

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI EKSTREM TERMOFİL ANAEROBİK BAKTERİLERİN ALKALİ  
PROTEAZLARININ ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Leila GHEORGHİU ALPAN**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2008**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Leila GHEORGHIU ALPAN tarafından hazırlanan “**Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 05.03.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ*  
*Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği A.B.D*

*Başkan: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ*  
*Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği A.B.D*

*Üye: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK*  
*Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği A.B.D*

*Üye: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ*  
*Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D*

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Orhan ATAKOL**

**Enstitü Müdürü**

**ÖZET**  
Yüksek Lisans Tezi

**BAZI EKSTREM TERMOFİL ANAEROBİK BAKTERİLERİN ALKALİ  
PROTEAZLARININ ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Leila GHEORGHİU ALPAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat Dönmez

Bu çalışmada çeşitli sıcak su, çamur ve toprak örneklerinden izole edilmiş olan bazı ekstrem termofil anaerobik bakteriler alkali proteaz aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Test edilen 36 suş arasından Raman (Batman, Türkiye) petrol kuyusundan izole edilen, Ç olarak kodlanan ve Techirgiol (Köstence, Romanya) çamur banyosundan izole edilen, RÇ<sub>3</sub> olarak kodlanan iki bakterinin ekstraselüler alkali proteaz enzimi üretikleri saptanmıştır. Bu enzimlerin üretim koşulları ile karakteristik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ç ve RÇ<sub>3</sub> logaritmik gelişimlerini sırasıyla 32 ve 42. saatte tamamlamışlardır. Yapılan çalışmada Ç ve RÇ<sub>3</sub>'ün optimum gelişme sıcaklığı ve pH'ları sırasıyla 65°C, 55°C ve 9.0, 9.5 olarak belirlenmiştir. Gelişme sırasında maksimum alkali proteaz aktivitesi Ç için 42. saatte 91.3 U/ml, RÇ<sub>3</sub> için ise 46. saatte 78.5 U/ml olarak belirlenmiştir. Enzimlerin optimum sıcaklığı ve pH değeri; Ç için 70°C ve pH 9.5, RÇ<sub>3</sub> için 65°C ve pH 9.0 olarak bulunmuştur. 70°C'de 2 saat inkübasyondan sonra Ç izolatu enzim aktivitesinin %20'sini, 65°C'de RÇ<sub>3</sub> ise %45'ini kaybetmişlerdir. Bakteriler, Ç izolatu için, karbon kaynağı olarak maltoz, azot kaynağı olarak pepton ve kazein karışımı; RÇ<sub>3</sub> izolatu için ise, laktoz ve soya unu içeren besiyerlerinde maksimum gelişme göstermişlerdir. Maksimum alkali proteaz üretimi Ç için, maltoz, pepton ve kazein karışımında, RÇ<sub>3</sub> için ise laktoz ve kazein hidrolizat içeren besiyerlerinde meydana gelmiştir. Alkali proteaz aktivitesi, besiyerine 2 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile, sırasıyla Ç için %136 ve RÇ<sub>3</sub> %142 oranla artmıştır. Kaba enzim sıvısına, Ç için Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup>, RÇ<sub>3</sub> için Fe<sup>3+</sup> ve Co<sup>2+</sup> iyonları ilavesi ile enzim aktivitesi artmıştır. Ç için Co<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup>, RÇ<sub>3</sub> için ise Zn<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonları ilavesi enzim aktivitesini azaltmıştır. EDTA ilavesi ile Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatları için enzim aktivitesi sırasıyla %51 ve %45 oranına düşmüş, PMSF ilavesi ile her iki enzim aktivitesi de %90'dan daha büyük oranda inhibe olmuştur.

**Mart 2008, 56 sayfa**

**Anahtar Kelimeler :** Ekstem termofil, anaerob, alkali proteaz, ekstraselüler, proteolitik aktivite, termostabil

**ABSTRACT**  
Master Thesis

**DETERMINATION OF THE SPECIFICATIONS OF THE ALKALINE PROTEASES  
OF SOME EXTREMELY THERMOPHILIC ANAEROBIC BACTERIA**

Leila GHEORGHÏU ALPAN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat Dönmez

In this study some extremely thermophilic anaerobic bacteria isolated from various hot water, mud and soil samples were examined for alkaline proteolytic activity. It has been determined that among the 36 strains tested, the isolates coded as Ç from an oil well in Raman region (Batman, Turkey) and RÇ<sub>3</sub> from a mud bath in Techirgiol (Constanta, Romania) produced extracellular alkaline protease enzymes. The purpose of this study is to determine the production conditions and properties of the enzymes. Ç and RÇ<sub>3</sub> isolates have completed their logarithmic growth in 32<sup>nd</sup> and 42<sup>nd</sup> hours of incubation, respectively. According to the results, the optimum growth temperature and pH values for isolates Ç and RÇ<sub>3</sub> were 65°C, 55°C and pH 9.0, 9.5, respectively. The maximum alkaline protease activities during the growth were established as 91.3 U/ml at 42<sup>nd</sup> hour for the isolate Ç and 78.5 U/ml at 46<sup>th</sup> hour for the isolate RÇ<sub>3</sub>. The optimum temperature and pH values for enzymes have been found as 70°C, pH 9.5 for the isolate Ç and 65°C, pH 9.0 for the isolate RÇ<sub>3</sub>. After 2 hours of incubation at 70°C, isolate Ç has lost 20% of its enzyme activity, and similarly RÇ<sub>3</sub> has lost %45 of its enzyme activity at 65°C. The isolate Ç exhibited maximum growth in the medium that contains maltose as the carbon source, peptone and casein mixture as the nitrogen source, while the isolate RÇ<sub>3</sub> exhibited maximum growth in the medium that contains lactose and soy bean meal. The maximum alkaline protease production took place in a medium containing maltose, peptone and casein for the isolate Ç, and in a medium containing lactose with casein hydrolysate for the isolate RÇ<sub>3</sub>. Alkaline protease activity was increased to %136 and %142 levels by addition of 2 mM CaCl<sub>2</sub> in to the growth medium for the isolates Ç and RÇ<sub>3</sub> respectively. Enzyme activity was increased by addition of Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> ions to the enzyme solution for the Ç isolate, and Fe<sup>3+</sup> and Co<sup>2+</sup> ions for the RÇ<sub>3</sub> isolate. Addition of Co<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> ions for Ç isolate and Zn<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> ions for the isolate RÇ<sub>3</sub>, decreased the enzyme activity. Enzyme activities for the isolates Ç and RÇ<sub>3</sub> were decreased to %51 and 45% respectively by addition of EDTA, while addition of PMSF inhibited the enzyme activity up to %90 for both isolates.

**March 2008, 56 pages**

**Key words** : Extremely thermophilic, anaerobic, alkaline protease, extracellular, proteolytic activity, thermostable

## TEŐEKKÖR

Bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve önerilerini ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü)'e, desteklerini gördüğüm doktora öğrencisi Ayşe AVCI (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ve sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Leila GHEORGHİU ALPAN

Ankara, Mart 2008

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Alkalitermofil Mikroorganizmalar.....	3
2.2 Proteazlar.....	5
2.3 Proteolitik Enzimlerin Sınıflandırma ve Adlandırması.....	6
2.3.1 Eksopeptidazlar.....	7
2.3.2 Endopeptidazlar.....	7
2.3.2.1 Serin proteazlar.....	7
2.3.2.2 Sistein proteazlar.....	8
2.3.2.3 Aspartat proteazlar.....	8
2.3.2.4 Metallo proteazlar.....	8
2.4 Endüstriyel Açıdan Alkali Proteazlar.....	9
2.4.1 Süt teknolojisinde alkali proteazlar.....	11
2.4.2 Atık arıtımı ve dönüşümü.....	12
2.4.3 Deri endüstrisinde proteazlar.....	12
2.4.4 Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1 Kullanılan Mikroorganizma.....	15
3.2 Mikroorganizma Gelişmesinde Kullanılan Besiyeri.....	15
3.3 Mikroorganizmaların Geliştirilmesi ve Muhafazası.....	16
3.4 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi.....	16
3.5 Protein Tayini.....	16
3.6 Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17
3.7 Farklı Karbon Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Alkali Proteaz Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi.....	18

<b>3.8 Farklı Azot Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Alkali Proteaz Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>18</b>
<b>3.9 Farklı Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.10 Optimum Reaksiyon Sıcaklığının ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.11 Optimum pH ve pH kararlılığının Belirlenmesi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.12 Metal İyonlarının Alkali Proteaz Aktivitesine Etkisi.....</b>	<b>20</b>
<b>3.13 Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....</b>	<b>20</b>
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Mikroorganizmaların Çoğalmalarının İzlenmesi.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Mikroorganizmaların Enzim Aktiviteleri.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Enzimin Optimum Reaksiyon Sıcaklığı .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4 Enzimin Sıcaklık Kararlılığı.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5 Enzimin Optimum Reaksiyon pH'sı.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 Enzimin pH Kararlılığı.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7 Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi.....</b>	<b>29</b>
<b>4.8 Farklı Azot Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi.....</b>	<b>31</b>
<b>4.9 Farklı Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....</b>	<b>32</b>
<b>4.10 Bazı Metal İyonları Enzim Aktivitesine Etkisi.....</b>	<b>33</b>
<b>4.11 Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....</b>	<b>34</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>36</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>
<b>EK 1 Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatların mikroskoptaki görüntüsü.....</b>	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Ç izolatının 65°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki optik yoğunluk (OD) ve pH değişimi .....	21
Şekil 4.2	RÇ <sub>3</sub> izolatının 55°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki optik yoğunluk (OD) ve pH değişimi .....	22
Şekil 4.3	Ç izolatının 65°C’de ve RÇ <sub>3</sub> izolatının 55°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki alkali proteaz aktiviteleri.....	23
Şekil 4.4	Ç, RÇ <sub>3</sub> izolatlarının alkali proteazlarının farklı sıcaklıklardaki oransal aktiviteleri.....	24
Şekil 4.5	Ç izolatının ürettiği alkali proteazın 70°C ve 80°C sıcaklıklarda ve pH 9.0’da sıcaklık kararlılığı.....	25
Şekil 4.6	RÇ <sub>3</sub> izolatının ürettiği alkali proteazın 65°C ve 75°C sıcaklıklarda ve pH 9.0’da sıcaklık kararlılığı .....	26
Şekil 4.7	Ç, izolatın alkali proteazının farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri...27	
Şekil 4.8	RÇ <sub>3</sub> izolatının alkali proteazının farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri.....	28
Şekil 4.9	Ç izolatının 70°C ve RÇ <sub>3</sub> izolatının 65°C sıcaklıklarda, pH 6-11 arasındaki pH kararlılığı.....	29



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Anaerobik alkalitermofiller.....	4
Çizelge 2.2	Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri .....	5
Çizelge 2.3	Proteazların sınıflandırması.....	6
Çizelge 2.4	Bakteriyel alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve üreticileri .....	10
Çizelge 4.1	Ç ve RÇ3 izolatlarının, farklı karbon kaynağı içeren Horikoshi-I besiyerlerindeki gelişme ve alkali proteaz aktiviteleri.....	30
Çizelge 4.2	Ç ve RÇ <sub>3</sub> izolatlarının, farklı azot kaynağı içeren Horikoshi-I besiyerlerindeki gelişme ve alkali proteaz aktiviteleri.....	32
Çizelge 4.3	Ç ve RÇ3 izolatlarının farklı bileşiklerin içeren Horikoshi-I besiyerindeki alkali proteazların aktivitesine etkileri.....	33
Çizelge 4.4	Bazı metal iyonlarının Ç ve RÇ <sub>3</sub> izolatlarının ürettiği alkali proteazların aktivitesine etkileri.....	34
Çizelge 4.5	Bazı inhibitörlerin ve kimyasalların Ç ve RÇ <sub>3</sub> izolatlarının alkali proteazlarının aktivitesine etkileri.....	35

## 1. GİRİŞ

Enzim teknolojisindeki gelişmeler, enzimlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve çok yüksek ekonomik değer taşımaları nedeni ile, endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, günümüzde genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmesidir. Enzim üretiminde kullanılan mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilmektedir. Bugün, endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin üretiminde, mikroorganizma kullanımını artmıştır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır.

Günümüzde, endüstriyel olarak önemli birçok kimyasal proses, yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullarda gerçekleştiğinden, bunlara alternatif ve çevresel etkisi daha az yöntemler için ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır. Günümüzde endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmakta, ancak bir çok avantaja sahip olmalarına karşın, uygulamalara dayanıksız olmaları nedeni ile kullanımları sınırlı kalmaktadır. Öte yandan, ekstrem termofil mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) ekstrem koşullara daha dayanıklı olduklarından, enzim üretimi için önemlidirler.

Ekstremofilik mikroorganizmalar; sönmüş volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 1-4 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30 NaCl) yaşamak için adapte olmuşlardır. Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır.

Buralarda yaşıyan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira ve fotoğraf v.b. endüstrilerinde, organik sentezlerde ve atık arıtımında kullanılmaktadır.

Termofilik ve alkalifilik mikroorganizmalar tarafından üretilen alkalın proteazlar yüksek sıcaklık ve geniş bir pH aralığına (6-12) dayanabilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım alanı olan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi ve oranı küçük katkı maddesi olarak kullanımından, anahtar bileşen durumuna doğru değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi, birlikte kullanılan oksitleme ajanları ve ağartıcılara dayanıklı olmalıdır, ticari olarak kullanılan deterjan enzimlerinin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini koruyamamakta, bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha stabil olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu sorunu çözmek için mikrobiyal çeşitliliği derinlenmesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır. Bu anlamda üretim maliyetleri, zaman, kalite ve performans birlikte gözetilmekte, dış etkenlerden olabildiğince bağımsız ve farklı sıcaklık/pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimleri üreten mikroorganizmaların tanımlanması ve/veya geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Oberoi *et al.* 2001).

Bu çalışmada çeşitli kaynaklardan izole edilmiş iki termoanaerobik bakteri tarafından üretilen ve endüstriyel açıdan önem taşıyan, termostabil alkali proteaz enzimlerinin özellikleri ile biyoteknolojik üretim potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Alkalitermofil Mikroorganizmalar

Alkalitermofil ve alkalitolerant termofillerin, mezobiyotik atık sular, nehir ve göl sedimentleri, mikrobiyel olarak kendi kendine ısınmış kompost yığınları ve farklı pH'lardaki jeotermal kaynaklar gibi çok farklı çevrelerden izole edildiği belirtilmiştir. Alkalitermofil mikroorganizmaların, ekstrem çevrelerin yaygın olarak bulunduğu Arjantin ve Almanya'daki mezobiyotik nehir sedimentlerinden, ABD'deki göl sedimentlerini de içine alan tüm sedimentlerden, Yeni Zelanda ve İtalya'daki sıcak su kaynaklarından ve at gübresi kompostu gibi termobiyotik çevrelerden izole edildiği bildirilmiştir (Wiegel 1998).

Denizdibi hidrotermal sistemler, sülfat içeren alanlar ve alkali kaynaklardan izole edilen değişik ekstrem termofilik ve hipertermofilik alkali mikroorganizmaların, protein ve peptidleri içeren kompleks ortamları tercih ettikleri ve termoaktif proteazlar ürettikleri belirlenmiştir. *Pyrococcus woesei* ( $T_{opt}$  110°C,  $pH_{opt}$  8-9), *Thermococcus stetteri* ( $T_{opt}$  85°C,  $pH_{opt}$  8.5), *Thermococcus litoralis* ( $T_{opt}$  95°C,  $pH_{opt}$  9.5), *Staphylothermus marinus* ( $T_{opt}$  95°C,  $pH_{opt}$  9.5), *Fervidobacterium pennavorans* ( $T_{opt}$  80°C,  $pH_{opt}$  10) gibi ekstrem termofil ve hipertermofil arkelerde, termoaktif proteazların varlığı belirlenmiştir (Leuschner *et al.* 1995).

Anaerobik alkalifil bakteriler hakkındaki ilk çalışmalar, taksonomik özellikler belirtilmemiş olmakla birlikte, Niimura ve ark. (1987) tarafından bildirilmiştir. Daha sonraları, farklı yöntemler ile birçok sporlu anaerobik alkalifil izole edilmiş ve az sayıda uygulaması da araştırılmıştır. Örneğin, *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E bakterisinin ürettiği siklomaltodekstrin glukanotransferaz enziminin izolasyonu ve saflaştırılması Potkovyrov ve Zeikus (1992) tarafından rapor edilmiştir. Engle ve ark. (1995) ise, bazı termofilik anaerobik alkalifil bakterileri izole etmiş ve tanımlamışlardır. Yellow Stone (A.B.D.) milli parkından alınan su ve toprak örneklerinden, benzer özelliklere sahip dokuz alkali-tolerant termofilik bakteri, izole edilmiştir. Bunlardan JW/YL-138T suşu ve benzer diğer sekiz adet suşun, *Anaerobranca horikoshii* olduğu

anlaşılmıştır. 60°C sıcaklıkta, 6.9 ile 10.3 pH aralığında gelişebilen bu bakterinin optimum pH'sı ise 8.5'tir. Cook ve arkadaşları tarafından bildirildiğine göre, yeni bir alkali termofil olan *Clostridium paradoxum*'un 7.6-9.8 pH aralığında gelişebildiği ve hücre içi pH stabilitesi olduğu anlaşılmıştır (Cook *et al.* 1996).

Alkali termofiller hakkında çok kapsamlı bir araştırma, Wiegel tarafından yayınlanmıştır (Wiegel *et al.* 2003). Bu çalışmada alkali termofillerin bazı özellikleri incelenerek Çizelge 2.1'deki gibi sıralanmıştır.

