ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Doğal *Bacillus* sp. Suşlarından Halofilik Mezofil, Cold Aktif Alkaline Nötral Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Üretimi, Tüy, Yün ve Kollajenin Enzimatik hidrolizi, Hidrolizatların Yem, Gübre ve Kozmetikte Kullanılabilirliği

Süreyya KOCAMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

Doğal *Bacillus* sp. Suşlarından Halofilik Mezofil, Cold Aktif Alkaline Nötral Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Üretimi, Tüy, Yün ve Kollajenin Enzimatik hidrolizi, Hidrolizatların Yem, Gübre ve Kozmetikte Kullanılabilirliği

Süreyya KOCAMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 21/03/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN (Danışman) ……..……

: Prof. Dr. Fuat BUDAK ……..……

: Prof. Dr. Hatica Korkmaz GÜVENMEZ ……..……

: Prof. Dr. Osman KOLA ……..……

:Prof. Dr. Mutlu Nisa Ünaldı CORAL ……..……

Bu Tez Fen BilimLeri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBA-2020-13103

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.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
SİMGELER VE KISALTMALAR XIII
1. GİRİŞ 1
1.1. Mikrobiyal Enzimler 4
1.1.1. Alkalifiller ve Alkalifilik Enzimler 8
1.1.2. Termofiller ve Termofilik Enzimler 9
1.1.3. Cold Aktif Enzimler 9
1.2. Halofilik Enzimler 11
1.2.1. Proteazlar 11
1.2.2. Alkali Proteazlar 13
1.2.3. Keratinolitik Proteazlar 13
1.2.4. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Genel Özellikleri 14
1.3. Mikrobiyal Proteazların Sınıflandırılması 14
1.3.1. Serin Proteazlar 15
1.3.2. Sistein Proteazlar 15
1.3.3. Aspartat Proteazlar 15
1.3.4. Metallo Proteazlar 15
1.4. Keratin 16
1.4.1. Keratin Hidrolize Eden Bakteriler 19
1.5. Keratin Hidrolizatlarının Bitki ve Hayvan Uygulamaları İçin Önemi 21
1.6. Kollajen 25
1.6.1. Kollejenolitik Proteazlar 25
1.6.2. Kollajenaz Enzimlerinin Kullanım Alanları 26
1.6.3. Lomber Disk Hernisi Tedavisinde Kollajenaz Kullanımı 27
1.6.4. Yara İyileşmesinde Debridman Ajanı Olarak Kollajenaz Kullanımı 28
1.6.5. Dupuytren Hastalığının Tedavisinde Kollajenaz Kullanımı 28
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 30
3. MATERYAL ve METOD 39
3.1. Materyal 39
3.1.1. Besiyerleri 39
3.2. Kullanılan Çözeltiler 42

3.2.1. Aktivite Analizlerinde Kullanılacak Keratinin Hazırlanması 42
3.2.2. EMS (Etil Metan Sülfonat) 42
3.3. Tampon Çözeltiler 42
3.3.1. Sodyum-Fosfat Tamponu.....42
3.3.2. Glisin-NaOH Tamponu.....43
3.3.3. Borax-NaOH Tamponu.....43
3.4. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Solüsyonlar..... 43
3.4.1. Solüsyon A.....43
3.4.2. Solüsyon B.....44
3.4.3. Solüsyon C.....44
3.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat) (%10).....44
3.4.5. Elektroforez Tamponu (pH 8.3).....44
3.4.6. Örnek Tamponu (pH 6.8).....44
3.4.7. Boyayı Geri Alma Solüsyonu 44
3.4.8. Renatürasyon Solüsyonu (%2.5).....44
3.4.9. Coomassie Brillant Blue R250 (%2.5).....45
3.4.10. SDS-PAGE Zimogram Analizlerinde Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları 45
3.4.11. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları 45
3.4.12. Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi 45
3.4.13. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25).....45
3.4.14. 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) 45
3.4.15. Voges Proskauer Test Çözeltisi 45
3.4.16. Lowry Metodunda Kullanılan Solüsyonlar.....46
3.5. Metod..... 46
3.5.1. Keratinaz ve Kollajenaz Üreticisi Doğal Halofilik Mezofil, Cold, Alkaline ve Nötral *Bacillus* sp. İzolasyonu.....46
3.5.2. Keratinaz ve Kollajenaz Üreten Suşların Katı Besiyerinde Enzim Aktivitelerinin Saptanması 47
3.5.3. Bakterilerin Katı Besiyerinde Optimum Ürediği ve Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması 47
3.5.4. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimi Sentezleyen Suşlarının Tanımlama Çalışmaları.....48
3.5.5. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama.....48
3.5.6. Keratinaz ve Kollagenaz Pozitif Suşların Biyokimyasal Tanımlanması 49

3.5.7. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 *ve Brevibacillus* SK-27 Suşlarından Keratinaz ve Kollajenaz Genlerinin Klonlanması İçin Genomik DNA İzolasyonun Yapılması 52
3.5.8. *Brevibacillus agri* SK-27 *ve Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşlarına Ait Kollajenaz ve Keratinaz Genlerinin Biyoinformatik Analizler İle Belirlenmesi52
3.5.9. Kollejenaz ve Keratinaz Genlerinin Sekans Primerleri ile Çoğaltılması 53
3.5.10. *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Keratinaz ve Kollajenaz Gen Sekanslarının Çıkarılması 54
3.5.11. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerin Expresyon Vektörlerine Klonlanması.....56
3.5.12. pET28aa Vektörlerinin PCR İle Linear Hale Getirilmesi 56
3.5.13. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerinin PCR İle Çoğaltılması 58
3.5.14. Keratinaz ve Kollajenaz Genlerin pET28a İfade Vektörlerine In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Kullanılarak Klonlanması 60
3.5.15. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerini İçeren pET28a İfade Vektörlerin *E. coli* DH5α Bakterisine Transformasyonu 61
3.5.16. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerini İçeren pET28a İfade Vektörlerin *E.coli* BL21(DE3) Bakterisine Transformasyonu 63
3.5.17. *Escherichia coli'*den Kompetence Hücre Hazırlanması 63
3.5.18. *Escherichia coli* Kompetens Hücresine Transformasyon 64
3.5.19. Transformat Suşta Hücre İçi Enzimlerin Ekspresyonu ve Enzim İzolasyonu64
3.5.20. Keatinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma Deneyleri 65
3.5.21. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Aktivite Analizi 65
3.5.22. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Protein Konsantrasyonunun Saptanması 66
3.5.23. Tirozin Konsantrasyon Eğrisi 66
3.5.24. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Ünitesinin Saptanması.....67
3.5.25. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması 67
3.5.26. Keratinaz ve Kollajenaz Enziminlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması 67
3.5.27. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Termal Stabilitenin Saptanması 67
3.5.28. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimeri pH Stabilitesinin Saptanması 68
3.5.29. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Aktivitesine NaCL'ün Etkisi 68
3.5.30. Enzim Aktiviyesine Metal İyonları, Şelatörler, İnhibitörler, Yüzey Aktif Maddeler, Deterjanlar ve Okside Edici Ajanların Etkisi 68
3.5.31. Tüy parçalama Oranının Belirlenmesi 68

3.5.32. Keratinaz ve kollajenaz üreticisi suşlarda EMS (Emil Metan Sülfonat) ile mutasyon çalışması 68
3.5.33. Keratinaz ve Kollajenaz Üreticisi Suşlarda UV Mutasyon Çalışması 70
3.5.34. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Substrat Konsantrasyonu ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması 70
3.5.35. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Kaynağı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması 70
3.5.36. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması 70
3.5.37. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Miktarı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması 70
3.5.38. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Miktarı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması 71
3.5.39. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacllus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Substrat Spesifiklinin Saptanması 71
3.5.40. Kısmi Saflaştırılmış Enzimin Katı Besiyerindeki Aktivite Analizi 71
3.5.41. Keratinaz Enzimlerinin Ham Tüy Eritme Deneyi 71
3.5.42. Tavuk Tüyü ve Kollajen Hidrolizatlarının HPLC Sistemi İle Serbest Aminoasit Profillerinin Analizi 72
3.5.43. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antibakteriyel Aktivite Analizi 72
3.5.44. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etki Analizi 72
3.5.45. Keratinaz ve Kollajenaz Nnzimlerinin Gümüş Geri Kazanım Analizi 72
3.5.46. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antioksidan Aktivite (DPPH- Serbest Radikal Giderme Aktivitesi) Analizi 73
3.5.47. Doğal ve Mutant Organizmadan Elde Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerin Yıkama Performans Analizi 73
3.5.48. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Kombinasyonunun Antibakteriyel ve Yara İyileştirme Uygulaması 74
3.5.49. Keratin ve Kollajen Hidrolizatlarının Bitki Performans Denemeleri 74
3.5.50. Keratin ve Kollajen Hidrolizatlarının Etlik Piliçlerde Performans Artışı ve Yem Değerlendirmeye Etkisi 74
3.5.51. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi 75
3.5.52. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10) 75
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 77
4.1. Kısmi Saflaştırılan Keratinaz Enziminin Katı Besiyerinde Aktivite Sonuçları 81

4.2. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Bulguları 83
4.3. 16S Moleküler Tanılama Bulguları 85
4.3.1. *Bacillus* sp. SK 36 Suşunun (*Bacillus albus* SK-36) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç.....85
4.3.2. *Bacillus sp*. SKK-5 Suşunun (*Bacillus tropicus* SKK-5) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç.....86
4.3.3. *Bacillus sp*. SK-27 Suşunun (*Brevibacillus agri* SK-27) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç.....88
4.3.4. *Bacillus sp*. SKK-2 Suşunun (*Lysinibacillus fusiformis*) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç.....89
4.4. Keratin ve Kollajen Kaynakları 91
4.5. Keratinaz Enzim Üretiminde Kullanılan *Brevibacillus agri SK-27* Suşunun Enzim Üretim Zamanının Saptanması..... 92
4.6. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Karakterizasyonu 93
4.6.1. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değeri Sonuçları 94
4.6.2. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değeri Sonuçları 94
4.6.3. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları.....95
4.6.4. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin pH Stabilitesi Sonuçları 96
4.6.5. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine NaCL Etkisi Sonuçları.....97
4.6.6. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine Kimyasalların Etkisi 98
4.6.7. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Sıcaklık, Süre ve Substrat Miktarının Etkisi 101
4.6.8. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisinin Saptanması 103
4.6.9. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Azot Miktarlarının Etkisi 104
4.6.10. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....106
4.6.11. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi.....107

4.6.12. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Sentezlediği Keratinaz Enzimi Zimogram Analizi 109
4.7. Keratinaz Enzim Üretiminde Kullanılan *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Enzim Üretim Zamanının Saptanması..... 110
4.7.1. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması 111
4.7.2. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması 112
4.7.3. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Termal Stabilite Bulguları 113
4.7.4. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin pH Stabilite Bulguları 114
4.7.5. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine NaCl Etkisine 115
4.7.6. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine Kimyasalların Etkisi (10 ve 5 mM) 116
4.7.7. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi 118
4.7.8. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretiminde Azot Kaynağının Saptanması.....120
4.7.9. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Azot Miktarının Etkisi 121
4.7.10. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi 122
4.7.11. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinase Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi.....124
4.7.12. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Sentezlediği Keratinaz Enzimi Zimogram Analizi 125
4.8. Kollejenaz Enzimi Üreten *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarının Üreme Eğrisi..... 125
4.8.1. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması.....128
4.8.2. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması.....129
4.8.3. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Termal Stabilite Değerinin Saptanması.....130

4.8.4. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun pH Stabilite Değerinin Saptanması.....131
4.8.5. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz Enzimine NaCL Etkisinin Saptanması.....132
4.8.6. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz Enzimine Kimyasalların Etkisinin Saptanması (5 ve 10 mM).....133
4.8.7. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunda Kollajenaz Enzim Sentezine Farklı Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....136
4.8.8. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Kaynağının Etkisi 140
4.8.9. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Miktarının Etkisi.....142
4.8.10. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi 143
4.8.11. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşlarının Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi 145
4.8.12. *Lysinibacillus fusiformis* SSK-2 Suşunun Sentezlediği Kollajenaz Enzimi Zimogram Analizi.....147
4.9. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimi Otimum pH Değerinin Saptanması..... 147
4.9.2. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enziminin Termal Stabilitesinin Saptanması.....149
4.9.3. *Bacillus tropicus* SKK-5 Keratinaz Enziminin pH Stabilitesinin Saptanması.....150
4.9.4. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimine NaCL Etkisinin Saptanması 151
4.9.5. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimine Kimyasalların Etkisinin Saptanması (5 ve 10 mM).....152
4.9.6. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunda Kollajenaz Enzim Sentezine Farklı Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Substrat Miktarının Etkisi 155
4.9.7. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Azot Kaynağının Etkisi 160
4.9.8. *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Azot Miktarının Etkisi 162
4.9.9. *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi 163
4.9.10. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Karbon Miktarının Etkisi 165

4.9.11. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Sentezlediği Kollajenaz Enzimi Zimogram Analizi 166
4.10. Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Sentesinden Sorumlu Genin Klonlama Verileri..... 167
4.10.1. *Lysinibacillus fusiformis* Kolajenaz Geninin Nükleotid Dizisi.....167
4.10.2. *Brevibacillus agri* SK-27 Keratinaz Enzimi Sentezleyen Geninin Nükleotid Dizisi 169
4.10.3. Klonlanan Kollajenaz Enzimlerinin Aktivite Analizi 170
4.10.4. Keratinaz enzim geni taşıyan pET-28a Rekombinant DNA 171
4.10.5. Kollajenaz enzim geni taşıyan pET-28a Rekombinant DNA 172
4.10.6. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacllus agri* SK-27, *Lysiniobacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Substrat Spesifiklinin Saptanması 172
4.11. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin TLC Analizi İle Farklı Substratlarda Açığa Çıkan Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması 177
4.12. *Brevibacillus agri* SK-27, *Bacillus albus* SK-36, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından İzole Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin HPLC Sonuçları 181
4.13. *Bacillus albus* SK-36, *Bacillus agri* SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşuna Ait EMS Mutasyon onuçları 189
4.14. Bacillus albus SK-36, Brevibacillus agri SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşuna ait UV mutasyon sonuçları 195
4.15. Keratinaz ve kollajenaz enzim üreticisi ana suşlar ve mutant suşların (EMS ve UV) enzim üretme yeteneklerinin karşılaştırılması 200
4.16. Enzim Aktivitesinin Saptanması İçin Oluşturulan BSA Grafiği 203
4.17. Enzim Aktivitenin Saptanması İçin Oluşturulan Trozinaz Grafiği..... 204
4.18. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzim aktivite değerleri 204
4.19. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri..... 205
4.20. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen UV mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri..... 206
4.21. *Bacillus albus* SK-36, Suşlarından EMS Mutasyonu ile Üretilen Organizmaların Keratinaz Enzim Aktivite Değerleri 207
4.22. *Bacillus albus* SK-36, Suşundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Keratinaz Enzim Aktivite Değerleri 208

4.23. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan EMS mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri 210
4.24. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri 211
4.25. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşundan EMS Mutasyonu ile ÜretilenMutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri 212
4.26. *Bacillus tropicus* SKK-5 Sundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri 213
4.27. Röntgen Filminden Gümüş Giderme Uygulaması 215
4.28. Doğal Suşlardan İzole Edilen Kollajenaz ve Keratinaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etkisi 215
4.29. EMS ve UV Mutasyonu İle Oluşturulan Suşlar ve Doğal Suşlardan Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etkisinin Karşılaştırılması 216
4.30. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, *Bacillus tropicus* SKK-5, *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 Suşlarından Üretilen Kollajenaz ve Keratinaz Enzimerinin Yıkama Performansı 218
4.31. Ham tavuk tüyünün enzimatik hidroliz uygulamaları 222
4.32. *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 Suşlarından Üretilen Keratinaz Enzimi İle Tavuk Tüy Ununun (Feather meal) Hidroliz Sonuçları 226
4.33. Kemik Unununun Hidroliz Denemeleri 227
4.34. *Bacillus albus* SK-36, *Bacillus atropus* SKK-5, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antioksidan Etkisi 228
4.35. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Brevibacillus* SK-27 Suşlarından İzole Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antibakteriyel Aktivite Bulguları 228
4.36. Antibakteriyel Etkinlik Analizlerinde Kullanılan Kollajenaz ve Keratinaz Enzimlerinin Keçi Ağız ve Göz Yarası İle Fıtık Amaliyat Yarasında Uygulanması 230
4.37. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Biber Uygulaması 233
4.38. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Karanfil Uygulaması 236
4.39. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Hayvan Yeminde Kullanılması 238
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 241
KAYNAKLAR 288
ÖZGEÇMİŞ 303

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Doğal Bacillus sp. Suşlarından Halofilik Mezofil, Cold Aktif Alkaline Nötral Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Üretimi, Tüy, Yün ve Kollajenin Enzimatik hidrolizi, Hidrolizatların Yem, Gübre ve Kozmetikte Kullanılabilirliği

Süreyya KOCAMAZ

Danışman: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada Tuz gölü, Tavuk üretim çiftliklerinin atık depolarından, alınan örnekler 80ºC su banyosunda ısı şoku uygulanarak koloni morfolojilerine göre *Bacillus* sp olanlar izole edilmiştir. Suşlar 16S moleküler tanılama ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Enzim üretimi için seçilen iki keratinaz ve iki kollajenaz üreticisi suşa EMS ve UV mutasyonu uygulanarak enzim üretim verimLiliği test edilmiştir. Enzimler tavuk tüyü, tüy unu ve kemik unu kullanılarak hidrolizasyon analizleri yapılmıştır. Enzimler ve hidroliz ürünlerinin HPLC, Antioksidan, Antibakteriyel, Fibrinolitik etki, Gümüş giderme, bitkisel ve hayvansal performansa etki, Yara iyileştirme ve deriden kıl giderimi uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Moleküler tanılama sonunda keratinaz üreticisi *Bacillus sp*. SK-36 *Bacillus albus, Bacillus* SK-27 *Brevibacillus agri*, kollajenaz üreticisi *Bacillus* SKK-2 *Lysinibacillus fusiformis, Bacillus* sp. SKK-5 *Bacillus tropicus* olarak tanımlanmıştır. *Bacillus albus* optimum aktivitesini 10ºC ve pH 10.0 da göstermiştir. Zymogamda 38 kDa'luk tek aktivite bandı elde edilmiştir. *Brevibacillus agri* optimum aktivitesini pH 10.0 ve 50ºC de göstermiştir. Zimogram analizinde 240 ve 166 kDa'luk iki band elde edilmiştir. Enzim 20-80ºC ve pH 6-13 aralığında %100 stabildir. %15 NaCL de %104 aktivite göstermiştir. *Lysinibacillus fusiformis* 0ptimum aktivitesini pH 7.0 ve 50ºC de göstermiştir. Zimogram analizinde 160, 91, 59 kDa ağırlığında 3 aktivite bandı elde edilmiştir. Enzim metallo-serin proteaz özelliğindedir. *Bacillus tropicus* optimum aktivitesini pH 11.0 ve 10ºC de göstermiştir. Zimogram analizinde 98 ve 48 kDa iki band elde edilmiştir. Enzim 70-90ºC aralığında %113 stabil kalmıştır. %20 NaCL konsantrasyonunda %93 aktiviteye sahiptir. Enzim pH 10 da %65 stabil kalmıştır. Enzim metallo-serin proteaz özelliğindedir.

İzole edilen enzimLer cold ve mezofil, alkali, termostabil, NaCL stabil, inhibitör, şelatör, deterjan, okside edici ajanlar ve metal iyonlarına dirençli ve indüklenebilir özelliktedir. Enzimler deri, tekstil, bitkisel üretim, hayvansal üretim, et endüstrisi ve kişisel bakım ürünlerinin üretildiği bütün alanlara uygulama potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Keratinaz, Kollajenaz, *Bacillus* sp. Gübre, Kozmetik ürünleri

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

Production of Halophilic Mesophilic, Cold Active Alkaline Neutral Collagenase and Keratinase Enzymes from Natural Bacillus sp Strains, Enzymatic Hydrolysis of Feather, Wool and Collagen, Usability of Hydrolysates in Feed, Fertilizer and Cosmetics

Süreyya KOCAMAZ

Advisor: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Department of Biology

ABSTRACT

In this study, samples taken from waste storages of chicken production farms in Salt Lake were heat shocked in 80ºC water bath and *Bacillus sp*. were isolated according to their colony morphology. Strains were identified at species level with 16S molecular identification. Two keratinase and two collagenase producer strains selected for enzyme production were subjected to EMS and UV mutation to test enzyme production efficiency. Hydrolyzation analyses of enzymes were performed using chicken feather, feather meal and bone meal. FT-IR, HPLC, antioxidant, antibacterial, fibrinolytic effect, silver removal, effect on plant and animal performance, wound healing and hair removal from skin were performed for enzymes and hydrolysis products.

As a result of molecular identification, keratinase producer *Bacillus sp* SK-36 was identified as *Bacillus albus*, *Bacillus SK-27* as *Brevibacillus agri*, Collagenase producer *Bacillus* SKK-2 as *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus sp* SKK-5 as *Bacillus tropicus. Bacillus albus* showed its 0ptimum activity at 10ºC and pH 10.0. A single activity band of 38 kDa was obtained in zymogam. *Brevibacillus agri* showed its 0ptimum activity at pH 10.0 and 50ºC. Two bands of 240 and 166 kDa were obtained in zymogram analysis. The enzyme is 100% stable in the range of 20-80ºC and pH 6-13. It showed 104% activity in 15% NaCL. *Lysinibacillus fusiformis* showed its optimum activity at pH 7.0 and 50ºC. In the zimogram analysis, 3 activity bands weighing 160, 91, 59 kDa were obtained. The enzyme has metalloserine protease property. *Bacillus tropicus* showed optimum activity at pH 11.0 and 10ºC. Two bands weighing 98 and 48 kDa were obtained in the zymogram analysis. The enzyme remained 113% stable in the range of 70-90ºC. It has 93% activity at 20% NaCL concentration.

The isolated enzymes are cold and mesophilic, alkaline, thermostable, NaCL stable, inhibitory, chelating, detergent, oxidizing agents and metal ions resistant and inducible. The enzymes have the potential to be applied to all areas where leather, textile, plant production, animal production, meat industry and personal care products are produced.

Keywords: Keratinase, Collagenase, Bacillus sp. Fertilizer, Cosmetic products

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana devamlı yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a,

Doktora tez çalışmam sırasında çalışmalarıma pozitif katkı yapan, yönlendiren, teşvik eden TİK komitesi üyelerim ile sınavda katkısını esirgemeyen jüri üyesi hocalarıma

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve beni bilgi ve becerileri ile destekleyen Biyolog Dr. Derya KOCAMAZ, Yüksek Biyolog Selma GÜRZ ve Yüksek Matamatikçi Gizem KUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Biricik oğlum sevgili Hasan Doğukan AKER, Canım Annem Samiye Kaya KOCAMAZ ve Canım Babam Hasan KOCAMAZ'a hayatım boyunca yanımda oldukları ve her konuda destekledikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bana bu çalışmanın yürütülmesi ve tamamlanmasında maddi destek sağlayan Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve 1512 projesindeki desteği için TUBİTAK TEYDEB birimine çok teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması 42
Çizelge 3.2. Glisin-NaOH tampon çözeltilerinin hazırlanması 43
Çizelge 3.3. Borax-NaOH Tamponu 43
Çizelge 3.4. Mikroorganizmalardan izole edilen gDNA miktar ve saflığı 50
Çizelge 3.5. 16S rRNA Geninin PCR ile çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB) 51
Çizelge 3.6. 16S rRNA Geninin PCR ile çoğaltılası için kullanılan PCR koşulları 51
Çizelge 3.7. Kollejenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB) 53
Çizelge 3.8. Kollejenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR Bileşenleri (Q5® High Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB) PCR Protokolü 53
Çizelge 3.9. pKI1.1R vektörürünün *EcoRV* kesim bileşenleri (Eco32I (EcoRV) (10 U/µL) – (Thermo Fisher, ER0301) 55
Çizelge 3.10. pKI1.1R vektörlerinin jelden eksraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini 55
Çizelge 3.11. pKI1.1R, Keratinaz ve kollajenaz genlerin ligasyon içeriği ve koşulları (T4 DNA Ligase 2011A, Takara) 55
Çizelge 3.12. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan primer dizileri 56
Çizelge 3.13. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için Kullanılan PCR Bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) 56
Çizelge 3.14. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için Kullanılan PCR Bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR Protokolü 57
Çizelge 3.15. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) 57
Çizelge 3.16. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR protokolü 57
Çizelge 3.17. pET28a vektörlerinin jelden eksraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini 58
Çizelge 3.18. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) 59
Çizelge 3.19. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR Protokolü 59
Çizelge 3.20. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin PCR pürifikasyonu ve jelden ekstraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini 60
Çizelge 3.21. Firmanın önerdiği PCR protokolü 61
Çizelge 3.22. pET28a ifade vektörüne Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin klonlanması için In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Ligasyon koşul ve bileşenleri 61

Çizelge 3.23. In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Ligasyon koşulları 61
Çizelge 3.24. Kollajenaz ve Keratinaz genlerini içeren pET28a vektörünün *E.coli* DH5α koloni PCR bileşenleri (DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL), EP0705) 62
Çizelge 3.25. Kollajenaz ve Keratinaz genlerini içeren pET28a v ifade vektörlerin *E.coli* DH5α koloni PCR Protokolü (DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL), EP0705) ... 62
Çizelge 3.26. *E. coli* alıcı hücre hazırlığı için kullanılan Tampon 1 63
Çizelge 3.27. *E. coli* alıcı hücre hazırlığı için kullanılan Tampon 2 64
Çizelge 3.28. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması 66
Çizelge 3.29. Tirozin Standart Grafiğinin Hazırlanması 66
Çizelge 3.30. *Bacillus albus* SK 36 EMS mutasyon uygulaması 69
Çizelge 3.31. *Brevibacillus agri* SK 27 EMS mutasyon uygulaması 69
Çizelge 3.32. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 EMS mutasyon uygulaması 69
Çizelge 3.33. *Bacillus tropicus* SKK-5 EMS mutasyon uygulaması 69
Çizelge 3.34. Keratinaz ve kollajeaz enzimlerinin zimogram analizi için kullanılan SDS-PAGE ayırma jel bileşimi 75
Çizelge 3.35. Keratinaz ve kollajeaz enzimlerinin zimogram analizi için kullanılan SDS-PAGE dengeleme jel bileşimi 75
Çizelge 4.18. *Bacillus albus* SK-36 suşunun UV mutasyon sonuçları 195
Çizelge 4.20. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun UV mutasyon sonuçları 198
Çizelge 4.21. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun UV mutasyon sonuçları 199

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteazların farklı endüstriyel sektörlerdeki uygulamaları 4
Şekil 1.2. Keratinin yapısı 23
Şekil 1.3. Keratin kaynakları ve keratinazla hidrolize edilmiş ürünlerin kullanım alanları 24
Şekil 1.4. Keratin ve atık ürünlerinden elde edilen amino asit, peptidler ve keratinaz enziminin kullanım alanları 25
Şekil 1.5. Kollajenaz enziminin kullanım alanları 33
Şekil 3.1. Keratinaz ve kollegenaz geninin PCR sonucu 54
Şekil 3.2. pET28a (5195 bp) PCR ile liner hale getirilmesi. 60
Şekil 3.3. pET28a vektörüne klonlama yapmak için *Brevibacillus agri* SK-27 383aa keratinaz geninin PCR ile çoğaltılması..... 61
Şekil 3.4. pET28a vektörüne klonlama yapmak için *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2l072aa kollejenaz geninin PCR ile çoğaltılması 62
Şekil 4.1. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 72 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri 77
Şekil 4.2. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 96saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri 78
Şekil 4.3. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri 78
Şekil 4.4. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 96 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri..... 78
Şekil 4.5. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri..... 79
Şekil 4.6. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri..... 79
Şekil 4.7. Soğukta aktif halofil cold (Tuz gölü) izolatlarının farklı pH aralığında, 10°C ve 72-140 saatlik inkübasyon periyodunda tavuk tüylü (feather meal) besiyerindeki proteolitik akriviteleri 79
Şekil 4.8. Keçi kolu atığından izole edilen kollajenolitik suşların pH 6-11 aralığı, 20°C ve 48 saatlik inkübasyon sonunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri..... 80
Şekil 4.9. Tuz gölünden izole edilen termofilik keratinolitik ve kollajenolitik suşların pH 6-12 aralığı 65°C ve 48 saatlik inkübasyon sonunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri 80
Şekil 4.10. Keratinaz üreticisi suşların tavuk tüylü besiyerindeki görünümleri 81
Şekil 4.11. Kollajenaz enzimi sentezleyen suşların jelatinli besiyerindeki görünümleri..... 81

Şekil 4.12. Tavuk tüylü besiyerinde *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarının aktivite zonları 82
Şekil 4.13. Keratinaz ve kollajenaz üreten suşlardan izole edilen enzimLerin skimmilkli besiyerindeki aktivite davranışları. 82
Şekil 4.14. *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 (Kollajenaz enzim üreticisi) 83
Şekil 4.15. *Bacillus tropicus* SKK-5 (Kollajenaz üreticisi) 83
Şekil 4.16. *Brevibacillus agri* SK-27 (Keratinaz üreticisi) 84
Şekil 4.17. *Bacillus albus* SK-36 (Keratinaz üreticisi) 84
Şekil 4.18. *Bacillus albus* SK-36 suşunun filogenetik ağacı 86
Şekil 4.20. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun filogenetik ağacı 89
Şekil 4.21. *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 suşunun filogenetik ağacı 90
Şekil 4.22. Yün atığının doğadaki görünümü 91
Şekil 4.23. Tavuk tüyü atığı (A), Toz haline getirilmiş (B) Elenmiş (C) 91
Şekil 4.24. Kollajen kaynakları. Balık derisi (A) Balık pulu (B) 92
Şekil 4.25A.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim üretme zamanının saptanması 93
Şekil 4.25B.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim sentezleme zamanının saptanması 93
Şekil 4.26. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan üretilen keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerleri 96
Şekil 4.27. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık değeri 95
Şekil 4.28. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Termal Stabilite Sonuçları 96
Şekil 4.29. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzimi pH stabilite bulguları 97
Şekil 4.30. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim aktivitesine NaCL etkisi 98
Şekil 4.31. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin 10 mM kimyasallara karşı davranışı 100
Şekil 4.32. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin 5 mM kimyasallara karşı davranışı 101
Şekil 4.33. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine substrat miktarının (30°C, 72 ve 120 saat) 102
Şekil 4.34. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine azot kaynağının etkisi (30°C ve 72 saat) 103
Şekil 4.35. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine azot miktarının etkisi (30°C ve 72 saat) 105
Şekil 4.36. *Brevibacillus agri* SK-27'nin keratinaz enzim sentezine karbon kaynaklarının etkisi 106
Şekil 4.37. *Brevibacillus agri* SK-27'nin keratinaz enzim üretimine karbon miktarının etkisi (30°C ve 72 saat) 108

Şekil 4.38. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü..... 109
Şekil 4.39 A. *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretme eğrisi 110
Şekil 4.39 B. *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretme eğrisi 111
Şekil 4.40. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri..... 112
Şekil 4.41. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 113
Şekil 4.42. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin termal stabilite sonuçları 114
Şekil 4.43. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin pH stabilitesi sonuçları 115
Şekil 4.44. *Bacillus albus* SK 36 suşunun ürettiği keratinaz enzimine NaCL etkisi 116
Şekil 4.45. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enzimine 10 mM kimyasalların etkisi..... 117
Şekil 4.46. *Bacillus albus* SK-36.1 keratinaz enzim aktivitesine 5 mM kimyasalların etkisi 118
Şekil 4.47. *Bacillus albus* SK 36 suşunun keratinaz üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (72 saat)..... 119
Şekil 4.48. *Bacillus albus* SK-36 Keratinaz üreticisi suşun en fazla enzim ürettiği azot kaynağının saptanması 72 saat 120
Şekil 4.49. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enzim üretimine azot miktarının etkisi (72 saat)..... 122
Şekil 4.50. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enzim üretimine karbon kaynağının etkisi (120 saat)..... 123
Şekil 4.51. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enzim üretimine karbon miktarının etkisi (72 saat)..... 124
Şekil 4.52. *Bacillus albus SK-36* suşundan üretilen keratinaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü 125
Şekil 4.53A.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun üreme eğrisi 126
Şekil 4.53B. B.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun üreme eğrisi..... 126
Şekil 4.54A.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun üreme eğrisi 127
Şekil 4.54B. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun üreme eğrisi 128
Şekil 4.55. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunndan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktivite bulguları. 129
Şekil 4.56. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunndan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık bulguları. 130
Şekil 4.57. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun termal satbilite bulguları. 131
Şekil 4.58. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun tpH satbilite bulguları 132
Şekil 4.59. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine NaCL etkisi 133
Şekil 4.60. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (10 mM) 134

Şekil 4.61. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (5 mM) 135
Şekil 4.62. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 sununun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (10 °C de 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)..... 136
Şekil 4.63. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 sununun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (30 °C de 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)..... 138
Şekil 4.64. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzim sentezine azot kaynağının etkisi (30°C 96 saat). 141
Şekil 4.65. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimine azot miktarının etkisi..... 143
Şekil 4.66. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezine karbon kaynağınının etkisi (30°C de 24 saat)..... 144
Şekil 4.67. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi (30°C 120 saat) 146
Şekil 4.68. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü..... 147
Şekil 4.69. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum pH değeri..... 148
Şekil 4.70. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum sıcaklık değeri..... 149
Şekil 4. 71. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin termal stabilite değeri 152
Şekil 4.72. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin pH stabilite değeri..... 151
Şekil 4.73. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimine NaCL etkisi 152
Şekil 4.74. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (10 mM) etkisi . 153
Şekil 4.75. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (5 mM) etkisi ... 154
Şekil 4.76. *Bacillus tropicus* SKK-5 sununun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (10 °C ve 24-168 saat..... 156
Şekil 4.77. *Bacillus tropicus* SKK-5 sunda kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (30 °C ve 24-168 saat). 158
Şekil 4.78. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzim sentezine azot kaynağının etkisi (30°C 96-146 saat). 161
Şekil 4.79. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimine azot miktarının etkisi 163
Şekil 4.80. *Bacillus trophicus* SKK-5 kollajenaz enzim sentezine karbon kaynağını etkisi (30°C de 24-216 saat). 166

Şekil 4.81. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi (30°C 120-168 saat)..... 165
Şekil 4.82. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü..... 167
Şekil 4.83. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geninin nükleotid dizisi..... 168
Şekil 4.84.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geninin amino asit sekansı171
Şekil 4.85. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda keratinaz sentezleyen genin nükleotid dizisi..... 169
Şekil 4.86. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimini sentezleyen genin amino asit sekansı..... 172
Şekil 4.87. Rekominant suşlardan kollajenaz enzim üretimi ve ana suşla karşılaştırılması 170
Şekil 4.88. *Brevibacillus agri* SK-27 keratinaz geni taşıyan rekombinant DNA 171
Şekil 4.89. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geni taşıyan rekombinant DNA 172
Şekil 4.90. *Bacillus albus* SK-36 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi 174
Şekil 4.91. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi..... 175
Şekil 4.92. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi..... 176
Şekil 4.93. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi. 177
Şekil 4.94. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kazeni hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profili..... 178
Şekil 4.95. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kazeni hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profili 179
Şekil 4.96. *Lysinibacillus fusiformis SKK-2* suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kollaen (kemik unu), jelatin, keratin (tavuk tüyü unu),kazein ve skimmilki hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profili..... 180
Şekil 4.97. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimininkollaen (kemik unu), jelatin, keratin (tavuk tüyü unu),kazein ve skimmilki hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profili 181
Şekil 4.98. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suuşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları 190
Şekil 4.99. *Bacillus tropicus* SKK-5 suuşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları 191
Şekil 4.100. *Brevibacillus agri* SK-27 suşuna ait EMS mutantlar ve orijinal suşun aktivite zon çapları 192
Şekil 4.101. *Bacillus albus* SK-36 suuşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları 194
Şekil 4.102. *Bacillus albus* SK-36 suşunun UV mutasyon sonuçları..... 196

Şekil 4.103. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun UV mutasyon sonuçları 197
Şekil 4.104. *Brevibacillus agri* SK-27'nin (HY-27) suşunun UV mutasyon sonuçları 198
Şekil 4.105. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun UV mutasyon sonuçları 199
Şekil 4.106. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan UV mutasyonu ile üretilen suştaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması 200
Şekil 4.107. *Bacillus albus* SK-36 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile üretilen suşlardaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması 201
Şekil 4.108. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile üretilen suşlardaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması 202
Şekil 4.109. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile üretilen suşlardaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması 203
Şekil 4.110. BSA standart eğrisi 203
Şekil 4.111. Tirozinaz standart eğrisi 204
Şekil 4.112. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzim aktivite değerleri 205
Şekil 4.113. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri 206
Şekil 4.114. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen UV mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri 207
Şekil 4.115. *Bacillus albus* SK-36, suşlarından üretilen EMS mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri 208
Şekil 4.116. *Bacillus albus* SK-36, suşundan üretilen UV mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri 209
Şekil 4.117. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının kollajenaz enzim aktivite değerleri 211
Şekil 4.118. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen UV mutant organizmalarının kollajenaz enzim aktivite değeri 212
Şekil 4.119. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının kollajenaz enzim aktivite değerleri 213
Şekil 4.120. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen UV mutant organizmalarının kollajenaz enzim aktivite değerleri 214
Şekil 4.121. İzole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin röntgen filminden gümüş giderim testi 215
Şekil 4.122. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarından izole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimLerinin pıhtı sıvılaştırma tesi 216

Şekil 4.123. Kan pıhtısını 26 saatte oda sıcaklığında sıvılaştıran ana ve mutant suşların fibrinolitik etkisi 217
Şekil 4.124. Kan pıhtısında sıvılaştırma etkisi göstermeyen suşların fibrinolitik etkisi 218
Şekil 4.125. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz enziminin kan lekesini giderme denemesi 219
Şekil 4.126. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin kan lekesini giderme denemesi 220
Şekil 4.127. *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme denemesi 221
Şekil 4.128. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme denemesi 222
Şekil 4.129. Cold (T35) ve Termofil TT suşların ham tavuk tüyünü hidroliz çalışması 223
Şekil 4.130. Ham tavuk tüyünün şişelerdeki hidroliz denemeleri 225
Şekil 4.131. *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarından izole edilen kollajenaz enzimLerinin *Pseudomons aeroginosaya* karşı antibakteriyel etkisi 229
Şekil 4.132. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin *Shigella sonnai*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibaklteriyel etkisi 229
Şekil 4.133. Ağız ve göz bölgesinde enfeksiyona bağlı yara dokusu gelişmiş keçi (A ve B). Aynı keçinin bir kes sprey şeklinde keratinaz ve kollajenaz enzim karışımı uygulamasından bir hafta sonraki görünümü (C ve D). 231
Şekil 4.134. Fıtık amaliyatı sonrası kapanmayan ve sürekli enfekte olan yara (A) keçiye uygulanan enzim kokteyli uygulandıktan bir gün sonraki görünüm (B) ve enzim kokteyli uygulandıktan 3 gün sonraki görünüm (C). 232
Şekil 4.135. Amino asit karışımı uygulanan deney biber ve su uygulanan kontrol biberlerinin başlangıç görünümü 233
Şekil 4.136. Amino asit karışımı uygulanan kontrol (A) ve deney (B) biberlerinin üçüncü uygulama sonundaki görünümleri 234
Şekil 4.137. Amino asit karışımı uygulanan deney ve kontrol biberlerinin 14 günlük deneme sonundaki görünümleri 235
Şekil 4.138. Keratin ve kollajen substratlarının enzimatik hidrolizi ile elde edilen amino asit kokteylinin karanfil denemeleri 238
Şekil 4.139. Amino asit uygulamasından 32 gün soraki tavuk görünümleri (A ve B) 242

SİMGELER VE KISALTMALAR

µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
AMPS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovine Serum Albümin
$CaCl_2$	: Kalsiyum Klorür
$NaCO_3$	: Sodyum Karbonat
dH_2O	: Distile su
EDTA	: Etilen Diamino Tetra Asetik Asit
kDa	: Kilo dalton
KH_2PO_4	: Mono Potasyum Fosfat
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
$MgSO_4.7H_2O$	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na_2HPO_4	: Disodyum Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH_4Cl	: Amonyum klorür
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PGA	: Poliglikolik Asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
rpm	: Dakikada devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
TLC	: Thin Layer Chromatography
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U	: Ünite
U/mg	: Ünite/miligram
U/mL	: Ünite/mililitre
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/Hacim

w/v : Ağırlık/Hacim

$ZnCl_2$: Çinko Klorür

β-Merk. : β-Merkaptoetanol

SDS-PAGE :Sodyum dodecil sülfat polyacrilamid jen elektroforez

1. GİRİŞ

Enzimler metabolizmanın temel taşlarıdır ve yaşamın varlığının kilit noktasını oluşturur. Bununla birlikte, enzimler son zamanlarda, substratın verimli bir şekilde ürüne biyodönüşümünü sağlayan spesifik ve hızlı etkileri ve çeşitli üretim işlemleri için ham madde, enerji ve kimyasallardan tasarruf etme yetenekleri nedeniyle, çeşitli endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Enzimler, potansiyel olarak endüstriyel işlemlerde tehlikeli kimyasalların tamamen değiştirilmesine veya kullanımının azaltılmasına yardımcı olabilecek, dolayısıyla sürdürülebilir üretim vaat eden çevre dostu (yeşil) kimyasallar olarak kabul edilir.

Çeşitli endüstriyel enzimler arasında mikrobiyal proteazlar gıda, ilaç, tekstil, fotoğraf, deri ve deterjan gibi çeşitli biyoendüstrilerdeki çok yönlü uygulama potansiyelleri nedeniyle dünya enzim pazarına hakimdir. Örneğin tarım sektöründe proteazların gelecek vaat eden uygulamaları arasında zararlıların biyolojik kontrolü, ipek gamının giderilmesi, kenevirin seçici delignifikasyonu ve yün işleme gibi uygulamaları yer alabilir. Bununla birlikte, başarılı endüstriyel uygulamalar için proteazların, genellikle zorlu proses koşullarına uyacak kadar sağlam olması gerekir. Endüstriyel uygulamalara yönelik proteazlar, geniş sıcaklık ve ekstrem pH aralıklarında, uzun süreler boyunca ve hatta çeşitli potansiyel enzim inhibitörlerinin varlığında bile aktiviteye ve stabiliteye sahip olmalıdır. *Bacillus* spp. endüstriyel proses koşullarına uygun olabilecek dayanıklı proteaz enzimLeri üretme yetenekleri nedeni ile özel bir öneme sahiptir (Razzaq ve ark. 2019).

Sürdürülebilir kimya olarak da adlandırılan yeşil kimya, tercihen yenilenebilir hammaddelerin kullanılmasını, toksik ve tehlikeli kimyasallardan kaçınılmasını, böylece ticari üretim ve imalat sırasında minimum atık üretilmesini amaçlamaktadır (Brandelli ve ark. 2010). Ayrıca, giderek artan dünya enerji talebi, sanayileşme, hızla tükenen fosil yakıt rezervleri, çevre sağlığı sorunları göz önüne alındığında, çevre açısından güvenli ve minimum emisyon içeren sürdürülebilir endüstriyel teknolojilerin geliştirilmesine vurgu yapılmaktadır (Brandelli ve ark. 2010).

Sonuç olarak, geleneksel kimyasal bazlı üretim ve imalat kavramlarından, eşit derecede verimli ve ekonomik olan çevre dostu süreçlere doğru bir paradigma değişimi söz konusudur. EnzimLerin endüstriyel alanlara uygulanması, çevreye duyarlı süreçlerin geliştirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunabilir (Sharma ve ark. 2017). Enzim kullanan teknolojiler, hammaddelerin verimli kullanımını, minimum düzeyde atık oluşmasını veya hiç atık oluşmamasını ve toksik kimyasalların kullanımından kaçınmayı ön görmektedir (Mukharjee ve ark. 2023).

Son zamanlarda farklı endüstriyel alanlarda enzimlerin uygulama potansiyellerinin anlaşılması nedeniyle enzim araştırmaları proses mühendisleri ve üretim kimyagerleri tarafından yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir. Enzime dayalı endüstriyel işlemler, geleneksel kimyasal işlemLere göre çevre açısından çok daha güvenlidir ve daha az emisyon içerir (Sheldon ve ark. 2007). Ancak enzimlerin, büyük ölçüde (doğası gereği) canlı sistemlerdeki ortam koşulları

altında işlev görmek üzere tasarlanmış biyolojik moleküller olduğu göz önüne alındığında, nispeten zorlu endüstriyel süreçler için pek uygun olmayabilir

Muazzam doğal mikrobiyal çeşitlilikten yararlanarak veya biyomühendislik yoluyla prosese uygun enzimleri izole etmeye yönelik sürekli ve yoğun bir araştırma vardır (Singh ve Bajaj 2017). Mikrobiyal enzimler potansiyel olarak çok sayıda endüstriyel uygulamada kullanılabilir ve toksik/tehlikeli kimyasal katalizörlerin yerini almaya en güçlü adaydırlar (Singh ve Bajaj 2017).

Proteazlar, son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biridir (Sharma ve ark. 2017). Proteazlar (EC 3.4), tüm canlı formlarda meydana gelen bir grup enzimdir ve canlı sistemlerde hücre bölünmesi, sinyal iletimi, sindirim, kan basıncının düzenlenmesi ve apoptoz gibi çok çeşitli karmaşık fizyolojik ve metabolik fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynarlar. Proteazlar toplam gen içeriğinin yaklaşık %1-5'ini temsil eder. Proteazlar, çok yaygın endüstriyel ve diğer alanlardaki büyük uygulama potansiyelleri nedeniyle küresel endüstriyel pazarın %60'ını oluşturmaktadırlar (Mukherjee, 2023).

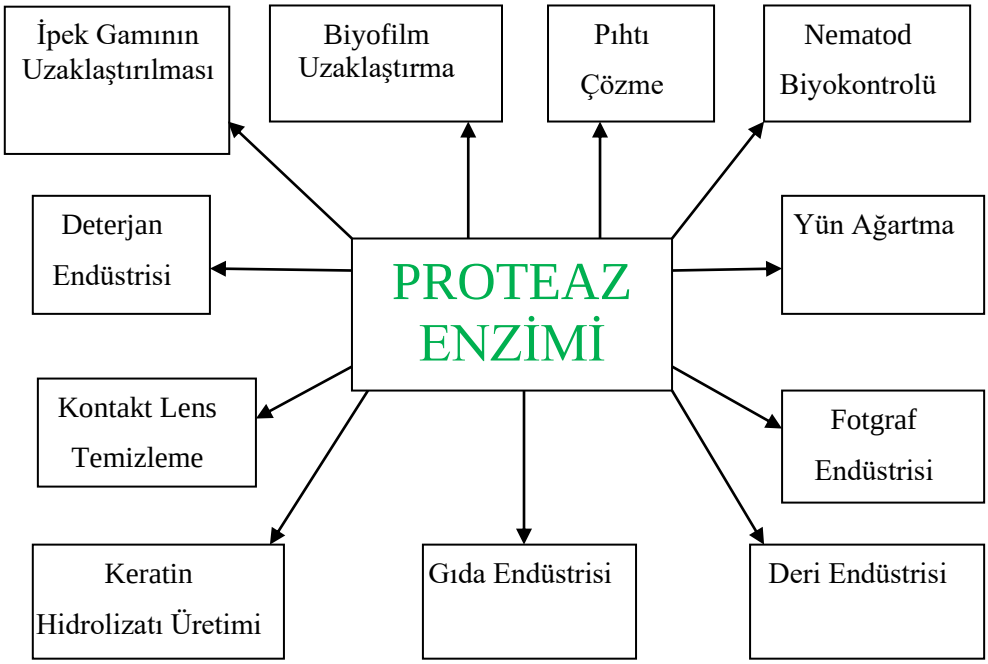
Proteaz enzimleri ilaç endüstrisinde, peptid sentezi için gıda endüstrisinde, kıl giderme için deri endüstrisinde (Singh ve Bajaj 2017), gümüş geri kazanımı için fotoğraf endüstrisinde (Joshi ve ark, 2007), deterjan formülasyonunda katkı maddesi olarak deterjan endüstrisi ve keratin kalıntılarının işlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca kontakt lens temizleme, biyofilm çıkarma, nükleik asit izolasyonu, zararlı böcek ve mantarların kontrolü, ipek gamının giderilmesi ve kenevirin delignifikasyonu gibi uygulamalar için de kullanılmaktadır.

Biyoteknolojik alanlardaki işlemlere yönelik proteazlar yeterince kararlı olmalı, ekstrem sıcaklıklar, pH ve kritik endüstriyel ortamlarda inhibitörlerin kinetik ve yapısal adaptasyon kapasitesine sahip olmalıdır (Singh ve Bajaj 2017). Bu tür proteazlar mikrobiyal kaynaklardan, özellikle ekstremofillerden, yani aşırı ekolojik nişlerin örnekleri olan mikroorganizmalardan izole edilebilirler. Mikroorganizmalar sadece proteazlar için değil aynı zamanda diğer endüstriyel ürünler için de altın madenleridir. Mikroorganizmalar birçok benzersiz avantaja sahip olmaları nedeniyle en çok tercih edilen enzim üretme kaynaklarıdır (Sharma ve Bajaj 2017).

Güncel endüstriyel alanlarında kullanıma uygun yeni proteaz enzimlerini bulmak için mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması devam eden bir uygulamadır. Çeşitli mikrobiyal gruplar arasında bakteriler, muazzam biyo-çeşitlilikleri ve diğer özellikleri nedeniyle, proteazlar da dahil olmak üzere endüstriyel enzim üretimleri için ilgi çekici bir kaynak haline gelmiştir (Sharma ve ark. 2017). Endüstriyel enzimler için *Bacillus* spp. sınıfındaki bakteriler büyük önem kazanmış olup, bu organizmalardan üretilen enzimLer toplam mikrobiyal enzim satışının %35'ini oluşturmaktadır (Singh ve Bajaj 2017). Bunun nedeni *Bacillus* spp.'nin endüstrilerdeki farklı proses koşullarına iyi uyum sağlayan enzimler üretme yeteneğidir (Sharma ve ark. 2017). *Bacillus* spp.'den üretilen enzimler poliekstremotoleransa, yani aşırı sıcaklık, pH, solventlerin, deterjanların ve diğer potansiyel enzim inhibitörlerinin varlığı gibi olumsuz uygulama koşulları altında çalışma

kapasitesine sahiptir. Ayrıca *Bacillus* spp., genlerin heterolog ekspresyonu için bir model organizma özelliğine sahiptir (Mukherje ve ark., 2023).

Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Baillus licheniformis ve diğerleri, mükemmel fermentasyon özellikleri, yüksek ürün verimLeri ve toksik yan ürünlerin bulunmaması nedeniyle bu grubun en popüler örnekleri haline gelmiştir. Danimarka firması olan Novo Industry tarafından piyasada satışı yapılan enzimLer *Bacillus* spp.'den üretilmektedirler.



Şekil 1.1. Proteazların farklı endüstriyel sektörlerdeki uygulamaları

Biyoteknoloji farklı alanlardaki uygulamalar dikkate alınarak değişik şekillerde adlandırılmaktadır. Red biyoteknoloji sağlık alanlarını, white biyoteknoloji endüstriyel uygulamaları ve green biyoteknoloji tarım ve gıda alanlarındaki faaliyetleri kapsamaktadır.

Gelişmiş ülkeler biyoteknolojiyi stratejik alan olarak tanımlamışlardır. Biyoteknoloji doğada hemen her gün gerçekleşen biyolojik olayların kontrollü ve optimize edilmiş koşullarda hızlandırılması işlemlerinin bütünüdür. Doğada yıllar içinde elde edilen sonuçlar biyoteknolojik uygulamalar sonunda haftalar, günler hatta saatler içerisinde sonuca ulaştırılmaktadır. Yapılan güncel değerlendirmelerde dünya biyoteknoloji sektörünün 3.4 trilyon dolar piyasa değerine sahip olduğu ifade edilmektedir. Bütün işlemler biyokatalizör adı verilen enzimlerin katalitik aktiviteleri sonucu gerçekleştiği için ortaya çıkan ürünler de biyo-uyumlu özellik taşımaktadırlar. Özellikle kimyasal katalizörlerin kullanılmaması ile ürünler daha saf, daha ucuz ve daha yüksek verimlilikte elde edilmektedirler. Enzimlerin kullanılması sonucu, kimyasal katalizörler nedeni ile ortaya çıkan çevre kirliliği sorunları başta olmak üzere, ürünlerin uygulandığı alanlar ve son kullanıcılarda allerjik, toksik ve kanserojen sonuçların görülmesi söz konusu değildir. Enzimler hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan ve canlı sistemlerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların

katalizlenmesini sağlayan biyomoleküllerdir. Bütün canlı sistemlerde bulunmalarına rağmen biyoteknoloji alanında kullanılmaları söz konusu olduğunda, mikrobiyal kökenli enzimler tercih edilmektedir. Endüstriyel üretim ve farklı alanlardaki uygulamalarda kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Sing ve ark. 2016).

Mikrobiyal enzimlerin kullanılmalarının temelinde aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralıklarının çok geniş olması, aynı enzimin sıcaklık ve pH optimumlarına göre çok farklı uygulamalarda kullanılma olanaklarının bulunması, farklı inhibitör, şelatör, metal iyonları, deterjanlar ve okside edici ajanlara karşı dirençli olmaları ön plana çıkmaktadır. Mikroorganizmalar arasında da özellikle bakteri kökenliler ön plana çıkmaktadır. Aynı substrata etki ettikleri halde mantar enzimlerinin sınırlı pH (genellikle asidik) ve sıcaklık (psikro-mezofilik) değerlerinde aktif olmaları kullanım alanlarını sınırlayan faktörlerdir (Song ve ark. 2023)

Genel olarak bakıldığında enzimlerin Nişasta, Yem Üretimi, Gıda, İçecek, Deterjan, Tekstil, Kağıt endüstrisi, Biyoremediasyon, Atıksu ve katı atıkların değerlendirilmesi, Sağlık, Biyobenzer ilaç üretimi, Kişisel bakım ürünlerinin eldesi, Kozmetik endüstrisi, Fermente ürünlerin üretimi, Biyoenerji üretimi ve Kanserle mücadele alanlarında kullanıldığı görülmektedir (Sing ve bajaj, 2017).

Hemen her gün enzimlerin kullanıldığı yeni bir alan ortaya çıkmaktadır. Son birkaç yıldır özellikle bitkisel üretimde kimyasal mücadele uygulamalarının terk edilmesi ve biyolojik mücadelenin ön plana çıktığını görmek mümkündür. Pestisit, herbisit, insektisit gibi kimyasal mücadele ajanlarının kullanıldığı bütün ortamlarda ve ürünlerde ortaya çıkan kimyasal kirlilik, giderek ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Birikime bağlı olarak toprakta verim iliğin birinci derecede aktif yapıları olan mikrobiyal çeşitlilik yok olmakta, kullanılan kimyasallar parçalanamamakta, su aracılığı ile bitkiye geçmenin yanı sıra bitkisel üründe birikerek dokuya girmesi sonucu son kullanıcılar olan hayvan ve insanlarda rahatsızlıklara yol açmaktadırlar. Kimyasallar nedeni ile üretilen bitkisel ürünler ve bunlarla beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerin ticari değeri olumsuz etkilenmektedir. Bu ürünlerin son kullanıcıları olan insanlarda DNA hasarlarından alerjiye kadar bir çok rahatsızlığa neden olmalarından dolayı, tedavi ve iş kaybı dikkate alındığında büyük bir maliyet ortaya çıkmaktadır. Enzimler kullanılarak bitkisel ve hayvansal üretim aşamalarında kimyasalların kullanım arının terk edilmesi ile sürdürülebilir gelişme ve sağlıklı nesiller oluşturulabilir (Song ve ark. 2023).

