ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Yasemin CAF

ALKALİ VE TERMOSTABİL KERATİNAZ ÜRETİCİSİ DOĞAL *Bacillus* sp. VE *Streptomyces* sp. SUŞLARINDA GENETİK MANİPÜLASYON İLE ENZİM ÜRETİMİNİN ARTTIRILMASI, ENZIM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL ALANLARDA KULLANILABİLİRLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2015

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alkali ve Termostabil Keratinaz Üreticisi Doğal *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarında Genetik Manipülasyon ile Enzim Üretiminin Arttırılması, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Alanlarda Kullanılabilirliliğinin Araştırılması

Yasemin CAF

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 12/08/2015 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

…….....	……
Prof.Dr.Burhan ARIKAN DANIŞMAN	Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ ÜYE

…….....	…….....	…….....
Prof. Dr.Bilgehan GÜZEL ÜYE	Doç.Dr. Ashabil AYGAN ÜYE	Doç.Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma, Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FEF2012D40) ve Tubitak (Proje: 2211C)Tarafından Desteklenmiştir.

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ALKALİ VE TERMOSTABİL KERATİNAZ ÜRETİCİSİ DOĞAL *Bacillus* sp. VE *Streptomyces* sp. SUŞLARINDA GENETİK MANİPÜLASYON İLE ENZİM ÜRETİMİNİN ARTTIRILMASI, ENZİM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL ALANLARDA KULLANILABİLİRLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Yasemin CAF

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Yıl: 2015, Sayfa: 237
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Doç. Dr. Ashabil AYGAN
: Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU

Alkalin keratinaz; deri işletme, deterjan, tarım ve hayvancılık endüstrisi ile protein hidrolizatlarının üretimi gibi birçok alanda çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Mikrobiyal kaynaklı alkalin keratinaz araştırmaları ile ilgili çok kaynak mevcut olmakla birlikte, düşük maliyetli substrat ile yüksek verimlilikte enzim üretimi için çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Bu çalışmada, alkali ve termostabil keratinaz üreticisi doğal *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. suşlarının izolasyonu, tanımlanması, geliştirilmesi, besiyeri optimizasyonu ve enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu ve endüstriyel kullanılabilirlikleri analiz edilmiştir. Mutasyon çalışmaları sonunda UV mutant C11-UV8 suşunun üreme süresi 2 kat azalırken enzim veriminin 2.7 kat arttığı (1405 U/ml), EMS mutant C1-EMS80 suşunun keratinaz üretiminin 8 kat arttığı ve geniş sıcaklık aralığında ana suşa göre çok daha stabil olduğu saptanmıştır. *Bacillus licheniformis* C11 suşundan izole edilen *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geni, pET22b(+) vektör sistemine klonlanmış ve *E.coli* (*Rosetta-gami (DE3)pLysS*) hücresine transfer edilmiştir. Rekombinant protein (keratinaz) üretimi 18 saat sonunda ana suşa göre 3.3 kat artış göstermiştir (1728 U/ml). Elde edilen verilere göre doğal ve rekominant keratinaz enzimi; deri, deterjan, biyoremediasyon, yem ve tarım gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus sp., Streptomyces sp.,* Keratinaz, Mutasyon, Klonlama

ABSTRACT

PhD THESIS

ENHANCING THE ENZYME PRODUCTION FROM ALKALINE AND THERMOSTABLE KERATINASE PRODUCER NATIVE *Bacillus* sp. AND *Streptomyces* sp. STRAINS BY GENETIC MANIPULATION, AND ENZYME CHARACTERIZATION

Yasemin CAF

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Year: 2015, Pages: 237
Jury :Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
:Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
:Assoc. Prof. Dr. Ashabil AYGAN
:Assoc. Prof. Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU

Alkaline keratinase are widely used in several fields including leather processing, detergents, agricultural-animal industry, and production of protein hydrolysates, etc. Although, there are many researches on microbial alkalin keratinase, the studying about enhanced enzyme production with low cost substrat is still continues intensely.

In this study, natural *Bacillus* sp. and *Streptomyces* sp. strains which are the producer of alkali and thermo-stabile keratinase were isolated, identified and developed. Also, medium conditions, biochemical characterization of enzymes and their industrial usability was analyzed. In mutation studies was detected that while the reproduction time of UV mutant C11-UV8 strain decreased, the enzyme yield increased 2.7 times (1405 U/ml), and keratinase production of the EMS mutant C1-EMS80 strain increased 8 times and is very stable compared to the main strain at wide temperature range. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaze gen was cloned into pET22b(+) vector system and transferred to the *E.coli* (*Rosetta-gami (DE3)pLysS*) cell. Recombinant protein (keratinase) production showed an increase of 3.3 times compared to the main strain at the end of 18 hours. According to the obtained data, native and recombinant keratinase enzyme can be used in several industry area including leather, detergents, bioremiation, feed and agriculture etc.

Key Words: *Bacillus sp., Streptomyces sp*., Keratinase, Mutation, Cloning

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek bilimsel gerekse manevi desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ ve Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e teşekkür ederim.

HPLC çalışamalarımda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Deniz YILDIRIM'a ve deneysel çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilimdalı Doktora ve Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım esnasında maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: FEF2012D40) ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TUBİTAK)'na (Proje no: 2211-C) içten teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bugüne hep en iyi yerlere gelmemi arzulayan ve benden uzakta da olsalar her zaman ilgilerini ve sevgilerini çok yakınımda hissettiğim ve benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, yaşam kaynağım canım babam Ertan CAF'a, canım Annem Hava CAF'a ve manevi desteklerini esirgemeyen canım kardeşlerim Mihriban, Fadime ve Mehmet Caf'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XXII
1. GİRİŞ 1
1.1. Enzimler 2
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 3
1.1.2. Alkalifiller ve Alkalifilik Enzimler 5
1.1.3. Termofiller ve Termofilik Enzimler 6
1.2. *Bacillus* 6
1.3. *Streptomyces* sp 10
1.4. Proteolitik enzimler (Proteazlar) 10
1.4.1. Proteolitik enzimlerin kaynağı 11
1.4.1.1. Mikrobiyal Proteazlar 12
1.4.1.1(1) Bakteriyal Proteazlar 12
1.4.1.1(2) Fungal Proteazlar 12
1.4.2. Proteazların Sınıflandırılması 13
1.4.2.1. Alkalin Proteazlar 15
1.5. Alkalin Proteazlar 15
1.5.1. Keratin Degredasyonu 16
1.6. Keratinolitik Proteazlar 17
1.6.1. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Genel Biyokimyasal Karakteristikleri 17
1.6.2. Keratinolitik Proteazların Kaynağı 18
1.6.3. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Üretimi ve Kültür Koşulları 19
1.7. Proteaz Fermentasyonu ve Üretiminin Geliştirilmesi 20

1.7.1. Fermentasyon Metotları. 21
1.7.2. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Enzim Üretimi. 21
1.7.3. Alkalin Proteazların Klonlanması. 22
1.7.4. SDM (Site-Directed Mutagenesis, Yönlendirilmiş Mutasyon) ve Rastgele Mutasyon (Random Mutagenesis) Çalışmaları. 23
1.8. Keratinolitik Proteazların Potansiyel Uygulamaları. 25
1.8.1. Yem Kaynağı Olarak Keratin Hidrolizatların Hazırlanması. 25
1.8.2. Deriden Kıl/Yün Uzaklaştırma Uygulaması ve Çevresel Kirlilik Kontrolü. 26
1.8.3. Deterjan Uygulamaları. 27
1.8.4. Gümüş Geri Kazanımı. 29
1.8.5. Keratinolitik Proteazların Diğer Potansiyel Uygulamaları. 29
1.9. Elektroforez. 31
1.10. Çalışmanın Amacı. 31
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 33
3. MATERYAL VE METOD 51
3.1. Materyal 51
3.1.1. Besiyerleri. 51
3.1.1.1. N1 Besiyeri. 51
3.1.1.2. LB Besiyeri. 52
3.1.1.3. Tavuk Tüyü Unlu Katı Besiyeri. 52
3.1.1.4. Tavuk Tüylü Sıvı Besiyeri. 53
3.1.1.5. Tavuk Tüyü Unu. 53
3.1.1.6. Skim-Milk Besiyeri. 53
3.1.1.7. M9 Besiyeri. 54
3.1.1.8. Clark-Lubs Besiyeri. 55
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler. 55
3.1.2.1. Keratin Solüsyonu (pH 7.0). 55
3.1.2.2. EMS (Etil Metan Sülfonat). 55
3.1.2.3. dNTP Mix (Dezoksinükleosid trifosfat karışımı) (Promega). 56
3.1.2.4. EtBr (Etidium Bromit). 56

3.1.2.5. Genel Bakteri Primerleri (Iontek). 57
3.1.2.6. Taq DNA Polimeraz. 57
3.1.2.7. 6X Loading Dye Solution (Promega). 57
3.1.2.8. 10X TBE (Tris Borate EDTA) Elektroforez Tampon Çözeltisi. 57
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler. 58
3.1.3.1. Sodyum-Fosfat Tamponu. 58
3.1.3.2. Glisin-NaOH Tamponu. 58
3.1.3.3. Borax-NaOH Tamponu. 59
3.1.4. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Solüsyonlar. 59
3.1.4.1. Solüsyon A. 59
3.1.4.2. Solüsyon B. 59
3.1.4.3. Solüsyon C. 59
3.1.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat) (%10). 60
3.1.4.5. Elektroforez Tamponu (pH 8.3). 60
3.1.4.6. Örnek Tamponu (pH 6.8). 60
3.1.4.7. Boyayı Geri Alma Solüsyonu. 60
3.1.4.8. Renatürasyon Solüsyonu (%2.5). 60
3.1.4.9. Coomassie Brillant Blue R250 (%2.5). 61
3.1.5. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları. 61
3.1.5.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi. 61
3.1.5.2. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25). 61
3.1.5.3. L-prolin (% 1) (w/v), L-Glisin (%1) (w/v), L-Sistein (%1) (w/v), L-Histidin (%1) (w/v) ve L-tirosin (%1) (w/v). 61
3.1.6. HPLC Analizinde Kullanılan Solüsyonlar. 61
3.1.6.1. OPA Reaktifi. 61
3.1.6.2. FMOC-Cl Reaktifi. 62
3.1.6.3. Borat Tamponu (0.4 M; pH 10.6). 62
3.1.6.4. Standart Solüsyonu. 62
3.1.7. Lowry Metodunda kullanılan Solüsyonlar. 62
3.1.7.1. Protein (BSA) Standartı. 63

3.1.7.2. A Solüsyonu. 63
3.1.7.3. B Solüsyonu. 63
3.1.7.4. C Solüsyonu. 63
3.1.7.5. D Solüsyonu. 63
3.2. Metod..... 63
3.2.1. Alkalin ve Termofilik Keratinaz Üreticisi *Bacillus* Sp. ve ……. *Streptomyces* Sp. Suşlarının Izolasyonu ve Katı Besiyerinde ……. Keratinaz Aktivitesi Tayini. 65
3.2.1.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu. 65
3.2.1.2. *Streptomyces* sp. suşlarının izolasyonu. 65
3.2.1.3. Keratinaz Üreten *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Saptanması. 66
3.2.1.4. Sıvı Besiyerinde Keratinaz Aktivitelerinin Saptanması ve Suşların Seçimi. 66
3.2.1.5. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması. 67
3.2.2. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Tanımlama Çalışmaları. 67
3.2.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama. 67
3.2.2.1(1) Gram Boyama. 67
3.2.2.1(2) Katalaz Testi. 68
3.2.2.1(3) Sitrat Testi. 68
3.2.2.1(4) Metil Kırmızısı Testi. 68
3.2.2.1(5) Nişasta Hidroliz Testi. 68
3.2.2.1(6) Voges Proskaver Testi. 68
3.2.2.2. Moleküler Tanımlama. 69
3.2.2.3. 16S rRNA Gen Sekansının BLAST Analizi ve Filogenetik Ağacının Oluşturulması. 70
3.2.3. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma. 70
3.2.3.1. Optimizasyon Çalışmaları. 70

3.2.3.1(1) Farklı konsantrasyondaki (5-10 g/l) Tavuk Tüyünün Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi. 71
3.2.3.1(2) Tavuk Tüylü Ortamda Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi. 71
3.2.3.1(3) pH ve Sıcaklığın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi. 72
3.2.3.1(4) İnokülasyon Miktarının ve İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi. 72
3.2.3.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma. 73
3.2.3.2(1) Enzim Reaksiyonu. 73
3.2.3.2(2) Lowry Metodu. 74
3.2.3.2(3) Tirozin Konsantrasyon Eğrisi. 75
3.2.3.2(4) Enzim Ünitesinin Tanımı ve Hesaplanması. 75
3.2.3.2(5) Tüy Parçalanma Oranının Belirlenmesi (TPO). 76
3.2.4. Rastgele Mutasyon Çalışmaları Yapılarak Keratinaz Ekspresyon Düzeyinin Artırılması. 76
3.2.4.1. EMS (Emil Metan Sülfonat) ile Mutasyon. 76
3.2.4.2. UV ile Mutasyon. 76
3.2.4.3. Pozitif Mutasyon Geçiren Mutant Suşların Belirlenmesi. 77
3.2.4.4. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma. 77
3.2.5. C11 Keratinaz Üretici Genin *E.coli*'ye Klonlanması. 77
3.2.5.1. Hedef Genin Belirlenmesi. 77
3.2.5.2. Vektör Seçimi ve Keratinaz Genlerine Ait Primerlerin Tasarımı. 78
3.2.5.3. PCR İşlemi İçin Dizayn Edilen Primerler ve Özellikleri. 79
3.2.5.4. *Bacillus licheniformis* C11 Suşunun Keratinaz Gen Bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir Reksiyonu) İle Çoğaltılması. 80
3.2.5.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması. 81
3.2.5.6. Konak Hücreden pET22b(+) Plazmid Vektörünün İzolasyonu. 81
3.2.5.7. PCR Ürünü ve Plasmid Vektörünün Restriksiyon

Enzimleri ile Kesimi. 82
3.2.5.8. Ligasyon İşlemi. 83
3.2.5.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması. 83
3.2.5.10. Ligasyon İşleminden Sonra Elde Ettiğimiz Rekombinant DNA'nın Rosetta-Gami (DE3)pLysS'ye Transformasyonu. 84
3.2.5.11. Klonların Seçimi ve Analizi. 85
3.2.5.12. Rekombinant Suşların Keratinli Katı Besiyerinde Analizi. 85
3.2.5.13. pET22b-c11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Ekspresyonu. 86
3.2.5.14. pET22b-c11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Saflaştırılması 86
3.2.6. Doğal (Yabani), Mutant ve Rekombinant Suşlardan Elde Edilen Keratinaz Enzimlerinin Biokimyasal Karakterizasyonu. 87
3.2.6.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması. 87
3.2.6.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Saptanması. 88
3.2.6.3. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin (Termal Stabilite) Saptanması. 88
3.2.6.4. Enzimlerin pH Stabilitelerinin Saptanması. 89
3.2.6.5. Enzim Aktivitesine İnhibitörlerin Etkisi. 89
3.2.6.6. Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi. 89
3.2.6.7. SDS-PAGE Elektroforezinde Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi. 90
3.2.6.8. Enzim Örneklerinin Jele yüklenmesi. 91
3.2.6.9. SDS- PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram analizi. 92
3.2.6.10. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması 92
3.2.6.11. Ham Tavuk Tüyünün Keratinaz ile Muamelesi Sonucunda Elde Edilen Hidroliz Ürününün HPLC Analizi. 92

4. BULGULAR VE TARTIŞMA. 95
4.1. Çalışmada Kullanılacak Suşların İzolasyonu ve Seçimi. 95
4.1.1. Alkalin Termofilik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu. 95
4.1.2. Alkalin Termofilik *Streptomyces* sp. Suşlarının İzolasyonu. 95
4.1.3. Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması ve Suşların Seçimi. 95
4.2. *Bacillus* sp. C11 ve *Streptomyces* sp. C1 Bakterilerinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralıklarının Saptanması. 98
4.3. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Identifikasyon Çalışmaları. 103
4.3.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama. 103
4.3.1.1. Gram Boyama. 103
4.3.1.2. Katalaz Testi. 104
4.3.1.3. Sitrat testi. 105
4.3.1.4. Metil Kırmızısı Testi. 105
4.3.1.5. Nişasta hidroliz testi. 106
4.3.1.6. Voges-Proskauer Testi. 107
4.3.2. Moleküler Tanımlama. 107
4.4. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma. 110
4.4.1. Optimizasyon Çalışmaları. 110
4.4.1.1. Substrat (Tavuk tüyü) Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi. 111
4.4.1.2. Farklı Karbon Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi. 113
4.4.1.2(1) D-Glukoz'un farklı konsantrasyonlarının *Bacillus licheniformis* C11'in Keratinaz Üretimine Etkisi. 116
4.4.1.3. Farklı Azot Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi. 117
4.4.1.3(1) Mayanın farklı konsantrasyonlarının *Streptomyces sp.* C1'in Keratinaz Üretimine Etkisi. 119

4.4.1.3(2) Pepton'un farklı konsantrasyonlarının *Bacillus licheniformis* C11'in Keratinaz Üretimine Etkisi..... 120
4.4.1.4. İnokülasyon Miktarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi..... 120
4.4.1.5. İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi..... 122
4.4.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma..... 125
4.5. Doğal (Yabani) Suşların Enzimatik Özellikleri..... 127
4.6. Doğal (Yabani) Suşlardan Elde Edilen Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu..... 128
4.6.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular..... 128
4.6.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular..... 132
4.6.3. Enzimin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar..... 134
4.6.4. Enzimin pH Stabilitesine Ait Sonuçlar..... 137
4.6.5. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi..... 140
4.6.6. Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkisi..... 142
4.6.7. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar..... 146
4.6.8. Enzimin İnce Tabaka Kromatografisine (TLC) Ait Sonuçlar..... 149
4.7. Rastgele Mutasyon Çalışmaları İle Keratinaz Enziminin Ekspresyon Düzeyinin Artırılması..... 151
4.7.1. EMS (Etil Metan Sülfonat) ve UV ışını ile Pozitif Mutant Suşların Elde edilmesi..... 152
4.7.2. Pozitif Mutasyon Geçiren Mutant Suşların Belirlenmesi ve Kontrole Göre (Ana Suş) En Yüksek Keratinaz Üreticisi Mutant Suş/Suşların Seçimi..... 155
4.7.3. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma..... 160
4.7.3.1. Optimizasyon Çalışmaları..... 160
4.7.3.1(1) Substrat (Tavuktüyü) Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi..... 160
4.7.3.1(2) İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine

Etkisi..... 161
4.7.3.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma. 163
4.7.4. Mutant Suşların Enzimatik Özellikleri. 165
4.7.4.1. Mutant Suşlardan Elde Edilen Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu. 168
4.7.4.1(1) Mutant Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular..... 168
4.7.4.1(2) Mutant Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular..... 170
4.7.4.1(3) Mutant Enzimlerin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar..... 172
4.7.4.1(4) Mutant Enzimlerin pH Stabilitesine Ait Sonuçlar. 173
4.7.4.1(5) Mutant Enzimlerin Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkisi..... 175
4.7.4.1(6) Mutant Enzimlerin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar. 177
4.7.4.1(7) Enzimin İnce Tabaka Kromatografisine (TLC) Ait Sonuçlar..... 179
4.8. *Bacillus licheniformis* C11 Suşuna Ait Keratinaz Üreticisi Genin *E.coli*'ye Klonlanması. 181
4.8.1. Keratinaz Geninin Gen Bankasından Araştırılması. 181
4.8.2. Restriksiyon Enzimlerinin Belirlenmesi. 181
4.8.3. Primer Tasarımı. 182
4.8.4. *Bacillus Licheniformis* C11 Suşunun Keratinaz Gen Bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir Reksiyonu) İle Çoğaltılması. 182
4.8.5. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz genine ait PCR Ürününün Saflaştırılması. 184
4.8.6. Plazmid DNA'nın Izolasyonu ve Saflaştırılması. 185
4.8.7. PCR Ürünü (ker geni) ve Plasmid Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi. 185

4.8.8. Klonların Seçimi ve Analizi 186
4.8.9. Rekombinant Suşların Keratinli Katı Besiyerinde Analizi 187
4.8.10. pET22b-*Bacillus licheniformis* C11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Ekspresyonu 189
4.8.11. Rekombinant Suşlardan Elde Edilen Keratinaz Enzimlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu 190
4.8.11.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması 190
4.8.11.2. *Bacillus licheniformis* C11 Rekombinant Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular 191
4.8.11.3. c11ker Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular 192
4.8.11.4. c11ker Enziminin pH Stabilitesine Ait Bulgular 193
4.8.11.5. c11ker Enzim Aktivitesine Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Etkisi 194
4.8.11.6. c11ker Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar. 195
4.8.11.7. Ham Tavuk Tüyünün Rekombinat Keratinaz İle Muamelesi Sonucunda Elde Edilen Hidroliz Ürününün HPLC Analizi 197
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 201
KAYNAKLAR 215
ÖZGEÇMİŞ 237

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri.. 8
Çizelge 1.2. Mikrobiyal enzimlerin yıllık pazar payları. 10
Çizelge 1.3. Proteazların (Peptidazlar) sınıflandırılması. 14
Çizelge 3.1. Genel bakteri primerleri (İontek: 1204291127-1 ve 1204291127-2). ... 57
Çizelge 3.2. Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması..... 58
Çizelge 3.3. Glisin-NaOH tampon çözeltilerinin hazırlanması. 58
Çizelge 3.4. Protein standartının hazırlanması..... 63
Çizelge. 3.5. VP testi için ayraçların hazırlanışı. 69
Çizelge 3.6. Genel bakteri primerleri: İontek: 1204291127-1 ve 1204291127-2..... 69
Çizelge 3.7. PCR bileşenleri. 69
Çizelge 3.8. PCR koşulları. 70
Çizelge 3.9. PCR bileşenleri. 80
Çizelge 3.10. PCR koşulları. 81
Çizelge 3.11. *XhoI* enzimi ile kesim koşulları. 82
Çizelge 3.12. *NcoI* enzimi ile kesim koşulları. 82
Çizelge 3.13. Ligasyon protokolü. 83
Çizelge 3.14. Ayırıcı jelin içerikleri ve hazırlanışı. 91
Çizelge 3.15. Dengeleyici jelin içerikleri ve hazırlanışı. 91
Çizelge 4.1. *Bacillus sp.* C11 suşuna ait 30-60 ºC'de ve farklı pH değerlerinde (6.0-13.0) sıvı tavuk tüylü besiyerindeki rölatif aktiviteleri. 97
Çizelge 4.2. *Streptomyces* sp. C1 suşuna ait 30-60 ºC'de ve farklı pH değerlerinde (6.0-13.0) sıvı tavuk tüylü besiyerindeki rölatif aktiviteleri..... 97
Çizelge 4.3. *Streptomyces fradiae* C1 için optimum üretim koşulları. 126
Çizelge 4.4. *Bacillus licheniformis* C11 için optimum üretim koşulları..... 126
Çizelge 4.5. Mutant *Bacillus licheniformis* C11 suşları..... 156
Çizelge 4.6. Mutant *Streptomyces fradiae* C1 suşları. 157
Çizelge 4.7. C11-UV8 için optimum üretim koşulları. 164
Çizelge 4.8. C1-EMS80 için optimum üretim koşulları. 164

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *Bacillus* spp. identifikasyon akış şeması. 9
Şekil 3.1. Çalışmanın işlem akış şeması. 64
Şekil 3.2. BSA tüp serilerini hazırlama. 75
Şekil 3.3. pET22b(+) vektörünün dairesel haritası. 79
Şekil 3.4. PAGE sistemi. 90
Şekil 4.2. Tavuk tüyü unlu katı besiyerinde *Streptomyces* sp. kolonileri. 96
Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. C1, C2, C3 ve C4 suşlarına ait pH 6-13 aralığı ve 60°C' de 40 saatlik katı besiyerindeki inkübasyon sonuçları. 100
Şekil 4.4. *Bacillus* sp. C11, C25, C5 ve C8 suşlarına ait pH 6.0-13.0 aralığı ve 55°C de 40 saatlik katı besiyerindeki inkübasyon sonuçları. 102
Şekil 4.5. *Bacillus sp*. C11'in Gram boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü.. 103
Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. C1'in Gram boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü... 104
Şekil 4.7. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için katalaz testi. 104
Şekil 4.8. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için sitrat testi. 105
Şekil 4.9. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için metil kırmızısı testi. 106
Şekil 4.10. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 nin nişasta hidroliz sonucu. 106
Şekil 4.11. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için VP testi. 107
Şekil 4.12. *Bacillus sp*. C11 ve *Streptomyces* sp. C1 suşunun 16S rRNA sekansının PCR ürünün jel görüntüsü. 108
Şekil 4.13. *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait 16S rDNA gen sekansı 109
Şekil 4.14. *Streptomyces fradiae* C1 suşuna ait 16S rDNA gen sekansı 109
Şekil 4.15. *Bacillus licheniformis* C11'in filogenetik ağacı. 110
Şekil 4.16. *Streptomyces* sp. C1'in filogenetik ağacı. 110
Şekil 4.17. Substrat konsantrasyonunun *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi. 112
Şekil 4.18. Substrat Konsantrasyonunun *Streptomyces* sp. C1'in keratinaz üretimine etkisi. 113

Şekil 4.19. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı... 114
Şekil 4.20. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı... 115
Şekil 4.21. D-Glukoz'un *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi. 116
Şekil 4.22. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı nitrojen kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı... 117
Şekil 4.23. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı azot kaynaklarının keratinaz üretimine etkisi. 118
Şekil 4.24. Mayanın *Streptomyces fradiae* C1'in keratinaz üretimine etkisi..... 119
Şekil 4.25. Pepton'un *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz üretimine etkisi. 120
Şekil 4.26. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı inokülasyon miktarlarının keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı..... 121
Şekil 4.27. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı inokülasyon miktarlarının keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı..... 125
Şekil 4.28. İnkübasyon süresinin *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi. 123
Şekil 4.29. İnkübasyon süresinin *Streptomyces fradiae* C1'in keratinaz üretimine etkisi. 124
Şekil 4.30. C11 ve C1 suşlarından kısmi saflaştırma yöntemiyle izole edilmiş enzim çözeltisinin tavuk tüyü unu agar ortamında oluşturduğu aktivite reaksiyonu. 128
Şekil 4.31. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı. 130
Şekil 4.32. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin optim
um aktivite
gösterdiği pH aralığı. 131
Şekil 4.33. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı. 132
Şekil 4.34. *Bacillus licheniformis* C1 keratinaz enziminin optimum aktivite

gösterdiği sıcaklık aralığı. 134
Şekil 4.35. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları.... 135
Şekil 4.36. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları.. 136
Şekil 4.37. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları.. 138
Şekil 4.38. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları.. 139
Şekil 4.39. C11 Keratinaz'ın çeşitli NaCl konsantrasyonlarında stabilite analiz sonucu..... 140
Şekil 4.40. C1 Keratinaz'ın çeşitli NaCl konsantrasyonlarında stabilite analiz sonucu. 141
Şekil 4.41. Çeşitli inhibitörlerin C1 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi. 142
Şekil 4.42. Çeşitli inhibitörlerin C11 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi. 145
Şekil 4.43. *Bacillus licheniformis* C11 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları. ... 146
Şekil 4.44. *Streptomyces fradiae* C1 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları..... 148
Şekil 4.45. *Bacillus* licheniformis C11 keratinaz enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması. 149
Şekil 4.46. *Streptomyces fradiae* C1 enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması. 150
Şekil 4.47. *Streptomyces fradiae* C1 ve *Bacillus licheniformis* C11 suşlarının EMS kullanılarak oluşturulan mutantları. 154
Şekil 4.48. *Streptomyces fradiae* C1 ve *Bacillus licheniformis* C11 suşlarının UV ışını kullanılarak oluşturulan mutantları..... 155
Şekil 4.49. Substrat konsantrasyonunun C11-UV8'in keratinaz üretimine etkisi..... 160
Şekil 4.50. Substrat konsantrasyonunun C1-EMS80 suşunun keratinaz üretimine etkisi. 161
Şekil 4.51. İnkübasyon süresinin C11-UV8 keratinaz üretimine etkisi. 162
Şekil 4.52. İnkübasyon süresinin C1-EMS80 keratinaz üretimine etkisi..... 162

Şekil 4.53. Mutant C11-UV8 kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilmiş enzim çözeltisinin ham tavuk tüyü üzerine etkisi. 165
Şekil 4.54. Mutant C1-EMS80 kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilmiş enzim çözeltisinin ham tavuk tüyü üzerine etkisi. 166
Şekil 4.55. C1-UV8 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı. 168
Şekil 4.56. C1-EMS80 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı..... 169
Şekil 4.57. C11-UV8 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı. 170
Şekil 4.58. C1-EMS80 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı. 171
Şekil 4.59. C11-UV8 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları. 172
Şekil 4.60. C1-EMS80 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları. 173
Şekil 4.61. C11-UV8 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları. 174
Şekil 4.62. C1-EMS80 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları. 175
Şekil 4.63. Çeşitli inhibitörlerin C11-UV8 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi. 176
Şekil 4.64. Çeşitli inhibitörlerin C1-EMS80 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi. 176
Şekil 4.65. C11-UV8 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları. 177
Şekil 4.66. C1-EMS80 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları. 178
Şekil 4.67. C11-UV8 ve C1-EMS80 keratinaz enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması. 179
Şekil 4.68. NcoI ve XhoI Restriksiyon Enzimlerinin tanıdığı nükleotit Dizileri..... 181
Şekil 4.69. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geninin çoğaltılması için dizayn edilen primerlerin dizileri ve özellikleri 182
Şekil 4.70. Genomik DNA Agaroz Jel Görüntüsü..... 183
Şekil 4.71. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geninin PCR ürünü jel Görüntüsü. 184

Şekil 4.72. Restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel analizi 185
Şekil 4.73. Amp^{+}, Cam $^{+}$LB agar besiyerinde gelişen transformantlar (c11-pet22b(+) plazmidini içeren E.coli suşları) ve kontrol. 186
Şekil 4.74. Transformant hücreden izole edilen rekombinant DNA'nın enzimlerle kesilmesi sonucu ortaya çıkan bandların görünümü. 187
Şekil 4.75. C11-3 Rekombinant Suşun Skim-milk Katı Besiyerindeki Proteolitik Hidroliz Zonları 188
Şekil 4.76. Transformant suşun üreme ve besiyeri pH'sındaki değişim grafiği 189
Şekil 4.77. c11ker geninin ekspresyonu..... 190
Şekil 4.78. c11ker enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 191
Şekil 4.79. c11ker enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri..... 192
Şekil 4.80. c11ker enziminin termal stabilite değerleri..... 193
Şekil 4.81. c11ker enziminin pH stabilite değerleri..... 194
Şekil 4.82. Çeşitli inhibitörlerin c11ker Keratinaz aktivitesi üzerine etkisi 195
Şekil 4.83. c11ker keratinaz enziminin zimogram analizi 196
Şekil 4.84. %1'lik (w/v) tirozin standartı için HPLC analiz sonucu..... 198
Şekil 4.85. %1'lik (w/v) glisin standartı için HPLC analiz sonucu 198
Şekil 4.86. %1'lik (w/v) sistein standartı için HPLC analiz sonucu..... 198
Şekil 4.87. %1'lik (w/v) prolin standartı için HPLC analiz sonucu..... 199
Şekil 4.88. 100 µl (7.5 mg/ml ;1728 U/ml) β-keratinaz ile 900 µl %1'lik keratin çözeltisi (w/v), reaksiyon süresi 15 dk.... 199
Şekil 4.89. 100 µl (7.5 mg/ml ;1728 U/ml) β-keratinaz ile 900 µl %1'lik keratin çözeltisi (w/v), reaksiyon süresi 30 dk.... 199

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol
ATPase	: Adenozin Tri Phosphatase
bp	: Base Pair (Baz çifti)
bç	: Baz çifti
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dATP	: Deoksi adenozin trifosfat
dCTP	: Deoksi sitozin trifosfat
dGTP	: Deoksi guanozin trifosfat
dTTP	: Deoksi timidin trifosfat
dNTP	: Deoksiribo Nükletid Tri Fosfat
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen Diamin Tetrasetik Asit
EGTA	: Etilen Glycol Tetrasetik Asit
EMS	: Ethyl Methane Sulfonate
FPLC	: Fast Protein Liquid Chromatography
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nukleik Asit
HPLC	: High Purification Liquid Chromatography
IEF	: İzo Elektrik Fokuslama
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
mL	: Mili litre
MMS	: Methyl Methanesulfonate
ng	: Nanogram
NEM	: N-ethylmaleimide
NTG	: N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguinidine

PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pCMB	: p-chloromercuribenzoate
PMSF	: Phenylmethanesulfonyl Fluoride
rDNA	: Ribozomal DNA
rpm	: Revolution per minute
	Recombination Test)
SDM	: Site Directed Mutagenesis
SDS-PAGE	: Sodium Dodesil Sülphate Poliacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	: Scanning Electron Microscopy
sp	: Species
Taq	: *Thermus aquaticus*
TBE	: Tris-borat EDTA tamponu
TLC	: Thin Layer Chromatography
UV	: Ultra viole

1. GİRİŞ

Ülkemiz hayvancılığı içerisinde en fazla gelişen şüphesiz tavukçuluk sektörü olmuştur. 1986 verilerine göre toplam tavukçuluk işletmeleri sayısı ortalama 7210, ortalama tavuk sayısı ise 60 milyon civarındadır. Günümüzde ticari amaçlı kurulan tavukçuluk işletmeleri ister istemez modernize olmak ve en az 50-100 bin tavuk barındırmak zorundadırlar. Ayrıca yumurtanın çokça tüketilmesi ve kullanım alanının oldukça yaygın olması, tavuk etinin sevilerek ve sağlık açısından risksiz bir şekilde tüketilebilmesi yanında, diğer etlere göre ucuz olması bu sektörün gelişmesine önayak olmuştur.

Gelişen tavukçuluk, beraberinde bazı sorunları da getirmiştir. Tavukçuluk endüstrisinin karşılaştığı en büyük sorunlar arasında, üretim sırasında meydana gelen artıkların çevreye zarar vermesidir. Tavuk üretimindeki artış, çok miktarda gübre, ölü hayvan, kuluçkahane ve kesimhane artıkları gibi maddelerin oluşmasına sebep olmaktadır.

Kesimhanelerde ortaya çıkan artıklar içinde en çok payı tüyler oluşturur. Kesimhanede çıkan tüyler kurutularak öğütülüp yem olarak kullanılabileceği (Proteinin sindirim derecesi düşük olsa da otoklavdan geçirilerek % 80'ne kadar veya enzimatik işlem sonrası sindirim oranı %100 'e kadar çıkanlabilmektedir) gibi çürüdüklerinde yapılarındaki azotu tamamen toprağa bıraktıklarından gübre olarak da kullanılması mümkündür. Kurutularak öğütülmüş tüy unu % 80 ham protein içermektedir. Tüy unu temel bir rasyonda soya unu yerine %2-5 oranında kullanılabilmektedir. Protein ve amino asitlerce elverişli bir rasyona %2-4 oranında tüy unu katılırsa hayvanlarda belirgin bir gelişme görülmektedir.

Tavuk tüyü ve tavuğun diğer atıkları uygun enzimatik metodlarla işlenerek değerlendirildiğinde işletmenin kârına katkıda bulunabilecek kıymetli yan ürünler haline gelebilmektedir. Böylece ekonomik kazanç yanında çevre kirliliğine sebep olması da önlenmektedir (Demirulus ve Aydın, 1996; Kumar ve Takagi, 1999; Gupta ve ark., 2002).

Tüyler, enzimatik hidroliz sonucu hayvan yemi, gübre, yapıştırıcılar ve filmlere dönüştürülebilir veya serin, sistein ve prolin gibi nadir aminoasitlerin üretiminde kullanılabilirler (Onifade ve ark., 1998; Gupta ve Ramnani 2006).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması ve özellikle keratinolitik proteazların biyoteknolojik uygulamalardaki önemi ve giderek artan talep nedeniyle, ticari amaçlar için yeterli miktarda bu enzimlerin üretimine gereksinim duyulmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışındaki diğer ülkeler bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar (Caf, 2012; Saraçoğlu, 2010; Akan, 2010). Ticari enzimler arasında en önemli enzim grubunu proteolitik enzimler oluşturmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999; Gupta ve ark., 2002).

Doğal suşların ürettikleri enzim miktarı düşük olduğundan, suşların geliştirilmesi ve besiyerinin optimizasyonu yapılarak enzim miktarının arttırılması sağlanabilir. Endüstriyel suş geliştirilmesi mikrobiyal fermentasyon işlemlerinin ticari gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır. Enzim üreticilerinin geliştirmiş olduğu suşlar, önemli bir sermaye harcaması olmadan etkili bir üretim için en büyük fırsatı sunmaktadır. Bu fırsat seçilen suşun, minimum düzeyde hammadde kullanarak en yüksek oranda enzim sentezi gerçekleştirdiğinde elde edilebilmektedir (Bisht ve ark., 2012).

Ekonomik bir substrat ile hiper verimli bir organizma herhangi bir fermentasyon sürecinin temel ihtiyacıdır. Mutasyon alkalin proteaz verimini geliştirmede önemli bir role sahiptir (Nadeem ve ark. 2010).

1995 yılı itibariyle endüstriyel enzimlerin dünya genelindeki satışı 1 milyar doları geçtiği, 2005 yılında bu miktarın 1.7-2.0 milyar doları bulduğu tahmin edilmiş ve üretilen bu endüstriyel enzimlerin farklı ülkelerdeki üretim payının % 60'ını Avrupa, diğer % 40'ını da ABD ve Japonya olduğu bildirilmiştir (Bhat, 2000)

1.1. Enzimler

Enzimler; yüksek moleküllü, protein yapısında kompleks organik polimerler olup, genellikle stereo selektif biyokatalizörler şeklinde spesifik etki gösterirler.

Enzimler hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal olmak üzere üç ana kaynaktan elde edilmektedirler. Endüstriyel alanda üretimi, aynı enzimin farklı alanlarda kullanılabilirliği ve uygulamasındaki kolaylık bakımından en önemli grubu mikrobiyal enzimler oluşturmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel uygulamalardaki etkinlikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından farklı alanlarda kullanılmışlardır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin fırıncılık, bira yapımı, alkol üretimi ve peynir yapımı gibi alanlardaki kullanımı Eski Yunan tarihine kadar uzanmaktadır (Haki ve Rakshit, 2003).

Kimyasal katalizörlerin çeşitli olumsuzluklarından dolayı, mikrobiyal enzimlerin birçok endüstriyel uygulamada giderek artan bir hızda yaygın bir kullanımı söz konusudur. Bazı enzimlerin, yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel uygulamalarda soğutma işlemine gereksinim duyulmaksızın yüksek sıcaklıkta ya da düşük sıcaklık gerektiren endüstriyel uygulamalarda ısıtma işlemine gereksinim duyulmaksızın düşük sıcaklıkta aktivite yeteneklerinin olması, enerji ve zaman tasarrufu sağlayarak büyük ekonomik ve pratik yararlar sağlamaktadırlar. Ayrıca enzimler çevre ve insan sağlığına zararsız olup, biyolojik olarak parçalanabilirler ve geri dönüşüm sorunları yoktur.

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılma işlemleri enzim teknolojisi olarak adlandırılır. Enzim teknolojisi, enzimin üretimi, izolasyonu, saflaştırılması ve soluble veya immobilize formlarda kullanımını içermektedir. Ticari olarak enzimlerin üretimiyle modern toplumun karşı karşıya kaldığı birçok önemli problemin çözümüne katkı sağlamak mümkündür. Bunlar arasında tıbbi uygulamalar, gıda üretimi, enerji üretimi ve çevre kirliliğinin eliminasyonu sayılabilir (Caf, 2012; Smith, 2004).

1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

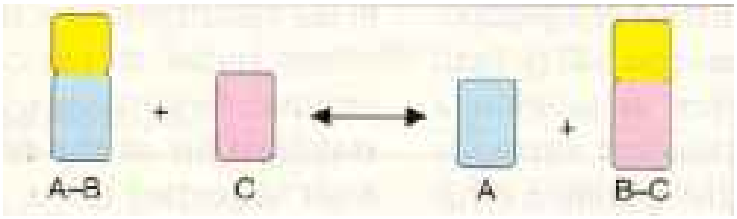
Yeni keşfedilen enzimlerin sürekli artan sayısıyla oluşan karmaşıklığı ortadan kaldırmak için 1961'de Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin

(IUBMB) oluşturduğu enzim komisyonunun raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar;

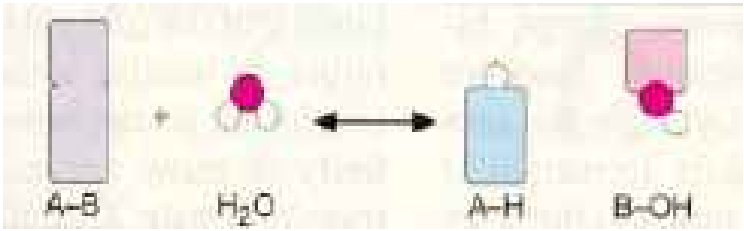
1. Oksidoredüktazlar (sınıf 1): oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını kataliz ederler.



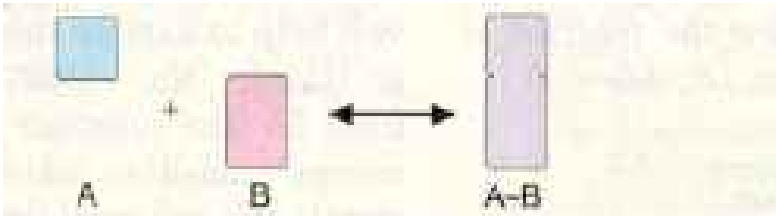
2. Transferazlar (sınıf 2): Metil, acyl, amino, glikosil ve fosfat gibi spesifik grupların bir gruptan diğerine transferini katalize ederler.



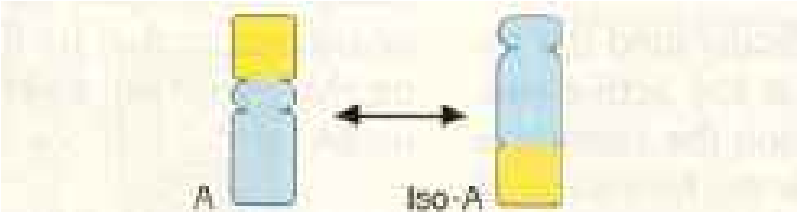
3. Hidrolazlar (sınıf 3): Bir su molekülün ilavesiyle C−O, C−N, C−C ve diğer bazı bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler.



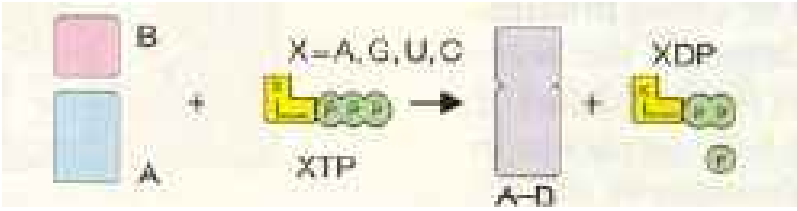
4. Liyazlar (sınıf 4): Hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla bağları kataliz ederler veya yeni bağlar oluştururlar.



5. İzomerazlar (sınıf 5): Bir molekül içindeki geometrik veya yapısal değişiklikleri katalize ederler.



6. Ligazlar (sınıf 6): ATP veya başka bir nukleosid trifosfatta bir pirofosfat bağının hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler.



(Waites ve ark.,2001; Aehle, 2004)

1.1.2. Alkalifiller ve Alkalifilik Enzimler

Alkalifil terimi pH 9.0'un üzerinde, genellikle pH 10.0-12.0 arasında optimum üreyebilen fakat pH 6.0-7.0 aralığında az veya hiç üreyemeyen mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Bazı alkalifillerin üremesi sadece pH 9.0'un üzerindeki pH değerlerinde sınırlıyken (obligat alkalifiller), diğerleri ayrıca nötral pH'ya yakın değerlerde de üreyebilmektedirler (fakültatif alkalifiller). Bu mikroorganizmalar; baterileri, arkea ve ökaryotları kapsamaktadır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen enzimler, özellikle de ekstraselüler enzimler, yüksek pH değerlerinde katalitik aktivite ve stabilite gösterirler. Alkalin enzimler geniş pH aralığında aktivite göstermenin yanı sıra ve nötral enzimlere göre oksidantlara toleranslı olup, termostabil özelliğe sahiptirler. Alkalifilik organizmalar arasında en fazla *Bacillus* sp. türleri karakterize edilmiştir. Alkalifilik *Bacillus* sp. türleri sadece soda gölleri gibi alkalin çevrelerde değil nötral topraklardan izole

edilen bakteriler arasında da en yüksek frekansa sahiptirler. *Bacillus*'lar özellikle endüstriyel alanda kullanılan çok sayıda farklı alkaline özellikte enzim üretme yeteneğine sahiptirler (Fujinami ve Fujisawa, 2010).

1.1.3. Termofiller ve Termofilik Enzimler

Çoğunlukla termofilik organizmalardan izole edilen termofilik enzimler, stabiliteleri nedeniyle pek çok ticari uygulamalarda yer bulmuşturtur. Özellikle ekstrem pH'larda aktif oldukları için deterjan ve organik çözücülerle ilgili uygulamalarda benzersiz avantajlar sağlamaktadırlar (Haki ve Rakshit, 2003). Ayrıca ekstremofilik enzimlerin 60 ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda kullanılması olası mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltması yönünden büyük bir avantajdır (Zamost ve ark., 1991). Termofilik enzimler, yüksek sıcaklıklardaki atıkların arıtılmasında substratların çözülebilirliğini arttırması nedeniyle biyoremediasyonda çok önemlidirler (Mayende ve ark., 2006).

Günümüzde endüstri ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler olmasına karşın, enzimlerin kullanım alanlarının artmasına ve bu alanlarda gerçekleştirilen kimyasal işlemlerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalar nedeniyle bu enzimlerin kullanımları sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle ortaya çıkan gereksinimlere bağlı olarak enzimlerin bahsedilen ekstrem özelliklere sahip olmaları ön plana çıkmıştır. Bundan dolayı son 20 yılda biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak ekstremozimlerin izolasyonları için ekstrem koşullardan elde edilen mikroorganizmalar üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır (Hough ve ark. 1999; Sterner ve Liebel, 2001).

1.2. *Bacillus*

Bacillus çubuk şekilli, gram pozitif, spor formlu, aerobik veya fakültatif anaerobik, çoğunlukla katalaz pozitif, fermantatif veya respiratör mekanizmasıyla kemoorganotrofik bakterilerdir (Holt ve ark, 1994). Ekstraselüler enzimleri

(proteazlar, amilazlar, selülazlar, lipazlar, pektinazlar ve ksilanazlar) üretme yeteneğine sahiptirler. Sodalı toprak, biyokompost, sodalı göl, nötral ortamlar ve deniz dibi sedimenti gibi doğal ile hayvan gübresi ve ayrıca gıda, tekstil, kağıt fabrikası ve deterjan endüstrisi atıkları gibi insan etkisiyle oluşmuş alkalin çevrelerde yüksek sıklıkta bulunurlar. Büyük kısmı patojen olmayıp yüksek düzeyde ekstraselüler enzim üretme kapasitesine sahiptirler.

Bütün bu nedenlerden dolayı *Bacillus* sp. bakterileri alkalifil organizmalar içinde ekstraselüler enzimleri en fazla çalışılmış ve endüstriyel alanda uygulanmıştır. (Fujinami ve Fujisawa, 2010; Martins ve ark, 2001; Horikoshi, 1999; Kumar ve Takagi, 1999). *Bacillus* sp. türlerinin çoğu ekstraselüler enzim sentezleyen alkalifilik *Bacillus* türlerini içermekte olup, genel olarak *Bacillus cereus* dışındakilerin tehlikesiz ve patojenik olmadığı düşünülmektedir. Enzim sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği, izolasyon için hazırlanan katı besiyeri üzerindeki koloni etrafında bir zon oluşup oluşmadığına bakılarak hızlıca değerlendirilebilir. Bu nedenle alkalifilik *Bacillus*' sp. suşlarından izole edilen enzimler toplam endüstriyel enzim pazarının yaklaşık yarısını oluşturmaktadırlar. Buna ek olarak, alkalifilik *Bacillus* sp. türlerinden elde edilen spesifik ekstraselüler enzimler nötral organizmalara göre ekstrem alkali koşullar altında daha aktif ve stabildirler. Bu özelliklerinden dolayı bazı endüstriyel uygulamalarda daha yaygın kullanımı söz konusudur (Martins ve ark, 2001; Haki ve Rakshit, 2003; Fujinami ve Fujisawa, 2010). *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan temel özellikler çizelge 1.1'de verilmiştir.

Bacillus cinsine ait sporlar, vejetatif hücre formlarına oranla besin yetersizliği, ısı, UV, radyasyon, dezenfektanlar ve H_2O_2 gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı çok dirençlidirler. Vejetatif hücrelerdeki endospor şekli, türün özelliğine bağlı olarak terminal, subterminal ve sentral olmak üzere üçe ayrılır. Ayrıca endospor hücrede yine türün özelliğine bağlı olarak şişkinlik oluşturabilir. Sporları ise elipsoidal, yuvarlak, oval, muz veya silindirik şekillerde olabilir. *Bacillus* sporları içten dışarıya doğru gidildikçe öz, iç spor ceketi, dış spor ceketi, korteks ve ekzosporiyum kısımlarından oluşur. Spor protoplastı ve özündeki düşük su içeriği, spor ceketindeki kalsiyum vedipiklonik asit gibi yüksek mineral seviyesi, azaltılmış

spor geçirgenliği ve spor kromozomunun asitle çözünebilen (SASP) bir grup proteinle doyurularak DNA hasarının önlenmesi direncinin nedenleridir. Zor koşullarda spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkalin veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Claus and Berkeley 1986).

Çizelge 1.1. *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri

Özellik	*Bacillus* cinsi
Çubuk şekli	+
Hücre çapı	<2.5µm
Filament	-
Kıvırlmış çubuklar veya filamentlerin varlığı	-
Hareket yeteneği	+
Endospor oluşumu	+
Gram reaksiyonu	+
Zorunlu anaerob üreme	D
Fakültatif anaerob üreme	D
Hemolaktik fermentasyon	D
Sülfatın sülfite reaksiyonu	-
Katalaz aktivitesi	+
Oksidaz aktivitesi	D
Glukozdan asit oluşumu	+
Nitratın nitre redüksiyonu	D
G+C oranı (%mol)	32-69

D: Değişken

Biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik tekniklere göre spor oluşturabilen Gram (+) *Bacillus*'ların taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Tekin, 2008).

Domain = Bacteria (Eubacteria)

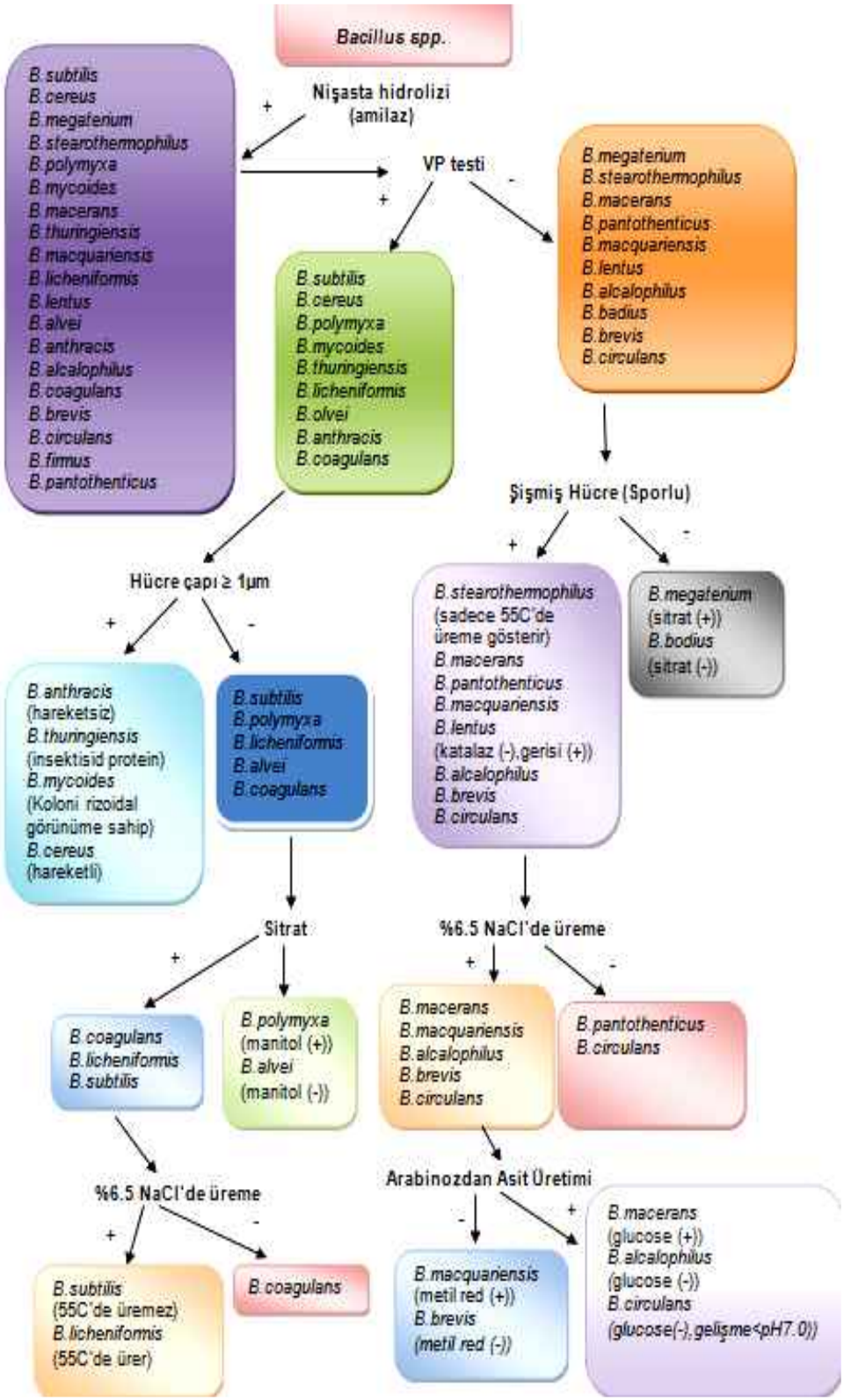
Alem = Firmicutes (Gram (+) Bakteri)

Sınıf = Bacilli

Ordo = Bacillaes

Aile = Bacillaceae

Cins = *Bacillus*



Şekil 1.1. *Bacillus* spp. identifikasyon akış şeması

1.3. *Streptomyces* sp.

Streptomyces filomentöz, gram pozitif, sporları konidya adını alır ve *Bacillus* ve *Clostridium* sporlarından farklıdır ve zorunlu aerobturlar. Koloni yaşlandıkça, besiyerinin yüzeyinde spor meydana getirecek sporofor adı verilen karakteristik bir aeriyal (üst) filament oluşur. Aeriyal filamentlerinin şekli, düzenlenişlerindeki farklılık ve spor taşıyan yapıları, Streptomyces türlerini sınıflandırmada kullanılan temel özelliklerdir. Streptomyces'ler toprak organizmaları olup, çok azı sucul habitatlarda bulunur. Streptomycesler asidik topraklara nazaran alkali ve nötral toprakta gelişmeyi tercih ederler. Topraktan izolasyonları oldukça kolaydır.

1.4. Proteolitik enzimler (Proteazlar)

Proteolitik enzimler sulu ortamda peptid baglarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimlerin bir grubudur (Beg ve ark., 2003) Bu enzimler, enzimlerin hidrolazlar sınıfının altında kategorize edilirler. Proteazlar prokaryot, mantar, bitki ve hayvanları içeren dünyadaki bütün yaşam formlarının temel elemanlarıdırlar ve ticari enzimlerin en önemli gruplarını oluştururlar. Bu enzimler deri, gıda, deterjan, eczacılık, fotografçılık, atık yönetimi v.b. birçok endüstriyel alanda kullanılan enzim grubudur. Alkali proteazlar genis pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadırlar ve bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir paya sahiptirler. Proteaz enzimlerinin yıllık pazar payları Çizelge 1.2'de verilmiştir (Kumar ve Takagi 1999; Gupta ve ark., 2002; Rao ve ark., 2003).

Çizelge 1.2. Mikrobiyal enzimlerin yıllık pazar payları (Rao ve ark., 2003)

Enzim	**Pazar payı (%)**
Alkali Proteazlar	25
Diğer Proteazlar	21
Amilazlar	18
Reninler	10
Analitik Enzimler	10
Karbohidrolazlar	10
Lipazlar	3
Tripsin	3

1.4.1. Proteolitik enzimlerin kaynağı

Proteazlar yaşayan organizmalar için fizyolojik olarak gerektiğinden bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çok farklı canlı gruplarında yaygın olarak bulunurlar. Enzimler bakteri, mantar, virus arkea gibi mikroorganizmalar, çeşitli bitki ve hayvan dokuları tarafından üretilirler (Rao ve ark., 1998).

Bitkilerden proteaz üretimi zaman gerektiren bir işlemdir. Kültür koşullarının devamlılığı ve gelişme için gerekli olan iklim koşulları gibi faktörler bitkisel proteazların kullanımına olan ilgiyi azaltmaktadır. Papain, bromelin, keratinaz ve fisin gibi proteazlar iyi bilinen bitki orijinli proteazlardır. Hayvansal orijinli proteazları pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin oluşturmaktadır. Bu proteazlar büyük hacimlerde fazla miktarda saflaştırılabilmektedir.

Ancak bu durum, proteazların üretimi için fazla miktarda çiftlik hayvanının kesimi gerektirdiğinden tarımsal politikalara bağlı olarak yönlendirilmektedir. Bitkisel ve hayvansal proteazların elde edilmesindeki kısıtlamalar nedeni ile mikrobiyal proteazlara karşı ilgi tüm dünyada artmaktadır.

Proteaz kaynağı olarak bitki ve hayvan kaynakları ile kıyaslandığında mikroorganizmalar en çok tercih edilen kaynaklardır. Bu durum, onların kısa kültivasyon zamanına sahip olması, kültivasyon için küçük bir alana gereksinim duymaları ve basit bir şekilde genetik manipülasyonlarının yapılmasından kaynaklanmaktadır. Üstelik mikroorganizmalardaki enzimlerin çoğu ekstraselüler olup organizmanın yıkıma gerek yoktur (Rao ve ark., 1998).

Dünyadaki mevcut talebi karşılamak için bitki ve hayvan proteazlarının yetersiz olduğu dikkate alındığında mikrobiyal proteazlara karşı ilgiyi daha da arttırmak için radikal bir değişikliğe ihtiyaç vardır.

Biyokimyasal çeşitlilikkleri ve genetik manupulasyonlara olanak sunması nedeni ile mikroorganizmalar uygun proteaz kaynaklarıdır. Mikrobiyal proteazlar dünya piyasasındaki enzim satışlarının yaklaşık olarak % 40'ını kapsamaktadır.

Endüstri ve biyoteknolojideki önemleri ve mikroorganizma kaynaklı proteazların biyoteknolojik metodlarla elde edilmesini sağlayan özellikleri nedeni ile

bakteri ve mantar proteazları önemli derecede çalışılmıştır (Deshpande ve ark., 1998).

1.4.1.1. Mikrobiyal Proteazlar

1.4.1.1.1. Bakteriyal Proteazlar

Ticari proteazların birçoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalin olarak üretilmektedirler. Bakteriyal nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında aktivite göstermektedir ve termal protazlara kıyasen termal stabiliteleri düşüktür. Nötral proteazlar, gıda endüstrisinde hayvan proteazlarına göre daha fazla tercih edilmektedir. Bunun nedeni aktivite gösterdikleri pH aralığı ve hayvansal proteazlara göre hidrolize edilmiş gıda proteinlerinde daha az acı tat oluşturmalarıdır. Bakteriyal alkalen proteazlar pH 10.0 gibi alkalin koşullarda yüksek aktivite göstermeleri ve geniş substrat spesifikliğine sahip olmaları ile karakterize edilmişlerdir. Bakteriyel Proteazların optimal sıcaklıkları genellikle 60 °C civarındadır. Bakteriyel alkalin proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi için uygun kılmaktadır (Deshpande ve ark., 1998).

1.4.1.1.2. Fungal proteazlar

Funguslar, bakterilere göre çok daha çeşilit enzimler üretebilmektedirler. Örneğin; *Aspergillus Oryzae* asidik, nötral ve alkalen proteaz üretebilmektedir. Fungal proteazlar pH 4.0-11.0 gibi çok geniş pH aralığında aktivite sergilemektedir ve oldukça geniş bir substrat spesifikliğine sahiptirler. Ancak, fungal proteazların reaksiyon hızları ve termoltoleransları daha düşüktür.

Fungal asit proteazlar pH 4.0-4.5'da optimum aktivite gösterirler ve asidik pH (2.5-6.0) aralığında stabildirler. Dar pH ve sıcaklık özellikleri nedeni ile peynir endüstrisinde kullanılırlar. Fungal alkalen proteazlar gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılmaktadırlar (Deshpande ve ark., 1998).

1.4.2. Proteazların Sınıflandırılması

Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğinin (IUBMB) oluşturduğu enzim komisyonunun raporuna göre proteazlar hidrolazlar olarak adlandırılan 3. Grubun 4. Alt grubunda sınıflandırılmışlardır. Proteazlar çok geniş etki mekanizmaları ve yapısal çeşitlilikleri nedeni ile genel enzim adlandırma sisteminde diğer enzim sınıfları gibi sınıflandırılamamaktadır.

Proteazlar;

- Kataliz ettikleri reaksiyon tipi,
- Katalitik bölgenin kimyasal yapısı,
- Yapılarıyla ilgili evrimsel ilişki
-

şeklinde 3 ana kritere göre sınıflandırılmışlardır.

Proteazlar katalize ettikleri reaksiyon tipine göre;

- Ekzopeptidazlar
- Endopeptidazlar

olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Nduvimana ve ark., 1995; Rao ve ark., 1998).

Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucu tarafındaki peptid bağını parçalarken endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit baglarını hidroliz ederler.

Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre (Aktif bölgelerindeki fonksiyonel amino asit köküne göre dört ana grupta sınıflandırılırlar);

- serin proteazlar (EC 3.4.21),
- sistein proteazlar (EC 3.4.22),
- aspartik proteazlar (EC 3.4.23) ve

· metallo proteazlar (EC 3.4.24) seklinde sınıflandırılmıslardır.

Standart sınıflandırmaya uymayan az sayıda farklı proteazlar da bulunmaktadır. Örneğin; ATP-bağımlı proteazlar aktivite gösterebilmek için ATP'ye ihtiyaç duymaktadırlar.

Amino asit sekansları temel alındığında proteazlar dört familyada sınıflandırılır ve evrensel ataları olan peptidazlara göre familyalar klan olarak adlandırılan alt gruplara ayrılır. Her peptidaz ailesi katalizlediği reaksiyonu simgeleyen kod harfine sahiptir. Örneğin; 'S' serin proteazlar, 'C' sistein proteazlar, 'A' aspartik proteazlar, 'M' metalloproteazlar ve 'U' bilinmeyen tip proteazı simgelemektedir (Deshpande et al 1998). Buna göre, bazı proteazların bu sınıflandırmadaki yeri Çizelge 1.3.'te verilmistir.

Çizelge 1.3. Proteazların (Peptidazlar) Sınıflandırılması

E.C. numarası	**Proteaz Tipi**	**Etki**
Exopeptidaz		
3.4.11	Aminopeptidaz	Serbest N-terminal uca etki eder
3.4.13	Dipeptidaz	Sadece dipeptidlere etki eder
3.4.14	Dipepyil peptidaz Tripeptil peptidaz	Serbest N-terminal dipeptid uca Serbest N-terminal dipeptid uca
3.4.15	Peptidil dipeptidaz	Serbest C-terminal dipeptid uca
3.4.16	Karboksipeptidaz (serin)	Serbest C-terminal uca etki eder (aktif bölgede serin aminoasit)
3.4.17	Karboksipeptidaz (metallo)	Serbest C-terminal uca etki eder (metal gerektiren proteaz)
3.4.18	Karboksipeptidaz (sistein)	Serbest C-terminal uca etki eder (aktif bölgede sistein aminoasit)
3.4.19	Omega peptidaz	Amino uçlarındaki peptit baglarının hidrolizini katalize eder
Endopeptidaz		
3.4.21	Serin endopeptidaz	aktif bölgede serin aminoasit
3.4.22	Sistein endopeptidaz	aktif bölgede sistein aminoasit
3.4.23	Aspartik endopeptidaz	aktif bölgede aspartat aminoasit
3.4.24	Metallo endopeptidaz	metal gerektiren proteaz
3.4.99	Katalitik mekanizması bilinmeyen Endopeptidaz	

Ayrıca proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralıgına göre de asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmıslardır (Nduvimana et al. 1995; Rao et al. 1998.)

1.4.2.1. Alkalin Proteazlar

Alkalin proteazlar nötral-alkalin ortam pH'sına doğru aktif olan enzimler olarak tanımlanırlar. Bu enzimler bakteri, küf ve mayaları içeren mikroorganizmaların büyük bir kısmı tarafından üretilirler. Singh ve ark., 2001). Bakteri orijinli alkali proteolitik enzimler dünyadaki endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 60'ını oluşturan çok önemli endüstriyel enzimlerdir (Enshaasy ve ark., 2008). Bu enzimler biyoteknolojinin bir kaç alanında bir çok uygulamaya sahip olup biyokimyasal farklılıkları nedeniyle tabakhane (deri endüstrisi), gıda endüstrisinde, tıbbi formülasyonlarda, deterjanlarda, atık arıtma işlemlerinde, gümüşün tekrar elde edilmesinde ve aminoasit karışımlarının ayrıştırılması gibi bir çok endüstride geniş kullanım alanları vardır (Gupta ve ark., 2002; Agrawal ve ark., 2004).

Alkalin proteazların optimum pH aralığı genelde pH 9.0 ve 11.0 arasındadır, fakat pH 11.5 (Tobe ve ark., 1975; Takami ve ark., 1990), pH 11.0-12.0 (Kumar, 1997; Horikoshi, 1971), pH 12.3 (Kobayashi ve ark., 1995) ve pH 12.0-13.0 (Fujiwara ve ark., 1999) olan daha yüksek optimum pH değerlerinin olduğu birkaç istisna vardır. Kumar ve Takagi (1999)'nin belirttiği gibi alkalin proteazların optimum sıcaklık aralığı 50-70 ºC arasındadır. Bakteriyel alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisinde kullanımları için uygun hale getirmektedir (Rao ve ark., 1998). Fakat, alkalofilik Bacillus sp. B189'dan elde edilen enzim 85 ºC'de ve Fervidobacterium islandicum AW-1'de ise 100 ºC'de sıradışı optimum sıcaklıkta aktivite göstermiştir (Nam ve ark., 2002).

1.5. Keratin

Keratince zengin polipeptid atıklar, hidrojen ve hidrofobik bağlar ile birtakım disülfit bağlarının eklenmesiyle güçlü bir şekilde sabitlemiş ve sıkışık olarak pakatlenmiş olduğundan degrade olması (parçalanması) çok güçtür (Brandelli, 2008). Keratinin kendi aminoasit bileşenlerinin bileşimi ve moleküler konfigürasyonu yapısal sabitliliğini temsil etmektedir (Cohlberg, 1993).

Keratin zinciri süperkoil polipeptid zincirinde α-heliks veya β -tabaka olarak sıkıca paketlenmesi pepsin, tripsin ve papain gibi ticari proteolitik enzimlere karşı mekanik stabilite ve direnç oluşturmuştur (Parry ve North 1998; Kreplak ve ark., 2004).

Keratinler fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların etkilerine son derece dayanıklıdırlar. Keratinlerin yüksek mekanik stabiliteleri ve proteolitik parçalanmaya karşı direnci onların yapılarındaki disülfit bağları, hidrojen bağları, tuz bağlantıları ve diğer çapraz bağlar sayesindedir (Kunert, 1973; Kaluzewska ve ark., 1991).

Keratin bitişik polipeptid zincirlerini çapraz bağlarla bağlayan disülfit bağlarından oluşmuş sistein rezidüleri bakımından zengindir. Keratinler içeriğindeki sulfure bağlı olarak sert (%5 sülfür) ve yumuşak (%1 sülfür) olarak gruplandırılabilir. Sert keratinler yüksek oranda disülfüt bağ içeriği olan deri, saç, toynak ve tırnak benzeri yapılarda bulunurlar. Oysa ki yumuşak keratinler düşük disülfit bağ içeriği olan deri ve kallusta (çevresel koşullara bağlı olarak sertleşmiş deri, nasır) bulunurlar (Voet ve Voet, 1995). Bununla birlikte keratinler memelilerde α- keratin veya kuş ve sürüngenlerde β-keratin olarak bulunurlar (Voet ve Voet, 1995) (Letourneau ve ark., 1998; Rouse ve Van Dyke, 2010).

1.5.1. Keratin Degredasyonu

Keratini protein hidrolizatlarına çevirmek için 2 yaklaşım vardır. Bunlardan biri hidrotermal diğeri ise biyolojik muamelelerdir (Eggum, 1970; Papadopouos, 1986). Hidrotermal süreç çoğunlukla asit veya baz varlığında yüksek buhar basıncı (10-15 psi) ve/veya yüksek sıcaklıkta (80-140 ºC) gerçekleşir (Gousterova ve ark., 2003). Dünya genelinde, ticari kümes hayvancılığıyla her yıl buhar basıncı ve kimyasal işlemlerle yeme dönüştürülebilecek milyonlarca ton kuştüyü atığı oluşmaktadır (Shih, 1993). Yüksek maliyeti, yüksek enerji girişine gerek duyulması (Papadopoulos ve ark., 1986), temel amino asitlerin (Lysine, Methionine and Tryptophan) kaybı ve Lycinoalanine ve Lanthinonine gibi besleyici olmayan amino asitlerin oluşumu (Wang ve Parsons, 1977) bu işlemin temel eksikliğidir. Oysa ki,

keratin atıklarının mikrobiyal olarak parçalanmasının; ekolojik olarak güvenli olması, düşük maliyet, hafif reaksiyon koşulları, tüy keratinlerinin amino asit mevcudiyetini önemli derecede arttırabilen mikrobiyal keratinazlar ile muamele edilmesi sonucu kuş tüyü yeminin besleyiciliğini arttırması nedeniyle tüylerin kullanımını iyileştirmede uygulanabilir bir alternatif sağlar (Odetallah ve ark., 2003; Grazziotin ve ark.,2006).

1.6. Keratinolitik Proteazlar

Keratinolitik proteazlar bakteri (Williams ve ark., 1990) ve mantarların (Friedrich ve ark., 1999) keratin parçalayan türleri tarafından üretilen proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler tavuk tüyü, insan ve hayvan saçı, hayvanların boynuz ve yünlerinde bulunan çözülmez bir protein olan keratini parçalama özelliğine sahiptirler (Onifade ve ark., 1998). Keratinolitik proteazların çoğu sadece keratini hidrolize eder, fakat *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen keratinolitik proteaz gibi bazı enzimler birkaç protein substratlarını da hidroliz etme özelliğine sahiptir (Lin ve ark., 1992).

Keratinolitik enzimler keratinler üzerinde aktiftir (Rao ve ark., 1998). Ancak keratinolizisin tam mekanizması tamamen anlaşılamamıştır. Keratinolitik mikroorganizmaların tüm keratini parçalama verimliliğinin var olması sadece keratinolitik proteazın kullanımıyla değildir, burada aynı zamanda bu organizmalar tarafından üretilen keratinolitik proteazlar ve disülfit redüktazların birlikte etki göstermesindendir.

Disülfit bağlarını indirgeyen faktörlerin varlığında keratin kullanan mikroorganizmalar var olsa da keratin parçalaması ile ilgili olan disülfit bağlarını indirgeyen enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonuna kimse odaklanmamıştır (Yamamura ve ark., 2002). Vibrio kr2 suşu ile tüy keratini kullanılarak yapılan hidroliz işleminde tiol oluşumunun disülfit redüktaz varlığında gerçekleştiği bildirilmiştir. (Sangli ve Brandelli, 2000).

1.6.1. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Genel Biyokimyasal Karakteristikleri

Mikrobiyal keratinolitik proteazlar ağırlıklı olarak ekstraselüler, optimum pH'sı 7.5-9.0 arasında olan alkaline veya nötral proteazlardırlar. Ancak, bunlardan bazıları bu pH aralığı dışında ekstrem alkali pH'ta optimal aktivite gösterirler (Kobayashi ve ark., 1995). *Streptomyces pactum* DSM 40530, *Streptomyces sp*. SK1-02, Scopulariopris brevicaulis, *B. licheniformis* and K. rosea tarafından üretilen keratinolitik proteazlar 40 ve 50 ºC arasındaki optimum sıcaklıklara sahiptirler (Bockle ve ark., 1995; Letourneau ve ark., 1998; Bressollier ve ark., 1999; Bernal ve ark., 2006). Bu enzimlarin optimal sıcaklık değerleri organizmaların kaynağı ve orijini nedeniyle 30 ºC'den 80 ºC'ye kadar değişebilir. Fakat, Alkalifilik Bacillus sp. B189'ten elde edilen enzim 85 ºC, Fervidobacterium islandicum AW-1 keratinazı ise 100 ºC'lik değerinde optimum aktivite gösterir (Nam ve ark., 2002).