Çizelge 2.1 Anaerobik alkalitermofiller (Wiegel *et al.* 2003)

Tür	Optimum pH	İzolasyon Sıcaklığı (°C)	Optimum Sıcaklık (°C)
<i>Clostridium paradoxum</i>	10.3	55	54-58
<i>Clostridium thermoalcaliphilum</i>	9.8	50	49
<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	9.5	-	53
<i>Thermopallium natronophilum</i>	9.5	-	70
<i>Anaerobranca sp.KS5Y</i>	8.7	-	57
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	8.5	25	63
<i>Desulfotomaculum alkaliphilum</i>	8.6	-	53
<i>Anaerobranca horikoshii</i>	8.5	60	57
<i>Halonatronum saccharophilum</i>	8.3	-	46
<i>Thermobrachium celere</i>	8.2	60	65-67
<i>Caloramator indicus</i>	8.1	-	63
<i>Thermococcus acidaminovorans</i>	9	-	85
<i>Thermococcus alkaliphilus</i>	9	-	85
<i>Thermococcus fumicolans</i>	8.5	-	85
<i>Methanothermobacter thermotrophicus AC60</i>	8	-	60
<i>Methanothermobacter thermoflexus</i>	8	-	55

Yakın zamana kadar alkalifillerin hidrotermal bölgelerde geliştikleri az sayıda mikrobiyolog tarafından düşünülmekteydi. İtalya'nın Vulcano (yanardağ) adasında, sıg bir deniz hidrotermal sisteminde 56-90°C sıcaklık aralığında, alkali pH, polisülfidli bir ortamda gelişen, *Thermococcus alcaliphilus* adlı yeni bir hipertermofil arke, izole edilmiştir (Tanabe *et al.* 1988). Bu bakteri, çoğalması için pH aralığının 6.5-10.5, optimum pH'nın ise 9.0 olduğu bildirilmiştir. Polisülfidler ve elementel kükürt, H<sub>2</sub>S'e indirgenmektedir. Dirmeier ve arkadaşları (1998) tarafından, İtalya'nın Vulcano

adasının Levante limanı yakınlarında bulunan 1m kadar derinlikteki sığ bir kıyıda yeni bir hipertermofil arke izole edilmiştir. Bu bakterinin kok şeklinde ve beş flagellaya sahip olduğu, 56-93°C arasında (85°C optimum) ve 5.0-9.5 pH aralığında (9.0 optimum pH) gelişebildiği belirlenmiştir. Bu organizma zorunlu anaerob olup kazamino asit, malt ekstraktı, pepton, et ekstraktı, tripton, kazein gibi organik substratlar içeren besin ortamında gelişme göstermektedir. DNA-DNA hibridizasyonu ve 16s rRNA sekans analizi sonuçlarına göre, yeni izole edilen bu bakterinin, *Thermococcus* cinsine ait olan *Thermococcus acidaminovorans* olarak tanımlanan yeni bir tür olduğu bildirilmiştir.

## 2.2 Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Alkali proteazlar deri, gıda, deterjan, eczacılık, fotoğrafçılık, atık yönetimi v.b. birçok endüstriyel alanda kullanılan enzim grubudur. Son yıllarda, endüstride klasik yöntemler yerine enzimlere dayalı süreçlerin kullanımı giderek ağırlık kazanmaktadır. Çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin, yıllık toplam satış tutarı bir milyar \$'ın üzerindedir. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz ve kaliteli ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır ve bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir paya sahiptir, proteaz enzimlerinin yıllık olarak tüketilen oranları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri (Rao *et al.* 2003)

Enzim	Pazar payı(%)
Alkali Proteazlar	25
Diğer Proteazlar	21
Amilaz	18
Reninler	10
Analitik enzimler	10
Karbohidrolazlar	10
Lipaz	3
Tripsin	3

### 2.3 Protolitik Enzimlerin Sınıflandırma ve Adlandırması

Ken McDonald (1985) tüm proteolitik enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için, peptidaz (peptit bağlarını hidrolize edenler) ve proteaz olmak üzere iki terim belirleyerek terminolojideki sorunları büyük oranda çözmüşlerdir. Proteazlar ayrıca, katalize ettikleri reaksiyon tipine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır ((Nduvimana *et al.* 1995; Rao *et al.* 1998). Bu tanımlamada belirleyici olan enzimlerin substratta etkili oldukları bölgedir. Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre; serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metallo proteazlar şeklinde ve aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır (Nduvimana *et al.* 1995; Rao *et al.* 1998). Buna göre, bazı proteazların bu sınıflandırmadaki yeri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 Proteazların Sınıflandırması (Rao *et al.* 1998)

Proteaz	E.C. sayısı
Ekzopeptidaz	
Aminopeptidaz	3.4.11
Dipeptidil peptidaz	3.4.14
Tripeptidil peptidaz	3.4.14
Karboksipeptidaz	3.4.16-3.4.18
Serin proteaz	3.4.16
Metaloproteaz	3.4.17
Sistein proteaz	3.4.18
Peptidil dipeptidaz	3.4.15
Dipeptidaz	3.4.13
Omega peptidaz	3.4.19
Endopeptidaz	3.4.21-3.4.34
Serin proteaz	3.4.21
Sistein proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metallo proteaz	3.4.24
Endopeptidaz (bilinmeyen katalitik mekanizmanın)	3.4.99

### 2.3.1 Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar. Proteazlarda, zincirin amino ucundaki ilk peptit bağı hidrolizleyen aminopeptidazlar, amino ucundaki ikinci peptit bağının hidrolizini katalize eden endopeptidazlar, dipeptilaminopeptidazlar v.b. olarak bilinirler. Karboksipeptidazlar proteinlerin karboksil ucunda etki gösterirler. Gerçek karboksipeptidazlar bu uçtaki son peptid bağı hidrolize ederler. Dipeptidilkarboksipeptidazlar ise karboksi uca bulunan son peptid bağından bir önceki peptid bağı hidroliz ederler. Aminopeptidazlar ve karboksipeptidazların yanı sıra tanımlanmış iki ekzopeptidaz ailesi bulunmaktadır. Bunlar dipeptitleri hidroliz eden dipeptidazlar ve prostetik gruba bağlı aminoasitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize eden omegapeptidazlardır (Nduvimana *et al.* 1995)

### 2.3.2 Endopeptidazlar

Hartley, 1960 yılında endopeptidazları katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C. 3.4.21), sistein proteazlar (E.C. 3.4.22), aspartat proteazlar (E.C. 3.4.23) ve metallo proteazlar (E.C. 3.4.24) olmak üzere dört grup altında sınıflandırmıştır. Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (Nduvimana *et al.* 1995).

#### 2.3.2.1 Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif merkezlerindeki aspartik asit (Asp), serin (Ser) ve histidinden (His) oluşan üçlü katalitik yapılar ile karakterize edilirler. Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir elemandır (Nduvimana *et al.* 1995). Serin proteazlar alkali koşullarda aktivite göstermeleri ve kararlılıkları nedeni ile farklı endüstriyel uygulama alanlarına sahip enzimlerdir (Rao *et al.* 1998). Serin proteazlar



DFP (diizopropilflorofosfat) ve PMSF (fenilmetilsulfonylflorid) tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Alkali pH değerlerinde aktif olan bu enzimler geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir, molekül ağırlıkları ise çoğunlukla 18-35 kDa aralığındadır (Rao *et al.* 1998)

### **2.3.2.2 Sistein proteazlar**

Sistein proteazlar tiol proteazlar olarak da bilinir ve aktif merkezlerindeki sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterize edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olmakta ve aktif merkezlerinde bir -SH grubu içerdiklerinden ve bu grup ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla kolayca inhibe edildiğinden önemli enzimlerdir.

### **2.3.2.3 Aspartat proteazlar**

Aspartat proteazlar asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki aspartik asit içerir ve bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında olup; pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazların bilinen örnekleridirler.

### **2.3.2.4 Metallo proteazlar**

Bu grup, etki mekanizması yönünden diğer protezlara göreceli olarak, en çok farklılık gösteren enzimleri içerirler. Metallo proteazlar aktiviteleri için divalent katyonlara gerek duyan enzimlerdir. Metallo proteazların yapısında katyon olarak genellikle çınko ( $Zn^{+2}$ ) bulunmaktadır, bunlar EDTA gibi, şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Bu grup içinde bulunan 30 adet enzim ailesinden 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve birisi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidazdır. Metallo peptidazlar nötral, alkali, *miksobakter* I ve II olmak üzere dört gruba ayrılırlar ( Nduvimana *et al.* 1995; Rao *et al.* 1998).

## 2.4 Endüstriyel Açıdan Alkali Proteazlar

Proteazlar global enzim ürünleri satışında önemli paya sahip bir endüstriyel enzim grubu olup; deterjan, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğrafçılık, organik atıklar ve geri dönüşüm v.b. endüstrisinde kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan alkali proteazlar bakteri, fungi ve böcekler gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (Horikoshi *et al.* 1996; Anwar ve Saleemuddin 1998). Proteazların endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini bazı özellikleri belirler, daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda proteaz ürünleri için fungal kültürlerde çalışılmış ve ürün miktarının kullanılan tür ve ortama göre fazlasıyla değişken olduğu ortaya konmuştur. Banerjee ve Bhattacharya (1992) yaptıkları çalışmada bir *Rhizopus oryzae* izolatından alkali proteaz elde etmek için kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Çalışmada, organik ve inorganik azot kaynakları, metal iyonları, surfaktanlar ve mantar öldürücü ilaçların proteaz üretimi ve ürünleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Organik azot kaynaklarının proteaz üretimini olumlu etkilediği saptanmış, ancak ekonomik boyutu gözetilerek endüstriyel proteaz üretimi için inorganik tuzlar tercih edilmiştir. İnorganik azot kaynağı olarak % 0,2 sodyum nitrat çözeltisinin en etkili olduğu saptanmıştır. Bazı metal iyonları ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) ve surfaktanlar (Tween 80, SDS, Triton X-100) proteaz üretimi için uyarıcı bir etkiye sahiptir. Proteaz üretimi için etken süreçlerin geliştirilmesi, alkali proteazların endüstride birçok alanda kullanılmasında etken olmuştur. Çizelge 2.4'de alkali proteazların güncel endüstriyel kullanım alanları, kaynakları ve üreticileri görülmektedir (Gupta *et al.*, 2002). Alkali proteazların yüksek pH ve sıcaklıklarda, çeşitli surfaktanların varlığında aktivite göstermeleri, bunların endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır (Kumar and Takagi 1999, Anwar ve Saleemuddin 1998).

Son yıllarda ultrafiltrasyon ve ters osmoz gibi membran prosesleri atık işleme, süt ve meşrubat endüstrilerinde büyük önem kazanmıştır. Bu süreçleri sınırlayan temel faktörler; membran tıkanmalarına bağlı olarak akış hızının azalması ve membran temizliğinin maliyeti arttırmasıdır. Enzim temelli bir basamak ile birlikte veya enzim kullanılmaksızın asit ve alkali ile membranların temizlenmesi; geleneksel temizlik uygulamalarında kullanılan ana basamaklardır. Bu amaçla kullanılan enzimler günümüzde daha çok mezofilik organizmalarından elde edilmekte, dar pH aralığında, ılımlı sıcaklıklarda çalışmakta ve deterjanlara karşı toleransları sınırlı olmaktadır. Buna karşın alkali proteazlar yüksek pH ve sıcaklıklarda, sürfaktanlar ve kaotropik ajanların varlığında optimal aktivite göstermekte ve bu özellikleri onları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır.

Çizelge 2.4 Bakteriyel alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve üreticileri (Gupta *et al.* 2002)

Üretici	Ürün ismi	Mikrobiyal kaynak	Uygulama alanı
Novo Nordisk, Danimarka	Alcalase Savinase Esparase Biofeed pro Durazym Novozyme 47 1 MP Novozyme 243 Nue	<i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>B. lentus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp. Belirtilmiyor <i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp.	Deterjan, ipek Deterjan, tekstil Deterjan, gıda, ipek Yem Deterjan Fotoğraf Deri
Genencor International, A.B.D.	Purafact Primatan	<i>B. lentus</i>  Bakteriyel kaynaklı	Deterjan Deri
Gist-Brocades, Hollanda	Subtilisin Maxacal Maxatase	<i>B. alcalophilus</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	Deterjan Deterjan  Deterjan
Solvay Enzymes, Almanya	Opticlean Optimase Maxapem HT-proteolytic Protease	<i>B. alcalophilus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp.'nin protein mühendisliği ile üretilmiş varyantı <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	Deterjan Deterjan Deterjan Alkol, içki, ekmek, yem, gıda, deri, fotoğrafik atık Gıda, atık
Amano Pharmaceuticals, Japonya	Proleather Collagenas Amano protease S	<i>Bacillus</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	Gıda Teknik Gıda
Enzyme Development, A.B.D.	Enzeco alkaline protease Enzeco alkaline protease-L FG Enzeco high alkaline protease	<i>B. licheniformis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp.	Teknik Gıda Endüstriyel

Çizelge 2.4 Bakteriyel alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve üreticileri (Gupta *et al.* 2002) (devam)

Nagase Biochemicals, Japonya	Biopraxe concentrate Ps. Protease Ps. Elastase Cryst. Protease Cryst. Protease Biopraxe Biopraxe SP-10	<i>B. subtilis</i> <i>P. aeruginoso</i> <i>P. aeruginoso</i> <i>B. subtilis(K2)</i> <i>B.</i> <i>subtilis(bioteus)</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>	Kozmetik, farmasötik  Araştırma Araştırma Araştırma Araştırma Deterjan, temizlik Gıda
Jodo Shusei, Japonya	Codo Bap	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, gıda
Rohm, Almanya	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Gıda
Wuxi Synder Bioproducts, Çin	Wuxi	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan
Advance Biochemicals Hindistan	Protosol	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjan

Bütün bunların yanında, proteazların peptid sentezinde ve protein işlenmesinde kullanılmalarının çok sayıda avantajı vardır. Proteazlar genel olarak akışkan olmayan ortamlarda çok düşük hızda reaksiyon verirler veya inaktive olurlar, bu nedenle kullanılan çözücüye dirençli proteazların araştırılması güncel bir çalışma alanıdır. Enzimleri organik çözücülerin içerisinde kararlı kılmak üzere, kimyasal modifikasyon, immobilizasyon, protein mühendisliği ve yönlendirilmiş evrim gibi çeşitli fiziksel, kimyasal ve moleküler yöntemler ve rekombinant DNA teknikleri kullanılabilir. Son yıllarda organik çözücülere dayanıklı bazı mikroorganizmalar rapor edilmiş ve bu organizmaların organik çözümlerde çalıştığı saptanmıştır (Gupta *et al.* 2005).

#### 2.4.1 Süt teknolojisinde alkali proteazlar

Laktik asit bakterileri, süt teknolojisinde peynir ve süt ürünlerinin yapımında çok önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur (Thomas and Mills 1981). Bu bakteriler sütte bulunan kazeinin peptit bağlarının kırarak kazeinin pıhtılaşmasını ve buna bağlı olarak peynirin oluşumunu sağlarlar. Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde süütün asitlenmesi ile peynirin olgunlaşmasında işlevseldir ve özgün lezzetin oluşumuna da

katkıda bulunurlar. Bakterilerin bu iki işlevi için proteolitik aktivite temeldir. Peynir endüstrisindeki önemleri nedeni ile son yıllarda fermentasyon bakterileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Laktik asit bakterileri başka besinlerin fermentasyonu ve fermentasyon için uygun ortamın oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Proteazlar ayrıca gıda sektöründe bebek maması, diyet ürünleri, meyve suyu v.b. ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Anwar and Saleemuddin 1998).

#### **2.4.2 Atık arıtımı ve dönüşümü**

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır, bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir.

Alkalin proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmaktadır, filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemden proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler üzerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile, üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmakta, proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir (Anwar and Saleemuddin 1998).

#### **2 4.3 Deri endüstrisinde proteazlar**

Deri endüstrisinde enzim kullanımı ile hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu süreç, geleneksel olarak kullanılan, derilerin kireç ve

sodyum sülfid ile işlenmesinin yerini almaktadır. Ayrıca kimyasalların kullanıldığı klasik yöntem pahalı ve çevreye zararlı olduğundan, günümüzde deri sanayinde enzimlerin kullanılması tercih edilmektedir. Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkali proteazlar daha kaliteli deri üretimine olanak sağlamaktadır. Bu uygulamada, deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı bir deri yüzeyinin elde edilmesi sağlanmaktadır (Anwar and Saleemuddin 1998).

#### **2.4.4 Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar**

Uzun yıllardan beri bazı enzimler alkali pH'da çalışabildikleri için deterjan endüstrisinde de kullanılmaktadır. Deterjanlar proteaz, amilaz, lipaz gibi farklı enzimler içerir ve deterjan katkı maddesi olarak farklı enzimlerin kullanılması protein içerikli lekelerin yanı sıra, nişasta ve karbohidrat lekelerinin de çıkarılmasına olanak sağlar. Enzimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasında etken olan başlıca özellikler; alkali pH'da çalışmaları ve deterjanlarla uyumlu olmalarıdır. Daha iyi temizleme performansı ve düşük maliyet, proteazların deterjan endüstrisinde kullanımını yaygınlaştırmıştır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlar çoğunlukla *Bacillus* proteazlarıdır.

