



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2009; 23 (3): 137-144
http://www.fusabil.org

Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Trichophyton Rubrum* ve *Trichophyton Mentagrophytes*'in Proteaz Aktivitelerinin Araştırılması

Hüseyin TANIŞ¹
Nilüfer CİHANGİR²

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Kahramanmaraş, TÜRKİYE

²Hacettepe Üniversitesi
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Ankara, TÜRKİYE

Bu araştırmada; Kahramanmaraş Devlet Hastanesinden izole edilen *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in proteaz aktivitesinin araştırılması amaçlandı.

Mantar şüphesi olan ve Kahramanmaraş Devlet Hastanesi Dermatoloji kliniğine başvuran hastalardan tırnak ve kazıntı örnekleri alındı. Örnekler % 15'lik KOH ile muamele edilerek mikroskopta direkt inceleme yapıldı. Direkt mikroskopik inceleme ile mantar hif ve sporlarının varlığı/yokluğu araştırıldı. Ayrıca Sabouraud Dekstrose Agar(SDA) besiyerlerine ekimler yapılarak kültürleri gerçekleştirildi. Kültürlerin tanımlanması yapılarak *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* suşları ayrıldı. *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* suşlarının kazeinolitik özellikleri incelendi.

Kazeinolitik özellikleri pozitif olarak belirlenen Tr2(*Trichophyton rubrum*2), Tr3, Tm(*Trichophyton mentagrophytes*321)207, Tr319 ve Tm321 suşlarının proteaz aktivitesi araştırıldı. Dermatofit suşları, enzim üretimi için belirli koşullarda 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. En yüksek proteaz aktivitesi Tr2'de 14 gün inkübasyon süresi sonunda 13.1 U/ml olarak, daha sonra Tr3 12.3 U/ml, Tr319 8.71 U/ml, Tm207 7.65 U/ml, Tm321 7.4 U/ml olarak elde edildi. Çalışmamızda en yüksek proteaz aktivitesi 50 °C inkübasyon sıcaklığında, pH 5.5 ile 6 arasında 14 U/ml olarak elde edildi. Aynı şartlar altında 30 °C'de Tr3'de 12.3 U/ml, 30 °C'de Tm207'de 7.6 U/ml, Tr319'da 8.7 U/ml, Tm321'de 7.4 U/ml olarak elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçlar, keratinolitik funguslar olan dermatofitlerin sahip oldukları proteazın önemli oranda olduğu ve patojenitede potansiyel olarak önemli bir virulans faktör oluşturdukları kanısını oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Proteaz aktivitesi, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Investigation of Protease Activities of *Trichophyton Rubrum* and *Trichophyton Mentagrophytes* Obtained From Clinical Isolates

We aimed to investigate the protease activities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* isolated from Kahramanmaraş State Hospital.

The samples from nail and skin were collected from patients who had suspicious infection presented to Department of Dermatology of Kahramanmaraş State Hospital. The samples were treated with 15% KOH and, then microscopic examination and culturing was carried out on Sabouraud Dextrose Agar. Cultures were defined and *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*' isolates were differentiated. The caseinolytic properties of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* were investigated.

The strains found to be casein positive as, Tr2(*Trichophyton rubrum*2), Tr3, Tm(*Trichophyton mentagrophytes*321)207, Tr319 ve Tm321 were tested for protease activity. Dermatophyte strains were incubated for enzyme production for 23 days under certain circumstances. The highest protease activity was obtained at 13.1U/ml from the strain Tr2 after 14 days of incubation. Tr3, Tr319, Tm207, and Tm321 produced the enzyme activity as 12.3 U/ml, 8.71 U/ml, 7.65 U/ml, and 7.4 U/ml, respectively. Our results showed that the dermatophytes which are keratinolytic fungi had significant amount of protease enzyme and this might constitute potentially a significant virulence factor in the pathogenicity.

Key Words: Protease activity, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Geliş Tarihi : 16.06.2009
Kabul Tarihi : 18.11.2009

Yazışma Adresi Correspondence

Hüseyin TANIŞ
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Kahramanmaraş-TÜRKİYE
huseyintanis23@hotmail.com

Giriş

Flamentöz funguslar, hidrolitik enzimleri sentezlerler. Bu funguslardan bazıları endüstriyel olarak önemli olan enzimlerin üretiminde kullanılırlar. Keratinazlar, keratinlerin hidrolizini katalizleyen proteazların özel bir sınıfıdır. Bu enzimlere çoğunlukla deri ve deri uzantılarında infeksiyon etkeni olan dermatofitlerin sahip olduğu, birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır (1-6).

Doğada keratinler keratinolitik enzimler sentezleyen mikroorganizmalar tarafından parçalanırlar. Bunlar arasında en iyi bilinenler keratin atıklarının degradasyonu için kullanılan dermatofitozis ya da kandidozis etkeni olan patojenik funguslardır (7).

Dermatofitik fungusların proteolitik, keratinolitik ve lipolitik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Dermatofitler tarafından sentezlenen ve salgılanan serin proteazların deri-

nin fungal invazyonunda büyük bir rol oynadığı kabul edilmektedir (8).