Birkaç keratinolitik proteazın moleküler ağırlığı belirlenmiştir ve bunların 18 kDa ile 240 kDa arasında oldukları bulunmuştur. Fakat bu enzimlerin çoğunun ağırlıkları sıklıkla 50 kDa'dan daha azdır. Daha yüksek molekül ağırlık, genellikle metalloproteaz özelliğindeki keratinazlar veya termofilik organizmlar tarafından üretilenler ile ilişkilidir (Brandelli ve ark., 2010). Ca^{2+}, Mg^{2+}, and Mn^{2+}gibi divalent metal iyonlarının varlığı keratinolitik proteaz aktivitesini genellikle stimüle eder. Buna karşılık Cu^{2+}, Ag^{2+}, Hg^{2+}, and Pb^{2+}gibi geçiş ve ağır metaller genellikle keratinolitik enzimlerin inhibisyonuna neden olurlar (Brandelli ve ark., 2010).

Bugüne kadar bildirilen mikrobiyal keratinolitik proteazların çoğu, spesifik substratlar ve inhibitörler tarafından belirlenen serin proteaz ailesine aittir (Lin ve ark., 1992). Fakat günümüzde keratinolitik metaloproteazlar hakkında raporlar mevcuttur ve bunların çoğu gram negatif bakterilerle ilişkilidir. Gram negatif baktari *Chryseobacterium* sp. kr6 tarafından üretilen keratinolitik proteaz 1,10-phenanthroline tarafından inhibe edildiği için metaloproteaz tipine aittir (Riffel ve ark., 2003). Tatineni ve ark. (2008)'nın bildirdiği gibi doğada *Streptomyces* sp. S7 tarafından üretilen ve serin metallo olan keratinolitik proteaz olağan üstü bir karakter gösterir. Tartışmada kullan!!!!

1.6.2. Keratinolitik Proteazların Kaynağı

Keratinolitik proteazlar bitki dokularından ve özellikle keratinöz materyallerin depolandığı toprak ve sucul çevrelerde bulunan bakteri, mantar ve aktinomisetlerin dahil olduğu birkaç mikroorganizma türünden de elde edilebilirler (Rao ve ark., 1998). Aspergillus sp. ve *Rhizomucor sp.* (Friedrich ve ark., 1999), *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton gallinae, Microsporum canis ve Microsporum gypseum* (Wawrzkiewicz ve ark., 1991) keratinolitik proteaz üretebilen mantarların farklı türleridir. Keratinolitik aktivitenin en fazla bulunduğu Bacillus türleri arasında B. licheniformis ve B. subtilis (Lin ve ark., 1992; Lin ve ark., 1999; Suh ve Lee., 2001) türleri ön plana çıkmaktadır. S. albidus E4 ve S. griseoaurantiacus E5 (Amany ve ark., 2009), *S. albus* AZA (Esawy, 2007), *S. pactum, S. albus, S. thermoviolaceus, ve S. albidofla*vus (Bressollier ve ark., 1999) gibi *Streptomyces*'ler keratinolitik proteaz üretebilen bakteriyel türlerdir. Keratinolitik proteazların kaynağı olarak *Vibrio* sp.'sin tüy parçalayan suşlarını içeren gram negatif bakterilerin olduğunu gösteren birkaç çalışma vardır (Sangali ve Brandelli, 2000). Benzer şekilde, Riffel ve Brandelli (2006) nin yapmış olduğu diğer bir çalışmada da çürümüş tüy ortamından çoğunlukla keratinolitik enzim sentezleyen gram negatif bakterilerin izole edildiği bildirilmiştir.

1.6.3. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Üretimi ve Kültür Koşulları

Keratinolitik proteazlar, literatürde durgun batık fermentasyonla üretildiği raporlanan birkaç termofilik bakteri (Nam ve ark., 2002) ve mantar (Singh, 1999) dışında çalkalama batık kültür koşulları altında üretilirler. 2006 yılına kadar keratinolitik proteaz üretimi için katı faz üzerinde fermentasyonun olduğu raporlarlanmamıştır (Brandelli ve ark., 2010). Ancak, son zamanlarda katı faz fermentasyonuna rağmen keratinolitik enzimlerim bu koşullarda üretiminin olduğu bildirilmiştir (Gioppo ve ark., 2009).

Keratinolitik proteazlar keratinöz substrat ile birlikte büyük ölçüde bazal medyumda (mineral tuzlar) üretilirler. Keratinolitik mikroorganizmaların çoğu karbon ve azotun tek kaynağı olarak keratini kullanma kapasitesine sahiptir (Lin ve ark., 1999). Ancak keratinolitik proteaz üretimi için keratinöz bir substratın katılması her zaman gerekli değildir (Cheng ve ark., 1995; Kim ve ark., 2001). Diğer keratinöz olmayan maddeler keratinolitik proteazların üretimi için indükleyici olarak iş gördükleri bildirilmiştir (Brandelli ve ark., 2010).

Farklı karbon ve/veya azot kaynakları ile birlikte keratin içeren medyumun takviyesi yüksek seviyede keratinolitik proteaz üretimi ile sonuçlanabilir. Örneğin, karbon kaynağı olarak glukoz (Ramnani ve Gupta, 2004), maltoz şurubu (Cheng ve ark., 1995) ve pulp (Gioppo ve ark., 2009), nitrojen kaynağı olarak da pepton, maya akstraktı, üre, tripton, amonyum klorid ve sodyum nitrat gibi maddelerin ilavesi keratinolitik proteazların verimini arttırdığı bildirilmiştir (Ramnani ve Gupta, 2004). Buna karşılık karbonhidratlar, inorganik ve/veya organik nitrojen kaynaklarının ortama gereğinden fazla eklenmesi katabolit baskılama mekanizmaları nedeniyle mikroorganizmaların keratinolitik proteaz üretiminin azalmasına sebep olurlar (Gioppo ve ark., 2009). Tartışmaya

1.7. Proteaz Fermentasyonu ve Üretiminin Geliştirilmesi

Enzim üretimi ve sonraki işlemlerin toplam maliyeti enzim endüstrisindeki her bir teknolojinin başarılı uygulamasına karşı büyük bir engeldir. Bu nedenle optimum maliyetlerin mümkün olduğunca düşürülmesi yöntemlerin başarısı ve etkinliğini artıracaktır. Araştırıcılar ve mühendisler endüstriyel gereksinimlere göre alkalin proteazların verimini arttırmak için çeşitli metotlar kullanmışlardır. Proteaz verimini arttırmak için yapılmış olan son çalışmalar; aşırı üretim yapan suşların taranması, klonlama ve aşırı ekspresyon, kesikli-beslemeli (Fed-batch), kemostat fermentasyonları, kültür koşullarının optimizasyonuve alternatif tarımsal atıkların substrat olarak kullanılması gibi parametreleri içermektedir.

1.7.1. Fermentasyon Metotları

Genel olarak mikroorganizmalardan üretilen proteazlar doğada konstititüftürler veya kısmen indüklenebilirler ve bir çok kültür koşulları altında *Bacillus* türleri post-eksponensiyel ve durağan fazlarda ekstraselüler proteazlar üretirler. Mikroorganizmların ürettiği ekstraselüler proteazlar karbon/azot oranı, glikoz gibi kolay bir şekilde metabolize olabilen şekerlerin (Beg ve ark., 2002a) ve metallerin (Verala ve ark., 1996) varlığı medium komponentleri tarafından şiddetli bir şekilde etkilenirler. Proteaz sentezi besiyerindeki amino asitler gibi hızlı metabolize olabilen nitrojen kaynakları tarafından etkilenir. Bunların yanında havalandırma, inokule miktarı, pH, sıcaklık ve inkübasyon gibi diğer fiziksel faktörler proteaz üretim miktarını etkiler (Hameed ve ark., 1999; Puri ve ark., 2002). Biyokimya ve proses mühendisleri mikroorganizmalardan endüstriyel seviyede proteaz üretimini arttırmak için bir fermentörde yüksek verimde proteaz elde etmek için çeşitli stratejiler kullanırlar. Literatürde uzun süreli inkübasyonlar için batch ve fed-batch fermentasyon ve kemostat kültür yöntemi kullanılarak glukoz, amonyum iyon konsantrasyonu, oksijen basıncı, pH ve tuz bileşenlerini (Hameed ve ark. 1999; Hubner ve ark. 1993; Mao ve ark. 1992; Van Putten ve ark. 1996) ortama senkronize bir şekilde kontrollü olarak (Frankena ve ark. 1985, 1986) ekleyip proteaz üretimininin artırılmasında kullanıldığı bildirilmiştir.

Beg ve ark. (2002a) yaptıkları son çalışmada *B. mojavensis'*den elde edilen toplam alkalin proteaz verimini artırmak için yarı kesikli ve kesikli beslemeli işlemler gerçekleştirerek, belirli aralıklarla biyomastaki baskılamayı ortadan kaldırıp (de-represyon) verimliliği 4 kata kadar artırdıklarını bildirmişlerdir. Son yıllarda fermentasyon ortamında fazla miktarda alkalin proteaz üretimi elde etmek amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları esnasında farklı istatiki program paketleri kullanarak istatiksel yaklaşım metotlarının kullanıması ve verimliliğin bu şekilde artırılmasına odaklanılmıştır (De Coninck ve ark., 2000; Puri ve ark., 2002; Varela ve ark., 1996). Optimizasyon çalışmalarından elde edilen veriler ile protein mühendisliği yaklaşımları sonucu ortaya çıkan bulgular enzim üretimini arttırmak için yeni stratejşlerşn geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Farklı mikroorganizmalardan proteaz üretimini artırmak için farklı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Örneğin, *B. firmus* 44'ün hücre immobilizasyonu (Landau ve ark. 1995, 1997), B. thuringiensis kullanılarak polietilen glikol (PEG)-(4000, 6000, 9000) ve potasyum fosfattan oluşmuş sulu ikili faz (ATPase) (Hotha ve Banik 1997), B. licheniformis kullanarak PEG-6000 ve dextran T500'dan oluşmuş ATPaz sistemler (Lee ve Chang 1990), katı faz fermentasyon metotları (Chakraborty ve Srinivasan, 1993; George ve ark., 1995; Kaur ve ark., 2001) ve iki fazlı büyüme sistemleri (Kaur ve ark., 2001) gibi bazı metotlar kullanılmıştır.

1.7.2. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Enzim Üretimi

Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine gen klonlaması adı verilmektedir. Gen klonlama rekombinant DNA teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasıdır (Kuk ve Erensoy, 2008).

1.7.3. Alkalin Proteazların Klonlanması

Daha yüksek proteaz üretimi yapan selektif mutantlar üretmek için konvansiyonel mutagenesis (UV ve kimyasalla muamele) veya recombinant DNA teknolojisi (rDNA)'nin her biri ile gerçekleştirilen mikrobiyal suş gelişimi mikroorganizmalarda proteaz üretimini artırmak için kullanılmıştır. Rekombinant DNA teknikleri seçilen enzim üreticileri (makineleri) ile birlikte genetik olarak modifiye edilmiş suşların oluşturulmasında yeni fırsatlar açan enstrümanlardır. Bu konuda en önemli aşama, alkalin proteazı enzimini kodlayan genin izolasyonu ve klonlanması olup tamamen mühendislik çalışması şeklinde gerçekleştirilir ve üretici mikroorganizmaların yüksek düzeyde verimli hale getirilmesindeki temel basamaktır. Literatürde bakteriyel alkalin proteaz enzimini kodlayan bazı genlerin ekspresyon düzeylerini artırmak için konak üretici organizma olarak *Escherichia coli* ve *B. subtilis* seçilmiş ve klonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisinin pBX 96 plazmidi (α-amylase amy genini taşıyan plazmid)'nin alkalofilik *B. pumilis* c172 konak organizmasına transformasyon yoluyla aktarılması sonucunda elde dilen *B. pumilis*, c172-14 (pBX96)'ün yeni bir suşunu geliştirmek için kullanıldığı bildirilmiştir (Feng ve ark. 2001). Bu yeni suştaki alkalin proteaz üretim seviyesi ana suş ile kıyaslandığında % 43 kadar artmıştır. pBX 96 plazmidine yerleştirme olayı karbon kaynağını glukozdan nişastaya kadar değiştirmekle kalmamış aynı zamanda yüksek glukoz konsantrasyonlarının proteaz üretimi üzerindeki inhibitor etkisini de bertaraf etmeyi sağlamıştır. Diğer bir çalışmada, Fleming ve ark. (1995), spoIIAc geninin delesyonu sonucunda organizmada sporulasyonu engelleyerek ekstraselüler proteaz sentez özelliğini kazandıracak delesyonları hazırlamak amacıyla in vivo rekombinasyonun B. *licheniformis'*te kullanılabileceğini göstermiştir. Başka bir çalışmada Shah ve ark. (1986) alkalin proteaz üretimini arttırmak için *B. licheniformis* suşunda UV muamelesi yoluyla sisteine kullanımını artırarak verimliliği yükseltecek fenotipik bir gereklilik oluşturmuşlardır. Bierbaum ve ark. (1994) proteaz üreten *B. licheniformis*'in iki suşunda (strains 4a, 114) klasik UV mutasyonu uygulayarak nisin antibiyotiği ve katabolit represyonuna dirençli suş geliştirmişlerdir.

1.7.4. SDM (Site-directed mutagenesis, yönlendirilmiş mutasyon) ve Rastgele Mutasyon (random mutagenesis) Çalışmaları

SDM yöntemi genellikle subtilisin varyantlarının oluşturulmasında ve oksidasyon stabilitelerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. *B. amyloliquefaciens* subtilisin BPN' nin lineer dizisindeki 222. pozisyondaki oksidasyona hassas metiyoninin alanin, serin veya glutamin gibi aminoasitlerin oksidasyona dirençli amino asitler ile yer değiştirmesi subtilisin inaktivasyonunun önlenmesi ile yapılabilir ve buda oksijen beyazlatıcıları ile gerçekleştirilmiştir (Estell ve ark. 1985). Subtilisin BPN' nin tersiyer yapısındaki farklı pozisyonlarda yer alan 6 amino asitin (N218S, G169A, Y217K, M50F, Q206C, N76D) her biri yüksek sıcaklıklarda (65 °C) ve ekstrem alkali ortamda (pH 12.0) enzimin stabilitesini arttırdığı bulunmuştur

(Pantoliano ve ark. 1989). Sonuçta denature edici koşullar altında kombinasyon varyantının inaktivasyon oranı, yabani tip subtilisin BPN' den 300 kat daha yavaş olmuştur. Narhi ve ark. (1991), siklizasyonu önlemek için iki Asn-Gly dizisinin modifikasyonu ile B.subtilis'ten elde edilen apr-A subtilisinin stabilizasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Ilave olarak, apr-A subtilisinin 109. ve 218. pozisyonundaki Asn >Ser yer değişimi subtilisini 7 °C'de stabilize ettiği bulunmuştur. Protein mühendisliği ile Cys 61 ve Cys 98 yapıları arasında ek bir disulfide bağlantısının oluşturulması subtilisin E'nin termostabilitesinin artmasına neden olmuştur (Takagi ve ark., 1990). Von der Osten ve ark. (1993), iki alkalin Bacillus proteazı olan savinase ve esperase enzimlerini kullanarak (Novo Nordisk tarafından ticari olarak üretilmektedirler) bu enzimlerin saklama stabilitelerini geliştirmek, izoelektrik noktasını daha da düşürmek (deterjan endüstrisinde yıkama performansını geliştirdiği için sıvı deterjan formülasyonunun pH'ına yaklaştırmak) ve termal stabilitelerini geliştirmek için protein mühendisliği uygulamalarını yapmışlardır. Aehle ve ark. (1993),enzimin yıkama performasını arttırmak amacıyla Brookhaven protein veri bankasından elde ettikleri subtilisin Carlsberg 1CSE.BRK yapısı ile başlayarak bilgisayar destekli üç boyutlu modelleme temelinde *B. alcalophilus*'dan elde edilen yüksek derecede bir alkalin subtilisin benzeri proteaz (opticlean) modeli tasarlamışlardır. SDM kullanarak 60 °C' de geliştirilmiş termostabilite ile subtilisin E moleküllerindeki iki Ser236Cys arasında disülfit bağı oluşturulmasıyla mutant bir subtilisin E üretilmiştir (Yang ve ark. 2000a). Mutant M222A geni üzerinde random mutagenez yaklaşımı subtilisin E'nin termal stabilitesini geliştirmek ve oksidasyona dirençli mutantını elde etmek amacıyla aynı grup (Yang ve ark. 2000b) tarafından kullanılmıştır. Bu yeni mutantın ısı stabilitesi yabani tip enzimden 5 kat daha fazladır.

Literatür bilgilerinin yanı sıra bir çok uluslararası patentlerde farklı araştırıcılar tarafından subtilisinin oksidasyona stabil daha fazla mutantlarını elde etmek için çeşitli stratejiler yer almıştır. Bech ve ark. (1993), oksidatif ajanlara karşı stabiliteyi geliştirmek için deterjan enzimleri için yeni bir proses bildirmişlerdir. Subtilisin-309 222. pozisyonda yer alan metiyoninin bir HS grubuna sahip sistein ile yer değiştirmesi yoluyla modifiye edilmiştir ve bu sistein rezidüsü formülün değişken

(R) grubundaki HS grubunun H atomu ile yer değiştirmesi ile daha ileri derecede modifiye edilmiştir. Branner ve ark. (1996) enzimatik deterjan ve temizlik karışımlarında kullanmak için bir kaç subtilisin mutantı oluşturmak amacıyla olgun subtilisin BPN' in amino asit dizisinde bir kaç mutasyon üretmişlerdir. Protein mühendisliği tekniği bu günlerde başarılı bir şekilde kullanılsa bile bir önceki raporda SDM ile disulfide bağlarının girdirilmesi yoluyla subtilisin BPN' yi stabilize etmek için yapılan 5 girişimin başarız olduğunu bildirmişlerdir (Mitchinson ve Wells 1989). Çalışmada 26-232, 29-119, 36-210, 41-80 ve 148-243 rezidüleri arasındaki disülfit bağları çalışılmıştır. Eksprese olmuş protein B.subtilis'ten salgılandığında bu enzimde disülfit bağlarının hepsinin oluştuğu ve bu bağların enzim kinetiği üzerinde sadece minor etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir. Ancak hiç bir disüfit mutantının yabani tip BPN' den önemli derecede daha stabil olmadığının gözlendiği açıklanmıştır.

1.8. Keratinolitik Proteazların Potansiyel Uygulamaları

1.8.1. Yem Kaynağı Olarak Keratin Hidrolizatların Hazırlanması

Mevcut gıda gereksinimleri dramatic bir şekilde artmaktadır. Bu olgu evcil hayvanların protein kaynakları olarak değerlendirilmelerinde daha büyük bir talebe yol açmaktadır. Yüksek protein içeriğine sahip olan keratin yapılarından hayvan kılı/yünü (% 92 protein) ve tavuk tüyleri (% 96) bu taleplerin karşılanması için iyi bir alternatiftir (Onifade ve ark., 1998). Hayvancılık endüstrisinin yan ürünlerinden elde edilen keratin hidrolizatlaı hayvan yem endüstrisi için temel tüketim malzemesi olarak pahalı olmayan ve alternatif protein kaynağı özelliğine sahip olması nedeniyle keratinöz atıkların yeniden dönüştürülmesi büyük ilgi konusudur (Takami ve ark., 1992). Keratin atıkların sindirilebilirliğinin sınırlı olmasına karşılık mikrobiyal fermentasyon ile hidrolizasyonun artırılması ve oluşan amino asit karışımının protein kaynağı olarak kullanılması mümkündür (Lee ve ark., 1991; Williams ve ark., 1990).

Atık tüyler hayvan besini için çok pahalı olan diyet içeriklerine alternatif potansiyel bir protein özelliği gösterir (Onifade ve ark., 1998). Ancak, yaygın bilinen proteazlar keratini büyük ölçüde parçalayamazlar. Fakat keratinolitik proteaz salgılayan bazı mikroorganizmalar keratini hücrelerin absorbe edebileceği daha küçük moleküler yapılara (protein hidrolizatlar) ayrıştırılabilirler (Bernal ve ark., 2006).

Versazim *Bacillus licheniformis* PWD1 tarafından üretilen ve Shih ve çalışma arkadaşları tarafından BRI (Kuzey Karolina)'da geliştirilen ilk ticari keratinolitik proteazdır ve tüy unu üretiminde keratinöz atıkların ekonomik değere dönüştürülmesini sağladığı bildirilmiştir (Brandelli ve ark., 2010).

Amino asit ve peptid üretiminde keratinolitik enzimlerin kullanımı biyoteknolojik uygulamalar için oldukça ilgi çekicidir. Bu enzimlerin yardımıyla saçlar serin, sistein ve prolin gibi eser amino asitlere dönüştürülebilir. Bu enzimatik süreç, üründen ayrıştırılması gereken büyük miktarlardaki tuzlar kullanılmadığı için bilinen ticari metodlara göre avantajlıdır (Korkmaz ve Dinçer, 2004).

1.8.2. Deriden Kıl/Yün Uzaklaştırma Uygulaması ve Çevresel Kirlilik Kontrolü

İnsanoğlunun endüstrileşme gibi sosyo-ekonomik aktiviteleri yüzünden, çevre zaman geçtikçe harabiyete uğramaktadır. Endüstriyel işlemlerin çoğu hızlı olan çevresel değişimlerde olumsuz etkilere sebep olmakta ve bu yüzden toplum zorlanmaktadır. Bunlar arasında deri endüstrileri ve ticari kümes hayvancılığı nedeni ile atık olarak ortaya çıkan tüyler giderek artmakta önemli bir çevre sorunu oluşturmaktadır. Bu sorunun giderilmesinde tüylerin hidrolize edilerek protein kaynağı şeklinde kullanılması aynı zamanda kirliliğin eliminasyonu yönünde görüşler oluşmuştur. (Shih, 1993). Deri işletmleri bir seri işleme ünitesinden meydana gelir. Her bir aşamada çeşitli kimyasallar ve malzemeler kullanılır ve bunlar atıklar şeklinde çevreye verilir (Thanikaivelan ve ark., 2004).

Deri endüstrisinde baş ve derilerdeki saç ve kılların giderilmesi klasik olarak kireç, sodyum sülfit, vb. kimyasallar ile yapılmaktadır. Deri endüstrisinde kullanılan

bu maddeler deri endüstrisinin atıklarının % 80-90'ını oluşturur ve hidrojen sülfit ve kireç taşı gibi atıklarda görüldüğü gibi zehirli gazlar oluştururlar (Thanikaivelan ve ark., 2004). Bu nedenle deri endüstrisi, kullanılan kimyasalların çevre üzerindeki olumsuz etkisini indirgemek için kimyasal yerine enzimlerin kullanımını tercih etmeye başlamıştır (Sundararajan ve ark., 2010).

Bacillus subtilis S14 tarafından üretilen enzim deri endüstrisinde saç/kıl giderme işlemi süresince gerekli olan toksik sodyum sülfit kullanımının tamamen yerini alabilecek potansiyeline sahiptir (Macedo ve ark., 2005). Deri ürünlerine giderek artan bir ilgi söz konusudur. Bununla birlikte deri işletmeleri kullanılan kimyasallar nedeni ile ciddi bir çevre sorununa yol açmaktadırlar. Bu sorunun ortadan kaldırılması için deri işletmeleri kimyasal yerine mikrobiyal enzim kullanımına yönelmektedirler..

Keratinolitik proteazların kollajenolitik ve elastolitik aktiviteleri olmadığı için selektif olarak foliküldeki keratin dokusunu hedef alırlar. Bu nedenle kıl/yün giderme işlemlerinde özellikle tercih edilirler ve derinin elastikiyetinde bozulma olmadan kıl/yün gibi yapıların tamamen temizlenmesini sağlarlar (Macedo ve ark., 2005). B. subtilis S14 suşunun kollajen üzerinde herhangi bir etkisi olmayan keratinolitik bir proteaz (KerS14) ürettiği ve bu enzimin deriden kıl/yün uzaklaştırma işlemleri için uygun özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Macedo ve ark., 2008).

1.8.3. Deterjan uygulamaları

Proteazların deterjan alanında kullanım düşüncesini ilk olarak bir deterjan içine pankreatik proteaz enzimlerini ekleyen Rohm (German Patent GP283923, 1913) önermiştir (Saeki ve ark., 2007). 1960'lı yıllarda Bacillus sp.'den elde edilen bakteriyel alkalin proteazlar deterjan endüstrisine girdiğinde alkalin proteazların ekonomik önemi bilinmeye başlanmıştır (Kazan ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2008). Şu anda deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması gelişen ülkelerde yaygındır ve bütün deterjanların yarısından fazlasında enzimler kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2008). Proteazlar, ev temizlik ürünlerinin bütün

deterjan çeşitlerinden kontakt lens veya protezlerin temizlenmesi için kullanılan reaktiflere kadar bir çok malzemede standart katkı maddelerinden biri haline gelmiştir. Proteazların deterjan endüstrisindeki pazar payı dünya pazarında total enzim satışının yaklaşık % 25'ini (yaklaşık olarak her yıl 13 milyar ton) oluşturmaktadır (Tanksale, 2001).

Keratinolitik proteazların deterjan uygulamaları ile ilgili literatürlerde sınırlı bilgi olsa da keratinolitik proteazların deterjanların formülasyonlarında kullanıldığı doğrulanmıştır (Gupta ve Ramnani, 2006). Diğer proteazların aksine keratinolitik proteazlar saç benzeri katı substratları hidrolize etme yeteneklerine sahiptirler. Bu durum, deterjan enzimlerinin katı yüzeylere yapışmış protein substratları üzerinde aktivite gösterdiğinden sert yüzey temizleyicileri için çekicilik sağlayan çok önemli bir özelliktir (Brandelli ve ark., 2010). Bu enzimler bir çok proteazın yapamadığı, kirli çamaşırlarda gömleklerin yakaları gibi sıklıkla karşılaşılan keratinöz kirliliklerinin giderilmesine yardımcı olurlar (Amare Gessesse ve ark., 2003).

İdeal deterjan proteazı kan, gıda ve diğer vücut salgılarının sebep olduğu lekelerin çoğunu gidermeye yardım edecek geniş substrat spesifitesine sahip olmalıdır. Deterjanlarda kullanılan proteaz enzimlerinde aranılan özellikler arasında enzimin yüksek pH ve sıcaklıklarda aktif ve stabil olması, diğer şelatlayıcı ve okside edici ajanlarla birlikte uyumu, yüksek izoelektrik noktaları (pI) ve yüksek pH aralığına dayanmak gibi parametreler önemli ön koşullar arasındadır (Tanksale, 2001).

Genel anlamda ticari olarak elde edilen enzimlerin büyük bir kısmı ağartıcı ve okside edici ajanların varlığından dolayı stabil değildirler. Bundan dolayı, enzim temelli deterjanlardaki en son eğilim, enzimi etkileyen ajanlara karşı yüksek stabilite gösteren mikroorganizmaların bulunması ve bunların enziminin üretimi ile biyomühendislik uygulamaları sonucunda stabilitesi yüksek enzim dizaynı yönündedir (Gupta ve ark., 2002).

1.8.4. Gümüş Geri Kazanımı

Gümüş bir çok amaç için özellikle de görüntüleme endüstrisinde büyük miktarlarda kullanılan pahalı ve asil metallerden biridir. Jelatinde gümüş içeren X-ray veya fotoğraf filmleri gibi atıklar diğer film atıklarına nazaran gümüşün geri kazanılması için çok iyi bir kaynaktır. Dünyadaki gümüş için talebin artmasıyla birlikte kaynak olarak X-ray veya fotoğraf filmleri kullanımı üzerinde odaklanılmıştır (Shankar ve ark., 2010). X-ray filmleri üzerinde bulunan protein, çözülmeyen bir protein olan ve bilinen proteazlarla parçalanmayan kollajenin bir türevidir. Keratinolitik proteazlar proteazların bir sınıfıdır ve X-ray filmlerindeki jelatini parçalama yeteneğine sahiptirler, bu yüzden gümüşü geri kazanma işleminde kullanılmaktadırlar. Kullanılmış X-ray/fotoğraf film atıklarından gümüşü geri kazanmak için literatürde birçok araştırma mevcuttur (Nakiboglu ve ark., 2003). Genelde gümüş istenmeyen çevresel kirliliğe sebep olan filmlerin yakılması ile geri kazanılır fakat poliesterden yapılmış olan taban film bu metot ile geri kazanılamaz. Gümüş, jelatine bağlandığı için proteolitik muamaleler ile protein tabakasından gümüşü ekstrakte etmek mümkündür. Bu yüzden jelatinin enzimatik hidrolizi sadece gümüşün ekstrakte edilmesinde değil aynı zamanda poliester filmler de yeniden dönüştürülebilmesini sağlamaktadır (Nakiboglu ve ark., 2003).

1.8.5. Keratinolitik Proteazların Diğer Potansiyel Uygulamaları

Keratinolitik proteazlar ilaç, biyoparçalanabilir filmler, yapışkanların üretilmesin, keratin fiberlerden biyopolimerlerin geliştirilmesi (Riffel ve ark., 2003) saç bakım ürünleri ve tırnak sertleştirme ürünlerini içeren kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadırlar **(**Matsubara ve Tabata (1994)'ya atfen Karthikeyan ve ark., 2007).

Keratinolitik proteazlar yavaş bırakılan azot gübreleri üretmek için de kullanılmaktadırlar (Chikura ve ark.,1994). Keratin materyallerinin hidrolizatları beton ve seramik yapımında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Karthikeyan ve ark., 2007). Bu enzimler yeniden üretilebilir emiciler olarak silika yüzey üzerindeki

hidrolizat çözeltisinde bulunan aktif aminoasitlerin immobilizasyonu ile endüstriyel atık sulardaki kalsiyum, magnezyum, demir ve manganez gibi bazı kirletici metallerin eliminasyonunda kullanılır (Sayed ve ark., 2005). Yangın söndürmede kullanılan koloidinin üretiminde keratin kullanılmaktadır. Yangın söndürücüler, boynuz ve toynakların hidrolizinden türetilen organik bir koloidin çözeltisinden hazırlanır (Datta, 1993). Keratinöz materyallerin oksidasyonu ile disülfit bağlarının bazıları kırılır ve okside olur, sonuçta suda çözülebilir peptidler oluşur ve oluşan bu materyal yaraların iyileştirilmesinde kullanılır (Van Dyke ve ark., 2001).

Keratinolitik enzimlerle ilişkili diğer umut verici uygulamalar ise bazı dokularda ilaç iletimini geliştirmek için kullanılmasıdır Örneğin; Tırnak hastalıklarının terapisinin etkinliği tırnak tabakasının ilaca karşı çok düşük geçirgen özellikte olmasından dolayı sınırlıdır (Mohorcic ve ark. 2007). Prion protein (Prp)' lerinin hidrolizi (Prp: insanlarda ölümcül ve bulaşıcı olan nörodejeneratif hastalıklara ve bulaşıcı Spongiform Ensefalopatiye sebep olur) keratinolitik proteazların yeni mükemmel uygulamaları olarak ortaya çıkmıştır. (Gupta ve Ramnani, 2006; Brandelli, 2008; Sharma ve Gupta, 2010; Vigneshwaran ve ark., 2010). Örneğin, *Bacillus licheniformis* PWD-1 tarfından üretilen keratinolitik bir proteazın enfekte olmuş inek ve koyunların beyin kökündeki PrPSc (prion proteininin anormal izoformu)'i tamamen parçalamada etkili olduğu bildirilmiştir (Priola, 2001; Langeveld ve ark., 2003).

Keratinolitik proteazlar, sinek larvalarını öldürmek için endotoksinlerin üretiminde kullanışlı olan tüy temelli kültür medyumunu geliştirmek için kullanılmaktadır Poopathi ve Abidha, 2007). Kwon ve ark. (1994) Vibrio metschnikovii RH530'dan elde edilen alkalin proteazların DNA izolasyonunda kullanılan Proteinaz K'ya alternatif olarak kullanıldığını bildirmişlerdir.

Keratinöz atıkların biyodönüşümü, metan ve biyohidrojen içeren biyoenerji üretiminde sık bir şekilde kullanılmaktadır (Balint ve ark., 2005; Brandelli ve ark., 2010). Keratninolitik mantarlar topraktaki petrol hidrokarbon kontaminasyonunu elimine için biyoremediasyonda potansiyel araçlardır (Ulfig ve ark., 2003). Keratinolitik proteazlar, keratin temelli biyomateryaller veya hidrolizatları

hemoostatiyi ve sinir rejenerasyonunu düzenlemek için kullanılır (Sierpinski ve ark., 2008; Apel ve ark., 2008; Aboushwareb ve ark., 2009; Rouse ve Van Dyke, 2010).

1.9. Elektroforez

Elektroforez, elektriksel alanın etkisiyle yüklü moleküllerin göçüdür. Moleküllerin göç hızı –alanın net gücüne, moleküllerin yüküne, boyutuna şekline ve ayrıca iyonik güç, viskosite, ve moleküllerin hareket ettiği ortam sıcaklığına bağlıdır. Analitik olarak elektroforez basit, hızlı ve son derece hassas bir alettir. Farklı kullanım alanları olan çeşitli elektroforetik teknikler vardır. En sık olarak agaroz ve poliakrilamid olmak üzere, genelde örnek bir destek ortamında yürütülür. Gözenekli jeller uygun koşullar altında molekülleri moleküler boyutuna göre ayırmayı sağlayan bir araçtır. Burada özellikle proteinlerin elektroforez yöntemi üzerinde durulacaktır. Protein elektroforezi denatüre veya non-denatüre şeklindedir. Nondenatüre metotta aktif proteinlerin geri dönüşümü ve enzim aktivitesi analizinde veya natif protein yapısı gereken diğer analizler için kullanılabilir. Biyokimyada yaygın olarak kullanılan iki teknik SDS-PAGE ve izoelektrik odaklanma (IEF)'dır. SDS-PAGE proteinleri moleküler ağırlığına bağlı olarak ayırmaktadır, IEF ise izoelektrik noktasına göre ayırmaktadır (Harisha, 2007).

1.10. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, farklı ortamlardan izole edilen alkali, termostabil keratinaz üreticisi doğal termofilik *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. suşlarının izolasyonu, identifikasyonu (morfolojik, biyokimyasal, 16S rRNA ve filogenetik ağacının çıkarılması); yüksek düzeyde keratinaz ürettiği belirlenen suşlardan genetik manipülasyonlar (mutajen bir madde ile, UV ile muamele) yapılarak keratinaz üretimin arttırılması, bu suşların kültür koşullarının optimizasyonu, keratinaz üretimi, saflaştırılması, karakterizasyonu, *Bacillus* sp. suşuna ait keratinaz geninin klonlanması, rekombinant enzim üretimi, karakterizasyonu ve bu enzimlerin endüstriyel kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Anbu ve ark. (2007), Hindistan'ın Namakkal bölgesindeki tavuk çiftliklerinden aldıkları toprak örneklerinden *Scopulariopsis brevicaulis* mantarını izole etmiş ve kertinaz üretimini etkileyen faktörleri çalışmışlardır. Mantarın pH 7.5'da 30 °C'de ve 5 günlük üretim periyodu sonrasında en yüksek keratinaz üretimini elde etmişlerdir (6.2 KU/ml). Kültür medyumu %1 glukoz, % 2 sodyum nitrat, % 1.5 tüy unu ve 1mM $CaCl_2$ ile desteklendiğinde enzim üretiminin arttığını tespit etmişlerdir.

Radha ve Gunasekaran (2007), kendi laboratuar stoklarında bulunan *Bacillus megaterium* bakterisinden keratinaz genini klonlayarak elde ettikleri rekombinant suştan yüksek miktarda keratinaz elde etmek amacıyla keratinaz enziminin fermentasyon koşullarının optimizasyonunu yapmışlardır. Klonlama çalışmalarında KERORF-F and KERORF-R primerleri kullanılarak keratinaz genini amplifiye etmişlerdir. Daha sonra içinde T7 promotörü olan pETK3 ve pETProK3 vektörler aracılığı ile bu geni *Escherichia coli* BL21 (DE3)'e transfer etmişlerdir. Uygun inkübasyon koşulları sağlanarak elde ettikleri rekombinant suş tarafından üretilen intraselüler keratinazın aktivitesinin 740.32 U/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar *ker* genini daha sonra *E.coli-Bacillus* shuttle vektörü pWH1520 aracılığı ile *Bacillus megaterium* ATCC 14945 suşuna transfer etmişlerdir. Yapısında *xyl*A promotorünün olduğu rekombinant plazmidi taşıyan *Bacillus megaterium* ATCC 14945 suşu tarafından üretilen ekstraselüler keratinazın aktivitesinin 95 U/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, fermentasyon koşullarını optimize etmek ve rekombinant suşun keratinaz üretim seviyesini geliştirmek için yüzey tepki metodolojisini kullanmışlardır. % 0.75 w/v ksiloz konsantrasyonuna sahip medyumda 18 saatlik fermentasyon süresinde maksimum keratinolitik aktivitenin 166 U/ml ve spesifik aktivitenin 33.25 U/mg olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda arşatırıcılar, *Bacillus licheniformis* keratinazını T7 promotörü bulunan vektör aracılığı ile *B. megateriuma* klonlayarak ksiloz ile indüklenebilen sistem yardımı ile enzimi eksprese ettirmişlerdir.

Cai ve ark. (2008), kümes hayvanlarının yetiştirildiği alandaki toprak örneklerinden ve çürümüş tüylerden tüy parçalayan *Bacillus subtilis* bakterilerini izole ederek KD-1 suşunu morfolojik, fizikokimyasal ve filogenetik yöntemlerle tanımlamışlardır. Bu suşta MNNG (N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine) ile mutasyonlar oluşturarak KD-N1 ve KD-N2 mutant suşlarını elde etmişler ve bu mutantların üretmiş olduğu keratinaz enziminin aktivitesini değerlendirmişlerdir. KD-N2 mutant suşunun üretmiş olduğu keratinaz aktivitesinin (60.9±0.87 U/ml) yabani tip suşun üretmiş olduğu keratinaz aktivitesinden (24.3±1.31 U/ml) yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, KD-N2 suşuna ait keratinazın maksiumum aktivitesinin inkübasyondan 30 saat sonra gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, tüy, saç, yün ve ipeği KD-N2 suşu için substrat olarak kullandıklarında bunların keratinaz tarafından parçalandığını taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile tespit etmişlerdir. Bununla birlikte susbstrat olarak tüy kullanıldığında 16 saatlik inkübasyon ile pH 7.5 ve 23 °C sıcaklıktaki optimum keratinaz üretimi sonucunda substratın treonin, valin, metiyonin benzeri temel aminoasitlere kadar parçalandığını tespit etmişlerdir. Son olarak araştırıcılar, izole etmiş oldukları KD-N2 suşunun göstermiş olduğu tüy parçalama yeteneği ile bu suşun keratinaz üretiminde ve atık tüylerin değerlendirilmesinde kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Deivasigamani ve Alagappan (2008) kesimhane ve tavuk çiftliği alanındaki toprak örneklerinden azokeratin medyumu kullanarak *Bacillus* spp. izole etmişlerdir. İzole etmiş oldukları bu bakterinin üretmiş olduğu keratinazın en yüksek aktivitesinin (122.5 KU ml^{-1}) pH 8.0'de olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, % 1 (w/v) tüy ve pH'nın 8.0 olduğu ortamda uyguladıkları submerged fermentasyon sonucunda en yüksek enzim üretiminin (140 KU $^{ml-1}$) 4. günde gerçekleştiğini, 5. günün sonunda ham protein içeriğinin 1.44 mg/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yapmış oldukları SDS-PAGE analizi keratinazın moleküler ağırlığının 32 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Tamilmani ve ark. (2008), Hindistan'ın Tamilnadu şehri Namakkal bölgesindeki tavuk çiftliklerinden almış oldukları katı atıklardan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* bakterisini morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre

tanımlamışlar ve bu mikroorganizmanın ürettiği keratinazın karekterizasyonunu yapmışlardır. Tuzla çöktürme, diyaliz ve kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığının 35 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir. %1 oranında tüy içeren besiyerinde 37 °C'de 7 günlük süreyle ürettikleri *Bacillus licheniformis* bakterisinin üretmiş olduğu enzimin maksimum aktivitesinin pH 8.0 ve 35 °C sıcaklıkta gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi Streptomyces sp. türünün üretmiş olduğu keratinaz enziminin yaklaşık olarak 44 kDa olduğunu, bu enzimin 45 °C ve pH 11.0'de optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Serin metaloproteaz olan keratinaz aktivitesinin Ca^{+2} iyonu varlığında önemli derecede arttığını, PMSF ve EDTA varlığında ise bu aktivitenin inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırıcılar deterjan, yüzey temizleyicileri ve çözücülerin varlığında enzimin stabil olmasının, keratinazın keratin hidrolizi gerektiren biyoteknolojik işlemlerde veya deri endüstrisinde son derece kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir.

Fakhfakh-Zouari ve ark. (2009), Tunus'taki bir mezbahanenin atık sularından alkalin proteaz üreten *Bacillus pumilus* A1 suşunu izole ederek 16S rDNA dizi analizi ile bu suşu tanımlamışlardır. Tüy unu içeren medyumda kültüre ettikleri suşun üretmiş olduğu keratinolitik enzimin (KerA1) 34 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir. Araştırmacılar keratini substrat olarak kullandıklarında KerA1 enziminin optimum aktivitesinin pH 9.0 ve 60 °C olduğunu ve enzimin iyonik olmayan surfaktantlara karşı yüksek derecede stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. CM-Sephadex column (2x25 cm) kullanarak saflaştırdıkları keratinazın zimogram analizini yaptıklarında tek bir hidroliz zonu tespit etmişlerdir. Saflaştırma aşamalarının sonunda KerA1'in substrat olarak keratini kullandıklarında 25 kat aktivite gösterdiğini ve spesifik aktivitesinin 6.320 U/mg olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, 5 mM $CaCl_2$ varlığında enzimin stabilitesinin arttığını, 50 °C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesini % 100 oranında korurken 60 °C'de ise enzimin aktivitesini % 89.3 oranında koruduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık enzimin aktivitesinin PMSF tarafından tamamen, EDTA tarafından ise yüksek oranda inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, yüksek alkali pH'da

ve çeşitli deterjanların varlığında yüksek derecede keratinolitik aktivite ve stabilte gösteren KerA1 enziminin keratin hidrolizinin gerekli olduğu biyoteknolojik işlemlerde, deri endüstrsinde ve çamaşır deterjanlarında kullanım potansiyeline sahip olduğunu ve çevre dostu özelliğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Radha ve Gunasekaran (2009), kendi laboratuarlarında var olan yüksek keratinolitik aktiviteye sahip *B. licheniformis* MKU3 suşunu kullanarak rekombinant suşlar elde etmiş ve bu rekombinant suşun ürettiği keratinazı saflaştırıp karakterize etmişlerdir. *B. licheniformis* MKU3 suşunun genomunda yer alan 1053 bç büyüklüğündeki keratinaz genini klonlayarak *Bacillus megaterium* MS941 ve *Pichia pastoris* X33'te başarılı bir şekilde eksprese etmişlerdir. Orjinal suş ile kıyasladıklarında rekombinant *P. pastoris* keratinaz seviyesini 2.9 kat arttırırken, rekombinant *B. megaterium* keratinaz üretim seviyesini 3 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar rekombinant *P. pastoris* (pPZK3) ve *B. megaterium* MS941 (pWAK3)'den elde edilen keratinazı affinite kromotografisi ile saflaştırmış ve *P. pastoris* (pPZK3)'in 365.7 U/mg ve *B. megaterium* MS941 (pWAK3)'in 1277.7 U/mg spesifik aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. *B. megaterium*'dan elde edilen monomerik rekombinant keratinazın moleküler ağırlığının 30 kDa, *P. pastoris*'ten elde ettikleri glikozillenmiş rekombinant keratiazın ise 39 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, her iki suştan elde ettikleri rekombinant keratinazların optiumum sıcaklık ve pH, çeşitli metal iyonları ve inhibitörlere karşı hassasiyet gibi özelliklerinin benzer olduğunu belirlemişlerdir. Maya sistemindeki glikolizasyon nedeniyle glikozillenmiş keratinaz enzimi aktivitesini pH 11.0'de % 95, 80 °C'de % 75 oranında koruduğunu bildirmişlerdir. Substrat olarak N-succinyl- Ala-Ala-Pro-Phe-pNA kullandıklarında enzimin Km değerinin 0.201 mM ve Vmax değerinin 61.09 U/dk olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, deterjanların, surfaktantların, metal iyonlarının ve çözücülerin varlığında stabilite göstermeleri nedeniyle bu enzimlerin endüstriyel işlemler için uygun olduklarını belirlemişlerdir.

Syed ve ark. (2009), keratini parçalayan *Streptomyces gulbargensis* DAS 131 suşunu izole ederek, suşunun ürettiği keratinaz enziminin karakterizasyonunu çalışmışlardır. Bakteri suşunun 45 °C ve pH 9.0 ortamda 120 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen enzim maksimum keratinolitik aktivite gösterdiği

belirtilmiştir. Enzim 30 ve 45 °C ve pH 7.0-9.0 ortamında stabilitesini tamamen korumuştur. Besi yerine nişasta eklenmesinin keratinaz sekresyonunun arttırdığını, inkübasyonun 7. gününden sonra medyuma 3 g/L nişastanın eklenmesi ile keratinaz üretiminin 10 kat artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığının 46 kDa olduğu, aktivitesinin $CaCl_2$ tarafından önemli derecede, EDTA ile ise kısmen inhibe edildiğini, buna karşılık Na_2SO_3'ün enzim aktivitesini 2.9 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmada, 96 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen enzimin tamamen inaktif hale geldiği bildirilmiştir. Araştırıcılar, *S. gulbargensis* DAS 131 tarafından üretilen bu enzimin keratin içeren atıkların değerlendirilmesinde ve deri endüstrisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Jaouadi ve ark. (2010), Fas'ın kuzeyinde yer alan Mitidja bölgesinden almış oldukları toprak örneklerinden Actinomycete suşlarını izole etmiş ve bunlardan keratinolitik alkalin proteaz üreten Streptomyces sp. AB1 suşunu analitik profilleme indeks (API) strip testi ile ve 16S rDNA gen dizisine göre tanımlamışlardır. Saflaştırmış oldukları enzimin (KERAB) moleküler ağırlığının 29850.17 Da olduğunu MALDI-TOF kütle spektrometri analizi ile tespit etmişlerdir. Applied Biosystem Model 473A gaz-faz dizileyicisi kullanarak KERAB'ın NH_2 uç tarafındaki amino asit dizisinin TQANPPSWGLDDIDQTAL şeklinde olduğunu tespit eden araştırıcılar, bu enzimin PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) ve DIFP (Diiodopropyl fluorophosphates) tarafından tamamen inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, pH 11.5 ve 75 °C'de enzimin optimum aktivite gösterdiğini, pH 4.0 ve 30 °C'de 4 saat, pH 11.0 ve 60 °C'de ise 96 saat boyunca stabil kaldığını tespit etmişlerdir. 5 mM $MgCl_2$ varlığında enzimin termoaktivite ve termostabilitesinin arttığını tespit eden araştırıcılar KERAB'ın deterjanlara karşı da stabilite gösterdiğini, organik çözücülere karşı yüksek derecede dirençli olduğunu ve tüyleri tamamen parçalayabildiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, bu özelliklere sahip KERAB enziminin deterjan endüstrisinde, deri işlemede ve susuz biyokataliz işlemlerinde potansiyel kullanım özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Jeong ve ark. (2010), tavuk fabrikasındaki bir bölgede çürümüş tavuk tüyünden *Bacillus* sp. SH-517 suşunu izole ederek bu bakterinin üretmiş olduğu keratinaz aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar suşun 40 °C ve 180 rpm

çalkalayıcı inkübatörde 40 saat boyunca ürettikleri organizmanın tüyleri parçaladığını bildirmişlerdir. Amonyum sülfatla çöktürme, iyon değiştirme kromatografisi ve Sephadex G-150 jel filtrasyon ile keratinazın verimini % 10.82, saflığını da 14 kat arttırarak spesifik aktivitesini 825 U/mg olarak ölçmüşlerdir. Enzimin SDS-PAGE analizi sonucunda tek bir band oluşturduğunu ve moleküler ağırlığının 51 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. SH-517 suşundan elde etmiş oldukları keratinazın optimum aktivitesini pH 7.5 ve 40 °C de gösterdiğini, bununla birlikte pH 4.0-9.0 aralığında ve 50 °C nin altındaki sıcaklıklarda enzimin stabil kaldığını tespit etmişlerdir. Keratinazın süt kazeini ve tavuk tüylerini kolaylıkla hidroliz ettiğini tespit eden araştırıcılar, Hg^{+2}, Ag^{+2}, EDTA ve EGTA tarafından enzimin önemli derecede inhibe edildiğini, fakat K^{+} ve Na^{+} tarafından hafif bir şekilde stimüle edildiğini bildirmişlerdir.

Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp JB 99 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum üretim koşullarının 45 °C, pH 10 ve 36 saatlik inkübasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Moleküler ağırlığı 66 kDa olan keratinazın 65 °C ve pH 10'da maksimum aktivite gösterdiği ve PMSF tarafından inhibe edildiği, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Co^{+2} ve Ba^{+2} iyonları tarafından enzim üretiminin stimüle edildiğini, fakat Hg^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarının aktiviteyi azalttıkları tespit edilmiştir. Bu araştırıcılar, *Bacillus sp*. JB 9'un tüy unu üretiminde ve dericilik endüstrisinde son derece kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Lin ve Yin (2010), Tayvan'ın güneyinde yer alan tavuk mezbahasındaki tavuk tüylerinden oluşmuş örneklerden bakteri izole etmişler ve keratini parçalayan bakterileri tanımlamışlardır. API identifikasyon kiti kullanarak tanımladıkları bakterilerin 16S rDNA dizilerini GenBank veritabanındaki diziler ile karşılaştırmışlardır. Bakterilerin keratinaz üretimini optimize ettikten sonra CM sepharose Fast Flow (2.6 × 30 cm) kullanarak enzimi saflaştırmışlar ve azokeratini hidroliz edebilme özelliğine göre bu enzimin aktivitesini ölçmüşlerdir. Araştırıcılar, pH 3.0-11.0 ve 10-90 °C sıcaklık aralıklarında 60 dk için enzimin stabilitesini araştırmışlardır. Çeşitli metal iyonları (Li^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg2+, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}), dithiothreitol (DTT), glutathione (GSH), β-mercaptoethanol (β-Me) gibi indirgeyici ajanlar ve ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), N-

ethylmaleimide (NEM), p-chloromercuribenzoate (pCMB), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) and N-toyl- L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) gibi inhibitörlerin enzime etkisini değerlendirmişlerdir. Tanımlamış oldukları *Bacillus licheniformis* YJ4 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 9.0 ve sıcaklık değerinin 60 °C olduğunu, pH 6-10 ve 10-50 °C arasındaki değerlerde enzimin stabil olduğunu bildirmişlerdir. Keratinaz-I enzimi Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, TLCK ve EDTA tarafından orta derecede, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, NEM ve pCMB tarafından ise yüksek derecede inhibe edilmiştir. Keratinaz-II enzimi Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, EDTA, NEM, pCMB ve TLCK tarafından orta derecede, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+} ve PMSF tarafından ise yüksek derecede inhibe edilmiştir. Bununla birlikte enzim DTT, GSH ve β-Mercaptoethanol tarafından aktive edilmiştir. Araştırıcılar, *Bacillus licheniformis* YJ4 suşundan elde ettikleri enzimin yüksek derecede keratinaz aktivitesine sahip olduğunu, doğal atıklar, tüy ve pirinç kabuğunu substrat olarak kullanabildiklerini göstermişlerdir.

Nadeem ve ark. (2010), çürümüş organik bileşiklerin olduğu toprak örneklerinden *Bacillus licheniformis* N-2 suşunu izole etmişlerdir. İzole ettikleri suşu 11.5 cm yükseklikten 5-120 dk aralığında farklı sürelerde 254 nm dalga boyundaki UV ışını kullanarak, NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguinidine) ve MMS (methyl methane sulfonate) gibi kimyasal mutajenlerle muamele ederek mutasyona uğratmışlardır. UV ile mutasyona uğrattıkları UV-9 suşunun alkalin proteaz aktivitesinin ana suştaki enzim aktivitesinden 1.4 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, *B. licheniformis* N-2 suşunun UV ışını ve MMS ile muamelesi ile elde ettikleri mutant suşa ait enzimin NTG ile muamele edilen suştan elde edilen enzime göre daha aktif olduğunu ve sonuçta UV ışınlarının enzimin aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2011), izolasyonunu, taksonomik tanımlaması ve kültür optimizasyonunu önceden yapmış oldukları alkalin β-keratinaz üreten *Brevibacillus* sp. AS-S10-II suşundan EMS (ethyl methyl sulphonate) ve UV ile mutant suşlar elde etmişlerdir. Mutant suşları elde etmek için önce bakteri süspansiyonunu 10-45 dk sürelerle UV ışınına (2600 A) maruz bırakmışlardır. Daha sonra hücre süspansiyonunu skim-milk agara yayarak 45 °C'de 24 saat inkübasyona

bırakmışlardır. Bu sürenin sonunda hidroliz zonu veren mutant kolonilerden elde edilen hücre süspansiyonu (1 .10^6 hücre ml^{-1}) son konsantrasyonu 1.0 mg/ml olacak şekilde EMS ile muamele etmişlerdir. Araştırıcılar, mutasyon çalışmalarından sonra mutant suşlar ile yabani tipten elde etmiş oldukları alkalin β-keratinaz enzimlerinin deterjan stabilitesi, termostabilite ve optimum pH değerlerini karşılaştırmışlardır. EMS ile 20 dk'lık inkübasyon sonunda elde edilen mutant EMS-05 suşunun yabani tip *Brevibacillus* sp. AS-S10-II A suşu ile diğer mutant ve yabani suşa kıyasla alkalin β-keratinaz üretiminde 9 kat daha fazla enzim üretimi gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, EMS-05 mutant suşunun optimum enzim üretümini 37-45 °C aralığındave 18 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirdiğini saptamışlardır. Araştırıcılar EMS-05 mutantından elde ettikleri keratinazın (Mukartinase MR) moleküler ağırlığının 55 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Yabani tip *Brevibacillus* sp. AS-S10-II A suşlarından elde ettikleri ham alkalin β-keratinazları kıyasladıklarında termostabilite, deterjan stabilitesi, Km ve Vmax değerleri gibi biyokimyasal parametreleri arasında bir farkın olmadığını tespit etmişlerdir. Mukartinase MR'ın Km değerinin 1.3 mg/ml ve Vmax değerinin 19.8 mmol/dk olduğunu tespit eden araştırıcılar bu enzimin geniş bir pH (5.0-11.0) ve sıcaklık (25-55 °C) aralığında aktivite gösterdiğini, enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerinin 9.0-10.0 ve optimum sıcaklık değerinin de 37 °C olduğunu bildirmişlerdir. İnkübasyon süresinin son 48. saatinde Mukartinase MR'ın tüy-keratininin yaklaşık %78-82'sini parçalayabildiğini SEM çalışması ile tespit etmişlerdir. Tüy-keratininin Mukartinase MR ile muamelesi sonucunda miktar olarak en fazla serbest kalan amino asitlerin sırasıyla cysteine, valine, threonine, lysine, isoleucine, phenylalanine ve methionine olduğunu HPLC metodu ile belirlemişlerdir.

Rai ve Mukherjee (2011), Hindistan'ın Sivasagar ilçesinden almış oldukları toprak örneklerinden β-keratinaz özelliğine sahip alkalin proteaz üreten bakterileri izole etmişler ve bakterinin fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizleri ile tanımlama sonunda *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II olduğunu saptamışlardır. *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II suşunun üretmiş olduğu β-keratinaz (Brevikarnaz) enziminin karakterizasyonu sonunda optimum aktiviteyi 45 °C ve pH 12.5 da gösterdiğini saptamışlardır. Enzimin moleküler ağırlığının 83.2 kDa olduğu ve 48

saatlik inkübasyon sonunda üretilen enzimin 923.0 Ul^{-1} enzim aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Brevikarnaz enziminin *Km* değerinin 0.3 mg/ml ve *Vmax* değerinin de 4.5 µmol dk^{-1} mg^{-1} olduğunu tespit eden araştırıcılar, enzimin anyonik, iyonik olmayan surfaktant, okside edici ve ağartıcı ajanlar ile EDTA ile muamele edildiğinde termostabilitesini güçlü şekilde koruduğu bulunmuştur. Araştırıcılar, enzimin deterjan formülasyonları ve deri endüstrisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yue ve ark. (2011), kertenkele dışkısından izole ettikleri *Bacillus* sp. 50-3 suşundan kök-budak nematodu olan *Meloidogyne incognita*'yı öldüren alkalin keratinaz enzimi üretmişlerdir. Elde etmiş oldukları keratinaz, başlangıç pH'ı 7.0 ile 37 °C'de 680±25 U/ml aktiviteyle tavuk tüylerini parçaladığını tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. 50-3'ten elde ettikleri enzimi çöktürme ile saflaştırdıktan sonra DEAE-Sephadex-A50 kolonu kullanarak likit kromatografisi ile 17.7 kat daha saflaştırmışlardır. Saflaştırmış oldukları enzimin moleküler ağırlığının 27.423 Da olduğunu MALDI-TOF-MS ile belirlemiş ve enzimin göstermiş olduğu maksimum aktivitenin 17.409 U/mg olduğunu tespit etmişlerdir. 50 µg/ml keratinaz çözeltisi ile 24 saat boyunca muamele ettikleri *Meloidogyne incognita* yavrularının % 98.5 oranında öldüklerini, dolayısıyla bu enzimin *Meloidogyne incognita* gibi kök-budak nematodlarının kontrolünde biyoteknolojik bir potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kuo ve ark. (2012), Tayvan'ın kuzeyinde yer alan, sıcaklığı 55-60 °C ve pH'ı 8 olan sıcak su kaynaklarından örnekler alarak bakteri izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakterinin genomik DNA'sını, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (FD1) ve 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (RD1) üniversal primerlerini kullanarak 16 S rDNA düzeyinde tanımlamışlardır. *Meiothermus* sp. I40 olarak tanımladıkları suştan 2 günlük inkübasyon sonrasında elde ettikleri keratinaz enzimini (Keratinaz 140) 0.3 ml/dk akış hızı ile FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) kullanarak saflaştırmış ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Saflaştırmış oldukları keratinaz 140 enziminin moleküler ağırlığının 76 kDa, *Km* değerinin 0.29 mM, *Vmax* değerinin 1428.6 U/mg dk, optimum pH'ın 8.0 ve optimum sıcaklık değerinin 70 °C olduğunu bildirmişlerdir. Stabilite amacı ile enzim

65 °C ve 70 °C'de 12 saat inkübe edildiğinde e aktivitesini sırasıyla % 96.7 ve % 71.3 oranında korumuştur. Keratinaz 140 enziminin, PMSF tarafından tamamen inhibe edildiğini buna karşılık DMSO, etanol, izopropanol ve asetonitril varlığında stabilitesini yüksek düzeyde koruduğunu tespit etmişlerdir. Tavuk tüyünün optimum koşullarda keratinaz 140 1 günlük muamelesi sonucunda tüylerin tamamen parçalandığını tespit eden araştırıcılar, muamele sonrasında serbest kalan peptidlerin moleküler ağırlığının 1.84 kDa ortalama ile 0.48-10 kDa aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu özelliklere sahip olan keratinazın keratin içeren tüylerin parçalanmasında etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve bu enzimin çevre dostu olduğunu bildirmişlerdir.

Okoroma ve ark. (2012), tüylerin parçalanmasını sağlayan yüksek keratinaz aktivitesine sahip mikrobiyal suşları elde etmek amacıyla kümes/hayvanların temel atıklarından 32 bakteri suşu izole etmişlerdir. Elde ettikleri suşların proteolitik ve keratinaz aktivitelerini kazein agar yöntemiyle belirlemişlerdir. Bu suşlardan 16 S rDNA analizi ile tanımladıkları ve en yüksek keratinaz aktivitesini (11.00 ± 0.71 U/ml) gösteren *Bacillus licheniformis* N22 suşunu elde etmişlerdir. Enzim üretimi için % 1.1 w/v tüy unu içeren besiyerinde 50 °C sıcaklıkta ve pH 8.5'te 32 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimin SDS-PAGE ve MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ile analiz edildiğinde moleküler ağırlığın yaklaşık olarak 28 kDa olduğunu tespit etmişlerdir.

Asker ve ark. (2013), toprak örneklerinden izole ettikleri proteaz üreten bakterileri Biolog GP2 MicroPlate kullanarak morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre tanımlamışlardır. Tanımlama sonucu *Bacillus megaterium* bakterisinden elde ettikleri proteazı amonyum sülfat ile çöktürme, DEAE-selüloz iyon değiştirme kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırdıktan sonra farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltilerde ve farklı sıcaklık değerlerinde optimum aktiviteyi analiz etmişlerdir. Kullanılan saflaştırma yöntemine göre elde edilen proteaz enziminde DEAE-selüloz iyon değiştirme kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi için sırası ile (P1: 561.27 U/mg^{-1}) ve (P2: 317.23 U/mg^{-1}) aktivite değerleri elde edilmiştir. Moleküler ağırlıkları P1 28 ve P2 25 KDa

olan bu iki enzimin amino asit içeriğini alanin, lösin, glisin, valin, treonin ve glutamik asit bakımından zengin olmakla birlikte aspartik asit ve serince oldukça zengin olduğu bulunmuştur. Her iki enzimin maksimum aktivitelerini 50 °C, pH 7.5 ve % 1'lik jelatin konsantrasyonunda gösterdikleri, pH 7.0-8.5'te stabil oldukları ve 80 °C'ye kadar termal stabilitelerini koruduklarını tespit etmişlerdir. Enzim düşük PMSF konsantrasyonunda bile inaktive olduğundan serin proteaz olarak değerlendirilmiştir. Enzimin aktivitesi 1.0-4.0 mM EGTA ve 1.0-3.0 mM EDTA konsantrasyonda indirgeyici ajanlar ile etkilenmemiş, ancak 4.0 mM'dan daha yüksek EDTA konsantrasyonlarda aktivitesinin % 80 oranında düştüğü bulunmuştur. Bu özelliklere sahip enzim ile deri, oda sıcaklığında 12 saat süreyle muamele edildiği zaman tüylerin tamamen yok olduğu bildirilmiştir.

Bin ve ark. (2013), tavuk tüylerinden *Bacillus subtilis* S1-4 bakteri suşunu izole ederek comparative genom analiz metoduyla tanımlamışlardır. Araştırıcılar, *Bacillus subtilis* S1-4 bakteri suşunun tüyleri parçalaması sonucunda 11.61 mg/ml çözülebilir peptid ve 6.86 mg/ml amino asit elde edildiğini belirtmişlerdir. Enzimin optimum aktivitesini pH 8.0 de gösterdiği, 30-42 °C arasındaki sıcaklıklarda tüyleri etkili bir şekilde parçalayabildiğini bildirmişlerdir.

Jaouadi ve ark. (2013), keratinaz üreten mikroorganizmaları üretmek için Tunus'un M'Saken şehrindeki deri tabakhanesinden aldıkları toprak örneklerinden 75 adet bakteri suşu izole etmişler ve bunlardan 6'sının keratinaz zon çapının 3 mm den yüksek olduğunu (en yüksek oran 5 mm) bildirmişlerdir. En yüksek keratinaz aktivitesinin yaklaşık olarak 7,500 $U.ml^{-1}$ ile US575 suşuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. US575 suşunu morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik karakteristiklerine göre tanımlamışlardır. *Brevibacillus brevis* US575 suşundan elde ettikleri 1506 bp uzunluğundaki 16 S'lik rDNA'nın % 99 oranında kültüre edilmiş bir kaç *Bacillus* türü ile benzer olduğunu ve en yakın ilişkisinin *Brevibacillus brevis* türü ile olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar enzimi (KERUS) santrifüj ile çöktürdükten sonra HPLC ile saflaştırmış ve moleküler ağırlığının SDS-PAGE analizi ile 29 kDa, MALDI-TOF/MS analizi ile de 29.121 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. KERUS'un optimal aktiviteyi pH 8.0 ve 40 °C de gösterdiğini, termoaktivite ve termostabilitesini 5 mM Ca^{+2} varlığında arttırdığını, PMSF

(phenylmethanesulfonyl fluoride) ve DFP (diiodopropyl fluorophosphates) tarafından enzim aktivitesinin inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca 5 mM'lık $MnCl_2$ %161, $MgCl_2$ % 190 ve $CaCl_2$ % 325 oranında enzim aktivitesini arttırırken, Hg^{+2}, Ni^{+2} ve Cd^{+2} enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği, Zu^{+2} nun ise enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği bulunmuştur. Bu özelliklere sahip olan KERUS'u kodlayan 1.3 kb'lık genini (kerUS) pCR-Blunt vektörü aracılığıyla *E. coli* BL21'e klonlayarak genin ifade olmasını sağlamışlardır. Saflaştırdıkları ekstraselüler rekombinant enzim olan rKERUS'un biyokimyasal özellikleri yabani tipteki KERUS enzimi ile benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, elde etmiş oldukları rekombinant enzimin biyoteknolojik işlemlerde, özellikle dericilik ve kümes hayvancılığı endüstrisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Lakshmi ve ark. (2013), tavuk tüy atıklarının parçalanması ve yeniden değerlendirilmesi amacıyla Hindistan'ın farklı bölgelerindeki tavuk çiftliklerinden örnekler alarak keratinaz üreten iki *Bacillus* suşunu (*Bacillus subtilis* BF11 ve *Bacillus cereus* BF21) morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve genetik özelliklerine göre karakterize etmişlerdir. *Bacillus subtilis* BF11 ve *Bacillus cereus* BF21 suşlarında fiziksel (UV) ve kimyasal (hydroxylamine hydrochloride ve ethyl methyl sulphonate) yollarla mutasyon oluşturmak suretiyle iki yeni suş (BF11 suşundan mutasyon yoluyla MBF11 suşunu ve BF21 suşundan mutasyon yoluyla MBF21 suşunu) elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu izolatları keratinaz üretimini optimize etmek için kullanmışlardır. MBF11 suşu için pH 8.5 ve 44-55 °C sıcaklıklarda, MBF21 suşu için pH 8.5 ve 37 °C sıcaklıkta enzimin optimum üretimin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, fermentasyon süreci boyunca kültür filtratında cysteine, cystine, methionine ve toplam serbest amino asitlerin miktarında önemli derecede bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2013), *Streptomyces lividans* 1326 tarafından üretilen yabani tip keratinazın ekspresyon seviyesini arttırmak için klonlama ve alana spesifik mutasyon çalışmaları yapmışlardır. *ori* (*E.coli* için replikasyon orijini) ve *bla* (ampisilin direnç geni)'yı taşıyan pSP72 plazmit ile oriT, *tsr (*thiostrepton direnç geni) ve *rep* genini (plazmidin *Streptomyces*'te otonom bir şekilde replike olmasını sağlayacak gen) taşıyan pHZB58 plazmidini XbaI ve EcoRI enzimleriyle kestikten

sonra oluşan iki fragment ve keratinaz geninin ligasyonunu sağlamışlardır. Ligasyon sonucunda elde etmiş oldukları pJTU4881 plazmidine Xi promoter-Shine-Dalgarno sekansı-*sfp*2-*amy*A2 terminator'ü içeren sentetik fragmenti subklonlama yaparak pJTU4882 ekspresyon vektörünü oluşturmuşlardır. Oluşturdukları pJTU4882 ekspresyon vektörünü *Streptomyces lividans* 1326 konak suşuna transfer ederek keratinazı üretmişlerdir. pBSFP plazmidinde CTC mutasyonlu alanların 9 nükletoid upstream (kodlanacak ipliğin 5' kısmına doğru olan alandır) yönünde *Kpn*I ve 12 nükleotid downstream (kodlanacak ipliğin 5' kısmına doğru olan alandır) yönünde *Bsm*I kesici enzimlerinin kesim noktalarını yerleştirmişlerdir. KB-Fw ve KB-Rv primerleri ile pBSFP plazmid DNA'sı kalıp olarak kullanarak inverse PCR ile elde ettikleri fragmentleri DpnI ile kesmiş ve tekrardan sirküler yapı haline gelmesini sağlamışlardır. Sirküler yapısını kazanan pBSFP-KB plazmidini pJTU4882 ekspresyon vektörüne klonlayarak pJTU4882-KB plazmidini üretmişlerdir. Daha sonra Leu (-1)/Lys(-2) subtitüsyonları oluşturmak için, yapısı değiştirilmiş nükleotidler ile (mutated nucleotids) sentezlenmiş tek iplikli oligonükleotidleri komplamenterleri ile birleştirmişlerdir. Elde etmiş oldukları çift iplikli bu oligonükleotidleri pJTU4882-KB'ye klonlayarak pJTU4882-X ekspresyon vektörünü oluşturmuşlardır [X: WT, L(-1) D, L(-1)F, L(-1)G, L(-1)H, K(-2)E, or K(-2)L]. *Araştırıcılar, Streptomyces lividans* 1326'e transfer ettikleri Sfp2 geninin ekspresyonunu sağladıktan sonra yabani tip, mutasyonlu ve rek. enzimin aktivitesini değerlendirmişlerdir. Elde etmiş oldukları mutantlardan L(-1)F mutantının, yabani tip enzimin sahip olduğu spesifik aktiviteden 9 kat daha fazla bir aktiviteye sahip olduğunu (48935 U/mg) tespit ederlerken, elde etmiş oldukları diğer L(-1)D, L(-1)G, L(-1)H, K(-2)E, ve K(-2)L mutantların enzim aktivitelerinin yabani tip enzimin aktivitesinden % 2-52 kadar daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. L(-1)F mutantının Sfp2 ürününün total proteinini (800 µg/mg) olarak ve yabani tip enzimden 9 kat fazla olduğunu ,mutant kültür süpernatantının (112 mg/l) ise yabani tip enzimden 2 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (2013), tekstil fabrikasından aldıkları toprak örneklerinden keratin parçalayan *Bacillus licheniformis* BBE11-1 bakterisini izole ederek moleküler identifikasyonunu yapmışlardır. *B. lichemiformis* PWD-1 suşunun kerA geninin ORF

(Open Reading Frame, açık okuma bölgesi) bölgeleri dikkate alınarak primerleri dizayn (5'-ATGAGCGTAAGAAATCCTTTTGG-3' ve 3'-TTACTGTGCAGCCGCTTCAAC-5') etmişler. Ve bu primer kullanarak 'Ker' geninin amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir.. Araştırıcılar amplifiye ettikleri bu geni güçlü bir PHpaII promotorünü yapısında barındıran pMA0911 vektörü aracılığı ile *Bacillus subtilis* WB600 suşuna transforme etmişlerdir. İndükleyici kullanmadan 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda 323 U/ml rekombinant enziminin üretildiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, elde etmiş oldukları rekombinant keratinazın optimum sıcaklık ve pH'sını sırasıyla 40 °C ve pH 10.5 olarak bulmuşlardır. Enzimin stabilite değerlerinin ise 10-50 °C ve pH 7.0-11.5 aralığında bulunduğunu belirtmişlerdir. Enzim Mg^{+2} ve Co^{+2} kullanıldığında aktive olurken, 1 M'lık H_2O_2 ile 5 saatlik bir uygulama sonunda aktivitesini %20 kaybetmektedir.

Mei ve ark. (2013), toprak örneklerinden pektinaz üreten 128 bakteri suşu izole etmişler ve bunlar arasından elde ettikleri aerobik, spor oluşturan, gram pozitif çubuk ve hareketli olan bakteri suşunu (M29 suşu) 16 S rDNA'sına göre tanımlayarak bu suşun *Bacillus halodurans* olduğunu tespit etmişlerdir. *B. halodurans* M29 suşundaki pektinazı kodlayan geni 5'-CT(N)GG(N)GT(N)GG(N)AC(N)AA(T/C)GG-3' ve 5'-TT(T/C)TA(T/C) AA(T/C)CA(T/C) CA(T/C) TT(T/C)AC-3' primerlerini kullanarak amplifiye etmişlerdir. Amplifiye edilen geni pET-20b (+) gen ekspresyon vektörüne yerleştirilerek *E.coli* JM 109 bakterisine elektroporasyon yoluyla transforme etmişlerdir. Rekombinant plazmid içeren *E. coli* JM109 (DE3) bakteri hücrelerinin üretmiş olduğu rekombinant enzimin moleküler ağırlığının 44 kDa olduğunu SDS-PAGE ile tespit etmişlerdir. Bu enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 10.0, sıcaklık değerinin ise 80 °C olduğu, pH 9.5-10.5 değerlerinde stabil kaldığı bulunmuştur. DEAE-Sepharose Fast Flow (FF) ile saflaştırılan enzimin *Km* değerinin 4.1 g L^{-1} mM ve *Vmax* değerinin ise 351 U mg^{-1} olduğu tespit edilmiştir..