Deterjan endüstrisinde genellikle subtilisinler kullanılmaktadır. Subtilisinler katalitik mekanizmaları gözetilerek alkali proteazlar olarak tanımlanırlar. Aminoasit dizileri ve üçboyutlu yapıları diğer serin proteazlardan farklıdır. Subtilisinlerin katalitik üçlü yapıları aspartik asit, histidin ve serin içermektedir. Subtilisinlerin molekül ağırlıkları 18-90 kDa arasında değişmekle birlikte, deterjanlarda kullanılanlar genellikle 27 kDa büyüklüğündedir. Subtilisinlerin başarılı kullanımının temelinde, yüksek sıcaklıklardaki kararlılık ve yüksek substrat özgülülüğü gibi nitelikleri yatmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise, oldukça kısa sürede üretilebilmeleridir. Bu proteazlar her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmakta; işlevleri kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin azaltılmasını sağlamaktadır (Maurer 2004).

İdeal deterjan enzimi, yüksek pH da ve 65 °C sıcaklıklarda çalışmalı ve deterjanın daha kısa sürede bozulmasına neden olan oksitlenmeye karşı dayanıklı olmalıdır. Ayrıca deterjan çözeltisi içinde düşük miktarlarda bile etkili olmalı ve substrat özgüllüğü yönünden geniş olmalıdır. Bu bağlamda günümüzde deterjan sanayinde kullanılan proteazlar, pH 8-10 değerleri arasında etkili ve protein lekelerine özgül olmalıdır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Mikroorganizmalar**

Bu çalışmada çeşitli araştırmalarda değişik ekstrem termofil kaynaklardan izole edilmiş olan 20 anaerobik bakteri izolatu ve ayrıca çeşitli ekstrem bölgelerden edinilen 16 yeni izolat kullanılmıştır. Yeni izolatlar, Techirgiol (Köstence, Romanya) şehrindeki çamur banyolarından, Adana'da faaliyet gösteren bir gıda işletmesinin atık sularından ve farklı kaplıca sularından elde edilmişlerdir. Toplam 36 izolat 3 g/L yağsız süt içeren Horikoshi-I katı besiyerine (pH 8.0), anaerobik koşullarda aşılandıktan sonra, içlerinden koloniler etrafında en geniş çaplı şeffaf bölge oluşturanlar belirlenmiştir. Buna dayanarak en yüksek alkali proteaz aktivite potansiyeli göstermiş olan Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatları üzerinde çalışma yürütülmesine karar verilmiştir. Ç izolatu, Raman'da (Batman) bulunan petrol kuyularından, RÇ<sub>3</sub> izolatu ise Techirgiol (Köstence, Romanya)'da bulunan kaplıca çamur örneklerinden izole edilmiştir. Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatları termofilik anaerobik, çubuk şeklinde, sporsuz, gram negatif, sırasıyla 65°C sıcaklıkta, pH 9.0'da ve 55°C'de, pH 9.5'te optimum gelişme gösterebilen iki suştur. Kùltürler, -65°C sıcaklıkta, gliserin (%20 v/v) içinde saklanmıştır.

#### **3.2 Mikroorganizma Gelişmesinde Kullanılan Besiyeri**

Horikoshi-I besiyeri: Bileşiminde (g/L damıtık su olarak) glikoz 10 g/L, maya özütü 5 g/L, pepton 5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 g/L içeren besiyeri (Horikoshi, 1996) mikroorganizmaları çoğaltmak için kullanılmıştır. Uygulamada Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ayrı sterilize edilmiş ve besiyerin pH değeri 9 olacak şekilde aseptik olarak ilave edilmiştir.

Besiyeri, sterilizasyon öncesi, bir redoks indikatörü olan resazurinden kaynaklanan mavi renk pembeye dönüşünceye kadar kaynatılmış, N<sub>2</sub> atmosferi altında soğutulmuş ve Hungate tüplerine (Bellco Inc.) 10 mL olarak dağıtılmıştır. Daha sonra tüpler 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.



### **3.3 Mikroorganizmaların Geliştirilmesi ve Muhafazası**

Bakteri izolatları, Horikoshi-I sıvı besiyerinde Ç izolatının 65°C ve RÇ<sub>3</sub> izolatının 55°C sıcaklıkta geliştirilen kültürlerinin anaerobik ortamda (Glove Box) petri kutularındaki Horikoshi-I katı besiyerine yayılması ve anaerobik ortamda 72 saatlik inkübasyondan sonra oluşan kolonilerin sıvı besiyerine aktarılması ile elde edilmiştir. Sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler her üç günde bir taze besiyerine aktarılarak çalışma süresince aktif halde oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

### **3.4 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi**

Mikroorganizmaların gelişmesi O.D. (optik yoğunluk) ve pH değerlerindeki değişim ile izlenmiştir. 20 mL'lik Hungate tüplerindeki 10 mL besiyeride, Ç izolatı 65°C'de 24 saat ve RÇ<sub>3</sub> izolatı da 55°C'de 32 saat süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra kültürler 50 mL besiyeri içeren 100 ml'lik serum şişelerine %10 (v/v) oranında inoküle edilmiş ve tekrar 65°C ve 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Serum şişelerindeki kültürlerden belirli aralıklarla alınan örneklerin optik yoğunluk değerleri 600 nm'de spektrofotometre (Shimadzu UV- 1208) ile, besiyeri tanık olarak kullanılarak ölçülmüştür. pH değişimi ise pH metre (GP-353 ATC) ile yapılmış, optik yoğunluk ve pH değerleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri oluşturulmuştur.

### **3.5 Protein Tayini**

Gelişen bakteri kültürün protein miktarı belirli aralıklarla alınan 1,5 mL'lik örneklerin 10.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmesiyle (Heraus Biofuge B) elde edilen kaba enzim sıvısında toplam protein miktarı, Lowry (1951) yöntemine göre saptanmış, sonuçlar 0-400 µg/mL BSA (sığır serum albumini) kullanarak hazırlanan standart eğriye göre değerlendirilmiştir.

### 3.6 Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Geliştirilen bakteri süspansiyonundan belirli aralıklarla alınan 1.5 mL'lik örneklerin 10.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmesi ile (Heraus Biofuge B) elde edilen berrak sıvı, hücre dışı enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi için izlenen yöntem aşağıda basamaklar halinde açıklanmıştır.

- 0,5 mL örnek eppendorf tüpüne alınarak üzerine 0.5 mL 0,1M Glisin-NaOH tamponu ( pH 9.0 ) içinde çözülmüş 0,5%'lik azokazein eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır.
- Örnek, Ç izolatu için 70°C, ve RÇ<sub>3</sub> izolatu için 60°C sıcaklıkta su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiş,
- Süre sonunda 0,5 mL TCA çözeltisi (15 g/L) ilave edilerek vorteks ile iyice karıştırılmış ve bu işlem sonunda 15 dakika buz banyosunda bekletilmiştir.
- Eppendorf tüp içindeki örnek 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş.
- Örnek içermeyen 0,5 mL saf su ile hazırlanan tanığa karşı spektrofotometrede A<sub>420</sub> okunmuştur.

Enzim aktivitesi üç paralel olarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

Bir alkali proteaz enzim ünitesi ( 1U), 1 dakikada 1 µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış ve aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{Serbestleşen tirozin (µg)}}{\text{Kullanılan Enzim Hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dak)}}$$

Proteolitik aktiviteyi belirlemek amacıyla, kullanılan tirozin standardını hazırlamak için 0.1 M Glisin-NaOH tamponu (pH 9.0) içinde çözülmüş L-tirozin dilüsyonları kullanılarak aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

- 0-800 µg/mL L-tirozin dilüsyonların çözeltileri iki set halinde hazırlanmış.
- Örnekler spektrofotometrede köre (tirozin içermeyen buffer) karşı ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir.
- Her iki setin absorbans değerlerinin ortalaması alınarak L-tirozin miktarlarına (apsis) karşı ortalama absorbans değerlerinin (ordinat) yerleştirilmesi ile elde edilen grafikten, eğim hesaplanmış ve örneklerde proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

### **3.7 Farklı Karbon Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Alkali Proteaz Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Farklı karbon kaynaklarının etkilerinin belirlenmek amacıyla, Horikoshi-I besiyerindeki 10 g/L glikoz yerine aynı oranda galaktoz, maltoz, ksiloz, ksilan, fruktoz, rafinoz, sellobiyoz, arabinoz, riboz, mannoz, sakkaroz, melizitoz, laktoz, dekstroz, trehaloz, melibiyoz, nişasta ilave edilerek hazırlanan besiyerleri Hungate tüplerine 10 mL'lik hacimlerde dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarını içeren besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden elde edilen örneklerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri belirlenmiş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen enzim çözeltilisinden, proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

### **3.8 Farklı Azot Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Alkali Proteaz Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi**

Bu amaçla, Horikoshi-I besiyerindeki toplam 10 g/L pepton ve maya özütü yerine organik azot kaynağı olarak aynı oranda kazein hidrolizati, yağsız soya unu, tripton, sığır eti özütü (meat extract), pepton ve kazein karışımı (5 g/L + 5 g/L) ve inorganik azot kaynağı olarak amonyum nitrat, amonyum klorid, amonyum sülfat, sodyum nitrat, potasyum nitrat, 5 g/L oranda ilave edilmiştir.

Farklı azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden alınan örneklerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri belirlenmiş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen hücresiz ekstraktan, proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

### **3.9 Farklı Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Bu amaçla, Horikoshi-I besiyerinde 0.2 g/L yerine 0.1 g/L ve 1 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  kullanılarak kültür geliştirilmiş ve proteaz aktivitesi üzerine etkisi saptanmıştır. Aynı şekilde  $KH_2PO_4$  bileşiğinin konsantrasyonu 1 g/L'den 0.5 ve 2 g/L'ye değiştirilerek bunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ayrıca Horikoshi-I besiyeri Tween 80 (0.25 g/L) ve  $CaCl_2$  (0.1 g/L ve 1 g/L) ilavesiyle zenginleştirilerek, enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

### **3.10 Optimum Reaksiyon Sıcaklığının ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi**

Optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için alkali proteaz aktivitesi 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C sıcaklıklarda ölçülmüştür. Ölçülen proteaz aktivitesi sonuçlarına göre enzim için optimum reaksiyon sıcaklığı belirlenmiş ve daha sonra yapılan enzim özellikleri belirleme çalışmalarındaki aktivite testleri bu sıcaklıkta yapılmıştır.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi amacı ile Ç izolatı 70°C ve 80°C'de, RÇ<sub>3</sub> izolatı ise 65°C ve 75°C sıcaklıklarda 120 dakika inkübe edilip, inkübasyon sırasında belirli aralıklarla alınan örnekte proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca kaba enzim sıvılarına 5 mM  $CaCl_2$  ilave edilerek aynı sıcaklıklarda 120 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonundaki aktivite hesaplanmıştır.

### **3.11 Optimum pH ve pH Kararlılığının Belirlenmesi**

Enzimin optimum reaksiyon pH'sının belirlenmesi amacıyla pH 6.0, 7.0 ve 8.0 değerleri için 0.1 M sodyum fosfat, pH 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 değerleri için 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0,

10.0, 10.5, 11.0 değerleri için 0.5% azokazein içeren 0.1 M Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılmıştır. Bu çalışmada daha önce belirlenmiş olan optimum reaksiyon sıcaklığı değeri uygulanmıştır.

Enzimin pH kararlılığını belirlemek için enzim farklı pH'lardaki tamponlarla reaksiyon karışımında  izolatı için 70°C'de, ve R<sub>3</sub> izolatı için 65°C sıcaklıkta 2 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek için kalan oransal aktivite, optimum reaksiyon pH'ında aktivite değerleri 100 kabul edilerek belirlenmiştir.

### **3.12 Metal İyonlarının Alkali Proteaz Aktivitesine Etkisi**

Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada belirli iyonların klorla oluşturduğu tuzlar ile, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl gibi, çözelti hazırlanmıştır. 2 mM ve 10 mM son konsantrasyondaki metal çözeltileri, kaba enzim üst sıvısı ile inkübe edilmiştir. Enzim-metal çözeltisi karışımları,  izolatı için 70°C ve R<sub>3</sub> izolatı için 65°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Metal özeltisi içermeyen tampon çözeltisi, kontrol rneği olarak kullanılmıştır.

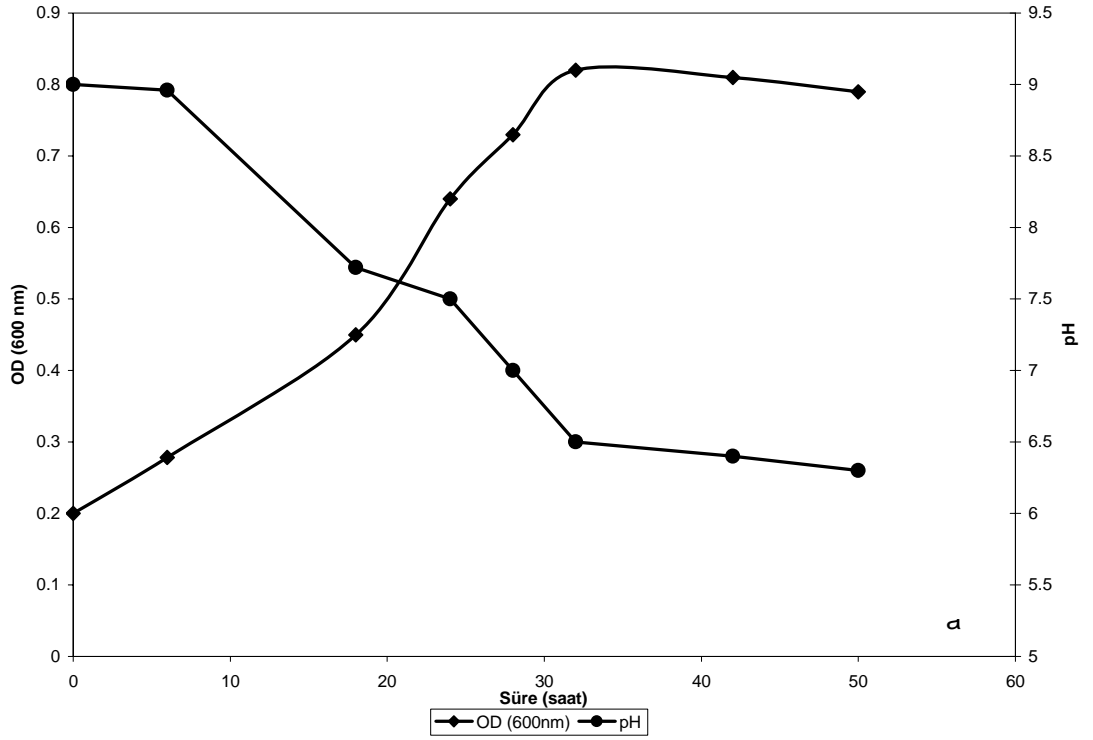
### **3.13 Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada metallo proteaz inhibitörü olarak etilendiamintetraasetik asit (EDTA), serin proteaz inhibitörü olarak fenil metil sülfonil florid (PMSF), oksidasyon aracı olarak da hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanılmıştır. EDTA ve PMSF için 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için %5 ve %15 h/h son konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Hazırlanan rnekler  izolatı için 70°C ve R<sub>3</sub> izolatı için 65°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir. İnhibitör içermeyen tampon çözeltisi kontrol rneği olarak kullanılmıştır.

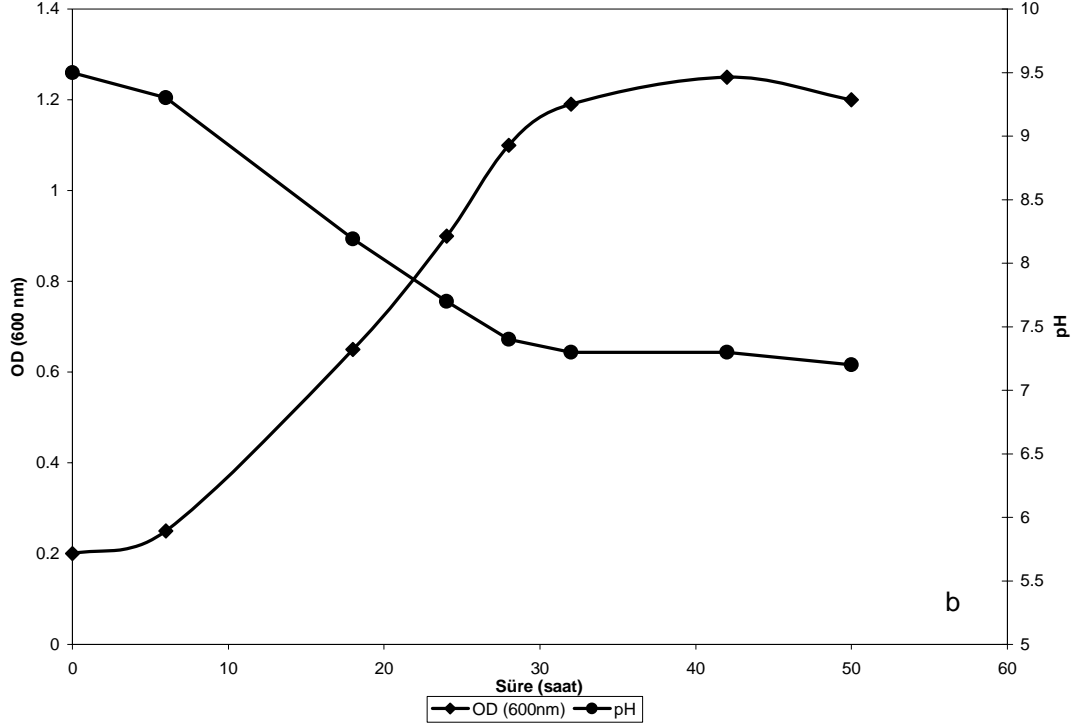
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Mikroorganizmaların Çoğalmalarının İzlenmesi

Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatları, saflık kontrolü için, Horikoshi-I katı besiyerinde geliştirildikten sonra oluşan kolonilerden alınan örnekler sıvı besiyerine aktarılmıştır. Mikroorganizmaların gelişimlerinin izlenmesi amacıyla Ç bakteri izolatu 65°C, RÇ<sub>3</sub> izolatu ise 55°C sıcaklıkta Horikoshi-I besiyerinde geliştirilmiş ve belirli sürelerde alınan örneklerin optik yoğunluğu ve pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular grafiklenerek Şekil 4.1’de ve Şekil 4.2’de verilmiştir.



