. In acidic reactions, sodium acetate buffer was used instead of Tris HCl buffer.

secvențele ARNr 16S existente din baza de date GenBank.

S-au efectuat testul esterazei [25-27] și testul lipazei [28, 26] pentru selectarea enzimei hidrolitice extracelulare calitative. Izolatele inoculate au fost incubate timp de 7 zile la temperatura de 37°C pe agar SW-25 conținând 1% Tween 80. Zona opacă observată în jurul coloniei a fost considerată activitate pozitivă a esterazei [25-27]. Pentru activitatea lipazei, izolatele inoculate au fost incubate timp de 7 zile la 37°C pe agar modificat cu rodamina B. După incubare, plăcile au fost examinate la lumină ultravioletă (UV) de 350 nm. Coloniile roșu-portocaliu aprins au reprezentat o activitate pozitivă a lipazei [26, 28, 29].

După cultivarea izolatelor în mediu SW-25 la 37°C la 150 rpm, s-au prelevat zilnic probe de lichid. S-au adăugat în mediu 1% Tween 80 și ulei de măsline ca agenți de inducere. Probele au fost centrifugate la 10,000xg timp de 10 minute și apoi s-au utilizat supernatanții ca sursă de enzimă. Activitățile esterazei și lipazei au fost măsurate la 410 nm cu spectrofotometrul UV, utilizând p-nitrofenil butirat (pNPB), respectiv laurat de p-nitrofenil (pNPL) [30]. S-au dizolvat câte 10 mM de pNPB și pNPL în 2-propanol ca soluție substrat. Soluția tampon a fost preparată în apă pură și s-au adăugat 100 mM Tris HCl, 0,5% Triton X-100, 2 M NaCl la pH 7,5. Amestecul de substrat a fost preparat prin adăugarea a 1 ml soluție substrat în 9 ml de soluție tampon (1:9, v/v) și s-a preîncălzit la 37°C timp de 5 minute. Soluția a fost preparată proaspăt de fiecare dată.

În primul rând, reacțiile esterazei și lipazei au fost efectuate cu 0,8 ml amestec de substrat pNP și 0,2 ml sursă de enzimă timp de 10 minute la 37°C. În al doilea rând, s-a utilizat 0,5 ml de Na₂CO₃ (0,5 M) pentru a inhiba reacția și în final, probele au fost centrifugate la 10,000 x g timp de 10 min. S-a aplicat aceeași procedură pentru tubul martor fără sursă de enzimă. Cantitatea de enzimă care produce 1 µmol p-nitrofenol pe minut în condițiile de reacție menționate mai sus a fost identificată ca fiind 1 unitate de mililitru (U/ml) activitate enzimatică [30, 31]. S-au variat temperaturile (4-60°C), pH-ul (3,0-12,0 pH) și NaCl (0,5-5M) în reacții pentru a determina efectele acestor factori asupra activităților enzimatică. În reacțiile acide, s-a utilizat ca tampon acetat de sodiu în loc de Tris HCl.

RESULTS AND DISCUSSION

Gram stain, antibiotic susceptibility testing and 16S rRNA sequence analysis method were applied to isolates. Then, their hydrolytic enzyme activities were determined qualitatively and quantitatively. Esterase and lipase activities of isolates were also determined quantitatively according to qualitative findings. In the meantime, the effects of enzyme amount, temperature, pH and salt variables on esterase and lipase activities were measured spectrophotometrically.

Morphological and Microscopic Characteristics of the Isolates

Both isolates used in the current research were observed with the cream colored colonies on SW 25 agar after 7 days incubation at 37°C. Both of isolates have been found to be rod shape and Gram negative [Gr (-)](Figure 1).

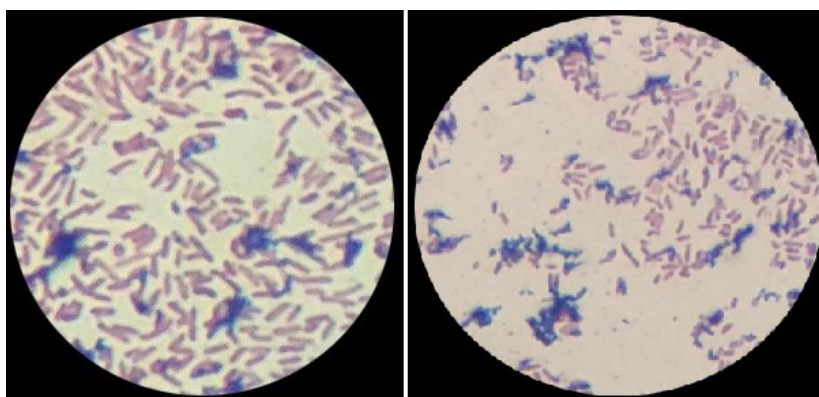


Figure 1. Gram stain images of isolate 1 (left) and isolate 2 (right)
Figura 1. Imagini cu colorație Gram ale izolatului 1 (stânga) și izolatului 2 (dreapta)