1.1. Mikrobiyal Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerde bulunan, kimyasal dönüşüm erin meydana gelmesinde katalizör rolü oynayan kompleks organik moleküllerdir. Biyokimya bilim dalının gelişimiyle, enzim erin canlı hücrelerde bulunmaları ve etki şekilleri hakkında çok çeşitli bilgiler elde edilmiştir. Bununla birlikte, enzim er sadece canlı hücrelerde aktivite göstermezler. Bunlardan bazıları hücrelerden ayrılabilir ve fonksiyonlarına *in vitro* devam edebilirler. Enzimlerin izolasyon esnasında kendi özel

kimyasal dönüşüm erini gerçekleştirmelerini sağlayan bu özellikleri gıda başta olmak üzere çok farklı endüstri alanlarında, gıda üretiminde, biyoremediasyon ve ilaç alanındaki kullanımLarının giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur. Bu uygulamalar genel olarak enzim teknolojisi şeklinde adlandırılmaktadır (Kumari ve ark. 2021)..

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimLerle ilgili alanında yapılan araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır.

Enzimin katalitik fonksiyonu yalnızca enzimin primer moleküler yapısına değil, aynı zamanda enzim molekülünün karışık katlanmış yapısına da bağlıdır. Enzim aktivitesi, enzimin katalitik bölgesinin özelliği ile ilişkilidir. Enzim, reaksiyon esnasında yok olmadan aktivitesini korumakta olup reaksiyon, çok yüksek hızlarda gerçekleşir. Biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan enzim er, reaksiyonun aktivasyon enerjisini artırmaktadırlar. Enzimlerin reaksiyon ve substrat spesifikliği olmak üzere iki önemli özelliği bulunmaktadır. Enzim reaksiyon spesifikliğinden anlaşılan, substratın birçok değişim reaksiyonu mümkün iken, enzimin substratı bu yollardan sadece birine göre katalize etmesidir. Enzim, rekabete giren substratlar arasında kendi substratı ile ilişkiye girer ve yalnızca onunla reaksiyon gerçekleştirir. Her enzim sadece bir substratla reaksiyona girebilir. Enzimler, sadece substratlarına spesifik olup, çok az miktardaki enzim çok fazla miktardaki substratla reaksiyona girebilir (Baweja ve ark. 2016).

Bazı bileşikler enzimlerin aktif bölgelerinin tutulması sonucu enzimin yapısını bozarak, katalitik aktivitesini düşürebilir yada tamamen durdurabilirler. Bu tür maddelere ‘inhibitör’ adı verilir.

Enzimler, kendi özelliklerinden dolayı yapısal olarak benzer oldukları kimyasallar arasında seçicilik gösterebilirler. Enzimler çok geniş sıcaklık (0-100°C) ve pH (1-13) aralığındaki reaksiyonları katalizleyebilmektedirler. Ayrıca enzimler non-toksik ve geri dönüşümlü olmalarının yanı sıra, mikroorganizmalar tarafından büyük miktarlarda üretilebilmektedirler (Bajaj ve Jamwal 2013; Singh ve ark, 2016)

Her organizma pek çoğu az miktarda üretilen ve hücresel süreçlerde yer alan çok farklı enzim üretmektedir. Bazı enzimler, bazı organizmalar tarafından çok daha fazla miktarlarda üretilirler ve üretim sırasında hücre dışına salgılanırlar. Ekzoenzimler denilen bu ekstrasellüler enzimler selüloz, protein, yağ ve nişasta gibi çözünmeyen polimerleri parçalama yeteneğindedirler. Yıkım sonucu oluşan ürünler, organizmanın gereksinimlerini karşılamak için hücre içerisine alınırlar.

Enzim teknolojisi, üretim, izolasyon, saflaştırma ve enzimlerin çözünmüş ve immobilize formlarının kullanımını kapsamaktadır. Ticari olarak üretilmiş enzimler modern toplumun karşı karşıya olduğu çok önemli problemlerin, örneğin gıda üretimi, enerji azlığı ve korunumu, çevrenin verimli hale getirilmesi ve medikal uygulama gibi alanlarda sorunların çözümüne katkıda bulunmaktadır. Enzim teknolojisi temelini biyokimyadan almış olmasına rağmen enzim üretimi söz

konusu olduğunda özellikle mikrobiyoloji alanından yararlanılmaktadır. Dünya enzim pazarının 2028 yılında 27 milyar dolar piyasa değerine ulaşması öngörülmektedir.

Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan şekilde mikrobiyal enzimlere yönelinmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri, ekstrem koşullarda aktivite gösteren çok farklı enzim üretmeleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedirler. Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Karbonhidrat parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Danilova ve ark. 2020).

Çeşitli endüstri alanlarında kullanılan enzimlerin dağılımları şu şekildedir: Gıda endüstrisinde %41, deterjan endüstrisinde %34, tekstilde %11, deri endüstrisinde %3, kağıt hamuru/kağıt endüstrisinde %1 ve diğer uygulamalarda %6 şeklindedir.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkaline proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, renin %10, tripsin %3, lipaz %3, diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 şeklinde bir dağılımLa karşılaşılmaktadır (Sing ve ark. 2016)

Endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimlerin, bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğine sahip olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olmasına bağlıdır.

Bir enzim molekülü genel anlamda globüler yapıda bulunur ve molekül içi veya arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulur. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH'daki değişmeler ile bozulabilir. Bu yüzden, bir enzimin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa duyarlıdır. Her enzim; maksimum aktivite gösterebilmek için optimum bir pH ve sıcaklık derecesi ister. Hayvansal enzimlerin sıcaklık optimumu genellikle 37˚C civarındayken, bitkisel enzimlerde optimum sıcaklık 60-70°C'ye kadar yükselmektedir. Mikrobiyal enzimlerde enzimatik reaksiyon için optimum sıcaklık, mikroorganizmanın 0ptimum ürediği sıcaklığa bağlıdır. Psikrofilik mikroorganizmaların enzimleri optimum aktivitelerini suyun donma derecesine yakın sıcaklıklarda gösterirken, ekstrem termofillerin enzimleri 100˚C'ye yaklaşan sıcaklıklarda aktivite göstermektedirler. Enzim ektivitesini etkileyen diğer bir faktör, ortamdaki H^+ iyonu derişimidir. Enzimatik reaksiyon hızının en yüksek değere ulaştığı H^+ iyonu konsantrasyonu enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeridir. Mikrobiyal enzimlerin optimum pH değeri, mikroorganizmanın alkalofilik veya asidofilik olmalarına göre farklılıklar göstermektedir (Banerjee ve Ray, 2017).

Örneğin, alkalifilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler aşırı bazik reaksiyon şartlarına sahip uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Deterjan üretimi bu duruma örnek olarak gösterilebilir.

İnsanlar Dünya üzerinde genelde ılıman sıcaklıklarda yaşadıkları için, çok sıcak ve çok soğuk çevreler aşırı kabul edilmektedir. Buna karşılık, pek çok mikroorganizma aşırı sıcak ya da soğuk ortamlar, toprak, su, hayvan ve bitkiler gibi yaygın habitatlar ve insanlar tarafından yapılmış yapıların içi ve yüzeyi dahil olmak üzere her yerde yaşamaktadırlar. Bu ortamlar ekstrem çevreler olarak adlandırılırlar. Çoğunlukla prokaryotlardan oluşan ve ekstrem koşullarda yaşayabilen organizmalar, ekstremofiller olarak adlandırılmaktadırlar (Mukherje ve ark., 2023)..

Ekstremofil organizmalar bu koşullar altında optimum üreyecek şekilde adapte olmuşlardır. Ekstremofilik prokaryotlar kaplıcalarda, buzla kaplı göl suları veya yüzeyde, kutup bölgelerindeki buzul ve denizlerde, aşırı tuzlu göller ve sularda, pH'sı 0-12 aralığına sahip toprak ve soda gölleri gibi çevrelerde üreyebilmektedirler. Ekstremofil organizmalardan, yüksek sıcaklıkta yaşayanlar hipertermofiller, düşük sıcaklıkta yaşayanlar psikrofiller, yüksek pH'da yaşayanlar alkalifiller, düşük pH'da yaşayanlar asidofiller, basınçlı ortamda yaşayanlar barofiller, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olanlar ise halofiller olarak sınıflandırılmaktadırlar

Mikroorganizmaları üredikleri sıcaklık ihtiyaçlarına göre dört grup altında toplanmak mümkündür. Düşük sıcaklıkta üreyenler psikrofil (20°C altında), orta aralıklardaki sıcaklıkta üreyenler mezofil (20-55°C), yüksek sıcaklıkta üreyenler termofil (55°C üzeri) ve oldukça yüksek sıcaklıkta üreyenler hipertermofil şeklinde adlandırılırlar (Santiago ve ark. 2016; Kumari ve ark, 2021).

Dünya üzerinde, ekstrem ortamlarda üreyen çeşitli organizmalar arasında biyokütle, çeşitlilik ve dağılım açısından en çok bulunan organizmalar psikrofillerdir. Ekstrem psikrofiller, antarktik ve arktik kutup bölgelerinden, yüksek rakımlı dağlardan, kar örtüsü altı topraktan, buzullardan ve buz dağlarının bulunduğu okyanuslardan izole edilmektedirler. Psikrofil organizmlara ait enzimLerin büyük çoğunluğu cold aktif özellikte olup, organizmanın düşük sıcaklıklara adaptasyonunda temel bir rol oynamaktadırlar (Margesin ve Feller, 2010). Bu organizmalar düşük sıcaklıklarda yaşamak için bir dizi büyük adaptasyon geliştirmişlerdir. Örneğin; psikrofilik enzimler düşük sıcaklıklarda katalizör görevi görebilmektedir. Bu özellik, psikrofil organizmalardan elde edilecek enzimLerin deterjan, tekstil ve gıda gibi endüstriyel alanlarda enerji tüketimini azaltmaya yönelik avantajlar sağlamaktadır (Arabacı ve Arikan, 2018; Furhan, J. 2020).

Ekstremofilik enzimler sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluk gibi ekstrem şartlarda çalışabilen ve endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahip enzimlerdir. Mezofilik enzimler, enzim stabilitelerindeki eksikliklerden dolayı endüstriyel enzimlerden istenen zorlu reaksiyon şartları için, pek uygun değillerdir. Alkalifilik mikroorganizmalar, alkalifiller ve haloalkalofiller olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadırlar. Alkalifil organizmalar, üreyebilmek için genellikle 8.0'in üzerinde pH'ya ihtiyaç duymakla birlikte, optimum pH 9.0-10.0 aralıkta üremektedirler.

Düşük sıcaklık optimumuna sahip psikrofil organizmalar, 0-20°C aralığında üremekle birlikte optimum 15°C de üreme gösterirler. 0°C'de üreyebilen buna karşılık optimum 20-25˚C'ler

arasındaki sıcaklıklarda üreyen organizmalar psikrotolerant olarak adlandırılırlar (Hakim ve ark. 2018).

Psikrofiller, kutup bölgelerinde ya da deniz çökeltileri gibi devamlı soğuk olan çevrelerde de bulunmaktadırlar. Psikrotolerant mikroorganizmalar psikrofillerden çok daha fazla yayılım göstermekte olup, ılıman iklimlerdeki toprak ve su örneklerinden izole edilebildikleri gibi, et, süt ve süt ürünleri, elma şarabı ve buzdolabında (4˚C) saklanan sebze ve meyvelerden de izole edilebilmektedirler.

Soğuğa uyumlu mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin en belirgin özelliği, düşük sıcaklıklarda reaksiyonun gerçekleşebilmesi için yüksek katalitik yeterliliğe sahip olmalarıdır. Bu özellikler cold aktif enzimlere büyük ekonomik değer kazandırmaktadır. Çünkü bu enzimlerin enzimatik reaksiyonları, mezofil enzimlerinin katalitik aktivitelerinin önemli derecede düşüş gösterdiği 0-20°C'lerde gerçekleşebilmektedir. Bu açıdan bakıldığında, cold-aktif enzimler birçok endüstriyel uygulama alanının dikkatini çekmiştir. Soğuğa adapte mikroorganizmalardan üretilen enzimler, enerji tasarrufunda önemli bir avantaj sağlamaktadır. Örneğin deterjan katkı maddesi olarak kullanılıp temizleme işlemlerinin düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi gibi. Bu organizmaların yüksek katalitik aktiviteye sahip olan enzimleri moleküler biyoloji, medikal araştırmalar, endüstriyel gıdalar, besin teknolojileri, deterjanlar, kozmetik gibi uygulama alanlarında da çok tercih edilmektedir (Margesin ve Colins, 2019).

Mikrobiyal enzimler, tekstil, deri, kağıt ve kağıt hamuru, araştırma ve geliştirme, farmasötik, tarım, deterjan, atık ve atık su arıtımı, biyorafineri, biyoremediasyon, sağlık, fotografcılık ve bütün gıda endüstrisi alanlarında yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Okpara, M.O., 2022)

1.1.1. 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 değerleriyle sınırlıyken, diğerleri nötral pH'ya yakın değerlerde de üreyebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar; bakteri, arkea ve ökaryotları kapsamaktadır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen enzimLer, özellikle de ekstraselüler enzimler, yüksek pH değerlerinde (pH 8.0-13.0) katalitik aktivite ve stabilite göstermektedirler (Furhan ve ark. 2019).

Alkali enzimler geniş pH aralığında aktivite göstermenin yanı sıra nötral enzimlere göre okside edici bileşiklere toleranslı olup, termostabil özelliğe sahiptirler. Alkalifilik organizmalar arasında en fazla bilinen ve tanımlananlar *Bacillus* sp türleridir. Alkalifilik *Bacillus* sp türleri sadece soda ve tuz gölleri gibi alkali çevrelerde değil nötral topraklardan izole edilen bakteriler arasında da en yüksek frekansa sahiptirler. *Bacillus*'lar özellikle endüstriyel alanda kullanılan çok sayıda farklı alkali özellikte enzim üretme yeteneğine sahiptirler (Arikan ve ark. 2003;Arikan, 2008).

1.1.2. Termofiller ve Termofilik Enzimler

Çoğunlukla termofilik organizmalardan izole edilen termofilik enzimler, stabiliteleri nedeniyle pek çok ticari uygulamalarda yer bulmuşlardır. Özellikle ekstrem sıcaklıklarda aktif oldukları için deterjan ve organik çözücülerle ilgili uygulamalarda benzersiz avantajlar sağlamaktadırlar. Ayrıca ekstremofilik enzimlerin 60ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda kullanılması olası mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltması yönünden büyük bir avantajdır (Arikan ve ark. 2003). Yüksek sıcaklıkta polimer yapıların sıcaklıkla daha kolay hidrolize olmaları nedeni ile termofil enzimlerin hidrolizasyon performansları üst seviyelere çıkmaktadır. Nişasta gibi polimer yapıların şekerleştirme ve hidroliz işlemleri yüksek sıcaklıklarda termofil ve termostabil enzimlerle gerçekleştirilir. Diğer taraftan yem endüstrisinde peletleme işlemleri genellikle 85ºC nin üzerinde yapıldığından eksojen enzim olarak termofil ve termostabil enzimLer kullanılmaktadır. Termofilik enzimler, yüksek sıcaklıklardaki atıkların arıtılmasında substratların çözülebilirliğini arttırması nedeniyle biyoremediasyonda çok önemlidirler (Białkowska ve ark.2016).

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. Bundan dolayı son 20 yılda biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak ekstremozimlerin izolasyonları için ekstrem koşullardan elde edilen mikroorganizmalar üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır.

1.1.3. Cold Aktif Enzimler

Mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda işlev yapabilmek ve hayatta kalmak için adaptasyon mekanizması geliştirdiklerinden dolayı 0ºC sıcaklıkta bile üreyebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar psikrofil ve psikrotolerantlar olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Psikrofilik mikroorganizmaların üremeleri için optimum sıcaklık 15ºC, maksimum gelişim sıcaklığı 20ºC'nin üstünde ve minimum 0ºC'dir (Yadav ve ark. 2015)

Son zamanlarda soğuk uyumlu organizmadan izole edilen enzimlerin bildirilmesi önemli ölçüde artmıştır. Çoğu Antarktika ve antarktik mikroorganizmalarından üretilmiştir. Sadece çok az cold aktif proteazlar deniz mantarlarında incelemişlerdir. Deniz mantarları üzerindeki araştırmalar da çoğunlukla biyoaktif substratlar ve sekonder metabolitler üzerinde durmuşlardır. Katalitik aktivitelerini spesifik olarak 0-30°C'de gösteren enzimlerin katalitik dönüştürme yeteneklerinin mezofilik enzimlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak cold aktif olan enzimlerin düşük termostabiliteye, buna karşılık yüksek spesifik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Arabacı ve Arikan, 2018).

Psikrofillerin düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdikleri ve düşük aktivasyon enerjileri ile enzim sentezledikleri bilinmektedir. 0-20°C'lik koşullarda enzimatik aktivitelerini sürdürmeleri

nedeniyle cold aktif enzimler büyük ekonomik değere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı cold aktif enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarındaki önemi çok artmıştır. Soğuk uyumlu mikroorganizmaların enzimleri önemli enerji tasarrufu oluşturduğundan, pratik uygulamalarda çok fazla kullanılmaya başlanmıştır.

Düşük sıcaklıklara adapte olmuş mikroorganizmalar ekstremofillerin bir üyesi olup, 0°C de bile üreyebilme özelliğine sahiptirler. Literatürde psikrofil bakterilerin optimum 15°C, maksimum 20°C, minimum 0°C veya daha düşük sıcaklıklarda üredikleri bildirilmiştir (Kuddus ve ark. 2024). Cold aktif enzimler 3 genel özelliğe sahiptir.

1. Sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin düşük sıcaklığa doğru artarak değişmesi,
2. Spesifik aktivitesinin ve fizyolojik verimin düşük sıcaklıklarda mezofilik koşullara göre daha yüksek olması
3. Mezofil sıcaklıkta enzimin termal stabilite sınırının hızlı bir şekilde düşmesi (Kuddus ve ark. 2024).

Cold aktif enzimler, derin denizler, yüksek dağlar ve kutuplarda sürekli yaşayan organizmalar tarafından üretilmektedirler. Bu enzimlerin en önemli grubunu düşük termal stabiliteleri ve düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle cold aktif proteazlar oluşturur. Bu özelliği nedeniyle temizlik deterjanları, deri işletmeleri, gıda endüstrisi ve moleküler biyoloji gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadırlar (Wang ve ark, 2008).

Düşük sıcaklıklarda proteinleri hızlı şekilde parçalayan mikroorganizmalar protein içerikli atık suların arıtılmasında gereklidirler. Bu tür atık su drenajlarının sıcaklıkları (yaklaşık 5°C-25°C) nispeten düşüktür. Dahada önemlisi cold aktif proteaz enzimlerinin kullanıldığı alanlarda önemli bir enerji tasarrufu sağlanmaktadır (çok pahalı olan ısıtma işlemlerine gerek olmamakta, kış mevsimi boyunca soğuk koşullarda aktivite devam etmekte, reaksiyon veriminde artış sağlanmakta, yüksek sıcaklıklarda ortaya çıkabilecek istenmeyen kimyasal reaksiyonlar minimize edilmekte ve ihtiyaç duyulduğu anda enzim kolayca inhibe edilebilmektedir) (Kumari ve ark., 2021).

Örneğin gıda endüstrisinde sıcaklığa hassas ürün ve substratların orijinal yapılarının değişmesi önlenmektedir. Bunların dışında cold aktif proteaz enzimleri içecek ve şarap endüstrisi, peynir üretimi, hayvansal gıdaların eldesi ve meyve suyu endüstrisi gibi alanlarda da mezofilik enzimlere iyi bir alternatif oluştururlar. Cold aktif proteazların düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle, gıda endüstrisinde tatlandırıcı enzimler şeklinde kullanılması da söz konusudur (örneğin, buzdolabında saklanan et ürünlerinin lezzetlerinin artırılmasında) (Kuddus ve ark. 2024).

1.2. Halofilik Enzimler

1.2.1. Proteazlar

Bakteriyel kökenli proteaz enzimleri nötral ve alkali ağırlıklı enzimler olup, genellikle *Bacillus* cinsindeki organizmalar tarafından üretilmektedirler. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında optimum aktivite gösterirler ve termotolerans özelliği nispeten düşüktür (Hadjidj ve ark. 2018). Termotolerans özelliklerinin düşük olması gıda ürünlerinin üretilmesi sırasında reaksiyonların kontrol edilebilmesi açısından bir avantajdır. Bazı nötral proteaz enzimleri metalloprotein yapısına sahip olup, aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Bakteriyel alkaliproteazlar yüksek pH değerlerinde (pH 10.0 gibi) aktivite göstermeleriyle karakterize olup, substrat sipesifiklikleri oldukça geniştir (Rao ve ark, 1998). Bütün proteazlar içerisinde *Bacillus* türlerinden üretilen alkali proteazlar farklı koşullarda stabilitelerini korudukları için oldukça önemlidir (Joshi ve ark, 2007).

Alkali proteaz üretiminde *Halobacterium* sp., *B. licheniformis*, *B. megatherium*, *Aspergillus* sp., *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri kullanılmaktadırlar (Horikoshi, 1999; Sirisatha ve ark. 2016).

Proteazlar, ekzopeptidaz ve endopeptidaz olmak üzere iki büyük grup içinde sınıflandırılırlar. Ekzopeptidazlar aminopeptidaz ve karboksipeptidaz, endopeptidazlar ise serin, aspartik, sistein ve metallo proteazlar şeklinde gruplandırılırlar.

Ekzopeptidazlar ve aminopeptidazlar bakteri ve mantarların bulunduğu mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmektedirler (Watson, 1976). Genel olarak aminopeptidazlar intraselüler enzimlerdir. *Aspergillus oryzae*'dan üretilen ektraselüler aminopeptidaz enzimleri ile ilgili tek bir yayın bulunmaktadır. Aminopeptidazlar *E. coli*'den üretilen büyük proteazlardır (400.000 Da). Aminopeptidazlar optimum aktivite göstermek için Mn^{+2} veya Mg^{+2} iyonları ile pH 7.5-10.5 aralığındaki ortamlara ihtiyaç duymaktadırlar (Marco ve Dick, 1978).

Karboksipeptidazlar serin karboksipeptidazlar, metallokarboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Serin karboksipeptidazlar *Penicillium* spp., *Sacharomyces* spp. ve *Aspergillus* spp.'den izole edilmiş ve substrat spesifikliği benzer olan ancak inhibitör etkisi, moleküler ağırlıkları, stabiliteleri, optimum aktivite gösterdikleri pH gibi özellikleri farklı enzimlerdir. Metallokarboksipeptidaz *Saccharomyces* spp.(Felix ve Brouillet, 1966) ve *Pseudomonas* spp.'dan izole edilmişlerdir. Aktiviteleri için Zn^{+2} veya Co^{+2} gereksinim duymaktadırlar (Banerjee ve Ray, 2017).

Endopeptidazlar serin proteazlar, metallo proteazlar, sistein proteazlar ve aspartik proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Rawlings ve Barrett, 1993)

Serin proteazlar aktif bir serin grubunun varlığı ile karakterize edilirler. Serin proteazlar PMSF, DFP, TLCK, 3,4 DCI ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olmasıyla bilinmektedirler. Bazı proteazlar thiol reaktanları ile örneğin PCMP ile inhibe olmaktadır. Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH'da aktiftirler. Bununla birlikte pH 7.0-11.0 aralığında oldukça aktiftirler. Serin

proteazlar geniş substrat spesifikliğine sahip olup esterolitik ve amidaz aktivitesini içermektedirler. Moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasındadır. *Blakeslea trispora*'dan izole edilen serin proteaz'ın moleküler ağırlığı 126 kDa'dur (Govind ve ark, 1981). izoelektrik noktaları genellikle pH 4.0-6.0 arasındadır. Serin alkali proteazların geniş alt grupları yüksek alkali pH'da aktiftirler.

Serin alkali proteazlar birçok bakteri, maya, küf ve mantardan üretilirler. Bunlar TPCK, TLCK ile inhibe olmayıp patates proteaz inhibitörü veya DFP ile inhibe olmaktadırlar. Alkali proteazların optimum pH'sı 10.0 ve izolektrik noktası pH 9.0 civarındadır. Moleküler ağırlığı 15-30 kDa aralığındadır. Bununla birlikte alkali serin proteazlar birçok bakteri suşundan örneğin *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* spp.'den üretilmiştir (Boguslawski ve ark, 1983; Sharma ve ark., 2017).

Serine proteazların ikinci geniş ailesi *Bacillus sp.* den izole edilen subtilisin proteaz enzimleridir. Alkali proteazların iki farklı tipi subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo veya bakteriyel proteaz Nagase (BPN) olarak tanımlanır. Subtilisin Carlsberg *B. licheniformis*'den, subtilisin Nova veya BPN *B. amyloliquefaciens* 'den üretilmişlerdir. Subtilisin Carlsberg deterjanlar içinde oldukça geniş kullanıma sahiptir. Saf enzim proteini için yıllık üretim 500 ton civarındadır. Subtilisin BPN enziminin ticari önemi azdır. Her iki subtilisin kökenli enzimin de moleküler ağırlığı 27.5 kDa olmakla birlikte 58 amino asidi ile diğerlerinden farklılık göstermektedirler. Her ikiside benzer özelliklere sahiptir. Örneğin optimum sıcaklık 60ºC ve optimum pH 10.0'dur (Phadatare ve ark, 1997)

Aspartik proteaz'lar genellikle asidik proteaz olarak bilinir. Asidik proteazlar pepsin, retropepsin, pararetropepsin olarak 3 gruba ayrılırlar. Birçok aspartik proteaz enzimi maksimum aktiviteyi düşük pH'da (pH 3.0-4.5) gösterir ve izoelektrik noktaları pH 3.0-4.5 arasındadır. Moleküler ağırlıkları 30-45 kDa'dur (Sielecki ve ark, 1991). Aspartik proteaz enzimleri pepstatin (Fitzgerald ve ark, 1990) tarafından inhibe olmaktadır. Bununla birlikte diazoketon karışımlarına ve bakır iyonlarında bulunan örneğin DAN ve EPNP bileşiklerine hassastır.

Sistein proteazlar prokaryot ve ökaryotların her ikisinde de bulunur. Sistein proteazların yaklaşık 20 ailesi bilinmektedir. Sistein proteazlar nötral pH'larda optimum aktivite gösterirler, ancak birkaçı örneğin lizozomal proteazlar asit pH'da maksimum aktiviteye sahiptir. Sistein proteazlar sülfidril ajanlara örneğin PCMB'ye hassas oldukları halde metal şelatör ajanlardan DFP ye dirençlidirler.

Metalloproteaz enzimatik aktiviteleri için divalent metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Metalloproteazlar'ın yaklaşık 30 familyası bilinmektedir. Bunların 17 tanesi sadece endopeptidazları, 12 tanesi sadece ekzopeptidazları ve 1 tanesi her ikisini içerir. Metalloproteazlar EDTA ile inhibe olmakta ancak sülfidril veya DFP ile inhibe olmamaktadırlar. Alkali metalloproteazlar *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* spp.'den üretilmişlerdir. pH 7.0-9.0 arasında aktif olup, moleküler ağırlığı 48-60 kDa'dur. (Browner ve ark, 1995).

1.2.2. Alkali Proteazlar

Alkali proteazlar, nötralden alkali ortama 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 endüstrisi, tıbbi formülasyonlar, deterjanlar, atıksu arıtma işlemleri, gümüşün tekrar elde edilmesi ve polipeptidlerin aminoasitlere hidrolizi gibi çok farklı endüstriyel alanda geniş olarak kullanılmaktadırlar (Gupta ve ark., 2002; Agrawal ve ark., 2004).

Alkali proteazların optimum aktivite gösterdikleri pH aralığı genelde 9.0-11.0 arasındadır. Bununla birlikte aktivite değeri 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 birkaç istisnada vardır. Kumar ve Takagi (1999)'nin belirttiği gibi alkali 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, alkalifilik *Bacillus sp*. B189'dan elde edilen enzim 85ºC'de, *Fervidobacterium islandicum* AW-1'den izole edilen ise 100 ºC'de aktivite göstererek, sıradışı davranış göstermişlerdir (Nam ve ark., 2002).

1.2.3. 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 farklı protein substratlarını hidroliz etme özelliğine sahiptir (Lin ve ark., 1992).

Keratinolitik enzimler keratinler üzerinde katalitik aktivite göstererek keratin yapılarını hidrolize etmektedirler. Keratinin %100 e yakın düzeyde hidrolize edilmesinde sadece keratinolitik proteazlar değil, disülfit redüktaz enzimlerinin birlikte etki gösterdiği saptanmıştır (Elhamdi ve ark. 2025).

Keratinazlar (EC no. 3.4.99.11), bir grup proteaz enzimi olup, atık su arıtımı sırasında kanalizasyon sistemindeki tıkanıklıkları temizlemek tüy, saç, yün, kollajen ve kazeini hidrolize etmek için önemlidir.

1.2.4. Mikrobiyal Keratinolitik Proteazların Genel Özellikleri

Mikrobiyal keratinolitik proteazlar ağırlıklı olarak ekstrasellüler, optimum aktivite gösterdikleri pH değeri 7.5-9.0 arasında olan, alkali veya nötral karakterde proteaz enzimleridir. Bu genel bulgunun yanı sıra ekstrem alkali pH değerlerinde optimal aktivite gösteren keratinolitik proteaz enzimlerinin varlığı da belirtilmiştir (Kobayashi ve ark., 1995). *Streptomyces pactum* DSM 40530, *Streptomyces sp*. SK1-02 ve *B. licheniformis* suşlarının ürettiği keratinolitik proteaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklıklarının 40 ve 50ºC arasında olduğu bildirilmiştir (Bernal ve ark., 2006). Literatürde, alkalifilik *Bacillus* sp. B189 suşundan izole edilen keratinolitik enzimin optimum aktivitesini 85ºC, *Fervidobacterium islandicum* AW-1 suşundan üretilen keratinolitik proteaz enziminin ise optimum aktivitesini 100ºC' de gösterdiklerini belirtmişlerdir (Nam ve ark., 2002; Elhamdi ve ark. 2025).

Keratinolitik proteaz enzimlerinin 18 ile 240 kDa arasında değişen çok farklı moleküler ağırlığa sahip oldukları bildirilmiştir. Bununla birlikte çoğunun moleküler ağırlığı genellikle 50 kDa'dan daha az bulunmuştur. Büyük moleküler ağırlığa sahip keratinolitik enzimlerin genellikle metalloproteaz özellikte veya termofilik organizmalar tarafından üretilenler olduğu bulunmuştur (Brandelli ve ark., 2010). Ca^{2+}, Mg^{2+}, ve Mn^{2+}gibi divalent metal iyonlarının varlığı keratinolitik proteaz aktivitesini genellikle uyardığı bulunmuştur. Buna karşılık Cu^{2+}, Ag^{2+}, Hg^{2+}, and Pb^{2+}gibi geçiş ve ağır metallerin keratinolitik proteazları inhibe ettikleri saptanmıştır (Brandelli ve ark., 2010; Bezus ve ark, 2021).

Bugüne kadar izole edilen bakteriyel keratinolitik proteaz enzimlerinin büyük çoğunluğu serin proteaz özelliğine sahiptir (Lin ve ark., 1992). Tatineni ve ark. (2008)'nın *Streptomyces* sp. S7 suşundan izole ettikleri serin-metallo enzim özelliğine sahip keratinolitik proteaz enziminin bilinenlerin dışında bir özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

1.3. Mikrobiyal Proteazların Sınıflandırılması

Proteazların sınıflandırılması kökenlerine, katalitik mekanizmalarına, spesifikliklerine veya katalitik bölgedeki reaktif grupların doğasına dayanmaktadır. Polipeptit zincirleri üzerindeki etki bölgesine bağlı olarak proteazlar, ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Ekzopeptidazlar yalnızca polipeptit zincirlerinin uçlarına yakın etki gösterirler ve sırasıyla amino veya karboksil terminalindeki etki bölgesine bağlı olarak amino ve karboksipeptidazlar olarak alt sınıflara ayrılırlar. Endopeptidazlar, polipeptit zincirlerinin iç bölgelerindeki peptit bağlarını her iki uç terminalden uzağa böler. Bunlar ayrıca aktif bölgede mevcut olan temel katalitik kalıntıya dayalı olarak serin, aspartik, sistein, metallo, glutamik asit ve treonin proteazlar olmak üzere altı gruba alt sınıflandırılır (Boominad ve ark.2009).

1.3.1. Serin Proteazlar

Mikroorganizmalar ve ökaryotlar arasında en yaygın şekilde bulunan serin proteazlar, aktif bölgede reaktif bir serin kalıntısının varlığı ile karakterize edilir. Bu proteazlar, 7–11 arasındaki geniş pH aralığında optimal olarak aktiftir ve amidaz ve esterolitik aktivite dahil olmak üzere geniş substrat spesifikliklerine sahiptir. Serin alkalin proteazlar, aşırı reaksiyon koşullarındaki yüksek aktiviteleri ve stabiliteleri nedeniyle en büyük ticari uygulamaya sahiptir. Bu enzim grubu genel olarak di-izopropil florofosfatlar, 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI), 1-3-karboksitrans 2,3-epoksipropil-lösilamido (4-guanidin) bütan (E.64), tosil-l-lizin klorometil keton (TLCK) ve fenilmetilsülfonil florür (PMSF) (Sing ve ark. 2016).

1.3.2. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar, aktiviteleri açısından sistein ve histidinden oluşan katalitik bir ikili oluşturan proteinlerdir. Sistein proteazların katalitik aktivitesinin uyarılması için HCN veya sistein, DTT, EDTA gibi indirgeyici maddeler gerekli olmasına rağmen, 4-hidroksi civa benzoik asit (p-CMB), iyodoasetik asit, iyodoasetamid gibi sülfhidril (SH) reaktifleri tarafından inhibe edilir. Geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitelerinden dolayı gıda ve farmasötik uygulamalarda yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler. Scrapie proteininin dendritik ve nöronal hücrelerde parçalanması gibi proteinlerin ve peptitlerin metabolik parçalanmasında rol oynarlar. Papain, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan, en iyi bilinen mikrobiyal sistein proteazlardan biridir (Sing ve ark. 2016).

1.3.3. Aspartat Proteazlar

Bu endopeptidazlar asit proteazlar olup katalitik aktiviteleri için iki aspartik kalıntı içerirler. Çoğu aspartik proteaz, asidik pH'da (pH 3 ila 4) optimal olarak aktiftir ve pH 3 ila 4,5 aralığında izoelektrik noktalara sahiptir. Bu proteazlar tercihen polar olmayan amino asit kalıntıları arasındaki peptid bağlarını keser. Bu proteazlar pepstatin tarafından ve bakır iyonlarının varlığında diazoketon bileşikleri tarafından inhibe edilir (Hadjidj ve ark. 2018).

1.3.4. Metallo Proteazlar

Bu enzim grubu, katalitik aktiviteleri için çinko, kobalt veya manganez gibi iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Bu proteazlar, şelatlama maddelerinin katalitik mekanizmada yer alan metal iyonları üzerindeki tecrit edici etkisi nedeniyle EDTA gibi şelatlama maddelerine karşı duyarlıdır. Çok çeşitli substrat spesifikliğine sahiptirler ve ilaç geliştirme de dahil olmak üzere farklı endüstrilerde geniş bir uygulama alanı bulurlar.

Ek olarak proteazlar ayrıca treonin proteazlar, glutamik asit proteazlar ve asparajin proteazlar olmak üzere üç önemli gruba daha sınıflandırılır. Treonin proteazlar (EC 3.4.25), katalitik bölgede bir treonin kalıntısının varlığıyla temsil edilir. Bu grubun klasik örnekleri

asiltransferazlar ve proteazomlardır. Glutamik asit (EC 3.4.19) ve asparagin proteazlar, aktif bölgelerinde sırasıyla glutamik asit ve asparajin kalıntısının varlığıyla karakterize edilir. Glutamik asit grubundaki proteaz enzimlerinin gıda endüstrisinde ve terapötik uygulama potansiyeli vardır (Sing ve ark. 2016).

1.4. Keratin

Keratin molekülünün üç boyutlu yapısı ilk kez 1959'da tanımlanmıştır. Ancak bu alandaki çalışmaların sayısı 1990'dan sonra büyük ölçüde artmıştır. Şu anda, benzersiz fizikokimyasal özelliklerine, moleküler yapılarına ve üreten epitel hücrelerine bağlı olarak çeşitli gruplara sınıflandırılmış en az 30 farklı Keratin polipeptidi vardır.

Keratinler, geleneksel proteazlar (pepsin, tripsin) tarafından parçalanmaya dirençlidir ve seyreltilmiş asitler, alkali reaktifler, su ve organik çözücülerde çözünmezler. Keratinlerin amino asit dizisi ve bileşimi keratin liflerinin katlanmasını, özelliklerini ve işlevlerini etkiler. Sistein, bu moleküllerin yapısal stabilitesi için önemli olan disülfid bağlarının oluşumunda anahtar rol oynar. Sert keratinler (tüyler, saçlar, tırnaklar ve toynaklar gibi sert dış yüzeylerde bulunur) yumuşak, esnek keratinlerden daha fazla disülfür bağları içerir. Amino asit sekansı ayrıca, α-heliks (α-keratinler için tipik) veya β-yaprak yapıları (β-keratinler için tipik) bakımından zenginleştirilebilen keratinlerin ikincil yapısını da etkiler.

Keratinler tipik olarak farklı ikincil yapılara sahip üç alandan oluşur: baş alanı, merkezi sarmal alan ve kuyruk alanı. Baş bölgesi veya proteinin N-terminal kısmı, pozitif net yüklü değişken sayıda aminoasitten (50-100) oluşan β dönüşlü küresel bir yapıdır.

α-keratinlerin merkezi sarmal alanı yaklaşık olarak 310 aminoasittir ve birbirlerinden "bağlayıcı" bölgeler adı verilen sarmal olmayan dönüşleri ile ayrılan dört sağ elli α-sarmal alt etki alanından (1A, 1B, 2A ve 2B) oluşur. İkincisi, amino asit dizisi ve uzunluğu bakımından farklılık gösterir. Yaklaşık% 38-45 keratin molekülü α-heliks yapıda bulunur.

Proteinin kuyruk bölgesi veya C-terminal kısmı küresel yapı içerir. Bir keratin molekülünün alanları ve alt alanları, heterodimerler, tetramerler ve son olarak keratin lifleri oluşturan bitişik keratin moleküllerininkilerle etkileşime girer. Paralel oryantasyondaki bir asidik ve bir temel keratin molekülünün çubuk alanları, keratin moleküllerinin heterodimerlerini oluşturur ve keratin filamentlerinin yapı taşlarını temsil eder.

Keratinlerin kuarterner yapısı, tetramer (2 nm çapında protofilament), oktamer (protofibril, 4,5 nm çapında iki protofilament) ve birim uzunluk oluşturma kapasitesi üzerinde etkilidir. 20 nm çapında dört demetlenmiş protofibriliçeren filamentler (ULF'ler). Protofibrillerin ve mikrofiberlerin yapıları disülfür bağları, hidrojen ve hidrofobik etkileşimLerle güçlendirilir ve bunlar aynı zamanda keratin moleküllerinin sertliğinde ve inatçı olmasında önemli bir rol oynar.

Keratin proteini, yaklaşık %91 keratin, %1,3 yağ ve %7,9 sudan oluşan tavuk tüyünden elde edilen bir proteindir. Keratin proteini, saç, deri ve tırnaklarda da bulunan sert bir proteindir.

Keratinazlar, hayvan besinlerinin hazırlanmasında, protein takviyelerinde, deri imalatında, tekstil işlemede, deterjan formülasyonunda, yem ve gübre için tüy unu işlemede, farmasötik ve biyomedikal endüstrisinde ve atık yönetiminde gereklidir.

Keratin, dünyada en çok bulunan biyopolimerlerden biridir. Vücut sıvılarının kaybını önlemek için insan ve hayvan organlarının dış yüzeyini kaplayan sert, lifli, çözünmez bir malzemedir.

Keratin ağırlıklı olarak sürüngenlerin, kuşların, amfibilerin ve memelilerin dokularında bulunur. Tüy, saç, tırnak, boynuz, toynak, kemik, kürk, pençe, post, kuş gagası, deri, yün, pul ve kılların yapısal bileşeni keratindir. α-keratinler (alfa heliks) genellikle memelilerin saçlarında, yünlerinde, boynuzlarında, tırnaklarında, pençelerinde ve toynaklarında bulunurken, daha sert olan β-keratin (beta tabakaları) kuş tüylerinde, gagalarında ve pençelerinde bulunur.

Ayrıca keratin hepatositler, hepatobiliyer duktal hücreler, oval hücreler, asiner hücreler, ince bağırsak enterositleri, kolon ve goblet hücrelerini içeren sindirim organlarının (karaciğer, pankreas, bağırsak ve safra kesesi) epitel hücre tiplerinde de eksprese edilir.

Keratin, disülfid köprülerine sahip kükürt bileşikleri açısından zengindir. Bu yapılar keratine çözünmez özellik kazandırır. Ayrıca, ağırlıklı olarak sistin, lizin, prolin ve serin olmak üzere çeşitli amino asitler içerir.

Keratin serttir, skleroprotein içerir, çoğu kimyasala karşı reaktif değildir ve pepsin, tripsin veya papain keratini parçalayamaz. İnsanlar da dahil olmak üzere daha yüksek omurgalılar, keratinli malzemeleri parçalayamazlar.

Keratin, insan karaciğer hastalıklarıyla bağlantılı olan epitel hücrelerinde oluşan ara madde demetlerini oluşturan bir monomerdir.

Heteromerik birleşim ve perinükleer organizasyon için keratin elementleri 5 ve 1 ile ilgili yapısal ayrıntılar bildirilmiştir. Protein Veri Bankası Erişim kodu: 3TNU; Farklı keratin filamentler arasında K8 ve K18 hepatositlerin korunması için önemLidir. Apoptoz sırasında K18 kaspaz-bölünme bölgeleri ayrıntılı olarak tarif edilmiştir.

Çevre sorunlarına neden olan keratin kirliliğinin ana kaynakları, keratini hammadde olarak kullanan endüstrilerden başlamaktadır. Kümes hayvanı çiftlikleri tüy atıklarının boşaltılmasıyla da ilişkilidir. Nitekim tüylerin %90'ı keratindir ve her yıl milyonlarca kilogram tüy çevreye atılmaktadır. Tüylerin atılması, üretim sırasında kuşların tüy ve tüylerinin doğal olarak dökülmesine de eşlik eder, bu nedenle keratin birikimini azaltacak yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Keratinin çevresel olarak değerlendirilmesi için, daha düşük maliyetle kolay işlemeyi gerçekleştirecek acil adımlar atılması gereklidir.

Keratinler, çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip omurgalı epitelyumu tarafından üretilen önemli yapısal proteinlerdir. Keratinler, suya, enfeksiyona karşı koruyucu bir bariyer görevi görebilir veya dokuya mekanik darbelere karşı esneklik kazandırır. Keratin proteinlerinin iki ana

türü α-keratin ve β-keratinlerdir. Bu iki tip asidik veya bazik, yumuşak veya sert olarak ayrılır ve farklı moleküler ağırlıklara sahiptir.

α-Keratin, hidrojen bağı ve disülfit köprüleri oluşturan çoklu sisteinlerin varlığı ile ifade edilen bir sarmal yapıya sahiptir. α -Keratin, diğer keratinlere kıyasla daha düşük kükürt içeriği ve 60-80 kDa'lık moleküler ağırlıkları ile karakterize edilir.

Sert keratin memeli lifleri, tırnakları, toynakları ve boynuzlarının ana proteinidir. Diğer taraftan lif kütikülünün ana bileşenini oluştururlar. β-keratin kıvrımlı levhalar, yanal olarak paketlenmiş ve paralel veya antiparalel bir yönelime sahip olabilen β-iplikçiklerden oluşur. Yapraklar, hidrojen bağları ve peptid bağının düzlemsel doğası ile bir arada tutulur, bu da kararlı kıvrımlı bir yapı ile sonuçlanır

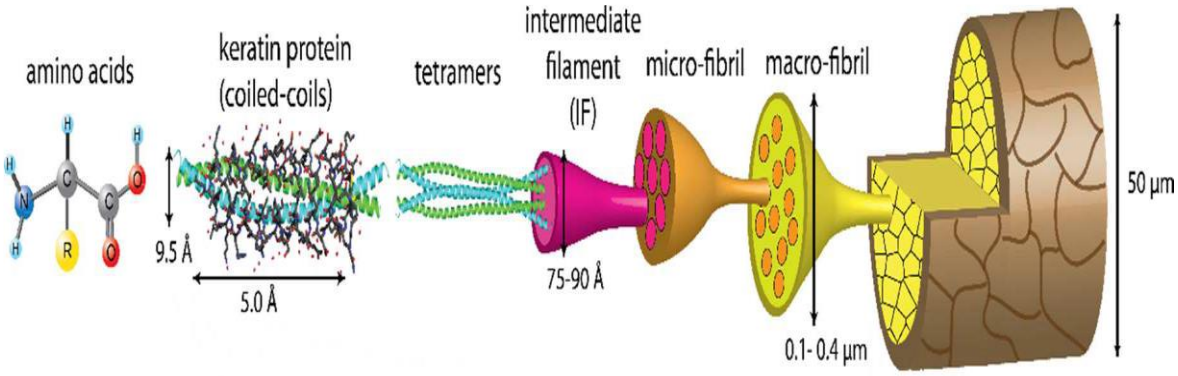
β-Keratinlerin moleküler ağırlığı 10–22 kDa'dır. Üçüncü bir keratin türü olan γ-keratin, yüksek kükürt içeriğine ve yaklaşık 15 kDa moleküler ağırlığa sahip dairesel bir proteindir. Bu keratin, keratinle ilişkili proteinlerle birlikte, memeli liflerinin lif korteksinin mikrofibrilleri ve mikrofibriller arasındaki matrisi oluşturur ve yoğun disülfit köprüsü oluşumu ile korteksin yapısını stabilize eder.

Tüm memeli liflerinin karmaşık yapısal organizasyonu çok benzerdir Saç lifi, korteksin etrafında koruyucu bir kılıf oluşturan üst üste binen düzleştirilmiş pul benzeri hücrelerden ve en dıştaki kütikül tabakasından oluşur. Lif kütikülünün ana proteini β-keratindir Korteks, kükürt açısından zengin bir matris içine gömülmüş sert keratin ara liflerinden oluşur. Bu filamentler, daha kalın liflerde olduğu gibi medullayı çevreler. Hücre zarı kompleksi, kütikül ve kortikal hücreleri bağlar.

Kütikül tabakası lamine edilmiştir ve aşağıdaki tabakalardan oluşur: kütikül filamanı ile ilişkili yüzey zarı, sistin bakımından zengin ekzokütikül a-tabakası, alt ekzokütikül ve yalnızca düşük seviyelerde kükürt içeren amino asitler içeren ve endokütikula endokütikülü kütikülün iç astarı Kütikülün en dış tabakası, lif yüzeyini sudan ve kimyasal bileşiklerden koruyan hidrofobik bir bariyer gibi davranır. Bu kütikül filamanı ile ilişkili yüzey zarı 2-7 nm kalınlığındadır ve yüksek oranda çapraz bağlı proteinler ve lipitlerden oluşur. İnsan ve hayvan kıllarında bulunan kütikül yüzey lipidlerinin ana yağ asidi 18-etileiksanoik asittir protein matrisine bir tiyoester bağı ile kovalent olarak bağlanır ve protein matrisi, izopeptit bağları ile çapraz bağ oluşturur İzopeptit bağı, örneğin lizin ve glutamin gibi keratin proteinindeki aminoasit kalıntılarının aminoasit yan zincirleri arasında transglutaminaz katalizli bir amid bağı oluşumundan kaynaklanır.

Kortikal hücreler, keratin ara filamanları olarak toplanır ve tüm memeli liflerinde 7-8 nm çapındadır Bu ara filamentler, türe ve işleve bağlı olarak düzenli kümeler veya mikrofibriller ve makrofibriller oluşturur (Şekil 1.1). Sert keratin ara filamentleri, bir çift yanal olarak sıralanmış ve antiparalel dimerik moleküller olan tetramerlerden birleştirilir. Ortalama olarak, keratin ara filamentleri sekiz tetramer içerir. Yün söz konusu olduğunda korteks bölgesi, farklı ara lif/matris

dolgusuna sahip bir ortokorteks ve parakorteksten oluşur. Yün lifindeki orto ve parakorteks oranı kıvrılma derecesini belirler



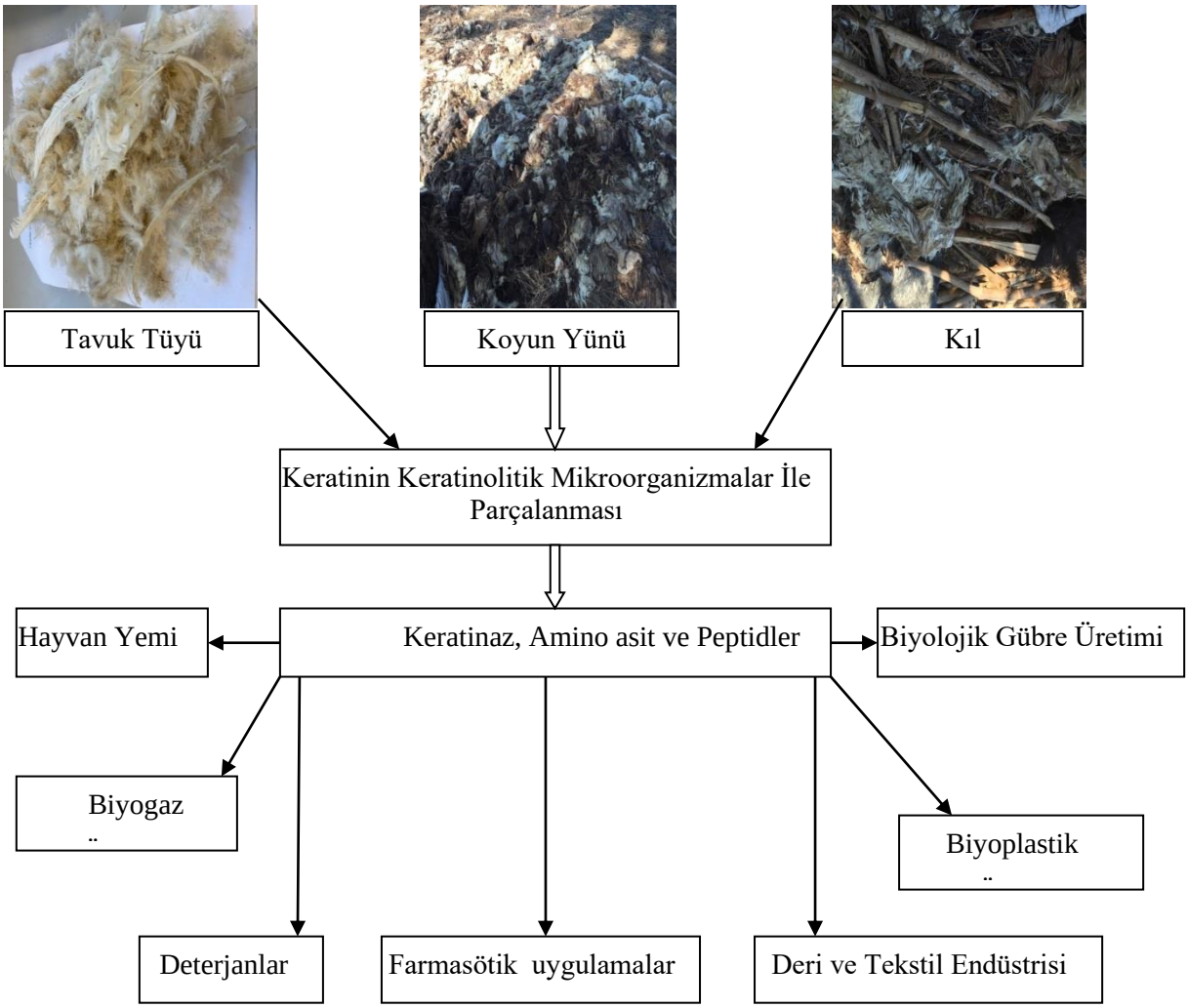
Şekil 1.2. Keratinin yapısı (Gopinaht ve ark., 2015).

Keratin peptit heterodimerleri, bir tip I (asidik) polipeptit zinciri ve bir tip II (temel) polipeptit zinciri paralel olarak dizildiğinde oluşur. Her bir polipeptit zinciri, sarmal olmayan baş ve kuyruk alanlarına sahip merkezi bir sarmal bölgeden (yaklaşık 46 nm uzunluğunda) oluşur Baş ve kuyruk alanları sistein, glisin ve tirozin amino asitleri açısından zengindir. Disülfit ve izopeptit bağları, lifi stabilize eden diğer keratin ara filamentleri, sistein açısından zengin matris proteinleri ve keratinle ilişkili proteinler ile oluşturulur Baş ve kuyruk bölgelerindeki N-asetil glukozamin glikosile edilmiş serin ve treonin ile birlikte disülfid bağları da heterodimerleri stabilize eder.

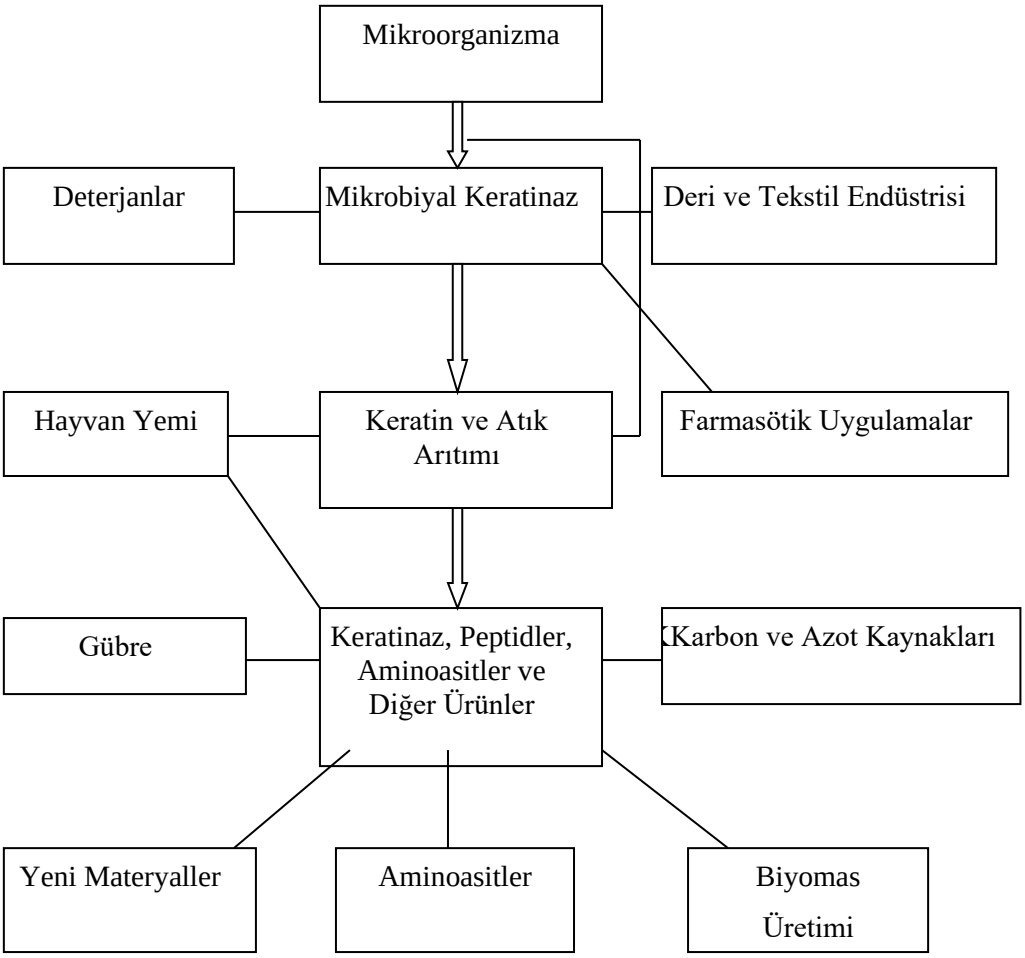
1.4.1. Keratin Hidrolize Eden Bakteriler

Mantar izolatlarına benzer şekilde, keratinleri parçalayabilen bakteri suşlarının listeleri hazırlanmıştır. Bakteriler, mantar türlerinden daha hızlı üreyebilir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda yüksek kullanım potansiyeline sahiptir. Mantarların avantajları, mantar hiflerinin bakterilere göre keratine daha kolay kolonize olabilmektedir. Keratini parçaladığı veya keratinaz ürettiği bilinen bakteri suşları, öncelikle *B. subtilis ve B. Licheniformis gibi Bacillus* sp. bakterilerinden oluşur Bunun yanısıra Gram-pozitif *Lysobacter, Nesterenkonia, Kocuria ve Microbacterium* ve Gram negatif *Vibrio, Xanthomonas, Stenotrophomonas, Chryseobacterium, Fervidobacterium, hermoanaerobacter ve Nesterenkonia* gibi diğer bakteriler de keratini parçalayabilir.

