Keratinaz Üretimi ve Karakterizasyonu: Doğal İzolat *Bacillus proteolyticus*

Aboubacar Sıdiki Dansako[1], Mete Karaboyun[2], Fatıma Masume Uslu[2], Damla Sihay[2], Hatice Korkmaz Güvenmez[3]

[1]Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana
[2]Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana
[3]Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Adana

hkorkmaz@cu.edu.tr

Giriş

Keratinazlar; suda çözünmeyen keratin substratları parçalama yeteneği ve substrat çeşitliliği nedeni ile yoğun çalışılan, enzim pazarı için kıymetli, hücre dışına salınan proteolitik enzim sınıfıdır. Deri, deterjan, tekstil, yem endüstrisinde (prionların arındırılmasında), medikal uygulamalarda (akne, nasır tedavisi, prion kontaminasyonlu materyallerin temizlenmesi), ilaç üretiminde (topikal ilaçların tırnak ve deriden geçişini arttırıcı etki) yaygın ve etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Mikroorganizma kökenli proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük gruplarından birini temsil eder. Bu araştırmada, doğal izolat *Bacillus proteolyticus*'tan keratinaz üretim koşullarının optimizasyonu ve keratinazın karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Gereçler ve Yöntemler

Keratinolitik *Bacillus proteolyticus* yoğun keratin içeren Çukurova Üniversitesi Tavuk Üretim Çiftliği atık alanından izole edilmiştir. Keratinaz üretimi için Temel Tüylü Besiyeri (NH_4Cl, NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgCl_2.6H_2O$, Maya, Öğütülmüş Tavuk Tüyü) kullanılmıştır. Keratinaz aktivitesi keratin-azure yöntemi ile serbest kalan azo boyasının kolorimetrik yöntemle ölçülmesi ile belirlenmiştir. Seçilen izolatlar arasından en yüksek aktivite gösteren suş 16S rRNA analizi ile tanılanmıştır. Enzim karakterizasyonu için çeşitli tamponlar (Sitrat-Fosfat, Sodyum-Fosfat, Glisin-NaOH, Borax-NaOH), çeşitli kimyasallar (EDTA, Tween-20, Üre, SDS) ve metal iyonları ($ZnCl_2$, $MgCl_2$, $NiCl_2$, $CaCl_2$, $HgCl_2$, $CuCl_2$) tercih edilmiştir.

Bulgular

Toplam 63 Bacillus izolatından en yüksek aktivite gösteren 30 nolu suş, 16S rRNA analizi ile *Bacillus proteolyticus* (%100 benzerlik, OK605868.1) olarak belirlenmiştir. Optimum üretim koşulları pH=8,0 ve 30ºC; enzimin optimum aktivitesi pH: 9,0 ve 50 ºC'de saptanmıştır. Enzim 50-100 ºC'lerde 30 dk inkübe edildiğinde 50 ºC'lik ön inkübasyondan sonra aktivitesini yüksek oranda (%90) korumuş, 70 ºC'nin üzerinde aktivite tamamen inhibe olmuştur. Kimyasallar ve metal iyonlarının 1-5 mM konsantrasyonları ile 30 dk ön inkübasyonundan sonra; Tween 20 (%215) ve SDS'nin (%204) önemli oranda aktiviteyi arttırdığı, EDTA (%76), Üre (%40), $ZnCl_2$ (%28), $MgCl_2$ (%51), $NiCl_2$ (%24), $CaCl_2$ (%56), $HgCl_2$ (%0) ve $CuCl_2$ (%83)'ün aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir.

Sonuç ve Tartışma

B. proteolyticus'un mezofil ve alkali koşullarda optimum enzim üretme yeteneğinde olduğu; üretilen alkali, termotolerant enzimin, deterjanların varlığında yüksek düzeyde aktivite artışı deterjan endüstrisi için eşsiz olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus proteolyticus*, keratinaz, enzim, karakterizasyon.

Teşekkür: Çukurova Üniversitesi BAP birimi tarafından Proje No: FYL-2021-13486 ile desteklenmiştir.