Distinction between Bacteria and Archaea

According to the findings of antibiotic susceptibility test, both isolates were sensitive to bacitracin and novobiocin antibiotics, while they were resistant to other antibiotics used in the study. Holmes and Dyall-Smith [32] expressed that most halophilic Archaea are susceptible to novobiocin and bacitracin, which are DNA gyrase inhibitors. Çetinkuş [33] identified the isolated halophilic microorganisms as Archaea or Bacteria via 16S rRNA analysis and found that the isolates were susceptible to bacitracin and novobiocin and resistant to penicillin G. Yıldız *et al.* [34] reported that halophilic Archaea isolates were gram-negative and gram-variable features and were sensitive to novobiocin and bacitracin antibiotics in their study.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au aplicat colorația Gram, testarea sensibilității la antibiotice și metoda de analiză a secvenței ARNr 16S. Apoi s-au determinat calitativ și cantitativ activitățile enzimice hidrolitice. Activitățile esterazei și lipazei din izolate au fost, de asemenea, determinate cantitativ conform constatărilor calitative. Între timp, s-au măsurat spectrofotometric efectele cantității de enzimă, temperaturii, pH-ului și cantității variabile de sare asupra activităților esterazei și lipazei.

Caracteristici morfologice și microscopice ale izolatelor

În cazul ambelor izolate folosite în cercetările de față s-au observat colonii de culoare crem pe agar SW 25 după 7 zile de la incubare la temperatura de 37°C. Ambele izolate au avut formă de tijă și colorație Gram negativă [Gr (-)] (Figura 1).

Distincția dintre Bacteria și Archaea

Conform rezultatelor testului de sensibilitate la antibiotice, ambele izolate au fost sensibile la bacitracină și novobiocină și rezistente la alte antibiotice utilizate în studiu. Holmes și Dyall-Smith [32] au afirmat că majoritatea Archaea halofile sunt sensibile la novobiocină și bacitracină, care sunt inhibitori ai girazei ADN. Çetinkuş [33] a identificat microorganismele halofile izolate ca Archaea sau bacterii prin analiza ARNr 16S și a constatat că tulpinile au prezentat sensibilitate la bacitracină și novobiocină și rezistență la penicilina G. Yıldız și colab. [34] au raportat în studiul lor că izolatele Archaea halofile sunt gram-negative și gram-variable și prezintă sensibilitate la novobiocină și bacitracină.

In this study, the features of isolate 1 and 2 have been found to be similar to the general characteristics of the domain Archaea. The findings of the present and previous studies indicate that the isolates might be Archaea. The results of PCR performed with Archaea and Bacteria primers disclosed that isolate 1 and 2 belong to the Archaea domain (Figure 2).

În acest studiu, caracteristicile izolatelor 1 și 2 s-au dovedit a fi similare cu caracteristicile generale ale domeniului Archaea. Constatările studiilor anterioare și actuale indică faptul că izolatele ar putea face parte din domeniul Archaea. Rezultatele tehnicii PCR efectuate cu primeri Archaea și Bacteria au arătat că izolatele 1 și 2 aparțin domeniului Archaea (Figura 2).

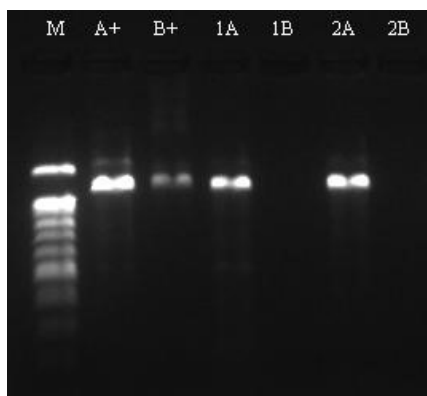


Figure 2. Agarose gel image of PCR products of isolates. M: Marker, A +: Archaea positive control, B +: Bacterial positive control, 1A: isolates 1 with Archaea primers, 1B: isolates 1 with Bacteria Primer, 2A: isolates 2 with Archaea Primer, 2B: isolate 2 with Bacteria Primer

Figura 2. Imaginea obținută cu ajutorul gelului de agaroză a produselor PCR ale izolatelor. M: marker, A+: martor pozitiv Archaea, B+: martor pozitiv bacterian, 1A: izolate 1 cu primeri Archaea, 1B: izolate 1 cu primeri bacterii, 2A: izolate 2 cu primeri Archaea, 2B: izolate 2 cu primeri bacterii

In our study, 16S rRNA sequence analysis method was used for molecular diagnostics of isolate 1 and 2. As a result, it was found that isolate 1 was similar to *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 was similar to *Haloarchaeon* strain 129 according to the gene bank database. 16S rRNA gene sequences of *Halomicrobium zhouii* strain 144 and *Haloarchaeon* strain 129 were determined by Bilgi *et al.* [14]. In their study, *Haloarchaeon* strain 129 was isolated from salted raw hide and cultivated for the first time. Considering first identified regions for these strains, *Halomicrobium zhouii* [35] and uncultured haloarchaeon clone YA32 [36] were determined in Jiangsu sea saltern (China). Our findings were found to support the haloarchaeal diversity noted in previous studies.