Korniłłowicz-Kowalska ve Bohacz [2009], *Actinomisetler,*ve *Streptomyces* grubu, yani *S. fradiae, Streptomyces türleri A11, S. pactum, S. albidolavus, S. thermoviolaceus SD8 ve S. graminofaciens* gibi Streptomyces grubuna ait bakterilerinde keratinaz üretme yeteneğine sahip olduklarını belirtmişlerdir.



Şekil 1.3. Keratin kaynakları ve keratinazla hidrolize edilmiş ürünlerin kullanım alanları



Şekil 1.4. Keratin ve atık ürünlerinden elde edilen amino asit, peptidler ve keratinaz enziminin kullanım alanları

1.5. Keratin Hidrolizatlarının Bitki ve Hayvan Uygulamaları İçin Önemi

Keratin yapılarının amino asite dönüştürülmesi işlemlerinde alkali lizi ve ısı ile hidroliz uygulamaları da kullanılmakla birlikte, esansiyel amino asitlerin (Lizin, Metiyonin ve Triptofan) hidroliz sırasında kaybolması ve Lycinoalanin ve Lanthinonin gibi besleyici olmayan amino asitlerin oluşumuna neden oldukları için, amino asit içerigi önemli düzeyde azalmakta/farklılaşmakta ve biyolojik yeterlilik zarar görmektedir.

Enzimatik hidroliz, keratini meydana getiren amino asitleri birbirine baglayan peptid ve disülfit baglarını hidroliz ederek hem amino asit içeriğinde kayıp olmamakta hem de biyolojik aktiflikleri yüksek düzeyde korunmaktadır.

Keratinolitik enzimler *Bacillus* ve *Streptomycet* gibi ekstrasellüler sentez yapan bakteriler tarafından sentezlenen ve organizmanın keratini hidrolize etmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. *Bacillusun* bir çok suşu keratinolitik enzim üretmektedir. Bakteriler hemen her gün mutasyon geçirdiklerinden izole edildikleri kaynağa gore diğerlerinden farklı özelliklere sahip olacaklardır.

Elde edilecek ürünler zengin içerikleri nedeni ile (özellikle hayvan besleme ve bitkisel üretimde eksikligi çekilen lizin, metiyonin ve triptofan) hayvansal ve bitkisel üretimde önemli bir yem ve gübre katkı bileşeni olacaklardır.

Ülkemizde yem üretiminde kullanılan yem hammaddelerinin eksikliği, dışarıdan alınma zorunluluğu ve hayvanların yemden yeterince yararlanamaması hayvansal üretimde eksikliklereve düşüşlere neden olmaktadır. Benzer durum bitkisel üretim için geçerlidir.

Küresel iklim degişikliği, bilinçsiz kimyasal gübre kullanımı, antibiyotik, herbisit, pestisit, insektisit ve fungisit gibi bitki hastalıkları ile mücadele amaçlı kimyasalların kullanımı toprak bitki ilişkisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bitkide stres oluşumu ve bitkisel verimliliğin düşmesine neden olmaktadır. Bitkiler hemen her türlü olumsuz koşula karşı savunma mekanizmalarını geliştirmek ve canlılıklarını devam ettirmek için protein yapılı sekonder metabolitler üretmektedirler.

Sekonder metabolitler için gerekli aminoasitler bitki tarafından sentezlendigi için bitki önemli miktarda enerji tüketmekte ve bu nedenle yaşamsal mücadelede yeterli başarı elde edilememektedir. Keratinin enzimatik hidrolizi ile elde edilen aminoasit karışımLarı bitkinin gereksinim duyduğu bütün aminoasitleri içerecek zenginliktedir. Keratinolitik hidrolizatın gübre üretiminde kullanılması, bitkinin iklim degişikligi kaynaklı olumsuzluklar dahil, bütün stres koşullarına karşı güçlü bir cevap oluşturmasını sağlayacaktır. Bu durum bitkilerin olumsuz koşullarda varlıklarını ve verimliliklerini sürdürmelerinde büyük bir avantaj oluşturacaktır.

Hayvansal organizmalar temel aminoasitleri dışarıdan besinler aracılıgı ile almak zorundadırlar. Bu amino asitler izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin şeklinde sıralanabilir. Mikroorganizmalar ve bitkiler kendi aminoasitlerini sentezlemektedirler.

Bitkiler aminoasitlerini sentezleselerde, özellikle büyümenin kritik aşamalarında protein gereksinimleri oldukça artmaktadır (yapraklanma, çiçeklenme, döl tutumu, meyve oluşumu vb.). Bu dönemlerde bitki beslenmesinde kullanılan gübrelerde serbest aminoasit bulunması, bitkisel üretimde hızlı bir verim artışını meydana getirecektir.

Tüylerin keratinolitik bakteriler ve keratinaz enzimleri tarafından parçalanması, tüy atıklarını, serbest aminoasitler, peptitler ve amonyum iyonları içeren beslenme açısından dengeli faydalı tüy lizatına dönüştürebilir.

Keratinolitik enzimlerle elde edilen tüy hidrolizatların bitki büyümesini artırma aktivitelerine ve ek olarak IAA gibi bitki büyüme hormonu üreterek ve inorganik fosfatı çözündürerek bitkilerin büyümesini daha da artırabileceğinden, gübrelemenin etkilerini daha da artırabilir.

Tüylerin keratinolitik hidrolizi ile aminoasitler üretebilir. Özellikle bitki büyüme hormonu IAA'nın bir öncüsü olan triptofan (Trp) gibi amino asitler buna en güzel örnektir. IAA, hücre plastisitesi, doku uzaması, embriyogenez, uç baskınlığı ve yan köklerin ortaya çıkması dahil olmak üzere bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan bir fitohormondur. IAA üretimi, hidroliz için kullanılan tavuk tüyü konsantrasyonundaki artışla artar.

Besiyerine farklı konsantrasyonlarda tavuk tüyü (%0.25-2 w/v) ekleyerek *Bacillus subtilis* tarafından IAA üretimini gözlemlemiş ve artan tavuk tüyü konsantrasyonu ile IAA üretiminin doğrusallık gösterdiğini, %2 tüy varlığında maksimum IAA üretimi gerçekleştiğini saptamışlardır.

Benzer durum hayvansal organizmalar için de söz konusudur. Özellikle 8 temel aminoasidin mutlaka dışarıdan alınmak zorunda olması, bu aminoasitlerin hayvan yemlerine karıştırılması ile verimlilikte büyük bir artış sağlanacaktır.

Gerek bitki gerekse hayvansal organizmalarda gerçekleşen bütün kimyasal ve metabolik faaliyetlerde katalizör olarak kullanılan enzimler ve hormonların protein yapısında olmaları, yem ve gübre ile birlikte hazır aminoasitlerin kullanılmasının verimlilikte nedenli etki yapacağını açıkça göstermektedir. Zira hayvanların bu aminoasitleri dışarıdan almaları ve alırken proteinleri parçalamak için büyük enerji harcamaları, bitkisel organizmalarda gerekli olan aminoasitlerin üretimleri için büyük miktarda enerjiye ihtiyaç duymaları, her iki canlı grubunda da verimliliği olumsuz yönde etkileyecektir (Stamenkovich ve ark. 2019).

Hayvanlarda yem ile birlikte hazır amino asit kullanılması et, süt ve diğer ürünlerin artışında, olumsuz çevre koşulları ile hastalıklara karşı dayanıklılıkta hayvana avantajlar sağlarken, antibiyotik kullanımı olmayacağı için organik üretim yapılmasının yolu açılmış olacaktır.

Bitkilerde çimlenmeden üretim süresinin kısalmasına, daha erken sürede ürün eldesine, stres koşullarına (kuraklık, tuzluluk, soguk, besin eksikligi) uyum ve dayanıklılığın artmasına, her türlü enfeksiyona karşı dayanıklı bitkiler üretilmesine, hastalıklarla mücadele için özellikle kimyasal tarım ilaçları ve antibiyotik kullanılmamasına ve sürdürülebilir organik tarımsal üretimin gerçekleştirilmesine çok büyük katkı sağlanacaktır.

Yüksek sıcaklık, düşük nem, don, fırtına, sel, mekanik zararlar, tuzluluk artışı, pestisit, herbisit, insektisit, anti fungal gibi kimyasal ilaçlar ve kimyasal gübre uygulamaları gibi olaylar bitkiler üzerinde strese neden olurlar. Hazır aminoasit uygulaması ile bitkilerin enzim ve bitkisel hormonları sentezlemeleri uyarılarak strese dayanıklıkları ve verim artışı sağlamanın yolu açılacaktır.

Glisin ve Glutamik asit amino asitleri, bitkisel doku ve klorofil sentezinde rol alan temel primer metabolitlerdir. Bu aminoasitlerin dışarıdan hazır verilmesi ile bitkideki klorofil konsantrasyonunun artması ve daha yüksek derecede fotosentez yapması sağlanabilir.

Stomalar, ışık ve nem, düşük sıcaklık ve tuz konsantrasyonu yüksek olduğunda kapanır, bu durumda fotosentez ve transpirasyon azalır. Bu durumda bitkinin metabolik dengesi bozulur ve bitki büyümesinin durmasına neden olur.

Glutamik asit amino asidi, bitkide stoplazma ozmotik ajanı gibi davranır. Böylece stomaların açılması kolaylaşır ve metabolizma dengelenmiş olur.

Aminoasitlerin mikro besin maddeleri üzerine bağlanma özelligi vardır. Amino asitler mikro besin maddeleri ile birlikte uygulandığında, bitki içindeki mikro besin maddelerinin emilimi ve

taşınması daha kolay olur. Glisin ve Glutamik asidin çok etkili şelatlama maddeleri olduğu bilinmektedir (Stamenkovich ve ark. 2019).

Aminoasitler, bitki hormonlarının ve büyüme maddelerinin öncüleri ve aktivatörleridir. Metiyonin, Espermine ve Espermidine gibi büyüme faktörlerinin öncüsüdür. Triptofan, auxin sentezinin öncüsüdür. Triptofan aminoasidi, protein enzimatik hidrolizle parçalanırsa kullanılabilir. Bunun nedeni hidroliz işleminin (birçok Avrupa ülkesinde oldugu gibi) asit veya alkali ile gerçekleştirilmesi durumunda triptofan aminoasidinin yok olmasıdır. Arginin, çiçek ve meyve ile ilgili hormonların sentezini indükler.

Prolin polen verimliliğinde etkili iken, lizin, metiyonin ve glutamik asit tozlaşma için gerekli amino asitlerdir. Bu amino asitler polen çimlenmesini ve dişicik tüpünün uzunluğunu artırır. Aminoasitler bitki kök bölgelerinde gelişen ve verimLililkte kritik öneme sahip olan mikrobiyol floranın gelişmesi ve aktivitesinde oldukça etkilidirler (özellikle metiyonin aminoasidi). Mikrobiyal florayı oluşturan mikroorganizma topluluğu bitki verimliliğini artırmanın yanısıra biyoremediasyon işlemlerinin gerçekleştirirler.

Hayvansal ve bitkisel uygulamaya dönük üretilecek aminoasitlerin tavuk başta olmak üzere kanatlı hayvan tüyleri ve atık olarak doğaya terk edilen yün, kıl ve benzeri keratinli organik ürünlerden enzimatik yolla üretilecek olması, alkali hidroliz gibi kimyasal uygulama içermeden elde edilmesi, hayvansal ve bitkisel uygulamalarda elde edilecek başarıyı dahada artıracaktır.

Zira alkali hidroliz yöntemi ile elde edilen amino asit karışımında canlıların (hayvansal organizmaların) mutlaka dışardan almak zorunda oldukları (metionin, lizin, triptofan vb.) bir çok temel amino asit tamamen kaybolmaktadır.

Bu nedenle elde edilen ürün, biyolojik aktifligi ve yeterliligi çok zayıf hatta (Bütün proteinlerde başlangıç amino asidi daima metionindir) olmayan bir ürün şekline dönüşmektedir.

Amino asitler hayvanlarda yem rasyonlarına karıştırılarak kullanılabileceği gibi bitkilerde yaprak ve kök bölgelerinden verilebilir. Araştırmalar, aminoasitlerin doğrudan veya dolaylı olarak bitkinin fizyolojik faaliyetlerini etkileyebildigini kanıtlamaktadır.

Amino asitler toprakta protein sentezi için hazır yapı taşlarını sağlamaktadırlar. Toprağın mikroflorasını iyileştirdikleri için bitki besinlerinin asimilasyonunu arttırarak, makro ve mikro besin maddelerinin topraktan emilimini yüksek düzeylere ulaştırırlar.

1.6. Kollajen

Kollajen (daha spesifik olarak, kolajen ailesi), insan vücudundaki toplam protein kütlesinin yaklaşık %30'unu oluşturan farklı bağ dokusu türleri için hücre dışı matrisin (ECM) ana proteinidir. Kollajen makromolekülü iç içe geçmiş üç polipeptit zincirinden (α-helisler) oluşur ve fibroblastlarda, fibrositlerde ve bunların özel formlarında (kondro-, osteo-, tenno- ve keratinositler) sentezlenir. Kollajen düz kas ve bazı epitel hücrelerinde az miktarda sentezlenir. Günümüzde moleküler organizasyona, molekül boyutuna ve supramoleküler yapıların oluşumundaki özel fonksiyonlarına dayalı olarak 29 tip kolajen tanımlanmıştır.

En önemlileri, fibrillo ve fibrogenez aşamalarını hücre dışında geçiren fibriler kollajen tip I ve III'tür (birincil filamentler, subfibriller, fibriller, lifler ve lif demetleri). Kıkırdakta lif oluşturmayan fibriler kolajen tip II ve bazal membranlarda bulunan nonfibriler kollajen tip IV olarak adlandırılır. Diğer (küçük) kolajen türleri, fibrillojenezde, ana kolajen türlerinin moleküller arası ve fibriller arası bağlanmasında, kolajen yapılarının füzyonunda ve ECM ve hücrelerin diğer elemanlarında rol oynar. Tüm kollajen yapılar vücudun mekanik iskeletinde (kemikler, kıkırdaklar, tendonlar ve bağlar) önemli bir rol oynar ve inter organ ve intra organ bağ dokusunun iç iskeleti olarak görev yapar. Kollajenler, ECM'nin diğer bileşenleri ile birlikte, hücrelerin metabolizmasının ve fonksiyonlarının, hücreler arası etkileşimlerin, proliferasyonun, farklılaşmanın ve apoptozun düzenlenmesine katılırlar. Özellikle cilt yaralarının iyileşmesi, iç organ ve kas defektlerinin onarımı sırasında kolajenlerin onarıcı işlevinden sözetmek gerekir.

Kollajen, glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi diğer ECM bileşenleri, cilt kıkırdak tendonları ve bağları seröz ve mukoza zarları, aponevroz meninks iç organ kapsülleri sklera ve gözün korneası gibi yapıların temelini oluşturur, orta ve iç kulak ve vasküler adventisya da bulunur.

Kollajen, bağ dokularındaki hücre dışı matriste bulunan çözünmeyen ana lifli protein sınıfıdır. Başlıca özellikleri üçlü helikal konformasyonu ve hidroksiprolin kalıntılarının miktarının, sert yapıları nedeniyle doğada bulunan diğer proteinlerde bulunan miktardan çok daha yüksek amino asit içeriğine sahiptirler ve sınırlı sayıda proteaz tarafından hidrolize edilebilirler. Kollajenolitik proteazlar bunlara en güzel örnektir.

1.6.1. Kollejenolitik Proteazlar

Kollajenden elde edilen peptidler kozmetik alanında kullanılmak üzere çeşitli hammaddelerden üretilebilirler ve derinin boyanmasını kolaylaştıran toksik olmayan ve çevre dostu biyokatalizörler olarak da kullanılabilirler.

Bunun yanı sıra kollajenolitik proteaz enzimleri bitki kök zararlısı nematodların dışını oluşturan kutikula tabakasının parçalanmasını sağladığı için tarımsal mücadelede kimyasalların yerine biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecek çok etkili bir enzimdir

Kollajenolitik proteazların elde edildiği kaynaklar arasında *Clostridium histolyticum, Porfiromonas gingivalis* ve *Vibrio alginolyticus* gibi bakteriler bulunmaktadır. Bu bakterilerin

patojen olmaları ve toksinlerinin patojenik karakter göstermesi nedeni ile kollajenolitik enzimin uygulanmasında tehlike söz konusudur. Bu nedenle son yıllarda kollajenaz enzim üretimi için *Bacillus pumilus, Bacillus subtilis, Geobacillus collagenovoras*, and *Bacillus* sp. strain MO-1 gibi patojen olmayan bakterilere yönelinmiştir.

Kollajenolitik proteazların kollajen hidrolizi ve kollajen türevleri için kullanımı tıpta, tarımda, gıda takviyelerinde, kozmetikte ve deri endüstrisinde önemlidir. Kollajenolitik proteazlar tıpta ve endüstriyel faaliyetlerde oldukça önemli olup, bu nedenle çeşitli terapötik ve endüstriyel uygulamaları yapılmaktadır. Kollajenaz enzimleri gıda endüstrisinde deneysel olarak kullanılmış ve kollajen peptitlerin oral yoldan verilmesinin osteoporozu önlediği, mide ülserine karşı koruduğu, gevşemeyi desteklediği, hipertansiyonla savaştığı ve ciltte metabolizmayı uyardığı gösterilmiştir (Pegueno ve ark. 2019).

Spesifik olmayan proteolitik enzimler tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Kronik yaralarda, yanıklarda ve ülserlerde aşırı kollajen birikimi sonucu nekrotik bağ dokusu oluşumuna bağlı (lifli deri dönüşümleri, yara izleri ve darlıklar gibi) çeşitli bozukluklar meydana gelir. Bu bozuklukların düzeltilmesinde spesifik kollajenolitik etki gösteren kollajenaz enzimLerinin kullanılması önerilmektedir.

Yaklaşık 60 yıldan bu yana tıpta clostridium hystolyticium bakterisinden elde edilen kollajenaz enzimi yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte bitki ve farklı bakterilere ait kollajenaz enzimleri ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Kollajenaz enzimleri özellikleri nedeni ile yeni etkili ilaç bileşenlerinin hazırlanmasında önerilmektedirler.

Extrasellüler konnektif doku metabolizmasının bozulması sonucu cildde keloid skarların gelişmesine, iç organların fibrozu ve sklerozuna (karaciğer, böbrekler, akciğerler ve kalp), kontraktürlerin oluşumuna, ankiloz ve tübüler organların lümeninin oklüzyonlarına neden olurlar.

1.6.2. Kollajenaz Enzimlerinin Kullanım Alanları

Kollajenaz enzimi kullanılarak hidrolizi hidrolize edilmiş kollajen yapılarından, endüstriyel uygulamalarda kullanılan çeşitli peptitler üretilebilir. Hidrolize kollajen, immünoterapötik ajan, kozmetiklerde nemlendirici ve et endüstrisinde et ürünlerinin yumuşatılmasına ve tat ve aroma oluşumuna katkıda bulunur (Chauhan ve Prabha.,2017)

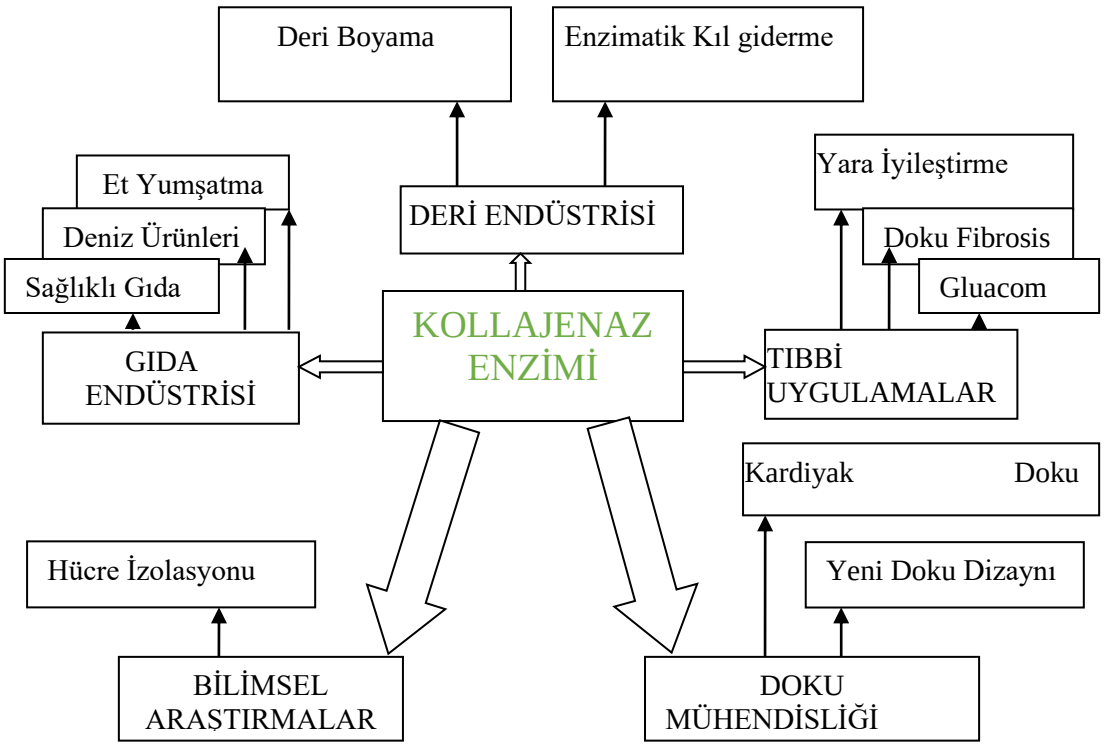
Kollajenaz enzimlerinin çeşitli insan hastalıklarındaki rolü, ya kollajenaz enziminin aşırı üretimini ya da vücutta yetersiz kollajenaz miktarına bağlı olmayı içerir. Bu hastalıkların doğması, kollajenazın katılımının anlaşılmasını ve daha sonra tedavi için terapötiklerin geliştirilmesini içerir.

Kollajenaz enzimi iki kategoride sınıflandırılabilecek geniş ve yaygın uygulamalar bulmuştur. Kollajenolitik proteazların doğrudan kullanıldığı uygulamalar ve kollajenolitik proteazların ürettiği reaksiyon ürünlerinin (kollajen/kollajen peptidler) kullanıldığı uygulamalar. Kollajenazlar, nekrotik dokunun bozulmasında potansiyel olarak önemli ajanlar olarak ortaya çıkmıştır ve doku kültürü ortamının önemli bileşenleri olarak kullanılmıştır.

Mikrobiyal kollajenazlar, et yumuşatma, kollajen peptidleri, hidrolizatlar, kollajen ekstraksiyonu, yan ürün kullanımı ve fonksiyonel gıdalar gibi gıda ve beslenme sektöründe potansiyel uygulamalara sahiptir.

Gıda endüstrileri, kozmetik endüstrileri tabakhane ve et endüstrileri dahil olmak üzere kollajenazın çok çeşitli endüstriyel uygulamaları vardır. Ancak kollajenazın en önemli uygulamaları terapötik alandadır. Kolajenazların Dupuytren ve Peyronie hastalıklarının tedavisi, yanıklar, yara iyileşmesi, intervertebral disk herniasyonu, kronik total oklüzyonlar, glokom, kıkırdak onarımı, rahim fibroidi, selülit, keloid, meme başı ağrısı ve insanda tutulan plasentanın bozulması gibi çeşitli invaziv olmayan terapötik uygulamalar ve kanser gen terapisi alanlarında kullanıldıkları belirtilmektedir.

Kollajenazlar, tümör hücreleri tarafından yapısal enzim üretimi, komşu stromal hücrelerde kollajenaz üretiminin indüklenmesi ve tümör/stromal hücreler arasındaki etkileşimlerin bir veya her iki hücre tipi tarafından kollajenaz üretimini indüklemesini içeren çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör istilasına aracılık edebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, interstisyel kollajenazların yüksek ekspresyonu, çeşitli kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilidir ve bu nedenle bu MMP'ler, tümör ilerlemesinin bir belirteci olarak hizmet edebilir (Chauhan ve ark. 2017).



Şekil 1.5. Kollajenaz enziminin kullanım alanları

1.6.3. Lomber Disk Hernisi Tedavisinde Kollajenaz Kullanımı

Lomber disk hernisi son yıllarda genç erişkinlerde en sık görülen hastalıklardan olup, sadece cerrahi rezeksiyon yaygın tedavi olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar kollajenaz gibi enzimlerin

enjeksiyonunun disk herniasyonu belirtilerinde iyileşme sağlayabileceğini göstermiştir Son yıllarda, intervertebral diskin klinik tedavisinde kollajenaz ile kombinasyon halinde perkütan diskektomi de dahil olmak üzere çeşitli minimal invaziv teknikler kullanılmıştır. Bu teknik Çin'de geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Kollajenaz kullanımı sinir kökündeki temas alanını arttırır ve kısa sürede kolajenin çözünmesi başlar. Çözünmüş kollajen yavaş yavaş emilir, bu da intradiskal basıncı daha da azaltır ve sinir kökü üzerindeki baskıyı hafifletir (Salamonea ve ark. 2012).

1.6.4. Yara İyileşmesinde Debridman Ajanı Olarak Kollajenaz Kullanımı

Debridman, önemli bir sağlık sorunu olan yaradan ölü nekrotik veya enfekte dokuyu uzaklaştırma tekniğidir. Kollajenaz enzimlerinin, yara iyileşme sürecinde dermal hücrelerin çoğalmasını, anjiyogenezini ve migrasyonunu arttırdığı deneysel olarak araştırılmıştır. Kollajenaz, debridman için kullanılan iyi bilinen bir enzim preparatıdır. Kolajenaz, doğal kolajeni hidrolize edebilir ve böylece kronik yaraların hızlı debridmanını ve iyileşmesini kolaylaştırabilir. Kollajenaz ilk önce kollajeni jelatine indirger, daha sonra bunun üzerine daha az spesifik enzimler etki eder. Ancak kolajenaz kolajeni parçalayana kadar başka hiçbir enzim onu parçalayamaz.

Yatak yarası (WBP), kronik yara tedavisinde yerleşik bir kavramdır. Kollajenaz ile bakım debridmanının kolaylaştırılması, yaranın kapanmasını tamamlamak için kullanılabilir. Kollajenaz enzimi kullanılarak debridman ve yatak yarası iyileşmesinin optimizasyonu, kronik ve iyileşmesi zor yaraların yönetimini iyileştirme fırsatları sunar. Kollajenaz enzimi kullanılarak enzimatik debridman, diyabetik ayak ülserleri ve bası ülserlerinin tedavisi için yanıklara yönelik antibiyotiklerle birlikte kullanılır. (Chauhan ve ark. 2017).

1.6.5. Dupuytren Hastalığının Tedavisinde Kollajenaz Kullanımı

Dupuytren kontraktürü, elin fibroproliferatif bir durumudur ve avuç içinde giderek fibrotik kordonlara ilerleyen nodüllerin oluşmasıyla karakterize edilir. Kordonların kontraktürü parmaklarda deformasyonlara neden olur Bu deformite önemli ölçüde sakatlığa neden olur ve hastanın günlük yaşam aktivitelerini, manuel aktivitelerini, spor hobilerini sınırlayabilir ve son olarak hastaların yaşam kalitesini belirgin şekilde azaltabilir ve genel popülasyonda Duputyren hastalığının prevalansı yaşla birlikte artar. Dupuytren hastalığının ameliyatsız tedavisine büyük önem verilmektedir. Enjekte edilebilir kollajenaz, cerrahi fasiyotomiden daha etkilidir ve daha hafif yan etkilere sahiptir, bu da daha yüksek hasta memnuniyetine yol açar.

Son on yılda translasyonel araştırmalar, kollajenaz enjeksiyonları ile cerrahi olmayan enzimatik fasiyotomi tekniğini tanıttı ve yaşam kalitesini artırabilmişlerdir (Salamonea ve ark. 2012).

Çalışmanın amacı; doğal ortamdan izole edilecek keratin ve kollajen yapılarını hidrolize etme yeteneğine sahip cold ve mezofil alkalin *Bacillus* sp. bakterilerinden keratinaz ve kollajenaz

enzim izolasyonu, karakterizasyonu, enzimlerle kollajen ve keratin atık ürünlerinin hidrolize edilerek amino asit eldesi, enzim ve amino asitleri ayrı ayrı ve kombine halde kullanarak hayvan ve bitki performansını artırarak verimliliği üst seviyelere çıkartmak, amino asit ve enzimleri kişisel bakım ürünlerinin üretiminde kullanmak, kişisel bakım ürünleri ve tedavide kullanılacak formülasyonları elde etmek, enzimleri rekombinant olarak üretip maliyetleri düşürerek ülkemiz enzim sektörüne çok yönlü ürünler kazandırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünyada tarıma dayalı endüstriler içerisinde en hızlı büyüyeni kanatlı hayvan yetiştiriciliğidir. Dünya genelinde 2012 yılında kanatlı eti üretimi, beşte biri Amerika Birleşik Devletleri'nde olmak üzere 100 milyon tonun üzerine çıkmıştır. Avrupa Birliği'nin yıllık kanatlı eti üretimi yaklaşık 13 milyon ton, ortalama tüketim ise kişi başına yılda yaklaşık 23 kilo olarak gerçekleşmiştir. Son 20 yılda kümes hayvanları endüstrisi, şu anda küresel et üretiminin üçte birini oluşturan et pazar payının %10'unu ele geçirmiştir. Bu durum kanatlı eti ve yumurta tüketiminde bağlanabilir. Kanatlı sektöründeki bu gelişme kanatlı hayvanlardan kaynaklanan büyük ölçekli atık sorununa neden olmuştur. Kanatlı hayvanlardan elde edilen tüyler ana keratin atığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya genelinde 4 milyon tondan fazla tüy kaynaklı keratin atığı oluşmaktadır. Tüylerin birincil bileşeni olan keratin, yapısında çok sayıda disülfit bağının bulunması nedeniyle mekanik ve kimyasal işlemlere dayanıklı fibriler bir proteindir. Doğal keratin peptsin, tripsin ve papain gibi doğal enzimatik hidrolize dirençlidir. Tüylerin doğal koşullarda parçalanması 2-3 yıllık bir süreçte gerçekleşmektedir. Geridönüşüm firmalarının sınırlı sayıda olması rekabet gücünü zayıflatmakta ve üreticilerin atıkları değerlendirecek alternatif yollar bulamaması nedeni ile atıkların değeri düşürmektedir (Popko ve ark. 2015; Ambrosio de Menezes ve ark.2021)

Sığır süngerimsi ensefalopati (BSE) salgınının ortaya çıkması, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde işlenmiş hayvansal protein kullanımını sınırlamak için bir dizi yasal düzenlemenin getirilmesine yol açmıştır. İngilterede 1988 yılında getirilen ilk yasak sığır beslemede geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünlerin kullanılmasına yönlendirme şeklindeydi. 1994 yılında memelilerden elde edilen et ve kemik ununun koyun, keçi ve sığır beslemede kullanılması yasaklandı. 2001 yılında hayvansal gıda ürünleri üretiminde kullanılan hayvanların beslenmesinde hayvansal protein kullanımı tamamen yasaklandı. Çevrenin korunması ve değerli organik maddelerin israfının önlenmesi göz önüne alındığında, çevre için güvenli ve ekonomik olarak uygulanabilir etkili bir tüy atık yönetimi geliştirmek gerekliliği ortaya çıkmıştır (Popko ve ark. 2015).

Keratinler, çapraz bağlı disülfid köprüleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimleri olan çözünmeyen lifli proteinlerdir. Keratinler esas olarak doğada saç, yün, tüy, tırnak ve omurgalıların diğer epitel örtülerini oluşturan yapılarda bulunur. Sıkıca paketlenmiş süper sarmal polipeptit zincirleri nedeniyle, tripsin, pepsin ve papain gibi yaygın proteazlara dirençlidir (Onifade ve ark. 1998).

Keratin açısından zengin tüy hidrolizatı, terapötik bir dermal yama üretmek için agar, aljinat ve gellan gibi üç farklı mikrobiyal ekzopolisakarit ile birleştirilmiştir. Dermal yamalar, topikal yüzeyi sağlamak için hücre debridmanı, antioksidan, antibakteriyel, antifungal gibi farklı yara iyileştirme özelliklerinin yanı sıra gerilme mukavemeti, su şişmesi, biyolojik olarak

parçalanabilirlik ve gözeneklilik ile daha hızlı yara iyileştirme uygulaması için optimum koşulu sağlamak üzere incelenmiştir ((Wang ve diğerleri, 2017).

Literatürde keratinaz enzimlerinin, çözünmeyen keratin substratlarını parçalama yeteneği gösteren özel bir proteolitik enzim sınıfı olduğu ifede edilmiştir. Bu enzimlerin, diğer uygulamaların yanı sıra keratinli substratların hidrolizi ile ilişkilendirilen birçok potansiyel uygulama nedeniyle son yıllarda önem kazandığı saptanmıştır. Bakteriyel keratinazların çoğunlukla serin proteaz grubunda yer aldıkları, keratin atıklarının hidrolize edilmesi ile keratinli yapıların yem ve gübrelere dönüştürülmesinde oldukça faydalı olduğu bildirilmiştir (Brandelli, A.2008; Zhou ve ark.2020).

Keratin hayvanların kıllarında, tüylerinde, tırnaklarında, yünlerinde ve boynuzlarında bulunan ve hayvan yemi ve gübre üretiminde amino asit kaynağı olarak kullanılabilen, çözünmeyen lifli yapısal bir proteindir. Keratinin hidrolizi yapısındaki disülfid köprüleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler nedeniyle oldukça düşüktür. Keratin eucaryotlarda ubiquitin protezaom yolu ile parçalanmaktadır. Keratinazlar *Bacillus, Streptomyces, Aspergillus, Fervidobacterium, Xanthomonas, Chryseobacterium* ve *Vibrio* türleri tarafından üretilen ve keratini parçalayan ekstrasellüler bir enzimdir. Keratinazlar deri ve kozmetik endüstrisinde sodyum sülfit ve kireç yerine kullanılarak enzimatik tüy giderme ve kaliteli saçların oluşumunda etkili şekilde kullanılmaktadırlar. Tüyden enzimatik amino asit üretimi sırasında yan ürün olarak hidrojen elde edilmektedir (Sihni ve ark.2015).

Tüyler kümes hayvanlarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan yan ürün olarak her yıl büyük miktarlarda üretilmektedirler. Tüyler yetişmiş bir tavuğun canlı ağırlığının yaklaşık %8.5'ini oluşturabilirler. Keratin içeriği yüksek bir protein kaynağıdırlar. Tüylerin erozyon kontrolü, bebek bezi dolgusu, biyolojik olarak parçalanabilen kompozitler, sera endüstrisi, hayvan yemleri, döşeme, sanat eseri, kağıt alternatifleri, hafif yapı malzemeleri, su filtreleme lifleri, kumaş, uçak, otomotiv ve ısı yalıtımı endüstrisinde kullanım alanı vardır. Tüy proteini kolayca parçalanamaz, bu durum sindirilebilirliğini ve hayvan yemi olarak kullanımını etkiler. Bu yüzden tüylerin hidrolizi için etkili, kolay ve ucuz işleme tekniklerinin geliştirilmesi gerekli hale gelmiştir. Birkaç araştırmacı tüylerin kimyasal ve enzimatik hidrolizi ile ilgili araştırmalar yapmışlardır (Oluseun ve ark. 2016; Nnolim NE ve Nwodo UU. 2021)

Tavuk tüyü, balık ununun yerini alabilecek önemli bir ekonomik potansiyele sahip olduğu tespit edilen mezbaha atıklarından biridir. Tavuk tüyleri, %80-90 kuru madde içeren ve soya fasulyesi küspesi (%42,5) ve balık ununun (%66,5) ham protein içeriğini aşan yüksek protein içeriğine sahip olduğundan hayvan yemi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte tavuk tüyünün işlem görmeden %5.8 sindirilebildiği bu nedenle sindirilebilirliği artırmak için hidrolize edilmesi gerektiği saptanmıştır (Nursinatrio and Nugroho, 2019).

Bacillus subtilis SCK6 suşundan izole edilen metalloproteaz kullanılarak enzimin keçi kıllarının uzaklaştırılmasındaki etkisi araştırılmıştır. Enzim %12.5 SDS-PAGE jelinde analiz

edildiğinde moleküler ağırlığının 40.08 kDa olduğu saptanmıştır. Enzim optimum aktivitesini pH 6.5 ve 50°C de göstermiştir. Li^+ ve K^+ enzim aktivitesini kısmen artırmıştır. Bununla birlikte %1 konsantrasyonda Tween 20 (%114) Tween 80 (%131), SDS (%124), ve Triton X-100 (%135) enzim aktivitesini ciddi şekilde artırmıştır. Enzim 5mM EDTA ile tamamen inhibe olurken, 5 mM PMSF ile yaklaşık %54 inhibe olmuştur. Enzim keçi derisindeki kılları 30-35°C aralığında tamamen uzaklaştırmıştır (Tian, ve ark.2019).

Bacillus paralicheniformis MUK3 bakterisinden üretilen keratinaz enziminin, koyun derisinden tüy alma yeteneği nedeniyle deri endüstrisinde vazgeçilmez bir rol oynadığı belirtilmiştir. Tüy giderme sürecinde %100 sonuç verdiği ve tüy giderme sürecinde kimyasalların kullanımının önlenmesine yardımcı olduğu belirtilmiştir. (Santha Kalaikumari ve ark., 2019).

Literatürde, yara iyileşmesinde keratinaz enziminin uygulanmasına ilişkin geleneksel görüş devam ederken, tavuk tüylerinden elde edilen enzim ekstraktları yara iyileştirme tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Wang ve ark., 2017). Tüy keratininin hidrolizi ile elde edilen hidrolizat, yüksek su içeriği nedeniyle yaraya nemli bir ortam sağlayarak, yarayı tedavi etmek için in vivo biyouyumluluk testlerinde kullanılmıştır. Aynı zamanda şişme yeteneğine sahip olup hücre yapışmasını ve doku sızıntısını absorbe ederek, hücre çoğalmasını destekleyen ve oksijenin nüfuz etmesine izin veren gözenekli bir yapı meydana getirmiştir (Jain ve ark. 2016)

. Tüy keratin hidrolizatının insan saçını boyaması ve perma yapmında kullanılması insan keratininden farklı olarak daha kolaydır. Bu nedenle tüy keratinin hidrolizatlarından üretilen hidrojeller, tiyol gruplarında hidrojen peroksit ile çapraz bağlanma reaksiyonu sonucu üretilmiştir. Tavuk tüyünden üretilen keratin hidrolizatlarının, insan saçı keratiniyle karşılaştırıldığında in vivo biyouyumluluk, yara iyileştirme etkisi ve hızlı biyobozunma gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak tüy keratininden elde edilen hidrojeller biyomedikal uygulamalar ve yara iyileşmesi için kullanılabilirler (Bezeus ve ark. 2021).

Bakteriler arasında, *Bacillus* ve *Streptomyces* cinslerine ait türler için keratinolitik aktivite geniş çapta kanıtlanmıştır. Bakterilerden elde edilen keratinolitik enzimler, kirletici olmayan süreçlerin geliştirilmesi yoluyla, kümes hayvanları ve deri endüstrisi kaynaklı keratin içeren atıkların dahil olduğu biyoteknolojik süreçlerde önemli kullanımlara sahip olabilirler. Çözünmeyen tüy keratinleri, enzimatik hidrolizden sonra yem maddelerine, gübrelere, yapıştırıcılara ve filmlere dönüştürülebilir veya nadir amino asitler olan serin, sistein ve prolinin üretiminde kullanılabilirler (Brandelli, A.2008).

Keratinin mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanmasının mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Sistein köprülerinin azalmasının keratin hidrolizi üzerinde önemli bir etkisi olmasına rağmen mevcut araştırmaların proteolitik mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaştığı belirtilmektedir (Brandelli, A.2008).

Şu an hayvan yemi endüstrisi, tarımsal sanayi yan ürünlerinden elde edilen keratin hidrolizatlarının ana tüketicisidir. Tüylerin geri dönüşümü, ucuz ve alternatif bir protein kaynağı

olma potansiyeli nedeniyle hayvan beslenmesinde büyük ilgi gören bir konudur. Keratinin sınırlı besin değerine rağmen, tüy proteininin hem sindirilebilirliği hem de amino asit dengesi mikrobiyal fermantasyonla geliştirilebilir. Keratin açısından zengin atıklar aynı zamanda toprak gübresi olarak da değerlendirilmektedir. Kan unu, toynaklar, boynuz, tüyler, kemikler ve gübre gibi hayvan kökenli çeşitli organik materyaller, yavaş salınımlı azotlu gübreler olarak değerlendirilmektedir. Tüylerin yaklaşık %15 oranında azot içerdiği ve yavaş salınımlı azotlu gübre olarak kullanılma potansiyelinin büyük olduğu belirtilmektedir (Brandelli, 2008).

Enzimatik kıl giderme, tabakhanelerde sülfürün yarattığı sorunu önlemek için giderek daha güvenilir bir alternatif olarak görülüyor. Enzimatik tüy gidermenin avantajları, atık sudaki sülfit içeriğinin azaltılması, iyi kalitede saçın geri kazanılması ve kireç giderme işlemindeki kılların ortadan kaldırılmasıdır. Enzimlerin deri üretiminde ticari kullanım potansiyeli, yüksek verimli ve seçici katalizör olma özelliklerinden dolayı önemlidir. Enzimatik tüy giderme işleminin önemli bir özelliği, tüylerin tamamen alınması ve sülfitin ve tabakhane atık suyundan oluşan ayrışma ürünlerinin minimum düzeyde kullanılması ve bunun sonucunda atık su kalitesinde büyük bir iyileşme olmasıdır. Bu nedenle deri endüstrisindeki kimyasal tüy dökücü ajanların mikroorganizmalar tarafından üretilen proteolitik enzimler ile değiştirilmesinin önemli bir ekonomik ve çevresel etkisi vardır (Brandelli, 2008; Zhang ve ark. 2016a).

Bazı keratinazlar, jelatin ve sentetik substratı hidrolize etmez ve bunların büyükbaş hayvan postlarının tüylerinin alınmasında kullanılması, kolajen hasarına neden olmaz. Keratinazın kozmetik uygulamalarda kullanılması, tıraş kremi gibi tüy dökücü bileşimlerde bir bileşen olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca keratinazlar akne veya sedef hastalığında keratinin ortadan kaldırılması ve insan kallusunun giderilmesi için topikal formülasyonlarda da yararlı olabilir. Son zamanlarda ilaç dağıtımını arttırmak için keratinolitik enzimLerin kullanımı daha fazla araştırılmaktadır. Tırnak hastalıklarının topikal tedavisinin etkinliği genellikle ilaçların tırnak plağının çok düşük geçirgenliği nedeniyle sınırlıdır. *Paecilomyces marquandii*'den elde edilen keratinaz enziminin kullanıldığı ilaç kombinasyonunda, ilacın insan tırnağına nüfuzunu önemli ölçüde artırarak tedaviyi olumlu yönde etkilediği saptanmıştır (Uttangi ve Aruna 2018)

Bacillus subtilis DP1 suşundan izole edilen keratinaz enzimi kozmetik alanında kullanılma potansiyeline sahiptir. Enzim pH 8.0-12.0 ve 20-50ºC aralığında aktivite göstermekle beraber optimum aktivitesini pH 10.0 ve 37ºC de göstermektedir. Ca^{+2} ve Mg+2 enzim aktivitesini artırmıştır. Saflaştırılmış keratinazın moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile 97.4 kDa olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın saflaştırılmış keratinaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, pH 10.0'da ve çeşitli sıcaklıklarda (20–50◦C) incelenmiştir. Enzim, 30-50°C arasındaki geniş sıcaklık aralığında aktif olup optimum aktivitesini 37ºC de göstermiştir. Enzim, 35-50°C arasındaki sıcaklıklarda 8 saat boyunca stabil kalmış ve bu sıcaklıklarda maksimum aktivitenin %20'sinden azı kaybolmuştur. 50°C'nin üzerinde, enzim aktivitesi neredeyse inaktive olmuştur (Sanghvi ve ark. 2016)

Birkaç *Bacillus* suşunda 20-30 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip enzim elde edilmiştir. *Bacillus pumilus'tan* 34 ve 65 kDa moleküler ağırlığa sahip keratinaz izole edildiği bildirilmiştir (Pillai ve Archana, 2008: Sanghvi ve ark. 2016).

Keratinazlar (EC no. 3.4.99.11), bir grup proteaz enzimi olup, atık su arıtımı sırasında kanalizasyon sistemindeki tıkanıklıkları temizlemek tüy, saç, yün, kollajen ve kazeini hidrolize etmek için önemlidir. Çözünmeyen tüy keratinlerinin enzimatik hidrolizden sonra açığa çıkan serin, sistein ve prolin amino asitleri hayvan yemi, gübre ve yapıştırıcıların üretimi için kullanılır. Proteaz enzimleri, dünya çapındaki satışların yaklaşık %40'ını kapsamakta olup endüstriyel talep artışı mikrobiyal proteazlara olan ilgiyi giderek artırmaktadır (Gupta and Ramnani., 2006).

Farklı mikrobiyal kaynaklar arasında özellikle *Bacillus* cinsine ait bakteriler iyi proteaz üreticileri olarak tanınırlar ve büyük hacımlı ticari boyutlarda submers fermentasyon tekniği ile proteaz üreticisi olarak kullanılırlar *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis'in* birkaç suşu ile *B. pumilus* gibi türler de keratinaz üretme yeteneğine sahiptirler (Kim ve ark., 2001). *Bacillus* keratinazları, çözünmeyen keratinöz substratların hidrolizindeki etkinlikleri nedeniyle ilgi çekicidir. Keratinolitik mikroorganizmalar üzerine yapılan araştırmalar, esas olarak keratin içeren yan ürünlerin hidrolizini içeren biyoteknolojik uygulamalara odaklanmıştır (Giongo ve ark., 2007).

Genel olarak, mikrobiyal keratinazlar 30–80ºC aralığında optimum sıcaklık değerine, nötürr ila alkali pH aralığında optimum pH'a sahiptir. Daha önceki raporlarda bazı *Bacillus* sp. türlerinin (*B. Subtilis* MTCC (9102) kaynaklı keratinaz gibi), 40°C ve pH 6.0'da maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *B. subtilis* KS-1 60°C'de ve pH 7.0. *Streptomycessp* kaynaklı keratinaz. SK1-02, 70ºC ve pH 10.0'da optimal aktivite göstermiştir (Letourneau, ve ark. 1998). Bu nedenle, mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler esas olarak endüstriyel işlemede kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta meydana gelen inaktivasyon, peptit zincirinin hidrolizi, amino asitlerin yok edilmesi veya agregasyondan kaynaklanan yanlış konformasyon nedeniyle olabilir. Bu aynı zamanda enzimin termolabil yapısını da gösterir (Kumar ve ark.2008; Wang ve ark.2011).

Bacillus sp N1 suşu 20-45°C ve pH 7,0-9,0 arasında üreyebilmektedir. Suş optimum keratinaz üretimini, pH 8.0 ve 37°C gerçekleştirmiştir. Deneysel koşullar altında optimum keratinaz aktivitesi ikinci günde gerçekleşmiştir. Beşinci günde %50'den fazla ağırlık kaybı gözlenmiştir. Ağırlık kaybı birinci günden üçüncü güne kadar keskin bir şekilde arttı ve üçüncü günden sonra yavaşlamıştır. Bunun nedeni büyük olasılıkla ortamdaki mikro besinlerin azalması nedeniyle hücre konsantrasyonunun azalması sonucu enzim konsantrasyonunun düşmesidir (Tyas and Nilamsari, 2019).

Bacillus sp. N1 suşundan üretilen keratinaz enzimi kullanılarak tüy keratini hidrolize edilmiştir. Hidrolizasyon sonunda 17 amino asit ortaya çıkarken üç esansiyel amino asit saptanmamaıştır. Hidroliz işlemi sonunda L-asparajin, L-histidin ve L-serini az miktarda buna karşılık L-glutamik asit ve L-aspartik asit yüksek miktarda ortaya çıkmıştır. Hidrolizatta L-aspartic acid 79.80, L-glutamic acid 06.40, L-asparagine <0.04, L-glutamine 65.60, L-threoine 69.60, L-

glycine 60.20, L-arginine 54.20, L-tyrosine 64.40, L-tryptophane and L-Methionine 8.60, L-valine 26.40, L-phenylalanine, 29.80, L-isoleucine 18.80, L-lysine 51.60, L-histidine + L-serine <0.01 µg/mL amino asit açığa çıktığı belirtilmiştir (Wang ve ark.2006; Tyas and Nilamsari, 2019).

Spesifik olmayan proteolitik enzimler tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Kronik yaralarda, yanıklarda ve ülserlerde aşırı kollajen birikimi sonucu nekrotik bağ dokusu oluşumuna bağlı (lifli deri dönüşümLeri, yara izleri ve darlıklar gibi) çeşitli bozukluklar meydana gelir. Bu bozuklukların düzeltilmesinde spesifik kollajenolitik etki gösteren kollajenaz enzimlerinin kullanılması önerilmektedir.

Yaklaşık 60 yıldan bu yana tıpta *Clostridium hystolyticium* bakterisinden elde edilen kollajenaz enzimi yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte bitki ve farklı bakterilere ait kollajenaz enzimleri ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Kollajenaz enzimleri özellikleri nedeni ile yeni ve etkili ilaç bileşenlerinin üretilmesinde önerilmektedirler.

Extrasellüler konnektif doku metabolizmasının bozulması sonucu cildde keloid skarların gelişmesine, iç organların fibrozu ve sklerozuna (karaciğer, böbrekler, akciğerler ve kalp), kontraktürlerin oluşumuna, ankiloz ve tübüler organların lümen bölgelerinin oklüzyonlarına neden olurlar (Anatoly ve ark., 2019).

Kollajen, bağ dokularındaki hücre dışı matriste bulunan ana çözünmeyen lifli protein sınıfıdır. Üçlü heliksel konformasyonu ve hidroksiprolin yapıların miktar, doğada bulunan diğer proteinlerden çok daha fazla aminoasit içermeleri nedeni ile kollajen yapılarını hidroliz eden proteazlar sınırlı sayıdadır. Kollajenolitik proteazlar bunlara en güzel örnektir (Harrington, DJ., 1996).

Kollajenolitik proteazlar tıp ve endüstriyel faaliyetlerde oldukça önemli olup, bu nedenle çeşitli tedavi ve endüstriyel uygulamaları gerçekleştirilmektedir.

Kollajenaz enzimleri gıda endüstrisinde fazlaca kullanılmıştır Kollajen peptitlerin ağız yolu ile kullanılmasının osteoporozu önlediği, mideyi ülsere karşı koruduğu, gevşemeyi desteklediği, hipertansiyonla savaştığı ve ciltte metabolizmayı uyardığı deneysel olarak gösterilmiştir (Hamilton ve Guddet., 2007).

Kollajenaz enzimi ile çeşitli substratlardan elde edilen kollajen peptidler kozmetik alanında kullanılmaktadırlar. Ayrıca kollajenaz enzimleri deri endüstrisinde derinin boyanmasını kolaylaştıran, toksik olmayan ve çevre dostu biyokatalizörler olarak da kullanılabilirler.

Bunun yanı sıra kollajenolitik proteaz enzimleri bitki kök zararlısı nematodların dış tabakasını oluşturan kutikula tabakasının parçalanmasını sağladığı için tarımsal mücadelede kimyasalların yerine biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecek çok etkili enzimLerdir (Sela ve ak. 1998).

Kollajenolitik proteazların kollajen yapılarının hidrolizi ve kollajen türevlerinin tıpta, tarımda, gıda takviyelerinde, kozmetikte ve deri endüstrisinde önemli oranda kullanılması sözkonusudu (Lorena ve ark., 2015)..

Kollajenaz enzimi gr + ve gr – bakterilerden asidik ve alkali koşullarda izole edilmiştir. *Bacillus cereus* CNA1 kollajenaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.5, *Klebsiella pneumoniae* CNL3 kollejenaz enzimi ise pH 6.0 da göstermiştir. Her iki suştan elde eilen enzimin optimum aktivite sıcaklığın 37ºC olduğu bildirilmiştir. Her iki suştan elde edilen kollajenaz enziminin termal ve pH stabilitelerinin 37ºC ve sırası ile pH 5.0 ve 7.0 olduğu saptanmıştır. Her iki kollajenaz enzimide somon balığı derisinden kollajen ekstraksiyonunda kullanılmıştır. *Bacillus cereus* CNA1 enziminin ekstraksiyon verimliliği %54.6, *Klebsiella pneumoniae* CNL3 enziminin %53 olarak gerçekleşmiştir (Suphatharaprateep,W., ve ark. 2011).

Bacillus sp. MO-1 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi kollajen tip-I ve tip-IV ile jelatine karşı yüksek hidroliz aktivitesi göstermiştir. Enzim 94 kDa ağırlığında aktivite bandı oluşturmuştur.. Enzim serin proteaz özelliğindedir. Enzim optimum aktivitesini 60ºC de göstermiştir. Enzim pH 4.8-11.5 aralığında aktivite gösterirken optimum aktivitesini pH 7.1–9.3 aralığında göstermiştir. Enzim aktivitesi Li^{+},Na^{+}, K^{+}, Cs^{+}, $Mg^{2+,}$ $Ca^{2+,}$ $Sr^{2+,}$ $Ba^{2+,}$ and Mn^{2+}ile etkilenmezken Fe^{+2} ile tamamen inhibe olmuştur.Enzim sırası ile $Co^{2+,}$ $Ni^{2+,}$ $Cu^{2+,}$ $Zn^{2+,}$ ve Sn^{2+} ile 23, 50, 79, 78, ve 86%, inhibe olmuştur. Enzim EDTA ile %81, EGTA ile %80 inhibe olmuştur. Enzim PMSF ile %97 inhibe olmuştur (Okomato,W., ve ark. 2001; Su ve ark.2020b)

Lysinibacillus sphaericus VN3 suşundan kollajenaz enzimi izole edilmiştir. Enzim Cu^{+2} ile güçlü şekilde inhibe olurken, Zn^{+2} aktiviteyi güçlü şekilde aktive etmiştir. Kollajenaz üreten suş indol, citrat, Voges prouskauer negatif, metil kırmızısı ve katalaz pozitif özellik göstermiştir. Enzim pH 7.0 ve 37ºC de optimum aktivite göstermiştir. Enzim nötral proteaz olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi pH 6.0 da aktivitesini %60, pH 8.0 de %70 kaybetmiştir. Enzim Zn^{+2} ile %123 aktivite göstermiştir. Enzimin moleküler büyüklüğü 110 kDa bulunmuştur (Hoa Bach, ve ark. 2020)

Literatürde, Endonezyadan izole edilen bakteriyel kollajenaz enziminin sığır tendon kollajeninin işlenmesinde kullanıldığı, moleküler ağırlığının 72 kDa, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 20ºC ve pH ortamının 7.5 olduğu belirtilmiştir (Ekram and Prasetyo., 2016).

Bacillus KM369985 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum üretiminin 37ºC, %1.5 substrat konsantrasyonu ve pH 7.5 te gerçekleştiği bulunmuştur. Enzim üretimi %1 Hg^{2+}, EDTA ve β-mercaptoethanol konsantrasyonunda inhibe olurken, $Fe^{2+,}$ Zn^{2+} ve DMSO, üretimi indüklemiştir. İzole edilen enzim casein, gelatin, ve keratini hidroliz etme yeteneğine sahiptir. Enzim üretiminin optimum 72’ inci saatte gerçekleşmiştir (Savita ve Arachana,, 2015).

Bacillus cereus MBL13 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 38 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Enzimin amino asit analizinde yüksek miktarda asparagine, lysine ve serin içerdiği saptanmıştır. Enzim optimum aktivitesini pH 8.0 ve 40ºC de göstermiştir. Enzimin aktivite analizlerinde Tip-I kollajen kullanılmıştır. Tip-I kollajen kemik dokusunun en önemli bileşeni olup, kemiğin %85-90 ını oluşturan proteindir. Aktivite analizinde enzim aktivitesinin indüklendiği ve Ca^{+2} %130, Zn^{+2} %110, ve Mg+2 ile %107 aktivite değerine ulaşıldığı belirtilmiştir. EDTA ve

EGTA'nın 2 ve 5mM konsantrasyonu enzim aktivitesini tamamen inhibi etmiştir. PMSF ile 2 mM da %98, 5 mM da %93 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim metalloproteaz olarak adlandırılmıştır (Liu, ve ark. 2010; Nurdiawati ve ark. 2017).

