



***Aeromonas salmonicida* EDT1'den PROTEAZ  
ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ  
İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU  
VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ezgi DAĞ TAŞKESENLİĞİL**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı  
Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU  
2018  
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

*Aeromonas salmonicida* EDT1'den PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ  
FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK  
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2018

Her Hakkı Saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Aeromonas salmonicida* EDT1'den PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **17.01.2019** tarih ve **03.../36** nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ***Aeromonas salmonicida* EDT1'den PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ezgi DAĞ TAŞKESEN LİGİL

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu tez çalışması kapsamında Erzurum Söğütlü Mahallesi'nden Betbaşı, Karaçoban ve Geçitler gözelerinden temin edilen soğuk su örneklerinden toplam 10 adet psikrofilik bakteri izole edildi. İzolasyon sonrasında yapılan konveksiyonel ve moleküler analizler sonucunda 10 izolat (EDT1: *Aeromonas salmonicida*, EDT2, EDT14: *Pseudomonas azotoformans*, EDT3, EDT4, EDT7: *Shewanella putrefaciens*, EDT6: *S. profunda*, EDT12: *P. psychrophila*, EDT18, EDT19: *P. yamanorum*) tür düzeyinde tanımlandı. Petri denemeleri sonucunda 2 suşun proteaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olduğu gözlemlendi. En yüksek aktiviteyi ise *A. salmonicida* EDT1 izolatının verdiği tespit edildi. *A. salmonicida* EDT1 soğuk-aktif proteaz enzimi pH 7,0, 1,0:1,5 (ham enzim çözeltisi: *t*-Bütanol oranı) ve %80 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan üçlü faz ayırma sistemi (TPP) sistemi ile %244 verimle, 42 kat saflaştırıldı. Enzim molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 39,44 kDa olarak hesaplandı. Enzim için optimum pH 9,0 ve optimum sıcaklık 5°C olarak belirlendi. Enzimin 5°C'de 60 dakika sonunda aktivitesinin arttığı; 60 dakikadan sonra ise aktivitesinin giderek azaldığı tespit edilmiştir. EDT1 proteaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Mg<sup>2+</sup> (1 mM), Na<sup>+</sup> (5 ve 10 mM) ve Mn<sup>2+</sup> (10 mM) iyonları varlığında enzimin aktivitesini artırdığı; Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Li<sup>+</sup> iyonları varlığında ise enzimin inhibe olduğu gözlemlendi. Enzimin serin proteaz inhibitörü PMSF ile inhibe olduğu; %5'lik β-merkaptoetanolün enzimin aktivitesini artırdığı belirlendi. Soğuk-aktif alkalın proteaz enziminin aktivitesinin, 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda aseton (%50) ve izopropanol (%15-50) varlığında arttığı; 24 saatlik inkübasyon sonunda ise organik çözücülerde aktivitesini koruyamadığı fakat %50'lik *t*-bütanol varlığında %153 oranında artırdığı tespit edildi. %5'lik SDS konsantrasyonunda enzimin aktive olduğu; %1'lik TritonX-100 varlığında ise %77 oranında aktivitesini korunduğu belirlendi. Enzim, en yüksek aktiviteyi kazein substratı için gösterdi. *A. salmonicida* EDT1 enzimi için K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 0,751 mg/ml ve 43,29 μmol.ml<sup>-1</sup>.dk<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. Enzimin kullanılan ticari deterjanların büyük bir kısmında aktivitesini koruduğu belirlendi. Saflaştırılan EDT1 proteaz enziminin kan ve çimen lekeleri üzerine etkileri araştırıldı. Islak/kurutulmuş kan ve çimen lekeleri için en iyi leke gideriminin sırasıyla 1 saatlik inkübasyon sonucunda enzim ve deterjan uygulanan grupta olduğu tespit edildi.

**2018, 111 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Psikrofilik bakteri, *Aeromonas salmonicida*, soğukta aktif proteaz, üçlü faz ayırma sistemi (TPP), enzimatik karakterizasyon, saflaştırma

## ABSTRACT

Master Thesis

### PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICABILITY OF PROTEASE ENZYME FROM *Aeromonas salmonicida* EDT1 WITH THE THREE PHASE PARTITIONING SYSTEM

Ezgi DAĞ TAŞKESEN LİGİL

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics  
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Doc. Dr. Melda Şişecioglu

Within the scope of this thesis, a total of 10 psychrophilic bacteria were isolated from the cold-water samples obtained from the water sources of Betbaşı, Karaçoban and Geçitler from Erzurum Söğütlü neighborhood. After isolation, 10 isolat type levels were defined (EDT1: *Aeromonas salmonicida*, EDT2, EDT14: *Pseudomonas azotoformans*, EDT3, EDT4, EDT7: *Shewanella putrefaciens*, EDT6: *S. profunda*, EDT12: *P. psychrophila*, EDT18, EDT19: *P. yamanorum*) as a result of convector and molecular analyses. As a result of the petri trials, it was observed that 2 strains were positive in terms of protease enzyme activity. The highest activity was determined by *Aeromonas salmonicida* EDT1 isolates. The triple phase partitioning system was applied with using *A. salmonicida* EDT1 cold-active protease enzyme pH 7,0, 1,0:1,5 (Crude enzyme solution: *t*-butanol ratio) and 80% saturated ammonium sulfate using (TPP) system, and it was not only 244% efficiency, but also 42 times were purified. The molecular mass of the enzyme was estimated at approximately 39.44 kda with the SDS-PAGE. Optimum pH 9,0 and optimum temperature at 5 °C for protease enzyme were determined. At the end of 60 minutes, the enzyme activity increased at 5 °C, after 60 minutes, the activity decreased gradually. When the effect of metal ions on the activity of EDT1 protease enzyme is examined, the enzyme activity in the presence of Mg<sup>2+</sup> (1 mM), Na<sup>+</sup> (5 and 10 mM) and Mn<sup>2+</sup> (10 mM) ions was increased. However, in the presence of Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>+2</sup> and Li<sup>+</sup> ions, it was observed that the enzyme activity was inhibited. The serine protease inhibitor of the enzyme was strongly inhibited with PMSF; although, 5% β-mercaptoethanol increased enzyme activity, in the presence of other inhibitors it was determined that the enzyme could not preserve its activity. At the end of the 1-hour incubation period, the activity of the protease enzyme increased in the presence of acetone (50%) and isopropanol (15-50%); at the end of 24-hour incubation, it was determined that it could not maintain its activity in organic solvents but enzyme activity was increased by 153% in the presence of 50% *t*-butanol. In the 5% SDS concentration, the enzyme was activated; in the presence of TritonX-100% 1%, it was determined that the enzyme activity preserved at a rate of 77%. For the enzyme of *A. salmonicida* EDT1, the K<sub>M</sub> and V<sub>max</sub> values were calculated respectively 0,751 mg/ml, 43,29 µmol.ml<sup>-1</sup>.dk<sup>-1</sup>. *A. salmonicida* EDT1 Enzyme was applied to the commercial detergent application. The enzyme was found to retain its activity in most of the commercial detergents used. The effects of purified EDT1 protease on blood and grass stains were investigated. The best stain removal for wet / dried blood and grass stain samples was found to be in the enzyme and detergent group after 1 hour of incubation.

**2018, 111 pages**

**Keywords:** Psychrophilic bacteria, *Aeromonas salmonicida*, cold-active protease, triple phase partitioning system (TPP), enzymatic characterization, purification

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı en iyi şekilde ilerletebilmem için laboratuvarında birçok imkan oluşturan ve bu tezin mikrobiyolojik aşamasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan Sayın Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e

Tez konumu belirlemede ve deneysel çalışmalarında değerli fikirlerini, bilgi birikimini ve tecrübesini benden esirgemeyen bu tezi yazmamda büyük desteği olan Sevgili Danışmanım Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na

Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında; cihazlar, deney yöntemleri ve akademik anlamda sorduğum tüm soruları bıkmadan güler yüzüyle yardım sever bir şekilde cevaplayan ve yeri geldiğinde benimle birlikte çalışan Sayın Esra ALÇİÇEK 'e aynı şekilde tezimin mikrobiyolojik kısmında tüm bilgi birikimini ve tecrübesini benimle paylaşan ve bana öğreten, her türlü yardımı gösteren, güler yüzünü ve desteğini hiç esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT'a, yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Yeliz DEMİR'e ve Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI'ya

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiç esirgemeyen, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, en stresli anlarımda tüm sabırlarıyla yanımda olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim merhume anneannem Sayın Sevim AKYOL'a, babam Sayın Osman Nuri DAĞ'a, annem Sayın Hülya DAĞ'a ve kardeşim Sayın Bahadır DAĞ'a

Ve son olarak tez çalışmam sırasında bana karşı olan desteğini, güvenini ve yardımını bir an olsun benden esirgemeyen bu süreç içerisinde benimle birlikte yıpranan ve koşuşturan laboratuvarında geceler boyu benimle birlikte çırpınan, her umutsuzluğa kapıldığımda sonsuz güç veren eşim Sayın M. Yusuf TAŞKESENLİGİL'e ve bu süreç içerisinde bana güç ve destek veren, her sorunumu dinleyen eşimin değerli ailesine teşekkürü bir borç bilirim.

**Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL**

**Aralık, 2018**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Ekstremofilik Enzimler.....	4
1.3. Psikrofillerin Özellikleri.....	4
1.4. Soğukta Aktif Enzimler.....	5
1.5. Proteazlar.....	6
1.6. Alkalın Proteazlar.....	6
1.6.1 Serin Proteazlar.....	7
1.6.2 Sistein Proteazlar.....	8
1.6.3. Aspartik Proteazlar.....	8
1.6.4. Metallo Proteazlar.....	9
1.7. Soğukta Aktif Proteazlar ve Özellikleri.....	9
1.8. Soğukta Aktif Proteazların Kullanım Alanları.....	10
1.9 <i>Aeromonas</i> Cinsinin ve <i>Aeromonas salmonicida</i> Türünün Özellikleri.....	10
1.10. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP).....	12
1.10.1. Üçlü Faz Ayırma Yönteminin Avantajları.....	13
1.10.2. Üçlü Faz Ayırma Yönteminin Dezavantajları.....	14
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>15</b>
2.1. Tezin Amacı.....	23
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>24</b>
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	24
3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.....	25

3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan DeneYlerde Kullanılan ÇöZeltilerin Hazırlanışı.....	26
3.1.4. Tez Kapsamında Yapılan DeneYlerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı..	30
3.2. Yöntem .....	32
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	32
3.2.2. Mikroorganizmaların İzolasyonu .....	32
3.2.3. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanılarının Yapılması .....	32
3.2.3.a. Seçilen İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.3.a.1. Gram Boyama.....	33
3.2.3.a.2. Seçilen İzolatların %3'lük KOH ÇöZeltisi ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi.....	33
3.2.3.a.3 Hareketlilik Testi .....	34
3.2.3.b. Fizyolojik Özelliklerin Belirlenmesi .....	34
3.2.3.b.1. İzolatların Gelişme Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	34
3.2.3.b.2. İzolatların Gelişebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi.....	34
3.2.3.b.3.İzolatların Gelişebildikleri Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	34
3.2.3.c. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	35
3.2.3.c.1. Katalaz Testi .....	35
3.2.3.c.2. Oksidaz Testi .....	35
3.2.4. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması.....	35
3.2.4.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	35
3.2.4.2. 16S rRNA PCR İşlemi .....	36
3.2.4.2.1.16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi .....	38
3.2.4.3. Kompetant Hücre Hazırlanması .....	38
3.2.4.4. Ligasyon İşlemi .....	39
3.2.4.5. Transformasyon İşlemi .....	39
3.2.4.6. Kolonilerin Seçilmesi ve Sıvı Kültüre Alınması .....	40
3.2.4.7. Koloni PCR için Örneklerin Hazırlanması ve PCR İşlemi .....	40
3.2.4.8. Plazmit İzolasyonu.....	41
3.2.4.8.1. Plazmit Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	42
3.2.5. Proteaz Enzimin Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları .....	42
3.2.5.1. Alkalın Proteaz Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının Skim Milk Agar Besiyerinde Belirlenmesi.....	42



3.2.5.2. Alkalın Proteaz Üretimi.....	43
3.2.5.3. Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	43
3.2.5.4. Protein Tayini.....	44
3.2.5.5. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma(TPP) Sistemiyle Saflaştırılması.....	44
3.2.5.5.a. Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması için Sıcaklık Optimizasyonu...45	
3.2.5.5.b.TPP İşlemi için Uygun Tuz Yüzdesi ve Organik Çözgen Oranının Belirlenmesi.....	46
3.2.5.5.c.TPP İşlemi için pH Optimizasyonu.....	47
3.2.5.5.d. Alkalın Soğuk-Aktif Proteazın TPP İşlemiyle Saflaştırılması.....	47
3.2.5.6. Alkalın Proteaz Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	47
3.2.5.6.a.Sodyum Dodesil Sülfat -Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü, Enzimin Moleküler Kütlesinin Tayini ve Zimogram Analizi.....	47
3.2.5.6.b. Örneklerin Gümüş Boyama Yöntemiyle Boyanması.....	49
3.2.5.6.c. Alkalın Proteaz Enziminin Zimogram Analizi.....	50
3.2.5.6.d. Alkalın Proteaz Enzimin için Optimum pH ve Stabil pH'nın Belirlenmesi.....	50
3.2.5.6.e. Alkalın Proteaz Enzimi için Optimum Sıcaklığın ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesi.....	51
3.2.5.6.f. Bazı Metal İyonlarının Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi.....	51
3.2.5.6.g. Bazı Organik Çözücülerin Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi .....	52
3.2.5.6.h. Bazı İnhibitörlerin Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi.....	52
3.2.5.6.i.Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanların Etkisinin Belirlenmesi.....	53
3.2.5.6.j. Alkalın Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğünün Belirlenmesi.....	53
3.2.5.6.k. Alkalın Proteaz Enzimi için $K_M$ ve $V_{MAX}$ Parametrelerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar.....	53

3.2.5.6.1. Ticari Olarak Satılan Bazı Katı ve Sıvı Deterjanların Proteaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	54
3.2.5.6.m. Kan ve Çimen Lekesi Gibi Protein Lekelerinde Soğukta Aktif Proteaz Enziminin Aktivitesinin Etkisi .....	54
3.2.6. İstatistiksel Analiz .....	55
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>56</b>
4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu .....	56
4.2. Konveksiyonel Test Sonuçları.....	57
4.2.1. Morfolojik Özelliklerinin Test Sonuçları .....	57
4.2.1.a. KOH ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi.....	57
4.2.1.b. Gram Boyama ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi.....	57
4.2.1.c. Hareketlilik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	57
4.2.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Test Sonuçları .....	58
4.2.2.a. Oksidaz ve Katalaz Test Sonuçları.....	58
4.2.3. Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	59
4.2.3.a Sıcaklık, pH, Tuz Özelliklerinin Belirlenmesi .....	59
4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması.....	61
4.3.1. Amplifiye Edilen 16S rRNA Bölgesinin Klonlanması .....	62
4.4. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	64
4.5. Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik .....	65
4.6. Protein Aktivitesi Hesaplanmasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği.....	65
4.7. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemiyle Alkali Proteazın Saflaştırılması.....	65
4.7.1. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemiyle Alkali Proteazın Saflaştırılması için Sıcaklık Optimizasyon Sonuçları.....	66
4.7.2. TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonu ve Organik Çözgen Oranının Etkisinin Belirlenmesi .....	66
4.7.3. Alkalın Proteaz'ın Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi.....	70
4.7.4. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları.....	71
4.8. SDS-PAGE ile Enzimin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogram Analizi.....	72
4.9. Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimi için Optimum pH ve Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	74

4.10. Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimi için Optimum ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	75
4.11. Bazı Metal İyonlarının Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları.....	77
4.12. Bazı İnhibitörlerin Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları.....	79
4.13. Bazı Organik Çözücülerin Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları.....	81
4.14. Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanın Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları .....	84
4.15. Bazı Doğal Substratların Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları .....	85
4.16. $K_M$ ve $V_{MAX}$ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	85
4.17. Bazı Endüstriyel Deterjanların Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları .....	86
4.18. Kan ve Çimen Lekesi Gibi Protein Lekelerinde Soğukta Aktif Proteaz Enziminin Aktivitesine Etkisinin Sonuçları.....	86
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>88</b>
KAYNAKÇA .....	102
ÖZGEÇMİŞ .....	111

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
AA	: Akrilamid
APS	: Amonyum Persülfat
Bis - AA	: Bis Akrilamid
BSA	: Sığır Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum Klorür
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
DNTB	: Dinitrotiyo Benzen
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	: Etanol
EU	: Enzim Ünitesi
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IPTG	: izopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SKM	: Skim Milk Powder
TCA	: Triklorik asit
sn	: Saniye
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris – HCl	: Trizma Tamponu
TSA	: Triptone Soy Agar
TSB	: Triptone Soy Broth
V	: Volt
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Üçlü faz ayırma yöntemi çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.1. Kan ve çimen lekelerinin hazırlanması.....	55
Şekil 4.1. EDT1, EDT7 ve EDT19 suşlarına ait petri görüntüleri.....	56
Şekil 4.2. EDT1 izolatına ait gram ve hareketlilik görüntüsü .....	58
Şekil 4.3.a. EDT1suşuna ait oksidaz testi görüntüsü.....	59
Şekil 4.3.b. EDT1,EDT4, EDT18 suşuna ait katalaz testi görüntüsü.....	59
Şekil 4.4. 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü.....	62
Şekil 4.5. Mavi-beyaz koloni örnek görüntüsü.....	62
Şekil 4.6. Koloni PCR jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.7. Söğütlü Mahallesinde bulunan Betbaşı, Geçitler ve Karaçoban gözelerinden alınan soğuk su örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analizi sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining...63	
Şekil 4.8. EDT1 suşuna ait proteaz enzim aktivitesi görüntüsü .....	64
Şekil 4.9. EDT8 suşuna ait proteaz enzim aktivitesi görüntüsü .....	64
Şekil 4.10. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	65
Şekil 4.11. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği.....	65
Şekil 4.12. TPP prosesinin %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	67
Şekil 4.13. TPP prosesinin %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	68
Şekil 4.14. TPP prosesinin %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	68
Şekil 4.15. TPP prosesinin %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	69
Şekil 4.16. TPP prosesinin %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	69
Şekil 4.17. TPP prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	70
Şekil 4.18. TPP prosesinin %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi .....	70
Şekil 4.19. Alkalın proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi.....	71
Şekil 4.20. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-Rf grafiği.....	72
Şekil 4.21.a. <i>A. salmonicida</i> EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü.....	73
Şekil 4.21.b. <i>A. salmonicida</i> EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin zimogram görüntüsü.....	73

<b>Şekil 4.22.</b> Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği .....	74
<b>Şekil 4.23.</b> Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	75
<b>Şekil 4.24.</b> Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçümü için çizilen sıcaklık bağıl aktivite grafiği .....	76
<b>Şekil 4.25.</b> Sıcaklığın proteaz enzim kararlılığı üzerine etkisi .....	77
<b>Şekil 4.26.</b> Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	78
<b>Şekil 4.27.</b> Proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi.....	80
<b>Şekil 4.28.</b> Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	82
<b>Şekil 4.29.</b> Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi .....	83
<b>Şekil 4.30.</b> Proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisi.....	84
<b>Şekil 4.31.</b> Kazein substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği.....	85
<b>Şekil 4.32.</b> TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari deterjanların etkisi.....	86
<b>Şekil 4.33.</b> Kan lekelerinin sonuçları.....	87
<b>Şekil 4.34.</b> Çimen lekelerinin sonuçları.....	87

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı istasyonlar .....	24
Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar, kitler ve şirket adı.....	24
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları. ....	26
Çizelge 3.4. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	27
Çizelge 3.5. Tez kapsamında kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları.....	31
Çizelge 3.6. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	37
Çizelge 3.7. PCR programı, sıcaklık döngüsü .....	37
Çizelge 3.8. Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarlar.....	39
Çizelge 3.9. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları .....	40
Çizelge 3.10. Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü .....	41
Çizelge 3.11. Alkalın proteaz enziminin saflaştırılması için sıcaklık optimizasyonu ....	45
Çizelge 3.12. Yürütme jeli bileşenleri .....	49
Çizelge 4.1. Psikrofilik bakteri suşları ve izole edildikleri istasyonlar.....	56
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik özellikleri.....	57
Çizelge 4.3. Biyokimyasal özellikleri.....	58
Çizelge 4.4. İzolatların sıcaklık özellikleri .....	60
Çizelge 4.5. İzolatların pH özellikleri.....	60
Çizelge 4.6. İzolatların tuz özellikleri.....	61
Çizelge 4.7. DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri .....	64
Çizelge 4.8. <i>A.salmonicida</i> proteaz enziminin aktivitesinin belirlenebilmesi için sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	66
Çizelge 4.9. <i>A.salmonicida</i> EDT1’den izole edilen alkalın proteazın saflaştırma tablosu.....	71
Çizelge 4.10. <i>A. salmonicida</i> EDT1’den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1M sodyum fosfat (pH:6.0-7.0), Tris-HCl (pH:7.5-8.5) ve glisin-NaOH (pH:9.0-11.0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH’sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları. ....	74
Çizelge 4.11. <i>A.salmonicida</i> EDT1’den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1M sodyum fosfat (pH:6.0-7.0), Tris-HCl (pH:7.5-8.5) ve glisin-NaOH (pH:9.0-11.0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH’sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	75
Çizelge 4.12. <i>A.salmonicida</i> EDT1’den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık – bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi. ....	76
Çizelge 4.13. <i>A.salmonicida</i> EDT1’den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık-kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi .....	77



<b>Çizelge 4.14.</b> <i>A. salmonicida</i> EDT1'den elde edilen proteaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	78
<b>Çizelge 4.15.</b> <i>A. salmonicida</i> EDT1'den elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi.....	80
<b>Çizelge 4.16.</b> Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	81
<b>Çizelge 4.17.</b> Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	82
<b>Çizelge 4.18.</b> <i>A. salmonicida</i> EDT1'den saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisi.....	84
<b>Çizelge 4.19.</b> <i>A. salmonicida</i> EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlar varlığında aktivitesi.....	85



## 1.GİRİŞ

### 1.1.Enzimler

Enzimler, kimyasal reaksiyonları seçici bir şekilde katalizleme yeteneğine sahip olarak organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereklidirler. Kimyasal reaksiyonlar; katalizörler varlığında saniyeler içinde, katalizörler olmadan ise yıllarca sürebilirler. Enzimler benzer substratlar arasında inanılmaz ölçüde seçim yapabilen, reaksiyonun gerçekleşme hızını  $10^{17}$  kat kadar arttırabilen özgül biyomoleküllerdir.

Biyokimyasal reaksiyonlarda enzimler merkez konumundadır. Enzimlerin katalizleyerek besin moleküllerinin parçalandığı tepkimelerde kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin üretimi sağlanır (Lehninger 2005).

Enzimlerin çoğu protein yapısında olmasına rağmen bazıları ise ribonükleik asit veya ribonükleoproteinlerdir. Substrat ile enzimin birbirine bağlandığı ve kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği aktif bir bölgede katalitik mekanizma gerçekleşir. Enzim ve substratın dinamik ve direkt etkileşimin gerçekleştiği bu bölgede; enzimatik reaksiyonlar meydana gelir. Hidrofobik, elektrostatik, dipolar etkileşimler ve hidrojen bağları yine bu bölgede oluşur. Aminoasitlerin yan zincirleri fonksiyonel gruplar içerir ve bu şekilde glutamat, aspartat, lisin, histidin, arginin, serin, treonin, tirozin ve sistein dizilerinin karboksi, amino, imidazol, hidroksi ve tiyol grupları ile kataliz gerçekleştirilir. Substrat ile enzim arasında elektrostatik etkileşmeyi sağlayan bu fonksiyonel gruplar hidrojen bağlarını oluşturarak asit-baz, nükleofilik, elektrofilik katalizi meydana getirir (Frey and Hegeman 2007).

Enzimler 12 000'den 1 000 000'a kDa kadar değişen molekül ağırlığına sahip olabilirler. Enzimlerin bazıları aktiviteleri için  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{+2}$  gibi metal iyonlarına ve koenzim olarak adlandırılan organik ve metalloorganik moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bunlar kimyasal gruplardır ve kofaktör olarak adlandırılırlar. Enzim proteinine bağlanan metal iyonuna ve koenzime prostetik grup denir. Metal iyonu ya da koenzimiyle aktif

olan enzime holoenzim, holoenzimi oluşturan protein kısmı ise apoenzim olarak ifade edilir (Lehninger 2005).

Enzimler; katalizli reaksiyonlarda  $\Delta G$ 'yi düşürerek reaksiyonun gerçekleşmesini kolaylaştırır. ES kompleksini oluşturmak için aktivasyon enerjisini düşürerek geçici bir şekilde substratla reaksiyona girer ve alternatif bir yol olarak reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar. Reaksiyon entropisini düşmesi için substratı reaksiyona uygun hale getirir ve reaksiyonlarda sıcaklığı yükselterek enzimin fonksiyonunu gerçekleştirmesini ve sonuç ürününün oluşmasını hızlandırır fakat çok fazla sıcaklıkta enzimin şekline zarar vererek enzimi denature eder (Fersht 1985).

Bir enzimin aktivitesini ifade etmek için IU (International Unit) tanımlaması kullanılır. Bir ünite enzim (EU), bir dakikada 1  $\mu\text{mol}$  substratı ürüne dönüştüren veya 1  $\mu\text{mol}$  ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesidir ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bir diğer birimdir.

Enzim reaksiyon hızına etki eden faktörler; sıcaklık, pH, iyonik şiddet, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, ortamda bulunan aktivatör ve inhibitörlerdir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı denir. Bir enzimin optimum pH'sı substratının yapısına ve elde edildiği kaynağa bağlıdır (Özata ve Kutlu 2000). Ortamın asidik veya bazik olmasına karşı duyarlı olan enzimlerin çoğu pH'nın 1'e kadar düşmesine veya 11'e kadar yükselmesine dayanamayarak aktivitelerini kaybeder (Keskin 1987). Enzimatik reaksiyonlar için sıcaklığın etkisi değişkendir. Sıcaklık enzimatik reaksiyon hızını yükseltir ancak sıcaklık yükseldiğinde enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapılı olduğundan denatüre olarak aktivite göstermezler. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir (Özata ve Kutlu 2000).

Enzimler 6 ana grup olarak sınıflandırılır:

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasındaki oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasındaki hidrojenen başka fonksiyonel bir grubun transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Proteolitik enzimlerden olan nükleazlar, lipazlar, fosfatazlar ve glikozidazlar 'nda bulunduğu hidrolazlar; eter, ester, peptit, glikozit, anhidrit bağlarının hidroliz reaksiyonunu katalizler.
- 4. Liyazlar:** Substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri hidrolizden farklı bir mekanizma ile katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Mutaz, epimeraz, rasemaz gibi özel adları ile verilen bu enzimler; geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler.
- 6. Ligazlar:** Bir bağın kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla, iki metabolitin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimin kataliz mekanizmasının açıklanabilmesi için hücre içinde enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının belirlenmesi, farklı organizmalarda ve dokulardaki izoenzimlerin karşılaştırılması, metabolizmanın düzenlenmesindeki kontrol mekanizmalarının belirlenmesi, aktivatör ve inhibitör olarak görev yapabilecek maddelerin saptanması, enzimin aktif bölgesindeki aminoasitlerin ve yan grupların belirlenmesi yardımcı olur (Temizkan ve Arda 2008).

Substrat konsantrasyonunu arttırılıp serbest enzimlerin (E), substrata bağlanmış (ES) kompleksine dönüştürülmesiyle bir enzimatik tepkimenin maksimum hızı ( $V_{max}$ ) bulunur. Enzimin maksimum hızında ES kompleksinin miktarı toplam enzim miktarına eşittir. Enzimin maksimum hızının yarısına ulaşması için gereken substrat miktarı Michaelis-Menten sabiti ( $K_M$ ) olarak bilinir ki buda enzimin substrata olan ilgisinin bir ifadesidir. Diğer önemli bir parametre olan  $k_{cat}$ ; bir saniyede aktif bölgede değişime uğrayan substrat molekülü sayısını ifade eder.

Enzimin katalizör olarak kullanıldığı reaksiyonların hızlarını azaltan veya reaksiyonları tamamen durduran küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlara inhibitör denir. Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir (Altan 2000).

İnhibitörler feedback mekanizmasının bir parçası olarak birçok organizmada görev alabilirler. Eğer bir enzim organizmada bir maddeden aşırı miktarda üretirse, aşırı miktarda üretilen madde bu maddeyi üreten enzimin inhibitörü gibi davranır böylece aşırı bir üretimin önüne geçilir. Reaksiyon hızlarını düzenleme kapasitesine sahip olan multienzim sistemleri; reaksiyonun son ürününün konsantrasyonu belirli bir düzeye geldiğinde sistemin ilk enzimini veya enzim sistemindeki dallanma noktasındaki enzimi inhibe ederek feedback inhibisyonunu gerçekleştirir. (Onat and Emerk 1987).

## **1.2. Ekstremofilik Enzimler**

Enzimler; biyoteknolojik üretimin ve araştırmanın önde gelen alanlarından biri olarak ortaya çıkan yüksek spesifiklik seviyesiyle biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin en büyük spesifitesi sadece kendi substratlarıyla sınırlı değil aynı zamanda sıcaklık, pH ve iyon varlığı gibi diğer faktörlere karşı genişliğidir. Ancak dünya biyosferi; evrimleşerek yaşayan organizmaların ekstrem çevrelerini içerir fakat biyolojik fonksiyonları ekstremofilik enzimlerle devam eden mikrobiyolojik yaşam formlarıyla gelişir (Hough and Danson 1999). Böyle ekstremofillerin, ekstrem olmayan eşleriyle fonksiyonları homologdur. Fakat ekstrem olmayan enzimler inhibe ya da denatüre olan koşullar altında biyolojik fonksiyonları katalizlemede etkilidir. Ekstremofiller sadece bir stres koşulu altında değil çoklu stres koşulları altında da stabilitelelerini ve aktivitelerini devam ettirmek için evrimleşirler. Buda onları endüstriyel biyoteknoloji ve araştırmalar için önemli kılar (Gomes and Steiner 2004).

## **1.3. Psikrofillerin Özellikleri**

Dünyanın tüm soğuk coğrafi bölgelerinde yaşayan soğuğa karşı adapte olan mikroorganizmalar psikrofiller olarak bilinir. Modern biyoteknoloji endüstrisi; ekstrem koşullar altında fonksiyon gösterebilen makromoleküllere gereksinim duymaktadır.

Psikrofil mikroorganizmalar optimum yaklaşık 15°C sıcaklığında ya da en fazla yaklaşık 20°C ve altındaki sıcaklıklarda büyürler. Aynı zamanda psikrofillerin 0°C'de hayatta kalma yeteneği vardır. Buna karşın psikrotolerantlar ise genellikle optimum ve maksimum 20°C ve üzerindeki sıcaklıklarda gelişirler. Psikrotolerant mikroplar 20°C ve 40°C arasında optimum büyüme sıcaklığına sahiplerdir. Fakat aynı zamanda 0°C derecede büyüme kapasiteleri de vardır (Feller 2003).

#### **1.4. Soğukta Aktif Enzimler**

Soğukta aktif olan enzimler, çok çeşitli biyoteknolojik alanlarda ilgi görmektedir. Onların düşük ekstrem sıcaklıklarda kararlı stabilitesi ve yüksek aktivitesi farklı endüstriyel uygulamalar için oldukça önemlidir (López *et al.* 2014; Elleuche *et al.* 2014). Bununla birlikte yürütülen proses; çevre sıcaklıklarında enerjinin korunmasına yardım eder ve sonuç olarak proses içindeki tüm maliyeti azaltır (Sarmiento *et al.* 2015; Krishnaraj *et al.* 2017). Ayrıca; soğukta aktif enzimlerin değişken sıcaklık özellikleri; ürünün niteliği etkilemeksizin böyle biyokatalizörlerin inaktivasyonu için uygun bir çözüm oluşturur (Moran *et al.* 2001). Psikrofil ve psikrotolerans mikroorganizmalar; soğukta aktif enzimler için önemli kaynaklardır. Onların enzim mekanizmaları ekstrem düşük sıcaklıklar altında çalışabilmek için adapte olmuştur. Mezofilik mikroorganizmalarda izofonksiyonel homologları aynı sıcaklıklar altında etkili davranmamalarına rağmen psikrofilik enzimler; enzim stabilitesi ve esnekliği arasında olan ilişkiyi göstermede onların farklı özelliklerinin kullanışlı olmasından dolayı son yıllarda bilimsel alanda dikkat çekmektedirler (Elleuche *et al.* 2014). Soğukta aktif enzimlerin X-ray kristalografisi ve protein mühendisliğiyle moleküler özelliklerinin tahmin edilmesi, böyle enzimlerin adaptasyon stratejilerini anlamada önem taşır. Soğukta aktif olan enzimlerin esnekliği; düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteyi açıklayan düşük enerjide; substratlar ile aktif bölgelerinden birleşirler. Öte yandan termofilik enzimler; termofilik olmayan enzimlere kıyasla daha katı ve daha az esnektir. Böylece belirli sıcaklıklarda enzimin stabilitesi ve esnekliği arasındaki denge enzimin katalitik fonksiyonunu optimize etmede anahtar bir faktördür (Maiangwa *et al.* 2015).

### 1.5. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin peptid bağlarını katalize ederler. Proteazlar; proteinlerin yapısındaki peptid bağlarını hidrolize eder ve organik çözücü varlığında peptid sentezini katalizlerler (Sookkheo *et al.* 2000). Enzim komisyon sınıflandırmasına göre proteazlar N ya da C terminal peptit bağları (ekzopeptitaz) ya da internal peptit bağları (endopeptitaz) hidroliz etme yeteneğine göre iki gruba ayrılırlar. Ekzopeptitazlar bazı ticari uygulamalarda kullanılmasına rağmen; endopeptitazlar, ekzopeptitazlardan daha önemli endüstriyel uygulamalara sahiptir. Ekzopeptitazlar; N terminal peptit bağlarını hidrolizleyen, aminopeptitazlar ve C terminal peptit bağlarını hidrolizleyen karboksipeptitazlar olarak alt gruba ayrılırlar.

Böyle enzimler, küresel enzim pazarında neredeyse %60 oranında varlık gösterirler. Deterjanlar endüstrisi, yiyeceklerin endüstriyel süreçlerinde, deride ve ilaç üretimi gibi uygulamalarda çok yönlü kullanımları vardır (Rao *et al.* 1998). Endüstriyel alanlarda; proteazların büyük kullanımı ve proteazlara olan gereksinim; ürünlerin hazırlanması, depolanması ve üretilmesinde büyük avantajlar doğurabileceğinden, proteazlar üzerinde çalışmaya araştırmacıları yönlendirir. Bir diğer faktörde; oda sıcaklığında performans gösterebilen proteazların endüstriyel sürece katkı sağlayabileceği için enerjinin korunması açısından kritik özellik olarak düşük sıcaklıklarda proteazların etkili performansının olabileceğidir. Örneğin ılıman ülkelerde; deterjanlar çamaşır yıkama sırasında suyun ısınmasında oluşacak maliyeti musluk suyu gibi düşük enerji kullanarak azaltır (Gupta *et al.* 2002).