Genel olarak dermatofitoziste salgılanan keratinazlar önemli bir virulans faktör olarak kabul edilirler (9). Dermatofitlerin sahip olduğu proteazlar, hedef doku olan dış deri tabakasını parçalayarak besin sağlarlar ve buna bağlı olarak virulansda önemli rol oynarlar (10).

Bu özel grup patojenik funguslar arasında keratin substratını en iyi parçalayanlar arasında yer alırlar. Bu nedenle keratin hidrolizi yapılması gereken, tıp, kozmetik, deterjan, deri endüstrisi gibi farklı alanlarda uygulanmalıdır (7).

Keratinolitik funguslar, patojenitede önemli rol oynamasının yanı sıra aynı zamanda çevre kirlenmesine neden olan keratin atıklarının biodegradasyonunda da önemli rol oynarlar (11).

Bu çalışmamızda, Kahramanmaraş Devlet Hastanesi'ne başvuran hastalardan izole edilen *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'in sahip olduğu önemli virulans faktörlerden sayılan proteazın potansiyel olarak varlığını belirlemenin yanısıra atık biodönüşümünde ve endüstriyel alanda üretimi sağlanarak farklı alanlarda kullanılabilmesi yönündeki ileri çalışmalara veri sağlamada katkı yapmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin Toplanması

Bu çalışma 1 Haziran 2006-31 Ocak 2007 tarihleri arasında Kahramanmaraş Devlet Hastanesi dermatoloji kliniğine başvuran mantar enfeksiyonu tanısı konulan hastalardan 338 olgudan deri ve tırnak kazıntı örnekleri incelendi. Lezyon deride ise steril bistüri ile lezyonun kenarlarından steril petri kaplarına kazıntı örnekleri alındı. Tırnak lezyonlarında sağlam dokulara ulaşıncaya kadar kazıntı örnekleri ve tırnak parçaları alındı. Alınan örnekler direkt mikroskopi ile incelendikten sonra SDA besiyerlerinde kültürleri yapıldı.

Örneklerin Direk Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Laboratuara getirilen saç ve deri kazıntı örnekleri, % 15 lik KOH çözeltisinden bir iki damla temiz bir lam üzerine damlatıldı ve alınan örnekten öze ile lam üzerine konularak lamel kapatıldı. Oda ısısında 20-25 dakika bekletildi, daha sonra mikroskopda önce 10'luk sonra 40'luk büyütmede artrosporlar, tomurcuklanmış blastosporlar araştırıldı. Mantar elemanları gözlenen örnekler pozitif, görülmeyenler negatif olarak değerlendirildi (12).

Örneklerin Ekilmesi ve Kültürü

SDA besiyerlerine delme yöntemi ile üçlü ekim yapıldı. Kültürler inkübasyon sırasında haftada 2-3 kez kontrol edildi. Ekim yapılan kültürlerden ikisi oda sıcaklığında, biri 37 °C de en az 4 hafta bekledikten sonra değerlendirmeye alındı. Üreme tespit edilmeyen kültürler negatif olarak değerlendirildi (13).

Kültürde Üreyen Mantar Kolonisinin İdentifikasyonu

Kolonilerin yapısı makroskopik ve mikroskopik olarak incelendi.

Koloninin Makroskopik İncelenmesi: Ekimi yapılmış kültürler inkübasyon süresi sonunda, yüzey(havasal miçel) ve taban rengi, yüzey örgüsü(çıplak, mumsu, pudramsı, granüler, süet benzeri, kadifemsi, tüylü, kabarık), topografisi(düz, kabarık, dağınık), koloninin büküm şekli(ışınal, beyin krater gibi) ve üreme hızına göre incelendi.

Koloninin Mikroskopik İncelenmesi: Bu inceleme makrokonidyum ve mikrokonidyumların varlığının belirlenmesi, hiflerin yapısının incelenmesi amacı ile yapıldı (14).

Enzimatik Aktivitelerin Belirlenmesi

Kazeinolitik Özelliklerin Belirlenmesi: *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in proteaz aktivitelerinin olup olmadığının belirlenmesi için özgün bir besiyeri kullanıldı. Bunun için % 0.1 K₂HPO₄, % 0.05 MgSO₄.7H₂O, %0.05 KCl, %1.6 agar su içinde çözündürülüp, 121 °C de 1.5 atm de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 60 °C'ye kadar soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyonu % 4.8 olacak şekilde distile su ile hazırlanmış ve aynı şartlarda sterilize edilmiş yağsız sütte çözeltisi aseptik olarak ilave edildi. Bu karışım steril test tüplerine 10'ar ml olarak dağıtılıp, dik olarak donduruldu.

Kültürün enzim üretim yeteneğini test edebilmek için, hazırlanan bu özgün besiyerinin üzerine sıvı stok kültürden 0.1 ml inokule edilerek 26 °C de 7 güne kadar inkübasyona bırakıldı. Test kültürü proteaz üretebiliyorsa (proteaz pozitif ise), besiyerinde bulunan ve bulanıklığı sağlayan süt kazeinini parçalayarak berraklık oluşturmaktadır. Berraklık oluşmadıysa, kültür kazeini parçalayamadığı için besiyeri berraklaşmamıştır ve negatiftir. Testin değerlendirilmesi; oluşan şeffaflığın derinliği cetvel yardımı ile ölçülerek yapılmıştır. Bu ölçümde 7. günün sonunda 4 mm ve üzerinde ise proteaz yönünden pozitif, 4 mm'nin altında ise negatif olarak değerlendirilmiştir (15).

