



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

**HALOARKEAL PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Ümit TOR

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
HAZİRAN-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOARKEAL PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Ümit TOR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2015

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOARKEAL PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİNİN KARAKTERİZASYONU**

ÜMİT TOR
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Birgül ÖZCAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 26/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Birgül ÖZCAN
Başkan



Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Hasan YILDIZ
Üye

Kod No: 843

Doç. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü V.

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

26/06/2015

TEZ BİLDİRİMİ

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

Ümit TOR

ÖZET

HALOARKEAL PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİNİN KARAKTERİZASYONU

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilmiş halofilik arke suşları proteaz aktivitesi yönünden taranmış ve 8 izolat arasından B45, D83A ve SD23 izolatlarının ekstraselüler proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. İzolatların proteaz üretimi % 0.2 yağsız süt tozu içeren yüksek tuzlu (% 25 NaCl) ve çalkalamalı ortamda gerçekleştirilmiştir. Her bir izolatın en yüksek proteaz üretimini gerçekleştirdiği inkübasyon zamanı, kültür ortamı pH'ı ve NaCl konsantrasyonu, gelişme sıcaklığı ve farklı karbon kaynaklarının optimizasyonu yapılmıştır. Ayrıca her bir izolata ait ham ekstraselüler proteazın maksimum aktivite gösterdiği tuz konsantrasyonu, pH, sıcaklık derecesi ve enzimin farklı organik solventlere toleransı belirlenmiştir. İzolatların genel olarak 37 °C'de, gelişme periyodunun 7. ve 9. günlerinde, pH 6.5 - 7'de, 3.5 – 2.5 M NaCl'de, karbon kaynağı olarak fruktoz ve glukoz varlığında maksimum enzim üretiminin gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Kültür koşullarının optimizasyonu ile enzim üretiminin B45 izolatında % 73.01, D83A izolatında % 113.84 ve SD23 izolatında % 35.38 oranında arttığı belirlenmiştir. B45 proteazının 55 °C, pH 9 ve 2.5 M NaCl'de, D83A proteazının 50 °C, pH 8.5 ve 3.5 M NaCl'de ve SD23 proteazının 45 °C, pH 8.5 ve 2.5 M NaCl'de maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca arkeal proteazların aktivitelerini düşük

Log P_{ow} değerine sahip gliserol, DMF ve etanol varlığında % 84 ve üzerindeki oranlarda, apolar organik solventlerin varlığında ise % 62 ve üzerindeki oranlarda koruduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile; haloarkeal proteaz üretiminin tüm optimizasyon işlemleri sonucunda 1 – 2.5 kat arttığı, karbon kaynağı olarak kullanılan fruktozun enzim üretimini arttırdığı ve arkeal proteazların log P_{ow} değeri -1.76 ile 4.77 arasında değişen farklı organik solventlere toleranslı olduğu gösterilmiştir.

2015, 39 sayfa

Ahantar Kelimeler: Halofilik arke, proteaz, optimizasyon, karakterizasyon, organik solvent

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS ON THE HALOARCHAEAL PROTEASE PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME ACTIVITY

Halophilic archaea, isolated from different parts of Turkey, were screened for protease activity and it was detected that among 8 isolates, strains of B45, D83A and SD23 had extracellular proteolytic activity. Protease production of the isolates was carried out under shaking conditions in the medium containing with 0.2 % skim milk and high salt concentrations (25 % NaCl, w/v). For each of the isolates, the highest protease production conditions were optimized including the parameters of incubation time, pH of the medium, NaCl concentrations, growth temperature and various carbon sources. Furthermore, the salt concentrations, pH and temperature which the maximum activity is achieved as well as the tolerance to different organic solvents were determined for proteases all of the isolates. It was revealed that the isolates generally produced the maximal enzyme at 37 °C, at the 7th and 9th days of the incubation period, at pH 6.5 – 7 and 3.5 - 2.5 M NaCl with the presence of fructose and glucose as carbon source. By optimizing the culture conditions, the increase was detected in the enzyme production for B45, D83A and SD23 isolates with the values of 73.01 %, 113.84 % and 35.38 %, respectively. The temperature, pH and salt concentrations for the maximum enzyme activities of B45, D83A and SD23 were found as 55 °C, 9 and 2.5, 50 °C, 8.5 and 3.5 M and 45 °C, 8.5 and 2.5 M, respectively. In addition, archaeal protease activities remained more than 84% in the presence of organic solvents with low log P_{ow} such as glycerol, DMF and ethanol, and more than 62% in the presence of apolar organic solvents. In this study, it was revealed that the haloarchaeal protease productions were increased 1 to 2.5 fold after all the optimization processes, that the fructose of which was used as carbon source increased the enzyme production and that the archaeal proteases could be able to tolerate various organic solvents having log P_{ow} values ranging from -1.76 to 4.77.

2015, 39 pages

Key Words: Halophilic archaea, protease, optimization, characterization, organic solvent

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikirlerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan, öneri ve yorumları ile çalışmamı düzenleyen, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten ve çalışma hayatımda yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Birgül ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar arkadaşlarım Mehmet Ali LEYLA ve Yağmur AL ile arkadaşlarım Dr. Evrim YILDIZ ve Fettullah KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

Lisans öğrenciliğim döneminden itibaren bana emeği geçen bütün bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Bahar TOR, babam Ramazan TOR ve kardeşlerim Seçim Mustafa TOR ve Atike TOR'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	11
3.1.2. Halofilik Arkeler	11
3.1.3. Besiyerleri	11
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi	12
3.2.2. Proteaz Aktivitesine Sahip Suşların Taranması	12
3.2.3. Proteaz Aktivitesi Tayini.....	12
3.2.4. Proteaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyonu	13
3.2.4.1. İnkübasyon Zamanının Etkisi	13
3.2.4.2. NaCl Konsantrasyonunun Etkisi	13
3.2.4.3. pH'nın Etkisi	13
3.2.4.4. Sıcaklığın Etkisi	13
3.2.4.5. Karbon Kaynaklarının Etkisi	13
3.2.5. Proteaz Aktivitesinin Optimizasyonu	14
3.2.5.1. Optimum Tuz Derişiminin Saptanması.....	14
3.2.5.2. Optimum pH Değerinin Saptanması	14
3.2.5.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması	14
3.2.6. Organik Solventlerin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	15
4.1. Proteaz Aktivitesi Gösteren Suşların Taranması	15
4.2. Proteaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyon Sonuçları	15
4.2.1. Proteaz Üretiminin İnkübasyon Zamanına Bağlı Değişimi	15
4.2.2. Proteaz Üretim NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	16
4.2.3. Proteaz Üretiminin pH'a Bağlı Değişimi	17
4.2.4. Proteaz Üretiminin Sıcaklığa Bağlı Değişimi	18
4.2.5. Proteaz Üretiminin Farklı Karbon Kaynaklarına Bağlı Değişimi.....	19
4.3. Ekstraselüler Proteaz Aktivitesi Üzerine Ortam Koşullarının Optimizasyonu.....	23

4.3.1. Proteaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	23
4.3.2. Proteaz Aktivitesinin pH Optimizasyonu.....	24
4.3.3. Proteaz Aktivitesine Sıcaklık Optimizasyonu.....	25
4.4. Organik Solventlerin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	26
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Yağsız süt tozu içeren modifiye SG agarda halofilik arkelerin proteaz tarama sonuçları	15
Şekil 4.2.	Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin inkübasyon zamanına bağlı değişimi.....	16
Şekil 4.3.	Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin kültür ortamındaki NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi	17
Şekil 4.4	Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin kültür ortamınının pH'sına bağlı değişimi	18
Şekil 4.5.	Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin üreme sıcaklığına bağlı değişimi.....	19
Şekil 4.6.	B45 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi	20
Şekil 4.7.	B45 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki glukoz, nişasta ve beef ekstrakt miktarlarına bağlı değişimi	20
Şekil 4.8.	D83A izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi	21
Şekil 4.9.	D83A izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki laktoz, kazamino asit ve fruktoz miktarlarına bağlı değişimi.....	21
Şekil 4.10.	SD23 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi	22
Şekil 4.11.	SD23 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki glukoz, fruktoz ve sükroz miktarlarına bağlı değişimi	22
Şekil 4.12.	Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi	24
Şekil 4.13.	Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	25
Şekil 4.14.	Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine sıcaklık değerlerinin etkisi	26
Şekil 4.15.	Organik solventlerin B45 proteaz aktivitesi üzerine etkisi	27
Şekil 4.16.	Organik solventlerin D83A proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	27
Şekil 4.17.	Organik solventlerin SD23 proteaz aktivitesi üzerine etkisi	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği ortam koşulları	31
Çizelge 5.2. Kültür koşullarının optimizasyonu sonucundaki aktivite artış oranları.....	31
Çizelge 5.3. Maksimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği ortam koşullar ve aktivite değişim oranları	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
U	: Ünite
V	: Hacim
nm	: Nanometre

KISALTMALAR

EC no	: Enzim komisyon numarası
log P _{ow}	: Su ve oktanol arasındaki ayrılma katsayısı
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
SG	: Sehgal – Gibbons besiyeri
TCA	: Trikloro asetik asit

1. GİRİŞ

Hücrelerde meydana gelen tüm metabolik reaksiyonlar enzim aktivitesi ile düzenlenmektedir. Hücrelerde önemli görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük hayatta, ekonomik ve endüstriyel alanlarda da yerlerini almıştır. Enzim teknolojisi ile birlikte endüstriyel olarak üretilen enzimler deterjan tekstil, sağlık ve gıda gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak daha önce üretilemeyen ve farklı koşullara uyum sağlamış çok özel enzimlerin elde edilmesi de mümkün hale gelmiştir.

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 75'i hidroliz amaçlı kullanılmaktadır. Proteaz, lipaz ve karbonhidrazlar enzim piyasasına egemen olup toplam enzim satışının %70'inden fazlasını oluşturmaktadırlar. Hidrolazlar arasında ise günümüz endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60'ını proteazlar oluşturmakta ve dünya genelindeki pazar payının 3 milyar Amerikan dolarının üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Li ve ark., 2012).

Günümüzde mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar, deterjan ve gıda endüstrisi başta olmak üzere, organik sentez, deri, tekstil, ipek ve yem sanayi, kozmetik, atık suların nötralizasyonu ve detoksifikasyonu, eczacılık ve çeşitli klinik uygulamalar gibi birçok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Ticari önem ve ilgileri nedeniyle çeşitli habitatlarda yaşayan ve endüstriyel öneme sahip proteaz üreticisi mikroorganizmalarla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimler bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha yüksek katalitik aktivite ve stabiliteye sahiptir. Ayrıca yüksek miktarda üretilmekte ve daha ucuza mal olmaktadır. Endüstriyel alanda kullanılacak enzimlerin bu gibi avantajlara sahip olmasının yanı sıra ekstrem koşullara dayanıklı olması da istenilen özelliklerden birisidir. Çünkü endüstriyel işlemler genellikle yüksek sıcaklık ve basınç gibi oldukça sert koşullar altında gerçekleşmektedir. Günümüzde mezofilik mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bir çok avantajı olmasına rağmen kimyasal işlemlerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalarda kullanımları sınırlı olmaktadır. Bu aşamada ekstremofilik mikroorganizmaların enzimleri ön plana çıkmaktadır. Ekstrem

mikroorganizmalardan elde edilen ve ekstreozim olarak adlandırılan bu enzimler yukarıda bahsedilen sert koşullara dayanıklıdır.

Ekstrem koşullarda yaşayan türlerin büyük bir kısmı arke domainine aittir. Arkeal türlerin büyük bir kısmı, çoğu mikroorganizma için ölümcül olabilen yüksek basınç, pH, tuz ve sıcaklık derecelerinde üremektedir (Rothschild ve Mancinelli, 2001). Ekstreofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri ekstrem halofil olarak adlandırılmaktadır. Ekstrem halofilik organizmaların enzimleri de yüksek tuz konsantrasyonundan kaynaklanan yüksek iyonik şiddette aktivite gösterecek şekilde adapte olmuşlardır (Hough ve Danson, 1999). Haloarkeal ekstreozimler sadece tuzla toleranslı olmayıp, aynı zamanda uzun periyotlarda sıcak ortamlarda da stabilitelerini korumaktadırlar (Madern ve ark., 2000). Ayrıca halofilik enzimlerin düşük su aktivitesi özellikleri nedeniyle sulu organik ve susuz ortamlarda kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır (Gomes ve Steiner, 2004). Ekstrem halofilik mikroorganizmalar farklı sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonlarında en iyi aktivite gösteren, proteinlerin ve peptidlerin parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimler üretmektedir. Halofilik arke kaynaklı proteazlar yüksek tuz konsantrasyonlarında oldukça aktiftirler. Halofilik olmayan organizmalara ait proteinlerin denatüre olduğu 3-4 M NaCl konsantrasyonlarında arkeal proteazlar stabil kalarak aktivite göstermektedirler (Lanyi, 1974). Bu özellikleri nedeniyle halofilik arkeler biyoteknolojik açıdan önemli proteaz kaynağı haline gelmiştir (De Castro ve ark., 2006).

Potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahip olan haloarkeal proteazlarla ilgili devam eden çalışmalar daha çok enzim üretiminde verimin yükseltilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Endüstriyel işlemlerde mikroorganizmaların geliştirildiği ve enzim üretimin yapıldığı ortam önemli bir maliyet oluşturmaktadır. Bu nedenle üreme ortamının optimizasyonu ile yüksek düzeyde enzim üretiminde endüstriyel olarak maliyetin düşürölmesi amaçlanmaktadır. Devam eden ve yakın gelecekte yapılacak çalışmalar, arkeal orjinli ekstreozimlerin kullanım potansiyellerinin daha da artacağına işaret etmektedir.