### 1.6. Alkalın Proteazlar

Alkalın proteazlar; mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunda bulunur. Diğer organizmalara kıyasla mikroorganizmalar; nispeten kısa büyüme döngüsü, büyük skalada kültürler için uygun olması, ucuz doğal besinleri kullanarak hızlıca büyüebilmesi, kontrol edilebilen biyoprosesler ile hedeflenen ürünleri bol miktarda üretebilmesi ve umut verici klonların genetik seleksiyonu için yönlendirmenin kolay olması gibi avantajlara sahiptir. Böyle avantajlara dayanarak alkalın proteazların büyük skalada üretimi ve etkili

ticari kullanımı için ideal bir adaydır (Beg and Gupta 2003; Adinarayana *et al.* 2003; Deng *et al.* 2010; Guleria *et al.* 2016; Jayakumar *et al.* 2012; Salihi *et al.* 2016). Aktif merkezinin yapısına göre proteazlar serin proteazlar, sistein(tiyol) proteazlar, asit (aspartik) proteazlar ve metal (metallo) proteazlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Atav ve Karaboğa 2017).

### 1.6.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar (EC 3.4.21.), günümüzde endüstriyel amaçlarda kullanılan termostabil proteazlar arasında büyük öneme sahiptir (Fu-Li Li 2015). Serin proteazlar alkali pH değerlerinde aktitirler ve geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde farklı ve geniş endüstriyel uygulama alanlarına sahiptirler (Alpan 2008).

Serin proteazlar gerçekleştirdiği peptit bağlarının hidrolizi; taşıyıcı proteinlerden önder dizilerin taşınmasının, polipeptit hormon sürecinin, yeni taşınmış proteinlerden N-terminal metiyoninin taşınmasının, viral enfeksiyonda poliprotein sürecinin, yabancı proteinlerin sindirilmesinin, apoptozisde hücrel protein sindiriminin ve diğer pek çok sürecin temelini oluşturur. (Öztekin 2011).

Serin proteazlar yapılarında serine grubunun varlığı ile karakterize edilebilmektedir. Bu enzimler PMSF, DFP, TLCK, 3,4 DCI inhibitörleri ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olmalarıyla tanınırlar ve moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasındadır. Serin alkali proteazlar birçok bakteri, maya, küf ve mantardan üretilirler (Turus 2011). Alkalifilik özelliklerinden dolayı endüstride (daha çok çamaşır deterjanı endüstrisinde) geniş kullanım alanlarına sahip serin proteazların çoğu *Bacillus* suşlarından izole edilmektedir. 1947'de Carlsberg Laboratory'de bulunan ve ticari adı "Subtilisin Carlsberg" olan ticari alkali proteazın endüstriyel üretimi 1960'larda başlamıştır. İkinci ticari öneme sahip serin proteaz *Bacillus licheniformis*'den "Subtilisin Novo" dur (Ercan 2007).



### 1.6.2. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar (EC.3.4.22) prokaryot ve ökaryotlar tarafından üretilen proteazlardır. Bu tip proteazların yaklaşık 20 alt sınıfı tanımlanmıştır ve bunların birçoğu (papain, bromelain, fisin ve hayvansal katepsinler gibi) endüstriyel açıdan çok önemlidir. Tripsin benzeri tiyol proteazlar, papain benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tiplerdeki tiyol proteazlar olmak üzere dört grupta incelenmektedir. Bunlardan en iyi bilinen grup papain benzeri endoproteazlardır. Sistein proteazlar, aktif merkezlerinde bulunan -SH (tiyol) grubu, okside edici ajanlarla ve ağır metal iyonları kolayca inhibe edilebilmesinden dolayı önemli enzimlerdir (Özden 2014).

Son zamanlarda sistein proteazlar, ilaç endüstrisinin ilgisini çekmektedir. Lizozomal proteinazlar olan katepsinler, endopeptidazların ve/veya ekzopeptidazların bir ailesi olarak belirtilmektedir. Bazı katepsinler asidik pH ortamında aktifken, bazıları da nötral pH ortamında aktif kalabilmektedirler. Katepsinler; osteoporoz, romatoid artrit, damar sertliği, kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalık için ilaç olarak umut vericidir (Sarı 2011).

Papain (EC. 3.4.22.2) en iyi bilinen sistein proteazlardandır (Şekil 1.2). Carica papaya'nin meyvelerinden 1879 yılında izole edilmiştir ve aynı zamanda kristalografik yapısı belirlenen ilk proteazdır. Papaya meyvesinin kurutulmuş ham lateksi en az dört sistein proteazın (papain, kimopapain, karikain ve gisil endopeptidaz) ve diğer enzimlerin bir karışımını içermektedir. Papain 212 amino asidin üç disülfid köprüsüyle birleşmesiyle oluşur ve molekül kütlesi 23,4 kDa'dur (Sarı 2011).

### 1.6.3. Aspartik proteazlar

Aspartik proteazlar (EC 3.4.23) asidik proteazlar olarak tanımlanırlar ve katalitik aktivitelerini aspartik asit kökleri üzerine etki ederek gösteren endopeptidazlardır. Aspartik proteazları birçoğu pH 3,0-4,0 gibi düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler ve molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir. Aspartik proteazlar

Diazoasetilnorlösin-DL-norleucine metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi bakır iyonlarını içeren diazoketon bileşiklerine karşı hassastırlar (Tekin 2008).

Aspartik proteazlar; bitki, retrovirüslerde ve bitki virüsleri bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirliği serin proteazlara oranla daha azdır. Asidik proteazlar 3 gruba ayrılırlar. Bunlar pepsin (A1) , retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimlerdir. A1 ve A2 nin birbirleriyle yakın ilgisi vardır fakat A3 bunlardan farklıdır. Aspartik asitler maksimum aktiviteyi pH 3,0-4,0 izoelektrik noktayı ise 3,0 ile 4,5 civarında gösterir (Sevinç 2010).

#### **1.6.4. Metalloproteaz**

Metalloproteazlar, tanımlanmış 30 sınıfıyla katalitik proteazların en çok çeşitlilik gösteren grubudur. +2 değerlikli metal iyonları varlığında aktivite göstermeleriyle karakterize edilirler. Metalloproteazlar EDTA gibi jelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar (Ahmetoğlu 2011). Metalloproteazların bilinen en iyi tipleri serralizin gibi matriks metalloproteazları ve hücre zarının yapısında bulunan yüzey membran proteinleri olan ADAM (A disintegrin And Metalloproteinase) proteinleridir (Edwards *et al.* 2008).

#### **1.7. Soğukta Aktif Proteazlar ve Özellikleri**

Psikrofil ve psikrotolerant mikroorganizmalar ve onların soğuğa dayanıklı protein ve enzimleri biyoteknolojik uygulamalarda kullanılır (Gounot 1991). Bu soğuk-aktif mikroorganizmaların soğuk-aktif enzim ürettiği bilinir (Huston *et al.* 2000). Soğuk-aktif enzimler arasında proteazlar düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik etkilere sahip olan önemli bir gruptur. Proteazlar işlevsel, metabolik ve düzenleyici fonksiyonlarda önemli oldukları için tüm yaşam formlarında bulunan önemli hidrolitik enzim sınıfında yer alır (Rao *et al.* 1998). Soğukta aktif proteazlar; yapısal esneklikleri ve yüksek turnover ( $k_{cat}$ ) sayılarından dolayı düşük sıcaklıklar altında yüksek katalitik etkiye sahiptir (Craik *et al.* 2011; Demirjian *et al.* 2001; Fornbacke and Clarsund 2013; Kuddus and Ramteke 2012).

### 1.8. Soğukta Aktif Proteazların Kullanım Alanları

Proteazların kullanım alanları; kozmetik (yüzdeki çizgilerin giderimi), bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi (biyofilmlerin tahribi), yara yönetimi (nekrotik dokular ve fibrin pıhtılarının kaldırılması için debridement ajan gibi), ağız sağlığı (periyodontal hastalıkların önlenmesi ve plakların kaldırılması) ve viral enfeksiyon (insan rhinovirüs 16 ve herpes simplex virüs durumunda viral enfeksiyonun düşürülmesi)'da kullanılır. Soğuğa adapte olan ya da soğukta aktif proteazlar ise kirli çevrelerin biyoremediasyonu, temizlik ürünleri, ilaç ve tekstil endüstrisini içeren çeşitli uygulamalarda kullanılırlar. Bununla birlikte soğukta aktif proteazlar; mayalama ve şarap endüstrisi, peynir üretimi, hayvansal gıdalar ve meyve suyu endüstrisinde mezofilik enzimlere iyi bir alternatif olabilir. Yüksek aktivite ve stabilitesiyle soğukta aktif proteazlar; farklı uygulamalarla biyoteknolojik ürünlerin farklı bir sınıfı gibi rekombinant üretim tekniklerine dayalı üretimle birleştirilerek kullanılır (Craik *et al.* 2011; Demirjian *et al.* 2001; Fornbacke and Clarsund 2013; Kuddus and Ramteke 2012).

Proteazlar deterjan endüstrisi, deri endüstrisi, ilaç endüstrisi, yiyecek ve süt ürünleri, X ışını veya fotoğrafik filmlerden gümüşün geri kazanımında, atık arıtımı gibi farklı alanlarda uygulamalara sahiptir (Ward 1985).

Alkalın proteazlar; deterjan endüstrisinde kan, süt, insan teri gibi protein lekelerinin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptir. Bu proteazların temizleme kapasitesinden dolayı; çevresel olarak kabul edilen fosfat bulundurmeyen deterjanlarda ek olarak kullanılabilir. Alkalın proteazın bu performansı; suyun pH'sı, sıcaklığı, deterjan bileşimi gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenir. İdeal deterjan enzimi; geniş pH ve sıcaklık skalasında ve aynı zamanda okside edici ajanlara karşı kararlı olmalıdır. Bu arada deterjan solüsyonlarında düşük enzim seviyesinde bile giysi temizlemesinde etkili olmalıdır. Ayrıca geniş substrat spesifitesi olmalıdır (Anwar *et al.* 1998).

### 1.9. *Aeromonas* Cinsinin ve *Aeromonas salmonicida* Türünün Özellikleri

*Aeromonas* cinsi aynı zamanda Aeromonad'lar olarakta bilinir. Bergery's Manual of Systematic Bacteriology en son baskısında resmi olarak açıklanan 14 tür ile oldukça

kompleks bir taksonomiye sahiptir. Ancak güncel çalışmalar; moleküler filogeni ( house keeping genler ve çekirdek genomları), ortalama nükleotidleri (ANI) ve DNA-DNA hibridizasyonuna dayalı olarak *Aeromonas*'ların taksonomik açıdan zengin olduğunu gösterdi. *Aeromonas salmonicida*; mezofilik sıcaklıklarda yaşayabilme/ yaşayamama özelliğine dayalı olarak iki gruba ayrılırlar. Mezofilik alt türleri içeren grubun en iyi bilinen temsilcileri; *A.hydrophila*, *A.caviae*, *A.veronii* ve *A.pectinolytica* insan patojenidir. Psikrofilik alt türleri içeren grubun temsilcileri ise; *A.salmonicida*, *A.smithia*, *A.achromogenes* ve *A.masoucida* olup balık patojenidir. *A.salmonicida* dünyada ekonomik olarak önemli kayıplara sebep olan gram negatif bir balık patojenidir ve tüm alt türlerin genomları, GenBank ya da Sequence Read Archive(SRA) gibi veritabanlarında depolanmıştır. Yeni mezofilik alt türler henüz keşfedilmemiştir. Buda mezofilik yaşam stiline psikrofilik yaşam stiline kaydığının bir göstergesidir (Martin-Carnahan, A., and Joseph, S., 2005., Colston, SM. *et al* 2014., Percival, SL., and Williams, DW., 2014., Pavan, ME., *et al* 2000., Janda, JM., and Abbott, SL., 2010., Dallaire-Dufresne, S., *et al* 2014., Reith, M.E., *et al* 2008.) *A. salmonicida*'nın alt türlerinin sınıflandırılması biyokimyasal karakterizasyon ve 16S rRNA gen dizilimine dayanmaktadır. Genomik bilgiler ışığında maksimum büyüme sıcaklıklarındaki büyük farklılıklar, alt tür seviyesinde ayrışıklarını ve bu süreçte evrimleştiklerini göstermektedir. (Merino *et al* 2015). *A.salmonicida* psikrofilik alt türleri, 25°C sıcaklığın altındaki sıcaklıklarda büyür ve bu değerin üzerine çıktığında ise ölürlar (Katherine, H. T., *et al* 2017). Ancak mezofilik alt türler ise 37°C'de dahi büyüebilirler. Alt türlerin genomları incelendiğinde mezofilik ve psikrofilik alt türler arasında farklı dizilimlerin olduğu görülmekte buda onların durumlarını net bir şekilde açıklamaktadır. Aynı zamanda *A.salmonicida*'nın alt türlerinin ayrımı, dış tabakalarındaki lipopolisakkarit yapısındaki farklılıktan da kaynaklanabilir. *A. salmonicida*, *A. masoucida*, *A. smithia* aynı benzer LPS yapısına, SDS-PAGE ve kimyasal yapı analizi sonucuna sahiptir. *A. achromogenes* suşları ise benzer LPS yapısı gösterirken, en dış kalıntılarında (galaktoz) biri eksiktir. *A. pectinolytica* farklı lipopolisakkarit tabakası sergilerken genomik analizleri çalışılan, *A. hdyrophilia*'da da bu farklı lipopolisakkarit tabakasının bulunduğunu ve bu farklılığın psikrofilik ve mezofilik alt türlerin ayrımında kullanıldığını ortaya koyar (Merino *et al* 2015).

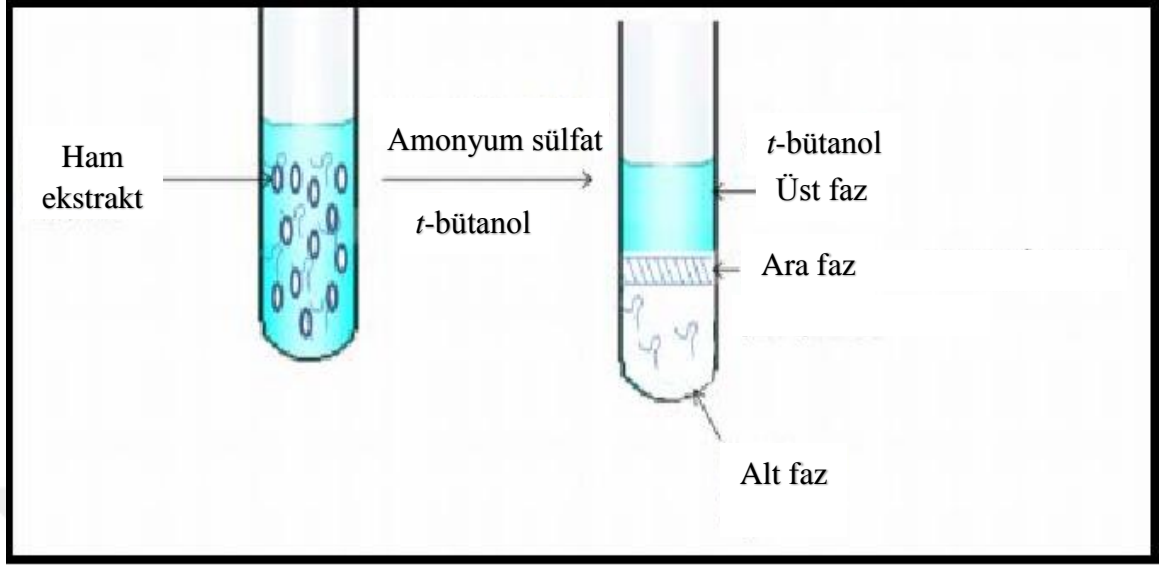
Mezofilik *A. salmonicida*'nın alt türlerinin bazı insan enfeksiyonlarında etkili olduğu görülmüştür. Bu yüzden memelilerin patojenitesini incelemek için fare modellerinde patojenite değerlendirilmesi yapılmış, mezofilik *A. salmonicida* suşlarıyla enfekte olan farelerin akciğerlerinde doku tahribi ve nekrotik fasiit'e neden olduğu gözlemlenmiş ve bu durumun insanlarda da aynı etkiye sebep olabileceği düşünülmüştür (Antony T. V., *et al*,2018). *A. salmonicida* subsp *salmonicida* bakteriyofajlar ya da fajlar gibi virüsler tarafından enfekte edilebileceği ve bununla birlikte genellikle fajların; bakteriyel lizis, konakçı metabolizmasını tekrar programlama ve horizontal gen transferi gibi mikrobiyal genetikte önemli rol üstlenebileceği sonucuna varılmıştır (Popof, M. and Vieu, J.-F., 1970).

### 1.9. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP)

TPP ilk kez Lovrien ve arkadaşları tarafından (1987) açıklanan kısmi saflaştırma tekniğidir ve aynı zamanda enzimin stabilitesini ve katalitik aktivitesini arttıran geniş bir uygulama skalasına sahip yeni bir biyoayırım tekniğidir. Bu teknik yoğun olarak çeşitli hedef makromoleküllerin çöktürülmesinde kullanılmıştır fakat son zamanlarda çok yönlü ve yaygın bir biyoayırım yöntemi olarak kullanılmaktadır (Gagaoua and Hafid 2016).

TPP; hedef proteinleri kompleks karışımlardan ayırma ve saflaştırmada kullanılan; basit, hızlı, etkili ve genellikle tek adımda gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu teknik proteinlerin; salting out, izoionik çöktürme, ko-solvent çöktürme, ozmolitik ve kozmotropik çöktürme gibi ilkelerin bütününe içerir (Kaya 2014).

TPP sistemleri proteinlerin sulu çözeltisine, tuz olarak sülfat tuzları ve genellikle amonyum sülfat  $(NH_4)_2SO_4$  ve bir organik çözügen olarak C4 alkoller ve genellikle *t*-bütanol eklenmesiyle oluşur ve uygun ortam koşulları sağlandıktan yaklaşık bir saat sonra üç faz oluşması şeklinde özetlenebilir. Bunlar; alt faz, ara faz ve üst faz olarak adlandırılır.



Şekil 1.1. Üçlü faz ayırma yöntem (TPP) çalışma prensibinin şematik gösterimi

Üst faz; organik çözücü zengin fazdır ve pigmentler, lipidler ve diğer hidrofobik maddeler gibi polar olmayan bileşikler bu fazda toplanır. Alt faz; tuzca zengin faz olup proteinler, sakkaritler gibi polar bileşikler içerir. Ara faz; ise genellikle su ve organik çözücü ara yüzeyinde oluşan fazdır ve çöken proteinleri içerir (Erol 2018).

### 1.10.1. Üçlü faz ayırma yönteminin avantajları

- TPP; kısa ve basit bir saflaştırma işlemidir.
- Amonyum sülfat ve *t*-bütanol ucuz kimyasallar olduğundan TPP ekonomik bir yöntemdir.
- TPP koşulları ılımlıdır ve proteinleri denatüre etmez.
- Genellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir fakat soğukta aktif olan proteazlar için koşullar optimize edilir.
- Küçük ve büyük hacimlerle de çalışılabilmektedir.
- TPP diğer saflaştırma proseslerinin aksine proteinleri hem saflaştırır hem de konsantre eder.
- TPP'de elde edilen saflaştırma katsayısı diğer tuzla çöktürme (salting out) prosedürlerinden çok daha yüksektir.

- TPP direkt ham ekstrakta uygulanabilir (Alçiçek 2017).

### **1.10.2. Üçlü faz ayırma yönteminin dezavantajları**

Üçlü faz ayırma yönteminin birçok avantajının yanısıra TPP işlemine maruz kalan bazı hassas proteinler *t*-bütanol varlığında denatüre olabilmesi, ham ekstrakta eklenen tuzun enzimin aktivitesini düşürmemesi için diyaliz yoluyla tuzun uzaklaştırılması gerekmesi ve IgG antibodileri veya 5µg dan daha az protein olması durumunda TPP ile saflaştırma uygun olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Alçiçek 2017).



## 2.Kaynak Özetleri

Ping *et al.* 2018; fermente edilmiş soya peynirinden izole edilen *Bacillus* sp. ZJ1502'den alkalın proteazı %40 doygun amonyum sülfat çöktürülmesinden sonra DEAE- Selüloz-52 anyon-değişim kromatografisi tekniğiyle; 18,6 kat saflaştırmışlardır ve spesifik aktiviteyi 30,230 U/mg bularak enzimatik özelliklerini incelemişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile yaklaşık 14 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 10,0, stabil pH'sını 9,0-11,0, optimum sıcaklığını ise 40°C olarak tespit etmişlerdir. Metal iyonları varlığında enzim aktivitesinin  $Mn^{2+}$ 'da %22, yüzey aktif maddeler varlığında ise enzim aktivitesinin Tween80'de %31 oranında artış gösterdiğini, SDS ise %33 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır. Alkalın proteazın EDTA varlığında %22 oranında inhibe olduğunu ve organik çözümlerden n-bütıl alkol ve etanol varlığında ise enzimin kararlılık gösteremediğini fakat okside edici ajan olan 0,5 M'lık  $H_2O_2$  varlığında aktivitesinin %29,8 'inin korunduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin kazein substratı için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 16,7 mg/ml, 14,7  $\mu$ g/min.mL olarak belirlemişlerdir.

Rajagopalan *et al.* 2018; *Wrightia tinctoria* bitkisinden elde edilen proteazlardan süt pıhtılaştırıcı proteazları üç fazlı ayırım (TPP) tekniğiyle ilk kez kısmi olarak saflaştırmışlardır. Tuz ve çözücü konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelerin protezin saflaştırılmasını etkilediğini belirtmişlerdir. Enzimi %60 doygun amonyum sülfat ve 1,0:1,0 (ham enzim ekstraktı: *t*-bütanol) oranıyla 22,6 kat saflaştırarak %89,49 verimle ara faz'da belirlemişlerdir. Aynı zamanda enzimin optimum pH'sını ve sıcaklığını sırasıyla 7,5 ve 50°C bulmuşlardır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda; PMSF ile inhibe olduğundan enzimin bir serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Mageswari *et al.* 2017; soğuk-aktif proteaz enziminin üretimi için taradıkları doğal ve yapay soğuk su ortamlarından 22 adet psikrotolerant bakteri izole etmişlerdir. 6. günde 5°C'de en yüksek proteaz üretimini gösteren (18U/mg) IMDY suşunu seçmişlerdir ve *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup>'ye yakın akraba olan yeni bir bakteri olarak IMDY'yi belirlemişlerdir. Morfolojik olarak oksidaz ve katalaz aktivitesinin yanı sıra doğada sarımsı-turuncu bir renkte, düz, sirküler koloni ve aeorobik olarak gözlemlemişlerdir.



IMDY'nin gram negatif olduğunu ve 0-30°C arasında optimum büyüme sıcaklığını 28°C olarak bulmuşlardır. IMDY suşundan soğuk-aktif proteaz enzimini %40 doymuş amonyum sülfat çöktürmesiyle 9,4 kat saflaştırmışlardır. Klasik optimizasyonla 1. günle 6. gün arasında yaptıkları aktivite tayininde kademeli olarak 18 U/mg 'dan 26 U/mg 'a artış gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu enzimin aynı zamanda 10°C'de en yüksek aktivite de 20°C'de %85 aktivitede olduğu 30°C'de ise %50 aktivitede olduğunu göstermişlerdir. Optimum pH'nın 7,0 ve 8,0 olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin ZnSO<sub>4</sub> ile (26.4 U/mg), CaCl<sub>2</sub> ile (24 U/mg) , 2mM Na<sup>+</sup> iyonu varlığında %55 oranında aktivitesinin arttığını aynı zamanda FeCl<sub>3</sub> ve KCl tuzları varlığında ise enzimin aktivitesinin korunduğunu belirtmişlerdir. Enzimin substratı olarak kazein kullanıldığında en yüksek aktivite ( 25,4 U/mg ) 'nin olduğunu bulmuşlardır. Soğuk aktif enzimin inhibitörler varlığında ise PMSF ile inhibe olduğunu gösterdiler. Organik çözücülerden metanol, hekzan, tolüen varlığında sırasıyla enzimin aktivitesinin %40 ,%80, %60 oranında arttığını, okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında % 2,5,10 konsantrasyonlarında sırasıyla %89, %72, %64 aktivitede olduğunu, yüzey aktif maddelerden 2mM Tween20 varlığında enzimin aktivitesinin %144 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin amonyum sülfat ile 9 kat saflaştırıldığını göstermişlerdir ve SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığını ~27 kDa olarak bulmuşlardır.

Baweja *et al.* 2016; Güney Okyanus su örneklerinden alkalın proteaz üreten 28 tane bakteri izole etmişler ve bunların sadece 1 tanesinin proteaz zonu verdiğini belirlemişlerdir. Bu izolatın 16S rRNA gen sekans analizi sonucu *Bacillus pumilus* KL-052'e %98 oranında benzediğini göstererek yeni proteaz üreten *Bacillus pumilus* MP27 bakterisini keşfetmişlerdir. *B. pumilus* MP27 bakterisinden DEAE-Sephrose ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografi teknikleri kullanılarak proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu proteazın 10-70°C arasında aktif ve optimum aktivitesinin 50°C'de olduğunu belirterek psikrotermotolerant bir bakteri olduğunu aynı zamanda pH 11.0 'de kalan aktivitesinin %70 ve 50°C 'de kalan aktivitesinin %69 olduğunu ve optimum pH'nın ise pH 9,0 olarak belirtmişlerdir. Yüzey aktif maddelerden TritonX-100 varlığında %87,ticari deterjan olan Tide varlığında %100 oranında aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Metal iyonlarından Cu<sup>2+</sup> 'nin enzimi inhibe ettiğini, Ca<sup>2+</sup> 'un ise enzimin aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Yıkama performansı uygulaması için kumaş

parçaları üzerine bulaştırılan kan lekelerini 4-20-50°C’de 15 dakika su+deterjan / su+enzim / su+deterjan+enzim gruplarında enzim oranını (109 U/mg) ekleyerek denemişler ve leke gideriminin; 50°C’de en iyi sonucu verdiğini ve 4°C’de gözlemlenemeyecek kadar az olduğunu belirtmişlerdir.

Gagaoua *et al.* 2016 tarafından yapılan çalışmada; Cucumisin proteazını ilk kez TPP ile *Cucumis melo*’dan saflaştırmışlardır. Optimum saflaştırmanın %60 amonyum sülfat, ham enzim ekstraktı: *t*-bütanol (1,0:1,25) oranıyla pH 8,0 ‘de ve 20°C ‘de %156 verimle 4,61 kat saflaştırıldığını tespit ettiler. Cucumisin’in molekül ağırlığını yaklaşık 68.4 kDa, izoelektrik pH’sını ise 8,7 olarak belirlemişlerdir. Optimum pH’nın 9,0, optimum sıcaklığın ise 60-70°C arasında olduğunu aynı zamanda enzimin 20-70°C ve pH 2,0-12,0 arasında kararlı olduğunu göstermişlerdir.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 2,24±0,22 mg/mL ve 1048±25  $\mu$ M/min belirlemişlerdir. Bu enzimin aktivitesinin metal iyonlarından olan  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  ile arttığını en büyük artışın ise 5 mM  $CaCl_2$  varlığında 2,35 kat olduğunu göstermişlerdir.  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  varlığında aktivitesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. İnhibitörlerden ise serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Cucumisin proteazının 4-25°C ile kıyasla -20°C’de depolandığında daha yüksek aktivite gösterdiğini belirttiler. Bu enzimin peynir yapımında süt pıhtılaştırıcı enzim olarak kullanılabilmesi için TPP’nin enzimin saflaştırılması ve konsantre edilmesinde kullanışlı bir strateji olduğunu sonucuna varmışlardır.

Hao *et al* 2014 tarafından yapılan çalışmada; amonyum sülfat çöktürülmesi, DEAE-Sephorse ve Sephacryl S-200 jel filitasyon kromatografi tekniği kullanılarak %60 verimle 10 kat *Pseudomonas aeruginosa* HY1215’den yeni bir alkalın proteazı saflaştırmışlardır. Bu proteazın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 32,8 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin optimum sıcaklığı ve pH’sı sırasıyla 25°C ve 10,0 olarak belirlenmiştir. pH 7,0 – 10,0 arasında proteazın iyi bir stabiliteye sahip olduğu ve aktivitesinin %80’nini koruduğunu göstermişlerdir. 15-35 °C sıcaklık arasında proteazın kararlı, 20 °C’de maksimum aktivitede ve 25 °C’de ise maksimum aktivitenin %85’ine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çeşitli ticari yüzey aktif maddelerinden olan Tween 40, Tween 80 ve Triton X-100’e karşı iyi bir stabilite değeri gösterdiğini ve okside edici ajan

olan  $H_2O_2$  varlığında %0,4 konsantrasyonunda aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Metal iyonlarından  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  varlığında enzimin aktive olduğunu hatta  $Ca^{2+}$  (1mM) ve  $Zn^{2+}$ 'de (2mM) varlığında sırasıyla %21 ve %15 oranında aktivitesinin arttığını ve  $Ag^+$  (10mM) varlığında ise tamamen inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin aktivitesinin serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile inhibe olduğunu bulmuşlardır.

Yang *et al.* 2014 tarafından yapılan çalışmada; psikrofilik proteaz üreten bir bakteri olan HW08, Doğu Çin'de Sarı Deniz sedimentlerinden elde etmişlerdir. 16S rRNA sekans analizi ve fiziksel özelliklerine göre izolatu *Pseudomonas lundensis* olarak tanımlamışlardır. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığını  $25^{\circ}C$  olduğunu tespit etmişler ve proteazı %40 - %65 arasında doygun amonyum sülfat oranında 1,2 kat %65 verimle, ultrafiltrasyon ile 2,1 kat %60 verimle, jel filtrasyon ile 14 kat %20 verimle saflaştırmışlardır. Proteazın kararlılığının  $0-40^{\circ}C$  arasında olduğunu, enzimin optimum sıcaklığının  $30^{\circ}C$  olduğunu bulmuşlardır. Salgılanan proteazın adının P<sub>5</sub> olduğunu ve SDS-PAGE analizi ile proteazın molekül ağırlığının yaklaşık 46 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin pH 9,6 ve 11,0 arasında aktivitesinin çok fazla olduğu, optimum pH'sının 10,4 olduğu pH 7,0-9,0'da %50 aktiviteye sahip olduğu ve  $Ca^{2+}$  yokluğunda pH 9,0'ın üzerinde aktivitenin hızlıca düştüğünü tespit etmişlerdir. Metal iyonlarından  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  varlığında güçlü inhibe edici etkisini gözlemlemişlerdir.  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  varlığında aktivitenin %14'e düştüğünü;  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  varlığında enzimin aktivitesinin %70'e düştüğünü;  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Li^+$  varlığında aktivitenin korunduğunu aynı zamanda  $Ca^{2+}$ 'nin aktiviteyi biraz düşürmesine rağmen enzimin stabilitesini artırdığını tespit etmişlerdir. 5 mM  $Ca^{2+}$  varlığında  $25-40^{\circ}C$  arasında enzimin stabil olduğunu ancak  $Ca^{2+}$  olmadığında  $20-35^{\circ}C$  arasında enzimin %20 ve  $40^{\circ}C$ 'de ise %50 aktivite kaybına uğradığını tespit etmişlerdir.  $Ca^{2+}$  'un enzimin konformasyonunu stabilize edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Yüzey aktif maddelerinden olan SDS'nin %0,1 oranında kullanıldığında enzimin aktivitesini düşürmediği fakat SDS'nin %1 oranında kullanıldığında ise enzimin inhibe olduğunu ; %5 Tween-20 ve Tween-80 varlığında aktivitenin %50'sinin kaybedildiğini ve %1 TritonX-100 'de ise aktivitenin % 30'a düştüğünü ancak okside edici ajan olan  $H_2O_2$  'in %1 konsantrasyonda kullanıldığında

aktivitenin %124 olduğunu, %10 konsantrasyon oranında ise aktivitenin sadece %73'e düştüğünü tespit etmişlerdir. %10 konsantrasyon üre varlığında enzimin %112 aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. 1 mM EDTA varlığında enzimin aktivitesinin %60 oranında inhibe olduğundan bir metalloproteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin 30°C'de ve pH 10,4'te maksimum aktivite gösterdiğini aynı zamanda 4°C'de 1 saat inkübasyondan ve 4 kere tekrarlanan donma-çözülmeden sonra aktivitenin sırasıyla %90 ve %95 oranında koruduğunu göstermişlerdir.

Yang 2013 tarafından yapılan çalışmada; deniz sedimentleri soğuk- aktif enzim üreten bakteri habitatı olduğunu için proteaz üreten *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşunu Güney Çin denizinin tabakalarından izole etmişlerdir. *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşundan ekstraselüler proteazı amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sephadex iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-75 jel filitasyon teknikleriyle 4°C'de homojen bir şekilde %26 verimle saflaştırarak spesifik aktiviteyi 3077±49 U/mg olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırılan proteazın 30°C'de ve pH 8,0' de maksimum aktivite gösterdiğini (83±12 U/ml) ve 0°C 'de aktivitesinin %20'sini koruduğunu bulmuşlardır. Enzimin aktivasyon enerjisinin 34,4 kJ/mol olduğunu böylece soğuk-aktif proteaz olduğunu belirlemişlerdir. Bu proteazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığını 35 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin EGTA varlığında inhibe olmasına rağmen serin proteaz inhibitörü olan PMSF varlığında inhibe olmadığını göstermişlerdir. Metal iyonlarından olan Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> ile enzimin aktivitesinin arttığını; Cu<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> enzimi inhibe ettiğini, Zn<sup>2+</sup> ise 1 mM konsantrasyonda enzimin aktivitesini hiç etkilemediğini, 5 mM' da ise inhibitör etkisini gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Enzimin üzerine substrat etkisini incelemek amacıyla 50 mM Tris-HCl (pH:8,0) ile hazırladıkları substrat çözeltileriyle enzimi 30°C 'de inkübe etmişler; kazein ve jelatin substratlarında enzimin spesifik aktivitesini sırasıyla 3077 U/mg ve 2899 U/mg bulmuşlardır. Saflaştırılan enzimin N-terminal aminoasit dizilimine dayalı olarak enzimin kodlayan genin tamamını, degenerate primer PCR ve hiTAIL-PCR kombinasyonu ile belirlemişlerdir. Bulunan bu aminoasit diziliminin termo-lizin ailesinden olan mezofilik ve termofilik proteaza sırasıyla %57 ve %52 oranında benzediğini tespit etmişlerdir. Böylece enzimin; endüstriyel uygulama alanında tek termo-lizin benzeri proteaz olduğunu belirtmişlerdir.

*Pseudomonas* sp. türlerinde bulunan proteazlar P<sub>6</sub> olarak, *Bacillus subtilis* bakterisinde bulunan proteazlar ise subtilisin olarak adlandırılırlar. Acevedo *et al.* 2012 tarafından yapılan çalışmada; P<sub>6</sub> ve Carlsberg subtilisin'ni Histidin bağlanma bölgesi içeren afinite kromatografi tekniğiyle saflaştırmışlardır. P<sub>6</sub>'nın optimum pH 'sını 8,0-9,0, optimum sıcaklığının ise 25-35°C arasında olduğunu aynı zamanda 25°C 'nin altında aktivitesinin hızlı bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. P<sub>6</sub> proteazının 1mM PMSF ile %90 oranında inhibe olduğunu ve aynı sonucu mezofilik homoloğu olan Carlsberg subtilisin'de de görmüşlerdir. Bu yüksek PMSF duyarlılığı serin rezidüsü varlığını gösterir ki buda subtilisin benzeri proteinlerin aktif bölgesindeki katalitik aminoasitin varlığını göstermektedir. Yüzey aktif maddelerinden SDS'in %1 konsantrasyonun da P<sub>6</sub>'nın proteolitik aktivitesini % 90; Carlsberg subtilisin'in proteolitik aktivitesini ise %20 oranında inaktive ettiğini bulmuşlardır. %5 β-Merkaptoetanol'ün proteolitik aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediğini ve okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ise P<sub>6</sub> ve Carlsberg subtilisin'nin kalan aktivitelerinin sırasıyla %15 ve %30 olarak bulmuşlardır.