Proteaz Aktivite Tayini

Sıvı Stok Kültürün Hazırlanması: Sabouraud Dextrose Broth(SDB) 100 ml'lik erlenmeyerlere 50 ml üretim ortamı olarak hazırlandı. Dermatofit stok kültürlerinden sıvı SDB besiyerlerine 0.1 ml olarak aşılama yapılarak 30 °C de 2 hafta süre ile inkübasyona bırakıldı ve sıvı stok kültürler hazırlandı.

Ekim ve Üretim: Sıvı stok kültürden, enzim üretimi için hazırlanan 100 ml'lik SDB besiyerlerine 0.1 ml olarak steril koşullarda ekim yapıldı.

Kültürde Üremenin Ölçülmesi: Kültürde üreme miktarı, hücre kitlesindeki değişmelerin kuru ağırlık olarak (gr/lt cinsinden) ölçülmesiyle belirlendi. Bu amaçla fungus kitlesi önceden kurutulup darası alınarak desikatörde saklanan filtre kağıtlarından (Whatman No:1) süzülerek kültür ortamından ayrıldı. Daha sonra 70 °C'de 24 saat kurutulup tartıldı. Üreme, gr kuru miçelyum/lt besiyeri olarak hesaplandı (16).

Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması: İnkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisini incelemek amacı ile izole ettiğimiz dermatofit stok kültüründen hazırlanmış SDB besiyerine ekim yapıldı. Kültürler 25 ile 60 °C'de değişen sıcaklıklarda 150 r.p.m. çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 14 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

Optimum inkübasyon pH'sının Saptanması: Enzim aktivitesine inkübasyon pH'sının etkisini belirlemek amacı ile 4 ile 8 arasında değişen pH aralıklarında hazırlanan SDB besiyerlerine dermatofit örneklerinden ekimler yapıldı. Kültürler 14 gün süre ile 30 °C'de 150 r.p.m. çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesine bakıldı.

Proteaz Miktarının Günlere Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

Ekim yapılan besiyerleri yüksek proteaz verimi elde etmek için uygun inkübasyon süresini saptamak amacı ile 30 °C'de 150 r.p.m. çalkalama hızında 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

Proteaz Aktivite Tayin Yöntemi: Proteaz aktivite tayininde Kunitz metodunun modifiye edilmesi ile oluşan Kazein-Folin yöntemi uygulandı (17, 18). Proteaz pozitif örneklerden 1ml örnek alınarak 50 ml olarak hazırlanmış SDB besiyerine ekim yapıldı. Üretim, her bir dermatofit türü için 7 kültür hazırlanarak 30 °C'de, 150 rpm çalkalama hızında 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

Enzim kaynağı olarak üretim ortamının filtrasyonu ile elde edilen supernatant kullanıldı. Substrat olarak ise 0.1 M fosfat tamponu(pH:6.0) içinde çözünmüş % 1'lik kazein kullanıldı. 1ml enzim ile 1 ml substrat deney tüpünde karıştırılarak 60 dk 30 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için % 10'luk Trikarboksilik asit (TCA) çözeltisinden 3 ml ilave edildi ve vortekste karıştırılarak 30 dk sonra Whatman I filtre kağıdından süzülde. Elde edilen filtrattan 1 ml alındı ve 5 ml Lowry C eklendi. Lowry A; 0.1 M NaOH içinde % 2 Na₂CO₃, Lowry B₁; % 1 CuSO₄ ve Lowry B₂, % 2 sodyum potasyum tartarat hazırlandı. Lowry C ; A:B₁:B₂ nin sırasıyla 100:1:1 oranında karıştırılması ile elde edildi (19).10 dk sonra 1:1 oranında sulandırılmış folin ayırıcından 0.5 ml ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Karışım 60 dk oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı, süre sonunda spektrofotometrede 700 nm'de okundu (19, 20).

Enzim aktivitesi internasyonel ünite (IU) olarak hesaplandı. Bir ünite enzim aktivitesi 1 saatlik inkübasyon süresinde inkübasyon karışımının optik yoğunluğundaki 0.1 birim artışı sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı (21).

Dermatofitlerin Kazeinolitik Özelliklerinin İncelenmesi

İzole edilen dermatofit türlerinden *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'in kazeinolitik özelliklerinin incelenmesi için stok kültürlerden süt tozu ilave edilmiş özel hazırlanmış besiyerlerine ekimler yapıldı. Kültürler 2 hafta süre ile 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon

sonrasında fungusun salgıladığı proteaz enzimi kazeni parçalaması sonucu besiyeri renginde açılma meydana geldi. Bu renk açılımının derinliği ölçülerek *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* türlerinin kazeinolitik özellikleri değerlendirildi (15).

Dermatofitlerin Optimum Üreme ve Enzim Üretim Süresinin Belirlenmesi

Kazeinolitik özellikleri pozitif olarak değerlendirilen Tr2, Tr3, Tm207, Tr319 ve Tm321 dermatofit suşları enzim aktivitesinin incelenmesi için ayrıldı. Her bir dermatofit türü SDB besiyerlerine ekim yapılarak 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Söz konusu süreler sonunda ağırlık artışı ve enzim aktivitelerine bakıldı. Sonuçlar grafiğe geçirildi.

