

Submerged Fermantasyonu ile *Bacillus subtilis* RSKK96'dan Proteaz Üretimi

*Nurullah AKCAN¹, Fikret UYAR²

¹Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 36100 Kars-Türkiye

²Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 21100 Diyarbakır- Türkiye

Makale Kodu (Article Code): 10-08A

Özet: Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* RSKK96'dan submerged fermentasyonu ile proteaz üretimi amaçlanmıştır. Yapılan incelemelerde en yüksek proteaz üretimi 72. saatte yapılan kültürden elde edilmiştir. Kültür ortamına farklı azot ve karbon kaynakları eklendiğinde proteaz üretimi baskılanmıştır. Bununla birlikte aminoasitlerden izoleusin içeren ortam kontrole göre proteaz üretimini %27 arttırmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis* RSKK96, proteaz, submerged fermantasyon

Protease Production by *Bacillus subtilis* RSKK96 with Submerged Fermentation

Abstract: This study aimed to produce protease by *Bacillus subtilis* RSKK96 with submerged fermentation. Maximum enzyme production was achieved at 72 hours of incubation. Protease production was suppressed when supplementation with different nitrogen and carbon sources in culture medium. However; supplementation with isoleusin aminoacid increased protease production 27% comparing with the control.

Key words: *Bacillus subtilis* RSKK96, protease, submerged fermentation

*E-mail: nurullah.akcan@gmail.com

Giriş

İnsanoğlu uzun yıllardan beri peynir, şarap ve bira üretimi gibi birçok uygulamada enzimlerin katalitik aktivitelerinden faydalanmaktadır. Mikrobiyal proteazlar hidrolitik enzimler arasında en önemli olanlarıdır ve enzimoloji bilimi ortaya çıktığından beri yaygın olarak incelenmişlerdir. Proteazlar fizikokimyasal ve katalitik özelliklerinde muazzam farklılıklar göstermektedirler ve bu enzimlerle ilgili yapılan çalışmaların birçoğu biyokimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımları içermektedir (Rao ve ark 1998, Saeki ve ark 2007).

Proteolitik enzimler dünya endüstriyel enzim pazarının % 60'ını meydana getirirler. Proteaz çeşitlerinden olan alkalın proteazlar gıda, deri ve eczacılık gibi çeşitli endüstrilerde yaygın kullanımlarından dolayı en fazla çalışılmış enzim gruplarından biridir (Gupta ve ark 2002, El-Safey ve ark 2004). Değişik uygulamalardan biri de alkalın proteazların başlıca deterjan endüstrisinde kullanımına yöneliktir. Alkalın proteazlar çeşitli deterjanlarda ve otomatik çamaşır makinesi deterjanlarında kullanılırlar. Proteinli lekeleri parçalama aktivitesi gösterirler (Gupta ve ark 2002).

Submerged fermantasyonu (SmF) genelde sentetik olarak hazırlanmış ortamlarda meydana gelen fermantasyon işlemidir. Mikrobiyal proteazlar bakterilerin kullanılmasıyla submerged fermentasyon yöntemi ile üretilebilirler. *Bacillus* cinsi bakterilerin tercih edilmelerinin nedeni; bu enzimleri sentezleyebilme, çok miktarlarda salgılama yeteneğinde olmaları ve büyüme gereksinimlerinin basit oluşudur. En önemli avatanjlarından biri de kuşkusuz patojen olmamalarıdır (Jose ve Kurup 1999)

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* RSKK96'dan submerged fermentasyon (SmF) yöntemi ile alkalın proteaz üretimi ve ortam bileşenlerinin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

1. Mikroorganizma

Çalışmalarımızda, Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Kültür Suşları Bölümünden temin edilen *Bacillus subtilis* RSKK 96 kullanılmıştır. *B. subtilis* RSKK96 saklanma koşullarından (-20°C) çıkarılıp 37°C'de 24 saat boyunca LB besiyerinde üretildi. Proteaz üretimi için Luria Broth (LB) sıvı besiyeri kullanıldı. Bu besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 100 mL'lik erlenmayerlerde 20 mL farklı sıvı besiyeri içeren ortamlara 100 µL örnek eklenerek, mikroorganizmalar 0.6 absorbansa gelecek şekilde 37°C'de 24 saat süreyle üretildi.