Öztekin 2011; Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin temizlik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırmıştır. Bu amaçla 3 adet (5x5) kumaş parçası üzerine 50 µL kan damlatmış ve kuruması beklemiştir. 100 mL'lik 3 adet beherden 1. behere 1 mL enzim çözeltisi, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6,0) eklemiş ve hacmi saf su kullanılarak 50 mL'ye, 2. behere 1 mL deterjan, 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6,0) eklemiş ve hacmi saf su kullanılarak 50 mL'ye, 3. behere ise 10 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:6,0) eklemiş ve hacmi saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlamıştır. Kurutulan kumaşları hazırlanan 3 beherde 1 gece boyunca bekletmiştir ve leke gideriminin de en iyi sonucu deterjanın verdiğini ve enziminde kontrole göre lekeyi azda olsa giderdiğini çekilen fotoğraflarla göstermişlerdir.

Saba *et al.* 2011 tarafından yapılan çalışmada; psikrotolerant alkalın proteaz üreten *Stenotrophomonas* sp. (III N-STO45) suşu Kaşmir ve Hindistan'dan toplanan toprak numunelerinden biyokimyasal özellikleri ve 16S rRNA gen dizilimine dayalı olarak izole edilmiştir. Bu suşun 4-37 °C arasında iyi bir büyüme gösterdiği gözlemlenmiştir ancak optimum 15 °C'de büyüme gösterdiğini bulmuşlardır. Bu suştan alkalın proteaz enzimini %80 doygun amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE-Sepharose CL-6B kolon

kromatografisi yöntemiyle 18,45 saflaştırarak spesifik aktiviteyi 41.2 U/mg olarak belirlemişlerdir. SDS-PAGE ile molekül ağırlığının ~55 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Bu enzimin pH 6,5-12,0 arasında geniş pH aralığında aktiviteye sahip olan enzimin optimum pH'sının 10,0 olduğunu tespit etmişlerdir. Optimum sıcaklığının 15 °C olduğunu proteolitik aktivitenin 40 °C'de %56 azalış göstererek sıcaklık arttıkça azaldığını tespit etmişlerdir. Metal iyonları olan 5mM Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> varlığında sırasıyla enzim aktivitesini %110, %109, %120 oranlarında bulmuşlardır; bununla birlikte Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> metal iyonlarının enzimi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Maksimum enzim aktivitesi için substrat olarak kazein kullanılarak V<sub>max</sub> (378,0 U/mg) ve K<sub>M</sub> (0,73 mg/mL) değerlerini belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimin 10-60 °C arasında ipek giysiler üzerinde çay lekesi giderimini göstermişlerdir. Farklı ticari deterjanlar için 15°C 'de 3 saat süren denemeler yapmışlardır ve en iyi sonucu Ariel'de görmüşlerdir. Ayrıca deterjanların çoğunda enzim aktivitesinin % 50'den fazla devam ettiğini tespit etmişlerdir. En iyi yıkama etkisinin düşük sıcaklıklarda elde edildiğini ve bununda enzimin yüksek sıcaklıklarda bozulabilen giysiler için düşük sıcaklıklarda yıkanmasında kullanılabilir olduğunu belirlemişlerdir. Bunun için; kontrol olarak su/deterjan deneme olarak enzim+deterjan kullanmışlar ve en iyi sonucu enzim+deterjan'da tespit etmişlerdir.

Zhu *et al.* 2009; *Penicillium chrysogenum* FS010'dan ekstraselüler soğuk-aktif alkalın proteazı amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE – iyon değişim ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle % 9,8 verimle, %103 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığını 41,000±1000 kDa olduğunu görmüşlerdir. Proteazın pH 5,0-10,0 aralığında aktif olduğunu; pH 7,0-9,0 aralığında stabil olduğunu ve enzim maksimum aktivitesinin ise pH 9,0'da 30 dakika inkübasyondan sonra %80 oranında olduğunu gözlemlemişlerdir. 15-35°C arasında yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini, optimum sıcaklığın 35 °C olduğunu, 0 °C'de enzim aktivitesinin %41'ini koruduğunu, 60 °C'de 5 dakika inkübasyon sonunda aktivitenin %90'nını kaybettiğini belirlemişlerdir. pH 8,0-10,0 arasında 35 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin %80'inden fazlasının korunduğunu bulmuşlardır. En iyi k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> oranını belirlemek için 4-15-35 °C'lerde yapılan ölçüm sonucunda en yüksek oranın 35 °C'de olduğunu göstermişlerdir. Doğal substrat olan BSA 2,0 µg/mL kullanıldığında pH 9,0 ve 35 °C'de

en az 90 dakika boyunca proteolitik aktivitenin devam ettiğini ancak bu koşullar olmadığında ise tamamen enzimin inaktif olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer endüstriyel proteazlarla karşılaştırdıklarında düşük sıcaklıkta hidrolitik aktivitelerinin yüksek olduğunu ve 50 °C üzerindeki sıcaklıklara çok duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Enzimin izoelektrik pH'sının yaklaşık 6,0 olduğunu tespit etmişlerdir. Metal iyonlarından olan  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  'nin enzimin aktivitesini arttırdığını  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ise enzimi inhibe ettiğini göstermişlerdir. EDTA inhibitörü varlığında enzimin inhibe olduğunu, sistein inhibitörü olan PCMB,  $\beta$ -merkaptoetanol ve IAA varlığında enzimin inhibe olmadığını ancak serin proteaz inhibitörü olan 3mM PMSF ve DFP'de güçlü bir şekilde inhibe olduğunu bu yüzden bu proteazın bir serin proteaz olduğunu göstermişlerdir.

Kuddus *et al.* 2008 tarafından yapılan çalışmada; 100 adet bakteri izolatının 21 tanesinin 15 °C'de ekstraselüler soğuk-aktif metalloproteaz enzimini salgıladığını göstermişlerdir fakat milk agar besiyerinde en büyük zonu veren tek bir bakteri izolatı bulmuşlardır. Bu izolatın 5-42°C, pH 5,0-12,0 arasında büyüebildiğini ve gram pozitif olduğunu göstermişlerdir. Yeni psikrotolerant bir bakteri olan *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529)'dan salgılanan ekstraselüler proteaz enziminin maksimum aktivitesini 120. saatte skim milk içeren pH'sı 7,0 olan besiyerinde 15°C'de 46,4 U/mg olarak gözlemlenmişlerdir. Soğuk- aktif metalloproteaz enzimini % 60 amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE- selüloz da tek basamaklı iyon değişim kromatografisiyle 34,1 kat saflaştırarak spesifik aktiviteyi 8,090 U/mg olarak tespit etmişlerdir. Enzimin spesifik aktivitesini 8,090 U/mg olarak bulmuşlardır. İnkübasyon sıcaklığını arttırdıkça enzimin aktivitesinde giderek azaldığını ve 45°C'de tamamen inhibe olduğunu bulmuşlardır. Enzimin 4-50°C arasında aktivite gösterdiğini ve optimum aktivitenin 20°C'de olduğunu bulmuşlardır. 4-20°C arasında aktivitenin giderek arttığını, 20°C' den sonra azaldığını 60°C'de tamamen enzimin inaktif olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin pH 5,0 ile 11,0 arasında aktivite gösterdiğini ve optimum pH'nın 7,0'de olduğunu aynı zamanda maksimum aktivitenin yaklaşık % 84'ünün pH: 6,0-8,0 arasında olduğunu göstermişlerdir. Enzimin kazein, BSA, yumurta albümini ve skim milk doğal substratlarına olan ilgisini incelediklerinde en iyi aktiviteyi kazein ve skim milk 'te verdiğini bulmuşlardır.  $Zn^{2+}$  ve  $Cr^{2+}$  gibi metal iyonları varlığında enzim aktivitesinin

sırasıyla %136, %152 oranında arttığını; fakat  $\text{Co}^{2+}$  'de enzimin %13,5 oranında inhibe olduğunu,  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin ise enzimin aktivitesini etkilemediğini belirlemişlerdir. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığının 115 kDa olduğunu; EDTA ve EGTA inhibitörleriyle enzimin inhibe olduğu için bir metalloproteaz olduğunu belirlemişlerdir.

Wang *et al.* 2007; psikrofilik bakteri olan *Colwellia* sp. NJ341' den ekstraselüler soğuk aktif proteaz enzimi üretimi için enzim kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Bu amaçla; doğal substrat olan kazein, sodyum sitrat, sıcaklık ve yüzey aktif maddesi olan Tween-80'i denemişlerdir ve kazein için 5,18 g/L, sodyum sitrat için 3,84 g/L, sıcaklık için 7,96 C ve Tween-80 için 0,23 g/L optimize ettikleri değerler ile maximum proteaz enzim aktivitesini 183,21 U/mL bulmuşlardır.

## 2.1 Tezin Amacı

Canlı yaşamı için son derece önemli olan, proteolizden sorumlu proteazlar, endüstriyel uygulamalarda en önemli enzim gruplarından birini oluşturmaktadır. Günümüzde endüstriyel açıdan önemli birçok kimyasal proses yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiğinden soğukta yaşayan mikroorganizmalardan ekstraselüler olarak elde edilen soğukta aktif olan proteazlar aynı kimyasal prosesi daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirdiğinden endüstriyel açıdan termofilik proteazlara göre oldukça önemli ve kıymetlidir. Soğuk-aktif proteazlar; deterjan endüstrisinde leke çıkarımını daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirebildiğinden enerji tasarrufu sağlanmasında ve giysilerin yüksek sıcaklıklarda bozulmasının önüne geçilmesinde son derece önem kazanır.

Bu tez kapsamının ilk aşamasında; Betbaşı, Geçitler ve Karaçoban gözelerinden alınan soğuk su örneklerinden, psikrofilik - psikrotolerant bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak bakteri suşlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra ikinci aşamasında ise; identifikasyonu yapılan ve en yüksek proteaz enzim aktivitesine sahip olan *Aeromonas salmonicida* EDT1'den proteaz enziminin kromatografik olmayan hızlı, basit, genellikle tek adımda gerçekleştirilen bir yöntem olan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılarak saflaştırılan enzimin biyoteknolojik açıdan uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.



### 3. Materyal ve Yöntem

#### 3.1. Materyal

Tez çalışmasında soğukta aktif alkalın proteaz üretimi için mikrobiyal kaynak olarak kullanılan su örnekleri Erzurum iline bağlı Söğütlü Mahallesi'nden temin edildi (Çizelge 3.1).

#### Çizelge 3.1 Örneklerin alındığı istasyonlar

##### İstasyonlar

Söğütlü Mahallesi Betbaşı Gözesi
Söğütlü Mahallesi Karaçoban Gözesi
Söğütlü Mahallesi Geçitler Gözesi

#### 3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve kitler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

#### Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar, kitler ve şirket adı

Kimyasallar ve Kitler	Şirket
Agaroz	Sigma
Agaroz DNase–RNase-Protease free	Sigma
Amfisilin	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
DTNB	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile Su	Thermo
DNA Marker	Thermo
dNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil Alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetikası (EDTA)	Sigma

**Çizelge 3.2.** (devam)

Gliserol	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma
İzopropil β-D-tiyogalaktozit (IPTG)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum Klorür (MgCl <sub>2</sub> )	İnvitrogen
Malaşit Yeşili	Sigma
N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum hidroksit (KOH)	Sigma
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification System (Plazmit İzolasyon Kiti)	Promega
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Kit (DNA İzolasyon Kiti)	Promega
RNaz A	İnvitrogen
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
TetrameTİL-p-fenilendiamin dihidroklorit (Oksidaz kiti)	Biomerieux
Tris-Asetat EDTA (TAE)	Sigma
t-Bütanol	Ensure
5-Bromo-4-kloro-3-İndoli β-D-Galaktopiranosit (Xgal)	Sigma
6X Yükleme tamponu	Thermo

### 3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları.

<b>Ekipman Adı</b>	<b>Şirket</b>
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Çalkalayıcı inkübatör (10°C)	ZHWY-2102C
Spektrofotometre	Beckman Coulter
Santrifüj	Hettich
Buzdolabı(+4°C, -20°C)	Vestel
Kuru hava stertilizatörü	Telstar Bio -A
Otoklav	HMC Hirayama
Su banyosu	Poly Science
Mikroskop	Leica
Jel görüntüleme cihazı	QuantumViber Courmat
Dijital ısıtıcı	VWR
Etüv	Binder
PCR cihazı	SensoQuest
Manyetik karıştırıcı	Heidolpy
pH metre	Mettler Toledo
Vorteks	Fisons
Mini santrifüj	Hangzhou Allheng
SDS-PAGE elektroforez cihazı	Bio-rad
Agaroz jel elektroforez cihazı	Thermo- EC
Çalkalayıcı inkübatör (37°C)	Edmund Bühler GmbH
Mikrodalga fırın	Beko
Saf su cihazı	MP minipure
Çeker ocak	TÜV-SÜD
Deep freze (- 86°C)	Glacier

### 3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylede Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tez çalışmasında yapılan deneylede kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Tez kapsamında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.

<b>%0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi</b>	9 gr NaCl 1000 mL didistile su içerisinde çözüldü ve otoklavlandı.
<b>EDTA Tamponu (50 mM pH:8,0)</b>	1,46 gr EDTA 90 mL didistile su içerisinde çözüldü, 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH: 8,0'e ayarlandı.
<b>%70'lik EtOH</b>	70 mL EtOH 30 mL didistile su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.
<b>1X TAE Tamponu</b>	10 mL 10X TAE'den alınıp hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.
<b>CaCl<sub>2</sub> Solüsyonu (100mM)</b>	1,11 gr CaCl <sub>2</sub> , didistile su içerisinde çözülüp otoklavlandı.
<b>Amfisilin solüsyonu</b>	20 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
<b>X-Gal Solüsyonu</b>	40 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.
<b>IPTG Solüsyonu</b>	23,8 mg/mL steril didistile su içerisinde hazırlandı ve 0.22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
<b>%3'lük KOH Çözeltisi</b>	6 gr KOH 200 mL steril didistile su içerisinde çözüldü.
<b>%7'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi</b>	7 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin hacmi steril didistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**Çizelge 3.4.** (devam)

<b>Tris – HCl Tamponu (100 mM pH:8,5)</b>	1,21 gr Tris(hydroxymethyl aminomethane) 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 8,5'a ayarlandı. Ardından tamponun hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.
<b>Glisin – NaOH Tamponu (100 mM pH:9,0)</b>	0,75 gr glisin, 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M NaOH ile pH'sı 9,0'a ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.
<b>Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM pH:6,0)</b>	1,15 gr sodyum fosfat 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M NaOH ve HCl ile pH'sı 6,0'a ayarlandı. Sonrasında tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.
<b>%0,65 (w/v)'lik Kazein Çözeltisi</b>	0,65 gr kazein tartılarak, 90 mL pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris – HCl tampon çözeltisinde, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda düşük ısıda (30 °C – 50 °C), pH dengesi korunarak damla damla HCl ve NaOH eklendi. Kazein tam çözüldükten sonra, son pH 8,5 olacak şekilde ve son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.
<b>Triklorikasetik asit (TCA) Çözeltisi (110 mM)</b>	1,79 gr TCA tartılarak 100 mL didistile suda çözüldü.
<b>Sodyum Karbonat Çözeltisi (0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	5,29 gr Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> tartılarak 100 mL didistile su içerisinde çözüldü.
<b>Folin-Ciocalteau (F-C Reaktifi 0,5M)</b>	12,5 mL F-C reaktifi son hacim 50 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

**Çizelge 3.4.** (devam)

<b>Bradford Çözeltisi</b>	0,1 gr Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak balon joje içerisinde 50 mL %95'lik EtOH ile çözüldü. Daha sonra bu çözeltiyi 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi ve çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı. Çözelti karanlık ortamda hazırlandı ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.
<b>Standart serum albümin çözeltisi (1mg/mL)</b>	1 mg standart serum albüminin 1 mL didistile suda çözülmesiyle hazırlandı.
<b>Tris-HCl (1M pH:8,8)</b>	12,1 gr Tris(hydroxymethyl)aminomethane 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.
<b>Tris-HCl (1M pH:6,8)</b>	12,1 gr Tris (hydroxymethyl) aminomethane 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.
<b>Akrilamid – Bisakrilamid Çözeltisi (%30-%0,8)</b>	6 gr akrilamid ve 0,16 gr bisakrilamid tartılarak 13,84 mL didistile su içerisinde çözüldü.
<b>SDS Çözeltisi (%10)</b>	0,5 gr sodyum dodesil sülfat tartılarak, 4,5 mL didistile suda çözüldü.
<b>PER Çözeltisi (%10)</b>	0,5 gr amonyum per sülfat tartılarak 4,5 mL didistile suda çözüldü.
<b>Yürütme Tamponu</b>	3 gr Tris, 14,4 gr glisin tartıldı ve üzerine %10'luk SDS eklenerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

**Çizelge 3.4. (devam)**

<b>Numune Tamponu</b>	650 µL Tris-HCl (1M pH:6,8), 100 µL %10'luk SDS, 1000 µL gliserin ve 1000 µL %1'lik Brom Fenol mavisi 50 mL'lik bir erlen içerisinde pipetlendi ve çözeltinin son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tamponun içerisine 500 µL β-Merkaptoetanol pipetlendi ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
<b>Tespit Çözeltisi</b>	60 mL didistile su, 30 mL %96'lık EtOH ve 10 mL asetik asit 250 mL'lik bir erlen içerisinde karıştırılarak hazırlandı.
<b>Redüksiyon Çözeltisi</b>	80 mL didistile su 45 mL EtOH ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışıma 4,8 gr sodyum asetat eklendi ve asetik asit ile pH'sı 6,0 olacak şekilde ayarlandı. 0,15gr sodyum tiyosülfat ve 4 mL glutaraldehit eklenip çözeltinin son hacmi 150 mL olacak şekilde tamamlandı.
<b>Boyama Çözeltisi</b>	50 mL didistile su 20 µL Formaldehit ve 0,1 gr gümüş nitrat 100 mL'lik bir beher içerisinde karanlık ortamda karıştırılarak hazırlandı.
<b>Yıkama 1 Çözeltisi</b>	3,75 gr sodyum karbonat, 270 mL didistile su ile karıştırıldı ve üzerine 120 µL Formaldehit ilave edilerek hazırlandı.
<b>Yıkama 2 Çözeltisi</b>	1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit karıştırıldı, çözeltinin son hacmi 270 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

#### 3.1.4. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

Tez çalışmasında yapılan deneylerde kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Tez kapsamında kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları.

<b>Tryptone Soy Broth (TSB)</b>	17 gr/L Tripton, 3 gr/L Soya pepton, 5 gr/L sodyum klorit, 2,5 gr/L dipotasyum hidrojen fosfat, 2,5 gr/L dekstroz içerikli hazır besiyerinden (LabM) 30 gr tartılıp 1000 mL didistile suda çözüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı.
<b>Tryptone Soy Agar (TSA)</b>	15 gr/L Tripton, 5 gr/L Soya pepton, 5 gr/L sodyum klorit, 12 gr/L agar içerikli hazır besiyerinden (LabM) 30 gr tartılıp 1000 mL didistile suda çözüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı.
<b>Proteaz Katı Besiyeri</b>	1 gr/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 gr/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 gr/L KCl, 37 gr/L TSA tartılarak 500 mL didistile suda çözüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak 500 mL didistile suda 5 dakika manyetik karıştırıcıda çözdürüldükten sonra 121 °C'de 5 dakika otoklavlandı. Steril SKM kuru hava sterilizatörü içinde steril agar içerisine eklendi ve petrilere döküldü.
<b>Proteaz Sıvı Besiyeri</b>	1 gr/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 gr/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 gr/L KCl, 30 gr/L TSB tartılarak 500 mL didistile suda çözüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak 500 mL didistile suda 5 dakika manyetik karıştırıcıda çözdürüldükten sonra 121 °C'de 5 dakika otoklavlandı. Steril SKM kuru hava sterilizatörü içinde sıvı besiyerine eklendi.



## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Örneklerin Toplanması**

Çalışmada kullanılan örnekler Erzurum ilinde bulunan üç farklı soğuk su gözesinden soğuk ortam muhafaza edilerek alınıp ve laboratuvar ortamına getirildi. Çalışma yapıncaya kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

### **3.2.2. Mikroorganizmaların İzolasyonu**

Psikrofilik bakteri izolasyonu için toplanan soğuk su örneklerinden 100'er mL alınarak erlenlere konuldu. Üzerlerine belli miktarlarda TSB besiyeri ilave edilerek, 4°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde psikrofil mikroorganizmalar büyüme ve gelişim gösterinceye kadar inkübasyona bırakıldı. Büyüyen bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu için, 9 gr NaCl 1000 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve %0,9'luk fizyolojik su kullanılarak, bir seri ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ) dilisyon tüpü hazırlandı. Dilüe edilecek bakteriler katı besi yerine (TSA) yayma ekim yöntemiyle inoküle edildi. İnoküle edilen petrilere 4°C'ye ayarlı etüvde büyüme gösterene kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gelişen tipik görünümlü kolonilerden hücre ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen izolatlar seçildi. Seçilen izolatlar TSA katı besiyerine 4 faz çizgi ekim yöntemi kullanılarak inoküle edildi ve 4°C'de 6 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve bu işleme örnekler petrilere tek koloni düşene kadar devam edildi (Adiguzel et al. 2009).

### **3.2.3. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanılarının Yapılması**

#### **3.2.3.a. Seçilen İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

İzole edilen bakterilerden morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınan izolatlar, 3-4 faz çizgi ekimi ile TSA besiyerine aktarıldı ve 4°C'de büyüme gösterinceye kadar inkübe edildi. Gelişen kolonilerden örnekler alınarak preparatlar hazırlandı. Ardından bu preparatlar özel boyalarla boyanarak immersiyon objektifiyle incelendi. Bu sayede bakterilerin hücre morfolojileri (kokoid, çomak, spiral, pleomorfik vs.) tespit edildi (Şimşek 2003).

### 3.2.3.a.1. Gram Boyama

Bakteriler hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre temelde iki büyük gruba ayrılırlar (Gram pozitif ve Gram negatif). Gram boyama tekniğinde iki farklı yöntem kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerden birincisinde öncelikle; temiz bir lam üzerine, yaklaşık 48 saatlik bakteri kültüründen örnek alınarak smear preparat hazırlandı ve bu preparat kristal violet ile 1 dakika boyandı. Bu sayede boyanın hücreye nüfuz etmesi sağlandı ve böylece hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler mor renge boyandı. Sürenin sonunda fazla boya preparat üzerinden suyla uzaklaştırıldı. Ardından preparatın üzerine sabitleştirici görevi olan lügol eklendi ve 1 dakika bekletildi. Daha sonra bu preparat %96'lık etanol ile dikkatlice yıkanır. Alkol ile yıkanma sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmadığı ve mor renkli kaldığı, Gram (-) bakterilerin ise dış membranlarının bozulduğu ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığından renksizleştiği gözlemlendi. Yıkama işlemi sonrasında, saf sudan geçirilen preparat safranin ile 20 saniye süre ile boyandı. Boyama süresi sonunda hafif bir şekilde suyla yıkanan preparat, kurutularak immersiyon objektifinde inceleme yapıldı. Mikroskop altında mor renkli olarak görülen hücreler Gram (+), pembe kırmızı renkte görülenleri ise Gram (-) olarak değerlendirildi (Johnson and Case 2007; Acar 2009).

### 3.2.3.a.2. Seçilen İzolatların %3'lük KOH Çözeltisi ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların konveksiyonel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Gram özellikleri %3'lük KOH çözeltisiyle belirlendi. Bu amaç doğrultusunda bir öze dolusu bakteri bir damla KOH solüsyonu ile boş bir petride muamele edilerek sakız gibi uzayanlar Gram (-), uzamayanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi (Saygılı *et al.* 2006).

### **3.2.3.a.3. Hareketlilik Testi**

Bu test için deney izolatları TSB +% 0,5 gr'lık agar içeren tüplere, iğne öze ile ekildi. 6 gün inkübasyona bırakıldı. Tüplerde oluşan ekim hattındaki değişime göre gelişimleri gözlemlenerek, hareketlilik durumu incelendi (Arda 2000; Temiz 2000).

### **3.2.3.b. Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.3.b.1. İzolatlarının Gelişme Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklıkların belirlenmesinde TSB besiyeri kullanıldı. Sıcaklık belirlenmesi testinde öncelikle izolatların, hazırlanan TSB besiyerine inokülasyonu gerçekleştirildi. İnokülasyonun ardından izolatlar farklı sıcaklıklarda (4°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C) inkübasyona bırakıldı. 48 saat süreyle inkübasyonu gerçekleştirilen izolatların, inkübasyon sonucunda gelişme gösterdikleri maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi. Bu amaçla spektrofotometrede (OD<sub>600</sub>) ölçüm gerçekleştirildi (Facklam *et al.* 2002).

#### **3.2.3.b.2. İzolatların Gelişebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi**

İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığının belirlenmesinde; öncelikle farklı pH değerlerine (pH:3,0, pH:4,0, pH:5,0, pH:6,0, pH:7,0, pH:8,0, pH:9,0, pH:10,0, pH:11,0) sahip TSB besiyerleri hazırlandı. Ardından test izolatları TSB besiyerlerine inoküle edildi ve 48 saat süreyle 10°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometrede (OD<sub>600</sub>) ölçümleri yapılarak, izolatların büyüebildikleri maksimum. Minimum ve optimum pH aralıkları tespit edildi (Tekinşen *et al.* 2002).

#### **3.2.3.b.3. İzolatların Gelişebildikleri Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

İzolatların gelişme gösterdiği tuz aralıklarının belirlenmesi için farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6) sahip TSB besiyerleri hazırlandı. Daha sonra test izolatları farklı tuz konsantrasyonları içeren besiyerlerine inoküle edildi ve ardından 10°C'de ki çalkalamalı inkübatörde 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda izolatların üreyebildikleri minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri belirlendi.

Bunun için spektrofotometrede ( $OD_{600}$ ) ölçüm gerçekleştirildi (Holzapfel and Schillinger 1992).

### **3.2.3.c. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.3.c.1. Katalaz Testi**

Katalaz enzim varlığının araştırılması amacıyla izole edilen bakteriler TSA besiyerine inoküle edildi. TSA besiyerinde büyütülen bakterilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerine konuldu ve üzerine %5'lik  $H_2O_2$  'den bir damla bırakıldı. Öze yardımıyla dairesel hareketlerle  $H_2O_2$  'nin bakteri içine iyice nüfuz etmesi sağlandı ve kabarcık oluşup oluşmaması durumu gözlemlendi. Kabarcık oluşumuna neden olan bakteriler katalaz pozitif, kabarcık oluşturmayan bakteriler ise katalaz negatif olarak değerlendirildi (Arda 2000;Harley and Prescott 2002;Adıgüzel 2006).

#### **3.2.3.c.2. Oksidaz Testi**

Oksidaz testi için hazır kitler kullanıldı. %1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorit içeren bu kitler, 1 damla saf su ile aktive edildi. Üzerine öze ile inkübasyon sonucunda büyütülen bakteri kültürlerinden bırakıldı. Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluşumu verdi, oksidaz negatiflerde ise renk oluşumu gözlemlenmedi (Acar 2009).

### **3.2.4. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması**

#### **3.2.4.1.Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu için stokta muhafaza edilen bakteri izolatları TSA besiyerine aktarıldı ve  $10^{\circ}C$ 'de 6 gün süreyle inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda büyüyen bakteriler TSB sıvı besiyerine inoküle edildi.  $10^{\circ}C$ ' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde, 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İkinci inkübasyonun ardından, genomik DNA izolasyonuna başlandı. İzolasyon için Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolü uygulandı.

48 saat inkübasyona bırakılan 5 mL TSB besiyerlerinden 2 mL'lik ependorflara aktarıldı ve 16000 rpm'de 2 dakika çöktürüldü. Hücreler çöktürüldükten sonra

- ❖ süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra 50 mM EDTA'dan çökelti üzerine 480 µL eklendi. 10 mg/mL olan 120 µL lizozim ilave edilerek, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Gram (-) bakterilerde hücre duvarı olmadığından lizozim eklenmeden ikinci aşamaya geçildi.
- ❖ İnkübasyon sonrası karışım 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Üzerine 600 µL Nüklei Lizis eklendi ve homojen hale getirmek için hafifçe pipetajlandı.
- ❖ Ependorf 5 dakika boyunca 80°C'lik çoklu blok ısıtıcıda inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakıldı ve daha sonra üzerine 3 µL RNase A eklendi. Elde edilen karışımın tam çözünebilmesi için dikkatli bir şekilde alt üst edildi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- ❖ Oda sıcaklığında soğutulan karışıma Protein Presipitasyon Solüsyonundan 200 µL eklendi ve 20 saniye vortekslendi.
- ❖ Ependorflar buzda 5 dakika bekletildikten sonra, 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µL izopropanol bulunan yeni ependorf içerisine alındı ve pellet oluşumu görünene kadar dikkatlice alt üst edildi.
- ❖ Pellet oluştuktan sonra tüpler tekrar 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdında içindeki sıvı tamamen uzaklaşmaya kadar bekletildi.
- ❖ Üzerine %70'lik etanolden 600 µL eklendi ve 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- ❖ Ependorflara 100'er µL DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65°C'lik çoklu blok ısıtıcı içerisinde 1 saat boyunca inkübe edildi.
- ❖ Hazır olan DNA içerikli ependorflar kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

#### 3.2.4.2. 16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematigi açısından çok önemlidir ve evrimsel açıdan da korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır (Arslan 2017). 16S rRNA dizisini PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için öncelikle kullanılacak primerlerin belirlenmesi gerekmektedir (Marul 2007). Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rRNA

gen bölgesi 27F ve 1492R primerleri kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltıldı (Yanmış ve Adiguzel 2014).

**Çizelge 3.6.** 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar ( $\mu$ L)
PCR Buffer	10X	3
Dntp	25 Mm	0.6
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1.8
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
DMSO	%99	1.2
ddH <sub>2</sub> O	-	12.1
Kalıp DNA	100 ng	3
Taq Polimeraz	5 unit/ $\mu$ L	0,3

16S rRNA PCR hazırlık aşamaları şu şekildedir. İlk olarak steril bir ependorf içerisinde; Çizelge 3.6'da verilen oranlar, örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüj de spinlenerek PCR tüplerine 27'şer  $\mu$ L kondu. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp DNA'dan 3'er  $\mu$ L eklenerek, spinlendi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında çizelge 3.7'de verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve cihaz çalıştırıldı.

**Çizelge 3.7.** PCR programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık ( $^{\circ}$ C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	3:00	1
Denatürasyon	94	1:00	35
Bağlanma	57,5	1:00	35
Uzama	72	1:30	35
Son Uzama	72	5:00	1
Saklama	4	$\infty$	

### 3.2.4.2.1. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

16S rRNA PCR tekniğiyle çoğaltılan genomik DNA agaroz jel elektroforez tekniği ile görüntülendi. Agaroz ile hazırlanan jelin ilk kuyucuğuna 10 kb DNA markırı (Sigma D-7058) konuldu. Diğer PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara belirli bir sırayla yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dakika yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemiyle görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi (Adıgüzel 2006).

### 3.2.4.3. Kompetant Hücre Hazırlanması

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri adı verilir. *Escherichia coli* hücreleri plazmit DNA'sıyla transformasyonu için sıklıkla kullanılan bir kompetant bakteridir. Kompetant hücre hazırlama prosedürü şu şekildedir;

- ❖ Kompetant hücre hazırlamak amaçlı stokta muhafaza edilen *E. coli* JM101 suşu LB katı besiyerine 3-4 faz ekim yapılarak canlandırıldı. 16-24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Daha sonra bu besiyerinde oluşan tek bir koloni öze yardımıyla LB Broth sıvı besiyerine inoküle edildi. Bir gece 37°C'de çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı.
- ❖ 30 mL'lik LB Broth sıvı besiyerine inoküle edilmesi gereken hücre miktarını mL cinsinden hesaplamak amacıyla 300 µL kültür 2700 µL suyla seyreltilip spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme değeri olan 10 ile çarpıldı ve  $3/zX10$  formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 30 mL'lik besiyerine steril pipet yardımıyla inoküle edilip 37°C'de 60-90 dakika 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Yaklaşık 40 dakika sonrasında kültürden örnek 3 kat seyreltilerek 600 nm'de 0,044-0,055 olana kadar belirli zaman aralıklarında ölçüm yapıldı.
- ❖ Uygun değere ulaşan kültürden steril tüpler içerisine 8 mL eklendi ve kültür içerisindeki hücreler 4400 rpm'de 7 dakika çöktürülüp süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- ❖ Çökelti üzerine 10 mL CaCl<sub>2</sub> (100 mM) eklenip +4°C'de bir gece bekletildi.

#### 3.2.4.4. Ligasyon İşlemi

**Çizelge 3.8.** Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar ( $\mu\text{L}$ )
Ligasyon Buffer 2X	5
PCR Ürünü	3
Vektör	1
T <sub>4</sub> DNA Ligaz	1

0,2 mL'lik tüplerde Çizelge 3.8'da verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek PCR cihazında 16 °C'de 13-15 saat bekletildikten sonra, kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

#### 3.2.4.5. Transformasyon İşlemi

Klonlama işleminde vektörün bakterine hücrelerine transformasyonu için yapılan işlemler şöyledir;

- ❖ Önceden hazırlanıp bir gece +4°C'de bekletilen kompetant hücrelerden 200'er  $\mu\text{L}$ , örnek sayısı kadar ependorfların her birine pipetlendi.
- ❖ Her bir ependorf tüplerinin üzerlerine 2,5  $\mu\text{L}$  ligasyon ürünü eklenerek, 30 dakika buzda bekletildi.
- ❖ Karışım ısı şokuna uğratılmak amacıyla buzdan dikkatlice çıkartılıp, 42°C'de sabit bir şekilde 2 dakika tutuldu.
- ❖ Üzerlerine LB Broth sıvı besiyerinden 200  $\mu\text{L}$  konulup, yaklaşık 1 saat 40 dakika süre ile 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.
- ❖ İnkübasyon süresi sırasında önceden otoklavlanmış amfisilinli katı besiyeri oda ısısına geldikten sonra steril kabin içerisinde 40  $\mu\text{L}$  X-Gal ve 40  $\mu\text{L}$  IPTG pipetlenerek, petrilere döküldü.



- ❖ Hazırlanmış petrilere inkübasyon süresi dolan karışımdan 150 µL eklendi ve drigalski özesiyle iyice yayılımı sağlandı.
- ❖ Yayma ekimi yapılan petrilere 37°C’de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

#### 3.2.4.6. Kolonilerin Seçilmesi ve Sıvı Kültürü Alınması

37 °C’ye ayarlanmış inkübasyona bırakılan petrilere 14 saatin sonunda etüvden alınıp, 4 °C’ye bırakıldı ve bir gece de burada bekletildi. Mavi beyaz koloniler oluşumu gözlemlendikten sonra, beyaz koloniler steril bir pipet ucu ile alındı ve içinde 3 mL amfisilinli LB Broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edildikten sonra, 37 °C’lik çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı (Alçiçek 2017).

#### 3.2.4.7. Koloni PCR İçin Örneklerin Hazırlanması ve PCR İşlemi

Amfisilinli LB Broth besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 µL alınıp, içinde 16 µL steril didistile su bulunan tüplere konularak seyreltildi. Seyreltme işleminden sonra ısı şokuna maruz bırakmak amacıyla önce su banyosuna alınarak 10 dakika kaynatıldı ve sonra 2 dakika buzda bekletildi. Elde edilen bu karışım 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra Çizelge 3.9’de verilen reaktifler ve miktarlara göre PCR tüpleri hazırlandı.