Halofilik arkeal kaynaklı proteaz aktivitesi ve üretimi üzerine kültür şartlarının etkisinin ve enzim aktivitesi üzerine organik solvent etkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışma ile yüksek tuz konsantrasyonunda gelişen proteaz üreticisi halofilik arke suşlarının belirlenmesi, enzim aktivitesi üzerine kültür

koşullarının etkisinin belirlenmesi ve enzimin organik solvent toleransının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez kapsamında, farklı bölgelerden izole edilmiş halofililik arke izolatları aktifleştirilerek proteolitik özellikleri yönünden taranmış ve proteaz üreticisi olduğu belirlenen izolatların enzim üretimi üzerine üreme periyodu, NaCl konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve çeşitli karbon kaynaklarının etkisi belirlenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bir izolata ait ham enzimin maksimum aktivite gösterdiği tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık derecesi ve farklı organik solventlerin varlığında organik solvent toleransı belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kamekura ve Seno (1990), 172 P1 halofilik arke suşunun % 15 - 27 tuz içeren ortamda üç farklı ekstraselüler proteaz ürettiğini bildirmiştir. Bunlardan F-II saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Saflaştırılan proteazın stabilitesi için yüksek (% 25) NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyduğu ve 60 °C’de 30 dakikalık inkübasyon sonrasında aktivitesinin yalnızca % 4’ünü kaybettiği, % 5 NaCl’de enzimin tamamen inaktivite olduğu bildirilmiştir. Ayrıca enzimin % 25 NaCl’de 75 - 80 °C’de sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda F-II’nin termofilik ve halofilik bir proteaz olduğu ifade edilmiştir.

Kamekura ve ark. (1992), tanımlanmamış bir halofilik arke suşundan alkali serin proteaz (halolisin) genini klonlayarak dizisini belirlemiştir. Moleküler ağırlığının 41.963 olduğu belirlenen proteinin 411 aminoasit içerdiği belirlenmiş ve halosin olarak isimlendirilmiştir. Halolisinin *Thermoactinomyces vulgaris*’in ürettiği termitaz ile yüksek benzerliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Stepanov ve ark. (1992), ekstrem halofilik arke *Halogeometricum mediterranei* 1538 suşundan izole ettikleri serin proteazı saflaştırmıştır. Saflaştırılan proteaz aktivitesinin 2 - 5 M aralığındaki NaCl konsantrasyonunda aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Studdert ve ark. (1997), bir haloalkalifilik arke olan *Natronococcus occultus*’un ekstraselüler proteazının en yüksek aktiviteyi 1 - 2 M NaCl ya da KCl konsantrasyonunda gösterdiğini belirlemiştir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 60 °C olduğu ancak bu sıcaklık derecesinde aktivitenin kararlı olmadığı bildirilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi ve stabilitesinin 2 M NaCl ve 50 °C’de belirlendiği rapor edilmiştir.

Gimenez ve ark. (2000), *Natrialba magadii*’nin ekstraselüler proteazını saflaştırarak karakterize etmiştir. Buna göre saf enzimin 60 °C, pH 8 ve 3 M KCl de en yüksek aktiviteyi gösterdiği bildirilmiştir. *N. magadii* proteazının 35 -40 °C’de 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası % 80 ve % 40 oranında aktivitenin korunduğu ve enzimin uzun bir süre 6-12 arasında ki pH’da stabil kaldığı bildirilmiştir.

Nolasco ve ark. (2002), bir halofilik arke olan *Haloferax mediterranei* ekstraselüler proteazı üretiminin besiyerinde ki tuz konsantrasyonuna bağlı olduğunu

göstermiştir. Saflaştırılan arkeal proteazın 2.56 - 4 M arasındaki NaCl konsantrasyonlarında en yüksek aktivite gösterdiği düşük tuz konsantrasyonlarında enzimin kararsız olduğu ve aktivitesinin geri dönüşümsüz kaybedildiği bildirilmiştir. Ayrıca *Haloferox mediterranei* ekstraselüler proteolitik enzimlerinin aktiviteleri için Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyduğu da belirtilmiştir.

Sanchez-Porro ve ark. (2003), ılımlı halofilik bakteri olan *Pseudoalteromonas* sp. CP76 suşundan izole ettikleri CP1 proteazını saflaştırarak karakterize etmiştir. Enzimin en iyi aktivitesini 55 °C, pH 8.5'te gösterdiği ve geniş bir NaCl (0-4 M) aralığında aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Kanlayakrit ve ark. (2004), Tayvan balık sosundan izole ederek *Halobacterium* cinsi üyesi olarak tanımladıkları *Halobacterium* sp. PB407 suşunun 4 M NaCl, pH 7.0 ve (M73 ortamı) çalkalamalı koşullarda 5 günlük inkübasyon sonrasında halofilik proteaz üretebildiğini bildirmiştir. Ayrıca 2,5 L mini fermentörde suşun proteaz üretimini daha kısa sürede gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Tanımlanan *Halobacterium* sp. PB407 suşu proteazı en yüksek aktiviteyi 1 - 4 M tuz derişiminde, pH 8'de ve 40 °C'de gösterdiği belirlenmiştir. Böylece balık sosu üretiminde bu halofilik arkeal enzimin kullanımına dikkat çekilebileceği ifade edilmiştir.

Higara ve ark. (2005), *Fillobacillus* sp. RF2-5 olarak isimlendirdikleri ılımlı halofilik özellikteki suşun ürettiği proteaz enzimini saflaştırmış ve bu saf enzimin % 10 NaCl, pH 10-11 ve 60 °C sıcaklıkta en yüksek aktiviteyi gösterdiğini % 25 NaCl'de stabil kaldığını göstermiştir.

Fukushima ve ark. (2005), bir halofilik arke olan *Haloarcula* sp. S-1 suşu tarafından üretilen α -amilaz enziminin 4.3 M NaCl, pH 7.0 ve 50 °C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Çeşitli organik solventlerde (benzen, toluen, kloroform vb. gibi) aktif ve stabil kaldığı, etil alkol ve aseton varlığında aktivite gözlenmediği tespit edilmiştir.

Patel ve ark. (2005), haloalkalifilik *Bacillus* sp. Ve1 suşunun optimum gelişim ve alkali proteaz üretiminin % 10 NaCl, pH 8 - 9'da gerçekleştiğini bildirmiştir. Pepton ve yeast ekstrakt kombinasyonlarının bakteri üremesini arttırdığı jelatin ve kazamino kombinasyonlarının ise proteaz üretimini maksimum seviyeye çıkardığı belirtilmiştir. Proteaz üretiminin glukoz ve amonyum varlığında katabolik represyona uğradığı ifade edilmiştir.

Vidyasagar ve ark. (2006), *Halogeometricum* sp. TSS101 tarafından üretilen proteazın mikroorganizmanın gelişimi ile doğrudan bir ilişkisi olduğunu göstermiştir. Maksimum proteaz aktivitesin maksimum üreme hızı ve maksimum biyokütlenin gözlemlendiği üstel gelişim fazında gerçekleştiğini ve arkeal proteazın bir primer metabolit olarak üretildiği saptanmıştır. Hem maksimum proteaz üretiminin hem de gelişimin inkübasyonun 84. saatinden sonra azaldığı bildirilmiştir.

Dodia ve ark. (2006), izole ettikleri ılımlı halofilik ve haloalkalifilik bakteri suşlarının % 5 - 20 NaCl, pH 8 - 10 gibi geniş aralıklarda gelişebildiği ve alkalın proteaz üretebildiğini rapor etmiştir. Bu izolatlardan S₅ suşu tarafından üretilen proteaz saflaştırılmış ve saf enzimin maksimum aktivitesini ve stabilitesini % 10 NaCl ve pH 9 - 9.5'da gösterdiği kaydedilmiştir.

Xiong ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, Kuzey Pasifikte 3310 metre derinlikten çıkarılan ve bir derin deniz bakterisi olan *Pseudomonas isachenkonii* UST041101-043'de soğuğa uyum sağlamış E1 ismi verilen bir proteaz üretildiği ve enzim üretimi için gereken optimum sıcaklık değerinin 35 °C olduğu bildirilmiştir.

Chamroensaksri ve ark. (2007), halofilik ve proteolitik özelliğe sahip bir bakteri olan NB2-1 suşunu karakterize ederek *Virgibacillus marismortui* olarak tanımladıkları çalışmada proteaz üretimi için gerekli olan kültür koşullarının % 15 NaCl, pH 9 ve 30 °C olduğunu belirtmiştir. Maksimum proteaz aktivitesinin ise optimum % 5 NaCl, pH 10.0 ve 50 °C'de tespit edildiği bildirilmiştir.

Vidyasagar ve ark. (2007), tarafından yapılan çalışmada halofilik bir bakteri olan *Chromohalobacter* sp. TVSP101'in proteaz üretimi üzerine kültür koşulları optimize edilmiştir. Suşun proteaz üretiminin üremeye bağlı olduğu ve maksimum enzim üretiminin durağan fazda (96 saat) gerçekleştiği belirtilmiştir. Suşun optimum üreme ve enzim üretiminin 40 °C, pH 7.2 ve 4 M NaCl konsantrasyonunda gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca organik azot kaynağı olarak kazein, pepton ve yağsız süt tozu kullanıldığında proteaz üretiminin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Özellikle besi ortamına % 1 pepton ile birlikte % 1 yağsız süt tozu ya da % 1 kazein ilave edildiğinde hücrelerin proteaz üretiminin en yüksek seviyeye çıktığı gözlenmiştir.

Ruiz ve De Castro (2007) tarafından yapılan çalışma ile haloalkalifilik bir arke olan *Natrialba magadii* ekstraselüler proteazının dimetilsülfoksit (DMSO), N,N-dimetilforamid, propilenglikol ve diokzan ile 1.5 M NaCl içeren sulu-organik solvent

karışımı içerisinde aktif ve stabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca optimum tuz konsantrasyonu ve organik solventlerde (DMSO, propilenglikol ve gliserol) enzimin etkinliğini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir.

Karbalaei-Heidari ve ark. (2007), ılımlı halofilik bakteri olan *Salinivibrio* sp. AF-2004 suşunun durağan fazda bir metalloproteaz ürettiğini bildirmiştir. Saflaştırılan bu enzimin maksimum aktivitesini 55 °C ve 0 - 0.5 M NaCl'de gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca enzimin 4 moların üzerindeki NaCl nin üzerindeki NaCl konsantrasyonunda aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin 5-10 arasındaki geniş pH aralığında stabil kaldığı ve pH 8.5'te maksimum aktivitenin gerçekleştiği bildirilmiştir. AF-2004 suşunun proteazının suyla çözünebilen organik solvent yada alkol içeren çözücülerde, içermeyenlere göre daha stabil olduğu ortaya konmuştur.

Akolkar ve ark. (2008), *Halobacterium* sp. SP1(1) suşunda ekstraselüler proteaz üretimi için besiyeri bileşimini istatistiksel yaklaşımla optimize etmiştir. Soya unu gibi ucuz hammadde kullanılarak üretilen arkeal proteazın çürüme önleyici kaplama ve balık sosu üretimi gibi farklı uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu organizmanın ürettiği ekstraselüler proteazın boyalarda sıklıkla kullanılan toluen, ksilen, n-dekan, n-dodekan ve n-undekan gibi organik solventlere karşı oldukça toleranslı olduğunu göstermişlerdir.

Joshi ve ark. (2008), izole ettikleri yirmi beş haloalkalifilik bakteri suşundan S-20-9'un potansiyel proteaz üreticisi olduğunu ve suşun % 5-25 NaCl ve pH 7-10 gibi geniş aralıklarda enzim üretebildiğini bildirmiştir. Bakteri suşunun optimum enzim üretimini % 15 NaCl ve pH 9 da gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Suşun enzim üretimi maltoz, laktoz, süktroz ve glukoz gibi şekerler ve yüksek miktarda jelatin, yeast ekstrakt, pepton ve kazamino asit gibi azot kaynakları varlığında enzim üretiminin baskılandığı belirtilmiştir.

Manikandan ve ark. (2009), ekstrem halofilik arke olan *Haloferax lucentensis* VKMM 007 suşunda üretilen proteazı saflaştırmıştır. Saf proteaz 20 - 70 °C aralığındaki sıcaklık derecelerinde, 0.85 - 5.13 M arasındaki NaCl konsantrasyonlarında ve 5.0 - 9.0 pH arasında kararlı olduğu bulunmuştur. Saf enzimin maksimum aktivitesini 60 °C, 4.3 M NaCl ve pH 8.0'de gösterdiği bildirilmiştir.

Moreno ve ark. (2009), tarafından ekstrem halofilik bir bakteri izolatu olan *Salicola* sp. IC10 suşunun % 15-20 NaCl, pH 8.0, ve 37 °C'de maksimum geliştiği ve

bakteri proteazının kazein, jelatin, sığır serum albüminini ve yumurta albuminini parçaladığı tespit edilmiştir.

Karbalaeei-Heidari ve ark. (2009), ılımlı halofilik bakteri olan *Halobacillus karajensis* MA-2 suşunun maksimum proteaz üretimini jelatinli ortamda 34 °C ve pH 8.0-8.5'te gerçekleştirdiğini tespit etmiştir. Mikroorganizmadan izole edilerek saflaştırılan enzimin 0.5 M NaCl, pH 9.0 ve 50 °C'de maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Karan ve Khare (2010), halofilik bakteri izolatı olan *Geomicrobium* sp. EMB2'nin ürettiği alkali proteazının bir çok organik solvent varlığında aktif ve stabil olduğunu bildirmiştir. Mikroorganizmadan saflaştırılan enzimin pH 6 - 12 arasında stabil olduğu ve en iyi aktivitesini 50 °C'de gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Bu enzimin 2'den büyük log P_{ow} değerlerine sahip organik solventlerde dikkate değer ölçüde stabilitesini koruduğu (sürfaktan ve deterjanların çoğu) gösterilmiştir.