**Şekil 4.1** Ç izolatının 65°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki optik yoğunluk (OD) ve pH değişimi



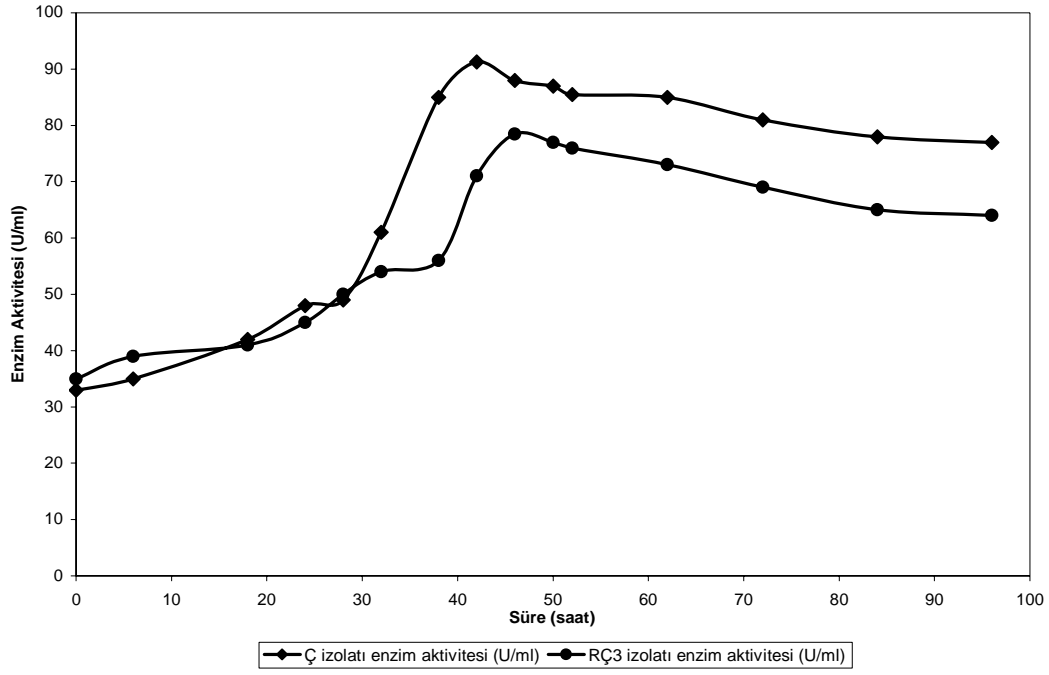
**Şekil 4.2** RÇ<sub>3</sub> izolatının 55°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki optik yoğunluk (OD) ve pH değişimi

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’den anlaşıldığı gibi, Ç izolatı logaritmik gelişimini inkübasyonun 32. saatte tamamlarken, RÇ<sub>3</sub> izolatı ise 42. saatte gelişmesini tamamlanmış ve bu süre sonunda durağan evreye geçmiştir. Gelişme sırasında alınan örneklerden pH değişimi kaydederek, Ç izolatın geliştiği besiyerin başlangıçta 9.0 civarında olan pH değeri inkübasyonun 50. saatinden sonra yaklaşık 6.3’e, RÇ<sub>3</sub> izolatı besiyerinin ise başlangıçta 9.5 olan pH değeri, 7.1 değerine kadar azalmıştır.

RÇ<sub>3</sub>’nin gelişimi, Ç’ye göre daha yavaş gerçekleşmiş fakat daha yüksek bir optik yoğunluk göstermiştir. Ç için 32. saatte 600 nm’de ölçülen en yüksek optik yoğunluk değeri 0.82, RÇ<sub>3</sub> için ise 42. saatte 1.25 olarak ölçülmüştür.

## 4.2 Mikroorganizmaların Enzim Aktiviteleri

Proteaz aktivitelerinin ölçülmesi amacıyla, Ç izolatu 65°C’de, RÇ<sub>3</sub> ise 55°C’ sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla alınan örneklerde hücre gelişimi (OD<sub>600</sub>), enzim aktivitesi (OD<sub>420</sub>) ve protein (OD<sub>660</sub>) tayini yapılmış, elde edilen bulgular grafiklenerek Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3** Ç (-♦-) izolatının 65°C’de ve RÇ<sub>3</sub> (-●-) izolatının 55°C’de Horikoshi-I besiyerinde inkübasyon sırasındaki alkali proteaz aktiviteleri

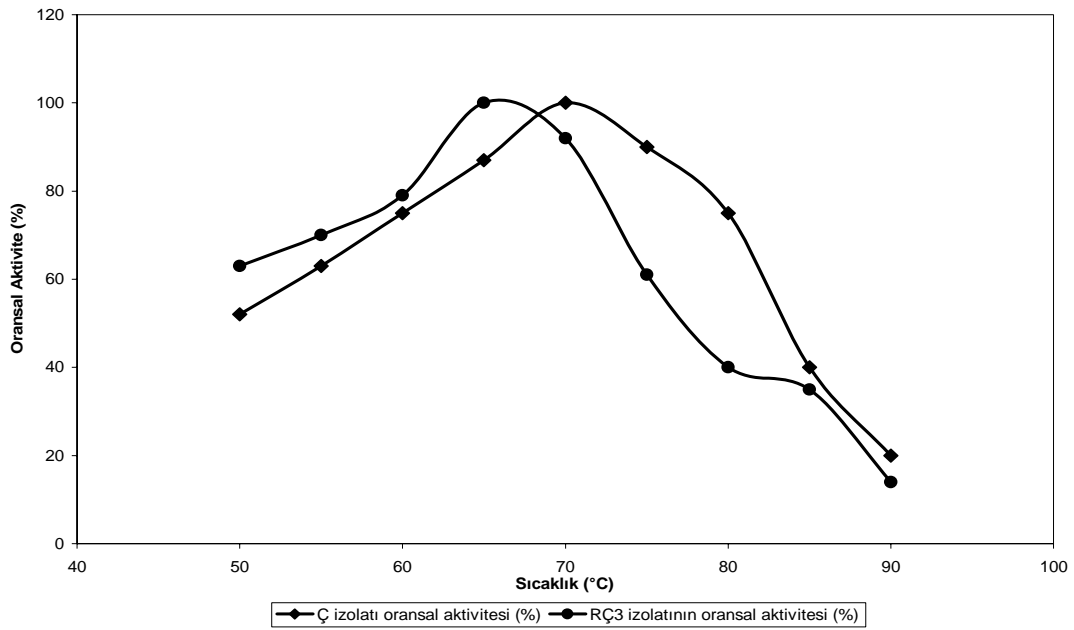
Şekil 4.3’de görüldüğü gibi, Ç izolatının inkübasyonunda logaritmik evrenin ilk saatleri boyunca önemli bir artış gözlenmemiştir. İnkübasyonun 42. saatinde, yani durağan evrenin son saatlerinde en yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir ve alkali proteaz değeri 91.3 U/ml olarak hesaplanmıştır. Bu süreden sonra durağan evre süresince enzim aktivitesinde düşüş kaydedilmiştir. Toplam protein miktarı 4.88 mg/ml olmuş ve bundan hesaplanan spesifik aktivite 18.70 U/mg protein olarak belirlenmiştir.



RÇ<sub>3</sub> izolatın enzim aktivitesi logaritmik evre süresince artmış ve en yüksek değeri 46. saatte, 78.5 U/ml olarak durağan evrede ölçülmüş ve giderek azaldığı gözlenmiştir. Toplam protein miktarı 4.43 mg/ml bulunup, alkali proteaz spesifik aktivitesi 17.72 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

### 4.3 Enzimin Optimum Reaksiyon Sıcaklığı

Alkali proteazın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C sıcaklıklarda proteaz aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.4’de gösterilmiş, oransal aktiviteler, en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.



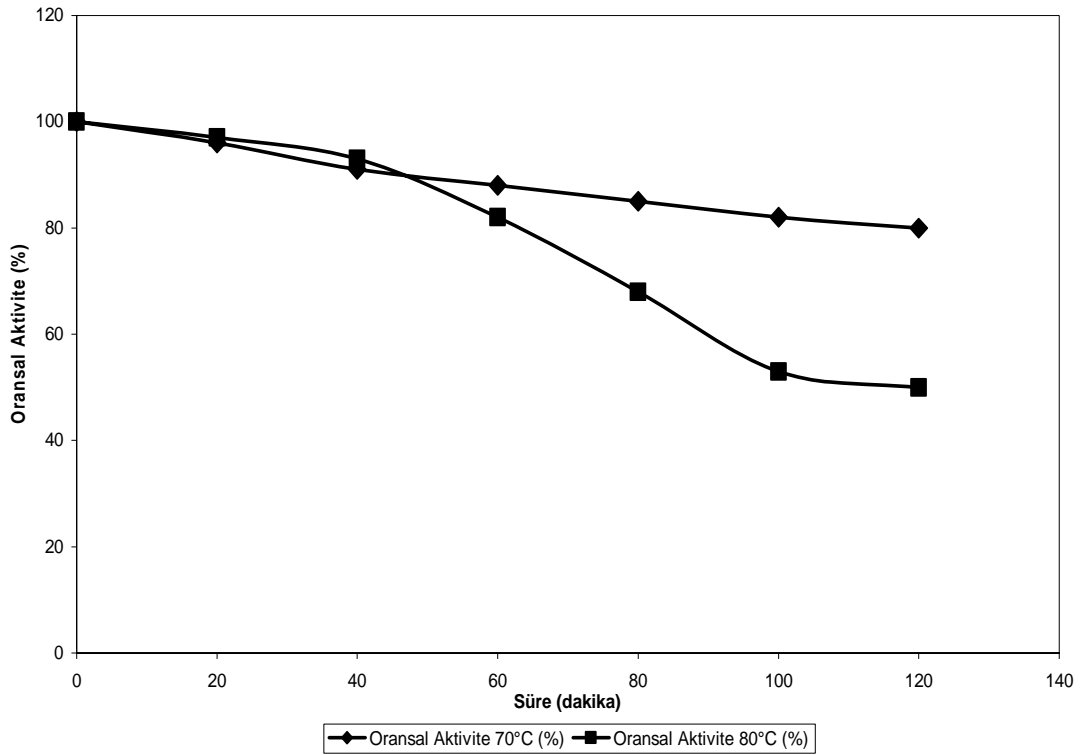
**Şekil 4.4** Ç (-♦-), RÇ<sub>3</sub> (-●-) izolatlarının alkali proteazlarının farklı sıcaklıklardaki oransal aktiviteleri

Şekil 4.4’te görüldüğü gibi Ç izolatın enzim aktivitesinin 50-70 °C değerleri arasında artış gösterdiği, 70°C’de maksimum düzeye ulaştığı ve 75°C’de oransal aktivitenin % 90’ını, 80°C’ta yaklaşık %75’ini, 85°C’ta % 40’ını, 90°C’ta yaklaşık % 20’sini koruduğu gözlenmiştir. RÇ<sub>3</sub> izolatın enzim aktivitesi ise 65°C’ye kadar sıcaklık artışı ile

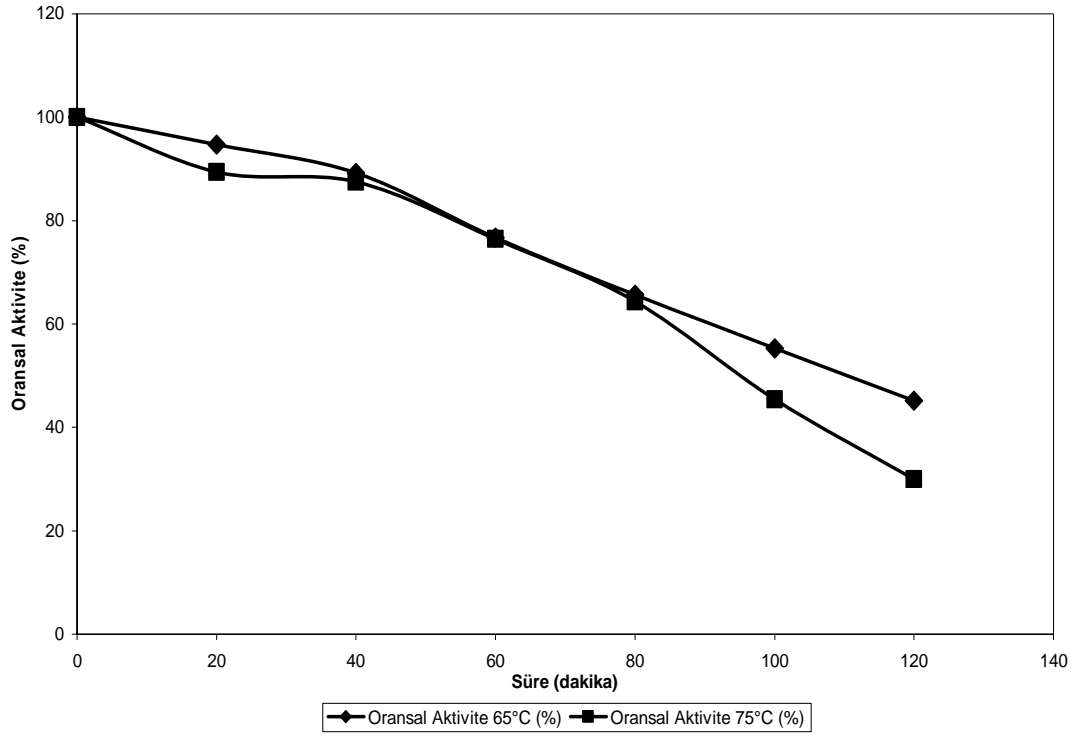
orantılı olarak artmış, 65°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise düşüş gözlenmiş, 90°C'ya kadar oransal aktiviteleri sırasıyla %92, %61, %40, % 35, %14 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.4 Enzimin Sıcaklık Kararlılığı

İzolatların ürettiği alkali proteazların sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için enzim sıvıları, belirlenen sıcaklıktaki su banyosunda 2 saat süre ile inkübe edilmiş ve her 20 dakikada bir alınan örneklerde aktivite ölçülerek sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.5'de ve Şekil 4.6'da gösterilmiş, oransal aktivite, en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.



**Şekil 4.5** Ç izolatının ürettiği alkali proteazın 70°C (-♦-) ve 80°C (-■-) sıcaklıklarda ve pH 9.0'da sıcaklık kararlılığı



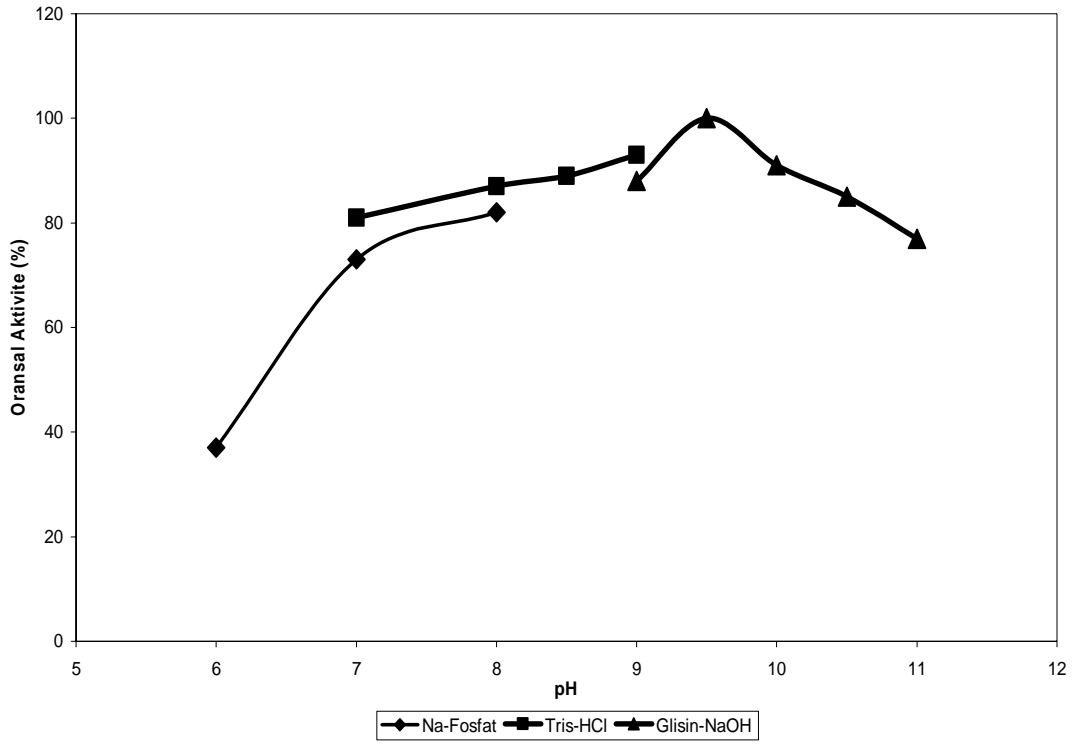
**Şekil 4.6** RC<sub>3</sub> izolatının ürettiği alkali proteazın 65°C (-♦-) ve 75°C (-■-) sıcaklıklarda ve pH 9.0’da sıcaklık kararlılığı

Ç izolatının ürettiği alkali proteazın 70°C sıcaklıkta, 2 saat inkübasyon sonucunda etkisinin %20’sini, 80°C sıcaklıkta ise yaklaşık %50’sini kaybettiği belirlenmiştir. Kaba enzim sıvılarına 5mM CaCl<sub>2</sub> ilave edildiğinde 70°C sıcaklıkta kalan aktivite değeri %96 olarak belirlenmiş, 80°C’de ise kalan aktivite %72 olarak hesaplanmıştır. RC<sub>3</sub> izolatının ürettiği alkali proteazın ise 65°C’de inkübasyon sonucunda etkisinin %55’ini, 75°C sıcaklıkta ise yaklaşık %70’ini yitirdiği belirlenmiştir. 5mM CaCl<sub>2</sub> ilave edildiğinde 65°C sıcaklıkta kalan aktivite değeri %88, 75°C sıcaklıkta ise kalan aktivite değeri %82 olarak hesaplanmıştır.