**Çizelge 3.9.** Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (µL)
Tampon	3
Dntp	0.6
MgCl <sub>2</sub>	1.8
T <sub>7</sub> Primer	2
Sp <sub>6</sub> Primer	2
DMSO	1.2
ddH <sub>2</sub> O	16.1
Taq Polimeraz	0.3
Supernatant	3

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilip Çizelge 3.10’de verilen program değerleri girilerek, koloni PCR programı olarak kaydedildi ve çalıştırıldı.

**Çizelge 3.10.** Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	50	30 sn	35
Uzama	72	2 dk	35
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklanma	4	∞	

PCR işlemi sonunda ürünlerin elektroforezi için daha önce belirtilen konsantrasyonlarda agaroz jel hazırlandı. Etidyum bromür ilaveli %1’lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif) – içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller örnekler ile birlikte yüklenerek, 90 voltta bir saat süreyle yürütüldü. Jel görüntüsüne bakılarak istenilen aralıkta bant veren koloniler seçildi ve plazmit izolasyonu için amfisilinli LB Broth’a inoküle edildi (Baltacı 2016).

#### 3.2.4.8. Plazmit İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için Promega (A1330) plazmid izolasyon kitine ait protokol uygulandı. Buna göre;

- ❖ LB Broth besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 mL alınarak, 11000 rpm’de çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- ❖ Çöken pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonu eklendi ve pipetajlanarak, homojen hale getirildi. Homojen hale getirildikten sonra karışım üzerine 250 µL Cell Lysis Solüsyonundan eklendi ve alt üst edilerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- ❖ Süre sonunda üzerine Alkaline Protease Solüsyonundan 10 µL eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı.
- ❖ Daha sonra üzerine 350 µL Nötralizasyon çözeltisinden eklenip 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

- ❖ Süpernatantdan yaklaşık 650-750 µL alındı ve içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı. Ardından 13000 rpm’de bir dakika süreyle santrifüjlendi.
- ❖ Santrifüj sonunda kolonun üstte kalan kısmına 750 µL Wash Solution eklendi ve tekrar 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Ardından kolonun üzerine 250 µL Wash Solution eklendi ve 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı uzaklaştırılıp 1 dakika 13000 rpm’de tekrar santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine Nuclease-Free Water Solüsyonundan 100 µL eklendikten sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Son olarak kolon çıkarılıp uzaklaştırıldı ve tüpler ölçüm yapılincaya kadar -20’de muhafaza edildi.

#### **3.2.4.8.1. Plazmit Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

- ❖ 2 µL plazmit 998 µL didistile su ile karıştırılarak, spektrofotometrede OD<sub>260</sub> nm dalga boyunda konsantrasyonu tespit edildi.
- ❖  $A_{260} \times 50$  (sabit katsayı)  $\times 500$  (dilüsyon oranı) denklemine göre hesaplama yapılarak plazmit konsantrasyonunu 100-200 ng olması sağlandı.
- ❖ Uygun konsantrasyona sahip örneklerden 30-50 µL alınarak, sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

#### **3.2.5. Proteaz Enziminin Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları**

##### **3.2.5.1. Alkalın Proteaz Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının Skim Milk Agar Besiyerinde Belirlenmesi**

Stokta (-86°C) muhafaza edilen bakteri izolatları (ED1, ED2, ED3, ED4, ED6, ED7, ED12, ED14, ED18, ED19) stoktan çıkartılarak önceden hazırlanıp petrilere dökülen TSA besiyerlerine steril öze yardımıyla 3-4 faz - ekim yöntemiyle inoküle edilip canlandırıldı. 10°C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Büyüyen bakteriler Skim Milk Agar besiyerlerine well difüzyon yöntemi kullanılarak inoküle edilip 10°C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi boyunca 24. saat ve 48. saat sonunda zon veren petrilere görüntüleri kaydedildi.

### 3.2.5.2. Alkalın Proteaz Üretimi

Alkalın proteaz üreten bakteri izolatlarından Skim Milk Agar besiyerinde en iyi zon veren bakteri *A. salmonicida* EDT1 suşu seçilerek bundan sonraki işlemlerde bu bakteri izolatu kullanıldı. *A. salmonicida* EDT1 suşu TSA katı besiyerine inoküle edilip 10°C'de 48 saat süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu suş sıvı besiyerine alınıp 10°C'lik çalkalamalı inkübatörde 48 saat üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerinde büyüyen bakterilen hücre miktarını mL cinsinden hesaplamak amacıyla 300 µL kültür 2700 µL su ile seyreltilip spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı ve  $3/z \times 10$  formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 100 mL proteaz sıvı besiyerine inoküle edildi.

### 3.2.5.3. Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Alkalın proteaz aktivitesi Takami *et al.* (1989), tarafından kazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntemin kısmen modifiye edilmesiyle belirlendi. Bu yöntemin uygulama aşamaları şu şekildedir;

- ❖ 0,5 ml enzim çözeltisi üzerine 100 mM pH'sı 8,5 olan Tris-HCl tampon çözeltisinde hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinden 2,5 mL eklenerek reaksiyon çözeltisi 10°C'de ve 10 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Kör olarak enzim çözeltisi yerine Tris-HCl tampon (100 mM pH 8,5) çözeltisi ilave edilen reaksiyon çözeltisi kullanıldı.
- ❖ İnkübasyon sonunda reaksiyonun sonlanması amacıyla reaksiyon karışımlarına 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 2,5 mL ilave edildi. Bu karışım, 10°C'de ve 30 dakika boyunca su banyosunda bekledikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Süpernatantdan 1 mL alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 2,5 ml ve 0,5 M Folin-Ciocalteu reaktifinden 0,5 ml eklenerek, karışım 10°C'de 30 dakika bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans köre karşı ölçüldü.

Kazeinin hidrolizi sonucu dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı bir ünite alkalın proteaz aktivitesi (U/mL) olarak belirlendi. Bu hesaplama

önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı (Yıldırım 2014). Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı bölüm 3.1.2.4'te gösterilmiştir. (Takami, Akiba, and Horikoshi 1989).

$$\text{Proteaz Aktivitesi (EU/mL)} = \frac{(\text{A660/Eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

#### 3.2.5.4. Protein Tayini

Protein tayini, Bradford yöntemiyle (Bradford 1976) gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazik aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Protein miktarını belirlemek amacıyla Alçiçek 2017 tarafından hazırlanan protein standart grafiği kullanıldı.

- ❖ Protein tayini yapılan numuneler için aynı şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklendi ve 10 dakika sonra 595 nm'de absorpsiyon değeri okundu. Elde edilen absorpsiyon değeri ve standart grafiğinin eğimi kullanılarak protein miktarı hesaplandı. Proteaz enziminin üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırma basamaklarında gerekli protein tayinleri bu yöntemde yapılmıştır.

#### 3.2.5.5. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi İle Saflaştırılması

Proteaz enziminin kısmi saflaştırılması amacıyla ilk olarak 4°C'de 6000 rpm'de 25 dakika santrifüjleme işlemi yapıldı. Elde edilen bu homojenat üçlü faz saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Yeni gelişen bir biyoayırım tekniği olan üçlü faz ayırma sistemi; proteinlerin salting out, izoionik presipitasyon, kosolvent presipitasyonu, ozmolitik ve kozmotropik presipitasyonu gibi birçok farklı tekniğin prensiplerini kolektif bir şekilde içermektedir (Kadıoğlu 2016). TPP işlemi; homojenata önce tuz ve ardından organik çözügen eklenerek uygun ortam koşulları sağlandıktan sonra yaklaşık 1 saat sonra üç faz oluşması esasına dayanır.

TPP sistemiyle alkalın proteaz enzimin saflaştırılmasında kullanılan organik çözügen olarak *t*-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

### 3.2.5.5.a. Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması İçin Sıcaklık Optimizasyonu

TPP yönteminde 2 mL homojenat içerisine uygun tuz miktarı, çözügen miktarı eklenip pH ayarlandıktan sonra sıcakta aktif olan enzimler için uygun olan protokolün 37° C'de 1 saat inkübasyon sıcaklığının optimizasyonu yapıldı. Bunun için Çizelge 3.11'da belirtilen şekilde tüpler hazırlanarak belirtilen sıcaklıklarda inkübe edildi ve her bir sıcaklık için bölüm 3.2.5.3' te belirtilen şekilde soğukta aktif proteaz enziminin aktivitesi belirlendi. Optimum aktiviteyi veren sıcaklıkta tüm çalışma yürütüldü.

**Çizelge 3.11.** Alkalın proteaz enziminin saflaştırılması için sıcaklık optimizasyonu

37°C'de 1 saatlik inkübasyon aşaması	
5°C (kör)	5°C
5°C (kör)	5°C
10°C (kör)	10°C
10°C (kör)	10°C
15°C (kör)	15°C
15°C (kör)	15°C

**Çizelge 3.11. (devam)**

20°C (kör)
20°C
20°C (kör)
20°C
25°C (kör)
25°C
25°C (kör)
25°C
30°C (kör)
30°C
30°C (kör)
30°C
37°C (kör)
37°C

**3.2.5.5.b.TPP işlemi için uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen oranının belirlenmesi**

Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Yapılacak amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır. TPP işlemiyle saflaştırmada en iyi verimi elde edebilmek için en uygun amonyum sülfat yüzdesi ve en uygun *t*-bütanol oranı optimize edilmelidir. Bunun için aşağıdaki formüle göre %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere 7 farklı tuz oranı; ham enzim ekstraktı: *t*-bütanol; (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) olmak üzere, 4 farklı alkol oranı ile denendi. Her bir denemede alt ve ara faz dikkatlice ayrılıp bölüm 3.2.3.4'te anlatıldığı gibi aktivite tayini ve Bradford yöntemiyle protein miktarı hesaplandı. Elde edilen verilen kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı yüzde geri kazanım grafikleri oluşturuldu. Çıkarılan grafikler incelenerek en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen miktarı belirlendi.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

$S_1$ : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

$S_2$ : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

### **3.2.5.5.c.TPP işlemi için pH optimizasyonu**

TPP işleminde en uygun tuz yüzdesi ve organik çözen oranı belirlendikten sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Bunun için 2 mL homojenat içine %80 oranında tuz eklendikten sonra karışımın pH değeri 9 farklı değerde ayarlandı ( pH:4,0-12,0). pH değerleri, farklı her bir tüpün üzerine belirlenen oranda (1,0:1,5) *t*-bütanol eklenerek 30 saniye vortekslenip 10°C'de 1 saat beklemeye bırakıldı. Süre sonunda fazlar ayrıştırılarak aktivite ve protein tayini yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı yüzde geri kazanım grafikleri oluşturuldu ve çıkarılan grafikler incelenerek TPP işlemi için pH belirlendi.

### **3.2.5.5.d.Alkalin soğuk- aktif proteazın TPP işlemiyle saflaştırılması**

Optimize edilen koşullarda proteaz enzimi saflaştırıldı. Bu işleme göre ilk olarak 2 mL homojenat 1 tüpe alındı. Üzerine % 80 oranında amonyum sülfat (1,033 gr) eklendi ve yavaşça vortekslendi. Karışımın pH'sı 7,0'ye ayarlandıktan sonra üzerine 1 mL *t*-bütanol eklendi ve 30 saniye yavaşça vortekslendi. Daha sonra karışım, 10°C'de 1 saat süreyle beklemeye bırakıldı. Süre sonunda üst organik faz pastör pipetiyle ayrıştırıldı. Alkalin soğuk-aktif proteazın saflaştırıldığı alt faz ayrıştırılarak karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, +4°C'de muhafaza edildi (Alçiçek 2017).

### **3.2.5.6. Alkalin Proteaz Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.2.5.6.a. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü ve Enzimin Molekül Ağırlığının Tayini**

TPP işleminde saflaştırılan alt ve ara faz örnekleri enzimin saflığını kontrol etmek ve yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı (Laemmli 1970). Yürütme jeli için %10'luk, yığma jeli için %4'lük akrilamid jel hazırlandı. Protein bantlarının gözlenmesi için gümüş boyama metodu uygulandı.



Elektroforez plakaları önce su ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka arada jel aralığı olacak şekilde kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içindeki jeli dışarıya sızdırmayacak şekilde jel hazırlama kabinine koyuldu. Çizelge 3.9'da verilen kimyasallar sırasıyla cam bir beherde hazırlandı. Jel bileşenlerinden amonyum persülfat son aşamada eklendi. Hızlıca pipetaj yapılarak toplam hacim 4,5 mL olan ayırma jeli polimerleşme başlamadan önce hızlıca hazırlanan plakalar arasına döküldü. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirilerek 20-30 dakika jelin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki alkol uzaklaştırıldı ve bir kurutma kağıdı yardımıyla jelden tamamen ayrılması sağlandı. Bu işlemden sonra yığılma jeli yine amonyum persülfat en son eklenmek üzere hazırlanıp ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra numune kuyucuklarının oluşması için tarak hızlı ve dikkatlice yerleştirildi ve 20 dakika süreyle yükleme jeli polimerleşmeye bırakıldı.

Örneklerin hazırlanması için elektroforeze yüklenecek örneklerden (Homojenat, alt faz, ara faz) 20'şer  $\mu\text{L}$  ve hazırlanan numune çözeltisinden (1M Tris-HCl pH 6.8 650  $\mu\text{L}$ , %10'luk SDS 1000  $\mu\text{L}$ , Gliserin 1000  $\mu\text{L}$ , %1'lik Bromfenolmavisi 1000  $\mu\text{L}$  +  $\beta$ -Merkaptoetanol 500  $\mu\text{L}$  olacak şekilde hacim 10 mL'ye tamamlanır.) 20  $\mu\text{L}$  alınarak bir ependorfda karıştırıldı. Hazırlanan örnekler kaynayan suda 5 dakika bekletilerek denatüre edildi.

Polimerleşen jel önce saf su daha sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına, içine dökülen yürütme tamponunu dışarıya sızdırmayacak şekilde yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu (1,5 gr Tris, 7,2 gr Glisin, 5 mL %10'luk SDS olacak şekilde hacim 500 mL'ye tamamlanır ve tekrar tekrar kullanılabilir.) dolduruldu. Yukarıda anlatıldığı gibi enzim örneklerinden 18  $\mu\text{L}$  kuyucuklara eklendi. İlk kuyucuğa markırdan 1  $\mu\text{L}$  olacak şekilde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafı (+) anota, üst tarafı ise (-) katota yerleştirildi ve 60 voltta 30 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve gümüş boyama yöntemiyle boyanarak en uygun görüntüsü kaydedildi.

**Çizelge 3.12.** Yürütme jeli bileşenleri

Kimyasallar	Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)	Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)
ddH <sub>2</sub> O	2,35	1,84
%30	3,3	0,325
<b>Akrilamid/bisakrilamid</b>		
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,31
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75	-
%1,5 PER	0,2	0,05
%5 TEMED	0,1	0,025
%10 SDS	0,15	0,025

### 3.2.5.6.b. Örneklerin Gümüş Boyama Yöntemiyle Boyanması

Yürütme işleminden sonra plakalar yürütme kabından çıkarıldı. Kaset açıldıktan sonra jel cam bloklardan dikkatlice ayrılıp zemini düz bir kap içerisine bırakıldı. Jel gümüş boyama kabında hazırlanan tespit çözeltisi ile (30 mL saf su, 15 mL etanol, 5 mL asetik asit) 30 dakika boyunca karanlık ortamda çalkalandı. Sürenin sonunda tespit çözeltisi dökülüp jel ddH<sub>2</sub>O ile 5 dakika yıkandı. Yıkama işleminden hemen sonra redüksiyon çözeltisi (40 mL saf su, 22,5 mL etanol, 2,4 gr Na-Asetat trihidrat karışımı asetik asitle pH 6,0'ya ayarlandı. Üzerine 75 mg Na-Tiyosülfat, 2 mL Glutaraldehit eklenip hacmi 75 mL'ye tamamlandı.) kaba eklenerek yine 30 dakika boyunca karanlık ortamda çalkalandı. Daha sonra redüksiyon çözeltisi kaptan uzaklaştırılarak yıkama işlemine geçildi. Bu işlem ddH<sub>2</sub>O ile 5'er dakika olmak üzere üç kez tekrarlandı. Bu süre zarfında hazırlanan boyama çözeltisi (50 mL saf su, 10 µL formaldehit, 0,05 gr AgNO<sub>3</sub>) yıkama işlemleri bittikten sonra kaba eklenerek 20 dakika çalkalamaya bırakıldı. Gümüş boyama çözeltisiyle muamele edilen jel bantlar belirginleşinceye kadar yıkama-1 çözeltisiyle (1,875 gr Na-Karbonat, 135 mL saf su, 60 µL formaldehit) hafifçe çalkalandı. Jel bantların görünmeye başladığı andan itibaren en iyi görüntü kaydedildi ve jel yıkama-2 çözeltisine (500 µL gliserin, 6,25 mL asetik asit olacak şekilde hacmi 125 mL'ye tamamlanır) aktararak boyama işlemi sonlandırıldı. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek  $R_f$  değerleri hesaplandı. Log MK- $R_f$  değerleriyle çizilen grafiğe göre alkalın proteaz enziminin molekül kütlesi hesaplandı.

### 3.2.5.6.c. Alkalın Proteaz Enziminin Zimogram Analizi

*A. salmonicida* EDT1 suşundan üretilen alkalın proteaz enziminin zimogramı için SDS-PAGE jel elektroforezi kullanıldı. Yığma ve ayırma jeli hazırlanarak elektroforez tankına döküldü. Zimogram analizinde SDS-PAGE işleminden farklı olarak numune çözeltisi  $\beta$ -merkaptotanol eklenmeden hazırlandı. Örnekler hazırlanırken ependorf tüplerine, numune çözeltisinden 20  $\mu$ L %0,65'lik kazein çözeltisinden ve örneklerden 20  $\mu$ L eklenerek kaynatma işlemi olmadan direkt kuyucuklara 18  $\mu$ L yüklendi. Elektroforez sisteminde önce 60 voltta 30 dakika ardından 120 voltta 60 dakika süreyle numunelerin jelin alt kısmına kadar yürütülmesi sağlandı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jelden SDS'in uzaklaştırılması için jel düz zeminli bir kapta %2'lik Triton X-100 çözeltisinde 37 °C'de 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi. Ardından jel Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponunda 37 °C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 20 dakika bekletildi. Daha sonra jel %0,65'lik kazein çözeltisinde 10 °C'de 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi ve süre bitiminde gümüş boyama yapılarak jelin fotoğrafı çekildi (Kazan *et al.* 2005).

### 3.2.5.6.d. Alkalın Proteaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH'nın Belirlenmesi

Proteaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,5 mL enzim çözeltisiyle 0,1 M farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH: 6,0-7,0), Tris-HCl (pH: 7,5-8,5) ve Glisin-NaOH (pH: 9,0-11,0) tampon çözeltilerinde hazırlanan 2,5 mL %0,65'lik kazein çözeltisiyle karıştırıldı ve aktivite tayini yapıldı. Enzimin pH profilinin grafik çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden kıyaslandı (Yıldırım 2014). Enzimin stabil pH'sını belirlemek için farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH: 6,0-7,0), Tris-HCl (pH: 7,5-8,5) ve Glisin-NaOH (pH: 9,0-11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki 2mL tampon çözeltisine 2 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 10°C'de 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında aktivite tayini yapıldı. Her bir deneme üç kez tekrarlandı. Enzimin stabil pH grafiğinin çiziminde, farklı değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek,

inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Rahman *et al.* 2006; Venugapol and Samarra 2007).

#### **3.2.5.6.e. Alkalın Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklık ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesi**

Proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0,5 mL enzim çözeltisiyle Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinin 2,5 mL'si karıştırıldı ve 5 °C'den 40 °C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında 10 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir sıcaklık değeri için aktivite tayini yapıldı (Yıldırım 2014). Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için; 1,5 mL enzim çözeltisi 5 °C'den 40 °C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında her bir sıcaklık için 30, 60 ve 90 dakika'lık inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafiğin çiziminde farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

#### **3.2.5.6.f. Bazı Metal İyonlarının Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi**

Bölüm 3.1.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^{+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  gibi 2+ değerlikli metal iyonlarının ve  $K^{+}$  gibi +1 değerlikli metal iyonunun alkalın proteaz enzimin aktivitesine etkisi incelendi. Hazırlanmış olan 10 mM'lık stok metal iyonu çözeltileri Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponuyla seyreltilerek 1,5 ve 10 mM'lık metal iyonu çözeltilerinden 450 µL üzerine 50 µL enzim çözeltisi eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerinden alınarak %0,65'lik kazeinin 2,5 mL'si karıştırılıp aktivite tayini yapıldı. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı.

### **3.2.5.6.g. Bazı Organik Çözücülerin Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

Saflaştırılan alkalın proteaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitedeki değişimini incelemek amacıyla; metanol, etanol, izopropanol, *t*-bütanol, aseton, DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonları kullanıldı. Her bir organik çözücü Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponu içinde hazırlandı. 50 µL enzim çözeltisi üzerine, 450 µL organik çözücülerden oluşan tampon çözeltisi eklendi. 1 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Kör olarak tampon çözeltisi yerine, her bir organik çözücülerin hazırlanmış farklı yüzde konsantrasyonlarından 50 µL eklenerek, tayin işlemi kullanıldı. Kontrol içinde 50 µL enzim çözeltisi üzerine 450 µL Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponu kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Organik çözücü içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Yıldırım 2014).

### **3.2.5.6.h. Bazı İnhibitörlerin Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

Alkalın proteaz enziminin aktif bölgesinde hangi grubun yer aldığını belirlemek amacıyla ile inhibitörlerden; serin proteaz inhibitörü PMSF (2 mM ve 5 mM), metalloproteaz inhibitörü EDTA (2 mM ve 5 mM), β-merkaptotanol (%1 ve %5), sistein proteaz inhibitörü DTNB (2 mM ve 5 mM) ve IAA (2 mM ve 5 mM) kullanıldı. EDTA, β-merkaptotanol, DTNB, IAA; Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponunda hazırlanırken PMSF %96 etanol çözeltisinde hazırlandı. 50 µL enzim çözeltisi üzerine hazırlanan çözeltilerden 450 µL eklenip 180 rpm'de 30 dakika 10°C'lik çalkalayıcıda bekletildikten sonra aktivite ölçümü yapıldı. 50 µL enzim çözeltisine 450 µL Glisin-NaOH (100 mM pH 9,0) tamponu eklenerek aynı koşullarda inhibe edilen, inhibitör içermeyen çözeltinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.* 1996).

### **3.2.5.6.i. Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanın Etkisinin Belirlenmesi**

Yüzey aktif maddelerinden SDS (%1 ve %5), Triton X-100 (%1 ve %5), Tween-20 (%1 ve %5), Tween-80 (%1 ve %5) ve okside edici ajan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin (%1 ve %5) alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. 50 µl enzim çözeltisi belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin 450 µl'si ile karıştırılarak 10°C'de, 30 dakika 180 rpm hızındaki çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini yapıldı ve 50 µl enzim çöztisine 450 µl pH'sı 9,0 olan 100 mM Glisin- NaOH tamponu eklenerek aynı koşullarda inkübe edilen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi. İnkübasyon sonrası aktiviteler kalan aktivite olarak değerlendirildi (Johnvesly and Naik 2001; Kazan *et al.* 2005; Shah *et al.* 2010).

### **3.2.5.6.j. Alkalın Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğünün Belirlenmesi**

Soğuk-aktif proteaz enziminin doğal substratlardaki olan spesifikliğin belirlenmesi için kazein, azokazein, hemoglobin, sığır serum albumini (BSA) ve jelatin kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Substratların %0,65'lik kazein çözeltileri 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tamponda hazırlandı. 500 µL enzim çözeltisi üzerine 2500 µL substrat çözeltisi karıştırıldı ve aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gösteren substratın aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğerleride ona göre hesaplandı (Johnvesly and Naik 2001).

### **3.2.5.6.k. Alkalın Proteaz Enzimi İçin K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> Parametrelerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar**

Saflaştırılan proteaz enziminin K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerini belirlemek amacıyla farklı kazein substratı konsantrasyonlarında (%0,02-0,6) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri hesaplandı (Laemmli 1970; Rao 2008).

### **3.2.5.6.l. Ticari Olarak Satılan Bazı Katı ve Sıvı Deterjanların Proteaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi**

Soğuk-aktif alkalın proteaz enziminin Ariel, ,Alo,OMO, Bingo, Peros gibi katı endüstriyel ticari deterjanlar varlığında ve Ariel (sıvı), Perwol ve Peros (sıvı) gibi sıvı endüstriyel deterjanlar varlığında aktivitesindeki değişim araştırıldı. Bu deterjanlardan %1 (w/v) konsantrasyonlarında ki çözeltileri çeşme suyuyla hazırlandı ve deterjanların içerisinde bulunan enzimleri inhibe etmek amacıyla bu çözeltiler kaynatıldı. 50 µL enzim çözeltisine 450 µL kaynatılan deterjan çözeltileri eklenerek 10 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İçerisinde kaynatılmış deterjan çözeltisi olmayan örnek kontrol olarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra aktivite tayini yapıldı. Kontrolün aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre hesaplandı (Yıldırım 2014).

### **3.2.5.6.m. Kan ve Çimen Lekesi Gibi Protein Lekelerinin Gideriminde Soğukta Aktif Proteaz Enziminin Etkisi**

*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğukta aktif proteaz enziminin Kan ve çimen lekelerinin giderilmesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla 6 adet (4:4)'lük olarak hazırlanan kumaş parçaları üzerine 50 µL kan damlatıldı. Kan damlatılan 3 adet kumaş parçası kurutuldu; diğerleri ise kurutulmadan işlemler uygulandı. 100 mL'lik 3 adet beher alındı ve 1. behere 1 mL enzim çözeltisi, 10 mL 0,1 M Glisin-NaOH (pH 9,0 ) tamponu eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. 2. behere 1 mL deterjan, 10 mL 0,1 M Glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. 3. behere ise 10 mL 0,1 M Glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu eklendi ve hacim saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. Kurutulan ve kurutulmamış ıslak kan örneklerinin bulunduğu kumaşlar hazırlanan 3 beherde 1 saat boyunca bekletildi. Aynı şekilde 3 adet (4:4)'lük olarak hazırlanan kumaş parçaları üzerine bir miktar çimenle lekeliendirme işlemi yapıldı ve aynı işlemler çimen lekeli bu kumaş parçaları içinde tekrarlandı (Öztekin 2011).



Şekil 3.1.Kan ve çimen lekelerinin hazırlanması

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekrar yapıldıktan sonra elde edilen 6 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 13.0 paket programı kullanılarak Student's two-tailed t-test ile yapıldı.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında Erzurum iline bağlı Söğütlü mahallesindeki Betbaşı, Karaçoban ve Geçitler gözelerinden temin edilen soğuk su örneklerinden toplam 10 adet psikrofilik bakteri izole edildi (Çizelge 4.1). İzolatlara EDT kodlu numaralar verilerek tümü gliserinli LB-Broth ihtiva eden stok tüplerine alındı ve -86 °C’de muhafaza edildi. Örneklerin saf kültürlerini gösteren petri görüntüleri Şekil 4.1’de verildi.

**Çizelge 4.1.** Psikrofilik bakteri suşları ve izole edildikleri istasyonlar

İSTASTON	İZOLAT KODU
Betbaşı Gözesi	EDT1, EDT2, EDT3, EDT4, EDT6, EDT7
Karaçoban Gözesi	EDT12, EDT14
Geçitler Gözesi	EDT18, EDT19

**Şekil 4.1.** EDT19, EDT7 ve EDT1 suşlarına ait petri görüntüleri



İzole edilen bakterilerin öncelikle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Ardından bu izolatların moleküler karakterizasyonu (16S rRNA gen analizi) gerçekleştirildi. Daha sonra SKM agar besiyeri kullanılarak yapılan petri denemeleri sonucunda en yüksek aktiviteyi veren EDT1 kodlu izolat ile enzim çalışmasına devam edildi.

## 4.2. Konveksiyonel Test Sonuçları

Bakterilerin izolasyonu sonucunda elde edilen izolatların çözeltisiyle belirlendi.

### 4.2.1. Morfolojik Özelliklerinin Test Sonuçları

Bakterilerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla basit boyama yapıldı ve immersiyon objektifinde incelendi. Sonuçta tüm izolatların hücre morfolojilerinin kok olduğu belirlendi (Çizelge 4.2).

#### 4.2.1.a. KOH ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi

Petride ekili halde bulunan bir öze dolusu bakterinin 1 damla KOH ile muamelesi sonucu sakız gibi uzayanlar Gram (-) uzamayanlar ise (+) olarak belirlendi. Yapılan analizler sonucunda 5-6 tanesinin Gram (+) diğerlerinin Gram (-) olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.2).

#### 4.2.1.b. Gram Boyama ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin smear preparatları hazırlanarak özel boyamalar yapıldı. Ve mikroskopta incelendi. Mikroskop altında mor renkli olarak görünen hücreler; Gram (+), pembe-kırmızı renkli olarak görünen hücreler ise; Gram (-) olarak değerlendirildi (Çizelge 4.2). EDT1 bakterisine ait mikroskop görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir.

#### 4.2.1.c. Hareketlilik Özelliklerinin Belirlenmesi

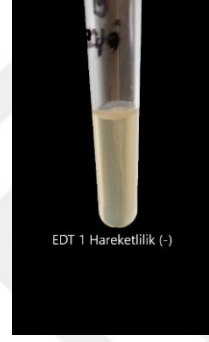
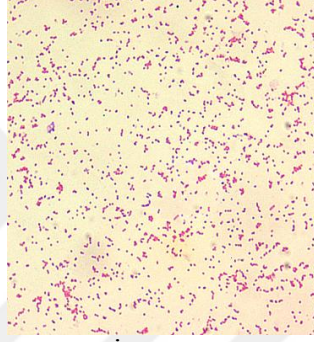
Bakterilerin hareketlilik testi için TSB + %0,5 Agar oranında besiyeri hazırlanarak cam tüplere 5'er mL dökülerek dik bir şekilde dondurulduktan sonra iğne öze ile batırılarak yapılan test sonucunda hiçbir izolatın hareketli olmadığı gözlemlendi (Şekil4.2) (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** İzolatların Morfolojik Özellikleri

Stok Kodu	Morfolojisi	KOH	Gram	Hareketlilik
EDT1	Kok	-	-	-
EDT2	Kok	-	-	-
EDT3	Kok	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam)

<b>EDT4</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT6</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT7</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT12</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT14</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT18</b>	Kok	-	-	-
<b>EDT19</b>	Kok	-	-	-



Şekil 4.2. EDT1 İzolatına ait gram boyama ve hareketlilik görüntüsü

#### 4.2.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Test Sonuçları

##### 4.2.2.a Oksidaz ve Katalaz Test Sonuçları

Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan oksidaz ve katalaz testi sonucunda izolatların bazıları oksidaz ve katalaz pozitif (+) sonuç verirken, bazıları ise, negatif (-) sonuç vermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Biyokimyasal Özellikleri

<b>Stok Kodu</b>	<b>Oksidaz</b>	<b>Katalaz</b>
<b>EDT1</b>	++	++
<b>EDT2</b>	-	++
<b>EDT3</b>	++	++
<b>EDT4</b>	++	++
<b>EDT6</b>	-	+
<b>EDT7</b>	++	++

**Çizelge 4.3.** (devam)

<b>EDT12</b>	-	++
<b>EDT14</b>	+	+
<b>EDT18</b>	+	++
<b>EDT19</b>	+	++

**Şekil 4.3.** EDT1 suşuna ait oksidaz testi ve EDT1, EDT4, EDT19 suşlarına ait katalaz testi görüntüleri (++, kuvvetli pozitif; +, pozitif; -, negatif)**Şekil 4.3.a.** EDT1 suşuna ait oksidaz testi görüntüsü**Şekil 4.3.b.** EDT1, EDT4 ve EDT18 suşlarına ait katalaz testi görüntüsü

### 4.2.3.Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 4.2.3.a.Sıcaklık, pH, Tuz Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin büyüme koşullarının belirlenmesi için 5°C, 10°C, 15 °C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C'de yapılan sıcaklık denemeleri 48. saatin sonunda ölçüldü ve optimum büyüme sıcaklıklarının 10 – 15°C olduğu tesbit edilmiştir. (Çizelge 4.4)

**Çizelge 4.4.** İzolatların sıcaklık özellikleri

<b>Stok Kodu</b>	<b>İzolatların Gelişebildiği Sıcaklık Aralığı (°C)</b>	<b>İzolatların Optimum Sıcaklığı (°C)</b>
<b>EDT1</b>	4°C - 35°C	10°C
<b>EDT2</b>	4°C - 35°C	15°C
<b>EDT3</b>	4°C - 30°C	15°C
<b>EDT4</b>	4°C - 30°C	15°C
<b>EDT6</b>	4°C - 35°C	15°C
<b>EDT7</b>	4°C - 30°C	15°C
<b>EDT12</b>	4°C - 35°C	10°C
<b>EDT14</b>	4°C - 35°C	15°C
<b>EDT18</b>	4°C - 30°C	10°C
<b>EDT19</b>	4°C - 30°C	10°C

Bakterilerin en iyi büyüme gösterdikleri optimum pH koşullarının belirlenmesi için yapılan denemeler sonucunda test izolatlarının; pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0 ' de 48. saat süreyle 10 - 15° C'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçta; pH 5,0 - 9,0 ' da gelişim gösterdikleri tespit edildi (Çizelge 4.5)

**Çizelge 4.5.** İzolatların pH Özellikleri

<b>Stok Kodu</b>	<b>İzolatların Gelişebildiği pH Aralığı</b>	<b>İzolatların Optimum pH'sı</b>
<b>EDT1</b>	7,0 - 11,0	9,0
<b>EDT2</b>	4,0 - 11,0	9,0
<b>EDT3</b>	6,0 - 9,0	7,0
<b>EDT4</b>	6,0 - 9,0	7,0
<b>EDT6</b>	6,0 - 9,0	7,0
<b>EDT7</b>	6,0 - 9,0	7,0
<b>EDT12</b>	6,0 - 9,0	8,0
<b>EDT14</b>	4,0 - 11,0	9,0
<b>EDT18</b>	4,0 - 10,0	8,0
<b>EDT19</b>	4,0 - 10,0	8,0

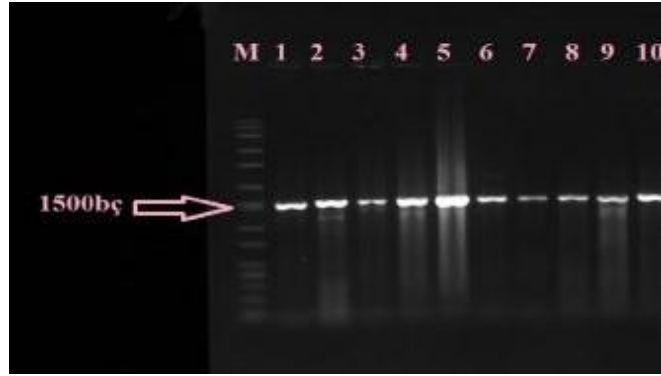
Bakterilerin büyüyebildikleri tuz konsantrasyonlarının tespiti amacıyla, test suşları 10-15°C' de % 2, % 4 ve % 6 tuz konsantrasyonlarında 48. saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve % 2 tuz konsantrasyonunda gelişebildikleri gözlemlendi (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** İzolatların tuz özellikleri

<b>Stok Kodu</b>	<b>İzolatların Gelişebildiği Tuz Konsantrasyonu Aralığı (%)</b>	<b>İzolatların Gelişebildiği Optimum Tuz Konsantrasyonu (%)</b>
<b>EDT1</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT2</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT3</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT4</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT6</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT7</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT12</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT14</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT18</b>	% 2 - % 6	% 2
<b>EDT19</b>	% 2 - % 6	% 2

### **4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması**

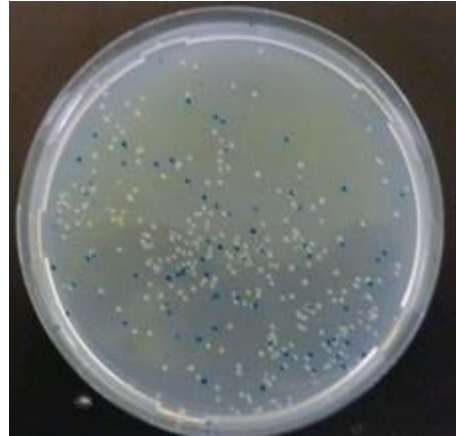
Soğuk su kaynaklarından izole edilen bakterilerin konveksiyonel yöntemlerle tanıları yapıldıktan sonra, izolatların moleküler karakterizasyon aşamasına geçildi. Bunun için öncelikle genomik DNA'ları izole edildi (Şekil 4.3). Daha sonra test suşlarının gen profillerinin belirlenmesi amacıyla, 16S rRNA gen bölgeleri 27F ve 1492R evrensel primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jelde yürütüldü ve tüm izolatların 1500 bp büyüklüğünde tek bant verdiği gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü

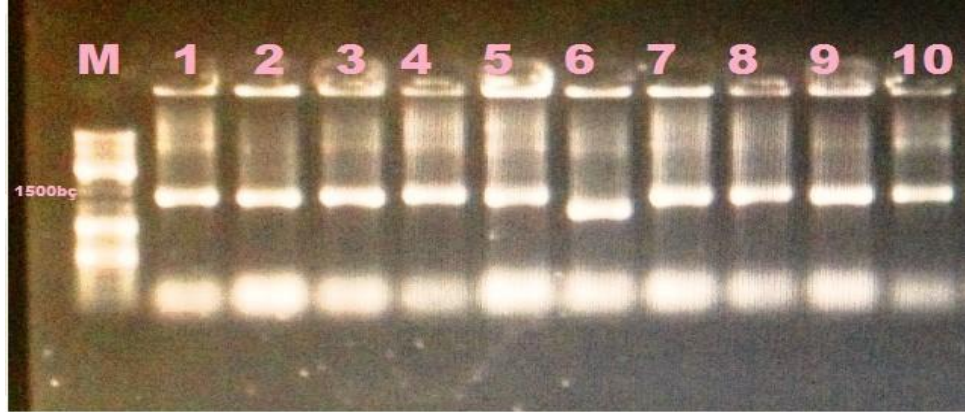
#### 4.3.1. Amplifiye Edilen 16S rRNA Bölgesinin Klonlanması

Transformasyon ve klonlama işlemi için 16S rRNA PCR ürünlerine ligasyon işlemi yapıldı. Daha sonra vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* JM 101 izolatları; amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve 14-16 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda mavi-beyaz koloni taraması yapıldı. Transformasyon işlemi sonucu oluşan mavi-beyaz koloni petri görüntüsü Şekil 4.5'te verildi.