Enzim Üretiminin Sıcaklığa Göre Ölçülmesi

En yüksek değer elde edilen Tr2 suşu 25 ile 60 °C arasında değişen sıcaklıklarda 14 gün inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesi ölçüldü

Bulgular

Kazeinolitik özelliklerini incelediğimiz dermatofitlerin, 3. ve 7.gün ölçümlerinin ortalaması 4 mm ve üzerinde olanlar pozitif, altında olanlar negatif olarak değerlendirildi. Kazeinolitik özellikleri incelenen Tr1, Tr4, Tr221, Tr237, Tr324 ve Tr329 negatif olarak değerlendirildi; Tr2, Tr3, Tm 207, Tr319 ve Tm321 nolu dermafiterler pozitif olarak değerlendirildi (15) (Tablo 1).

Tablo 1. Dermatofitlerin kazeinolitik özelliklerinin incelenmesi.

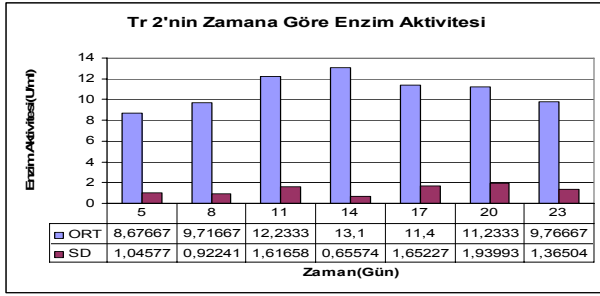
İncelenen dermatofitler	3.gün ölçüm(mm)	7.gün ölçüm(mm)	Ortalama
Tr 1	1 mm	3 mm	2 mm
Tr 2*	4 mm	6 mm	5 mm
Tr 3*	4 mm	7 mm	6.5 mm
Tr 4	2 mm	3 mm	5 mm
Tm207*	7 mm	9 mm	8 mm
Tr 221	1mm	3 mm	2 mm
Tr 237	1 mm	5 mm	3 mm
Tr 319*	4 mm	6 mm	5 mm
Tr 333	1 mm	5 mm	3 mm
Tm 321*	5 mm	9 mm	7 mm
Tr 324	2 mm	5 mm	3.5 mm
Tm 327	0 mm	2 mm	2 mm
Tr 329	0 mm	6 mm	3 mm
Tr 332	0 mm	1 mm	0.5 mm

Tr : *Trichophyton rubrum*

Tm: *Trichophyton mentagrophytes*

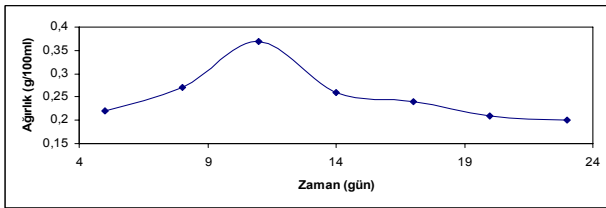
* : Kazeinolitik özellik açısından pozitif olarak değerlendirilen

Ekimi yapılan Tr2, 30 °C'de 150 r.p.m. çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Her bir süre sonunda enzim aktivitesine bakıldı. Ölçümler sonucunda en yüksek aktivite 14. gün sonunda 13,1 U/ml olarak belirlendi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil1).



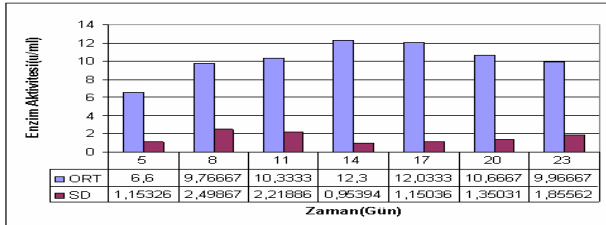
Şekil 1. Tr2'nin zamana bağlı enzim aktivitesi.

Kültürde üreme, supernatantdan süzgeç kağıdından süzülerek ayrılan ayrılan miçelyum kısmı tartılarak üreme miktarı 100 ml de gr olarak saptandı (Şekil 2). Ağırlık artışı enzim üretimine paralel olarak 11. güne kadar devam ettikten sonra bir miktar azalma göstererek devam etmektedir.



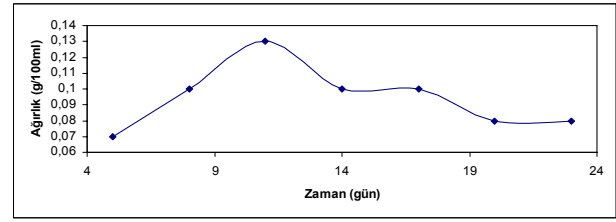
Şekil 2. Tr2' nin enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Ekimi yapılan 7 Tr3 örneği, 30 °C'de 150 rpm hıza ayarlı inkübatöre 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. En yüksek enzim aktivitesi 14. gün sonrasında 12.3 U/ml olarak elde edildi. Elde edilen sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır ve standart sapma ile birlikte grafikte verilmiştir (Şekil 3).