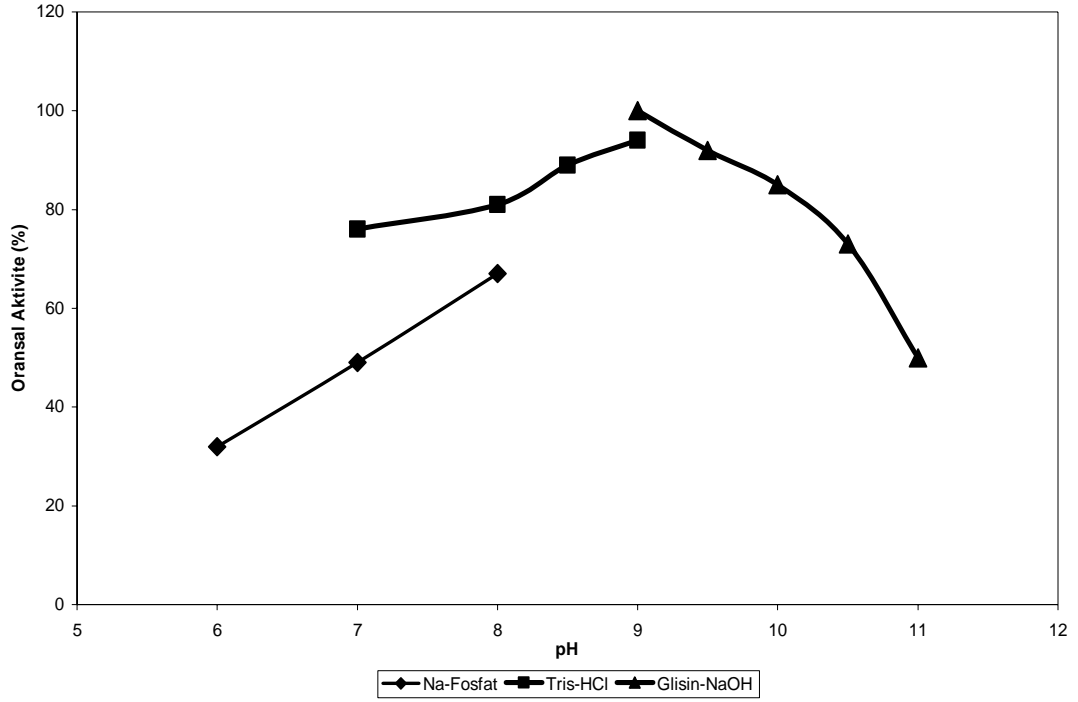
#### 4.5 Enzimin Optimum Reaksiyon pH’sı

Alkali proteazın optimum reaksiyon pH’sını belirlemek amacıyla, farklı pH değerleri için hazırlanan farklı tamponlardaki %0.5 azokazein substrat olarak kullanılarak,

aktiviteleri saptanmıştır. Enzimin pH 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0'daki aktiviteleri belirlenerek, optimum reaksiyon pH'sı Ç izolatu için 9.5, RÇ<sub>3</sub> izolatu için de 9.0 olarak bulunmuştur. Enzim pH 8-10.5 aralığında genel olarak Ç izolatu için % 85'in üzerinde ve RÇ<sub>3</sub> izolatu için yaklaşık %75 aktivite göstermiştir. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'deki oransal aktivite grafikleri, Ç izolatu için pH 9.5'da, ve RÇ<sub>3</sub> izolatu için pH 9.0'da enzim aktivitesi %100 kabul edilerek çizilmiştir.



**Şekil 4.7** Ç, izolatu alkaline proteazının farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri (tamponlar ◆ 0.1 M Na-Fosfat, ■ 0.1 M Tris-HCl, ▲ 0.1 M Glisin-NaOH)

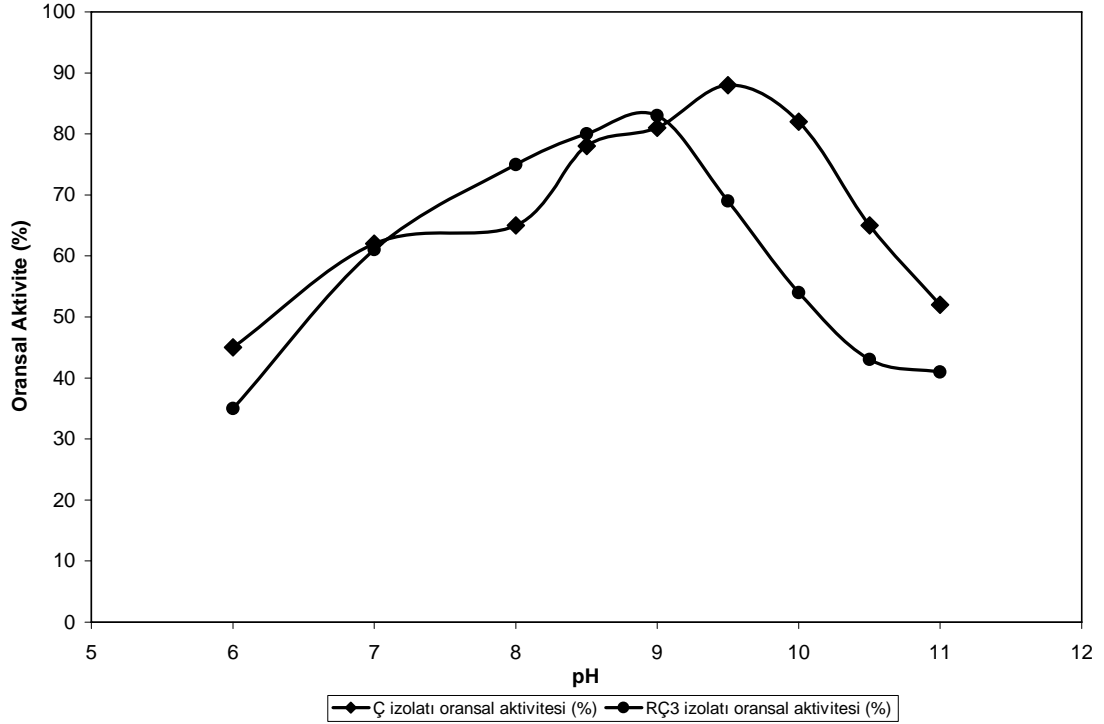


**Şekil 4.8** RÇ<sub>3</sub> izolatının alkali proteazının farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri (tamponlar ♦ 0.1 M Na-Fosfat, ■ 0.1 M Tris-HCl, ▲ 0.1 M Glisin-NaOH)

#### 4.6 Enzimin pH Kararlılığı

Enzim farklı pH'lardaki (6.0-11.0) tamponlar içinde oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra Ç izolatı için 70°C'de ve RÇ<sub>3</sub> izolatı için 65°C sıcaklıkta inkübasyondan sonra kalan aktivite standart koşullarda ölçülerek Şekil 4.9'da verilen pH kararlılık grafiği oluşturulmuştur.

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi Ç izolatı için pH 9.5'te enzim aktivitesinin %12, pH 10.5'de ise %35 oranında azaldığı, RÇ<sub>3</sub> izolatı için ise aktivitenin pH 9.0'da %17, pH 10.0'da %46 oranla azaldığı saptanmıştır.



**Şekil 4.9** Ç (-♦-) izolatının 70°C ve RÇ<sub>3</sub> (-●-)izolatının 65°C sıcaklıklarda, pH 6-11 arasındaki pH kararlılığı

#### 4.7 Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, galaktoz, maltoz, ksiloz, ksilan, fruktoz, rafinoz, sellobiyoz, arabinoz, riboz, mannoz, sakkaroz, melizitoz, laktoz, dekstroz, trehaloz, melobiyoz, nişasta içeren besiyerlerinde, bakterilerin optik yoğunluğu ile belirlenen çoğalma ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Glikozlu ortamda geliştirilen bakterinin alkali proteaz aktivitesini 100 olarak kabul ederek, elde edilen bulgular oransal aktivite olarak değerlendirilmiş ve Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelgeden anlaşıldığı gibi, Ç izolatu, maltoz, sakkaroz, dekstroz ve nişasta içeren besiyerlerinde, diğerlerine oranla daha yüksek alkali proteaz aktivitesi göstermiştir. En yüksek oransal enzim aktivitesi maltoz ve nişastalı besiyerlerinde sırasıyla %152 ve %135 olarak hesaplanmıştır. Galaktoz, fruktoz, riboz, mikroorganizma gelişimini olumlu yönde etkilerken enzim aktivitesini azaltmış, dekstroz ve nişastalı besiyerlerinde düşük olan çoğalmaya karşın, yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Buna karşın ksilan,

arabinoz, mellobiyozlu içeren ortamlarda en düşük gelişme ve oransal alkali proteaz aktivitesi sırasıyla %37, %42, %52 olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.1** Ç ve RÇ3 izolatlarının, farklı karbon kaynağı içeren Horikoshi-I besiyerlerindeki gelişme ve alkali proteaz aktiviteleri

Karbon Kaynağı	Ç			RÇ3		
	Gelişme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (%)	Oransal Aktivite (%)	Gelişme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (%)	Oransal Aktivite (%)
Kontrol	0.822	91	100	1.254	78	100
Galaktoz	0.938	73	80	1.178	72	92
Maltoz	1.215	138	152	0.946	69	88
Ksiloz	0.848	65	71	0.289	42	54
Ksilan	0.278	34	37	0.323	45	58
Fruktoz	1.011	84	72	1.365	128	164
Rafinoz	0.348	53	58	1.287	105	135
Sellobiyoz	0.362	49	54	0.568	65	83
Arabinoz	0.287	38	42	0.539	43	55
Riboz	1.119	75	82	0.745	109	140
Mannoz	0.730	56	62	0.766	61	78
Sakkaroz	0.932	98	108	0.884	69	88
Melizitoz	0.562	49	54	0.617	52	67
Laktoz	0.875	71	78	1.482	137	176
Dekstroz	0.637	110	121	1.081	61	78
Trehaloz	0.276	55	60	0.536	33	42
Mellobiyoz	0.384	47	52	0.459	38	49
Nişasta	0.743	123	135	1.163	42	54

RÇ<sub>3</sub> izolatı, karbon kaynağı olarak laktoz, fruktoz, rafinoz içeren besiyerinde daha hızlı bir gelişme gösterirken, ksiloz, ksilan, trehaloz, mellobiyoz, melizitoz, arabinoz, sellobiyozlu ortamlarda daha yavaş bir gelişme göstermiştir. Riboz'un karbon kaynağı olduğu besiyerinde çok hızlı bir gelişme olmamasına karşın, proteaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Laktoz, fruktoz, rafinozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda hem mikroorganizma gelişmesi, hem de enzim sentezi, oransal olarak sırasıyla %176, %164, %135 olmuştur. Buna karşın, nişasta içeren ortamda daha yoğun gelişme gözlenirken, enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş (oransal aktivite %54) gözlenmiştir. En düşük oransal enzim aktivitesi trehaloz, mellobiyoz, ksiloz, nişasta ve arabinoz

içeren besiyerlerinde olmuş ve sırasıyla %42, %49, %54, %54, %55 olarak hesaplanmıştır.

#### **4.8 Farklı Azot Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi**

Horikoshi-I besiyerinde 5 g/L oranında kullanılan pepton ve 5 g/L oranında kullanılan maya özütü yerine, farklı organik (10 g/L) ve inorganik (5 g/L) azot kaynakları ilave edilip, bu besiyerlerinde geliştirilen bakterilerin, gelişimi (optik yoğunluğu) ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular oransal aktivite olarak değerlendirilerek Çizelge 4.2’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi, Ç izolatı pepton ve kazein karışımı içeren besiyerinde %155 olarak en yüksek aktiviteyi göstermiştir. İnorganik azot kaynakları (amonyum nitrat, amonyum klorid, amonyum sülfat, sodyum nitrat, potasyum nitrat), Ç izolatının gelişmesini yavaşlattığı gibi alkali proteaz aktivitesini de belirgin bir oranda ( sırasıyla %36, %27, %32, %28, %13) azaltmıştır. Kazein hidrolizatı, soya unu ve pepton-kazein karışımı Ç izolatının gelişimi olumlu yönde etkilendiği gibi, oransal enzim aktivitesi de sırasıyla %117, %132 ve %155 olmuştur. Organik azot kaynaklarından, triptonun ve sığır eti özütünün (beef extract) Ç izolatının gelişimini yavaşlattığı ve enzim aktivitesini (oransal aktivite %83 ve %34) azalttığı belirlenmiştir.

RÇ<sub>3</sub> izolatı ise, en yüksek oransal enzim aktivitesini kazein hidrolizat içeren besiyerinde %146 olarak göstermiştir. İnorganik azot kaynakları, RÇ<sub>3</sub> izolatının gelişmesini ve enzim aktivitesini önemli oranda azaltmıştır. Soya unu ve pepton-kazein karışımı, RÇ<sub>3</sub>’ün gelişimini olumlu yönde etkilediği gibi, enzim aktivitesinin de sırasıyla %139 ve %121 oranlarına yükseldiği gözlenmiştir. Diğer organik azot kaynaklarından, triptonun ve sığır eti özütünün RÇ<sub>3</sub> izolatının gelişimini yavaşlattığı ve enzim aktivitesini (oransal aktivite %54 ve % 48) azalttığı belirlenmiştir.



**Çizelge 4.2** Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının, farklı azot kaynağı içeren Horikoshi-I besiyerlerindeki gelişme ve alkali proteaz aktiviteleri

Azot Kaynağı	Ç		RÇ <sub>3</sub>	
	Gelişme (OD <sub>600</sub> )	Oransal Aktivite (%)	Gelişme (OD <sub>600</sub> )	Oransal Aktivite (%)
Kontrol (Peptone+Maya Özütü 5+5 g/l)	0.822	100	1.254	100
Amonyum Nitrat (5 g/l)	0.492	36	0.457	23
Amonyum Klorid(5 g/l)	0.527	27	0.472	29
Amonyum Sülfat (5 g/l)	0.348	32	0.323	15
Sodyum Nitrat (5 g/l)	0.472	28	0.413	18
Potasyum Nitrat (5 g/l)	0.435	13	0.392	25
Kazein hidrolizat(10 g/l)	0.930	117	1.118	146
Soya Unu (10 g/l)	1.128	132	1.344	139
Tripton (10 g/l)	0.679	83	0.905	54
Sığır Eti Özütü (10 g/l)	0.531	34	0.937	48
Pepton+Kazein (5 +5 g/l)	1.145	155	1.248	121

#### 4.9 Farklı Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Horikoshi-I besiyerinin farklı bileşiklerle zenginleştirilmesinin, enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, besiyerin bileşimindeki MgSO<sub>4</sub> ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> son konsantrasyonları değiştirilmiş, ayrıca Tween 80 ve CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek, Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının proteaz aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

Besiyerine yüzey aktif özelliği olan Tween 80 (0.25 g/L) ilavesi ile Ç izolatın enzim aktivitesinin %21 oranla yükseldiği gözlenmiştir. 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub> varlığında, enzimin oransal aktivitesinin %136'ya yükseldiği, 1 g/L CaCl<sub>2</sub> varlığında ise enzim aktivitesinin %53 oranda inhibe olduğunu belirlenmiştir. Magnezyum sülfatın (MgSO<sub>4</sub>), farklı konsantrasyonlarda (0.1 g/L ve 1 g/L) enzim sentezini etkilemediği, 2 g/L konsantrasyondaki KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'ın ilavesinin, enzimin oransal aktivitesini %108'e yükselttiği, 0.5 g/L konsantrasyonda ise, oransal aktivitenin %93 olduğu belirlenmiştir.

Besiyerinde 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile RÇ<sub>3</sub> izolatın enzimin oransal aktivitesinin %142'ye yükseldiği; 1 g/L CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile enzim aktivitesinin oransal olarak %86 olduğu

belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ilavesi ile ( 0.5 g/L ve 2 g/L) enzim sentezinin etkilenmediği gözlenmiştir (oransal aktivite %98 ve %85). 0.1 g/L  $\text{MgSO}_4$  ilavesi ile enzimin oransal aktivitesinin %78 olduğu, 1 g/L ilavesi ile enzim oransal aktivitesinin %73 olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. 0.25 g/L Tween 80 varlığında ise enzim oransal aktivitesinin % 76'ya gerilediği gözlenmiştir.