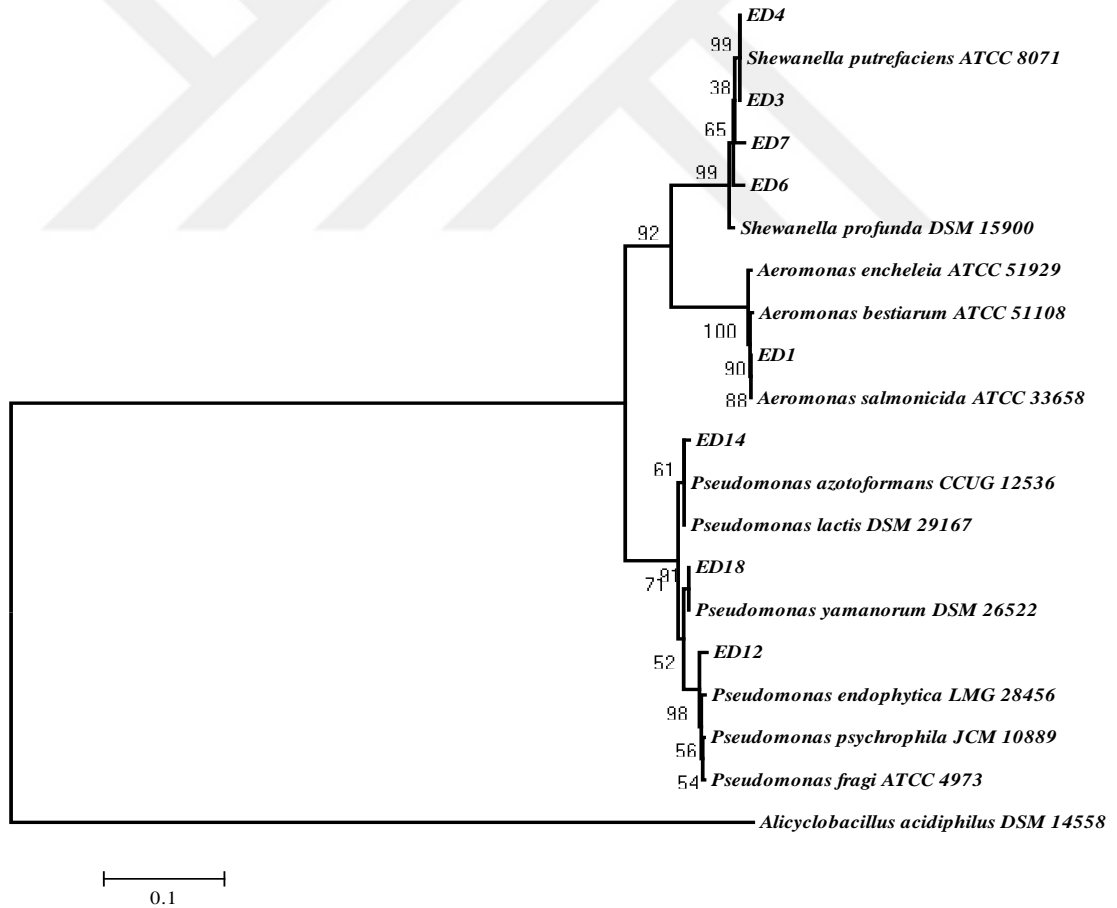
Şekil 4.5. Mavi-beyaz koloni örnek görüntüsü

Koloni PCR; incelenen petrillerdeki beyaz kolonilerden birkaç adet seçildi ve ilgili genin transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla, koloni PCR analizleri yapıldı. Elde edilen ürünler, %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Görüntüleme işlemi sonucunda 1500 bç'lik bölgede bant veren koloniler seçilerek, klonlama işlemine bunlarla devam edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Koloni PCR jel görüntüsü

DNA dizi analiz sonuçları; Macrogen firmasından gelen 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Söğütlü Mahallesinde bulunan Betbaşı, Geçitler ve Karaçoban gözelerinden alınan soğuk su örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen analizi sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) filogenetik ağacı Alicyclobacillus acidophilus dış grup olarak kullanılmıştır.

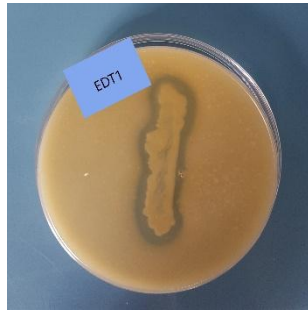


**Çizelge 4.7.** DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri

İzolat Kodu	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı
EDT1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	%99
EDT3, EDT4, EDT7	<i>Shewanella putrefaciens</i>	%99
EDT2, EDT6	<i>Shewanella profunda</i>	%99
EDT12	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	%99
EDT14	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	%99
EDT18, EDT19	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	%99

#### 4.4. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Soğuk su kaynaklarından izole edilen bakteriler Skim Milk agar besiyerlerine Wel difüzyon metodu kullanılarak inoküle edilip 10 °C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24. ve 48. saatin sonunda zon veren petrilerin görüntüleri kaydedildi. Yapılan incelemeler sonucunda EDT1 ve EDT8 suşlarına ait petrilerde zon görülürken diğer izolatların hiçbirinde zon tespit edilmedi. Zon büyüklüğüne göre en yüksek enzim aktivitesinin EDT1 suşuna ait petride olduğu belirlendi ve devam eden çalışmalarda bu bakteri suşu kullanıldı (Şekil 4.8 ve 4.9).



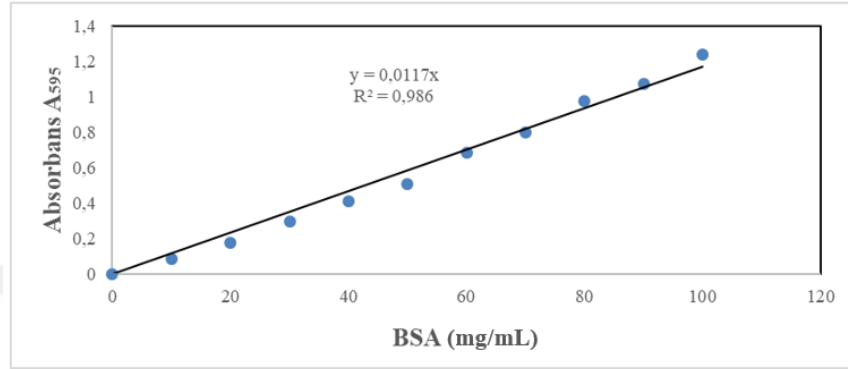
**Şekil 4.8.** EDT1 suşuna ait proteaz enzim aktivitesi ++  
(++: kuvvetli pozitif, +: pozitif, -: negatif)



**Şekil 4.9.** EDT8 suşuna ait proteaz enzim aktivitesi +  
(++: kuvvetli pozitif, +: pozitif, -: negatif)

#### 4.5. Protein Tayinin İçin Kullanılan Standart Grafik

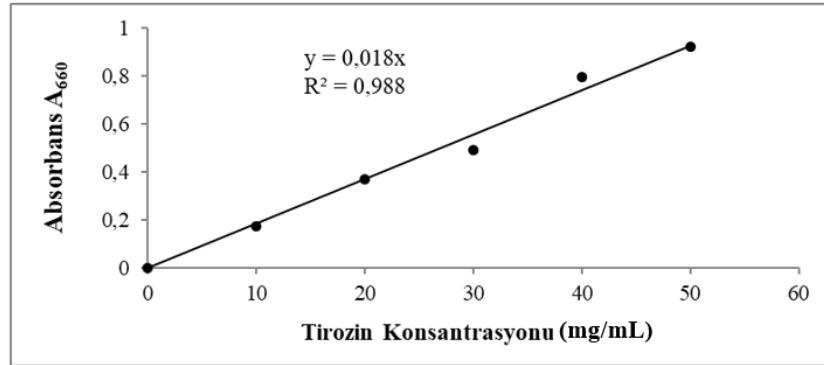
Tez kapsamında elde edilen enzim çözeltilerde protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldı. Bunun için Alçiçek 2017'nin oluşturduğu standart grafik kullanıldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Protein tayininde kullanılan standart grafik (Alçiçek 2017)

#### 4.6. Proteaz Aktivitesi Hesaplanmasında Kullanılan Tirozin Standart Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında Yıldırım (2014) tarafından oluşturulan tirozin standart grafiği kullanıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği (Yıldırım 2014)

#### 4.7. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemiyle Alkali Proteazın Saflaştırılması

Üçlü faz ayırma sisteminde (TPP) proteaz enziminin iyi bir verimle yüksek oranda saflaştırılabilmesi için tuz konsantrasyonu enzim miktarının organik çözügene oranı ve pH gibi sistemi etkileyen temel parametrelerin optimizasyonu gereklidir. Bu yüzden bu tez kapsamında farklı ham enzim çözeltisi: organik çözügen oranları, farklı tuz

konsantrasyonları ve farklı pH'ların saflaştırma katsayısı ve aktivitenin geri kazanımı üzerine etkileri incelenmiştir. Proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde organik çözen olarak *t*-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

#### 4.7.1 Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemiyle Alkali Proteazın Saflaştırılması için Sıcaklık Optimizasyonu Sonuçları

Proteaz enziminin aktivitesinin belirlenebilmesi sıcaklık optimizasyon sonuçları Çizelge 4.8'de belirtildiği gibi bulundu.

**Çizelge 4.8.** *A. salmonicida* proteaz enziminin aktivitesinin belirlenebilmesi için sıcaklık optimizasyon sonuçları

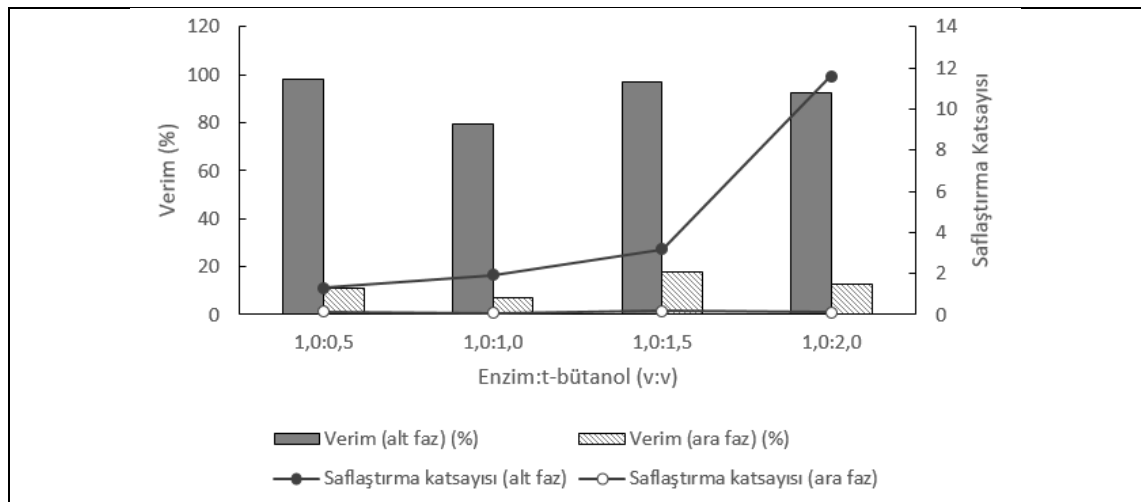
37°C'de 1 saatlik inkübasyon aşaması	Aktivite Sonuçları
5°C	0,865
5°C	0,884
10°C	1,446
10°C	0,858
15°C	1,010
15°C	1,084
20°C	1,026
20°C	0,767
25°C	0,749
25°C	0,901
30°C	0,777
30°C	1,034
37°C	1,054

#### 4.7.2. TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonu ve Organik Çözen Oranının Etkisinin Belirlenmesi

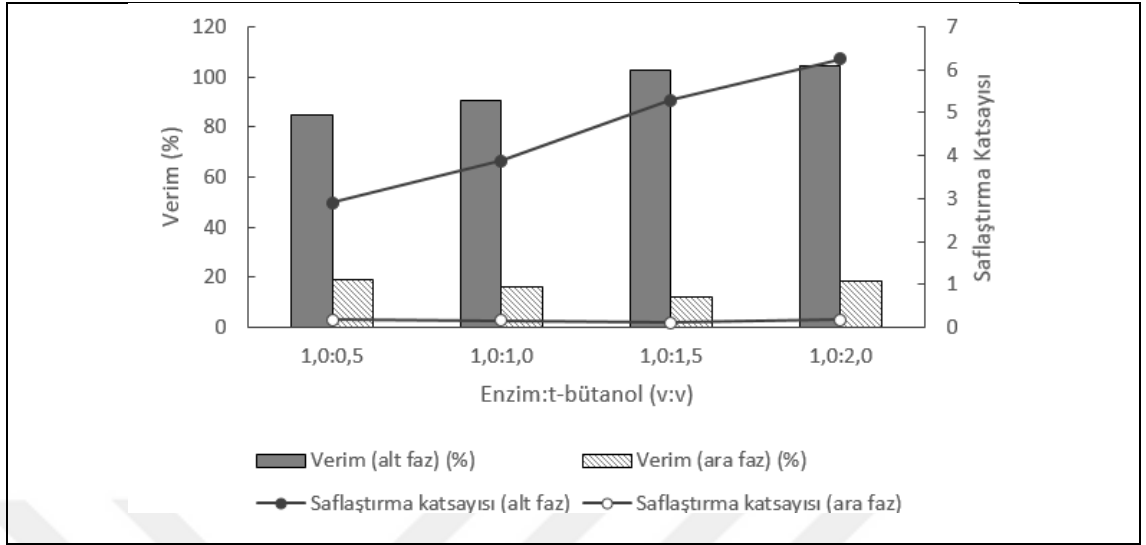
TPP sistemlerinde proteinleri ara yüzeyde etkin bir şekilde toplayabilmek için amonyum sülfat ve *t*-bütanol arasındaki karşılıklı ilişkiden yararlanır. Proteinlerin salting-out etkinliği; amonyum sülfat konsantrasyonu ve proteinlerin net yüküne bağlıdır. Bu nedenle

amonyum sülfat doygunluğu önemli bir parametre olup optimize edilmelidir (Bayraktar 2011).

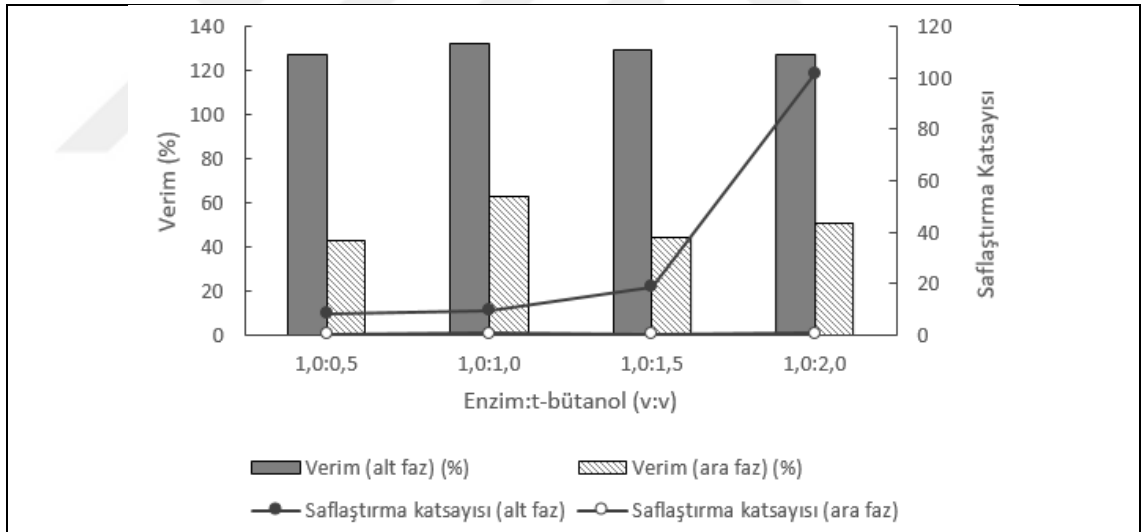
TPP proseslerinde optimizasyon çalışmaları farklılık gösterebilmektedir. Literatürlerde sabit bir tuz konsantrasyonu seçilip bu tuz konsantrasyonlarıyla farklı homojenat: *t*-bütanol oranları denenerek alkol oranı belirlendikten sonra bu alkol oranıyla farklı tuz konsantrasyonları çalışılarak gerekli olan tuz miktarı belirlenmektedir. Optimizasyon işlemi için kullanılan diğer bir yöntemde her bir tuz konsantrasyonunda farklı homojenat: *t*-bütanol oranlarının denenmesidir. Bu tez kapsamında yapılan TPP prosesi; farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80) ve farklı homojenat: *t*-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:1,2) kullanılarak 10 °C’de gerçekleştirildi. Bunun sonucunda düşük tuz konsantrasyonların da alkol oranı arttıkça yüksek verim görülürken; alkol oranı azaldıkça düşük verim görülmüştür. Yapılan çalışmaların grafiksel gösterimi sırasıyla Şekil 4.12 – 4.18’deki gibidir. Gösterilen şekiller incelendiğinde; saflaştırılan alkalın proteazın alt fazda kaldığı en yüksek verimin ve saflaştırma oranının %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda ve 1,0:1,5 homojenat: *t*-bütanol oranında elde edildiği görülmektedir. Bu aşamalardan sonraki saflaştırma prosesine bu oranlarla devam edildi.



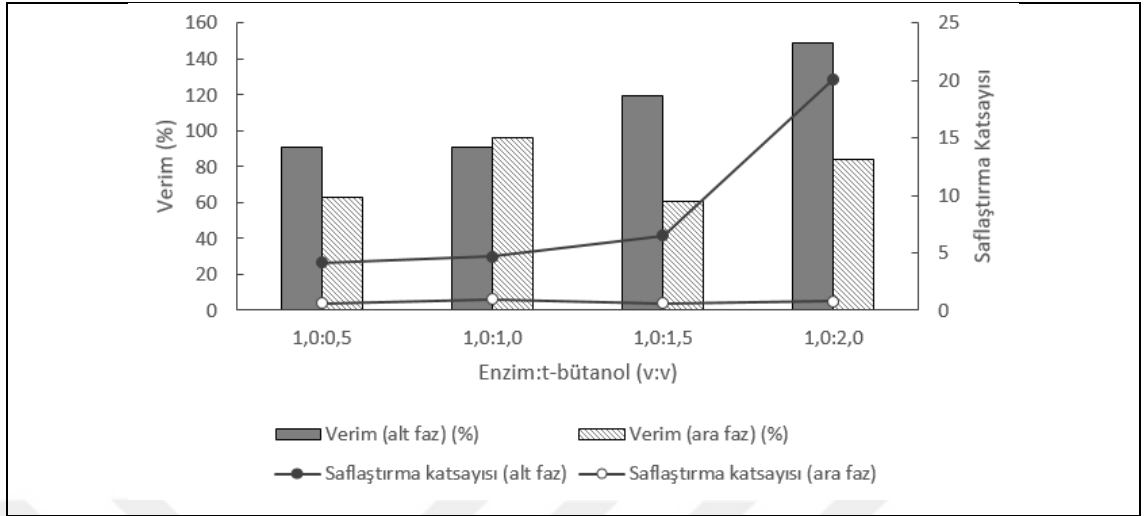
**Şekil 4.12.** TPP prosesinin %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.



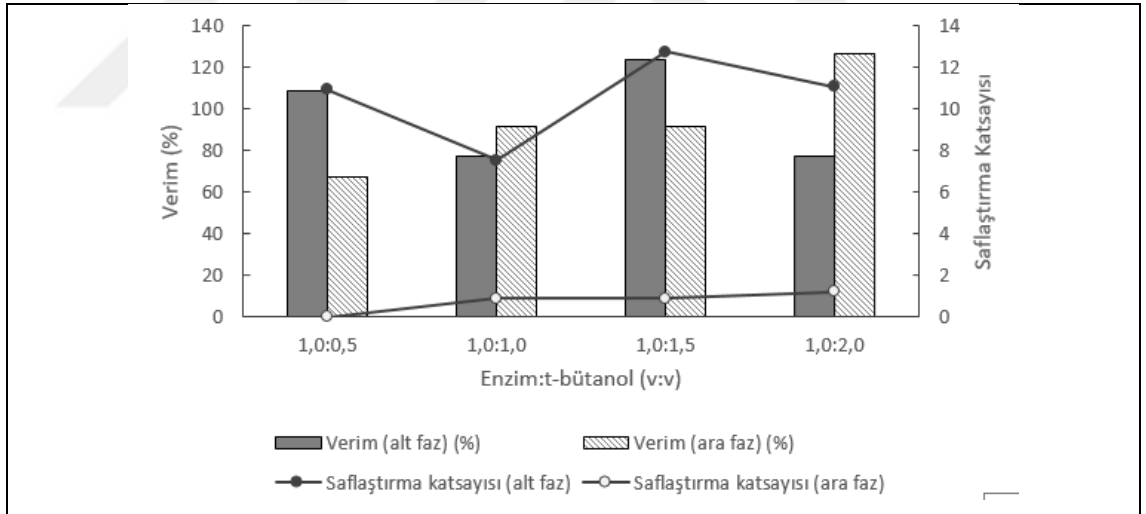
**Şekil 4.13.** TPP prosesinin %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.



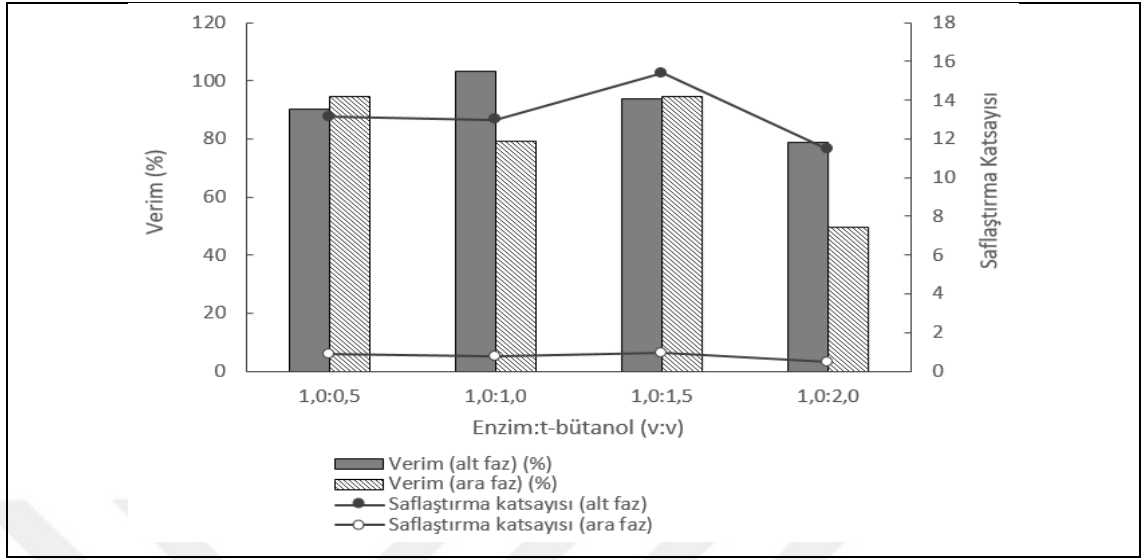
**Şekil 4.14.** TPP prosesinin %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.



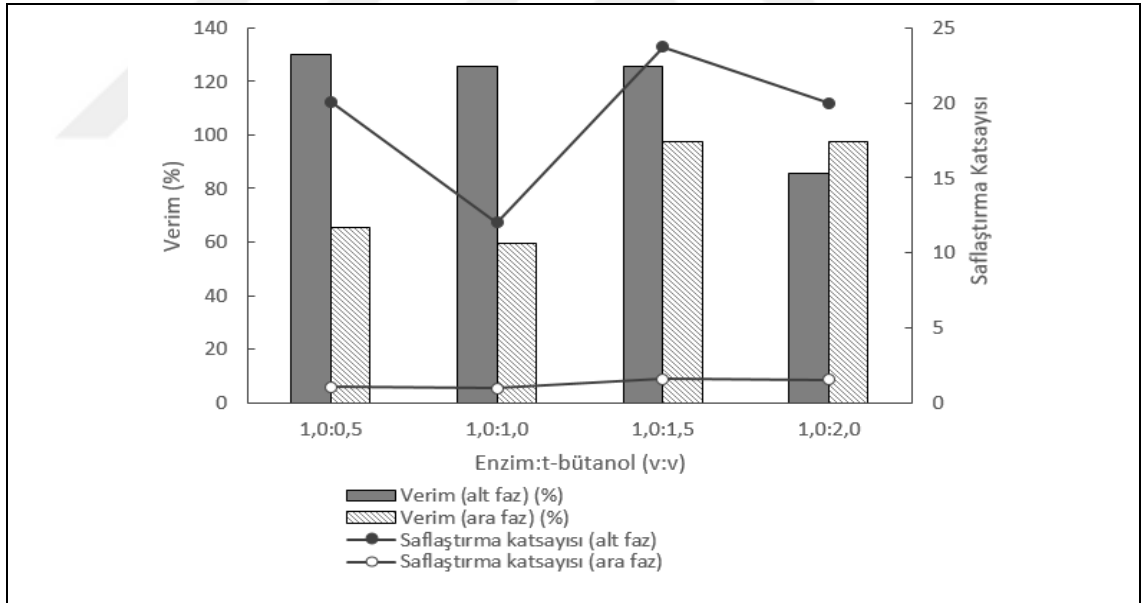
**Şekil 4.15.** TPP prosesinin %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.



**Şekil 4.16.** TPP prosesinin %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.



**Şekil 4.17.** TPP prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.

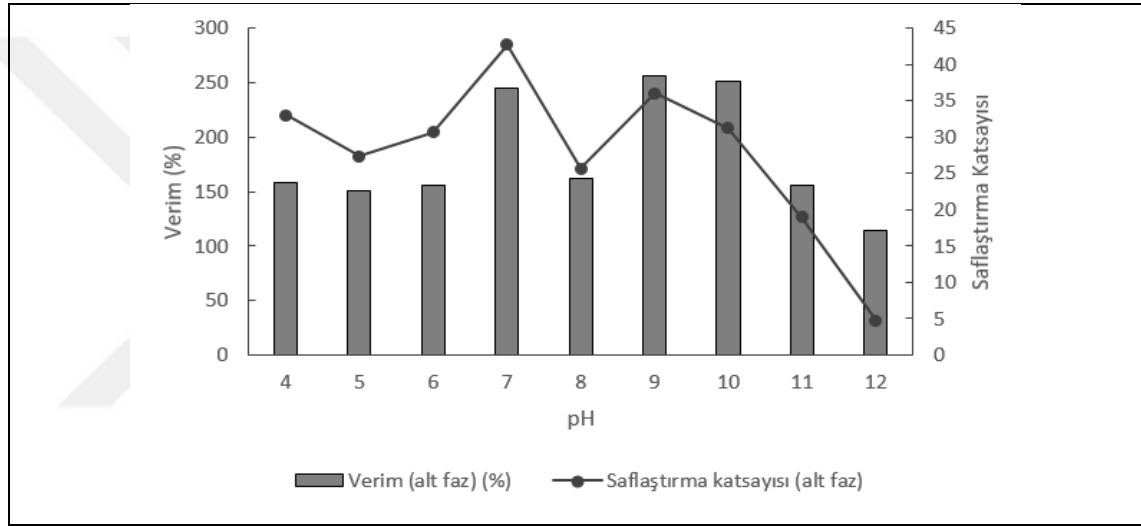


**Şekil 4.18.** TPP prosesinin %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat: *t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi

#### 4.7.3. Alkalın Proteaz'ın Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi

Üçlü faz ayırma sisteminde önemli bir diğer parametre; sistemin pH'sı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH'sı ayırımı gerçekleştirecek preparat içerisindeki

biyomoleküllerin dağılımı önemli ve etkin bir biçimde değiştirmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminantların yüzey karakteristiğine pH etki eder ve fazlar arasında dağılımın farklılaşmasına sebep olur (Kadı 2016). Bu nedenle sistemin pH'sı TPP sistemini etkileyen önemli parametrelerden biridir ve optimize edilmesi gerekmektedir. TPP işleminde en uygun tuz yüzdesi (%80) ve organik çözügen (1,0:1,5) oranı belirlendikten sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. pH'nın verime ve saflaştırma oranına etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 4.19'da verildi.



Şekil 4.19. Alkalın proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi

#### 4.7.4. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları

TPP optimizasyonunun hemen ardından belirlenen parametreler ile *A. salmonicida* EDT1'den alkalın proteaz enzimi saflaştırıldı. Saflaştırma sonuçları Çizelge 4.9'da verildi. %80 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1,0:1,5 (v/v) homojenat: *t*-bütanol oranı ve pH 7,0'de enzim %244 verimle 42 kat TPP sisteminin alt fazından saflaştırıldı.

Çizelge 4.9. *A. salmonicida* EDT1'den izole edilen alkalın proteazın saflaştırma tablosu

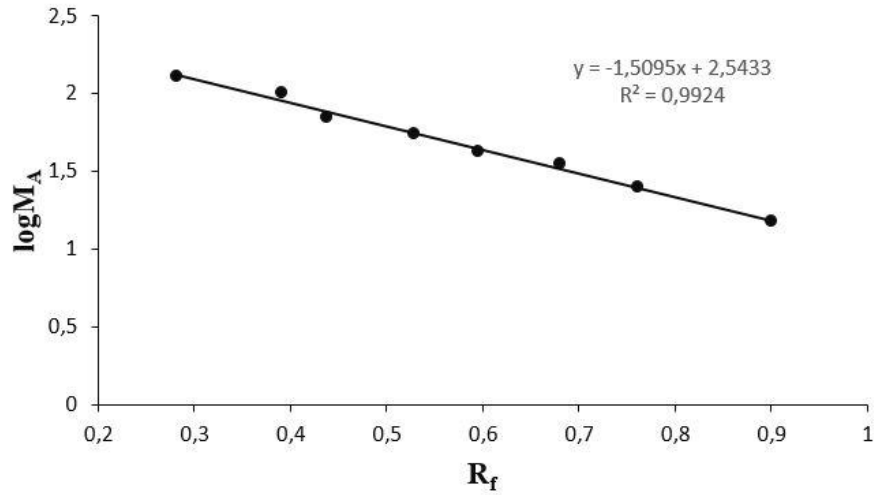
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
<b>Homojenat</b>	2	4,23	11,076	8,46	22,15	0,38	100	1
<b>TPP-Ara Faz</b>	2	6,89	11,64	13,78	23,28	0,59	97,48	1,55
<b>TPP-Alt Faz</b>	2	18,89	0,68	37,78	1,36	27,77	244	42



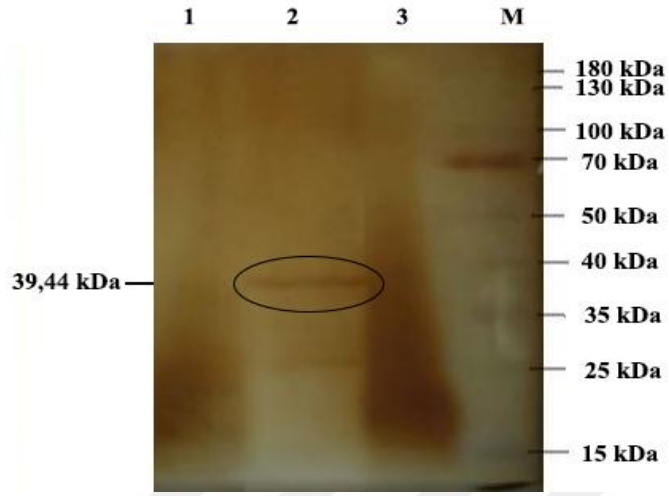
#### 4.8. SDS-PAGE İle Enzimin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogram Analizi

*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.20'da gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek  $R_f$  değerleri hesaplandı. Log MK- $R_f$  değerleriyle çizilen grafik Şekil 4.20'de gösterildi. Enzimin moleküler kütlesi 39,44 olarak hesaplandı.

Proteaz enzimi SDS-PAGE sisteminde yürütülerek zimogram analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda Şekil 4.21.a ve 4.21.b'de görülen proteaz enziminin bulunduğu yer daha açık renkte görünmektedir. Enzimin kazeini parçalamasından dolayı jelde diğer bölgelere göre daha açık renkteki görüntü proteaz enziminin varlığını doğrulamaktadır.