Mousavi ve ark. (2013), İran'ın Miyaneh kentindeki farklı alanlarda yer alan tavuk çiftliği atıklarının depolandığı toprak örneklerinden *Bacillus spp* izole ederek, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlama yapmışlardır. Faklı pH ve sıcaklık aralıklarında en iyi enzim aktivitesini bulmak amacıyla yapmış

oldukları çalışmada, *B. subtilis'*in üretmiş olduğu keratinaz enziminin moleküler ağırlığının 35 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Tüyleri parçalamak için kullanılan enzimin maksimum düzeye pH 11.0'de ve üretimin 6. gününde ulaştığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte bakterinin ölüm fazı ve sporulasyon ile maksimum keratinaz aktivitesi için en iyi sıcaklık koşulunun 40 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Saibabu ve ark. (2013), keratinaz üreten *Bacillus megaterium* bakterisini toprak örneklerinden tüy ununu susbstrat olarak kullanarak izole etmiş ve tanımlamışlardır. Asetonla çöktürme metodunu kullanarak kısmi olarak saflaştırdıkları keratinazın moleküler ağırlığının 41±1 kDa, optimum pH'ın 9.0 ve optimum sıcaklığın 50 °C olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin Hg^{+2} tarafından tamamen inhibe edilmesine rağmen, K^{+} ve Co^{+2} tarafından hafif derecede inhibe edildiğini saptamışlardır. NEM (Nethylmalamide), IAA (iodoacetic acid), NAI (N-acetylimidazole) ve TLCK (tocylchloridemethylketone) tarafından orta derecede inhibe edilen enzim, PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) ile güçlü bir şekilde inhibe edilmiş, fakat EDTA tarafından inhibe edilmemiştir. Termotolerant ve alkalifilik özelliklere sahip olan bu bakteriden izole edilen keratinazın deri işleme ve deterjan endüstrisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Tork ve ark. (2013), Suudi Arabistan'ın Cidde kentinden almış oldukları tavuk çiftliklerinin olduğu toprak örneklerinden keratinaz üreten bakteri suşlarını izole etmiş ve bunlardan (30 bakteri suşu) en iyi keratinaz üreten suşlardan *Bacillus subtilis* NRC3 suşunu biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve filogenetik çalışmalarla tanımlamışlardır. Bu suştan elde ettikleri keratinazı CM-selüloz üzerinde katyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-75 kolonları ile jel filtrasyon yöntemiyle saflaştırarak enzim aktivitesini araştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı 32 kDa olarak saptanmış, spesifik aktivitenin saflaştırmadan önce 169 U/mg saflaştırıldıktan sonra ise 31 katlık artış ile 5223 U/mg olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, saflaştırdıkları enzimin aktivitesinin Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} tarafından stimüle edildiğini, katyonlar ve metaloproteinaz inhibitörleri tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte enzimin pH 5.0-10.0 ve 20-60 °C aralığında yüksek derecede stabil olduğu, substrat olarak keratin azur kullanıldığında optimum pH'nın 7.5 sıcaklığın 50 °C, azokazein kullanıldığında ise optimum pH'nın

8.0 ve sıcaklığın 40 °C olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda araştırıcılar, elde etmiş oldukları enzimin bol miktarda bulunan tüy atıklarının işlenmesinde kullanışlı olabileceğini ve çevre dostu olduğunu bildirmişlerdir.

Habbeche ve ark. (2014), Cezayir'deki bir kümes çiftliğinden tavuk tüyü içeren besiyerini kullanarak izole ettikleri *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 aktinomiset suşundan ekstraselüler termaostabil bir keratinaz enzimi (KERAK-29) üretmişlerdir. MALDI-TOF/MS ile saflaştırdıkları enzimin moleküler kütlesinin 29233.10 Da olduğunu ve KERAK-29 enziminin yapısındaki 25.N ucundaki TQADPPSWGLNNIDRQTAFTKATSI amino asit dizisinin *Streptomyces* proteaz ile homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir. Serin proteaz ailesine ait olan bu enzimin PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) ve DFP (diiodopropyl fluorophosphates) ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. Keratin azuru substrat olarak kullandıklarında enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerinin 10.0 optimum sıcaklığın ise 70 °C olduğunu bulmuşlardır. KERAK-29 enzimi 20-60 °C arasındaki sıcaklıklarda 5 saat ve pH 3.0-10.0 arasındaki pH değişimlerinde ise 120 saat süreyle stabil kalmış, ayrıca 5 mM'lık Mn^{+2} varlığında termoaktivitenin ve termostabilitenin arttığını bildirmişlerdir. Araştırıcıların *A. keratinilytica* strain Cpt29 suşundan elde ettikleri KERAK-29 enziminin tüyleri tamamen parçalayabildiklerini ve deterjanların varlığında yüksek derecede keratinolitik aktivite ve önemli derecede stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. Söz konusu bu araştırıcılar, *A. keratinilytica* strain Cpt29 suşunun bu yeteneğinin keratin içeren atıkların değerlenmesi ve bu atıkların çevreye olumsuz etkilerinin azaltılması için yeni bir fırsat olabileceğini bildirmişlerdir.

Kumari ve Kumar (2014), kümes hayvanlarının olduğu toprak örneklerinden bakteri örnekleri izole ederek, bunları gram boyama ve biyokimyasal (indol, MR, VP, üreaz ve hareketlilik testi) özelliklerine göre tanımlamışlardır. İzole ettikleri *B. cereus* ve *P. aeruginosa* bakterilerini UV ile mutasyona uğratarak bunların keratinaz üretimlerini kıyaslamışlardır. *B. cereus* ve *P. aeruginosa* mutant suşlarının (sırasıyla 112 µg/ml ve 145µg/ml) yabani tip olanlardan daha fazla miktarda (sırasıyla 89 µg/ml ve 136µg/ml) keratinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, *B. cereus* ve *P. aeruginosa* mutant suşlarından elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizinde 56 kDa olduğunu, oysa ki yabani suşardan elde ettikleri enzimin

moleküler ağırlığının 29 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Son olarak UV ışınlarının çevreye zarar vermeden enzim aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Paul ve ark. (2014), özellikle deterjan endüstrisinde kullanılan keratinaz enzimini *Paenibacillus woosongensis* TKB2 bakteri suşundan elde etmişlerdir. Enzim verimini artırılması ve maliyetin düşürülmesi için 5 litrelik fermentör kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek keratinaz üretimi 30 °C sıcaklık, % 40 oksijen seviyesi, 500 rpm/dk karıştırma hızında ve % 0.76 tavuk yüyü içeren başlangıç pH değeri 8.5 e ayarlanmış besiyeri ile 48 saatlik fermentasyon sonunda 76.05 U/ml keratinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen keratinaz enzimi ile ham kazain kullanılarak zymogram analizi yapıldığında dört (4) izozimden meydana geldiği saptanmıştır. Ham keratinaz substrat olarak keratin kullanıldığında enzimin geniş bir pH (7-10.5) aralığında aktif olduğunu, ancak en yüksek aktiviteyi pH 9.0'da gösterdiğini tepit etmişlerdir. Daha düşük pH değerlerinde enzimin katalitik aktivitesini hızlıca kaybettiğini ve pH 6.0'da kataklitik aktivitenin % 50'e düştüğünü bildirmişlerdir. PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), β-mercaptoethanol, aprotinin ve leupeptin tarafından güçlü bir şekilde inaktive edilen ham keratinazın bu nedenlerle serin proteaz olduğunu belirtilmişlerdir. Ham enzimin EDTA ile önemli derecede stabilite gösterdiği ve ticari olarak mevcut olan deterjanlarla uyumlu olduğu bulunmuştur. Araştırıcılar *P. woosongensis* TKB2 suşundan elde ettikleri keratinolitik proteazın ticari deterjan bulunan koşullarda (% 0.7 w/v) 30 ve 60 dakikalık inkübasyon sonunda sırası ile %93-51 oranında stabilitesini koruduğunu saptamışlardır. Proteaz enziminin deterjan stabilitesi onun endüstriyel uygulamalarda kullanışlılığını gösteren önemli bir özelliktir. Araştırıcılar, bu çalışmada elde ettikleri alkalin keratinazın cerrah elbiselerinin üzerindeki kan lekelerinin giderilmesi ile çamaşırhanelerde potansiyel bir uygulamaya sahip olduğunu, kumaşın, elbiselerin (27.18 g/tex) ve elbise ipliklerinin sıkılığını değiştirmeden kısa sürede kan, yumurta sarısı ve çikolata lekelerinin temizlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırıcılar, bu deterjan formülasyonunda kullanılacak keratinaz enziminin sucul ekosistem üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını, dolayısıyla da elbiselerin yıkanması sonrasında oluşan

atıklarla ilişkili olan kirlilik problemlerinden kaçınmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilen Spektrofotometre (Shimadzu); Karıstırıcı (Elektro-Mag); pH Metre; Etüv; Otoklav; Blender; Hassas Terazi; Soğutmalı Santrifuj; Su Banyosu; Inkubatorler; Ultraviyole Lambası; TLC sistemi; HPLC; PCR cihazı; Elektroforez sistemleri; DNA dizi analizatörü, gibi teçhizatlar, sarf malzemeleri, kimyasallar, DNA ve plazmid izolasyon kitleri, protein ve DNA saflaştırma kitleri ve tavuk tüyü kullanılmıştır.

3.1.1. Besiyerleri

3.1.1.1. N1 Besiyeri

Bakteri suşlarının ilk izolasyonu, koloni morfolojilerine göre tanımlama ve örneklerin saf kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler ve miktarlar kullanılarak hazırlanan besiyerinin pH'ı 2N NaOH ile istenilen değere ayarlanıp, otoklavda steril edilmiştir (Anonymous, 1978)

Bileşimi	**(g/L)**
Pepton	10
Et Özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15
Distile su	1000 mL

3.1.1.2. LB Besiyeri

Mutasyon ve klonlama çalışmalarında katı, sıvı, antibiyotikli veya antibiyotiksiz olarak ve örneklerin saf kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler ve miktarlar kullanılarak hazırlanan besiyerinin pH'ı 2N NaOH ile istenilen değere ayarlanıp, otoklavda steril edilmiştir (Hu ve ark., 2013; Caf, 2012)

Bileşimi	**(g/L)**
Pepton	10
Et Özütü	10
NaCl	5
Agar	15
Distile su	1000 mL

3.1.1.3. Tavuk Tüyü Unlu Katı Besiyeri

İzole edilen suşlardaki keratinaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler ve miktarlar kullanılarak hazırlanan besiyerinin pH'ı 2N NaOH ile istenilen değere ayarlanıp, otoklavda steril edilmiştir (Bin ve ark, 2013; Okoroma ve ark, 2012).

Bileşimi	**(g/L)**
Tavuk Tüyü Unu	10
$MgSO_4x7H_2O$	0.2
K_2HPO_4	1
$CaCl_2$	0.1
KH_2PO_4	0.4
Agar	15
Distile su	1000 ml

3.1.1.4. Tavuk Tüylü Sıvı Besiyeri

İzole edilen ve keratinaz pozitif özellik gösteren suşlarda proteaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler ve miktarlar kullanılarak hazırlanan besiyerinin pH'ı 2N NaOH ile istenilen değere ayarlanıp, otoklavda steril edilmiştir (Bin ve ark, 2013; Okoroma ve ark, 2012).

Bileşimi	**(g/L)**
Tavuk Tüyü	10
$MgSO_4x7H_2O$	0.2
K_2HPO_4	1
$CaCl_2$	0.1
KH_2PO_4	0.4
Distile su	1000 ml

3.1.1.5. Tavuk Tüyü Unu

Tüyler 3-4 cm büyüklüğünde kesilerek musluk suyu ile iyice yıkanmış ve kurutulduktan sonra şişe içerisine alınarak üzerine kloroform:metanol (1:1) çözeltisi eklenenerek 48 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüyler süzülerek içerisine kloroform:aseton:metanol (4:1:3) çözeltisi eklenerek 48 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüyler süzülmüş ve solventlerden kurtulması için önce 4 defa çeşme suyunda son olarak distile su ile yıkanmıştır. En son güneş ışığında 30-40°C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Tüyler kurutulduktan sonra havan ile dövülerek un haline getirilmiştir (Saibabu ve ark., 2013).

3.1.1.6. Skim-milk Besiyeri

İzole edilen suşlarda keratinaz aktivitesi tespit edilmeden önce proteaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Aşağıdaki maddeler ve miktarlar kullanılarak hazırlanan besiyerinin pH'ı 2N NaOH ile istenilen değere ayarlanıp, otoklavda steril edilmiştir (Arabacı ve ark., 2012)

Bileşimi	**(g/L)**
Pepton	10
Et Özütü	3
NaCl	5
Skim-milk	11
Agar	15
Distile su	1000 ml

3.1.1.7. M9 Besiyeri

Suşların biyokimyasal identifikasyonunda Nişasta hidrolizinin gözlemlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Bileşimi	**(g/L)**
Pepton	3
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0.5
NH_4Cl	1
$MgSO_4$	0.24
$CaCl_2$	0.01
Nişasta	5
Agar	15
Distile su	1000 ml

Agar ve Nişasta dışındaki besiyeri bileşenleri distile suda çözüldükten sonra pH 7.0' a ayarlanmıştır. Son olarak agar ve nişasta da ilave edilerek otoklavda 120 °C'de 15 dk otoklav edilmiştir (Rai and Mukherjee,2011).

3.1.1.8. Clark-Lubs Besiyeri

Metil Kırmızısı ve Voges Proskauer testleri için kullanılmıştır (Clark ve Lubs, 1915.)

Bileşimi	**(g/L)**
Pepton	7
KH_2PO_4	5
Glikoz	5
Distile su	1000 ml

Otoklavda 120 °C'de 15 dk ster ediil edilerek kullanılmıştır.

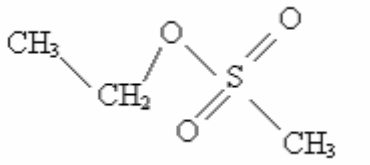
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. Keratin Solüsyonu (pH 7.0)

10 g tavuk tüyü 500 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide) ile 1000ml'lik şise içerisinde karıştırılmıştır ve 120°C'de 20 dk otoklav edilmiştir. Otoklavlandıktam sonra Tüy+DMSO karışımı soğumaya bırakılmıştır. Soğutma işleminden sonra üzerine -20°C'de soğutulmuş 1000 ml aseton eklenerek -20°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 10000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilerek çökelti birkaç defa distile suda yıkanmıştır 40°C'de etüvde kuramaya bırakılmıştır (Saibabu ve ark., 2013).

3.1.2.2. EMS (Etil Metan Sülfonat)

Pozitif mutajen olarak kullanılmıştır. EMS (Sigma, M0880). EMS'nin kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir (Mukherjee ve ark., 2011).



Açık Formülü:

Kapalı formülü : C3H8O3S

Molekül Formülü : CH3SO3C2H5

Diğer Adları : Ethyl mesylate, Ethyl methanesulphonate, Methanesulfonic acid ethyl ester, half-myleran, MSC 26805, ENT 26396.

CAS Kayıt No : 62-50-0 Sigma No : M-0880

Saflık düzeyi : ≥%99.9

Molekül Ağırlığı : 124.16 g/mol

Yoğunluğu : 1.15 g/cm3 (22 °C)

Erime Noktası : < 25 °C

Kaynama Noktası : 213–213.5 °C

3.1.2.3. dNTP Mix (Dezoksinükleosid trifosfat karışımı) (Promega)

PCR reaksiyonu esnasında polimerizasyonun gerçekleşmesinde gerekli olan nükleotidlerin sağlanması için dört çeşit dNTP (dezoksinükleosid trifosfat karışımı, dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) karışım halinde kullanılmıştır. Her bir dNTP'nin konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde hazırlanarak, kullanılmıştır (Innis ve Gelfand, 1990).

3.1.2.4. EtBr (Etidium Bromit)

Etidyum Bromür 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Elektroforez işleminden sonra amplifikasyonu gerçekleştirilen DNA fragmentlerinin UV ışığı altında görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Büyükleyla, 2013, Erlich ve ark. 1991).

3.1.2.5. Genel Bakteri Primerleri (Iontek)

Kullanılan 18-19 nükleotidlik primerlerin 5'→3' yönündeki nükleotid sıraları, her bir primerin G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklığı Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Genel bakteri primerleri (İontek: 1204291127-1 ve 1204291127-2)

Primer	Primer Dizisi (5'→3')	G+C yüzdesi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
Forward	GAGTTTGATCCTGGCTCA	72.1	55
Reverse	CGGTGTGTAGCAAGGCCC	71.9	55

3.1.2.6. Taq DNA Polimeraz

Promega marka *Taq* DNA polimeraz (5 Unite/µL), PCR reaksiyonu esnasında polimerizasyonun gerçekleşmesi için kullanılmıştır (Büyükleyla, 2013; Erlich ve ark. 1991).

3.1.2.7. 6X Loading Dye Solution (Promega)

Jelde yürütülen DNA'nın nereye kadar yürütüldüğünü belirlemek amacıyla 8µl (DNA) / 2 µl (yükleme solüsyonu) oranında yükleme solüsyonu olarak kullanılmıştır.

3.1.2.8. 10X TBE (Tris Borate EDTA) Elektroforez Tampon Çözeltisi

Agaroz jeli hazırlamak ve örnekleri jelde yürütmek amacıyla eriyik 20 kat sulandırılarak 0.5 X TBE tampon çözelti olarak kullanılmıştır (Büyükleyla, 2013; Erlich ve ark. 1991).

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimin pH 6.0-8.0 aralığındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de verilen tampon çözeltileri ve hacimleri belirtilen miktarlarda karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek yeni bir karışım elde edilmiştir (Aygan, 2008).

Çizelge 3.2. Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH	0,2 M NaH_2PO_4 (mL)	0,2 M Na_2HPO_4 (mL)	Distile Su (mL)
6,0	87,7	12,3	100
6,5	68,5	31,5	100
7,0	39,0	61,0	100
7,5	16,0	84,0	100
8,0	5,3	94,7	100

3.1.3.2. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M Glisin ile 0,2 M NaOH çözeltileri ve distile sudan uygun hacimlerde karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip yeni bir karışım elde edilmiştir. Hangi pH değerine sahip tampon hazırlanacaksa, çizelge 3.3'de verilen oranlar kullanılmıştır (Caf, 2012; Aygan, 2008).

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH	0,2M Glisin (mL)	0,2 M NaOH (mL)	Distile Su (mL)
8,6	50	4,0	146
9,0	50	8,8	141,2
9,6	50	22,4	127,6
10,0	50	32,0	118
10,6	50	45,5	104,5

3.1.3.3. Borax-NaOH Tamponu

Enzimin pH 11.0-12.5 arasındaki aktivitesini saptamak amacı ile kullanılmıştır. Tamponu hazırlamak için 0.05M Boraks (19,05g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilinceye kadar (0.2N NaOH ve yüksek pH değerleri için de 2 ve 3N NaOH) uygun NaOH çözeltisinden eklenerek son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir (Caf, 2012; Aygan, 2008).

3.1.4. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1. Solüsyon A

%29.2 Akrilamid
%0.8 Bisakrilamid

Hazırlanışı:

29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid distile su içerisinde çözülürek distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Buzdolabında +4 ºC'de saklanmıştır.

3.1.4.2. Solüsyon B

2 M Tris-HCl (pH 8.8)	75 mL
SDS (%10)	4 mL
Distile su	21 mL

3.1.4.3. Solüsyon C

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	50 mL
SDS (%10)	4 mL
Distile su	46 mL

3.1.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat) (%10)

AMPS	0.5 g
Distile su	(5 mL'ye tamamlanır)

3.1.4.5. Elektroforez Tamponu (pH 8.3)

25mM Tris	3 g
192 mM Glisin	14.4 g
SDS	%0.1
Distile Su	(1 L'ye tamamlanır)

3.1.4.6. Örnek Tamponu (pH 6.8)

Tris-HCl	1M
Gliserol (%50)	5 mL
SDS (%10)	2 mL
2-Mercaptoethanol	0.5 mL
Bromfenol mavisi	%1
Distile Su	0.9 mL

3.1.4.7. Boyayı Geri Alma Solüsyonu

Methanol	100 mL
Asetikasit	100 mL
Distile Su	800 mL

3.1.4.8. Renatürasyon Solüsyonu (%2.5)

Triton X-100	5 ml
Glisin-NaOH tamponu(0.2M, pH 10.0)	(200 ml'ye tamamlanır)

3.1.4.9. Coomassie Brillant Blue R250 (%2.5)

Coomassie Brillant Blue R250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
Distile Su	650 ml

3.1.5. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

3.1.5.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi

Keratinaz enziminin tavuk tüyünü parçalamasından sonra açığa çıkan hidroliz ürünlerinin belirlenmesinde hareketli faz olarak kullanılmıştır. Butanol-asetik asit-distile su (3:1:1) şeklinde hazırlanmıştır (Arabacı ve ark, 2012).

3.1.5.2. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25)

Ninhidrin	0.25 g
Aseton	(100 ml'ye tamamlanmıştır)

3.1.5.3. L-prolin (% 1) (w/v), L-Glisin (%1) (w/v), L-Sistein (%1) (w/v), L-Histidin (%1) (w/v) ve L-tirosin (%1) (w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin karşılaştırılarak tanımlanması amacıyla marker olarak kullanılmışlardır.

3.1.6. HPLC Analizinde Kullanılan Solüsyonlar

3.1.6.1. OPA reaktifi (Padovan ve ark, 2014)

o-fitalaldehit	51.2 mg
etanol	1.5 ml

3-merkaptopropionik asit	80 µl
Potasyum rhodanide	1750 mg
Borat Tamponu (0.4 M, pH 10.4)	(50 ml'ye tamamlanır)

3.1.6.2. FMOC-Cl reaktifi (Zhaou ve ark, 2011)

FMOC-Cl	0.025 g
Asetonitril	(10 ml'ye tamamlanır)

3.1.6.3. Borat Tamponu (0.4 M; pH 10.6)

Enzimin pH 11.0-12.5 arasındaki aktivitesini saptamak amacı ile kullanılmıştır. Tamponu hazırlamak için 0.05M Boraks (19,05g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilinceye kadar (0.2N NaOH ve yüksek pH değerleri için de 2 ve 3N NaOH) uygun NaOH çözeltisinden eklenerek son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir (Aygan, 2008).

3.1.6.4. Standart Solüsyonu

L-tirozin	10 mg
L-prolin	100 mg
L-sistein	10 mg
L-glisin	10 mg
L-histidin	10 mg
HCl	(her biri ayrı ayrı 10 ml'ye tamamlanır)

3.1.7. Lowry Metodunda kullanılan Solüsyonlar

3.1.7.1. Protein (BSA) standartı

1 mg/ml olarak hazırlanmış BSA sırayla Çizelge 3.4'te verilen oranlarda her birinden 2'şer tüp olacak şekilde hazırlanmıştır (Lowry, 1951).

Çizelge 3.4. Protein standartının hazırlanması

BSA*	5	20	50	100	300	400	500
Distile su (µl)	495	480	450	400	200	100	0

* 1 mg/ml BSA stok çözeltisinden her bir tüpe yukardaki değerlerde µl miktarda eklenerek standart hazırlanmıştır.

3.1.7.2. A Solüsyonu

$CuSO_4x5H_2O$	0.5 g
$Na_3C_6H_5O_7*2H_2O$	1 g
Distile Su	(100 ml'ye tamamlanır)

3.1.7.3. B Solüsyonu

Na_2CO3	20 g
NaOH	4 g
Distile Su	(1L'ye tamamlanır)

3.1.7.4. C Solüsyonu

A Solüsyonu	1 ml
B Solüsyonu	50 ml

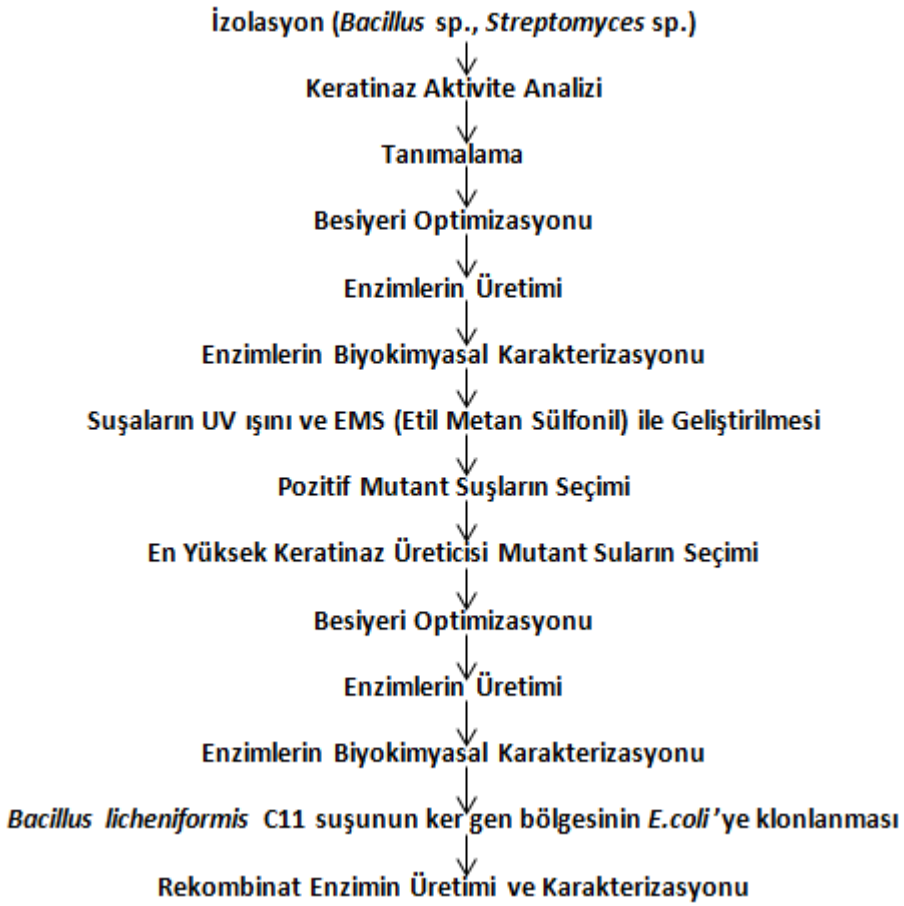
3.1.7.5. D Solüsyonu

Folin-Ciocalteu Ayracı	10 ml
Distile Su	10 ml

3.2. Metod

Bu arastırmada, farklı ortamlardan alınan toprak örnekleri, biyokompost ve tavuk üretim çiftliği atık sahalarından *Streptomyces* sp. C1 ve *Bacillus* sp. C11 susu izole edilmis ve tanımlamaları yapılmıştır. Daha sonra tanımlanan suşlarından optimum kültür koşullarında keratinaz enzim üretimi

gerçekleştirilerek üretilen enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Keratinaz üretici suşların ürettikleri keratinaz miktarlarını arttırmak amacı ile EMS (Etil metansulfonat) ve UV ile mumale edilerek mutasyon yapılmış, mutant suşların kültivasyon koşulları optimize edilerek kontrole kıyasla enzim üretim miktarı belirlenmiştir. İdentifikasyon çalışmalarında *Bacillus licheniformis* olduğu saptanan suşa ait keratinaz geninin klonlanması, rekombinant enzim üretimi ve bu enzimlerin endüstriyel kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmanın aşamaları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın işlem akış şeması

3.2.1. Alkalin ve Termofilik Keratinaz Üreticisi *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Izolasyonu ve Katı Besiyerinde Keratinaz aktivitesi Tayini

3.2.1.1. *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu

Çeşitli bölgelerden alınan toprak örnekleri 1'er gram tartılıp 5 mL steril distile su ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra, *Bacillus* sp. organizmalarını izole edebilmek için 80 ºC'de 10 dk inkübe edilerek, ısı şoku uygulanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2008; Arıkan, 2008).

Örnekler ön işlemi takiben, tek koloni elde edebilmek için steril su ile seri sulandırma (10^{-5}- 10^{-6}) yapılarak, LB agara yayma metoduyla ekim yapılmış ve 55 ºC'de pH 10.0'da 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında tek düşmüş kolonilerden karakteristik *Bacillus* görünümüne sahip koloniler seçilip N1 agara çizgi şeklinde ekilerek 55 ºC'de bir gece inkübe edilmiştir. Elde edilen *Bacillus* suşları keratinaz aktivitelerinin saptanması için stok kültür şeklinde +4 °C saklanmışlardır.

3.2.1.2. *Streptomyces* sp. suşlarının izolasyonu

Gram-pozitif bakteri olan *Streptomyces* sp. izolasyonu için çeşitli bölgelerden alınan toprak örnekleri 1'er gram tartılıp 5 ml steril distile su ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra, önceden hazırlanmış seçici besiyerine (g/L'de NH_4Cl: 5, $CaCl_2$: 2, $MgSO_4.7H_2O$: 2 K_2HPO_4: 4, Kazein: 5, Nişasta: 5, Agar: 15) yayma ekim yapılmış ve 50 ºC'de pH 10.0'da 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminden sonra meydana gelen *Streptomyces*'in karakteristik sporlara sahip koloniler N1 agar besiyerine ekilerek saf kültür elde edilmiştir. Elde edilen *Streptomyces* suşları keratinaz aktivitelerinin saptanması için stok kültür şeklinde +4 °C saklanmışlardır (Syed, 2009).

3.2.1.3. Keratinaz Üreten *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Saptanması

İzole edilen *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. suşları enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla pH'sı 10.0'a ayarlanmış Tavuk tüyü unu içeren katı besi yerlerine (g/L'de NH_4Cl: 5, NaCl: 5, $MgSO_4.7H_2O$: 1, K_2HPO_4: 3, KH_2PO_4 : 4, Maya: 1, Tavuk tüyü unu: 10, Agar: 15) çizgi şeklinde ekilmiş ve 55ºC'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesinin varlığının gözlenmesi amacı ile %10'luk soğuk TCA ile muamele edilmişlerdir.

Keratinaz üretme yeteneği tavuk tüyü bulunan besiyerinde üretilen kolonilerin etrafındaki şeffaf zon oluşumuna göre saptanmıştır (Joshi, 2010; Agrahari ve Wadhwa, 2010).

Üreme çizgisi etrafında şeffaf hidroliz zonu oluşturan suşlar stok kültürden tekrar taze kültürleri hazırlanarak sonraki çalışmalar için +4°C'de saklanmışlardır.

3.2.1.4. Sıvı Besiyerinde Keratinaz Aktivitelerinin Saptanması ve Suşların Seçimi

Katı besiyerinde alkalin keratinaz üreticisi olduğu belirlenen suşların optimum ürediği ve enzim sentezinin gerçekleştiği pH aralığının saptanması için pH 6.0-13.0'e sahip tavuk tüylü sıvı besiyerlerine keratinaz üreticisi suşların (İlk OD600=0.5 olacak şekilde) ekimi yapılarak farklı sıcaklıklarda (30-60 ºC) 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler kaba filtreden geçirildikten sonra 8000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant:soğuk aseton (1:3) ile 3 saat bekletilmiş ve 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek enzim çöktürülmüştür. Rölatif enzim aktiviteleri belilenerek en yüksek keratinaz üreticisi suş belirlenmiştir (Voget ve ark.2006).

3.2.1.5. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması

Bu amaçla, pH aralığı 6.0-13.0 arasında değişen tavuktüyü unu içeren katı besiyerlerine seçimi yapılan suşların, çizgi şeklinde ekimi yapılarak farklı sıcaklıklarda (30-60 ºC) inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni ve zon çapları ölçülerek üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Arabacı ve ark., 2012; Voget ve ark., 2006).

3.2.2. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Tanımlama Çalışmaları

3.2.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama

Seçilen bakteri örneklerinin teşhisi için gram boyama, hareketlilik ve spor oluşumu gibi kültür morfolojisi testlerinin yanı sıra, katalaz, sitrat, metil kırmızısı, nişasta hidroliz, % 6 NaCl'de üreme, glikoz ve mannitolden asit oluşumu gibi biyokimyasal testler yapılmıştır (Caf, 2012; Aygan, 2008; Hafer and Cruz, 2006).

3.2.2.1(1) Gram Boyama

LB agar besiyerinde üretilen 1 gecelik taze bakteri kültüründen öze yardımıyla bir miktar alınarak 1 damla sıvı fizyolojik su ile lam üzerinde homojen hale getirilmiştir. Kuruduktan sonra alevde tespit edilen örnekler sırasıyla Kristal viyole, Lugol, alkol, bazik fuksin ve distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Örnekler immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir (Claus ve Berkeley 1986).

3.2.2.1(2) Katalaz Testi

LB agar üretilen 1 gecelik taze bakteri kültürü yüzeyine, % 3'lük H_2O_2'ten 1ml damlatıp kültür yüzeyinde hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığına bakılarak değerlendirme yapılmıştır (York ve ark, 2010).

3.2.2.1(3) Sitrat Testi

Bakteri kolonisinden özeyle alınarak Sitrat Yatık Agar besiyerinin yüzeyine ekim yapılarak 37 °C'de 2-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, yeşil rengin maviye dönüşmesine göre değerlendirme yapılmıştır (MacFaddin, 2000).

3.2.2.1(4) Metil Kırmızısı Testi

Bakteri kolonisinden özeyle alınarak Glukoz-Fosfat sıvı besiyerine ekim yapılarak 50°C'de 2-3gün inkübe edilmiştir. inkübasyondan sonra tüpe, 5ml bakteri kültürüne 3-5 damla metil kırmızısı ayıracı ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak kırmızı renk oluşup oluşmamasına göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.2.1(5) Nişasta Hidroliz Testi

% 1 nişasta içeren M9 agar besiyerine Bakteri kolonilerinden çizgi ekim yapılarak 55 °C'de 48-72 saat inkübasyon yapılarak lugol ile boyamadan sonra ekim çizgisi etrafındaki şeffaf hidroliz zonu oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır (Caf ve ark., 2012).

3.2.2.1(6) Voges Proskaver Testi

Bakteri kolonisinden özeyle alınarak Clark-Lubs besiyerine ekim yapılmış, 50 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra tüpler hafif karıştırılarak 1 ml örneğe 600

µl Ayraç I ve 200 µl Ayraç II damlatılarak 15-20 dk sonra kırmızı renk oluşununa göre değerlendirilmiştir (Clark ve Lubs, 1915).

Çizelge. 3.5. VP testi için ayraçların hazırlanışı

Ayraç I	Miktar	Ayraç II	Miktar
α-naftol	5 g	KOH	10 g
etanol (%98-100)	100 ml	Distile su	100 ml

3.2.2.2. Moleküler Tanımlama

Tek koloniden hazırlanan bir gecelik taze kültürden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra Genel Bakteri primerleri (Çizelge 3.6.) kullanılarak uygun PCR koşullarında (Çizelge 3.7.ve 3.8.) 16S rDNA sekansı çoğaltılmıştır. PCR ürününün analizi ve saflaştılmak amacıyla %1'lik agaroz jelde yürülme ve daha sonra ortaya çıkan ürünün jelden saflaştırılması gerçekleştrilmiştir. Saflaştırma "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega" kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf PCR ürünü ile sekans analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Genel bakteri primerleri: İontek: 1204291127-1 ve 1204291127-2

Primer	Primer dizisi	G+C yüzdesi	Bağlanma Sıcaklığı(°C)
Forward	GAGTTTGATCCTGGCTCA	72.1	34
Reverse	CGGTGTGTAGCAAGGCCC	71.9	34

Çizelge 3.7. PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Hacim (µL)
ddH_2O	32
10X Taq Buffer	5
$MgCl_2$ (25 mM)	5
dNTP mix (2 mM)	2
Forward Primer (5 pmol)	1
Reverse Primer (5 pmol)	1
Taq DNA Polimeraz (500 U/µL)	1
DNA (5 ng/ µL)	3
Toplam Hacim	50

Çizelge 3.8. PCR koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	96	300	1
2.1 **2.2** **2.3**	Denatürasyon	94	60	25
	Primerin DNA'ya bağlanması	50	60	
	Uzama safhası	72	90	
3.	Son uzama safhası	72	600	1
4.	Soğutma	4	∞	

Elde edilen 16S rDNA sekanslarının NCBI da Blast analizi yapılarak filogenetik ağacı çıkarılmıştır. Tanımlamaları yapılan suşların NCBI gen bank veritabanına kaydı yapılmıştır (Caf ve ark., 2013).

3.2.2.3. 16S rRNA Gen Sekansının BLAST Analizi ve Filogenetik Ağacının Oluşturulması

EMBLve NCBL gibi veri tabanlarında elde edilen alignment (dizileme) sonuçları Mega 6.06 programları ile neighbour-joining metodu kullanılarak, filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir (Tatineni ve ark, 2008).

3.2.3. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

3.2.3.1. Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 100X şeklinde temel tuz çözeltisi (mineral medium) hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 0.2µm' lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve +4°C'de stok şeklinde saklanmıştır. Optimizasyon çalışmaları için her bir parametre aşamasında bir gecelik taze bakteri kültüründen optik yoğunluk ölçümü yapılarak standart sayıda mikroorganizma inoküle edilerek kullanılmıştır (Mousavi ve ark., 2013).

3.2.3.1(1) Farklı konsantrasyondaki (5-10 g/l) Tavuk Tüyünün Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı tüy konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla, daha önceden hazırlanmış tuz çözeltisi optimum pH değerine ayarlanarak (ana suşun) son hacim 20 ml olacak şekilde 50 ml' erlenlere dağıtılmıştır. Sırasıyla 1, 5, 10, 15, 20 g/l tavuk tüyü ilave edilerek 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Farklı tüy konsantrasyonunu içeren besiyerlerinde üretilen organizmalar kaba filtreden geçirildikten sonra süpernatant 8000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek bakteriler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakterisiz süpernatantlar kısmi saflaştırma işleminden sonra ayrı ayrı enzim aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır (Evans ve ark., 2010).

3.2.3.1(2) Tavuk Tüylü Ortamda Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimine etkilerini belirlemek amacıyla, daha önceden hazırlanmış tuz çözeltisi optimum pH değerine ayarlanarak (ana suşun) son hacim 20 ml olacak şekilde 50 ml' erlenlere dağıtılmıştır. Her test üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Her bir erlen üzerine bir önceki aşamada optimum enzim üretiminin elde edildiği miktarda tavuk tüyü ilave edilmiştir. Daha sonra sırasıyla %0.1 glukoz, maltoz, sukroz, laktoz ve nişasta ilave edilerek hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarını içeren besiyerlerinde üretilen kültürler kaba filtreden geçirildikten sonra 8000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek organizmalar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar kısmi saflaştırma işleminden enzim aktivitesinin saptanması için ayrı ayrı analiz yapılmıştır. Kontrol olarak sadece tavuk tüyü içeren tuz çözeltisi ile üretim denemesi ve aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Denemelerde azot kaynağı olarak; (%1) pepton, Üre, NH_4Cl, $NaNO_3$ ve (%0.5) Maya kullanılarak bileşenlerin keratinaz üretimine etkisi araştırılmıştır (Kiran ve Chandra 2008; Kainor ve ark., 2011).

3.2.3.1(3) pH ve Sıcaklığın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Optimizasyon aşamasında en iyi enzim üretiminin gerçekleştiği besiyeri pH'sının saptanması için son hacmi 20 ml olacak şekilde önceden hazırlanmış tuz çözeltisi 50 ml'lik erlenlere aktarılmış ve pH'ları 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13'e ayarlanmıştır. Her bir erlene daha önce optimizasyonu yapılan miktarlarda tavuk tüyü, karbon kaynağı ve azot kaynağı ilave edilerek 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Farklı pH'larda üretilen kültürler kaba filtreden geçirildikten sonra 8000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar kısmi saflaştırma işleminden sonra enzim aktivitesinin saptanması için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Denemeler üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiş ve değerlendirmede tekrarların ortalamaları kullanılmıştır.

Sıcaklığın keratinaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla son hacmi 20 ml olacak şekilde önceden hazırlanmış tuz çözeltisi 50 ml'lik erlenlere aktarılmış çözeltinin pH'sı optimim verimin elde edildiği değere ayarlanark kullanılmıştır. Her bir erlene daha önce optimizasyonu yapılan miktarlarda tavuk tüyü, karbon kaynağı ve azot kaynağı ilave edilerek 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyerlerine standart organizma aşılaması yapıldıktan sonra 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de çalkalamalı üretim gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda üretilen kültürler kaba filtreden süzüldükten sonra 8000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek bakteriler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar kısmi saflaştırma işleminden sonra enzim aktivitesinin saptanması için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Denemeler üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiş ve değerlendirmede tekrarların ortalamaları kullanılmıştır. (Swain ve ark., 2006; Suneetha ve ark. 2011)

3.2.3.1(4) İnokülasyon Miktarının ve İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı miktarlarda bakteri inokülasyonunun enzim üretimine etkilerini belirlemek amacıyla, daha önceden hazırlanmış tuz çözeltisi optimum pH değerine ayarlanarak son hacim 20 ml olacak şekilde 50 ml' erlenlere

dağıtılmıştır. 3'er li tekrar şeklinde hazırlanan herbir erlen üzerine bir önceki aşamalar da optimum enzim üretiminin elde edildiği miktarda tavuk tüyü, karbon kaynağı ve nitrojen kaynağı ilave edilerek 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha önceden hazırlamış olduğumuz gecelik sıvı kültürün OD_{600} değeri belirlenerek ana kültüre başlangıç OD_{600} sırasıyla 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 olacak şekilde hesaplanarak çeşitli miktarlarda inokülasyonlar yapılmıştır ve optimum olarak bulunan sıcaklıkta 72 saat inkübasyonun ardından örnekler alınarak kaba filtreden geçirildikten sonra 8000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakterisiz süpernatantlar kısmi saflaştırma işleminden sonra ayrı ayrı enzim aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır (Kalpana 2013; Kainor ve ark., 2011; Suneetha ve ark. 2011).

3.2.3.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Suşların optimum ürediği ve enzim sentezi gerçekleştirdiği koşullarda ve sürede enzim üretimi gerçekleştirilmiştir ve inkübasyon sonunda kaba filtreden geçirildikten sonra 8000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra süpernatant üzerine (1:3 oranda) -20 ºC' de soğutulmuş aseton eklenerek –20 ºC'de 120 dk bekletilerek enzim prespite edilmiştir. Presipite edilen örneğimiz 10000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiştir ve pellet pH 7.0 fosfat tamponunda çözülerek enzim solüsyonu olarak kullanılmıştır (Saibabu ve ark., 2013; More ve ark., 2013).

3.2.3.2(1) Enzim Reaksiyonu

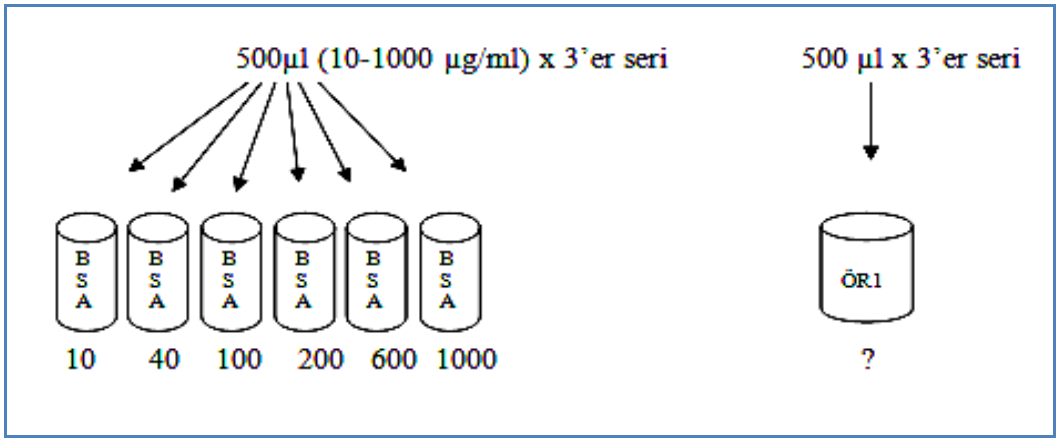
Enzim reksiyonu için 50 µl süpernatant, 950 µl % 0.5'lik pH 7.0 tamponu içerisinde hazırlanmış substrat (tavuk tüyü) solüsyonu ve 1000 µl pH 10.0 tamponu kullanılmıştır. Reaksiyon 55ºC'de 30 dk gerçekleştirilmiştir ve inkübasyon sonucunda reaksiyonu durdurmak amacıyla her örneğe eşit miktarda (1:1) 0.4 M soğutulmuş TCA eklenerek +4 ºC'de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dk çöktürüldükten sonra süpernatant 280 nm'de okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Tüm analizler 3 tekrar şeklinde

gerçekleştirilmiştir (Kainor ve ark., 2011; Suneetha ve ark. 2011; Poovendran ve ark., 2011)

3.2.3.2(2) Lowry Metodu

Lowry Metodu biyoljik örneklerdeki proteinlerinin miktarını belirlemede çok geniş olarak kullanılmıştır. Lowry Metodunun mekanizması proteinlerin öncellikle alkali ortamda bakır iyonları ön muameleden geçirilmesi ve sonra Folin ayracının eklenmesiyle bakır iyonlarıyla ön işlemden geçirilmiş aromatik aminoasitlerin fosfomolibdatfosfotungstik asiti indirgemesiyle oluşan reaksiyonda son ürünün mavi renk oluşumuna neden olmaktadır. Proteinlerin miktarı bu rengin 750 nm'de okunduktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan BSA standartıyla hesaplanabilmektedir (Gerhardt ve ark., 1994; Lowry, 1951).

Hazırlanışı: Tüpler içerisinde 500µl 3'erli tekrar halinde çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan BSA (10-1000 µg/ml) ve protein miktarını ölçmek istediğimiz örneğimizden tüp içerisine konulmuştur (Şekil 3.2). Ayrıca kör olarak 500 µl su kullanılmıştır. Daha sonra her bir tüpe önceden hazırlamış olduğumuz C solüsyonundan 2.5 ml eklenmiştir (deneyin hassasiyetini arttırmak için Folin ayracı önce 1.25 ml konulup çarkalandıktan sonra geriye kalan 1.25 ml eklenmiştir) ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her tüp içerisine 0.25 ml D solüsyonu eklenmiştir ve tüpler dikkatlice çalkalanarak karıştırlmıştır daha sonra 20-30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler 750 nm' de okunmuştur. Hazırlanan BSA standart eğrisi kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. BSA tüp serilerini hazırlama

3.2.3.2(3) Tirozin Konsantrasyon Eğrisi

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 12,5 mg/ml stok tirozin destile suda çözülmüş ve bu stok çözeltiden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 200 µg/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmelerden 0.5ml alınmış ve üzerine sırasıyla 2.5 ml 0.5 M Na2CO3 ile 0.5 ml 1N Folin-ayracı çözeltisi eklenerek 30 dakika 30°C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir dilüsyonun 660 nm'deki optik yoğunluğu ölçülmüştür. Bu yolla ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı Mm tirozin konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanmıştır (Folin, 1929; Prasad ve ark 2014) .

3.2.3.2(4) Enzim Ünitesinin Tanımı ve Hesaplanması

Bir ünite (U/ml) alkalen keratinaz, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli miktar olarak tanımlanmıştır. Aktivite hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Gradisar ve ark., 2005).

Enzim Aktivitesi (U/ml/dk) = (OD_{280}/Eğim) x TH (ml) / EH (ml) x İS (dk)

Eğim: Tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısı; *TH*: Toplam Reaksiyon Hacmi (ml), *EH*: Enzim Hacmi, *İS*: İnkübasyon Süresi

3.2.3.2(5) Tüy Parçalanma Oranının Belirlenmesi (TPO)

Kültivasyon sonunda süzülen tüyler etüvde kurutulmuştur ve aşağıdaki formül ile Tüy Parçalanma Oranı (*TPO*) belirlenmiştir. *TT* toplam tüy miktarını ve *KT* kalan tüy miktarını ifade etmektedir (Ni ve ark., 2011).

TPO (%)= (TT-KT) x 100/TT

3.2.4. Rastgele Mutasyon Çalışmaları Yapılarak Keratinaz Ekspresyon Düzeyinin Artırılması

3.2.4.1. EMS (Emil Metan Sülfonat) ile Mutasyon

Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces sp. C1*'in kreatinaz üretimini arttırmak amacıyla, sıvı LB besiyerinde hazırlanan 1 gecelik kültürleri alınarak bakteriler 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Yaklaşık ilk OD600 0.5 olacak şekilde LB besiyeri ile süspanse edildikten sonra hazırlanan süspansiyonun 2 ml 'lik eppendorflara 1er ml dağıtılmıştır. Süspansiyonun her mililitresi farklı sürelerde (0-60dk) 37 °C'deki su banyosunda farklı konsantrasyonda (10-60 µl) EMS (Etil Metan Sülfonat) ile muamele edilmişlerdir. Inkübasyon sonunda EMS, daha önceden hazırlamış olduğumuz LB besiyeri ile üç kez yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu süspansiyonlardan alınan 100 µl örnekler her biri ayrı ayrı ml skim-milk agar ortamına yayma şeklinde ekimi yapılarak önce 2 saat 37 °C'de daha sonra 48 saat 55 °C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda tek düşmüş Proteaz pozitif koloniler kontrol suş ile birlikte Tavuk tüyü unlu katı besiyerine çizgi şeklinde ekimi yapılarak analizi gerçekleştirilmiştir (Jeevana Lakshmi ve ark., 2013; Venitt ve ark., 1984).

3.2.4.2. UV ile Mutasyon

Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces sp. C1*'in kreatinaz üretimini arttırmak amacıyla, sıvı LB besiyerinde hazırlanan 1 gecelik kültürleri hazırlanmıştır. Örnekler tek koloni elde edebilmek için steril su ile seri sulandırma

(10^{-5}) yapılarak, Skim-milk agara yayma metoduyla ekim yapılmış ve çeşitli sürelerde (0-60dk)Ultraviole ışınına (UV) (30cm mesafede, 254nm) maruz bırakılmıştır. Aynı koşullarda hazırlanan kontrol Ultraviole ışınına maruz bırakılmamıştır. UV işleminden sonra petriler 37 °C'de karanlık ortamda 2 saat bekletildikten sonra 50 °C'de 48 saat inübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra pozitif mutant olduğu belirlenen Suşların Seçimi yapılarak bu suşlar kontrol ile birlikte stok kültür şeklinde hazırlanarak +4 °C'de saklanmışlardır (Nadeem ve ark. 2010)

3.2.4.3. Pozitif Mutasyon Geçiren Mutant Suşların Belirlenmesi

Katı besiyerinde alkalin keratinaz üreticisi olduğu belirlenen mutant suşlar kontrol suşlar ile birlikte belirlenen optimum koşullarda optimum süre inkübe edilerek az miktarlarda Keratinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kısmi saflaştırma yapılarak tüy paçalanma oranı, rölatif enzim aktivitesi, kerartinaz enzim aktivitesi U/ml ve Lowry metodu kullanılark en yüksek keratinaz üreticisi mutant suşun şeçimi yapılmıştır.

3.2.4.4. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

3.2.3.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.2.5. C11 Keratinaz Üretici Genin *E.coli*'ye Klonlanması

3.2.5.1. Hedef Genin Belirlenmesi

Kalitatif ve kantitatif olarak keratinaz üretici olduğu belirlenen *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait genomik DNA'da literatürde (NCBI) var olan keratinaz genlerinin varliğini tespit etmek amacıyla 'NCBI (National Center for Biotechnology Information)' genom veri tabanından yararlanılarak veritabanındaki *Bacillus licheniformis* keratinaz genlerinin sekansları

araştırılmıştır. Bu şekilde veritabanından 12 farklı keratinaz geninin dizisine ulaşılmıştır.

3.2.5.2. Vektör Seçimi ve Keratinaz Genlerine Ait Primerlerin Tasarımı

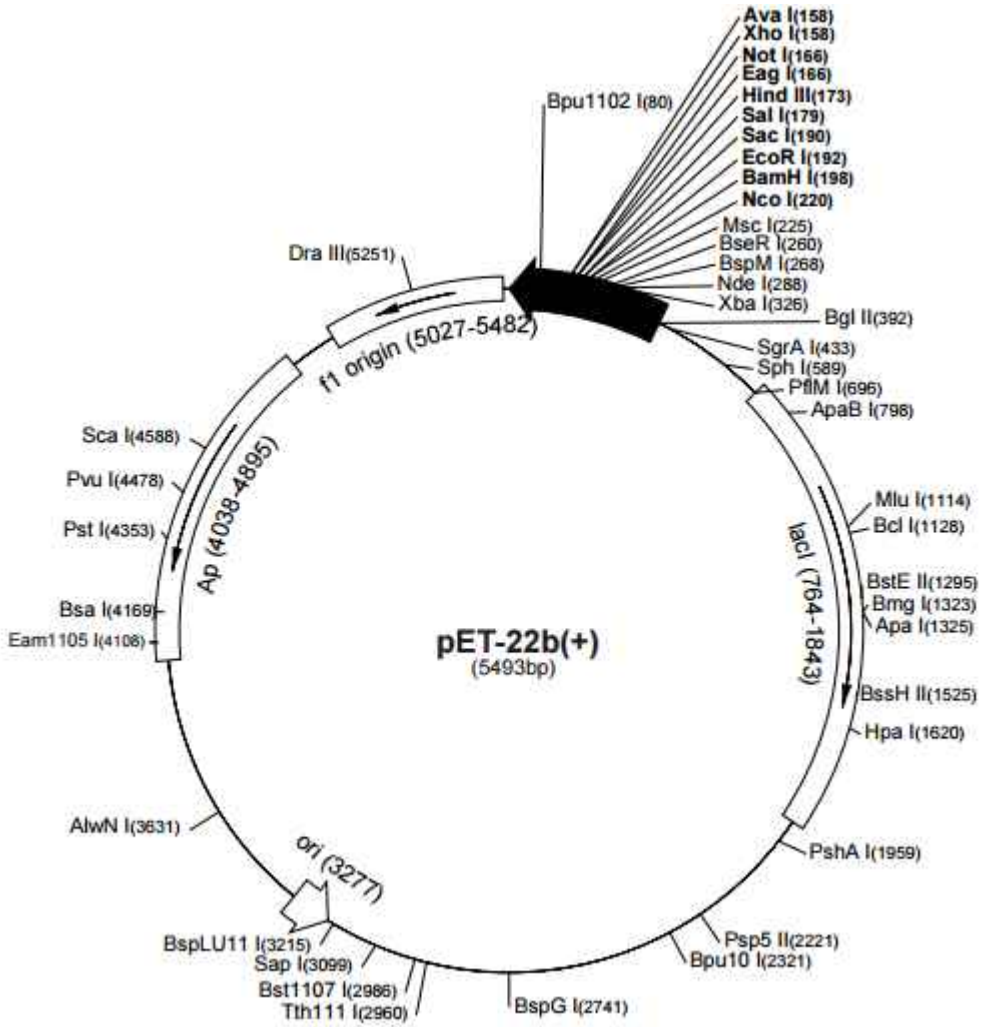
Rekombinat protein üretimi için birçok araştırmacı tarafından başarılı bir şekilde kullanılmış olan pET22b(+) (Novagen) vektörü (Şekil 3.3.) tercih edilmiştir.

pET-22b(+) sekansında önemli noktalar	
T7 promotör	361-377
T7 transkripsiyon başlangıç noktası	360
pelB'yi kodlayan sekans bölgesi	224-289
Çoklu klonlama bölgeleri	
(*Nco* I-*Xho* I)	158-225
His*Tag sekans bölgesi	140-157
T7 terminatör	26-72
*lac*I coding sequence	764-1843
pBR322 orjini	3277
bla sekans bölgesi	4038-4895
f1 orijin	5027-5482

Vektörümüze ait klonlama bölgesinde yer alan restriksiyon enzimleri tespit edilerek veritabanından elde edilen keratinaz genlerine göre klonlama yapılamk istenen her gen için enzim ikilileri seçildi. Restriksiyon enzim ikilileri seçilirken bu enzimlerin kesim bölgelerinin bizim klonlamak istediğimiz keratinaz genlerinin içerisinde olup olmadıkları 'NEB cutter V2.0' programı kullanılarak araştırılmıştır ve uygun olanları primer tasarımı için seçilmiştir.

İleri ve geri (Upstream and Downstream) primerleri için genom bankasından seçtiğimiz *Bacillus licheniformis* N5 keratinase geninden minimum 25-28 baz çifti (bç) bire bir olarak alınmıştır ve bu diziye restriksiyon

enzimlerinin dizileri ilave edilmiştir. Ayrıca birkaç modifiye çalışmaları yapılarak oligonükleotid Tm sıcaklığı düşürülerek optimize edilmiştir (Lin ve ark.,1995).



Şekil 3.3. pET22b(+) vektörünün dairesel haritası

3.2.5.3. PCR işlemi için dizayn edilen primerler ve özellikleri

Upstream primerinin baz sırası:

5'-CACCCATGGATATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTG-3

Baz uzunluğu : 36 bç

Tm (50 Mm NaCl) : 62.1 °C

GC içeriği : % 41.7

Moleküler Ağırlığı : 11,163.3

nmol/OD260 : 2.8

ug/OD260 : 31.2

Oligonükleotit miktarı: 33.0 (OD260)=92.1 (nMol)= 1.03 (mg)

Downstream primerinin baz sırası:

5'-AAT TCC CGG GTT GAG CAG CAG CTT CGA CAT TGA-3

Baz uzunluğu : 33 bç

Tm (50 Mm NaCl) : 67.1 °C

GC içeriği : % 51.5

Moleküler Ağırlığı : 10,153.6

nmol/OD260 : 3.1

ug/OD260 : 32.0

Oligonükleotit miktarı: 35.1 (OD260)=110.5 (nMol)= 1.12 (mg)

3.2.5.4. *Bacillus licheniformis* C11 Suşunun Keratinaz Gen Bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir Reksiyonu) İle Çoğaltılması

Tek koloniden hazırlanan bir gecelik taze kültürden "Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega" ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA'nın varlığının ve konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla 10'ar µl PCR ürünü 2 µl DNA Loading Dye ile muamele edildi ve % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra jel, etidyum bromid ile boyandı ve jel görüntülüme cihazı ile görüntülenerek DNA leader yardımıyla analiz edildi. Elde edilen genomik DNA PCR çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanıldı.

Çizelge 3.9. PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	**Hacim (µL)**
ddH_2O	6.375
10X Taq Buffer	5
MgCl2 (25 mM)	3
dNTP mix (10 mM)	0.5
Forward Primer (10 pmol)	2.5
Reverse Primer (10 pmol)	2.5
Taq DNA Polimeraz (5 Ünite/mL)	0.125
DNA (5 ng/µL)	5
Toplam Hacim	**25**

Dizayn edilen primelerin kalıp DNA'ya en iyi bağlanma sıcaklıkları gradiyent PCR yöntemi ile tespit edildikten sonra uygun PCR koşullarında (Çizelge 3.9.ve 3.10) Keratinaz C-11 gen bölgesi çoğaltılmıştır (Hu ve ark, 2013; Lin ve ark., 1995).

Çizelge 3.10. PCR koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (^{0}C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	94	300	1
2.1 2.2 2.3	Denatürasyon	94	50	30
	Primerin DNA'ya bağlanması	60	50	
	Uzama safhası	72	50	
3.	Son uzama safhası	72	300	1
4.	Soğutma	4	∞	

3.2.5.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, PCR ürününden 8 µl alınarak 2 µl loading Dye ile muamele edilerek % 1'lik Agaroz jelde yürütülmüştür ve Etidyum Bromide ile boyandıktan sonra jel görüntülüme cihazı ile görüntülenerek DNA leader yardımıyla analiz edilmiştir. Başarılı bir PCR gerçekleştirildiği tespit edildikten sonra PCR ürünleri PCR karışımından "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega" kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2.5.6. Konak Hücreden pET22b(+) Plazmid Vektörünün İzolasyonu

pET22b(+) vektörünü içeren konak hücreler karanlık ortamada Amphisilinli (50µg/ml) LB sıvı besiyerinde karanlık ortamada 37 °C sıcaklıkta 150 rpm'de 1 gecelik kültür hazırlanmıştır.

Bir gecelik kültür 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Daha sonra "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System- Promega" kiti kullanılarak plasmid izolasyonu ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.7. PCR Ürünü ve Plasmid Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

c11 keratinaz geni ve pET22b(+) vektörünün *XhoI* ve *NcoI* restriksiyon enzimleri ile kesimi farklı tampon sitemleri kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.11. *XhoI* enzimi ile kesim koşulları

c11-Xhol		**pET22b(+)-Xhol**	
10X NEB tamponu (pH 7.9; 25°C) (1x =NaCl 100 mM Tris-HCl 50 mM $MgCl_2$ 10 mM BSA 100 µg/ml)	5 µl (1X)	10X NEB tamponu (pH 7.9; 25°C) (1x =NaCl 100 mM Tris-HCl 50 mM $MgCl_2$ 10 mM BSA 100 µg/ml)	5 µl (1X)
c11 PCR ürünü	15 µl	pET22b(+)	10 µl
Saf su	14 µl	Saf su	19 µl
Xhol	1 µl	*Xhol*	1 µl
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	37	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	37
İnkübasyon Süresi (saat)	4	İnkübasyon Süresi (saat)	4

Çizelge 3.12. *NcoI* enzimi ile kesim koşulları

c11-NcoI		**pET22b(+)-NcoI**	
10X NEB tamponu (pH 7.9; 25°C) (1x =NaCl 100 mM Tris-HCl 50 mM MgCl2 10 mM BSA 100 µg/ml)	5 µl (1X)	10X NEB tamponu (pH 7.9; 25°C) (1x =NaCl 100 mM Tris-HCl 50 mM MgCl2 10 mM BSA 100 µg/ml)	5 µl (1X)
c11 PCR ürünü	15 µl	pET22b(+)	10 µl
Saf su	20 µl	Saf su	20 µl
NcoI	1 µl	NcoI	1 µl
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	37	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	37
İnkübasyon Süresi (saat)	4	İnkübasyon Süresi (saat)	4

Birinci aşamada, c11 keratinaz geni ve pET22b(+) vektörü Çizelge 3.11'deki değerler kullanılarak XhoI enzimi ile muamale edilmiştir. Enzimler pipetaj işleminden sonra reaksiyon karışımlarına eklenmiştir. Kesim işlemi 4 saat süresince sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Saatte bir ürünler karıştırılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Kesim sonrasında ürünler "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega" kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

İkinci aşamada, Çizelge 3.12'deki değerler kullanılarak birinci aşama sonucunda elde edilen ürünlerde '*NcoI'* ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir (Hu ve ark., 2013).

3.2.5.8. Ligasyon İşlemi

Kesilen plasmid DNA'ları ve PCR ürünlerinin ligasyon işlemi T4 DNA ligaz (Promega) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan madde miktarları aşağıdaki formülle tespit edildi ve Çizelge 3.13'teki değerler kullanıldı.

Ligasyon bileşenleri mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Vektör DNA : PCR ürününün oranı 3:1 olacak şekilde yukarıdaki formüle göre hesaplanarak belirlenmiştir (http://nebiocalculator.neb.com). T4 DNA Ligaz, tüm bileşenler eklenip resüspanse edildikten sonra karışıma daha sonra ilave edilmiştir. DNA' larımız yapışkan uçlu olduklarından inkübasyon 16 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmışlardır.

$$\frac{\text{kb (PCR ürünü) x ng (vektör)}}{\text{kb (vektör)}} \times \frac{3}{1} = \text{ng (PCR ürünü)}$$

Çizelge 3.13. Ligasyon protokolü

Bileşenler	**20 µl Reaksiyon**
10XT4 DNA Ligaz Tamponu	2µl
Vektör DNA (4 kb)	50 ng (0.020 pmol)
PCR ürünü (insert DNA)	37.5 ng (0.060 pmol)
PCR suyu (Nükleaz içermeyen)	20 µl'ye tamamla
T4 DNA Ligaz	1 µl

3.2.5.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

20 ml'lik antibiyotikli (Chloramphenicol (34 µg/ml), Kanamycin (15 µg/ml) Streptomycin (50 µg/ml) veya Tetracycline (12.5 µg/ml)) LB besiyerine tek koloniden (Rosetta-gami (DE3) pLysS) inoküle edilerek 37 °C'de 150 rpm'de 1 gecelik kültür hazırlanmıştır. Daha sonra 100 ml antibiyotikli besiyerine (500

ml'lik şişe) son OD_{600} yaklaşık 0.25-0.35 olacak şekilde 1 gecelik kültürden inoküle edilmiştir. Kültürümüz buz üzerinde 15 dk soğumaya bırakılmıştır ve bu arada önceden taze olarak hazırlamış olduğumuz 0.1 M $CaCl_2$ solüsyonu ile 0.1 M $CaCl_2$ + % 15 gliserol solüsyonuda buz üzerinde soğutulmuştur. Daha sonra hücreler +4 °C'de 3300 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 30-40 ml soğuk 0.1 M $CaCl_2$ eklenerek buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir. $CaCl_2$ ile muamele ettiğimiz hücreler tekrardan +4 °C'de 3300g'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve pellet üzerine 6 ml 0.1 $CaCl_2$ + %15 gliserol solüsyonu eklenerek resüspanse edilmiştir. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. En son hücreler hızlıca 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine herbiri 500 µl olacak şekilde paylaştırılarak ve kuru buz üzerinde dondurularak -80 °C'ye transfer edilerek saklanmıştır.

3.2.5.10. Ligasyon İşleminden Sonra Elde Ettiğimiz Rekombinant DNA'nın Rosetta-Gami (DE3)pLysS'ye Transformasyonu

-80 °C'den çıkarılır çıkarılmaz buz üzerine alınan kompetent hücreler kısa bir süre buz üzerinde erimeye bırakılmıştır. 20 µl Ligasyon ürünü 500'er µl olarak hazırlanan buz üzerindeki kompetent hücrelere inoküle edilerek buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra hücreler ve ligasyon ürünü buz üzerinden alınarak daha önceden 42 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 90-120 sn bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır. Süre sonunda tekrar hemen buz üzerine alınarak burada 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine +4 °C'de soğutulmuş 1 ml LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C'de 150 rpm'de 45dk-1saat inkübe edilmiştir. En son inkübasyondan sonra, 25-100'er µl transformantlar antibiyotik içeren LB agar besiyerine yayma şeklinde ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece karanlık ortamda inkübe edilmiştir (Radha ve Gunasekaran, 2007; Hu ve ark., 2013).

3.2.5.11. Klonların Seçimi ve Analizi

1 gecelik inkübasyondan sonra tek düşmüş kolonilerden 10 adet koloni seçilerek analiz edilmek üzere önceden 2'er ml olarak hazırlanan sıvı ve katı antibiyotikli besiyerlerine ekimi yapılmıştır ve 37 °C'de 150 rpm'de karanlık ortamda 1 gece inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler 1.5 ml alınarak ayrı ayrı her biri kodlanmış eppendorf tüplere aktarılmıştır ve 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletlerden "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Promega" kiti kullanılarak plasmid izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen plazmidler madde 3.2.5.8' de anlatıldığı gibi restriksiyon enzimleriyle kesilerek % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (100-120 V, 35-45 dk). Etidyum Bromid ile boyanan jel, jel görüntüleme cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda yaklaşık olarak 5400 bç ve 1150 bç büyüklüğüne denk gelen 2 çift bant gördüğümüz klonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif olarak değerlendirilen suşlar, sonradan keratinaz üretiminin ve analizinin yapılması için % 15 gliserol ile muamele edilerek -80 °C'de stok şeklinde saklanmıştır (Lin ve ark,1995; Hu ve ark., 2013).

3.2.5.12. Rekombinant Suşların Keratinli Katı Besiyerinde Analizi

pET22b-c11 ile transforme olmuş rekombinant Rosetta gami (DE)3 pLysS suşlarının stoklarından katı besiyerine tek koloni düşecek şekilde antibiyotikli LB besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de 1 gece üremeye bırakılmıştır. Aynı şekilde kontrol suş olarak transforme olmamış Rosetta gami (DE)3 pLysS'nin de ekimi yapılmıştır.

Tek düşümüş koloni; içerisinde antibiyotik, tavuk tüyü unu ve 10 mM IPTG bulunan LB agar besiyerine ekimi yapılmıştır ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri % 10'luk TCA ile yıkanarak koloni etrafında görülen şeffaf zona göre pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir (Radha ve Gunasekaran, 2007).

3.2.5.13. pET22b-c11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Ekspresyonu

pET22b-c11 ile transforme olmuş rekombinant Rosetta gami (DE)3 pLysS suşlarının stoklarından katı besiyerine tek koloni düşecek şekilde antibiyotikli LB besiyerine ekimi yapılarak 37°C'de 1 gece üremeye bırakılmıştır. Aynı şekilde kontrol suş olarak transforme olmamış Rosetta gami (DE)3 pLysS'nin de ekimi yapılmıştır.

pET22b-c11 ile transforme olmuş ve transforme olmamış koloni oluşumu görülen Rosetta gami (DE)3 pLysS petrilerinden birer koloni alınarak antibiyotik içeren 10 ml lik LB besiyerine inoküle edilmiştir ve 150 rpm'de 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda daha yüksek ölçekli üretim için 2x300 ml'lik antibiyotikli LB besiyeri içeren 1 L'lik erlenlere ilk OD_{600} yaklaşık 0.05 olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 37 °C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 0. Saatten başlamak üzere 2 saatte bir 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. OD_{600} yaklaşık 0.5-0.7'e ulaştığında erlendeki kültürler 1 M IPTG ile indüklenmiştir. IPTG ile 4.5 saatlik indüksiyonun ardından erlenler inkübasyondan alınarak +4 °C'de 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant hücre dışı protein analizi için steril bir şişeye alınmıştır. Elde edilen Rosetta gami (DE)3 pLysS hücrelerinden oluşan pellet ise hücre içi protein analizi için -20 °C'de saklanmıştır (Hu ve ark. 2013; Radha ve Gunasekaran, 2007).

3.2.5.14. pET22b-c11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

Metod 1: Santrifüj sonrası elde ettiğimiz -20 °C'deki pellet buz üzerine alınarak 5 ml 100 mM Tris/HCl (pH 7.5) tamponu ile muamele edilerek iyice süspanse edilmiştir ve sonra ultrasonikatör ile homojenize edilmiştir. Daha sonra +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek ham keratinaz enzimini içeren süpernatant ayrı steril bir tüpe alınmıştır. Kalan pellet (parçalanmayan hücreler) üzerine tekrar aynı şekilde 5 ml 100 mM Tris/HCl (pH 7.5) tamponu eklenerek aynı işlemler tekrarlanmıştır. Bu şekilde elde edilen süpernatantlar birleştirilmiştir. Elde edilen süpernatant imidazole tamponu (100 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl ve 25 mM imidazole) içerisinde, manyetik balık yardımıyla

karıştırılarak 1 gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra diyaliz ürünü steril bir tüpe alınmıştır. Daha sonra Poly-prep kromatografi kolonu hazırlanmıştır ve içerisi 100 mM Tris/HCl ile yıkanmıştır. 1 ml Ni-NTA sepharose kolon içerisine pipetör yardımıyla konulmuştur ve 3 defa 10 ml 100 mM Tris/HCl tamponu eklenerek yıkanmışır. Tampon tamamen akıp gittikten sonra diyaliz ettiğimiz süpernatant, kolon içerisine konulmuştur ve süzülmesi beklenmiştir. Diyaliz ürünü tamamen süzüldükten sonra tekrar 3 defa 100 mM Tris/HCl tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Tampon tamamen akıp gittikten sonra kolona tutunmuş olan protein yıkama solüsyonları ile (50 mM, 100 mM ve 500 mM imidazol içeren imidazol tamponu ile) sırasıyla yıkanarak tüm fraksiyonlar temiz tüpte toplanmıştır. Fraksiyonlar ayrı ayrı diyaliz membranı ile imidazolün uzaklaştırılması için 100 mM Tris/HCl tamponunda (pH 7.6, 300 mM NaCl) 1 gece diyaliz işlemi yapılmıştır ve diyaliz ürünü temiz tüpe alınarak % 12'lik SDS-PAGE ile analiz edilerek doğrulanmıştır ve +4 °C'de sonraki analizler için saklanmışıtr (Hu ve ark., 2013).

Metod 2: "MagneHis™ Protein Purification System - Promega" kiti kullanılarak enzim saflaştırılmıştır.

3.2.6. Doğal (Yabani), Mutant ve Rekombinant Suşlardan Elde Edilen Keratinaz Enzimlerinin Biokimyasal Karakterizasyonu

3.2.6.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Saflaştırma işlemi ile elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için Fosfat (pH=6.0-7.0), Tris-HCl (pH=8.0-9.0), Glisin-NaOH (pH=10.0), Boraks-NaOH (pH= 11.0-13.0) tamponları kullanılmıştır (Hamaguchi ve ark., 2000; Jasvir ve ark., 1999). Enzim reksiyonu için 50 µl süpernatant, 450 µl % 0.5'lik pH 7.0 tamponu içerisinde hazırlanmış substrat (tavuk tüyü) solüsyonu ve 500 µl pH tamponları kullanılmıştır. Reaksiyon 55 ºC'de 30 dk gerçekleştirilmiştir ve inkübasyon sonucunda reaksiyonu durdurmak amacıyla her örneğe eşit miktarda (1:1) % 10'luk soğutulmuş TCA eklenerek +4 ºC'de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dk çöktürüldükten sonra

süpernatant 280 nm'de okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanıp, rölatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011; Lin ve ark., 1999).

3.2.6.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 ºC 'lik sıcaklık değerleri seçilmiştir (Arabaci ve ark., 2013; Syed ve ark., 2009). İnkübasyonlar 20-90 ºC aralığında su banyosu 100-110 ºC aralığında yağ banyosunda gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayini için 50µl Süpernatant, 450 µl substrat solüsyonu ve 500 µl optimum pH tamponu kullanılmıştır ve seçilen sıcaklıklarda 30 dk süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değeri 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerleri buna göre oranlanıp, rölatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011; Lo ve ark., 2012).

3.2.6.3. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin (Termal Stabilite) Saptanması

Termal (sıcaklık) stabilitenin saptanması için enzimler 30-110 ˚C aralığındaki sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon uygulamasından sonra aktivite tayini için 50µl Süpernatant, 450 µl substrat solüsyonu ve 500 µl optimum pH tamponu kullanılmıştır ve seçilen sıcaklıklarda 30 dk süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Suneetha ve ark. 2011). İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif termal stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Arıkan, 2008).