Qualitative Findings of Hydrolytic Enzyme Activity

In the present research, esterase and lipase enzyme activities were investigated. Tween-80 for esterase activity and 1% olive oil for lipase activity were used in enzyme activation. In experiments of quantitative enzyme activity,

În studiul nostru, metoda analizei de secvență ARNr 16S a fost utilizată pentru diagnostic molecular al izolatelor 1 și 2. Ca urmare, s-a constatat că izolatul 1 este similar cu tulpina *Halomicrobium zhouii* 144, iar izolatul 2 a fost similar cu tulpina *Haloarchaeon* 129 conform bazei de date a băncii de gene. Secvențele de gene ARNr 16S ale tulpinii *Halomicrobium zhouii* 144 și ale tulpinii *Haloarchaeon* 129 au fost determinate de Bilgi și colab. [14]. În studiul acestora, tulpina *Haloarchaeon* 129 a fost izolată din piele crudă sărată și cultivată pentru prima dată. Luând în considerare mai întâi regiunile identificate pentru aceste tulpini, *Halomicrobium zhouii* [35] și clona *Haloarchaeon* YA32 necultivată [36] au fost determinate în salina Jiangsu (China). Descoperirile noastre au sprijinit diversitatea haloarchaea observată în studiile anterioare.

Rezultate calitative ale activității enzimei hidrolitice

În cercetarea de față, s-au investigat activitățile enzimactice ale lipazei și esterazei. Pentru activarea enzimei s-au utilizat Tween-80

p-NPB (for esterase test) and p-NPL (for lipase) substrates were used according to the procedure in experimental. Camacho *et al.* [30] produced esterase and lipase from *Haloarcula marismortui* and then have carried out their characterization. The researchers declared that p-nitrophenyl butyrate (pNPB), p-nitrophenyl valerate (pNPV) for esterase activity and p-nitrophenyl laurate (pNPL) for lipase activity were used as substrates.

Esterase and lipase activities were measured quantitatively for 10 days. Growth curve was generated for each isolate and the results were compared with activity findings. According to the research findings, the highest esterase (4 U/ml), and lipase (1 U/ml) activity values of isolate 1 was determined in supernatant on the 4th day of growth. The highest esterase (2.7 U/ml) and lipase (1.9 U/ml) activity values of isolate 2 were determined in supernatant on the 3rd day of growth. These supernatants were used as raw enzyme source in the subsequent enzyme analyses. Enzyme amount was detected as 0.2 ml for the highest esterase activity of both isolates. In such conditions, esterase activity of isolate 1 and 2 were found to be 0.45 U/ml and 0.54 U/ml, respectively. Optimal temperature was determined as 35°C for the highest esterase activity of both isolates. Esterase activity was determined at a wide temperature range of 4-55°C (Figure 3). This finding was considered as an important result for industrial esterase production.

pentru activitatea esterazei și ulei de măsline 1% pentru activitatea lipazei. În experimentele de activitate enzimatică cantitativă, s-au utilizat substraturile p-NPB (pentru testul esterazei) și p-NPL (pentru testul lipazei), în conformitate cu procedura menționată în partea experimentală. Camacho și colab. [30] au produs esteraza și lipaza din *Haloarcula marismortui* și apoi le-au caracterizat. Cercetătorii au raportat utilizarea substanțelor p-nitrofenil butirat (pNPB) și valerat de p-nitrofenil (pNPV) ca substraturi pentru activitatea esterazei și laurat p-nitrofenil (pNPL) ca substrat pentru activitatea lipazei.

Activitățile esterazei și lipazei au fost măsurate cantitativ timp de 10 zile. S-a generat curba de creștere pentru fiecare izolat, iar rezultatele au fost comparate cu rezultatele activității. Conform rezultatelor cercetării, cele mai mari valori ale activității esterazei (4 U/ml) și lipazei (1 U/ml) pentru izolatul 1 au fost determinate în supernatant în patra zi de creștere. Cele mai mari valori ale activității esterazei (2,7 U/ml) și lipazei (1,9 U/ml) pentru izolatul 2 au fost determinate în supernatant în treia zi de creștere. Acești supernatanți au fost utilizați ca sursă primară de enzimă în analizele enzimatiche ulterioare. S-a detectat cantitatea de enzimă la 0,2 ml pentru cea mai mare activitate a esterazei din ambele izolate. În aceste condiții, activitatea esterazei a izolatelor 1 și 2 s-a dovedit a fi de 0,45 U/ml, respectiv 0,54 U/ml. Temperatura optimă a fost determinată la 35°C pentru cea mai mare activitate a esterazei din ambele izolate. Activitatea esterazei a fost determinată în cadrul unei game largi de temperaturi, 4-55°C (Figura 3). Această constatare a fost considerată un rezultat important pentru producția industrială de esterază.

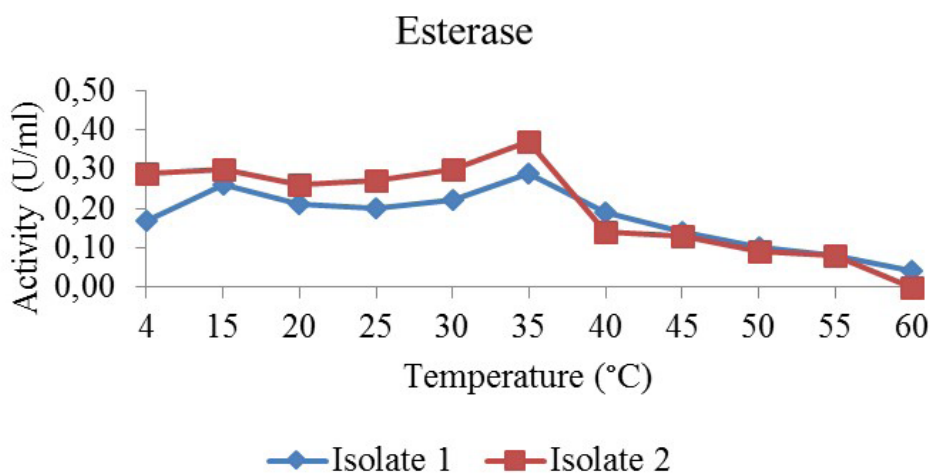


Figure 3. The graph of temperature changes of esterase activity
Figura 3. Graficul modificărilor de temperatură ale activității esterazei

The highest activity of lipase was detected at 40°C for isolate 1 and at 35°C for isolate 2. Lipase activity of isolate 2 was observed to be higher than that of isolate 1 (Figure 4).