VijayAnand ve ark. (2010), ekstrem halofilik arke olan *Halobacterium* sp. JS1'in maksimum gelişim ve proteaz üretimini % 20 NaCl, pH 7.0, 40 °C ve 200 rpm'de inkübasyonun 96. saatinden itibaren gösterdiğini rapor etmiştir. Bu çalışma kapsamında karbon kaynağı olarak kullanılan prinç kepeğinin enzim üretimini arttırdığı bildirilmiştir.

Shafiei ve ark. (2011), *Nesterenkonia* sp. F suşundan saflaştırdıkları α -amilazı en yüksek aktivitesinin pH 6.5, 0.75 - 1 M NaCl ve 45 °C sıcaklıkta gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca bu enzimin benzen, kloroform, toluen ve sikloheksan gibi çeşitli organik solventlerin varlığında stabilitesini korduğu tespit edilmiştir.

Annapurna ve ark. (2012), % 10 NaCl, pH 8.0 ve 37 °C'de optimum gelişme gösteren *Bacillus subtilis* izolatının kazein ve insan saçı varlığında maksimum proteaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Vijayaraghavan ve ark. (2012) *Halobacterium* cinsine ait proteaz üreticisi üç izolatın kültür koşullarını optimize ettikleri çalışmada optimum bakteriyel gelişim ve enzim aktivitesinin % 2.5 kazein, % 5 NaCl, pH 10.0 ve 37 °C'de inkübasyonun 48. saatte gözlemlendiğini belirtmiştir. Saf enzimin % 1 - 5 NaCl, pH 8.0 - 10.0 ve 40 - 60 °C gibi geniş aralıklarda stabil olduğu maksimum aktivitesini % 5 NaCl, pH 10.0 ve 60 °C'de gösterildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu enzimin boya endüstrisinde kullanılan toluen ve hekzan gibi organik solventlerde kararlı olduğu ve bu solventlerde % 103 ve % 114

oranında aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Li ve Yu (2012), *Salimicrobium halophilum* LY20 suşundan üretilen ve saflaştırılan proteazının % 12.5 NaCl, pH 10.0 ve 80 °C’de maksimum aktiviteyi gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca enzimin geniş aralıktaki pH (6.0 - 12.0), NaCl konsantrasyonu (% 2.5 - 20) ve sıcaklık (30-80 °C) derecelerinde yüksek aktivite gösterdiği de bildirilmiştir. Bununla birlikte her iki proteazın -0.24 ve daha düşük log P_{ow} değerlerine sahip suda çözünebilen organik solventlerin varlığında stabilitesini önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir.

Shafiei ve ark. (2012) *Nesterenkonia* sp. F suşundan saflaştırdıkları α -amilazın maksimum aktivitesini pH 7 - 7.5, 45 °C ve 0.25 M NaCl’de gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Enzimin % 20 oranında yüksek log P_{ow} değerine sahip solventler ve aseton, kloroform ve etanol varlığında da aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda ki (% 50), suyla karışabilen solventlerin aktivite üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Jadhav ve ark. (2013), tuzlu topraklardan izole ettikleri *Bacillus* cinsine ait aerobik bir tür olan AS-3 izolatında maksimum proteaz aktivitesinin 60 °C de gözlemlendiğini daha düşük sıcaklıklarda ise aktivitede önemli bir düşüş olduğunu bildirmiştir. AS-3 izolatına ait proteazın pH 5.0 - 11.0 arasındaki geniş bir aralıkta aktif olduğu ve en yüksek aktiviteyi de pH 9 ve 10’da gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak laktoz ve maltoz kullanılmasının proteaz üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte organik azot kaynağı olarak maya özütü varlığında proteaz aktivitesinin maksimum seviyeye ulaştığı görülmüş ve bunu sırasıyla sığır eti özütü ve peptonun takip ettiği bildirilmiştir. Diğer inorganik bileşenlerin ve aminoasitlerin varlığında üremenin arttığı ancak proteaz üretiminin düştüğü gözlenmiştir. KCl varlığında 72 saat inkübasyon sonrasında proteaz üretiminin maksimum seviyeye çıktığı belirtilmiştir.

Taprig ve ark. (2013), keratinolitik aktiviteye sahip alkali proteaz üreticisi olan halofilik *Bacillus* sp’nin maksimum enzim üretimi için % 12 tuza ihtiyaç duyduğunu ve 60 °C 'de aktivitesini koruduğunu bildirmiştir. Enzimin alkali pH’da yüksek sıcaklıkta kararlı olması nedeniyle deterjan endüstrisinin yanı sıra tüy degradasyonu ve keratin hidrolizi gibi önemli potansiyel uygulamalara sahip olabileceği rapor edilmiştir gösterilmiştir.

Pathak ve Sardar (2014), ise denizel tuzlalarda proteaz üreten arkelerin izole ederek karakterizasyonunu yapmıştır. Proteaz üreticisi izolatlar arasından APP15 suşunun en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Haloferax cinsine ait olduğu belirlenen zolatın pH 7.0, 35 °C’de ve % 10 - 26 arasındaki tuz konsantrasyonlarında geliştiği ve üretilen proteazın 4 M NaCl, pH 8 ve 50 °C sıcaklıkta en iyi aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *Haloferax* suşunun azot kaynağı olarak soya unu varlığında proteaz üretiminin arttığı tespit edilmiştir. NaCl yokluğunda enzimin tamamen aktivite kaybettiği ve pH 9 da aktivitesini % 83 oranında koruması nedeniyle enzimin halofilik alkali toleranslı olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada ham proteazın organik solventler varlığındaki stabiletisi belirlenmiş olup en yüksek stabilitenin gözlendiği etanolde vediger solventlerde de 7 günlük inkübasyon sonunda % 50 oranında stabilitesini koruduğu bulunmuştur.

Lakshmi ve ark. (2014), izole ettikleri haloalkalifilik *Bacillus* suşlarını % 1 yağsız süt tozu içeren ortamda proteolitik aktivite yönünden taranmış, S-8 izolatının potansiyel proteaz üreticisi olduğunu belirlemiştir. *Bacillus cereus* olarak tanımlanan izolatın % 1 melas, % 0.75 potasyum nitrat, % 5 magnezyum sülfat, % 0.5 KH₂PO₄ , % 0.01 demir sülfat ve % 0.5 kalsiyum karbonat ve % 1 NaCl içeren pH 12.0 olan ortamda % 2 oranında inokulumla 160 rpm’de 72 saatlik inkübasyon sonrasında maksimum proteaz üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Kazein (% 1) varlığında 1 saat inkübasyon sonrası optimum enzim aktivitesinin pH 10.0 ve 70 °C’de gözlendiği belirlenmiştir.

Sinha ve Khare (2014), ılımlı halofilik bakteri olan *Bacillus* sp. EMB9 proteazının yapı ve aktivitesi üzerine organik solvent etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada enzimin polar solventlerde önemli ölçüde kararlı kaldığını tespit etmişlerdir.

Vikramathithan ve Dhandapani (2014) proteaz üretimi için izole edilen 32 bakteriyel suş arasından HP-2 izolatının en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. İzolat proteazının % 5 - 25 arasındaki tuz konsantrasyonlarında oldukça kararlı olduğu ve 4 saat sonunda aktivitesini % 50 oranında koruduğu bildirilmiştir. İzolatın maksimum proteaz aktivitesinin % 15 NaCl, 200 mM CaCl₂ içeren ortamda pH 7.5’te ve 35 °C olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Sodyum klorür (NaCl), magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), potasyum klorür (KCl), demir sülfat ($FeSO_4$), sodyum sitrat, sodyum hidroksit (NaOH), hidrojen klorür (HCl), azocasein, asetik asit, tri kloro asetik asit, yeast ekstrakt (maya özütü), trizma, agar, kazein, kazamino asit, glukoz, yağsız süt tozu, jelatin, beef ekstrakt (sığır eti özütü), sükroz, nişasta, arabinoz, laktoz, fruktoz, pepton, gliserol (saf), dimetilformamid (DMF) (saf), etanol (% 96), 2-propanol (saf), 1-bütanol (saf), diklorometan (saf), kloroform (saf), toluen (saf), ksilen (saf), hekzan (saf), heptan (saf) ve izooktan (saf) Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları; hassas terazi (Ohaus EP 214C), otoklav (Alp CL32S), manyetik karıştırıcı (Are), sıcaklık ayarlı sabit inkübatör (Nüve EN 500), sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatör (Edmund Bühler GmbH), soğutmalı santrifüj (Hettich zentrifugen EBA 12R), spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Laminar kabin (Kojair KR-130 Golden Line), su banyosu (Nüve BM 402), vorteks (Mhisheler IKA), etüv (Heraeus), pH metre (İnılab wtw series).

3.1.2. Halofilik Arkeler

Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında bulunan, Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden (Çankaya Tuz Madeni-Çankırı, Samandağ-Hatay, Acıgöl-Denizli, Seyfe gölü-Kırşehir) izole edilmiş 8 halofilik arke izolatu kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

Halofilik arke izolatlarının aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla Seegal-Gibbons (SG) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri bileşimi (g/L) : NaCl 250, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20, KCl 2, sodyum sitrat 3, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.023, kazamino asit 7.5, yeast ekstrakt 1 ve pH 7.35 (Ozcan ve ark., 2007).

3.2. Yöntem

3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi

Halofilik arke koleksiyonuna ait izolatlar, gliserol stoklarından ardışık pasajlar yapılarak aktifleştirilmiştir. Katı ve sıvı ortama ekimi yapılan izolatlar 37 °C’de üretilmiştir. Sıvı ortamdaki üretimleri çalkalamalı olarak yapılmıştır.

3.2.2. Proteaz Aktivitesine Sahip Suşların Taranması

Proteolitik aktivite gösteren suşların belirlenmesi amacıyla yağsız süt tozu (% 0.3) içeren SG katı besiyerleri kullanılmıştır. 15 gün 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür üzerine % 25’lik Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi dökülerek proteaz aktivitesine sahip suşlar tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi çalışmalarında organik olarak sadece % 0.2 oranında yağsız süt tozu içeren modifiye SG besiyeri kullanılmıştır.

3.2.3. Proteaz Aktivitesi Tayini

Proteaz aktivitesi Vidyasagar ve ark. (2007)’den modifiye edilerek belirlenmiştir. Geç logaritmik fazdaki kültür +4 °C’de 15000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla substrat olarak, NaCl (2.5 M) içeren Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 8.0) hazırlanan % 0.5 azokasein çözeltisi kullanılmıştır. Substrat çözeltisi 45 °C’de 5 dk ön inkübasyondan sonra substrat çözeltisine enzim eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Bir saatlik inkübasyon süresi sonunda reaksiyon karışımına % 10 TCA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. TCA ilave edilen örnekler santrifüjlendikten sonra 440 (nm)’de süpernatantın absorbansı belirlenmiştir. Bir ünite (enzim aktivitesi), dakikada 0.01 birim absorbans değişimi olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = (\Delta A \times V_T) / (0.01 \times dk \times V_e)$$

- ΔA Absorbans farkı
- 0,01 absorbans değişimi
- V_T (toplam hacim)
- V_e (enzim hacmi)

3.2.4. Proteaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyonu

Her bir kültür koşulunun optimizasyonu sonrasındaki aktivite çalışmaları belirlenen optimum koşullar üzerinden kademeli olarak yürütülmüştür.

3.2.4.1. İnkübasyon Zamanının Etkisi

Halofilik arkelerde maksimum proteaz üretiminin gerçekleştiği inkübasyon zamanının belirlenmesi amacıyla, 37 °C’de, 150 rpm’de inkübe edilen kültürlerden 24 saat ara ile örnek alınarak enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4.2. NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Halofilik arkelerin proteaz üretimi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla tuz içeriği 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 ve 4.5 M olan besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon 37 °C sıcaklıkta çalkalamalı olarak (150 rpm) gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. pH’nın Etkisi

Ortam pH’sının proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla her bir izolat için belirlenen optimum NaCl konsntrasyonlarına ve 6, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 pH değerlerine sahip besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon 37 °C’de ve 150 rpm’de gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.4. Sıcaklığın Etkisi

Her bir halofilik arke izolatının maksimum proteaz üretimi gösterdiği optimum NaCl konsantrasyonu ve optimim pH değerine sahip besiyerleri kullanılarak 25, 30, 37.5, 40, 45, 50 ve 55 °C’de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Kültürler çalkalamalı olarak 150 rpm’de inkübe edilmiştir.

3.2.4.5. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarının proteaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla her bir izolat için belirlenen optimum koşullara sahip besi ortamına tek karbon kaynağı olarak % 0.5 oranında glukoz, yağsız süt tozu, yeast ekstrakt, jelatin, beef ekstrakt, sükroz, nişasta, arabinoz, laktoz, fruktoz, gliserol, pepton

veya kazamino asit eklenmiştir. İnkübasyon 150 rpm de gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Proteaz Aktivitesinin Optimizasyonu

3.2.5.1. Optimum Tuz Derişiminin Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gözleendiği NaCl konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, final tuz konsantrasyonu 1.4, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 M olan substrat çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.5.2. Optimum pH Değerinin Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gözleendiği pH değerinin belirlenmesi amacıyla ile optimum NaCl konsantrasyonuna sahip pH'ı 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5 olan tampon çözeltiler kullanılmıştır.

3.2.5.3. Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gözleendiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, optimum NaCl konsantrasyonuna ve optimum pH değerine sahip tampon çözeltiler kullanılarak 20, 30, 35, 45, 50, 55 ve 60 °C olmak üzere yedi farklı sıcaklıkta aktivite belirlenmiştir.