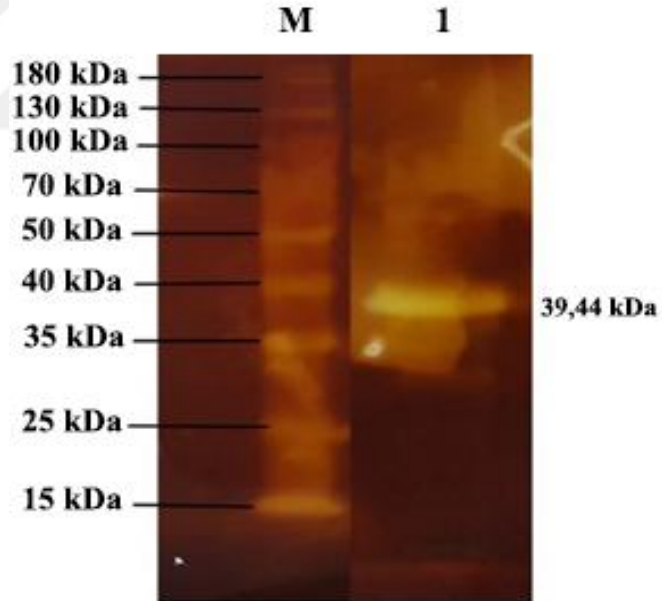


Şekil 4.20.SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-Rf grafiği



**Şekil 4.21.a.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

1) Ara faz 2) Alt faz 3) Homojenat M) Marker



**Şekil 4.21.b.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin zimogram görüntüsü M) Marker 1) Alt faz

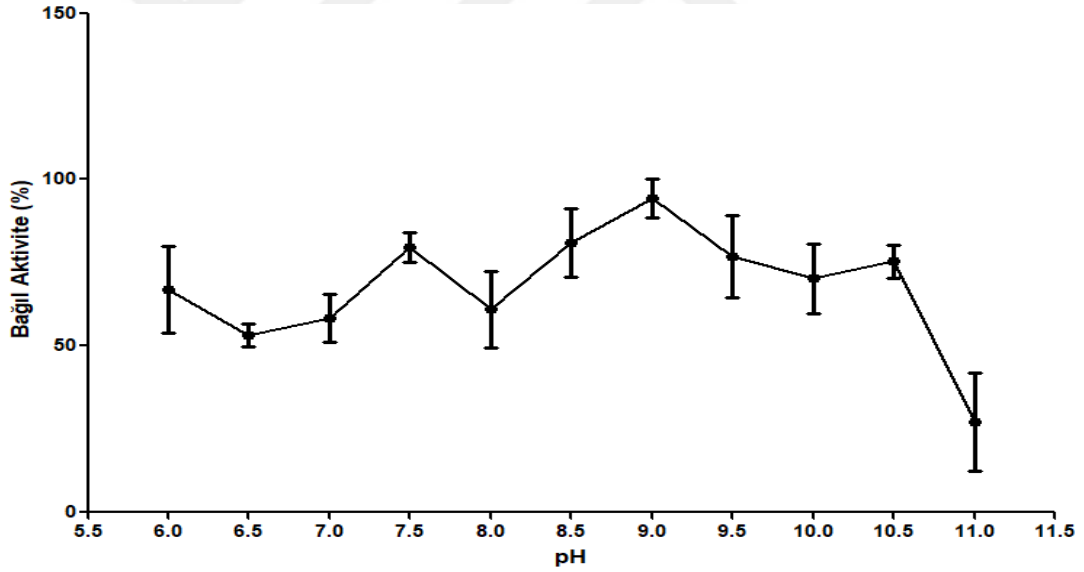
*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü incelendiğinde enzimin alt fazda kaldığı görüldü.

#### 4.9. Soğuk-Aktif Alkalın Proteaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sı 9,0 olarak belirlendi (Çizelge 4.9 – Şekil 4.22).

**Çizelge 4.10.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1M sodyum fosfat (pH:6,0-7,0), Tris-HCl (pH:7,5-8,5) ve Glisin-NaOH (pH:9,0-11,0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Bağlı Aktivite (%)	77,67	62,97	67,85	94,18	71,01	95,88	100	88,68	81,21	89,3	30,9

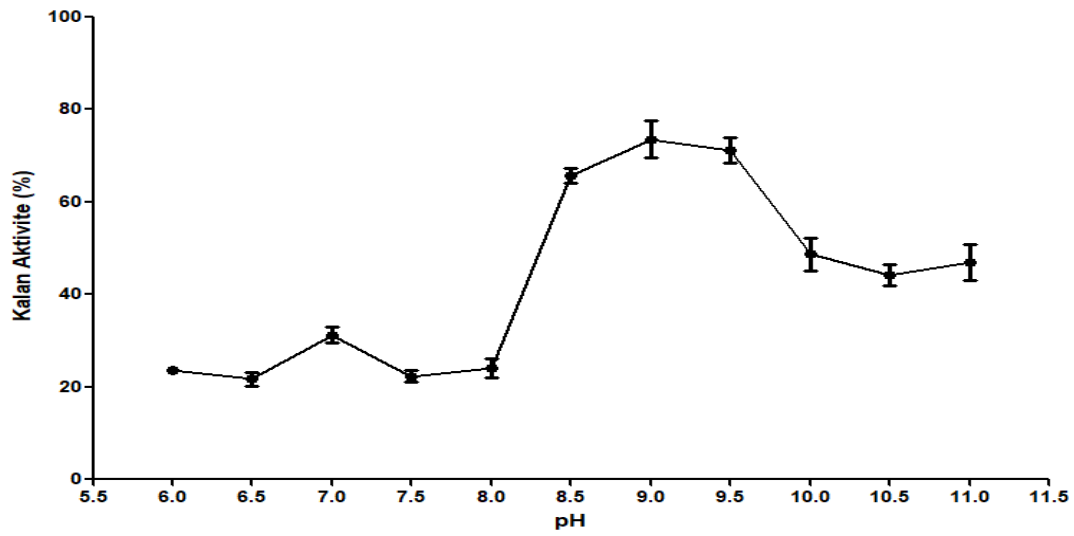


Şekil 4.22. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin stabil pH'sı için 0,1M Sodyum fosfat (pH 6,0-7,0) Tris-HCl (pH 7,5-8,5) ve Glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Elde edilen verilere göre grafik oluşturuldu ve proteaz enzimi için stabil pH; Glisin-NaOH tamponu pH 9,0 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.11.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1M sodyum fosfat (pH:6,0-7,0), Tris-HCl (pH:7,5-8,5) ve Glisin-NaOH (pH:9,0-11,0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
<b>Kalan Aktivite (%)</b>	25,73	22,39	23,3	30,76	21,84	42,0	84,54	70,3	59,8	39,0	49,36



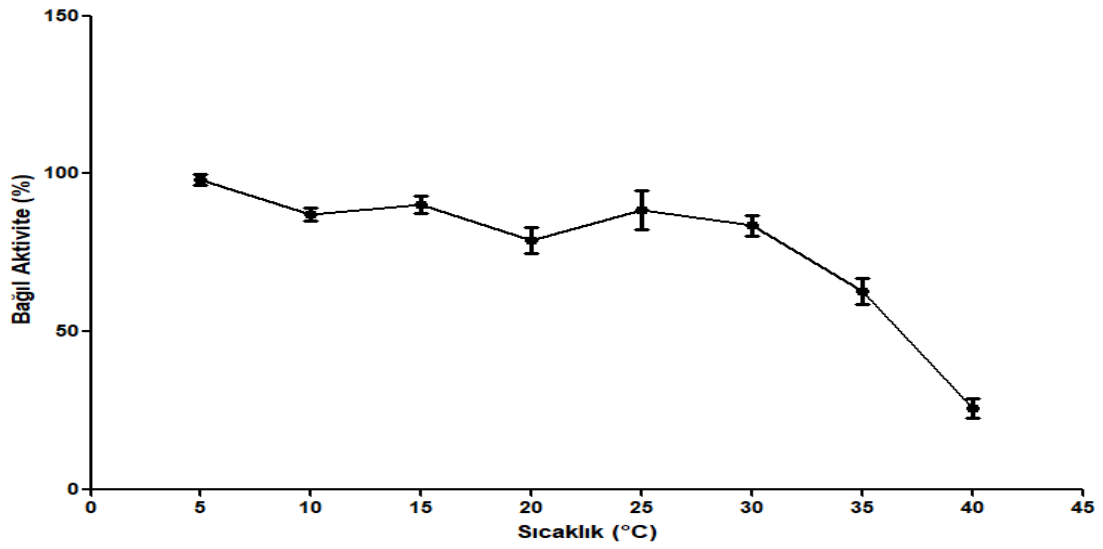
Şekil 4.23. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

#### 4.10. Proteaz Enzimi İçin Optimum ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

EDT1 proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 5 °C ile 40 °C arasındaki sıcaklıklar denendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12'de ve Şekil 4.24'de gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde; *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 5 °C olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.12.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık – bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi.

Sıcaklık (°C)	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Bağıl Aktivite (%)	100	94,13	90,57	87,84	84,0	88,86	70,56	40,34

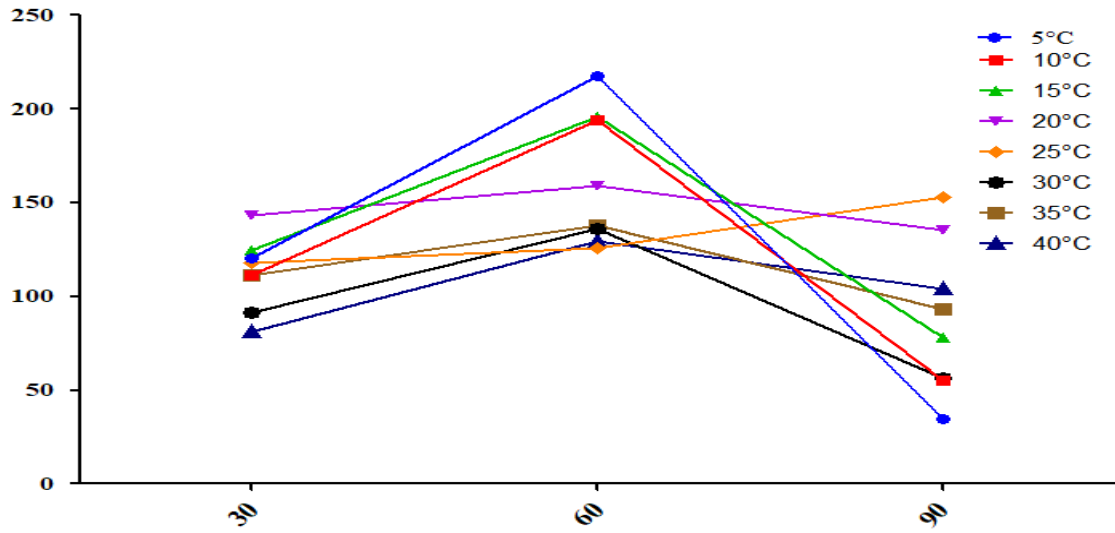


**Şekil 4.24.** Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçümü için çizilen sıcaklık bağıl aktivite grafiği

*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla 5°C'den 40°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 30, 60 ve 90 dakikalık inkübasyon sürelerinde bekletildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 4.25 ve Çizelge 4.13). Enzimin her bir sıcaklık aralığında 60 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesini muhafaza ettiği ancak 60 dakikadan sonra aktivitesinin azaldığı görüldü.

**Çizelge 4.13.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık-kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi

Süre (dk)	İnkübasyon sonrasında kalan aktiviteler (%)							
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
30	120,27	111,48	124,49	143,15	118,16	91,40	111,29	81,05
60	217,42	193,96	195,53	159,0	125,82	135,83	137,80	129,40
90	34,46	55,32	77,93	135,64	135,06	56,35	93,22	103,97



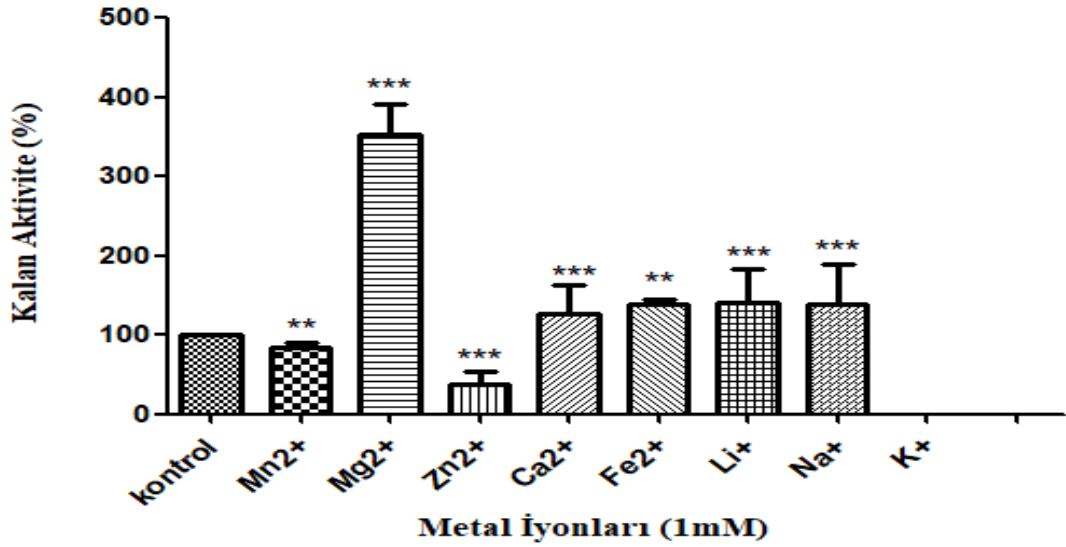
Şekil 4.25. Sıcaklığın proteaz enzim kararlılığı üzerine etkisi

#### 4.11 Bazı Metal İyonlarının Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

Bazı metal iyonlarının ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$  ve  $K^+$ ) proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla bu metal iyonlarının 1, 5 ve 10mM'lık konsantrasyonları kullanılarak bölüm 3.2.5.3.'te belirtilen yönteme göre proteaz enzim aktivitesi belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.13'de ve Şekil 4.25'de verildi.  $Mg^{2+}$ 'in 1 mM'lık konsantrasyonda proteaz enziminin aktivitesini %153 arttırdığı;  $Na^+$ 'nın 5 mM'lık konsantrasyonunda proteaz enzimi aktivitesini %113 artırdığı;  $Mn^{2+}$ 'in 10 mM'lık konsantrasyonunda proteaz enzim aktivitesini %69 artırdığı tespit edildi.

Çizelge 4.14. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi

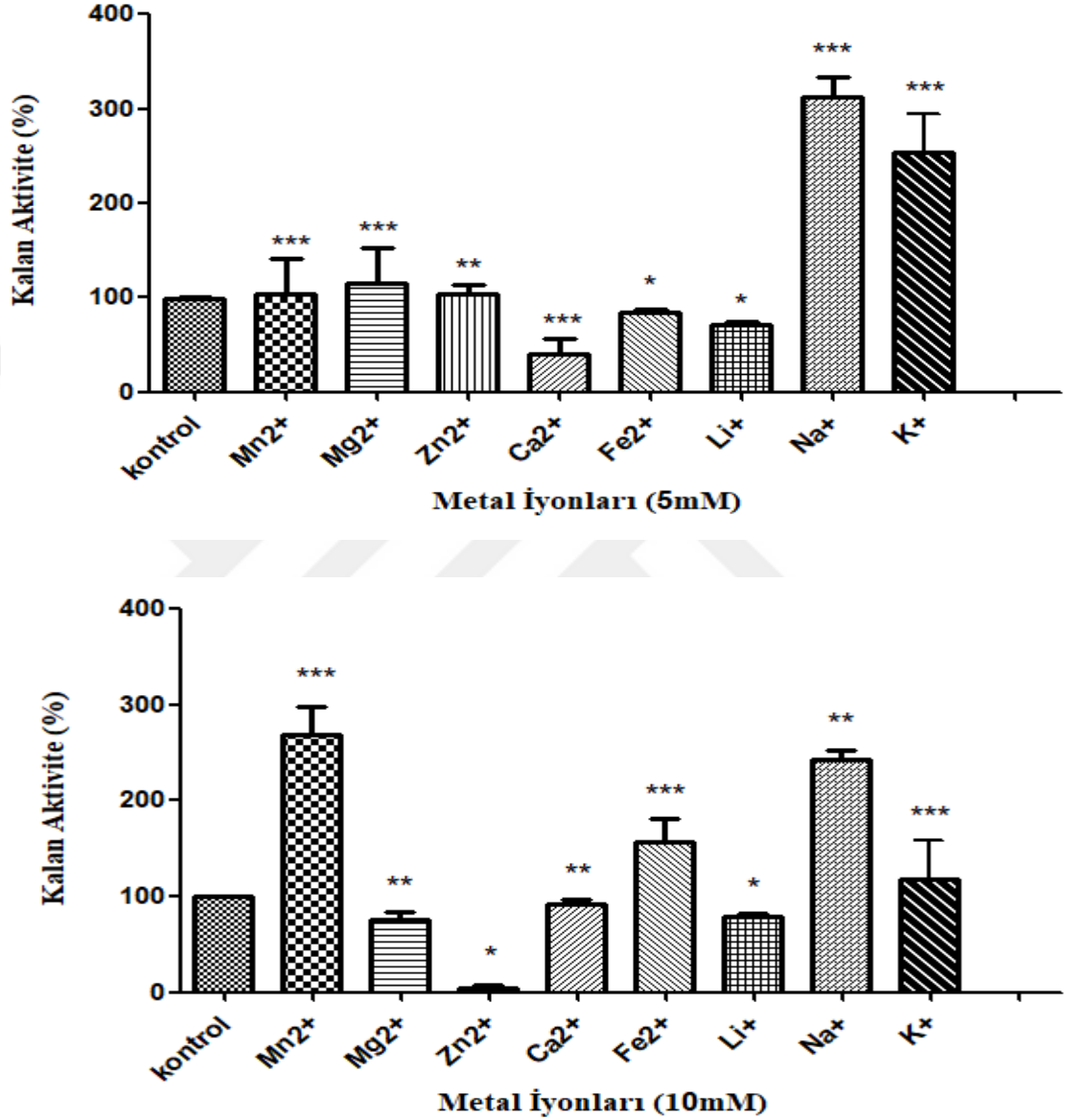
Metal İyonları	1Mm	5mM	10mM
<b>Kontrol</b>	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	15,32 ± 6,492	3,798 ± 37,30	169,0 ± 29,81
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	253,8 ± 136,9	16,05 ± 36,59	23,16 ± 8,106
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	62,38 ± 16,32	3,798 ± 10,21	95,71 ± 3,934
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	26,35 ± 37,78	59,93 ± 17,55	7,967 ± 5,402
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	38,60 ± 6,957	15,32 ± 2,999	56,74 ± 24,63
<b>Li<sup>+</sup></b>	41,05 ± 42,63	28,06 ± 3,549	20,22 ± 2,958
<b>Na<sup>+</sup></b>	39,58 ± 51,01	213,1 ± 78,60	144,0 ± 9,396
<b>K<sup>+</sup></b>	99,63 ± 0,3180	153,3 ± 40,62	17,52 ± 42,06



Şekil 4.26. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi

(Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve  $\pm$  SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. <sup>#</sup> P <0,005 kontrole karşı; <sup>ns</sup> P >0,05, \* P <0,05, \*\* P <0,005, \*\*\* P <0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

Şekil 4.26. (devam)



#### 4.12. Bazı İnhibitörlerin Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

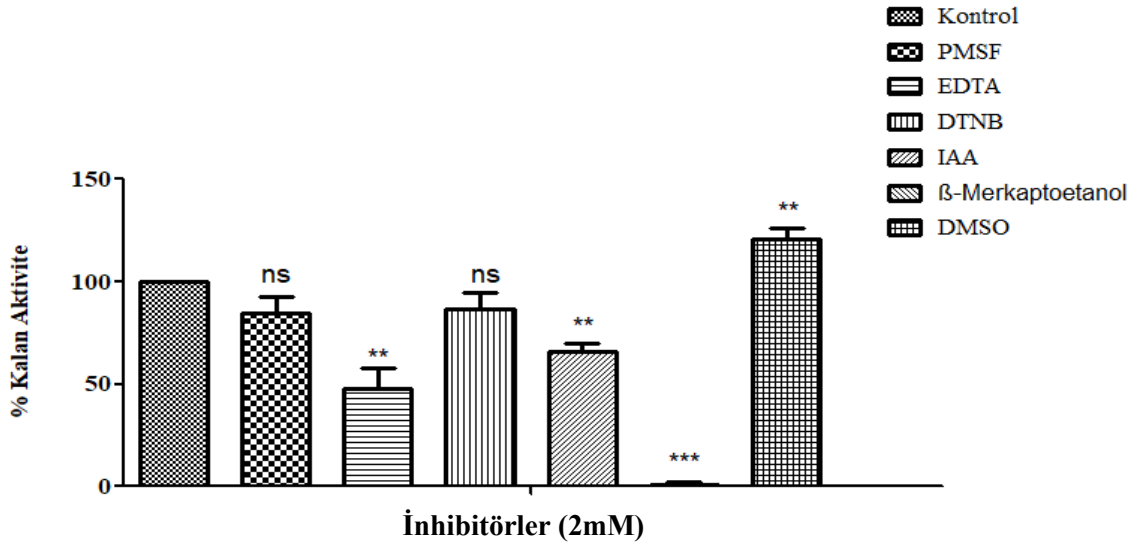
*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enziminin üzerine inhibisyon ajanlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-5mM'lık konsantrasyonlarında PMSF, EDTA, DTNB, IAA ve %1 ve %5'lik konsantrasyonlarında  $\beta$ -Merkaptoetanol kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15 ve Şekil 4.26'da verildi. %5'lik  $\beta$ -Merkaptoetanol'ün enzimin aktivitesini önemli ölçüde artırdığı fakat diğer inhibitörlerin enzimi farklı oranlarda



inhibe ettiği; en fazla inhibisyonun 2 mM'lık DTNB konsantrasyonunda %96,67 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Serin proteaz inhibitörü olan PMSF varlığında inhibe olması enzimin serin alkalın proeaz olduğunu gösterdi

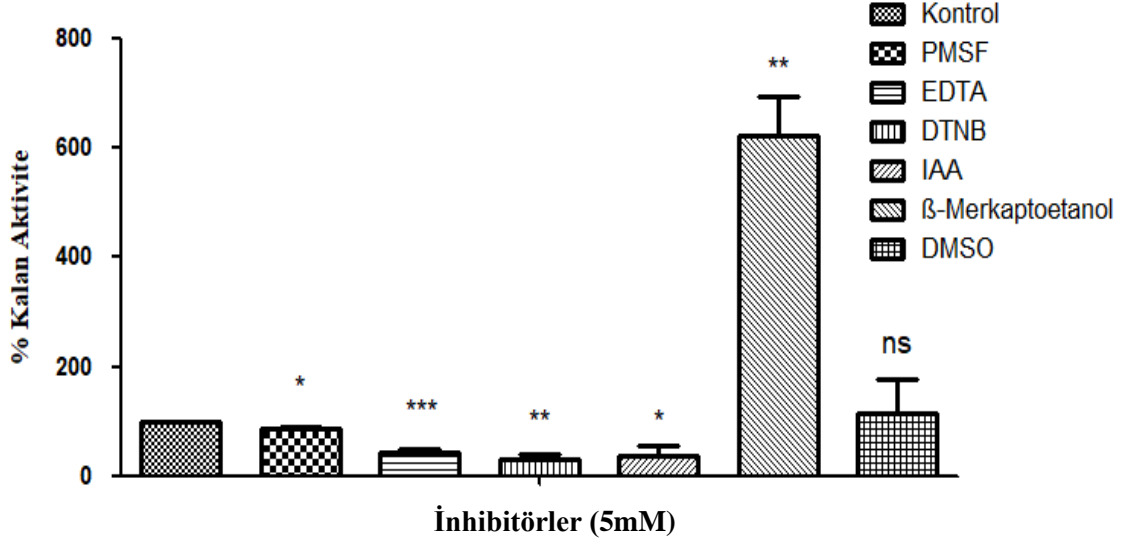
**Çizelge 4.15.** *A. salmonicida* EDT1'den elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	2mM	5Mm
<b>Kontrol</b>	100±0,00	100±0,00
<b>PMSF</b>	15,56 ± 8,303	14,22 ± 4,511
<b>EDTA</b>	52,44 ± 10,34	56,44 ± 4,949
<b>DTNB</b>	3,33 ± 7,813	71,11 ± 9,808
<b>IAA</b>	33,78 ± 3,875	63,11 ± 18,80
<b>İnhibitör</b>	%1	%5
<b>β-Merkaptoetanol</b>	98,67 ± 1,333	522,2 ± 73,50



**Şekil 4.27.** *A. salmonicida* EDT1'den elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi (Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve ± SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. ## P <0,005 kontrole karşı; ns P >0,05, \* P <0,05, \*\* P <0,005, \*\*\* P <0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

Şekil 4.27. (devam)

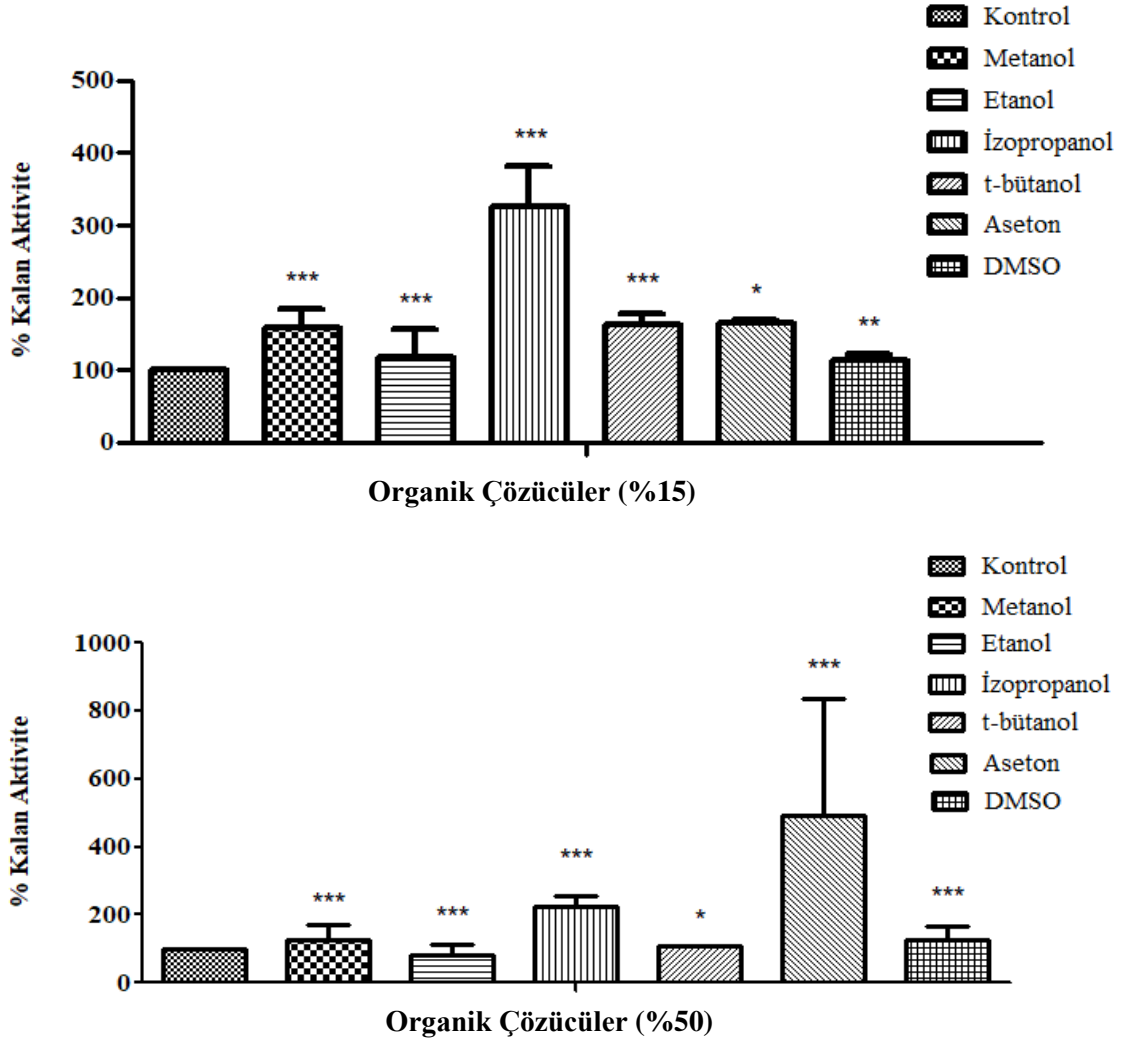


#### 4.13. Bazı Organik Çözücülerin Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

Metanol, etanol, izopropanol, *t*-bütanol, aseton ve DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonlarında 1 ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda proteaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı (Çizelge 4.16 - Şekil 4.27). %50'lik aseton varlığında 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda enzimin aktivitesinin arttırdığı gözlemlendi. İzopropanolun ise her iki konsantrasyonda da enzimin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda ise %50'lik *t*-bütanol'ün % 152 oranında enzimin aktivitesini arttırdığı görülmüştür.

**Çizelge 4.16.** Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik Çözücüler	%15	%50
<b>Kontrol</b>	100±0,00	100±0,00
<b>Metanol</b>	57,84 ± 25,77	27,45 ± 43,80
<b>Etanol</b>	18,63 ± 37,25	16,67 ± 28,02
<b>İzopropanol</b>	226,5 ± 54,58	125,5 ± 29,67
<b><i>t</i>-bütanol</b>	61,76 ± 15,28	6,863 ± 2,594
<b>Aseton</b>	64,71 ± 3,396	393,1 ± 342,0
<b>DMSO</b>	13,73 ± 7,657	26,47 ± 38,83



**Şekil 4.28.** Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

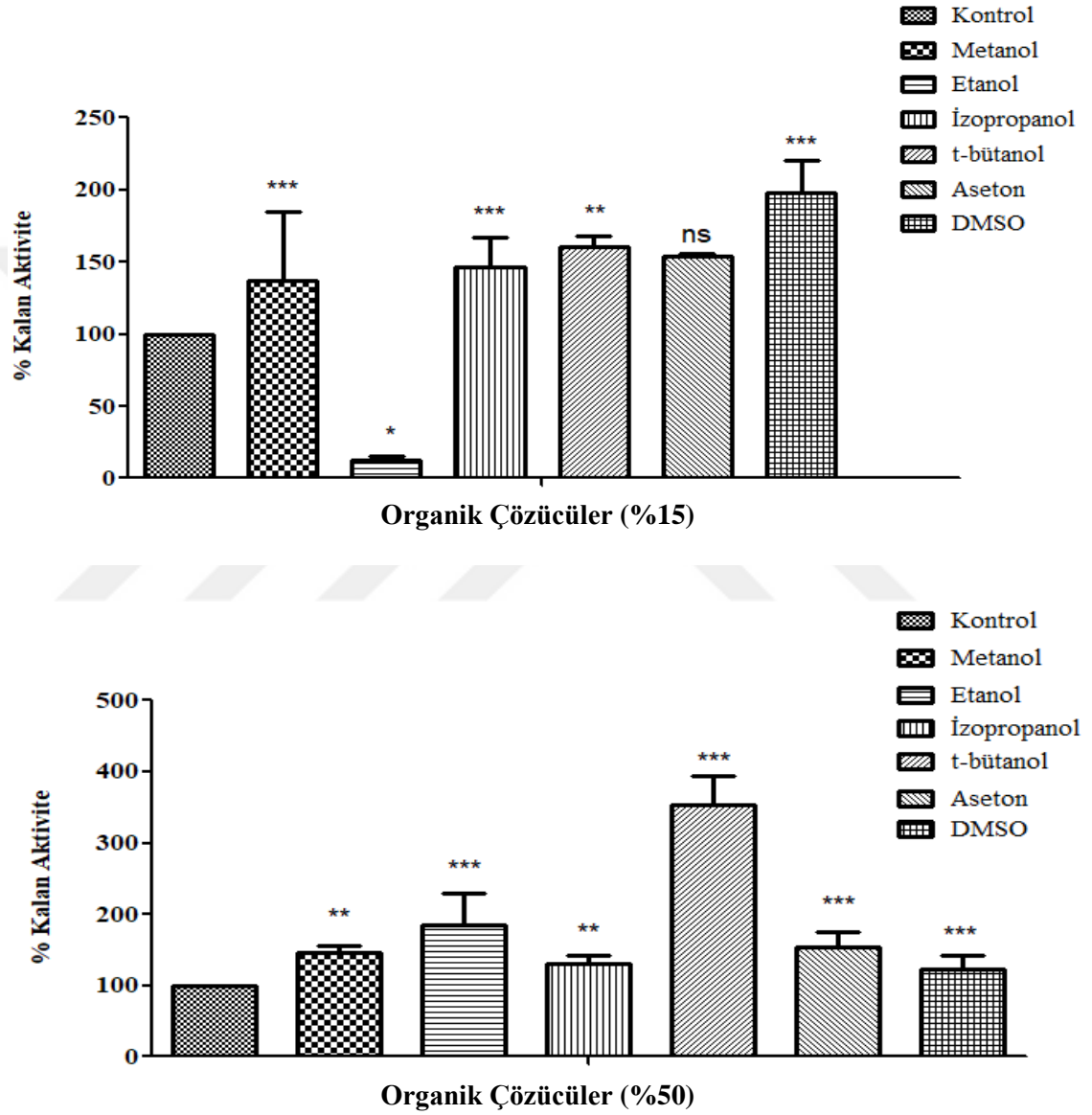
(Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve  $\pm$  SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. ## P < 0,005 kontrole karşı; <sup>ns</sup> P > 0,05, \* P < 0,05, \*\* P < 0,005, \*\*\* P < 0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

**Çizelge 4.17.** Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik Çözücüler	%15	%50
Kontrol	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
Metanol	37,25 $\pm$ 47,50	47,06 $\pm$ 7,782
Etanol	87,25 $\pm$ 2,594	84,31 $\pm$ 45,00
İzopropanol	46,08 $\pm$ 21,23	31,37 $\pm$ 10,38
t-bütanol	60,78 $\pm$ 7,070	252,9 $\pm$ 40,04

Çizelge 4.17. (devam)

Aseton	53,92 ± 1,961	53,92 ± 21,83
DMSO	98,04 ± 22,10	23,53 ± 19,29



Şekil 4.29. Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

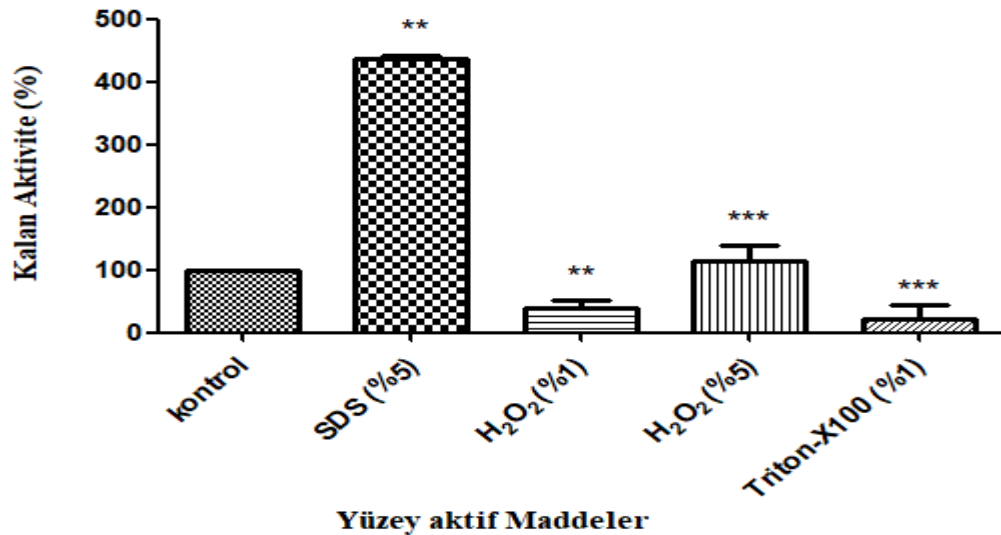
(Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve  $\pm$  SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. ## P < 0,005 kontrole karşı; ns P > 0,05, \* P < 0,05, \*\* P < 0,005, \*\*\* P < 0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

#### 4.14.Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

*A. salmonicida* EDT1'den proteaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisini ve okside edici ajanın etkisini göstermek için %1-5'lik konsantrasyonlar da SDS, Tween-20, Tween-80, TritonX-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.18'de ve Şekil 4.29'da verildi. %5'lik SDS konsantrasyonunda enzimin aktive olduğu, %1'lik ve %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun da sırasıyla %61 ve % 15 ; %1'lik TritonX-100 varlığında ise % 77 oranında enzimin aktivitesini korunduğu belirlendi.