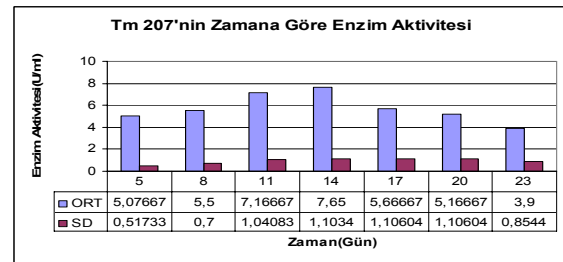
Şekil 3. Tr3'ün zamana bağlı enzim aktivitesi.

Enzim aktivitesi ölçümü yapılan 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23. günlerde kültürleri filtre ederek supernatantdan ayrılan miçelyum kısmı kurutularak ağırlıkları gr olarak tartıldı. Üremede 5. günden itibaren 11. güne kadar hızlı bir artış görüldü. Daha sonraki ağırlık artışlarında azalma görüldü (Şekil 4).



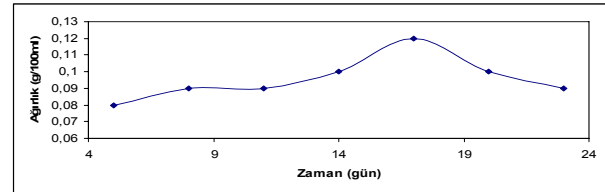
Şekil 4. Tr3'ün enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Ekimi yapılan Tm207 30 °C'de 150 rpm hıza ayarlanmış inkübatörde, 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. En yüksek enzim aktivitesi 11 ve 14.günün inkübasyonu sonunda 7.16 U/ml ve 7.65 U/ml olarak saptandı. Elde edilen sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak alındı ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterildi (Şekil 5).



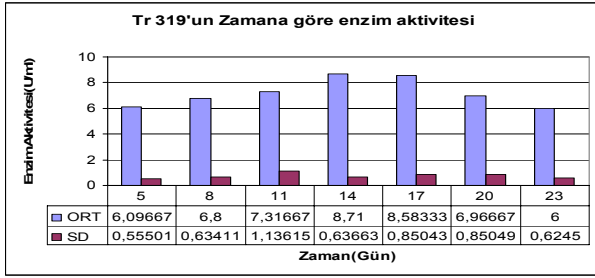
Şekil 5. Tm207'nin zamana bağlı enzim aktivitesi.

Tm207'nin inkübasyonunda üreme miktarı 14. günden sonra belirgin bir artış gösterdi ve 17. günde en fazla ağırlık artışı görüldü (Şekil 6).



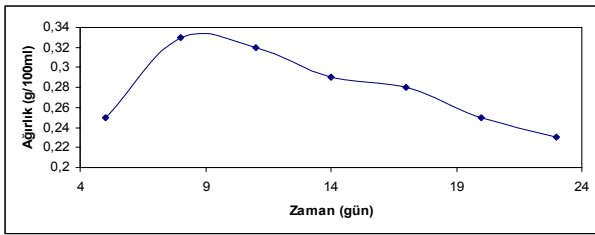
Şekil 6. Tm207' nin enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Ekimleri yapılan Tr319 örnekleri 30 °C ve 150 rpm çalkalama hıza ayarlanmış inkübatöre 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona konuldu. İnkübasyon süreleri sonunda enzim aktivitelerine bakıldı. Elde edilen en yüksek aktivite 14. günde 8.71 U/ml ve 17. günde 8.58 U/ml olarak saptandı. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak grafikte gösterildi (Şekil 7).



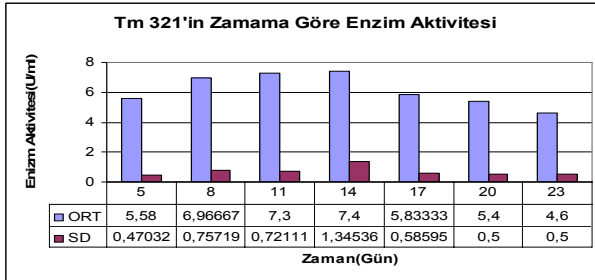
Şekil 7. Tr319'un zamana bağlı enzim aktivitesi.

Kültürlerin 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23. gün süre ile üretimleri sonunda ağırlık artışları tartımlar yapılarak belirlendi. İnkübasyonun 5. gününden itibaren 8. gününe kadar üretimde hızlı bir artış görüldü ve daha sonra enzim üretimine paralel olarak azalma görüldü. (Şekil 8).



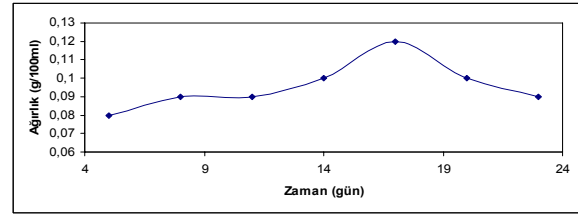
Şekil 8. Tr319' un enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Ekimi yapılan Tm321 no'lu dermatofit örnekleri 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlı inkübatörde 5, 8, 11, 14, 17, 20 ve 23 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda enzim aktivitelerine bakıldı. Enzim aktivitesi en yüksek 11. günde 7.3 U/ml ve 14. günde 7.4 U/ml olarak saptandı. Elde edilen sonuçlar ortalama olarak standart sapma ile birlikte grafikte gösterildi (Şekil 9).