3.2.6. Organik Solventlerin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

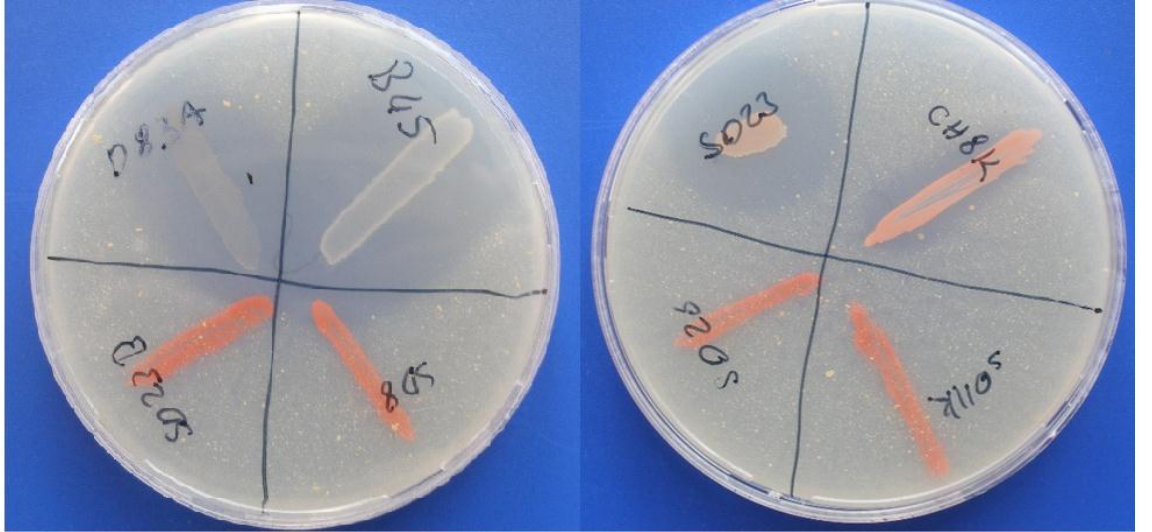
Organik solventlerin proteaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, farklı log P_{ow} değerlerine sahip organik solventler kullanılmıştır. Solventler ve log P_{ow} değerleri; gliserol (-1.76), DMF (-1.0), Etanol (-0.3), 2-propanol (-0.05), 1-bütanol (0.8), dikolorometan (1.18), kloroform (1.97), toluen (2.5), ksilen (3.15), hekzan (3.5), heptan (4.27) ve izooktan (4.8)'dır (Ogino ve ark., 1995; Ruiz ve De Castro 2007; Karan ve Khare 2010; Shafiei ve ark., 2011; Li ve Yu 2012). Eşit hacimde enzim kaynağı ve solvent karıştırılarak 25 °C, 150 rpm'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında standart deney koşulları uygulanarak enzim aktivitesi belirlenmiş ve bağıl aktivite hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez kapsamında ki tüm çalışmalar minimum 4 tekrarlı gerçekleştirilmiş olup her bir grafik üzerinde standart sapma değerleri gösterilmiştir.

4.1. Proteaz Aktivitesi Gösteren Suşların Taranması

Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden izole edilmiş halofilik arke koleksiyonuna ait 8 izolat gliserol stoklarından aktifleştirilerek % 0.3 yağsız süt tozu içeren katı ortamlara ekilmiştir. 15 günlük inkübasyon süresi sonunda sekiz izolat içerisinde 3 izolatın (B45, D83A ve SD23) belirgin derecede zon oluşturuğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Yağsız süt tozu içeren modifiye SG agarda halofilik arkelerin proteaz tarama sonuçları

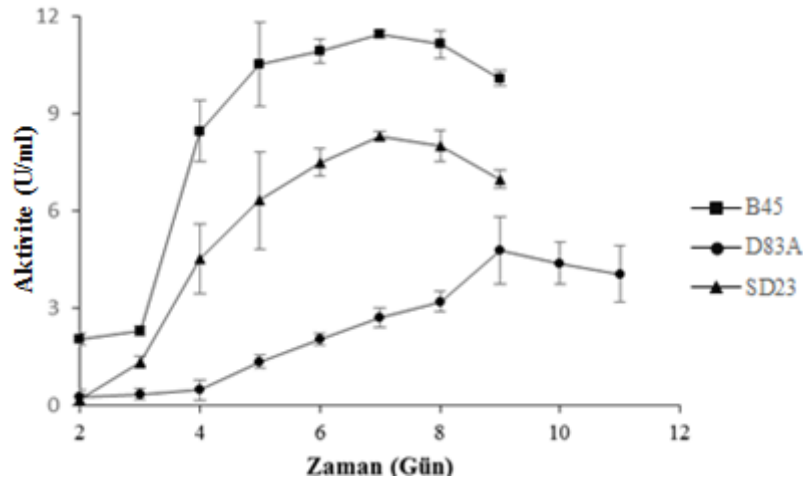
4.2. Proteaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Optimizasyon Sonuçları

B45, D83A ve SD23 izolatları, içerisinde karbon kaynağı olarak sadece % 0.2 yağsız süt tozu bulunan modifiye SG ortamında ve 150 rpm'de diğer kültür koşullarının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilerek en yüksek proteaz üretiminin gözlemlendiği koşullar saptanmıştır.

4.2.1. Proteaz Üretiminin İnkübasyon Zamanına Bağlı Değişimi

Modifiye SG ortamında (% 20 NaCl ve pH 7.35) 37 °C'de üretilen halofilik arke

izolatlarının inkübasyon zamanına bağlı proteaz aktivite değişimi Şekil 4.2’de verilmiştir. Zamana bağlı olarak en yüksek enzim aktivitesi B45 ve SD23 izolatları için 7. günde sırasıyla 11.45 U/ml ve 8.31 U/ml, D83A izolatı için 9. günde 4.77 U/ml olarak bulunmuştur.



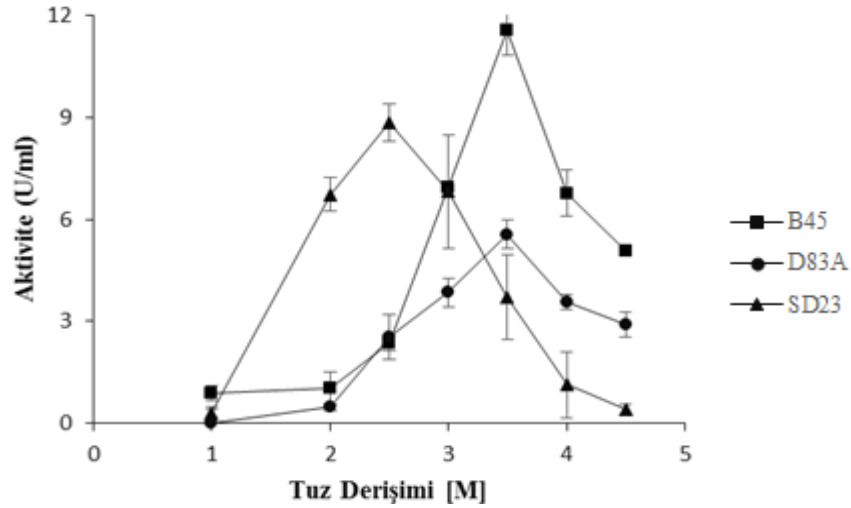
Şekil 4.2. Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin inkübasyon zamanına bağlı değişimi

Kim ve Dordick (1997) *Halobacterium halobium* ATCC 43214 suşuyla % 25 NaCl ve % 1 yeast ekstrakt içeren ortamda 40 °C’de 200 rpm inkübasyon koşullarında en yüksek aktiviteye 96. saatten sonra ulaşıldığını bildirmiştir. Diğer bir halofilik arke suşu olan *Halogeometricum* TSS 101 ile yapılan çalışmada (% 20 NaCl, % 1 pepton, pH 7.2, 37 °C’de, 200 rpm) ise inkübasyonun 84. saatinden sonra maksimum proteaz aktivitesi saptandığı belirtilmiştir (Vidyasagar ve ark., 2006).

4.2.2. Proteaz Üretimin NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Yedi farklı NaCl konsantrasyonu (1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ve 4.5 M), pH 7.35 ve 37 °C’de üretilen arkeal izolatların optimum inkübasyon zamanlarında belirlenen proteaz üretimi sonuçları (Şekil 4.3) verilmiştir.

En yüksek enzim üretiminin belirlendiği NaCl konsantrasyonunun B45 ve D83A izolatları için 3.5 M ve SD23 izolatı için 2.5 M olduğu bulunmuştur. Her bir izolatın optimum tuz konsantrasyonundaki aktivitesi sırasıyla 11.58 U/ml, 5.55 U/ml ve 8.85 U/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin kültür ortamındaki NaCl konsantrasyonuna bağlı değişimi

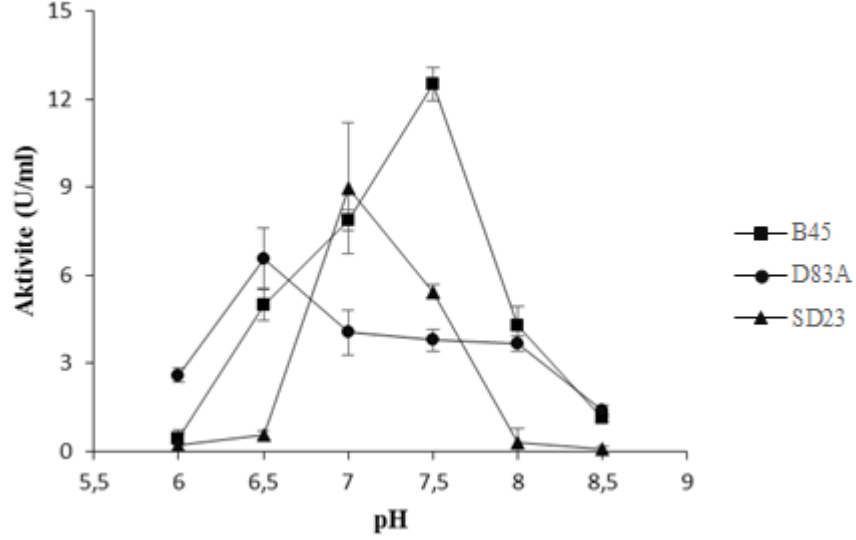
Halobacterium'un diğer suşu SP1(1) ile yapılan çalışmada optimum proteaz üretiminin 4.27 M NaCl'de saptandığı belirtilmiştir (Akolkar ve ark. 2008). VijayAnand ve ark. (2010), optimum sıcaklık ve pH şartlarında *Halobacterium* sp. Js1 suşu için maksimum proteaz üretiminin 3.5 M NaCl konsantrasyonunda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Diğer bir halofilik arke türü olan *Haloferax lucentensis* VKMM 007'nin 40 °C'de, çalkalamalı (150 rpm) olarak inkübe edilen kültür ortamında (% 0.5 beef ekstrakt, % 0.5 pepton ve pH 7.5) maksimum proteaz aktivitesini 3 M NaCl'de gösterdiği bildirilmiştir (Manikandan ve ark 2011). Ayrıca Vidyasagar ve ark. (2006) *Halogeometricum* sp. TSS101 suşunun % 1 yağsız süt tozu ve 3.4 M NaCl içeren ortamda 40 °C ve çalkalamalı koşullarda maksimum proteaz üretimini gerçekleştirdiğini ve 1.4 M'ın altındaki NaCl konsantrasyonunda proteaz üretiminin gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Ancak çalışmamızda her biri ekstrem halofil olan B45 ve SD23 izolatlarının 1 M NaCl içeren ortamda düşükde olsa proteaz ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).

4.2.3. Proteaz Üretiminin pH'a Bağlı Değişimi

Optimum NaCl konsantrasyonu, 37 °C ve 6 farklı pH'da (6.0 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) geliştirilen herbir izolatın optimum inkübasyon zamanında belirlenen proteaz aktivite değerleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

Maksimum enzim üretimi B45 izolatında pH 7.5'te (12.51 U/ml), D83A

izolatında pH 6.5'ta (6.57 U/ml) ve SD23 izolatında pH 7.0'de (8.96 U/ml) belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin kültür ortamının pH'sına bağlı değişimi

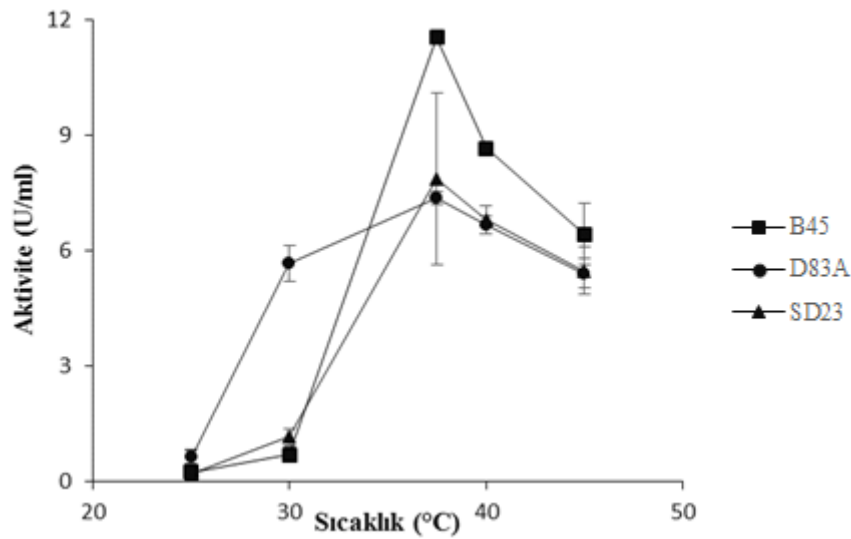
Halofilik arkelerin büyük bir kısmının yaklaşık pH 7'de optimum geliştiği bilinmektedir (Bowers ve Wiegel 2011). Çalkalamalı koşullarda 37 °C'de geliştirilen *Halobacterium* sp. PB407 ve 40 °C'de geliştirilen *Halobacterium* sp. JS1 suşlarında en yüksek proteaz aktivitesinin pH 7'de gerçekleştiği bildirilmiştir (Kanlayakrit ve ark. 2004 VijayAnand ve ark., 2010). *Halogeometricum* TSS101 ile yapılan diğer bir çalışmada ise maksimum proteaz aktivitesinin pH 7.2'de olduğu bulunmuştur (Vidyasagar ve ark., 2006). D83A izolatında diğer iki suşa göre optimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği pH'dan 8'e kadar olan aralıkta ortalama % 44 oranında bir azalma nedeniyle pH toleransının daha geniş olduğu ve pH 6'da düşükde olsa aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). *Halobacterium* sp JS1 ve *Halogeometricum* sp TSS101 suşlarında da geniş pH aralığına (7-11) sahip kültür ortamında enzim üretiminin meydana geldiği bildirilmiştir (VijayAnand ve ark., 2010; Vidyasagar ve ark., 2006).