3.2.6.4. Enzimlerin pH Stabilitelerinin Saptanması

pH stabilitenin saptanması için, stok enzim örneğinden 1 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra örnek üzerine aynı miktarda tampon eklenerek (pH'sı 6.0-12.0) enzim süspanse edilip 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif termal stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Suneetha ve ark. 2011; Tamılmanı ve ark., 2008).

3.2.6.5. Enzim Aktivitesine İnhibitörlerin Etkisi

Stok enzim çözeltisi santrifüjle (11.000 dev/dk) 5 dakika çöktürüldükten sonra uygun konsantrasyonda 1 mM ve 10 mM EDTA, 5 mM $CaCl_2$, 5 mM $MnCl_2$, 5 mM $ZnCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $CoCl_2$, 5 mM $CuSO_4$, 5 mM $FeSO_4$, 10 mM SDS, % 0.1 Triton-X100, % 1 β-merkaptoetanol, % 0.1 H_2O_2, % 0.1 Twen-20, % 0.1 Twen-80, % 1 PMSF ve 10 mM üre ile süspanse edilerek 60 dakika enzimin üretildiği sıcaklıkta (55 ºC) ön inkübasyon yapılmıştır. Ön İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra optimum aktivitenin gözlendiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında standart enzim aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif termal stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Caf ve ark., 2013; Shah ve ark.; 2010; Tork ve ark., 2008).

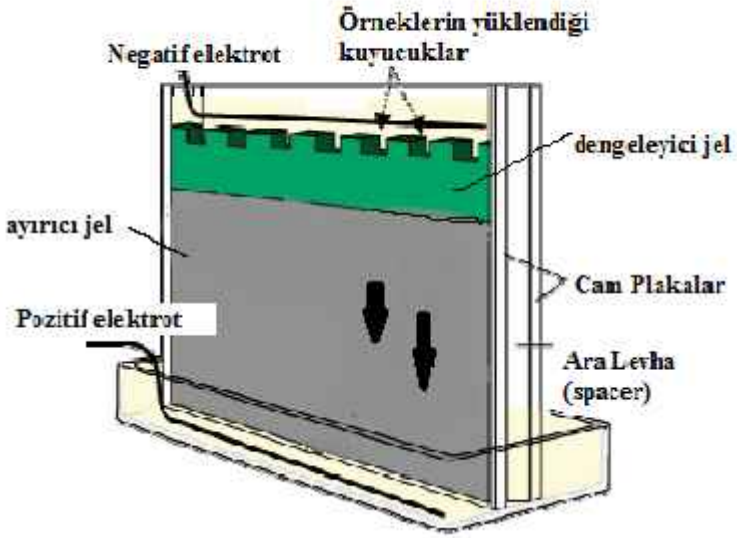
3.2.6.6. Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Çeşitli NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin saptanması amacıyla enzim örneğinden 2 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra enzim pellet'i aynı miktarda çeşitli NaCl

konsantrasyonları (% 3-30) ile süspanse edilmiştir ve 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön İnkübasyon sonunda optimum aktivitenin gözlendiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında standart enzim aktivitesi gerçekleştirilmiştir.. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif termal stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Xu ve ark., 2011; Essghaier ve ark., 2009; Arıkan, 2008).

3.2.6.7. SDS-PAGE Elektroforezinde Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Enzimin moleküler ağırlığının saptanması ve zimogram analizi için içerisinde % 0.1 skim-milk bulunan % 10'luk ayırıcı jel (Çizelge 3.14) ve % 5'lik dengeleyici jelden (Çizelge 3.15) oluşan SDS-PAGE sistemi (Şekil 3.4) kullanılmıştır (Coral ve ark., 2002; Arıkan, 2008).



Şekil 3.4. PAGE sistemi

Çizelge 3.14. Ayırıcı jelin içerikleri ve hazırlanışı

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	6.5 mL
Sol B	5.0 mL
Distile su	7.1 mL
Substrat	1.3 mL
AMPS (% 10)	66 µL
TEMED	15 µL

Sol A, Sol B, distile su ve substrat çözeltisi steril bir şişe içerisinde yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra 5 dk degaz işlemi uygulanmıştır. İşlemin ardından AMPS ve TEMED ilave edilerek karışım iki cam plaka arasına dökülmüştür. Daha sonra hem atmosferdeki oksijenin jel içerisine düfüzyonunu engelemek hem de jel yüzeyinde oluşan hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için jelin üst kısmını örtecek miktarda distile su ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.15. Dengeleyici jelin içerikleri ve hazırlanışı

Solüsyonlar	**Miktar**
Sol A	1.5 mL
Sol C	2.25 mL
Distile su	5.25 mL
AMPS (% 10)	30 µL
TEMED	10 µL

Ayırıcı jel tamamen polimerize olduktan sonra, üzerindeki distile su dökülmüştür. Yukarıda belirtilen miktarlarda Sol A, Sol C ve distile su bir şişe içerisinde karıştırılıp 5 dk degaz işlemi uygulanmıştır. Degaz işleminden sonra AMPS ve TEMED eklenmiştir. Karıştırıldıktan dengeleyici jelide cam plakalar arasına dökülmüştür. Dökme işleminden sonra jel polimerize olmadan kuyucukları oluşturmak için tarak yerleştirilerek oda sıcaklığında jelin polimerize olması beklenmiştir (Aygan, 2008).

3.2.6.8. Enzim Örneklerinin Jele yüklenmesi

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tarak yavaşça jelden çıkarılmıştır ve oluşan kuyucuklara örnek yükleme tamponuyla süspanse edilmiş

enzim örmekleri (25 µL) ve moleküler ağırlıklarını belirleyebilmek için 10µL marker protein yüklenmiştir. Elektroforez işlemleri örnekler dengeleyici jel içinde iken 25 mA, ayırma jeline ulaştığında ise 15 mA akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.9. SDS- PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram analizi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, jel marker proteinin bulunduğu kısım ve enzim örneklerinin bulunduğu kısım olarak kesilip ikiye ayrılmıştır.

Marker proteinin bulunduğu kısma Coomassie Brillant Blue R250 ile 2 saat boyanıp 24 saat boyayı geri alma işlemi uygulanırken enzim örneklerinin bulunduğu kısım ise % 2.5 Triton X-100 + Fosfat tamponunda (pH 10.0) oda sıcaklığında 60 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Renatürasyon işleminden sonra enzim aktivitesinin saptanması için jel optimum pH tamponu bulunan saklama kabı içerisine konularak 50 ºC'de 6 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda jel, Coomassie Brillant Blue R250 ile 2 saat boyanmıştır ve bantlar belirginleşinceye dek yak. 4 saat boya alma işlemi uygulanmıştır. Gözlenen şeffaf renkteki bantlar, marker protein ile karşılaştırılarak aktivite gösteren enzimin moleküler ağırlığı saptanmıştır (Arabaci ve ark., 2012).

3.2.6.10. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması

Enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan hidroliz ürünlerinin kalitatif olarak saptanması için TLC analizi yapılmıştır. Sabit faz olarak TLC Silica Gel 60 F254 plakalar ve Hareketli faz olarak Butanol: Asetikasit: distile su (4:1:1) kullanılmıştır.

Hazır levhalar levha üzerine reaksiyon ürününden 20 µL, markerdan (tirosin, prolin, glisin, histisin, sistein) ise 5 µL örnek yüklemesi yapılmıştır.

Reaksiyon ürünü % 2'lik tavuk tüyü solüsyonu içeren optimum pH'daki tampon + enzim karışımının 12 saatlik optimum aktivite sıcaklığındaki inkübasyonu sonunda elde edilmiştir. Hazırlanan jel plağı tank içerisine yerleştirilip yaklaşık 2 saat süreyle yürütme işlemi yapılmıştır. Reaksiyon ürünlerinin jel üzerinde görünür hale gelmeleri için plaka üzerine yürütme işleminin ardından asetonda çözülmüş % 0,25 Ninhidrin püskürtülerek son ürün görünür hale getirilmiştir. Püskürtme işleminden sonra levhalar yaklaşık 1-2 saat kadar kurumaya bırakılmıştır ve 35-40 dk süreyle 110 ºC'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan reaksiyon ürünleri ile marker karşılaştırılarak son ürün saptanmıştır (Arabaci ve ark., 2012).

3.2.6.11. Ham Tavuk Tüyünün Keratinaz ile Muamelesi Sonucunda Elde Edilen Hidroliz Ürününün HPLC Analizi

Enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan hidroliz ürünlerinin kalitatif ve kantitatif olarak saptanması için yapılmıştır. Hareketli faz olarak % 0.1 trifloroasetik asit içeren metanol/su (30/70, v/v) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı olarak 0.5 ml/dk; Dedeksiyon: UV dedektör 254 nm'de yapılmıştır. Türevlendirme işlemi için asetonitril içerisinde çözünmüş 2.5g/L FMOC-Cl reaktifi kullanılmıştır. Standart solüsyon olarak 0.1 M HCl içerisinde çözülmüş prolin, tirosin, histidin, glisin, sistein kullanılmıştır.

Reaksiyon ürünü % 0.5'lik tavuk tüyü solüsyonu içeren optimum pH'daki tampon+enzim karışımının 30 dk - 6 saatlik optimum aktivite sıcaklığındaki inkübasyonu sonunda elde edilmiştir. 15 µL alınarak filtreden geçirilmiş ürün içerisine 420 µL borat tamponu (0.4 M, pH 10.6) ve 15 µL FMOC-Cl reaktifi (2.5g/l) eklenerek karışım 2 dk bekletilmiştir ve HPLC cihazına yüklenmiştir (Zhou ve ark.,2011; Padovan ve ark., 2014).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılacak Suşların İzolasyonu ve Seçimi

4.1.1. Alkalin Termofilik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Bu çalışmada, keratin atıkların bulunduğu toprak örnekleri alınmış ve izole edilen toplam 205 *Bacillus* sp. suşu arasından 192 suşun (%93.7) alkalin proteaz üreticiticisi olduğu bunlardan da 16 suşun (%7.8) alkalin keratinaz üreticisi olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen organizmalar geniş, beyaz renkli ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisine sahiptirler. Suşların koloni morfolojileri, gram boyama ve katalaz aktivitesi özellikleri dikkate alınarak seçilen suşlar *Bacillus sp*. şeklinde adlandırılmışlardır.

4.1.2. Alkalin Termofilik *Streptomyces* sp. Suşlarının İzolasyonu

Çeşitli bölgelerden alınan toprak ve biyokompost örneklerinden toplam 132 *Streptomyces* sp. suşu izole edilmiştir. Bu suşlardan %100'ünün alkalin proteaz üreticisi olduğu bunlardan da 11 suşun (%8.3) alkalin keratinaz üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Suşlar gram pozitif, zorunlu aerob, filomentöz, koloni yaşlandıkça, besiyerinin yüzeyinde spor meydana getirecek sporofor adı verilen karakteristik bir aeriyal (üst) filament oluşumu göstermektedirler. Koloni morfolojileri ve diğer özellikleri dikkate alınarak seçilen suşlar *Streptomyces* sp. şeklinde adlandırılmışlardır.

4.1.3. Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması ve Suşların Seçimi

Katı besiyerinde alkalin keratinaz üreticisi olduğu belirlenen suşların optimum ürediği ve enzim sentezinin gerçekleştiği pH aralığının saptanması için pH 6.0-13.0 aralığındaki tavuk tüylü sıvı besiyerlerine keratinaz üreticisi suşların

($4x10^8$ hücre/ml) ekimi yapılarak farklı sıcaklıklarda (30-60 ºC) 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası standart aktivite analizi yapılarak optimum üredikleri ve enzim sentezini gerçekleştikleri sıcaklık ve pH değerleri saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011; Lo ve ark., 2012).



Şekil 4.2. Tavuk tüyü unlu katı besiyerinde *Streptomyces* sp. kolonileri

Keratinaz pozitif özellik gösteren bu suşlar içerisinde optimum üreme, pH ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak *Bacillus* sp. C11 ve *Streptomyces sp*. C1 örneği sonraki çalışmalar için seçilmiş ve sırasıyla *Bacillus* sp. C11 ve *Streptomyces sp*. C1 şeklinde adlandırılmıştır. En yüksek absorbans değeri 100 kabul edilmiştir ve buradaki enzim aktivitesi C11 için 405 U/ml/dk ve C1 için ise 320 U/ml/dk bulunmuştur.

Bacillus sp. C11 suşunun pH 10.0 ve 55 ºC'de; *Streptomyces sp*. C1 suşunun ise pH 11.0 ve 60 ºC'de optimum ürediği ve enzim sentezlediği tespit edilmiştir. Bulgular çizelge 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus sp.* C11 suşuna ait 30-60 ºC'de ve farklı pH değerlerinde (6.0-13.0) sıvı tavuk tüylü besiyerindeki rölatif aktiviteleri

pH / ºC	30	35	40	45	50	55	60	65
6	0	0	32	44	46	34	0	0
7	0	12	35	47	65	56	0	0
8	0	30	42	55	73	72	58	52
9	10	32	69	76	90	88	83	80
10	12	38	73	88	99	100	99	86
11	24	35	76	80	92	94	79	65
12	26	28	62	79	79	85	38	42
13	28	30	36	40	45	42	0	0

Çizelge 4.2. *Streptomyces* sp. C1 suşuna ait 30-60 ºC'de ve farklı pH değerlerinde (6.0-13.0) sıvı tavuk tüylü besiyerindeki rölatif aktiviteleri

pH/°C	30	35	40	45	50	55	60
6	0	0	21	23	21	14	0
7	41	42	45	51	41	56	32
8	43	45	52	58	65	72	45
9	43	42	62	76	84	88	74
10	55	78	87	88	99	96	98
11	54	75	86	80	93	100	100
12	54	76	89	87	88	88	91
13	23	30	36	36	38	28	14

Bacillus sp. C11 suşu pH 10.0 da 55 ºC de en yüksek aktivite (%100) gösterirken, pH 9.0-12.0 aralığında 45-65 ºC aralığında ortalama %93 aktivite göstermiştir. *Bacillus* sp. C11 suşunun 40 ºC'nin altındaki sıcaklık değerlerinde ve pH 7.0'nin altı ile 12.0 nin üzerindeki değerlerde ise hemen hemen hiç üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Literatür incelemelerinde sıvı besiyerinde farklı pH ve sıcaklık değerleri dikkate alındığı zaman farklı suşların optimum üreme ve enzim sentezi gerçekleştirdiği değerlerle ilgili bilgiler bir çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur.

Saibabu ve ark (2013), *Baciilus megaterium*'un optimum üreme ve enzim sentezini pH 9.0 ve 50 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Lakshami ve ark (2013), *Bacillus* sp. BF11'in optimum üreme ve enzim sentezini pH 8.5 ve 45-55 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Kainoor ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB99'un optimum üreme ve enzim sentezini pH 10.0 ve 45°C'de gerçekleştiğini

bildirmişlerdir. Mousavi ve ark (2007), *Bacillus subtilis*'en optimum üreme ve enzim sentezini pH 11.0 ve 40°C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Streptomyces sp. C1 suşu pH 11.0 de 60 ºC de en yüksek aktivite (%100) gösterirken, pH 9.0-12.0 aralığında 40-60ºC ortalama %90 aktivite göstermiştir. *Streptomyces* sp. C1 suşunun 40 ºC'nin altındaki sıcaklık değerlerinde ortalama %50 aktivite gösterdiği fakat pH 7.0'nin altında ve 12.0 nin üzerinde değerlerinde ise hemen hemen hiç üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir.

Syed ve ark (2009), *Sreptomyces gulbargensis*'ın optimum enzim üreme ve enzim sentezini pH 9.0 ve 45 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Mohamedin ve ark (1999), *Sreptomyces thermonitrificans*'ın optimum enzim üreme ve enzim sentezini pH 10.0 ve 50 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Letourneau ve ark. (1998), *Streptomyces* sp..S.K1-02 maksimum keratinaz aktivitesini pH 9.0 ve 70 °C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

4.2. *Bacillus* sp. C11 ve *Streptomyces* sp. C1 Bakterilerinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralıklarının Saptanması

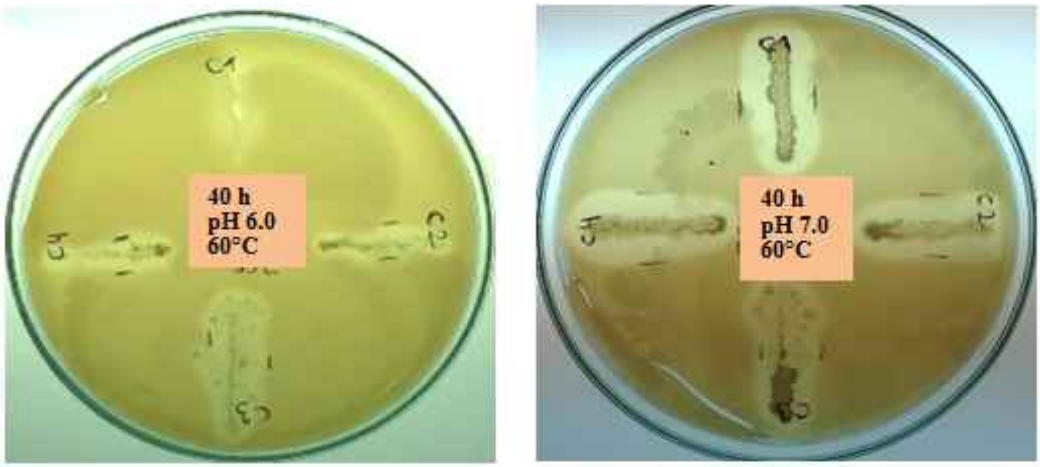
Sıvı besiyerinde enzim aktivitelerini belirleyip seçimini yapmış olduğumuz suşların katı besiyerlerinde enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla tavuk tüyü unu içeren katı besi yerlerine ekim yapılarak sıvı besiyerinde elde edilen optimum sıcaklıkta ve pH 6.0-12.0 aralığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda aktivite zon çapları ölçüldüğü zaman her iki suşunda optimum ürediği ve enzim sentezini gerçekleştiği sıcaklık ve pH değerlerinin sıvı kültürdeki sonuçlarla aynı değerleri gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen bulgular suşların sıvı ve katı besiyerinde keratinaz enzimini güçlü şekilde sentezlediklerini göstermektedir. Bulgular Şekil. 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir.

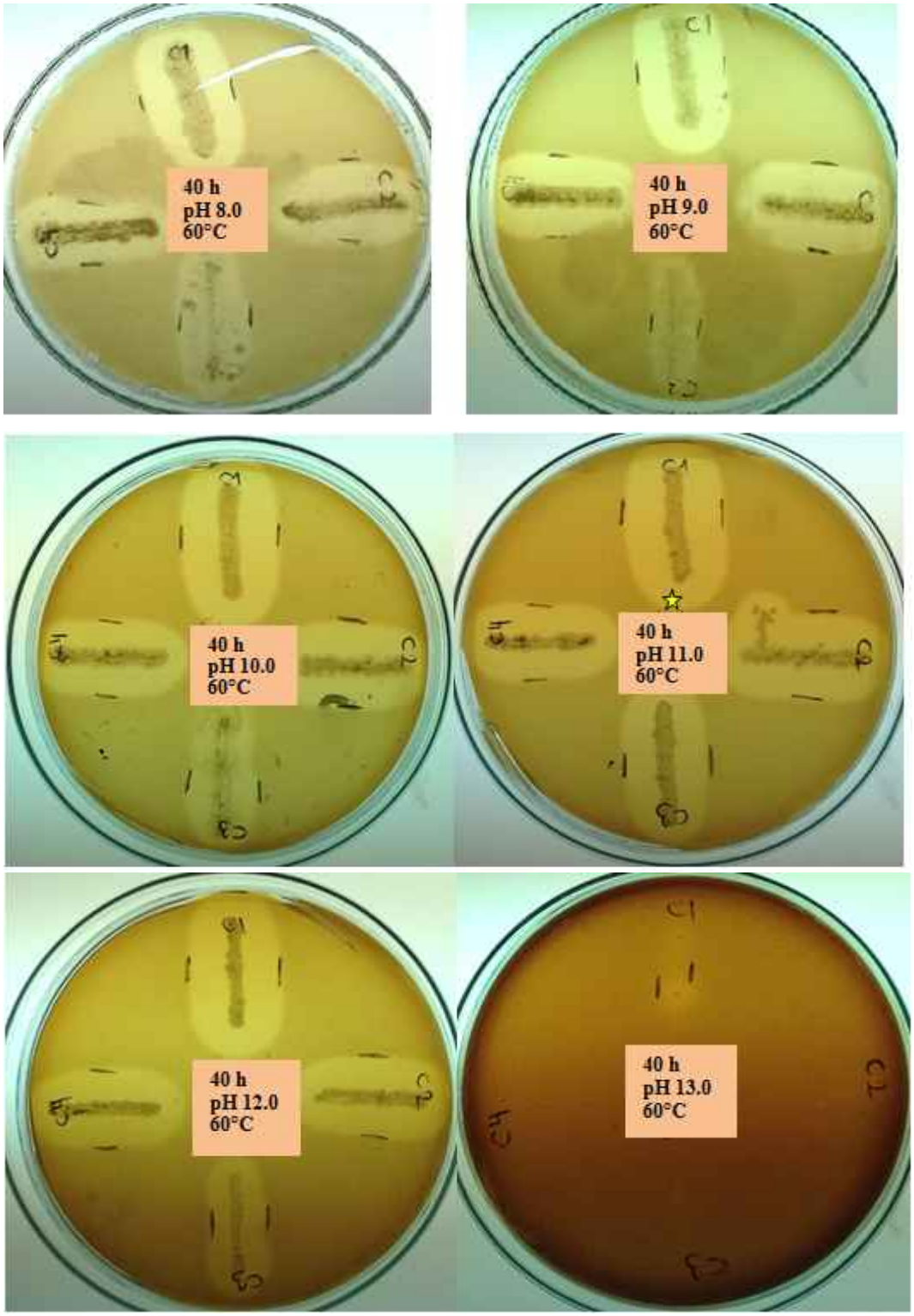
Literatürde katı besiyerinde elde edilen aktivite zon çapının genişliğinin sıvı kültürdeki enzim kosantrasyonunun yüksekliğini yansıttığı belirtilmektedir (Theather ve Wood, 1982; Liu ve ark, 2008; Fujinami ve Fujisawa, 2010).

Streptomyces sp. C1 suşu pH 11.0' de en geniş aktivite zonunu 24 mm ile 60 ºC de oluştururken, aynı sıcaklıkta pH 7.0 de 9 mm, pH 8.0 de 13 mm, pH 9.0 de 14 mm, pH 10.0 da 20 mm, pH 12.0 de 22 ve pH 13.0'de de 4 mm aktivite zonu elde edilmiştir. *Streptomyces* sp. C1 suşunun pH 6.0 de de üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Suşun pH 6.0 da üreme ve enzim sentezi göstermemesi suşun alkali olduğunun kanıtıdır (Horikoshi, 1999).

Jaouadi ve ark. (2013), keratinaz üreten mikroorganizmaları üretmek için Tunus'un M'Saken şehrindeki deri tabakhanesinden aldıkları toprak örneklerinden 75 adet bakteri suşu izole etmişler ve bunlardan 6'sının keratinaz zon çapının 3 mm den yüksek olduğunu (en yüksek oran 5 mm) bildirmişlerdir. En yüksek keratinaz aktivitesinin yaklaşık olarak 7,500 $U.ml^{-1}$ ile US575 suşuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. Literatür verileri dikkate alındığında *Streptomyces* sp. C1 suşunun oldukça yüksek aktiviteye (24 mm) sahip olduğu görülmektedir.

Fujinami ve Fujisawa (2010), Alkalifillerin optimum pH'sının üreme koşullarına bağlı olarak değişmesine rağmen pH 9.0-12.0 aralığında en iyi olduğunu bildirmişlerdir.

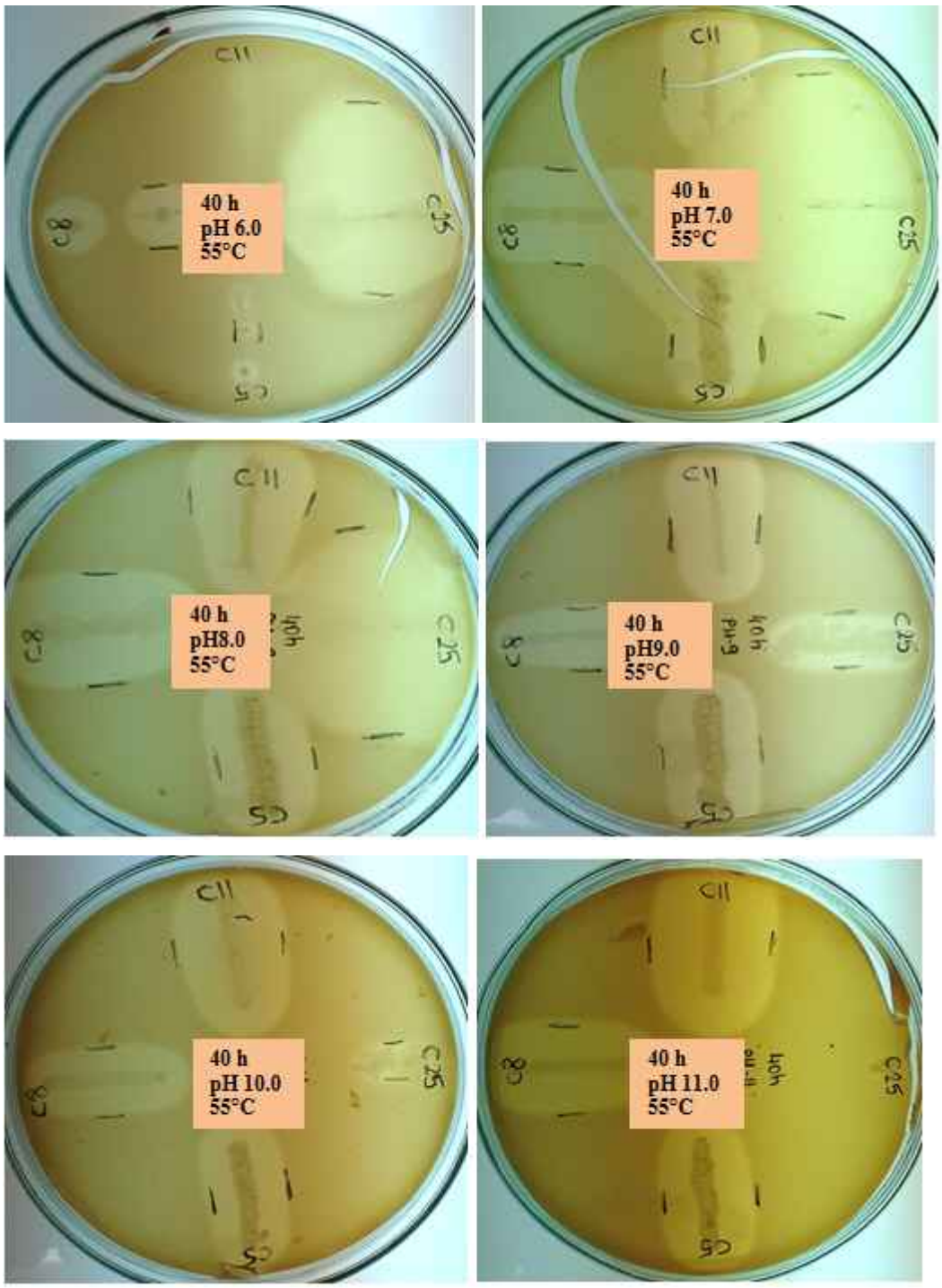


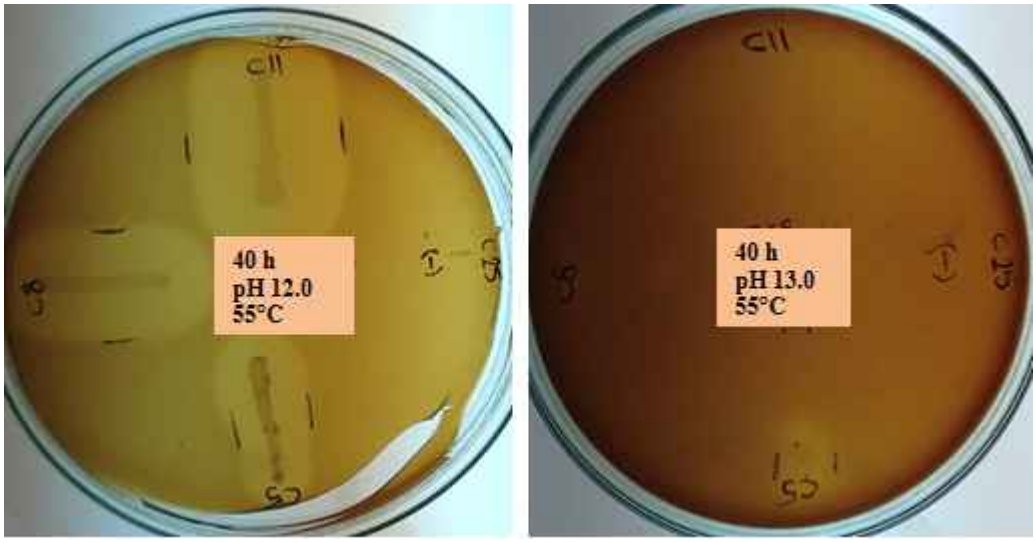


Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. C1, C2, C3 ve C4 suşlarına ait pH 6.0-13.0 aralığı ve 60°C' de 40 saatlik katı besiyerindeki inkübasyon sonuçları

Enzim üretimi için seçilen *Streptomyces* sp. C1 suşunun optimum ürediği sıcaklık ve pH değeri (30-60 ºC ve pH 8.0-13.0) incelendiği zaman, en yüksek

aktivite zonunu pH 11.0 ve 60°C de gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç organizmanın alkalin ve termofil özellikte olduğu göstermektedir.





Şekil 4.4. *Bacillus* sp. C11, C25, C5 ve C8 suşlarına ait pH 6.0-13.0 aralığı ve 55°C de 40 saatlik katı besiyerindeki inkübasyon sonuçları

Bacillus sp. C11 suşu ile katı besiyerinde yapılan çalışmalarda suşun, pH 11.0 ve 12.0 de en geniş aktivite zonunu 42 mm ile 55 ºC de oluştururken, aynı sıcaklıkta pH 7.0 da 16 mm, pH 8.0 de 23 mm, pH 9.0 de 23 mm ve pH 10.0 da da 36 mm aktivite zonu elde edilmiştir. *Bacillus* sp. C11 suşunun pH 6.0 ve 13.0 de de üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir.

Horiskoshi (1999), alkalifilik bakterilern optimum üremesini pH 9.0 ve üzerinde gösterirken pH 6.5'ta zayıf ya da hiç üremediklerini bildirmiştir. Literatür bilgilerinde farklı *Bacillus* sp.suşlarının katı besiyerinde alkalin keratinaz sentezleme yetenekleri ve elde edilen zon çapları ile ilgili bulgular yer almaktadır.

Mousavi ve ark (2013), *Bacillus subtilis* için maksimum enzim üretimini 40 °C'de ve pH 11.0'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Korkmaz ve ark (2004), *Bacillus licheniformis* HK-51 suşunun optimum aktivitesinin pH=11.0'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Towatana et al. (1999) yaptıkları bir çalısmada hidrotermal kaynaklarından izole ettikleri ve 55°C sıcaklıkta gelisen alkalifilik ve termofilik bir *Bacillus* PS719 susunun proteolitik aktivitelerini incelemislerdir. Sonuç olarak ekstraselüler proteazın, azokazein substrata karsı, 75°C sıcaklıkta ve pH 9.0'da maksimum aktivite gösterdigi belirlenmistir.

Literatür bulguları ile enzim üretimi için izole ettiğimiz *Bacillus* sp.C11 suşu karşılaştırıldığında, literatürde en yakın örneğin pH 11.0 ve 40-45 de Mousavi ve ark (2013) ve Korkmaz ve ark (2004) olduğu, *Bacillus* sp. C11 suşunun ise optimum sentezi 55°C ve pH 11.0 de gerçekleştirdiği görülmektedir. Bunun yanısıra seçilen suş 55°C de pH 7.0-12.0 aralığında (özellikle 10.-12.0 aralığında 35-42 mm aktivite zonu) çok fazla miktarda sentez gerçekleştirmektedir. Bu sonuç organizmanın yüksek düzeyde alkaline ve termofil olduğunun güçlü bir kanıtı olup, literatür bulgularına göre daha ön plana çıkmatadır.

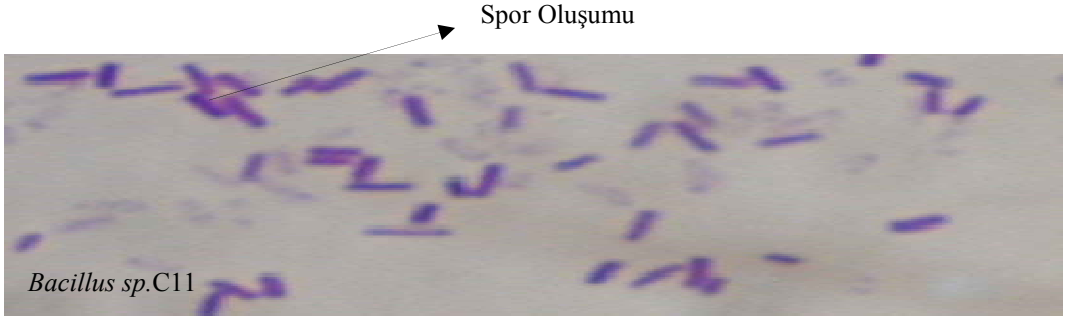
4.3. *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. Suşlarının Identifikasyon Çalışmaları

4.3.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama

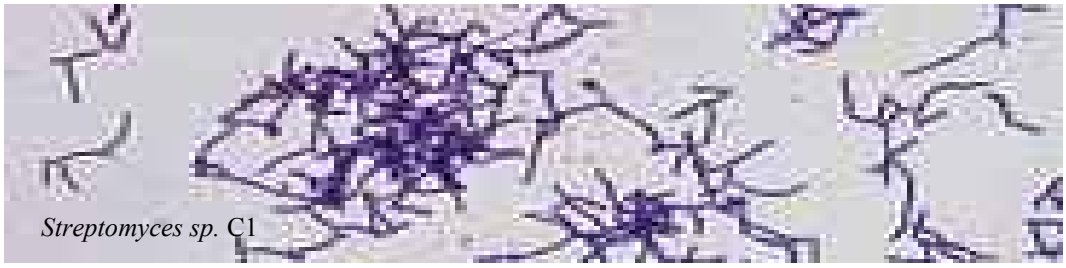
Seçilen bakteri örneklerinin teşhisi için gram boyama, hareketlilik, spor oluşumu gibi kültür morfolojisi testlerinin yanı sıra, katalaz, sitrat, metil kırmızısı, nişasta hidrolizi, %6 NaCl'de üreme, glikoz ve mannitolden asit oluşumu gibi biyokimyasal testler yapılmıştır (Caf, 2012; Aygan, 2008; Hafer and Cruz, 2006).

4.3.1.1. Gram Boyama

Keratin atıkları içeren toprak örneklerinin ısı şoku ön işleminden sonra izole edilmiş olan keratinaz (+) 16 suşda gram boyama sonuçlarına göre gram pozitif, çubuk şeklinde ve endospor oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5.). *Bacillus* sp. olduğu tespit edilen 16 adet suşun stok kültürü hazırlanarak sonraki çalışmalar için +4 ° saklanmıştır.



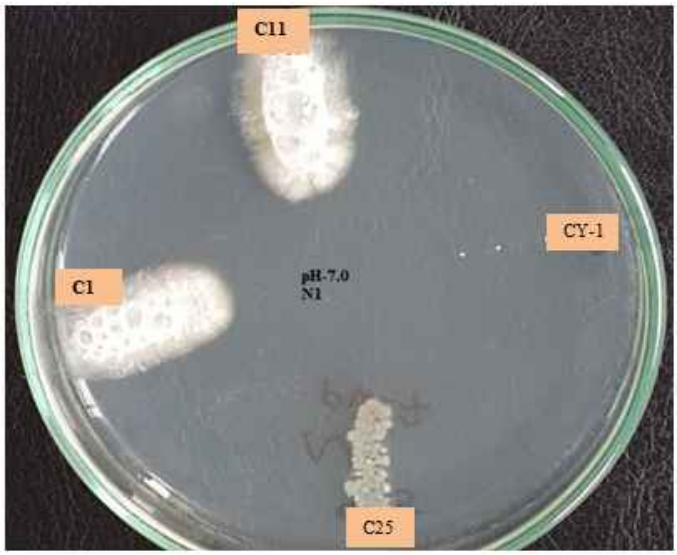
Şekil 4.5. *Bacillus sp*. C11'in Gram boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.6. Streptomyces sp. C1'in Gram boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü

Keratin atıkları içeren toprak örneklerinden izole edilimiş olan keratinaz (+) 11 suşun katı besiyerinde ön tanılama işleminden sonra (koloni yaşlandıkça, besiyerinin yüzeyinde spor meydana getirecek sporofor adı verilen karakteristik bir aeriyal (üst) filament oluşumu) yapılan gram boyama sonuçlarına göre, gram pozitif, çubuk şeklinde, dallı yapıda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6.). *Streptomyces* sp. olduğu tespit edilen 11 adet suş stok kültürü hazırlanarak sonraki çalışmalar için +4 °C'de saklanmıştır.

4.3.1.2. Katalaz Testi



Şekil 4.7. *Bacillus sp.*C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için katalaz testi

Aerob bakterilerin çoğu aerobik solunumun bir son ürünü olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluştururlar. H_2O_2 organizmalar için toksik etki gösterdiğinden bazı organizmalar bunu engellemek için H_2O_2'yi oksijen ve suya indirgeyen

katalaz enzimi üretirler (Tille ve ark., 2014). Nutrient agar besiyerinde geliştirilen bakteri kültürü yüzeyine, %3'lük H_2O_2'ten 1ml damlatıp kültür yüzeyinde hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığına bakılarak yapılan değerlendirmeye göre *Bacillus sp*. C11 ve *Streptomyces* C1'in katalaz (+) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

4.3.1.3. Sitrat testi

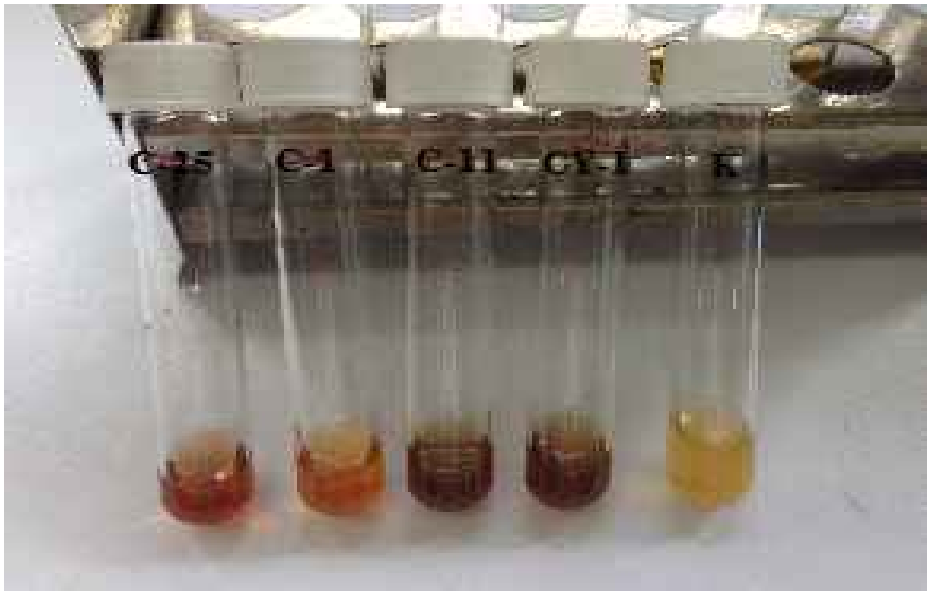
İnkübasyon sonunda, orjinal renk olan yeşilin maviye dönüşmesine göre *Bacillus sp*. C11' sitrat (+) , *Streptomyces* C1'in ise sitrat (-) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için Sitrat testi

4.3.1.4. Metil Kırmızısı Testi

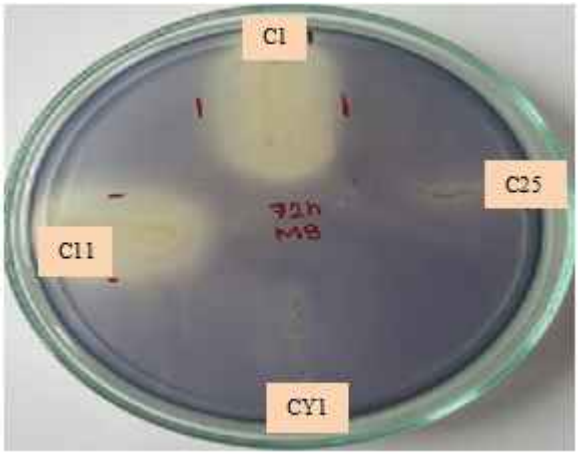
Suşların Glukoz-Fosfat Broth besiyerinde 37C'de 2-3 gün inkübasyondan sonra tüpeteki 2 ml bakteri kültürüne 3-5 damla olacak şekilde metil kırmızısı ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldığında kırmızı renk oluşumuna göre yapılan değerlendirme sonucunda *Bacillus sp*. C11 ve *Streptomyces* C1 suşlarının metil kırmızısı (+) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için metil kırmızısı testi

4.3.1.5. Nişasta hidroliz testi

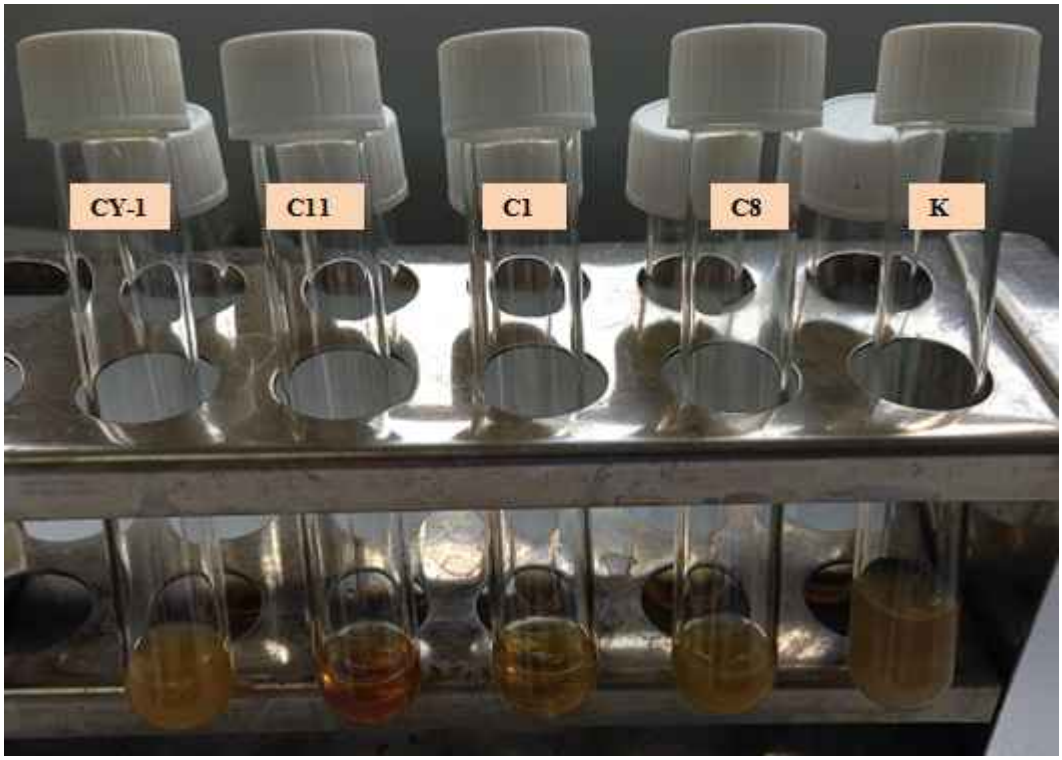
% 1 nişasta içeren M9 agar besiyerine Bakteri kolonilerinden çizgi ekim yapılarak 55°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra lugol damlatılarak amilaz zonu oluşup oluşmadığına göre yapılan değerlendirmede *Bacillus sp*. C11 ve *Streptomyces* C1'in Amilaz (+) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 nin nişasta hidroliz sonucu

4.3.1.6. Voges-Proskauer Testi

Suşlar Glukoz-Fosfat Broth besiyerinde 37C'de 2-3gün inküb edilmiş ve tüplere %40'lık KOH 1ml %5'lik alfa naftolden 3ml ilave edilerek kırmızı renk oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda *Bacillus sp*. C11 suşunun VP (+), *Streptomyces* sp. C1 suşunun ise VP (-) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. *Bacillus sp*.C11 ve *Streptomyces sp*. C1 için VP testi

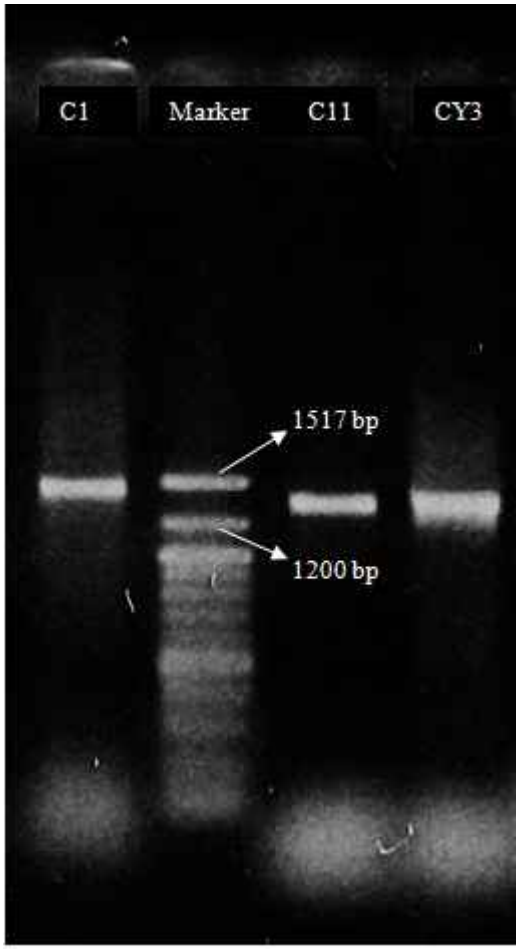
4.3.2. Moleküler Tanımlama

Tek koloniden hazırlanan bir gecelik taze kültürden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra Genel Bakteri primerleri kullanılarak belirlenen uygun PCR koşullarında 16S rDNA gen bölgesi çoğaltılmıştır (Şekil 4.12)

Sekans analizi sonucunda ortaya çıkan elektroferogram verilerinin değerlendirilmesiyle sekanslar sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14'teki gibi belirlenmiştir.

Elde edilen 16S rDNA sekanslarının NCBI-Blast analizi ile filogenetik haritası çıkarılarak tür tayini yapılmıştır. *Bacillus* sp. C11 örneğimizin

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ veritabanındaki kısmi 16S rDNA sonuçlarına göre *Bacillus licheniformis* N5 ile %99 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. C1 örneğimizin http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ veritabanındaki kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre ise *Streptomyces fradiae* NBRC 3439 ile %99 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. 'MEGA 6.06 Bootstrap Test of Phylogeny' yazılımı ile neighbour-joining metodu kullanılarak filogenetik ağaçları oluşturulmuştur Şekil 4.15. ve 4.16. Tanımlamaları yapılan suşların NCBI gen bank veritabanına KJ792472 ve JN409455 no ile kaydı yapılmıştır



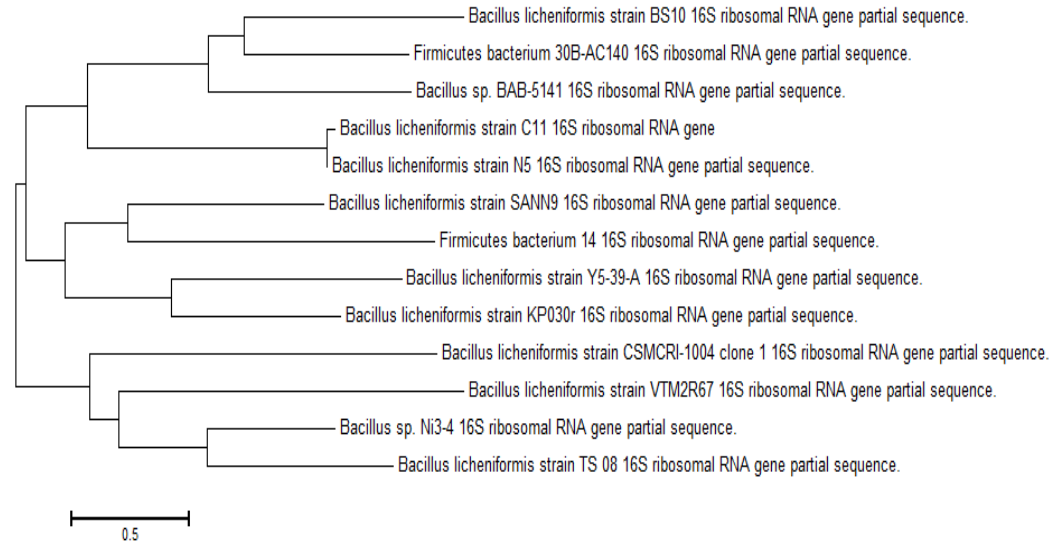
Şekil 4.12. *Bacillus sp*. C11 ve *Streptomyces* sp. C1 suşunun 16SrRNA sekansının PCR ürünün jel görüntüsü (DNA Leader=www.neb.com/N3231)

TGCAGAGGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGCATGCTTGATTGAA
CCGCATGGTCAATTATAAAAGGTGGCATTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGACCTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGGGAAGAACAAGTA
CCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGTTCCAAAGTTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTA
GTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGTTCGATTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT
CTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAA
GGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA
ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTA

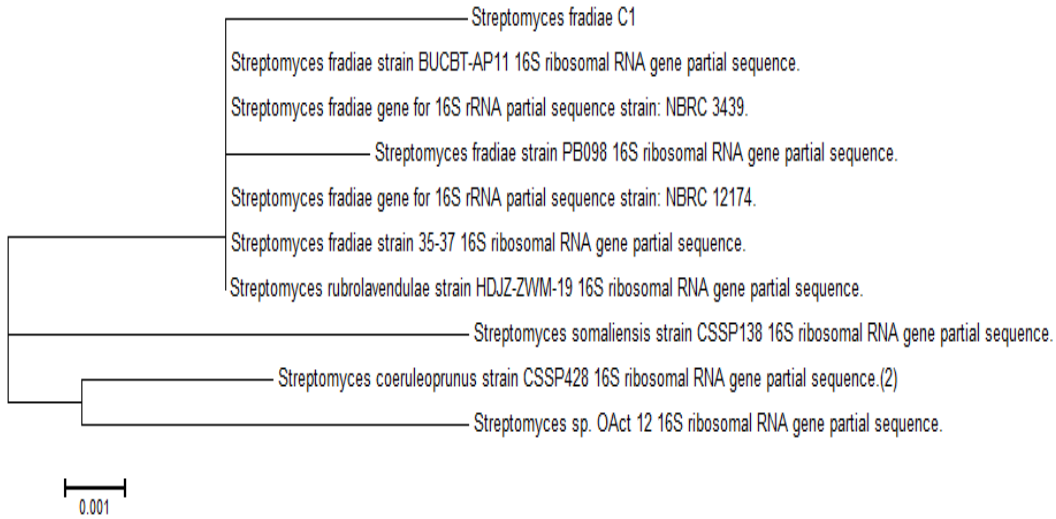
Şekil 4.13. *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait 16S rDNA gen sekansı

GCGAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCCACTTCGGTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGAT
ACGACCACTTCAGGCATCTGATGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTAT
CAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGCGGAATATTGCACAATG
GGCGAAAGCCTGATGCAGGGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG
CAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCTGTC
ACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCG
GTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGTACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGC
CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGCGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
GCTTGACATACACCGGAAACACCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCG
TGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG
GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCGGGT
ACAAAGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGT
CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTCTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCC
CAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGTAGTCGTAACAAGGTA
GCCGTACCG

Şekil 4.14. *Streptomyces fradiae* C1 suşuna ait 16S rDNA gen sekansı



Şekil 4.15. *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait filogenetik ağaç



Şekil 4.16. *Streptomyces fradiae* C1 suşuna ait filogenetik ağaç

4.4. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

4.4.1. Optimizasyon Çalışmaları

Şuşların optimum üreme ve enzim sentezinin gerçekleştirdiği ortam koşullarını tespit etmek amacıyla çeşitli azot kaynakları, karbon kaynakları,

inokülasyon miktarı ve inkübasyon süresi gibi parametreler dikkate alınarak araştırma yapılmıştır.

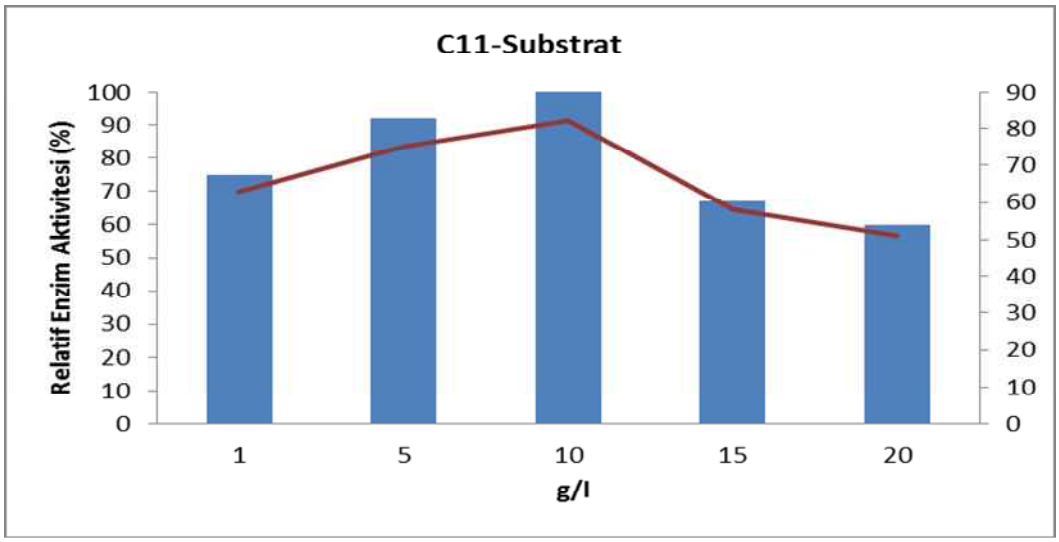
Mikroorganizmların ürettiği ekstraselüler proteazlar karbon/azot oranı, glikoz gibi kolay metabolize olabilen şekerler (Beg ve ark., 2002a) ve metallerin (Verala ve ark., 1996) varlığında olumlu yada olumsuz olarak şiddetli bir şekilde etkilendikleri belirtilmiştir. Proteaz sentezi besiyerindeki amino asitler gibi hızlı metabolize olabilen azot kaynakları tarafından da etkilenmektedir. Bunların yanında havalandırma, inokulasyon miktarı, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi diğer fiziksel faktörlerinde de proteaz üretim miktarını etkilediği ileri sürülmektedir (Hameed ve ark., 1999; Puri ve ark., 2002).

Proteaz verimini arttırmak için yapılmış olan son çalışmalar; aşırı üretim yapan suşların taranması, klonlama ve aşırı ekspresyon, kesikli-beslemeli (Fed-batch), kemostat fermentasyonları, kültür koşullarının optimizasyonu ve alternatif tarımsal atıkların substrat olarak kullanılması gibi parametreleri içermektedir (Hameed ve ark., 1999; Puri ve ark., 2002).

4.4.1.1. Substrat (Tavuk tüyü) Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi

Tavuk tüyü konsantrasyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla farklı konsantrasyonda tavuk tüyü içeren temel tüylü besiyerinde üretim yapılarak keratinaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Literatür verileri temel alınarak hazırlanan üretim besiyerinde 10g/L tavuk tüylü ortamda üreyen bakterilerin keratinaz aktiviteleri (kontrol) %100 kabul edilerek, elde edilen diğer bulgular buna göre oranlanıp rölatif enzim aktiviteleri saptanmıştır. Sonuç şekil 4.17 ve şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Bacillus licheniformis C11 suşunun aktivitesi %1 substrat konsantrasyonuna kadar arttığı ve en yüksek aktivitesininde %1 (10g/l) substrat konsantrasyonunda 412 U/ml olarak saptanmışıtr. Bu konsantrasyondan sonra enzim aktivitesinde düşüş olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.17. Substrat Konsantrasyonunun *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi

Cheng ve ark. (1995), *Bacillus licheniformis* PWD-1suşuyla en yüksek keratinaz üretimini besiyerinde %1 tavuktüyü olduğunda saptamışlardır. Lin ve ark. (2010), besiyerinde %0.5 konsantrasyonda tavuk tüyü unu varlığında *Bacillus licheniformis* YJ14 ile enzim üretimin en yüksek olduğunu saptamışlardır.

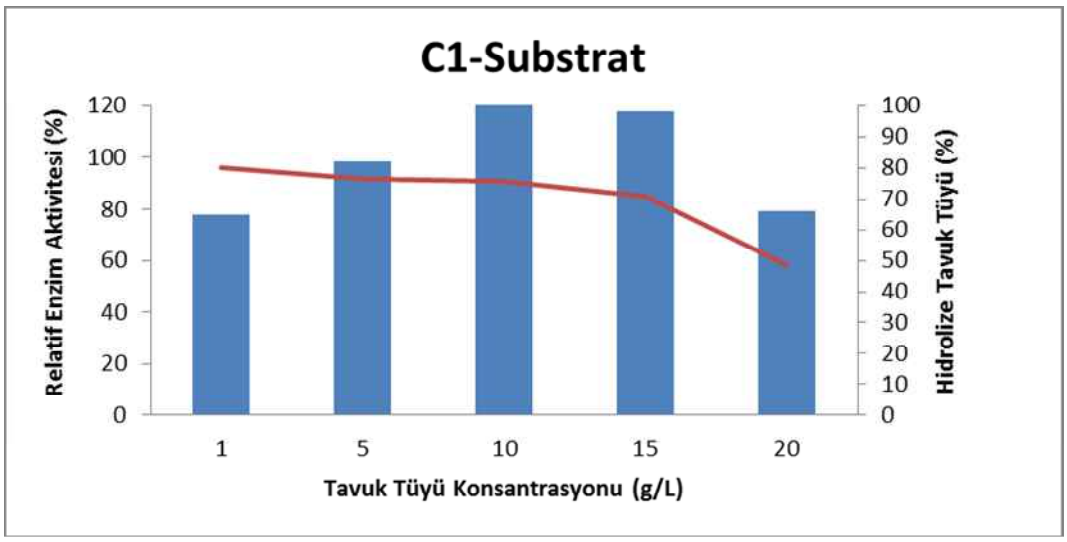
Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşuyla en yüksek keratinaz üretimini %1 tavuktüyü varlığında saptamışlardır. Saibabu ve ark. (2013), *Bacillus megaterium* suşuyla en yüksek keratinaz üretimini, %1.5 tavuktüyü varlığında saptamışlardır.

Cai ve ark (2008), *Bacillus subtilisten* keratinaz üretimi gerçekleştirmek için yaptıkları optimizasyon çalışmasında çeşitli konsantrasyonlarda tavuk tüyü içeren besiyerlerinde denemeler yapmışlardır. Sonuçta en yüksek verimin %1 tavuk tüyü içeren besiyerinde olduğunu saptamışlardır.

Alkalin termofil keratinaz üretimi için seçtiğimiz *Bacillus licheniformis* C11 suşu en fazla keratinaz üretimini %1 tavuk tüylü besiyerinde gerçekleştirmiştir. Bu bulgu literatür verilerinin büyük çoğunluğu ile uyumludur.

Streptomyces fradiae. C1 suşunda alkaline termofil keratinaz üretimininin %1 substrat konsantrasyonuna kadar arttığı ve en yüksek aktivitesininde %1 (10g/l) substrat konsantrasyonunda 314 U/ml olarak gerçekleştirdiği saptanmıştır. Çalışmalarda organizmanın %1.5 tavuk tüyü konsantrasyonlu ortamda azda olsa düşüş olmakla birlikte yüksek düzeyde keratinaz üretebildiği, %2

konsantrasyonda ise %0.1 lik tavuk tüyü konsantrasyonu düzeyine düştüğü görülmektedir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında substrat konsantrasyonu olarak %1 tavuk tüyü kullanımı ile devam edilse de %1.5 konsantrasyonda yüksek üretim değerinin görülmesi enzim üreticisi/doğada biyoremediasyon amacı ile kullanılacak organizmanın potansiyelini olumlu yönde etkileyecek özelliktir.



Şekil 4.18. Substrat Konsantrasyonunun *Streptomyces* sp. C1'in keratinaz üretimine etkisi

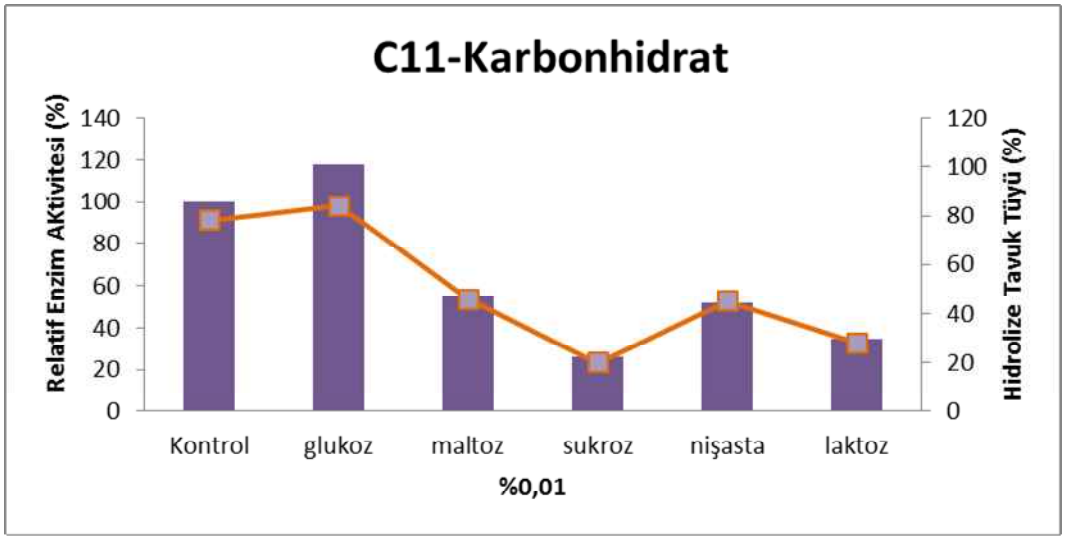
Jaouadi ve ark. (2010), *Streptomyces* sp. AB 1 suşundan %1 Tavuk tüyü içeren sıvı besiyeri kullanarak keratinaz enzim üretimi gerçekleştimişlerdir. Tatineni ve ark. (2008), *Streptomyces* sp. S7 suşundan %1 Tavuk tüyü içeren sıvı besiyeri kullanarak keratinaz enzim üretimi gerçekleştimişlerdir.

Literatürden elde edilen bulgular dikkate alındığında, alkalin termofil *Streptomyces fradiae.* C1 suşunun keratinaz üretimi açısından literatüre göre daha yüksek konsantrasyonda tavuk tüyünü hidrolize edebilecek potansiyelde olduğunu göstermektedir.

4.4.1.2. Farklı Karbon Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının alkalin termofil keratinaz enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla glukoz, maltoz, sukroz, laktoz ve nişasta içeren tavuk tüylü besiyerinde keratinaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. 10g/L

tavuk tüylü ortamda üreyen bakterilerin keratinaz aktiviteleri (kontrol) %100 kabul edilerek, elde edilen diğer bulgular buna göre oranlanıp rölatif enzim aktiviteleri saptanmıştır. Ramnani ve Gupta (2004), farklı karbon kaynaklarının keratin içeren medyuma takviyesi mikroorganizmalardan yüksek seviyede keratinolitik proteaz üretimi ile sonuçlanabildiğini bildirmişlerdir. Sonuç şekil 4.19.ve 4.20'de gösterilmiştir.

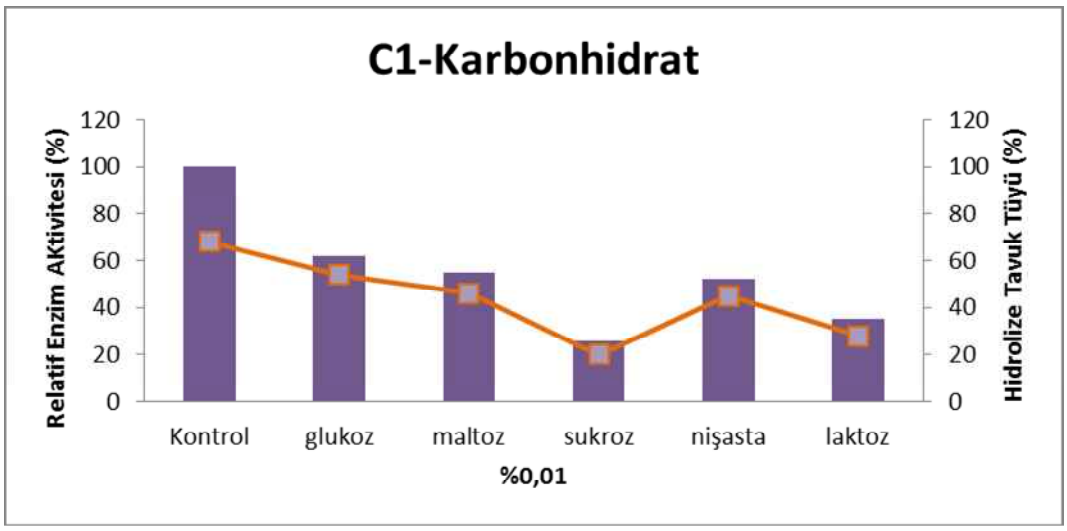


Şekil 4.19. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı

Grafikte de görüldüğü gibi; *Bacillus licheniformis* C11, karbon kaynağı olarak %0.01 D-glikoz kullanıldığında kontrole göre enzim üretiminde %18 verim artışı ile 472 U/ml olarak gerçekleşmiştir. Diğer karbon kaynakları ile yapılan çalışmalarda ikinci sıra maltoz yer almakla birlikte kontrole göre üretimde yaklaşık %50 ye yakın düşme söz konusudur. Karbon kaynakları içerisinde en düşük verim kontrole göre yaklaşık %70 ile sukrozda elde edilmiştir. Bu sonuçlar *Bacillus licheniformis* C11 suşu için keratinaz üretiminde karbon kaynağı olarak glikozu ön plana çıkarmaktadır.

Purva ve ark. (1998), *Bacillus* sp. IS-3'ün en yüksek proteaz üretimini karbon kaynağı olarak D-glukoz varlığında gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Kaur ve ark. (2001), *Bacillus* sp. P-2'nin besiyerinde karbon kaynağı olarak D-glukoz kullanıldığında en yüksek proteaz verimini elde ettiklerini bildirmişlerdir. Beg ve ark. (2002), *Bacillus majavensis* suşunun en yüksek proteaz üretimini karbon

kaynağı olarak D-glukoz varlığında gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.Literatür bilgilerinden de görüldüğü gibi *Bacillus* sp. suşları ile yapılan çalışmalarda keratinaz enzim üretimi için karbon kaynağı olarak glukoz ilk sırada yer almaktadır. Çalışmamızda seçilen organizma ile elde edilen bulgular literatür ile benzerdir.



Şekil 4.20. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı

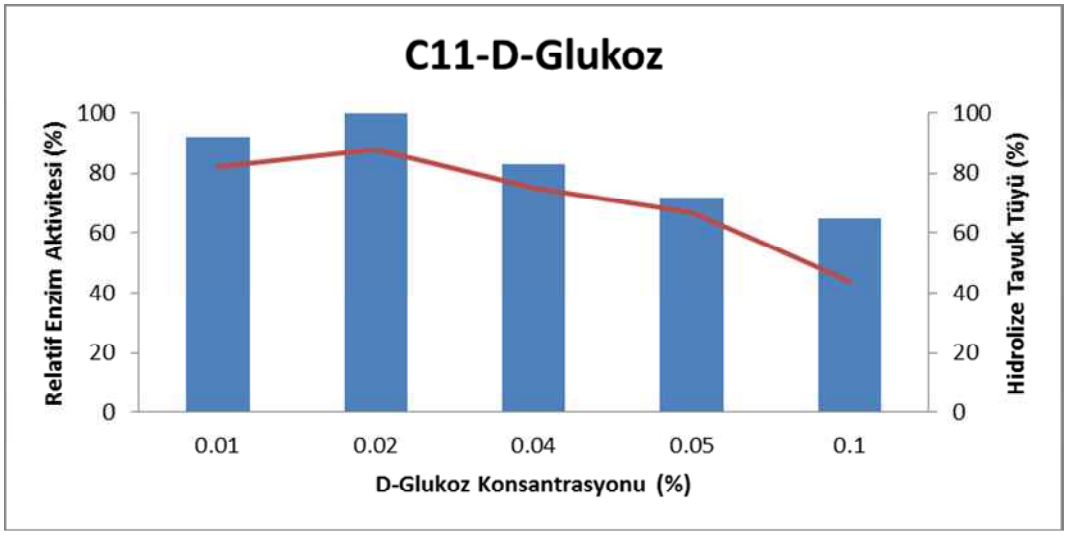
Streptomyces fradiae C1 suşu ile yapılan karon kaynaklarının optimizasyonu çalışmalarında en yüksek enzim üretiminin glukoz içeren temel tüylü besiyerinde gerçekleştiği görülmektedir. *Streptomyces fradiae* C1 suşunda glukoz ile en yüksek verim elde edilmekle birlikte *Bacillus licheniformis* C11 suşunun aksine kontrole göre daha düşük verim gerçekleştiği bulunmuştur. *Streptomyces fradiae* C1 suşunun diğer karbon kaynakları ile yapılan keratinaz üretim denemelerinde özellikle sukrozlu ortamda yaklaşık %30 düzeyinde verim alınması, bu substratın çalışmamızda kullanılan *Bacillus licheniformis* C11 suşunda elde edilen sonuçla benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Thangam ve Rajkumar (2000), *Alcaligenes faecalis'* ten keratinaz üretiminde sadece tavuk tüyünün gerekli karbonu sağladığını bu nedenle besiyerinde karbon kaynağına gerek olmadığını bildirmişlerdir. Romero ve ark (2001), *Flavobacterium balustinum* P104 den karbon kaynağı olmadan sadece tavuk tüyü ile optimum keratinaz üretim elde etmişlerdir.

Jaouadi ve ark (2010), *Streptomyces* sp. AB1 suşundan karbon kaynağı kullanmadan sadece tavuk tüyü ve çeşitli mineraller kullanarak keratinaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Hsun ve ark (2012), *Bacillus cereus* Wu2 suşundan karbon kaynağı kullanmadan sadece tavuk tüyü ve çeşitli mineraller kullanarak keratinaz üretimi gerçekleştirmişlerdir.

4.4.1.2(1) D-Glukoz'un Farklı Konsantrasyonlarının *Bacillus licheniformis* C11'in Keratinaz Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının analizi sonucunda *Bacillus licheniformis* C11'in %0.01 D-glikoz içeren besiyerinde en yüksek enzim üretiminin saptanmasıyla D-Glukoz'un farklı konsantrasyonlarının (%0.01; 0.02; 0.04; 0.05; 0.1) *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Sonuç şekil 4.21.'da gösterilmiştir.



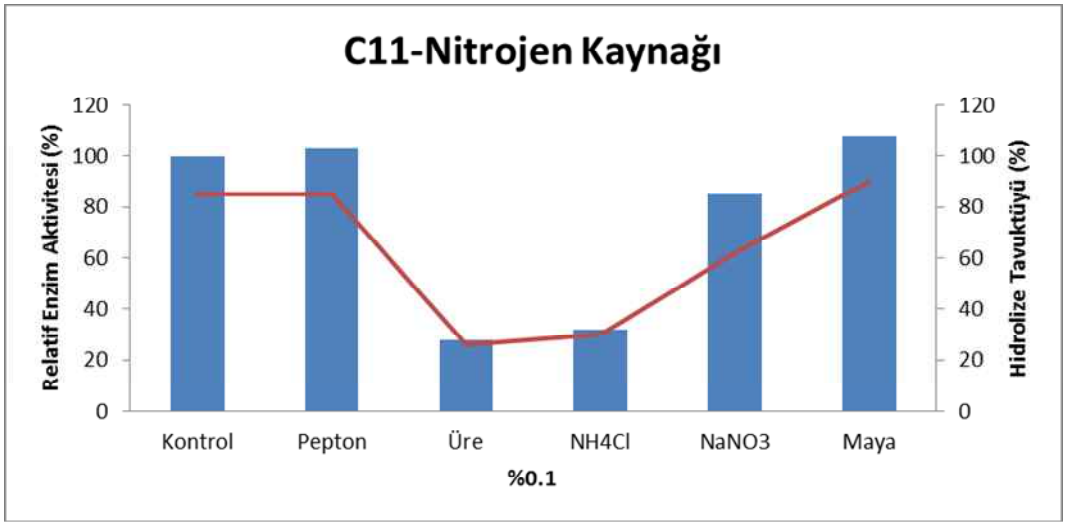
Şekil 4.21. D-Glukoz'un *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi

Bacillus licheniformis C11, % 0.02 konsantrasyonda D-glukoz içeren temel tüylü besiyerinde diğer oranlara göre daha yüksek keratinaz aktivitesi (482 U/ml) göstermiştir. Kullanılan glukoz konsantrasyonu arttıkça (%0.04-0.1 e doğru) enzim üretiminde kısmi azalma gözlenmiştir.