**Çizelge 4.18.** *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisi

Yüzey Aktif Maddeler	%1	%5
<b>Kontrol</b>	100±0,00	100±0,00
<b>SDS</b>	0	336,2 ± 5,391
<b>Tween-20</b>	0	0
<b>Tween-80</b>	0	0
<b>TritonX-100</b>	77,41 ± 22,22	0
<b>Okside Edici Ajan</b>	%1	%5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	61,36 ± 13,92	15,18 ± 23,13



**Şekil 4.30.** *A. samonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisi

(Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve ± SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. ## P <0,005 kontrole karşı; <sup>ns</sup> P >0,05, \* P <0,05, \*\* P <0,005, \*\*\* P <0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

#### 4.15. Bazı Doğal Substratların Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

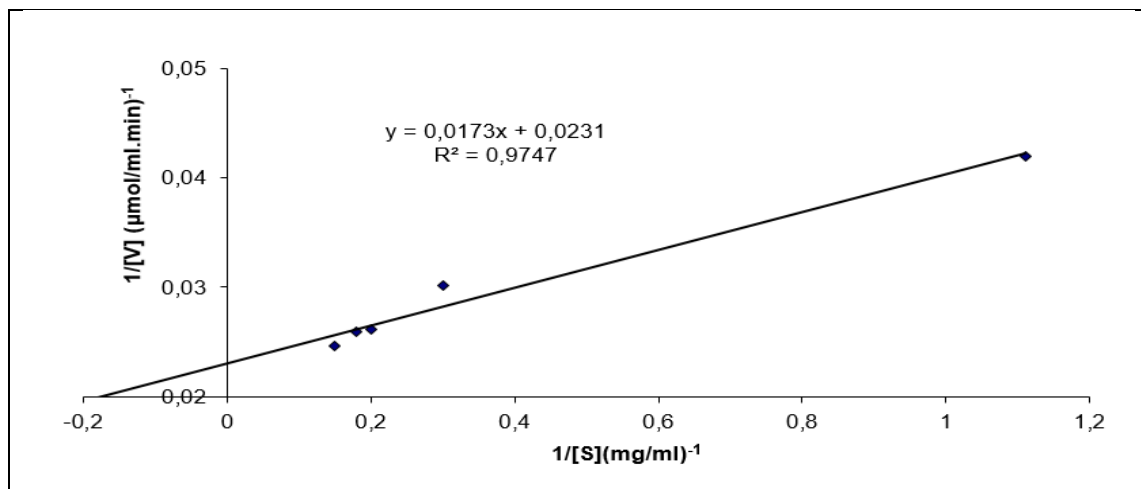
*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enziminin kazein, azokazein, hemoglobin, jelatin ve sığır serum albümin (BSA) substratlar varlığında aktivitesi incelendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi kazein substratında gösterdiği belirlendi.

**Çizelge 4.19.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlar varlığında aktivitesi

Doğal Substratlar (%0,65 w/v)	Bağlı Aktivite %100
<b>Kazein</b>	100
<b>Azokazein</b>	95
<b>Hemoglobin</b>	40
<b>Jelatin</b>	49
<b>BSA</b>	0

#### 4.16. $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

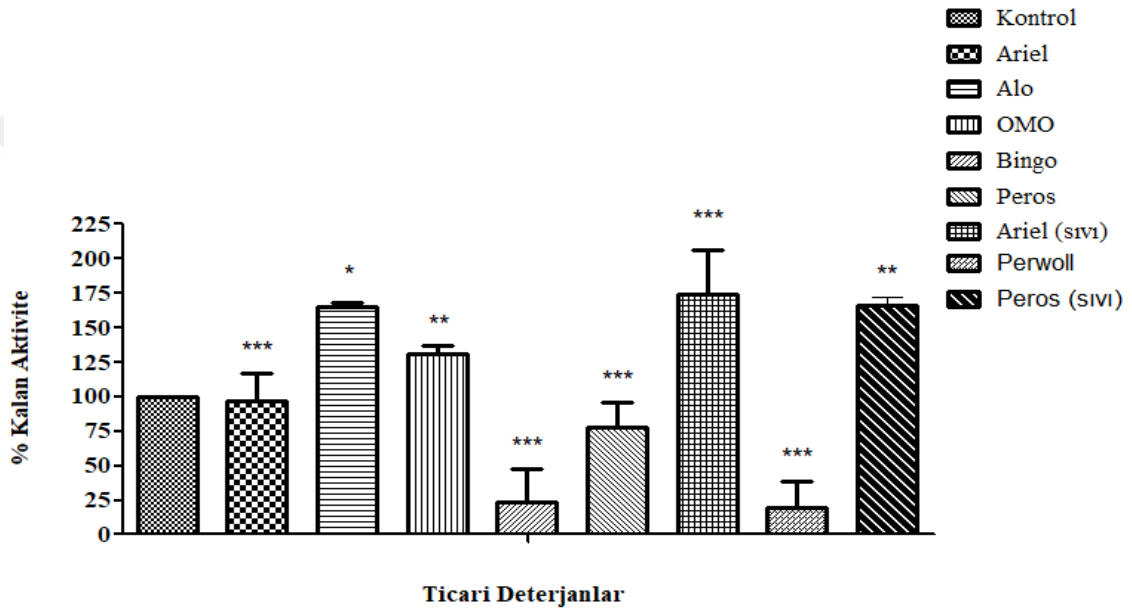
*A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratı varlığında  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak kazein substratı için  $K_M$  0,751 mg/mL ve  $V_{max}$  43,29  $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$  olarak tespit edildi (Şekil 4.31).



**Şekil 4.31.** Kazein substratı için  $K_M$  ve  $V_{max}$  bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.17. Bazı Endüstriyel Deterjanların Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Sonuçları

*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine ticari olarak satılan bazı deterjanların varlığında etkisi araştırıldı. Enzim aktivitesini en yüksek oranda; sıvı deterjanlar içinde Ariel markasının varlığında; katı deterjanlar içinde ise Alo markasının varlığında koruduğu görüldü.

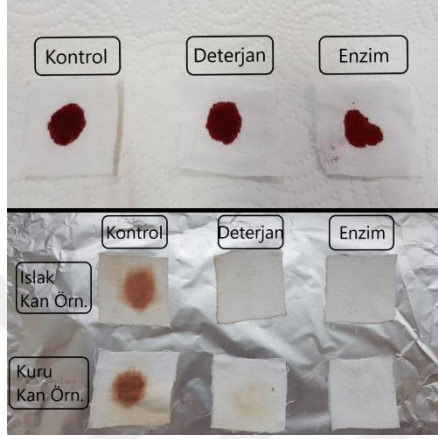


**Şekil 4.32.** *A. salmonicida* EDT1'den TPP yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari deterjanların etkisi  
(Tüm veriler üç deneyin ortalaması ve  $\pm$  SEM olarak ifade edildi ve her biri üçlü setler içeriyordu. ## P <0,005 kontrole karşı; ns P >0,05, \* P <0,05, \*\* P <0,005, \*\*\* P <0,0001, yalnız kontrole karşı (Student's two-tailed t-test).)

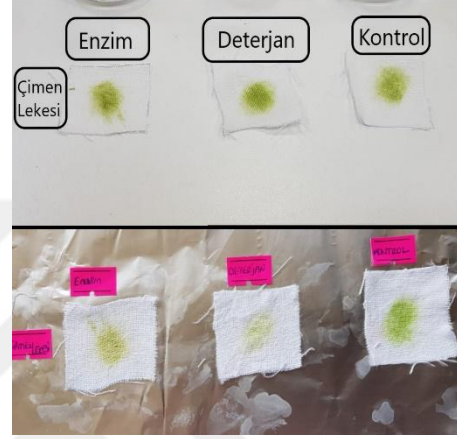
#### 4.18. Kan ve Çimen Lekesi Gibi Protein Lekelerinin Giderimi Üzerine Soğukta Aktif Proteaz Enziminin Etkisinin Belirlenmesi

Kan ve çimen lekeleriyle hazırlanan 4x4 kumaş parçalarının; bölüm 3.2.5.6.m 'deki gibi hazırlanan enzim, deterjan ve kontrol gruplarıyla 1 saat inkübasyon sonucu Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de gösterildiği gibidir. Buna göre; ıslak kan lekesi örneği ve kurutulmuş kan lekesi örneği yukardaki belirtilen gruplarda 1 saat inkübasyonu sonucunda kontrol grubuyla muamele edilen kumaş parçasındaki lekede hiçbir azalma gözlemlenmemişken; deterjan ve enzim gruplarıyla muamele edilen kumaş parçaları üzerindeki leke de ise

gözle görülür bir azalma olduğu görülmüştür. Ancak; enzim grubuyla muamele edilen lekeler, deterjan grubuyla muamele edilen lekelerle göre çok daha iyi bir şekilde giderilmiştir. Aynı zamanda kurutulmuş kan lekesi örneğinin, ıslak olarak hazırlanan kan lekesi örneğine göre; deterjan ve enzim gruplarında daha az giderimi olmuştur.



Şekil 4.33. Kan lekesi gideriminin sonuçları



Şekil 4.34. Çimen lekesi gideriminin sonuçları



## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Psikrofil ve psikrotolerant mikroorganizmalar ve onların soğuğa dayanıklı protein ve enzimleri biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Gounot *et al.* 1991). Bu soğuk-aktif mikroorganizmaların soğuk-aktif enzim ürettiği bilinmektedir (Huston *et al.* 2000). Soğuk-aktif enzimler arasında proteazlar düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik etkilere sahip olan önemli bir gruptur. Proteazlar işlevsel, metabolik ve düzenleyici fonksiyonlarda önemli oldukları için tüm yaşam formlarında bulunan önemli hidrolitik enzim sınıfında yer alır (Rao *et al.* 1998). Soğukta aktif proteazlar; yapısal esneklikleri ve yüksek turnover ( $k_{cat}$ ) sayılarından dolayı düşük sıcaklıklar altında yüksek katalitik etkiye sahiptirler (Demirjian *et al.* 2001; Craik *et al.* 2011; Kuddus and Ramteke 2012; Fornbacke and Clarsund 2013).

Alkalın proteazlar; deterjan endüstrisinde kan, süt, insan teri gibi protein lekelerinin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptir. Bu proteazların temizleme kapasitesinden dolayı; çevresel olarak kabul edilen fosfat bulundurmeyen deterjanlarda ek olarak kullanılmaktadır. Alkalın proteazın bu performansı; suyun pH'sı, sıcaklığı, deterjan bileşimi gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenir. İdeal deterjan enzimi; geniş pH ve sıcaklık skalasında ve aynı zamanda okside edici ajanlara karşı kararlı olmalıdır. Bu arada deterjan solüsyonlarında düşük enzim seviyesinde bile giysi temizlemede etkili olmalıdır. Ayrıca geniş substrat spetifitesine sahip olmalıdır (Anwar *et al.* 1998).

Bu tez çalışması kapsamında soğuk-aktif proteaz enzimi üretmek amacıyla Betbaşı, Geçitler ve Karaçoban gözelerinden temin edilen soğuk su örneklerinden toplam 10 adet psikrotolerant bakteri izole edildi. İzolasyon sonrasında yapılan konveksiyonel ve moleküler analizler sonucunda 10 izolat (EDT1: *A.salmonicida*, EDT2, EDT14: *P. azotoformans*, EDT3, EDT4, EDT7: *S. putrefaciens*, EDT6: *S. profunda*, EDT12: *P. psychrophila*, EDT18, EDT19 *P. yamanorum* ) tür düzeyinde tanımlandı. Bu 10 izolatta optimum büyüme sıcaklığı 10°C, optimum büyüme pH'sı 9,0 ve optimum büyüme tuz oranı ise %2 olarak belirlendi. Literatür incelendiğinde Mageswari *et al.* 2017; soğuk aktif proteaz enziminin üretimi için taradıkları doğal ve yapay soğuk su ortamlarından 22 adet psikrotolerant bakteri izole etmişlerdir. Ancak bunların hepsini genotipik ve

fenotipik yöntemlerle karakterize etmemişlerdir. Sadece proteaz aktivitesi veren suşun genotipik ve fenotipik karakterizasyonunu yapmışlardır. Buna göre; *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup> 'ye yakın akraba olan yeni bir bakteri olarak IMDY 'yi belirlemişlerdir. Morfolojik olarak oksidaz ve katalaz aktivitesinin yanı sıra doğada sarımsı-turuncu bir renkte, düz, sirküler koloni, aerobik ve gram negatif olarak gözlemlemişlerdir. 0-30°C arasında optimum büyüme sıcaklığını 28°C olarak bulmuşlardır. Baweja *et al.* 2016; ise alkalın proteaz üreten güney okyanus su örneklerinden 28 tane bakteri izole etmişler ve bu izolatın 16S rRNA gen sekans analizi sonucu *B. pumilus* KL-052'e %98 oranında benzediğini göstererek *B. pumilus* MP27 bakterisini keşfetmişlerdir. Yang *et al.* 2014; psikrofilik proteaz üreten bir bakteri olan HW08, Doğu Çin' de Sarı Deniz tabakalarından elde edildi. 16S rRNA sekans analizi ve izolatın fiziksel özellikleri ışığında izolatu; *P. lundensis* olarak tanımlamışlardır. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığını 25°C olarak belirlemişlerdir. Yang 2013; deniz tabakası soğuk aktif enzim üreten bakteri habitatı olduğunu için proteaz üreten *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşunu Güney Çin Denizi'nin sedimentlerinden izole etmişlerdir. Iram Saba 2011; psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri *Stenotrophomonas* sp. (III N-STO45) 'i Kaşmir ve Hindistan'dan toplanan toprak numunelerinden bakterinin biyokimyasal özellikleri ve 16S-rRNA gen dizilimine dayalı olarak izole etmişlerdir. Bu suşun 4-37°C arasında iyi bir büyüme gösterdiğini gözlemlemişlerdir; ancak optimum büyümeyi 15°C'de gösterdiğini bulmuşlardır. Kuddus *et al.* 2008; 100 bakteri izolatından 1'inin en fazla proteaz aktivite zonu verdiği için çalışmalarını bu izolat üzerinden gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatın 5-42°C, pH:5,0-12,0 arasında büyüebildiğini ve gram pozitif olduğunu göstermişlerdir. Yeni psikrotolerant bir bakteri olan *C. luteum*'u tanılamışlardır. Literatürle kıyaslandığında en düşük optimum büyüme sıcaklığının 10°C ile izole ettiğimiz 10 izolatta görüldüğü ve bu izolatlardan elde edilebilecek endüstriyel enzimlerinde düşük sıcaklıklarda aktif olabileceği böylelikle deterjan endüstrisi, yiyecek endüstrisi, deri endüstrisi gibi endüstrilerde reaksiyonun gerçekleşmesi gereken enerji miktarını düşürerek enerji tasarrufu sağlayabileceği ve bunun sonucunda maliyeti düşürebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda deterjan endüstrisinde düşük sıcaklıklarda leke gideriminin giysilerde yüksek sıcaklıklarda oluşacak deformasyonu önleyeceği tahmin edilmektedir.

Yapılan bu çalışmada izole edilen bakterilerin petri denemesi sonucunda sadece 1 suşun protez enzim aktivitesi bakımından pozitif sonuç verdiği, zonun ise oldukça fazla olduğu gözlemlendi. Bu aktivitenin EDT1 izolatına ait olduğu tespit edildi. *A. salmonicida* EDT1'den hem proteaz enziminin çalışılması hem de TPP yöntemiyle saflaştırılması ilk kez bu çalışmada yapıldı ve bunun için tuz, organik çözügen ve pH optimizasyonu gerçekleştirildi. EDT1 soğuk-aktif alkalın proteaz enzimi pH 7,0'da 1,0:1,5 (ham enzim çözeltisi: *t*-bütanol) ve % 80 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemiyle %244 verimle, 42 kat saflaştırıldı. Literatürdeki proteaz enzimlerinin saflaştırılması üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında; *Bacillus* sp. ZJ1502 suşundan izole edilen proteaz enzimi %40 amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE- Selüloz-52 anyon-değişim kromatografisi tekniğiyle 18,6 kat, 30,230 U/mg spesifik aktiviteyle; *P. aeruginosa* HY1215 suşundan izole edilen proteaz amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephorse ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanılarak 10 kat, %60 verimle; *P. lundensis*' ten alkalın proteaz %40-65 doygun amonyum sülfat aralığında 1,2 kat %65 verimle, ultrafiltrasyon ile 2,1 kat %60 verimle, jel filtrasyon ile 14 kat %20 verimle; *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşundan proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sephadex iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-75 jel filtrasyon teknikleriyle %26 verim ve 3077±49 U/mg spesifik aktiviteyle; *Stenotrophomonas* sp. (III N-STO45) suşundan proteaz enzimi %80 doygun amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE-Sepharose CL-6B kolon kromatografisi yöntemiyle 18,45 kat, 41.2 U/mg spesifik aktiviteyle; *P. chrysogenum* FS010'dan ekstraselüler soğuk-aktif alkalın proteaz amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-iyon değişim ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle %103 kat, %9,8 verimle; *C. luteum* (MTCC 7529) soğuk- aktif metalloproteaz enzimi %60 amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE- selüloz iyon değişim kromatografisiyle 34,1 kat 8,090 U/mg spesifik aktiviteyle saflaştırılmıştır. Proteaz enziminin kromatografik olmayan bir yöntem olan TPP sistemiyle saflaştırıldığı çalışmalara bakıldığında ise; Rajagopalan *et al.* 2018 tarafından yapılan çalışmada; *Wrightia tinctoria* bitkisinden süt pıhtılaştırıcı proteaz %60 doygun amonyum sülfat ve 1,0:1,0 (ham enzim ekstraktı: *t*-bütanol) oranıyla 22,6 kat %89,49 verimle ara fazda saflaştırmışlardır. Gagaoua *et al.* 2016 tarafından yapılan çalışmada; *Cucumis melo*'dan *Cucumis* proteazını %60 doygun amonyum sülfat, ham enzim ekstraktı: *t*-bütanol (1,0:1,25) oranıyla pH 8,0'da %156 verimle 4,61

kat saflaştırmışlardır. Literatürle kıyaslandığında *A. salmonicida* EDT1'den TPP sistemiyle saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin %244 verim, 42 kat saflaştırma oranıyla kromatografik yöntemlere ve TPP ile saflaştırılan diğer proteaz enzimlere göre çok daha iyi saflaştırıldığı görülmektedir. TPP yöntemi kısmi saflaştırma yöntemi olmakla birlikte kromatografik tekniklere göre daha kısa, basit ve ekonomik bir yöntem olması ve aynı zamanda TPP'nin proteinleri denatüre etmemesi gibi avantajları da beraberinde getirmektedir.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin saflığı ve TPP yönteminde enzimin alt fazda kaldığı SDS-PAGE ve zimogram analizinde tek bant ile teyit edildi. Saflaştırılan EDT1 soğuk-aktif proteazın molekül ağırlığı ~39,44 kDa olarak tespit edildi. Soğuk-aktif proteazların molekül ağırlığı 20-40 kDa arasında değişmektedir (Mageswari *et al.* 2017) Literatürdeki çalışmalara bakıldığında bu değerlerden farklı sonuçlar görmek mümkündür. SDS-PAGE *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup> proteaz ~27 kDa (Mageswari *et al.* 2017), *Bacillus* sp. (ZJ15) proteaz 14 kDa (Ping *et al.* 2018), *Cucumis* proteaz 68.4 kDa (Gagaoua *et al.* 2016), *P. aeruginosa* (HY1215) proteaz 32,8 kDa (Hao *et al.* 2014), *P. lundensis* proteaz 46 kDa (Yang *et al.* 2014), *Halobacillus* sp. (SCSIO 20089) proteaz 35 kDa (Yang 2013), *Stenotrophomonas* sp. (III N-STO45) proteaz ~55 kDa (Saba *et al.* 2011) ve *P.chrysogenum* (FS010) proteaz 41.000±1000 kDa (Zhu *et al.* 2009) olarak belirlenmiştir.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla pH profili incelendi. *A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan proteaz enzimi için optimum pH 9,0 olarak belirlendi. Bu sonuç bize saflaştırılan enzimin alkalın proteaz olduğunu göstermektedir. Literatürde optimum pH'sı 8,0 olan *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup>, *Halobacillus* sp. (SCSIO 20089) proteaz enzimi (Mageswari *et al.* 2017; Yang 2013); optimum pH'sı 10,0 olan *Bacillus* sp. (ZJ1502), *Stenotrophomonas* sp. (III N-STO45) (Ping *et al.* 2018; Saba *et al.* 2011); optimum pH'sı 7,5 olan *Wrightia tinctoria* (Rajagopalan *et al.* 2018); optimum pH'sı 9,0 olan *B. pumilus* MP27, *Cucumis* proteazı, *P. aeruginosa* (HV1215), *P.chrysogenum* (FS010) (Baweja *et al.* 2016; Gagaoua *et al.* 2016; Hao *et al.* 2014; Zhu *et al.* 2008); optimum pH'sı 10,4

olan *P. lundensis* proteazı (Yang *et al.* 2014), optimum pH 'sı 8,0-9,0 olan *Pseudomonas* sp. P<sub>6</sub> proteazı (Acevedo *et al.* 2012), optimum pH'sı 7,0 olan *C. luteum* proteazı (Kuddus *et al.* 2008) bildirilmiştir. *A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH değeri literatürdeki verilerle uyumludur. EDT1 proteaz enziminin alkali pH'larda yüksek aktivite göstermesi bu enzimi deterjan endüstrisi için önemli kılmaktadır.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin sıcaklık profili incelendi ve optimum sıcaklık 5°C olarak belirlendi. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında; Mageswari *et al.* 2017; *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup> IMDY proteaz enziminin optimum sıcaklığının 10°C olduğunu tespit etmişlerdir. Ping *et al.* 2018; *Bacillus* sp. ZJ1502'den alkalın proteazı enziminin optimum sıcaklığını 40°C bulmuşlardır. Rajagopalan *et al.* 2018; *Wrigtia tinctoria* kök proteazlardan süt pıhtılaştırıcı proteazın optimum sıcaklığını 50°C olarak belirlemişlerdir. Baweja *et al.* 2016; *B. pumilus* MP27 'den saflaştırılan proteazın optimum sıcaklığını 50°C olarak kaydetmişlerdir. Gagaoua *et al.* 2016; Cucumisın'ın optimum sıcaklığını 60-70°C belirlemişlerdir. Hao *et al.* 2014; *P. aeruginosa* HV1215'den saflaştırılan alkalın proteazın optimum sıcaklığını 25°C olarak bulmuşlardır. Yang *et al.* 2014; *P.lundensis*'ten saflaştırılan proteazın optimum sıcaklığını 30°C olarak tespit etmişlerdir. Yang 2013; *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşundan saflaştırılan proteazın optimum sıcaklığının 30°C olduğunu belirtmişlerdir. Acevedo *et al.* 2012; P<sub>6</sub>'nın optimum sıcaklığını 25-35°C olarak tespit etmişlerdir. Saba *et al.* 2011; psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45 'den saflaştırılan proteazın optimum sıcaklığının 15°C, Zhu *et al.* 2008; *P. chrysogenum* FS010'dan ekstra selüler soğuk-aktif alkalın proteazın, optimum sıcaklığının 35°C olduğunu, Kuddus *et al.* 2008; yeni psikrotolerant bir bakteri olan *Curtobacterium luteum* 'dan ekstraselüler proteazın optimum sıcaklığının 20°C olduğunu tespit etmişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değerlerinin, saflaştırdığımız enzimin optimum sıcaklık değerinin çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Saflaştırdığımız enzimin 5°C'de optimum aktivite göstermesi; deterjan endüstrisinde soğuk-aktif proteazın leke gideriminin de 5°C'de gerçekleştirerek enerji tasarrufu sağlayarak maliyeti azaltıcı etki yapacağı; ayrıca bu düşük sıcaklığın giysilerde yüksek sıcaklıkta oluşacak deformasyonu önleyeceği düşünülmektedir.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için 5-40°C sıcaklık aralığında 30, 60 ve 90. dakikalarda aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Enzimin sıcaklık kararlılığına bakıldığında 60 dakikaya kadar aktivitesinin denenen tüm sıcaklıklarda arttığı 60. dakikadan sonra azaldığını ancak 25°C’de ise 30. dakikadan 90. dakikaya kadar stabilitesinin giderek arttığı görüldü. Yapılan literatür çalışması sonucunda; Mageswari *et al.* 2017; *Chrseobacterium soli*<sup>T</sup> IMDY enziminin 20°C’de %85 aktivitede olduğu 30°C’de ise %50 aktivitede olduğunu tespit etmişlerdir. Baweja *et al.* 2016; *B. pumilus* MP27 ‘den saflaştırılan proteazın 10-70°C arasında aktif olduğunu ve 50°C ‘de kalan aktivitesinin %69 olduğunu kaydetmişlerdir. Gagaoua *et al.* 2016; Cucumis’in stabil sıcaklığının 20-70°C belirlemişlerdir. Hao *et al.* 2014; *P. aeruginosa* HV1215’den saflaştırılan alkalın proteazın 15-35 °C arasında iyi stabiliteye ve 25 °C’de ise maksimum aktivitenin %85’ine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Yang *et al.* 2014; *P. lundensis*’ten saflaştırılan proteazın 5 mM Ca<sup>2+</sup> varlığında 25-40°C arasında stabil olduğunu ancak Ca<sup>2+</sup> olmadığında 20-35°C arasında %20 aktivite kaybına uğradığını ve 40°C’de %50 aktivite kaybına uğradığını tespit etmişlerdir. Yang 2013; *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşundan saflaştırılan proteazın 0°C ‘de aktivitesinin %20’sini koruduğunu belirtmişlerdir. Acevedo *et al.* 2012; P<sub>6</sub> ‘nın 25°C ‘nin altında aktivitesinin hızlı bir şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. Saba *et al.* 2011; psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45’den saflaştırılan proteazın 40 °C’de %56 azalış göstererek sıcaklık arttıkça azaldığını, Zhu *et al.* 2008; *P. chrysogenum* FS010’dan ekstra selüler soğuk-aktif alkalın proteazın 15-35°C arasında yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini ve 0 °C’de enzim aktivitesinin %41’inin devam ettiğini, 60 °C’de 5 dakika inkübasyon sonunda aktivitenin %90’ını kaybettiğini, Kuddus *et al.* 2008; yeni psikrotolerant bir bakteri olan *C. luteum* ‘dan salgılanan ekstraselüler proteazın aktivitesinin 4-50°C arasında olduğunu ve 4-20°C arasında aktivitenin giderek arttığını, 20°C’ den sonra azaldığını 60°C’de tamamen enzimin inaktif olduğunu tespit etmişlerdir.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Mg<sup>2+</sup>’nin 1mM’lık konsantrasyonda proteaz enziminin aktivitesini %153 arttırdığı; Na<sup>+</sup>’nın 5Mm’lık konsantrasyonunda proteaz enzimi

aktivitesini %113 artırdığı;  $Mn^{2+}$ 'ın 10mM'lık konsantrasyonunda proteaz enzim aktivitesini %69 artırdığı tespit edildi.  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^+$  ve  $Na^+$  1mM'lık konsantrasyonlarında,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  5mM'lık konsantrasyonlarında ve  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Li^+$  'nin 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzimin aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. Literatür çalışmalarına bakıldığında; IMDY proteaz enziminin aktivitesinin 2 mM  $Na^+$  iyonu varlığında %55 arttığı (Mageswari *et al.* 2017); *Bacillus* sp. ZJ1502 proteaz enziminin aktivitesinin  $Mn^{2+}$ 'da %22 oranında arttığı (Ping *et al.* 2018); *B. pumilus* MP27'den saflaştırılan proteazı  $Cu^{2+}$ 'nin inhibe ettiği,  $Ca^{2+}$ 'un ise enzimin aktivitesini artırdığı (Bawej *et al.* 2016); Cucumisın'ın proteazın aktivitesinin  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  ile arttığı en büyük artışın ise 5mM  $CaCl_2$  varlığında 2,35 kat olduğu ve  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  ile aktivitesinin düştüğü (Gagaoua *et al.* 2016); *P. aeruginosa* HY1215 alkalın proteazın  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  ile enzimin aktive olduğu ve  $Ag^+$  (10 mM) varlığında ise tamamen inhibe olduğu (Hao *et al.* 2014); *P. lundensis*'ten saflaştırılan proteazın  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  varlığında güçlü bir şekilde inhibe olduğu,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  varlığında ise aktivitenin düştüğü;  $Na^+$   $K^+$  ve  $Li^+$  varlığında ise aktivitenin korunduğu (Yang *et al.* 2014); *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 proteazının  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  ile aktivitesinin arttığı,  $Cu^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  'nin ise enzimi inhibe ettiği (Yang 2013); psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45 'den saflaştırılan proteazın 5mM  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  varlığında sırasıyla enzim %110,%109,%120 oranlarında aktiviteye sahip olduğunu;  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  metal iyonlarının ise enzimi inhibe ettiğini (Saba *et al.* 201); *P. chrysogenum* FS010'dan ekstraselüler soğuk-aktif alkalın proteazın  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  iyonlarıyla aktivitesinin arttığı,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  'nin ise inhibe ettiği (Zhu *et al.* 2008); psikrotolerant bir bakteri olan *Curtobacterium luteum* 'dan saflaştırılan ekstraselüler proteazın  $Zn^{2+}$  ve  $Cr^{2+}$  gibi metal iyonları varlığında aktivitesinin sırasıyla %136, %152 oranında arttığı fakat  $Co^{2+}$ 'de enzimin %13,5 oranında inhibe olduğu,  $Cu^{2+}$  'nin enzimin aktivitesini etkilemediği (Kuddus *et al.* 2008) tespit edilmiştir. Literatürün aksine *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan proteaz enziminin 10mM'lık  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında inhibe olduğu belirlendi.

*A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzim aktivitesine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan PMSF, SH-grubu inhibitörü olan  $\beta$ -Merkaptoetanol, sistein spesifik inhibitörü ve sülfhidril oksidasyon ajanı olan DTNB, katalitik reaksiyon için gerekli olan metal iyonlarını şelatlayıcı EDTA, sülfhidril, karboksil, imidazol gruplarına bağlanan inhibitör IAA kullanıldı (Alçıçek, E. 2017). Elde edilen veriler sonucunda; enzimin aktivitesinin PMSF inhibitörüyle % 14'e, EDTA inhibitörüyle %52'ye, DTNB inhibitörüyle %3'e, IAA inhibitörüyle %33'e düştüğü ancak  $\beta$ -Merkaptoetanol ile %422 arttığı belirlendi. PMSF ile inhibe olduğu için bu soğuk aktif alkalın proteaz enziminin bir serin proteaz olduğu belirlendi. Yapılan literatür taramasında Mageswari *et al.* 2017; soğuk- aktif IMDY enziminin inhibitörler varlığında ise PMSF ile inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Ping *et al.* 2018; *Bacillus* sp. ZJ1502'den alkalın proteazı enziminin EDTA varlığında %22 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır. Rajagopalan *et al.* 2018; *Wrightia tinctoria* bitkisinden elde edilen proteazlardan süt pıhtılaştırıcı proteazın PMSF ile inhibe olduğundan enzimin bir serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir. Gagaoua *et al.* 2016; Cucumis'in inhibitörlerden PMSF ile inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Hao *et al.* 2014; *P.aeruginosa* HV1215'den saflaştırılan alkalın proteaz enziminin aktivitesinin PMSF inhibitörü ile inhibe edildiğini buldular. Yang *et al.* 2014; *P. lundensis*'ten saflaştırılan proteazın 1 mM EDTA varlığında aktivitesinin %60 oranında inhibe olduğundan bir metalloproteaz olduğunu belirlemişlerdir. Yang 2013; *Halobacillus* sp. SCSIO 20089 suşundan saflaştırılan proteazın EGTA varlığında inhibe olmasına rağmen serin proteaz inhibitörü olan PMSF varlığında inhibe olmadığını göstermişlerdir. Acevedo *et al.* 2012;  $P_6$  'nın 1mM PMSF ile enzimin %90 aktivitesinin inhibe ettiğini rapor etmişlerdir, Zhu *et al.* 2008; *P. chrysogenum* FS010'dan ekstra selüler soğuk-aktif alkalinin EDTA inhibitörü varlığında inhibe olduğunu, sistein inhibitörü olan PCMB,  $\beta$ -merkaptetanol ve IAA varlığında enzimin inhibe olmadığını ancak serin proteaz inhibitörü olan 3mM PMSF ve DFP'de güçlü bir şekilde inhibe olduğunu bu yüzden bu proteazın bir serin proteaz olduğunu ve Kuddus *et al.* 2008; yeni psikrotolerant bir bakteri olan *C. luteum* 'dan salgılanan ekstraselüler proteazın EDTA ve EGTA inhibitörleriyle inhibe olduğu için bir metalloproteaz olduğunu belirlemişlerdir. Serin proteazlar günümüzde endüstriyel amaçlarda kullanılan proteazlar arasında oldukça önemli olup, alkali pH değerlerinde aktif ve geniş bir substrat çeşitliliğiyle farklı ve geniş endüstriyel uygulama alanlarına



sahiptirler (Alpan 2008). Böylelikle serin proteaz olan *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif alkalın proteaz enziminin endüstriyel alanda büyük katkılarının olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında *A. salmonicida* EDT1 suşundan saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda %15 izopropanol'da %126, %50 izopropanolda %25, %50 asetonda %293 oranında enzimin aktivitesinin arttığı; ancak %15 ve %50 metanol, etanol, *t*-bütanol, DMSO varlığında aktivitesini kaybettiği görüldü. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise sadece %50 *t*-bütanolde %152 oranında enzimin aktivitesini artırdığı ancak diğer çözücüler enzimin aktivitesini inhibe ettiği belirlendi. Bu sonuçlara bakıldığında 1 saat için izopropanol ve DMSO'yu tolere edebildiğini ancak 24 saat içinde tolere edemediğini sadece *t*-bütanolde aktivitesi arttığı tespit edildi. Literatür incelendiğinde; IMDY enziminin metanol, hegzan, toluen varlığında sırasıyla enzimin aktivitesinin %40, %80, %60 oranında arttığı tespit edilmiştir (Mageswari *et al.* 2017). Endüstriyel enzimlerin organik çözücüler varlığında stabilite göstermeleri onların bu alandaki kullanımlarını avantajlı hale getirmektedir. Dolayısıyla EDT1 proteaz enziminin de bu özelliğiyle endüstriyel kullanım için oldukça uygun bir enzim olduğu görülmektedir.