4.2.4. Proteaz Üretiminin Sıcaklığa Bağlı Değişimi

Optimum NaCl konsantrasyonu ve pH ortamında 25, 30, 37, 40 ve 45 °C olmak üzere 5 farklı sıcaklıkta optimum inkübasyon zamanında belirlenen proteaz aktivite

sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir.

Halofilik arke türlerinin optimum gelişme sıcaklıkları 28-40 °C'dir (Bowers ve Wiegel 2011). Çalışmada kullandığımız her üç izolatın en yüksek proteaz üretimini 37 °C'deki gelişme koşullarında gerçekleştirdiği saptanmıştır. Halofilik arkeal suşlarla yapılan diğer proteaz üretimi çalışmalarında da optimum üreme sıcaklığının 35-40 °C olduğu bildirilmiştir (Kanlayakrit ve ark., 2004; VijayAnand ve ark., 2010).



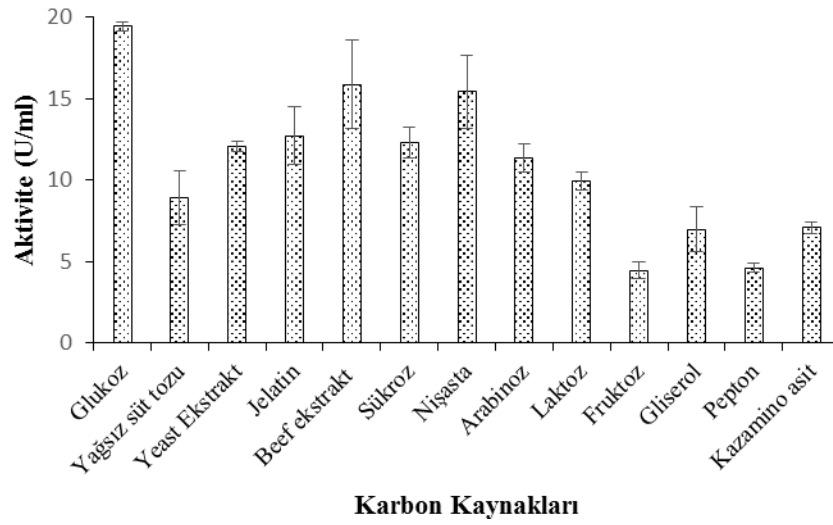
Şekil 4.5. Halofilik arke izolatlarında proteaz üretiminin üreme sıcaklığına bağlı değişimi

4.2.5. Proteaz Üretiminin Farklı Karbon Kaynaklarına Bağlı Değişimi

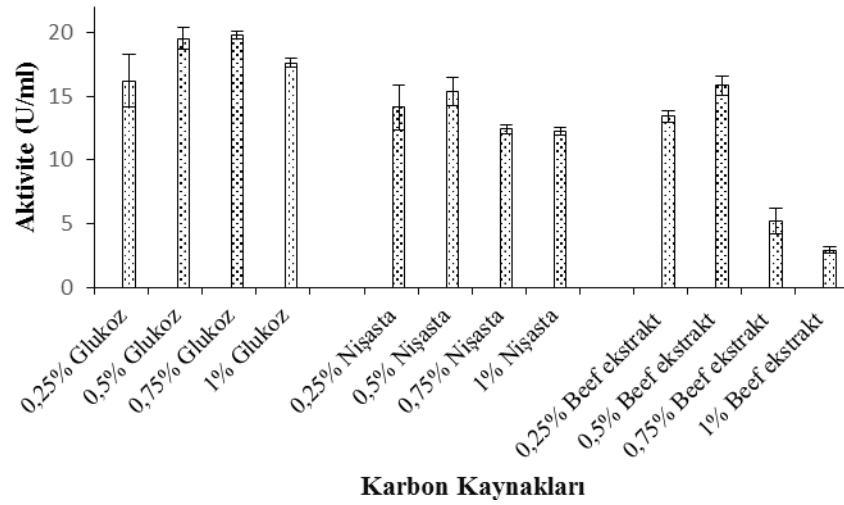
İzolatların belirlenen optimum koşullarında proteaz üretimi üzerine her biri % 0.5 oranında ortama ilave edilen 13 farklı karbon kaynağının (glukoz, yağsız süt tozu, yeast ekstrakt, jelatin, beef ekstrakt, sükroz, nişasta, arabinoz, laktoz, fruktoz, gliserol, pepton ve kazamino asit) etkisi belirlenmiştir. Ayrıca her bir izolatın en yüksek proteaz üretimini sağlayan karbon kaynaklarının optimizasyonu yapılmıştır

B45 izolatının 19.47 U/ml ile glukoz varlığında en yüksek proteaz üretimini gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Glukozdan sonra diğer karbon kaynaklarına göre en yüksek aktivite beef ekstrakt ve nişasta içeren ortamda birbirine yakın değerlerde sırasıyla 15.88 U/ml ve 15.44 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle bu 3 karbon kaynağının farklı derişimleri için optimizasyon yapılmış ve en yüksek enzim aktivitesinin 19.80 U/ml olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6). % 0.75 glukoz içeren ortamda gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.7). En düşük proteaz üretimi ise diğer izotlardan

farklı olarak fruktoz varlığında tespit edilmiştir.

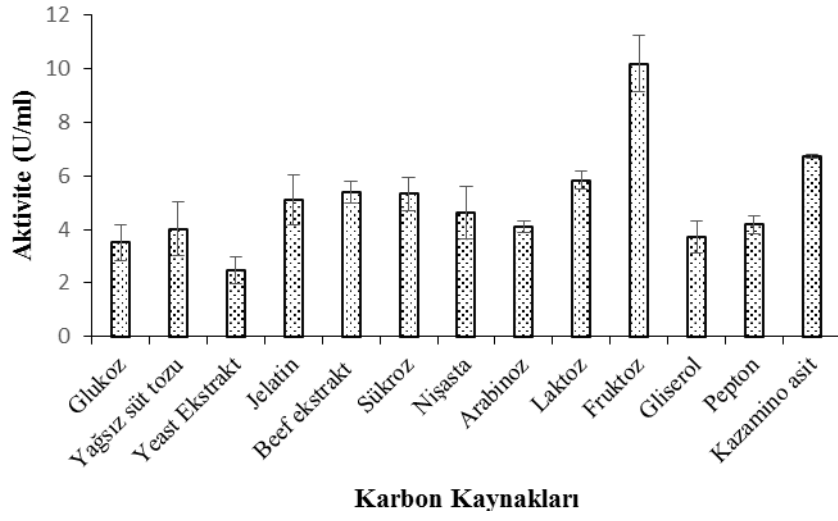


Şekil 4.6. B45 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi

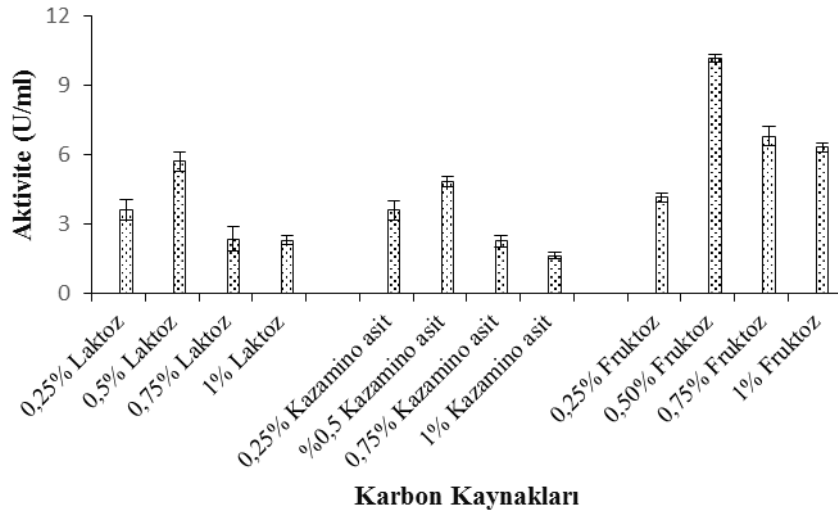


Şekil 4.7. B45 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki glukoz, nişasta ve beef ekstrakt miktarlarına bağlı değişimi

D83A izolatında en yüksek aktivite 10.2 U/ml olarak 13 karbon kaynağı arasından fruktoz içeren ortamda saptanmıştır. Fruktozdan sonraki en yüksek aktiviteler kazamino asit varlığında 6.7 U/ml ve laktoz varlığında 5.85 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). En yüksek 3 karbon kaynağındaki miktar optimizasyonu sonucunda ise en yüksek aktivite değerlerinin % 0.5 oranında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

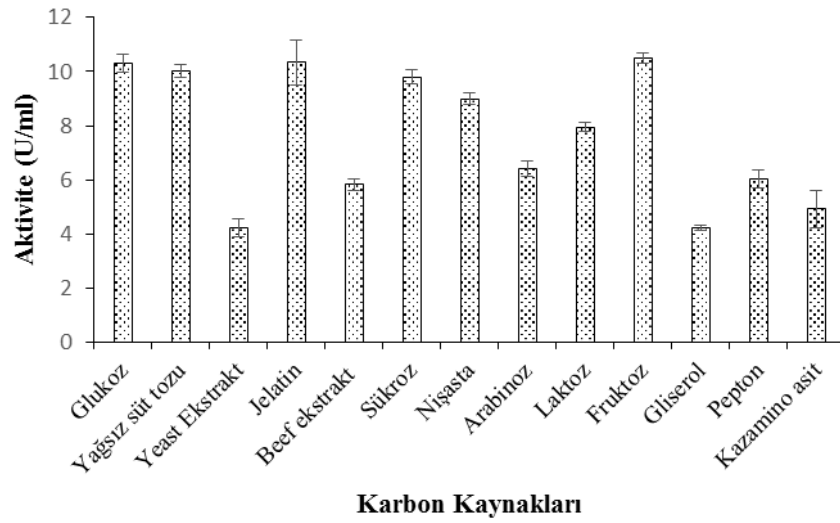


Şekil 4.8. D83A izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi

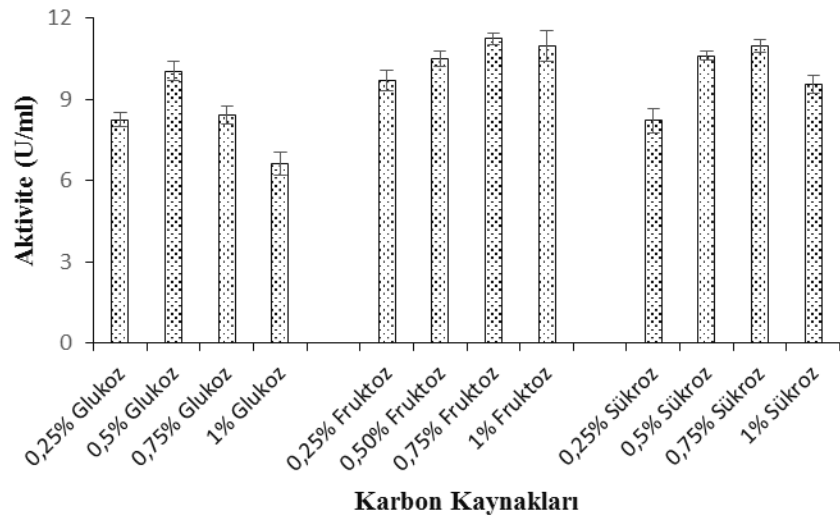


Şekil 4.9. D83A izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki laktoz, kazamino asit ve fruktoz miktarlarına bağlı değişimi

SD23 izolatının fruktoz, glukoz, süktroz, yağsız süt tozu, jelatin ve nişasta varlığında 9.06-10.54 U/ml aralığında yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bunlar arasından en yüksek aktivite değerlerinin elde edildiği fruktoz, glukoz ve süktroz'un farklı konsantrasyonlarının optimizasyonu sonucunda ise maksimum proteaz üretiminin % 0.75 fruktoz varlığında (11.25 U/ml) gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. SD23 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki farklı karbon kaynaklarına bağlı değişimi



Şekil 4.11. SD23 izolatında proteaz üretiminin kültür ortamındaki glukoz, fruktoz ve sükröz miktarlarına bağlı değişimi

Ekstraselüler enzim üretimi üzerine kültür ortamı kompozisyonunun etkisi büyüktür. Karbon ve azot kaynakları mikroorganizmalarda ki hücre gelişim ve enzim üretimini etkileyen en önemli faktörlerdir (D'Alessandro ve ark., 2007). Halofilik arke suşlarının proteaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisinin belirlendiği az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Vidyasagar ve ark (2006), *Halogeometricum* sp. TSS101'in % 1 yağsız süt tozu içeren ortamda maksimum proteaz aktivitesi gösterdiğini, glukoz içeren ortamda ise aktivite gözlenmediğini belirtmişlerdir. *Halobacterium* sp. JS1 suşuyla yapılan diğer bir çalışmada ise fruktoz, maltoz ve sükröz gibi şekerlerin

varlığında proteaz üretiminin gerçekleştiğini bildirmişlerdir (VijayAnand ve ark 2010).