Ramnani ve Gupta (2004), *Bacillus* sp.'den keratinaz üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz kullandıklarında en yüksek keratinaz üretimini elde ettiklerini bildirmişlerdir. Feng ve ark. (2001), mikroorganizmaların yüksek glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimi üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus licheniformis* C11 suşu kullanılarak farklı glukoz konsantrasyonlarının keratinaz sentezi üzerine etkisi araştırıldığında, konsantrasyonun artışına bağlı olarak %0.02 konsantrasyona kadar keratinaz sentezini artırdığı, buna karşılık %0.1 konsantrasyonda inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen bulgu Feng ve ark. (2001)'nın bulgularıyla uygunluk göstermektedir.

4.4.1.3. Farklı Azot Kaynaklarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

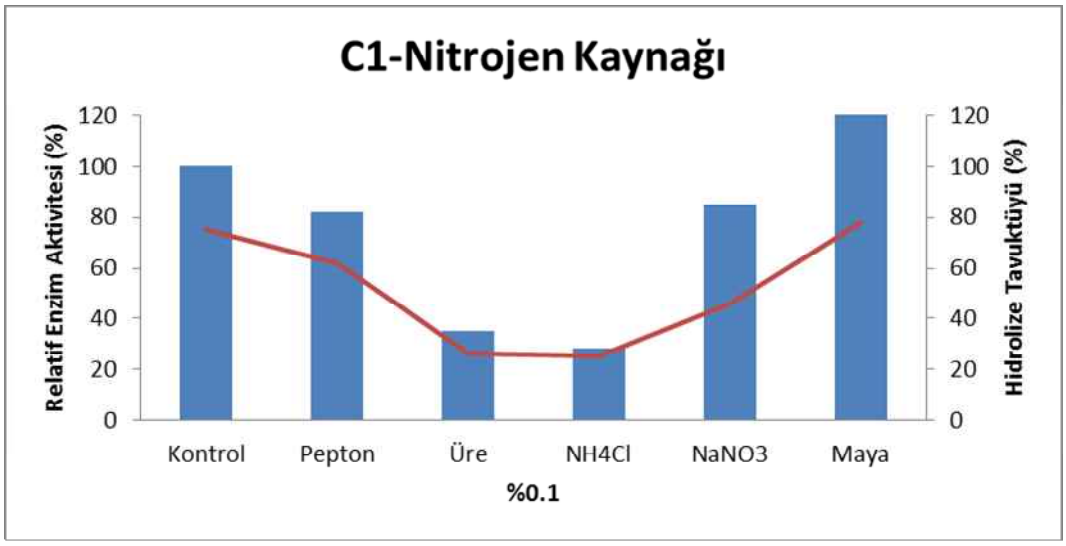
Farklı azot kaynaklarının bakteri gelişimi ve enzim sentezi üzerine etkisini araştırmak amacıyla pepton, üre, NH4Cl, $NaNO_3$ ve maya içeren tavuk tüylü besiyerinde keratinaz enzim üretimi araştırılmıştır. Tavuk tüylü (10g/L) ortamda (*Bacillus licheniformis* C11 için 0.02 glikoz ilave edilmiştir) gelişen bakterilerin keratinaz aktiviteleri (kontrol) %100 kabul edilerek, elde edilen diğer bulgular buna göre oranlanıp rölatif enzim aktiviteleri saptanmıştır. Sonuç şekil 4.22.ve 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.22. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı nitrojen kaynağı içeren besiyerlerindeki keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı

Bacillus licheniformis C11, pepton ve maya içeren temel tüylü besiyerinde kontrol ve diğer azot kaynaklarına göre daha fazla miktarda keratinaz üretilmesine neden olmuştur. Kontrole göre en yüksek enzim üretimi sırasıyla %113 (511 U/ml) ile %0.1 maya içeren ve %108 ile % 0.1 pepton içeren besiyerinde saptanmıştır. En düşük keratinaz üretiminin ise NH_4Cl ve Üre içeren besiyerlerinde rastlanmıştır.

Streptomyces fradiae C1, %0.1 oranında maya içeren temel tüylü besiyerinde kontrol ve diğer azot kaynaklarına göre daha yüksek keratinaz aktivitesi (384 U/ml) elde edilmiştir. En yüksek enzim üretimi %122 ile mayanın kullanıldığı testlerde elde edilirken, endüşük üretim yaklaşık %35 ile NH_4CL elde edilmiştir. *Bacillus licheniformis* C11 suşunda en düşük üretim üre kullanıldığında (yaklaşık %30) elde edilirken *Streptomyces fradiae* C1 de en düşük üretimin NH_4CL ile elde edilmesi en önemli farklılıklardan biridir.



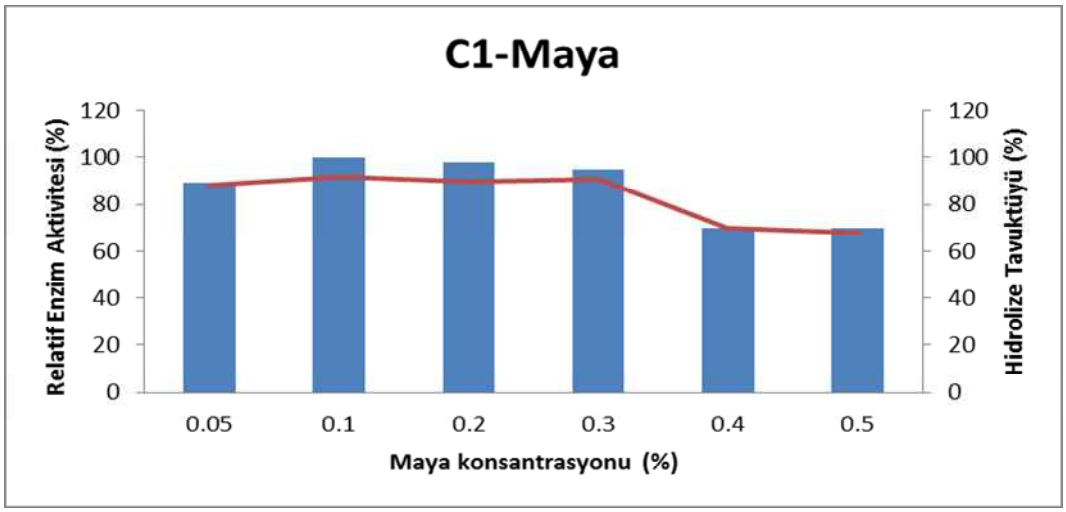
Şekil 4.23. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı azot kaynaklarının keratinaz üretimine etkisi

Ramnani ve Gupta (2004), azot kaynağı olarak pepton, maya akstraktı, üre, tripton, amonyum klorid ve sodyum nitrat gibi maddelerin ilavesi keratinolitik proteazların verimini arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan her iki suşta ta keratinaz üretiminin özellikle amonyumklorür ve üre ile baskılanması suşlarımızın literatür örneklerinden farklılığını ortaya koymaktadır.

Saibabu ve ark (2013), *Bacillus megaterium*' dan keratinaz enzim üretiminde üretim ortamında substrat olarak tavuk tüyü ve çeşitli izelementler yanında nitrojen kaynağı olarak %0.01 maya da kullanmışlardır.

4.4.1.3(1) Maya'nın farklı konsantrasyonlarının *Streptomyces sp.* C1'in Keratinaz Üretimine Etkisi

Streptomyces fradiae C1'in % 0.1 maya içeren besiyerinde en yüksek rölatif enzim üretiminin elde edildiğinin saptanmasıyla Maya'nın farklı konsantrasyonlarının (%0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5) *Streptomyces fradiae* C1'in keratinaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Sonuç şekil 4.24.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Mayanın *Streptomyces fradiae* C1'in keratinaz üretimine etkisi

Streptomyces fradiae C1, % 0.1 konsantrasyonda maya içeren temel tüylü besiyerinde diğer oranlara göre daha yüksek keratinaz üretimi sağlamıştır.

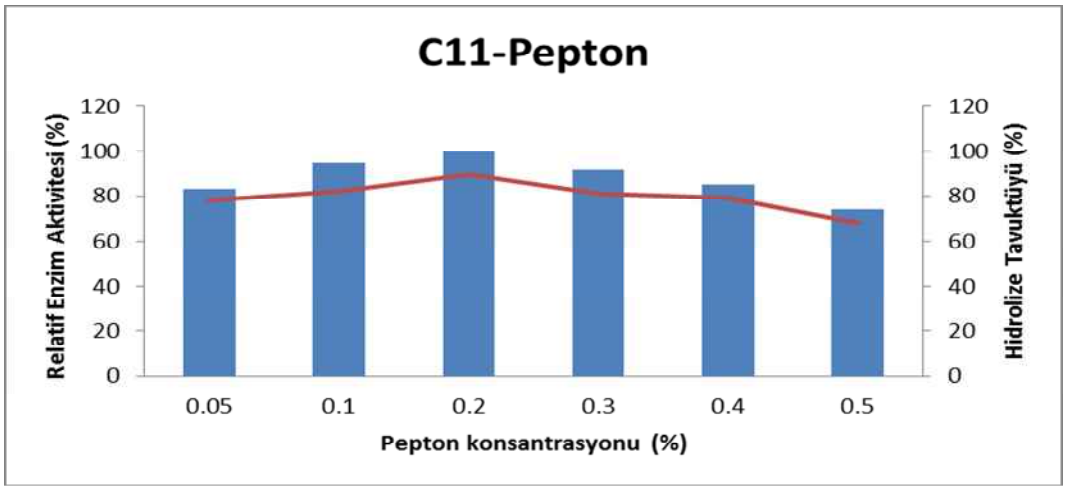
Gioppo ve ark., (2009) karbonhidratlar, inorganik ve/veya organik azot kaynaklarının ortama gereğinden fazla eklenmesi katabolit baskılama mekanizmaları nedeniyle mikroorganizmaların keratinolitik proteaz üretiminin azalmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

4.4.1.3(2) Pepton'un farklı konsantrasyonlarının *Bacillus licheniformis* C11'in Keratinaz Üretimine Etkisi

Farklı azot kaynaklarının analizi sonucunda *Bacillus licheniformis* C11'in % 0.1 pepton içeren besiyerinde en yüksek enzim üretimini sağladığının saptanması ile peptonnun farklı konsantrasyonlarının (%0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5) *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Sonuç şekil 4.25.'de gösterilmiştir.

Grafikten anlaşıldığı gibi; *Bacillus licheniformis* C11, % 0.2 konsantrasyonda pepton içeren temel tüylü besiyerinde diğer oranlara göre daha yüksek keratinaz aktivitesi göstermiştir.

Deivasigamani ve ark (2008), Bacillus sp. 'den optimum keratinaz üretimini % 0.2 konsantrasyonda pepton kullandıklarında elde etmişlerdir.

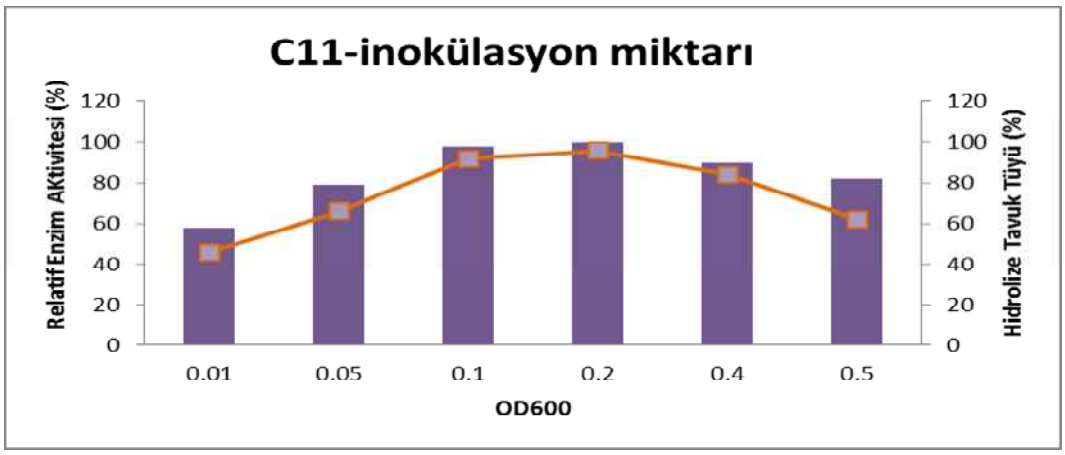


Şekil 4.25. Peptonun *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz üretimine etkisi

Çalışmamızda kullanılan *Bacillus licheniformis* C11 suşu ile yapılan keratinaz üretim çalışmalarında azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında (%0.2) en yüksek verim elde edilmiştir. Bu sonuç Deivasigamani ve ark (2008)'nın bulguları ile tam bir uyumluluk göstermektedir.

4.4.1.4. İnokülasyon Miktarının Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Her iki suş içinde belirlenen optimum koşullarda 6 seri x 3'erli tekrar şeklinde besiyerleri hazırlanarak daha önceden hazırlamış olduğumuz bir gecelik sıvı kültürün OD_{600} değeri belirlenerek ana kültüre ilk OD_{600} 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.5 olacak şekilde hesaplanarak çeşitli miktarlarda inokülasyonlar yapılmıştır. Sonuç şekil 4.26 ve 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.26. *Bacillus licheniformis* C11'in farklı inokülasyon miktarlarının keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı

Bacillus licheniformis C11 suşunun en yüksek keratinaz üretimini, üretim ortamına başlangıç olarak ml'de yaklaşık 1.6 x 10^8 (OD_{600}~0.2) bakteri aşılandığında gerçekleştirdiği bulunmuştur. Daha yüksek miktarda bakteri aşılandığında ise sentez azalma olduğu saptanmıştır.

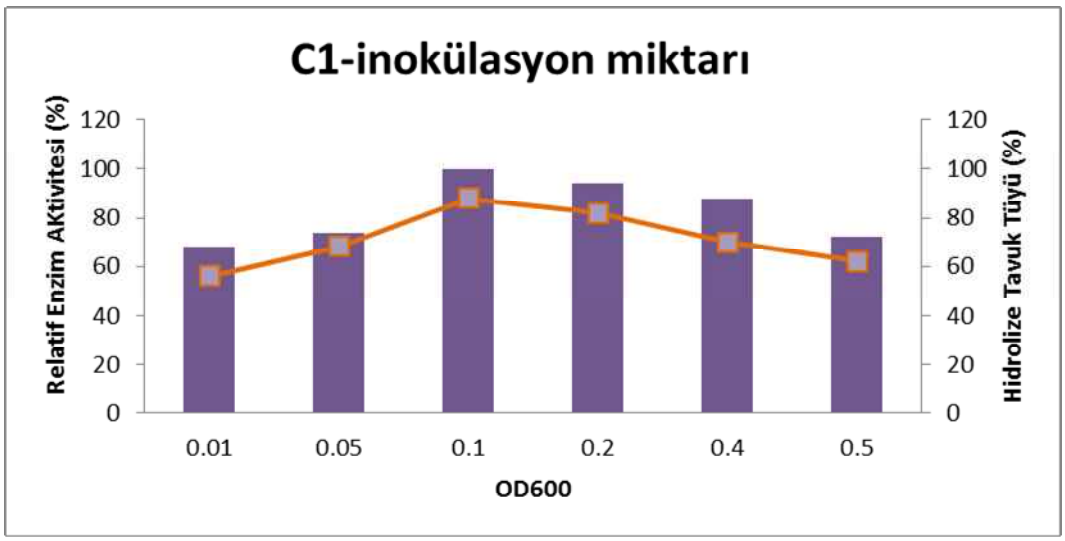
Cai ve ark (2008), *Bacillus subtilis*'ten en yüksek keratinaz verimini elde etmek amacıyla yaptıkları optimizasyon çalışmalarında inokülasyon miktarının keratinaz üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. En yüksek keratinaz üretimini besiyerine %2 (v/v) aşılama yapıldığında elde etmişlerdir.

Deivasigamani ve ark (2008), En yüksek keratinaz üretimini besiyerine % 5 (v/v) aşılama yapıldığında elde etmişlerdir.

Yue ve ark (2011), *Bacillus* sp. 50-3 ile en yüksek keratinaz verimini elde etmek amacıyla yaptıkları optimizasyon çalışmalarında inokülasyon miktarının

keratinaz üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. En yüksek keratinaz üretimini besiyerine 10^6 CFU/ml kültürden %2 (v/v) aşılama yapıldığında elde etmişlerdir.

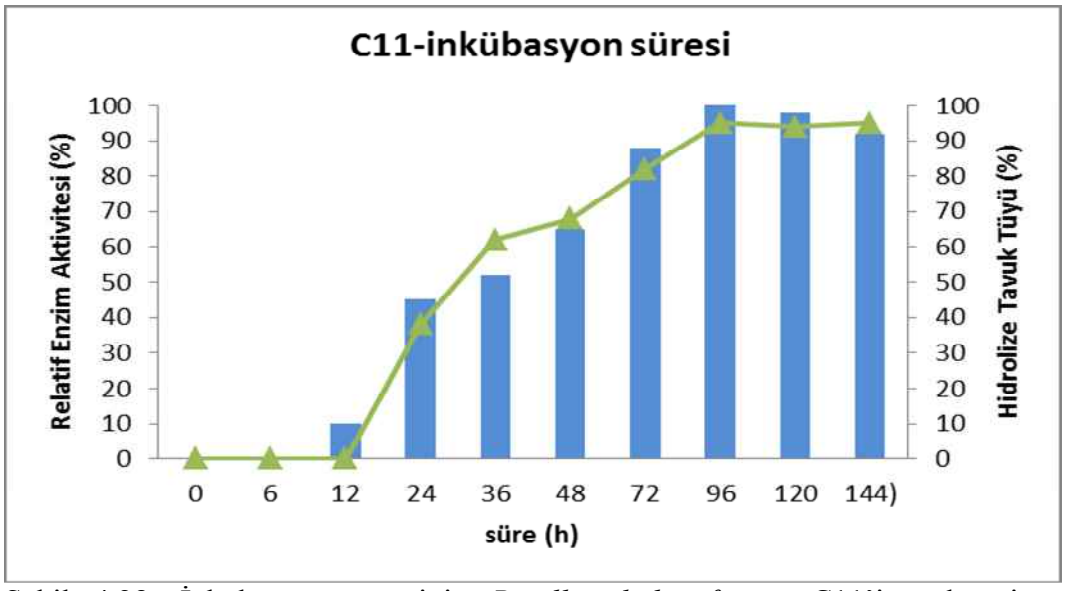
Grafikten anlaşıldığı gibi; *Streptomyces sp.* C1 suşunun en yüksek keratinaz aktivitesi (410 U/ml), en yüksek keratinaz üretimini besiyerine 8 x 10^7 (OD_{600}~0.1) aşılama yapıldığında elde etmişlerdir. Daha yüksek miktarda inoküle edildiğinde ise bu verimin düştüğü saptanmıştır.



Şekil 4.27. *Streptomyces fradiae* C1'in farklı inokülasyon miktarlarının keratinaz aktiviteleri ve hidrolize tavuk tüyü oranı

4.4.1.5. İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

Keratinaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacı ile 0, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96. ve 120. saatlerde örnek alınarak enzim inkübasyon süresinin enzim üretimine etkisi belirlenmiştir. Sonuç şekil 4.28 ve 4.29'da gösterilmiştir.

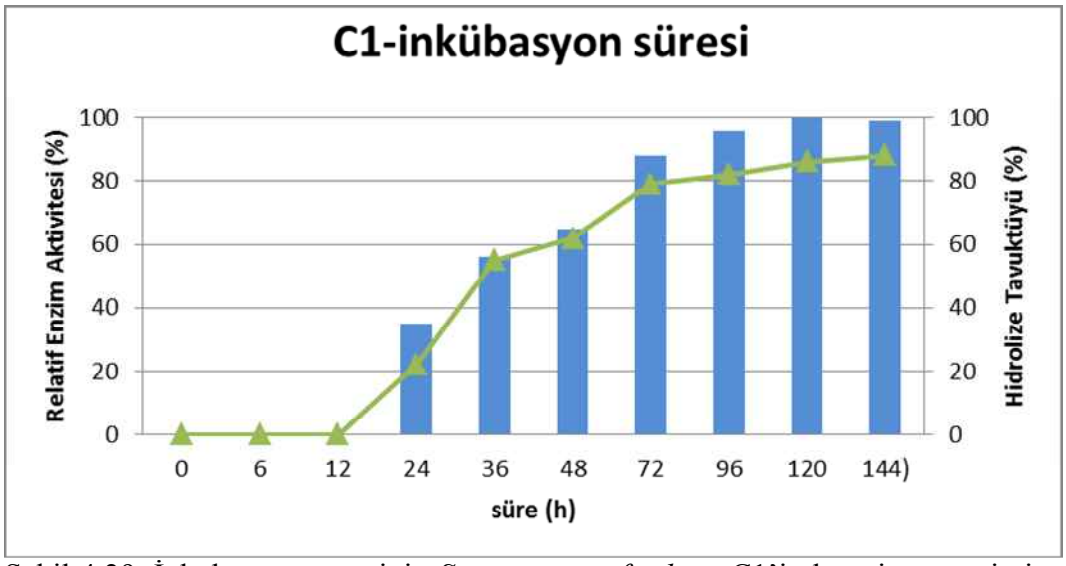


Şekil 4.28. İnkübasyon süresinin *Bacillus licheniformis* C11'in keratinaz üretimine etkisi

Yapılan çalışmada *Bacillus licheniformis* C11 suşunun en yüksek keratinaz sentezini üremenin 96'ıncı saatinde (520 U/ml) gerçekleştirdiği bulunmuştur. Keratinaz sentezinin başlangıcı ise 12.ci saat olup (yaklaşık %10) 24.cü saatte %50'lere ulaşmış, giderek yükselen bir seyirle 96.cı saatte maksimum seviye elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılmasına bağlı olarak enzim sentezinin çok büyük düşüş olmamakla birlikte azaldığı saptanmıştır. Vidhya ve Palaniswamy (2013), *Bacillus licheniformis* KMBVP suşunu keratinli besiyerinde optimum alkalin termofil serin keratinaz üretiminin inkübasyonun 144.saatinde maximum gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Kazan ve ark. (2005), *Bacillus clausii* GMBAE 42'nin proteince zengin bir besiyerinde ürettigi alkali serin proteazın, inkübasyonun duragan evresinde ve 96. Saatinde gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan *Bacillus licheniformis* C11 suşu bu özelliği ile Kazan ve ark. (2005) çalışmalarına uygunluk göstermektedir.

Saibabu ve ark (2013), *Bacillus megaterium* ile gerçekleştirilen çalışmada optimum keratinaz üretiminin inkübasyonun 72.ci saatinde gerçekleştiğini saptamışlardır.



Şekil 4.29. İnkübasyon süresinin *Streptomyces fradiae* C1'in keratinaz üretimine etkisi

Mousavi ve ark (2013), *Bacillus subtilis* suşu ile yapılan keratinaz üretim çalışmalarında maksimum enzim üretim seviyesine inkübasyonun 144. saatinde ulaşıldığını ifade etmişlerdir.

Yapılan çalışmada *Streptomyces fradiae* C1 suşunun en yüksek keratinaz sentezini üremenin 120'inci saatinde gerçekleştirdiği bulunmuştur. Keratinaz sentezinin inkübasyonun 24'üncü saatinde (yaklaşık %37) başladığı giderek yükselen bir seyirle 120'ci saatte maksimum seviye ulaştığı (468 U/ml), 144'cü saatte kısmende olsa düşüş gözlendiği belirlenmiştir (yaklaşık (%2).

Abdel-Mohsen ve ark (2012), *Trichoderma harzianum* MH-20 suşundan izole edilen keratinaz enziminin maksimum üretimin 144. Saatte gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Sutornsuk ve Sutornsuk (2003), *Bacillus* sp. FK-46 suşundan izole edilen keratinaz enziminin maksimum üretimin 120. saatte gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Syed ve ark. (2009), termo-tolerant *Streptomyces gulbargensis* suşundan izole edilen, optimum pH 9.0 ve 45°C de aktivite gösteren keratinaz enzimin maksimum üretimin 120'ci saatte gerçekleştiğini belirtmiştir.

Jaouadi ve ark. (2010*), Streptomyces* sp. AB 1 suşunda en yüksek keratinaz sentezinin 120 saatlik inkübasyon süresinde elde edildiğini belirtmişlerdir. Bir başka araştırmacı, Deivasigamani ve ark. (2008), Bacillus sp.'den keratinaz enzim üretimini 120 saat sonunda maximum seviyede keratinaz

elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan suştan elde edilen veriler Jaouadi ve ark. (2010) nın bulguları ile uyumluluk göstermektedir. Buna karşılık Syed ve ark. (2009),nın bulguları dikkate alındığında enzim üretiminde kullandığımız *Streptomyces fradiae* C1 suşunun enzim sentez süresi aynı olmakla birlikte sentezlenen enzimin özellikleri bakımından daha yüksek alkalinite ve termofiliteye (bakteri enzim sentezini pH 11.0 ve 60 °C de gerçekleştirmektedir) sahip olduğu dikkati çekmektedir.

4.4.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Suşların Optimum ürediği ve enzim sentezi gerçekleştirdiği koşullarda ve sürede enzim üretimi (Çizelge 4.3. ve 4.4.) gerçekleştirildikten sonra madde 3.2.3.2' deki şekilde kısmi saflaştırma işlemi yapılarak sonraki karakterizasyon aşamalarında kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

Streptomyces fradiae C1 suşunun enzim üretim optimizasyonu yapıldığı zaman, optimum inokülasyon miktarı 0.1 ($8x10^7$ bak./ml), inkübasyon süresi 120 saat (5 gün), inkübasyon sıcaklığı 60°C ve inkübasyon başlangıç pH değeri 11.0 olarak bulunmuştur. Fermentasyon sonunda en yüksek enzim üretimi (468 U/ml), açığa çıkan toplam protein karışımı 2.83 mg/ml olarak saptanmıştır.

Deivasigamani ve Alagappan (2008) kesimhane ve tavuk çiftliği alanındaki toprak örneklerinden azokeratin medyumu kullanarak Bacillus spp. izole etmişlerdir. İzole etmiş oldukları bu bakterinin üretmiş olduğu keratinazın en yüksek aktivitesinin (122.5 KU ml-1) pH 8.0'de olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, % 1 (w/v) tüy ve pH'nın 8.0 olduğu ortamda uyguladıkları submerged fermentasyon sonucunda en yüksek enzim üretiminin (140 KU ml-1) 4. günde gerçekleştiğini, 5. günün sonunda 1.44 mg/ml miktarda protein karışımı elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. *Streptomyces fradiae* C1 için optimum üretim koşulları

Tavuk tüylü besi yeri	g/L	Optimum İnokülasyon Miktarı (Başlangıç OD600)	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Optimum pH
MgSO4*7H2O	0.2	0.1	120	60	11
K2HPO4	1				
CaCl2	0.1				
KH2PO4	0.4				
Maya	0.1				
Tavuk Tüyü	10				

Çizelge 4.4. *Bacillus licheniformis* C11 için optimum üretim koşulları

Tavuk tüylü besi yeri	g/L	Optimum İnokülasyon Miktarı (Başlangıç OD600)	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Optimum pH
Pepton	0.2	0.2	96	55	10
Maya	0.1				
MgSO4*7H2O	0.2				
K2HPO4	1				
CaCl2	0.1				
KH2PO4	0.4				
Glukoz	0.1				
Tavuk Tüyü	10				

Streptomyces fradiae C1suşunun enzim üretme yeteneği araştırılırken elde edilen değerler literatür verilerinden oldukça yüksektir (örneğin aynı zaman diliminde açığa çıkan protein miktarı %100 den daha yüksektir.

Bacillus licheniformis C11 suşunun enzim üretim optimizasyonu yapıldığı zaman, optimum inokülasyon miktarı 0.2 ($1,6x10^8$ bak./ml), inkübasyon süresi 96 saat (4. gün), inkübasyon sıcaklığı 55°C ve inkübasyon başlangıç pH değeri 10 olarak bulunmuştur. Fermentasyon sonunda en yüksek enzim üretimi (520 U/ml), açığa çıkan toplam protein karışımı 2.83 mg/ml olarak saptanmıştır.

Syed ve ark. (2009), keratini parçalayan *Streptomyces gulbargensis* DAS 131 suşunu izole ederek, suşunun ürettiği keratinaz enziminin karakterizasyonunu çalışmışlardır. Bakteri suşunun 45 °C ve pH 9.0 ortamda 120 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen enzimin maksimum keratinolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Jeong ve ark. (2010), tavuk fabrikasındaki bir bölgede çürümüş tavuk tüyünden *Bacillus* sp. SH-517 suşunu izole ederek bu bakterinin üretmiş olduğu keratinaz aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar suşun 40 °C ve 180 rpm

çalkalayıcı inkübatörde 40 saat boyunca ürettikleri organizmanın tüyleri parçaladığını bildirmişlerdir.

Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp JB 99 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum üretim koşullarının 45 °C, pH 10.0 ve 36 saatlik inkübasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Mousavi ve ark. (2013), İran'ın Miyaneh kentindeki farklı alanlarda yer alan tavuk çiftliği atıklarının depolandığı toprak örneklerinden *Bacillus spp* izole etmişlerdir. Tüyleri parçalamak için kullanılan enzimin maksimum düzeye pH 11.0'de ve üretimin 6. gününde ulaştığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte bakterinin ölüm fazı ve sporulasyon ile maksimum keratinaz aktivitesi için en iyi sıcaklık koşulunun 40 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11suşundan elde edilen veriler literatürdeki Streptomycet suşlarına ait örneklerden oldukça yüksek iken *Bacillus* örneklerine ait sonuçlardan da Mousavi ve ark. 2013, İnkübasyonun 6.cı gününde ve 40 °C de maksimum üretim gerçekleştiğini belirtmişler) oldukça yüksektir (üretimin 4 gün ve termofil koşullarda pH 10.0 da gerçekleşmesi).

4.5. Doğal (Yabani) Suşların Enzimatik Özellikleri

Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces fradiae* C1 suşlarından optimum koşullarda üretim sonucunda elde edilen enzimlerin %1'lik tavuktüyü unu içeren agar besiyerine 25 µL damlatılarak 6 saat 55 ºC'de inkübe edilmiştir, %10 soğuk TCA ile 10 dk muamele edildikten sonra C11 ve C1 enzimine ait sırasıyla 26 ml ve 17 ml aktivite zonu oluşturduğu saptanmıştır Sonuç Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. C11 ve C1 suşlarından kısmi saflaştırma yöntemiyle izole edilmiş enzim çözeltisinin tavuk tüyü unu agar ortamında oluşturduğu aktivite reaksiyonu

4.6. Doğal (Yabani) Suşlardan Elde Edilen Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.6.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular

Hazırlanan enzim substrat (Na-fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Borax-NaOH (pH 11.0-12.0)) karışımları enzimin üretildiği sıcaklıkta 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmış ve standar aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

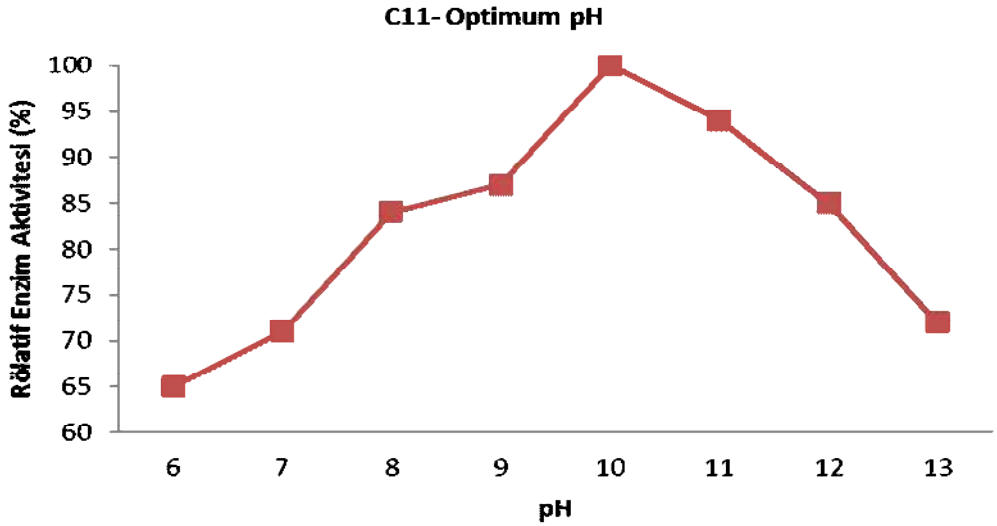
Spektrofotometrik ölçümler sonunda *Bacillus licheniformis* C11 enzimi için pH 6.0'da %65, pH 7.0'de % 71, pH 8.0'de %84, pH 9.0'da %87, pH 10.0'da %100, pH 11.0'de 94, pH 12.0'de %85 ve pH 13.0'de %72 relatif enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum aktivite pH 10.0 da elde edilirken bütün pH değerlerinde ortalama %82 aktivite saptanmıştır. Bu sonuçlar enzimin oldukça geniş bir pH aralığında (6.0-13.0) yüksek düzeyde aktif olduğunu

(ortalama %82), pH 8.0-12.0 aralığında ortalama %90 gibi oldukça yüksek bir aktivite gösterdiğini bu nedenle çok geniş bir pH aralığında etkin şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bacillus licheniformis C11 suşundan izole edilen keratinaz enzimi optimum aktivitesini pH 10.0'da göstermesi ile alkalin özelliğe sahiptir. Ayrıca hem asidik (pH 6.0 da %65) hem de ekstrem alkali (pH 13.0 de %72) pH değerlerinde yaklaşık ortalama %69 aktiviteye sahip olması, özellikle alkali pH değerlerinde ortalama %90 aktivite göstermesi, enzimin asido-alkalofilik ekstremofil enzim özelliği taşıdığını göstermektedir. Bu özelliği enzimin kullanım alanını oldukça genişletmektedir. Elde edilen bulgular şekil 4.31'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Kazan ve ark (2008), *Bacillus clausii* GMBAE 42 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum aktivitesini pH 11.3'da gösterdiğini bulmuşlardır. Fujiwara (1993), bir termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. B18 susundan, termofil alkalin proteaz saflastırmıstır. Bu enzimin kazein hidrolizi için optimum pH'sının 12.0-13.0 olarak saptamışlardır.

Saibabu ve ark. (2013), *Bacillus megaterium* suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0'da gösterdiğini bulmuşlardır. Thangam ve ark (2002), *Alcaligenes faecalis* suşundan termofil alkalin proteaz saflastırmıstır. Bu enzim için optimum pH'yı 9.0 olarak saptamışlardır.



Şekil 4.31. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı

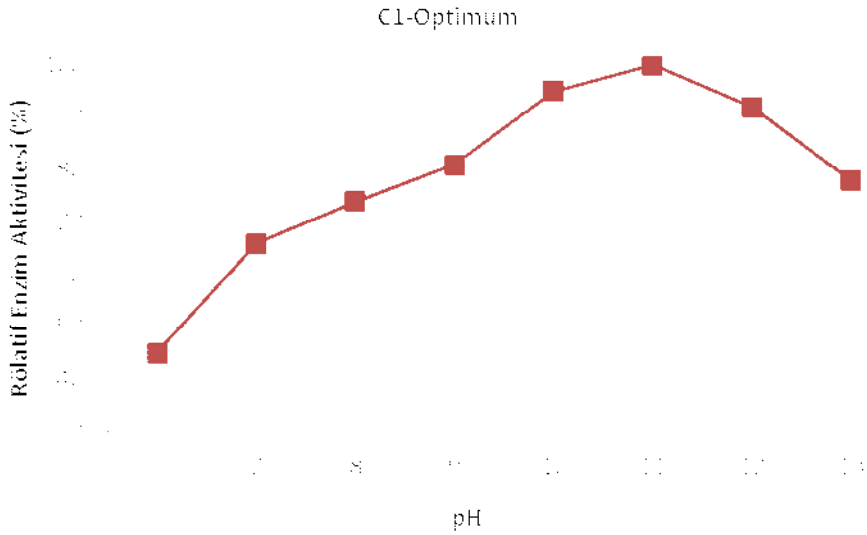
Mieko ve ark (2006), *Bacillus pseudofirmus* FA 30-01 suşundan üretilen keratinaz enzimin optimum pH aralığının 8.3-10.3 olarak saptamışlardır. Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan üretilen keratinaz enzimin optimum pH'sının 10.0 olarak saptamışlardır. Fakhfakh ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* R Pk suşundan üretilen termofil keratinaz enzimin pH 9.0 optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Yoshioka ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* MSK103 suşundan üretilen termofil keratinaz enzimin pH 10.0'da optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Suntornsuk ve ark. (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 suşundan üretilen termofil keratinaz enzimin pH 8.5'da optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Çalışmada izole edilen *Bacillus licheniformis* C11 suşundan üretilen keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve pH aralıkları ile literatürde verilen proteaz enzimleri ile uygunluk gösterirken, keratinolitik proteazlardan çok daha başarılı özelliğe sahiptir.

Streptomyces fradiae C1 enzimi ile yapılan optimum pH çalışmalarında pH 6.0'da %45, pH 7.0'de % 66, pH 8.0'de %74, pH 9.0'da %81, pH 10.0'da %95, pH 11.0'de 100, pH 12.0'de %92 ve pH 13.0'de %78 relatif enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum aktivite pH 11.0 de elde edilirken bütün pH

değerlerinde ortalama %78.8 aktivite saptanmıştır. Enzim pH 9.0-12.0 aralığında ortalama %92 gibi yüksek bir aktivite değerine sahiptir. Bu özellik enzimin pH 9.0'dan sonraki değerlerde çok daha başarılı reaksiyon gerçekleştirdiğini göstermektedir. Enzim bu özelliği nedeni ile diğer keratinaz enziminiz *Bacillus licheniformis* C11 den farklı olup ekstrem alkali özelliğe sahiptir. Elde edilen bulgular şekil 4.32'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.32. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı

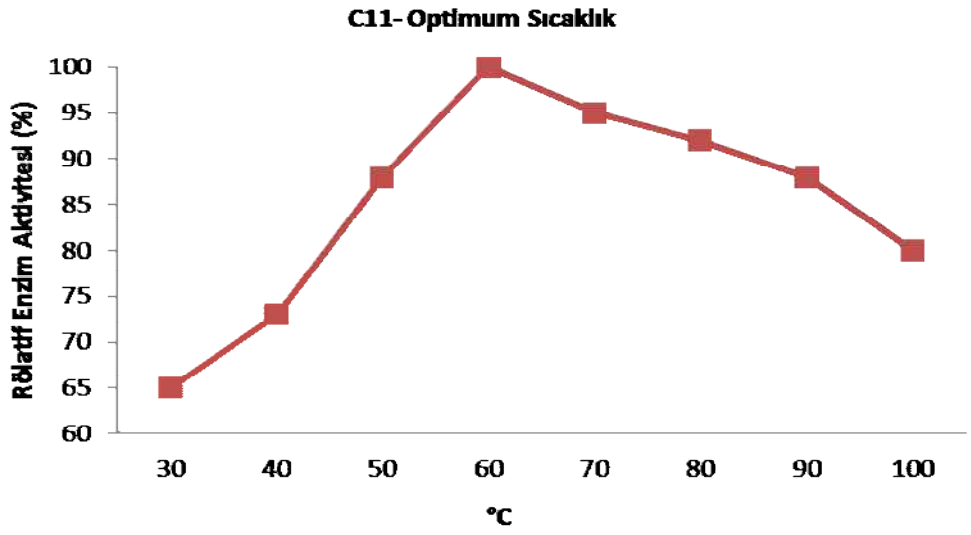
Syed ve ark (2009), *Streptomyces gulbargensis* suşundan termofil alkalin proteaz saflastırmıstır. Bu enzim için optimum pH'sının 9.0 olarak saptamışlardır. Tatineni ve ark. (2008), kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. türünün üretmiş olduğu keratinaz enziminin pH 11.0'de optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bressollier ve ark (1999), *Streptomyces albidoflavus* suşundan üretmiş oldukları termofil serin keratinazın pH 6.0-9.5 arasında optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Böckle ve ark (1995), *Streptomyces pactum* suşundan üretmiş oldukları termofil serin keratinazın pH 7.0-10.0 arasında optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Chitte ve ark (1999), Streptomyces thermoviolaceus suşundan üretmiş oldukları termofil keratinazın pH 8.5'da optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Literatür örnekleri (özellikle *Streptomyces*) ile izolasyonu ve karakterizasyonu karşılaştırılan keratinaz enzimimiz, optimum aktivitesinin pH 11.0 olması ile farklılık göstermektedir.

4.6.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular

Optimum aktivitenin gözlendiği sıcaklık değerinin saptanması amacı ile 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ºC'lik sıcaklık değerlerinde 60 dk inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart enzim aktivitesi analizi yapılarak enzimin en fazla reaksiyon ürünü oluşturduğu sıcaklık saptanmıştır. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enzimi ile yapılan optimum aktivite çalışmalarında 30 ºC 'de %66, 40 ºC'de %73, 50 ºC'de %88, 60 ºC'de 100, 70 ºC'de %96, 80 ºC'de %92, 90 ºC'de %88 ve 100 ºC'de %82 düzeyinde aktivite değeri elde edilmiştir.

Bacillus licheniformis C11 suşundan izole edilen alkaline keratinaz enzimi optimum aktivitesini 60 ºC'de göstermekle birlikte 30-40 ºC aralığında ortalama %69.25, 70-100 ºC aralığında ise %87 relatif aktivite göstermiştir. Bütün sıcaklık değerleri birlikte değerlendirildiği zaman enzim aktivitesi ortalama %85.6 olarak bulunmuştur. Elde edilen enzim termofil karaktere sahiptir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.33'te gösterilmiştir.



Şekil 4.33. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı

Kazan ve ark (2008), *Bacillus clausii* GMBAE 42 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum sıcaklığının 60°C, 5 mM $CaCl_2$ ilavesi ile optimum sıcaklıgın 70°C'ye çıktıgını belirtmişlerdir. Fujiwara (1993), termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. B18 susundan, termofil alkalin proteaz saflastırmıstır. Bu enzimin kazein hidrolizi için optimum sıcaklıgının ise 85°C olduğunu saptamışlardır. Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 susundan, termofil alkalin keratinaz saflastırmıstır. Bu enzimin keratin hidrolizi için optimum sıcaklıgının ise 60°C olduğunu saptamışlardır. Johnvesly ve Naik (2001), *Bacillus* sp. JB99 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum sıcaklıgının 70°C olduğunu belirtmişlerdir.

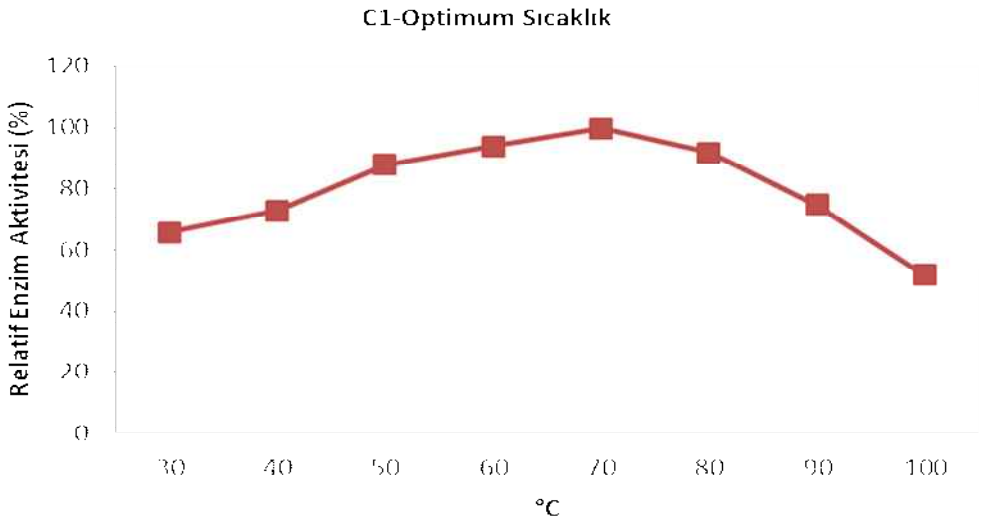
Gosh ve ark (2008), *Bacillus cereus* DCUW suşundan izole ettikleri alkalin keratinazın optimum sıcaklığını 50°C olduğunu saptamışlardır. Yoshioka ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* MSK103'ten izole ettikleri alkalin keratinazın optimum sıcaklığını 60-70°C aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Mieko ve ark (2006), termofilik ve alkalifilik *Bacillus pseudofirmus* susundan, termofil alkalin keratinaz saflastırmıstır. Bu enzimin kazein hidrolizi için optimum sıcaklıgının ise 60°C olduğunu saptamışlardır. Fakhfakh ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* R Pk suşundan izole ettikleri serin proteaz olduğu belirledikleri keratinazın optimum sıcaklığını 60 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada izole edilen *Bacillus* licheniformis C11 suşundan üretilen alkalin keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri literatür verileriyle tam bir uyum içerisinde olup, termofil özelliğe sahiptir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının saptanması çalışmalarında 30 ºC 'de %66, 40 ºC'de %73, 50 ºC'de %88, 60 ºC'de 94, 70 ºC'de %100, 80 ºC'de %92, 90 ºC'de %75 ve 100 ºC'de %52 düzeyinde aktivite değeri elde edilmiştir. *Streptomyces fradiae* C1 suşundan elde edilen enzimin optimum sıcaklığının 70 ºC olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular şekil 4.34'te gösterilmiştir.

Syed ve ark. (2009), *Streptomyces* sp. suşundan izole ettikleri keratinaz enziminin optimum sıcaklıgının 60°C olduğunu belirtmişlerdir. Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. türünün üretmiş olduğu keratinaz enziminin 45 °C'de optimal

aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bressolier ve ark (1999), *Streptomyces albidoflavus'* tan üretmiş oldukları alkalin serin keratinazın optimum aktivitesini 40-70 °C olduğunu bildirmişlerdir. Böckle ve ark (1995), *Streptomyces pactum'* tan üretmiş oldukları alkalin serin keratinazın optimum aktivitesini 40-75 °C olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.34. *Bacillus licheniformis* C1 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı

Chitte ve ark (1999), *Streptomyces thermoviolaceus* tan üretmiş oldukları alkalin keratinazın optimum aktivitesini 55 °C olduğunu bildirmişlerdir. Letourneau ve ark (1998), *Streptomyces* sp. $S.K_{1-02}$ suşundan üretmiş oldukları alkalin keratinazın optimum aktivitesini 70 °C olduğunu bildirmişlerdir.

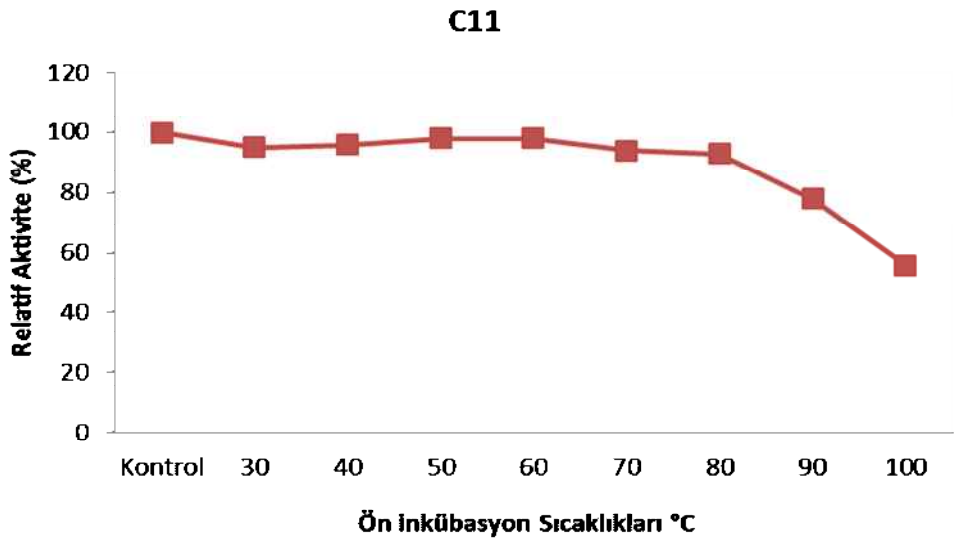
Çalışmada izole edilen *Streptomyces fradiae* C1 suşundan üretilen alkalin keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri literatür verilerinden daha yüksek (70°C) değere sahiptir. Enzim ekstrem alkali termofil özelliktedir.

4.6.3. Enzimin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar

Bacillus licheniformis C11 ve *Sterptomyces fradiae* C1 suşlarından üretilen alkaline, termofil keratinaz enzimine 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde 60 dk süreyle ön inkübasyon işlemi uygulanmış ve standart

enzim aktivitesi analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011).

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enzimi ile yapılan sıcaklık stabilite çalışmalarında orijinal aktivitenin 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ºC de sırası ile %95, %96, %98, %98, %94, %93, %78, ve %56 oranında korunduğu saptanmıştır. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen sıcaklıklarda 90 ºC dereceye kadar orijinal aktivitesini minumum %93 oranında korurken, 100 ºC'de kalan aktiviteyi değeri %56 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar enzimin termostabil olduğunun göstergesidir. Elde edilen veriler şekil 4.35' de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları

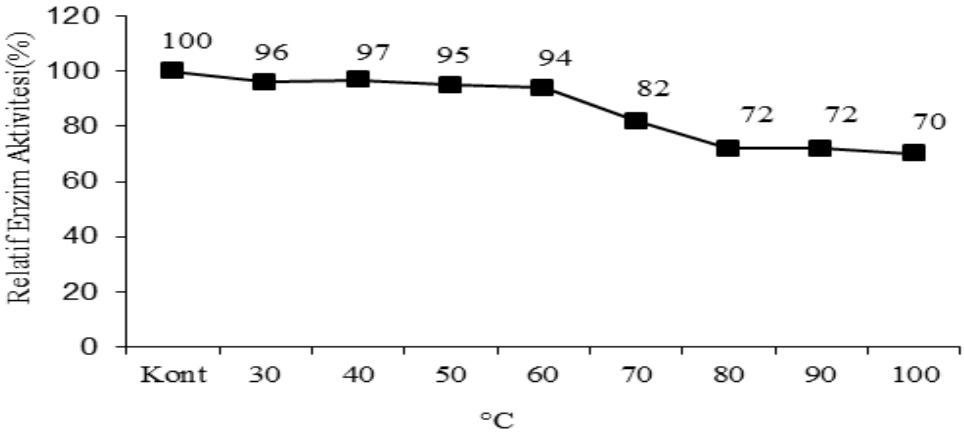
Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp. JB 99' dan izole edilen enzimin 1 saatlik ön inkübasyon sonunda aktivitesini 50 °C'ye kadar koruduğunu daha sonra gittikçe düşerek 80 °C'de tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir.

Ferrero ve ark (1995), *Bacillus licheniformis* MIR29'dan elde ettikleri termofil proteolitik enzimin 30-60 °C'de 10 dakikaya kadar %100 stabil kaldığını bildirmişlerdir. Liu ve ark (2013), *Bacillus licheniformis* suşundan elde ettikleri termofil ekstrem alkalin ve oksidant dirençli keratinaz enziminin 20-80 °C aralığında 30 dakika ön inkübasyonu sonucunda 20-40 °C aralığında

aktivitesini %90'nın üzerinde ve 50 °C'de %80 koruduğunu fakat 60 °C ise aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 enziminin daha yüksek sıcaklıklara kadar (30-90°C aralığında ortalama 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda original aktivitesini ortalama %93 korumuştur) yüksek düzeyde stabilitesini devam ettirmektedir. Literatür verilerin ile karşılaştırıldığında gerek ön inkübasyon için uygulanan sure ve gerekse daha düşük sıcaklıklarda stabilitenin büyük ölçüde kaybolması (stabilitenin genellikle 50°C düzeylerinde büyük ölçüde kaybolmaktadır) *Bacillus licheniformis* C11 alkaline termofil keratinaz enziminin ayrıcalıklı enzim olduğunu ve gerçek anlamda termostabil olduğunu göstermektedir. Bu nedenler ile *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enzimi ekstrem alkali termofil, termostabil özelliktedir.

Streptomyces fradiae C1'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın 30-70ºC arasındaki sıcaklık değerlinde 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %82'nin üzerinde 80-100ºC değerleri arasında ise %70'in üzerinde koruduğu tespit edilmiştir. Bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığı zaman ortalama stabilite%84.75 olarak gerçekleşmitir. Bu sonuçlar enzimin termostabil özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler şekil 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.36. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları

Tatineni ve ark (2008), *Streptomyces* sp. S7 suşundan elde etmiş oldukları alkalin termofil keratinaz enziminin 1 saat farklı sıcaklıklarda ön inkübasyondan sonra 50ºC'ye kadar %80 stabil olduğunu 70ºC ve üzeri sıcaklıklarda ise tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen keratinaz enzimi Tatineni ve ark. (2008) in izolayonunu gerçekleştirdikleri enzimden oldukça performanslıdır. Literatür verilerine göre yüksek düzeyde termostabil özellik göstermektedir.

Letourneau ve ark (1998), *Streptomyces* sp. S.K1-02'dan elde ettikleri keratinaz enzimin 60ºC'ye kadar stabil olduğunu bildirmişlerdir.

.

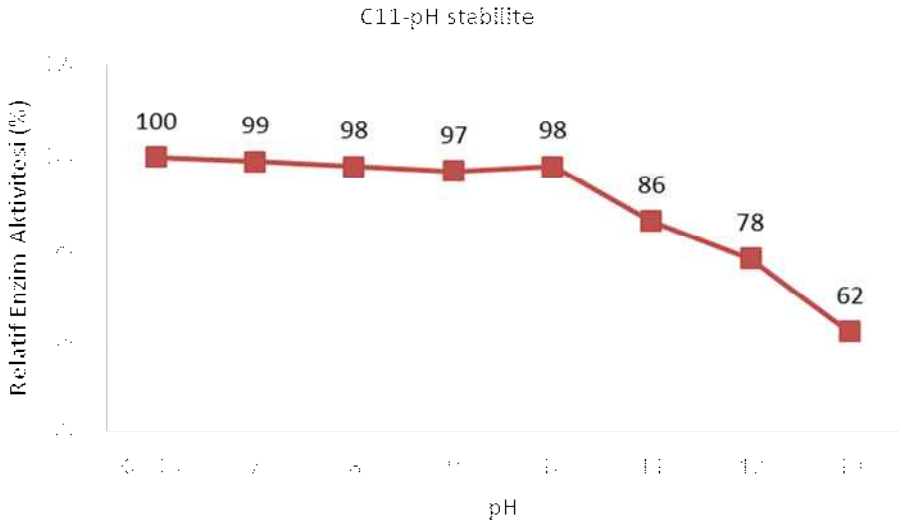
4.6.4. Enzimin pH Stabilitesine Ait Sonuçlar

pH stabilitenin saptanması için, enzim örneğinden 2 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra örnek üzerine aynı miktarda tampon eklenerek (pH'sı 6.0-13.0) enzim süspanse edilip 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif termal stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Suneetha ve ark. 2011; Tamılmanı ve ark., 2008).

Bacillus licheniformis C11'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz enziminin pH 7.0-10.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %98'nin üzerinde, pH 11.0, 12.0 ve 13.0 değerinde ise sırasıyla % 86, 78 ve 62 koruduğu tespit edilmiştir. Veriler şekil 4.37' de gösterilmiştir.

Akan (2012), *Bacillus* sp. HSK suşundan elde ettikleri keratinaz enziminin 30 dakikalık ön inkübasyon sonunda orijinal aktiviteyi pH 11.0 ve 12.0'de, %100 korurken, pH 7.0'de %57, pH 10.0'da %85; pH 13.0'te ise aktivitesini hızlıca kaybettiğini (%38 kalan aktivite) saptanmışlardır. Haile ve ark (2012), Mısırda soda gölünden izole ettikleri alkalifilik *Bacillus* sp. suşundan elde ettikleri proteaz enziminin farklı pH larda oda sıcaklığında 1 saatlik

inkübasyonundan sonra pH 7.5-11.5 aralığında %80 stabil olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.37. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları

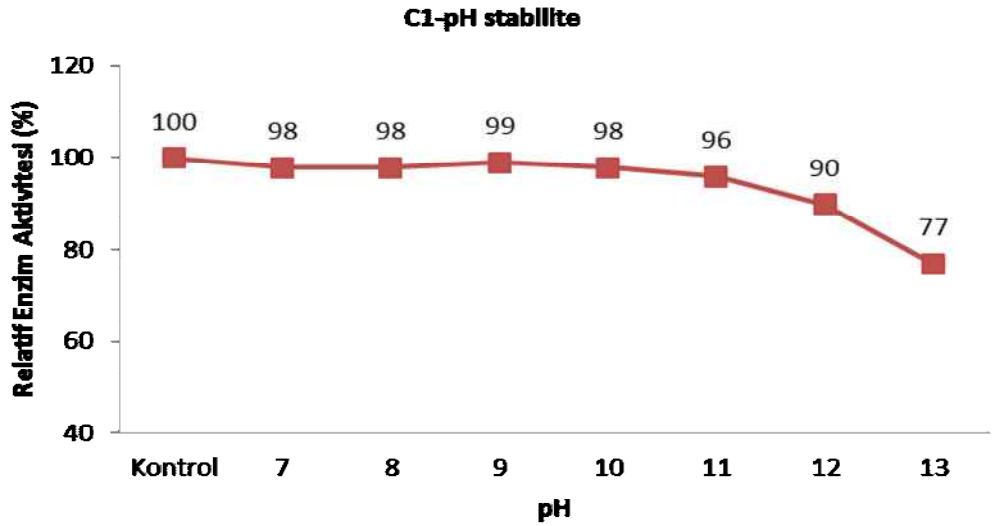
Kaur ve ark. (2001), *Bacillus* sp. P-2'den izole edilen ve pH 9.6'da optimum aktivite gösteren termostabil alkali proteazın, pH 7,0-11.0 aralığında bu aktivitenin %80'den fazlasını koruduğunu saptamışlardır.

Fakhfakh-Zourari ve ark (2010), *Bacillus pumilis* A1 suşundan elde ettikleri keratinaz enziminin 40 °C'de 1 saatlik ön inkübasyondan sonra enzimin pH 6.0-12.0 aralığında %85'ten fazla aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. Nasri ve ark (2006), *Bacillus licheniformis* RP1 suşundan elde ettikleri alkalin proteaz enziminin 40 °C'de 1 saat çeşitli pH aralığında ön inkübasyonundan sonra pH 8.0-10.0 aralığında %100'e yakın stabil iken pH 11.0' %96 ve pH 12.0'de ise %72 aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Literatür araştırmalarında elde edilen bulgularda 11.0 ve 12.0 pH değerlerinde yüksek sıtabilite değerleri bildirilmiş %%100) olmakla birlikte inkübasyon süresini 30 dakika olması, *Bacillus licheniformis* C11 keratinazının 24 saatlik inkübasyon sonunda gösterdiği stabilite karşısında (pH 7.0-12.0 aralığında %92,76) ortaya çıkan etkiyi zayıflatmaktadır. Bu açıdan *Bacillus licheniformis*

C11 24 saat gibi oldukça uzun bir süre yüksek düzeyde stabil kalarak alkaline stabil özellik göstermiştir.

Streptomyces fradiae C1'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın pH 7.0-12.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %96.5, pH 13.0 değerinde ise % 77 koruduğu tespit edilmiştir. Veriler şekil 4.38 de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları

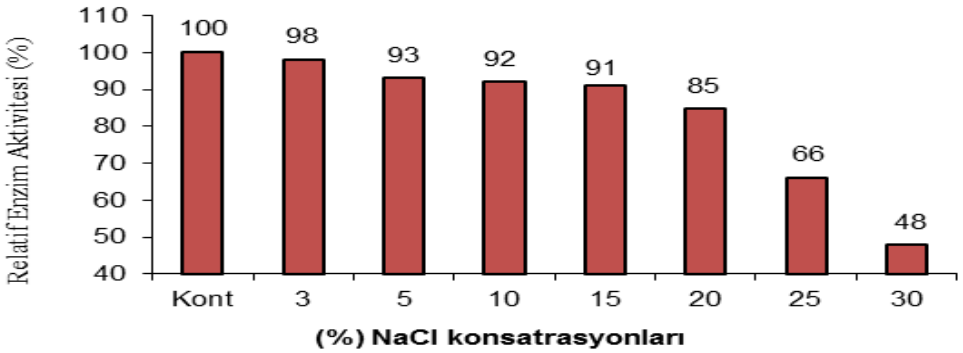
Tatineni ve ark (2008), *Streptomyces* sp. S7 suşundan ürettikleri alkalin keratinazın pH 7.0-9.0'arasında stabilitesinin %65'e, pH 5.0-7.0 aralığında %50 düştüğünü fakat pH 9.0-12.0 aralığında ise %80nın üzerinde stabil olduğunu bildirmişlerdir. Sreenivasa ve Vidyasagar (2013), *Streptomyces albus* suşundan ürettikleri alkalin keratinazı 40 C'de 1 saat süreyle pH 4.0-11.0 değerlerinde ön inkübasyonu sonrasında pH 4.0'te %80, pH 5.0 %75, pH 6.0'da %40, pH 10.0'da %60 ve pH 11.0'de %80 aktivitesini kaybettiğini buna karşılık pH 7.0-9.0 aralığında ise aktivitesini %80 ve üzerinde koruduğunu bildirmişlerdir.

Literatür verileri farklı zaman sürelerinde dahi *Streptomyces fradiae* C1 suşundan elde edilen keratinaz enziminin gösterdiği pH stabilitesinden oldukça uzaktırlar. İzolasyonu yapılan *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimi yüksek düzeyde pH stabil özelliğe sahiptir.

Gerek *Streptomyces fradiae* C1 ve gerekse *Bacillus licheniformis* C11 suşlarına ait keratinaz enzimleri kendi aralarında aktivite özellikleri açısından farklılıklara sahip olsalarda her ikiside oldukça yüksek düzeyde ve geniş bir pH aralığında 24 saat süreyle oda sıcaklığında stabildirler. Bu özellikleri her iki enziminde özellikle tavuk tüyü başta olmak üzere bütün keratinli yapıların hidrolizinde öncelikle kullanılabilecek özellikte olduklarını göstermektedir.

4.6.5. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Çeşitli NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin saptanması amacıyla enzim örneğinden 2 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra çöken enzim aynı miktarda çeşitli NaCl konsantrasyonları içeren çözelti (%3-30) ile süspanse edilmiş ve 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki kalan aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Xu ve ark., 2011; Essghaier ve ark., 2009; Arıkan, 2008).



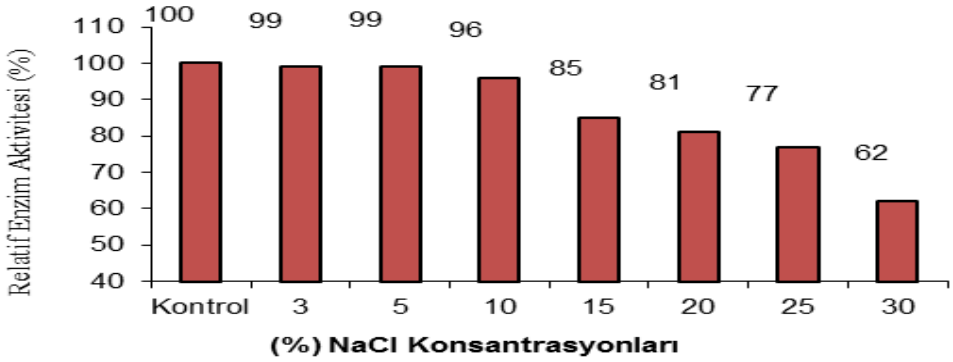
Şekil 4.39. C11 Keratinaz'ın çeşitli NaCl konsantrasyonlarında stabilite analiz sonucu

Bacillus licheniformis C11 suşundan elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz enziminin %3-%30 NaCl konsatrasyonlarında 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini sırasıyla % 98, 93, 92, 91, 85, 66, 48 koruduğu tespit

edilmiştir (Şekil 4.39). %3-20 NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ortalama %93.5 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar enzimin halofilik özellikte olduğunu göstermektedir.

Korkmaz ve Dinçer (2004), *Bacillus licheniformis* HK-1 suşundan elde ettikleri alkalin keratinaz enzimini NaCl'ün iki farklı konsantrasyonunda (50 Mm ve 1.0 M) oda sıcaklığında 15 dk öninkübasyon sonunda enzimin her iki konsantrasyondada aktivitesini %85 koruduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın %3, 5, 10, 15, 20, 25 ve %30 NaCl konsatrasyonlarında 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini sırasıyla % 99, 99, 96, 85, 81, 77, 62 koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.40). Enzimin %3-10 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama %98, %15-25 NaCl konsantrasyonlarında ortalama %81, %3-25 NaCl aralığında ortalama %89.5 kalan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.40. C1 Keratinaz'ın çeşitli NaCl konsantrasyonlarında stabilite analiz sonucu

Shah ve ark (2010), *Bacillus cereus* suşundan elde ettikleri deterjan ve okside edici ajanlara dirençli proteazın çeşitli NaCl konsantrasyonlarında (1-7 M) kontrole göre yaklaşık %60 aktivitenin düştüğünü bildirmişlerdir.

Nedra ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* NH1 suşundan elde ettikleri enzimin 0.1, 1 ve 2 M NaCl ile muamele ettiklerinde enzimin 0.1 M NaCl' de aktivitesini neredeyse %100, 1 M NaCl ise aktivitesinin %94'ünü koruduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 suşuna ait keratinaz enzimi yaklaşık 3M NaCL konsantrasyonunda 60 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesini ortalama %91 korumuştur. *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait keratinaz enzimi genel olarak daha yüksek NaCl değerlerinde *Streptomyces fradiae* suşunun keratinaz enziminden daha kararlı bir davranış göstermiştir. Her iki organizmaya ait enzimlerin alkaline, pH stabil ve halofilik karakterde olmaları öncelikli olarak deri işletmeleri için ideal enzim özelliğine sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

4.6.6. Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkisi

Stok enzim çözeltisi santrifüjle (11.000 dev/dk) 5 dakika çöktürüldükten sonra uygun konsantrasyonda metal iyonları, deterjanlar, şelatör, inhibitör ve okside edici ajanlarla ile süspanse edilerek 60 dakika enzimin üretildiği sıcaklıkta (55 ve 60ºC) ön inkübasyon yapılmıştır. Ön İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin metal iyonları, deterjanlar, şelatör, inhibitör ve okside edici ajanlara karşı stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Caf ve ark., 2013; Shah ve ark.; 2010).



Şekil 4.41. Çeşitli inhibitörlerin C1 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi

Streptomyces fradiae C1 Keratinaz enziminin 5mM $CaCl_2$ varlığında aktivitesini kontrole göre %56 arttırmıştır. Bu sonuç enzim aktivitesinin Ca^{+2} ile indüklenebilir olduğunu göstermektedir. PMSF ile yapılan çalışmalarda %0.1 PMSF bulunan ortamda kontrole göre aktivitenin %54, 1 M EDTA bulunan ortamda %42 oranında düştüğü saptanmıştır. Her iki sonuç enzimin serin metallo-proteaz olduğunun göstergesidir. Tatineni ve ark. (2008)'nın bildirdiği gibi doğada *Streptomyces* sp. tarafından üretilen ve serin metallo proteaz özelliğine sahip olan keratinolitik enzimlerin olağan üstü bir özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda analiz edilen iki enzimden biri olan *Streptomyces fradiae* C1 Keratinaz enzimi pH optimumunun 11, optimum sıcaklığının 70°C, termal stabilite ve pH stabilitesinin 24 saatlik uygulama sonunda (pH 7.0-12.0 aralığında %92,76) olması gibi bir çok özellik bakımından literatür verilerinden oldukça performanslıdır. Bu da enzimi literatüredekilere göre ön plana çıkarmaktadır.

Fakhfakh-Zouari ve ark. (2009), *Bacillus pumilus* A1 suşunun 5 mM $CaCl_2$ varlığında enzimin stabilitesinin arttığını, 50 °C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesini % 100 oranında korurken 60 °C'de ise enzimin aktivitesini % 89.3 oranında koruduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık enzimin aktivitesinin PMSF tarafından tamamen, EDTA tarafından ise yüksek oranda inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Jaouadi ve ark. (2010), *Streptomyces* sp. AB1 elde ettileri alkalin proteaz enzimin PMSF ile tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enzimi deterjan ve yüzey temizleyicileri ile 1 saat ön inkübasyonu gerçekleştirildiğinde %0.1 Triton X-100 ile %95, 10 mM SDS ile %72, %0.1 Tween 20 ile %92 ve %0.1 Tween 80 ile %89 stabil olduğunu göstermiştir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enziminin deterjan ve yüzey aktif bileşikler varlığında enzimin stabil olmasının, keratinazın keratin hidrolizi gerektiren biyoteknolojik işlemlerde, deterjan ve deri endüstrisinde son derece kullanışlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca deri ve deterjan endüstrilerinde kullanılan ticari proteaz enzimlerinin opimum pH aralıklarının pH 8.0-11.0

aralığında olması ve *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimini dahada ön plana çıkarmaktadır.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enzimi çeşitli metal iyonlarının 5mM $MgSO_4$, $CuSO_4$, $MnCl_2$ ve $ZnCl_2$ varlığında sırasıyla 98, 65, 85 ve 47 aktivite göstermiştir.

Zhang et al (2003) *Bacillus pumilis*'e ait hücre dışı alkalen proteazının aktivitesini 10mM Ca^{2+}'nın yaklaşık %20 oranında artırdığını, 10mM Mg^{2+}'nın aktiviteyi %15 oranında artırdığını, Cu^{2+} ve Zn^{2+}'nın ise %15-20 oranında azalttığını açıklamıştır.

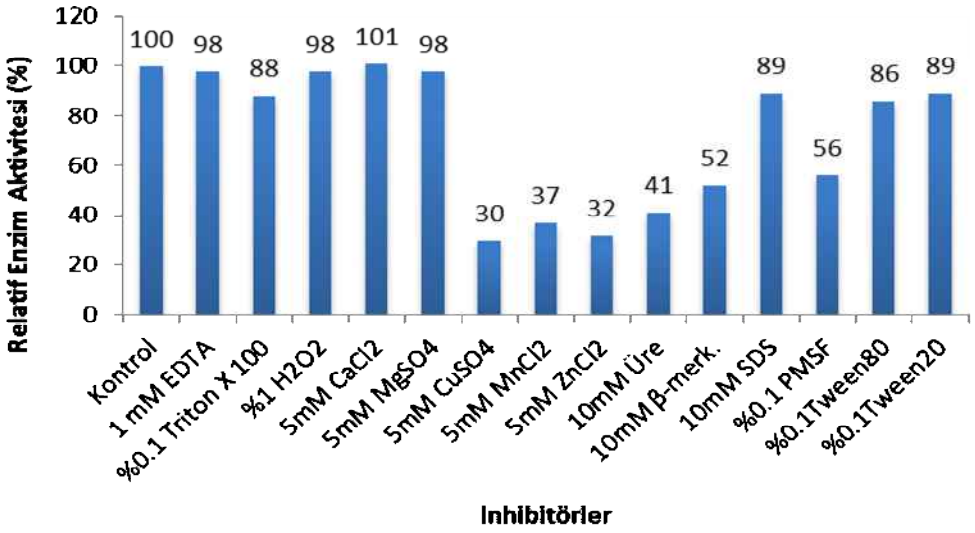
Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp JB 99 suşundan elde ettikleri keratinazın PMSF tarafından inhibe edildiği, Ca^{+2} tarafından enzim üretiminin stimüle edildiğini, fakat Hg^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarının aktiviteyi azalttıkları tespit edilmiştir. Lin ve Yin (2010), *Bacillus licheniformis* YJ4 suşundan elde ettikleri keratinazın EDTA tarafından orta derecede, Zn^{2+} tarafından ise yüksek derecede inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. suşundan üretilmiş serin metaloproteaz özelliği gösteren keratinaz enziminin aktivitesinin Ca^{+2} iyonu varlığında önemli derecede arttığını, PMSF ve EDTA varlığında ise bu aktivitenin inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin aktivitesi 5mM $CaCl_2$ ve EDTA varlığında etkilenmezken (sırası ile %101 ve 98), %0.1 konsatrasyonda PMSF ile muamele edildiğinde kontrole göre aktivitesinin % 46 oranında düşmesi serin proteaz olduğunun göstergesidir.

Ferrero et al (1996) *Bacillus licheniformis* MIR 29'dan elde edilen termostabil alkalen proteazın 2.5mM PMSF ile %60 oranında inhibe olduğunu, EDTA'nın ise aktiviteyi değiştirmediğini bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin divalent katyonik metal iyonlarından Ca^{+2} ve Mg^{+2} varlığında aktivitesi değişmezken (sırası ile %101 ve 98) Zn^{+2} ve Mn^{+2} varlığında ise sırasıyla %68 ve %63 oranında aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.42. Çeşitli inhibitörlerin *Bacillus licheniformis* C11 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enzimi deterjan ve yüzey temizleyicileri ile 1 saat ön inkübasyonu gerçekleştirildiğinde %0.1 Triton X-100 ile %88, 10mM SDS ile %89, %0.1 Tween 20 ile %89 ve %0.1 Tween 80 ile %86 stabil olduğunu göstermiştir. Bulgulara göre *Bacillus licheniformis C11* keratinaz enzimi iyonik olamayan deterjan (%0.1 Triton X-100) ile anyonik deterjan olan 10 mM SDS ile 60 dakika muamele edildiğinde yüksek düzeyde stabil olduğu bulunmuştur. Enzim bu özellikleri dikkate alındığında yeni deterjan formülasyonları için uygun özelliktedir.