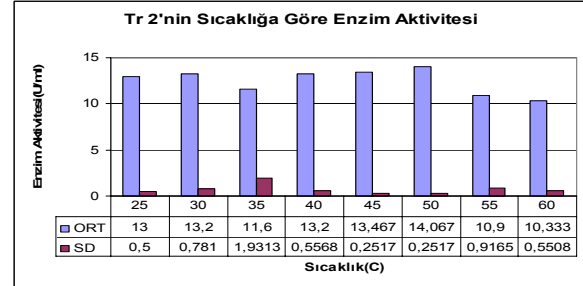
Şekil 9. Tm321'in zamana bağlı enzim aktivitesi.

Ekimi yapılan Tm321 no'lu dermatofit kültürünün üremesinde 5. gününden itibaren 14. güne kadar ağırlık artışı düşük oranda olmuştur. Bu günden itibaren 17. güne kadar hızlı bir artış olmuştur (Şekil 10).



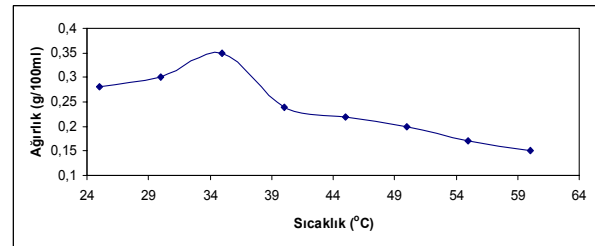
Şekil 10. Tm321' in enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Sıcaklığa göre enzim üretimi optimum olarak 45 ile 50 °C'de elde edildi. Elde edilen üç çalışmanın ortalaması ve standart sapmaları grafikte gösterildi (Şekil 11).



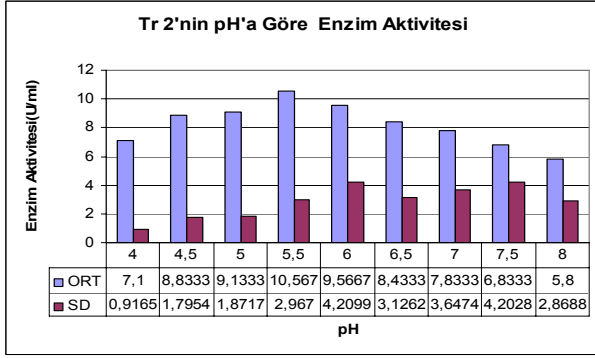
Şekil 11. Tr2' nin sıcaklığa bağlı enzim aktivitesi.

Değişen sıcaklıklarda Tr2'nin üretimindeki ağırlık artışı 14. güne göre 30 °C sıcaklıktan itibaren 35 °C'ye kadar hızlı bir artış görülmekte ve daha sonra sıcaklık arttıkça ağırlıkta azalma görülmektedir (Şekil 12).



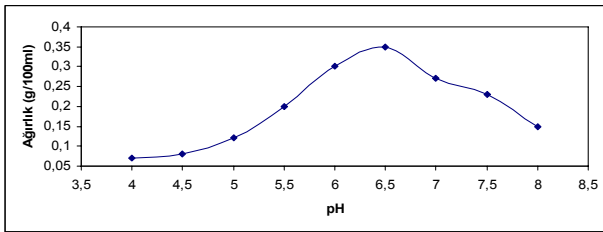
Şekil 12. Tr2'nin değişen sıcaklıkta enzim üretimindeki ağırlık artışı.

Enzim üretiminde optimum pH'nın belirlenmesi, enzim aktivitesi en yüksek olan Tr2'nin kültür ekimi yapılarak pH 4 ile 8 arasında değişen değişik pH'larda 14 gün süre ile 30 °C inkübasyonu sonrasında enzim aktiviteleri ölçüldü. En yüksek değerler pH 5.5'de 10.56 U/ml ve pH 6'da 9.56 U/ml olarak elde edildi. Alınan sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak grafikte gösterildi (Şekil 13).



Şekil 13. Tr2 'nin pH'ya bağlı enzim aktivitesi.

Değişen pH'larda Tr2 no'lu dermatofit suşunun 14 gün süre ile üretiminde ağırlık artışı en fazla pH 6.5'de olmuştur (Şekil 14).



Şekil 14. Tr2'nin değişen pH'da enzim üretimindeki ağırlık artışı

Tm321'in enzim üretimi 11 ve 14. günde artmasına karşın ağırlık artışı 17. günde olmuştur. Ekimi yapılan ve inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri çalışılan Tr2, Tr3, Tm207, Tr319 ve Tm321 no'lu dermatofit suşlarından en yüksek değer Tr2'de 14 gün inkübasyon sonrasında 13.1 U/ml olarak elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite Tr2 suşunun 14 gün süre, optimum sıcaklık 45 ile 50 °C'de ve optimum başlangıç inkübasyonu pH 5.5 ile 6 olarak saptandı.