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la 40°C pentru izolatul 1 și la 35°C pentru izolatul 2. S-a observat că activitatea lipazei în cazul izolatului 2 este mai mare decât cea a izolatului 1 (Figura 4).

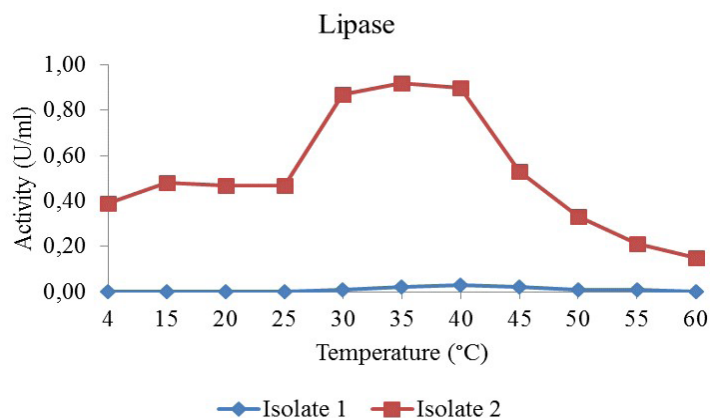


Figure 4. The graph of temperature changes of lipase activity
Figura 4. Graficul modificărilor de temperatură ale activității lipazei

The highest activity of esterase was detected at pH 8 for isolate 1 and at pH 7 for isolate 2. It was observed that isolate 2 was active at pH 4.5-9 range, while isolate 1 was active at pH 6.5-9.5 range. According to the obtained data, it was determined that isolate 2 had esterase activity in more acidic conditions than isolate 1 did (Figure 5).

Cea mai mare activitate a esterazei a fost detectată la pH 8 pentru izolatul 1 și la pH 7 pentru izolatul 2. S-a observat că izolatul 2 a fost activ în intervalul de pH 4,5-9, iar izolatul 1 a fost activ în intervalul de pH 6,5-9,5. Conform datelor obținute, s-a constatat că la izolatul 2 activitatea esterazei a avut loc în condiții mai acide decât în cazul izolatului 1 (Figura 5).

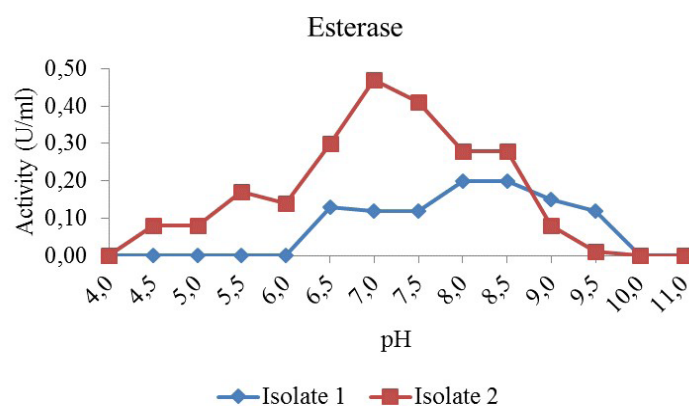


Figure 5. The graph of pH changes of esterase activity
Figura 5. Graficul modificărilor de pH ale activității esterazei

The highest activity of lipase was detected at pH 7.0 for isolate 1 and at pH 7.5 for isolate 2. It was observed that isolate 2 was active at pH 5.0-9.0 range, while isolate 1 was active at pH 5.0-7.5 range. Therefore, it was determined that isolate 1 had lipase activity in acidic, neutral and alkaline conditions (Figure 6).

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la pH 7,0 pentru izolatul 1 și la pH 7,5 pentru izolatul 2. S-a observat că izolatul 2 a fost activ în intervalul de pH 5,0-9,0, iar izolatul 1 a fost activ în intervalul de pH 5,0-7,5. Prin urmare, s-a stabilit că la izolatul 1 activitatea lipazei a avut loc în condiții acide, neutre și alcaline (Figura 6).

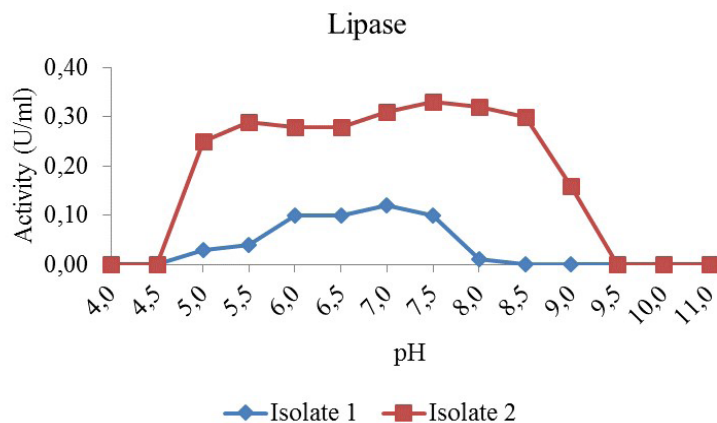


Figure 6. The graph of pH changes of lipase activity
 Figura 6. Graficul modificărilor de pH ale activității lipazei

The highest activity of esterase was detected in 2.5 M NaCl for isolate 1 and in 3 M NaCl for isolate 2. Both isolates were determined to have no esterase activity in 1 M NaCl (Figure 7).