Bacillus subtilis CN2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktivitesini pH 10.0 ve 50°C gösterdiği saptanmıştır. Enzim pH 7.0-11.0 ve 30-60°C sıcaklık aralıklarında yüksek aktivite göstermiştir. Enzimin moleküler ağırlı 27 kDa olan tek aktivite bandından oluşmaktadır. Kollajenaz enzimi PMSF ile inhibe olurken, SDS ye dirnçlilik göstermiştir. Kollajenaz enziminin PMSF ile inhibe olması enzimin serin proteaz özellikte olduğunu göstermektedir. Enzim aktivitesi KCL^{+}, $NaCL^{+}$ ve $LiCL^{+}$ ile indüklenmiş ve sırası ile %135, %118 ve %103 aktivite elde edilmiştir (Uchida, ve ark. 2004).

Bacillus cereus suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 4-40°C aralığında termal stabilite gösterdiği (Sela, Ş., ve ark. 1998) ve enziminin kök nematodu *Meloidogyne javanica* larvasının kütikul proteinlerini parçalayarak etki gösterdiği saptanmıştır. Enzimin %10 SDS PAGE analizinde moleküler ağırlığının 42.8 kDa olduğu bulunmuştur. Enzim pH 5.4–8.2 aralığında aktivite göstermekte olup, 4-40°C aralığında termal stabilite göstermiştir (Sela ve ark. 1998).

Nocardiopsis dassonvillei NRC2aza suşundan izole edilen kollajenaz enzimi yaraların tedavisinde kullanılmıştır. İzole edilen enzim 150 kDa moleküler ağırlığa sahip olup, metallo kollajenaz olarak tanımlanmıştır. Enzim pH 7.0-8.5 ve 40-55°C aralığında aktif olmakla birlikte optimum aktivitesini pH 8.0 ve 60°C de göstermiştir.

Enzim aktivitesi Mg^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Na+, K+ and Ba^{+2}, ile aktive olurken Mn^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2} Ag^{+} iyonları kısmen inhibe etmiştir. Enzimin bölgesel uygulamasında 25-50 U/ml enzimin kullanılmış ve cilt yarasınının iyileşmesini ciddi şekilde hızlandırmıştır. İyileşme, 72 saatlik uygulama sonunda 25U/mL kollajenaz enzimi kullanıldığında hücre gelişimi %112.1, 50U/mL kullanıldığında ise %122.4 hızlanmıştır. Bununla birlikte aynı konsantrasyonlarda 24 saatlik uygulama sonunda önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır.

Kollajenaz enzimi 45°C de bir saatlik inkübasyon sonunda aktiviesini %100 korumuştur. Sıcaklık 50-55°C ye yükseltildiğinde stabilite azalmıştır. Ön inkübasyon sıcaklığı 60-65°C ye yükseltildiğinde enzim stabilitesi sırası ile %39 ve %36 değerlerine düşmüştür. Enzim aktivitesi 5 mM Mg^{+2} ile %160, Ba^{+2} ile %13 artmıştır. 10 mM K^{+} ile enzim aktivitesi %169 değerine ulaşmıştır. 10 mM Ca^{+2} enzim aktivitesini %130 artırırken 5 mM Ca^{+2} aktivite %152 düzeyine ulaşmıştır (Villa ve ark.2013; Abood ve ark. 2018).

Kollajenolitik proteazlar tıp ve endüstriyel faaliyetlerde oldukça önemli olup, bu nedenle çeşitli tedavi ve endüstriyel uygulamalar gerçekleştirilmektedir. Kollajenaz enzimleri gıda endüstrisinde kullanılmıştır Kollajen peptitlerin ağız yolu ile verilmesinin osteoporozu önlediği, mide ülserine karşı koruduğu, gevşemeyi desteklediği, hipertansiyonla savaştığı ve ciltte metabolizmayı uyardığı, deneysel olarak gösterilmiştir (Kim ve ark., 2007; Gupta ve Ramnani.,2006).

Kollajenolitik enzimler, kollajen için oldukça spesifiktir olup kozmetik, tıp ve gıdatemelli uygulamaları içeren bir çok alanda pratikte ilgi odağı olmuştur. Bu enzimlerin en yaygın kullanımları tıp alanında olup, yanıkları ve ülserleri tedavi etmek, yara dokusunu ortadan kaldırmak ve belirli organların başarılı bir şekilde nakledilmesinde gerçekleştirilmiştir (Chauhan ve ark.,2017).

Gıda endüstrileri, kozmetik endüstrileri, tabakhane ve et dahil olmak üzere çok çeşitli endüstriyel kollajenaz uygulamaları vardır. Ancak kollajenazın en önemli uygulamaları terapötikler alanındadır (Chauhan ve ark.,2017 Gupta ve Ramnani., 2006).

Hayvan derisinin enzim kullanılarak tüylerinin alınması için en uygun koşulları optimize etmek amacı ile, alkolle sterilize edilmiş bir hayvan derisi parçası (~10 g), içerisinde 67.2 U/mL ham enzim bulunan 50 mL steril Na karbonat tampon çözeltisine konularak (pH 9) inkübe edilmiştir. Uygulama için 23 saat 29°C 50 rpm hızda çalkalama yapılmıştır; İşlem sonunda kılların gevşetilmesi için deri parçaları parmaklarla nazikçe kazınmıştır. Kısmi saflaştırılan 39.644 U/g enzim kullanıldığında sığır derisinin 2 saatlik inkübasyon sonunda tam deepilasyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir (Azza, M., 2013; Elhamdi ve ark. 2025).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak 10°C ve 30°C ortam sıcaklıklığına sahip mevsimlerde farklı doğal ortamlardan alınan (Tuz gölü su ve sedimenti, Tarsus Ardıçlı mahallesi tavuk üretim tesisleri, tavuk atıkları ve koyun yünü atıkları, Karataş deniz sedimenti, saklı göl sedimenti) örnekler kullanılmıştır. Bakteri izolasyonu, enzim üretimi ve karakterizasyon çalışmalarında Merck ve Sigma kimyasalları kullanılmıştır.

Bu çalışmada ekipman olarak; Spektrofotometre (Shimadzu), Karıstırıcı (Elektro-Mag), pH Metre, Etüv, Otoklav, Blender, Hassas Terazi, Soğutmalı Santrifuj, Su Banyosu, Yağ banyosu, soğutmalı ve standart çalkalamalı Inkubatorler, VİTEK-2 sitemi, Ultraviyole Lambası, HPLC ve TLC sistemi, PCR cihazı, Elektroforez sistemleri, tavuk tüyü, tavuk tüyü unu ve kollajen olarak kemik unu (tip-1 kollajen) kullanılmıştır.

Enzim üretiminde kullanılan bakteri suşlarının moleküler tanımlamaları hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Besiyerleri

N1 Besiyeri

Toprak ve su örneklerinden bakteri suşlarının izolasyonu aşamasında sıvı ve katı besiyeri şeklinde kullanılmıştır. Örnekler sıvı N1 besiyerinde 6 saatlik ön kültürleri yapıldıktan sonra ısı şoku uygulanıp tek koloni elde edilecek şekilde N1 agar ortamına aşılanarak bakteri üretimi gerçekleştirip koloni morfolojilerine göre bakterilerin izolasyonu ve stok şeklinde saklanmaları için kullanılmıştır. (Anonymous, 1978)

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

Kollajenaz Besiyeri

Farklı ortamlardan alınan (deniz su ve sedimenti, tuz gölü, keçi inciği ve derisi atığı) örneklerden kollajenaz enzim üreticisi bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır. Besiyerinin hazırlanmasında %50 yaşlandırılmış deniz suyu ve %50 distile su kullanılmıştır (Voget ve ark.2006).

Bileşimi	(g/L)
Jelatin	20 g/L
NaCL	0.1 g/L
Pepton	5 g/L
KH_2PO_4	0.5 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g/L
Agar	15 g/L
Distile su	500 mL
Yaşlanmış deniz suyu	500 mL
pH	7.0

Tavuk Tüyü Unlu Katı Besiyeri

İzole edilen suşların keratinaz enzimi üretme yeteneklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Besiyeri bileşenleri uygun miktarda tartılarak karıştırılmış, besiyeri pH'sı alkali ve nötral koşullara ayarlanarak otaklavda steril edildikten sonra katı besiyeri şeklinde petrilere dökülerek analizlerde kullanılmıştır. Besiyeri pH'sının alkali koşullara ayarlanması için 2 ve 3N NaOH stok çözeltileri kullanılmıştır. (Bin ve ark, 2013).

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

Tavuk Tüyü Unlu Sıvı Besiyeri

İzole edilen ve tavuk tüylü katı besiyerinde keratinaz pozitif özellik gösteren suşlarda keratinolitik proteaz enzim üretiminin gerçekleştirilmesi amacı ile kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 2 ve 3N NaOH çozeltisi ile alkali koşullara ayarlanmıştır (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

Tavuk Tüyü Ununun Hazırlanması

İki farklı şekilde hazırlanmıştır. Birinci yöntemde tavuk tüyü unu musluk suyu ile iyice yıkanmış ve kurutulduktan sonra ağzı kapaklı şişeye konulmuştur. 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 solventlerin uzaklaştırılması için 4 defa çeşme suyunda ve son olarak distile su ile yıkanmıştır. Hazırlanan tüy unu yıkama işleminden sonra güneş ışığında kurumaya bırakılmıştır.

İkinci yöntemde beyaz tavuk tüyleri 1-2 cm boyutlarında parçalandıktan sonra musluk suyu ile yıkanmış ve kurutularak şişeye konulmuştur. Parçalanmış tüy materyaline 1:1 oranında chloroform:metanol çözeltisi eklenerek 48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İşlemin sonunda çözelti süzülmüş ve tüy parçalarına 4:1:3 oranında chloroform:aseton:metanol eklenerek yeniden 48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler süzüldükten sonra tüy parçaları 4 kez çeşme suyu ve bir kezde distile su ile yıkanarak çözeltiler tamamen uzaklaştırılmıştır. Tüyler güneşte kurutulduktan sonra dövülerek un haline getirilmiştir (Saibabu ve ark., 2013).

Skim-milk Besiyeri

Farklı ortamlardan alınan örneklerden izole edilerek N1 agar stokları hazırlanan suşların proteaz üretme (süt proteinli ortamda) yeteneklerinin saptanması amacı ile kullanılmıştır. Bu besiyeri aynı zamanda ön tanılama amaçlı olarak suşların farklı pH ve sıcaklıklarda proteaz aktivitelerinin saptanması için kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı suşların taranması sırasında HCL ve NaOH kullanılarak pH 5-13 aralığında farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Besiyerinin hazırlanması sırasında skimmil ayrı olarak hazırlanıp otoklav edilmeden önce karıştırıcıda iyice çözülerek steril edilmiş ve besiyerinin diğer bileşenlerinin bulunduğu ortama steril koşullarda sonradan karıştırılarak kullanıma hazır besiyeri şekline getirilmiştir. (Arikan 2008)

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

3.2. Kullanılan Çözeltiler

3.2.1. Aktivite Analizlerinde Kullanılacak Keratinin Hazırlanması

10 g tavuk tüyü unu 500 mL DMSO (Dimethyl sulfoxide) ile 1000 mL'lik şise içerisinde karıştırılmıştır ve 120°C'de 20 dk otoklav edilmiştir. Otoklavlan işleminden sonra Tüy unu ve DMSO karışımı soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan karışımın üzerine - 20°C'de soğutulmuş 1000 mL aseton eklenmiş ve - 20°C'de 2 saat presipitasyona bırakılmıştır. Karışım a soğutmalı santrifüjde 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen çökelti birkaç defa distile suda yıkanmış ve kurutulmuştur(Saibabu ve ark., 2013).

3.2.2. EMS (Etil Metan Sülfonat)

Mutasyon yapmak için kullanılmıştır. EMS (Sigma, M0880). (Mukherjee ve ark., 2011).

3.3. Tampon Çözeltiler

3.3.1. Sodyum-Fosfat Tamponu

Çizelge 3.1. 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

Sodyum fosfat tampon çözeltisi keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin pH 6.0-8.0 aralığındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de verilen stok tampon çözeltileri ve hacimleri belirtilen miktarlarda karıştırılarak, son hacım 200 mL olacak şekilde distile su eklenip istenilen pH değerine sahip tampon çözeltiler elde edilmiştir (Arikan, 2008).

3.3.2. Glisin-NaOH Tamponu

Glisin-NaOH tampon çözeltisi keratinaz ve kollajenaz enzimLerinin pH 8.5-10.5 aralığındaki enzim aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de verilen stok tampon çözeltileri ve hacimleri belirtilen miktarlarda karıştırılarak, son hacım 200 mL olacak şekilde distile su eklenip istenilen pH değerine sahip tampon çözeltiler elde edilmiştir (Arikan, 2008).

Çizelge 3.2. 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

3.3.3. Borax-NaOH Tamponu

Borax-NaOH tampon çözeltisi keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin pH 11.0-13.0 aralığındaki enzim aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. 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 ve ark., 2012).

Çizelge 3.3. Borax-NaOH Tamponu

pH	0,05M Borax (mL)	0,2M-3 M NaOH (mL)	Distile Su (mL)
11.0	50	X	X
11.5	50	X	X
12.0	50	X	X
12.5	50	X	X
13	50	X	X

3.4. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Solüsyonlar

3.4.1. Solüsyon A

%29.2 Akrilamid

%0.8 Bisakrilamid

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.

3.4.2. Solüsyon B

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

3.4.3. Solüsyon C

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

3.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat) (%10)

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

3.4.5. Elektroforez Tamponu (pH 8.3)

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

3.4.6. 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

3.4.7. Boyayı Geri Alma Solüsyonu

Methanol	100 mL
Asetikasit	100 mL
Distile Su	800 mL

3.4.8. Renatürasyon Solüsyonu (%2.5)

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

3.4.9. 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

3.4.10. SDS-PAGE Zimogram Analizlerinde Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları

Solüsyon I: 50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) ve %40 oranında izopropanol eklenerek hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon II: 50 mM Na_2HPO_4 ile 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon III: 50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 5 mM β-merkaptoetanol ve 1 mM EDTA'nın bileşiminden oluşmaktadır (Burhan ve ark, 2003).

3.4.11. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

3.4.12. 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 (Caf ve ark., 2012; Caf 2015).

3.4.13. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25)

Ninhidrin	0.25 g
Aseton	(100 mL'ye tamamlanmıştır)

3.4.14. 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.

3.4.15. Voges Proskauer Test Çözeltisi

Ayıraç 1	Miktar	Ayıraç 2	Miktar
A-Naftol	5 g	KOH	10 g
Etanol	100 mL	Distile su	100 mL

3.4.16. Lowry Metodunda Kullanılan Solüsyonlar

A Solüsyonu

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

B Solüsyonu

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

C Solüsyonu

A Solüsyonu	1 ml
B Solüsyonu	50 ml

D Solüsyonu

Folin-Ciocalteu Ayracı	10 ml
Distile Su	10 ml

3.5. Metod

Cold (soğukta aktif) ve mezofilik alkaline, nötral keratinaz ve kollajenaz enzim üreticilerinin doğadan izolasyonundan başlayarak seçilen suşlardan üretilen enzimlerin farklı biyoteknolojik alanlardaki uygulamalarına kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, aşağıdaki başlıklar altında toplanan yöntemler kullanılmıştır.

3.5.1. Keratinaz ve Kollajenaz Üreticisi Doğal Halofilik Mezofil, Cold, Alkaline ve Nötral *Bacillus* sp. İzolasyonu

Türkiyenin farklı fiziksel ve kimyasal koşullara sahip bölgelerinden alınan toprak, su ve sediment örnekleri 1'er gram/mL miktarlarda 5 mL alkalin ve nötral N1 besiyerine ekim yapılarak 10 ve 37ºC'de bir gece inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Örnekler Tuz gölü, saklı göl (tuzlu ve tatlı su gölleri), Tarsus Ardıçlı köyü tavuk dışkısı depolama alanlarından (orman, bahçe ve kireçli topraklar) farklı iklim koşullarında (10-30ºC) ve Adana Karataş deniz suyu ve sedimentinden (10-30ºC) alınmıştır.

Gram-pozitif sporlu bakteri olan *Bacillus* sp. örneklerini izole etmek için 80ºC'de 10 dakika ısı şoku uygulanmıştır (Arıkan, 2008). Örnekler ısısal ön işlemden sonra, tek koloni elde edebilmek için steril distile su ile seri sulandırma (10^{-5}-10^{-6}) yapılarak, pH'sı 7.0 ve 9.0 olan N1

agar besiyerine yayma metoduyla ekim yapılmış, 10 ve 30ºC de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Arıkan 2008).

İnkübasyon sonunda koloni morfolojilerine göre *Bacillus* sp. oldukları değerlendirilen suşlar N1 agar besiyerine çizgi şeklinde ekim yapılarak 10 ve 30ºC de inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen suşlar sonraki aşamalarda kullanılmak üzere stok kültür şeklinde +4C de saklanmışlardır.

3.5.2. Keratinaz ve Kollajenaz Üreten Suşların Katı Besiyerinde Enzim Aktivitelerinin Saptanması

Koloni morfolojilerine göre seçilen *Bacillus* sp olarak adlandırılan suşlar pH'sı 9.0 ve 7.0 ye ayarlanmış skimmilk agar (10 gr pepton, 3 gr Et özütü, 5 gr NaCl, 11 gr Skimmilk, 15 gr Agar ve 1000 mL distile su) besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 10 ve 30°C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 10°C seçildiği koşullarda 72-96 saat, 30°C seçildiği koşullarda 40 saat inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Çizgi ekim bölgesinde meydana gelen hidroliz zonu, pozitif olarak değerlendirilmiştir (Arikan, 2008).

Skimmilk besiyerlerinde pozitif sonuç veren örnekler tavuk tüyü unu içeren katı besiyerlerine (g/L de tavuk tüyü 10, $MgSO_4x7H_2O$ 0.2, K_2HPO_4 1.0, $CaCl_2$ 0.1, KH_2PO_4 0.4, agar 15 ve distile su 1000 mL) çizgi şeklinde aşılanarak 10 ve 30°C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 10°C seçildiği koşullarda 72-96 saat, 30°C seçildiği koşullarda 40 saat inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Çizgi ekim bölgesinde meydana gelen hidroliz zonu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Caf, 2015).

Kollajenaz enzim üreticilerinin izolasyonunda yaşlandırılmış deniz suyu ile hazırlanmış jelatinli besiyeri kullanılmıştır (20 g gelatin, 0.1 g NaCl, 5 g peptone, 0.5 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 15 g agar, 500 mL yaşlanmış deniz suyu ve 500 mL distile su). Hazırlanan besiyerine çizgi şeklinde aşılanan örnekler 10 ve 30°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sıcaklığının 10°C seçildiği koşullarda 72-96 saat, 30°C seçildiği koşullarda 40 saat inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerlerine %33 TCA çözeltisi dökülmüş ve hidroliz sonu oluşturan suşlar kollajenaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Joshi, 2010; Guatam ve Azmi, 2017).

3.5.3. Bakterilerin Katı Besiyerinde Optimum Ürediği ve Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması

Alkalin ve nötral keratinaz üreten bakterilerin ürediği ve enzim sentezinin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralığının saptanması için pozitif olarak değerlendirilen suşlar pH 6.0-12.0 değerlerinde hazırlanmış tavuk tüyü unlu katı besiyerlerine çizgi şeklinde ekim yapılarak, mezofiller (20-60ºC), cold örnekler (0-40ºC) lerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni ve zon çapları ölçülerek üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Voget ve ark.2006).

Alkalin ve nötral kollajenaz üreten bakterilerin ürediği ve enzim sentezlerinin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralığının saptanması için izole edilen suşlar pH'sı 6.0-12.0 aralığında jelatinli katı besiyerlerine çizgi şeklinde ekim yapılarak mezofiller (20-60ºC), coldlar (0-40ºC) lerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni ve zon çapları ölçülerek üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Voget ve ark.2006).

3.5.4. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimi Sentezleyen Suşlarının Tanımlama Çalışmaları

Çalışmada hedeflenen amaçlar doğrultusundaizole edilen ve alkali, nötral, cold ve mezofil özellikte enzim üreterek, en geniş keratinaz ve kollajenaz aktivite zonu oluşturan *Bacillus* sp. suşlarının morfolojik ve moleküler tanımLanma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.5.5. Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama

Seçilen bakteri örneklerinin tanımlanması için gram boyama, hareketlilik, spor oluşumu gibi morfolojisi testlerinin yanı sıra, katalaz, sitrat, metil kırmızısı, gibi biyokimyasal testler yapılmıştır. Ön tanılama işlemlerinden sonra VİTEK-2 sistemi kullanılarak biyokimyasal tanımlama gerçekleştirilmiştir (Aygan, 2008).

Gram Boyama

N1 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 işlemLeri ile boyama gerçekleştirilmiştir. Boyanan preparatlar immersiyon objektifi ile mikroskopta analiz edilmiştir (Turus, 2011).

Katalaz Testi

N1 agar besiyerinde çizgi şeklinde üretilen 1 gecelik taze bakteri kültürüne, 1 mL %3'lük H_2O_2 damLatıp ekim çizgisinde gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığına bakılarak değerlendirme yapılmıştır (Arikan 2008).

Sitrat Testi

N1 agar besiyerinde üreyen bakteri örneğinden 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 (Aygan, 2008).

Metil Kırmızısı Testi

N1 agar besiyerinde üreyen bakteri kolonisinden alınan örnek 5 mL Glukoz-Fosfat sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 2-3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpe, 5mL

bakteri kültürüne 3-5 damLa metil kırmızısı ayıracı ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak kırmızı renk oluşup oluşmamasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Voges Proskaver Testi

N1 agar besiyerinde üretilen bakteri kolonisinden özeyle alınarak Clark-Lubs besiyerine ekim yapılmış, 37°C'de 1 gece inkübasyon gerçekleştirildikten sonra tüpler hafif karıştırılarak 600 µL/mL Ayraç I ve 200 µL/mL Ayraç II damLatılarak 15-20 dk bekletilerek kırmızı renk oluşununa göre değerlendirilmiştir (Clark ve Lubs, 1915).

3.5.6. Keratinaz ve Kollagenaz Pozitif Suşların Biyokimyasal Tanımlanması

En geniş aktivite zonu oluşturan toplam 45 *Bacillus* sp. suşu seçilerek koloni morfolojisi, gram boyama, spor oluşturma ve Vitek-2 sistemi kullanılarak biyokimyasal tanımLama yapılmıştır.

***Bacillus* sp. suşlarının 16S moleküler tanılaması**

İzole edilen bakteriler 16S moleküler tanılama için üretilip tek koloni düşecek şekilde LB besiyerinde üretilmişlerdir.

Tanılamada kullanılan üniversal primerler dizayn edilmiştir. Primer olarak aşağıda verilen bakteri ve archeaya spesifik ayrı ayrı forvard, bakteri ve archeaya spesifik ortak revers primer sentezlettirilmiştir.

Bact F (Forward)	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
Arch F (Forward)	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA
AIIR (Reverse)	GGTTACCTTGTTACGACTT

Primerlerin üretilmesinden sonra genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Bakteri genomik DNA izolasyon kiti için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (K182002, ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır. Genomik DNA izole etmek amacı ile bir öze yardımı ile alınan tek koloniler 50 mL falkon tüp içerisinde bulunan 10 mL sıvı besi ortamına inoküle edilmiştir. Ekimi yapılan bakteriler uygun sıcaklıkta soğutmalı çalkamalı inkübatörlerde 220 rpm'de 1-2 gün süre ile bakterilerin OD_{600} 0,8 'e gelene kadar büyütülmüştür. Büyüyen bakteriler 5000 x g'de 4 °C'de 5 dakika süre santrifüj yardımı ile çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 mL sıvı besi ortamı ile çözülmüş ve 500 µL bakteri kültürü 1,5 mL'lik ependorf tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen kültür firmanın önermiş olduğu protokole göre yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarı SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.4. Mikroorganizmalardan izole edilen gDNA miktar ve saflığı

Bakteri Adı	dsDNA concentration in µg/mL	Ratio A260/A280	Ratio A260/A230
1	166,274	1,77	1,85
2	94,839	2,37	1,89
3	211,214	1,85	1,87
4	364,399	1,97	2,18
5	51,614	1,93	1,67
6	392,999	1,9	1,73
7	40,324	1,77	1,89
8	110,114	1,81	1,64
9	123,264	1,74	1,89
10	244,544	1,91	1,86
11	115,309	1,92	1,86
12	69,979	1,95	1,89
13	853,399	1,95	2,4
14	142,464	1,73	1,81
15	317,604	1,92	2,25
16	284,359	1,87	1,96
17	438,819	1,94	2,24
18	161,039	1,87	1,94
19	197,474	1,86	1,83

Genomik DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde, 80 voltta, 45 dakika yürütülmüştür. GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) markör olarak kullanılmıştır.

16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu

Mikroorganizmaların moleküler olarak tür tayini için 16S rRNA genin tüm mikroorganizmalarda taraması yapılmıştır. Primerlerin Tm derecelerinin belirlenmesi için Thermo Tm calculater (https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.htmL) veri tabanından yararlanılmıştır. Daha sonra gradient PCR yöntemi ile primerlerin Tm'leri net olarak ortaya çıkarılmıştır. Yapılan optimizasyonu sonucuna göre PCR çalışmaları yürütülmüştür.

Çizelge 3.5.16S rRNA Geninin PCR ile çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB)

Bileşenler	Miktar (µL)
5X Q5 Reaction Buffer	5
Primer F	1
Primer R	1
10 mM dNTPs	0,75
Template DNA 20 ng/ul	2
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
Nüklea free su	15
Toplam	**25**

Çizelge 3.6.16S rRNA Geninin PCR ile çoğaltılası için kullanılan PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	98	30 sn	1 döngü
2	98	10 sn	
3	50	30 sn	34 döngü
4	72	1 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR ürünleri %0,8'lik agaroz jelde, 80 voltta, 45 dakika yürütülmüştür. GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) markör olarak kullanılmıştır. PCR sonucuna göre 19 adet mikroorganizmanın bakteri primeri ile bant verdiği ve arke primeri ile çoğalmadığı Şekil 1.2'de gösterilmektedir. Bakteri primeri ile yapılan PCR işlemi sonucunda jelde 1500 baz çiftlik bir bant elde edilmektedir. Doğrulaması gerçekleşen PCR ürünleri tanımlanması için sanger dizileme yapılmıştır. Elde edilen sekans örnekleri NCBI veri tabanında elde edilen sekans örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Sanger Sekansların Temizlenmesi

16S Rizomal RNA gen bölgesinin dizilenmesi sonucunda bakteri örneklerimiz moleküler olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin 16S RNA gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR örnekleri saflaştırıldıktan sonra çift yönlü sanger dizileme yöntemi sekans bilgileri açığa çıkarılmıştır. Sanger dizileme Macrogen (https://dna.macrogen.com/#) firmasından hizmet alınarak yapılmıştır. Sekans örnekleri ilk olarak SnapGene (https://www.snapgene.com/) programı kullanılarak kalite kontrolü yapılmıştır. SnapGene programı ile açılan ABI uzantılı sekans okumaların baş ve sonlarında kalitesis okumalar çıkarılmıştır. İleri ve geri yönde okunan sekanslar

temizlendikten sonra SnapGene yardımı ile Aligment yapılarak birleştirilmiştir. Sonuç olarak Bakteri örneklerimizin 16S ribozomal RNA gen bölgesine ait gen sekansı tam olarak elde edilmiştir.

Filogenetik Ağaç Oluşturulması

İzolatların 16S rDNA dizisine bağlı filogenetik ağacı MEGAX programı kullanılarak ClustalW hizalamasını takiben Neighbor Joining metoduna göre çizilmiştir ve 1000 bootstrap ile test edilmiştir. Filogenetik ağaç çizilirken *Bacillus* cinsine ait GenBankası'nda bulunan diğer 16S rDNA dizileri eklenmiş ve E. coli 16S rRNA dizisi dışgrup olarak kullanılmıştır. Her bir cinse ait örneklerin kendi arasında aynı grupta toplanması, yapılan analizin doğruluğunu göstermektedir.

3.5.7. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 *ve Brevibacillus* SK-27 Suşlarından Keratinaz ve Kollajenaz Genlerinin Klonlanması İçin Genomik DNA İzolasyonun Yapılması

Bakteri genomik DNA izolasyon kiti için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (K182002, ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır. Genomik DNA izole etmek amacı ile bir öze yardımı ile alınan tek koloniler 50 mL falkon tüp içerisinde bulunan 10 mL sıvı besi ortamına inoküle edilmiştir. Ekimi yapılan bakteriler uygun sıcaklıkta soğutmalı çalkamalı inkübatörlerde 220 rpm'de 1-2 gün süre ile bakterilerin OD_{600} 0,8 'e gelene kadar büyütülmüştür. Büyüyen bakteriler 5000 x g'de 4 °C'de 5 dakika süre santrifüj yardımı ile çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 mL sıvı besi ortamı ile çözülmüş ve 500 µL bakteri kültürü 1,5 mL'lik ependorf tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen kültür firmanın önermiş olduğu protokole göre yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarı SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.5.8. *Brevibacillus agri* SK-27 *ve Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşlarına Ait Kollajenaz ve Keratinaz Genlerinin Biyoinformatik Analizler İle Belirlenmesi

Çalışma kapsamında klonlanarak rekombinant protein olarak üretilecek keratinaz ve kollajenaz genlerinin çeşitli *Bacillus* türlerinin genomunda belirlenmesi, belirlenen aday genin diğer organizmalardaki genler ile benzerliklerinin ortaya konması, *E. coli*'de protein ekspresyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılan klonlama çalışmalarında kullanılacak primer ve DNA dizilerinin belirlenebilmesi için NCBI Genbank, BRENDA, PDB, ve Uniprot KB gibi çeşitli temel veri tabanlarından yararlanılmıştır. Uniprot KB veri tabanından ilgili organizmanın ismi ve enzimin isimleri anahtar kelime araması sonucunda mevcut enzim sekanslarına ulaşılmıştır. Elde edilen genlerin intraselüler veya ekstraselüler ksilanaz olduğunu belirlemek için SignalP-5.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php SignalP-5.0) programından yararlanılmıştır. Signal peptidi olan genler ekstraselüler olarak kabul edilmiştir.

3.5.9. Kollejenaz ve Keratinaz Genlerinin Sekans Primerleri ile Çoğaltılması

Uniprot KB veri tabanından analiz yapılarak tespit edilen genlerin başlangıç ve stop kodonlarını içerecek şekilde sekans primeri NCBI Primer3 (https://primer3.ut.ee/) programı ile tasarlanmıştır. Dizaynı yapılan her bir gene ait primerler kullanılarak bu genlerin varlığı elimizde mevcut olan *Bacillus* türünde PCR ile taranmıştır. PCR ile belirlen genler pKI1.1R vektörüne klonlanarak sanger ile çift yönlü dizlenerek doğrulanmıştır. Çalışmada kullanılan primerler EK- 'de sunulmuştur. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR bileşenleri çizelge 3.7'de, PCR koşulları ise çizelge 3.8'de verilmiştir.

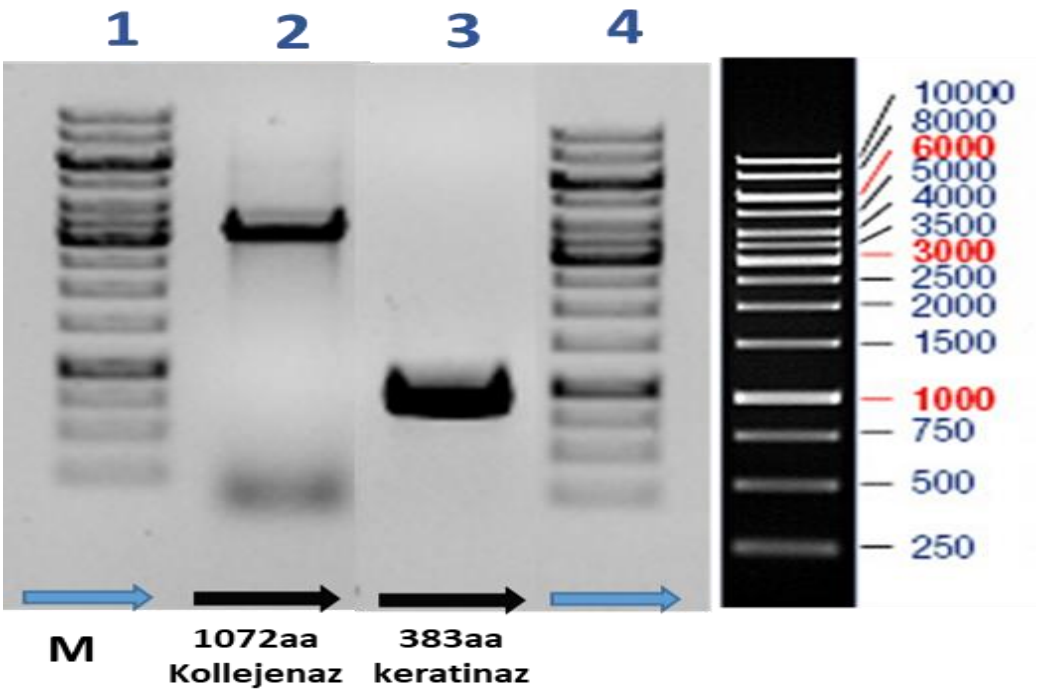
Çizelge 3.7. Kollejenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB)

Bileşenler	**Miktar (µL)**
5X Q5 Reaction Buffer	5
Primer F	1
Primer R	1
10 mM dNTPs	0,75
Template DNA 20 ng/ul	2
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
Nüklea free su	15
Toplam	**25**

Çizelge 3.8. Kollejenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR Bileşenleri (Q5® High Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB) PCR Protokolü

Sıra	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü**
1	98	30 sn	1 döngü
2	98	10 sn	
3	55	30 sn	34 döngü
4	72	2:20 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.Keratinaz ve kollajenaz geninin PCR sonucu: Hat 1:GeneRuler 1 kb DNA markır (SM0311). Hat 2: *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzimi 1072 amino asit büyüklüğündedir. Hat 3: *Brevibacillus a*gri SK-27 suşunun keratinaz enzimi383 amino asit büyüklüğündedir.

3.5.10. *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Keratinaz ve Kollajenaz Gen Sekanslarının Çıkarılması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 1072 amino asit büyüklüğünde kollegenaz enzimi ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun 383 amino asitbüyüklüğünde keratinaz kodladığı varsayılan genlerin sekans bilgileri çıkarılmıştır. PCR bileşenleri tablo 2.8'de PCR koşulları ise tablo 2.7'de gösterildiği gibihazırlanmış, PCR işlemi yapıldıktan sonra genler tam sekansların belirlenmesi için bir ara vektöre klonlanmıştır. High fidelity enzim ile çoğaltılan PCR ürünleri küt uçlu olarak elde edilmiştir. Bunun için pKI1.1R vektörü *EcoRV* enzimi ile küt uçlu kesilmiş, PCR ürünleri daha sonra ligasyona bırakılmıştır. *EcoRV* kesim koşul ve bileşenleri çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. pKI1.1R vektörürünün *EcoRV* kesim bileşenleri (Eco32I (EcoRV) (10 U/µL) – (Thermo Fisher, ER0301)

Bileşenler	Miktar (µL)	Kesim koşulları
pKI1.1R vektör (100 ng)	10	
10X Buffer R	2	
Eco32I (EcoRV) (10 U/µL) – (Thermo Fisher, ER0301)	1	37 °C'de 5 saat
Nükleaz free su	7	
10X Thermo Scientific™ FastDigest™ Buffer	2	37 °C'de 10 dakika
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µL) (EF0651)	1	80 °C'de 15 dakika
Toplam	**23**	

Kesim sonrası ürünler 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Daha sonra 10.000 bp büyüklüğünde plazmit jelde kesilerek FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit kullanılarak izole edilmiştir. Jel ekstraksiyon ürünlerinin miktar ve kalite tayini SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.10. pKI1.1R vektörlerinin jelden eksraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini

Örnek	Miktar (ng/µL)	A260/230	A260/280
pKI1.1R	32	1,9	2,0

Ligasyon koşulları ise çizelge 3.11'de gösterilmiştir. Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra ligasyon ürünleri heat shock metodu ile *E. coli* dh5@ suşuna transfer edilmiştir. Transformasyon sonrası bakteriler 100 mg/L spektinomisin içeren besi ortamında üretilmiş ve tek koloni elde edilmiştir.

Çizelge 3.11. pKI1.1R, Keratinaz ve kollajenaz genlerin ligasyon içeriği ve koşulları (T4 DNA Ligase 2011A, Takara)

Bileşenler	Miktar (µL)	Ligasyon koşulları
pKI1.1R vektör (30 ng)	7	
İnsert (50 ng)	4	
T4 DNA Ligase Buffer	2	
T4 DNA ligase	1	4°C'de Bir gece bekletilir.
Nükleaz free su	6	
Toplam	**20**	

Elde edile tek koloniler koloni PCR ile doğrulanmıştır. Doğrulanan koloniler plazmid izolasyonu yapmak için 10 mL sıvı LB+100 mg/L spektinomisin içeren falkonlara ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan bakteriler 37 °C soğutmalı çalkamalı inkübatörlerde 220 rpm'de 1 gün süre ile bakterilerin OD600 0,8 'e gelene kadar büyütülmüştür. Daha sonra bakterilerden plazmit

izolasyonu yapılarak elde edilen plazmitlere klonlanan genlerin sekans bilgileri ortaya çıkarmak için sanger dizileme yapılmıştır.

3.5.11. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerin Expresyon Vektörlerine Klonlanması

Sanger sekanslama sonrasında doğrulanan Keratinaz ve kollajenaz genleri ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 bakterisinin 1072 amino asit kollegenaz ve *Brevibacillus agri* SK-27 383 amino asit keratinaz kodlanan genler hücre dışı genler olduğu tespit edilmiş ve bun genlerin signal peptidleri belirlenmiştir. Daha sonra bu genler hücre içi üretim yapmak için pET28 ifade vektörüne klonlanmıştır. İfade vektörü olarak hücre içi üretilmesi hedeflenen genler pET28a vektörüne klonlanmıştır. İlgili genlerin klonlanması için Takara şirketinin geliştirmiş olduğu In-Fusion® Snap Assembly cloning (638948, Takara) klonlama sistemi kullanılmıştır. Bunun için ilk olarak signal peptidi kesilerek Primer design and other tools (https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools) online websitesi kullanılarak primer dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen primerler ekte sunulmuştur. Dizayn edilen primerler Oligomer Biyoteknoloji şirketine 50 nmol konsantrasyon da sentezletilmiştir.

3.5.12. pET28aa Vektörlerinin PCR İle Linear Hale Getirilmesi

pET28a vektörlerinin linear hale getirilmesi PCR temelli yapılmış olup ilk olarak gradient PCR ile primer Tm derecesi belirlenmiştir. İprof high fidelity enzim kullanılarak vektörler çoğaltılmıştır. PCR bileşenleri ve PCR koşulları aşağıda yer almaktadır.

Çizelge 3.12. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan primer dizileri

EtkaLAb Kodu	Primer Adı	Primer Dizisi	Amplikon (bp)
42	V.F. Pet28a	GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAA	5195
43	V.R. Pet28a	TAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGA	

Çizelge 3.13. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için Kullanılan PCR Bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad)

Bileşenler	Miktar (µL)
iProof High-Fidelity Master Mix	12.5
Primer F	1
Primer R	1
Template DNA 20 ng/ul	2
Nüklea free su	8,5
Toplam	**25**

Çizelge 3.14. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için Kullanılan PCR Bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR Protokolü

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	98	30 sn	1 döngü
2	98	10 sn	
3	65-58	30 sn	34 döngü
4	72	2 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü şekil 3.2'de gösterilmiştir. Gradient PCR çalışmasında 3 farklı bağlanma sıcaklığı (58, 62 ve 65) denenmiş ve en uygun Tm derecesi seçilmiştir.

Gradien PCR sonucunda pET28a vektörünün çoğaltılması için TM olarak 62 °C sıcaklık, enzim olarak iProf master mix seçilmiş ve tekrar PCR yapılmıştır. PCR bileşenleri (çizelge 3.15) ve PCR koşulları (çizelge 3.16) aşağıda gösterilmiştir.

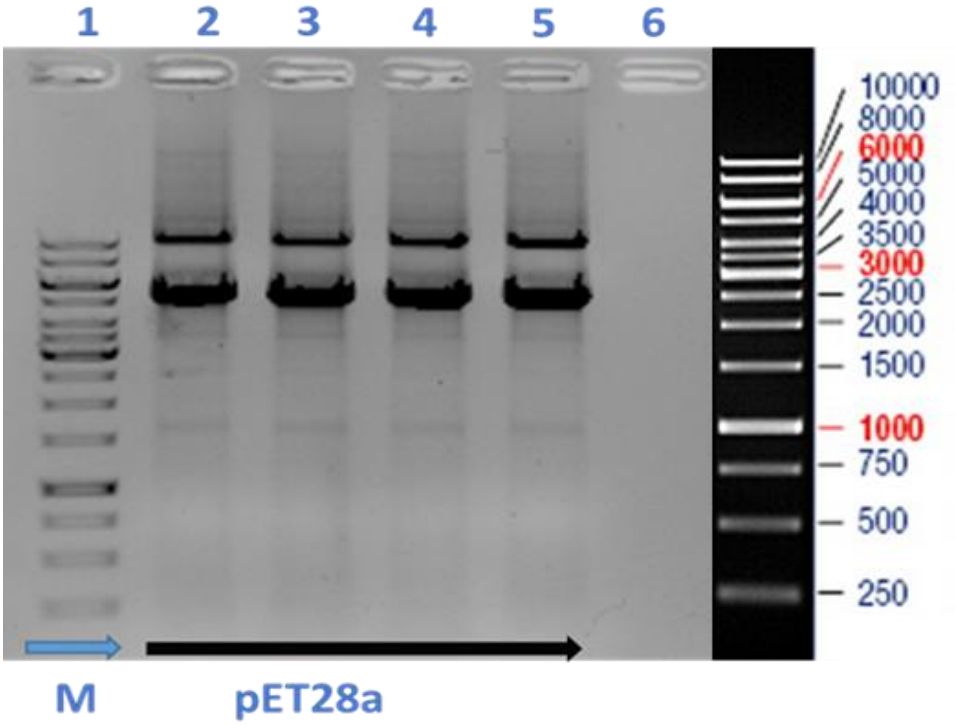
Çizelge 3.15. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad)

Bileşenler	Miktar (µL)
iProof High-Fidelity Master Mix	12.5
Primer F	1
Primer R	1
Template DNA 20 ng/ul	2
Nüklea free su	8,5
Toplam	**25**

Çizelge 3.16. pET28a vektörlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR protokolü

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	98	30 sn	1 döngü
2	98	10 sn	
3	62	30 sn	34 döngü
4	72	2 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü şekil 3.2 de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. pET28a (5195 bp) PCR ile lineer hale getirilmesi: Hat 1 ve 7: GeneRuler 1kb DNA markır (SM0311). Hat 2-5: pET28a. Hat 8-11: pET20b

Jelde yürütülen ve görüntülenen vektörlerde tek bant oluşmamıştır. Bundan dolayı ilgili vektörler jelden izole edilmiştir. İlk olarak hedef bantlar DUT-48 Blue Light Transilluminator (Mıulab) cihazı kullanılarak bistrü yardımı ile kesilerek 1.5 mL ependorf tüpe alınmış ve ağırlığı belirlenmiştir. FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (FAGCK 001) kullanılarak firmanın önermiş olduğu protokole göre jel ekstraksiyonu yapılmıştır. Jel ekstraksiyon ürünlerinin miktar ve kalite tayini SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak ölçülmüştür (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. pET28a vektörlerinin jelden eksraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini

Örnek	Miktar (ng/µL)	A260/230	A260/280
pET28a	32	1,8	2,0

3.5.13. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerinin PCR İle Çoğaltılması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 bakterisinin 1072 amino asit kollegenaz ve *Brevibacillus agri* SK-27 383 amino asit keratinaz genleri pET28a vektörü ile hücre içi üretilecektir. Takara klonlama yöntemine göre tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR bileşenleri (Çizelge 3.18) ve koşulları (Çizelge 3.19) aşağıda gösterilmektedir.

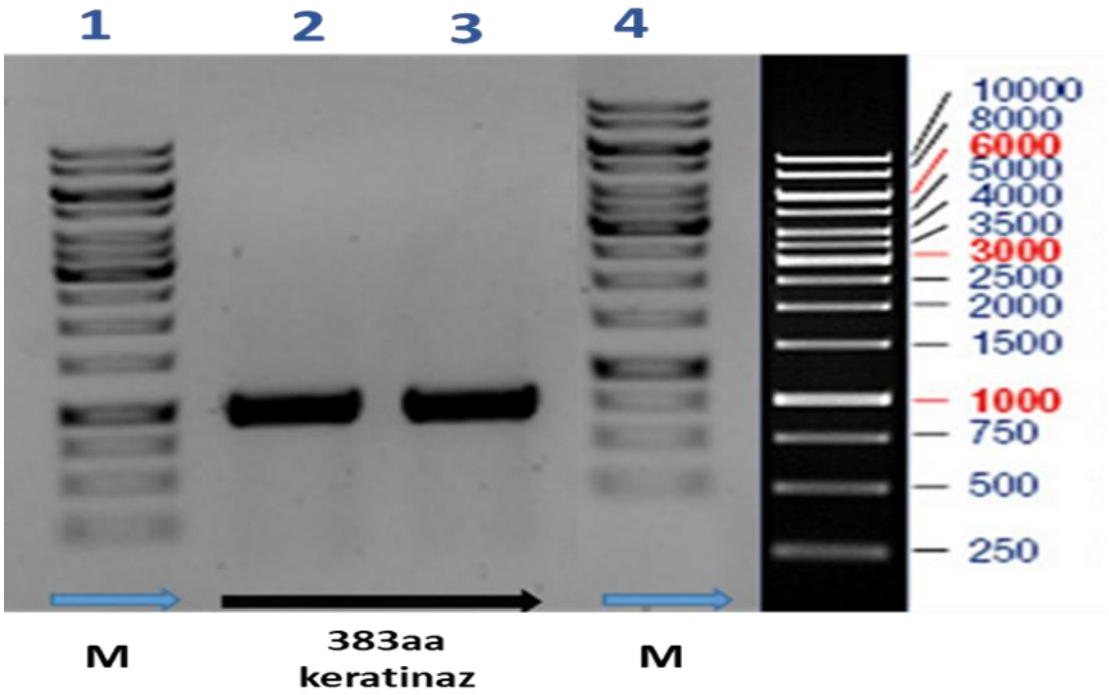
Çizelge 3.18. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad)

Bileşenler	Miktar (µL)
iProof High-Fidelity Master Mix	12.5
Primer F	1
Primer R	1
Template DNA 20 ng/ul	2
Nüklea free su	8,5
Toplam	**25**

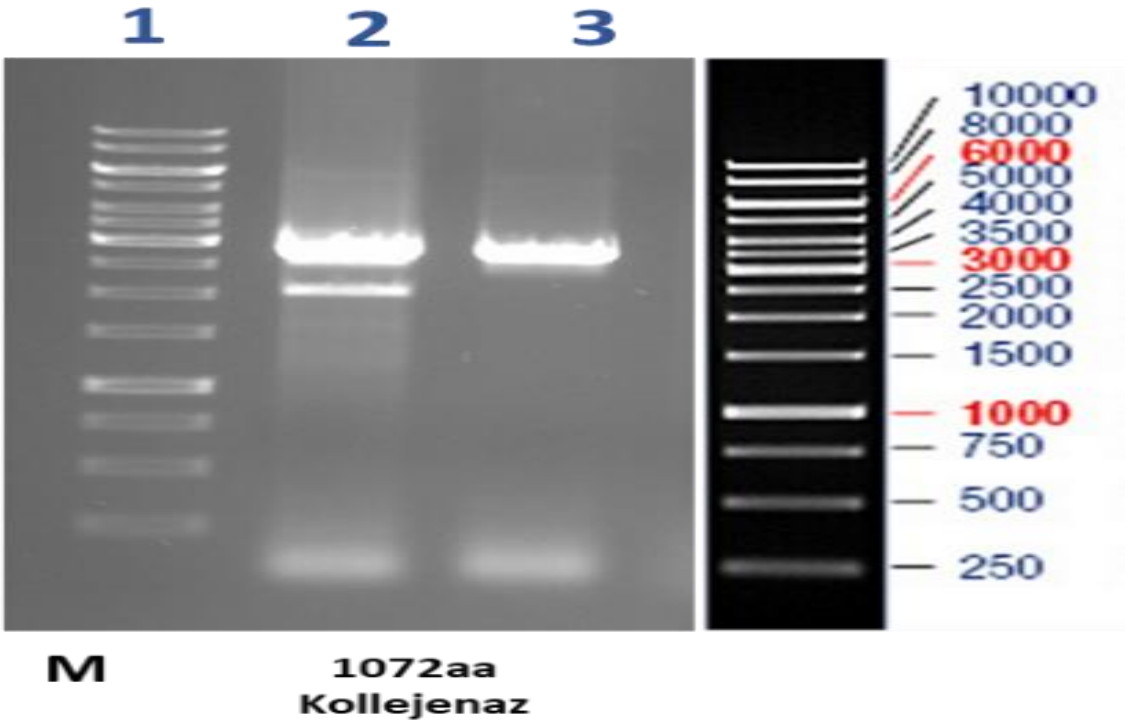
Çizelge 3.19. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin çoğaltılası için kullanılan PCR bileşenleri (iProof HF Master Mix, 1725310, Biorad) PCR Protokolü

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	98	30 sn	1 döngü
2	98	10 sn	
3	60	30 sn	34 döngü
4	72	2 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. pET28a vektörüne klonlama yapmak için *Brevibacillus agri* SK-27 383aa keratinaz geninin PCR ile çoğaltılması: Hat 1 ve 4: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). Hat 2-3: pET28a/383aa/ *Brevibacillus agri* SK-27.



Şekil 3.4. pET28a vektörüne klonlama yapmak için *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geninin PCR ile çoğaltılması: Lane 1 ve 4: GeneRuler 1 kb DNA markır (SM0311). Lane 2-3: pET28a/1072aa/ *Lycinibacillus fu*siformis SKK-2

Jelde yürütülen ve görüntülenen vektörlerde tek bant oluşan PCR ürünleri PCR pürifikasyon yapılmıştır. Çift bantlar genle ise jelde izole edilmiştir. İlk olarak hedef bantlar DUT-48 Blue Light Transilluminator (Mıulab) cihazı kullanılarak bistrü yardımı ile kesilerek 1.5 mL ependosf tüpe alınmış ve ağırlığı belirlenmiştir. Daha sonra jelden alınan ürünler ve PCR ürünleri FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (FAGCK 001) kullanılarak firmanın önermiş olduğu protokole göre PCR pürifikasyonu ve jel ekstraksiyonu yapılmıştır. PCR ürünlerinin miktar ve kalite tayini SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarka ölçülmüştür (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20. Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin PCR pürifikasyonu ve jelden ekstraksiyon sonucu miktar ve kalite tayini

S	Örnek	Miktar (ng/µL)	A260/230	A260/280
1	pET28a/383aa/ *Brevibacillus brevis*.	32	1,8	2,0
2	pET28a/1072aa/ *Lysinibacillus fusiformis*.	48	1,9	2,0

3.5.14. Keratinaz ve Kollajenaz Genlerin pET28a İfade Vektörlerine In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Kullanılarak Klonlanması

PCR ürünleri ve linear vektörlerin klonlanmasında NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation) kullanılarak ligasyon reaksiyonun oluşturlumasında 3:1 oranına göre inser ve vektörün miktarı belirlenmiştir. Klonlama çalışması In-Fusion® Snap

Assembly Master Mix (638948 Takara) kiti kullanılarak yapılmış ve ligasyon koşulları firmanın önermiş olduğu protokol takip edilmiştir. Firmanın önermiş olduğu protokol çizelge 3.21 'de ve ligasyon için kullanılan bileşenlerde çizelge 3.22. 'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.21.Firmanın önerdiği PCR protokolü

Reaction component	Cloning reaction	Negative control reaction	Positive control reaction
Purified PCR fragment	10–200 ng	–	2 µl of 2 kb control insert
Linearized vector	50–200 ng	1 µl	1 µl of pUC19 control vector
5X In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 µl	2 µl	2 µl
Deionized Water	to 10 µl	to 10 µl	to 10 µl

Çizelge 3.22. pET28a ifade vektörüne Kollajenaz ve Keratinaz genlerinin klonlanması için In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Ligasyon koşul ve bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kollajenaz (µL)	Keratinaz (µL)
Purified PCR fragment	1	6
Linearized vector pET28aa (32 ng/µL)	2	2
5X In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2	2
Deionized Water	5	0
TOPLAM	**10**	**10**

Çizelge 3.23. In-Fusion® Snap Assembly Master Mix Ligasyon koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	50	15 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

3.5.15. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerini İçeren pET28a İfade Vektörlerin *E. coli* DH5α Bakterisine Transformasyonu

Yukarıda tabloda belirtilen ligasyon ürünlerinin oluşturulması sonucunda ürünler EK-4'de belirtilen protokol takip edilerek *E. coli* DH5α suşuna ısı-şok yöntemi ile transfer edilmiştir. Daha sonra bakteriler pET28a vektörü içerinler 30 µg/mL kanamisin içeren LA besiyerine, spreader yardımı ile yayma tekniği ile ekim yapılmıştır. Daha sonra bakteriler 37 °C'de 16 saat inkübe edilerek tek koloniler gözlemlenmiştir.

Elde edilen koloniler doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Steril kabin içerisinde steril PCR tüpleri içerisine 10 µL steril su eklenmiştir. Seçimi yapılan koloniler bir pipet yardımı ile alınan koloniler pcr tüpleri içerinde steril suya pipetaj yapılarak bulaştırılmıştır.

10 µL bakteri bulaştırılmış suyun 2 µL'si koloni PCR'da kullanılmış, 8 µL'sinin ise plazmit izolasyonu ve stok oluşturmak için 10 mL uygun antibiyotik eklenen LB (pET28a için 30 µg/ µL Kanamisin,) besi ortamına ekim gerçekleştirilmiştir. Koloni PCR koşulları çizelge 3.24 ve bileşenleri çizelge 3.25 de gösterilmiştir. LB besi ortamında geliştirilen bakteri kültüründen plazmiT izolasyonu ve stok oluşturulmuştur.

Çizelge 3.24. Kollajenaz ve Keratinaz genlerini içeren pET28a vektörünün *E.coli* DH5α koloni PCR bileşenleri (DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL), EP0705)

Bileşenler	**Miktar (µL)**
10X DreamTaq Buffer*	2,5
Primer F	1
Primer R	1
10 mM dNTPs	0,5
Template DNA 20 ng/ul	2
DreamTaq DNA Polymerase	0,2
Nüklea free su	17,8
Toplam	**25**

Çizelge 3.25. Kollajenaz ve Keratinaz genlerini içeren pET28a v ifade vektörlerin *E.coli* DH5α koloni PCR Protokolü (DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL), EP0705)

Sıra	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü**
1	95	3 dk	1 döngü
2	95	30 sn	
3	49	30 sn	30 döngü
4	72	1 dk	
5	72	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü şekil 1.2'de gösterilmiştir. Agaroz jelde doğrulanan koloniler plazmit izolasyonu yapılarak sanger dizileme ile klonlanan genin doğruluğu test edilmiştir. Daha sonra bakteriler pET28a vektörü içerinler 30 µg/mL kanamisin içeren LA besi yerine, spreader yardımı ile yayma tekniği ile ekim yapılmıştır. Daha sonra bakteriler 37 °C'de 16 saat inkübe edilerek tek koloniler gözlemlenmiştir. Elde edilen koloniler doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Steril kabin içerisinde steril PCR tüpleri içerisine 10 µL steril su eklenmiştir. Seçimi yapılan koloniler bir pipet yardımı ile alınan koloniler PCR tüpleri içerinde steril suya pipetaj yapılarak buşaltırılımıştır. 10 µL bakteri bulaştırılmış suyun 2 µL koloni PCR, 8 µL'si ise plazmit izolasyonu ve stok oluşturmak için 10 mL uygun antibiyotik eklenen LB (pET28a için 30 µg/ µL Kanamisin,) besi ortamına ekim gerçekleştirilmiştir.