Gupta ve ark (1999) *Bacillus* sp.'den elde edilen ağartıcılara karşı stabil alkalen proteaz aktivitesinin iyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20 ve Tween 80 ile %20-50 artarken, SDS gibi kuvvetli anyonik deterjan ile %20-40 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Chang et al (2003) *Bacillus clausii* I-52'ye ait oksidant ve SDS stabil alkalen proteazın, %1 SDS ile muamele edilince aktivitesinin değişmediğini, %5 SDS ile muamele edilince aktivitesini %78 oranında koruduğunu yayınlamışlardır.

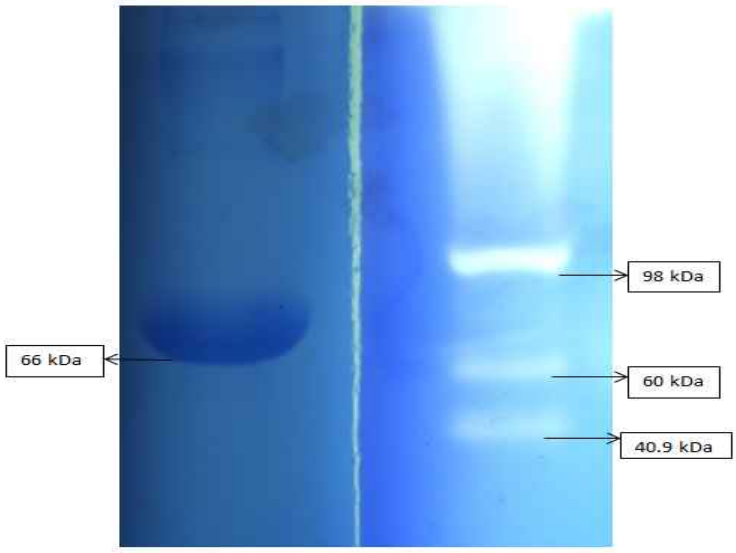
Bacillus licheniformis C11 keratinaz'ın % 1 H_2O_2 ile muamele edildiğinde aktivitesinin değişmediği ve yaklaşık % 100 stabil kaldığı görülmektedir. *Bacillus licheniformis C11* keratinaz'ın %1 H_2O_2 ile 1saat muamele edildikten sonra aktivitesinin stabil kalması enzimimizin oksidant stabil olduğunu göstermiştir.

Sarnaik ve ark. (2006), H_2O_2 gibi okside edici ajanlara karşı alkalen proteazların stabil olması bu enzimlerin ağartıcı içerikli deterjan formüller için uygun olduğu bildirilmiştir. *Bacillus licheniformis* C11 alkaline termostabil, pH stabil ve termofil serin keratinaz enzimi deterjan başta olmak üzere ağartıcı işlemlerinin uygulandığı endüstri alanları için özellikle uygundur.

4.6.7. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar

Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces fradiae* C1 α-keratinaz enziminin SDS-PAGE ve Zimogram analizi %0,1 skim-milk içeren %12'lik SDS-PAGE sistemi kullanılarak zimogram analizi gerçekleştirilmiştir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlıkları sırasıyla 98, 60 ve 40.9 kDa olan 3 farklı aktivite bandı elde edilmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. *Bacillus licheniformis* C11 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları.

Saibabu ve ark (2013), *Bacillus megaterium* suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 41 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Gosh ve ark (2008), *Bacillus cereus*

DCUW suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 80 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 35 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yoshioka ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* MSK103' suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 26 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Lin ver ark. (1992), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 33 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

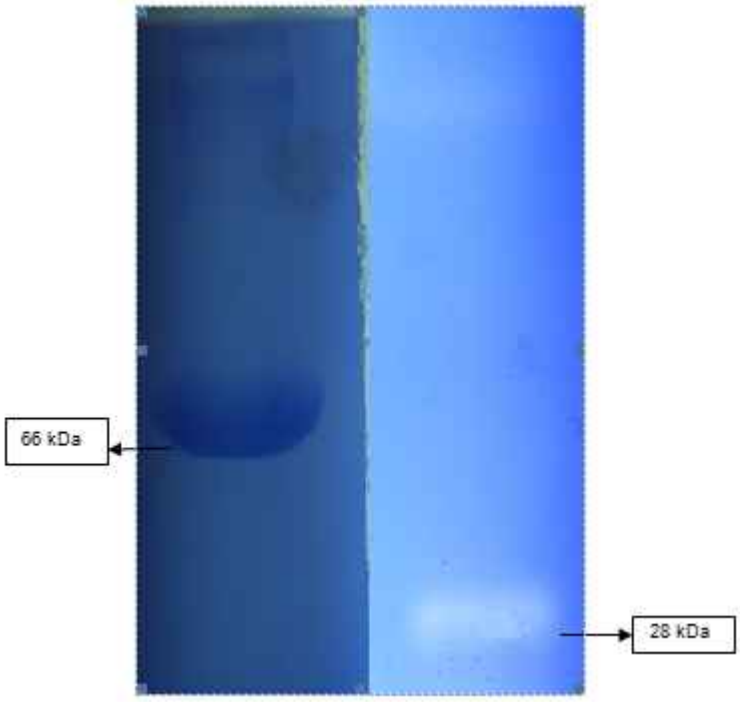
Prakash ve ark (2010), *Bacillus halodurans* PPKS-2 suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 30 ve 66 kDa ağırlığında olmak üzere iki adet aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tamilmani ve ark. (2008), *Bacillus licheniformis* ürettiği keratinazın karekterizasyonunu yapmışlardır. Tuzla çöktürme, diyaliz ve kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığının 35 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir. Fakhfakh-Zouari ve ark. (2009), *Bacillus pumilus* A1 suşundan izole edilen keratinaz enziminin (KerA1) 34 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir.

Buna göre *Bacillus* licheniformis C11 keratinaz enziminin SDS-PAGE ortamında 98 kDa ağırlığa sahip aktivite bandının 60 ve 40,9 kDa ağırlığındaki bandlara göre çok daha fazla aktifliğe sahip olduğu saptanmıştır. Asıl aktivitenin 98 kDa bandına ait diğer iki aktivite bandının ise izozim olduğu düşünülmektedir. Enzimin yürüme hattı boyunca aktivitesini göstermesi, enzimin SDS ye direncinin bir göstergesidir.

Streptomyces fradiae C1 α-keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 28 kDa olan tek bir aktivite bandı elde edilmiştir (Şekil 4.44).

Bressolier ve ark (1999), Streptomyces albidoflavus suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 18 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yadav ve ark (2011), *Streptomyces sclerotialus* suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 46 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tatineni ve ark (2008), *Streptomyces* sp. S7 suşundan ürettikleri Serin keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 44 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kitadokoro ve ark (1994), *Streptomyces fradiae* ATCC 14544 S7 suşundan ürettikleri serin proteinase enziminin zimogram analizi sonunda 19 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu saptmılardır.

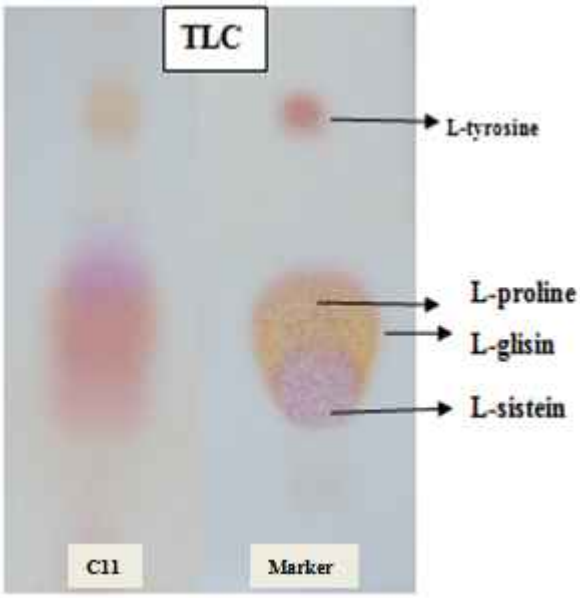


Şekil 4.44. *Streptomyces fradiae* C1 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları.

Çalışmamızda karakterizasyonu gerçekleştirilen *Streptomyces fradiae* C1 serin metallo keratinaz enzimi *Bacillus licheniformis* C11 serin keratinaz enziminden diger özelliklerinin yanı sıra tek aktivite bandı elde edilmesi ile de farklı olduğu ortaya konulmuştur.

4.6.8. Enzimin İnce Tabaka Kromatografisine (TLC) Ait Sonuçlar

Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile reaksiyon ürünlerinin saptanması işlemi yapılmıştır. Sabit faz olarak TLC Silica Gel 60 F_{254} plakalar, hareketli faz olarakta; Butanol: Asetikasit: distile su (4:1:1) kullanılmıştır.Yürütme işleminin ardından asetonda çözülmüş %0,25 Ninhidrin püskürtülerek 110 °C de 30-45 dk inkübasyon yapılarak son ürün görünür hale getirilmiştir. *Bacillus licheniformis* C11 serin keratinaz enzimi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuk tüyünün çok büyük oranda prolin, glicine, sistein, tirosine başta olmak üzere birçok diğer aminoasitlere de hidroliz edildiği saptanmıştır. Elde edilen sonuç, şekil 4.45 de gösterilmiştir.



Şekil 4.45. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması

Lakshmi ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* BF11 ve *Bacillus cereus* BF21 suşundan elde ettikleri enzimle tüy keratinin muamele ettiklerinde sistein, sistine, methionine ve toplam serbest amino asitlere parçalandığını tespit etmişlerdir.

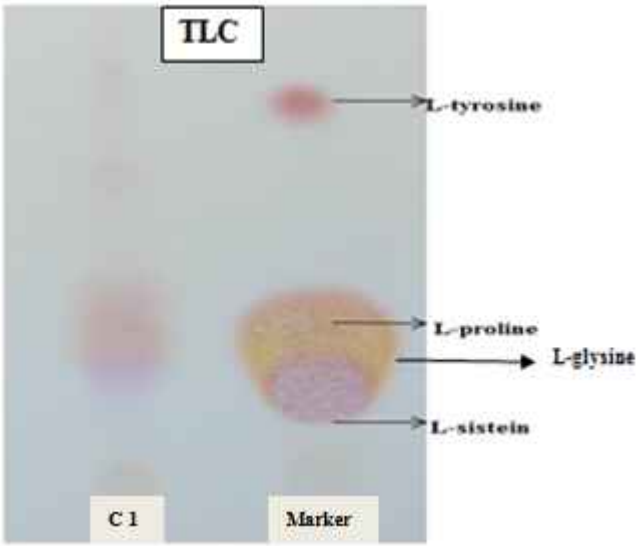
Kumar ve ark. (2011), *Bacillus altitudinis* GVC11 suşundan elde ettikleri keratinaz ile tüy keratinini 24 saat optimum koşullarda muamele ettiklerinde

hidroliz ürünü olarak tirosin, hidroksiprolin, glisin, aminoadipik asit, fenilalanin gibi yüksek oranda olmak üzere lösin, izolösin, valin gibi birçok aminoasit gibi oluştuğunu saptamışlardır.

Haddar ve ark (2009), Keratin içeren materyalin değerlendirilmesiyle elde edilecek olan aminoasitler çeşitli yeni endüstrilerde kullanılabilecek önemli ürünlerden biridir.

İzolasyonu ve karekterizasyonu gerçekleştirilen *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enziminden elde edilen hidroliz ürünleri literatür bulguları ile büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enzimi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuktüyünün çok büyük oranda glisin ve tirosine, az miktarda sistein ve prolin olmak üzere birçok diğer serbest aminoasitlere de hidroliz edildiği saptanmıştır. Elde edilen sonuç, şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.46. *Streptomyces fradiae* C1 enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması

Sangali ve ark (2000), *Vibrio* sp. suşundan elde ettikleri keratinaz ile tüy keratinini optimum koşullarda muamele ettiklerinde zengin miktarda serin, tirosin, lösin, alanin, glutamin ve az miktarda histidin ve metiyonin gibi hidroliz ürünü oluştuğunu saptamışlardır.

Wei ve ark. (2012), *Bacillus cereus* Wu2 suşundan elde ettikleri keratinaz ile tüy keratinini optimum koşullarda muamele ettiklerinde lizin, metionin ve treonin gibi hidroliz ürünü oluştuğunu saptamışlardır.

Queiroga ve ark (2012), Fiziko-kimyasal metodlarla keratin yapılardan aminoasitlerin eldesinin pahalı olması yüksek basınç ve sıcaklık ortamlarında metionin, lisin, triptofan, tirosin gibi sıcaklığa hassas bazı aminoasitlerin kaybı nedeniyle enzimatik yolla aminoasit üretimi ön plana çıkmaktadır.

Her iki organizmadan elde edilen keratinolitik enzimin reaksiyon ürünlerinde benzerlik olmakla birlikte TLC ortamında reaksiyon ürünlerinin kantitaif olarak farklılığı olduğu görülmektedir. Ayrıca *Bacillus licheniformis* C11 suşundan elde edilen serin keratinaz enzimi ile prolin daha yüksek düzeyde elde edilirken, Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen keratinaz enzimi ile glisin ve tyrozin amino asitlerinin daha fazla miktarda elde edildiği gözlenmiştir.

Her iki enzimde ham tavuk tüyünün literatürlere göre çok daha kıza zaman diliminde bir çok amino aside hidroliz edilmesi için kullanılabilecek özelliğe sahiptir. Enzimler alkalofilik ve termofilik özellikte olduklarından üretim aşamalarında kontaminasyon riski önemli düzeyde elimine edileceğinden daha sağlıklı bir üretim gerçekleştirilmesi söz konusudur. Tavuk tüyleri özelinde yapılacak hidroliz uygulamaları sonucu elde edilecek kükürtlü amino asitler, gıda ve yem üretimi başta olmak üzere amino asit desteği gerektiren bütün alanlar için ideal çözüm oluşturacaklardır. Böylece bir yandan kirletici olarak görülen (gerçekte %90'lara varan ham protein kaynağıdır) tavuk tüyü atıklarının doğaya yararlı hale getirilmesi sağlanırken, diğer yandan elde edilen ürünlerin yukardaki alanlarda kullanılması ile önemli bir ekonomik girdi sağlanması söz konusu olacaktır.

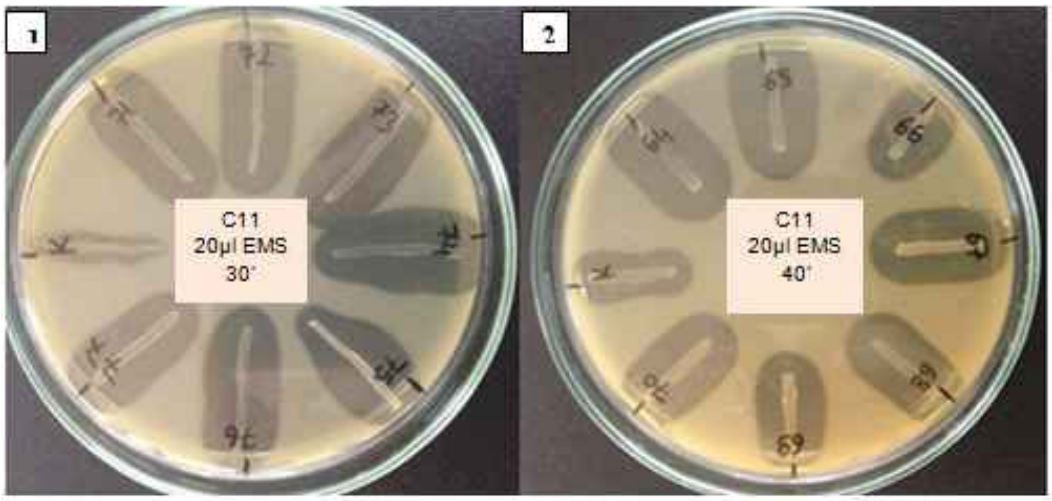
4.7. Rastgele Mutasyon Çalışmaları İle Keratinaz Enziminin Ekspresyon Düzeyinin Artırılması

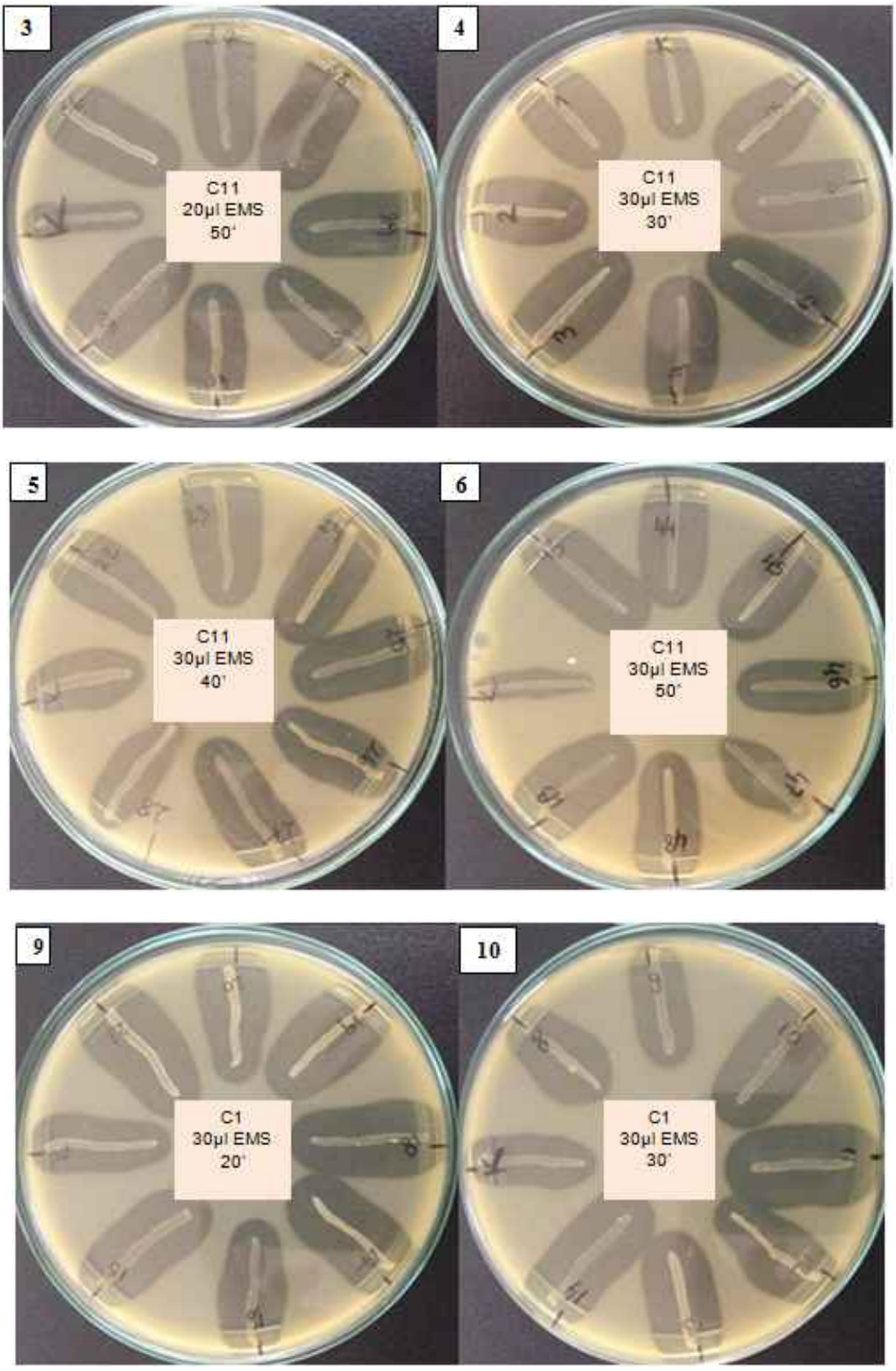
Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces fradiae C1* suşlarının kreatinaz üretimini arttırmak amacıyla EMS (Etil Metan Sülfonat) ve UV ışını kullanılarak bu suşların mutantları elde edilmiş ve ürettikleri keratinaz miktarları

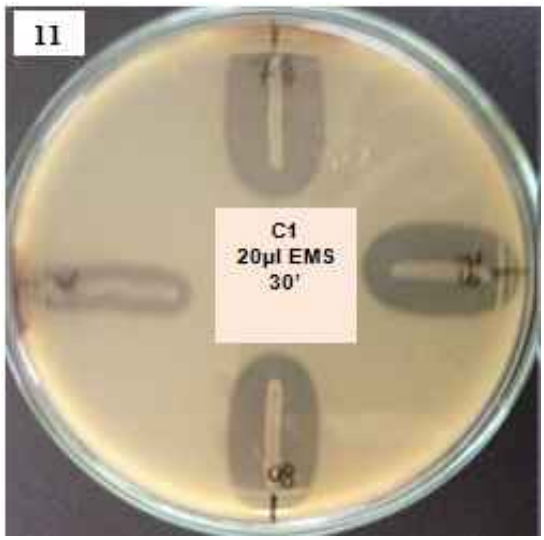
saptanmıştır. En fazla keratinaz üreticisi olduğu belirlenen mutant suşun (Katı besiyerindeki aktivite zon çapının genişliğine göre) keratinaz üretim miktarını arttırmak amacıyla kültür koşulları optimize edilmiş ve enzim üretimi gerçekleştirilerek enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

4.7.1. EMS (Etil Metan Sülfonat) ve UV ışını ile Pozitif Mutant Suşların Elde Edilmesi

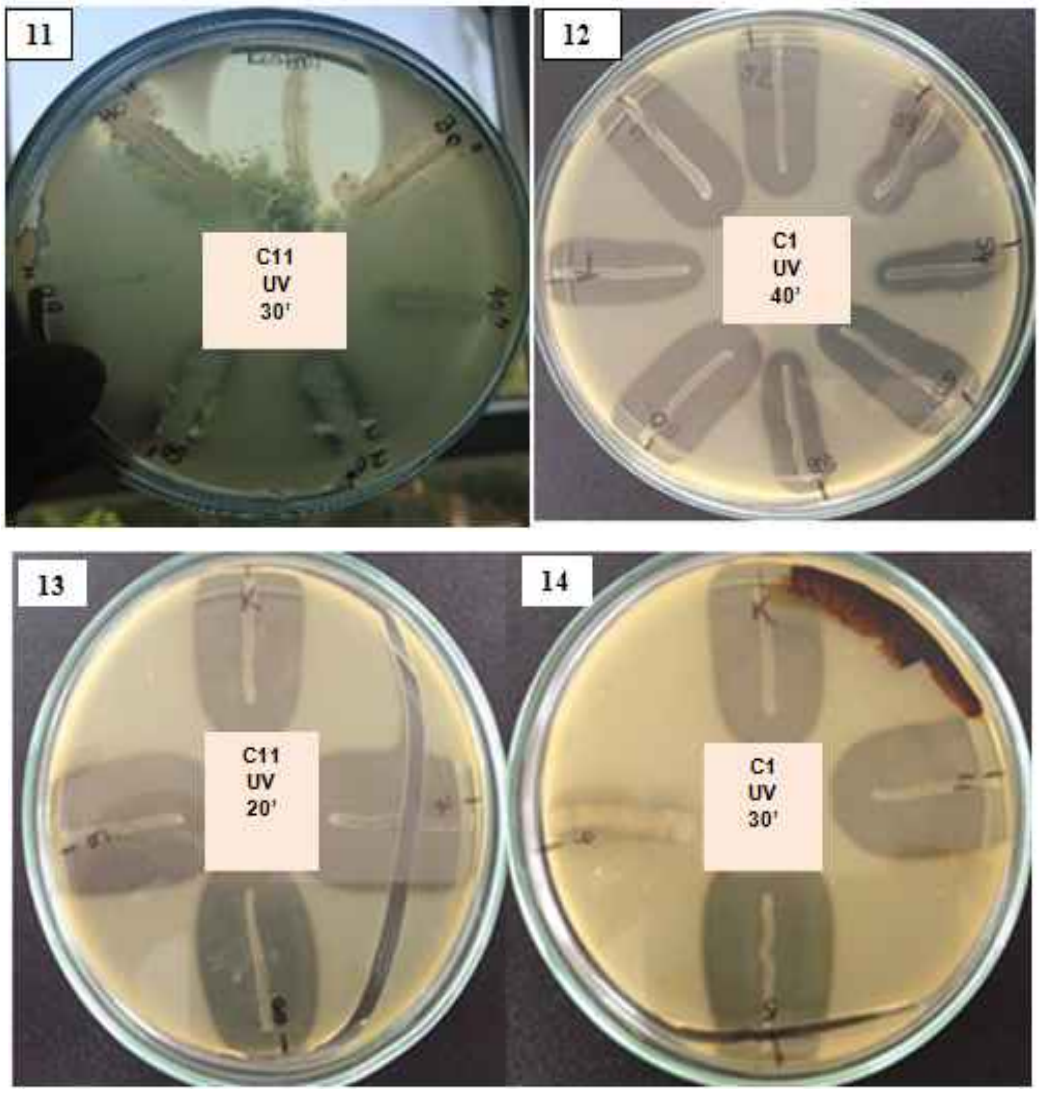
Bacillus licheniformis C11 ve *Streptomyces fradiae C1* suşları EMS (Etil Metan Sülfonat) ve UV ışını kullanılarak bu suşların mutantları elde edilmiştir. Mutasyon işlemi sonunda keratinaz (+) koloniler tavuk tüylü katı besiyerine çizgi şeklinde ekilerek kontrole göre zon çapı değerlendirilerek analiz edilmiştir. Bulgular şekil 4.47. ve şekil 4.48.'de gösterilmiştir.

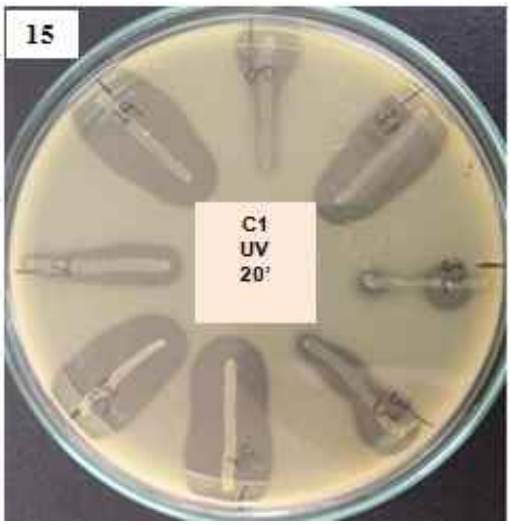



3
C11
20µl EMS
50'
4
C11
30µl EMS
30'
5
C11
30µl EMS
40'
6
C11
30µl EMS
50'
9
C1
30µl EMS
20'
10
C1
30µl EMS
30'



Şekil 4.47. *Streptomyces fradiae* C1 ve *Bacillus licheniformis* C11 suşlarının EMS kullanılarak oluşturulan mutantları





Şekil 4.48. *Streptomyces fradiae* C1 ve *Bacillus licheniformis* C11 suşlarının UV ışını kullanılarak oluşturulan mutantları

4.7.2. Pozitif Mutasyon Geçiren Mutant Suşların Belilenmesi ve Kontrole Göre (Ana Suş) En Yüksek Keratinaz Üreticisi Mutant Suş/Suşların Seçimi

Katı besiyerinde zon çapına göre alkalin keratinaz üreticisi olduğu belirlenen mutant suşlar, kontrol suşlar ile birlikte orijinal suşlara ait optimum koşullarda inkübe edilerek keratinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda tüy paçalanma oranı belirlenmiş ve kısmi saflaştırma yapıldıktan sonra rölatif ve spesifik enzim aktivitesi dikkate alınarak en yüksek keratinaz üreticisi mutant suşun şeçimi yapılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.5. ve 4.6'da gösterilmiştir. *Bacillus licheniformis* C11'in mutajenler ile (UV Işını ve EMS) muamelesi sonucunda oluşturulan mutant suşlar karşılaştırıldığında en yüksek üretimi 30 cm uzaklıkta 254nm'de 20 dakika UV ışınına maruz bırakılarak oluşturulan C11-UV8 mutant suşun gerçekleştirdiği yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Mutant C11-UV8 suşu ortmadaki tavuk tüyünün hemen hemen hepsini hidroliz ederek ana kültüre göre yaklaşık 2 kat daha fazla üretim gerçekleştirdiği görülmektedir. En yüksek enzim üretimi gerçekleştirdiği belirlenen mutant C11-UV8 suşu seçilerek sonraki enzim üretimi ve karakterizasyonu çalışmaları için +4 °C'de stok şeklinde saklanmıştır.

Çizelge 4.5. Mutant *Bacillus licheniformis* C11 suşları

***Bacillus licheniformis* C11**	**Hidrolize olan substrate (g/L)**	**Toplam Protein (mg/ml)**	**Keratinaz aktivitesi (U/ml)**
Kontrol C11 (Ana Suş)	5.06	2.83	520
UV Mutants			
CUV4-11	7.45	4.72	1093
CUV5-11	6.22	3.91	960
C11-UV8	9.95	4.86	1120
CUV9-11	8.95	4.15	985
CUV7-11	8.65	4.06	1085
EMS Mutants			
CEMS1-11	6.65	3.96	805
CEMS3-11	5.26	3.55	796
CEMS5-11	8.12	4.19	1065
CEMS64-11	8.85	4.09	1053
CEMS65-11	5.15	3.25	650
CEMS67-11	6.06	4.01	830
CEMS70-11	7.75	3.90	935

Nadeem ve ark. (2010), çürümüş organik bileşiklerin olduğu toprak örneklerinden *Bacillus licheniformis* N-2 suşunu izole etmişlerdir. İzole ettikleri suşu 11.5 cm yükseklikten 5-120 dk aralığında farklı sürelerde 254 nm dalga boyundaki UV ışını kullanarak, NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguinidine) ve MMS (methyl methane sulfonate) gibi kimyasal mutajenlerle muamele ederek mutasyona uğratmışlardır. UV ile mutasyona uğrattıkları UV-9 suşunun alkalin proteaz aktivitesinin ana suştaki enzim aktivitesinden 1.4 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz mutant suşun (C11-UV8) enzim aktivitesi orijinal suşa göre iki kat daha fazladır. Bu sonuç enzim üreticisi mutant suşumuzun literatür verilerinden çok daha başarılı olduğunu göstermektedir. Araştırıcılar, *B. licheniformis* N-2 suşunun UV ışını ve MMS ile muamelesi ile elde ettikleri mutant suşa ait enzimin NTG ile muamele edilen suştan elde edilen enzime göre daha aktif olduğunu ve sonuçta UV ışınlarının enzimin aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kumari ve Kumar (2014), kümes hayvanlarının olduğu toprak örneklerinden bakteri örnekleri izole ederek, bunları gram boyama ve biyokimyasal (indol, MR, VP, üreaz ve hareketlilik testi) özelliklerine göre tanımlamışlardır. İzole ettikleri *B. cereus* ve *P. aeruginosa* bakterilerini UV ile mutasyona uğratarak bunların keratinaz üretimlerini kıyaslamışlardır. *B. cereus* ve *P. aeruginosa* mutant suşlarının (sırasıyla 112 µg/ml ve 145µg/ml) yabani tip olanlardan daha fazla miktarda (sırasıyla 89 µg/ml ve 136µg/ml) keratinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, UV ışınlarının çevreye zarar vermeden enzim aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir. C11-UV8 mutant suşumuz 1120 U/ml enzim üretirken, yaban tip suşumuz 520 U/ml enzim üretmektedir. Bu sonuçlar literatür verilerinden oldukça yüksektir.

Çizelge 4.6. Mutant *Streptomyces fradiae* C1 suşları

Streptomyces fradiae C1	***Hidrolize olan Substrate (g/L)***	***Toplam Protein (mg/ml)***	***Keratinaz Aktivitesi (U/ml)***
Kontrol C1 (Ana Suş)	5.16	2.83	468
UV Mutants			
CUV1-1	4.45	2.72	420
CUV11-1	3.20	1.75	445
CUV9-1	6.20	4.45	620
CUV7-1	7.70	5.10	780
EMS Mutants			
CEMS2-1	6.65	3.96	805
CEMS3-1	5.26	3.45	565
CEMS35-1	5.45	3.45	510
CEMS72-1	7.50	4.15	720
CEMS78-1	9.65	6.10	1170
C1-EMS80	10.00	8.25	1870
CEMS79-1	8.90	7.10	1735

Streptomyces fradiae C1 suşunun mutajenler ile (UV Işını ve EMS) muamelesi sonucunda oluşturulan mutant suşlar enzim üretimi bakımından karşılaştırıldığında en yüksek üretimi 20 µl (%2) EMS (Etil Metan Sülfonat)'ye 30 dakika maruz bırakılarak oluşturulan mutant C1-EMS80 gerçekleştirdiği yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Mutant C1-EMS80 suşu

ortamdaki tavuk tüyünün %100'ünü hidroliz ederek ana kültüre göre yaklaşık 4 kat daha fazla üretim gerçekleştirdiği görülmektedir (Ana suşta 468 U/ml enzim üretilirken EMS mutant suşunda 1870 U/ml enzim üretimi sağlanmıştır). En yüksek enzim üretimi gerçekleştirdiği belirlenen mutant C1-EMS80 suşu seçilerek sonraki enzim üretimi ve karakterizasyonu çalışmaları için +4 °C'de stok şeklinde saklanmıştır.

Nadeem ve ark. (2010), çürümüş organik bileşiklerin olduğu toprak örneklerinden *Bacillus licheniformis* N-2 suşunu izole etmişlerdir. İzole ettikleri suşu 11.5 cm yükseklikten 5-120 dk aralığında farklı sürelerde 254 nm dalga boyundaki UV ışını kullanarak, NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguinidine) ve MMS (methyl methane sulfonate) gibi kimyasal mutajenlerle muamele ederek mutasyona uğratmışlardır. UV ile mutasyona uğrattıkları UV-9 suşunun alkalin proteaz aktivitesinin ana suştaki enzim aktivitesinden 1.4 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, *B. licheniformis* N-2 suşunun UV ışını ve MMS ile muamelesi ile elde ettikleri mutant suşa ait enzimin NTG ile muamele edilen suştan elde edilen enzime göre daha aktif olduğunu ve sonuçta UV ışınlarının enzimin aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kumari ve Kumar (2014), kümes hayvanlarının olduğu toprak örneklerinden bakteri örnekleri izole ederek, bunları gram boyama ve biyokimyasal (indol, MR, VP, üreaz ve hareketlilik testi) özelliklerine göre tanımlamışlardır. İzole ettikleri *B. cereus* ve *P. aeruginosa* bakterilerini UV ile mutasyona uğratarak bunların keratinaz üretimlerini kıyaslamışlardır. *B. cereus* ve *P. aeruginosa* mutant suşlarının (sırasıyla 112 µg/ml ve 145µg/ml) yabani tip olanlardan daha fazla miktarda (sırasıyla 89 µg/ml ve 136µg/ml) keratinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, UV ışınlarının çevreye zarar vermeden enzim aktivitesini arttırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2011), izolasyonunu, taksonomik tanımlaması ve kültür optimizasyonunu önceden yapmış oldukları alkalin β-keratinaz üreten *Brevibacillus* sp. AS-S10-II suşundan EMS (ethyl methyl sulphonate) ve UV ile mutant suşlar elde etmişlerdir. EMS ile 20 dk'lık inkübasyon sonunda elde edilen mutant EMS-05 suşunun yabani tip *Brevibacillus* sp. AS-S10-II A suşu ile diğer

mutant ve yabani suşa kıyasla alkalin β-keratinaz üretiminde 9 kat daha fazla enzim üretimi gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.

Fleming ve ark. (1995), spoIIAc geninin delesyonu sonucunda organizmada sporulasyonu engelleyerek ekstraselüler proteaz sentez özelliğini kazandıracak delesyonları hazırlamak amacıyla in vivo rekombinasyonun B. *licheniformis'*te kullanılabileceğini göstermiştir. Başka bir çalışmada Shah ve ark. (1986) alkalin proteaz üretimini arttırmak için *B. licheniformis* suşunda UV muamelesi yoluyla sisteine kullanımını artırarak verimliliği yükseltecek fenotipik bir gereklilik oluşturmuşlardır. Bierbaum ve ark. (1994) proteaz üreten *B. licheniformis*'in iki suşunda (strains 4a, 114) klasik UV mutasyonu uygulayarak nisin antibiyotiği ve katabolit represyonuna dirençli suş geliştirmişlerdir.

Lakshami ve ark. (2013), Bacillus subtilis BS11 suşunu izole ettiklerinde 10 KU/ml enzim üretimi gerçekleştiridiğini optimizasyon sonucunda bu üretimin 187-210 KU/ml' ye yükseldiğini daha sonra bu suşu UV ışını ve EMS ile mutant hale getirerek MBF11 şeklinde adlandırmışlardır. Mutasyon sonucu oluşturulan MBF11 suşunun enzim üretiminin ana suşa göre üretiminin arttığını (280 KU/ml) kültür koşullarını optimize ettiklerinde ise üretimin (518 KU/ml) üretimin ana suşa göre 50 kat arttığını bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2013), *Streptomyces lividans* 1326 tarafından üretilen yabani tip keratinazın ekspresyon seviyesini arttırmak için mutasyon çalışmaları yapmışlardır. Elde etmiş oldukları mutantlardan L(-1)F mutantının, yabani tip enzimin sahip olduğu spesifik aktiviteden 9 kat daha fazla bir aktiviteye sahip olduğunu (48935 U/mg) tespit ederlerken, elde etmiş oldukları diğer L(-1)D, L(-1)G, L(-1)H, K(-2)E, ve K(-2)L mutantların enzim aktivitelerinin yabani tip enzimin aktivitesinden % 2-52 kadar daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

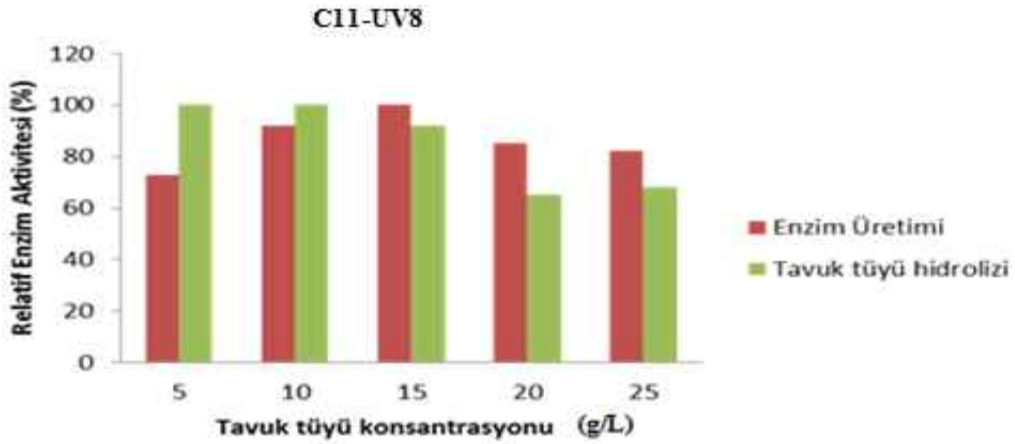
4.7.3. Optimizasyon, Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

4.7.3.1. Optimizasyon Çalışmaları

En fazla keratinaz üreten mutant suşların, olusturdugu karotenoid miktarını artırmak amacıyla farklı inkübasyon süreleri ve farklı tavuktüyü konsantrasyonu içeren kültür koşullarında araştırmalar yaparak mutant suşların en yüksek keratinaz ürettiği kültür koşulları belirlenmiştir.

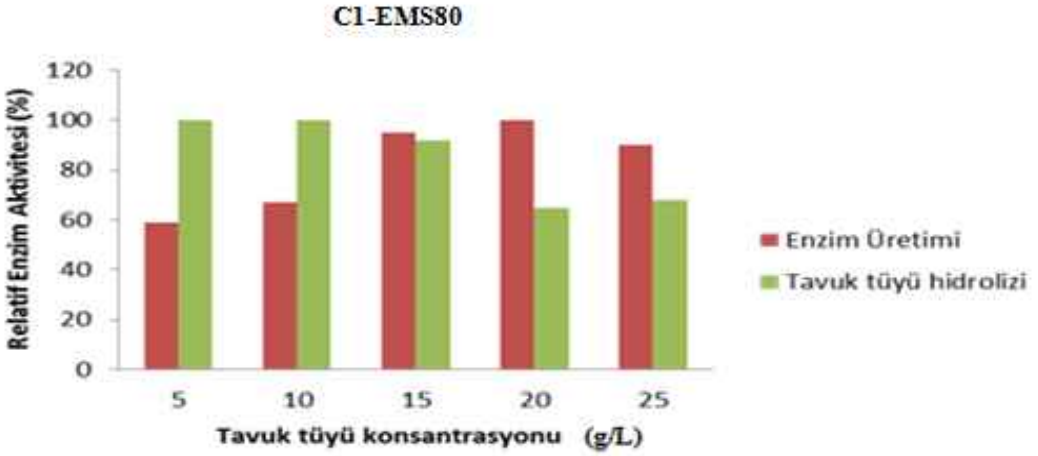
4.7.3.1(1) Substrat (Tavuk tüyü) Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi

Tavuk tüyü konsantrasyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla farklı konsantrasyonda tavuk tüyü içeren temel tüylü besiyerinde üretim yapılarak keratinaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Literatür verileri temel alınarak hazırlanan üretim besiyerinde 10g/L tavuk tüylü ortamda üreyen bakterilerin keratinaz aktiviteleri (kontrol) %100 kabul edilerek, elde edilen diğer bulgular buna göre oranlanıp rölatif enzim aktiviteleri saptanmıştır. Sonuç şekil 4.49.ve 4.50.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Substrat Konsantrasyonunun C11-UV8'in keratinaz üretimine etkisi

C11-UV8 suşunun aktivitesi %1.5 substrat konsantrasyonuna kadar arttığı ve en yüksek aktivitesininde %1.5 (15g/l) substrat konsantrasyonunda yaklaşık 1402 U/ml olarak saptanmışıtr. Bu konsantrasyondan sonra enzim aktivitesinde düşüş olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.50. Substrat Konsantrasyonunun C1-EMS80 suşunun keratinaz üretimine etkisi

C1-EMS80 suşunda alkaline termofil keratinaz üretimininin %2 substrat konsantrasyonuna kadar arttığı ve en yüksek aktivitesininde %2 (20g/l) substrat konsantrasyonunda 1987 U/ml olarak gerçekleştirdiği saptanmışıtr.

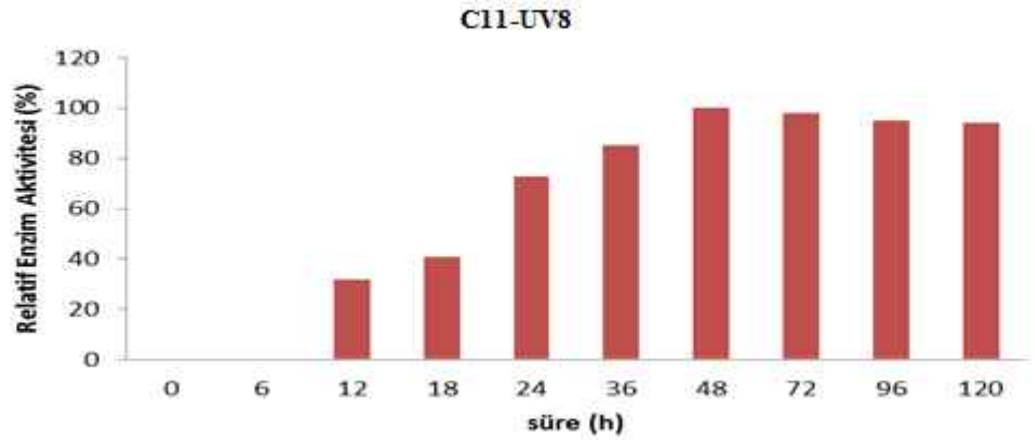
Bierbaum ve ark. (1994) proteaz üreten *B. licheniformis*'in iki suşunda (strains 4a, 114) klasik UV mutasyonu uygulayarak katabolit represyonuna dirençli suş geliştirmişlerdir. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisini araştırıldığı mutant organizma çalışmalarında C1-EMS80 mutantının C11-UV8 mutantından daha başarılı olduğu görülmektedir.

4.7.3.1(2) İnkübasyon Süresinin Keratinaz Üretimi Üzerine Etkisi

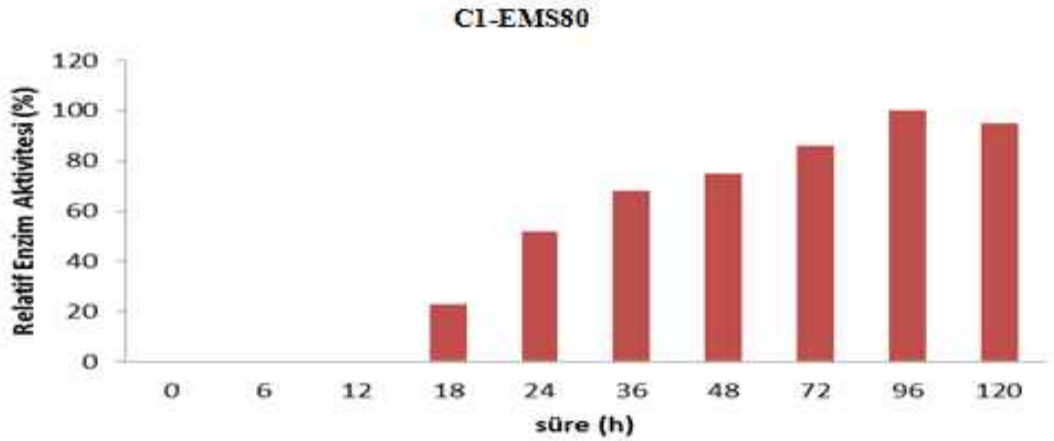
Keratinaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacı ile 0, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96. ve 120. saatlerde örnek alınarak enzim inkübasyon süresinin enzim üretimine etkisi belirlenmiştir. Sonuç şekil 4.51.ve 4.52.'de gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada C11-UV8 suşunun en yüksek keratinaz sentezini üremenin 48'incı saatinde gerçekleştirdiği bulunmuştur. Keratinaz sentezinin başlangıcı ise 12.ci saat olup (yaklaşık %10) 24.cü saatte %50'lere ulaşmış, giderek yükselen bir seyirle 48.ci saatte maksimum seviye elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılmasına bağlı olarak enzim sentezinin çok büyük düşüş

olmamakla birlikte azaldığı saptanmıştır. C11-UV8 suşunun maximum üretim için gereken inkübasyon süresi dikkate alındığında ana suşa göre (optimum koşullarda 96 saatlik inkübasyon sonunda 520 U/ml) 2 kat daha kısa sürede yaklaşık 3 kat daha iyi verim (48 saatte 1405 U/ml) elde edildiği görülmektedir. Bu sonuç UV mutasyonunun enzim üretimini artırıcı yönde pozitif değişikliğe neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.51. İnkübasyon süresinin C11-UV8 keratinaz üretimine etkisi



Şekil 4.52. İnkübasyon süresinin C1-EMS80 keratinaz üretimine etkisi

Yapılan çalışmada C1-EMS80 suşunun en yüksek keratinaz sentezini üremenin 96'inci saatinde gerçekleştirdiği bulunmuştur. Keratinaz sentezinin inkübasyonun 18'inci saatinde (yaklaşık %30) başladığı giderek yükselen bir seyirle 96'ci saatte maksimum seviye ulaştığı, 96. satten sonra kısmende olsa

düşüş gözlendiği belirlenmiştir (yaklaşık %4). C1-EMS80 suşunun maximum üretim için gereken inkübasyon süresi dikkate alındığında ana suşa göre (optimum koşullarda 120 saatlik inkübasyon sonunda 468 U/ml) 24 saat daha kısa sürede ve neredeyse 8 kat daha fazla üretim (96. Saatte 1982 U/ml) elde edildiği görülmektedir.

Cai ve ark. (2008), *Bacillus subtilis* KD-1 suşunu MNNG (N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine) ile mutasyonlar oluşturarak KD-N1 mutant suşunu elde etmişler. KD-N2 mutant suşunun üretmiş olduğu keratinaz aktivitesinin (6.9±0.87 KU/ml) yabani tip suşun üretmiş olduğu keratinaz aktivitesinden (2.43±1.31 KU/ml) yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle C1-EMS80 mutant suşu ile elde edilen üretim artışı literatür verilerinin oldukça yüksektir.

Haq ve ark. (2010), *Bacillus amyloliquefaciens* EMS ile mutant hale getirdiklerinde enzim üretiminde 1.4 kat artış olduğunu ve optimum inkübasyon süresinin 72 saatten 48 saate düştüğünü bildirmişlerdir.

Park ve ark. (2009), Keratinaz üretimin genellikle mikrobiyal gelişmenin geç exponential veya stationar fazda gerçekleştiğini buda 24 saat ile farklı günler sürebileceğini ifade etmiştir.

4.7.3.2. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Suşların Optimum ürediği ve enzim sentezi gerçekleştirdiği koşullarda ve sürede enzim üretimi (Çizelge 4.7 ve 4.8.) gerçekleştirildikten sonra 3.2.3.2' deki verildiği gibi kısmi saflaştırma işlemi yapılarak sonraki karakterizasyon aşamalarında kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız C11-UV8 suşu kullanılarak gerçekleştirilen keratinaz üretimi pH 10.0, 48 saat, $1.6x10^7$ bakteri/ml ve 55°C lik koşullarda %1.5 ham tavuk tüyü kullanılarak sağlanmıştır.

Jeong ve ark. (2010), tavuk fabrikasındaki bir bölgede çürümüş tavuk tüyünden *Bacillus* sp. SH-517 suşunu izole ederek bu bakterinin üretmiş olduğu keratinaz aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar suşun 40 °C ve 180 rpm

çalkalayıcı inkübatörde 40 saat boyunca ürettikleri organizmanın tüyleri parçaladığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7. C11-UV8 için optimum üretim koşulları

Tavuk tüylü besi yeri	g/L	Optimum İnokülasyon Miktarı (Başlangıç OD600)	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Optimum pH
Pepton	0.2	0.2	48	55	10
Maya	0.1				
$MgSO_4*7H_2O$	0.2				
K_2HPO_4	1				
$CaCl_2$	0.1				
KH_2PO_4	0.4				
Glukoz	0.02				
Tavuk Tüyü	15				

Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp JB 99 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum üretim koşullarının 45 °C, pH 10.0 ve 36 saatlik inkübasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Anbu ve ark. (2007), Hindistan'ın Namakkal bölgesindeki tavuk çiftliklerinden aldıkları toprak örneklerinden *Scopulariopsis brevicaulis* mantarını izole etmiş ve kertinaz üretimini etkileyen faktörleri çalışmışlardır. Mantarın pH 7.5'da 30 °C'de ve 5 günlük üretim periyodu sonrasında en yüksek keratinaz üretimini elde etmişlerdir (6.2 KU/ml).

Çizelge 4.8. C1-EMS80 için optimum üretim koşulları

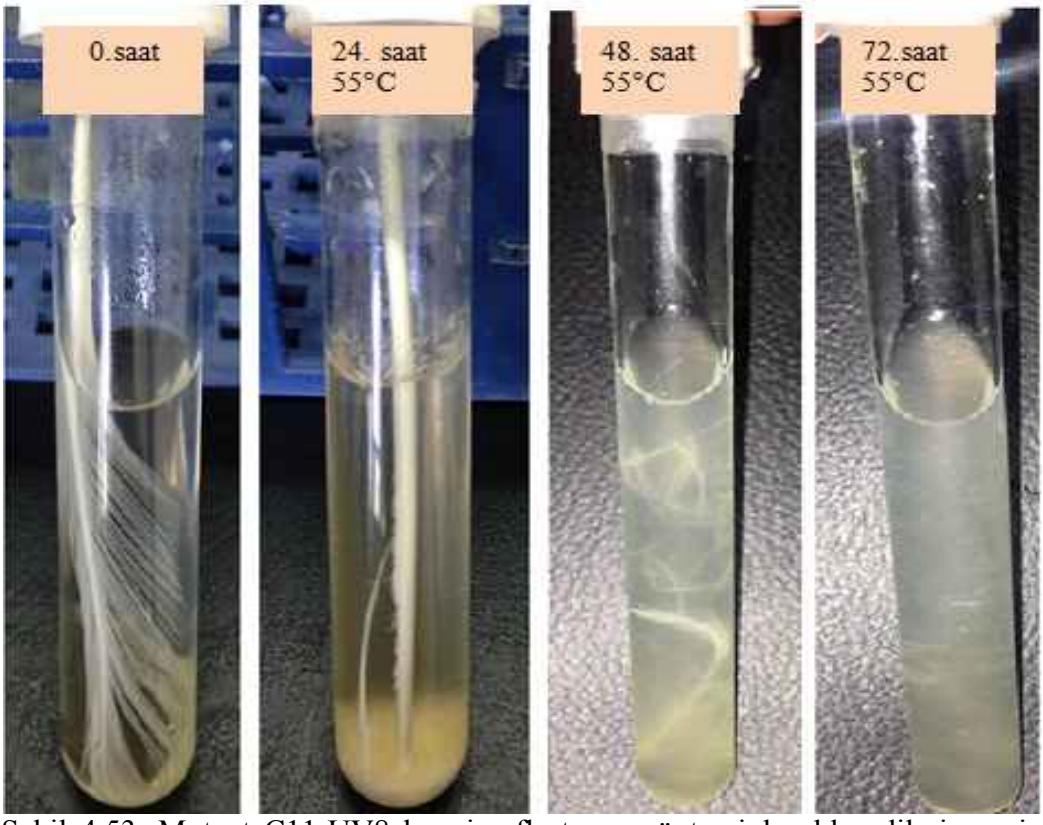
Tavuk tüylü besi yeri	g/L	Optimum İnokülasyon Miktarı (Başlangıç OD600)	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Optimum pH
$MgSO_4*7H_2O$	0.2	0.1	96	60	11
K_2HPO_4	1				
$CaCl_2$	0.1				
KH_2PO_4	0.4				
Maya	0.1				
Tavuk Tüyü	20				

Kültür medyumu %1 glukoz, % 2 sodyum nitrat, % 1.5 tüy unu ve 1mM $CaCl_2$ ile desteklendiğinde enzim üretiminin arttığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız C1-EMS808 suşu kullanılarak gerçekleştirilen keratinaz üretimi pH 11.0, 96 saat, $8x10^7$ bakteri/ml ve 60°C lik koşullarda %2 ham tavuk tüyü kullanılarak sağlanmıştır.

4.7.4. Mutant Suşların Enzimatik Özellikleri

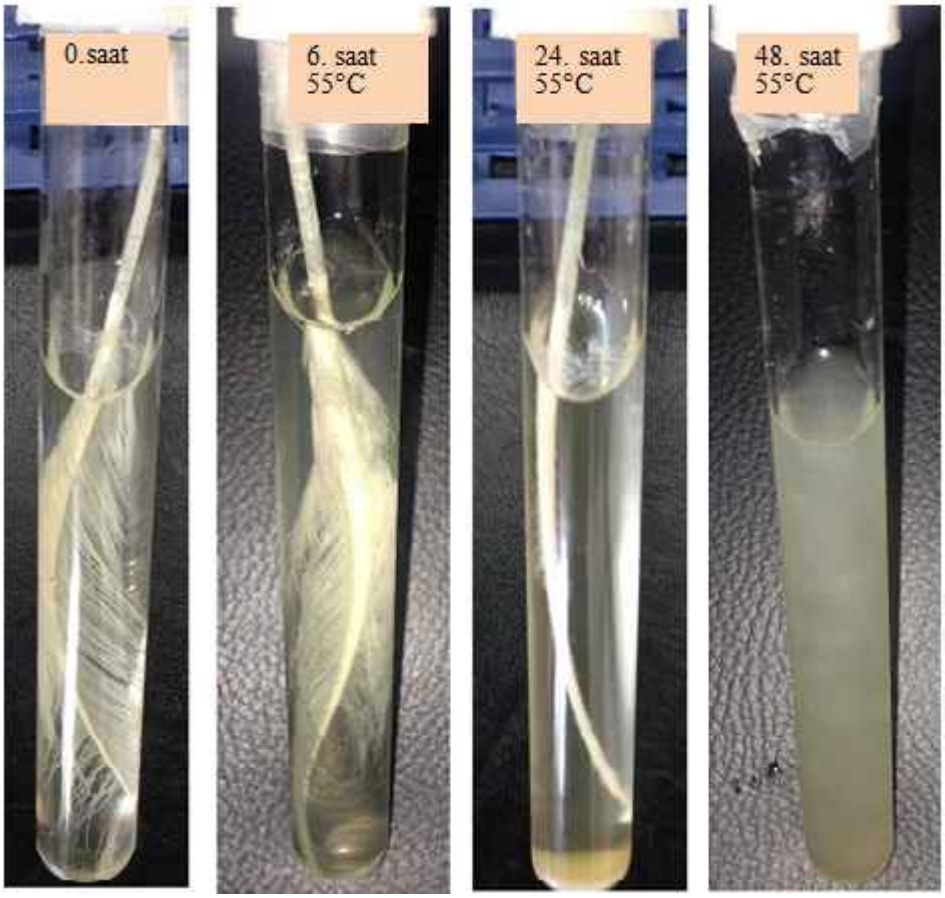
Elde edilen enzim çözeltisinden 500µl (C11-UV8: 1405 U/ml; C1-EMS80: 1982 U/ml) alınarak 9.5 ml (pH 10 tamponu) tampona eklenmiş ve 20 ml lik ağzı kapaklı tüpe aktarılarak içerisine ön işlemden geçirilmemiş steril tavuk tüyü konularak 55°C de 12, 24 ve 48 saat inkübasyon gerçekleştirilerek tavuk tüyünü hidrolize etme analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular şekil 4.53. ve 4.54' de gösterilmiştir.



Şekil 4.53. Mutant C11-UV8 kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilmiş enzim çözeltisinin ham tavuk tüyü üzerine etkisi

C11-UV8 mutantından elde edilen enzim ile yapılan uygulamada (Şekil 4.53 de görüldüğü gibi) inkübasyonun 24.cü saatinde tüylerin tamamen hidroliz olarak tüpün dip kısmında toplandıkları, telekteki sert yapılı orta kısmın ise sağlam kaldığı gözlenmiştir. İnkübasyonun 48.ci saatinde telekte bulunan sert yapılı kısmında tamamen hidroliz olduğu ve emülsiyon haline geldiği saptanmıştır. İnkübasyonun 72.ci saatinde ise hem tüye ait yapılar hemde sert yapılı kısım tamamen hidroliz olarak homojen bir karışım elde edilmiştir.

Jeong ve ark. (2010), *Bacillus* sp. SH-517 suşunun keratinaz enzimi üretiminin 40. saatinde ortamdaki tüyleri parçaladığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.54. Mutant C1-EMS80 kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilmiş enzim çözeltisinin ham tavuk tüyü üzerine etkisi

C1-EMS80 mutantından elde edilen enzim ile yapılan uygulamada (Şekil 4.54 de görüldüğü gibi) inkübasyonun 6. saatinde tüylerin tüpün alt kısmından başlayarak hidroliz olmaya başladıkları gözlenmiştir. İnkübasyonun 24.cü

saatinde teleğin ortadaki sert keratinli yapısına tutunmuş olan tüylerin tamamen hidroliz oldukları belirlenmiştir. Hidrolize olan yapılardan açığa çıkan ürün dip kısımda toplanırken çözelti şeffaf bir görüntü almıştır. İnkübasyonun 48.ci saatinde ortamdaki bütün yapılar hidrolize olarak çözeltinin tamamında homojen bir dağılım gerçekleşmiştir.

Her iki mutant suştan elde edilen enzimlerin hidroliz zamanları kendi aralarında karşılaştırıldığında C1-EMS80 suşuna ait keratinaz enziminin aynı miktardaki ham tavuk tüyünü 24 saat daha kısa zamanda tamamen hidroliz ettiği bulunmuştur. Ayrıca C1-EMS80 suşuna ait enzim hidroliz işlemine inkübasyonun 6.cı saatinde başlamıştır. Syed ve ark. (2009), *Streptomyces gulbargensis* suşunun Tavuk tüyünü 96 saat inkübasyon sonunda tamamen parçaladğını bildirmişlerdir.

Jaouadi ve ark. (2013), *Brevibacillus brevis* US575 suşundan elde ettikleri keratinaz enziminin (7500 U/ml) 10. saatte tavuk tüyünün büyük bir kısmını hidroliz ettiğini bildirmişlerdir.



Brevibacillus brevis US575 keratinaz'ın enzimatik özellikleri (Jaouadi ve ark., 2013)

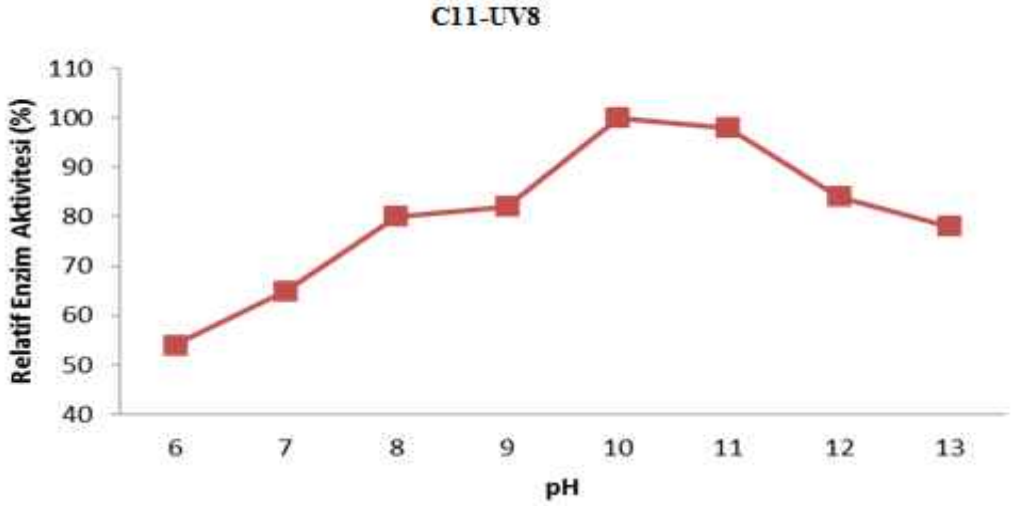
Mukherjee ve ark. (2011), alkalin β-keratinaz üreten *Brevibacillus* sp. AS-S10-II suşundan elde ettikleri mutan suştan elde ettikleri keratinaz enziminin inkübasyon süresinin son 48. saatinde Mukartinase MR'ın tüy-keratininin yaklaşık %78-82'sini parçalayabildiğini SEM çalışması ile tespit etmişlerdir.

Literatür verileri ile karşılaştırıldığı zaman özellikle C1-EMS80 mutant suşuna ait keratinaz enzimi çok daha yüksek hidroliz yeteneğine sahiptir.

4.7.4.1. Mutant Suşlardan Elde Edilen Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.7.4.1(1) Mutant Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular

Hazırlanan enzim substrat (Na-fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Borax-NaOH (pH 11.0-12.0)) karışımları enzimin üretildiği sıcaklıkta 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmış ve standar aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.



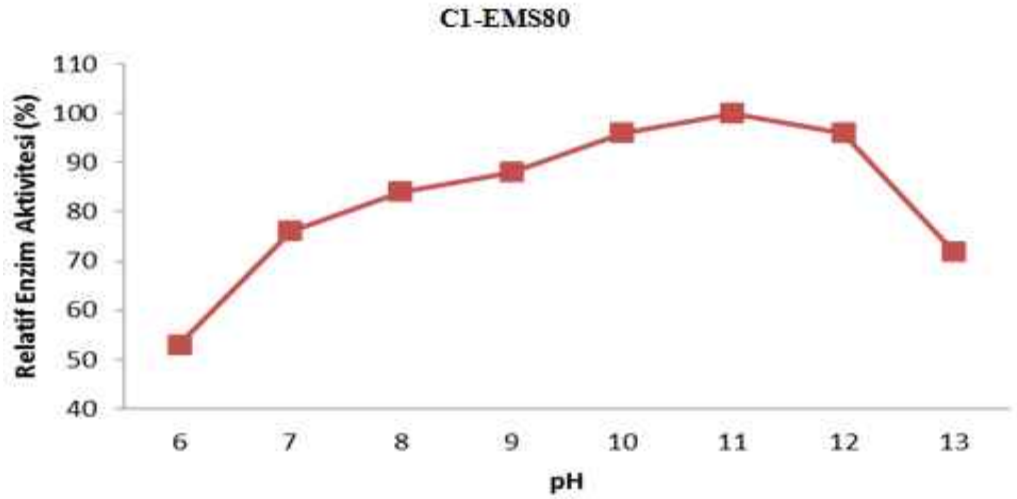
Şekil 4.55. C11-UV8 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı

Spektrofotometrik ölçümler sonunda C11-UV8 enzimi için pH 6.0'da %54, pH 7.0'de % 65, pH 8.0'de %80, pH 9.0'da %82, pH 10.0'da %100, pH 11'de 98, pH 12'de %84 ve pH 13'de %78 relatif enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum aktivite pH 10.0 da elde edilmiştir. Bu sonuçlar mutant suştan elde edilen enzimin optimum pH değerlerinde ana suşa göre bir

değişiklik olmadığını göstermektedir. Elde edilen bulgular şekil 4.55.'te grafiksel olarak gösterilmiştir.

Mieko ve ark (2006), *Bacillus pseudofirmus* FA 30-01 suşundan üretilen keratinaz enzimin optimum pH aralığının 8.3-10.3 olarak saptamışlardır. Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan üretilen keratinaz enzimin optimum pH'sının 10.0 olarak bulmuşlardır. Fakhfakh ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* R Pk suşundan üretilen termofil keratinaz enzimin pH 9.0 optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Spektrofotometrik ölçümler sonunda C1-EMS80 enzimi için pH 6.0'da %53, pH 7.0'de % 76, pH 8.0'de %84, pH 9.0'da %88, pH 10.0'da %98, pH 11.0'de 100, pH 12.0'de %96 ve pH 13.0'de %72 relatif enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum aktivite pH 11.0 de elde edilirken bütün pH değerlerinde ortalama %80 aktivite saptanmıştır. Elde edilen bulgular mutant suştan elde edilen enzimin optimum pH değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Sonuç şekil 4.56'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.56. C1-EMS80 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı

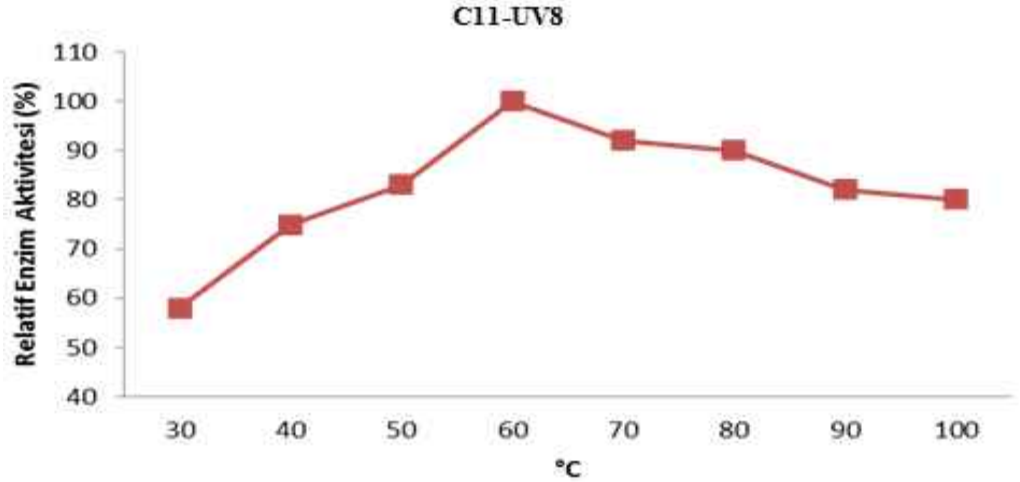
C11-UV8 mutant suşundan elde edilen keratinaz enzimi pH optimumu ve pH aktivite aralığı dikkate alındığı zaman (optimum pH 10.0 ve yüksek aktivite aralığı pH 10.0-11.0) literatürde benzer enzim çalışmalarından elde edilen değerlerden çok daha alkalifilik özellik göstermektedir. C1-EMS80 mutant suşu

ile yapılan optimum pH aktivite çalışmalarında pH 9.0-12.0 aralığında yaklaşık %90 düzeyinde geniş bir pH aralığında aktivite elde edilmiştir.

4.7.4.1(2) Mutant Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular

C11-UV8 mutant suşunun optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması amacı ile 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100ºC'lik sıcaklık değerlerinde 60 dk inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart enzim aktivitesi analizi yapılarak enzimin en fazla reaksiyon ürünü oluşturduğu sıcaklık saptanmıştır.

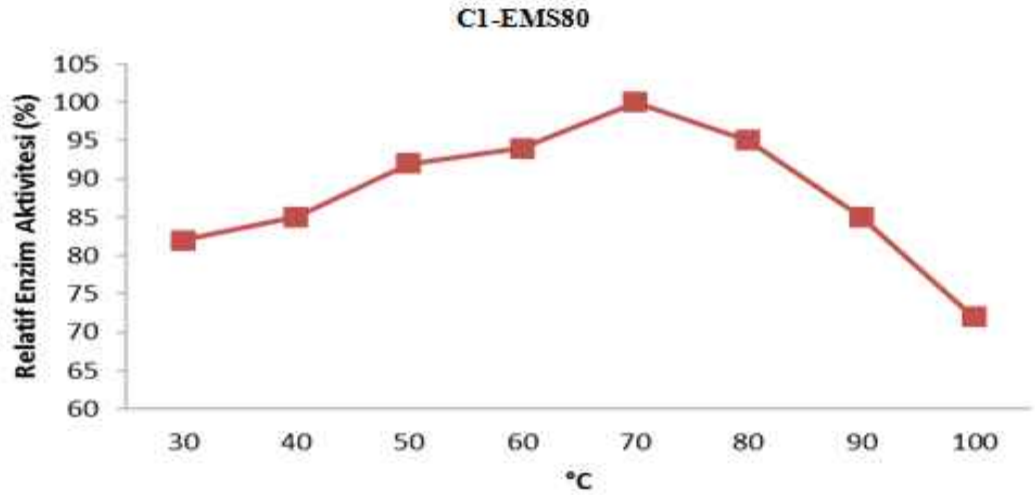
Spektrofotometrik ölçümler sonucunda 30 ºC 'de %58, 40 ºC'de %75, 50 ºC'de %83, 60 ºC'de 100, 70 ºC'de %92, 80 ºC'de %90, 90 ºC'de %82 ve 100 ºC'de %80 düzeyinde aktivite değeri elde edilmiştir. C11-UV8 suşundan izole edilen alkaline keratinaz enzimi optimum aktivitesini 60 ºC'de göstermekle birlikte 30-40 ºC aralığında ortalama %70, 70-100 ºC aralığında ise %85 relatif aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar mutant suştan elde edilen enzimin optimum sıcaklık değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermektedir.
Elde edilen bulgular şekil 4.57'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.57. C11-UV8 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı

Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 susundan, termofil alkalin keratinaz saflastırmıstır. Bu enzimin keratin hidrolizi için optimum sıcaklığının 60°C olduğunu saptamışlardır. Fakhfakh ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* R Pk suşundan izole ettikleri ve serin proteaz olarak belirledikleri keratinazın enziminin optimum aktivite sıcaklığının 60 °C olduğunu bildirmişlerdir. Literatürden elde edilen sonuçlar analizi gerçekleştirilen mutant suşa ait enzim sonuçları ile uyum içindedir. Sonuç şekil 4.58'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

C1-EMS80'na ait keratinaz enzimi ile yapılan optimum aktivite sıcaklığı ile ilgili çalışmalarda 30 ºC 'de %82, 40 ºC'de %85, 50 ºC'de %88, 60 ºC'de 94, 70 ºC'de %100, 80 ºC'de %95, 90 ºC'de %85 ve 100 ºC'de %72 düzeyinde aktivite değeri elde edilmiştir. C1-EMS80 suşundan izole edilen alkaline keratinaz enzimi optimum aktivitesini 70 ºC'de göstermekle birlikte 30-40 ºC aralığında ortalama %82, 80-100 ºC aralığında ise %80 relatif aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar mutant suştan elde edilen enzimin optimum sıcaklık değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.58. C1-EMS80 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı

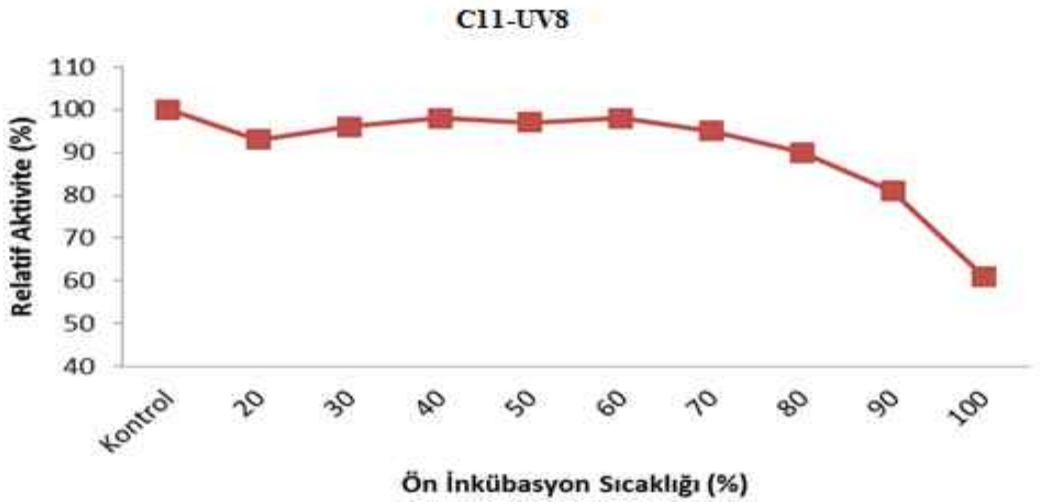
Chitte ve ark (1999), *Streptomyces thermoviolaceus* tan üretmiş oldukları alkalin keratinazın optimum aktivitesini 55 °C olduğunu bildirmişlerdir. Letourneau ve ark (1998), *Streptomyces* sp. $S.K_{1-02}$ suşundan üretmiş oldukları

alkalin keratinazın optimum aktivitesini 70 °C olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar literatür değerleri ile uyumluluk göstermektedir.