Tartışma

Son yıllarda, fungusların salgıladığı proteolitik enzimler potansiyel virulans faktör olarak çok dikkat çekmektedir. Genellikle dermatofitler tarafından salgılanan keratinazların dermatofitlerin virulansı için önemli olduğu kabul edilirler. Dermatofitlerin keratinize olmuş dokuları invade edebilme yeteneği dermatofitlerin biyolojik bir özelliğidir (9).

Diğer taraftan enzimler, endüstriyel proseslerde geniş şekilde uygulama alanlarına sahiptirler. Proteazlar, gıda, ilaç ve diğer birçok endüstriyel alanda kullanıldığından dolayı bütün enzim pazarının yaklaşık % 60'ını oluşturur. Keratinaz üretmede aktif olarak tanımlanan fungus suşları tıp ve kozmetikte kullanılabilen keratinaz üretim potansiyeline sahiptirler (15). Proteazlar, geniş bir şekilde keratofilik funguslarda ve dermatofitlerde birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (22-25).

Proteaz aktivitesi ile ilgili literatüre baktığımızda, deri infeksiyonlarının etkenleri olan dermatofitlerin *Trichophyton*(5, 26) ve *Microsporum* (2, 3), bunun yanı sıra mayalardan *Candida sp.*'nin (27, 28) keratinolitik aktiviteleri çalışılmıştır. Keratin atıklarının biyodönüşümünde kullanılmak amacı ile Noval ve Nickerson (29) tarafından bakterilerin yanı sıra 18 fungusun kaz tüyleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve en etkili olarak, *Verticillium tenuipes*, *Trichophyton equinum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'i bulmuşlardır (30). Başka bir araştırmada, tavuk tüyleri üzerinde en etkili mikroorganizmanın *Trichophyton simii* olduğu saptanmıştır (6). Friedrich ve Kern (7) tarafından yapılan araştırmada, *Doratomyces microsporus* fungusundan elde ettikleri keratinolitik proteazın farklı proteinleri hidrolize etme özelliği incelenmiştir. İnkübasyon sonunda enzimin hem fibrilli proteinler hem de globüler proteinleri parçaladığı belirlenmiştir. Keratinli substradı parçalama etkisini şu şekilde sıralamışlardır; deri keratini> tırnak keratini> saç keratini, keratinsiz substrada ise; kazein> BSA(Bovine Serum Albumin)> elastin. Bu çalışmada elde edilen keratinazın farklı proteinleri farklı derecelerde degrade ettiği saptanmıştır. Keratinazın özellikle kazein ve BSA'yı degrade ettiği halde kollajen ve elastini degrade etmemesi özelliğinden dolayı deri endüstrisinde kullanılabilceğini belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, kanalizasyon atıklarından izole ettikleri 2 saprofit, 2 dermatofit türün keratinaz enzim aktivitesi çalışmasında sıvı kültürde keratinin parçalanarak ağırlık kaybının ölçülmesine göre, en yüksek oranda keratini parçalama özelliği, % 62 ile *Chrysosporum pannicola* ve daha sonra % 48 ile *Microsporum gypseum* olduğunu saptadılar. 27 °C inkübasyon sıcaklığında, başlangıçta 6.5 olan pH inkübasyon sonunda ortama salınan ürünler nedeni ile 7.8'e kadar değiştiğini ve keratinaz aktivitesinin *T. mentagrophytes*'in 8 U/ml, *Microsporum gypseum*'un 14 U/ml olduğunu saptadılar (11).

Fungusların keratinolitik özelliklerinin tarandığı bir çalışmada en yüksek aktivite *Aspergillus flavus* tarafından 14 günde 30 °C pH 7 ile 8 arasında inkübasyonda 781 mU/ml olarak üretildiği saptanmıştır (20).

Singh (31) tarafından yapılan bir çalışmada, organik atıklı bir yerden izole edilen *Chrysosporium keratinophilum* fungusunun potansiyel olarak ekstraselular proteaz üreticisi olduğunu belirledi. En iyi enzim aktivitesinin 15 gün inkübasyon süresinde, 40 C'de, pH 8'de 18.6 U/ml ve 115.5 mg biomass olduğu tespit edildi.

Kumar ve ark. (32) birçok bakteri ve fungusun proteaz üretebilme yeteneklerini test etmeleri sonucunda, peynir üretiminde kullanılan ticari enzimlerle karşılaştırıldığında *Rhizopus oryzoë*'den elde ettikleri enzimin, sütü daha iyi pıhtılaştırdığı ve daha iyi kalitede olduğunu saptamışlardır. Bu enzimin kazeinolitik özelliği incelenmiştir ve spesifik aktivitesi 8.4 U/mg olarak belirlenmiştir. Moreira ve ark. (33) yaptıkları çalışmada ilk kez funguslar arasında bir bitki patojeni olan *Myrothecium verrucaria*'nın keratinolitik özelliklerini incelediklerinde, 40 °C'de ve pH 8 ile 9 arasında çok iyi

derecede proteaz ürettiğini belirlediler. Bu proteazın, kirli atık tüylerin degradasyonunu insan saç ve tırnağından ve daha sonra koyun yününden daha iyi gerçekleştirdiğini saptadılar. Bu patojenik fungusun endüstriyel amaçlar için kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

Görüldüğü gibi birçok araştırmada diğer funguslarla birlikte *Trichophyton* ve *Microsporum* genuslarına ait dermatofitler ile değişik metodlar kullanılarak yapılan çalışmalarda keratin ve kazein substradı üzerinde oldukça etkili oldukları gözlenmiştir.