3.5.16. Kollajenaz ve Keratinaz Genlerini İçeren pET28a İfade Vektörlerin *E.coli* BL21(DE3) Bakterisine Transformasyonu

E.coli DH5α suşuna klonlanarak sanger dizileme yöntemi ile doğrulanan pET28a/383aa/ *Brevibacillus agri* SK-27 ve pET28a/1072aa/*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ifade vektörleri *E.coli* BL21(DE3) bakterisine ısı-şoku yöntemi ile transfer edilmiştir. Daha sonra bakteriler pET28a vektörü içerinler 30 µg/µL kanamisin içeren besi yerine, yayma tekniği ile aşılanmıştır. Daha sonra bakteriler 37 °C'de 16 saat inkübe edilerek tek koloniler gözlemlenmiştir.

Elde edilen koloniler doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Steril kabin içerisinde steril PCR tüpleri içerisine 10 µL steril su eklenmiştir. Seçimi yapılan koloniler bir pipet yardımı ile alınan koloniler pcr tüpleri içerinde steril suya pipetaj yapılarak bulaştırılmıştır. 10 µL bakteri bulaştırılmış suyun 2 µL koloni PCR, 8 µL'si ise plazmit izolasyonu ve stok oluşturmak için 10 mL uygun antibiyotik eklenen LB (pET28a için 30 µg/ µL Kanamisin,) besi ortamına ekim gerçekleştirilmiştir. LB besi ortamında üretilen bakteri kültüründen stok oluşturulmuştur.

3.5.17. *Escherichia coli'*den Kompetence Hücre Hazırlanması

E. coli alıcı hücreleri Hanahan (1983) tarafından önerilen $RbCl_2$ metodu kullanılarak hazırlanmıştır. *E. coli* DH5α ve *E. coli* BL21 stokları -86 ºC'den alınıp LB agar plaklarında canlandırılır, tek koloni seçilip yeni hazırlanmış sıvı LB içerisine ekimi yapılarak 37 ºC ve 220 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonunda oluşan kültürlerden 3 mL kadar alınıp 200 mL LB besi ortamına ekim yapılmıştır. OD_{600} değeri 0.4 ile 0.7 aralığına erişinceye kadar kültürler 37 ºC'de 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İstenilen OD_{600} değeri elde edildikten sonra kültürler 15 dak. buz içinde bekletilip 3500 rpm'de 4 ºC'de 5 dak. santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 20 mL soğuk tampon 1 çözeltisinde çözülmüş ve santrifüj yapılmıştı. Oluşan pellet 8 mL soğuk tampon 2'de çözülerek 100 µL'lik hacimLerde ependorflara dağıtılmıştır. 20 dak. buz içerisinde inkübe edilen tüpler sıvı azot ile dondurulmuş ve -86 ºC'de saklanmıştır.

Çizelge 3.26.*E. coli* alıcı hücre hazırlığı için kullanılan Tampon 1

Bileşenler	Konsantrasyon
Potasyum asetat	30 mM
$RuCl_2$	100 mM
$CaCl_2$	10 mM
Gliserol (%87)	8.6 mL
Son hacim dH2O ile 50 mL'ye tamamLanır ve filtre sterilizasyonu yapılır.	

Çizelge 3.27. *E. coli* alıcı hücre hazırlığı için kullanılan Tampon 2

Bileşenler	Konsantrasyon
MOPS	10 mM
$RuCl_2$	10 mM
$CaCl_2$	75 mM
Gliserol (%87)	8.6 mL
0.2 M KOH ile pH 6.5'e ayarlanır. Hacim dH2O ile 50 mL'ye tamamLanır.	

3.5.18. *Escherichia coli* Kompetens Hücresine Transformasyon

E. coli alıcı hücrelerinin transformasyonu Sambrook vd (1989) tarafından optimizasyonu yapılmış metot modifiye edilerek kullanılmıştır.

1.-86 ºC'de muhafaza edilen 100 µL'lik hacimdeki *E. coli* alıcı hücrelerinin buz içerisinde 20-30 dakika çözünmeleri sağlanmıştır.

2.Alıcı hücrelerin içerisine 1-10 µL hacimde plazmit DNA (1-50 ng) yada ligasyon ürünü eklenerek yavaşça pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır.

3.Daha sonra Eppendorf tüpler 30 dak. buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.

4.Hücre ile DNA karışımını içereen tüp 42 ºC'de 60 sn. ısı şokuyla muamele edilerek hemen ardından, buz içerisinde 5 dak. inkübasyona bırakılmıştır.

5.Karışımın üzerine 900 µL SOC besiyeri eklenerek 37 ºC'de, 1 saat boyunca ve 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir.

6.1 saat sonunda ve 3400 rpm'de 10 dak. santrifüj sonrasında pellet 100 µL SOC besiyerinde çözülür. Bakteri çözeltisi seçici antibiyotik içeren LB agarlı plaklara (LA) yayma ekim yöntemi ile ekildikten sonra 37 ºC'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.19. Transformat Suşta Hücre İçi Enzimlerin Ekspresyonu ve Enzim İzolasyonu

1-pET28a vektörüne klonlanan enzimLerin *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) hücrsindeki ifadesi için rekombinant *E. coli* BL21 suşuna ait stoklardan 10 mL LB besiyerine 30 µL, 100 mg/mL kanamisin antibiyotiği stoğundan da 3 µL ekilerek 37 °C'de 200 rpm'de 16 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

2-Ardından, ön kültürü oluşturulan hücreden 2 mL alınarak 100 mL LB içeren erlene ekilmiş ve 100 mL lik LB besiyerine plazmide uygun antibiyotik ilave edilmiştir (100 mg/mL kanamisin antibiyotiği stoğundan 100 mL besiyerine 30 µL kanamisin şeklinde).

3-Daha sonra 37 °C'de 200 rpm'de inkübasyon ile OD_{600} 0.4-0.6 değerine geldiğinde erlene son konsantrasyon 1mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir (100 mg/mL IPTG stoğundan 100 mL besiyerine 238 µL IPTG). Beş saat boyunca inkübasyon devam ettitrilmiş ve 5 saat sonunda kültürler tüplere alınarak, 4 °C'de ve 6.000 g'de 15 dak. Santrifüj gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süpernatantlar atılarak pelletler -86 °C'ye sonikasyon işlemi için kaldırılmıştır.

4-Eğer kontrolllü çalışılmak istenirse aynı işlemLer indüklenen enzim ile birlikte başka bir erlende yapılacak ve kontrole IPTG eklenmeyecektir.

5-Bakterilerin indüklenmesi sonunda santrifüj ile elde edilen pellet uygun tampon (Sodyum fosfat) ile çözülmüştür. 100 mL'lik kültür örneği 10 mL tamponda çözülmüştür.

6-Karışıma 100 mg/mL lizozim stoğundan 10 µL eklenerek vorteks işlemi yapılıp 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

7-Hazırlanan örnek %20 amplitude güçde sonikasyon cihazı ile patlatılarak, 15000 g'de, 4°C'de, 15 dak. çöktürülmüş, süpernatantlar 4 °C'de saklanmıştır.

8.Süper natant doğrudan enzim aktivitesi için kullanılarak aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. İstenirse alkon/aseton/amonyum sülfar uygulamalarından herhangi birisi kullanılarak enzim yoğunlaştırılarak aktivite analizi gerçekleştirilebilir. Amonyum sülfar uygulaması yapılırsa, dializ işlemi gerçekleştirilmesi zorunludur.

9-Aktivite ve SDS-PAGE zimogram analizi yapılarak, transformant organizmalarda genin ekspresyon aşamasında na kadar indüklendiği kontrol edilmiştir. Bu işlem için ana suştan üretilen enzim, indüklenmemiş ve IPTG ile indüklenmiş transformantlardan izole edilen hücra içi enzimLer kullanılarak aktivite analizi gerçekleştirimiş ve eksprsyon saptanmıştır.

3.5.20. Keatinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma Deneyleri

İzole edilen bakteri suşlarının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerine sahip tavuk tüyü unu ve kemik unu (kollajen) bulunan sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerlerine bir gecelik bakteri kültürlerinden %10 olacak şekilde aşılama yapılmış ve 5 gün süre ile 150 rpm de çalkalanarak enzim üretilmiştir.

Bakteriler 8000 rpm de 10 dakika çöktürülerek uzaklaştırılmış ve üzerine 1:3 oranında önceden soğutulmuş aseton eklenerek -20ºC ye konularak enzim çöktürülmüştür. Elde edilen karışım 10000 rpm de 10 dakika ve +4ºC de çöktürülerek üst sıvı atılmış ve çökelti pH'sı 7.0 olan Na-fosfat tamponunda sıvılaştırılarak enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.5.21. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Aktivite Analizi

Aktivite analizi için 100 µL enzim, 300 µL (%1 tavuk tüyü ve %0.5 kemik unu) substrat ile karıştırılarak 60 dakika süresince enzimin üretildiği sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Örneğin üzerine 400µL %10'luk TCA eklenerek 20 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Örnek 8000 rpm de 10 dakika çöktürülmüştür. Üst fazdan 300 µL alıarak yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 300µL folin ayıracı (1:2 sulandırılmış) ve 1500µL 0.4M $NaCO_3$ eklenerek karıştırılıp 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Keratinaz enzimi 485, kollajenaz enzimi 578 nm de köre karşı okunarak absorbans değeri saptanmıştır (Caf 2015).

3.5.22. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Protein Konsantrasyonunun Saptanması

Enzim çözeltilerindeki protein miktarı, lowry yöntemine göre belirlenmiştir (Lowry, 1951). Kalibrasyon eğrisi için 1 mg/mL sığır serum albumini pH 7.0 tamponunda çözülmüş ve stok çözelti hazırlanmıştır.

Çizelgede verilen değerler kullanılarak hazırlanan örnek çözeltilerinin her birinden 0.3 mL alınıp üzerlerine 1.5 mL C Solüsyonu eklenmiş ve elde edilen karışım 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışıma 0.3 ml solusyon D eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri Excel programı kullanılarak BSA standart grafiği ve R^2 değeri elde edilmiştir. Aynı işlemler orijinal ve mutatnt enzimler için de yapılmıştır. Bütün testler üç tekrarlı şekilde yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. BSA standart grafiğinden elde edilen denklem ve enzim örneklerine ait absorbans değerleri kullanılarak enzimlere ait protein miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.28. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

	Kör	1	2	3	4	5	6
BSA Stok Çözeltisi (µL)	0	12.5	50	100	150	200	300
Distile su (µL)	500	487.5	450	400	350	300	200
Karışımın Konsantrasyonu (mg/mL)	0	25	100	200	300	400	600

3.5.23. Tirozin Konsantrasyon Eğrisi

Tirozinaz eğrisinini ve formülasyonun oluşturulması için dstile suda çözülmüş 12.5 mg/mL stok tirozin çözeltisinden çizelgede verilen değerler kullanılarak örnek serileri hazırlanmıştır. Her örnek serisinden 300µL alınarak üzerine 300 µL folin ve 1500 µL 0.4 M NaCO3 eklenerek karıştırılmış ve 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra köre karşı 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Denemeler üç tekrarlı şeklinde yapılmış ve ortalamaları alınmıştır (Caf, 2015).

Çizelge 3.29. Tirozin Standart Grafiğinin Hazırlanması

	Kör	1	2	3	4	5	6
Tirozin Stok Çözeltisi (mL)	0	50	100	150	200	250	400
Distile Su (mL)	2000	1950	1900	1850	1800	1770	1600
Karışımın Konsantrasyonu (µg/mL)	0	25	50	75	100	150	200

3.5.24. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Ünitesinin Saptanması

Bir ünite (U/ml) keratinaz enzimi, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli miktar olarak tanımlanmıştır. Bir ünite kollajenaz aktivitesi, dakikada salınan 1 µmol lösinin serbest kalması için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilir (Chauhan and Prabha.,2017). Enzim ünite hesaplamasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Gradisar ve ark., 2005).

$$\text{Ker.Enzim Aktivitesi (U/ml/dk)} = \frac{\text{(OD485/Eğim) X Seyreltme Faktörü X Top. Hacim (mL)}}{\text{Enzim hacmi (mL) x İnkübasyon süresi}}$$

$$\text{Kol. Enzim Aktivitesi (U/ml/dk)} = \frac{(OD_{578}/\text{Eğim}) \text{ x Top. Hacim (mL) x Seyreltme Faktörü}}{\text{Enzim hacmi (mL) x İnkübasyon süresi}}$$

3.5.25. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Farklı tampon sistemLeri kullanılarak farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlanıp her birine %1 tavuk tüyü ve kemik unu ilave edilerek substrat kazırlanmıştır. Standart keratinaz ve kollajenaz aktivite analizi yapılarak en yükek absorbansın elde edildiği pH değeri enzimLerin 0ptimum aktivite gösterdikleri pH olarak saptanmıştır (Arıkan 2008).

3.5.26. Keratinaz ve Kollajenaz Enziminlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

Optimum aktivite değerine sahip substrat kullanılarak 0-100 ºC aralığında 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek standart aktivite analizi yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği değer 0ptimum aktivitenin gerçekleştirği sıcaklık olarak saptanmıştır (Arıkan 2008).

3.5.27. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Termal Stabilitenin Saptanması

EnzimLer 0-100 ºC aralığındaki farklı sıcaklıklarda 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyonadan geçmiş her sıcaklığa ait enzim 0ptimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübe edilip standart aktivite analizi yapılmıştır. Ön işlemden geçmemiş enzimin analizi sonunda elde edilen değer 100 kabul edilerek ön işlemden geçen enzimLerin absorbansları ile oranlanarak % kalan aktivite (stabilite) saptanmıştır (Arıkan 2008)

3.5.28. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimeri pH Stabilitesinin Saptanması

Enzim farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler kullanılarak 40 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyona bırakılmamış enzim ve ön inkübasyondan geçen enzimler standart aktivite analizi ile test edilmiştir. Ön inkübasyondan geçmemiş enzime ait absorbans değeri 100 olarak değerlendirilip, diğer pH değerlerinden elde edilen absosrbans değerleri ile kıyaslanarak kalan aktivite (pH stabilitesi) saptanmıştır (Aygan 2008)

3.5.29. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Aktivitesine NaCL'ün Etkisi

Keratinaz ve kollajenaz enzimLeri eşit miktarlarda alınarak çöktürülmüş ve çökeltinin üzerine orijinal hacım kadar %3-35 arasında değişen konsnatrasyonlarda NaCL eklenerek 60 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda standart aktivite analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Arikan 2008).

3.5.30. Enzim Aktiviyesine Metal İyonları, Şelatörler, İnhibitörler, Yüzey Aktif Maddeler, Deterjanlar ve Okside Edici Ajanların Etkisi

Keratinaz ve kollajenaz enzimlerinden eşit hacımda alınarak çöktürülüp, çökeltiye 5 ve 10 mM konsantrasyonda orijinal hacım kadar kimyasal ajan eklenmiş ve 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart enzim aktivitesi gerçekelştirilmiştir. Kontrol olarak işlem görmemiş enzim kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır. Kontrol ile işlem gören enzimLerin absorbans değerleri karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Arikan 2008).

3.5.31. Tüy parçalama Oranının Belirlenmesi

Enzimin 0ptimum aktivite gösterdiği pH değerine sahip tampon çözeltiye önceden yıkanarak kurutulmuş tavuk tüy unu ve kemik unu eklenerek 0ptimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 5 gün süre ile150 rpm de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 50, 100 ve 300 g/L konsantrasyonda tüy kullanılmış ve ortama sırası ile 5, 10 ve 30 mL enzim eklenmiştir (1 enzim 9 substrat). İnkübasyon sonunda filtreden süzülen örnekler etüvde kurutulduktan sonra tartılarak başlangıç ağırlığında nekadar eksilme olduğu saptanmıştır (Caf 2015).

3.5.32. Keratinaz ve kollajenaz üreticisi suşlarda EMS (Emil Metan Sülfonat) ile mutasyon çalışması

1-Bir gecelik taze bakteri kültürleri santrifüj edilerek çöktürülür (6000 rpm de 10 dakika) üst faz atılmıştır.

2-Bakteri çökeltisi üzerine başlangıç hacmi kadar steril serum fizyolojik eklenir ve süspansiyon elde edilir.

3-Süspansiyondan 1 mL alınarak steril ependorf tüplerine aktarılır (Her örnekten kaç doz hazırlanacaksa o kadar tüpe aktarım yapılır. Bu amaçla bir örnekten dört tüp hazırlanarak her tüpe sırası ile (10, 20, 40 ve 80 µL) EMS eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır.

4-Örnekler 20°C sıcaklıkta 30, 60, 90 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

5-İnkübasyon sonunda bakteriler çöktürülür, üst faz atılır ve her tüpe 1 mL steril fizyolojik su eklenerek üç kez yıkama işlemi gerçekleştirimiştir.

6-Tüplere 1 er mL distile su eklenerek süspansiyon elde edilir ve seri sulandırma yapılarak skimmilk agar besiyerine ekim gerçekleştirilir. Örnekler oda sıcaklığında 40 saat inkübasyona bırakılmıştır (Caf, 2015).

Çizelge 3.30. *Bacillus albus* SK 36 EMS mutasyon uygulaması

Suş	İnkübasyon süresi	Konsantrasyon (µL EMS)			
SK-36	30 dk	10	20	40	90
SK-36	60 dk	10	20	40	90
SK-36	90 dk	10	20	40	90

Çizelge 3.31. *Brevibacillus agri* SK 27 EMS mutasyon uygulaması

Suş	İnkübasyon süresi	Konsantrasyon (µL EMS)			
SK-27	30 dk	10	20	40	90
SK-27	60 dk	10	20	40	90
SK-27	90 dk	10	20	40	90

Çizelge 3.32. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 EMS mutasyon uygulaması

Suş	İnkübasyon süresi	Konsantrasyon (µL EMS)			
SSK-2	30 dk	10	20	40	90
SSK-2	60 dk	10	20	40	90
SSK-2	90 dk	10	20	40	90

Çizelge 3.33. *Bacillus tropicus* SKK-5 EMS mutasyon uygulaması

Suş	İnkübasyon süresi	Konsantrasyon (µL EMS)			
SSK-5	30 dk	10	20	40	90
SSK-5	60 dk	10	20	40	90
SSK-5	90 dk	10	20	40	90

3.5.33. Keratinaz ve Kollajenaz Üreticisi Suşlarda UV Mutasyon Çalışması

UV ışınlama süresi 30, 60 ve 90 dakika olacak şekilde üç farklı periyotta gerçekleştirilmiştir. UV kaynağı ile örnek arasındaki mesafe 20 cm tutulmuştur. Işınlama işleminden sonra alüminyum folyo ile tamamen kapatılan petri besiyerlerinde üreyen koloniler numaralandırılarak 1 mL N1 sıvı besiyerine kürdan aracılığı ile aşılanıp 24 saat 20 °C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak ışınlanmamış ana suşlarda 1 mL N1sıvı besiyerine ekilerek bir gecelik kültür elde edilmiştir.

Sıvı besiyerinde üreyen mutant ve ana suşlara ait örnekler 10 µL miktarda skimmilk agar besiyerine aşılanarak petriler alüminyum folyo ile kapatılıp 20 °C 40 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda besiyerinde üreyen ana suş ve mutant suşların koloni ve zon çapları ayrı ayrı ölçülmüş ve net aktivite zonları bulunmuştur (Nadem ve ark., 2010; Rahman ve ark., 2017).

3.5.34. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Substrat Konsantrasyonu ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz üreticisi bakteri suşlarının enzim üretimine substrat miktarının araştırılması için %1-30 konsantrasyonda tavuk tüyü unu ve kemik unu içeren üretme besiyerleri hazırlanmış ve %1 aşılama yapılarak 72 ve 120 saatlik inkübasyon gerçekleştirilerek standart aktivite analizi ile enzim üretim miktarları saptanmıştır (Caf, 2015).

3.5.35. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Kaynağı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz üreticisi bakteri suşlarının enzim üretimine azot kaynağının etkisinin araştırılması hazırlanana besiyerlerine aşılama yapılmış ve 72, 120, 168 saat 30ºC de inkübasyon gerçekleştirilerek standart aktivite analizi ile en yüksek enzim üretilen substrat belirlenmiştir (Kainor ve ark., 2011).

3.5.36. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz üreticisi bakteri suşlarının enzim üretimine karbon kaynağının etkisinin araştırılması hazırlanana besiyerlerine aşılama yapılmış ve 72, 120, 168 saat 30ºC de inkübasyon gerçekleştirilerek standart aktivite analizi ile en yüksek enzim üretilen substrat belirlenmiştir (Kainor ve ark., 2011).

3.5.37. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Miktarı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz enzim üretiminde en yüksek üretimin gerçekelştirildiği azot kaynağı kullanılarak ilgili kaynağı içeren farklı konsantrasyonlarda besiyerleri hazırlanıp 30ºC de 150 rpm

de 72, 120 ve 168 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar sonunda standart aktivite analzi yapılmış ve en yüksek enzim üretinminin gerçekleştiği miktar ve inkübasyon süresi belirlenmiştir (Kainor ve ark., 2011).

3.5.38. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Miktarı ve İnkübasyon Süresinin Etkisinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz enzim üretiminde en yüksek üretimin gerçekleştirildiği karbon kaynağı kullanılarak ilgili kaynağı içeren farklı konsantrasyonlarda besiyerleri hazırlanıp 30ºC de 150 rpm de 72, 120 ve 168 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar sonunda standart aktivite analzi yapılmış ve en yüksek enzim üretinminin gerçekleştiği miktar ve inkübasyon süresi belirlenmiştir (Suneetha ve ark. 2011).

3.5.39. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacllus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Substrat Spesifiklinin Saptanması

Substrat olarak BSA (Sığır serum albumini), Skimmilk, Jelatin, Balık pulu, Kazein, Doğal Tavuk Tüyü, Kıkırdak (keçi kürek kemiği uç kısmı), Balık Derisi, Koyun Yünü, Doğal Kemik Unu, İnsan Saçı ve Keçi Kılı kullanılmıştır. Kontrol olarak %1 konsantrasyonda kemik unu ve feather meal pH 7.0 ve pH 9.0 tamponlarında hazırlanıp otoklav edilerek kullanılmıştır. BAS, skimmilk, jelatin, balık pulu, kazein, kıkırdak, balık derisi ve doğal kemik unu %1 konsantrasyonda pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış ve otoklavda steril edilerek kullanılmıştır. Doğal tavuk tüyü, feather meal, koyun yünü, insan saçı ve keçi kılı %1 konsantrasyonda pH 9.0 glisin-sodyum hidroksit tamponunda hazırlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır (Caf, 2015).

3.5.40. Kısmi Saflaştırılmış Enzimin Katı Besiyerindeki Aktivite Analizi

İzole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimleri hem sıvı fazın enzim kaynağı olarak kullanılması için hemde çöktürülmüş enzimin pH 7.0 olan sodyum fosfat ve pH 9.0 glisin sodyum hidroksit tamponlarında sıvılaştırılması ile kullanıma hazır stok örnekler hazırlanmıştır. Keratinaz aktivitesinin analizi için skimmilk ve tavuk tüylü katı besiyeri, kollajenaz aktivitesi için %50 yaşlandırılmış deniz suyu katkılı kemik unlu katı besiyeri hazırlanmıştır. Kısmi saflaştırılan enzimden 60µL katı besiyerlerine damlatılarak bakterinin üretildiği sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Radha ve Gunasekaran, 2007).

3.5.41. Keratinaz Enzimlerinin Ham Tüy Eritme Deneyi

İzole edilen enzimler kullanılarak ham tavuk tüyünün tüp ve farklı hacımlardaki kapaklı şişelerde tüyü eritme denemeleri yapılmıştır. Tüplerde 1 mL enzim ve 9 mL 0ptimum aktivitenin

görüldüğü tampon karıştırılarak içerisine steril edilmiş ve edilmemiş tam tüy konulmuştur. Kontrol olarak aynı hacımda siteril su kullanılarak içerisine siteril edilmiş ve edilmemiş tüy konulmuş ve 30ºC de inkübasyona bırakılmıştır (Caf, 2015).

3.5.42. Tavuk Tüyü ve Kollajen Hidrolizatlarının HPLC Sistemi İle Serbest Aminoasit Profillerinin Analizi

Keratinaz ve kollajenaz enzimLerinden 1 mL alınarak 9 gr steril edilmiş tavuk tüyü unu ve kemik unu (tip-I kollajen) ile (her enzimin optimum aktivite gösterdiği tamponda çözülmüş ve steril edilmiş) karıştırılarak 30°C de 3 ve 5 gün inkübasyona bırakılarak hidroliz uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda ürünler 60°C de 2 (iki) saat kurutulup, havanda toz haline getirilmiş ve serbest amino asit profilinin saptanması için HPLC sisteminde analiz ettirilmişlerdir (Stiborova ve ark. 2016).

3.5.43. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antibakteriyel Aktivite Analizi

Enzim izolasyonunda kullanılan bakteri suşlarının bir gecelik kültürleri hazırlanmıştır. Test bakterisi olarak çoklu antibiyotik dirençliliği bulunan hastane yoğun bakım ünitesine ait *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* ve *Shigella sonnei*'den bir gecelik kültür hazırlanmış ve besiyerine 10^2 sulandırma ile yayıldıktan sonra 2 saat 37ºC inkübe edilmiştir. Bir gecelik enzim izolasyon bakteri kültürlerinden 25 µL petrilere damLatılarak 37ºC inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Tsai ve Su., 1999).

3.5.44. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etki Analizi

Steril tüplere 250µL siteril koşullarda alınmış kan örneği konulmuştur. Her bir tüpe kan miktarı kadar keratinaz ve kollajenaz enzimi eklenmiştir. Kontrol olarak boş siteril tüpe 250 µL kan ve 250 µL siteril distile su eklenmiş ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Yogesh ve Halami., 2015).

3.5.45. Keratinaz ve Kollajenaz Nnzimlerinin Gümüş Geri Kazanım Analizi

Keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin kullanılmış röntgen filmlerindeki gümüşün geri kazanılması amacıyla yapılan çalışmada izole edilen enzimLerden %1 enzim içeren tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Tamponlar 30 mL hacımda enzimLerin 0ptimum aktivite gösterdiği değerde hazırlanmıştır. Röntgen filmLerinde 2x2 boyutlarında kare şekilli parçalar kesilmiş ve şişelere bulunan enzim+tampon karışımına konularak oda sıcaklığında 150 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak sadece distile su bulunan 30 mL'lik şişeye röntgen filmi konularak inkübasyon sonunda karşılaştırma yapılmıştır (Singh ve Bajaj 2017).

3.5.46. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antioksidan Aktivite (DPPH- Serbest Radikal Giderme Aktivitesi) Analizi

DPPH• testi, antioksidanların aktivitesini değerlendirmek için geçerli, hızlı, doğru bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntem, kararlı serbest radikal DPPH•'in elektron veya hidrojen atomLarı veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bakteri tarafından üretilen renk maddesinin toplam antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 1,8g/mL' lik çözeltiden 100 µl metanol ekstraktı ile 2.9 mL DPPH çözeltisi (metanol içerisinde 6×10^{-5} M) karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dak bekletildikten sonra absorbans 515 nm'de çift ışınlı UV-Visible spektrofotometresiyle (Shimadzu 1200 UV/Vis, Japonya) ölçülmüştür. Kontrol örneği de hazırlanmış ve absorbansı tespit edilmiştir (Keçeli Mutlu ve Harp, 2014). Absorbanstaki düşüş ne kadar büyükse antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir. Antioksidan aktvite, aşağıdaki formül yardımıyla % antioksidan aktivite hesaplanmıştır.

$$\boldsymbol{Antioksidan\ Aktivitesi}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}}}{\boldsymbol{Abs_{kontrol}}}\boldsymbol{x100}$$

Abskontrol = Sadece DPPH• radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değeri

Absörnek = DPPH• radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri

3.5.47. Doğal ve Mutant Organizmadan Elde Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerin Yıkama Performans Analizi

Bacillus albus SK-36, *Brevibacillus a*gri SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ana suşlarından üretilerek kısmi saflaştırılan keratinaz ve kollajenaz enzimleri kullanılarak bebek maması, salça, çikolata ve kan lekesinin gideriminde enzimin performansı test edilmiştir. Analizlerde üç farklı deterjan ile ayrı ayrı yıkama performans uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ana suşlardan elde edilen (kimyasal ve UV mutantı) mutantlardan en geniş aktivite zonu oluşturan örneklere ait enzimLer kullanılarak yıkama performans deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla;

1-20 mL çeşme suyu + lekeli kumaş

2-20 mL çeşme suyu + %1 deterjan + lekeli kumaş

3-20 mL çeşme suyu + %1 enzim (500 U/mL) + lekeli kumaş

4-20 mL çeşme suyu + %1 enzim (500 U/mL) + % 1 deterjan + Lekeli kumaş.

Hazırlanan örnekler 180 rpm de çalkalamı inkübatör kullanılarak (*Bacillus albus* SK-36 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşları için 10°C, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Bacillus trophicus* SKK-5 suşları için 50°C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sıcaklıkların farklı seçilmesinin nedeni

bu suşlardan üretilen enzimLerin 0ptimum aktivitelerini bu sıcaklıklarda göstermeleridir) 60 dakika yıkama işlemi uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda lekeli kumaşlar çeşme suyunda durulanmış ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra görsel olarak leke giderimi değerlendirilmiştir. Aynı işlemLer mutant örneklerden üretilen enzimLerle yapılmış ve yıkama performansı açısından karşılaştırma yapılmıştır ((Pathak ve Deshmukh, 2012).

3.5.48. Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Kombinasyonunun Antibakteriyel ve Yara İyileştirme Uygulaması

Bacillus albus SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusif*ormis SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarından izole edilerek kısmi saflaştırma yöntemi ile konsantre hale getirilen enzimLerden eşit hacımda karıştırılarak enzim kokteyli hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler enfekte ağız yarası bulunan keçi ve kasık fıtığı amaliyatlı geçirmiş fakat kapanmayan yara şeklinde seyreden gönüllü bireyde uygulanmıştır. Uygulama keçide bir kez sprey şeklinde, insanda birbirini takibeden günlerde iki kez sprey şeklinde uygulanmıştır.

3.5.49. Keratin ve Kollajen Hidrolizatlarının Bitki Performans Denemeleri

Keratinaz ve kollajenaz enzimLeri ayrı ayrı kullanılarak keratin (tavuk tüy unu) ve kollajen (kemik unu) yapılarının hidrolizi sonucu elde dilen amino asit çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak bitki gelişimi ve performansına etkisninin araştırılması için biber ve karanfil uygulamalarında test edilmiştir. Hazırlanan karışımdan kullanım aşamasında 1:9 oranında sulandırma yapılmış ve biber örneğine 20 mL/hafta olacak şekilde kök bölgesinden uygulama yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan bibere aynı periyotta 20 mL çeşme suyu verilmiştir. Uygulama 14 günlük periyot sonunda sonlandırılmıştır (Kontrol biberin kuruması üzerine). Çalışma sonunda biberde yapraklanma sayısı, yaprak rengi, çiçeklenme sayısı, gövde ve dallarda gelişim ile biber verimi ve biberin kızarma durumu değerlendirilmiştir (Liya ve Umesh, 2023).

Aynı karışımın çiçek üzerindeki etkisinin saptanması için karanfil uygulaması gerçekleştirilmiştir. Karanfil uygulamasında da 1:9 oranında sulandırılan amino asit karışımından iki kez 20 mL miktarda kök uygulaması gerçekleştirilmiştir. Toplam 7 günlük çalışma sonunda yapraklanma ve yaprak rengi, çiçek rengi, tomurcuklanma, çiçek açılım oranı ve parlaklığı, yeni çiçek sayısı değerlendirilmiştir (Liya ve Umesh, 2023).

3.5.50. Keratin ve Kollajen Hidrolizatlarının Etlik Piliçlerde Performans Artışı ve Yem Değerlendirmeye Etkisi

Tavuk tüyü ve kollajen ihdrolizatları 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 1:9 sulandırılarak kullanılmıştır. Hidrolizat uygulaması haftada bir kez ve tüketilen toplam yemin %2 si oranında içme sularına eklenerek gerçekleştirilmiştir (Yemler %2-4 oranında ham protein karıştırılmektedır). Dönem sonunda kümesteki tavukların bireysel ve toplam ağırlıkları tartılarak hidrolizat

uygulanmayan kümes ile karşılaştırılmıştır. Dönem sonunda elde edilen toplam canlı hayvan ağırlığı ve tüketilen toplam yem miktarı karşılaştırılarak yemin performansa dönüşme orenı bulunmuştur (Chen ve ark. 2017).

3.5.51. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Amilaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek ve aktivitesini zimogram analizi ile incelemek için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970).

3.5.52. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10)

Keratinaz enzimi için %1 kazein, kollajenaz enzimi için %1 jelatin içeren %10'luk ayırıcı jel hazırlanmıştır. Jel bileşimi çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.34. Keratinaz ve kollajeaz enzimlerinin zimogram analizi için kullanılan SDS-PAGE ayırma jel bileşimi

Çözeltiler	Kullanılan miktar
Sol A	6.6 mL
Sol B	5.0 mL
Distile su	8.3 mL
Kazein/Jelatin	1.3 mL
AMPS	66 µL
TEMED	20 µL

Çizelgede verilen oranlarda çözeltiler (AMPS ve TEMED) karıştıldıktan sonra 5 dakika degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Degaz uygulamasından sonra taze hazırlanmış AMPS ve TEMED eklenerek önceden hazırlanan cam plakalar arasına dökülerek, üst yüzey distile su ile kapatılıp, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.35. Keratinaz ve kollajeaz enzimlerinin zimogram analizi için kullanılan SDS-PAGE dengeleme jel bileşimi

Çözeltiler	Kullanılan miktar
Sol A	2 .0 mL
Sol C	2.5 mL
Distile su	5.4 mL
AMPS	66 µL
TEMED	20 µL

Polimerizasyon gerçekleştikten sonra distile su dökülmüş ve üzerine uygun şekilde hazırlanmış dengeleme jeli dökülerek, tarak yerleştirilmiş ve polimerizasyona bırakılmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tarak gözlerinden birine 10µL protein markerı, diğer gözlere örnek tamponu ile hazırlanmış analiz edilecek enzimden 20µL yükleme yapılmıştır. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilerek bir saat 25 mA de yürütme işlemi yapılmış, daha sonra 15 mA akım uygulanarak elektroforez işlemine devam edilmiştir.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, protein markerının bulunduğu jel bölümü kesilerek boya çözeltisine konularak boyama işlemi gerçekleştirilmştir. Örneklerin bulunduğu jel bölümü renatürasyon çözeltileri kullanılarak ortamdan SDS'nin uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Renatürasyon işlemi için sol-1 de 1 saat, sol-2 de 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Jel sol-3 ortamına alınarak enzimin aktivite gösterdiği sıcaklıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

Renatürasyon işleminden sonra, jel Comassie Brilland Blue ile 2 saat boyanmış ve jeldeki boyanın geri alınması için destainig çözeltisine alınarak 24 saat düşük devirde karıştırıcıda inkübasyon gerçekleştirilmiştir

Protein markerının bulunduğu jel parçası ile enzimin bulunduğu jel parçası birleştirilerek zimogram analizinde jelde aktivite zonu oluşturan protein bandının moleküler ağırlığı saptanmıştır (Arikan, 2008).

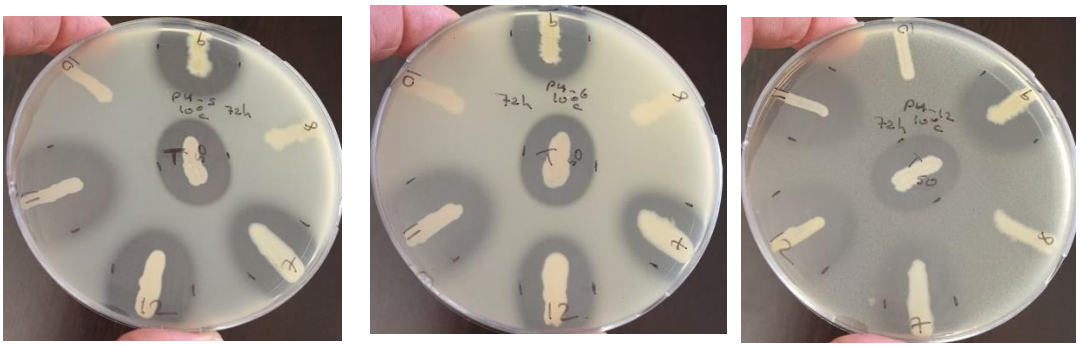
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Keratinaz ve kollajenaz enzim üreticilerinin doğadan izolasyonu, enzim üretme yeteneklerinin saptanması için toplam 568 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiştir. Bakteri izolasyonları coğrafik ve iklimsel farklılık gösteren Tuz gölü, Saklı göl, Tarsus Ardıçlı köyü ve civarında üretim yapan tavuk işletmeleri ile doğaya atılmış koyun ve keçi üretimi yapan hayvan besleyicilerin yaşam alanlarından alınan tavuk tüyü, deri, yün, kıl, keçi ayağı, çekrge, Gergedan böceği ile Adana Karataş bölgelerinden deniz suyu ve sedimenti, balık pulu, kılçık ve derisinden oluşan atık alanlarından alınan örneklerden gerçekleştirilmiştir.

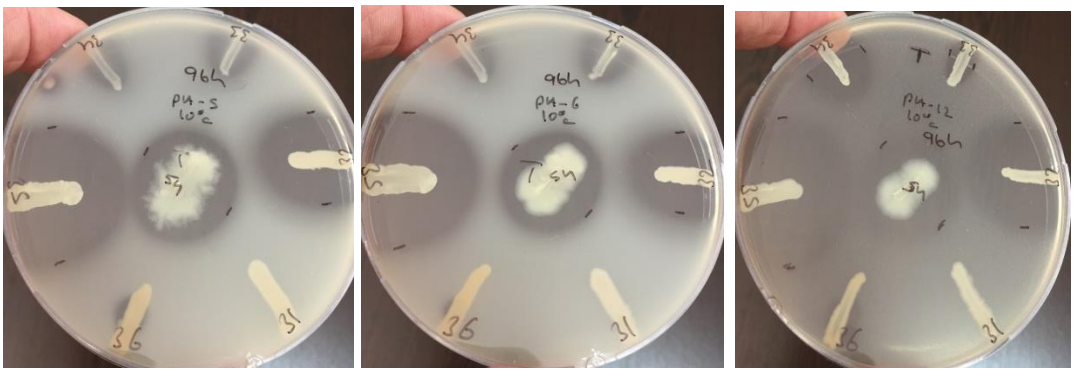
Özellikle Tuz gölü ve Ardıçlı köyü alanlarından ortam sıcaklığının 0-10ºC olduğu dönemLerde alınan örneklerden cold, alkali ve halofilik keratinaz ve kollajenaz enzim üreticileri izole edilmiştir.

Laboratuarda koloni morfolojisine göre seçilen 568 *Bacillus* sp. suşunun 497 si skimmilkli ortamda proteolitik aktivite göstermiştir. Örneklerin proteolitik frekansı %87.5 gibi oldukça yüksek bir değerdir. İzole edilen suşlar daha sonra tavuk tüyü ve kemik unlu katı besiyerlerinde keratinolotik ve kollajenolitik aktivite yetenekleri açısından taranmışlardır.

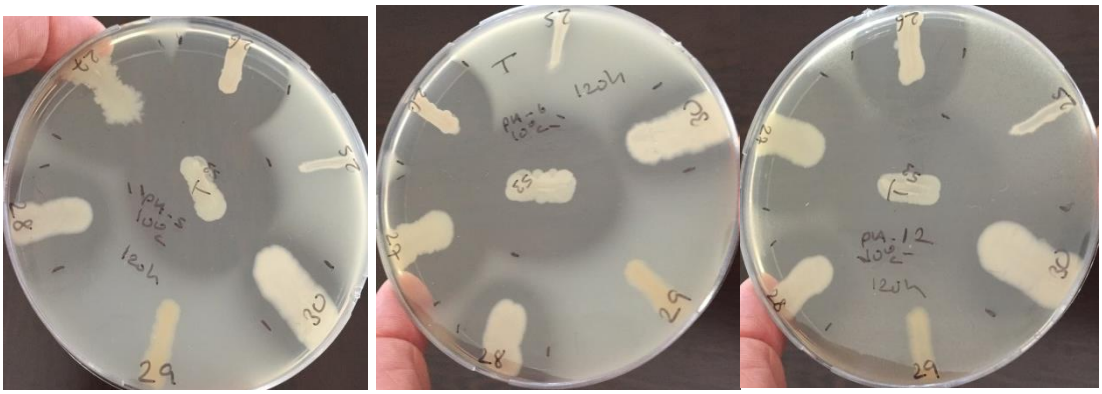
Katı besiyerinde gerçekleştirilen taramalar sonunda amaca en uygun dört suş ile devam edilmesine karar verilmiş, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanılama ile suşlar tür düzeyinde adlandırılarak enzim üretimi, karakterizasyon ve farklı uygulamalar ile önemli kazanımlar elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 72 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri



Şekil 4.2. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 96saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri



Şekil 4.3. Soğukta aktif tavuk atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri



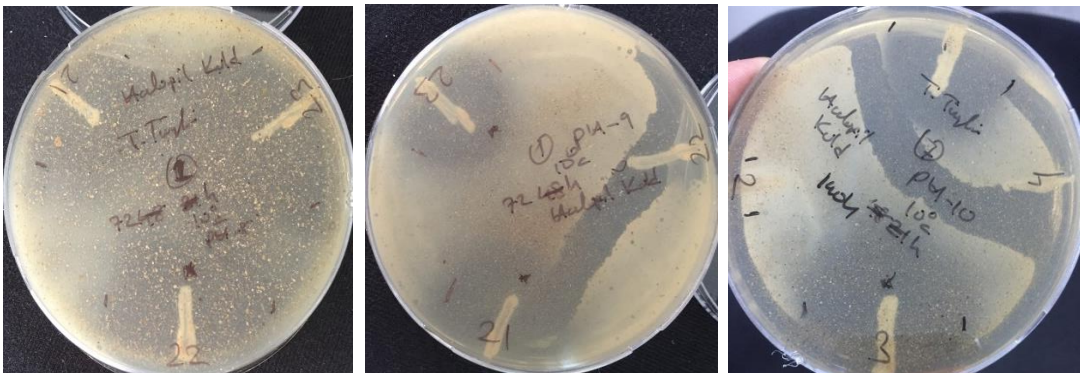
Şekil 4.4. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 96 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri



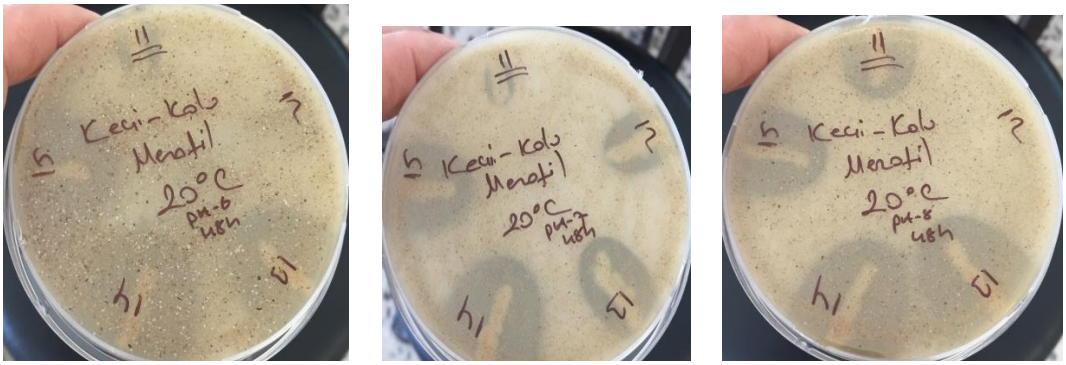
Şekil 4.5. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri

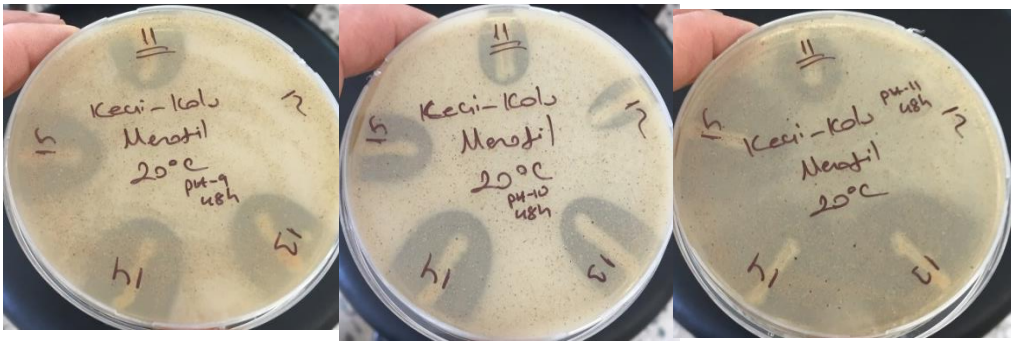


Şekil 4.6. Soğukta aktif koyun yünü atığı izolatlarının pH 5-12 aralığında, 10°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda skimmilk besiyerindeki proteolitik akriviteleri

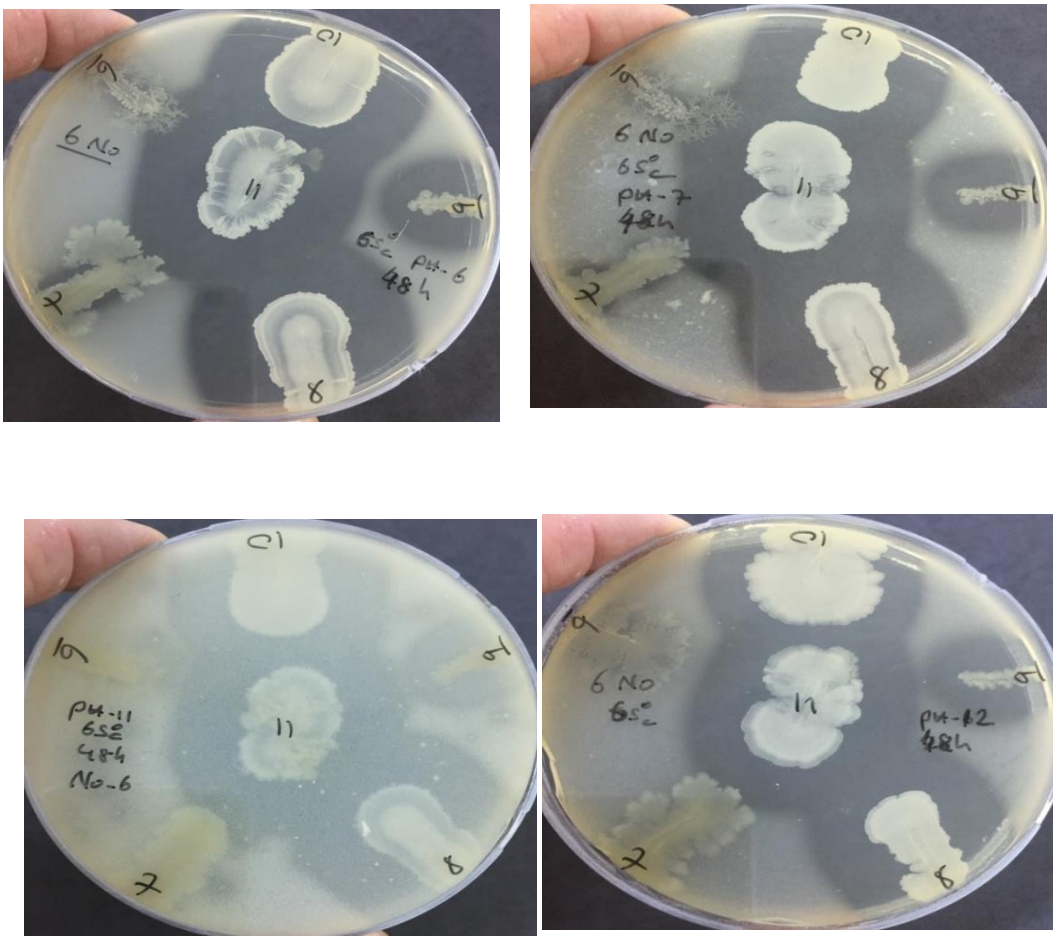


Şekil 4.7. Soğukta aktif halofil cold (Tuz gölü) izolatlarının farklı pH aralığında, 10°C ve 72-140 saatlik inkübasyon periyodunda tavuk tüylü (feather meal) besiyerindeki proteolitik akriviteleri

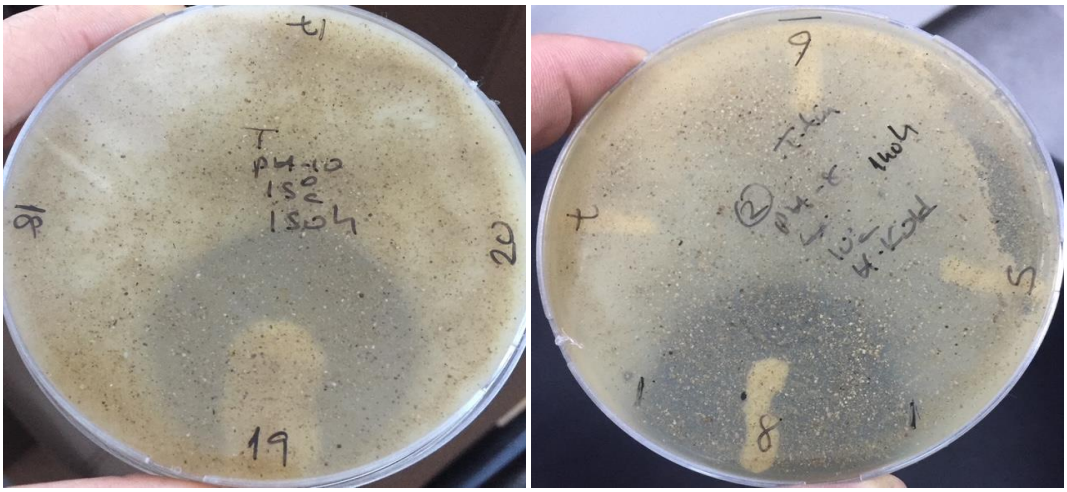




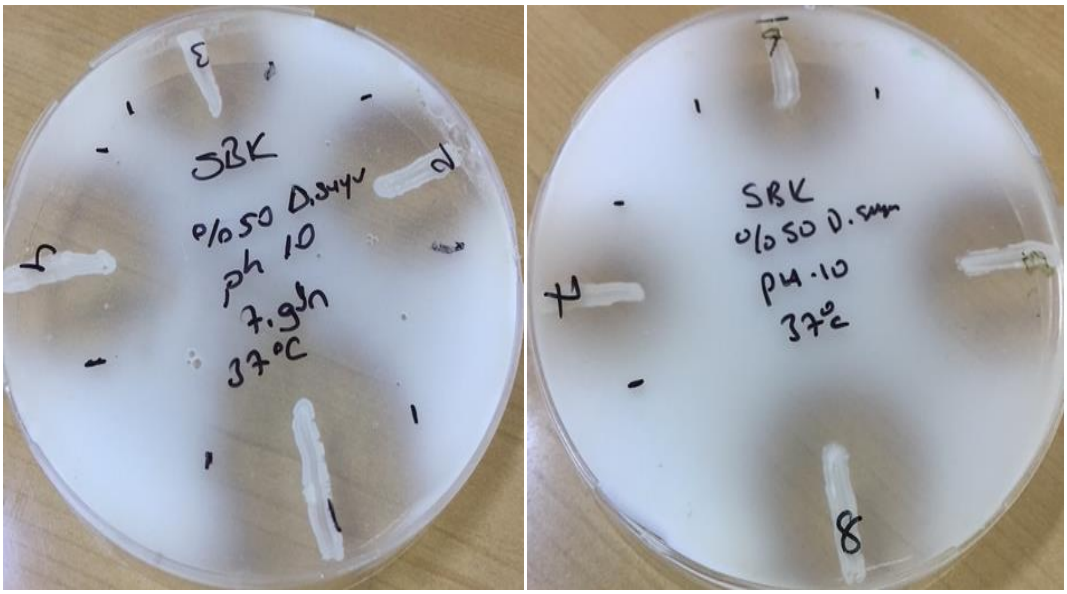
Şekil 4.8. Keçi kolu atığından izole edilen kollajenolitik suşların pH 6-11 aralığı, 20°C ve 48 saatlik inkübasyon sonunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri



Şekil 4.9. Tuz gölünden izole edilen termofilik keratinolitik ve kollajenolitik suşların pH 6-12 aralığı 65°C ve 48 saatlik inkübasyon sonunda skimmilk besiyerindeki proteolitik aktiviteleri



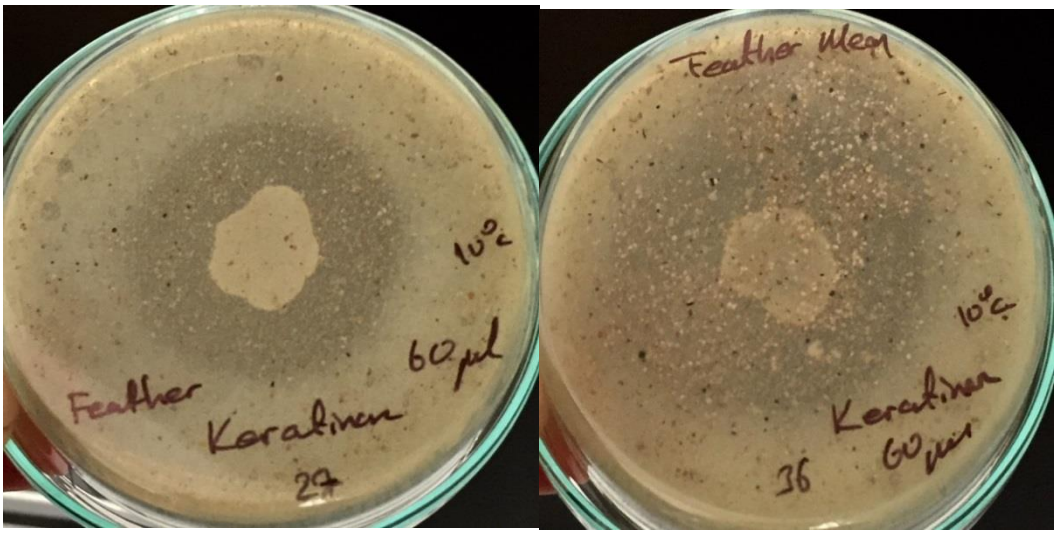
Şekil 4.10. Keratinaz üreticisi suşların tavuk tüylü besiyerindeki görünümleri



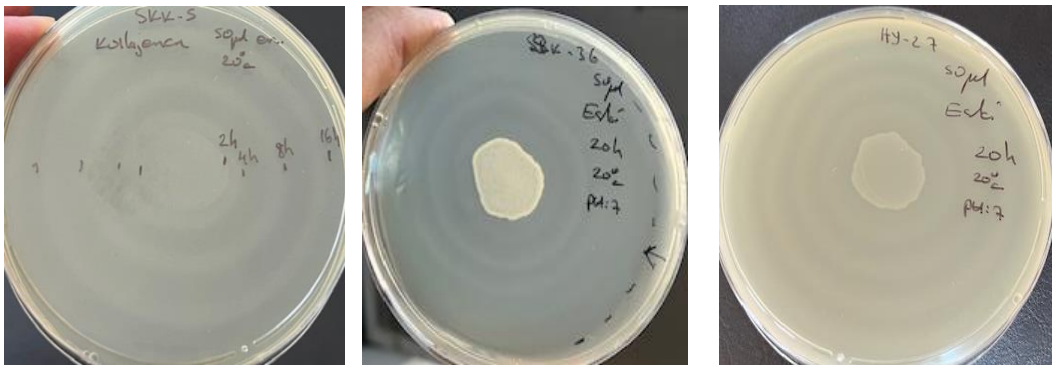
Şekil 4.11. Kollajenaz enzimi sentezleyen suşların jelatinli besiyerindeki görünümleri

4.1. Kısmi Saflaştırılan Keratinaz Enziminin Katı Besiyerinde Aktivite Sonuçları

Seçilen ve tanımlamalar ile keratinaz enzim üretimi gerçekleştirilen örneklere ait keratinaz enzimLeri pH 7.0 olan sodyum fosfat tamponunda sıvılaştırılarak tavuk tüyü unu ile hazırlanmış agar besiyerine 60µL damlatılarak 10°C de inkübasyona bırakılıp enzim aktivitesi saptanmıştır.