Cea mai mare activitate a esterazei a fost detectată la 2,5 M NaCl pentru izolatul 1 și la 3 M NaCl pentru izolatul 2. Niciunul dintre izolate nu au avut activitate a esterazei la 1 M NaCl (Figura 7).

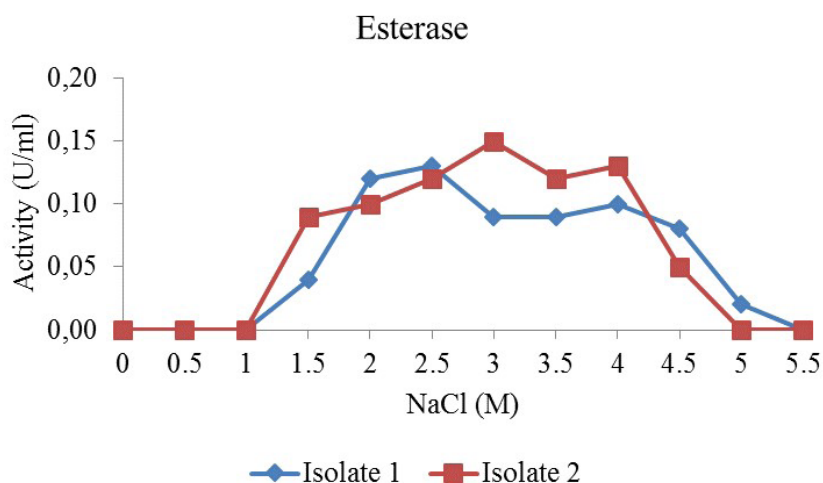


Figure 7. The graph of NaCl changes of esterase activity
 Figura 7. Graficul modificărilor de NaCl ale activității esterazei

The highest activity of lipase was detected in 2-3.5 M for isolate 1 and 2 M for isolate 2. Isolates 1 and 2 were found to exhibit lipase activity in 1.5-4 M and 0.5-4.5 M NaCl, respectively. It was observed that isolate 2 had slight lipase activity in low concentrations of salts such as in 0.5 M, 1.0 M and 1.5 M NaCl (Figure 8).

Thus, optimal esterase activity was detected at 35°C, pH 8, 2.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, 3 M NaCl for isolate 2. Additionally, the optimal lipase activity was detected at 40°C, pH 7.0, 2 M-3.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7.5, 2 M NaCl for isolate 2.

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la 2-3,5 M pentru izolatul 1 și la 2 M pentru izolatul 2. Izolatele 1 și 2 au prezentat activitate a lipazei la 1,5-4 M și respectiv 0,5-4,5 M NaCl. S-a observat că izolatul 2 a prezentat o ușoară activitate a lipazei la concentrații scăzute de săruri, cum ar fi la 0,5 M, 1,0 M și 1,5 M NaCl (Figura 8).

Astfel, activitatea optimă a esterazei a fost detectată la 35°C, pH 8, 2,5 M NaCl pentru izolatul 1 și la 35°C, pH 7, 3 M NaCl pentru izolatul 2. În plus, activitatea optimă a lipazei a fost detectată la 40°C, pH 7,0, 2 M-3,5 M NaCl pentru izolatul 1 și la 35°C, pH 7,5, 2 M NaCl pentru izolatul 2.

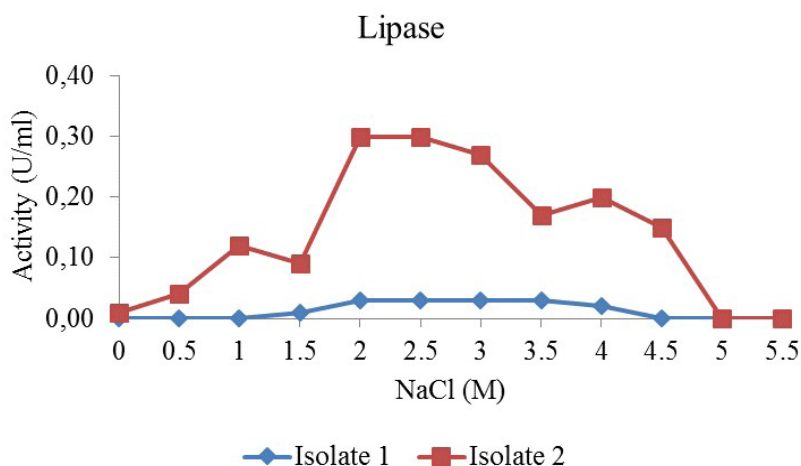


Figure 8. The graph of NaCl changes of lipase activity
 Figura 8. Graficul modificărilor de NaCl ale activității lipazei

In the study which investigates the esterase and lipase activities of 5 halophilic archaeal strains, p-Nitrophenyl butyrate (pNPB) for esterase and p-nitrophenyl palmitate (pNPP) for lipase were used as substrates [37]. In the mentioned study, the maximum esterase activity was observed in reaction conditions of 3–4.5 M NaCl, pH 8-8.5 and 60–65°C, and maximum lipase activity in 3.5-4 M NaCl and at pH 8 and 45–60°C. Moreover, it was also detected that the values of esterase activity were higher than those of lipase activity. It was found that our results related to optimal conditions were different from the above reported research results.