**Çizelge 4.3** Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının farklı bileşiklerin içeren Horikoshi-I besiyerindeki alkali proteazların aktivitesine etkileri

Bileşikler	Ç	RÇ <sub>3</sub>
	Oransal Aktivite (%)	Oransal Aktivite (%)
$\text{MgSO}_4$ (0.1 g/l)	84	78
$\text{MgSO}_4$ (1 g/l)	71	73
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.5 g/l)	93	98
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2 g/l)	108	85
Tween 80 (0.25 g/l)	121	76
$\text{CaCl}_2$ ( 0.1 g/l)	136	142
$\text{CaCl}_2$ ( 1 g/l)	47	86

#### 4.10 Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Bazı metal iyonlarının test edilen bakteri izolatlarının alkali proteaz aktivitesine etkilerinin belirlenmesi amacıyla kaba enzim sıvısına son konsantrasyon 2 mM ve 10 mM olacak şekilde  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  ilave edilerek enzim aktiviteleri ölçülmüş ve oransal aktivite değerleri hesaplanmıştır. Kontrol olarak kullanılan metal içermeyen enzim çözeltisinin oransal alkali proteaz aktivitesi %100 kabul edilmiştir.

Ç izolatının alkali proteaz aktivitesinde, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 2 mM  $\text{NaCl}$  ilavesi ile artış gösterdiği, bu koşulda enzim aktivitesini de %165'e artırarak en yüksek aktivatör etkisini gösteren metal iyonunun 2 mM derişiminde  $\text{Ca}^{2+}$  olduğu belirlenmiştir. 10 mM  $\text{KCl}$ , belirgin bir etki yaratmazken, 2 mM  $\text{KCl}$  ilavesi aktiviteyi yaklaşık %55'e, benzer şekilde 10 mM  $\text{NiCl}_2$ 'ün %43'e, 10 mM  $\text{FeCl}_3$ 'ün %62'ye düşürdüğü belirlenmiştir. 2 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında  $\text{CoCl}_2$ , aynı zamanda 2

mM ve 10 mM CuCl<sub>2</sub> ilavesinin, enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi yarattığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.4 Bazı metal iyonlarının Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının ürettiği alkali proteazların aktivitesine etkileri

Kullanılan Metal Tuzları	Ç		RÇ <sub>3</sub>	
	Oransal Aktivite (%)		Oransal Aktivite (%)	
	2 mM	10 mM	2 mM	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	165	112	120	81
MgCl <sub>2</sub>	123	87	87	64
MnCl <sub>2</sub>	137	98	56	47
CoCl <sub>2</sub>	55	34	125	86
ZnCl <sub>2</sub>	85	56	46	34
FeCl <sub>3</sub>	72	62	112	136
NiCl <sub>2</sub>	76	43	57	48
CuCl <sub>2</sub>	38	20	65	53
KCl	55	97	115	97
NaCl	104	93	87	123

RÇ<sub>3</sub> izolatının, alkali proteaz aktivitesinin, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM CoCl<sub>2</sub>, 2mM ve 10 mM FeCl<sub>3</sub>, 2mM KCl ilavesi ile arttığı belirlenmiştir. Enzim aktivitesini %136 oranına yükselten 10 mM derişiminde FeCl<sub>3</sub>'ün en yüksek aktivator etkiyi yarattığı gözlenmiştir. 2mM MgCl<sub>2</sub>, belirgin bir etki yaratmazken; 10 mM MgCl<sub>2</sub>'ün aktiviteyi yaklaşık %64'e düşürdüğü belirlenmiştir. 2 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ve CuCl<sub>2</sub>'ün enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi yarattığı gözlenmiştir.

#### 4.11 Bazı İnhibitörlerin ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için metalo-proteaz inhibitörü olarak etilendiamintetraasetikasit (EDTA), serin proteaz inhibitörü olarak fenil metil sülfonil florid (PMSF), oksidasyon ajanı olarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kaba enzim sıvıları 1 saat süre ve oda sıcaklığında inkübe edilerek, süre sonunda enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Ç izolatının, sırası ile 0.1, 1 ve 10 mM EDTA varlığında başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla %96, %73 ve %51'ini koruyabildiği, 0.1, 1 ve 10 mM PMSF ilavesi ile %76, %88 ve %98'e yakın oranda inhibe olduğu, %5 ve %15 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile başlangıç aktivitesinin sırasıyla %91 ve %77'sini koruduğu gözlenmiştir. 10 mM EDTA varlığında aktivitesinin yarısını kaybeden enzimin, 10 mM CaCl<sub>2</sub>+10 mM EDTA karışımının varlığında proteaz aktivitesinin %98'e yakını koruduğu kaydedilmiştir.

Çizelge 4.5 Bazı inhibitörlerin ve kimyasalların Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının alkali proteazlarının aktivitesine etkileri

Bazı İnhibitörler ve Kimyasallar	Ç Kalan Aktivite (%)	RÇ <sub>3</sub> Kalan Aktivite (%)
EDTA (0.1 mM)	96	98
EDTA ( 1 mM)	73	82
EDTA (10 mM)	51	45
10 mM CaCl <sub>2</sub> + 10 mM EDTA	98	114
PMSF (0.1 mM)	24	19
PMSF( 1 mM)	12	5
PMSF (10 mM)	2	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%5)	91	78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%15)	77	52

RÇ<sub>3</sub> izolatının ise, sırasıyla 0.1, 1, ve 10 mM EDTA varlığında enzimin başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla %98, %82 ve %45'ini koruyabildiği, 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyon PMSF varlığında sırasıyla %81, %95 ve %100'e yakın oranda inhibe olduğu, %5 ve %15 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında başlangıç aktivitesinin %78'inin ve % 52'sinin koruduğu gözlenmiştir. 10 mM EDTA ile aktivitesinin yarısından fazlasını kaybeden enzimin, 10 mM CaCl<sub>2</sub>+10 mM EDTA varlığında ise kalan aktivite değeri %114 olarak ölçülmüştür.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Alkali proteazlar deterjan ve gıda endüstrisinde, süt ürünleri ve bazı besinlerde yenilebilir tat oluşturulmasında, dericilikte kılların uzaklaştırılması ve daha pürüzsüz deri yüzeyinin elde edilmesinde ve fotoğrafçılıkta filmlerin yüzeyinde bulunan gümüşün geri kazanılmasında kullanılmaktadır (Singh *et al.* 1999). Ayrıca ilaç sanayi, fırıncılık, yakıt, hayvan yemlerinde, meşrubat, tekstil, kağıt ve kimya endüstrilerinde de kullanım alanına sahiptirler (Rao *et al.* 1998, Kumar *et al.* 1999, Kirk *et al.* 2002).

*Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermococcus*, *Anaerobranca*, *Methanothermobacter*, *Pyrococcus*, *Desulfurococcus*, *Sulfolobus* türlerine ait ekstrem alkalitermofil bazı suşların 55-90°C sıcaklıklar arasında gelişebilen, yüksek sıcaklıkta (60-125°C) stabilitesini koruyan ve mikroorganizmanın optimum gelişme sıcaklığında ve üzerindeki sıcaklıklarda maksimum aktiviteye sahip olan enzimler ürettikleri belirlenmiştir. Özellikle ekstrem termofil ve hipertermofil mikroorganizmalar tarafından üretilen proteinler, genellikle termal ve kimyasal denaturasyona karşı benzer protein yapısına sahip olan mezofilik homologlarından daha dirençli oldukları bilinmektedir (Szilagyı *et al.* 2000).

Endüstriyel alanlarda oldukça farklı sıcaklık değerlerinde aktivite gösterebilen mikrobiyal alkali proteazlar kullanılmaktadır. Geçmiş yıllarda *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoruber*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus* gibi mikroorganizmalar kullanılarak, 45-90°C sıcaklık aralığında optimal aktiviteye sahip proteazlar üretilmiştir (Haki and Rakshit 2003). Yine, *Bacillus* türlerinde yapılan çalışmalarda proteazların, pH 6.0-12.0 gibi geniş bir aralıkta aktivite gösterebildiği belirtilmiştir (Haki and Rakshit 2003).

Bu çalışmada, alkalen proteaz üreten bazı bakterilerin taranması sonucunda Horikoshi-I besiyerinde en iyi gelişme gösteren Ç ve RÇ<sub>3</sub> kodlu iki adet anaerob alkalitermofil izolatın, sırasıyla 32. ve 42. saatlerde logaritmik evreyi tamamladığı ve yoğunlukların 0.820 ve 1.250 OD değerlerine ulaştığı gözlenmiştir. RÇ<sub>3</sub> ve Ç olarak kodlanan izolatlardan Ç izolatının, RÇ<sub>3</sub> izolatına göre daha hızlı fakat daha düşük yoğunlukta

gelişme gösterdiği anlaşılmıştır. Başlangıçta yaklaşık olarak pH 9.0 olan Horikoshi-I besiyeri ortamında, Ç izolatının gelişmesine bağlı olarak 72. saatten sonra ortam pH'sının 6.3'e düştüğü, RÇ<sub>3</sub> için ise besiyerin pH'sının 9.5'ten 7.1 değerine kadar düştüğü gözlenmiştir.

Seçilen bakteri izolatlarının, proteaz aktivitelerinde inkübasyonun ilk 32. saatine kadar önemli bir artış gözlenmezken, 32. saatten sonra önemli artışlar kaydedilmiştir. Ç izolatının maksimum enzim aktivitesi, inkübasyonun durağan evresinde 42. saatte, 91.3 U/ml olarak gerçekleşmiştir. RÇ<sub>3</sub> izolatının enzim aktivitesi ise, inkübasyonun 46. saatinde 78.5 U/ml olarak en yüksek değere ulaşmıştır.

Bir alkalitermofilik bakteri olan *Anaerobranka horikoshii*'nin tanımlanması için yapılan bir çalışmada, izolatın çoğalması için optimum pH değerinin 8.5 ve optimum sıcaklığın 57°C olduğu ve bakterinin maya özütü ile yağsız süt içeren besiyerinde ekstraselüler alkali proteaz enzimi ürettiği belirlenmiştir (Engle *et al.* 1995).

Ayrı bir çalışmada, *Bacillus clausii* GMBAE 42'nin proteince zengin bir besiyerinde ürettiği alkali serin proteazın maksimum aktivitesinin, inkübasyonun durağan evresinde ve 72. saatte olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 60°C, optimum pH'sının ise 11.3 olduğu, 5 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile optimum sıcaklığın 70°C'ye çıktığı belirlenmiştir (Kazan *et al.* 2005).

Hipertermofilik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalarda, ürettikleri alkali proteazların optimum sıcaklığının 70-110°C aralığında, optimum pH'nın da 8-10 aralığında olduğu rapor edilmiştir (Leuschner *et al.* 1995). Bir *Fervidobacterium pennivorans* suşunda proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığının 80°C ve optimum pH'sının 10.0 olduğu saptanmıştır (Friedrich and Antranikian 1996, Kluskens *et al.* 2001). Aynı şekilde, *Thermococcus kodakaraensis*'in enzimi için T<sub>opt</sub> 80°C, pH<sub>opt</sub> 9.5 (Kannan *et al.* 2001), *Pyrococcus horikoshii* için T<sub>opt</sub> 95°C, pH<sub>opt</sub> 7.5 (Ando *et al.* 1999), ve *Pyrococcus abyssi* st 549 için de T<sub>opt</sub> 95°C, pH<sub>opt</sub> 9 (Dib *et al.* 1998) olarak bulunmuştur.

Fujiwara (1993), bir *Bacillus* türünün termofilik alkalifilik B18 suşundan, termofil alkalın proteaz saflaştırmıştır. Bu enzimin kazein hidrolizi için optimum pH'sının 12-13, optimum sıcaklığının ise 85°C olduğu, her iki parametrenin de diğer alkali proteazlarınkinden daha büyük olduğu gözlenmiştir. Han ve Damodaran (1998), bir *Bacillus pumilus* suşundan, %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 8 M üre çözeltisinde bile yüksek kararlılık gösteren bir ekstraselüler endopeptidazı saflaştırmış ve özelliklerini tanımlamışlardır. Bu enzimlerin bazıları, günümüzde deterjan katkısı olarak kullanılmak üzere ticarileştirilmiştir.

Takami *et al.* (1990) alkalifilik bir *Bacillus* türünden (AH-101) yeni bir alkali proteaz izole etmiş ve bu enzimin pH 12-13 arasından kazeine karşı yüksek proteolitik aktivite gösterdiğini, pH 5-13 arası ve 60°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca kararlı olduğunu bildirmiştir. Bu enzimin 5 mM CaCl<sup>2+</sup> ilavesi ile optimum sıcaklığının 80°C olduğunu belirtmiştir. Bu enzimin elastin ve keratine karşı proteinaz K ve subtilisinden daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Cheng *et al.* (1995), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan kuş tüylerini parçalayan bir keratinaz izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu enzimin pH 5-12 arasında kararlılık gösterdiği, toz haline getirilmiş kuş tüylerine karşı, optimum pH değerinin 8,5 olduğu, kazeine karşı bu değer 10,5-11,5 arasında değiştiğini açıklamışlardır.

Zaghloul *et al.* (1998), bazı toprak örneklerinden tüy parçalayan bir kaç bakteri izole ederek tanımlamışlar ve bunların keratinolitik aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, bir hipertermofil arke olan, *Pyrococcus* izolatının 65-100°C sıcaklık aralığında gelişme gösterdiği, optimum gelişme sıcaklığının 95°C olduğu belirlenmiştir. Bu anaerobik izolatın termostabil tiyol proteaz ürettiği, azokazeine karşı pH 7.0 ve 110°C'de maksimum aktivite gösterdiği, 90°C'de 2 saat ve 100°C'de 60 dakika boyunca, sıcaklık kararlılığının korunduğu açıklamıştır (Morikawa *et al.* 1994).

Alkali proteaz enzimlerinin özelliklerini belirlemek için yapılan bir başka çalışmada, *Vibrio fluvialis* VM10 suşunun proteazının pH 8.0 ve 55°C sıcaklıkta optimum aktivite

gösterdiği belirlenmiştir. Bu proteazın  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonların ile inhibe olduğu,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonları varlığında aktivitesinin arttığı ve PMSF'in serin proteazı inhibe ettiği ortaya konmuştur (Venugopal *et al.* 2005).

*Alcaligenes faecalis*'in % 0.5 peptone ve % 0.5 soya unu içeren besiyerinde, hücre gelişimine bağlı olarak ekstraselüler alkali proteaz ürettiği bildirilmiştir. Bu bakterinin logaritmik gelişimini inkübasyonun 48. saatinde tamamladığı ve maksimum alkali proteaz aktivitesin 563 U ( $\mu$ mol tirozin/dak.mg protein) olduğu saptanmıştır. Enzimin maksimum aktivite sıcaklığının  $55^{\circ}C$  ve optimum pH'sının 9.0 olduğu, enzimin PMSF (5 mM) ile tamamen ihhibe olduğu ve 2 mM  $CaCl_2$  ilavesi ile oransal aktivitesinin %124'e yükseldiği gözlenmiştir (Thangam *et al.* 2002).

Towatana *et al.* (1999) yaptıkları bir çalışmada hidrotermal kaynaklarından izole ettikleri ve  $55^{\circ}C$  sıcaklıkta gelişen alkalifilik ve termofilik bir *Bacillus* PS719 suşunun proteolitik aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuç olarak ekstraselüler proteazın, azokazein substrata karşı,  $75^{\circ}C$  sıcaklıkta ve pH 9.0'da maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin 2 mM  $CaCl_2$  varlığında %185 oranla artığı ve  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonların inhibitör olarak etkili olduğu belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans çalışmasında, bazı kaplıca çamurlarından izole edilen Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatlarının proteaz aktivitelerini nitelendirmek için optimum sıcaklıkları ve sıcaklık kararlılıkları belirlenmiştir. Ç izolatının proteazının optimum sıcaklığı  $70^{\circ}C$ , RÇ<sub>3</sub>'ün ise  $65^{\circ}C$  olduğu belirlenmiştir. Ç izolatının enzim aktivitesinin  $50-70^{\circ}C$  aralığında arttığı,  $75^{\circ}C$ 'de sıcaklıktaki aktivitenin %90'ını koruduğu ancak  $80^{\circ}C$ 'den sonra aktivitenin hızla azaldığı görülmüştür. RÇ<sub>3</sub> izolatı için ise, enzim aktivitesinin  $50-65^{\circ}C$  aralığında arttığı,  $70^{\circ}C$ 'de sıcaklıktaki aktivitenin %92'sini koruduğu ancak  $75^{\circ}C$ 'den sonra aktivitenin hızla azaldığı görülmüştür.  $70^{\circ}C$  ve  $80^{\circ}C$  sıcaklıkta (pH 9.0'da) 2 saat inkübasyon sonucu Ç izolatının proteaz aktivitesinin sırasıyla %20 ve %50 oranlarında kaybolduğu gözlenmiştir. Kaba enzim sıvısına 5 mM  $CaCl_2$  ilavesi ile, enzimin sıcaklık kararlılığının yükseldiği,  $70^{\circ}C$  ve  $80^{\circ}C$ 'deki oransal aktivitesinin %96 ve %72 olduğu belirlenmiştir. RÇ<sub>3</sub> izolatı için ise,  $65^{\circ}C$  ve  $75^{\circ}C$  aralığında (pH 9.0'da) 2 saat inkübasyon sonucu proteaz aktivitesinin sırasıyla %45 ve %70 oranlarında kaybolduğu



gözlenmiştir. Kaba enzim sıvısına 5 mM CaCl<sub>2</sub> ilave edildiğinde, enzimin sıcaklık kararlılığının yükseldiği, 65°C ve 75°C sıcaklıklarda oransal aktivitesinin sırasıyla %88 ve %82 olduğu belirlenmiştir. Son olarak, 5 mM CaCl<sub>2</sub> eklendiğinde her iki enzimin sıcaklıktaki kararlılığının arttığı saptanmıştır.