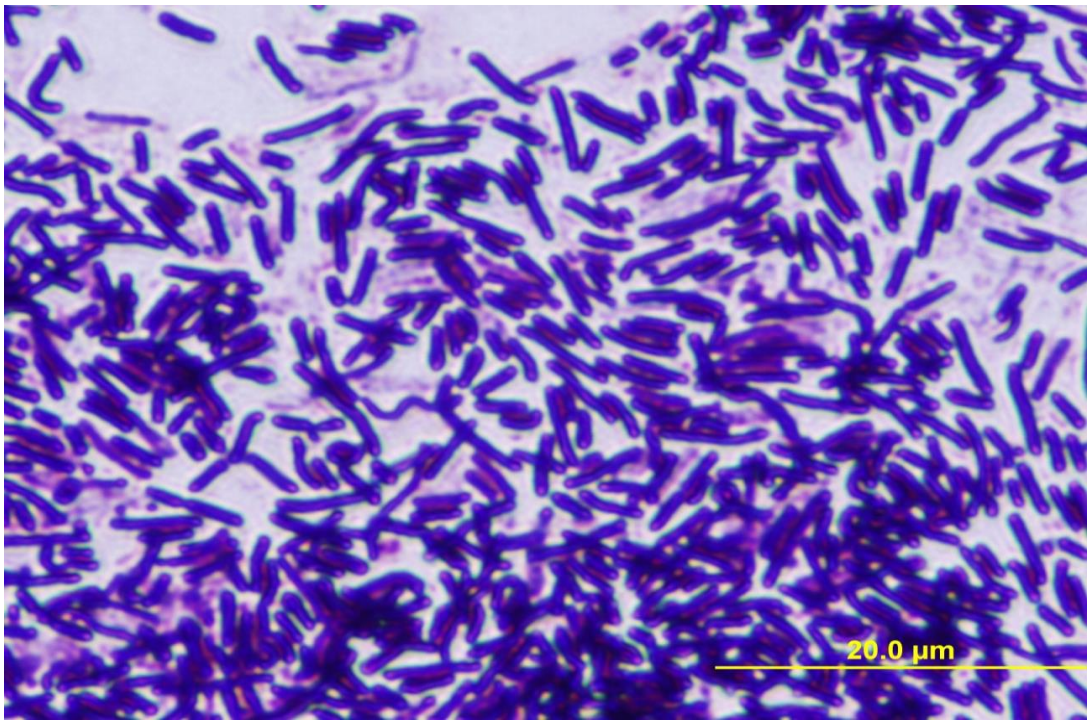


Şekil 4.12. Tavuk tüylü besiyerinde *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus a*gri SK-27 suşlarının aktivite zonları

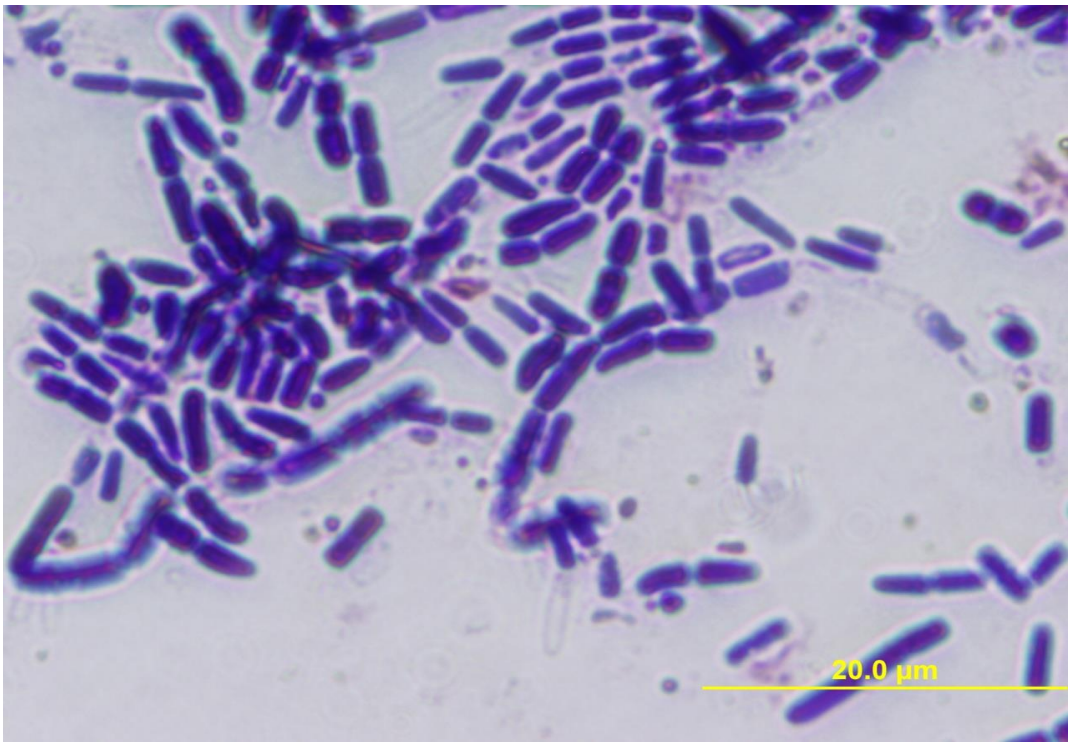


Şekil 4.13. Keratinaz ve kollajenaz üreten suşlardan izole edilen enzimlerin skimmilkli besiyerindeki aktivite davranışları

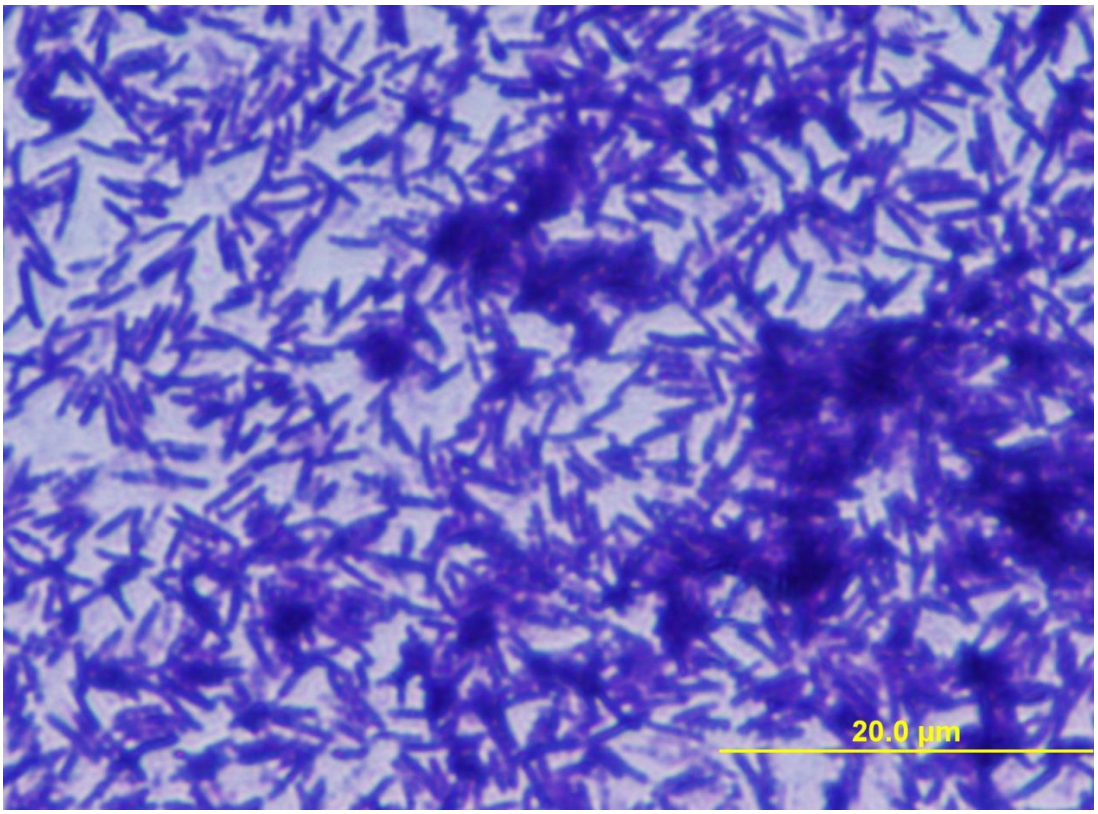
4.2. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Bulguları



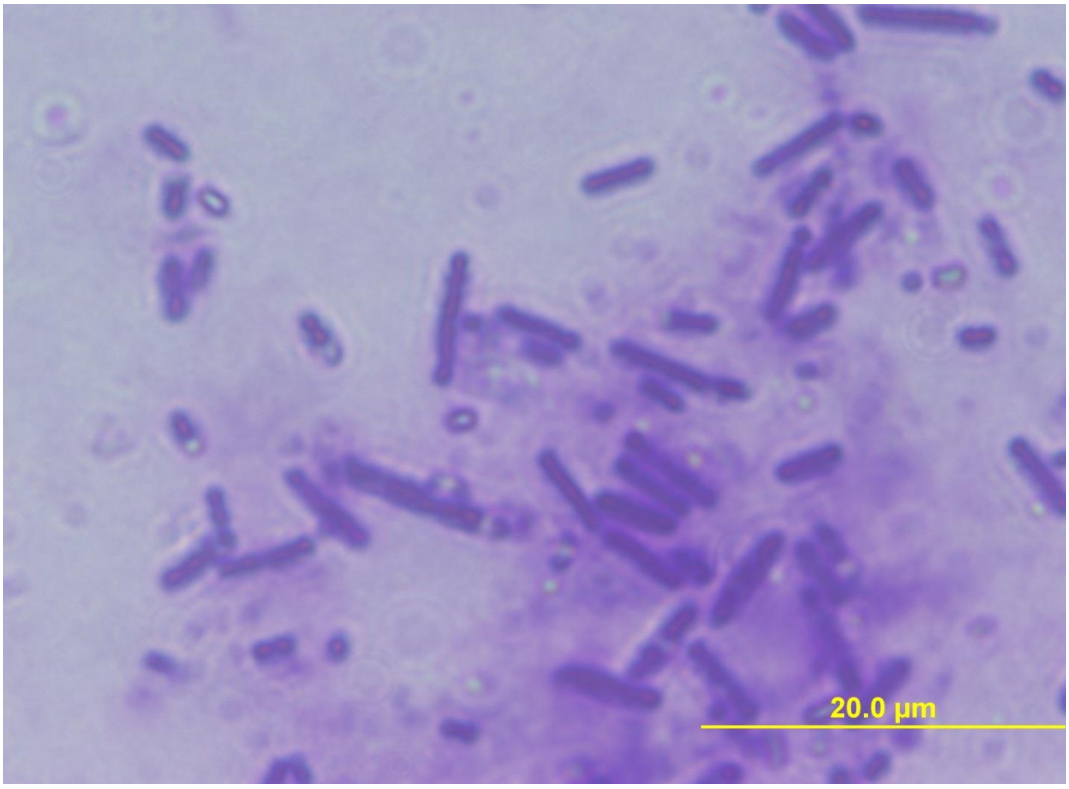
Şekil 4.94. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 (Kollajenaz enzim üreticisi)



Şekil 4.15. *Bacillus tropicus* SKK-5 (Kollajenaz üreticisi)



Şekil 4.106. *Brevibacillus agri* SK-27 (Keratinaz üreticisi)



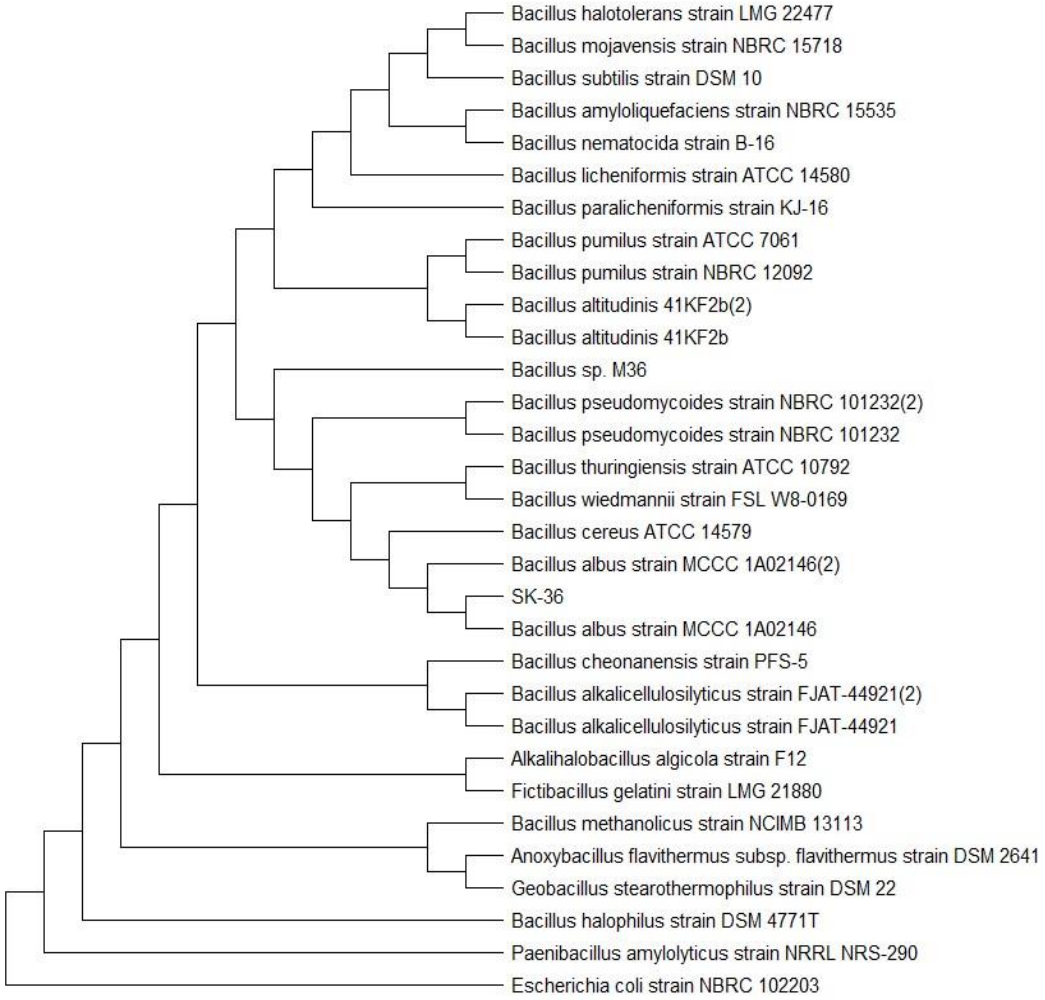
Şekil 4.117. *Bacillus albus* SK-36 (Keratinaz üreticisi)

4.3. 16S Moleküler Tanılama Bulguları

4.3.1. *Bacillus* sp. SK 36 Suşunun (*Bacillus albus* SK-36) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç

ATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCAGGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGC
TGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGC
CCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCGGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAACCAGGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACCCCTAGAGAT
AGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTG

Filogenetik analiz sonucunda analiz elden 16S bölgesinin yaklaşık 995 nükleotidden meydana geldiği bulunmuş ve NCBI gen kütüphanesinde bulunan genler ile karşılaştırılarak tanılama gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda suş *Bacillus albus* SK-36 olarak adlandırılmıştır.



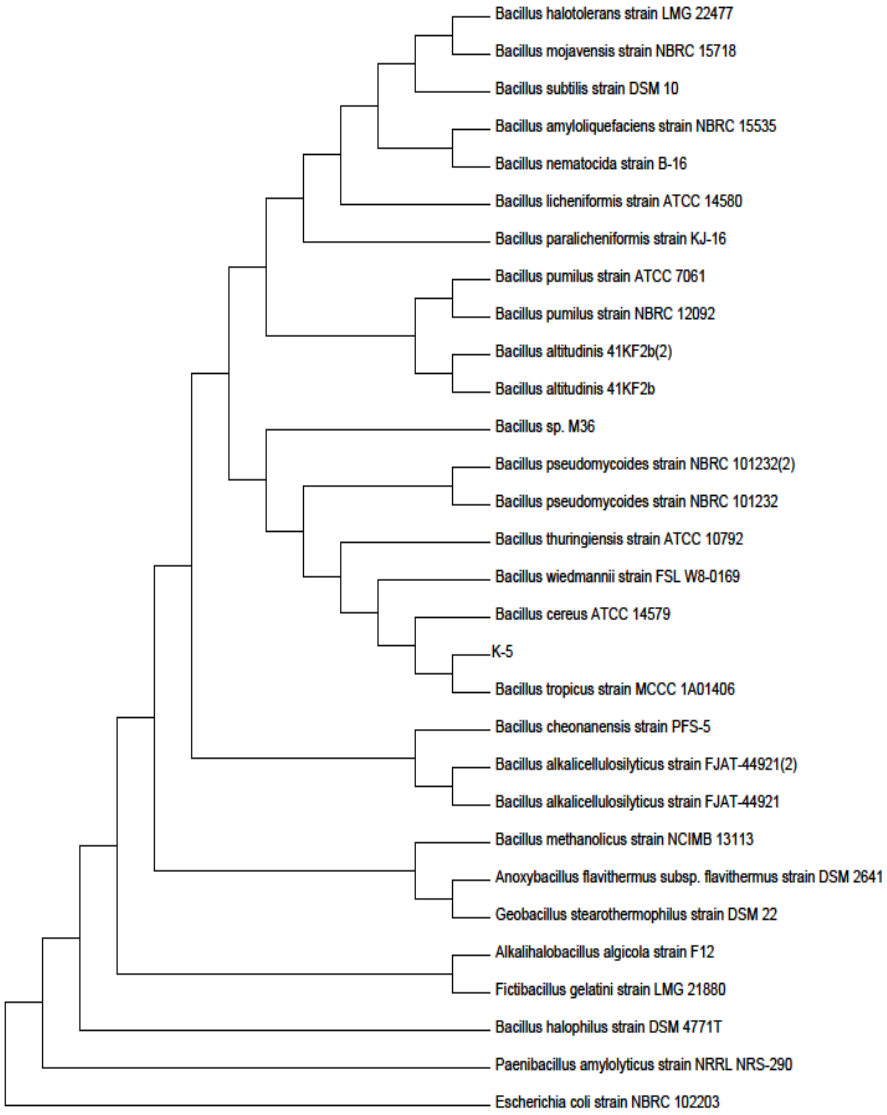
Şekil 4.128. *Bacillus albus* SK-36 suşunun filogenetik ağacı

4.3.2. *Bacillus sp*. SKK-5 Suşunun (*Bacillus tropicus* SKK-5) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç

TGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCAGGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGC
TGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG

CGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGC
CCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAACCAGGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACCCCTAGAAGAT
AGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACA

Filogenetik analiz sonucunda analiz elden 16S bölgesinin yaklaşık 998 nükleotidden meydana geldiği bulunmuş ve NCBI gen kütüphanesinde bulunan genler ile karşılaştırılarak tanılama gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda suş *Bacillus tropicus* SKK-5 olarak adlandırılmıştır.

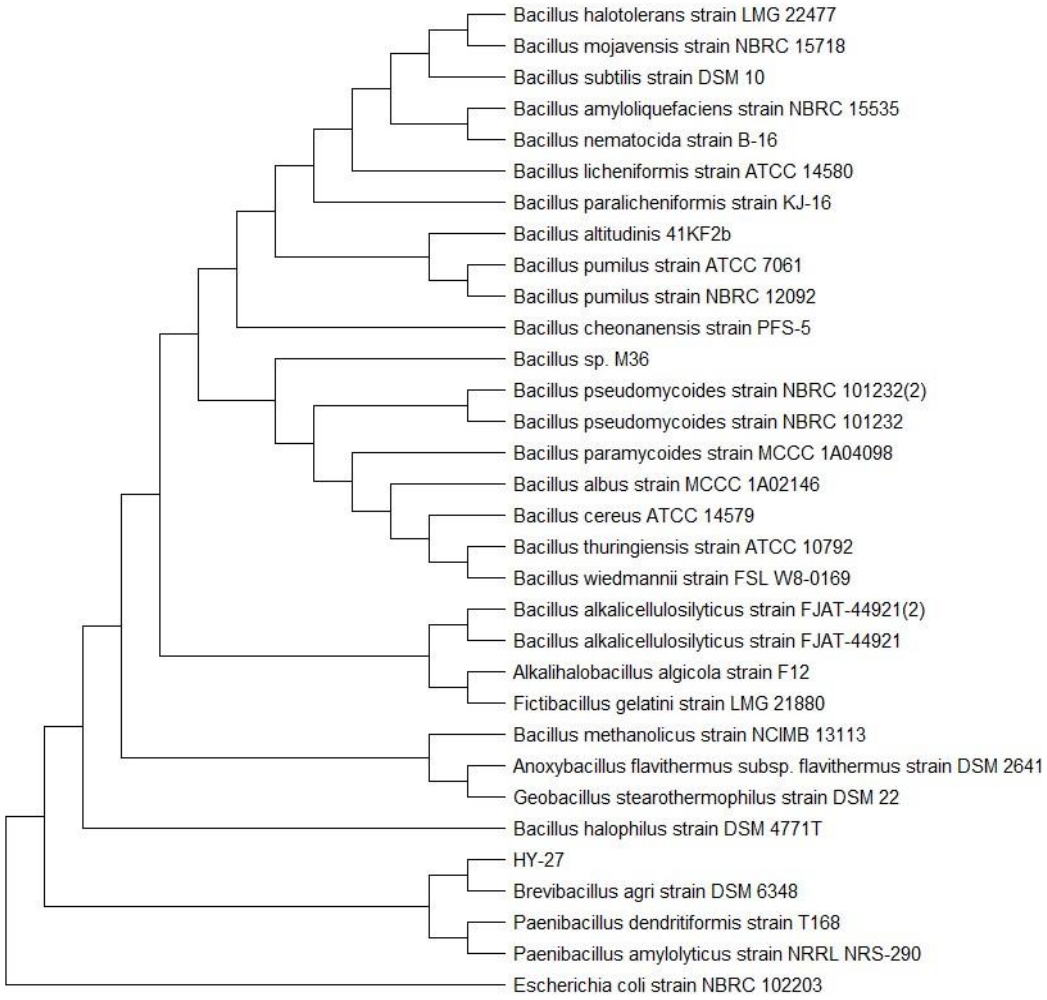


Şekil 4.139. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun filogenetik ağacı

4.3.3. *Bacillus sp.* SK-27 Suşunun (*Brevibacillus agri* SK-27) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç

CATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA
GGCACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGAAGGTT
TTTGGATCGCATGATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGC
CTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACAATGCGTAGCC
AACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCCGT
GAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACAAACACGTACCGTT
CGAACAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTTAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTCGCAT
CGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGGGGGGTTTCAATACCCTCAGTGCCGCAGCT
AACGCAATAAGCACTCCGCCCGGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAACCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGA

Filogenetik analiz sonucunda analiz elden 16S bölgesinin yaklaşık 957 nükleotidden meydana geldiği bulunmuş ve NCBI gen kütüphanesinde bulunan genler ile karşılaştırılarak tanılama gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda suş *Brevibacillus agri* SK-27 olarak adlandırılmıştır.



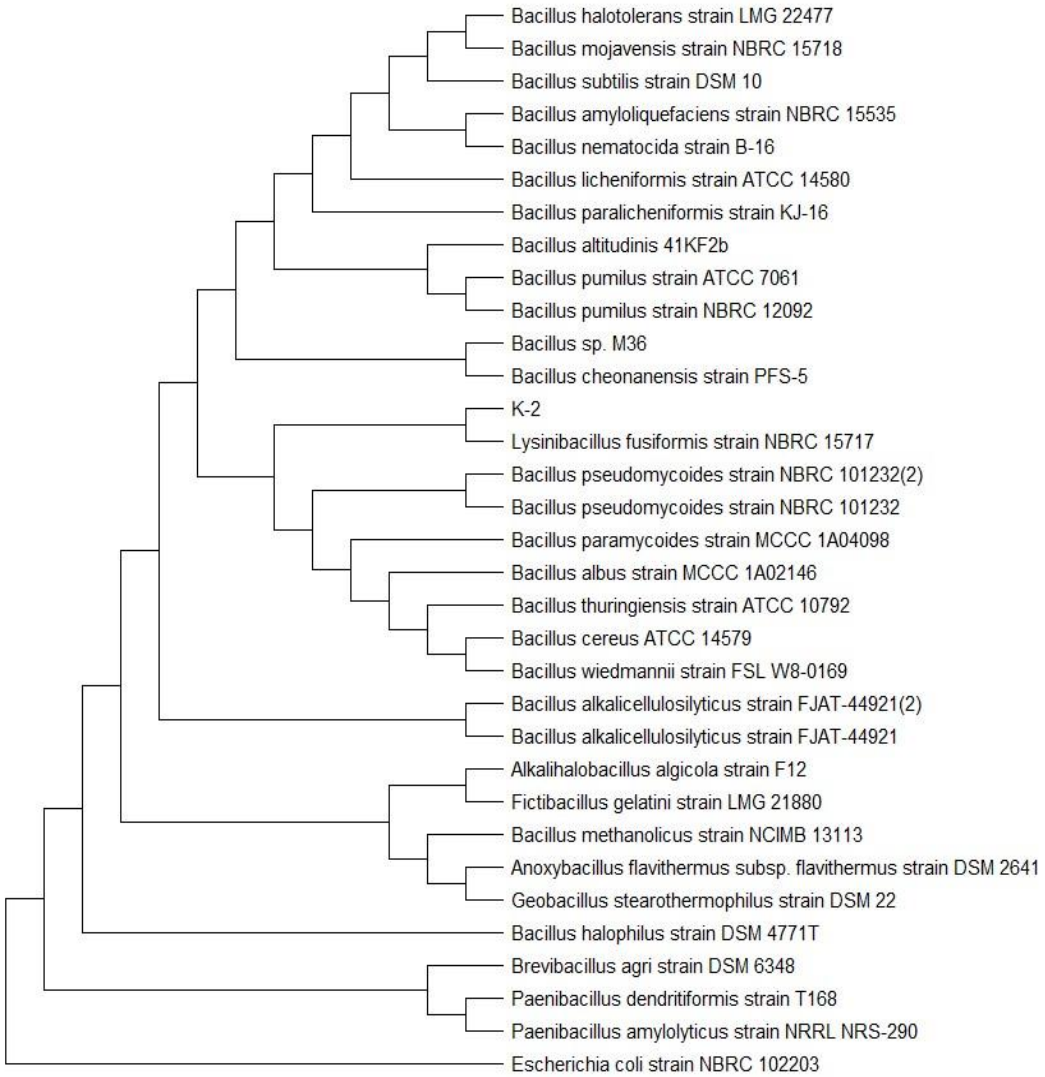
Şekil 4.20. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun filogenetik ağacı

4.3.4. *Bacillus sp*. SKK-2 Suşunun (*Lysinibacillus fusiformis*) 16S Dizi Analizi ve Filogenetik Agaç

CATGCAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCAGGGTGAAACACTGAAAGACGGTTTCGGCTG
TCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACAATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCGGTTCGTAAAACTCTGTTGTAAGGG
AAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA
ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATT
CCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TATCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA

TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTTAGGGGGTTTCCGCCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAACCAGGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATA
TAGT

Filogenetik analiz sonucunda analiz elden 16S bölgesinin yaklaşık 978 nükleotidden meydana geldiği bulunmuş ve NCBI gen kütüphanesinde bulunan genler ile karşılaştırılarak tanılama gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda suş *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 olarak adlandırılmıştır.



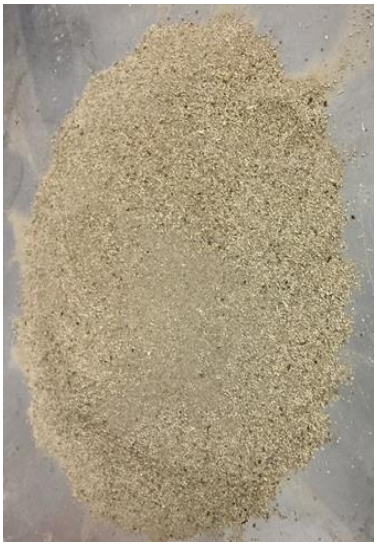
Şekil 4.141. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun filogenetik ağacı

4.4. Keratin ve Kollajen Kaynakları

Keratinaz ve kollajenaz enzim üreticisi *Bacillus* suşlarının enzim üretimi ve karakterizasyonunda kullanılacak tavuk tüyü, koyun yünüve balık atıklarının doğal ortamda çevre kirliliği yaratacak boyutta yoğun şekilde bulundukları saptanmıştır. Bu ortamlardan alınan atık yapılar laboratuarda ön yıkama işleminden sonra izole edilen bakteri suşlarından üretilen enzimler kullanılarak hidroliz çalışmaları yapılmıştır. Özellikle ham tavuk tüylerinin farklı konsantrasyonda ve tüp denemelerinde oldukça başarılı hidroliz işlemi gerçekleştirdikleri şekillerde görülmektedir. Tüp denemelerinde farklı suşların farklı süre ve konsantrasyonda hidroliz gösterdikleri şekillerde gösterilmiştir.

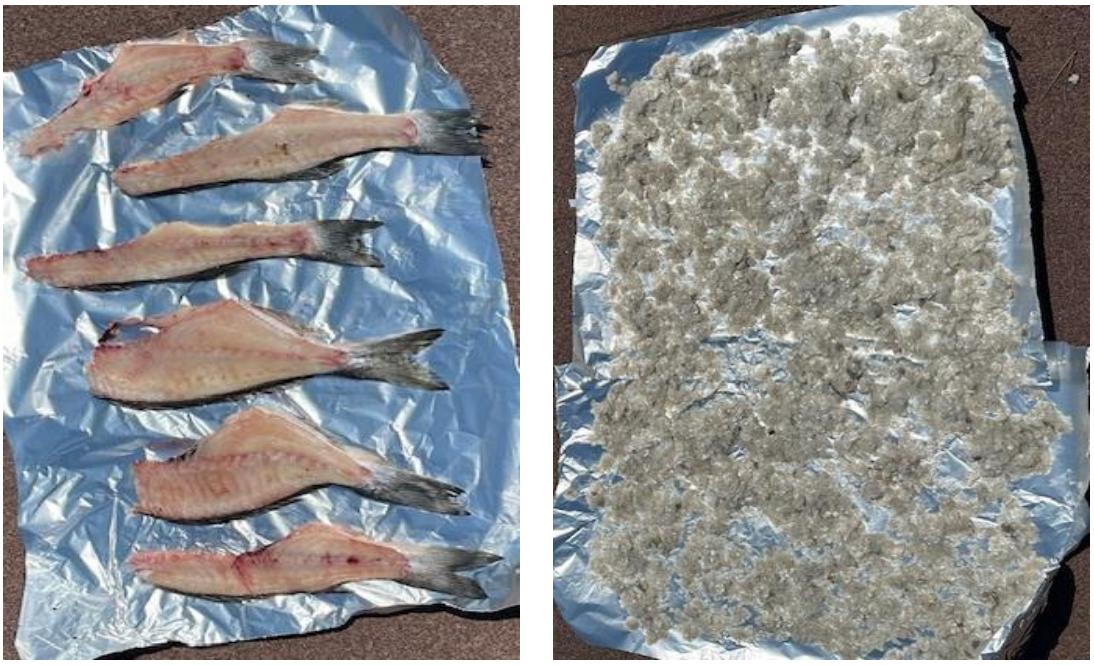



Şekil 4.22. Yün atığının doğadaki görünümü


A B C

Şekil 4.153. Tavuk tüyü atığı (A), Toz haline getirilmiş (B) Elenmiş (C)



A B

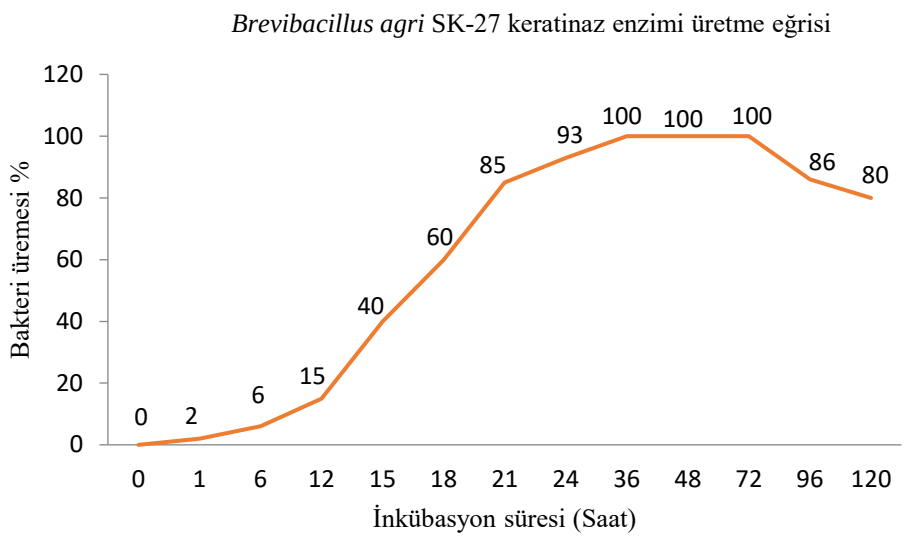
Şekil 4.164. Kollajen kaynakları. Balık derisi (A) Balık pulu (B)

4.5. Keratinaz Enzim Üretiminde Kullanılan *Brevibacillus agri SK-27* Suşunun Enzim Üretim Zamanının Saptanması

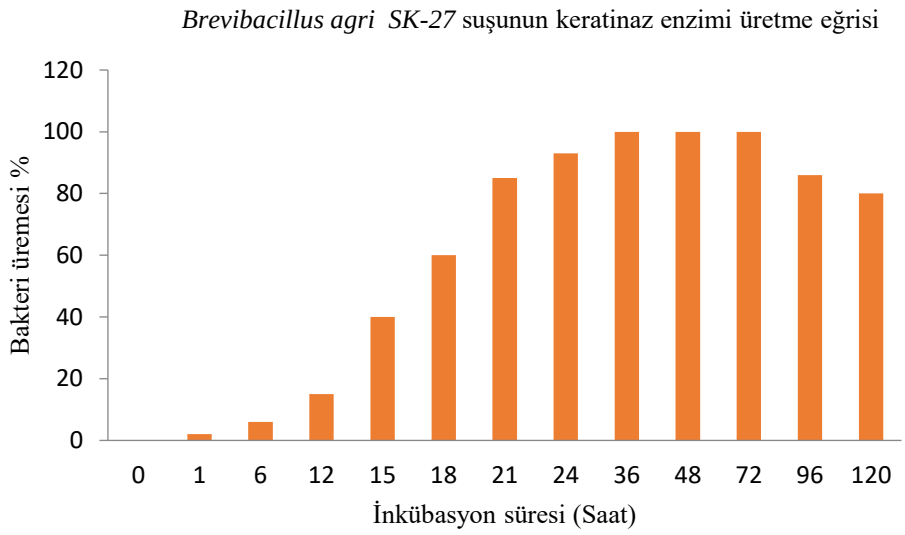
Brevibacillus agri SK-27 suşunun 24 saatlik kültüründen %5 aşılama yapılarak üreme eğrisi çalışması başlatılmıştır. Belirlenen zaman dilimlerinde ortamdan 2 mL örnek alınarak standart enzim aktivitesi analizi gerçekleştirilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşu 0-6 ıncı saatler arasında latent dönemi geçirmiş ve enzim üretimi birinci saatte %2, altıncı saatte % 6 gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi devam ettirilmiş ve sırası ile 12, 15, 18, 21 ve 24 üncü saatlerde %15, 40, 60, 85 ve 93 enzim üretimi saptanmıştır. İnkübasyonun otuz altıncı saatinde enzim üretimi %100 değerine ulaşmış ve kırk sekizinci saat ile yetmiş ikinci saatte de %100 şeklinde devam etmiştir. İnkübasyonun doksak altıncı saatinde enzim üretimi azalarak %86, yüz yirminci saatinde ise %80 seviyesine düşmüştür.

Bakterinin üreme davranışındaki değişimle birlikte enzim üretimi de buna göre şekillenmiştir. Özellikle logaritmik fazın son aşamalarına doğru enzim üretimi hızla yükselmiş ve otuz altıncı saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.25A ve 4.25B).



Şekil 4.25A.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim üretme zamanının saptanması



Şekil 4.17B.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim sentezleme zamanının saptanması

Keratinaz üretimi, üremenin durağan fazında veya logaritmik fazın sonunda en yoğun olduğu belirtilmiştir (Avdiyuk ve Varbanets, 2019). *Bacillus agri* SK-27 ve *Bacillus albus* SK-36 suşlarının enzim üretme davranışları literatür ile örtüşmektedir.

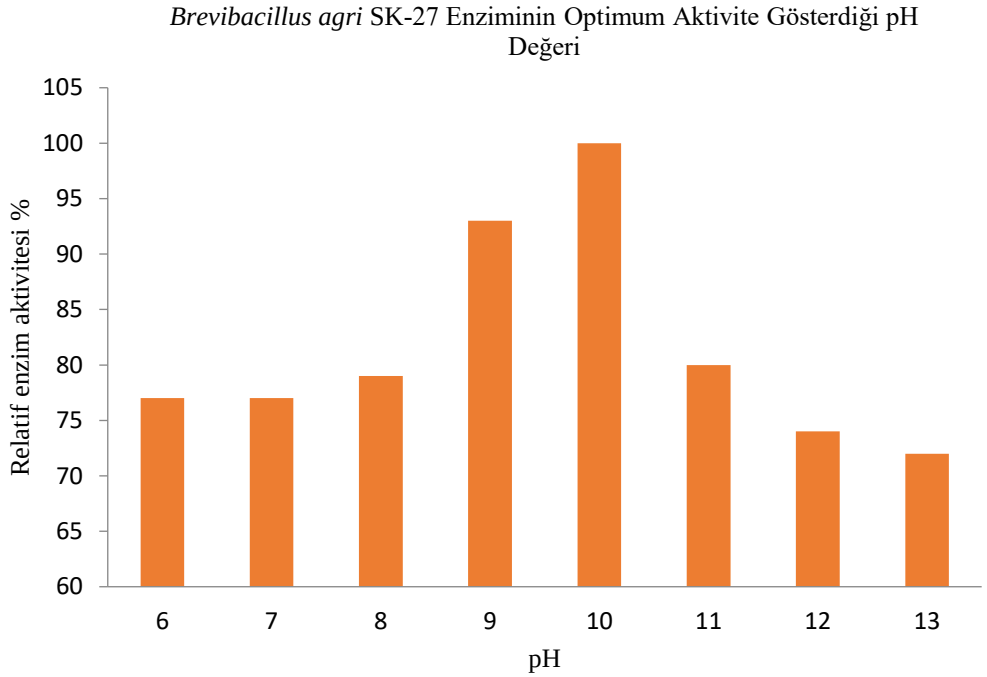
4.6. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Karakterizasyonu

Keratinaz enzimlerinin optimum pH değerlerinin saptanması için kısmi saflaştırma ile elde edilen farklı suşlara ait keratinaz enzimLeri, farklı pH değerine sahip tampon çözeltilerde hazırlanmış %1 tavuk tüyü unu kullanılıp enzimLerin üretildiği sıcaklık değerlerinde 60 dakika inkübasyona bırakılarak, standart aktivite analizleri yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonunda elde edilen en yüksek absorbans değeri 100 olarak değerlendirilip, diğer pH değerlerinden elde edilenlerle oranlanarak enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve pH aralığı saptanmıştır.

4.6.1. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değeri Sonuçları

Brevibaillus agri SK-27 keratinaz enzimi optimum aktivitesini pH 10.0 da göstermiştir. Enzim pH 9.0-10.0 aralığında yaklaşık %96.5 gibi oldukça yüksek aktivite değerine sahip olup, radikal alkali özellik göstermiştir. Enzimin pH 6.0-8.0 aralığındaki aktivitesi yaklaşık %78, pH 11.0-13.0 aralığında ise yaklaşık %75 olarak gerçekleşmiştir.

Optimum aktivitenin gerçekleştiği pH 10.0 un altındaği (pH 6.0-pH 9.0) değerlerde yaklaşık %81.5 aktivite elde edilmesi enzimin pH 6.0-10.0 aralığında 11.0-13.0 aralığına göre daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Enzim bütün pH değerlerinde oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olup, ekstrem asidik, nötral ve alkali koşullarda yaklaşık aynı etkinlikte kullanılabilecek özelliktedir. Genel olarak, keratinaz enzimlerinin optimum keratinolitik aktivite aralığının pH 7.0 ile 12,5 arasında olduğu belirtilmektedir (Qiu ve ark. 2020). İzole ettiğimiz suşlara ait keratinaz enzimlerinin pH optimumları literatür verileri ile uyum içindedir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerleri

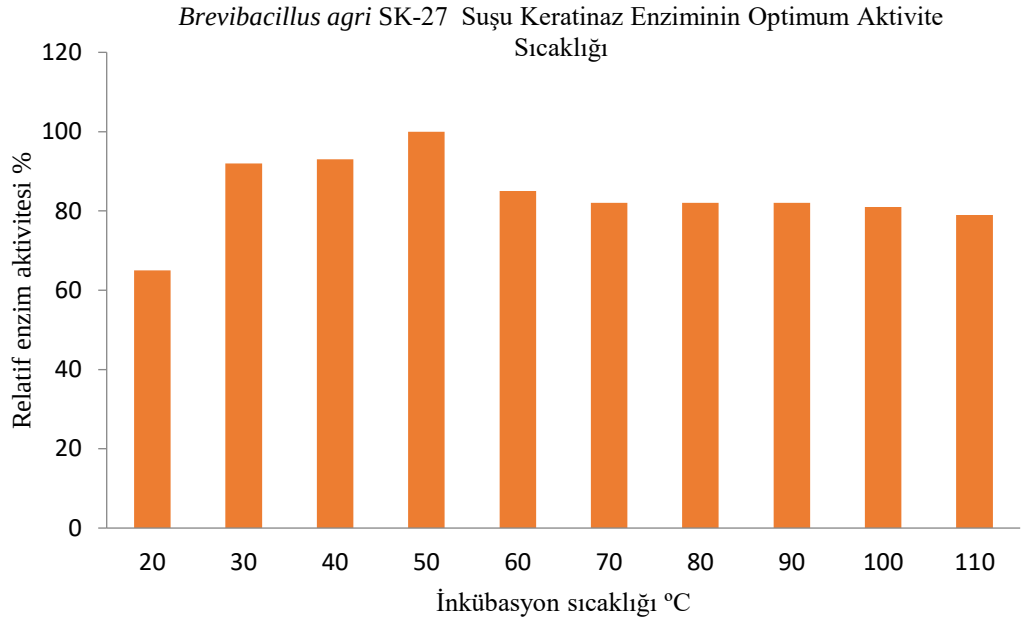
4.6.2. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değeri Sonuçları

Brevibaillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi optimum aktivitesini 50°C de göstermektedir. Enzim 30 °C de %92 aktivite gösterirken 40°C de aktivite %93,, 50°C de ise %100 ile optimuma ulaşmıştır.

Brevibaillus agri SK-27 suşuna ait keratinaz enzimi 60°C den itibaren 110°C ye kadar bütün sıcaklıklarda ortalama %82 oranında oldukça yüksek ve stabil bir aktivite göstermiştir. Bütün

sıcaklık değerleri dikkate alındığında, *Brevibaillus agri* SK-27 keratinaz enziminin ortalama %84 aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen aktivite değerleri enzimin ekstremofilik karakterde olduğunu göstermektedir. *Brevibaillus agri* SK-27 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri şekil 4.28 de gösterilmiştir.

İzole edilen enzim, optimum elde edildiği substrat bulunan tampon çözeltide 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110°C 60 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzimin sırası ile %65, 92, 93, 100, 85, 82, 82, 82, 82 ve 79 katalitik aktivite göstermiştir.



Şekil 4.27. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık değeri

4.6.3. *Brevibaillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları

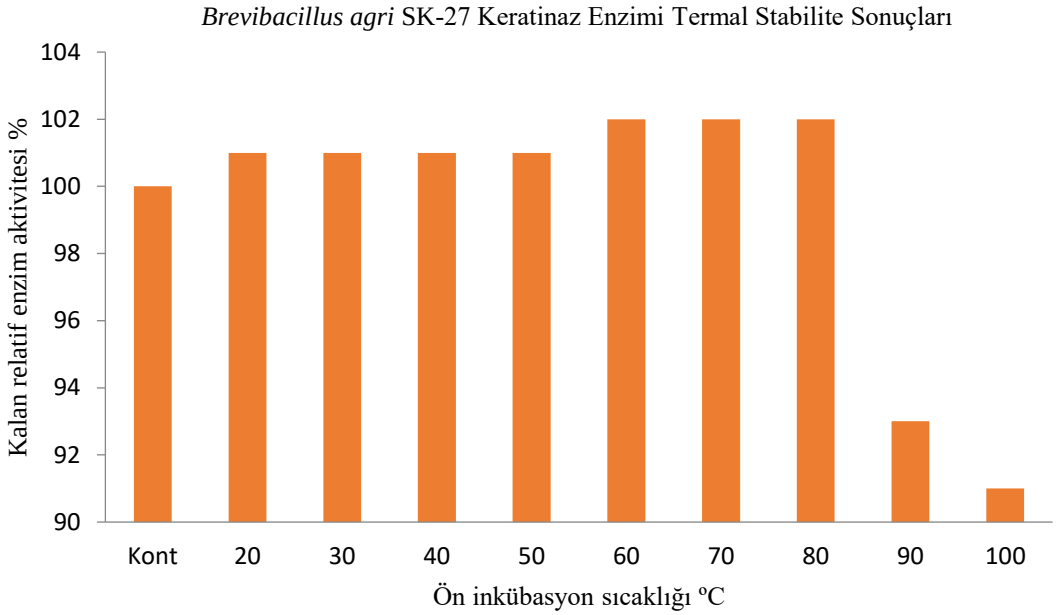
Termal stabilite analizleri için kısmi saflaştırma ile izole edilen keratinaz enzimi ile optimum aktivite sıcaklığının saptanması için kullanılan sıcaklıklarda 60 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimler optimum aktivitenin elde edildiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 60 dakika reaksiyona bırakılarak kalan aktivite değerleri saptanmıştır.

Ön inkübasyon işlemi uygulanmayan enzim optimum pH değerine sahip substrat ve optimum aktivite sıcaklık değerinde başlangıç aktivitesinin saptanması için analiz edilmiştir. Ön işlem uygulanmayan enzim reaksiyonundan elde edilen absorbans değeri 100 olarak değerlendirilip, ön işlem uygulanan enzimlerden elde edilen absorbans değerleri ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi (enzim stabilitesi) saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen enzim 60 dakika 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C lerde inkübe edilmiş ve sırası ile %101, 101, 101, 101, 102, 102 ve 102 kalan aktivite değerleri

elde edilmiştir. Enzim 20-80°C aralığındaki sıcaklıklarda kontrolden daha yüksek aktivite göstermiş ve indüklenebilir stabilite göstermiştir. İnkübasyon sıcaklığı 90 ve 100 °C ye yükseltildiğinde aktivite hızla düşerek sırası ile %93 ve 91 kalan aktivite değeri elde edilmiştir.

Her nekadar 90 ve 100°C lerde kontrole göre yaklaşık yaklaşık %7 ve %9 aktivite kaybı olsada bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığında enzim yaklaşık %99 stabilitesini korumuştur. Bu özellikler enzimin ekstrem termosatbil özellikte olduğunu göstermektedir (Şekil 4.28).



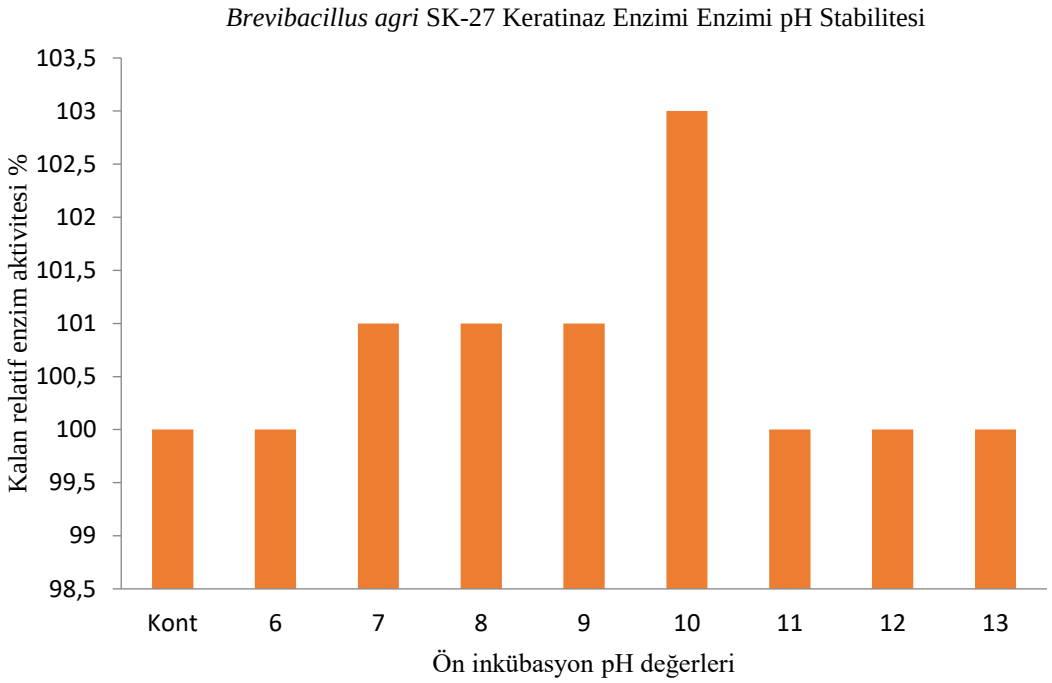
Şekil 4.188. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Termal Stabilite Sonuçları

4.6.4. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin pH Stabilitesi Sonuçları

Brevibacillus agri SK-27 suşunun pH stabilitesinin saptanması için stok keratinaz enzim çözeltisinden 2 mL enzim çöktürülerek üzerine 2 mL farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler eklenip homojenizatörde çözülmüştür. Enzim 37ºC de 40 saat ön inkübasyona bırakılmış standart aktivite analkizi ile enzimin stabilitesi saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun enzimi 40 saat süre ile 37ºC de farklı pH tamponlarında ön inkübasyona bırakılmış ve analiz edilen bütün pH değerlerinde orijinal aktivite değeri ile tam bir uyum göstermiştir. Enzim pH 11.0-13.0 aralığında stabilitesini %100 korumuştur. Enzim pH 6.0-10.0 aralığındaki değerlerde orijinal aktiviteye göre %1 indüklenerek ortalama %101 aktivite değerine ulaşılmıştır. Bununla birlikte pH 10.0 da aktivite %3 indüklenerek %103 kalan aktivite değerine ulaşılmıştır. Enzim genel olarak indüklenme davranışı göstermiştir. Enzim bu özellikleri ile bütün pH değerlerinde asido alkali stabil özellikte olup, indüklenebilir enzim özelliğine sahiptir. İzole edilen enzim, optimum aktivite gösterdiği pH değerinde diğer pH değerlerine göre yaklaşık %103 stabil kalmıştır (Şekil 4.29)

Keratinaz enziminin, 16 saat boyunca geniş pH (8.0–12.0) aralığında %90 stabilitesini korumuştur. Enzimin bu özellikleri saflaştırılmış keratinazın deri endüstrileri gibi aşırı pH gereksinimlerine sahip endüstriler için yeni bir aday olduğu anlamına gelmektedir (Sanghvi ve ark., 2016). İzole ettiğimiz enzimin 40 saatlik ön inkübasyon sonunda %100 stabilitesini sürdürmesi literatür verilerine göre oldukça güçlü bir enzim olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.29. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzimi pH stabilite bulguları

4.6.5. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine NaCL Etkisi Sonuçları

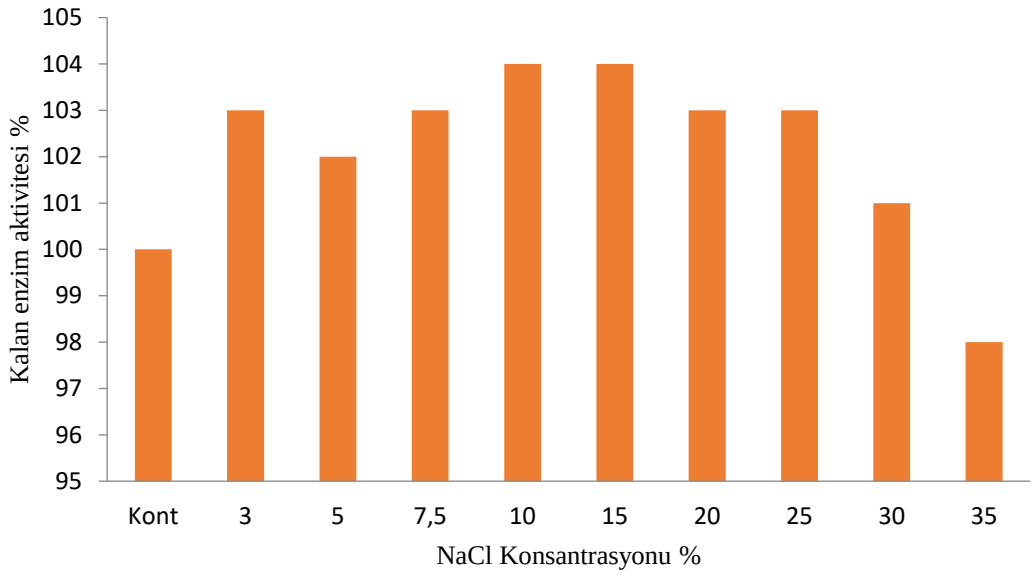
Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi farklı konsantrasyona sahip NaCL çözeltilerinde 37ºC de 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizi ile kalan enzim aktivitesi saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 keratinaz enzimi %35 dışındaki bütün NaCl konsantrasyonlarında tam bir stabilite göstermiş ve aktivite orijinale göre artış göstermeiştir. Enzim %30 NaCl konsantrasyonuna kadar indüklenmiş ve ortalama %103 aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim en yüksek aktiviteyi %10 ve 15 NaCl konsantrasyonunda %104 ile göstermiştir.

Keratinaz enzimi %3-35 aralığında sırası ile ortalama %103, 102, 103, 104, 104, 103, 103, 101 ve 98 aktivieye sahiptir. Enzim NaCL konsantrasyonu arttıkça indüklenenerek en yüksek aktivitenin elde edildiği konsantrasyona göre orta düzeyde halofilik özelliktedir. Bununla birlikte %35 konsantrasyonda %98 aktivite göstermesi enzimin ekstrem halofilik koşullarda da kontrolden daha yüksek aktivite ve stabilite değerine sahip olduğunu göstermektedir.

Enzim bütün NaCL konsantrasyonlarında %100 ün üzerinde aktif ve stabil kalmıştır. İzole edilen enzim ekstrem halostabil koşullarda da indüklenebilir enzim özelliği göstermektedir. Enzim bu özelliği ile halofilik uygulamaların gerçekleştirildiği bütün endüstriyel proseslere uygundur. Ayrıca yüksek tuz etkisi nedeni ile verimliliğin düşmesinde neden olan bitkisel üretim alanlarında kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir. İzole edilen enzim ve enzimin üretildiği *Brevibacillus agri* SK-27 suşu tuz stresine karşı bitkiye ciddi avantaj sağlayacaktır. Enzim üksek alkali ve tuz koşullarının hakim olduğu deri endütrisinde uygulandığında, yüksek etkinlik oluşturacak posansiyele sahiptir. (Şekil 4.30).

Brevibacillus agri SK-27 Keratinaz Enzimine NaCL Etkisi



Şekil 4.30. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim aktivitesine NaCL etkisi

4.6.6. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine Kimyasalların Etkisi

İzole edilen enzimin farklı kimyasallara karşı davranışının saptanması için pH 7.0 tamponunda sıvılaştırılmış olan enzim çözeltisinden çöktürme yapılarak aynı hacımda kimyasal ajan ile tekrar sıvılaştırılmış ve 37ºC de 40 saat ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnhibitör, metal iyonları, şelatör, deterjan, yüzey aktif bileşik, üre, metal iyonları ve okside edici ajanlar 5 ve 10 mM iki farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Ön inkübasyon uygulamasından sonra standart aktivite analizi yapılmış ve kalan enzim aktivitesi saptanmıştır.