Halofilik bakterilerde glukoz ve laktoz gibi temel karbon ve enerji kaynakları varlığında proteolitik enzim üretiminin katabolik represyonla baskılandığının bildirilmesine rağmen (Lama ve ark., 2005; Sanchez-Porro ve ark. 2003), diğer bir çalışmada ise proteaz üretiminde glukoz ve laktozun bu tür bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Amoozegar ve ark., 2007). Çalışmamızda ise kültür ortamına eklenen şekerlerden glukoz ve fruktozun izolatlarda ekstraselüler proteaz aktivitesinin artmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bileşiminde sadece % 0.2 oranında yağsız süt tozu bulunan yüksek tuzlu ortama glukoz ve fruktoz ilavesiyle arkeal proteaz üretiminin artması, şekerlerin aktif bir şekilde izolatlar tarafından enerji kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir. Aerobik halofilik arkelerde (örneğin *Haloarcula marismortui* ve *Halobacterium saccharovororum*) glukozun sadece modifiye bir “yarı-fosforilatif” Entner–Doudoroff metabolik yolu ile, fruktozun ise yine modifiye Embden–Meyerhof metabolik yolu üzerinden tamamen yakınının metabolize edildiği gösterilmiştir (Brasen ve ark., 2014).

4.3. Ekstraselüler Proteaz Aktivitesi Üzerine Ortam Koşullarının Optimizasyonu

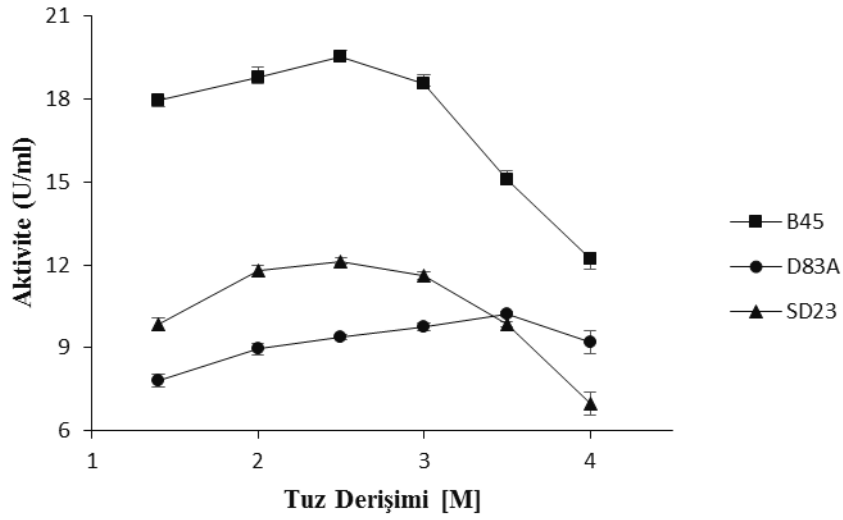
Optimum ekstraselüler proteaz üretim koşullarında geliştirilen B45, D83A ve SD23 izolatlarının maksimum proteaz aktivitesi gösterdiği NaCl konsantrasyonu, sıcaklık derecesi ve pH değeri belirlenmiştir.

4.3.1. Proteaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Her bir izolat proteazının maksimum aktivite gösterdiği NaCl konsantrasyonunu belirlemek amacıyla altı farklı tuz konsantrasyonu (1.4, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 M) kullanılmış ve en yüksek aktivitenin B45 ve SD23 proteazı için 2.5 M NaCl (sırası ile 19.55 U/ml ve 12.13 U/ml), D83A proteazı için 3.5 M NaCl (10.23 U/ml) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

Doygun tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda yaşayabilen halofilik arkelerin hücre dışı ve hücre içi enzimleri de yüksek tuz konsantrasyonlarına adapte olmuştur. Yüksek konsantrasyondaki tuz varlığına adapte olan haloarkeal enzimler 1 M’den düşük NaCl konsantrasyonlarında hızla denatüre olmakta ve üç boyutlu yapısını geri dönüşümsüz olarak kaybedebilmektedirler (Sellek ve Chaudhuri 1999). Çalışmamızda

üç izolatın ekstraselüler proteazının 1.4 – 4.0 M aralığındaki NaCl konsantrasyonunda aktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.12). Manikandan ve ark. (2009) *Haloferax lucentensis* VKMM 007 proteazının 0.85-5.13 M arasındaki NaCl konsantrasyonunda aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *Halobacterium* sp. PB407 suşuyla yapılan diğer bir proteaz aktivitesi belirlenmesi çalışmasında maksimum aktivitenin 2.13 M NaCl’de belirlendiği bildirilmiştir (Kanlayaktrik ve ark., 2004). Nolasco ve ark (2002) *Haloferax mediterranei* proteazında en yüksek aktivitenin 3.5 M NaCl’de belirlendiğini bildirmiştir. Gimenez ve ark. (2000) ise *Natrialba magadii* ‘den saflaştırılan proteazın en yüksek aktivitesini 3 M KCl varlığında gösterdiğini bildirmişlerdir.



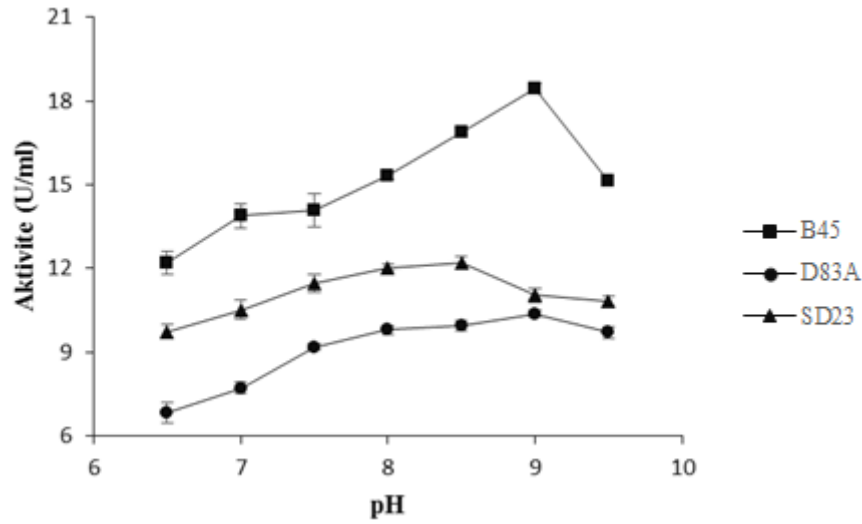
Şekil 4.12. Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi

4.3.2. Proteaz Aktivitesinin pH Optimizasyonu

Optimum kültür koşullarında elde edilen enzimin aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla her bir izolat için optimum NaCl konsantrasyonu ve 7 farklı (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5) pH’da yapılan çalışmalar sonucundaki aktivite değişimi Şekil 4.13’te verilmiştir.

B45 ve D83A proteazının maksimum aktivitesini pH 9’da ve SD23 proteazının ise maksimum aktivitesini pH 8.5’te gösterdiği saptanmıştır. Optimum pH değerinde enzim aktivitesi, B45 için 18.46 U/ml, D83A için 11.04 U/ml ve SD23 için 12.21 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Her üç halofilik arke proteazının test edilen geniş pH aralığında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer halofilik arke suşlarına ait

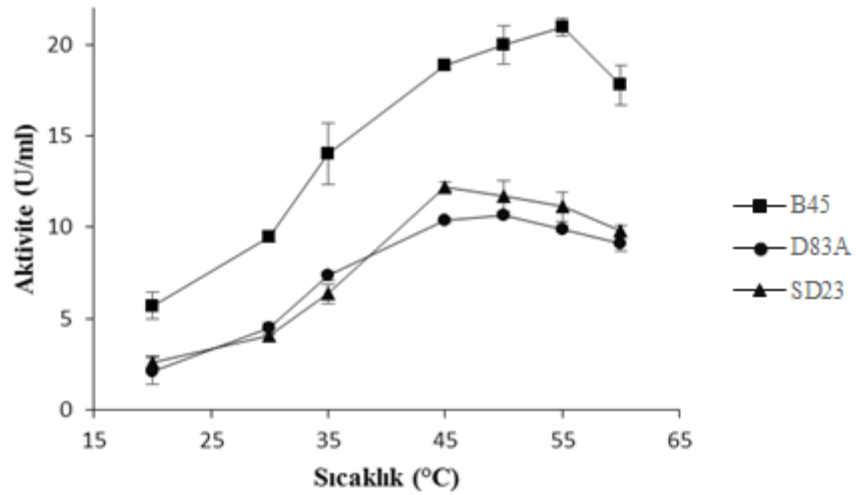
proteazlarla yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmış olup enzimin aktivite gösterdiği pH aralığının, *Natrialba magadii* proteazı için 6-12, saflaştırılmış *Haloferax mediterranei* proteazı için 4-9 ve saflaştırılmış *Haloferax lucentensis* VKMM 007 proteazı için 5-9 arasında olduğu ve maksimum aktivitenin ise pH 8’de belirlendiği bildirilmiştir (Gimenez ve ark., 2000; Nolasco ve ark., 2002; Manikandan ve ark., 2009). Vidyasagar ve ark. (2006) haloalkalifilik bir arke suşu olan *Halogeometricum* sp. TSS101’den kısmi saflaştırılan proteazın aktivitesi için optimum pH’nın 10 olduğunu belirtmişlerdir. Kanlayakrit ve ark. (2004), *Halobacterium* sp. PB407 proteazı için maksimum aktivitenin pH 8’de gözleendiği bildirmişlerdir.



Şekil 4.13. Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

4.3.3. Proteaz Aktivitesine Sıcaklık Optimizasyonu

Optimum kültür koşullarında geliştirilen her bir izolata ait proteazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla maksimum aktivitenin gözleendiği NaCl konsantrasyonu ve pH’da 7 farklı sıcaklıkta (20, 30, 35, 45, 50, 55 ve 60 °C) aktivite değerleri belirlenmiştir. Sıcaklığa bağlı aktivite değişimi sonuçları Şekil 4.14’te verilmiştir. D83A izolatında maksimum aktivitenin 50 °C’de 10.64 U/ml olduğu, B45 izolatında maksimum aktivitenin 55 °C’de, 21 U/ml olduğu ve SD23 izolatında maksimum aktivitenin 45 °C’de 12.21 U/ml olduğu tespit edilmiştir.



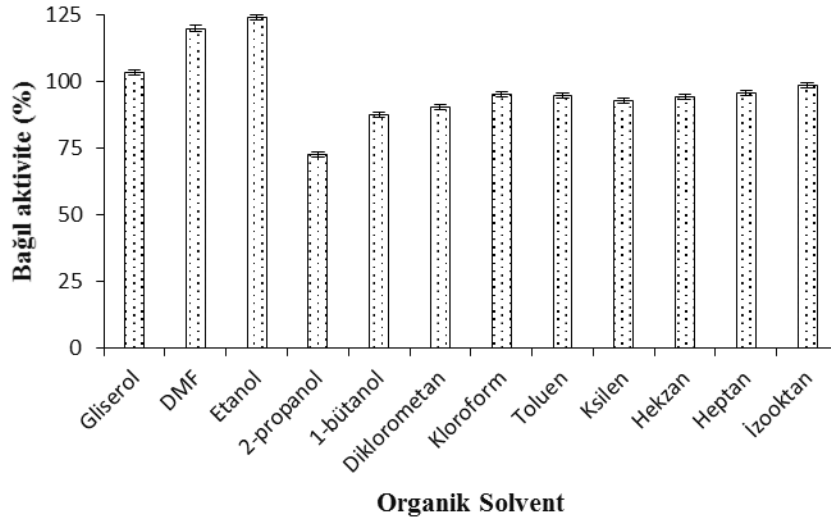
Şekil 4.14. Halofilik arke izolatlarının ekstraselüler proteaz aktivitesi üzerine sıcaklık değerlerinin etkisi

En yüksek aktivite koşullarda *Haloferax mediterranei* proteazının 45-50 °C’de, *Halobacterium* sp. PB407 proteazının 40 °C’de ve *Haloferax lucentensis* VKMM 007 proteazının 60 °C’de en yüksek aktivitelerini gösterdiği bildirilmiştir (Nolasco ve ark., 2002; Kanlayakrit ve ark., 2004; Manikandan ve ark., 2009). Ayrıca *Natrialba magadii* ve *Halogeometricum* sp. TSS101 suşlarından izole edilerek kısmi saflaştırılan proteazların 60 °C’de maksimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Vidyasagar ve ark., 2006; Gimenez ve ark., 2002). B45, D83A ve SD23 izolatlarında da optimum enzim aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda (45, 50 ve 55°C) gerçekleşmesi ve 45’in üzerindeki sıcaklık değerlerinde aktivitenin büyük oranda korunması nedeniyle (Şekil 4.14), bu organizmalara ait proteazların termofilik karakterde olduğu anlaşılmaktadır. Haloarkeal enzimlerin sadece tuza toleranslı olmayıp 40 °C’nin üzerindeki ortam sıcaklıklarında stabil kaldıkları önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Eichler 2001; Madern ve ark., 2000; Ozcan ve ark., 2009).

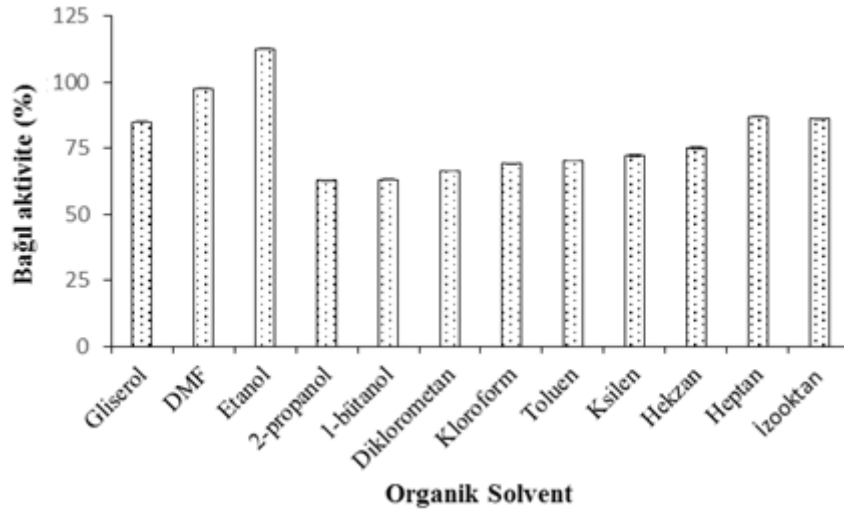
4.4. Organik Solventlerin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

İzolatlara ait proteazların organik solvent toleransını belirlemek amacıyla, 12 farklı organik solvent kullanmıştır. Çalışmada kullanılan organik solventler, solventin oktanol ve su arasındaki ayrılma katsayısının logaritmik bir ifadesi olan $\log P_{ow}$ değerlerine göre seçilmiştir. Her bir izolat proteazının % 50 (v/v) solvent varlığında ve oda koşullarındaki 1 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen bağıl aktivite değerleri Şekil 4.15 - 4.17’de verilmiştir.