*Bacillus clausii* GMBAE 42 suşundan üretilen bir serin alkali proteazın optimum pH değerinin 11.3, optimum sıcaklığının ise 60°C olduğu, 5 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesiyle optimum sıcaklığın 70°C'ye yükseldiği bildirilmiştir. pH 10.5'ta 2 saat inkübasyon sonucunda 30°C ve 40°C sıcaklıklarda stabil olduğu, 50°C sıcaklıkta oransal aktivitesini %86 düzeyinde koruyabildiği belirlenmiştir (Kazan *et al.* 2005).

Farklı alkali proteazların geniş sıcaklık aralığında aktivite gösterebildiği bilinmektedir. Alkalofilik *Bacillus* sp. I-312 alkali proteazının optimum reaksiyon sıcaklığının 60-65°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Joo ve Chang. 2004). Yapılan bir çalışmada alkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719 suşundan elde edilen proteazın optimum reaksiyon sıcaklığının 75°C olduğu da gösterilmiştir (Towatana *et al.* 1999).

*Bacillus stearothermophilus* F1'den izole edilen proteazın, optimum pH'sının 9.0'da olduğu gösterilmiş, pH 8.0-10.0 aralığında ve 70°C'de 24 saat boyunca kararlı olduğu belirlenmiştir (Rahman *et al.* 1994).

Bu çalışmada ise, Ç izolatının proteazının optimum pH'sı 9.5 olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesinin pH 8.0-10.5 pH aralığında, %85 gibi yüksek bir stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. RÇ<sub>3</sub> izolatının optimum reaksiyon pH'sının ise 9.0 olduğu, pH 8.0-10.5 aralığında oransal aktivitenin %75 olduğu hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, alkali proteazın pH kararlılığını belirlemek amacıyla, kaba enzim sıvısı farklı tamponlarda (pH 6.0-11.0) oda sıcaklığında 2 saat bekledikten sonra, Ç izolatının pH 9.5'te enzim aktivitesinin %12, pH 10.5'de %35 oranında azaldığı, RÇ<sub>3</sub> izolatı için ise pH 9.0'da aktivitenin %17, pH 10.0'de %46 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Alkali proteazların, optimum pH aralığı genellikle 9.0-11.0 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte pH 6.0-12.5 değerleri arasında aktivite gösteren alkali proteazlar da bulunmakta olup, geniş bir pH aralığında aktivite yeteneği, alkali proteazların farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Kumar *et al.* 1999).

Ekstrem termofil arke olan *Thermococcus stetteri*'den elde edilen yüksek sıcaklıkta kararlı alkali proteazın çok geniş bir sıcaklık ve pH aralığında (50-100°C, pH 5-11) aktif olduğu belirlenmiştir. Bu enzimin 85°C ve pH 8.5-9.0 arasında, kazeine karşı optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır (Klingeberg *et al.* 1995).

Ayrıca, bir *Bacillus horikoshii*'den saflaştırılan alkali proteazın optimum pH'sı 9.0 olarak belirlenmiş ve enzimin pH 8.0-11.0 aralığında yüksek aktivite gösterdiği anlaşılmıştır (Joo *et al.*, 2002). *Bacillus* sp. AH-101 proteazının ise, pH 5.0-13.0 aralığında 60°C'de 10 dakika süreyle aktivitesini koruduğu, bu enzim için, pH 5.0-9.0 arasında %80 olan oransal aktivitesini, pH 10.0-11.5 aralığında %90 olduğu belirtilmiştir (Takami *et al.* 1988).

*Bacillus* sp. P-2'den izole edilen ve pH 9.6'da optimum aktivite gösteren termostabil alkali proteazının, pH 7.0-11.0 aralığında bu aktivitenin %80'den fazlasını koruduğu anlaşılmıştır. Optimum reaksiyon sıcaklığı 90°C olan enzimin bu sıcaklıkta bir saatten fazla stabil kaldığı gösterilmiştir. Aynı enzimin, 90°C'de bir saat inkübasyondan sonra, aktivitesinin %95'ini ve 121°C'de ise %37'sini koruduğu, *Bacillus* sp. P-2 proteazının optimum pH ve sıcaklık yönünden deterjan formülasyonlarında kullanılmak için uygun bir enzim olduğu açıklanmıştır (Kaur *et al.* 2001).

Çeşitli karbon kaynaklarının enzim üretimi ve bakteri gelişimine olan etkilerin incelendiği bu çalışmada, Ç izolatının maltoz ve nişastalı besiyerinde; RÇ<sub>3</sub> izolatının ise laktoz, fruktoz ve rafinozlu besiyerinde yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Ç izolatının, galaktoz, fruktoz ve riboz içeren besiyerlerinde hızlı bir gelişme göstermesine karşın enzim aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Dekstroz ve nişasta gelişmeyi olumlu yönde etkilememiştir, ancak proteaz sentezini yükselttiğini saptanmıştır. Ksilan, arabinoz, mellobiyoz içeren besiyerlerinde hem yavaş bir gelişme,

hem de düşük değerlerde enzim aktivitesi belirlenmiştir. RÇ<sub>3</sub> izolatının riboz içeren besiyerinde yüksek proteaz aktivitesi fakat düşük gelişme gösterdiği; nişastanın gelişmeyi artırdığı, buna karşın enzim aktivitesi azaltığı belirlenmiştir. Trehaloz, mellobiyoz, ksiloz, nişasta ve arabinoz içeren besiyerlerinde proteaz aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır.

Azot kaynaklarının enzim üretimi ve bakteri gelişimine olan etkileri incelendiğinde,  izolatının pepton ve kazein karışımı, RÇ<sub>3</sub> izolatının ise kazein hidrolizat içeren besiyerinde maksimum proteaz aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir.  izolatının kazein hidrolizati ve soya unu içeren besiyerlerinde iyi bir gelişme ve proteaz sentezi gerçekleştirdikleri gözlenmiş; tripton ve sığır eti ekstraktı (beef extract) içeren besiyerlerinde hem gelişmenin hem de proteaz aktivitesinin azaldığı; inorganik azot kaynaklarının proteaz üretimini baskıladığı ve gelişmenin düşük olduğu belirlenmiştir. RÇ<sub>3</sub> izolatının soya unu ve pepton-kazein karışımı içeren besiyerlerinde iyi bir gelişme ve proteaz sentezi gerçekleştirdiği gözlenmiş; tripton ve sığır eti ekstraktı (beef extract) içeren besiyerlerinde ise, hem gelişmenin hem de proteaz aktivitesinin azaldığı; inorganik azot kaynaklarının proteaz üretimini baskıladığı ve bu nedenle gelişmenin düşük olduğu belirlenmiştir.

Alkali proteazlar yapısal olmayıp, farklı karbon ve azot kaynaklarının varlığında farklı düzeylerde enzim üretebilen, 60°C sıcaklığa ve 9.0 pH değerine kadar gelişebilen, *Bacillus licheniformis* MIR 29 ile yapılan çalışma sonucunda, kazeinin enzim sentezini uyardığı, ayrıca st kültür sıvısının amino asit ve peptidlerden (10 kDA'dan küçük moleküller) arındırılmadığı koşullarda aktivitenin azaldığı, enzim üretiminin son ürün inhibasyonu ile düzenlenebileceği önerilmiştir. Üre besiyerinde azot kaynağı olarak kullanıldığında, enzim üretimini baskılamıştır (Ferrero *et al.* 1996).

Yapılan bir çalışmada ise, *Alcaligenes faecalis*'in maksimum alkali proteaz ( pH<sub>opt</sub> 9.0, T<sub>opt</sub> 55°C) retimini azot kaynağı olarak peptone (5 g/L) ve soya unu (5 g/L) içeren bir besiyerinde gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Thangam *et al.* 2002).

Morikawa *et al.* (1994), S-bağımlı bir hipertermofil arkea olan *Pyrococcus* sp. KOD1'in proteaz aktivitesinin karbon kaynağı olarak kazein hidrolizat ve peptone içeren ortamlarda maksimum olduğunu belirlemiştir.

Venugopal *et al.* (2005) yeni izole edilmiş *Vibrio fluvialis* ile yaptıkları çalışmada bakterinin alkali proteaz üretiminin kazein (10 g/L), peptone (1 g/L), maltose (4 g/L) içeren besiyerinde maksimum düzeyde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

*Bacillus* sp. JB-99'un ürettiği termostabil alkali proteazın (  $pH_{opt}$  11.0,  $T_{opt}$  75°C) en yüksek enzim aktivitesini, karbon kaynağı olarak sitrik asit, çözünen nişasta veya fruktoz (10 g/L) ; azot kaynağı olarak da  $NaNO_3$  veya  $KNO_3$  (10 g/L) içeren besiyerinde gösterdiği belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz (10 g/L) alkali proteaz sentezini baskılamıştır (Johnvesly *et al.* 2001).

Yapılan bir çalışmada, *Bacillus clausii* I-52 'in maksimum alkali proteaz (  $pH_{opt}$  11,  $T_{opt}$  60°C) üretimini azot ve karbon kaynağı olarak soya unu (15 g/L), buğday unu (5 g/L) ve maltoz (25 g/L, sıvı olarak) içeren bir besiyerinde gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Joo *et al.* 2003).

*Geobacillus caldoproteolyticus* sp. SF03'in termostabil alkali proteaz aktivitesinin ( $pH_{opt}$  8.0-9.0,  $T_{opt}$  70-80°C) karbon kaynağı olarak glikoz, laktoz, kazein hidrolizat içeren besiyerinde baskılandığı; yağsız süt ( %10), sakkaroz ve  $NH_4Cl$  içeren besiyerinde ise yükseldiği belirlenmiştir (Chen *et al.* 2004).

*Geobacillus* sp. YMTC 1049'dan elde edilen termostabil ekstraselüler proteazın üretimi için iki farklı besiyeri kullanılmıştır. İlk olarak, glikoz (5 g/L) ve maya özütü (1 g/L) içeren A-besiyerinde izolat 8 saat geliştirildikten sonra, ikinci basamak, kazein (20 g/L) ve gliserol (2 g/L) içeren B besiyeri A besiyerine aktarılmış ve 10 saat süreyle enzim üretimi için inkübasyona devam edilmiştir (Zhu *et al.* 2006).

*Thermobacteroides proteolyticus*'tan üretilen termostabil alkali proteaz aktivitesinin ( $pH_{opt}$  6.5-10.0,  $T_{opt}$  75-95°C) karbon ve azot kaynağı olarak tripticase BBL (2 g/L) ve

maya özütü (2 g/L) içeren besiyerinde yüksek değerde olduğu belirlenmiştir (Antranikian *et al.* 1991).

*Thermococcus stetteri*'nin ürettiği termostabil alkali proteaz aktivitesinin ( $pH_{opt}$  8.5-9.0,  $T_{opt}$  85°C) karbon ve azot kaynağı olarak tripton (5-6 g/L) ve maya özütü (2.5 g/L) ve 10 mM amonyum içeren besiyerinde yüksek değerde olduğu belirlenmiştir (Klingeberg *et al.* 1995).

Zorunlu alkalifilik *Bacillus* P-2 suşundan izole edilen ve sıcaklık kararlılığı gösteren alkali proteazın, glikoz (10 g/L), pepton ve maya özütü (2.5 g/L) içeren besiyerinde maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kültür ortamına inorganik azot kaynaklarının eklendiği koşullarda proteaz üretimi %90'a varan düzeylerde baskılanmıştır (Kaur *et al.* 2001).

Bu çalışmada, izolatların geliştiği Horikoshi-I besiyerindeki  $MgSO_4$  ve  $KH_2PO_4$  bileşiklerinin son konsantrasyonları değiştirilmiş, ayrıca Tween 80 ve  $CaCl_2$  ilave edilerek, bu bileşiklerin varlıklarında proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Ç izolatının ürettiği enzim aktivitesinin Tween 80 (0.25 g/L) ve  $CaCl_2$  (0.1 g/L) varlığında %121 ve %136 oranlarına arttığı, RÇ<sub>3</sub> izolatının ürettiği enzim aktivitesinin ise, sadece  $CaCl_2$  (0.1 g/L) varlığında %141 oransal aktivite düzeyine yükselerek önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin, farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesini etkilemedikleri saptanmıştır.

Metal iyonlarının alkali proteaz aktivitesi üzerine uyarıcı veya inhibitör etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kumar *et al.* 1999, Kumar *et al.* 2001). Bu çalışmada, bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkileri test edilmiştir. Ç izolatının alkali proteaz aktivitesinin 2 mM  $CaCl_2$ , 2 mM  $MgCl_2$  ve 2 mM  $MnCl_2$  varlığında arttığı gözlenmiştir. 2 mM  $CaCl_2$ , en yüksek indüktör etki göstererek enzimin oransal aktivitesini %165 değerine yükseltmiştir. 2 mM ve 10 mM NaCl ilavesi belirgin bir etki yaratmazken, 2 mM ve 10 mM  $CuCl_2$  ilavesi aktivite üzerine inhibitör etki yaratarak, oransal aktiviteyi yaklaşık %38 ve %20'ye, benzer şekilde 2 mM ve 10 mM  $CoCl_2$

aktiviteyi sırasıyla %55 ve %34'e düşürmüştür. 10 mM NiCl<sub>2</sub> ve 10 mM ZnCl<sub>2</sub> varlığında aktivitenin sırasıyla %43 ve %56'ya düştüğü gözlenmiştir.

RÇ<sub>3</sub> izolatının alkali proteaz aktivitesi ise, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM ve 10 mM FeCl<sub>3</sub> ve 10 mM NaCl ilavesi ile artmış, 10 mM FeCl<sub>3</sub> ilavesi ile oransal aktivitesi %136 oranına artmıştır. 2 mM ve 10 mM KCl belirgin bir etki yaratmazken, 2 mM ve 10 mM ZnCl<sub>2</sub> inhibitör etki yaratarak oransal aktiviteyi yaklaşık %46 ve %34'e düşürmüştür. Benzer şekilde 2 mM ve 10 mM MnCl<sub>2</sub> varlığının aktiviteyi sırasıyla %56 ve %47'e düşürdüğü belirlenmiştir. 2 mM ve 10 mM NiCl<sub>2</sub> ve 10 mM MgCl<sub>2</sub> varlığında ise aktivitenin sırasıyla %57, %48 ve %64'e azaldığı gözlenmiştir.

Ekstrem termofil arke olan *Thermococcus stetteri*'nin yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren alkali proteazın Zn, Ni, Cu iyonları tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ilavesi ile aktivitenin önemli ölçüde etkilenmediği, 0.5 M NaCl ilavesi ile proteaz aktivitesinin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Klingeberg *et al.* 1995).

Alkalofilik *Bacillus pumilus* MK6-5'ten izole edilen alkali proteazın aktivitesinin Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> iyonları ile arttığı ve stabilitesinin de arttığı anlaşılmıştır. 10 mM Hg<sup>2+</sup> varlığında, enzimin %96 oranda inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, denen katyonların enzimin yapısında rol aldıklarını ve sıcaklıkla denatürasyona karşı korunma için gerekli olduklarını doğrulamıştır (Kumar *et al.* 2002).

Alkalofilik *Alcaligenes faecalis*'ten saf olarak elde edilen alkali proteazın aktivitesinin 2 mM CaCl<sub>2</sub> ve MgSO<sub>4</sub> ile arttığı, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> iyonları ile önemli bir etki görülmemiş, Cu<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup> iyonları ise inhibisyona neden olmuştur (Thangam *et al.* 2002).

Termofilik arke *Pyrococcus horikoshii*'nin saflaştırılan proteazı (T<sub>opt</sub> 90°C) aktivitesi için, Ca<sup>2+</sup> iyonunun enzim yapısına bağlı olmasına karşın zorunlu bir metal iyonu olmadığı, 0.5 mM Co<sup>2+</sup> iyonunun ise aktivatör etkili olduğu belirlenmiştir (Ando *et al.*, 1999). Hipertermofil arke olan *Thermococcus kodakaraensis* KOD1'den saflaştırılmış

subtilisin proteazının ( $T_{opt}$  80°C,  $pH_{opt}$  9.5) belli bir substrata karşı sadece  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında aktivite gösterebildiği bildirilmiştir (Kannan *et al.* 2001).

*Bacillus stearothermophilus* F1'in proteaz sıcaklık stabilitesi  $Co^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiş,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  iyonları ise ya düşük oranda bir inhibisyona neden olmuş ya da etkimemişlerdir.  $Mn^{2+}$  iyonu ise, proteaz aktivitesini önemli oranda aktive etmiştir (Rahman *et al.* 1994).