Kontrol olarak ön işlem görmemiş pH 7.0 tamponunda sıvılaştırılmış enzim kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Kontrol analizinden elde edilen absorbans değeri 100 olarak değerlendirilmiş, inhibitör ve diğer kimyasallar ile elde edilen absorbans değerleri ile karşılaştırılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin 10 mM konsantrasyonda inhibitör ve kimyasallar ile gerçekleştirilen çalışma sonuçları şekil 17 de verilmiştir.

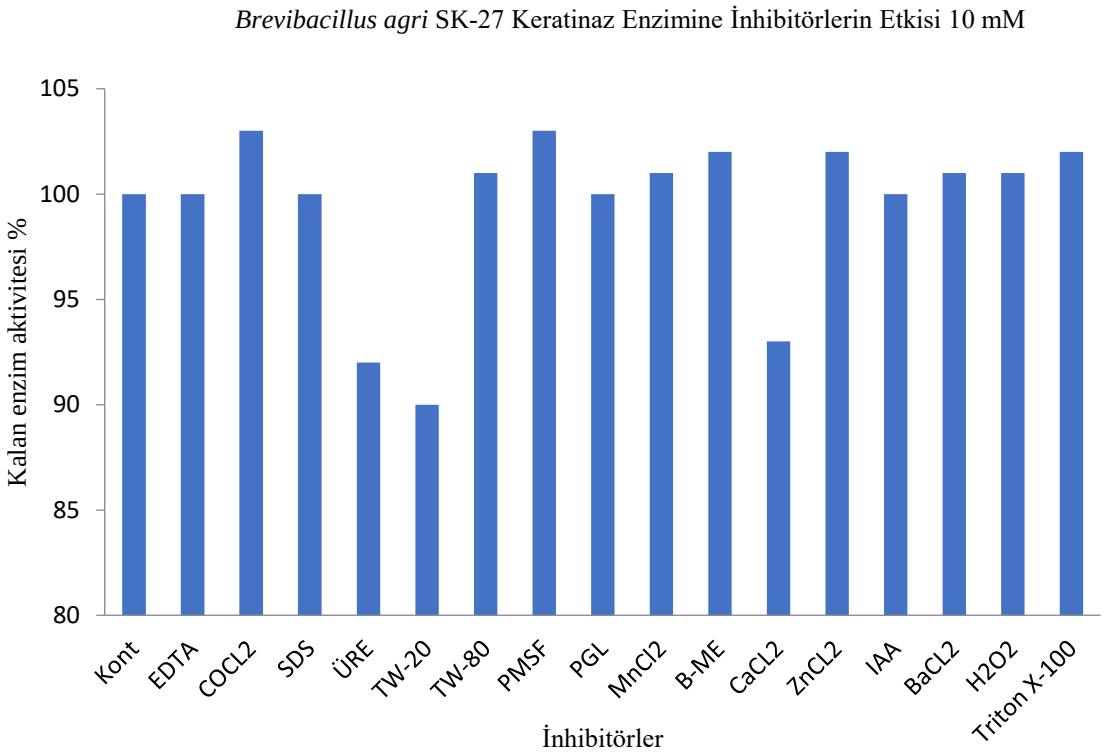
Brevibacillus agri SK-27 mezo termofil alkaline keratinaz enziminin 10 mM EDTA, $CoCl_2$, SDS, ÜRE, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCl_2$, β-mercaptoethanol, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, IAA, $BaCl_2$, H_2O_2 ve Triton X-100 ajanları ile analiz edilerek enzim aktivitesindeki katalitik davranış araştırılmıştır.

Analiz edilen enzim yüksek konsantrasyondaki bileşiklere sırası ile %100, %103, %100, %92, %90, %101, %103, %100, %101, %102, %93, %102, %100, %101, %101 ve %102 aktivite göstermiştir.

Enzim ürede %8, Twen-20 de %10 ve $CaCl_2$ de %7 düzeyinde inhibe olmuştur. İzole edilen enzim orijinal aktivitesini EDTA ya karşı %100 korumuştur. PMSF ile yapılan analizde ise %3 oranında aktivite artışı gerçekleşmiş ve %103 oranında kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Her iki inhibitörde izole edilen enzimde inhibisyona neden olmamıştır. SDS deterjanı kullanıldığında %100, Triton X-100 deterjanında ise %102 enzim aktivitesi elde edilmiştir.

İzole edilen enzim H_2O_2 e karşı %101 direnç göstererek okside edici ajanların kullanıldığı üretim proseslerinde kullanılabilir özellikte olduğunu göstermiştir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi $ZnCL_2$ lü ortamda indüklenerek aktivitesinde orijinal aktiviteye göre %2 artış meydana gelmiştir. Enzimin anyonik ve nananyonik deterjanlardan etkilenmemesi deterjan formülasyonlarında kullanım için oldukça güçlü bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Enzim Üre, tween-20 ve CaCl2 ajanları ile muamele edildiğinde sırası ile %8, %10 ve %7 oranında inhibe olmuştur (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin 10 mM kimyasallara karşı davranışı

İzole edilen keratinaz enzimi genel olarak 5 mM inhibitör ve kimyasal konsantrasyonunda 10 mM konsnatrasyona göre indüklenerek stabil kalmanın ötesinde enzimde aktivite artışı gerçekleşmiştir.

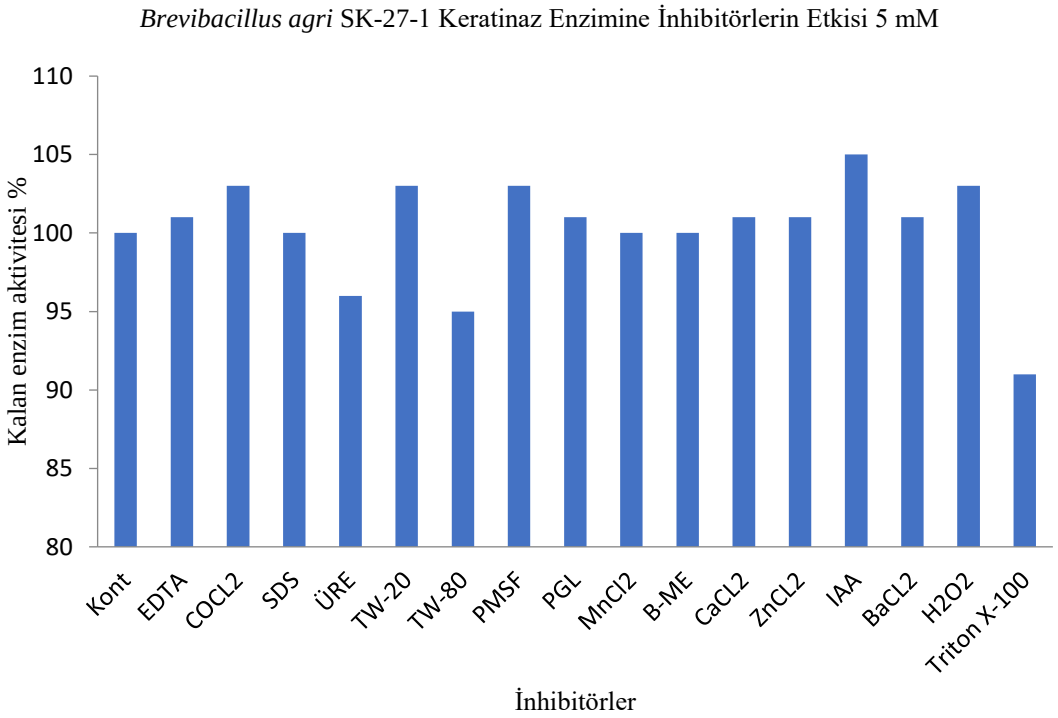
İzole edilen enzim IAA ile %105 indüklenerek en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim EDTA ile %101, PMSFS ile %103 aktivite göstermiştir. Her iki inhibitörde enzim aktivitesini inhibe etme yerine indüklemiştir. $CoCl_2$, Tween-20 ve H_2O_2 enzim aktivitesini kontrole göre %3 artırmıştır. Üre, Twenn-80 ve Triton X-100 diğer ajanların aksine enzim aktivitesini sırası ile %4, %5 ve %9 inhibe etmiştir.

Düşük konsnatrrasyondaki (5 mM) kimyasal ajanlar enzim aktivitesinde 10 mM konsantrasyondaki bileşiklere göre indükleyici etki göstermiştir. Bununla birlik 10 mM Triton X-100 konsantrasyonunda %102 enzim aktivitesi elde edilirken, 5 mM da %9 inhibisyon gerçekleşmiştir. Keratinaz enzimLerinin metallo, serin veya Metallo-Serin proteaz özelliği gösterdikleri, genellikle hücre ekstrasellüler oldukları ve sentezlerinin keratin substratları tarafından indüklendiği belirtilmektedir (Avdiyuk ve Varbanets, 2019).

Enzim 5 mM konsantrasyonda triton X-100 ile %91 aktivite göstermiş, 10 mM konsantrasyona göre %11 inhibe olmuştur. Buna karşılık $CaCL_2$ ün 10 mM konsantrasyonunda %92 katalitik aktivite elde edilirken, 5 mM konsantrasyonda indüklenmiş ve %101 aktivite gerçekleşmiştir. Enzim 5 mM IAA'lı ortamda indüklenmiş ve %105 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim 60 dakikalık ön inkübasyonda SDS ye karşı her iki konsantrasyonda da %100 stabil

kalmıştır. Enzimin SDS den etkilenmemsi, optimum aktivitesini pH 10.0 da göstermesi deterjan formülasyonları için ideal özellikte olduğunu göstermektedir.

Enzim aktivitesi üzerine 10 mM ve 5 mM kimyasal ajanlarının etkisi karşılaştırıldığında enzim 10 mM konsantrasyonda yaklaşık %99, 5 mM konsantrasyonda ise %100 aktivite elde edilmiştir. Bu sonuçlar düşük konsantrasyonda azda olsa aktivitenin indüklendiğini göstremektedir (Şekil 4.32).



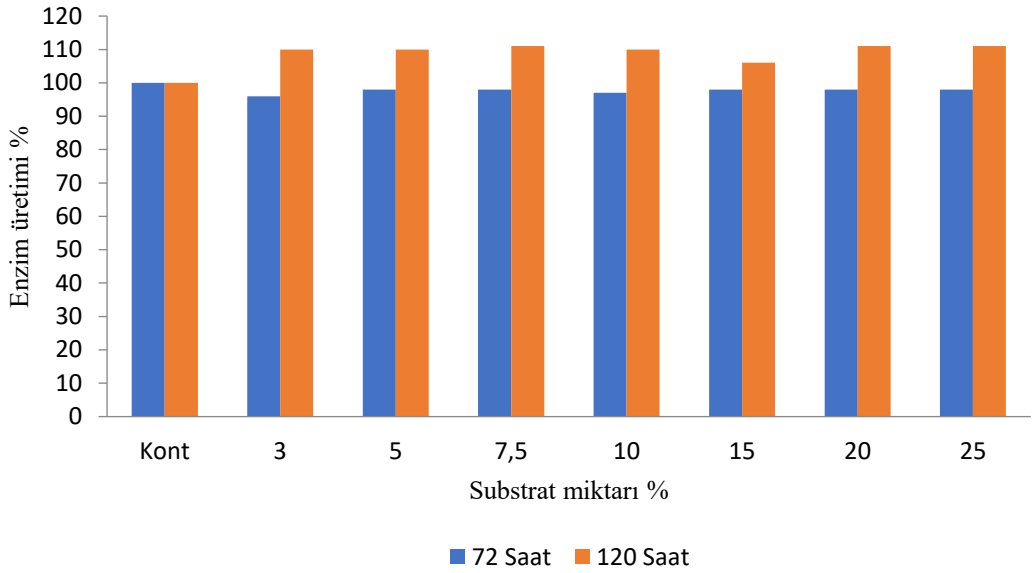
Şekil 4.32. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin 5 mM kimyasallara karşı davranışı

4.6.7. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Sıcaklık, Süre ve Substrat Miktarının Etkisi

Brevibacillus agri SK-27 suşunun optimum üreme ve enzim sentezi gerçekleştirdiği substrat miktarının saptanması için %3-25 tüy unu kullanılarak 72 ve 120 saatlik iki farklı sürede üretim gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi standart enzim aktivitesi analizi ile saptanmıştır. Kontrol olarak %1 tüy unu içeren ortamda üretim gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen bakteri 30°C de 72 saat inkübasyona bırakıldığında %3 substrat konsantrasyonunda %96 enzim üretmiştir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşu, %5-25 aralığındaki bütün konsantrasyonlarda kontorol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %98 enzim üretmiştir. Bu sonuçlar 72 saatlik inkübasyon süresinde kontrol dışındaki substrat konsantrasyonlarının tamamında *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun kontrolden yaklaşık %2 daha düşük keratinaz enzim sentezi gerçekleştirdiğini göstermektedir (Şekil 4.33).

Brevibacillus agri SK 27 keratinaz üretimine substrat miktarının etkisi



Şekil 4.33. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine substrat miktarının etkisi (30°C, 72-120 saat)

Brevibacillus agri SK-27 suşunda 30°C ve 120 saatlik inkübasyon sonunda kontrole göre enzim üretiminde önemLi ölçüde artış saptanmıştır. Yapılan aktivite analizlerinde %3 ve 5 substrat konsantrasyonunda enzim üretimi ortalama %110 artmıştır. En yüksek enzim üretimi %7.5, 20 ve 25 konsantrasyonda %111 ile elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonu %15 olan süreçte enzim üretimi kontrole göre %106 gerçekleştiği halde diğer substrat konsantrasyonlarına göre yaklaşık %4 düşmüştür.

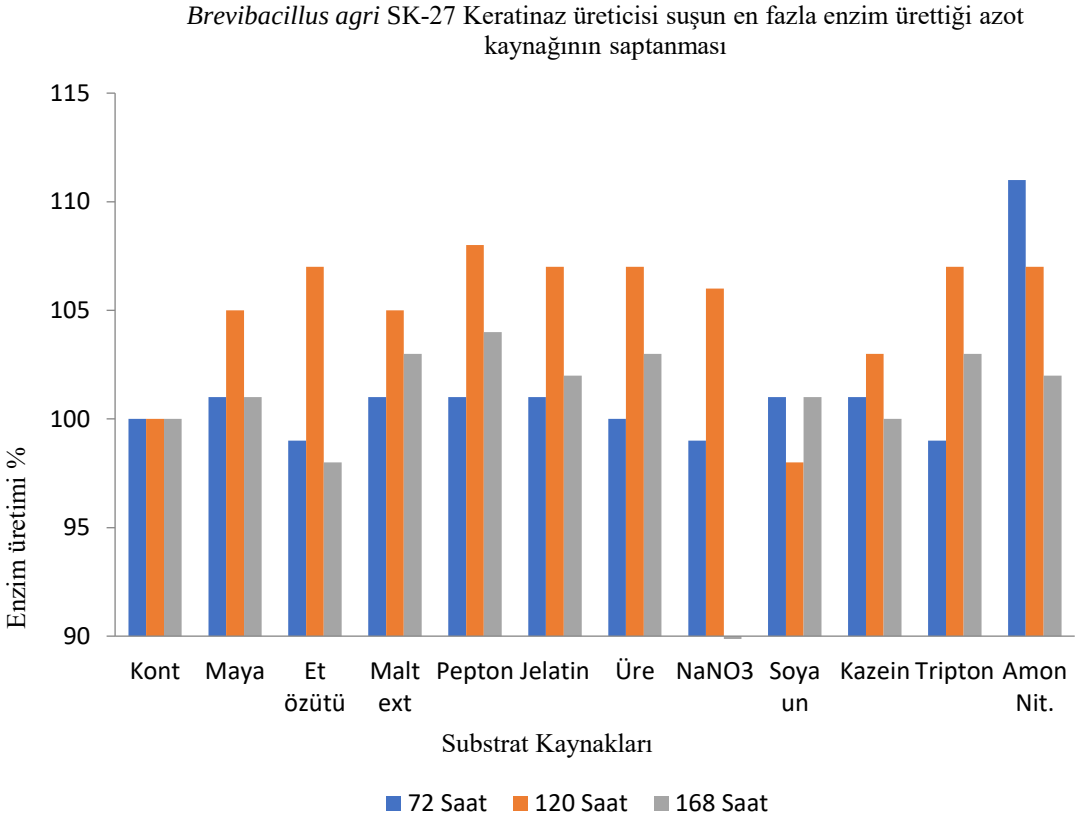
Bütün konsantrasyon değerleri birlikte değerlendirildiğinde ortalama enzim üretimi %110 olarak gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılması enzim sentezi üzerinde pozitif etki göstermiş ve kontrole göre yaklaşık %11 oranında daha yüksek enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar literatür verileri ile tam bir uyum içinde olup, literatürde en yüksek keratinaz enzim üretiminin 5 gün (120 saat) inkübasyon gerçekleştirildiğinde gerçekleştiği belirtilmektedir.

Farklı sürede gerçekleştirilen enzim üretiminde 120 saatlik inkübasyonda 72 saatlik inkübasyona göre daha yüksek enzim üretimi elde edilmiştir. Yapılan analizlerde 72 saatlik üretimde kontrole göre ortalama %98 enzim üretimi gerçekleşirken, 120 saatlik inkübasyonda üretilen enzim ortalama %111 olarak ölçülmüştür.

4.6.8. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisinin Saptanması

Brevibacillus agri SK-27 suşunun enzim üretimi için en yüksek verimin elde edildiği azot kaynağının saptanması amacı ile %1 konsantrasyonda farklı azot kaynakları kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek enzim üretiminin belirlenmesi için 72, 120 ve 168 saatlik üç farklı sürede ve 30ºC de üretim yapılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun en yüksek enzim üretimini 72 saatlik inkübasyon sonunda %111 ile amonyum nitrat bulunan besiyerinde gerçekleştirdiği bulunmuştur. Kullanılan azot kaynakları sırası ile değerlendirindiğinde enzim üretimine Maya %101, Et özütü %99, Malt özütü %101, Pepton %101, Jelatin %101, Üre %100, Sodyum nitrat %99, Soya %101, Kazein %101 ve Tripton %99 etki yapmıştır. Amonyum nitrat dışındaki diğer azot kaynaklarında 72 saatlik üretim sonunda yaklaşık %100 üretim gerçekleştiği saptanmıştır (Şeki 34).



Şekil 4.34. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine azot kaynağının etkisi (30°C ve 72, 120, 168 saat)

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 30ºC de 120 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin %108 ile pepton kullanılan üretim ortamında gerçekleştirdiği saptanmıştır. İnkübasyon süresinin 120 saat uygulandığı çalışmada soya hariç (%98) diğer bütün azot kaynaklarında 72 saatlik uygulamaya göre enzim üretiminde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Buna karşılık, 72

saatlik üretimde amonyum nitrat bulunan ortamda %111 enzim üretimi gerçekleşirken 120 saatlik üretim uygulamasında amonyum nitrat bulunan besiyerinde %107 enzim sentezi gerçekleşmiştir.

Enzim üretimi için kullanılan diğer azot kaynakları ile sırası ile maya özütünde %105, et özütünde %107, malt özütünde %105, jelatinde %107, ürede %107, sodyum nitritte %106, kazeinde %103, triptonda %107 verim elde edilmiştir. Kullanılan bütün azot kaynaklarında 72 saatlik inkübasyon süresine göre enzim üretiminde ortalama %5.45 artış gerçekleşmiştir.

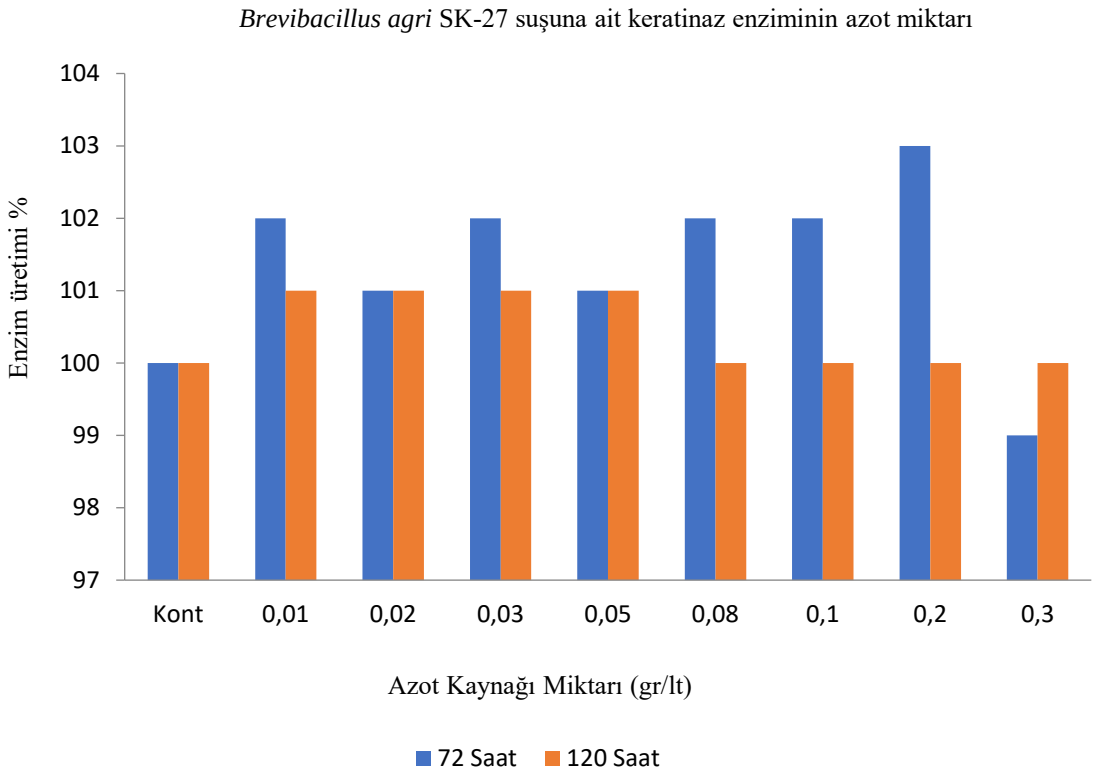
Brevibacillus agri SK-27 suşu kullanılarak farklı azot kaynakları ile gerçekleştirilen enzim üretim çalışmalarında 168 saatlik inkübasyon sonunda %4 düşüş olmakla birlikte en yüksek üretim %104 ile pepton bulunan besiyerinde elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin 168 saate yükseltilmesi sonunda kullanılan bütün azot kaynaklarında enzim üretiminin düşerek yaklaşık 72 saatlik inkübasyon düzeyine gerilediği gözlenmiştir. Bütün azot kaynakları dikkate alındığında ortalama enzim üretiminin %100.5 değerine düştüğü bulunmuştur. En büyük düşüş sodyum nitrat kullanıldığında gerçekleşmitir. Sodyum nitrat bulunan besiyerindeki enzim miktarı 120 saatte %106 iken inkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığında %89 a düşmüştür. Sodyum nitratlı besiyerindeki enzim miktarında gerçekleşen düşüş yaklaşık %17 düzeyindedir.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmalarda bütün azot kaynakları için en yüksek üretim değerinin 120 saatlik inkübasyonda ortalama %105 düzeyinde gerçekleştiği saptanmıştır. Buna karşılık 72 ve 168 saatlik inkübasyonlar sonunda enzim üretimi yaklaşık %100 olarak bulunmuşturr. Optimum enzim üretiminin inkübasyon süresi 120 saat olduğunda gerçekleştiği, inkübasyon süresinin uzatılması ile (168 saat) üretimin düşerek 72 saat sonunda elde edilen değere düştüğü bulunmuştur.

Azot kaynağı olarak amonyum nitrat bulunan üretim besiyerinde en yüksek üretim %111 ile 72 saatlik inkübasyonda elde edilirken inkübasyon süresinin sırası ile 120 ve 168 saate yükseltildiği koşullarda enzim üretimi %107 ve %102 değerlerine düşmüştür. Buna karşılık inkübasyon süresinin 120 ve 168 saat olduğu inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretimi her iki inkübasyon süresinde de sırası ile %108 ve %104 ile peptonda elde edilmiştir. Bu sonuçlar keratinaz enzim üretimi için inkübasyon süresinin 120 saat olarak verildiği literatür bilgileri ile tam uyum göstermektedir.

4.6.9. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Azot Miktarlarının Etkisi

Brevibacillus agri SK-27 suşundan keratinaz enzim üretimi için azot kaynağı olarak en yüksek üretimin elde edildiği peptonun farklı konsantrasyonları kullanılarak enzim üretimine etkisi belirlenmiştir. Enzim üretiminin gerçekleştirildiği 30ºC ve 72 saatlik çalışmada 0.01, 0.03, 0.08 ve 0.1 konsantrasyonlarda kontrole göre yaklaşık %2 artış gerçekleşmiştir. En yüksek enzim üretimi 0.2 gr konsantrasyon %103 elde edilmiş, 0.3 gr konsantrasyonda ise %99 seviyesine düşmüştür (Şekil 4.35).



Şekil 4.195. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine azot miktarının etkisi (30°C ve 72-120 saat)

Yapılan analizlerde bütün pepton konsantrasyonlarında %100'ün üzerinde enzim üretimi elde edilmiştir. 0.01-0.3 g/Lpepton değerlerinde elde edilen enzim üretimi yaklaşık %101.5 bulunmuştur.

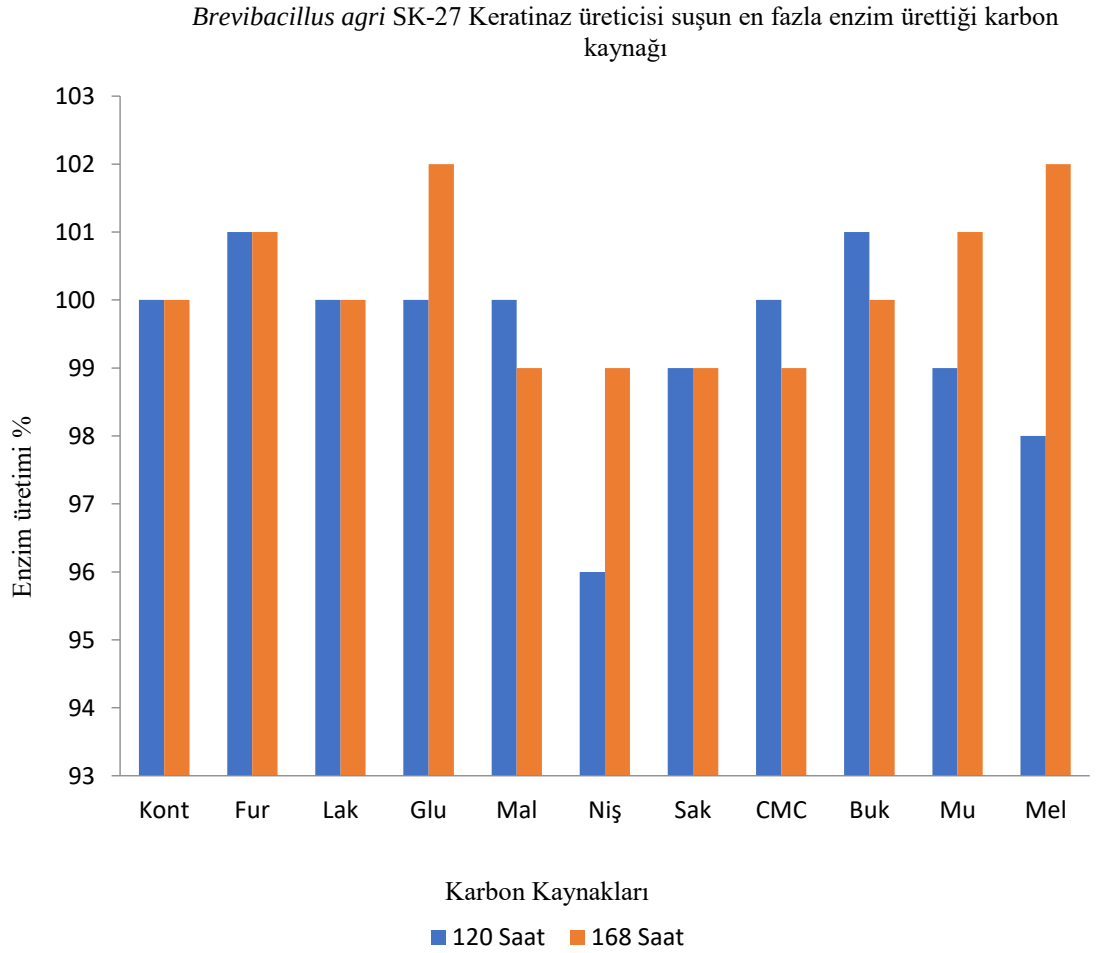
Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi azot miktarının saptanması için geçekleştirilen çalışmalarda 120 saatlik üretim sürecinde kullanılan azot kaynağının 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.04 gr konsantrasyonlarda sırası ile %101, 101, 101 ve 101 aktivite elde edilmiştir. Kontrole göre enzim üretiminde kısmende olsa artış gerçekleşmiştir. Analiz edilen 0.08, 0.1, 0.2 ve 0.3 konsantrasyonlarda kontrolle aynı miktarda enzim üretimi elde edilmiştir.

Azot miktarının saptanması için gerçekleştirilen çalışmalar sonunda aynı kaynak kullanıldığı halde inkübasyon süresine bağlı olarak enzim üretiminin farklılık gösterdiği görülmektedir. Yapılan analizlerde 72 saatlik sürecin 120 saatlik üretim sürecine göre enzim üretiminde yaklaşık %2 daha verimli olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim üretimi için azot kaynağı optimizasyonunda en iyi performansın 72 saatte elde edildiği bulunmuştur.

4.6.10. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Brevibacillus agri SK-27 suşundan keratinaz enzim üretim çalışmalarında karbon kaynaklarının etkisi araştırılmış, 30°C ve 72, 120, 168 saatlik inkübasyon süreleri seçilmiştir. Üretim için tercih edilen sıcaklık azot kaynağı için kullanılan 30ºC olarak belirlenmiştir. Karbon kaynakları olarak Fruktoz, Laktoz, Glukoz, Maltoz, Sukroz, Nişasta, CMC, Buğday kepeği, Mısır unu ve Melas kullanılmıştır.

Enzim üretiminin 30°C ve 120 saatlik inkübasyon sonunda fruktozda %101 ve buğday kepeğinde %101 düzeyinde gerçekleştiği bulunmuştur. Sukroz ve mısır ununda %99, melasta %98, nişastada %96 enzim üretimi elde edilmiştir. Laktoz, glukoz, maltoz ve CMC de %100 enzim üretimi meydana gelmiştir. Kullanılan bütün substratlar analiz edildiği zaman elde edilen ortlama enzim miktarı %99.4 bulunmuştur (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisi

İnkübasyon süresi 168 saate çıkartıldığında enzim üretimi indüklenmiş ve glukoz %102 ve melas %102 ile öne çıkmıştır. Maltoz, sukroz, nişasta ve CMC de %99 enzim üretimi saptanmıştır. Furuktoz ve mısır unu kullanıldığında ortalama enzim üretinmi %101 gerçekleşmiştir. Laktoz ve buğday kepeğinde ise %100 ile kontrol ile aynı değerde enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bununla birlikte genel olarak enzim üretiminde bütün karbon kaynaklarının %100 e yakın düzeyde etkili olduğu bulunmuştur.

İnkübasyon süresinin168 saat tutulduğu inkübasyon çalışmasında melas ve glukozda 72 ve 120 saatlik inkübasyon süresine göre enzim üretiminin indüklendiği görülmektedir. Maltoz, sukroz, nişasta ve CMC de 72 saatlik dönemdeki değerlere göre enzim üretiminde düşme olmuştur. Özellikle 72 saatlik dönemde CMC de %106 aktivite elde edilirken, 168 saatlik inkübasyonda %99 aktivite değeri elde edilmiştir.

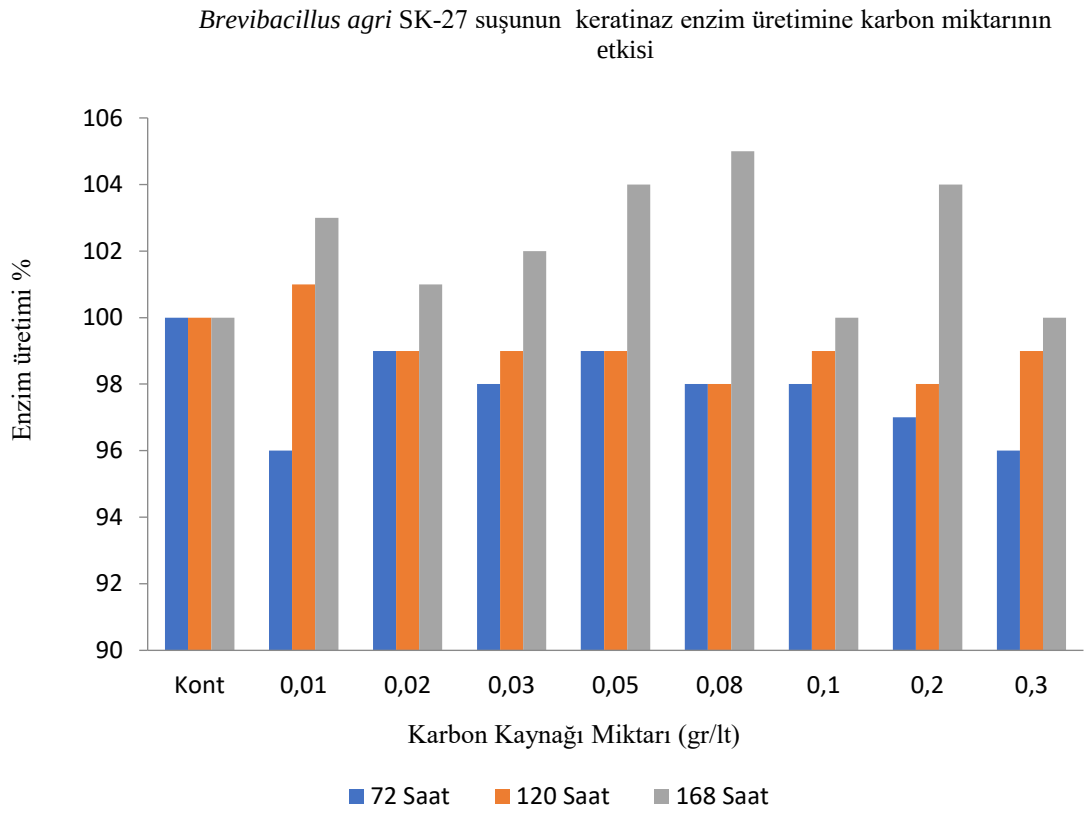
İnkübasyon süresi 168 saate çıkartıldığında enzim üretiminde glukoz %102 ve melas %102 ile öne çıkmıştır. Bununla birlikte genel olarak enzim üretiminde bütün karbon kaynaklarının %100 e yakın düzeyde etkili olduğu bulunmuştur.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan keratinaz enzim üretimi için test edilen karbon kaynaklarında özellikle 72 saatlik inkübasyon süresi (%102) en yüksek enzim üretiminin elde edildiği periyot olmuştur. Diğer inkübasyon sürelerinde yaklaşık %100 enzim üretilmiştir.

4.6.11. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi

Enzim üretimi için belirlenen karbon kaynağının hangi konsantrasyonda en yüksek etkiyi gösterdiğinin saptanması için 0.01-0.3 g/L aralığında, 30ºC de ve farklı inkübasyon sürelerinde üretim gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin 72 saat olarak seçildiği periyotta 0.02-0.1 aralığındaki konsantrasyonlarda ortalama %98 enzim üretilmiştir.

Bununla birlikte 0.02 ve 0.05 g/L konsantrasyonlarda %99 enzim verimi elde edilmiştir. Karbon miktarları analiz edildiğinde %0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 v3 0.3 te sırası ile %96, 99, 08, 99, 98, 98, 97 ve 96 enzim üretimi elde edilmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz enzim üretimine karbon miktarının etkisi (30°C ve 72, 120 ve 168 saat)

Enzim üretimi için seçilen inkübasyon süresi 120 saat olduğunda en yüksek enzimin %101 ile 0.01 g/L konsantrasyonda gerçekleştiği bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda ortalama verim %99 olarak bulunmuştur. Karbon miktarı olarak 0.08 ve 0.2 g/L konsantrasyonda enzim üretimim %98 gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin uzaması bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde düşük düzeyde de olsa enzim üretiminde artışa neden olmuştur.

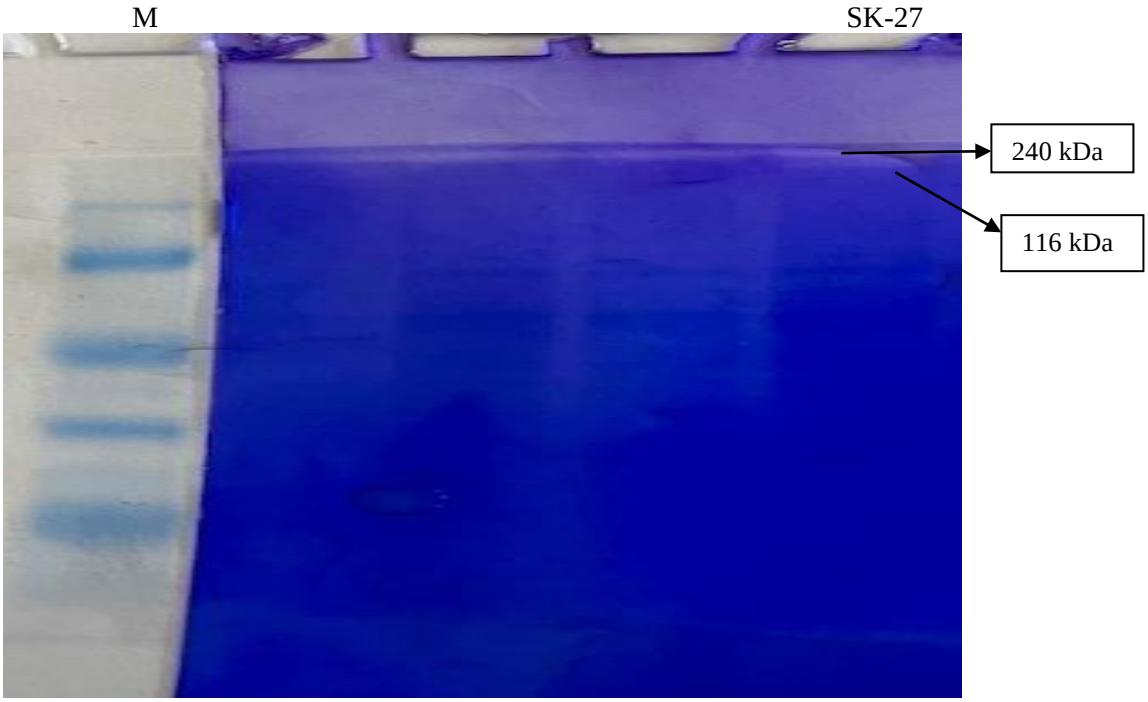
Enzim üretimi için inkübasyon süresinin 168 saat olarak gerçekleştirildiği çalışmada enzim sentezinin 72 ve 120 saate göre belirgin şekilde artış saptanmıştır. Enyüksek enzim üretimi %105 ile 0.08 g/L karbon konsantrasyonunda elde edilirken, 0.2 g/L de %104, 0.01 g/L de %103, 0.03 g/L de %102, 0.02 g/L de %101 enzim üretilmiştir. Kullanılan bütün karbon miktarlarında enzim üretiminin kontrolden (0.1 ve 0.3 g/L hariç) daha yüksek gerçekleştiği bulunmuştur.

İzole edilen keratinaz enzim üretimi için aynı karbon kaynağı kullanıldığı halde farklı inkübasyon sürelerinin üretimde farklılık meydana getirdiği saptanmıştır. İnkübasyon süresi uzadıkça yeni karbon kaynağı eklenmediği halde üretilen enzim miktarı artış göstermiştir. İnkübasyon süresinin 72 saat olduğu üretim periyodunda en yüksek üretim %99, 120 saatte %101, 168 saatte ise %105 gerçekleşmiştir. Enzim üretimi için farklı inkübasyon periyotlarında farklı karbon kaynaklarının enzim üretiminde ön plana çıktığı saptanmıştır. En yüksek enzim üretimi CMC kullanıldığında elde edildiği için (72 saatlik inkübasyon süresinde %106) karbon miktarının

belirlenmesinde karbon kaynağı olarak CMC kullanılmıştır. Bu sonuçlar *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan keratinaz enzim üretiminde en iyi karbon kaynağının CMC olduğunu göstermektedir.

4.6.12. *Brevibacillus agri* SK-27 Suşunun Sentezlediği Keratinaz Enzimi Zimogram Analizi

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi skimmilk içeran %12 SDS-PAGE jelinde analiz edilmiş ve enzimin 240 ve 116 kDa ağırlıkta iki aktivite bandından oluştuğu bulunmuştur. 240 kDa ağırlığındaki band daha yoğun görülmekte olup, enzim aktivitesinde etkin fragment olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.39). Elektroforez çalışmasında thermofisherin 120, 85, 50, 35, 25 ve 20 kDa prestaning protein moleküler ağırlık markerı kullanılmıştır.



Şekil 4.38. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü

Micrococcus luteus'tan izole edilen keratinaz enzimi moleküler ağırlıkları 62 kDa, 139 kDa, 185 kDa ve 229 kDa olan dört bağomsız aktivite zonu oluşturmuştur (Kublanov ve ark., 2009). Keratinolitik proteaz enzimlerinin 18 ile 240 kDa arasında değişen çok farklı moleküler ağırlığa sahip oldukları bildirilmiştir (Brandelli ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda en yüksek moleküler ağırlığa sahip keratinaz enziminin 240 kDa ile , *Kocuria rosea*'dan izole edildikleri belirtilmiştir (Gubta ve ark., 2016)

Yüksek moleküler ağırlıklar genellikle termofiller tarafından sentezlenen veya metaloproteazlar olan keratinazların özelliğidir (Bouacem ve ark. 2016). *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen 240 kDa moleküler ağırlığa sahip keratinaz enzimi, literatür kayıtlarına göre tanımlanan ikinci enzimdir.

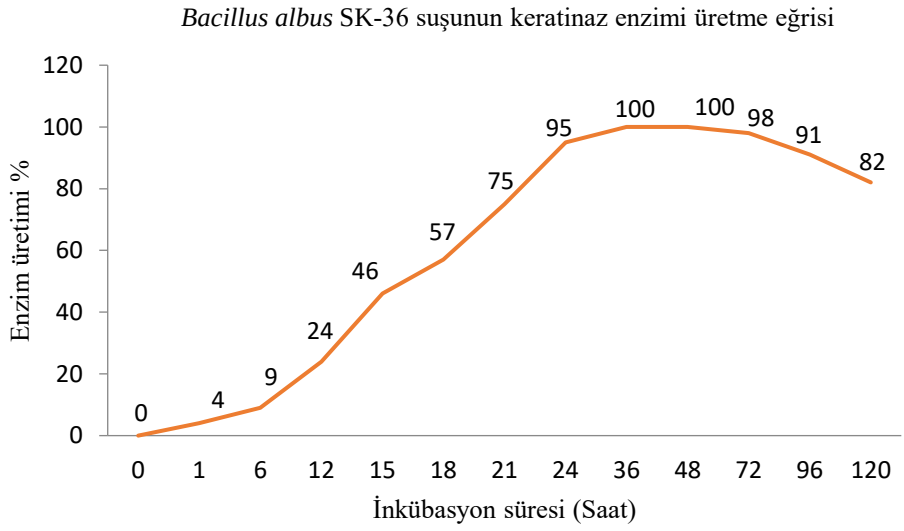
4.7. Keratinaz Enzim Üretiminde Kullanılan *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Enzim Üretim Zamanının Saptanması

Bacillus albus SK-36 suşunun 24 saatlik kültüründen %5 aşılama yapılarak üreme eğrisi çalışması başlatılmıştır. Belirlenen zaman dilimlerinde ortamdan 2 mL örnek alınarak standart enzim aktivitesi analizi gerçekleştirilmiştir.

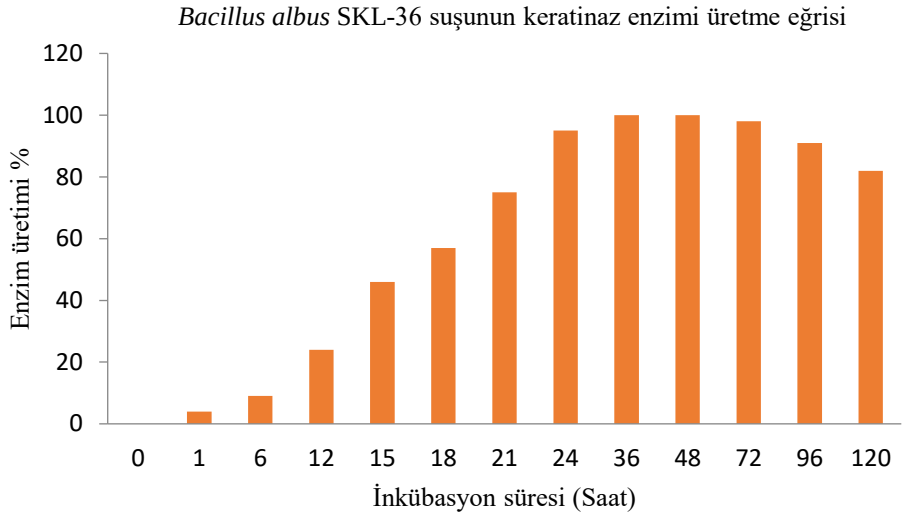
Bacillus albus SK-36 suşu 0-6 ıncı saatler arasında latent dönemi geçirmiş ve enzim üretimi birinci saatte %4, altıncı saatte % 9 gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi devam ettirilmiş ve sırası ile 12, 15, 18, 21 ve 24 üncü saatlerde %24, 46, 57, 75 ve 95 enzim üretimi saptanmıştır. İnkübasyonun otuz altıncı saatinde enzim üretimi %100 değerine ulaşmış ve kırk sekizinci saatte de %100 şeklinde devam etmiştir. İnkübasyonun yetmiş ikinci saatinden itibaren enzim sentezinde düşme gerçekleşmiş, doksan altı ve yüz yirminci saattede düşüş devam etmiştir. İnkübasyonun yetmiş ikinci saatinde %98, doksan altıncı saatinde %91 ve yüz yüz yirminci saatinde %82 enzim üretimi saptanmıştır.

Bakterinin üreme davranışındaki değişimle birlikte enzim üretimi de buna göre şekillenmiştir. Özellikle logaritmik fazın son aşamalarına doğru enzim üretimi hızla yükselmiş ve otuz altıncı saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.40A ve 4.40B).

Bacillus albus SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşları enzim üretim zamanları açısından karşılaştırıldığında her ikisinde de logritmik fazın tepe noktasının otus altıncı saat olduğu görülmektedir. Bununla birlikte *Bacillus albus* SK-36 suşunda otuz altıncı saate kadarki dönemlerde *Brevibacillus agri* SK-27 suşuna göre daha yüksek miktarda enzim üretimi gerçekleşmiştir. Stasyoner faz ise *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda otuz altıncı saatten yetmiş ikinci saate kadar devam ederken, *Bacillus albus* SK-36 suşunda otuz altıncı saatten kırk sekizinci saate kadar sürmüştür.



Şekil 4.39A.*Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretme eğrisi

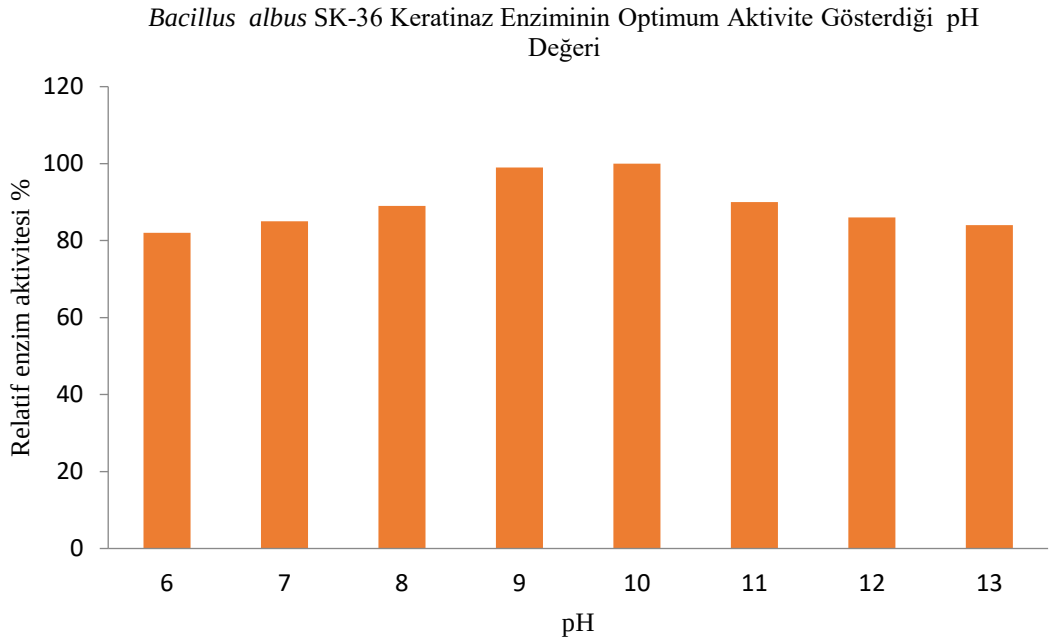


Şekil 4.39B. *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretme eğrisi

4.7.1. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin optimum aktivitesini pH 10.0 da gösterdiği bulunmuştur. Enzim pH 9.0-11.0 değerlerinde ortalama %90'ın üzerinde aktiviteye sahip olup, yaklaşık %96,33 katalitik aktivite elde edilmiştir. Bütün pH değerleri birlikte değerlendirildiği zaman enzimin ortalama %89.31 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. İzole edilen keratinaz enzimi asido-nötral-alkali özelliktedir.

Bu özellikler enzimin her pH değerinde yüksek aktivite gösterme yeteneğinde olduğunun göstergesidir. Enzimin pH özellikleri deterjan, tekstil ve deri endüstrisi başta olmak üzere özellikle pH 9.0-11.0 aralığında faaliyet gösteren prosesler için çok güçlü bir uygulama potansiyeli söz konusudur (Şekil 4.40).

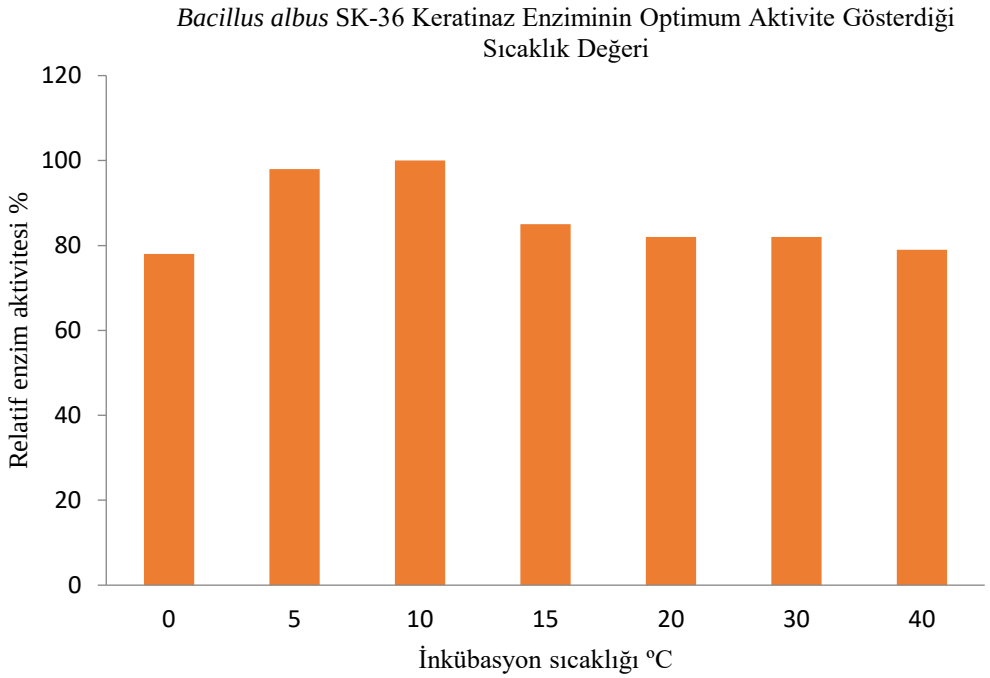


Şekil 4.40. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri

4.7.2. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

Bacillus albus SK-36 suşundan kısmi saflaştırma ile izole edilen keratinaz enziminin optimum aktivite değeri 10°C olarak saptanmıştır. Enzim 5°C de %99.08, 10 °C de %100 katalitik aktiviteye sahiptir. Bir başka ifade ile enzim 5 ve 10°C lerde optimum aktivite göstermekte olup katalitik aktivitesi %99'dur. Literatürlerde keratinaz enzimlerinin pH 8-10 aralığında optimum aktivite ve stabilite gösterdikleri belirtilmiştir (Kardenavis ve ark., 2009). *Bacillus albus* SK-36 enziminin optimum aktivite pH'sı literatür ile tam uyum göstermiştir.

Yapılan aktivite çalışmaları sonunda enzimin 0°C de %78, 15°C de %85.81, 20°C de %80.57, 30 °C de %84.52 ve 40 °C de %86.19 relatif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bütün inkübasyon sıcaklıkları değerlendirildiğinde yaklaşık %88 aktivite gerçekleştiği bulunmuştur. Optimum aktivitenin aslında 5-10°C aralığında gerçekleştiği ve çok güçlü bir aktivite olduğu görülmektedir. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enziminin özellikle ekstrem cold özellik gösterdiği saptanmıştır. Enerjinin maliyetlerdeki en büyük girdiyi oluşturması nedeni ile hemen her üretim prosesinde enaz enerji kullanılması ve maliyetlerin düşürülmesi temel hedeftir. İzole ettiğimiz enzimin 5-10ºC lerde ortalama %99 aktivite göstermesi enaz enerji en yüksek verimLilik vizyonuna çok güçlü katkı yapma potansiyelini göstermektedir. Özellikle deterjan endüstrisinde 30ºC'lerin büyük başarı olarak gösterildiği günümüz uygulamalarında enzimin 5-10ºC ve pH 9.0-10.0-11.0 değerlerinde enyüksek aktivite göstermesi bu alanda bütün uygulamaları sarsacak potansiyeldedir. Enzim bu özellikleri ile, ekstrem cold-alkali koşullarda aktif özelliktedir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri

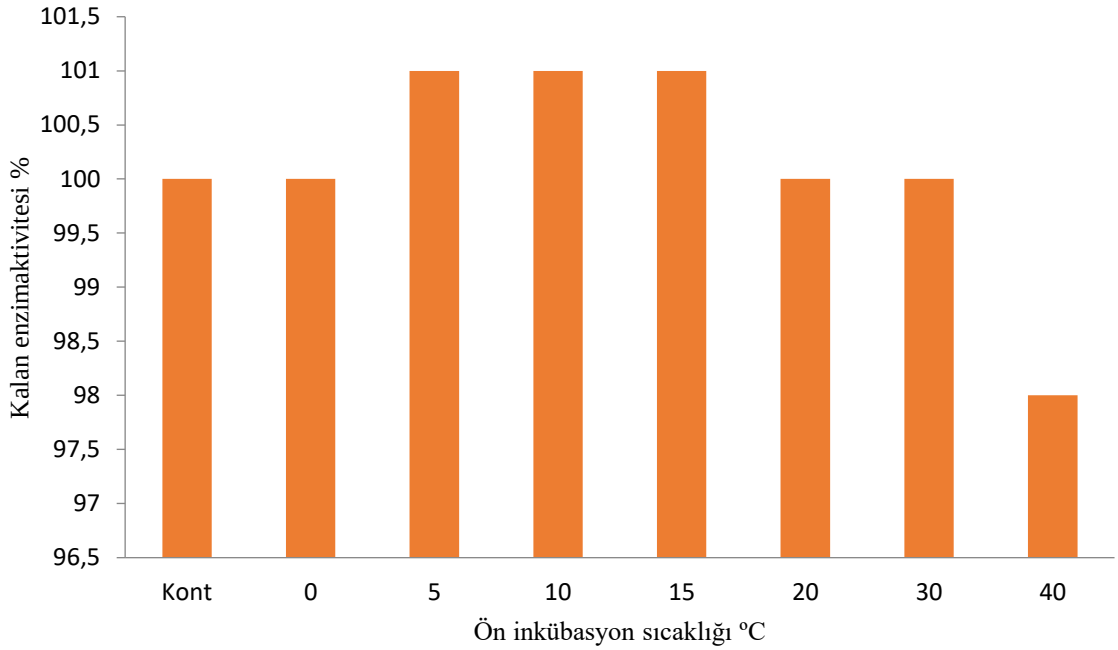
4.7.3. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin Termal Stabilite Bulguları

Termal stabilite analizleri için kısmi saflaştırma ile izole edilen farklı suşlara ait keratinaz enzimleri ile optimum aktivite çalışmaları için kullanılan sıcaklıklarda 60 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. EnzimLer optimum aktivitenin elde edildiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktiviteni gerçekleştiği sıcaklıkta 60 dakika reaksiyona bırakılarak kalan aktivite değerleri saptanmıştır.