Bhatnagar *et al.* [26] examined lipolytic activity of halobacteria strain using similar substrates. The study showed that optimal conditions of Halobacteria strain were 3.5 M NaCl, pH 8, 40°C for esterase and 4 M NaCl, pH 7.5 40°C for lipase. They also suggest that esterase activity occurs faster than the lipase activity. Ozcan *et al.* [38] reported that optimal esterase and lipase activity of halophilic archaeal isolates were identified at pH 8.5 in 3-4.5 M NaCl. In addition, optimal temperature was stated as 50-55°C for esterase and as 60-65°C for lipase. Boutaiba *et al.* [39] investigated lipolytic activity of extremely halophilic Archaea *Natronococcus* sp. p-nitrophenyl palmitate (pNPP) was used as a substrate. They reported that optimal lipolytic activity was detected in 4 M NaCl, pH 7, at 50°C. Thus, our research findings were found to be compatible with these results.

În cadrul unui studiu care investighează activitatea esterazei și lipazei la 5 tulpini Archaea halofile, s-au utilizat ca substraturi p-nitrofenil butiric (pNPB) pentru esterază și palmitat p-nitrofenil (pNPP) pentru lipază [37]. În cadrul studiului menționat, activitatea maximă a esterazei a fost observată în condiții de reacție de 3-4,5 M NaCl, pH 8-8,5 și 60-65°C, iar activitatea maximă a lipazei la 3,5-4 M NaCl, la pH 8 și 45-60°C. Mai mult decât atât, s-a observat, de asemenea, că valorile activității esterazei au fost mai mari decât cele ale activității lipazei. S-a constatat că rezultatele noastre legate de condițiile optime au fost diferite de rezultatele cercetării prezentate mai sus.

Bhatnagar și colab. [26] au examinat activitatea lipolitică a tulpinilor halobacteriilor folosind substraturi similare. Studiul a demonstrat că condițiile optime ale tulpinilor halobacteriilor au fost de 3,5 M NaCl, pH 8, 40°C pentru esterază și 4 M NaCl, pH 7,5, 40°C pentru lipază. De asemenea, aceștia sugerează că activitatea esterazei are loc mai rapid decât activitatea lipazei. Ozcan și colab. [38] au raportat că activitatea optimă a esterazei și a lipazei la izolatele Archaea halofile s-a identificat la pH 8,5 în 3-4,5 M NaCl. În plus, temperatura optimă a fost raportată la 50-55°C pentru esterază și la 60-65°C pentru lipază. Boutaiba și colab. [39] au investigat activitatea lipolitică a unei Archaea extrem halofilă, *Natronococcus* sp. S-a utilizat ca substrat palmitat p-nitrofenil (pNPP). Autorii au raportat că activitatea lipolitică optimă a fost detectată la 4 M NaCl, pH 7, 50°C. Astfel, rezultatele cercetării noastre s-au dovedit a fi compatibile cu aceste rezultate.

CONCLUSIONS

In the study, firstly, it was found that isolate 1 was similar to *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 to *Haloarchaeon* strain 129 by 16S rRNA gene sequence analysis. It was determined that both isolates were Gram negative and susceptible to novobiocin and bacitracin antibiotics. Thus, our research findings supported that isolates belong to the Archaea domain. It was revealed that two extremely halophilic Archaea also have lipolytic activity. Extremely Halophilic Archaea with lipolytic enzyme activities may cause fat migration which is undesirable on the raw hide and skin. If Archaea causing damage to the skin by lipolytic activities were identified, ad hoc chemicals could be used to control them.

Secondly, optimal esterase and lipase activity conditions of the two Extreme Halophilic Archaea were quantitatively determined. According to the research findings, the highest esterase (4 U/ml) and lipase (1 U/ml) activity values of isolate 1 were observed in supernatant on the 4th day of growth. The highest esterase (2.7 U/ml) and lipase (1.9 U/ml) activity values of isolate 2 were determined in supernatant on the 3rd day of growth. Optimal esterase activity was detected at 35°C, pH 8, and in 2.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, and in 3 M NaCl for isolate 2. The optimal lipase activity was also determined at 40°C, pH 7.5, and in 2 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, and in 2 M NaCl for isolate 2.

It was detected that esterase and lipase enzymes of isolate 2 were active at a wide pH range of 4.5-9.0 and 5.0-9.0, respectively. Thus, it was considered as an important finding that both esterase and lipase activity of isolate 2 have a wide pH range. Besides, it was also recorded as an important finding that isolate 2 exhibits lipase activity in a high salt concentration, e.g. in 4.5 M NaCl, as well as in low salt concentration, e.g. in 0.5 M NaCl. Esterase activity of isolate 2 was determined at a wide temperature range of 4-55°C. Thus, these findings were considered important for industrial esterase and lipase production.

Finally, it was thought that the investigation of esterase and lipase enzymes of isolate 2 by advanced research methods and of their usability in industry would be useful. It should not be ignored that these isolates can be used as a source of lipolytic enzyme in several areas of the industry.