4.7.4.1(3) Mutant Enzimlerin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar

C11-UV8 ve C1-EMS80 suşundan üretilen alkaline, termofil keratinaz enzimlerine 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 sıcaklık değerlerinde 60 dk süreyle ön inkübasyon işlem uygulanmış ve standart enzim aktivitesi analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011).

C11-UV8 suşundan elde edilen keratinaz enziminin analizi sonunda enzim aktivitesinin 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ºC sırası ile %93, %96, %98, %97, %98, %95, %90, %81, ve %61 oranında korunduğu saptanmıştır. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen sıcaklıklarda 90 dereceye kadar orijinal aktivitesini minumum %81 oranında korurken, 100 ºC'de kalan aktiviteyi değeri %61 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar mutant suştan elde edilen enzimin ön inkübasyon için seçilen sıcaklık değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermekte ve enzimin termostabil özelliğinin değişmediğini ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler şekil 4.59 de gösterilmiştir.



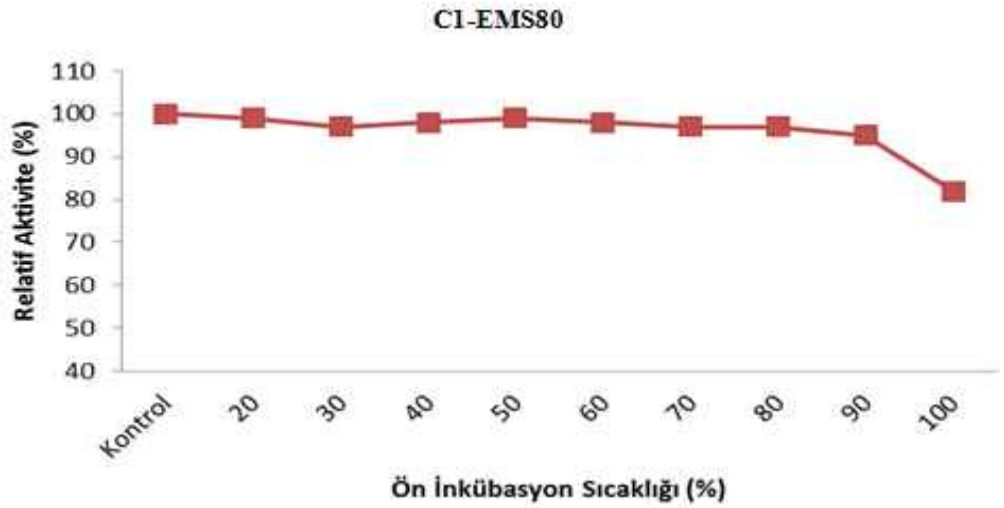
Şekil 4.59. C11-UV8 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları

Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus sp*. JB 99' dan izole edilen enzimin 1 saatlik ön inkübasyon sonunda aktivitesini 50 °C'ye kadar koruduğu sıcaklığın

yükselmesine bağlı olarak düştüğü 80 °C'de tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Ferrero ve ark (1995), *Bacillus licheniformis* MIR29'dan elde ettikleri termofil proteolitik enzimin 30-60 °C'de 10 dakikaya kadar %100 stabil kaldığını bildirmişlerdir.

C11-UV8 suşundan üretilen keratinaz enzimi termostabilite açısından literatür verilerine göre oldukça yüksek stabiliteye sahiptir.

C1-EMS80 mutant suştan elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın 20-90ºC arasındaki sıcaklık değerlinde 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %95'in üzerinde 100ºC de ise %78'in üzerinde koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar mutant suştan elde edilen enzim ana suşa göre daha termostabil özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler şekil 4.60. de gösterilmiştir.



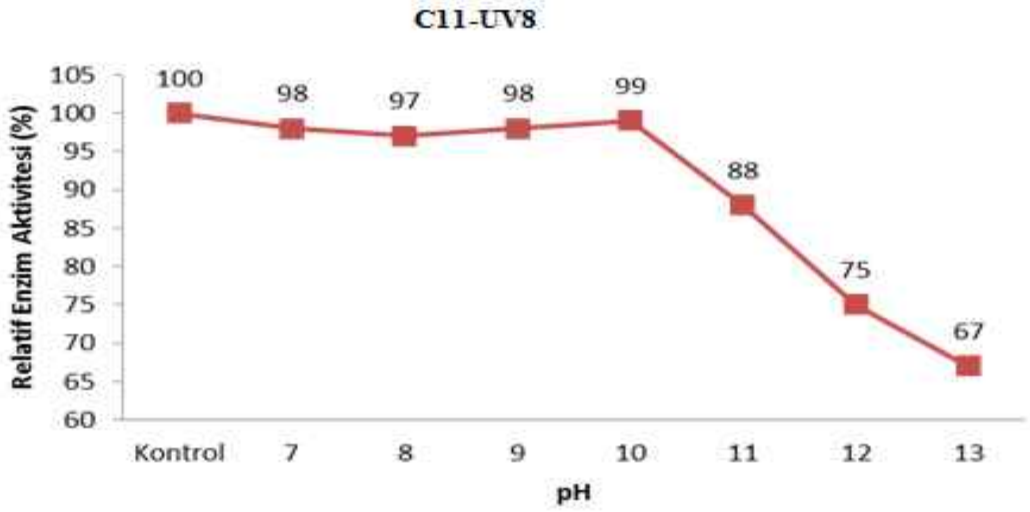
Şekil 4.60. C1-EMS80 keratinaz enziminin sıcaklık stabilite sonuçları

4.7.4.1(4) Mutant Enzimlerin pH Stabilitelerine Ait Sonuçlar

pH stabilitesinin saptanması için, enzim örneğinden 2 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra örnek üzerine aynı miktarda tampon eklenerek (pH'sı 6.0-13.0) enzim süspanse edilip 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul

edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif pH stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Suneetha ve ark. 2011; Tamılmanı ve ark., 2008).

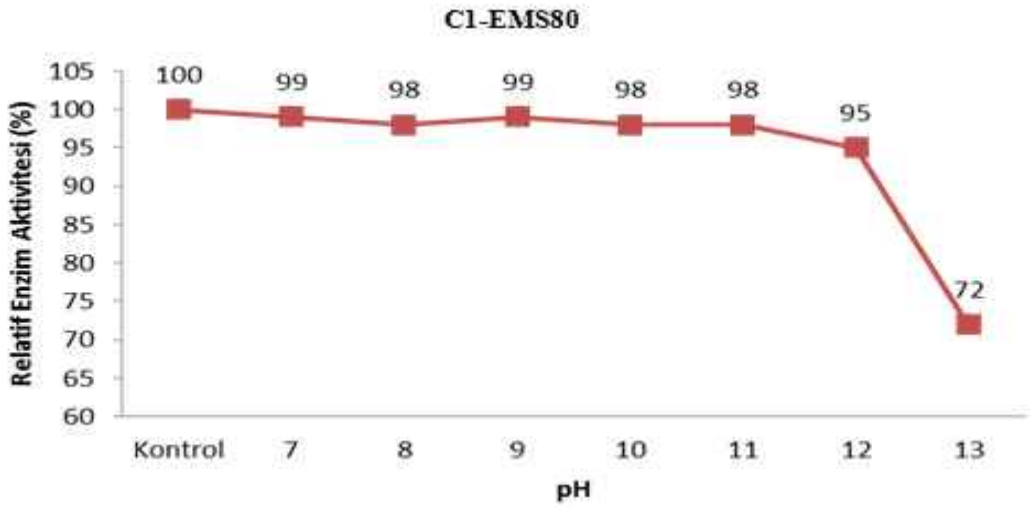
Elde edilen verilere göre; C11-UV8 mutant suşundan elde edilen keratinaz enziminin pH 7.0-10.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %98'nin üzerinde, pH 11.0, 12.0 ve 13.0 değerinde ise sırasıyla % 88, 75 ve 67 koruduğu tespit edilmiştir. Veriler şekil 4.61.da gösterilmiştir.



Şekil 4.61. C11-UV8 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları

Jeong ve ark (2010), *Bacillus* sp. SH-517 suşundan elde ettikleri serin keratinaz enzimini çeşitli pH değerlerinde (3.0-10.0) 37 °C'de 1 saat ön-inkübe ettiklerinde enzimin pH 4.0-9.0 arasında aktivitesini %90 koruduğunu, pH 9.0'dan sonra aktivitenin hızla düştüğünü bildirmişlerdir. Liu ve ark (2013), *Bacillus licheniformis* suşundan elde ettikleri termofil ekstrem alkalin ve oksidant dirençli keratinaz enziminin çeşitli pH değerlerinde (4.5-11.5) 2 saat ön-inkübasyonundan sonra enzimin aktivitesini pH 4.5' ta %80, pH 5.0'te %75 ve pH 6.0-7.0 aralığında %50'ye yakın kaybettiğini, bununla birlikte pH 7.5-11.5 aralığında aktivitesini ortalama %80-85 koruduğunu bildirmişlerdir.

C1-EMS80 suşundan elde edilen keratinaz'ın pH 7.0-12.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %95'nın üzerinde, pH 13.0 değerinde ise % 72 koruduğu tespit edilmiştir. Veriler şekil 4.62'de gösterilmiştir.

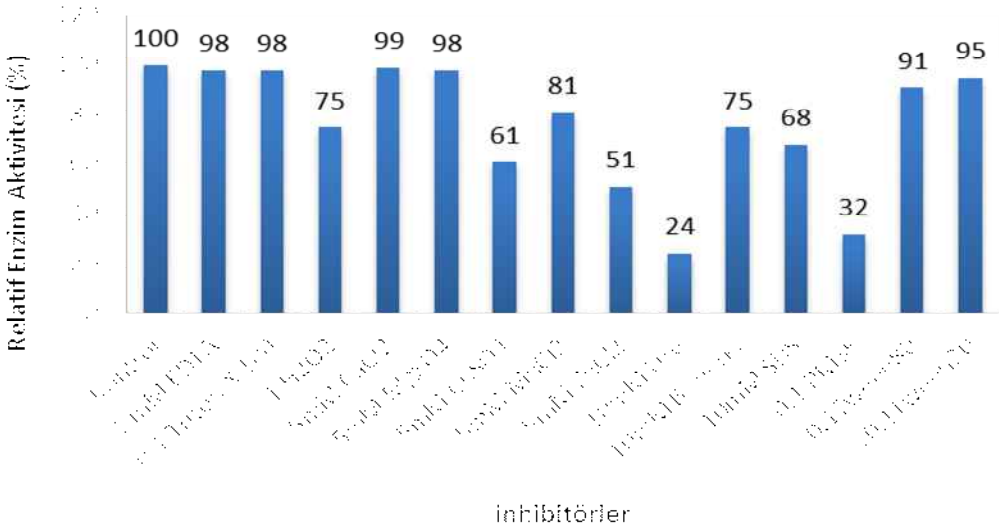


Şekil 4.62. C1-EMS80 keratinaz enziminin pH stabilite sonuçları

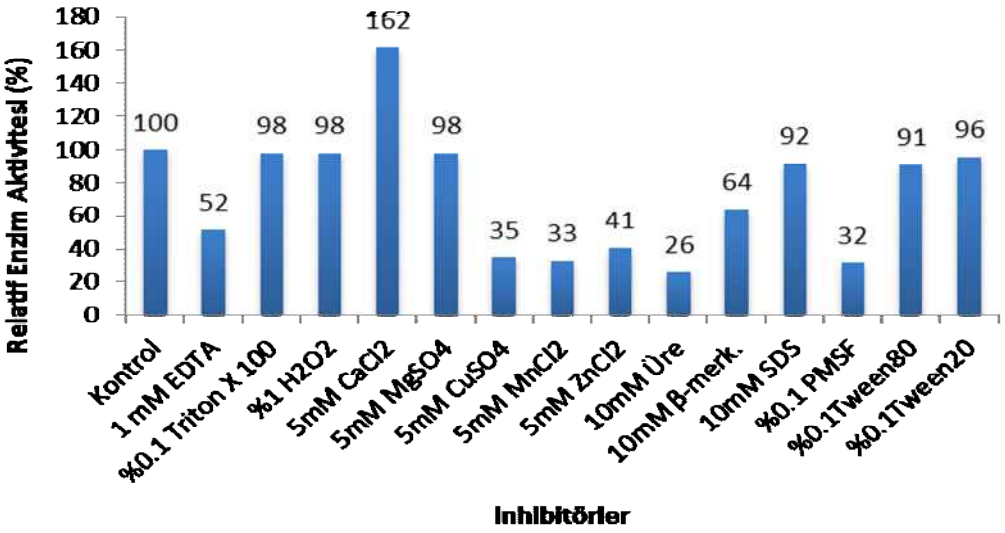
Fakhfakh-Zourari ve ark (2010), *Bacillus pumilis* A1 suşundan elde ettikleri keratinaz enziminin 40° C'de 1 saatlik ön inkübasyondan sonra enzimin pH 6.0-12.0 aralığında %85'ten fazla aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. Nasri ve ark (2006), *Bacillus licheniformis* RP1 suşundan elde ettikleri alkalin proteaz enziminin 40 °C'de 1 saat çeşitli pH aralıklarında ön inkübasyondan sonra pH 8.0-10.0 aralığında %100'e yakın stabil iken pH 11.0 de %96 ve pH 12.0'de ise %72 aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.7.4.1(5) Mutant Enzimlerin Aktivitesine Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Etkisi

Stok enzim çözeltisi santrifüjle (11.000 dev/dk) 5 dakika çöktürüldükten sonra uygun konsantrasyonda metal iyonları, deterjanlar, şelatör, inhibitör ve okside edici ajanlarla ile süspanse edilerek 60 dakika enzimin üretildiği sıcaklıkta (55 ve 60 ºC) ön inkübasyon yapılmıştır. Ön İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Caf ve ark., 2013; Shah ve ark.; 2010). Elde edilen bulgular şekil 4.63'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.63. Çeşitli inhibitörlerin C11-UV8 Keratinaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.64. Çeşitli inhibitörlerin C1-EMS80 Keratinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi

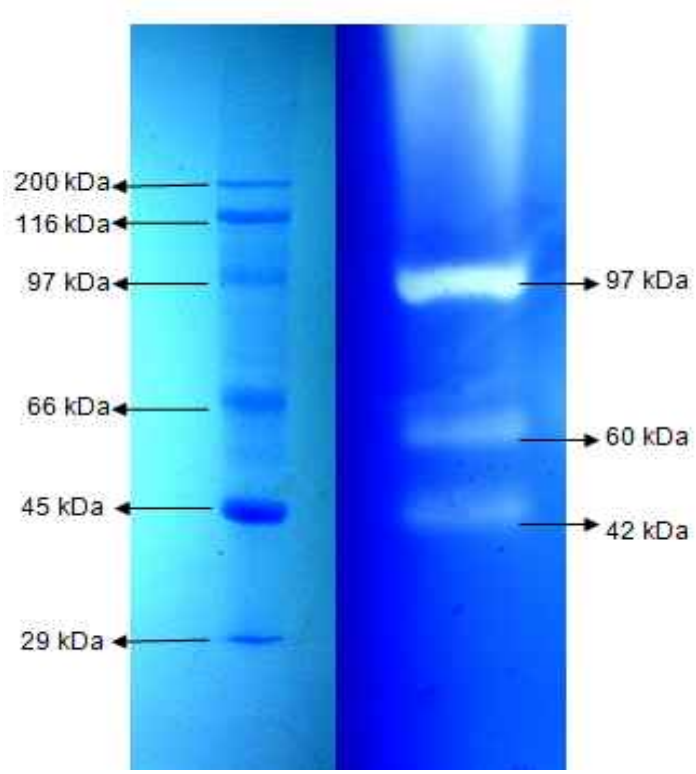
Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. türünün keratinaz aktivitesinin Ca^{+2} iyonu varlığında önemli derecede arttığını, PMSF ve EDTA varlığında ise bu aktivitenin inhibe edildiğini bildirmişlerdir ve enzimlerini serin metaloproteaz olarak sınıflandırmışlardır.

Paul ve ark (2014), Proteolitik enzimlerin deterjan stabilitesi onun endüstriyel uygulamalarda kullanışlılığını gösteren önemli bir özellik olduğunu bildirmişlerdir.

4.7.4.1(6) Mutant Enziminlerin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar

C1-UV8 ve C1-EMS80 keratinaz enziminin SDS-PAGE ve Zimogram analizi %0,1 skim-milk içeren %12'lik SDS-PAGE sistemi kullanılarak zimogram analizi gerçekleştirilmiştir.

C1-UV8 keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlıkları sırasıyla 97, 60 ve 42 kDa olan 3 farklı aktivite bandı elde edilmiştir.



Şekil 4.65. C11-UV8 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları.

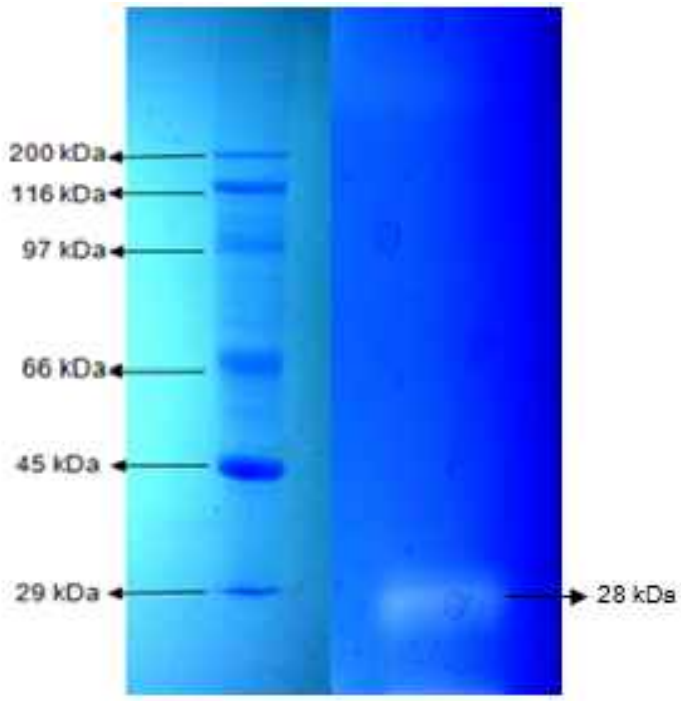
Saibabu ve ark (2013), *Bacillus megaterium* suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 41 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Gosh ve ark (2008), *Bacillus cereus*

DCUW suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 80 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 35 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir

C11-UV8 mutant suşundan elde edilen serin keratinaz enzimi literature (Suntornsuk ve ark.,2005) bilgileri ile gerek moleküler ağırlık ve gerekse ortaya çıkan izozim bandları açısından oldukça farklıdır.

C1-EMS80 keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 28 kDa olan tek bir aktivite bandı elde edilmiştir.



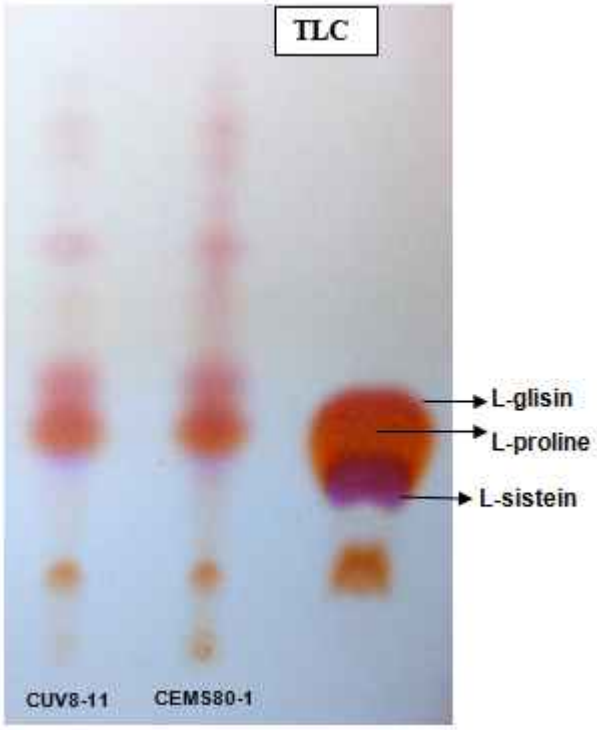
Şekil 4.66. C1-EMS80 enziminin SDS-PAGE analiz sonuçları.

Bressolier ve ark (1999), *Streptomyces albidoflavus* suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 18 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yadav ve ark (2011), Streptomyces sclerotialus suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 46 kDa ağırlığında olmak üzere tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

4.7.4.1(7) Enzimin İnce Tabaka Kromatografisine (TLC) Ait Sonuçlar

C11-UV8 ve C1-EMS80 keratinaz enzimlerinin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması için TLC analizi yapılmıştır. C11-UV8 ve C1-EMS80 keratinaz enzimi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuk tüyünün çok büyük oranda prolin, sistein, tirosine olmak üzere birçok diğer aminoasitlere de hidroliz edildiği saptanmıştır. Elde edilen sonuç, şekil 4.67'de gösterilmiştir.



Şekil 4.67. C11-UV8 ve C1-EMS80 keratinaz enziminin ince tabaka kromatografisi ile son ürünlerinin saptanması

Mutasyon çalışmaları sonunda her iki suşa ait enzimlerin hidroliz ürünlerinde farklılıklar ortaya çıkmıştır. C1-EMS80 suşunda ana suşa göre reaksiyon ürünleri arasında prolin miktarı artarken glisin azalmıştır. C11-UV8 suşuna ait sonuçlarda ise bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte her iki suştada reaksiyon ürünlerinin miktarları oransal olarak artmıştır.

Cai ve ark. (2008), mutant *Bacillus subtilis* KD-N2' suşundan elde edilen keratinaz enziminin susbstrat olarak tüy kullanıldığında pH 7.5 'de 16

saatlik inkübasyon sonucunda substratın treonin, valin, metiyonin benzeri temel aminoasitlere kadar parçalandığını tespit etmişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2011), Tüy-keratinini mutant *Bacillus subtilis* KD-N2 suşundan elde ettikleri Mukartinase MR'ın ile muamelesi sonucunda miktar olarak en fazla serbest kalan amino asitlerin sırasıyla cysteine, valine, threonine, lysine, isoleucine, phenylalanine ve methionine olduğunu belirlemişlerdir.

Lakshmi ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* BF11 ve *Bacillus cereus* BF21 UV ile muamele ederek mutant MBF11 VE MBF21 suşlarını elde etmişlerdir. Mutant suşlardan elde ettikleri enzim ile Tüy keratinini muamele ettiklerinde ana suşlara göre cysteine, cystine, methionine ve toplam serbest amino asitlerin miktarında önemli derecede bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

C11-UV8 mutant suşu genel olarak değerlendirildiği zaman, suştan elde edilen keratinaz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve sıcaklık stabilitesi ile inhibitör ve diğer kimyasalların etkileri bakımından C11 suşu ile benzer sonuçlar gösterdiği bulunmuştur. Bununla birlikte enzim enzim üretim süresi ve miktarında orijinal suşa göre çok daha kısa sürede (48 saat) ve yüksek düzeyde (1405 U/ml) verim elde edilmiştir (orijinal suşta 96. saatte 520 U/ml üretim gerçekleşmiştir). Alkalin, termofil, termostabil, oksidant-stabil serin keratinaz üreticisi C11-UV8 suşunun bu yeteneğinin keratin içeren atıkların değerlendirilmesi, tavuk tüyü başta olmak üzere keratinli atıkların protein üretiminde kullanılması ve atıkların çevreye olumsuz etkilerinin azaltılmasında yeni fırsatlar yaratabileceği düşünülmektedir.

Streptomyces fradiae C1 suşunun EMS ile muamelesi sonucu elde edilen C1-EMS80 mutant suştan elde edilen enzim karakterize edildiği zaman orijinal suş ile farklılıklar ortaya çıkmamıştır. Buna karşılık sıcaklık stabilitesi *Streptomyces fraidae* C1 suşundan elde edilen enzime göre artış göstermiştir. Ayrıca, enzim üretim miktarı ve üretim süresinde orjinal suşa göre pozitif yönde iyileşmeler sağlanmıştır. Orijinal suşta 144 üncü saatte 468 U/ml enzim elde edilirken, C1-EMS80 suşunda 96 saatlik inkübasyon sonunda 1870 U/ml enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Metallo serin alkalin keratinaz enzimi deri işletmeleri başta olmak üzere keratinolitik uygulamarın gerçekleştirildiği endüstri alanları ve biyoremediasyon uygulamalarında öncelikli çözüm oluşturacak özelliğe sahiptir.

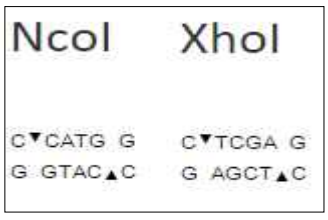
4.8. *Bacillus licheniformis* C11 Suşuna Ait Keratinaz Üreticisi Genin *E.coli*'ye Klonlanması

4.8.1. Keratinaz Genlerinin Gen Bankasından Araştırılması

Kalitatif ve kantitatif olarak keratinaz üretici olduğu belirlenen *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait keratinaz genininin belirlenmesi için NCBI (National Center for Biotechnology Information)' genom veri tabanından yararlanılarak veritabanındaki *Bacillus licheniformis* keratinaz genlerinin sekansları araştırılmıştır. Yapılan araştırmada *Bacillus licheniformis* veritabanında 8 farklı keratinaz geninin dizisine ulaşılmıştır ve "Clustal W" programı ile dizileme yapılarak analiz edilmiştir.

4.8.2. Restriksiyon Enzimlerinin Belirlenmesi

Vektörümüze ait klonlama bölgesinde yer alan restriksiyon enzimleri tespit edilerek veritabanından elde edilen keratinaz genlerine göre klonlama yapılmak istenen her gen için kullanılacak enzimler seçilmiştir. Restriksiyon enzimleri seçilirken bu enzimlerin kesim bölgelerinin bizim klonlamak istediğimiz keratinaz genlerinin içerisinde olup olmadıkları 'NEB cutter V2.0' programı kullanılarak araştırılmış ve uygun olanları primer tasarımı için seçilmiştir. Sonuç olarak "NcoI" ve "XhoI" restriksiyon enzimlerinin (şekil 4.69) hem klonlamada kullanacağımız pET22b(+) vektörümüzün (şekil 3.3.) klonlama bölgesinde yer aldığı hem de kesim bölgelerinin bizim klonlamak istediğimiz keratinaz genlerinin içerisinde olmadığı tespit edilerek primer tasarımı buna göre yapılmıştır.



Şekil 4.68. NcoI ve XhoI Restriksiyon Enzimlerinin tanıdığı nükleotit dizileri

4.8.3. Primer Tasarımı

İleri ve geri primerleri için genom bankasından seçtiğimiz *Bacillus licheniformis* N5 keratinase geninden minimum 25-28 baz çifti (bç) bire bir olarak alınmıştır ve bu diziye restriksiyon enzimlerinin dizileri ilave edilmiştir. Ayrıca birkaç modifiye çalışmaları yapılarak oligonükleotid Tm sıcaklığı düşürülerek optimize edilmiştir. Sonuç olarak dizayn edilen primerin özellikleri Şekil 4.69.'te gösterilmiştir.

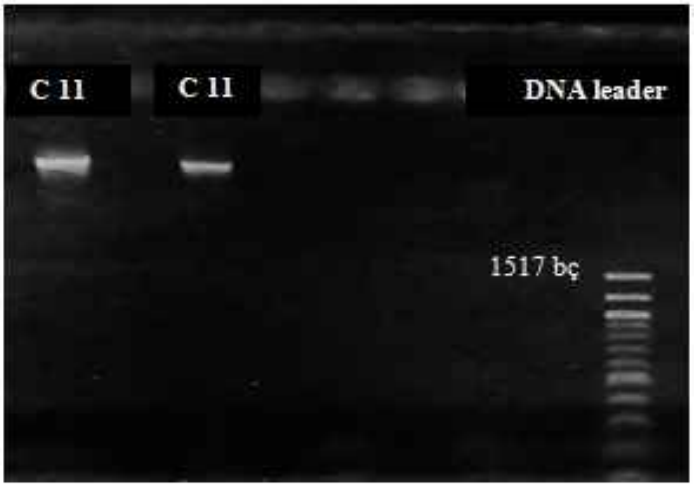
Upstream primerinin baz sırası:
5'-CACCCATGGATATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTG-3
Baz uzunluğu : 36 bç
Tm (50 Mm NaCl) : 62.1 °C
GC içeriği : %41.7
Moleküler Ağırlığı : 11,163.3
nmol/OD260 : 2.8
ug/OD260 : 31.2
Oligonükleotit miktarı: 33.0 (OD260)=92.1 (nMol)= 1.03 (mg)
Downstream primerinin baz sırası:
5'-AAT TCC CGG GTT GAG CAG CAG CTT CGA CAT TGA-3
Baz uzunluğu : 33 bç
Tm (50 Mm NaCl) : 67.1 °C
GC içeriği : %51.5
Moleküler Ağırlığı : 10,153.6
nmol/OD260 : 3.1
ug/OD260 : 32.0
Oligonükleotit miktarı: 35.1 (OD260)=110.5 (nMol)= 1.12 (mg)

Şekil 4.69. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geninin çoğaltılması için dizayn edilen primerlerin dizileri ve özellikleri

4.8.4. *Bacillus licheniformis* C11 Suşunun Keratinaz Gen Bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir Reksiyonu) İle Çoğaltılması

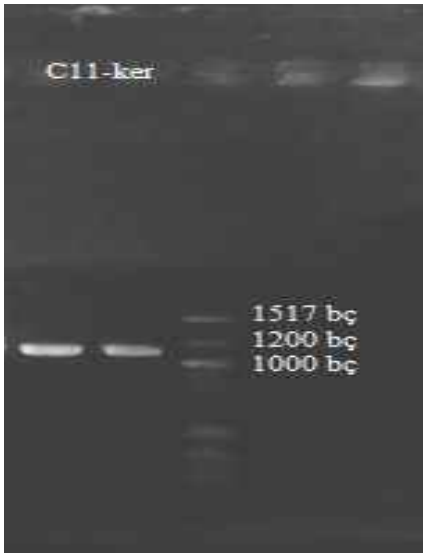
Keratinaz aktivitesinin olduğu tespit edilen *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait genomik DNA'nın 'Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega' ile izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA'nın

varlığının ve konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla 10'ar µl PCR ürünü 2 µl DNA Loading Dye ile muamele edilmiş ve % 1'lik agaroz jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.70.).



Şekil 4.70. Genomik DNA Agaroz Jel Görüntüsü

Keratinaz aktivesinin olduğu tespit edilen *Bacillus* licheniformis suşuna ait genomik DNA kalıp olarak, tasarlanan keratinaz genlerine ait primerler kullanılarak uygun koşullarda (Çizelge 3.9. ve 3.10.) PCR gerçekleştirildi. PCR ürünlerinden 10'ar µl PCR ürünü 2 µl DNA Loading Dye ile muamele edildi ve % 1'lik agaroz jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.71.). Agaroz jel görüntüsünden elde edilen bulgulara göre *Bacillus licheniformis* suşunda keratinaz geninin yaklaşık 1150 bç büyüklükte olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.71. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geninin PCR ürünü jel görüntüsü

4.8.5. *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz genine ait PCR Ürününün Saflaştırılması

Başarılı bir PCR gerçekleştirildiği tespit edildikten sonra PCR ürünleri amplifikasyon sonucu elde edilen PCR karışımından "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega" kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

4.8.6. Plazmid DNA'nın Izolasyonu ve Saflaştırılması

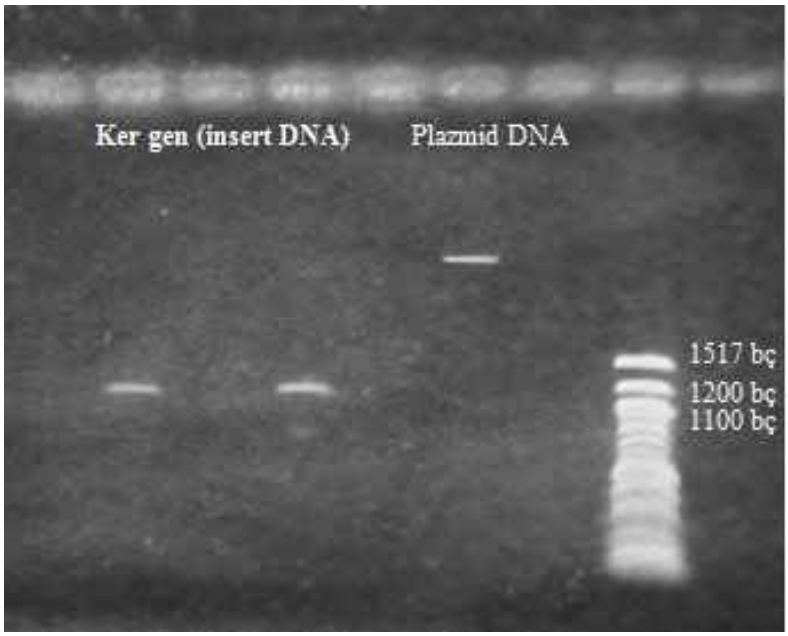
pET22b(+) vektörünü içeren konak hücreler Amphisilinli (50µg/ml) LB sıvı besiyerinde karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 190rpm'de 1 gecelik kültür hazırlanarak kültürden "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Promega" kiti kullanılarak plasmid izolasyonu ve saflaştırma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.8.7. PCR Ürünü (ker geni) ve Plasmid Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Sırasıyla '*XhoI'* ve '*NcoI'* restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimler sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel analizi ile pET22b(+) vektörünün 5431 bç,

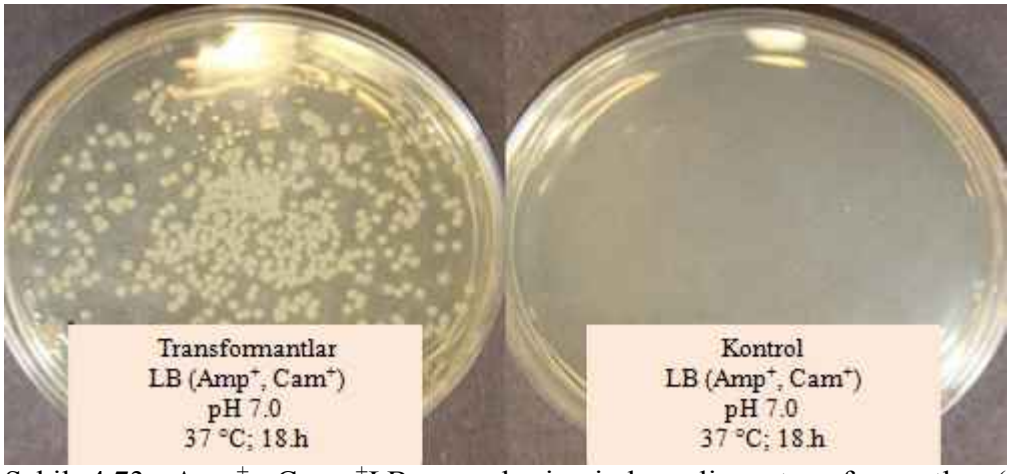
Bacillus licheniformis C11 keratinaz geninin ise 1150 bç büyüklüğünde iki ayrı DNA bandı şeklinde ortaya çıktığı saptanmıştır (Şekil 4.72.). Klonlamada kullanılacak (pET22b(+) vektörü 5493 bç büyüklüğünde olup, klonlanacak keratinaz geninin vektöre yerleştirileceği (bağlanacağı) yaklaşık 62 bç uzunluğunda nükleotid dizisi, kesici enzimlerle vektörden uzaklaştırılmıştır. Bundan dolayı kesilmiş olan vektör DNA'sı agaroz jel bandı 5431 bç büyüklüğünde görülmektedir.

Bu işlemlerden sonra ligasyon işlemi gerçekleştirlmiş ve oluşturulmuş olan rekombinat DNA (*Bacillus licheniformis* C11 keratinaz geni ve pET22b(+) plazmidinden oluşmuş), kompetent *E.coli* (Rosetta-gami (DE3)pLysS) suşuna tranformasyon ile aktarılmıştır.



Şekil 4.72. Restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel analizi

Transformasyon işleminin ardından transforme olmuş hücreler üzerine +4 °C'de soğutulmuş 1 ml LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C'de 150 rpm'de 45-60 dakika rejenerasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra, 25-100'er µl transformant karışımı antibiyotik içeren LB agar besiyerine yayma şeklinde aşılanarak 37°C'de 1 gece karanlık ortamda inkübe edilmiştir (Şekil 4.73).



Şekil 4.73. Amp^{+}, Cam $^{+}$LB agar besiyerinde gelişen transformantlar (c11-pet22b(+) plazmidini içeren *E.coli* suşları) ve kontrol

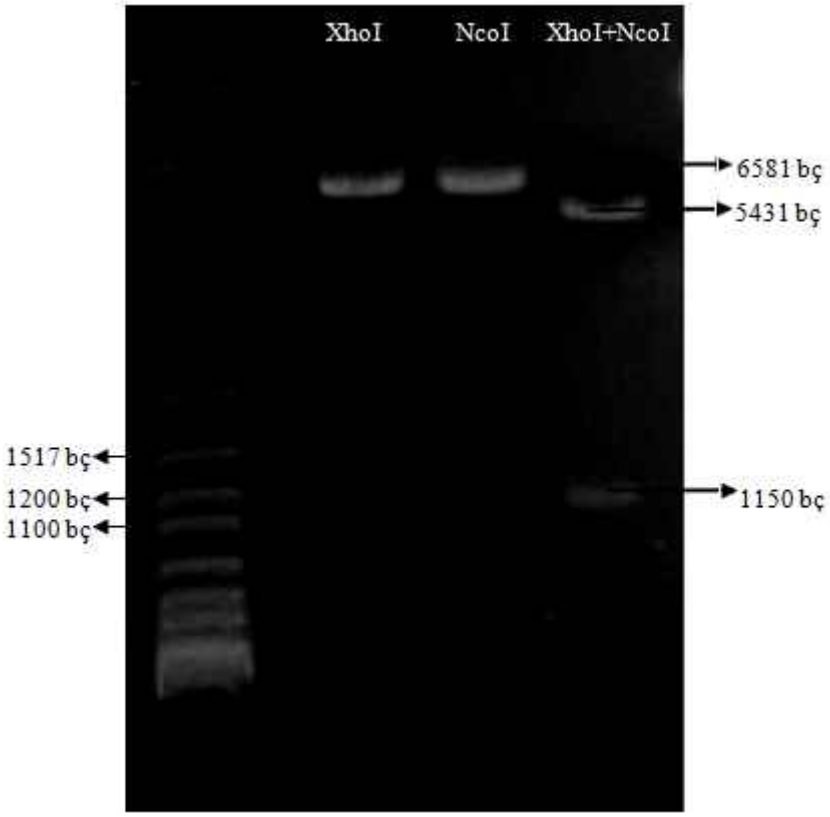
4.8.8. Klonların Seçimi ve Analizi

Bir gecelik inkübasyondan sonra tek düşmüş kolonilerden 10 adet seçilerek 2'şer ml sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de 190 rpm'de karanlık ortamda 1 gece inkübe edilmiştir. Aynı kolonilerden daha sonra kullanılabileceği (pozitif örnekler) öngörüsü ile antibiyotikli katı besiyerine aşılama yapılarak (aynı numara ile) aynı koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon sonunda her bir koloniye ait kültürden 1.5 ml alınarak eppendorf tüplere aktarılmıştır ve 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletlerden "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Promega" kiti kullanılarak plasmid izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Transformantlardan saflaştırılan rekombinant DNA yapıları restriksiyon enzimleri ile kesilerek %1'lik agaroz jelde (100-120V, 35-45dk) yürütülmüş ve büyüklükleri 5431 bç ile 1150 bç'inden oluşan iki band elde edilmiştir (Şekil 4.74). Kesme işleminde XhoI, NcoI ve XhoI+NcoI enzimleri kullanılmıştır. Rekombinant DNA'nın XhoI ve NcoI enzimlerinden birisi kullanılarak yapılan kesme sonunda agaroz jelde elde edilen bandların büyüklükleri 6581 bç olarak bulunmuştur. Bunun nedeni tek bir enzimle kesildiğinde sirküler rekombinant DNA'nın sadece açılması olup fraksiyona ayrılmamasıdır. İki enzimin birlikte kullanıldığı kesme işlemi sonunda ise agaroz jel analizi ile 5431 ve 1150 bç büyüklüğe sahip iki band elde edilmiştir. Bu sonuç rekombinant DNA'ya

keratinaz geninin orijinal büyüklüğünde yerleştirildiğini ve transformasyonun gerçekleştirildiğini göstermektedir (şekil 4.74).

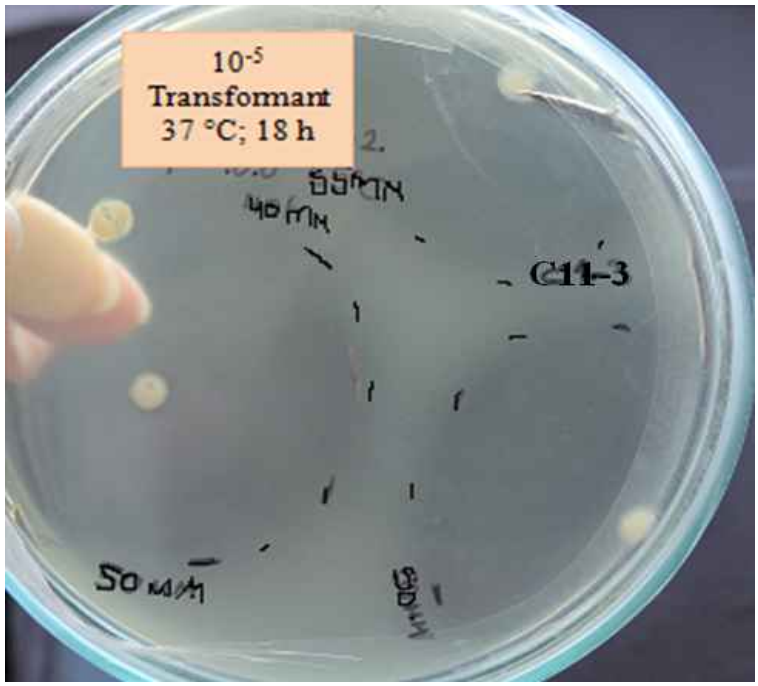


Şekil 4.74. Transformant hücreden izole edilen rekombinant DNA'nın enzimlerle kesilmesi sonucu ortaya çıkan bandların görünümü

4.8.9. Rekombinant Suşların Keratinli Katı Besiyerinde Analizi

Plazmid izolasyonu ve jel analizi sonucunda pET22b-c11 ile transforme olduğu saptanan suşlardan biri seçilerek (c11-3 klonu) stoğundan 10 ml'lik Amp^+, Cam^+ içeren pH 7.0 LB besiyerine inoküle 1 gecelik kültür hazırlanmıştır. Daha sonra içerisinde antibiyotik, skim-milk ve 1 mM IPTG bulunan LB agar besiyerine yayma şeklinde ekimi yapılmıştır (IPTG ve Antibiyotikler besiyeri 50'ye su banyosunda soğtulduktan sonra ilave edilmiştir.) ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri % 10'luk TCA ile yıkanarak koloni etrafında görülen şeffaf zona göre pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil.4.75.).

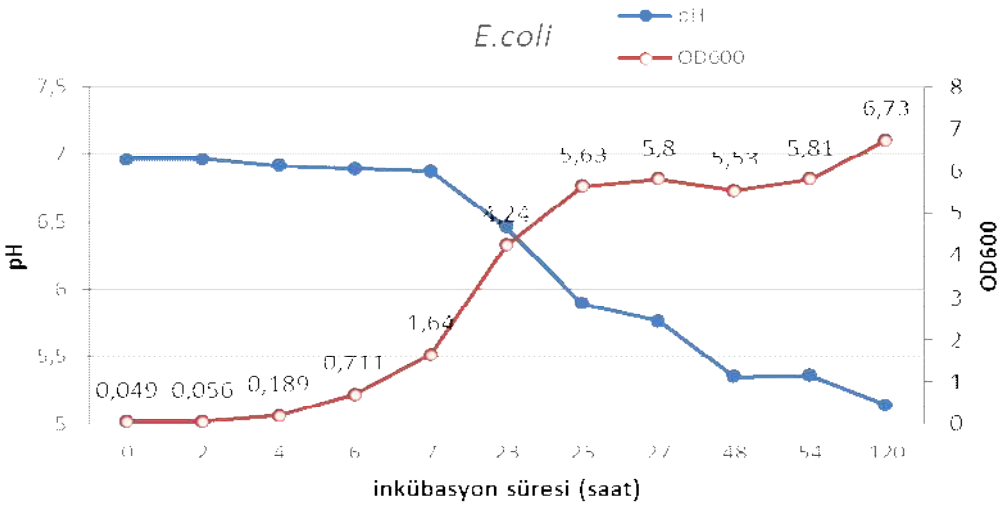
Rekombinant DNA izolasyonu, enzimlerle kesim ve agaroz jel analizinde pozitif sonuç elde edilen suşun katı besiyerindeki örneği kullanılarak 10 ml'lik Amp^+ ve Cam^+ içeren pH 7.0 LB besiyerine inoküle edilerek 1 gecelik kültür hazırlanmıştır. İnkübasyon sonunda kültürden tek koloni düşecek şekilde sulandırma yapılarak içerisinde Amp^+ ve Cam^+ antibiyotikleri, 1 mM IPTG ve skim milk bulunan LB agar besiyerine yayma ekim yapılarak (IPTG ve Antibiyotikler besiyeri 50°C'ye su banyosunda soğutulduktan sonra ilave edilmiştir.) 37 °C'de 18 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni etrafında görülen şeffaf hidroliz zonuna göre pozitif/negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil.4.75.) Besiyerinde üreyen C11-3 klonuna ait kolonilerin etrafında ortalama 55, 50, 50 ve 40 mm hidroliz zonu meydana gelmiştir. Bu sonuç transformant organizmanın proteolitik (keratinolitik) özelliği kazandığının göstergesidir.



Şekil 4.75. C11-3 Rekombinant Suşun Skim-milk Katı Besiyerindeki Proteolitik Hidroliz Zonları

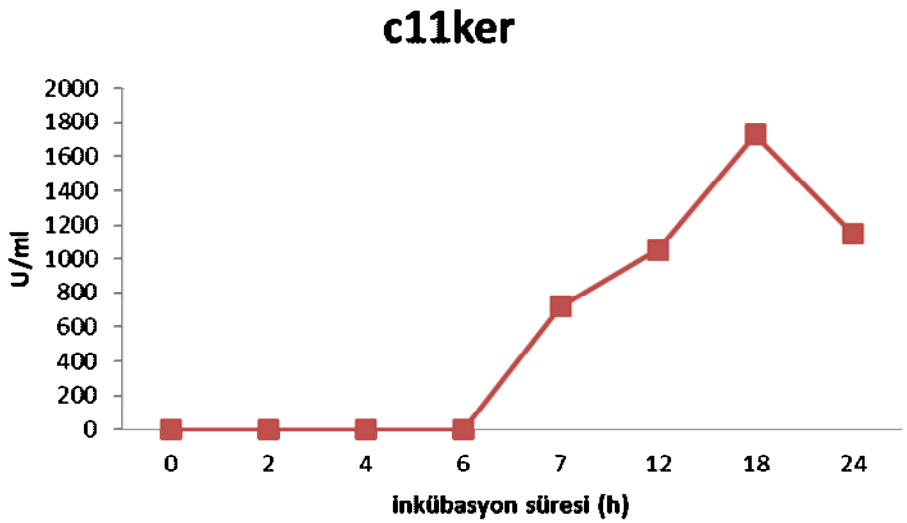
4.8.10. pET22b-*Bacillus licheniformis* C11 (Keratinaz) Rekombinant Proteinin Ekspresyonu

Transformant organizmanın LB besiyerinde bir gecelik inkübasyonundan sonra kültürde OD_{600} değeri 2.85 olarak saptanmıştır. Başlangıç bakteri sayısının istenilen değerde olması için (OD_{600} 0.05) OD_{600} değeri 2.85 değerine sahip kültürden 1750 µl alınarak içerisinde uygun antibiyotikler bulunan 2x100 ml'lik LB besiyerine aktarılmış ve 37°C'de 190 rpm'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sıfırıncı saatten başlamak üzere 2 saatte bir 600nm'de absorbans değerleri okunmuştur (Şekil 4.76). İnkübasyon başlangıcında 7.0 olan besiyeri pğH değeri yedinci (7) saate kadar stabilitesini korurken ortamdaki bakteri yoğunluğu aynı dönemde 1.64 değerine ulaşmıştır. Ortam pH değeri yedinci saatten sonra azalmaya başlamış ve 120'inci saatte pH 5.0 e düşmüştür. Buna karşılık ortamdaki bakteri yoğunluğu 120'inci saatte 6.73 değerine ulaşmıştır (Şekil 4.76). IPTG'nin indükleme koşulu pH 7.0 olduğundan üreyen organizma değeri 0.7 e ulaştığında (yaklaşık 6'ıncı saat ve pH 7.0) ortama 0.4 mM IPTG eklenmiş ve ortama steril edilmiş %1.5 oranında tavuk tüyü eklenmiştir. Tavuk tüylü ortamda gerçekleşen enzim sentezinin ne zaman başladığı ve nekadar üretildiğini saptamak için 0-6 saat aralığında (2 saatte bir), ve 7, 12, 18 ve 24'üncü saatlerde örnek alınarak enzim aktivitesine bakılmıştır (Şekil 4.77).



Şekil 4.76. Transformant suşun üreme ve besiyeri pH'sındaki değişim grafiği

Enzim üretimi IPTG ile indüklenene kadar (0-6 saat) herhangi bir farklılık göstermezken, 7.ci saatte yaklaşık 800 U/ml, 12.ci saatte 1100 U/ml, 18.ci saatte 1728 U/ml değere ulaşmış, 24.cü saat ise 1150 U/ml değere düşmüştür. Bu sonuç orijinal suşa göre rekombinant suşta enzim üretiminin yaklaşık 3.3 kat arttığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre enzimin en fazla üretildiği zaman 18.ci saat olarak bulunmuştur. En yüksek üretimin gerçekleştiği zamanda ortamdan elde edilen enzim kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır (3.2.5.14).



Şekil 4.77. c11ker geninin ekspresyonu

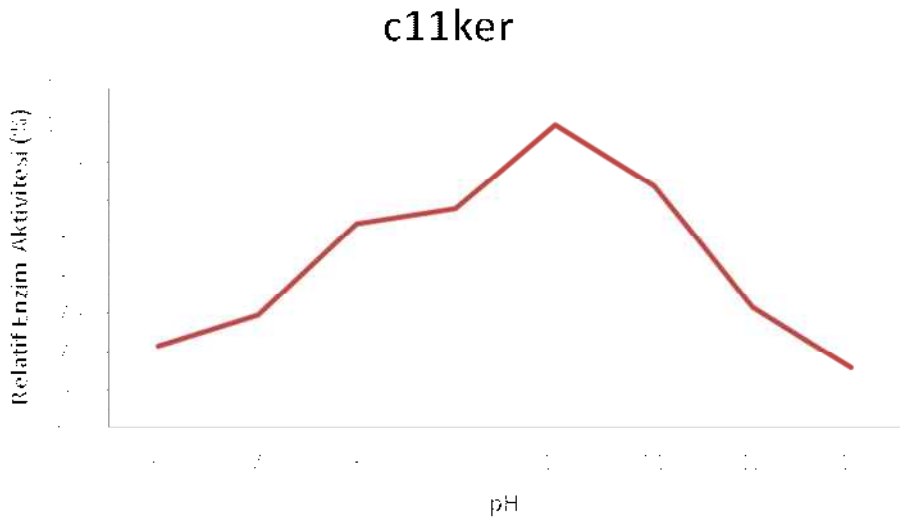
Radha ve ark. 2009, *Bacillus licheniformis* MKU3 suşunun keratinaz genini *Bacillus megaterium* MS941 suşuna klonladıklarında enzim üretiminin ana suşa göre 3 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

4.8.11. Rekombinant Suşlardan Elde Edilen Keratinaz Enzimlerinin Biokimyasal Karakterizasyonu

4.8.11.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Hazırlanan enzim substrat (Na-fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Borax-NaOH (pH 11.0-12.0)) karışımları enzimin üretildiği sıcaklıkta 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmış ve standar aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler sonunda *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enzimi için pH 6.0'da %71, pH 7.0'de % 75, pH 8.0'de %87, pH 9.0'da %89, pH 10.0'da %100, pH 11.0'de 92, pH 12.0'de %76 ve pH 13.0'de %68 relatif enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum aktivite pH 10.0 da elde edilirken bütün pH değerlerinde ortalama %83 aktivite saptanmıştır. Bulgular Şekil 4.78.'te verilmiştir.



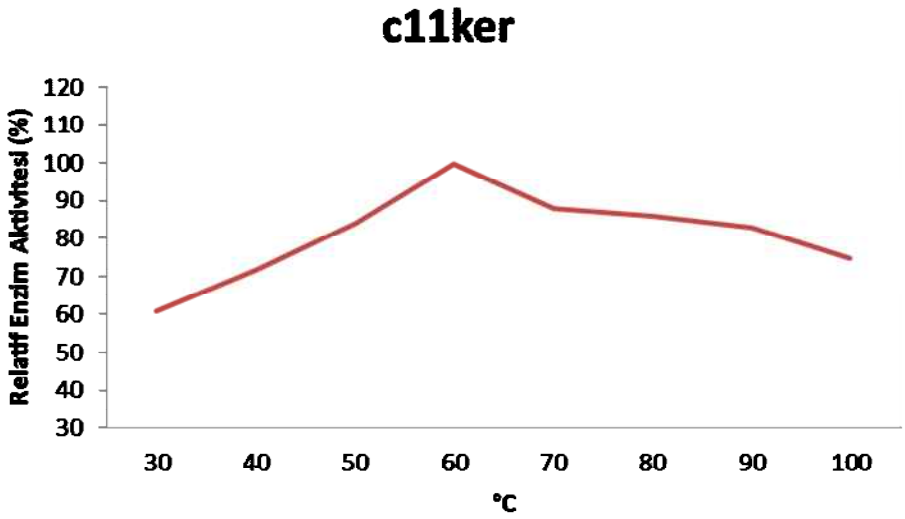
Şekil 4.78. c11ker enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri

Verilere göre rekombinat suştan elde edilen enzimin optimum pH değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

4.8.11.2. *Bacillus licheniformis* C11 Rekombinant Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Aralığına Ait Bulgular

c11ker enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması amacı ile 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100ºC'lik sıcaklık değerlerinde 60 dk inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart enzim aktivitesi analizi yapılarak enzimin en fazla reaksiyon ürünü oluşturduğu sıcaklık saptanmıştır.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda 30 ºC ‘de %61, 40 ºC’de %72, 50 ºC’de %84, 60 ºC‘de 100, 70 ºC’de %88, 80 ºC’de %86, 90 ºC’de %83 ve 100 ºC’de %75 düzeyinde aktivite değeri elde edilmiştir. Rekombinant suştan izole edilen alkaline keratinaz enzimi optimum aktivitesini 60 ºC’de göstermekle birlikte 30-40 ºC aralığında ortalama %66, 70-100 ºC aralığında ise %83 relatif aktivite göstermiştir. Elde edilen bulgular şekil 4.79’da grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.79. c11ker enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri

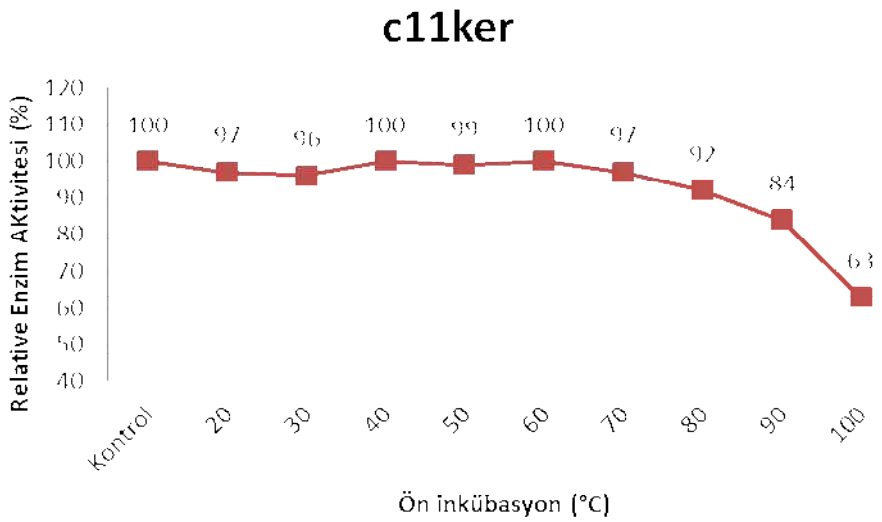
Bu sonuçlar rekombinant suştan elde edilen enzimin optimum sıcaklık değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

4.8.11.3. c11ker Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular

Rekombinant suştan üretilen alkaline, termofil keratinaz enzimine 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C sıcaklık değerlerinde 60 dk süreyle ön inkübasyon işlemi uygulanmış ve standart enzim aktivitesi analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Suneetha ve ark. 2011).

Rekombinant suştan elde edilen keratinaz enziminin analizi sonunda enzim aktivitesinin 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ºC sırası ile %97, %96, %100, %99, %100, %97, %92, %84, ve %63 oranında korunduğu saptanmıştır. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen sıcaklıklarda 90 ºC dereceye kadar orijinal aktivitesini

minumum %84 oranında korurken, 100 ºC'de kalan aktiviteyi değeri %63 olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler şekil 4.80' de gösterilmiştir.



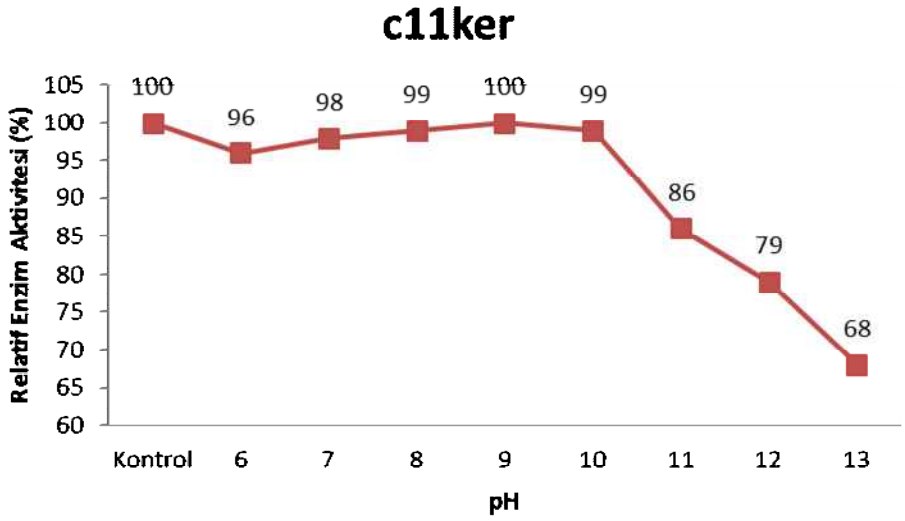
Şekil 4.80. c11ker enziminin termal stabilite değerleri

Bu sonuçlar rekombinant suştan elde edilen enzimin ön inkübasyon için seçilen sıcaklık değerlerinde ana suşa göre bir değişiklik olmadığını göstermekte ve enzimin termostabil özelliğinin değişmediğini ortaya koymaktadır.

4.8.11.4. c11ker Enziminin pH Stabilitesine Ait Bulgular

pH stabilitesinin saptanması için, enzim örneğinden 2 mL alınarak 11000 devirde 5 dk santrifuj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra örnek üzerine aynı miktarda tampon eklenerek (pH'sı 6.0-13.0) enzim süspanse edilip 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Orijinal aktivite analizinden elde edilen değer (100 olarak kabul edilmiştir) ve ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki fark enzimin relatif pH stabilitesi olarak değerlendirilmiştir (Suneetha ve ark. 2011; Tamılmanı ve ark., 2008).

Elde edilen verilere göre; C11-rekombinant suşundan elde edilen keratinaz enziminin pH 7.0-10.0 arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %98, pH 11.0, 12.0 ve 13.0 değerinde ise sırasıyla % 86, 79 ve 68 koruduğu tespit edilmiştir. Veriler şekil 4.81'de gösterilmiştir.



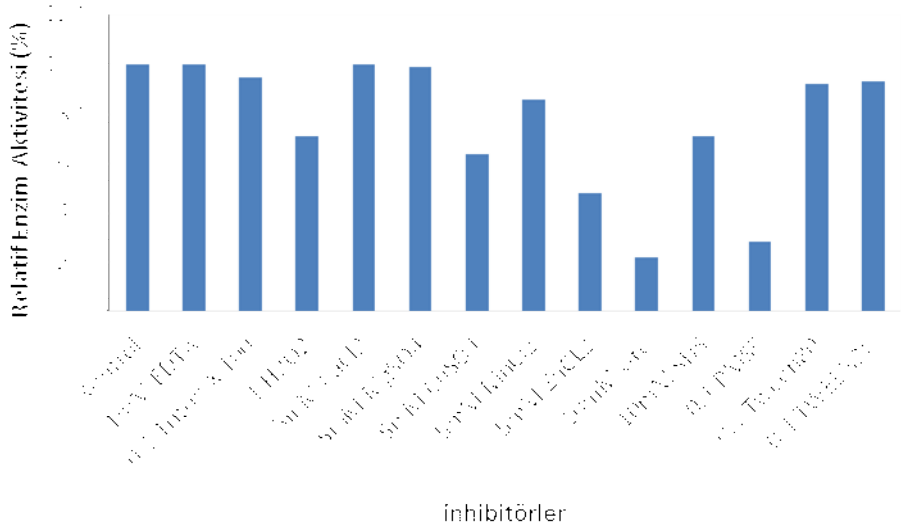
Şekil 4.81. c11ker enziminin pH stabilite değerleri

Rekombinant suştan elde edilen keratinaz enzimi pH 10.0 a kadar stabilitesini yaklaşık %100 yakın korurken, pH 11.0-13.0 aralığında stabilite giderek düşmüş ve pH 13.0 de %68 olarak ölçülmüştür. Enzim 24 saat süreyle alkali pH değerlerinde güçlü bir stabiliteye sahiptir. Bu özellikleri dikkate alıdığında özellikle deterjan formülasyonunda (deterjan uygulamalarında pH değeri 9.0-10.0 aralığındadır) uygun bir enzimdir.

4.8.11.5. c11ker Enzim Aktivitesine Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların Etkisi

Çeşitli İnhibitör, Şelatör, Metal iyonları ve Deterjanların varlığında 60 dakika 55 ºC sıcaklıkta ön inkübasyon yapılmıştır. Elde edilen bulgular şekil 4.82'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Rekombinant suştan elde edilen enzimle yapılan aktivite analizlerinde kullanılan inhibitör ve kimyasalların orijinal suştan elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.82. Çeşitli inhibitörlerin c11ker Keratinaz aktivitesi üzerine etkisi

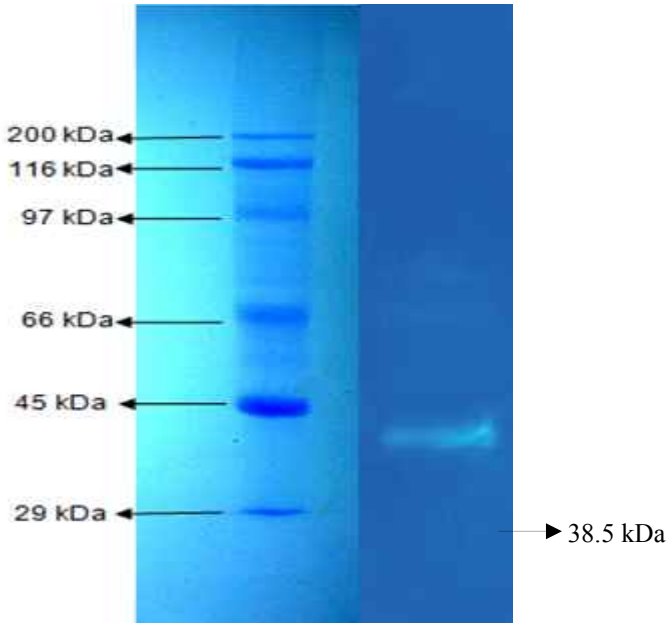
4.8.11.6. c11ker Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Sonuçlar

c11ker keratinaz enziminin %0,1 skim-milk içeren %12'lik SDS-PAGE sistemi kullanılarak zimogram analizi gerçekleştirilmiştir.

c11ker keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda 38.5 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandı elde edilmiştir.

Rekombinant enzim doğal enzimden farklı olarak 38.5 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandı şeklinde gözlenmiştir. Doğal suştan elde edilen enzimde 97, 60 ve 40.9 kDa ağırlığında üç band ile recombinant enzime ait tek band karşılaştırıldığı zaman 97 ve 60 kDa ağırlığındaki bandların kaybolduğu görülmektedir. Bu sonuç klonlama ile aktarılan keratinaz geninin gerçekte doğal suştan elde edilen enzim örneğindeki üçüncü banda karşılık geldiğini düşündürmektedir. Diğer iki band (özellikle yüksek aktivite gösteren 97 kDa ağırlığındaki band) keratinolitik özellik göstermeyen proteaz enzimlerine ait olabilir.

Radha ve ark., *Bacillus licheniformis* keratinaz genini *Bacillus megaterium* MS 941 ticari konak hücresine klonlamışlardır. Üretip afinite kromatografisiyle saflaştırdıkları recombinant enzimin moleküler ağırlığını 39kDa olarak saptamışlardır.



Şekil 4.83. c11ker keratinaz enziminin zimogram analizi

Hu ve ark., *Bacillus licheniformis* keratinaz genini sırasıyla pET30α ve pET32 α vektörleri ile *E.coli*'ye klonladıklarında elde ettikleri recombinant enzimlerin moleküler ağırlıklarını sırasıyla 45 kDa ve 55kDa olarak saptamışlardır.

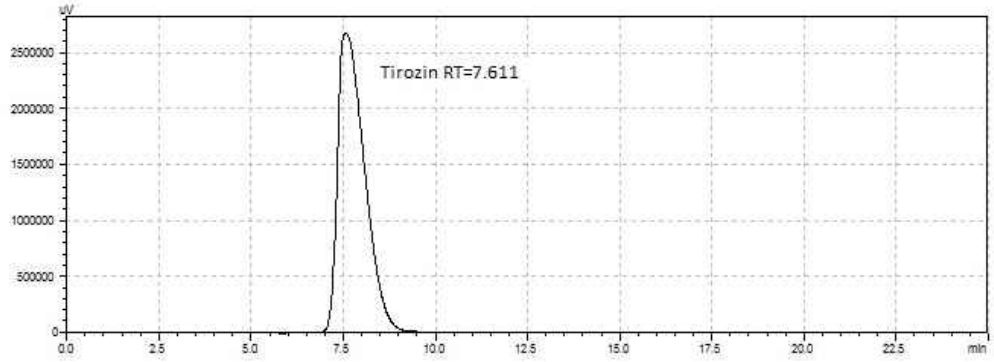
Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 35 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Lin ve ark. (1992), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 33 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tamilmani ve ark. (2008), *Bacillus licheniformis* ürettiği keratinazın karekterizasyonunu yapmışlardır. Tuzla çöktürme, diyaliz ve kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığının 35 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir.

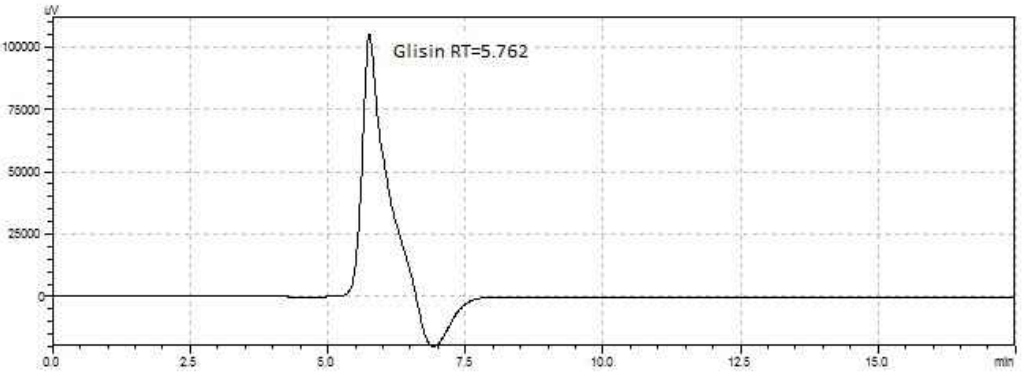
Literatür verileri değerlendirildiğinde C11 rekombinant suşundan elde edilen serin keratinaz enzimi literature bilgileri ile oldukça uyum içerisindedir. Literatürlerde *Bacillus licheniformis* türüne ait keratinaz enziminin 30-35 kDa arasında değiştiği görülmektedir. Rekombinant enzimimizden elde edilen zimogram sonucu (38.5 kDa) literatur ile uyumludur.

4.8.11.7. Ham Tavuk Tüyünün Rekombinat Keratinaz İle Muamelesi Sonucunda Elde Edilen Hidroliz Ürününün HPLC Analizi

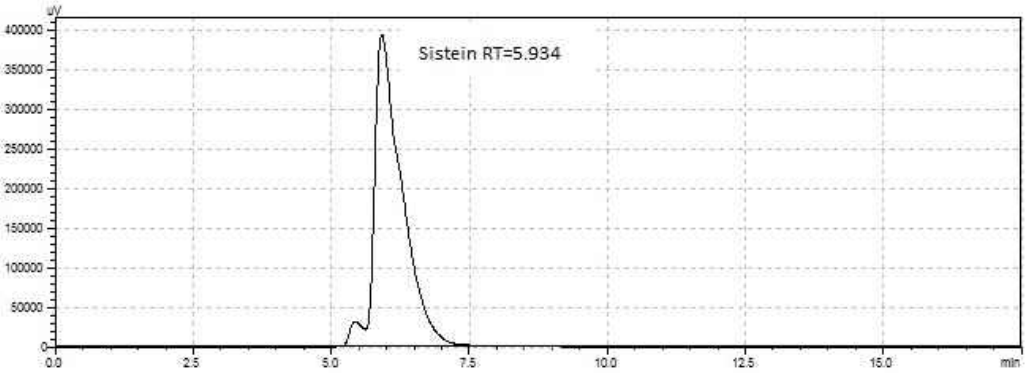
Reaksiyon ürünü % 1'lik tavuk tüyü solüsyonu içeren optimum pH'daki tampon+enzim karışımının 15 ve 30 dk saatlik optimum aktivite sıcaklığındaki inkübasyonu sonunda elde edilmiştir. Rekombinat keratinaz enzimi HPLC yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuk tüyünün standart olarak kullanılan amino asitler dikkate alındığında çok büyük oranda tirosine ve prolin, sistein amino asitlerine hidroliz edildiğini göstermektedir. Şekil 4.84'de %1'lik standart tirozin, şekil 4.85'de %1'lik standart glisin, şekil 4.86.'da %1'lik standart sistein ve şekil 4.87'de %1'lik standart prolin çözeltilerinin HPLC analiz sonuçları verilmektedir. Tirozin standartı için tek pik görülürken sistein de alıkonma zamanları çakışan biri diğerinden oldukça küçük (alıkonma süresi 5.5 dk) dalgalı pik görülmüştür. Aynı şekilde prolin standartı içinde söz konusudur. Prolin dede alıkonma zamanları çakışan biri diğerinden oldukça küçük (alıkonma süresi 5.5 dk) dalgalı pik görülmüştür. Rekombinant keratinaz enzimi ile tavuk tüyü solüsyonundan farklı reaksiyon süresi sonunda elde edilen ürünümüzün HPLC ile alınan ölçüm sonuçları şekil 4.88 ve 4.89'da gösterilmiştir. Şekil 4.84, şekil 4.85, şekil 4.86 ve şekil 4.87'den de görüleceği gibi sırasıyla glisin, sistein ve prolinin alıkonma süreleri (alıkonma süresi 5.5 dk) birbirine çok yakın olması nedeniyle reaksiyon ürününün HPLC sonucunda prolinin alıkonma süresine denk gelen bölgede görülen küçük glisin ve sistein pikinin proline ait olan pik tarafından çakışmasıyla kapatıldığı düşünülmektedir. Reaksiyonun 15. dakikasında elde edilen alıkonma süresi 12.5 olan pikin oligopeptidlere ait olabileceği düşünülmektedir. Söz konusu pik reaksiyonun 30. dakikasında kaybolurken tirosin ve prolin, sitein, glisine ait piklerde artış olduğu ve alıkonma süresi 13 dk olan (standartlarda olmayan bir aminoasite ait olduğu düşünülen) bir pik gözlemlenmektedir. Ana suş için yapmış olduğumuz TLC (ince tabaka kromatografisi) sonuçlarında reaksiyon ürünü olarak büyük oranda tirozin, prolin, glisin ve sistein aminoasitlerinin saptanması HPLC analizinden elde ettiğimiz bulgularla uyumluluk içerisinde olduğu görülmektedir.