B45 ekstraselüler proteazının test edilen bütün organik solventlerde % 70'in üzerinde bağıl aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15). En yüksek enzim aktivitesinin düşük log P_{ow} değerine sahip gliserol ve DMF varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir.



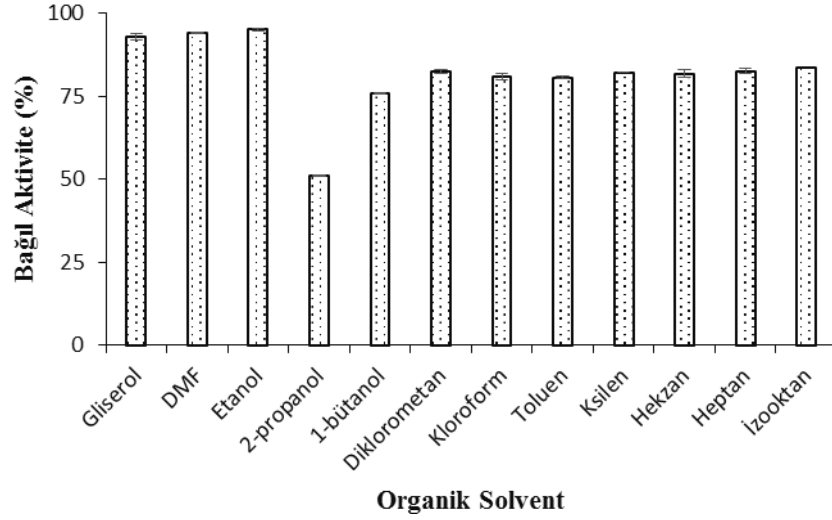
Şekil 4.15. Organik solventlerin B45 proteaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.16. Organik solventlerin D83A proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Düşük log P_{ow} değerine sahip gliserol ve DMF içeren ortamda D83A proteazının % 85'in üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16). D83A proteazının -0.05 ile 4.8 arasındaki log P_{ow} değerlerine sahip organik solventleri içeren ortamlarda % 62 ile % 87 arasındaki oranlarda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

SD23 proteazının 2-propanol hariç diğer düşük ve yüksek log P_{ow} değerlerine sahip solventlerde % 75'in üzerinde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Organik solventlerin SD23 proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Enzimlerin genel olarak suda çözünen ya da çözünmeyen organik solventler varlığında kolaylıkla denatüre olduğu ve katalitik aktivitelerini katbettikleri bilinmektedir (Ogino ve ark., 1999). Buna karşın herhangi bir özel işlem yapılmadan organik çözücü varlığında doğal stabilitesini koruyabilen enzimler, solvent kullanımına dayalı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi yönünden büyük bir önem taşımaktadırlar (Ogino ve ark., 2000). Tuzun mevcudiyeti su aktivitesini düşürdüğünden 1 M'in üzerindeki tuz konsantrasyonlarında çözünür formda kalarak aktivite gösteren halofilik karakterdeki arkeal enzimler, sulu/organik ve susuz ortamlarda kullanılma potansiyeline sahip olmaktadır (Sellek ve Chaudhuri 1999). Bu özellikleri arkeal enzimleri, organik solvent varlığında gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar için oldukça umut verici bir katalizör haline getirmektedir (Li ve ark., 2009).

Haloferax lucentensis VKMM 007'den saflaştırılan proteazın, reaksiyon ortamında hacimce % 25 oranda bulunan polietilen glikol, etanol, bütanol, aseton, dimetil sülfoksit ve ksilen gibi solventlerin varlığında 40 °C de 30 dk inkübasyon sonrasında stabil kaldığı bildirilmiştir (Manikandan ve ark., 2009). Haloalkalifilik *Natrialba magadii* ekstraselüler proteazının 1,5 M NaCl mevcudiyetinde gliserol, DMSO, DMF, propilenglikol ve dioksan içeren sulu organik solvent karışımlarında

stabil kalarak aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. Ayrıca enzimim optimum dışındaki NaCl konsantrasyonlarında DMSO, propilenglikol ve gliserol mevcudiyetinin enzim stabilitesinin korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Ruiz ve ark., 2007). Akolkar ve ark., (2008) *Halobacterium* sp. SP1(1) ekstraselüler proteazının toluene % 96, ksilene ve n-dodekana % 99 oranında tolerans gösterdiğini, n-undekan ve n-dekan varlığında ise aktivitesini tamamıyla koruduğunu bildirmişlerdir. Proteaz haricinde diğer haloarkeal kaynaklı (*Haloarcula* sp. S-1) enzimlerden α -amilazın polar olmayan organik solventlerde (benzen, toluen, kloroform, stiren, ksileni, n-oktan, n-nonan ve n-dekan) aktif ve stabil kaldığı, hidrofilik solventlerde ise (1-bütıl alkol, etıl alkol, 2-propıl alkol, DMSO, metıl alkol ve aseton) inhibe edildiği tespit edilmiştir (Fukushima ve ark., 2005).

Genel olarak 2'den yüksek Log P_{ow} değerine sahip polar olmayan organik solventlerde enzimlerin yüksek ya da orta dereceli aktivite gösterdiği, değeri 2'den daha az olan polar solventlerde ise aktivitenin düştüğu bildirilmiştir (Sardessai ve Bhosle 2004; Rachadech ve ark., 2010). Ancak alışmamızda her üç halofilik arke izolatına ait proteazın 2'den düşük log P_{ow} değerine sahip hidrofilik organik solventlerde aktivitesini kaybetmediği ve hatta aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (şekil 4.15-17).

Enzimatik reaksiyon ortamı olarak hidrofobik solventler genellikle hidrofilik olanlara göre daha üstün olmaktadır. Çünkü hidrofilik solventler enzim molekülünün katalitik aktivitesi için gerekli olup, moleküle sıkı bağlanan su moleküllerini yüksek oranda uzaklaştırma eğilimine sahiptir. Buna bağlı olarak enzim molekülünde konformasyonel yapı değişebileceğinden yüksek konsantrasyondaki hidrofilik solventler varlığında enzimlerin stabiliteeri azalmaktadır (Shafei ve ark (2012), Serdakowski ve Dordick 2008). 2'den daha küçük Log P_{ow} değerine sahip olan aşırı polar solventler de ise yapısal denatürasyon gerçekleştiğinden enzim inaktif hale gelmektedir (Laane ve ark., 1987). Ancak tuz, organik sistemlerdeki gibi su aktivitesini düşürdüğünden dolayı haloarkeal enzimler organik solvent toleransına sahip olabilmektedir (Marhuenda-Egea ve Bonete 2002). *Halobacterium halobium* proteazı ile yapılan çalışmada % 40 DMSO nun enzimin stabilizasyonunu 42 kat arttırdığı bildirilmiştir. Bu artışın solventin salting-out özelliği ile ilgili olduğu belirtilmiş olup solventin, protein solvasyonunu engellediği ve kor hidrofobistesini arttırarak daha kompakt ve stabilize bir yapıya kavuşturduğu ifade edilmiştir (Kim ve Dordick 1997).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimler, biyoteknolojik olarak gıda, içecek, tekstil, eczacılık, tıp, kimya, deterjan, deri, kâğıt vb. gibi çeşitli endüstriyel alanlarında kullanılmaktadır. Bu nedenle endüstriyel enzimlere yönelik yapılan çalışmalar günümüzde oldukça önem kazanmıştır.

Bilinen 4000 enzimden yaklaşık 200'ü mikroorganizmalardan elde edilmiş olup bunlardan yalnızca 20 kadarının endüstriyel ölçekte üretimi yapılmaktadır (Li ve ark., 2012). Mikrobiyal fermentasyonla üretilen endüstriyel enzimler diğer canlılardan elde edilenlere göre daha yüksek katalitik aktivite ve stabiliteye sahip olup daha ucuza mal olmaktadır (Wiseman, 1987). Endüstriyel enzimlerin dünyadaki en büyük grubunu mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır. Ekstrem özellikteki mikroorganizmaların enzimleri ise yüksek sıcaklık, yüksek pH ve iyon konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler açısından endüstriyel işlemler için avantaj teşkil etmektedir. Son yıllarda endüstriyel öneme sahip olması nedeniyle ekstrem enzimlerle ilgili çalışmalar ön plana çıkmaya başlamıştır.

Çalışmamızda, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişen ekstrem halofilik arkelerin ekstraselüler proteaz üretimi için ortam koşullarının optimizasyonu, ham enzimin kısmi karakterizasyonu ve çeşitli organik solventlerin varlığında aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında Türkiye'nin çeşitli tuzlu bölgelerinden izole edilmiş 8 halofilik arke izolatının SG Agar + yağsız süt tozu içeren katı ortamda proteolitik aktivite taramaları yapılmıştır. Katı ortamda proteolitik aktivite gösterdiği belirlenen 3 izolat ile (B45, D83A ve SD23) çalışmalara devam edilmiştir.

İzolatlarda maksimum proteaz aktivitesinin görüldüğü üreme zamanı belirlendikten sonra ilk olarak enzim üretimi üzerine tuz derişimi, pH, sıcaklık ve çeşitli karbon kaynaklarının etkisi belirlenmiştir. Sonraki adımda ise karbon kaynaklarının miktar optimizasyonu yapılmıştır. Buna göre B45 izolatında maksimum enzim üretiminin çalkalamalı koşullarda inkübasyonun 7. gününde, 3.5 M NaCl, pH 7.5, % 0.75 glukoz varlığında ve 37 °C'de gerçekleştiği bulunmuştur. Ortam koşullarındaki optimizasyon sonucunda 11.45 U/ml'den 19.81 U/ml'ye yükselen B45 proteaz üretiminde yaklaşık % 73.01 artış gözlenmiştir. D83A izolatında maksimum proteaz üretiminin 3.5 M NaCl, pH 6.5 ve % 0.5 fruktoz içeren kültür ortamında 37 °C'de çalkamalı inkübasyon koşullarında 9. günde tespit edilmiştir. Optimizasyon sonucunda

D83A izolatında proteaz aktivitesinin 4.77 U/ml'den 10.20 U/ml'ye yükselerek yaklaşık % 113.84 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir. SD23 izolatında en yüksek proteaz üretiminin 37 °C'de inkübasyonun 7. gününde 2.5 M NaCl ve % 0.75 fruktoz içeren kültür ortamında pH 7.0'da gerçekleştiği belirlenmiştir. Ortam koşullarının optimizasyonu sonucunda SD23 proteaz aktivitesinin 8.31 U/ml'den 11.25 U/ml'ye yükselmesine bağlı % 35.38 oranında bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 5.1. Maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği ortam koşulları

İzolat	Kültür Koşulları					
	İnkübasyon zamanı (gün)	NaCl (M)	pH	Sıcaklık (°C)	Karbon kaynağı ve miktarı (%)	
B45	7	3.5	7.5	37	Glukoz	0.75
D83A	9	3.5	6.5	37	Fruktoz	0.5
SD23	7	2.5	7.0	37	Fruktoz	0.75

Çizelge 5.2. Kültür koşullarının optimizasyonu sonucundaki aktivite artış oranları

İzolat	Aktivite (U/ml)		
	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası	Artış Oranı (%)
B45	11.45	19.81	73.01
D83A	4.77	10.20	113.84
SD23	8.31	11.25	35.38

Her üç halofilik arke izolatının proteaz üretimi için test edilen 13 farklı karbon kaynağını kullanabilme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Bu durumun halofilik arke proteazı ile ilgili yapılacak yüksek ölçekli üretim çalışmalarında ekonomik ve temini kolay kaynaklara yönelme konusunda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. İzolatların optimum proteaz üretimi farklı konsantrasyonlarda glukoz ve fruktoz içeren ortamda gerçekleşmiştir. Fruktozun halofilik arkelerde maksimum ekstraselüler proteaz üretimini destekleyen bir karbon kaynağı olduğu ilk olarak bu çalışma kapsamında belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise optimum kültür koşullarında geliştirilen izolatlardan elde edilen ekstraselüler proteazın maksimum aktivite gösterdiği optimum NaCl konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. B45 proteazının 2.5 M NaCl, pH 7.5 ve 55 °C'de 20.98 U/ml, D83A proteazının 3.5 M NaCl, pH 6.5 ve 50 °C'de 10.64 U/ml ve SD23 proteazının 2.5 M NaCl, pH 7.0 ve 45 °C'de 12.21 U/ml olacak şekilde maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Kültür ve enzim aktivite koşullarının optimizasyonu sonucunda başlangıçtaki enzimatik aktivitenin B45'te % 83.23, D83A'da % 123.1 ve SD23'te % 46.93 oranında

arttığı saptanmıştır. Bu çalışma ile proteaz üretim ve aktivitesinin artırılmasında optimizasyon işleminin önemi bir kez daha ortaya konmuştur. Kültür koşullarının optimizasyonu ile enzim üretiminin artırılmasının özellikle endüstriyel alanda kullanılan enzimlerde büyük avantaj sağladığı bilinmektedir.