Bu tez çalışmasında metalo-proteaz inhibitörü olarak bilinen EDTA'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi test edilmiştir. Bu amaçla 0.1, 1, 10 mM EDTA varlığında ve Ç izolatu için 70°C, RÇ3 izolatu için 65°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyonun ardından yapılan aktivite ölçümlerinde, Ç aktivitesinin değişen EDTA konsantrasyonunda sırasıyla %96, %73, %51 değerinde koruyabildiği, RÇ3 izolatu için ise kalan aktivite değerinin sırasıyla %98, %82 ve %45 olduğu belirlenmiştir. Her iki izolatın 10 mM EDTA varlığında proteaz aktivitesinin yaklaşık olarak yarısını koruduğu belirlenmiş, 10 mM EDTA ve 10 mM  $CaCl_2$  karışımı varlığında ise enzim kararlılığı üzerindeki olumsuz etkinin ortadan kalktığı, Ç izolatu için kalan aktivite değerinin %98, RÇ3 izolatu için ise %114 olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin farklı konsantrasyonlarda iki izolatın alkali proteazları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ç izolatının 0.1, 1, 10 mM PMSF varlığında 1 saat inkübasyondan sonra alkali proteazın kalan aktivitesi sırasıyla %24, %12, %2 olarak, RÇ3 izolatu için ise, %19, %5, %1 olarak belirlenmiştir. Serin proteazlar için aktif bölge inhibitörü olan PMSF her iki izolatın proteazlarını hemen bütünüyle inhibe etmiştir.

Hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ) ile kaba enzim sıvıları 1 saat süreyle, standart sıcaklıkta inkübe edilerek kalan enzim aktiviteleri belirlenmiş, Ç izolatu için %5 ve %15  $H_2O_2$  ilavesi ile aktivite değerinin %91 ve %77, RÇ3 izolatu için ise sırasıyla %78 ve %52 korunduğu belirlenmiştir.

*Thermococcus stetteri*'den saflaştırılan serin alkali proteaz ile yapılan çalışmalarda enzimin 5 mM EDTA varlığında 60°C'de 1 saat ve 85°C'de 15 dakika sonunda enzim aktivitesini %60 oranında koruduğu, 2 mM PMSF varlığında enzim aktivitesinin tamamen inhibe olduğu gösterilmiştir (Klingeberg *et al.*, 1995). Termofilik anaerobic bakteriler *Fervidobacterium pennavorans*'tan üretilen termostabil keratinaz aktivitesinin PMSF varlığında inhibe olduğu, ve 5 mM EDTA varlığında ise çok az bir oranla etkilendiği belirlenmiştir (Friedrich *et al.* 1996).

*Vibrio fluvialis*'ten üretilen alkali proteaz ile yapılan çalışmalarda ise enzimin farklı konsantrasyonlardaki (1-2.5 mM) çeşitli inhibitörlerle 1 saat inkübasyon sonucunda kalan aktivite değerleri belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin EDTA (2.5 mM) varlığında %84, PMSF ile %63-65 oranında inhibe olduğu, fenantrolin (metallo-proteaz inhibitörü) varlığında ise inhibe olmadığı ve sonuç olarak bu enzimin Ca<sup>2+</sup> veya Mg<sup>2+</sup> iyonlarına bağlı bir serin proteaz olduğu belirlenmiştir. VM10 proteazının aktivitesini %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile %100 oranla koruduğu, %4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında 30 dakika sonunda, oransal aktivitenin %132 olduğu belirlenmiştir (Venugopal *et al.* 2005).

Alkalifil *Bacillus* sp. 221 suşunun ekstraselüler alkali serin proteazın ürettiği, Horikoshi tarafından açıklanmıştır. Saflaştırılmış enzimin optimum pH değerinin 11.5 olduğu, pH 13.0'da ise enzimin aktivitesinin %25'ini kaybettiği, diizopropilflorofosfat veya 6 M üre ile tamamen inhibe olduğu ancak EDTA veya p-kloromerkübenzoat ile inhibe olmadığı anlaşılmıştır. Enzimin molekül ağırlığını 30,000 olduğu ve diğer alkali proteazlardan biraz daha büyük olduğu ve optimum sıcaklık değeri olan 60°C de, 5 mM kalsiyum iyonu çözeltisi ilavesi ile aktivitesinde %70 lik bir artış olduğu açıklanmıştır (Horikoshi *et al.* 1971).

Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. JB-99'dan üretilen termostabil ve alkali proteazın aktivitesinin 1mM PMSF ve TPCK (histidin inhibitörü) varlığında inhibe (%100 oranla) olduğu, ancak EDTA varlığında ise inhibe olmadığı belirlenmiştir. %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in enzim aktivitesi üzerine olumlu etki (oransal aktivite %107) yarattığı gözlenmiştir (Johnvesly *et al.* 2001).



Bu araştırmada, elde edilen izolatanın, ürettiği alkali proteazların karakterizasyonu amacıyla yapılan bu çalışmada optimum sıcaklığın 65°C-75°C ve optimum pH'nın 8.0-10.5 aralığında olduğu, Ca<sup>2+</sup> varlığında yükselen sıcaklıkta stabil olduğu, EDTA ve CaCl<sub>2</sub> karışımı varlığında aktivitesini yalnızca sınırlı bir oranda kaybettiği anlaşılmıştır. Buna göre bu iki izolatanın biyoteknolojik uygulamalar için uygun alkali proteaz kaynakları olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte izolatların ürettiği enzim miktarı bir çok *Bacillus* ve termoalkalifilik bakteri türlerinin ürettiği enzim miktarına göre daha düşük düzeylerde olması nedeni ile, başlangıçta besiyeri optimizasyonu, kullanılan karbon ve azot kaynaklarından ekonomik açıdan en düşük maliyeti ve en çok aktivite arttırıcı etki gösteren kaynakların seçilmesi önemli olacaktır. Ayrıca 16S rDNA analizi gibi moleküler temelli teknikler yoluyla yapılabilecek filogenetik sınıflandırma çalışmaları gelecekte bu konuda yürütülebilecek araştırmalara yarar sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ando, S., Ishikawa, K., Ishida, H., Kawarabayasi, K., Kikuchi, H. and Kosugi, Y. 1998. Thermostable aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii*. Federation of European Biochemical Societies, 447:25-28
- Anwar, A. and Saleemuddin, M. 1998. Alkaline Proteases: a review. Bioresource Technology, 64:175-183.
- Antranikian, G., Hashwa, F. and Klingeberg, M. 1991. Properties of extremely thermostable proteases from anaerobic hyperthermophilic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol, 34:715-719.
- Banerjee, R., Agnihotri, R. and Bhattacharyya, B.C. 1993. Purification of alkaline protease of *Rhizopus oryzae* by foam fractionation, 9:245-248.
- Chen, X.G., Stabnikova, O., Tay, J.H., Wang, J.Y. and Tay, S.T.L. 2004. Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. Extremophiles, 8:489-498.
- Cheng, S.W., Hu, M.N., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M. and Tsai, Y.C. 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Biosci Biotech Biochem, 59:2239-2243.
- Cook, G.M., Russell, J.B., Reichert, A. and Wiegel, J. 1996. The intracellular pH of *Clostridium paradoxum*, an anaerobic, alkaliphilic and thermophilic bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 62:4576-4579.
- Dib, R., Chobert, J.M., Dalgalarondo, M., Barbier, G. and Haertle, T. 1998. Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcus abyssi*, strain st 549, hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal ecosystem. Federation of European Biochemical Societies, 431:279-284.
- Dirmeier, R., Keller, M., Hafenbrandl, D., Braun, F.J., Rachel, R., Burggraf, S. and Stetter, K.O. 1998. *Thermococcus acidaminovorans* sp. nov., a new hyperthermophilic alkaliphilic archaeon growing on amino acids. Extremophiles, 2:109-114.

- Engle, E., Li, Y., Woese, C. and Wiegel, J. 1995. Isolation and characterization of a novel alkalitolerant thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 45:454-461.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. Appl Microbiol Biotechnol, 45:327-332.
- Friedrich, A. and Antranikian, G. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. Appl Environ Microbiol, 62:2875-2882.
- Fujiwara, N., Masui, A. and Imanaka, T. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. J Biotechnol, 30:245-256.
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 59:15-32.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S. and Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biotechnol, 60:381-395.
- Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K. and Gupta, M.N. 2005. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. J Chromatography A, 1069:155-161
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89:17-34.
- Han, X.Q. and Damodaran, S. 1998. Purification and characterization of protease Q: a detergent- and urea-stable serine endopeptidase from *Bacillus pumilus*. J Agric Food Chem, 46:3596-3603.
- Hartley, B.S. 1960. Proteolytic Enzymes. Annu Rev Biochem, 29:45-72.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. Agric. Biol. Chem., 35:1407-1414.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 735-750.

- Johnvesly, B. and Naik, G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37:139-144.
- Joo, H.S. and Chang, C.S. 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263-1270.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R. and Chang, C.S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*, 38:155-159.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R. and Chang, C.S. 2003. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. *J Appl Microbiol.*, 95:267-272
- Kannan, Y., Koga, Y., Inoue, Y., Haruki, M., Takagi, M., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 2001. Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Appl and Environ Microbiol*, 67:2445-2452.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K. and Hoondal, G.S. 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World J Microbiol Biotechnol*, 17:125-129.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N. and Eraslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE-42. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32:335-344.
- Ken McDonald, J. 1985. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *The Histochemical Journal*, 17:773-785.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351.
- Klingeberg, M., Galunsky, B., Sjöholm, C., Kasche, V. and Antranikian, G. 1995. Purification and properties of a highly thermostable, sodium dodecyl sulfate-resistant and stereospecific proteinase from the extremely thermophilic archaeon *Thermococcus stetteri*. *Appl Environ Microbiol*, 61:3098-3104.

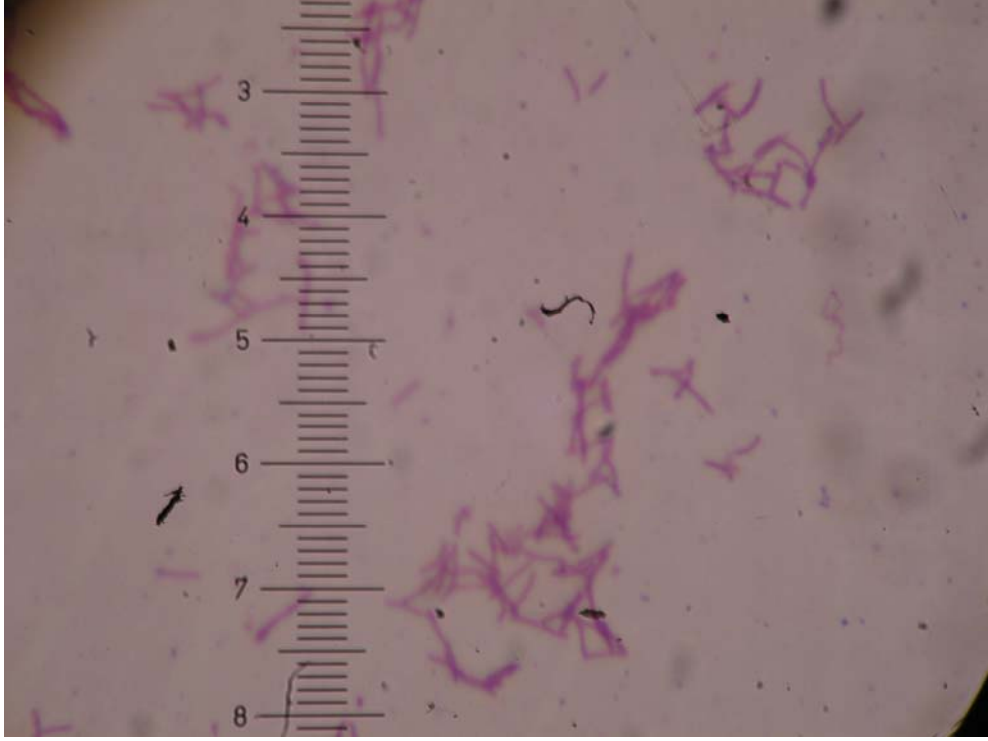
- Kumar, G.C. and Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Kumar, G.C. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology*, 34:13-17.
- Leuschner, C. and Antranikian, G. 1995. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11:95-114.
- Maurer, K.H. 2004. Detergent proteases. *Current opinion in biotechnology*, 15:1-5.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T. and Imanaka, T. 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl Environ Microbiol*, 60:4559-4566.
- Niimura, Y., Yanagida, F., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, K. and Kozaki, M. 1987. A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone and catalase. *Agric. Biol. Chem.*, 51:2271-2275.
- Nduwimana, J., Guenet, L., Dorval, I., Blayau, M., Le Gall, J.Y. and Le Treut, A. 1995. Proteases (Review article). *Ann. Biol. Clin.*, 53:251-264.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K. and Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 17:493-497
- Podkovyrov, S.M. and Zeikus, J.G. 1992. Structure of the gene encoding cyclomaltodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*-39E and characterization of the enzyme purified from *Escherichia coli*. *Journ. Bacteriol.*, 174:5400-5405.
- Rahman, R.N.Z.A., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W. and Salleh, A.B. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 40:822-827.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.
- Singh, J., Vohra, R.M. and Sahoo, D.K. 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters*, 21:921-924.

- Szilagyi, A. and Zavodszky, P. 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure*, 8:493-504.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol*, 30:120-124.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol*, 33:519-523.
- Takeuchi, M., Kaieda, N. and Koyama, N. 1997. Effect of amines on the (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> +Na<sup>+</sup>)-activated ATPase of an anaerobic alkaliphile, *Amphibacillus xylanus*. *Microbios*, 90:201-208.
- Tanabe, H., Kobayashi, Y. and Akamatsu, I. 1988. Pretreatment of pectic wastewater with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 52:1855-1856
- Thangam, E.B. and Rajkumar, G.S. 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35:149-154.
- Thomas, T.D. and Mills, O.E. 1981. Proteolytic Enzymes of Starter Bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35:255-273.
- Towatana, N.H., Painupong, A. and Suintinanalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS-719. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87:581-587.
- Venugopal, M. and Saramma, A.V. 2006. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, PRBI-7859.
- Wiegel, J. 1998. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles*, 2:257-267
- Wiegel, J. and Kevbrin, V.V. 2003. Alkalithermophiles. *Biochemical Society Transactions*, vol 32, part 2:193-198.
- Zaghloul, T.I., Al-Bahra, M. and Al-Azmeh, H. 1998. Isolation, identification and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. *Appl Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:207-211.

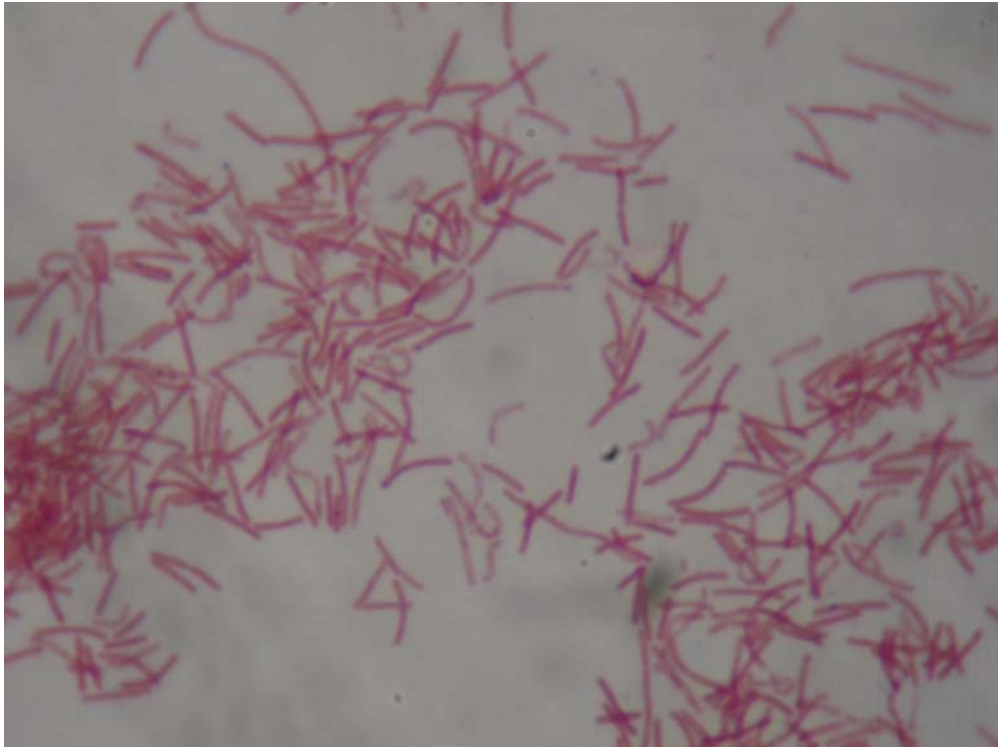
Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q. and Shen, P. 2006. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology*, EMT-7517.

**EK 1 Ç ve RÇ<sub>3</sub> izolatların mikroskoptaki görüntüsü**

Ç izolatın mikroskoptaki görüntüsü



RÇ<sub>3</sub> izolatın mikroskoptaki görüntüsü





## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Leila GHEORGHİU ALPAN

Doğum Yeri : MORENİ, ROMANYA

Doğum Tarihi : 19.07.1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, Romence, Fransızca

### Eğitim Durumu

Lise : ‘Mircea cel Batran’ Fen Lisesi, Köstence, Romanya (1990-1994)

Lisans : İktisadi Bilimler Akademisi, Finans-Bankacılık, Bükreş (1994-1996)

Dil Eğitimi : Ankara Üniversitesi, TÖMER (1996-1997)

Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü  
(1997-2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği  
Anabilim Dalı (Şubat 2004-Şubat 2008)