*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, TritonX-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda %1 SDS, Tween-20, Tween-80'in enzimi tamamen inhibe ettiği, ancak TritonX-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin varlığında enzimin aktivitesini sırasıyla %77 ve %61 oranında koruduğu belirlendi. %5 Tween-20, Tween-80, TritonX-100'ün enzimi tamamen inhibe ettiği ancak SDS'nin enzimin aktivitesini %236 oranında artırdığı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de enzimin aktivitesinin %15 oranında korunduğu tespit edildi. Literatür incelendiğinde Mageswari *et al.* 2017; IMDY enziminin okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %2, 5 ve 10'luk konsantrasyonlarında sırasıyla %89, %72, %64 aktiviteye sahip olduğunu, yüzey aktif maddelerden 2mM'lik Tween-20 varlığında ise enzimin %144 aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ping *et al.* 2018; *Bacillus* sp. ZJ1502'den alkalın proteaz enziminin aktivitesinin Tween-80 varlığında %31 oranında artış

gösterdiğini, SDS'de ise %33 oranında inhibe olduğunu bulmuşlardır. Baweja *et al.* 2016; *B. pumilus* MP27 'den saflaştırılan proteazın yüzey aktif maddelerden TritonX-100 varlığında %87 oranında aktivitesini devam ettirdiğini tespit etmişlerdir. Hao *et al* 2014; *P.aeruginosa* HV1215'den saflaştırılan alkalın proteazın yüzey aktif maddelerinden olan Tween-40, Tween-80 ve Triton X-100'e karşı iyi bir stabilite gösterdiğini ve okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %0,4 konsantrasyonunda aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Yang *et al.* 2014; *Pseudomonas lundensis*'ten saflaştırılan proteazın yüzey aktif maddelerinden olan %0,1 SDS oranında enzimin aktivitesinin azalmadığını fakat %1 SDS oranında enzimin inhibe olduğunu ; %5 Tween-20 ve Tween-80 varlığında aktivitenin %50 kayba uğradığını ve %1 TritonX-100 'de ise aktivitenin % 30'a düştüğünü ancak okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %1 konsantrasyonunda aktivitenin %124 olduğunu %10 konsantrasyonda ise aktivitenin sadece %73'e düştüğünü tespit etmişlerdir. Acevedo *et al.* 2012; *P<sub>6</sub>* 'nın okside edici ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında *P<sub>6</sub>* kalan aktivitesini %15 olarak belirlemişlerdir. *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin SDS, TritonX-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında aktivitesini önemli ölçüde koruduğu için birçok endüstriyel alanda cazip bir tercih olabileceği düşünülmektedir.

*A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin doğal substratlara olan spesifitesini belirlemek amacıyla %0,65'lik kazein, azokazein, hemoglobin, jelatin ve BSA doğal substratların kullanılmasıyla yapılan aktivite ölçümleri sonucunda enzimin en iyi kazeinde (%100), %95 azokazeinde aktivite gösterdiği ancak hemoglobin ve jelatinde ise sırasıyla %40 ve %49 oranında aktivite gösterdiği BSA'da ise hiç aktivite göstermediği tespit edildi. Literatürde yapılan çalışmalarda soğuk-aktif alkalın proteazların genellikle en yüksek aktiviteye kazein substratı için sahip olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi için kazein varlığında kinetik parametreleri  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-burk grafiği kullanılarak sırasıyla 0,751 mg/mL, 43,29  $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$  olarak hesaplandı. Saba *et al.* 2011; psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45'den saflaştırılan

proteazın kazein substratı kullanılarak  $V_{max}$  (378,0 U/mg) ve  $K_M$  (0,73 mg/mL) değerlerini hesaplamışlardır. Ping *et al.* 2018; *Bacillus* sp. ZJ1502'den alkalın proteaz enziminin kazein için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 16,7 mg/ml, 14,7  $\mu$ g/min.mL olarak belirtmişlerdir.  $K_M$  değerinin literatürdeki diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu ve dolayısıyla substrata olan ilgisinin daha fazla olduğu tespit edildi

Bu tez çalışmasında *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi üzerine ticari olarak satılan katı ve sıvı deterjanların etkisi incelendi. Bunun için Ariel, Alo, OMO, Bingo, Peros markalı katı deterjanlar ile Ariel, Perwoll, Peros markalı sıvı deterjanlar kullanıldı. Bingo ve Perwoll dışında diğer tüm deterjanlarda enzimin aktivitesini %100'den fazla koruduğu tespit edildi. En fazla stabiliteyi ise sıvı deterjanlardan Ariel, katı deterjanlardan Alo deterjan varlığında verdiği belirlendi. Saba, I. *et al* 2011;psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45 'den saflaştırılan proteazın farklı ticari deterjanlar için 15°C 'de 3 saat süren denemeler yapmışlardır ve en iyi sonucu Ariel'de görmüşlerdir. Ayrıca deterjanların çoğunda enzim aktivitesi % 50'den fazla aktivitesini devam ettirdiğini tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi üzerine kan ve çimen lekelerinin giderimi üzerine etkileri araştırıldı. Bunun için; kontrol grubu; pH 9,0 Glisin-NaOH tamponu +saf su /deterjan grubu; 1 mL deterjan + pH 9,0 glisin-NaOH tamponu +saf su / enzim grubu; 1mL enzim+pH 9,0 glisin-NaOH tamponu + saf su oluşturularak kan ve çimen lekeleri üzerine enzimin optimum sıcaklığı olan 10°C'de denemeler yapıldı. 1 saat içinde ıslak ve kurutulmuş kan lekelerinin bulunduğu kumaş parçalarındaki leke giderimi üzerine yapılan muamele de; en iyi sonucun enzim grubunda olduğu ve enzim grubunun iki kan lekesi örneğinde de lekenin tamamına yakınına çıkardığı gözlemlendi. Deterjan grubunda ise ıslak kan lekesinin, kurutulmuş kan lekesine göre daha kolay çıktığı ve gözle görülür bir fark olduğu belirlendi. Kontrol grubunda ise ıslak ve kurutulmuş kan lekesinin giderilmediği görüldü. Aynı şekilde yapılan çimen lekesi gideriminde ise 1 saat içinde en iyi leke gideriminin enzim grubuna nazaran deterjan grubunda olduğu belirlendi. Bu iki farklı sonuçtan yola çıkarak; kan

lekesinin tamamen protein yapıda olmasından dolayı *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enzimi kanda bulunan proteinleri 10°C'de bile aktif bir şekilde parçalarken, çimen lekesi örneğinin tamamen protein yapıda olmamasından dolayı deterjanda bulunan farklı enzim bileşenlerinin çimen lekesi gideriminde daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu durumun çimen lekesi örneğinde enzim grubunun deterjan grubuna göre daha etkin olamaması deterjanda bulunan farklı enzim bileşenlerinin çimen lekesindeki farklı molekülleri parçalayabilmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Literatür incelendiğinde, Baweja, M. *et al* 2016; *Bacillus pumilus* MP27 'den saflaştırılan proteazın yıkama performansı uygulaması için kumaş parçaları üzerine bulaştırılan kan lekelerini; 4-20-50°C'de 15 dakika su+deterjan, su+enzim, gruplarında leke gideriminin, 50°C'de su+deterjan+enzim grubunda en iyi sonucu verdiğini ve 4°C'de ise gözlemlenemeyecek kadar az leke gideriminin olduğunu tespit etmişlerdir. Saba, I. *et al* 2011; psikrotolerant alkalın proteaz üreten bakteri III N-STO45 'den saflaştırılan proteazın en iyi yıkama etkisinin düşük sıcaklıklarda elde edildiğini ve bununda enzimin yüksek sıcaklıklarda bozulabilen giysiler için düşük sıcaklıklarda yıkanmasında kullanılabilir olabileceğini belirtmişlerdir. Bunun için; kontrol olarak su+deterjan deneme olarak enzim+deterjan kullanmışlar ve en iyi sonucu enzim+deterjan'da tespit etmişlerdir. Öztekin; A. 2011; Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) saflaştırılan proteaz enziminin yıkama performansı uygulaması için kumaş parçaları üzerine bulaştırılan kan lekelerini 1 gece boyunca su+tampon, su+tampon+enzim, su+tampon+deterjan gruplarında denemişlerdir. En iyi sonucu su+tampon+deterjan grubunda verdiğini bulmuşlardır. Yapılan bu çalışma kapsamında *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin 10°C gibi düşük sıcaklıklarda kan ve çim lekesini etkili bir şekilde giderdiği görülmektedir. Bu çalışmadan önceki çalışmalarda daha yüksek sıcaklıklarda leke giderimi çalışılmıştır. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda leke giderimini sağlamasıyla EDT1 proteazının; hem enerji tasarrufu açısından hem de giysilerin yüksek sıcaklıklarda yıkanmasından oluşan deformasyonunu engelleyeceği açısından deterjan endüstrisi için önemli bir potansiyele sahip olacaktır.

Özetle; bu çalışmada soğuk su örneklerinden toplamda 10 adet bakteri izole edildi. 16S rRNA gen dizilimi, morfolojik ve fiziksel ve biyokimyasal özellikleriyle

identifikasyonları yapıldı. En yüksek proteaz aktivitesi veren *A. salmonicida* EDT1 suşundan soğuk-aktif alkalın proteaz enzimi ilk kez bu tez kapsamında çalışıldı. Literatür taraması sonucunda yapılan çalışmaların daha çok suşu tanımlama, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirleme, patojenitesi belirleme, taksonomik çalışmalar, bakteriyofaj veya fajlar tarafından infeksiyon çalışmaları ve *A. salmonicida* alt türlerinin mezofilik ve psikrofilik ayrımını yapmak için gen bölgesinin, lipopolisakkarit tabaka farklılıklarına yönelik çalışmalar olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, bu suş üzerinde yapılan enzimler ile alakalı ilk çalışmadır. *A. salmonicida* EDT1 'den alkalın proteaz enzimi TPP yöntemiyle ilk kez saflaştırıldı. %80 amonyum sülfat; 1,0:1,5 (ham enzim çözeltisi: t-Bütanol oranı), pH:7,0'de %244 verimle, 42 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Bu saflaştırma sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında 2-3 kat daha yüksek verim elde edildiği görülmektedir. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH'sının sırasıyla 5°C ve 9,0 olduğu tespit edildi. Literatürdeki soğuk-aktif proteaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarıyla kıyaslandığında, EDT1 alkalın proteaz enziminin çok daha düşük sıcaklıkta aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Aynı zamanda 5-40°C sıcaklık aralığında 1 saat inkübasyon sonucunda enzimin kararlılığını devam ettirmesi ile literatürdeki benzer çalışmalardan daha iyi bir sonuç verdiği tespit edildi. Enzimin pH 9,0-9,5 arasında stabil kaldığı görüldü. Enzim metal iyonları ile farklı konsantrasyonlar da muamele edildiğinde  $Mg^{+2}$ 'ın 1 mM'lık konsantrasyonda proteaz enziminin aktivitesini %153 arttırdığı;  $Na^{+}$ 'nın 5 mM'lık konsantrasyonunda proteaz enzimi aktivitesini %113 arttırdığı;  $Mn^{2+}$ 'ın 10 mM'lık konsantrasyonunda ise enzimin aktivitesini %69 arttırdığı tespit edildi. Yaptığımız çalışmada saflaştırılan soğuk-aktif alkalın proteaz enzime organik çözücülerin etkisi incelendiğinde aseton, izopropanol, t-bütanol'ün enzimin aktivitesini artırdığı, etanol ve DMSO gibi organik çözücüler varlığında ise %80'den fazla kararlılığını devam ettirdiği görüldü. Literatürdeki benzer çalışmalara göre enzimin daha dayanıklı olduğu belirlendi. Okside edici ajan ve bazı yüzey aktif maddeler varlığında enzimin aktivitesinde yüksek kararlılık gözlemlendi. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF ile enzimin tamamen inhibe olması enzimin, serin proteaz olduğunu göstermektedir. *A. salmonicida* EDT1 'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin en iyi substrat spesifitesini kazeine karşı gösterdiği ve  $K_M$  değerinin literatürdeki diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu ve dolayısıyla substrata olan ilgisinin daha fazla olduğu tespit edildi. Enzimin ticari olarak satılan deterjanlar

varlığında stabilitesini koruması onun iyi bir deterjan katkı maddesi olarak endüstriyel alanda kullanım potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca *A. salmonicida* EDT1'den saflaştırılan soğuk-aktif proteaz enziminin biyoteknolojik olarak uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla ıslak/kurutulmuş kan ve çimen lekeli örnekleri üzerine yapılan çalışmada, enzimin bu lekelerin giderimini de literatürlerle kıyaslandığında 1 saatlik inkübasyon sonucunda çok iyi sonuç verdiği gözlemlendi. Sonuç olarak *A. salmonicida* EDT1 soğuk-aktif proteaz enziminin, daha az enerji girişi ve dolayısıyla proses maliyeti için gerekli teknolojileri geliştirmeye çalışan günümüz endüstriyel uygulamaları için kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği; aynı zamanda alkali pH'da yüksek aktivite ve stabilitesi, yüzey aktif maddeler, organik çözücüler ve çeşitli ticari deterjanlar varlığında kararlılığı göz önüne alındığında, EDT1 proteazının özellikle deterjan endüstrisi için de güçlü bir aday olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Acar, D.Ö. 2009. Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi', Adnan Menderes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Acevedo, J.P., Rodriguez, V., Saavedra, M., Mun, M., Salazar, O., Asenjo, J.A. and Andrews, B.A., 2012. Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease, a Centre for Systems Biology, University of Chile, Santiago, Chile, 341-366
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., and Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey, Journal of Microbiological Methods, 321-28.
- Adiguzel, G., Gulluce, M., Bozoglu, C., Yanmis, D., Gormez, A., Atasever, M., and Adiguzel, A., 2012. Molecular Characterization of Escherichia coli O157:H7 from Retail Beef in Erzurum, Turkey, Journal of Pure and Applied Microbiology, 1033-41.
- Adıgüzel, A. 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D. S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. Aaps Pharmscitech, 440-448.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., and Haser, R.. 1996. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of alpha-amylase from the Antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23, Protein Science, 2128-29.
- Akila, G., and Chandra, T. S., 2003. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase, Fems Microbiology Letters, 63-67.
- Alam, S. I., Dube, S., Reddy, G. S. N., Btlattacharya, B. K., Shivaji, S., and Singh, L., 2005. Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp from Schirmacher oasis, Antarctica, Enzyme and Microbial Technology, 824-31.
- Alçiçek, E. 2017. Van İlinden Alınan Sıcak Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* EA10'dan Proteaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP) İle Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Altan, N., 2000. Biyokimya Olgu Yaklaşımı. Palme Yayıncılık, 69-74s, Ankara
- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D., 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus* - Kinetic and structural properties Journal of Biological Chemistry, 2199-206.
- Antony T. V., 2017. Characterization and diversity of phages infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada, 133-232
- Antony T. V., 2018. Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients Correspondence to: S. J. Charette, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Charles-Eugène-Marchand, 1030 avenue de la Médecine, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada, 231-245
- Anwar, A., and Mohammed, S. (1998). Bioresource Technology, 64, 139-144.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi 548.

- Arslan S., 2017, Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Baghel, V. S., Tripathi, R. D., Ramteke, P. W., Gopal, K., Dwivedi, S., Jain, R. K., Rai, U. N., and Singh, S. N., 2005. Psychrotrophic proteolytic bacteria from cold environment of Gangotri glacier, Western Himalaya, India, *Enzyme and Microbial Technology*, 654-59.
- Baltacı, O., Genç, B., Arslan, S., Adıgüzel, A., 2016. Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary.
- Barati, A., Shamsipur, M., Abdollahi, H. Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 470–475, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.073>.
- Bayraktar, H. 2011.  $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Bornova - İzmir.
- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P., Nain, L., and Shukla, P., 2016, An Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional Analysis of Its Binding Model toward Its Applications As Detergent Additive. *Front Microbiology*, 1195.
- Beg, Q. K., and Gupta, R., 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 294–304.
- Bhat, M. Y., Dar, T. A., Singh, L. R., 2016, Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. In *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects Biology*, 3(1), 39–46.
- Birgisson, H., O., Delgado, L. G., Arroyo, R., 2003. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases, *Extremophiles*, 7: 185-93.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Bujacz, A., 2012, Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D*, 68, 1278-1289p.
- Bui, T.T., Park, S.-Y., A carbon dot-hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection, *Green Chem.* 18 (2016) 4245–4253, <https://doi.org/10.1039/C6GC00507A>.
- Cavicchioli, R., K. S. Siddiqui, D. Andrews, and K. R. Sowers. 2002. 'Low-temperature extremophiles and their applications', *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 253-61.
- Collins, T., Meuwis, M. A., Stals, I.M., Feller, G. and Gerday, C., 2002. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization, *Journal of Biological Chemistry*, 35-39.
- Colston, S.M., Fullmer, M.S., Beka. L., Lamy, B., Gogarten, JP., 2014 Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. *MBio.*;51–13.
- Craik, C. S., Page, M. J., and Madison, E. L. 2011. Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*, 435(1), 1–16.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., and Gerday, C., 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life, *EMBO Rep*, 385-9.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K.H., Trudel. M.V., Lafaille, A., Charette, S.J., 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol.* 1–7.
- Deming, J. W. 2002. Psychrophiles and polar regions', *Current Opinion in Microbiology*, 301-09.
- Deng, A., Jie, W., Yun, Z., Zhang, G., and Wen, T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 7100–7106.



- Denner, E. B. M., Mark, B., Busse, H. J., Turkiewicz, M., and Lubitz, W., 2001. *Psychrobacter proteolyticus* sp nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease, *Systematic and Applied Microbiology*, 44-53.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. and Cassidy, C. S., 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 144–151.
- Divakar, K., Priya, J. D. A., and Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 311-18.
- Dube, S., L. Singh, and S. I. Alam. 2001. Proteolytic anaerobic bacteria from lake sediments of Antarctica, *Enzyme and Microbial Technology*, 114-21.
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahn, Antranikian, K., *Curr. Opin. Biotechnol.* 29 (2014)116-223
- Erol, A. 2018. *Enterococcus faecium* A2'den lakkaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Facklam, R. R., Sahn, D. S., Teixeira, L. M., 2002. Standart Laboratory Methods For Identifiyg and Growing Enterococci. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press.. 87-45
- Hao, H. and Sun, M., 2014, Purification and Characterization of a Cold Alkaline Protease from a Psychrophilic *Pseudomonas aeruginosa* HY1215, *Springer Science*, 93-52
- Feller, G. 2003. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 648-62.
- Feller, G., and Gerday, C., 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 830-41.
- Feller, G., O. and Gerday, C., 1998. Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: Assessment of the folding state of a recombinant alpha-amylase, *Applied and Environmental Microbiology*, 1163-65.
- Feller, G., T. Lonhienne, C., Deroanne, C., Libiouille, J., and Gerday, C., 1992. Purification, Characterization, and Nucleotide-Sequence of the Thermolabile Alpha-Amylase from the Antarctic Psychrotroph *Alteromonas-Haloplanctis* A23, *Journal of Biological Chemistry*, 5217-21.
- Fersht, A., 1985. Enzyme structure and mechanism. San Francisco. W. H. Freeman. pp. 50–2.
- Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, M. D., and Sineriz, F., 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 327-32.
- Fornbacke, M., and Clarsund, M., 2013. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infectious Disease Therapeutics*, 2, 15–26.
- Gagaouaa, M., Ziane, F., Rabah, S. N., Boucherba, N., Bouanane-Darenfed ,A., Hafid, K., 2017, Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo* var. *Reticulatus*, Equipe MaQuaV, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine,217-265
- Gagaoua,M., Hafid, K.J., 2016. Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. 2090-4967
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Feller, G. and Gerday. C., 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures, *Fems Microbiology Reviews*, 25-42.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M. A., and

- Feller, G., 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology, Trends in Biotechnology, 103-07.
- Gerike, U., Danson, M. J., Russell, N. J., and Hough, D. W., 1997. Sequencing and expression of the gene encoding a cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium, strain DS2-3R, European Journal of Biochemistry, 49-57.
- Gomes, J., and Steiner, W., 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes, Food Technology and Biotechnology, 223-35.
- Guo, M., Zou, J. W., Yi, P. G., Shang, Z. C., Hu, G. X., Yu, Q. S., 2004. Binding interaction of gatifloxacin with bovine serum albumin. Analytical Science, 465–470.
- Gupta, R., Beg, Q. K., and Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 15–32.
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., and Shirkot, C. K., 2016. Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. Journal of Basic Microbiology, 138–152.
- Gounot, A. M., 1991. Bacterial Life at Low-Temperature - Physiological-Aspects and Biotechnological Implications, Journal of Applied Bacteriology, 386-97.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M., 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavenensis* A21. Purification and characterization, Process Biochemistry, 29-35
- Harley, J.P., Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466.
- Hegeman, A. D., Schulte, C. F., Cui, Q., Lewis, I. A., Huttlin, E. L., Eghbalnia, H., Harms, A. C., Ulrich, E. L., Markley, J. L., and Sussman, M. R., 2007. Stable isotope assisted assignment of elemental compositions for metabolomics, Analytical Chemistry, 6912-21.
- Hough, D. W., and Danson, M. J., 1999. Extremozymes. Current Opinion in Chemical
- Huston, A. L., B. B. Krieger-Brockett, and J. W. Deming. 2000. Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice, Environmental Microbiology, 383-88.
- Janda, JM., and Abbott, SL., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin Microbiol Rev. 35–73.
- Jayakumar, R., Jayashree, S., Annapurna, B., and Seshadri, S., 2012. Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and its applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1849–1866.
- Jeon, J. H., Kim, J. T., Kim, Y. J., Kim, H. K., Lee, H. S., Kang, S. G., Kim, S. J., and Lee, J. H., 2009. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome, Applied Microbiology and Biotechnology, 865-74.
- Johnvesly, B., and Naik, G. R., 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium, Process Biochemistry, 139-44.
- Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Paik, S. R., and Chang, C. S., 2003. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties, Journal of Applied Microbiology, 267-72.
- Joshi, G. K., Kumar, S., and Sharma, V., 2007. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake Nainital, Uttaranchal state, India, Brazilian Journal of Microbiology, 773-79.
- Kalaiyarsan, G., Narendra Kumar, A.V., Sivakumar, C., Joseph, J., 2015. Photoluminescence

- of oligomers of aniline-2-sulfonic acid formed in the presence of AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> and sodium citrate: application in the optical detection of hemoglobin, *Sensors Actuators B Chem.* 883–888,
- Kasana, R. C., and Yadav, S. K., 2007. Isolation of a psychrotrophic *Exiguobacterium* sp SKPB5 (MTCC 7803) and characterization of its alkaline protease, *Current Microbiology*, 224-29.
- Katherine, H. T., 2017. Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns. Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, 1030, avenue de la Médecine, Quebec G1V 0A6, Canada
- Katı, H.; Karaca, B.; Gülşen, Ş.H., 2013. SAÜ Fen Bilimleri Dergisi, 281-90.
- Kaur, S., Vohra, R. M., Kapoor, M., Beg, Q. K., and Hoondal, G. S.. 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 125-29.
- Kaya, E., 2014. Kurutulmuş Nohut Granüllerinden (*cicer arietinum*) β-Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kocaeli
- Kazan, D., Denizci, A. A., Oner, M. N. K., and Erarslan, A.. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 335-44.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. *Biyokimya, Aktif Yayın Evi*, 91-95, İstanbul.
- Keskin, H., 1987. *Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Sti*, 49, İstanbul
- Khairullin, R. F., Mikhailova, A. G., Sebyakina, T. Y., Lubenets, N. L., Ziganshin, R. H., Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., Kostrov, S. V., and Rumsh, L. D., 2009. Oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*. I. Determination of primary structure, isolation, and purification of wild-type and recombinant enzyme variants, *Biochemistry-Moscow*, 1164-72.
- Kim, S. Y., Hwang, K. Y., Kim, S. H., Sung, H. C., Han, Y. S., and Cho, Y. J., 1999. Structural basis for cold adaptation - Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*, *Journal of Biological Chemistry*, 11761-67.
- Kobayashi, T., Lu, J., Li, Z. J., Hung, V. S., Kurata, A., Hatada, Y., Takai, K., Ito, S., and Horikoshi, K., 2007. Extremely high alkaline protease from a deep-subsurface bacterium, *Alkaliphilus transvaalensis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71-80.
- Kristjansson, M. M., Magnusson, O. T., Gudmundsson, H. M., Alfredsson, G. A., and Matsuzawa, H., 1999. Properties of a subtilisin-like proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species - Comparison with proteinase K and aqualysin I, *European Journal of Biochemistry*, 752-60.
- Kuddus, M., and Ramteke, P. W., 2008. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization, *Journal of General and Applied Microbiology*, 385-92.
- Kuddus, M., and Ramteke, P. W., 2011. Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry, *African Journal of Microbiology Research*, 809-16.
- Kuddus, M., and Ramteke, P. W., 2012. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Critical Reviews in Microbiology*, 330–338.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4, *Nature*, 680.

- Larsen, A. N., Moe, E., Helland, R., Gjellesvik, D. R., and Willassen, N. P., 2006. Characterization of a recombinantly expressed proteinase K-like enzyme from a psychrotrophic *Serratia* sp., *Febs Journal*, 47-60.
- Lehninger, A. L., 2005. Principles of biochemistry. New York. Worth Publishers Inc., 148-92
- López-López, O., Cerdan, M.E., Gonzalez Siso M.I., 2014. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15 445–455.
- Maiangwa, J., Ali, Salleh, M.S.M., Rahman, A.B.R., Leow, N.Z.R.A., 2015. *Extremophiles* 235–247.
- Mageswari, A., Subramanian, P., Chandrasekaran, S., Karthikeyan, S., Gothandam, K.M., 2017. Systematic functional analysis and application of a cold-active serine protease from a novel *Chryseobacterium* sp., School of Bio Sciences and Technology, VIT University Vellore 632014, Tamil Nadu, India, Department of Agricultural Biotechnology Vellore 632014, Tamil Nadu, India.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., Minor, W., 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 174-182.
- Margesin, R., Dieplinger, H., Hofmann, J., Sarg, B., and Lindner, H., 2005. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis*-production and properties, *Research in Microbiology*, 499-505.
- Margesin, R., and Schinner, F., 1991. Characterization of a Metalloprotease from Psychrophilic *Xanthomonas-Maltophilia*, *Fems Microbiology Letters*, 257-62.
- Martin-Carnahan, A., and Joseph, S., 2005. *Aeromonadales* ord. nov. In: Brenner D, Krieg N, Staley J, Garrity G, Boone D, De Vos P, editors. *Bergey's Manual® Syst. Bacteriol.* SE - 12. Springer US. 556–87.
- Mavromatis, K., Lorito, M., Woo, S. L., and Bouriotis, V., 2003. Mode of action and antifungal properties of two cold-adapted chitinases, *Extremophiles*, 385-90.
- Merino, S., de Mendoza, E., Canals, R., and Tomás, J. M. 2015. Functional genomics of the *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide O-antigen and A-layer from typical and atypical strains. *Mar. Drugs* 3791–3808
- Merino, S., and Tomás, J. M., 2016. The *Aeromonas salmonicida* Lipopolysaccharide Core from Different Subspecies: The Unusual subsp. *pectinolytica*. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, 315-372
- Moran, A. J., Hills, M., Gunton, J., Nano, F. E., 2001. *FEMS Microbiol. Lett.* 59–63.
- Morihara, K. 1974. Comparative Specificity of Microbial Proteinases, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 179-243.
- Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 144-67.
- Nakagawa, T., Nagaoka, T., Taniguchi, S., Miyaji, T., and Tomizuka, N., 2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes, *Letters in Applied Microbiology*, 383-87.
- Navanietha Krishnaraj, R., David, A., Sani, R. K., 2017. Fundamentals of Enzymatic Processes, in: R.K. Sani, R.N. Krishnaraj (Eds.), *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, Springer International Publishing, Cham 5–29.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Lehninger: Principles of Biochemistry, *WH Freeman and Company*, New York.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2013, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers.
- Nielsen, M. H., Jepsen, S. J., and Outtrup, H., 1981. Enzymes for Low-Temperature Washing, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 644-49.
- Oh, K. H., Seong, C. S., Lee, S. W., Kwon, O. S., and Park, Y. S., 1999. Isolation of a psychrotrophic *Azospirillum* sp. and characterization of its extracellular protease, *Fems Microbiology Letters*, 173-78.

- Okuda, M., Sumitomo, N., Takimura, Y., Ogawa, A., Saeki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., and Ito, S., 2004. A new subtilisin family: nucleotide and deduced amino acid sequences of new high-molecular-mass alkaline proteases from *Bacillus* sp., *Extremophiles*, 229-35.
- Olivera, N. L., Sequeiros, C., and Nievas, M. L., 2007. Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina, *Extremophiles*, 517-26.
- Onat, T., Emerk, K., 1997. *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı, İzmir.
- Özata, A., Kutlu, M., 2000. *Enzimoloji Ders Notları*, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 1254. Eskişehir.
- Öztekin A., 2011. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) bazı vitaminlerle (a, e, c), proteaz enziminin tanımlanması ve enzimin endüstriyel uygulanabilirliğinin 1989. 'Large Increases in General Stability for Subtilisin Bpn' through Incremental Changes in the Free-Energy of Unfolding', *Biochemistry*, 7205-13.
- Pavan, M.E., Abbott, S.L., Zorzópulos, J., Janda, J.M., 2000. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase- positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 1119–24.
- Pawar, R., Zambare, V., Barve, Z., Paratkar, G., 2009. Application of protease isolated from *Bacillus* sp158 in enzymatic cleansing of contact lenses, *Biotechnology*, 276-80.
- Percival, S.L., and Williams, D.W., 2014. Chapter Three - *Aeromonas*. In: Gray of WD (Second E, editor. London: Academic; 49–64.
- Ping Y., Huang, X., Ren, Q., Wang, X., 2018, Purification and characterization of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerant alkaline protease from *Bacillus* sp. ZJ1502, a newly isolated strain from fermented bean curd, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, 149
- Popof, M. and Vieu, J.F., 1970. Bactériophages et lysotypie d'*Aeromonas salmonicida*. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 2219–2222 .
- Price, N. C., 1979. What is meant by 'competitive inhibition. *Trends in Biochemical Sciences* 4: pN272.
- Rahman, R.N.Z., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B., 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: enzyme purification and characterization, *Enzyme and Microbial Technology*: 1484-91.
- Rajagopalan A., Sukumaran B. O., 2018, Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization, Department of Biochemistry, School of Sciences, Jain University, Bangalore, Karnataka, India
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S., 2008. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications, *Process Biochemistry*: 262–68.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 597
- Ravindran, B., Kumar, A. G., Bhavani, P. S. A., and Sekaran, G., 2011. Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste, *Current Science*, 726-30.
- Reith, M.E., Singh R.K., Curtis, B., Boyd, J.M., Bouevitch, A., Kimball, J., 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*. 427
- Rodrigues, D. F., and Tiedje, J. M., 2008. Coping with our cold planet, *Applied and Environmental Microbiology*, 1677-86.
- Russell, R. J. M., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W., and Taylor, G. L., 1998. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium, *Structure*, 351-61.

- Saba I., Parvaiz H. Q., Shabir A. R., Refaz A. D., Qurrat A. Q., Nasier A., Sarojini J., Subash C. T., Sami S., 2011, Purification and characterization of a cold active alkaline protease from *Stenotrophomonas* sp., isolated from Kashmir, India, 275-282
- Sakamoto, T., H. Ihara, S. Kozaki, and H. Kawasaki. 2003. 'A cold-adapted endo-arabinanase from *Penicillium chrysogenum*', *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 70-75.
- Salihi, A., Asoodeh, A., and Aliabadian, M., 2016. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, 827–835.
- Sarmiento, F., Peralta, R., Blamey, J. M., 2015, *Front. Bioeng.* 199
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye*, 550
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., and Jha, B.. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 85-91.
- Skaara, T., Regenstein, J. M., 1990, The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry, and fish, *Journal of Muscle Foods*, 269-291.
- Son, E. S., and Kim, J. I., 2003. Multicatalytic alkaline serine protease from the psychrotrophic *Bacillus amyloliquefaciens* S94, *Journal of Microbiology*, 58-62.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., and Chen, S. T., 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33, *Protein Expression and Purification*, 142-51.
- Storch, M. M., Daggett, V., and Atkins, W. M., 1999. Engineering out motion: Introduction of a de novo disulfide bond and a salt bridge designed to close a dynamic cleft on the surface of cytochrome b(5), *Biochemistry*, 5054-64.
- Strausberg, S. L., Alexander, P. A., Gallagher, D. T., Gilliland, G. L., Barnett, B. L., and Bryan, P. N., 1995. Directed Evolution of a Subtilisin with Calcium-Independent Stability, *Bio-Technology*, 669-73.
- Suzuki, S., and Odagami, T., 1997. Low-temperature-active thiol protease from marine bacterium *Alteromonas haloplanktis*, *Journal of Marine Biotechnology*, 230-33.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., and Esaki, N., 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp strain no. 6, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 144-48.
- Takami, H., Akiba, T., and Horikoshi, K., 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* Sp-No-Ah-101, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 120-24.
- Tariq, A. L., Reyaz, A. L., and Prabakaran, J. J., 2011. Purification and Characterization of 56 KDa cold active Protease from *Serratia marcescens*, *African Journal of Microbiology Research*, 5841-47.
- Temiz, A., 2000. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara
- Temizkan, G., ve Arda, N. 2008. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı. İstanbul
- Tekinşen, O., Atasever, M., Keleş, A., Tekinşen, K., 2002. *Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim Kontrolü*, 2.Baskı. Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Thangam, E. B., and Rajkumar, G. S., 2000. Studies on the production of extracellular protease by *Alcaligenes faecalis*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 663-66.
- Turkiewicz, M., Pazgier, M., Kalinowska, H., and Bielecki, S., 2003. A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*, *Extremophiles*, 435-42.
- Vazquez, S.C., MacCormack, W.P., Rios Merino, L.N., Fraile, E.R., 2000. Factors influencing protease production by two Antarctic strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rev. Argent. Microbiol.*, 53-62.

- Venugopal, M., Saramma, A., 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations, *Indian Journal of Microbiology*: 298-303.
- Villeret, V., Chessa, J. P., Gerday, C., and VanBeeumen, J., 1997. Preliminary crystal structure determination of the alkaline protease from the Antarctic psychrophile *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein Science*, 2462-64.
- Wang, Q. F., Hou, Y. H., Xu, Z., Miao, J. L., and Li, G. Y., 2008. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology, *Bioresource Technology*, 1926-31
- Wang, Q., Hou, Y., Xu, Z., Miao, J., Li, G., 2007. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology, Harbin Institute of Technology, School of the Ocean, Weihai 264209, PR China, Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, PR China.
- Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes. In: *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young Ed., Pergamon Press: Oxford, UK, 789-818.
- Yang, C. Y., Wang, F., Hao, J. H., Zhang, K., Yuan, N., and Sun, M., 2010. Identification of a Proteolytic Bacterium, HW08, and Characterization of Its Extracellular Cold-Active Alkaline Metalloprotease Ps5, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1220-25.
- Yang, J., Li, J., Mai, Z., Tian, X., and Zhang, S., 2013, Purification, characterization, and gene cloning of a cold-adapted thermolysin-like protease from *Halobacillus* sp. SCSIO 20089, Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, China, 282
- Yang, C., Wang, F., Hao, J., Zhang, K., Yuan, N., and Sun, M., 2014. Identification of a Proteolytic Bacterium, HW08, and Characterization of Its Extracellular Cold-Active Alkaline Metalloprotease Ps5, *Yellow Sea Fisheries Research Institute*, China, 821
- Yu, Y., Li, H. R., Zeng, Y. X., and Chen, B., 2011. Bacterial Diversity and Bioprospecting for Cold-Active Hydrolytic Enzymes from Culturable Bacteria Associated with Sediment from Nella Fjord, Eastern Antarctica, *Marine Drugs*, 184-95.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., and Kanekar, P., 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization, *New Biotechnology*, 173-81.
- Zeng, R. Y., Zhang, R., Zhao, J., and Lin, N. W., 2003. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization, *Extremophiles*, 335-37.
- Zhang, Y., Porcelli, M., Cacciapuoti, G., and Ealick, S. E., 2006. The crystal structure of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase II from *Sulfolobus solfataricus*, a thermophilic enzyme stabilized by intramolecular disulfide bonds, *Journal of Molecular Biology*, 252-62.
- Zhu, H. Y., Tian, Y., Hou, Y. H., and Wang, T. H., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010, *Molecular Biology Reports*, 2169-74.

## ÖZGEÇMİŞ

16.06.1992 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul ve liseyi bitirdikten sonra 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü kazandı ve 2015 yılında ilgili bölümden mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