Çizelge 5.3. Maksimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği ortam koşulları ve aktivite değişim oranları

İzolat	Ortam Koşulları			Aktivite (U/ml)		
	NaCl (M)	pH	Sıcaklık (°C)	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası	Artış Oranı (%)
B45	2.5	9.0	55	11.45	20.98	83.23
D83A	3.5	8.5	50	4.77	10.64	123.1
SD23	2.5	8.5	45	8.31	12.21	46.93

İzolat proteazlarının maksimum aktivitelerini 45, 50 ve 55 °C’de ve alkali pH’da (8.5 ve 9.0) göstermesi ve artan sıcaklık derecelerinde dahi aktivitelerini korumaya devam etmeleri nedeniyle termofilik, alkali ve termostabil karakterde oldukları tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık ve pH’da maksimum aktivite gösterdiği belirlenen bu enzimlerin, 8 - 11 aralığında ve yüksek sıcaklıkta etki gösteren deterjan formülasyonları başta olmak üzere yüksek sıcaklıkta gerçekleşen diğer endüstriyel işlemlerde kullanılma potansiyellerinin olabileceği belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında enzimlerin optimum koşullarda logaritmik P_{ow} değeri -1.76 ile 4.77 arasında değişen farklı organik solventlere toleransı belirlenmiştir. Düşük log P_{ow} değerine sahip gliserol, DMF ve etanol varlığında genel olarak her üç izolat proteazında en yüksek aktivite tespit edilmiştir (% 84 – 124). Ayrıca log P_{ow} değeri yüksek olan apolar organik solventlerde de enzimlerin orijinal aktivitesinin % 62’den 98.6’ya varan oranda yüksek derecede korunduğu belirlenmiştir. Polar yada apolar solventlerin halofilik arke proteaz aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği gözlenmiştir. Haloarkeal enzimler organik solventlerde yüksek aktivite ve stabilite gösterebilmektedir. Ekstrem halofilik enzimlerin organik solvent varlığında gerçekleşen biyotransformasyonlarda katalizör olarak kullanılma potansiyelleri bu enzimleri endüstriyel uygulamalar açısından oldukça ilgi çekici kılmaktadır.

Endüstriyel ve biyoteknolojik alandaki gelişmeler, dünya nüfusu ve bunun paralelinde artan talebin karşılanmasındaki güçlükler ve artan çevre kirliliği endüstriyel

alışmaları kısa zamanda daha fazla verim elde etmeye ve zorlu endüstriyel çalışma koşullarına uyum sağlayan enzimlere yöneltmiştir. Bu anlamda büyük bir kısmı ekstrem şartlarda yaşayan arkelere ait enzimler büyük bir önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma ile halofilik arkelerde ilk olarak proteaz üretiminin fruktoz varlığında maksimum düzeyde üretildiği belirlenmiştir. Optimizasyon sonrası izolatların proteaz üretiminde yaklaşık 1-2.5 kat oranında artış sağlanmıştır. Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi bu çalışmada kullanılan arkeal izolatların da enzim üretim çalışmalarında optimizasyon aşamasının doğru bir strateji olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Ayrıca organik solvent toleransı olduğu belirlenen arkeal proteazların organik çözücü ile kontamine olmuş endüstriyel atık suların remediasyonu gibi endüstriyel işlemlerde kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akolkar, A., Bharambe N., Trivedi S. and Desai A., 2008. Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1 (1) **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, 48, p.77–83.
- Amoozegar, M.A. Fatemi, A.Z. Karbalaee-Heidari, H.R. Razavi, M.R. 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, Vol. 162, (4), p.369-377.
- Annapurna, S.A., Singh, A., Garg, S., Kumar, A. and Kumar H. 2012. Screening, isolation and characterisation of protease producing moderately halophilic microorganisms. **Asian Journal of Microbiology Biotechnology Environmental Science.**, Vol. 14, No. (4) p.603-612.
- Bowers, K. J. and Wiegel. J., 2011. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini review. **Extremophiles.**, 2. P.119-128.
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. 2014. carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Vol. 78 no. 1 p.89-175.
- Chamroensaksri, N., Akaracharanya, A., Visessanguan, W. ve Tanasupawat S., 2007. Characterization of halophilic bacterium NB2-1 from pla-ra and its protease production. **Journal of Food Biochemistry.**, 32, p.536–555.
- D'Alessandro, C.P., De Castro, R.E., Gimenez, M.I. and Paggi, R.A. 2007. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. **Lett Appl Microbiol.**, 44, p.637– 642.
- De Castro R.E., Maupin-Furrow J.A., Gimenez M.I., Seitz M.K.H., Sanchez J.J., 2006. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. **FEMS Microbiol Rev.**, 30 p.17-35.
- Dodia, MS., Joshi, R.H., Patel, R.K. and Singh, SP., 2006. Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from Halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of Coastal gujarat, india. **Brazilian Journal of Microbiology**, 3, 48 p.270–282.
- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances**, 19, p.261–278.
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A. and Usami, R., 2005. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. **Extremophiles**, 9, p.85–89.
- Gimenez, M. I., Studdert, C.A., Sanchez, J.J. and De Castro R.E., 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. **Extremophiles**, 4, p.181-188.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes. **Food Technol. Biotechnol.**, 42 (4) p.223–235.

- Higara, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K. and Oda, K. 2005. Purification and characterization of serine proteinase from a Halophilic Bacterium, *Fillobacillus* sp. RF2-5. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 69 (1), p.38-44.
- Hough, D.W., M.J. Danson., 1999. Extremozymes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 3, p.39-46.
- Jadhav, A.G., Jaybhave A.A. and Musaddiq M. 2013. Salt tolerant protease produced by aerobic species belonging to the bacillus genus isolated from saline soil. **International Journal of Scientific and Research Publications**, Vol 3, 2, p.1-8
- Joshi, R.H., Dodia, M.S. ve Singh S.P., 2008. Production and optimization of a commercially viable protease from a *Haloalkaliphilic bacterium*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 13, p.552-559.
- Kamekura, M. and Seno, Y., 1990. A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172p1. **Biochem Cell Biol.**, 68, p.352-359.
- Kamekura, M. and Seno, Y. 1990. A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1. **Biochem. Cell Biol.**, 68. 352-359.
- Kamekura, M. , Seno, Y., Holmes, M.L. and Dyll-Smith, M.L. 1992. Molecular cloning and sequencing of the gene for a halophilic alkaline serine protease (halolysin) from an unidentified halophilic archaea strain (172P1) and Expression of the gene in *Haloferax volcanii*. **Journal of Bacteriology**, Vol. 174, No. 3. 736-742.
- Kanlayakrit, W., Bovornreungroj, P., Oka T. and Goto M., 2004. Production and characterization of protease from an extremely halophilic *Halobacterium* sp. PB407. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 38, p.15 – 20.
- Karan, R. and Khare, S.K., 2010. Purification and characterization of a solvent-stable protease from *Geomicrobium* sp. EMB2. **Environmental Technology**, Vol. 31, No. 10, September 2010, p.1061-1072.
- Karbalaei-Heidari, H.R., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A., 2007. Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. **Extremophiles**, 11, p.237-243.
- Karbalaei-Heidari, H.R., Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.A. and Ventose, A. 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensi*. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 36, p.21-27.
- Kim J. and Dordick J.S. 1997. unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile. **Biotechnology and Bioengineering**, 55, 3, p.471-479.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C., 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol Bioeng.**, 30, p.81-87.
- Lakshmi, B.K.M., Ratna Sri, P.V., Ambika Devi, K. ve Hemalatha K.p.J. 2014. Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from Haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **International Journal of Research in Engineering and Technology** Vol. 3 (2), p.435-443.
- Lanyi, J.K., 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. **Bacteriol Rev.**, 38, p.272-290.

- Li, S., He, B., Bai, Z. and Ouyang, P., 2009. A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, 56, p.85–88.
- Li, S. Yang, X. Yang, S. Zhu, M. Wang X. 2012. technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2 (3).
- Li, X. and Yu, H.Y., 2012. Purification and characterization of novel organic-solventtolerant b-amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. **FEMS Microbiol Lett.**, 329, p.204–211.
- Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles.**, 4, p.91- 98.
- Manikandan, M., Pasic, L. and Kanan, V., 2009. Purification and biological characterization of a halophilic thermostable protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007. **World J Microbiol Biotechnol.**, 25, p.2247-2256.
- Manikandan, M., Kannan, V., Velikonja, B.H. and Pašić L., 2011. Optimization of growth medium for protease production by *Haloferax lucentensis* VKMM 007 by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology.**, 42, p.818-824.
- Marhuenda-Egea, F.C and Bonete, M.J., 2002. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Vol. 13 No. 4 p.385-9
- Moreno, M.D.L., Garcia, M.T., Ventosa, A. and Mellado, E., 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and proteaseproducing extreme halophile. **FEMS Microbiol Ecol.**, 68, p.59–71.
- Nolasco, H., Kushner, D. and Ochoa J.L., 2002. Purification and properties of and extracellular halophilic serin-protease from *Haloferax mediterranei*. **Revista de la Sociedad Química de México.**, 46 (3), p.202-211.
- Ogino, H. Yasui, K. Shiotani, T. Tatsuya, I. and Haruo, I., 1995. Organic solvent – tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable proteolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 61, No. 12, p.4258-4262.
- Ogino, H., Miyamoto, K., Yasuda, M., Ishimi, K. and Ishikawa, H. 1999. Growth of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 in the presence of various organic solvents and production of lipolytic enzyme in the presence of cyclohexane. **Biochem Eng J.**, 4, p.1–6.
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M and Ishikawa, H., 2000 Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **J Biosci Bioeng.**, 89: p.451–457.
- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A. and Cokmus, C., 2007. Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17(6), p.985-992.
- Ozcan B., G. Ozyilmaz, C. Cokmus and M. Caliskan. 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 36, p.105–110.

- Patel, R., Dodia, M. ve Singh, S. P., 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and optimization. **Process Biochemistry**, 40, p.3569–3575.
- Pathak, A.P. and Sardar, A. G., 2014. Isolation and characterization of stable protease producing archaea from marina solar saltern of Mulund, Mumbai. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, 43(3), p.412-417.
- Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W., Pongtharangkul, T. and Vangnai, A.S. 2010. An organic solvent Detergent and thermostabil alkaline protease from the mesophilic, organic solvent tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5. **Microbiology**, 79. (5) p.630-638.
- Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. **Nature**, 409: p.1092–1101.
- Ruiz, D. M. and De Castro, R. 2007. Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 34: p.111–115.
- Sanchez-Porro, C. Mellado, E. Bertoldo, C. Antranikian. G. and Ventosa, A., 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophiliic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain CP76. **Extremophiles**, 7, p.221–228.
- Sellek, G. A. and Chaudhuri J.B., 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme and Microbial Technology**, 25, p.471-482 .
- Serdakowski, A.L. and Dordick, J.S., 2008 Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends Biotechnol.**, 26, p.48–54.
- Shafiei, M., Ziaee, A-A. and Amoozegar, M. A., 2011. Purification and characterization of an organic solvent tolerant halophilic α -amylase from the moderately *Nesterenkonia* sp. strain F. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 38: p.275–281.
- Shafiei, M., Ziaee, A-A. and Amoozegar, M. A., 2012. Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderatel halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. **Extremophiles**, 16, p.627–635.
- Sinha, R. and Khare, S. K., 2014. PRotective role of salt n cataysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. **Frontiers In Microbiology**, Vol 5. Article 165. p.1-6.
- Stepanov, V.M., Rudenskaya, GN., Revina, L.P., Gryaznova, Y.B., Lysogorskaya, E.N., Filippova, I.Y. and Ivanova I.I, 1992. A serine proteinase of an archaebacterium, *Halobacterium mediterranei* a homologue of eubacterial subtilisins, **Biochem. J.**, 285, p.281–286.
- Studdert, C. A., De Castro, R.E., Seitz, K H. and Sánchez J. J. 1997. Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic activities of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. Short communication. **Arch Microbiol.**, 168, p.532–535.
- Taprig, T. Akaracharanya, A. Sitdhipol, J. Visessanguan, W. and Tanasupawat, S., 2013. Screening and characterization of protease-producing Virgibacillus, Halobacillus and Oceanobacillus strains from Thai fermented fish. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 3 (2), p.025-030.

- Vidyasagar, M., Prakash, S.B, and Sreeramulu, K., 2006. Optimization of culture conditions for the production of haloalkaliphilic thermostable protease from an extremely halophilic archaeon *Halogeometricum* sp. TSS101 **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, 43, p.385–391.
- Vidyasagar, M., Prakash, S.B., Jayalakshmi, S. K. and Sreeramulu, K., 2007. Optimization of culture conditions for the production of halothermophilic protease from halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. **World J Microbiol Biotechnol.**, 23, p.655–662.
- Vijayanand, S., Hemapriya, J., Selvin, J. and Kiran, S., 2010. Production and Optimization of Haloalkaliphilic Protease by an Extremophile- *Halobacterium* sp. Js1, Isolated from Thalassohaline Environment. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, 5 (1), p.44-49.
- Vijayaraghavan, P., Jebamalar, T. R. J., Vicent S.G.P., 2012. Biosynthesis optimization and purification of a solvent stable alkaline serin protease from *Halobacterium* sp. **Ann Microbiol.**, 62, p.403–410.
- Vikramathithan, M. and Dhandapani, R. 2014. Isolation and identification of protease producing halophilic bacteria. **International Journal of Advanced Science and Engineering**, Vol. 1. No.2 p.33-36.
- Wiseman, A., 1987. **Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition.** Chapter The application of enzymes in industry, p.274-373.
- Xiong, H. Song, L. Xu, Y. Tsoi M.Y. Dobretsov, S. and Qian, P.Y., 2007. Characterization of proteolytic bacteria from the Aleutian deep-sea and their proteases. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 34, p.63–71.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında Mersin’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Tarsus’ta tamamladı. 2007 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden (Hatay) 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl içinde Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisansa öğrenimine başladı.