2. Enzim Üretimi ve Optimizasyonu

Uygun inkübasyon süresini belirlemek için mikroorganizma 37°C'de 150 rpm'de 12, 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamına azot kaynaklarından pepton, beef extract, kazein, tryptone, üre, yeast extract, amonyum nitrat (NH₄NO₃), amonyum klorid (NH₄Cl), sodyum nitrat (NaNO₃) ve amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄, karbon kaynaklarından çözümlü nişasta, patates nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, buğday unu, pirinç unu, soya unu, mısır unu, gliserol, arabinoz, mannoz, ksiloz, laktoz, sukroz, fruktoz, galaktoz ve glukoz %1 konsantrasyonunda, farklı aminoasitlerden L-fenilalanin, L-tirozin, L-lizin, L-sistein ve L-metyonin, glisin, glutamik asit, L-alanin, L triptofan, L-izolözin, L-valin % 0.01 konsantrasyonunda eklenerek uygun inkübasyon süresinden sonunda örnekler +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre sporlardan arındırıldı. Enzim aktivitesi ve optimizasyon çalışmaları için üst sıvı kullanıldı.

3. Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz aktivite tayini için 150 µL enzim çözeltisine 250 µL % 0.5 azokazein (0.1 M

Tris-HCl tamponu; pH: 9.0) ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda ortama 1 mL TCA katılarak reaksiyon durduruldu. 15 dakika +4°C'de bekletildikten sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 1 mL üst sıvı üzerine 500 µL NaOH ilave edilerek 420 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi (Leighton ve ark 1973)

Bir enzim ünitesi deney koşullarında 1 µmol azokazeini 30 dakikada parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

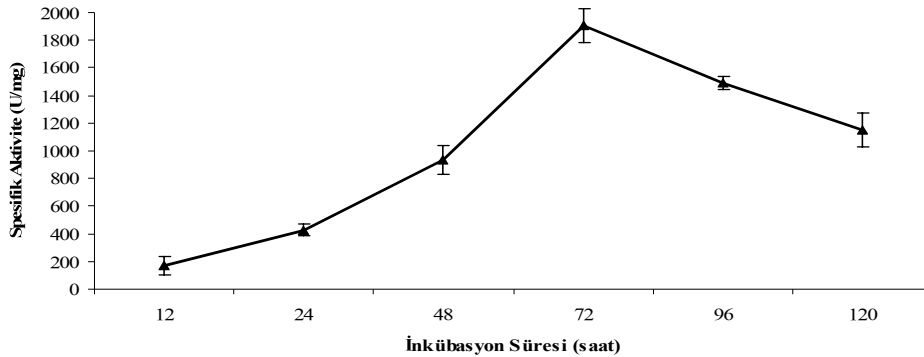
4. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (5 mg.mL⁻¹) Bovin serum albumin'den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı. Tüplere 2.5 mL alkalın çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 µL enzim ve 225 µL saf su ilave edildi. Örnekler 15 dakika 40 °C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 µL Folin Reaktifi (FCR) ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Lowry ve ark 1951).

Sonuç ve Tartışma

Genel olarak mikroorganizmaların meydana getirdiği proteazlar doğada temel ve kısmen birçok kültür şartlarında indüklenirler. *Bacillus* türleri logaritmik artış öncesi ve durağan fazlarda ekstraselüler proteazları üretirler. Mikroorganizmaların ürettiği ekstraselüler proteazlar aynı zamanda C/N oranındaki farklılardan, glukoz gibi kolay metabolize edilen şekerler ve metal iyonları gibi ortam bileşenlerinden yoğun şekilde etkilenirler. Proteaz sentezi ortamdaki aminoasitler gibi hızlı metabolize edilebilen azot kaynaklarından da etkilenir (El-Safey ve ark 2004, Haki ve Rakshit 2003, Hameed ve ark 1999).