CONCLUZII

În cadrul studiului, s-a constatat, în primul rând, că izolatul 1 a fost similar tulpinii *Halomicrobium zhouii* 144 și izolatul 2 similar tulpinii *Haloarchaeon* 129 în urma analizei secvenței genei ARNr 16S. S-a stabilit că ambele izolate sunt Gram negative și sensibile la novobiocină și bacitracină. Astfel, rezultatele cercetării noastre sprijină faptul că izolatele aparțin domeniului Archaea. S-a demonstrat că cele două Archaea extrem halofile au, de asemenea, activitate lipolitică. Archaea extrem halofile cu activități enzimactice lipolitice pot provoca migrația grăsimii, de nedorit la pielea brută. În cazul în care se identifică Archaea ce provoacă leziuni pe piele prin activitățile lipolitice, se pot folosi produse chimice ad-hoc pentru a le controla.

În al doilea rând, s-au determinat cantitativ condițiile optime pentru activitatea lipazei și esterazei în cazul celor două Archaea extrem halofile. În conformitate cu rezultatele cercetărilor, cele mai mari valori ale activității esterazei (4 U/ml) și lipazei (1 U/ml) pentru izolatul 1 au fost observate în supernatant în patra zi de creștere. Cele mai mari valori ale activității esterazei (2,7 U/ml) și lipazei (1,9 U/ml) pentru izolatul 2 au fost detectate în supernatant în treia zi de creștere. Activitatea optimă a esterazei a fost detectată la 35°C, pH 8, 2,5M NaCl pentru izolatul 1 și la 35°C, pH 7, 3 M NaCl pentru izolatul 2. Activitatea optimă a lipazei a fost determinată la 40°C, pH 7,5, 2 M NaCl pentru izolatul 1 și la 35°C, pH 7, 2 M NaCl pentru izolatul 2.

S-a observat că enzimele esterază și lipază din izolatul 2 au fost active într-o gamă largă de pH de 4,5-9,0, respectiv 5,0-9,0. Astfel, o constatare importantă a fost faptul că activitățile esterazei și lipazei la izolatul 2 au avut loc într-o gamă largă de pH. În plus, o altă constatare importantă a fost faptul că izolatul 2 prezintă o activitate a lipazei într-o concentrație mare de sare, de exemplu, la 4,5 M NaCl, precum și într-o concentrație scăzută de sare, de ex. la 0,5 M NaCl. Activitatea esterazei la izolatul 2 a fost determinată într-o gamă largă de temperaturi, 4-55°C. Astfel, aceste descoperiri au fost considerate importante pentru producția industrială de esterază și lipază.

În cele din urmă, s-a considerat utilă investigarea enzimelor esterază și lipază ale izolatului 2 prin metode avansate de cercetare și a gradului de utilizare a acestora în industrie. Nu trebuie ignorat faptul că aceste izolate pot fi utilizate ca sursă de enzime lipolitice în mai multe domenii ale industriei.

REFERENCES

1. Bilgi, S.T., Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N., Determination of Bacterial and Fungal Numbers in Floats of Pre-Tanning Operations, *Afr J Biotechnol*, **2009**, 8, 8, 1602–1607.
2. Kanagaraj, J., John Sundar, V., Muralidharan, C., Sadulla, S., Alternatives to sodium chloride in prevention of skin protein degradation-a case study, *J Clean Prod*, **2004**, 13, 825-831.
3. Rao, B.R., Henrickson L., Short-term preservation of cattle hide, *J Am Leather Chem As*, **1983**, 78, 48-53.
4. Vankar, P.S., Dwivedi, A.K., Raw Skin Preservation Through Sodium Salts-A Comparative Analysis, *Desalination*, **2009**, 249, 158-162.
5. Yapıcı, A.N., The Effect of Using a Fungicide along with Bactericide in the Main Soaking Float on Microbial Load, *Afr J Biotechnol*, **2008**, 7, 21, 3922-3926.
6. Yapıcı, A.N., Meriçli Yapıcı, B., Karaboz İ., Tozan, M., An in vitro Assessment of the Effectiveness of Some Bactericides on Bacteria Isolated from Soaking Float, *Asian J Chem*, **2009**, 21, 2, 1521–1525.
7. Thorstensen, T.C., Practical Leather Technology (4th.ed.). Kriger Publishing Company Krigerdrive, Malabar, Florida, **1993**, 340p.
8. Türkan, M.F., Aslan, A., Yapıcı, A.N., Meriçli Yapıcı, B., Bilgi, S.T., Assessment of Antimicrobial Activity of Natural Leathers Treated with *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf Extracts, *Tekstil ve Konfeksiyon*, **2013**, 23, 2, 176-180.
9. Ulaş, G., Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N., Evaluation of the Antimicrobial Activity of Some Commercial Vegetable Extracts Used in Tanneries, *Ekoloji*, **2014**, 92, 45-50.
10. Menteş Çolak, S., Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N., Determination of Antimicrobial Activity of Tannic Acid in Pickling Process, *Rom Biotech Lett*, **2010**, 15, 3, 5325-5330.
11. Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N. and Keçici, E., The Effect of Reuse of Unhairing-Liming Residual Floats Through Regeneration on the Microorganisms Number, *Afr J Biotechnol*, **2008**, 7, 17, 3077-3081.
12. DasSarma, S., Coker, J.A., ve DasSarma, P., Archaea - Overview, in: Schaechter, M. (Ed.), Desk Encyclopedia of Microbiology (2nd ed), Academic Press, **2010**, 118-139.
13. Kushner, D.J., The Halobacteriaceae, in: Woese, C.R., Wolfe R.S. (Ed.), The bacteria. A treatise on structure and function. Archaeobacteria. Vol 8. Academic Press, London, **1985**, 171-214.
14. Bilgi, S.T., Mericli Yapici, B., Karaboz, İ., Determination of Hydrolytic Enzyme Capabilities of Halophilic Archaea Isolated from Hides and Skins and Their Phenotypic and Phylogenetic Identification, *J Am Leather Chem As*, **2015**, 110, 2, 33-42.
15. Wiseman, A., Introduction to Principles, in: Handbook of Enzyme Biotechnology, Wiseman, A. (Ed.) 3rd Edn., Ellis Horwood Ltd., T.J. Press Ltd., Padstow, Cornwall, UK, **1995**, 3-8.
16. Eren Kiran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları (in Turkish), KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi, Kahramanmaraş, **2006**, 9, 2-19.
17. Afendra, A.S., Vargas, C., Nieto, J.J., Drinas, C., Gene Transfer and Expression of Recombinant Proteins in Moderately Halophilic Bacteria, *Methods Mol Biol*, **2004**, 267, 209-223.
18. Dussault, H.P., An Improved Technique For Stainin Red Halophilic Bacteria, *J Bacteriol*, **1955**, 70, 484-485.
19. Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R.H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C., Lopez-Gariga, J., Halogeometricum borinquense gen. nov., sp. nov., A Novel Halophilic Archaeon From Puerto Rico. *Int J Syst Bacteriol*, **1998**, 48, 1305-1312.
20. Birbir, M., Sesal, C., Extremely Halophilic Bacterial Communities in Serflikoçhisar Salt Lake in Turkey, *Turk J Biol*, **2003**, 27, 7-22.
21. Birbir, M., Cali, B., Mertoglu, B., Bardavid, R.E., Oren, A., Ogmen, M.R., Ogan, A., Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldirim and Kayacik salterns, *World J Microbiol Biotechnol*, **2007**, 23, 309–316.
22. Dyal-Smith, M., The Halohandbook-Protocols for Haloarchaeal Genetics. Version 7. **2008**, 144p.
23. Lane, D.J., 16S/23S rRNA Sequencing, in Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley and Sons, New York, **1991**, 115–175.

24. Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., Enhanced Sensitivity of DNA- and rRNA-Based Stable Isotope Probing by Fractionation and Quantitative Analysis Of Isopycnic Centrifugation Gradients, *Environ Microbiol*, **2004**, 6, 73–78.
25. Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A., Characterization of Extremely Halophilic Archaea Isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey, *World J Microbiol Biotechnol*, **2004**, 20, 719–725.
26. Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Baratti, J.C., Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production, *FEMS Microbiol Lett*, **2005**, 248, 133-140.
27. Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes, *J Appl Microbiol*, **2003**, 94, 295–300.
28. Kouker, G., Jaeger, K.E., Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, *Appl Environ Microbiol*, **1987**, 53, 1, 211-213.
29. Anonymous, Rhodamine B Agar Preparation Procedure (b.t.). Access August 7, 2009, from <http://www.alken-murray.com/lipase.html>, **2009**.
30. Camacho, R.M., Mateos, J.C., Gonzalez-Reynoso Orfil., Prado L.A., Cordova, J., Production and Characterization of Esterase and Lipase from Haloarcula marismortui, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**, 36, 901–909.
31. Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R., Methods for Lipase Detection and Assay: a critical Review, *Eur J Lipid Sci Technol*, **2000**, 133–153.
32. Holmes, M.L., Dyll-Smith, M.L., Mutations in DNA gyrase Results in Novobiocin Resistance in Halophilic Archaeobacteria, *J Bacteriol*, **1991**, 173, 642–648.
33. Çetinkuş, K., Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu (in Turkish), MSc Dissertation, Anadolu University. Eskişehir, Turkey, **2007**.
34. Yıldız, E., Özcan, B., Çalışkan, M., Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Halophilic Archaea from a Salt Mine in Central Anatolia (Turkey), *Pol J Microbiol*, **2012**, 61, 2, 111–117.
35. Yang, X., Cui, H.L., Halomicrobium zhouii sp. nov., A Halophilic Archaeon from a Marine Solar Saltern, *Int J Syst Evol Microbiol*, **2012**, 62, 1235–1240.
36. He, M., Zou, Z., Cai, L., Wang, G., Haloarchaea and Halophilic Bacteria in Two Hypersaline Soils of Jiangsu Province, China, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, **2007**.
37. Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., Characterization of Extracellular Esterase and Lipase Activities from Five Halophilic Archaeal Strains, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**, 36, 105–110.
38. Özcan, B., Özyılmaz, G., Cihan, A., Çökmüş, C., Çalışkan, M., Phylogenetic Analysis and Characterization of Lipolytic Activity of Halophilic Archaeal Isolates, *Microbiology*, **2012**, 81, 2, 186-194.
39. Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., Preliminary Characterisation of a Lipolytic Activity from an Extremely Halophilic Archaeon, Natronococcus sp., *J Mol Catal B-Enzym*, **2006**, 41, 21–26.

Article received/Data primirii articolului: 16.10.2016

Accepted/Acceptat la data: 18.11.2016