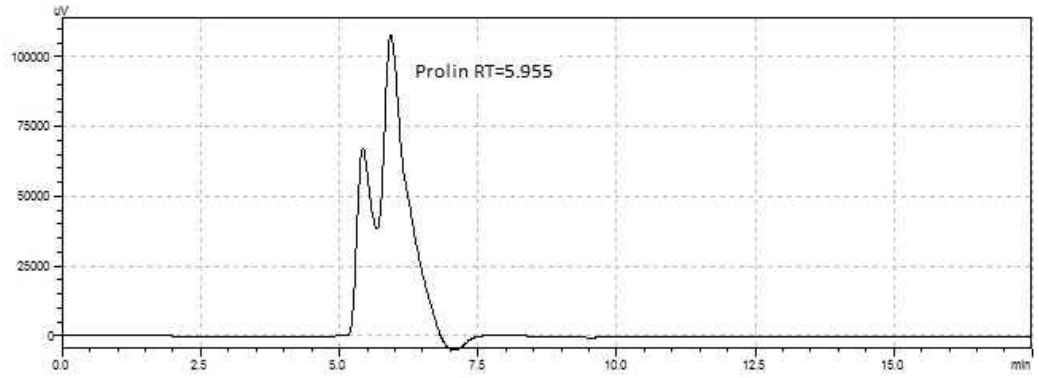
Şekil 4.84. %1'lik (w/v) tirozin standartı için HPLC analiz sonucu



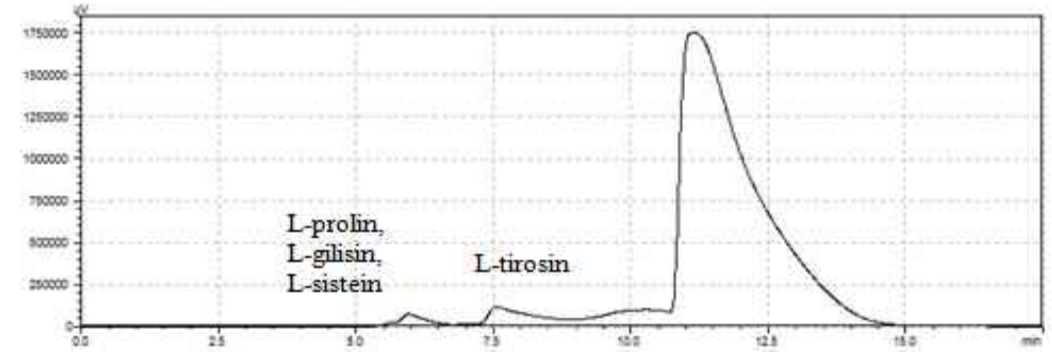
Şekil 4.85. %1'lik (w/v) glisin standartı için HPLC analiz sonucu



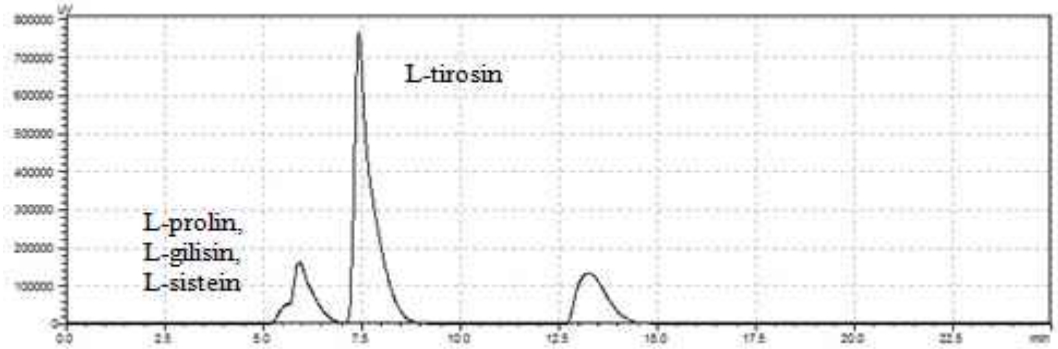
Şekil 4.86. %1'lik (w/v) sistein standartı için HPLC analiz sonucu



Şekil 4.87. %1'lik (w/v) prolin standartı için HPLC analiz sonucu



Şekil 4.88. 100 µl (7.5 mg/ml ;1728 U/ml) β-keratinaz ile 900 µl %1'lik keratin çözeltisi (w/v), reaksiyon süresi 15 dk



Şekil 4.89. 100 µl (7.5 mg/ml ;1728 U/ml) β-keratinaz ile 900 µl %1'lik keratin çözeltisi (w/v), reaksiyon süresi 30d k

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan araştırmalar, giderek önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışındaki diğer ülkeler bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar (Saraçoğlu, 2010).

Alkalifilik özellikteki organizmalar, prokaryot, eukaryot ve archea grubu içerisinde yer almaktadırlar. Alkalifiller arasında çok değişik taksonomik gruplar olmakla birlikte, bunların bazıları taksonomiye yeni girmişlerdir. Alkalifiller, bahçe toprağı gibi normal çevresel ortamlardan izole edilebileceği gibi, yüksek alkalik özellik gösteren topraklardan da izole edilebilirler. Alkalofilik enzimler endüstriyel uygulamalarda büyük öneme sahiptirler.

Alkaline selülaz, alkaline proteaz ve alkaline amilaz gibi alkalofilik organizmalardan izole edilen enzimler, çeşitli deterjanların içerisine karıştırılmışlar ve biyolojik deterjanlar şeklinde tanımlanmışlardır. Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin %30 dan büyük kısmı çamaşır deterjanları içerisine karıştırılarak değerlendirilmektedir (Horikoshi, 1996). Alkalifilik amilaz, selülaz ve proteazlar aynı zamanda endüstrinin diğer birçok alanında da yoğun şekilde değerlendirilmektedirler.

Alkalin proteazlar nötral-alkalin ortam pH'sına doğru aktif olan enzimler olarak tanımlanırlar. Bu enzimler bakteri, küf ve mayaları içeren mikroorganizmaların büyük bir kısmı tarafından üretilirler. Singh ve ark., 2001). Bakteri orijinli alkali proteolitik enzimler dünyadaki endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 60'ını oluşturan çok önemli endüstriyel enzimlerdir (Enshaasy ve ark., 2008). Bu enzimler biyoteknolojinin bir kaç alanında bir çok uygulamaya sahip olup biyokimyasal farklılıkları nedeniyle tabakhane (deri endüstrisi), gıda endüstrisinde, tıbbi formülasyonlarda, deterjanlarda, atık arıtma işlemlerinde, gümüşün tekrar elde edilmesinde ve aminoasit karışımlarının ayrıştırılması gibi bir çok endüstride geniş kullanım alanları vardır (Gupta ve ark., 2002; Agrawal ve ark., 2004).

Bir çok farklı organizmadan enzim üretimi gerçekleştirilse de mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta üretilmeleri gibi avantajlara sahip olması enzim teknolojisinde nerdeyse tek kaynak oluşturmalarına neden olmuştur. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler. (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. Örneğin ticari olarak üretilen ve kullanılan alkalin ve termostabil proteaz enzimlerinin üretilmelerinde *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* en çok kullanılan iki *Bacillus* türüdür (Lin ve ark., 1998). *Bacillus sp.* suşları, proteolitik enzimler ve karbohidratazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar.

Doğal suşların ürettikleri enzim miktarı düşük olduğundan, suşların geliştirilmesi ve besiyerinin optimizasyonu yapılarak enzim miktarının arttırılması sağlanabilir. Endüstriyel suş geliştirilmesi mikrobiyal fermentasyon işlemlerinin ticari gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır. Enzim üreticilerinin geliştirmiş olduğu suşlar, önemli bir sermaye harcaması olmadan etkili bir üretim için en büyük fırsatı sunmaktadır. Bu fırsat seçilen suşun, minimum düzeyde hammadde kullanarak en yüksek oranda enzim sentezi gerçekleştirdiğinde elde edilebilmektedir (Bisht ve ark., 2012).

Keratinolitik proteazlar bakteri (Williams ve ark., 1990) ve mantarların (Friedrich ve ark., 1999) keratin parçalayan türleri tarafından üretilen proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler tavuk tüyü, insan ve hayvan saçı, hayvanların boynuz ve yünlerinde bulunan çözülmez bir protein olan keratini parçalama özelliğine sahiptirler (Onifade ve ark., 1998). Keratinolitik proteazların çoğu sadece keratini hidrolize eder, fakat *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen keratinolitik proteaz gibi bazı enzimler birkaç protein substratlarını da hidroliz etme özelliğine sahiptir (Lin ve ark., 1992).

Keratinolitik enzimler keratinler üzerinde aktiftir (Rao ve ark., 1998). Ancak keratinolizisin tam mekanizması tamamen anlaşılamamıştır. Keratinolitik mikroorganizmaların tüm keratini parçalama verimliliğinin var olması sadece

keratinolitik proteazın kullanımıyla değildir, burada aynı zamanda bu organizmalar tarafından üretilen keratinolitik proteazlar ve disülfit redüktazların birlikte etki göstermesindendir.

Disülfit bağlarını indirgeyen faktörlerin varlığında keratin kullanan mikroorganizmalar var olsa da keratin parçalaması ile ilgili olan disülfit bağlarını indirgeyen enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonuna kimse odaklanmamıştır (Yamamura ve ark., 2002). Vibrio kr2 suşu ile tüy keratini kullanılarak yapılan hidroliz işleminde tiol oluşumunun disülfit redüktaz varlığında gerçekleştiği bildirilmiştir. (Sangli ve Brandelli, 2000).

Enzim üretimi için seçilen suşlardan biri olan *Bacillus* sp. C11 suşu pH 10.0 da 55 ºC de en yüksek aktivite (%100) gösterirken, pH 9.0-12.0 aralığında 45-65ºC aralığında ortalama %93 aktivite göstermiştir. *Bacillus* sp. C11 suşunun 40 ºC'nin altındaki sıcaklık değerlerinde ve pH 7.0'nin altı ile 12.0 nin üzerindeki değerlerde ise hemen hemen hiç üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir.

Streptomyces sp. C1 suşu ise pH 11.0 de 60 ºC de en yüksek aktivite (%100) gösterirken, pH 9.0-12.0 aralığında 40-60ºC ortalama %90 aktivite göstermiştir. *Streptomyces* sp. C1 suşunun 40 ºC'nin altındaki sıcaklık değerlerinde ortalama %50 aktivite gösterdiği fakat pH 7.0'nin altında ve 12.0 nin üzerinde değerlerinde ise hemen hemen hiç üremediği ve enzim sentezi gerçekleştirmediği belirlenmiştir.

Bacillus licheniformis C11 suşunun enzim üretim optimizasyonu yapıldığı zaman, optimum inokülasyon miktarı 0.2 ($1{,}6x10^8$ bak./ml), inkübasyon süresi 96 saat (4. gün), inkübasyon sıcaklığı 55°C ve inkübasyon başlangıç pH değeri 10 olarak bulunmuştur. Fermentasyon sonunda en yüksek enzim üretimi (520 U/ml), açığa çıkan toplam protein karışımı 2.83 mg/ml olarak saptanmıştır.

Streptomyces fradiae C1 suşunun enzim üretim optimizasyonu yapıldığı zaman, optimum inokülasyon miktarı 0.1 ($8x10^7$ bak./ml), inkübasyon süresi 120 saat (5 gün), inkübasyon sıcaklığı 60°C ve inkübasyon başlangıç pH değeri 11 olarak bulunmuştur. Fermentasyon sonunda en yüksek enzim üretimi (468 U/ml), açığa çıkan toplam protein karışımı 2.83 mg/ml olarak saptanmıştır.

Katı ve sıvı besiyerindeki üreme ve enzim sentezleme yeteneği göz önünde tutularak enzim üretimi için seçilen *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait keratinaz enzimi optimum katalitik aktivitesini pH 10.0'de gösterirken Ayrıca hem asidik (pH 6.0 da %65) hem de ekstrem alkali (pH 13.0 de %72) pH değerlerinde yaklaşık ortalama %69 aktiviteye sahip olması, özellikle alkali pH değerlerinde ortalama %90 aktivite göstermesi, enzimin asido-alkalofilik ekstremofil enzim özelliği taşıdığını göstermektedir. Bu özelliği enzimin kullanım alanını oldukça genişletmektedir. Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında çalışmada izole edilen *Bacillus licheniformis* C11 suşundan üretilen keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve pH aralıkları ile literatürde verilen proteaz enzimleri ile uygunluk gösterirken, keratinolitik proteazlardan çok daha başarılı özelliğe sahiptir.

Endüstriyel enzimlerin ekstrem koşullarda kullanılmaları bir çok farklı alana uygulanmalarının yolunu açmıştır. Özellikle optimum aktivite sıcaklığının yüksek olması deri ve deterjan gibi bir çok endüstri kolunda aranılan özelliktir.

Streptomyces fradiae C1 enzimi ile yapılan optimum pH çalışmalarında Optimum aktivite pH 11.0' de elde edilirken bütün pH değerlerinde ortalama %78.8 aktivite saptanmıştır. Enzim pH 9.0-12.0 aralığında ortalama %92 gibi yüksek bir aktivite değerine sahiptir. Bu özellik enzimin pH 9.0'dan sonraki değerlerde çok daha başarılı reaksiyon gerçekleştirdiğini göstermektedir. Enzim bu özelliği nedeni ile diğer keratinaz enziminiz *Bacillus licheniformis* C11 den farklı olup ekstrem alkali özelliğe sahiptir. Literatür örnekleri (özellikle *Streptomyces*) ile izolasyonu ve karakterizasyonu karşılaştırılan keratinaz enzimimiz, optimum aktivitesinin pH 11.0 olması ile farklılık göstermektedir.

Bacillus licheniformis C11 suşundan izole edilen alkaline keratinaz enzimi optimum aktivitesini 60 ºC'de göstermekle birlikte 30-40 ºC aralığında ortalama %69.25, 70-100 ºC aralığında ise %87 relatif aktivite göstermiştir. Bütün sıcaklık değerleri birlikte değerlendirildiği zaman enzim aktivitesi ortalama %85.6 olarak bulunmuştur. Çalışmada izole edilen *Bacillus* licheniformis C11 suşundan üretilen alkalin keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri literatür verileriyle karşılatırıldığında literatür verileriyle tam bir uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Literatürlerde Gosh ve ark (2008), *Bacillus cereus* DCUW suşundan izole ettikleri alkalin keratinazın optimum sıcaklığını 50°C olduğunu saptamışlardır. Yoshioka ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* MSK103'ten izole ettikleri alkalin keratinazın optimum sıcaklığını 60-70°C aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Mieko ve ark (2006), termofilik ve alkalifilik *Bacillus pseudofirmus* susundan, termofil alkalin keratinaz saflastırmıstır. Bu enzimin kazein hidrolizi için optimum sıcaklıgının ise 60°C olduğunu saptamışlardır. Fakhfakh ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* R Pk suşundan izole ettikleri serin proteaz olduğu belirledikleri keratinazın optimum sıcaklığını 60 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen enzimin optimum sıcaklığının 70 ºC olduğu saptanmıştır. Çalışmada izole edilen *Streptomyces fradiae* C1 suşundan üretilen alkalin keratinaz enzimi optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri literatür verilerinden daha yüksek (70°C) değere sahiptir. Enzim ekstrem alkali termofil özelliktedir.

Literatülerde, Syed ve ark. (2009), *Streptomyces* sp. suşundan izole ettikleri keratinaz enziminin optimum sıcaklıgının 60°C olduğunu belirtmişlerdir. Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. türünün üretmiş olduğu keratinaz enziminin 45 °C'de optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bressolier ve ark (1999), *Streptomyces albidoflavus'* tan üretmiş oldukları alkalin serin keratinazın optimum aktivitesini 40-70 °C olduğunu bildirmişlerdir. Böckle ve ark (1995), *Streptomyces pactum'* tan üretmiş oldukları alkalin serin keratinazın optimum aktivitesini 40-75 °C olduğunu bildirmişlerdir. Chitte ve ark (1999), *Streptomyces thermoviolaceus* tan üretmiş oldukları alkalin keratinazın optimum aktivitesini 55 °C olduğunu bildirmişlerdir. Letourneau ve ark (1998), *Streptomyces* sp. $S.K_{1-02}$ suşundan üretmiş oldukları alkalin keratinazın optimum aktivitesini 70 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enzimi ile yapılan sıcaklık stabilite çalışmalarında orijinal aktivitenin 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ºC de sırası ile %95, %96, %98, %98, %94, %93, %78, ve %56 oranında korunduğu saptanmıştır. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen sıcaklıklarda 90 ºC dereceye kadar orijinal aktivitesini minumum %93 oranında korurken, 100 ºC'de kalan

aktiviteyi değeri %56 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar enzimin termostabil olduğunun göstergesidir. *Bacillus licheniformis* C11 enziminin daha yüksek sıcaklıklara kadar (30-90°C aralığında ortalama 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda original aktivitesini ortalama %93 korumuştur) yüksek düzeyde stabilitesini devam ettirmektedir. Literatür verilerin ile karşılaştırıldığında gerek ön inkübasyon için uygulanan sure ve gerekse daha düşük sıcaklıklarda stabilitenin büyük ölçüde kaybolması (stabilitenin genellikle 50°C düzeylerinde büyük ölçüde kaybolmaktadır) *Bacillus licheniformis* C11 alkaline termofil keratinaz enziminin ayrıcalıklı enzim olduğunu ve gerçek anlamda termostabil olduğunu göstermektedir. Bu nedenler ile *Bacillus licheniformis* C11 keratinaz enzimi ekstrem alkali termofil, termostabil özelliktedir.

Streptomyces fradiae C1'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın 30-70ºC arasındaki sıcaklık değerlinde 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %82'nin üzerinde 80-100ºC değerleri arasında ise %70'in üzerinde koruduğu tespit edilmiştir. Bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığı zaman ortalama stabilite%84.75 olarak gerçekleşmitir. Bu sonuçlar enzimin termostabil özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Literatürlerde, Tatineni ve ark (2008), *Streptomyces* sp. S7 suşundan elde etmiş oldukları alkalin termofil keratinaz enziminin 1 saat farklı sıcaklıklarda ön inkübasyondan sonra 50 C'ye kadar %80 stabil olduğunu 70 C ve üzeri sıcaklıklarda ise tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Letourneau ve ark (1998), Streptomyces sp. S.K1-02'dan elde ettikleri keratinaz enzimin 60ºC'ye kadar stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen keratinaz enzimi Tatineni ve ark. (2008) in izolayonunu gerçekleştirdikleri enzimden oldukça performanslıdır. Literatür verilerine göre yüksek düzeyde termostabil özellik göstermektedir.

Bacillus licheniformis C11'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz enziminin pH 7.0-10.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %98'nin üzerinde, pH 11.0, 12.0 ve 13.0 değerinde ise sırasıyla % 86, 78 ve 62 koruduğu tespit edilmiştir.

Literatürlerde, Fakhfakh-Zourari ve ark (2010), *Bacillus pumilis* A1 suşundan elde ettikleri keratinaz enziminin 40 °C'de 1 saatlik ön inkübasyondan

sonra enzimin pH 6.0-12.0 aralığında %85'ten fazla aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. Nasri ve ark (2006), *Bacillus licheniformis* RP1 suşundan elde ettikleri alkalin proteaz enziminin 40 °C'de 1 saat çeşitli pH aralığında ön inkübasyonundan sonra pH 8.0-10.0 aralığında %100'e yakın stabil iken pH 11.0' %96 ve pH 12.0'de ise %72 aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Literatür araştırmalarında elde edilen bulgularda 11.0 ve 12.0 pH değerlerinde yüksek sıtabilite değerleri bildirilmiş %%100) olmakla birlikte inkübasyon süresini 30 dakika olması, *Bacillus licheniformis* C11 keratinazının 24 saatlik inkübasyon sonunda gösterdiği stabilite karşısında (pH 7.0-12.0 aralığında %92,76) ortaya çıkan etkiyi zayıflatmaktadır. Bu açıdan *Bacillus licheniformis* C11 24 saat gibi oldukça uzun bir süre yüksek düzeyde stabil kalarak alkaline stabil özellik göstermiştir.

Streptomyces fradiae C1'den elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz'ın pH 7.0-12.0 değerleri arasında 24 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini %96.5, pH 13.0 değerinde ise % 77 koruduğu tespit edilmiştir. Tatineni ve ark (2008), Streptomyces sp. S7 suşundan ürettikleri alkalin keratinazın pH 7.0-9.0'arasında stabilitesinin %65'e, pH 5.0-7.0 aralığında %50 düştüğünü fakat pH 9.0-12.0 aralığında ise %80nın üzerinde stabil olduğunu bildirmişlerdir. Literatürlerde, Sreenivasa ve Vidyasagar (2013), Streptomyces albus suşundan ürettikleri alkalin keratinazı 40 C'de 1 saat süreyle pH 4.0-11.0 değerlerinde ön inkübasyonu sonrasında pH 4.0'te %80, pH 5.0 %75, pH 6.0'da %40, pH 10.0'da %60 ve pH 11.0'de %80 aktivitesini kaybettiğini buna karşılık pH 7.0-9.0 aralığında ise aktivitesini %80 ve üzerinde koruduğunu bildirmişlerdir. Literatür verileri farklı zaman sürelerinde dahi *Streptomyces fradiae* C1 suşundan elde edilen keratinaz enziminin gösterdiği pH stabilitesinden oldukça uzaktırlar. İzolasyonu yapılan *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimi yüksek düzeyde pH stabil özelliğe sahiptir.

Gerek *Streptomyces fradiae* C1 ve gerekse *Bacillus licheniformis* C11 suşlarına ait keratinaz enzimleri kendi aralarında aktivite özellikleri açısından farklılıklara sahip olsalarda her ikiside oldukça yüksek düzeyde ve geniş bir pH aralığında 24 saat süreyle oda sıcaklığında stabildirler. Bu özellikleri her iki

enziminde özellikle tavuk tüyü başta olmak üzere bütün keratinli yapıların hidrolizinde öncelikle kullanılabilecek özellikte olduklarını göstermektedir.

Bacillus licheniformis C11 suşundan elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz enziminin %3-20 NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ortalama %93.5 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar enzimin halofilik özellikte olduğunu göstermektedir.

Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen kısmi saflaştırılmış keratinaz ise %3, 5, 10, 15, 20, 25 ve %30 NaCl konsatrasyonlarında 1 saatlik ön inkübasyonun ardından aktivitesini sırasıyla % 99, 99, 96, 85, 81, 77, 62 koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin %3-10 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama %98, %15-25 NaCl konsantrasyonlarında ortalama %81, %3-25 NaCl aralığında ortalama %89.5 kalan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Bacillus licheniformis C11 suşuna ait keratinaz enzimi yaklaşık 3M NaCL konsantrasyonunda 60 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesini ortalama %91 korumuştur. *Bacillus licheniformis* C11 suşuna ait keratinaz enzimi genel olarak daha yüksek NaCl değerlerinde *Streptomyces fradiae* suşunun keratinaz enziminden daha kararlı bir davranış göstermiştir. Her iki organizmaya ait enzimlerin alkaline, pH stabil ve halofilik karakterde olmaları öncelikli olarak deri işletmeleri için ideal enzim özelliğine sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

Analizi gerçekleştirilen enzimlerin farklı metal iyonları, inhibitör, şelatör, deterjan, yüzey aktif bileşikler ve okside edici ajanlar ile muamele edildiği zaman (60 dakika) bazıları enzim aktivitesini artırırken, bazıları inhibe etmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 Keratinaz enziminin 5mM $CaCl_2$ varlığında aktivitesini kontrole göre %56 arttırmıştır. Bu sonuç enzim aktivitesinin Ca^{+2} ile indüklenebilir olduğunu göstermektedir. PMSF ile yapılan çalışmalarda %0.1 PMSF bulunan ortamda kontrole göre aktivitenin %54, 1 M EDTA bulunan ortamda %42 oranında düştüğü saptanmıştır. Her iki sonuç enzimin serin metallo-proteaz olduğunun göstergesidir. Tatineni ve ark. (2008)'nın bildirdiği gibi doğada *Streptomyces* sp. tarafından üretilen ve serin metallo proteaz özelliğine sahip olan keratinolitik enzimlerin olağan üstü bir özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda analiz edilen iki enzimden biri olan *Streptomyces fradiae* C1 Keratinaz enzimi pH optimumunun 11, optimum sıcaklığının 70°C,

termal stabilite ve pH stabilitesinin 24 saatlik uygulama sonunda (pH 7.0-12.0 aralığında %92,76) olması gibi bir çok özellik bakımından literatür verilerinden oldukça performanslıdır. Bu da enzimi literatüredekilere göre ön plana çıkarmaktadır.

Fakhfakh-Zouari ve ark. (2009), *Bacillus pumilus* A1 suşunun 5 mM $CaCl_2$ varlığında enzimin stabilitesinin arttığını, 50 °C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesini % 100 oranında korurken 60 °C'de ise enzimin aktivitesini % 89.3 oranında koruduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık enzimin aktivitesinin PMSF tarafından tamamen, EDTA tarafından ise yüksek oranda inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Jaouadi ve ark. (2010), *Streptomyces* sp. AB1 elde ettileri alkalin proteaz enzimin PMSF ile tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enzimi deterjan ve yüzey temizleyicileri ile 1 saat ön inkübasyonu gerçekleştirildiğinde %0.1 Triton X-100 ile %95, 10 mM SDS ile %72, %0.1 Tween 20 ile %92 ve %0.1 Tween 80 ile %89 stabil olduğunu göstermiştir.

Streptomyces fradiae C1 keratinaz enziminin deterjan ve yüzey aktif bileşikler varlığında enzimin stabil olmasının, keratinazın keratin hidrolizi gerektiren biyoteknolojik işlemlerde, deterjan ve deri endüstrisinde son derece kullanışlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca deri ve deterjan endüstrilerinde kullanılan ticari proteaz enzimlerinin opimum pH aralıklarının pH 8.0-11.0 aralığında olması ve *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimini dahada ön plana çıkarmaktadır. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimi çeşitli metal iyonlarının 5mM $MgSO_4$, $CuSO_4$, $MnCl_2$ ve $ZnCl_2$ varlığında sırasıyla 98, 65, 85 ve 47 aktivite göstermiştir.

Literatürlerde, Zhang et al (2003) *Bacillus pumilis*'e ait hücre dışı alkalen proteazının aktivitesini 10mM Ca^{2+}'nın yaklaşık %20 oranında artırdığını, 10mM Mg^{2+}'nın aktiviteyi %15 oranında artırdığını, Cu^{2+} ve Zn^{2+}'nın ise %15-20 oranında azalttığını açıklamıştır. Kainoor ve Naik (2010), *Bacillus* sp JB 99 suşundan elde ettikleri keratinazın PMSF tarafından inhibe edildiği, Ca^{+2} tarafından enzim üretiminin stimüle edildiğini, fakat Hg^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarının aktiviteyi azalttıkları tespit edilmiştir. Lin ve Yin (2010), *Bacillus*

licheniformis YJ4 suşundan elde ettikleri keratinazın EDTA tarafından orta derecede, Zn^{2+} tarafından ise yüksek derecede inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Tatineni ve ark. (2008) kesimhaneden topladıkları örneklerden izole ettikleri proteaz üreticisi *Streptomyces* sp. suşundan üretilmiş serin metaloproteaz özelliği gösteren keratinaz enziminin aktivitesinin Ca^{+2} iyonu varlığında önemli derecede arttığını, PMSF ve EDTA varlığında ise bu aktivitenin inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin aktivitesi 5mM $CaCl_2$ ve EDTA varlığında etkilenmezken (sırası ile %101 ve 98), %0.1 konsatrasyonda PMSF ile muamele edildiğinde kontrole göre aktivitesinin % 46 oranında düşmesi serin proteaz olduğunun göstergesidir.

Ferrero et al (1996) *Bacillus licheniformis* MIR 29'dan elde edilen termostabil alkalen proteazın 2.5mM PMSF ile %60 oranında inhibe olduğunu, EDTA'nın ise aktiviteyi değiştirmediğini bildirmişlerdir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin divalent katyonik metal iyonlarından Ca^{+2} ve Mg^{+2} varlığında aktivitesi değişmezken (sırası ile %101 ve 98) Zn^{+2} ve Mn^{+2} varlığında ise sırasıyla %68 ve %63 oranında aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enzimi deterjan ve yüzey temizleyicileri ile 1 saat ön inkübasyonu gerçekleştirildiğinde %0.1 Triton X-100 ile %88, 10mM SDS ile %89, %0.1 Tween 20 ile %89 ve %0.1 Tween 80 ile %86 stabil olduğunu göstermiştir. Bulgulara göre *Bacillus licheniformis C11* keratinaz enzimi iyonik olamayan deterjan (%0.1 Triton X-100) ile anyonik deterjan olan 10 mM SDS ile 60 dakika muamele edildiğinde yüksek düzeyde stabil olduğu bulunmuştur. Enzim bu özellikleri dikkate alındığında yeni deterjan formülasyonları için uygun özelliktedir.

Gupta ve ark (1999) *Bacillus* sp.'den elde edilen ağartıcılara karşı stabil alkalen proteaz aktivitesinin iyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20 ve Tween 80 ile %20-50 artarken, SDS gibi kuvvetli anyonik deterjan ile %20-40 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Chang et al (2003) *Bacillus clausii* I-52'ye ait oksidant ve SDS stabil alkalen proteazın, %1 SDS ile muamele edilince aktivitesinin değişmediğini, %5 SDS ile muamele edilince aktivitesini %78 oranında koruduğunu yayınlamışlardır.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz'ın % 1 H_2O_2 ile muamele edildiğinde aktivitesinin değişmediği ve yaklaşık % 100 stabil kaldığı görülmektedir. *Bacillus licheniformis C11* keratinaz'ın %1 H_2O_2 ile 1saat muamele edildikten sonra aktivitesinin stabil kalması enzimimizin oksidant stabil olduğunu göstermiştir. Sarnaik ve ark. (2006), H_2O_2 gibi okside edici ajanlara karşı alkalen proteazların stabil olması bu enzimlerin ağartıcı içerikli deterjan formüller için uygun olduğu bildirilmiştir. *Bacillus licheniformis* C11 alkaline termostabil, pH stabil ve termofil serin keratinaz enzimi deterjan başta olmak üzere ağartıcı işlemlerinin uygulandığı endüstri alanları için özellikle uygundur.

Bacillus licheniformis C11 keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlıkları sırasıyla 98, 60 ve 40.9 kDa olan 3 farklı aktivite bandı elde edilmiştir.

Literatürlerde, Saibabu ve ark (2013), *Bacillus megaterium* suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 41 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Gosh ve ark (2008), *Bacillus cereus* DCUW suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 80 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Suntornsuk ve ark (2005), *Bacillus licheniformis* FK14 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 35 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yoshioka ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* MSK103' suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 26 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Lin ver ark. (1992), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan izole ettikleri serin keratinazın zimogram analizi sonunda 33 kDa ağırlığında tek aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Prakash ve ark (2010), *Bacillus halodurans* PPKS-2 suşundan izole edilen keratinaz enziminin zimogram analizi sonunda 30 ve 66 kDa ağırlığında olmak üzere iki adet aktivite bandına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tamilmani ve ark. (2008), *Bacillus licheniformis* ürettiği keratinazın karekterizasyonunu yapmışlardır. Tuzla çöktürme, diyaliz ve kolon

kromatografisi ile saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığının 35 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir. Fakhfakh-Zouari ve ark. (2009), *Bacillus pumilus* A1 suşundan izole edilen keratinaz enziminin (KerA1) 34 kDa olduğunu SDS-PAGE analizi ile tespit etmişlerdir.

Buna göre *Bacillus* licheniformis C11 keratinaz enziminin SDS-PAGE ortamında 98 kDa ağırlığa sahip aktivite bandının 60 ve 40,9 kDa ağırlığındaki bandlara göre çok daha fazla aktifliğe sahip olduğu saptanmıştır. Asıl aktivitenin 98 kDa bandına ait diğer iki aktivite bandının ise izozim olduğu düşünülmektedir. Enzimin yürüme hattı boyunca aktivitesini göstermesi, enzimin SDS ye direncinin bir göstergesidir.

Streptomyces fradiae C1 α-keratinaz enziminin zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 28 kDa olan tek bir aktivite bandı elde edilmiştir.

Çalışmamızda karakterizasyonu gerçekleştirilen *Streptomyces fradiae* C1 serin metallo keratinaz enzimi *Bacillus licheniformis* C11 serin keratinaz enziminden diger özelliklerinin yanı sıra tek aktivite bandı elde edilmesi ile de farklı olduğu ortaya konulmuştur.

Bacillus licheniformis C11 serin keratinaz enzimi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuk tüyünün çok büyük oranda prolin, glicine, sistein, tirosine başta olmak üzere birçok diğer aminoasitlere de hidroliz edildiği saptanmıştır. *Streptomyces fradiae* C1 keratinaz enzimi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edildiği zaman tavuktüyünün çok büyük oranda glisin, tirosine , sistein ve az miktarda prolin olmak üzere birçok aminoaside hidroliz edildiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Sonuç olarak;

Her iki organizmadan elde edilen keratinolitik enzimin reaksiyon ürünlerinde benzerlik olmakla birlikte TLC ortamında reaksiyon ürünlerinin kantitaif olarak farklılığı olduğu görülmektedir. Ayrıca Bacillus licheniformis C11 suşundan elde edilen serin keratinaz enzimi ile prolin daha yüksek düzeyde elde edilirken, Streptomyces fradiae C1 suşundan elde edilen keratinaz enzimi ile glisin ve tyrozin amino asitlerinin daha fazla miktarda elde edildiği gözlenmiştir.

Her iki enzimde ham tavuk tüyünün literatürlere göre çok daha kıza zaman diliminde bir çok amino aside hidroliz edilmesi için kullanılabilecek özelliğe sahiptir. Enzimler alkalofilik ve termofilik özellikte olduklarından üretim aşamalarında kontaminasyon riski önemli düzeyde elimine edileceğinden daha sağlıklı bir üretim gerçekleştirilmesi söz konusudur. Tavuk tüyleri özelinde yapılacak hidroliz uygulamaları sonucu elde edilecek kükürtlü amino asitler, gıda ve yem üretimi başta olmak üzere amino asit desteği gerektiren bütün alanlar için ideal çözüm oluşturacaklardır. Böylece bir yandan kirletici olarak görülen (gerçekte %90'lara varan ham protein kaynağıdır) tavuk tüyü atıklarının doğaya yararlı hale getirilmesi sağlanırken, diğer yandan elde edilen ürünlerin yukardaki alanlarda kullanılması ile önemli bir ekonomik girdi sağlanması söz konusu olacaktır.

KAYNAKLAR

ABDEL-MOHSEN S. I., HOUSSEIN, M. M., ABO-ELMAGD H. I., EL-SAYED, N. H., and HABIB M.,2012. Novel keratinase from *Trichoderma harzianum* MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities. International Biodeterioration & Biodegradation, 70 : 14-19.

ABOUSHWAREB, T., EBERLI, D., WARD, C., BRODA, C., HOLCOMB, J., ATALA, A., and VAN DYKE, M., 2009. A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: Evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. *J. Biomed. Mater. Res.* 90:45-54.

AEHLE W., 2004. Enzymes in industry production and applications. Second, Completely Revised Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

AEHLE, W., SOBEK, H., AMORY, A., VETTER, R., WILKE, D., SCHOMBURG, D., 1993. Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved "washing performance" – the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. J Biotechnol 28:31-40.

AGRAHARI S. and WADHWA N., 2010. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant. International Journal of Poultry Science, vol. 9:482-489.

AGRAWAL, D., PATIDAR, P., BANERJEE, T., and PATIL S, 2004, Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis, Process Biochemistry, 39, 977-981.

AKAN, N., 2010. Keratinolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, keratinaz üretimi ve karakterizasyonu. Ç.Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi 2010.

AMANY, L., KANSOH, EBTSAM, N., HOSSINY EMAN, K., and EL-HAMEED, A. B. D.,2009. Keratinase production from feathers wastes using some local *Streptomyces* isolates. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3:561-571.

ANBU, P., GOPINATH, S. C. B., HILDA, A., LAKSHMIPRIYA, T., and ANNADURAI, G., 2007. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. Bioresource Technology, 98:1298-1303.

ANONYMOUS, 1978. Mikrobiyologisches Handbuch, E. Merck, Darmstad

APEL, P.J., GARRETT, J. P., SIERPINSKI, P., MA, J., ATALA, A., SMITH, T.L., KOMAN, L.A., and VAN DYKE, M., 2008. Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: Long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *J. Hand Surg.Am.* **33:**1541-1547.

ARABACI, N., CAF, Y., MAASOGLU, Y., and ARIKAN B., 2013. Partial purification and characterization of thermostable, alkaline and chelatorresistant protease from a newly isolated *Bacillus* sp. CY7 and its potential applications in various industries. Journal of Applied Biological Sciences, 7:14-19.

ARIKAN, 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. Bioresource Technology, 99(8):3071-3076.

ASKER, M. M. S., MAHMOUD, M. G., SHEBWY, K.E., and ABD EL AZIZ, M. S., 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 11:103-109.

AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.

AYGAN, A., and ARIKAN, B., 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van Soda Lake. International Journal of Agriculture, 4: 369-374.

BALINT, B., BAGI, Z., TOTH, A., RAKHELY, G., PEREI, K., and KOVACS, K. L., 2005. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. Appl Microbiol Biotechnol, 69:404-410.

BECH, L. M., BRANNER, S., BREDDAM, K., and GROEN, H., 1993. Oxidation stable detergent enzymes. US Patent 5: 208-158.

BEG, Q. K., SAXENA, R. K., and GUPTA, R., 2002. Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. Biotechnol Bioeng 78:289-295.

BERNAL, C., CAIRO, J., and COELLO, N., 2006. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. Enzyme Microbial. Technol., 38, 49-54.

BHAT, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnolgy Advances, 18(5): 355-383.

BIN, Y., BIN-QUING, Y., and FENG, H., 2013. Efficient degradation of raw chicken feather into soluble peptides and free amino acids by a newly isolated *Bacillus subtilis* S1-4. Research Journal of Biotechnology, 8(9):48-55.

BIERBAUM, G., KARUTZ, M., BOTZ, D. W., WANDREY, C., 1994. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol 40:611-617.

BISHT, D., YADAV, SANTOSH K. Y., and DARMWAL N. S., 2012. Enhanced production of extracellular alkaline lipase by an ımproved strain of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10,055. American Journal of Applied Sciences 9:158-167.

BOCKLE, B., GALUNSKY, B., and MULLER, R., 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530, Appl. Environ. Microbiol., 61:3705-3710.

BRANDELLI, A., DAROIT, D. J., and RIFFEL, A., 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., 85:1735-1750.

BRANNER, S., HASTRUP, S., ERİKSEN, N., POUL, L., OLSON, OH., CASTELEIGN, E., EGMOND, M. R., HAVERKAMP, J., MUSTERS, W., VLEIG, J. D., 1996. Subtilisin mutants, 5: 482-849.

BRESSOLIER, P., LETOURNEAU, F., URDACI, M., and NERNEUIL, B.,1999. Purification and characterization of keratinolytic serine proteinases from *Streptomyces albidoflavus*. Appl. Environ. Microbiol. 65:2570-2576.

CAF Y., 2012. Termofil *Bacillus* sp.'den alkalin, termofilik, oksidant dirençli selülaz üretimi ve karakterizasyonu. Ç.Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi.

CAF, Y., MAASOGLU, Y., VALIPOUR, E., and ARIKAN, B., 2012. Production and characterization of novel cold-active, pH tolerant and detergent-stable: α-amylase from a psychrotrophic bacterium from soil samples. New Biotechnology, 29:23–26.

CAF, Y., VALIPOUR, E., and ARIKAN, B., 2014. Study on cold-active and acidophilic cellulase (CMCase) from a novel psychrotrophic isolat *Bacillus* sp. K-11. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 3(5): 16-25.

CAI, C-G., LOU, B-G., and ZHENG, X-D., 2008. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. J Zhejiang Univ Sci B, 9(1):60-67.

CHAKRABORTY, R., and SRINIVASAN, M., 1993. Production of a thermostable alkaline protease by a new Pseudomonas sp. by solid substrate fermentation. J Microb Biotechnol 8:7–16.

CHENG, S.W., HU, M.N., SHEN, S.W., TAKAGI, H., ASANO, M., and TSAI, Y.C., 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Biosci Biotech Biochem, 59:2239-2243.

CHIKURA, T., IZUMI, N., and MATSUMOTO, S., 1994. Manufacture of amino acid containing fertilizers. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 06: 786.

CHITTE, R. R., NALAWADE, V. K., and DEY, S., 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8, *Lett. Appl. Microbiol*., 28, 131-136 .

CLAUS, D. and BERKELEY, C.W., 1986. The genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 34: 1105-1139.

CLARK, W. M. and LUBS, H. A. J., BioI. Chem. 25, 479 (1916); see also W. M. Clark, Determination of hydrogen ions, 3d ed, ch. 9 (The Williams and Wilkins Co ., Baltimore, Md., 1928).

COHLBERG, J.A., 1993. 'The structure of α-keratin'. Trends Biochem. Sci. 18:360-362.

CONINCK D. J., BOUQUELET, S., DUMORTIER, V., DUYME, F., DENANTES, I.V., 2000. Industrial media and fermentation processes for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophila*. J Ind Microbiol Biotechnol 24:285–290.

CORAL, G., ARIKAN, B., UNALDI, M. N., and GUVENMEZ, H., 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain Turkish Journal of Biology, 26:209-213.

DA GIOPPO, N. M. R., MOREIRA-GASPARIN, F. G., COSTA, A. M.,ALEXANDRINO, A. M., SOUZA, C. G. M., and PERALTA, R. M., 2009. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. J. Ind. Microbiol. Biotechol., 36: 705-711.

DATTA, M. S., 1993. Role of keratin in fire fighting. J. Ind. Leath. Technol. Assoc. 43:297-299.

DEIVASIGAMANI, B. and ALAGAPPAN, K.M., 2008. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. J. Environ. Biol., 29(6):933-936.

DEMİRULUS, H. ve AYDIN A., 1996. Tavukçuluk artık ve atık maddelerinin işlenerek çevre kirliliğinin azaltılması. Y.Y.Ü. Ziraat Fak. Zootekni Böl. VAN 19:22-26.

DESHPANDE, V.V., RAO, M., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62:597-635.

EGGUM, B.O., 1970. Evaluation of protein quality of feather meal under different treatments. Acta Agricul Scand. 20:230-234.

ENSHAASY, E.H., ABUOL-ENEİN, A., HELMY, S., and AZALY, E., 2008. Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scales. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2:583-593.

ERLICH, H., A., GELFAND, D. H., and SNINSKY, J. J., 1991. Recent advences in polymerase chain reaction. Science, 252:1643-1650.

ESAWY, M. A., 2007. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a novel mesophilic *Streptomyces albus* AZA. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(6): 808-817.

ESSGHAIER, B., BEJJI, M., JIJAKLI, H., BOUDABOUS, A., and SADFI-ZOUAOUI, N., 2009. High salt-tolerant protease from a potential biocontrol agent *Bacillus pumilus* M3-16. Annals of Microbiology, 59(3):553-558.

ESTELL, D.A., GRAYCAR, T.P., and WELLS, J.A., 1985. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. J Biol Chem 260:6518-6521.

FAKHFAKH-ZOUARI, N., HMIDET, N., HADDAR, A., KANOUN, S., and NASRI, M., 2010. A novel serine metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather meal: Biochemical and Molecular Characterization. Appl Biochem Biotechnol, 162:329–344.

FENG, Y.Y., YANG, W.B., ONG, S.L., HU, J.Y., and NG W.J., 2001. Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilis* strain. Appl Microbiol Biotechnol 57:153-160.

FERRERO, M.A., CASTRO, G.R., ABATE, C.M., BAIGORI, M.D., and SINERIZ, F. 1995. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. Appl Microbiol Biotechnol, 45:327-332.

FLEMING, A.B., TANGNEY, M., JORGENSEN, P.L., DIDERICHSEN, B., and PRIEST, F.G., 1995. Extracellular enzyme synthesis in spore-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. Appl Environ Microbiol 61:3775-3780.

FOLIN, O. and CIOCALTEAU, V., 1926. Enzymatic assay of protease using casein as a substrate, J. Biol. Chem., 73: 627.

FRANKENA, J., KONINGSTEIN, G. M., VAN VERSEVELD, H. W., and STOUTHAMER A. H., 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. Appl Microbiol Biotechnol 24:106–112.

FRIEDRICH, J., GRADISAR, H., MANDIN D., and CHAUMONT, J.P., 1999. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. Lett. Appl. Microbiol., 28, 127-130.

FUJINAMI, S. and FUJISAWA, M., 2010. Industrial application of alkliphiles and their enzyme-past, present and future, Environmental Technology, 31: 845-56.

FUJIWARA D., 1999. Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. Yeast, 15:1183-97.

FUJIWARA, N., MASUI, A., and IMANAKA, T., 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. J. Biotechnol. 30:245-256.

GEORGE, S., RAJU, V., KRISHNAN, M. R. V., SUBRAMANIAN, T. V., and JAYARAMAN, K., 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Process Biochem, 30:457-462.

GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., WOOD, W. A., and KRIEG, N. R., 1994. Methods for general and molecular bacterology, ASM, Washington DC. ISBN 1-55581-048-9.

GESSESSE, A., HATTI-KAUL, R., GASHE, B. A., and MATTIASSON, B., 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme and Microbial Technology, 32:519-524.

GHOSH, A.K., RAMAKRISHNAN G, and RAJASEKHARAN, R., 2008. YLR099C (ICT1) encodes a soluble acyl-coa-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced

phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem,* 283(15):9768-9775.

GRADIŠAR, H., FRIEDRICH, J., KRIŽAJ, I., and JERALA, R., 2005. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinase of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. Appl. Environ. Microbiol., 71:3420-3426.

GRAZZIOTIN, A., PIMENTEL, F. A., DE JONG, E.V., and BRANDELLI, A., 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Anim. Feed Sci. Technol., 126:135-144.

GUPTA, R., BEG, Q.K., and LORENZ, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 59:15-32.

GUPTA, R. and RAMNANI, P., 2006. Microbial keratinase and their prospective application: an overview. Appl. Microbiol. Biotechnol., 70:21-33.

HABBECHEI A., SAOUDI, B., JAOUADI, B., HABERRA, S., KEROUAZ, B., BOUDELAA, M, BADIS, A., and LADJAMAL, A., 2014. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(4):413-421.

HAILE, G. and GESSESSE, G., 2012. Properties of alkaline protease C45 produced by alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from Chitu, Ethiopian Soda Lake. J Biotechnol Biomater 2012, 2:4.

HAKI, G.D. and RAKSHIT, S. K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89:17-34.

HAMEED, A., KESHAVARZ, T., and EVANS, C. S., 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. J Chem Technol Biotechnol, 74:5–8.

HARISHA, S., 2007. Biotechnology procedures and experiments handbook. New Delhi, India, 13-18.

HERBERT, P., SANTOS, L., and ALVES, 2001. Simultaneous quantification of primary, secondary amino acids, and biogenic amines in musts and wines using OPA/3-MPA/FMOC-Cl fluorescent derivatives. Food Chemistry and Toxicology. 66:1319-1325.

HOLT, J.G., KRIEG, N. R., SNEATHM, P. H. A., STALEY, J. T., and WILLIAMS, S. T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9. basım, (Williams and ilkins, Philadelphia).

HORIKOSHI, K., 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms: Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. Agric. Biol. Chem, 35: 1407-1414.

HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology, Reviews. 63:735-750.

HOTHA, S. and BANIK, R. M.,1997. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems. J Chem Technol Biotechnol 69:5-10.

HOUGH, D. W. and DANSON, M. J., 1999. Extremozymes. Curr Opin Chem Biol, 3:39-46.

HU, H., HE, J., YU, B., ZHENG, P., HUANG, Z., MOA, X., YU, J., HAN, G., and CHEN, D., 2013. Expression of a keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzymes. Biotechnol Lett 35: 239-244.

HUBNER, U., BOCK, U., and SCHUGERL, K., 1993. Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on complex medium in a stirred tank reactor. Appl Microbiol Biotechnol 40:182–188.

HUTADILOK-TOWATANA, N., PAINUPONG, A., and SUNTINANALERT P., 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS 719. J Biosci Bioeng, 87:581-587.

INNIS, M. A. and GELFAND, D. H., 1990. Optimization of PCRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.and White T.J (editör.). PCR protocols A guide to methods and applications.Academic Press, 3-12.

JAOUADI, B., ABDELMALEK, B., FODIL, D., FERRADJI, F. Z., REKIK, H., ZARAI, N., and BEJAR, S., 2010. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. Bioresource Technology, 101:8361–8369.

JAOUADI, N. Z., REKIK, H., BADIS, A., TRABELSI, S., BELHOUL, M., YAHIAOUI, A. B., AICHA, H. B., TOUMI, A., BEJAR, S., and JAOUADI, B., 2013. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. DOI: 10.1371/journal.pone.0076722.

JEONG, E-J., RHEE, M-S., KIM, G-P., LIM, K-H., YI, D-H., and BANG, B-H., 2010. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading bacterium, *Bacillus* sp. SH-517. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53(1), 43-49.

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 Biochem 37:139-144.

JOSHI, B. H., 2010. Purification and characterization of a novel protease from *Bacillus firmus* Tap5 isolated from tannery waste. Journal of Applied Sciences Research, 6(8):1068-1076.

KAINOOR, P. S. and NAIK, G. R., 2010. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus* sp. JB 99. Indian Journal of Biotechnology, 9:384-390.

KALPANA, J., 2013. Production, purification and characterization of alpha amylase from marine *Bacillus subtilis* S8-18 and ıts cLINical and ındustrial applications. Alagappa University, Department of Biotechnology, Doktora tezi.

KALUZEWSKA, M., WAWRZKİEWİCZ K., and LOBARZEWSKİ, J., 1991. Microscopic examination of keratin substrates subjected to the action of the enzymes of *Streptomyces fradiae*. Int. Biodeterioration, 27:11-26.

KARTHIKEYAN, R., BALAJI, S., and SEHGAL, P. K., 2007. Industrial applications of keratins: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research,* 66:710-715.

KAUR, S., VOHRA, R. M., KAPOOR, M., BEG, Q. K., and HOONDAL, G. S., 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. World J Microbiol Biotechnol 17:125–129.

KAZAN, D., DENIZCI, A. A., KERIMAK ONER, M. N., and ERARSLAN, A., 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. J. Ind. Microbiol. and Biotechno, 32: 335-344.

KIRAN, K. K. and CHANDRA, T. S., 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha amylase by moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. Appl Microbiol Biotechnol, 77: 1023-1031.

KIM, J. M., LIM, W. J., and SUH, H. J., 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.,* 37: 287-291.

KOBAYASHI, T., HAKAMADA, Y., ADACHI, S., HITOMI, J., YOSHIMATSU, T., KOIKE, K., KAWAI, S., and ITO, S., 1995. Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus sp.* KSM-K16. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 473-481.

KOJIMA, M., KANAI, M., TOMINAGA, M., KITAZUME, S., INOUE, A., and HORIKOSHI, K., 2006. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from Bacillus pseudofirmus FA30-01. Extremophiles. 10(3):229-35.

KORKMAZ, H., UNALDI, M. N., ASLAN, B., CORAL, G., ARIKAN, B., DINCER, S., and COLAK, O. 2003. Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. Annals of Microbiology, 53: 85-93.

KORKMAZ, H., HUR, H., DİNÇER, S., 2004. Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain Hk-1 from poultry waste", Annals of Microbiology, 54:201-211.

KREPLAK, L. DOUCET, J., DUMAS, P., and BRIKI, F., 2004. New aspects of the α-helix to β-sheet transition in stretched hard α-keratin fibers, Biophysical Journal, 87:640-647.

KUK, S. and ERENSOY, A., 2008. Gene clonning, selection of plasmids and application of *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Gene. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32:16-22.

KUMAR, C. G., 1997. Studies on microbial alkaline proteases for use in dairy detergents. National Dairy Research Institute, Deemed University, Karnal, India, Doktora Tezi.

KUMAR, C. G. and TAKAGI, H., 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial. Biotechnol Advances, 17: 561-594.

KUMAR, A. G., NAGESH, N., PRABHAKAR, T. G., and SEKARAN, G., 2008. Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresource Technology, 99: 2364-2372.

KUMARI, P. S. and KUMAR, N. S., 2014. Biodegradation of feathers by the microorganisms present in the poultry wastes and enhance its activity by mutation. Golden Research Thoughts, 3(7):1-7.

KUNERT, J., 1973. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of sulphitolysis of the protein. Experientia. 33:489-498.

KUO, J-M., YANG, J-I., CHEN, W-M., PAN, M-H., TSAI, M-L., LAI, Y-J., HWANG, A., PAN, B. S., and LIN, C-Y., 2012. Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp. I40. International Biodeterioration & Biodegradation 70:111-116.

KWON, Y.T., KIM, J.O., MOON, S.Y., LEE, H.H. AND RHO, H.M., 1994. Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530. Biotechnol. Lett. 16:413-418.

LAKSHMI, P. J., KUMARI, CH. M. C., and LAKSHMI, V. V., 2013. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. International Journal of Microbiology, DOI: 10.1155/2013/608321.

LANDAU, N. S., GORNOVA, I. B., GULIKOVA, O. M., and EGOROV, N. S., 1997. Proteinase production by free and immobilized cells of *Bacillus firmus* 44b. Microbiology (USSR) 66:310–315.

LANGEVELD, J. P., WANG, J. J., VAN DE WIEL, D. F., SHIH, G. C., GARSSEN, G. J., BOSSERS, A., and SHIH, J. C., 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. J. Infect. Dis., 188:1782-1789.

LEE, Y. H. and CHANG, H. N., 1990. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. Ferment. Bioeng., 69:89–92.

LEE, W. J., SON, G. M., and CHOI, C., 1991. Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. CW-1121. J. Korean Soc. Food Nutr. 20:388-94.

LETOURNEAU, F., SOUSSOTTE, V., BRESSOLLIER, P., BRANLAND, P., and VERNEUIL, B., 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. SK1-02: a new isolated strain. Lett.Appl. Microbiol. 26:77-80.

LI, J., CHEN, D., YU, Z., ZHAO, L., and ZHANG, R., 2013. Improvement of expression level of keratinase Sfp2 from *Streptomyces fradiae* by site-directed mutagenesis of its N-terminal pro-sequence. Biotechnol Lett, 35:743-749.

LIN, K-Y., JONES, R. J., and MATTEUCCI, M., 1995. Tricyclic-2'-deoxycytidine analogs: Synthesis and incorporation into oligodeoxynucleotides which have enhanced binding to complementary RNA. J. Am. Chem. Soc. 117:3873-3874.

LIN, X., WONG, S-L., MILLER, E. S., and SHIH, J. C. H., 1997. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in B. subtilis. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 19:134-138.

LIN, X., INGLIS, G. D., YANKE, L. J., and CHENG, K. J., 1999. Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23: 149–153.

LIN, H-H. and YIN, L-J. 2010. Feather meal and rice husk enhanced keratinases production by *Bacillus licheniformis* YJ4 and characters of produced keratinases. Journal of Marine Science and Technology, 18(3):458-465.

LIU S.L., CHEN W.Z., WANG Y., LIU G., YU S.W., and XING M., 2008. Purification and characterization of a novel neutral β-glucanase and an alkaline β-glucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. World J Microbiol Biotechnol 24:149-155.

LIU, B., ZHANG, J., LI, B., LIAO, X., DU, G., and CHEN, J., 2013. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. World J Microbiol Biotechnol, 29:825-832.

LO, H. W., TOO, R. J., and WU, Y. J., 2012. Production of keratinolytic enzyme by an indigenous featheredegrading strain *Bacillus cereus* Wu2. Journal of Bioscience and Bioengineering, 114(6):640-647.

LO, N., STABINSKY, Y., LEVITT, M., MILLER, L., SACHDEV, R., FINLEY, S., PARK, S., KOLVENBACH, C., ARAKAWA, T., and ZUKOWSKI, M. 1991. Enhanced stability of subtilisin by three point mutation. Biotechnol Appl Biochem 13:12–24.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MACEDO, A. J., DA SILVA, W. O. B., GAVA, R., DRIEMEIER, D., HENRIQUES, J. A. P., and I, C., 2005. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabalities. Appl Environ Microbiol. 71(1):594-596.

MACFADDIN, J. F., 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Third Edition, USA.

MAO, W., PAN, R., and FREEDMAN, D., 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in fed-batch fermentation using a synthetic medium. J Ind Microbiol, 11:1–6.

MARTINS, R. F., DAVIDS, W., AL-SOUD, W. A., FREDRIK, L., RADSTROM, P., HATTI-KAUL, R., 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. Extremophiles 5:135-144.

MATSUBARA, M. and TABATA Y. 1994. Cosmetic depilation containing keratin reduction products, Jpn Kokai Tokkyo Koho JP, 06,157,258.

MAYENDE, L., WILHELMI, B. S., and PLETSCHKE, B. I., 2006. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. Soil Biology & Biochemistry, 38:2963-2966.

MEI, Y., CHENA, Y., ZHAIA, R., and LIU, Y., 2013. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 94:77-81.

MITCHINSON, C. and WELLS, J. A., 1989. Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN′. Biochem 28:4807–4815

MOHAMEDIN, A. H., 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease – Producing thermophilic *Streptomyces* strain grown an chicken feather as a substrate. Int. Biodeterioration Biodegradation, 43, 13-21.

MOHORCIC, M., TORKAR, A., FRIEDRICH, J., KRISTL J., and MURDAN, S., 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery, Int. J. Pharm., 332, 196-201.

MORE, S. S., SRİDHAR, D. L., PRAKASH, S. N., VİSHWAKARMA, J., and UMASHANKAR, S., 2013. Purification and properties of a novel fungal alkaline keratinase from *Cunninghamella echinulata*. Turkish Journal of Biochemistry, 38(1):68–74.

MOUSAVI, S., SALOUTI, M., SHAPOURY, R., and HEIDARI, Z., 2013. Optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. Jundishapur J Microbiol., 6(8):e7160.

MUKHERJEE, A. K., RAI, S. K., and BORDOLOI, N. K., 2011. Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline β-keratinase (Mukartinase) purified from a mutant *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II. International Biodeterioration & Biodegradation, 65:1229-1237.

NADEEM, M., QAZI, J. I., and BAIG, S., 2010. Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. Braz. Arch. Biol. Technol., 53(5):1015-1025.

NAKIBOGLU, N., TOSCALI, D., and NISLI, G., 2003. Novel silver recovery method from waste photographic films with NaOH stripping. Turk J. Chem. 27:127-133.

NAM, G. W., LEE, D. W., LEE, H. S., LEE, N. J., KIM, B. J., CHOE, E. A., HWANG, J. K., SUHARTONO, M. T., and PYUN, Y. R. 2002. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe. Archives of Microbiology. 178: 538-547.

NDUWIMANA, J., GUENET, L., DORVAL, I., BLAYAU, M., LE GALL, J. Y., and LE TREUT, A. 1995. Proteases (Review article). Ann. Biol. CLIN., 53:251-264.

NEDRA, E. H. A., RYM, A., BASMA, G. F., ALYA, S. K.,SAFIA, K., and MONCEF, N., 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly *isolated Bacillus licheniformis* NH1. Enzyme and Microbial Technology. 40: 515-523.

NI, H., CHEN, Q., CHEN, F., FU, M. L., DONG, Y., and CAI, H. N., 2011. Improved keratinase production for feather degradation by *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 in submerged Cultivation. African Journal of Biotechnology Vol. 10(37): 7236-7244.

ODETALLAH, N. H., WANG, J. J., GARLICH, J. D., and SHIH, J. C. H., 2003. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. Poultry Sci. 82: 664-670.

OKOROMA, E. A., GARELICK, H., ABIOLA, O. O., and PURCHASE, D., 2012. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with

profound keratinase activity for degradation of melanised feather. International Biodeterioration & Biodegradation, 74:54-60.

ONIFADE, A. A., AL-SANE, N. A., AL-MUSALLAM, A. A., and AL-ZARBAN, S. 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresour. Technol. 66: 1-11.

OSTEN V.D., BRANNER, S., HASTRUP, S., HEDEGAARD. L., RASMUSSEN, M.D., FRANTZEN, H.S., CARLSEN, S., and MİKKELSEN, J.M., 1993. Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. J Biotechnol 28:55-68.

PADOVAN, G. J., LEME, I. A., FASSINI, P. G., JUNIOR, N. I., and MARCHINI., J. S., 2014. A new O-phthaldialdeyde (OPA) solution for fluorescence HPLC amine group detection without boric acid preparation. J Chromatograph Separat Techniq, DOI:10.4172/2157-7064.1000223

PANTOLIANO, M. W., WHITLOW, M., WOOD, J. F., DODD, S. W., HARDMAN, K. D., ROLLENCE, M. L., BRYAN, P. N., 1989. Large increases in general stability for the subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding. Biochemistry 28:7205–7213.

PAPADOPOULOS, M. C., BOUSHY, E. I., ROODBEEN, A. R., and KETELAARS, E. H., 1986. Effect of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Anim. Feed Sci. Technol. 14:279-290.

PARRY, D.A.T. and NORTH, A.C.T. 1998. 'Hard _-keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains'. J. Struct. Biol..122, p.67-75,

PAUL, T., DAS, A., MANDAL, A., HALDER, S. K., JANA, A., MAITY, C., DASMOHAPATRA, P. K., PATI, B. R., and MONDAL, K. C., 2014. An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with

detergent: towards industrial viewpoint. Journal of Cleaner Production, 66:672-684.

POOPATHI, S. and ABIDHA, S., 2007. Use of feather-based culture media for the production of mosquitocidal bacteria. Biological Control. 43:49-55.

POOVENDRAN, P., KALAIGANDHI, V., KANA, V. K., JAMUNA, E., and POONGUNRAN., E., 2011. A study of feather keratin degradation by Bacillus licheniformis and quantification of keratinase enzyme produced. J. Microbiol. Biotech. Res., 1 (3):120-126.

PRASAD, M. P. SETHI R., and ARTHIRAJAN, J., 2014. Optimization studies of Protease enzyme in in-vitro conditions from *Bacillus licheniformis*. International Research Journal of Biological Sciences. Vol. 3(2), 34-39.

PRIOLA, S. A., 2001. Prion protein diversity and disease in the transmissible spongiform encephalopathies. Adv. Protein Chem. 57:1-27.

PURI, S., BEG, Q. K., and GUPTA, R., 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. using response surface methodology. Curr Microbiol 44:286–290

PURVA, S. K., GUPTA, L. K., and GUPTA, J. K. 1998. Thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. IS-3. Indian J Microbiol 38:149-152.

RADHA, S. and GUNASEKARAN, P., 2007. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. Journal of Applied Microbiology Journal of Applied Microbiology 103:1301–1310.

RADHA, S. and GUNASEKARAN, P., 2009. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. Protein Expression and Purification 64:24–31.

RAI, S. K. and MUKHERJEE, A. K., 2011. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β-keratinaz from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. Biochemical Engineering Journal, 54:47–56.

RAMNANI, P. and GUPTA, R., 2004. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. Biotechnol. Appl. Biochem.,40(11):191-196.

RIFFEL, A. and BRANDELLI, A., 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. Brazilian J. Microbiol. 37:395-399.

RIFFEL, A., LUCAS, F., HEEB, F., and BRANDELLI A., 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Arch. Microbiol. 179:258-265.

ROMERO, F.J., GARCIA, L.A., SALAS, J.A., DIAZ, M., QUIROS, L.M., 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown on whey. Process Biochem 36:507-515.

ROUSE, J.G. and VAN DYKE, M.E., 2010. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. Materials. 3:999-1014.

SAEKI, K., OZAKI, K., KOBAYASHI, T., and ITO, S., 2007. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. J. Biosci. and Bioeng. 103:501-508.

SAIBABU, V., NIYONZIMA, F. N., and MORE, S. S., 2013. Isolation, partial purification and characterization of keratinase from *Bacillus megaterium*. International Research Journal of Biological Sciences,. 2(2):13-20.

SANGALI, S. and BRANDELLI, A., 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. J. Appl. Microbiol. 89:735-743.

SARAÇOĞLU, Z. N., 2010. Cellulase-free alkaline xylanase enzim üreticisi *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, enzim üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanım olanaklarının araştırılması. Ç.Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi.

SAYED, S.A., SALEH, S.M., and HASAN, E.E., 2005. Removal of some polluting metals from industrial water using chicken feathers. Desalination. 181:243-255.

SELAMI-KAMOUN, A., HADDAR, A., EL-HADJ ALI, N., GHORBEL-FRIKHA, B., KANOUN, S., and NASRI, M., 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiological Research, 163(3):299-306.

SHAH, D. N., SHAH, V. D., NAHET, P.N., and KOTHARI, R. M., 1986. Isolation of *Bacillus licheniformis* mutants for stable production profiles of alkaline protease. Biotechnol Lett 8:103–106.

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, 67: 85–91.

SHANKAR, S., MORE, S. V., and LAXMAN, R. S., 2010. Recovery of silver from waste x-ray film by alkaline protease from conidiobolus coronatus. J. sci. 6:60-69.

SHARMA, R. and GUPTA, R., 2010. Thermostable, thiol activated keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* KS-1 for prospective application in Prion decontamination. Research J. Microbiol. 5:954-965.

SHIH, J.C.H., 1993. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization. A review of Poultry Sci. 72:1617-1620.

SIERPINSKI, P., GARRETT, J., MA, J., APEL, P., KLORIG, D., SMITH, T., KOMAN, L.A., ATALA, A., and VAN DYKE, M. 2008. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. Biomaterials, 29:118-128.

SINGH, J., VOHRA, R. M., and SAHOO, D. K., 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. Biotechnology Letters. 21:921-924.

SINGH, J., VOHRA, R.M. and SAHOO, D.K. 2001. Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic Bacillus sphaericus. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 26: 387-393.

SMITH, J. E., 2004. Biotechnology, Fourth Edition, Cambridge University Press, New York.

SREENIVASA N. and VIDYASAGAR G. M., 2013. Purification and characterization of keratinase from native feather degrading *Streptomyces albus*. International Journal of Development Research , Vol. 3, Issue, 8, pp.034-039

SRIVASTAVA, A., SHARMA, A., and SUNEETHA, V., 2011. Feather waste biodegradation as a source of amino acids, European Journal of Experimental Biology, 1:56-63.

STERNER, R. and LIEBL, W. 2001. Thermophilic adaptation of proteins. Crit.Rev. Biochem Mol. 36: 39-106.

SUH, H. J. and LEE, H. K., 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. Journal of Protein Chemistry. 20:165-169.

SUNDARARAJAN, S., KANNAN, C.N., and CHITTIBABU, S., 2010. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. J. of Biosci. And Bioeng. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.09.009

SUNEETHA, V. and KHAN, Z. A. IN: G. SHUKLA, A.VARMA (Eds), 2011.Soil Enzymology. Springer, Germany, 259-268.

SUNTORNSUK, W., and SUNTORNSUK, L., 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. Bioresource Technology, 86: 239-243.

SWAIN, M. R., KAR, S., PADMAJA, G., and RAY, R.C., 2006. Partial characterization and optimization of extra-cellular α-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. Polish J. Microbiol 55:289-296.

SYED, D. G., LEE, J. C., LI, W-J. KIM, C-J., and AGASAR, D., 2009. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. Bioresource Technology, 100:1868–1871.

TAKAGI, H., TAKAHASHI, T., MOMOSE, H., INOUYE, M., MAEDA, Y., MATSUZAWA, H., and OHTA, T., 1990. Enhancement of the

thermostability of Subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic protease. J Biol Chem 265:6874–6878.

TAKAMI, H, KOBAYASHI, T., AONO, R., and HORIKOSHI K, 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl Microbiol Biotechnol 38:101–108

TAKAMI, H., AKIBA, T., and HORIKOSHI, K., 1992. Cloning, expression, and characterization of a minor alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Biosci Biotechnol Biochem 56:510–511

TAMILMANI, P., UMAMAHESWARI, A., VINAYAGAM, A., and PRAKASH, B., 2008. Production of an extracellular feather degrading enzyme by *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil in Namakkal District (Tamilnadu), International Journal of Poultry Science, 7(2):184-188.

TANKSALE, A. M., 2001. Molecular aspects of a fungal alkaline protease. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology, National chemical laboratory, University of Pune.

TATINENI, R., DODDAPANENI, K.K., POTUMARTHI, R. C., VELLANKI, R. N., KANDATHIL, M.T., KOLLI, N., and MANGAMOORI, L. N., 2008. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. Bioresource Technology, 99:1596–1602.

TEKIN, 2008. Alkaline protease production capacity of *Bacillus* spp. isolated from Turkey and partial characterization of enzymes. Ankara Universitesi, FEB Yüksek Lisans Tezi.

TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevi, Ist. 345s.

THANGAM, E. B. and RAJKUMAR, G. S., 2002. Purification and characterization of an alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. Biotechnol Appl Biochem 35:149-154.

THANIKAIVELAN, P., RAO, J. R., NAIR, B. U., and RAMASAMI, T., 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. Trends in Biotechnology.22:181-188.

THEATHER R.M. and WOOD P.J., 1982. Use of congo red-polysaccaride interaction in enumeration and characterization of cellulytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol 38:148-158.

TOBE, S., TAKAMI, T., HIROSE, Y., and MITSUGİ, K., 1975. Purification and some properties of alkaline proteinases from *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 39:1749-1755.

TORK, S. E., SHAHEIN, Y. E., EL-HAKIM, A. E., ABDEL-ATY, A. M., and ALY, M. M., 2013. Production and characterization of thermostable metallo-keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3. International Journal of Biological Macromolecules, 55:169–175.

ULFIG, K., PŁAZA, G., WORSZTYNOWİCZ, A. MAŃKO, T., TIEN, A. J., and BRIGMON, R. L., 2003. Keratinolytic fungi as indicators of hydrocarbon contamination and bioremediation progress in a petroleum refinery. Polish Journal of Environmental Studies, 12:245-250.

VAN DYKE, M. S., BLANCHARD, C. R., TIMMONS, S. F., SILLER-JACKSON, A. J., and SMITH, R. A., 2001. Soluble Keratin peptide, 6: 270.

VAN PUTTEN A. B., SPITZENBERGER, F., KRETZMER, G., HITZMANN, B., DORS, M., SIMUTIS, R., and SCHUGERL, K., 1996. Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by online monitoring and control in a stirred tank reactor. J Biotechnol 49:83-93.

VARELA, H., FERRARI, M. D., BELOBRADJIC, L., WEYRAUCH, R., and LOPERENA, M. L., 1996. Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. World J Microbiol Biotechnol, 12:643- 645.

VIGNESHWARAN, C., SHANMUGAM, S., and KUMAR, T.S., 2010. Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from Namakkal poultry farm. Researcher, 2:89-96.

VOET, D. and VOET J.G. 1995. Three-dimensional structure of proteins, 2. ed. New York: Wiley.

VOGET, S., STEELE, H. L., and STREIT, W. R., 2006. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. J. Biotechnol. 126 : 26-36.

WAITES, M. J., MORGAN, N. L., ROCKEY, J. S., and HIGTON, G., 2001. Industrial Microbiology: Introduction. Blackwell Science Ltd.

WANG, X. and PARSONS, C. M., 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. Poultry Science, 76(3): 491-496.

WAWRZKIEWICZ, K., WOLSKI, T., and LOBARZEWSKI, J., 1991. Screening of the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. Mycopathologia, 114:1-8.

WILLIAMS, C. M., RICHTER, C. S., MACKENZIE, J. M., and SHIH, J.C.H. 1990. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1509-1515.

XU B., ZHONG Q., TANG X., YANG Y., and HUANG Z., 2009. Isolation and characterization of a new keratinolytic bacterium that exhibits significant feather-degrading capability, Afr. J. Biotechnol., 18: 4590-4596.

YAMAMURA, S., MORITA, Y., and HASAN, Q., 2002. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. Journal of Bioscience and Bioengineering, 93: 595-600.

YANG, Y., JIANG, L., YANG, S., ZHU, L., WU, Y., and Lİ, Z., 2000. A mutant subtilisin E with enhanced thermostability. World J Microbiol Biotechnol 16:249-251.

YANG, Y., JIANG, L., ZHU, L., WU, Y., and YANG, S., 2000. Thermal stable and oxidation resistant variant of subtilisin. E. J Biotechnol, 81:113-118.

YORK, M. K., TRAYLOR, M.M, HARDY, J., and HENRY, M., 2010. Biochemical tests for the ıdentification of aerobic bacteria. catalase test. ın: Garcia LS (ed. in chief). CLINical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 3:17-11.

YUE, X. Y., ZHANG, B., JIANG, D. D., LIU, Y. J., and NIU, T. G., 2011. Separation and purification of a keratinase as pesticide against root-knot nematodes. World J Microbiol Biotechnol, 27:2147–2153.

ZAMOST, B. L. BRANTLEY, Q. I. ELM, D. D. BECK, C. M. 1991. Production and characterization of a thermostable protease produced by an asporogenous mutant of *Bacillus stearothermophilus*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 5: 303–312.

ZHAU, W., ZHANG, X. Y., and DUAN, G. L., 2011. Liquid-chromatography quantitative analysis of 20 amino acids after derivatization with FMOC-Cl and its application to different origin Radix isatidis. Journal of the Chinese Chemical Society, 58: 509-515.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Avusturya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Avusturya'da, lise öğrenimini Avusturya'da başlayıp Adana Özel Akdeniz Kolejinde tamamladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2012 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimine başladı.