Bu çalışmamızda izole ettiğimiz *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* suşlarının ilk önce kazeinolitik özellikleri incelendi (Tablo 1). Kazeinolitik özellikleri pozitif olan suşların proteaz enzim aktiviteleri çalışıldı.

Çalışmamızda en yüksek proteaz aktivitesi 50 °C inkübasyon sıcaklığında, pH 5.5 ile 6 arasında 14 U/ml olarak elde edildi (Şekil 6). Elde ettiğimiz sonuçlar diğer sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Kaynaklar

- Friedrich J, Gradisar H, Mandin D, Chaumont JP. Screening fungi for synthesis keratinolytic enzymes, Letters Applied Microbiology 1999; 7:130.
- Takiuchi I, Highuchi D, Sei Y, Koga M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. Sabouraudia 1982; 20: 281-288.
- Takiuchi, I., Highuchi, D., Sei, Y., Takagi, H. And Negi, M., Partial charectization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology 1984; 22: 219-224.
- Plempel M, Bremm KD, Gao Z. Pathogenese-Faktoren von Dermatophyten. German Patent Application 1991, DE 40 07 927 Al.
- Yu, R.J., Hormon, S.R. and Blank, F., Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophyton*. Journal of Bacteriology 1968; 96: 1435-1436.
- Singh CJ, Singh BG, Singh BS. Biodegradation of certain keratin substrates in vitro by some keratinophylic fungi. Advances in Plant Sciences 1995; 8: 271-276.
- Friedrich J, Kern S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2003; 21: 35-37.
- Kaufman G, Horwitz BA, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. Medical Mycology 2007; 45: 149-155.
- Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. International Journal of Medical Microbiol 2002; 292: 405-419.
- Toprak N Ü, Demirçay Z, Çerikçioğlu N, Karavuş M, Johansson C. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen dermatofitlerin enzim aktivitelerinin apizim yöntemiyle tayini. Mikrobiyoloji Bülteni 2005; 39: 183-189.
- Muhsin TM, and Hadi RB. Degradation of keratin substrades by fungi isolated from sewage sludge. Mycopathologia 2002; 154: 185-189.
- Tümbay E. Dermatomikozlarda örnek alma ve klinik-laboratuar işbirliği, 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu: Dermatomikoz Etkenleri ve Dermatomikozlar. 3-4 Haziran 2004 Kayseri.
- Tümbay E. Pratik Tıp Mikolojisi, İzmir-Bornova; Bilgehan Basımevi 1983, 1.Baskı s:3-30.
- Toraman Z A. Doğrudan tanı yöntemleri ve önemi, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 27-30 Mayıs 2003 Bodrum.
- Topal Ş. Pembeci C, Batum M, Borcaklı M, Çeltik Ö. Türkiye'nin tarımsal mikroflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amlaz, Proteaz, Lipaz. Turk Journal Of Biology TUBITAK 2000; 24: 79-93.
- Stainer RY, Adelberg EA, Ingraham JL. General Microbiology: Fourth ed. MacMillan Pres Ltd. London, 1980; 280-285.
- Boethling RS. Regulation of protease secretion in *P. Maltophila*. Journal of Bacteriology 1975; 123: 954-961.
- Cihangir N. Proteaz enziminin bakteriyel kaynaklardan saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1987 Ankara.
- Lowry OH Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Of Biology Chembridge 1951; 193: 265-275.
- Kebabcı Ö, Yeni mikrobial kaynaklardan proteaz eldesi ve özelliklerinin saptanması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.D. Bilim Uzmanlık Tezi. 2003, Ankara.
- Tsubio R, Ko I, Takamori K, Ogawa H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes*

- with enzymaticat acidic ph infection and immunity 1989; 57: 3479-3483.
22. Kunert J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the Actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *J Microbiol* 1989; 29: 597-604.
 23. Nigam N, Kushwaha RKS. Decomposition of feathers and hairs by keratinophilic fungi. *India J Microbiol* 1994; 29: 241-244.
 24. Singh CJ. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia* 1997; 137: 13-16.
 25. Singh CJ. Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. *Mycopathologia*. 1999; 143: 147-150.
 26. Siesenop U, Böhm KH. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. *Mycoses* 1995; 38: 205-209.
 27. Lin X, Kelemen DW, Miller, ES, Shih JCH. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Applied and Environmental Microbiol* 1995; 61: 1469-1474.
 28. Karam El-Din AA. Productions of keratinolytic proteinase by pathogenic *Candida* species isolated from clinical specimens. *African Journal of Mycology and Biotechnology* 1995; 3: 101-107.
 29. Noval JJ. and Nickerson WJ. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J of Bacteriol* 1959; 77: 251-263.
 30. Jain, P.C. and Agrawal, SC. A note on the keratin decomposing capability of some fungi. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 1980; 21: 513-517.
 31. Singh CJ. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia* 2004; 156: 151-156.
 32. Kumar NS, Sharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 2005; 40: 1701-1705.
 33. Moreira FG, de Souza CG, Costa MA, Reis S, Peralta RM. Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*. *Mycopathologia* 2007; 163: 153-160.