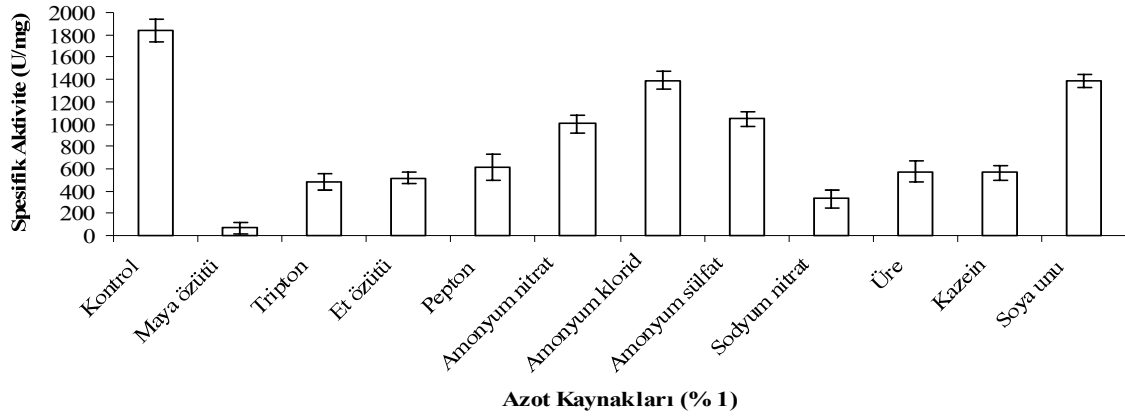
Mikroorganizmaların enzim üretimleri ile büyümeleri arasında bir ilişki söz konusudur. İnkübasyon zamanı ortamın özellikleri tarafından kontrol edilir ve bu olay doğal olarak büyüme ve enzim üretimine bağlıdır. *B. subtilis* RSKK96 LB besiyerinde 12. saatten başlayarak 120. saate kadar kültür edilmesi sonucunda en yüksek proteaz aktivitesi 72. saatte 1903.2 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 1) Benzer şekilde topraktan izole edilen *Bacillus subtilis*'in proteaz üretimi 72. saatte rapor edilmiştir (Dutt ve ark 2008).



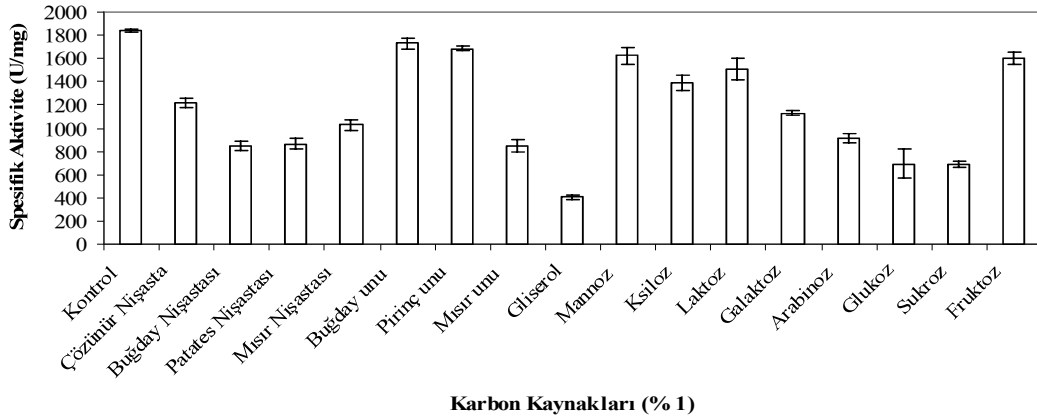
Şekil 1. *Bacillus subtilis* RSKK96' nın proteaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi

Kültür ortamlarına eklenen farklı azot kaynaklarından (%1) tümü proteaz üretimini baskılamıştır (Şekil 2). Azot kaynakları arasında yeast extract proteaz aktivitesini kontrole göre yaklaşık olarak %97 oranında inhibe etmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde *Bacillus* türleri ile yapılan daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde amonyum tuzları tarafından üreme ve enzim üretiminin baskılandığı olgusunu desteklemektedir (Kole ve ark. 1988). Daha önceki yapılan çalışmalarda *Bacillus* cinsinin birçok türünde karbonhidrat indirgeyen enzimlerin kolayca metabolize edilen substratların varlığında katabolit represyona uğradığı rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmalara benzer şekilde yaptığımız çalışmada SmF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda

kültür edilen *B. subtilis* RSKK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde kontrole (1837 U/mg) göre daha az proteaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3). Karbon kaynaklarından gliserol kontrole göre proteaz sentezini yaklaşık olarak %78 oranında baskılamıştır. Yapılan önceki çalışmalarda karbon kaynakları *B. subtilis*'in kültür edildiği ortamlara eklenmiş ve proteaz biyosentezi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Genelde saf karbon kaynakları proteaz üretimini inhibe etmekte ve aynı zamanda proteaz biyosentezinin katabolik represyonuna neden olabilmektedir. Elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde diğer çalışmalarda da ortama glukoz eklenmesi sonucu proteaz üretiminde düşüş gözlenmiştir (Wei-Hua 2007).



Şekil 2. *Bacillus subtilis* RSKK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi



Şekil 3. *Bacillus subtilis* RSKK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Tablo 1. *Bacillus subtilis* RSKK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı aminoasitlerin etkisi

Aminoasitler (%0,01)	Spesifik Aktivite(U/mg)
Kontrol	1842.5±79.1
Glisin	1796.4±76.5
L-lizin	1623.8±88.0
L-trozin	1611.4±56.7
L-sistein	1436.4±51.3
Glutamik asit	1431.4±69.4
L-alanin	1414.7±94.7
L-triptofan	1539.8±92.9
L-fenilalanin	1745.2±129.3
L-izolözin	2342.9±59.7
L-valin	1755.8±77.6
L-metyonin	1535.8±64.6

SmF ortamına eklenen %0.01 konsantrasyonundaki aminoasitlerin bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSKK96'dan proteaz üretimi izölosin içeren ortamda kontolden elde edilen değerden %27 daha fazla bulunmuştur. Diğer aminoasitleri içeren ortamlardaki tüm aktivite tayinleri kontolden düşük çıkmıştır. L-alanin içeren ortamda enzim üretimi önemli oranda baskılamıştır (Tablo 1). Yapılan önceki bir

çalışmada Ile, Cys, Phe, Asp, Glu, Met içeren ortamların *B. stearothermophilus*'un büyümesini uyardığı rapor edilmiştir. Aynı şekilde *B. subtilis*'in kültür edildiği ortama arjinin, sistein, glutamik asit, izolösin, lizin, metyonin, aspartik asit, prolin, fenil alanin, glisin, valin ve triptofan eklediğinde en yüksek proteaz aktivitesi valin bulunan ortamda elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Dutt K, Meghwanshi GK, Gupta P, Saxena RK 2008.** Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 46, 513-518
- El-Safey EM and Abdul-Raouf UM 2004.** Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. In: International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ.. p 14.
- Haki GD and Rakshit SK 2003.** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores. Technol.* 89, 17-34.
- Hameed A, Keshavarz T, Evans CS 1999.** Effect of dissolved oxygen tension and ph on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 5-8
- Gupta R, Beg QK, Lorenz P 2002.** . Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 5-32.
- Jose J and Kurup GM 1999.** Purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus pumilus*. *Ind. J. Exp. Biol.* 37,1213-1217.
- Kole MM, Draper I, Gerson DF 1988.** Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations *Appl Microbiol Biotechnol.* 28: 404-408
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA 1973** The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* 76, 103-22.
- Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 597-635.
- Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T, Izo S 2007.** detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and cristal structures. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 501-508
- Wei-Hua C 2007.** Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34, 241-245