Ön inkübasyon işlemi uygulanmayan stok enzim çözeltisi aynı koşullarda kontrol aktivite değeri için analiz edilmiştir. Ön işlem uygulanmayan enzim reaksiyonundan elde edilen absorbans değeri 100 alınarak, ön işlem uygulanan enzimLerden elde edilen absorbans değerleri ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi (enzim stabilitesi) saptanmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşunun enzimi ön inkübasyon gerçekleştirilen sıcaklık değerlerinden 5, 10 ve 15°C de %101 aktivite göstermiştir. Enzim 0°C de %100, 5°C de %101, 10°C de %101, 15 °C de %101, 20°C de %100, 30°C de %100 ve 40°C de %98 aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim 40°C de %2 aktivite kaybına uğramıştır. Enzim 5, 10 ve 15ºC değerlerinde %101 stabilite göstermiştir. Termal stabilite değerinin optimum aktivite değerinde paralel olarak 40°C düşüş göstermesi, enzimin cold aktif özelliğini desteklemektedir. Literatürde cold aktif enzimLerin 30°C'den daha yüksek sıcaklıkta aktivite kaybettikleri belirtilmektedir. Bütün sıcaklık değerleri birlikte değerlendirildiğinde ortalama enzim aktivite %100 bulunmuştur (Şekil 4.42).

Bacillus albus SK-36 Keratinaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları

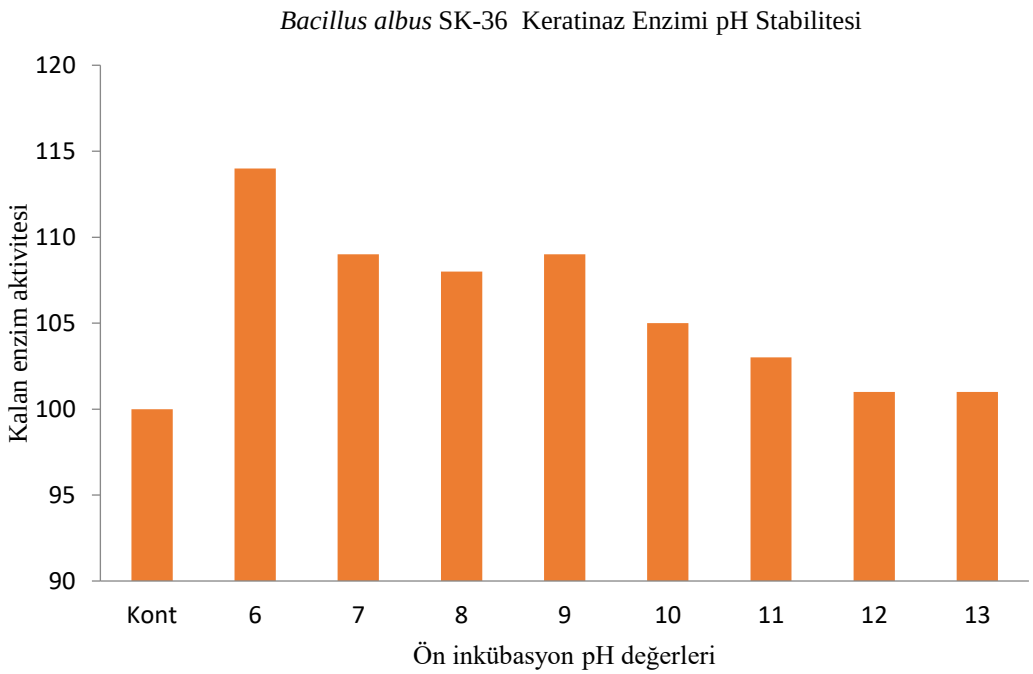


Şekil 4.42. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin termal stabilite sonuçları

4.7.4. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enziminin pH Stabilite Bulguları

Bacillus albus SK-36 suşundan elde edilen enzim en yüksek kararlılığı pH 6.0 da yaklaşık %114 ile göstermiştir. Enzim pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 ve 13.0 te sırası ile %109, 108, 109, 105, 103, 101 ve 101 aktivite göstererek güçlü şekilde stabil kalmıştır.

Enzim analiz edilen bütün pH değerlerinde ortalama %106 aktivite değeri ile pH ile indüklenebilen ve pH stabil özellik göstermektedir. Elde edilen bulgular enzimin yüksek düzeyde asido-nötral-alkali stabil olduğunu ve bu koşullarda aktivite gösteren prosesler için ideal çözüm potansiyeline sahip olabilir (Şekil 4.43).

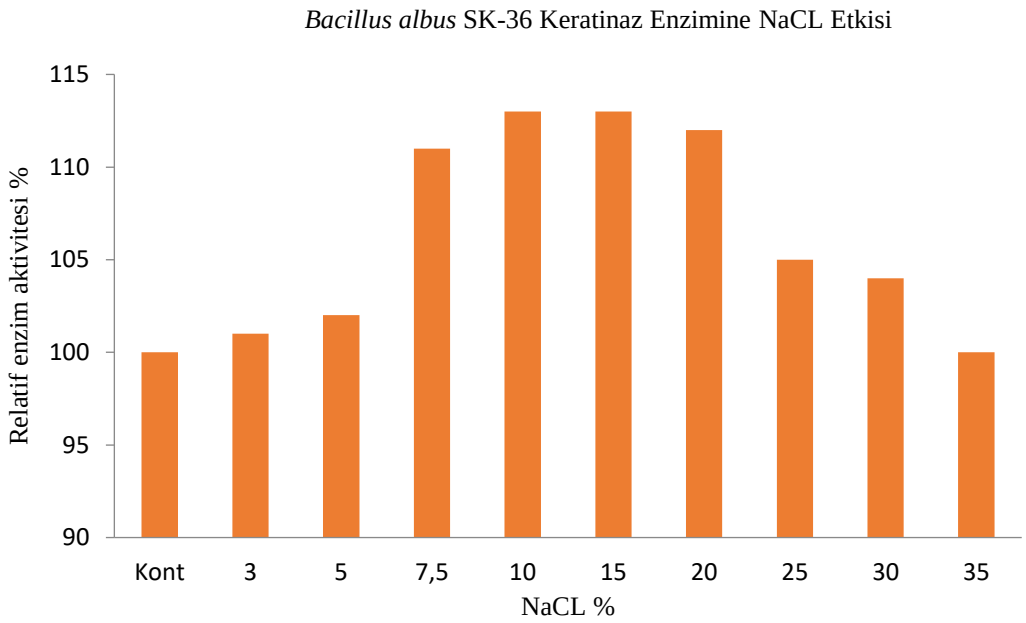


Şekil 4.43. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enziminin pH stabilitesi sonuçları

4.7.5. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine NaCl Etkisine

Bacillus albus SK-36 Keratinaz enzimi %3-5 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama %101 aktivite göstermektedir. NaCl konsantrasyonu %7.5, 10, 15 ve 20 ye yükseltildiğinde enzim aktivitesi giderek artan bir seyir izlemiş ve sırası ile %110, %112, %113 ve %113 değerine ulaşmıştır.

Enzim aktivitesi %25 NaCl konsantrasyonunda yaklaşık %8 düşerek %105, %30 konsantrasyonda %104 ve %35 konsantrasyonda %102 olarak gerçekleşmiştir. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında enzimin güçlü bir halostabil karektere sahip olduğu görülmektedir. Enzim indüklenebilir özellik göstermekte olup, moderately-ekstrem halofil özelliktedir (Şekil 4.44).



Şekil 4.4420. *Bacillus albus* SK 36 suşunun ürettiği keratinaz enzimine NaCL etkisi

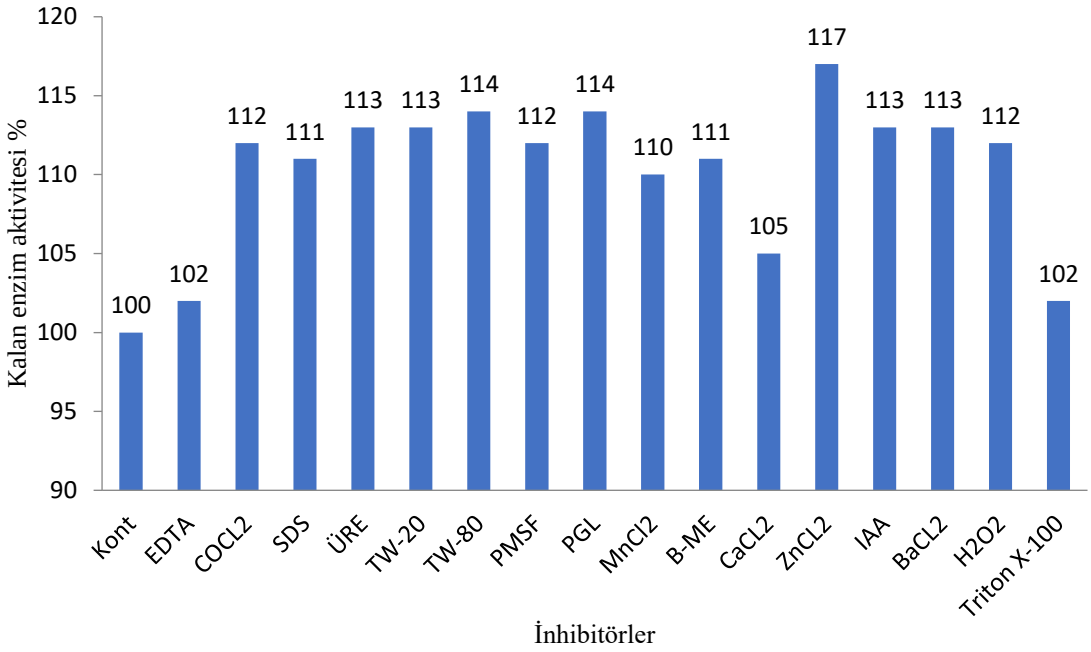
4.7.6. *Bacillus albus* SK-36 Suşundan İzole Edilen Keratinaz Enzimine Kimyasalların Etkisi (10 ve 5 mM)

Bacillus albus SK-36 cold aktif alkaline keratinaz enziminin 10 mM EDTA, $CoCl_2$, SDS, ÜRE, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCl_2$, β-mercaptoethanol, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, IAA, $BaCl_2$, H_2O_2 ve Triton X-100 ajanlarına karşı stabilite analizi gerçekleştirilmiştir.

Enzim kullanılan bileşiklere farklı düzeylerde reaksiyon göstermiş ve sırası ile %102, %112, %111, %113, %113, %114, %112, %114, %110, %112, %105, %117, %113, %113, %113 ve %103 aktivite elde edilmiştir. Enzim bütün bileşiklere karşı indüklenerek ortalama %12 aktivite artışı göstermiştir. Enzim EDTA ve PMSF den inhibisyon yönünde etkilenmemiştir. PMSF ile %112 indüklenen enzim, EDTA ile stabilitesini korumuştur. Enzimin EDTA kullanıldığında PMSF ye göre daha düşük (%102) indüklenmiştir. En yüksek aktivite $ZnCl_2$ ajanına karşı %117 düzeyinde gerçekleşmiştir.

Enzim SDS'ye karşı %111 aktivite gösterirken, triton X-100'e karşı %102 aktivite elde edilmiştir. Enzim Metallo proteaz özelliğindedir (İnhibisyon gerçekleşmese de indüklenmede EDTA nın daha az etkilemesi nedeni ile). Enzimin SDS bulunan ortamda kontrole göre %12 indüklenmesi deterjan formülasyonu için çok güçlü bir potansiyeli olduğunu göstermektedir (Şekil 4.45).

Literatürde *Bacillus* sp. bakterilerinden izole edilen keratinaz enzimLerinin çoğunluğunun, alkalin serin veya metallo enzimler olduğu, birkaç yayında mayalardan elde edilen aspartil keratinazlar tanımlanmıştır (Lin ve ark., 1993). Genel olarak, maksimum keratinolitik aktivite aralığı pH 7 ile 12,5 arasındadır ve 80 °C'ye kadardır (Qiu ve ark. 2020).



Şekil 4.45. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enzimine 10 mM kimyasalların etkisi

Bacillus albus SK-36.1 hiper termofil alkaline keratinaz enziminin 5 mM EDTA, $CoCl_2$, SDS, ÜRE, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCl_2$, β-mercaptoethanol, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, IAA, $BaCl_2$, H_2O_2 ve Triton X-100 ajanları ile muamele edilerek enzim analizi yapılmıştır.

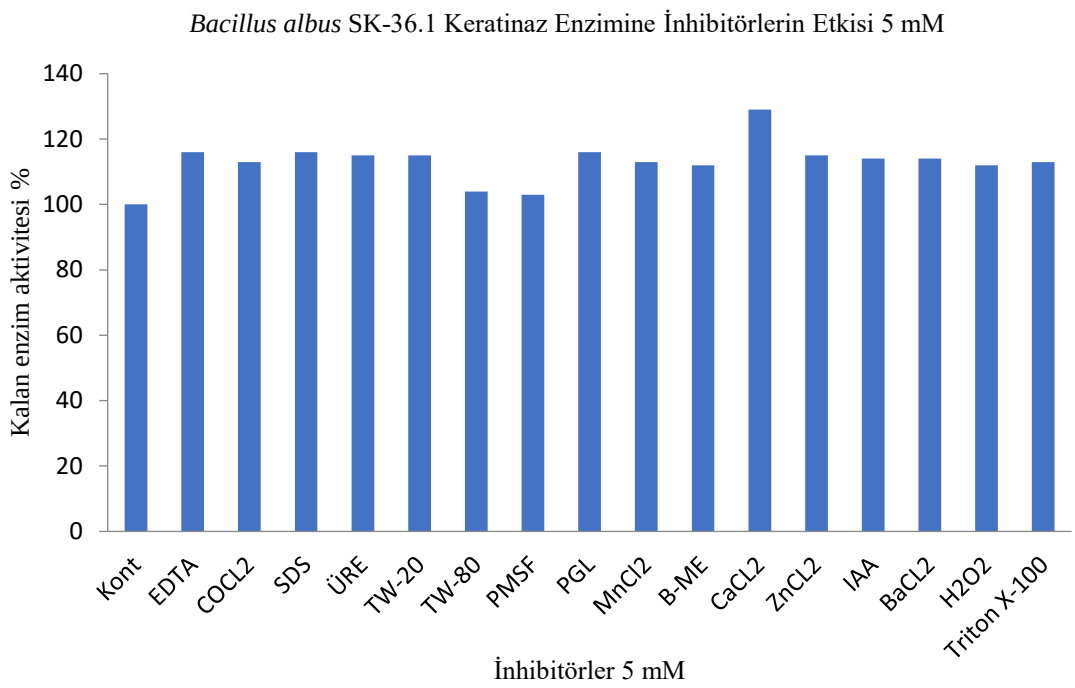
Analizlerde 5 mM konsantrasyonda kullanılan bileşiklere karşı enzim sırası ile %115, %112, %114, %114, %113, %103, %102, %115, %112, %111, %127, %113, %113, %112, %112 ve %112 aktivite saptanmıştır (Şekil 4.48).

Yüksek konsanrasyonda $CaCl_2$ iyonunda %105 aktivite gösterirken düşük konsantrasyonda %127 aktivite gerçekleşmiştir. Enzimin 10 mM konsantrasyonda $CaCl_2$ dışındaki bütün ajanlara karşı ortalama %15 e yakın aktivite artışı gerçekleşmiştir.

Enzimin düşük sıcaklıkta ve alkali koşullarda bu denli indüklenme davranışı göstermesi katalitik aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Enzim 10 mM konsantrasyonda PMSF ye karşı daha yüksek aktivite gösterdiği halde 5 mM konsantrasyonda aktivite %10 düzeyinde düşmüştür.

Triton X-100 ile yapılan analizlerde farklı bir durum ortaya çıkmış 10 mM konsantrasyonda %103 olan aktivite 5 mM da %112 ye yükselmiştir. Enzim aktivitesine 10 mM ve 5 mM konsantrasyondaki ajanların etkileri karşılaştırıldığında sırası ile %111 ve %114 toplam aktivite elde edilmiş ve bütün ajanlar enzim aktivitesini indüklemiştir.

Bacillus subtilis ES5 suşundan izole edien keratinaz enzimi 5 mM Ca^{2+} konsantrasyonda aktivitesini sırasıyla %132,56 ve indüklemiştir. β-merkaptoetanolün aktiviteyi artırdığı belirtilmiştir (Alamnie ve ark. 2023). İzole ettiğimiz enzin aktivitesi 5 mM konsantrasyonda $CaCl_2$ ile %129, β-merkaptoetanol ile %112 aktivite artışı göstermiştir.



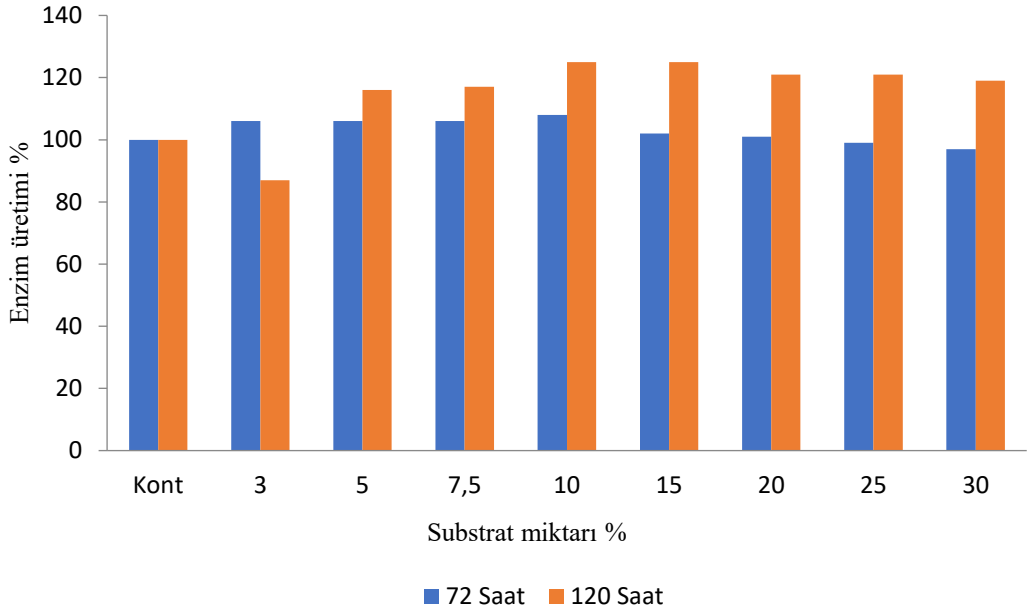
Şekil 4.46. *Baillus albus* SK-36 keratinaz enzim aktivitesine 5 mM kimyasalların etkisi

4.7.7. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Bacillus albus SK-36 suşunun en fazla keratinaz enzimi ürettiği subtrat miktarının saptanması için %3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 ve 30 substrat içeren üretim besiyerlerinde 10°C inkübasyon sıcaklığı, 72 ve 120 saat inkübasyon süresi kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen bakteri suşu 72 saatlik inkübasyon uygulamasında %3, 5 ve 7.5 substrat konsantrasyonlarında %106 düzeyinde enzim üretmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşu %10, 15, 20, 25 ve 30 substrat konsantrasyonlarında sırası ile %103, 102, 101, 99 ve 97 oranında enzim üretimi gerçekleşmiştir. Enzim üretimi %7.5 konsnatrasyondan itibaren konsantrasyon arttıkça düşmüş ve %30 konsantrasyonda %97 ile en düşük değere ulaşılmıştır. İzole edilen suş, %3-30 aralığındaki substrat konsantrasyonlarında ortalama %103.5 enzim üretmiştir (Şekil 4.47).

Bacillus albus SK 36 keratinaz üretimine substrat miktarının etkisi



Şekil 4.47. *Bacillus albus* SK 36 suşunun keratinaz üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (72-120 saat)

Bacillus albus SK-36 suşundan keratinaz enzim üretimi gerçekleştirmek için inkübasyon süresi 120 saate çıkarılmış ve %3-30 aralığında substrat içeren üretim besiyerleri kullanılarak enzim üretilmiştir. İnkübasyon işlemleri 10°C de gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizlerde 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda %3 substrat içeren besiyerinde yaklaşık %87 enzim üretimi gerçekleşmiş, kontrole göre üretim %13 düşmüştür. Konsantrasyon %5 düzeyine çıkarıldığında üretim hızlı bir artış göstermiş ve %116 değerine ulaşmıştır. Diğer konsantrasyonlarda (%7.5, 10, 15, 20, 25 ve 30) sırası ile elde edilen enzim üretimi yaklaşık %117, 125, 125, 121, 121 ve 119 bulunmuştur. En yüksek enzim üretimi %125 ile %10 ve 15 substrat konsantrasyonlarında elde edilmiştir.

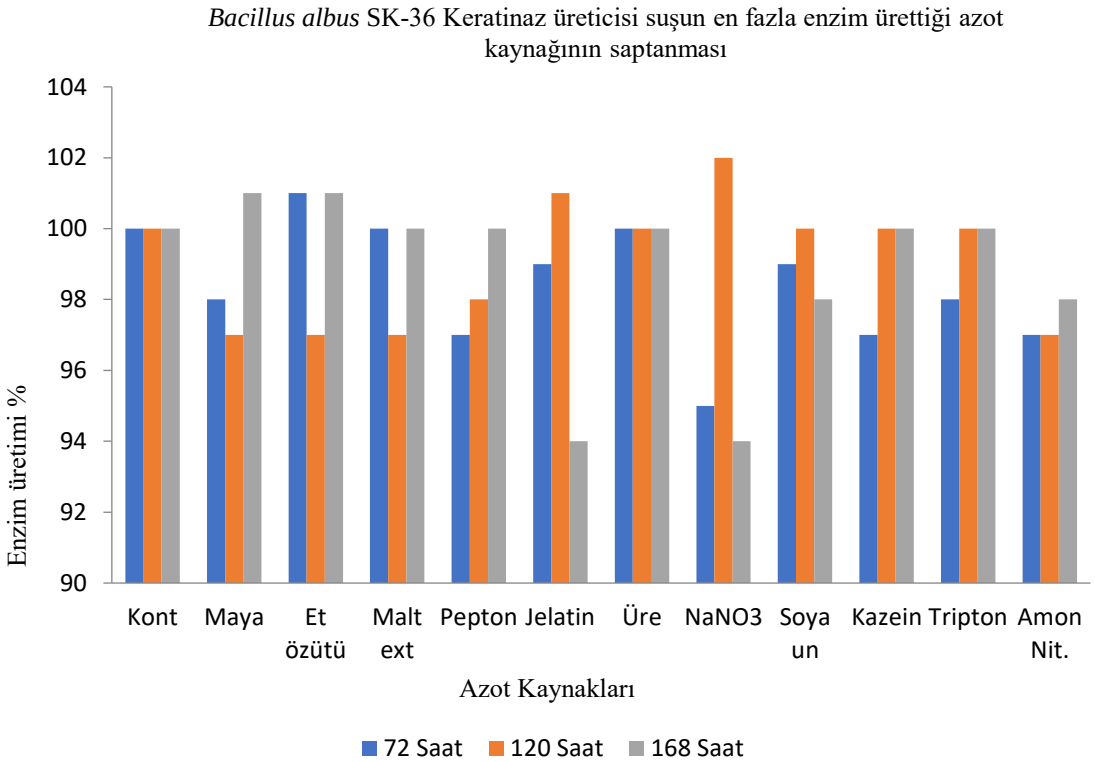
Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında 120 saatlik inkübasyonperiyodunda kontrole göre ortalama enzim üretimi yaklaşık %116 düzeyine ulaşmıştır. İnkübasyon süresinin 120 saate çıkarılması ile 72 saatlik üretim periyodunda elde edilen değere göre yaklaşık %13 daha fazla enzim üretilmiştir. Enzim üretimi 72 saatlik periyot konsantrasyon arttıkça kademeli olarak düştüğü halde 120 saatlik süreçte dengeli ve birbirine yakın değerde üretim gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunundan keratinaz enzim üretimi için seçilen konsantrasyonlar aynı olduğu halde inkübasyon süresinin enzim üretiminde belirgin bir farklılık oluşturduğu görülmektedir. İnkübasyon süresi 72 saat olarak seçildiğinde bütün konsantrasyonlarda ortalama %103.5 enzim elde edilirken, inkübasyon süresi 120 saat olduğunda ortalama üretim %116 seviyesine yükselmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür bulguları ile uyumLuluk göstermekte olup, en yüksek verim 120 saat (5 günlük üretim) üretim gerçekleştirildiğinde elde edilmiştir.

4.7.8. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretiminde Azot Kaynağının Saptanması

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz üretim için gereksinim duyduğu azot kaynağının saptanması için maya, et özütü, malt, pepton, jelatin, üre, $NaNO_3$, soya unu, kazein, tripton ve amonyum nitrat substrat olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı sabit kaldığı halde inkübasyon süresinin enzim üretimine olan etkisini belirlemek için 30°C de 72, 120 ve 168 saat süre ile üretim gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizlerde kontrole göre 72 saatlik periyotta en yüksek enzim üretimi %101 ile et özütü kullanıldığında elde edilmiştir. Malt ve üre kullanılan üretim besiyerlerinde %100 verim elde edilmiştir. Suşun enzim üretimi substratlara göre dalgalanma göstermiş ve sırası ile peptonda %97, jelatinde %99, $NaNO_3$ ta %95, Soya ununda %99, kazeinde %97, triptonda %98 ve amonyum nitratta %97 enzim elde edilmiştir. En düşük enzim üretimi %95 ile $NaNO_3$ ta gerçekleşmiştir. Bütün substratlardan elde edilen enzim verimi 72 saatlik inkübasyonda ortalama %98 gerçekleşmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz üreticisi suşun en fazla enzim ürettiği azot kaynağının saptanması (72, 120 ve 168 saat)

Bacillus albus SK-36 suşunun enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı ve 120 saat inkübasyon gerçekleştirildiği koşullarda, en yüksek enzim üretimi %102 ile $NaNO_3$ kullanıldığında elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin 72 saat olduğu dönemde en düşük enzim $NaNO_3$ kullanıldığında elde edilirken, inkübasyon süresinin 120 saate çıkarılması ile bu kez en yüksek üretim $NaNO_3$ kullanıldığında elde edilmiştir.

Kullanılan diğer substratlarda sırası ile mayada %97, et özütünde %97, malt özütünde %97 ve sodyum nitratta %97 enzim üretimi elde edilmiştir. Buna karşılık peptonda %98, jelatinde %101, ürede %100, soya ununda %100, kazeinde %100 ve triptonda %100 enzim üretilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılması ile 72 satlik dönemde yüksek üretim gerçekleşen azot kaynaklarında düşüş, düşük enzim üretilenlerde ise artış gözlenmiştir. Amonyum nitratta her iki inkübasyon süresinde de değişim gözlenmemiş ve %97 enzim üretilmiştir. İnkübasyon süresinin 120 saat olduğu üretim döneminde toplamda elde edilen verim ortalama %99 olmuştur.

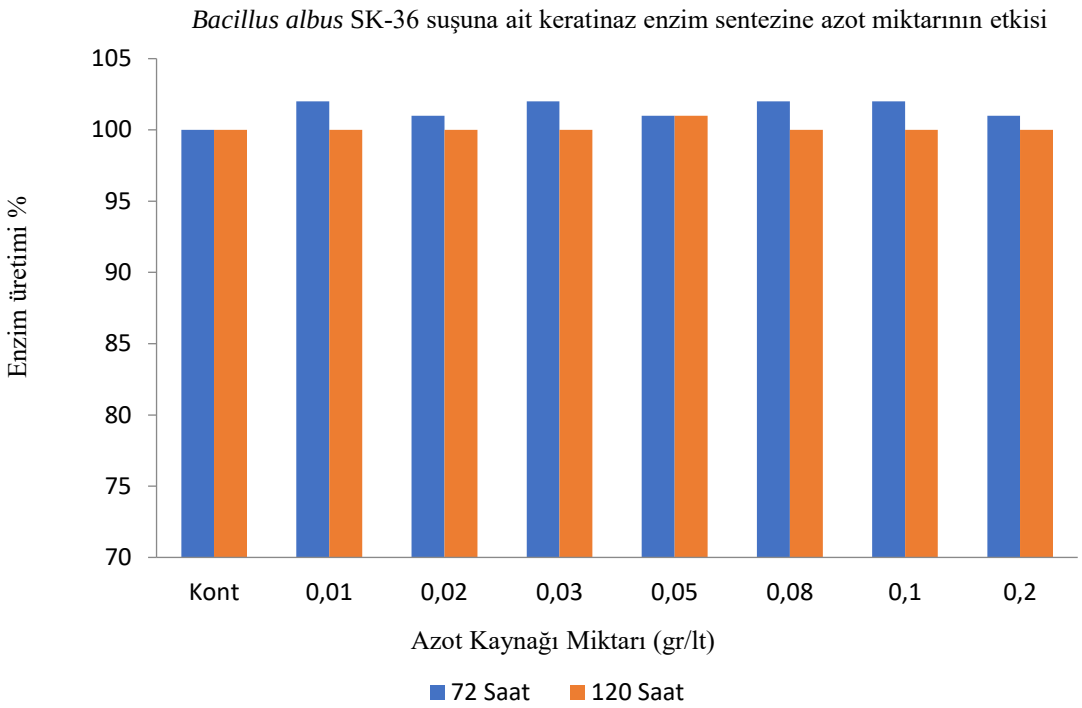
Enzim üretimi için 168 saatlik inkübasyon süresinin seçildiği çalışmada en yüksek enzim üretimi %101 ile maya ve et özütü kullanıldığında elde edilmiştir. $NaNO_3$ ve Jelatin kullanılan üretimlerde enzim üretimi kontrole göre düşüş göstermiş ve %94 değerine gerilemiştir. Amonyum nitrat ve soya kullanıldığında ise enzim üretimi %98 düzeyinde gerçekleşmiştir. Diğer substratlarda enzim üretiminin ortalama %100 gerçekleştiği saptanmıştır. Bütün substratlardan elde edilen verim ortalama % 99 olmuştur. İnkübasyon sürelerinde elde edilen toplam enzim miktarları 72 saatte %98, 120 saatte %99 ve 168 saatte %99 bulunmuştur.

Enzim üretimi için en etkili azot kaynağının saptanması için yapılan 72, 120 ve 168 saatlik inkübasyon gerçekleştirilen çalışmada 72 ve 168 saatlik inkübasyonda %101 ile et özütü en etkili substrat olmuştur. Azot miktarının belirlenmesi çalışmalarında azot kaynağı olarak et özütü seçilmiştir.

4.7.9. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Azot Miktarının Etkisi

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimi için azot kaynağı olarak et özütü seçilmiştir. Seçilen substrat farklı konsantrasyonlarda kullanılarak en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği azot miktarının saptanması için üretim gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 ve 0.3 konsantrasyonları seçilmiş, 72 ve 120 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilerek seçilen substratın enzim üretimine etkisi saptanmıştır.

En yüksek enzim üretimi 0..01, 0.03, 0.08 ve 0.1 g/L konsantrasyonlarda %102 düzeyinde elde edilmiştir. 0.02, 0.05 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarda %101 üretim gerçekleşmiştir (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimine azot miktarının etkisi (72 ve 120 saat)

İnkübasyon süresin 120 saat seçildiği üretim çalışmasında en yüksek enzim üretimi 0.05 g/L substrat miktarında %101 olarak gerçekleşmiştir. Diğer bütün konsantrasyonlarda aynı düzeyde enzim üretilmiştir (%100). Farklı konsantrasyonlarda elde edilen enzim üretim değerleri sırası ile %0.01 de 100, %0.02 de 100, %0.03 de 100, %0.05 de 101, %0.08 de 100, %0.1 de 100 ve %0.2 de 100 bulunmuştur.

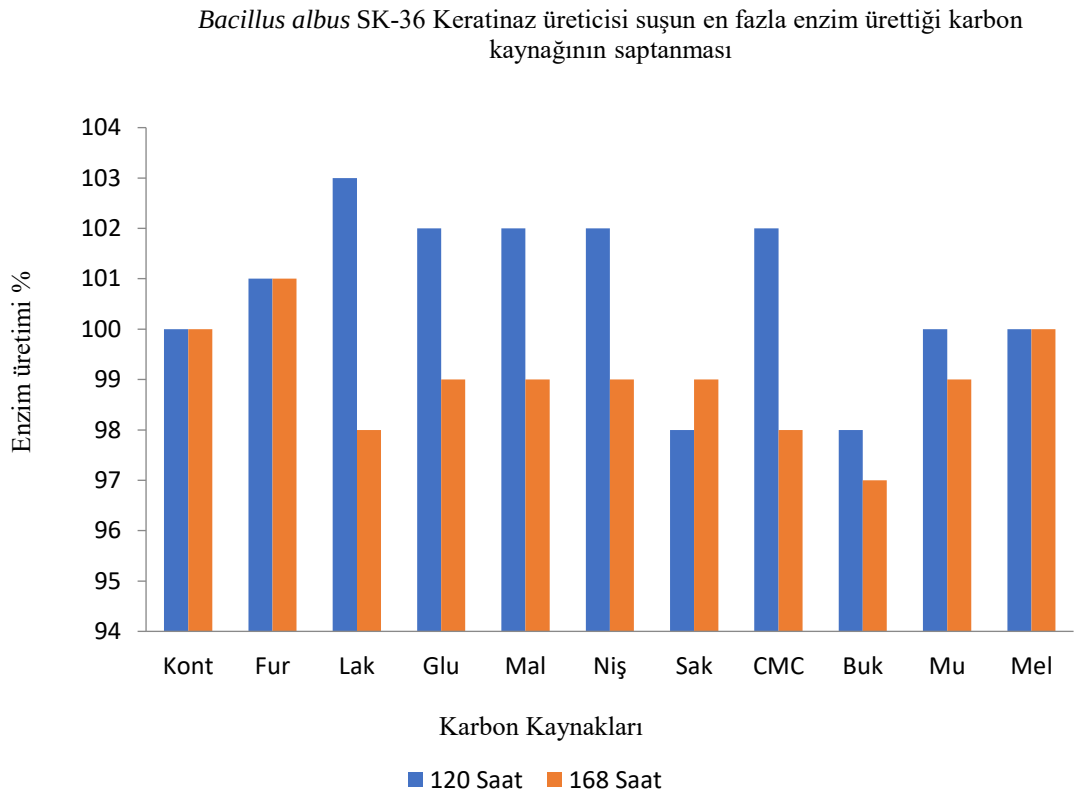
İnkübasyon süresi 72 saat olarak seçildiğinde 120 saatlik periyoda göre daha yüksek enzim üretilmiştir. Bununla birlikte 72 saatlik periyotta en yüksek enzim üretimi 0..01, 0.03, 0.08 ve 0.1 g/L de elde edilirken 120 saatlik periyotta %101 ile 0.05 g/L de gerçekleşmiştir.

4.7.10. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi

Karbon kaynağı olarak fruktoz, laktoz, glukoz, maltoz, sukroz, nişasta, CMC, buğday kepeği (BK), mısır unu (MU) ve melas kullanılmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisinin araştırıldığı 120 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin %103 ile laktozda gerçekleştiği saptanmıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında sukroz ve buğday kepeğinde enzim sentezi azalarak %98 değerine düşmüştür. Diğer karbon kaynakları analiz edildiğinde fruktoz (%101), glukoz (%102), maltoz (%102), nişasta (%102), CMC (%102) oranlarında enzim üretiminin gerçekleştiği ve bu karbon yapılarının bakteriyi indükledikleri görülmektedir. Mısır unu ve melasta kontrolle aynı miktarda enzim sentezi gerçekleşmiş ve bu bileşikler pozitif veya negatif bir etki

yapmamışlardır. Genel olarak değerlendirildiğinde *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretiminin kullanılan karbon kaynakları ile düşük düzeyde de olsa uyarıldığı ve ortalama %101 düzeyinde sentez gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 4.50).

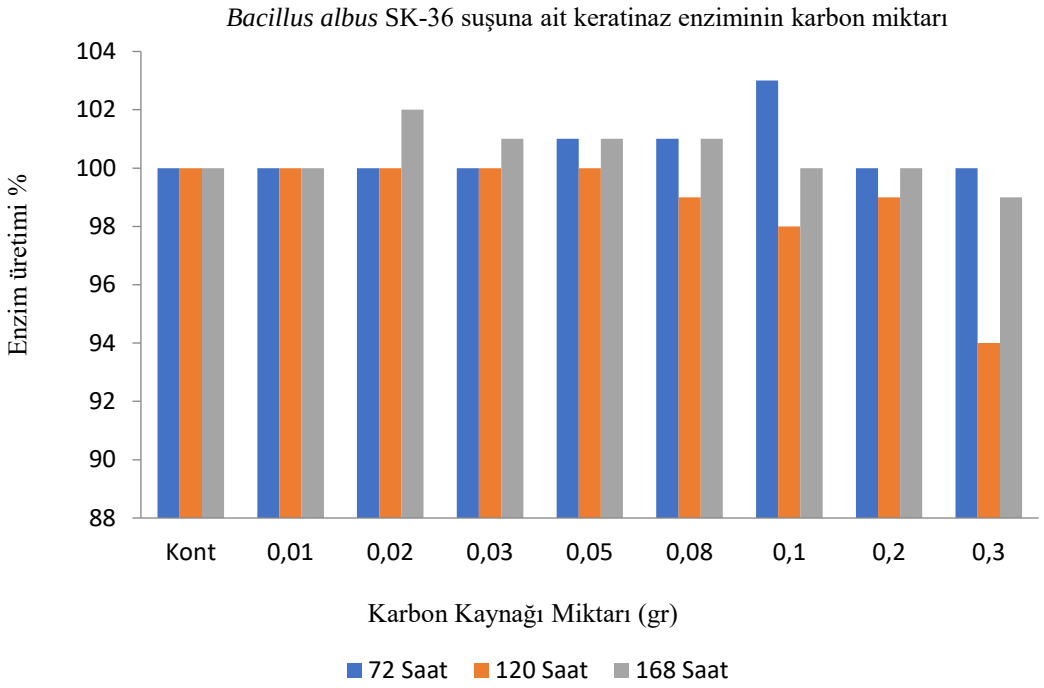


Şekil 4.50. *Bacillus albus* SK 36 keratinaz enzim üretimine karbon kaynağının etkisi (120-168 saat)

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz enzimi üretiminde farklı karbon kaynaklarının enzim sentezine etkisinin araştırılması için inkübasyon süresi 168 saate çıkartılmıştır. Analizlerde en yüksek enzim sentezinin %101 ile fruktaz bulunan ortamda gerçekleştiği, melas kullanıldığında %100 enzim üretildiği bulunmuştur. İnkübasyon süresinin 168 saate çıkartılması ile früktoz ve melas dışındaki diğer karbon kaynaklarında sentezin düştüğü saptanmıştır. En büyük düşüş yaklaşık %3 ile buğday kepeğinde gerçekleşmiş ve kontrolle karşılaştırıldığında %97 enzim üretimi saptanmıştır. Diğer substratlardaki etki sırası ile laktoz %98, glukoz, %99, maltoz %99, sukroz %99, nişasta %99, CMC %98 ve mısır unu %99 şeklinde gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasının ortamda karbon kaynaklarının azalmasına neden olduğu ve yeterli üremenin gerçekleşmemesi nedeniyle enzim sentezinde düşüş gerçekleştiği düşünülmektedir. Bütün substratlar değerlendirildiğinde elde edilen enzim verimi yaklaşık %99 bulunmuştur. Bu değer kontrolden %1 oranında düşüktür.

4.7.11. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Keratinase Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi

Karbon miktarının saptanması için en yüksek enzim üretiminin gerçekleştirildiği fruktoz 0.01-0.3 g/L konsantrasyonda kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin 72 saat olarak seçildiği üretim periyodunda en yüksek enzim üretimi %103 ile 0.1 g/L fruktoz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Diğer fruktoz konsnatrasyonları incelendiğinde 0.05 ve 0.08 g/L de sırası ile %101 ve 101 enzim üretimi saptanmıştır. Fruktozun 0.01, 0.02, 0.03, 0.2 ve 0.3 g/L konsantrasyonlarında kontrol ile aynı miktarda enzim üretimi elde edilmiştir (Şekil 4.51).



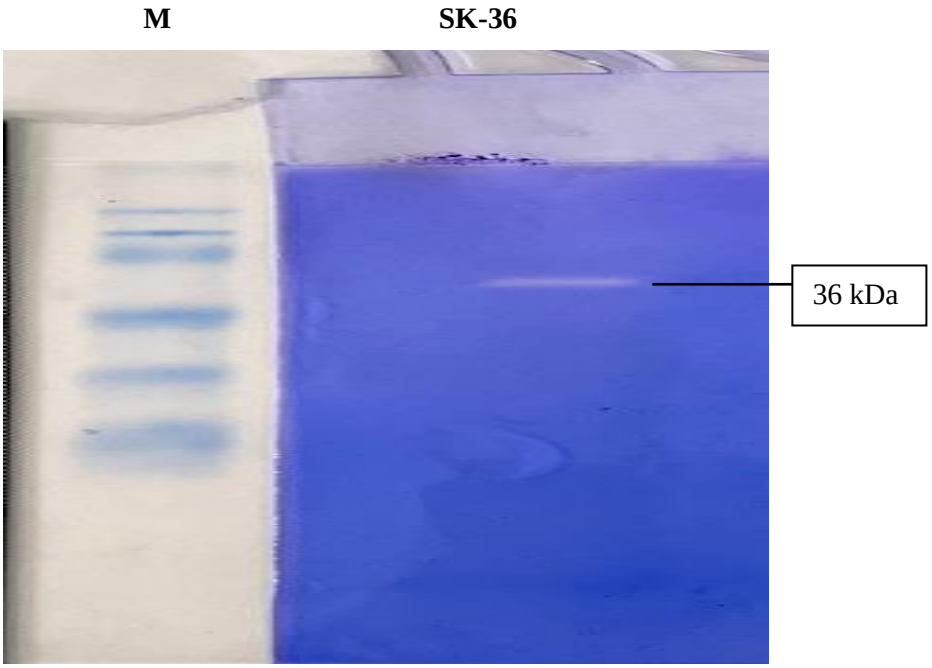
Şekil 4.51. *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimine karbon miktarının etkisi (72, 120 ve 168 saat)

Enzim üretimine karbon miktarının saptanması için 120 saatlik inkübasyon süresinin kullanıldığı çalışmada enzim üretimi oldukça stabil bir seyir izlemiştir. Substrat konsantrasyonu olarak 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 g/L fruktoz kullanıldığında kontrol ile aynı miktarda enzim üretimi gerçekleşmiştir. Substrat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak 0.08 konsantrasyonda %99, 0.1 de %98 ve 0.2 de %99 enzim elde edilşmiştir. Fruktoz konsantrasyonu 0.3 e yükseltildiğinde enzim üretiminde kontrole göre %6 düşüş gerçekleşmiş ve %94 oranında enzim üretilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde yaklaşık %99 enzim üretimi elde edilmiştir.

Enzim üretimine karbon miktarının etkisinin saptanması için inkübasyon süresi olarak 168 saat seçildiğinde en yüksek enzim üretimi %102 ile 0.02 g/L fruktoz kullanıldığında elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonu 0.03-0.08 aralığında kullanıldığı zaman enzim üretiminde stabil bir durum ortaya çıkmış ve ortalama %101 enzim elde edilmiştir.

Substrat konsantrasyonu 0.3 g/L ye yükseltildiğinde kontrole göre %1 oranında düşüş meydana gelmiş ve %99 enzim değeri elde edilmiştir. Bütün konsntrasyonlar değerlendirildiğinde ortalama enzim üretimi %100.5 olmuştur.

4.7.12. *Bacillus albus* SK-36 Suşunun Sentezlediği Keratinaz Enzimi Zimogram Analizi



Şekil 4.52. *Bacillus albus SK-36* suşundan üretilen keratinaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi %1 skimmilk bulunan %10 SDS-PAGE jelinde analiz edilmiştir. Enzim 36 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandı oluşturmuştur. Değerlendirme için thermofisherin 120, 85, 50, 35, 25 ve 20 kDa prestaning protein moleküler ağırlık markerı kullanılmıştır (Şekil 4.54).

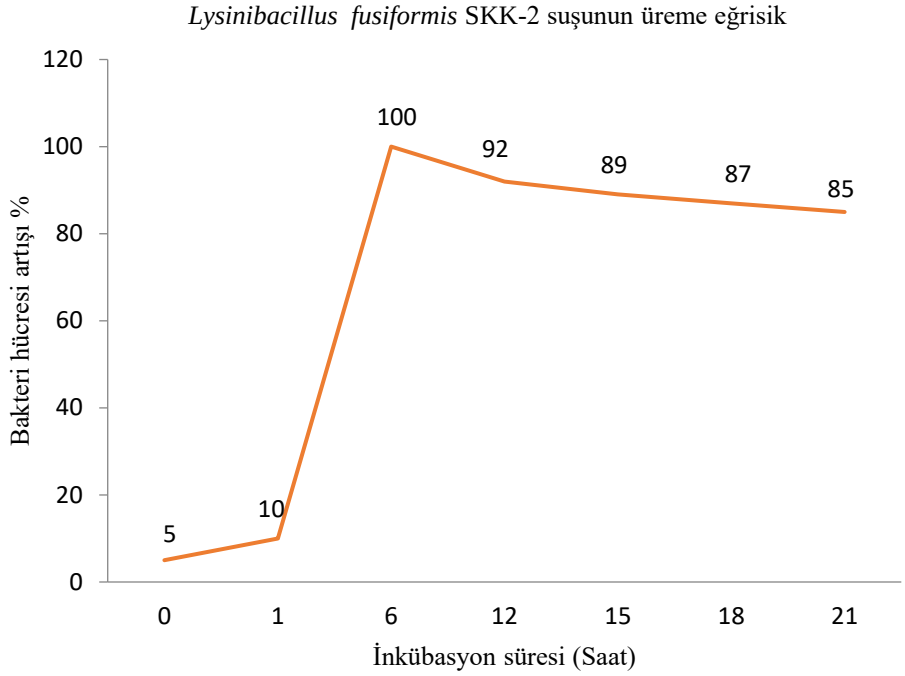
Literatürde, *Bacillus thuringiensis* Bt407 suşundan izole edilen keratinaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizinde 33kDa ağırlığında tek bir aktivite bandı oluşturduğu bulunmuştur (Utangi ve Aruna, 2018). Bulgumuz literatüre büyük ölçüde benzerdir.

Tüy parçalayıcı bakterilerin büyük bir kısmı Bacillus spp. grubunda bulunmaktadırlar. *Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaceins, Brevibacillus brevis* US575, *Bacillus tequilensis* suşu Q7, *Bacillus pumilus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis* ve *Bacillus halodurans'ı* içerir (Jaouadi ve ark., 2015).

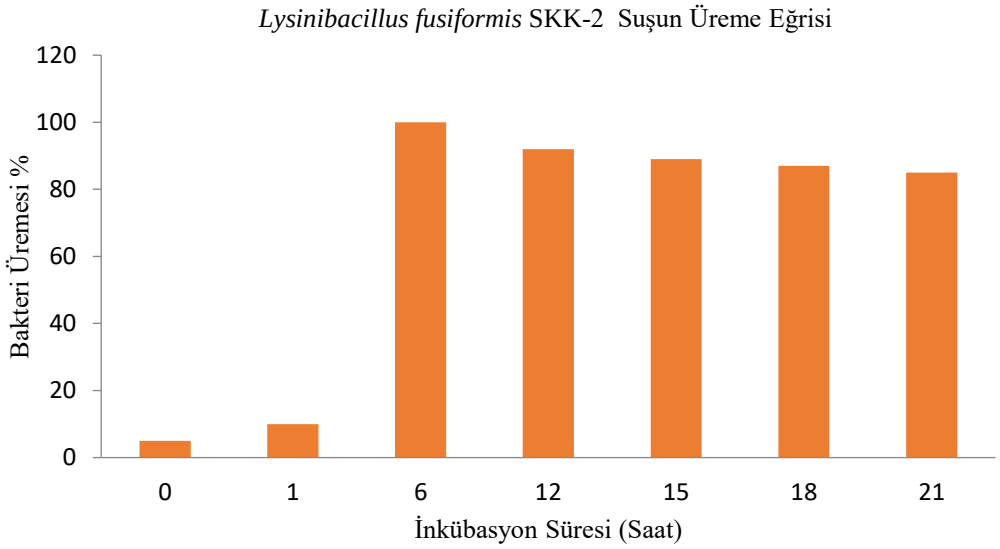
4.8. Kollejenaz Enzimi Üreten *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarının Üreme Eğrisi

Kollajenaz enzim üretimi için seçilen bakteri suşlarından *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının LB besiyerinde bir gecelik sıvı kültürleri üretilmiştir. Her

bakteri kültüründen %5 oranında 30 mL LB besiyerine aşılanıp 0, 1 , 6, 12, 15, 18 ve 21' inci saatlerde 2 mL örnek alınarak 660 nm de spektroskopik ölçüm yapılmış ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak bakteri üreme eğrisi oluşturulmuştur. İnkübasyon sıcaklığı bakterinin optimum üreme sıcaklığında ve 150 rpm de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.53A ve 4.53B).



Şekil 4.53A.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun üreme eğrisi



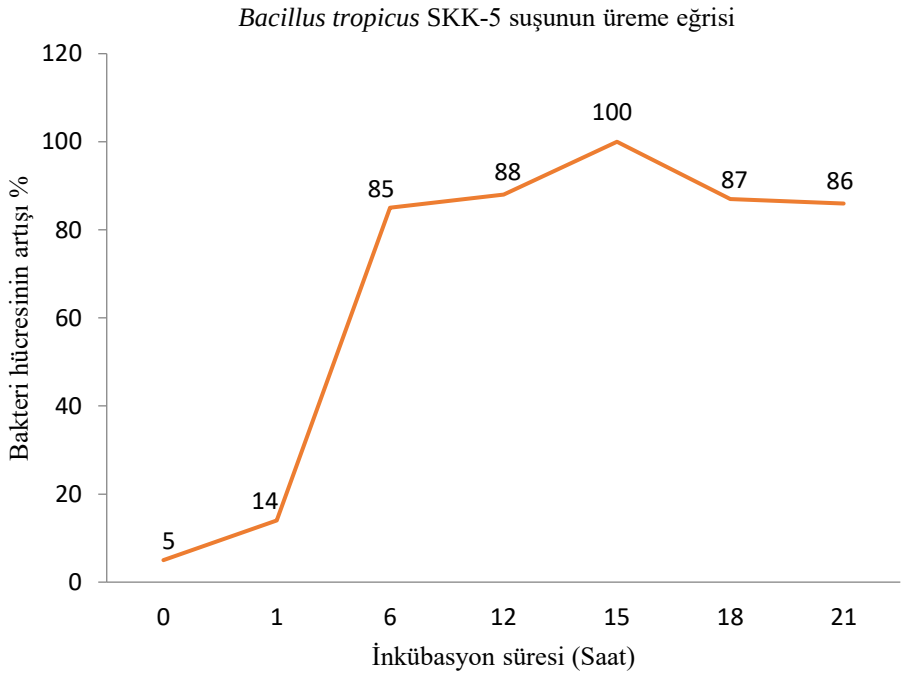
Şekil 4.53B.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun üreme eğrisi

Lysiniobacillus fusiformis SKK-2 kollajenaz üreticisi suşta birinci saatten başlayarak altıncı saate kadar hızlı bir bakteri üremesi gerçekleşmiş ve altıncı saatte üreme pik noktasına ulaşmıştır. 6' ıncı saatte üreme %100 seviyesine ulaşmıştır. Üremenin pik yaptığı altıncı saatten yirmi birinci

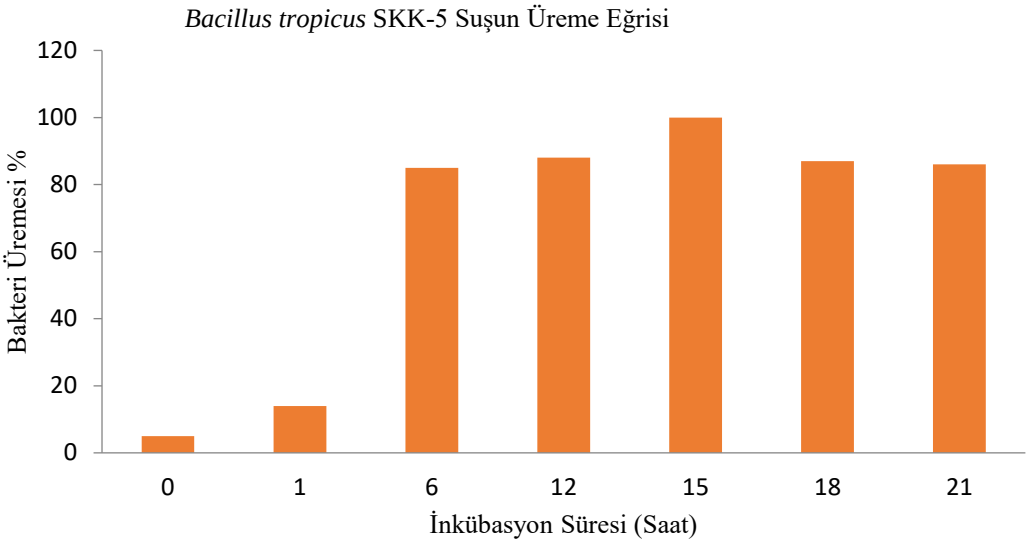
saate kadar üremede kısmi bir azalma meydana gelmiş ve yirmi birinci saatte %85 değerine düşmüştür. Bu durum suşun oldukça kısa sürede hızlı bir üreme gösterdiğini ve uzun bir stationer faz dönemi geçirdiğini göstermektedir. EnzimLerin logaritmik faz sonu ile stationer faz başlangıcında sentezlendikleri düşünüldüğünde *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun enzim üretimini altınca saatte tamamladığı görülmektedir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun üremesi altıncı saatte %85, on ikinci saatte %88, on beşinci saatte %100, on sekizinci saatte %87 ve yirmibirinci saatte %86 seviyesine ulaşmıştır. Logaritmeik faz sonu ve stationer faz başlangıcının on beşinci saat olduğu görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi on beşinci saatte büyük ölçüde tamamlanmıştır. Literatürde, *Bacillus subtilis* suşunda kollajenaz enzim üretiminin 24 saatte optimum düzeyde gerçekleştiği bulunmuştur (Roshima ve ark., 2016)

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu üreme eğrileri açısından değerlendirildiğinde *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun enzim üretiminin altıncı *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun ise on beşinci saatte gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.54A ve 4.54B)..



Şekil 4.54A. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun üreme eğrisi



Şekil 4.54B. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun üreme eğrisi

Kollajenaz enzim çalışmalarında daha önce izole edilerek katı besiyerinde kollajenaz aktivitesi saptanan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* suşları seçilerek %1 kollajen (kemik unu) içeren minimal besiyerinde enzim üretimi gerçekleştirilip, soğuk aseton ile kısmı saflaştırma işlemi yapılarak enzimatik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için %0.5 kollajen (ham kemik unu) içeren farklı pH tamponları kullanılarak pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 değerlerinde substrat çözeltileri hazırlanmış ve steril edilerek analizlerde kullanılmıştır.

Aktivite analizi için 50 µL enzim ve 250 µL farklı pH değerine sahip substrat karıştırılarak 60 dakika 30 ºC de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra karışıma 300 µL %10'luk TCA çözeltisi eklenmiş ve 20 dk soğukta bekletilmiştir. Örnek 10 dk 10000 rpm de sentrifüj edilmiştir. Üst fazdan 400 µL alınarak yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 400 µL folin ayıracı ile 2000 µL 0.4M $NaCO_3$ eklenmiştir.

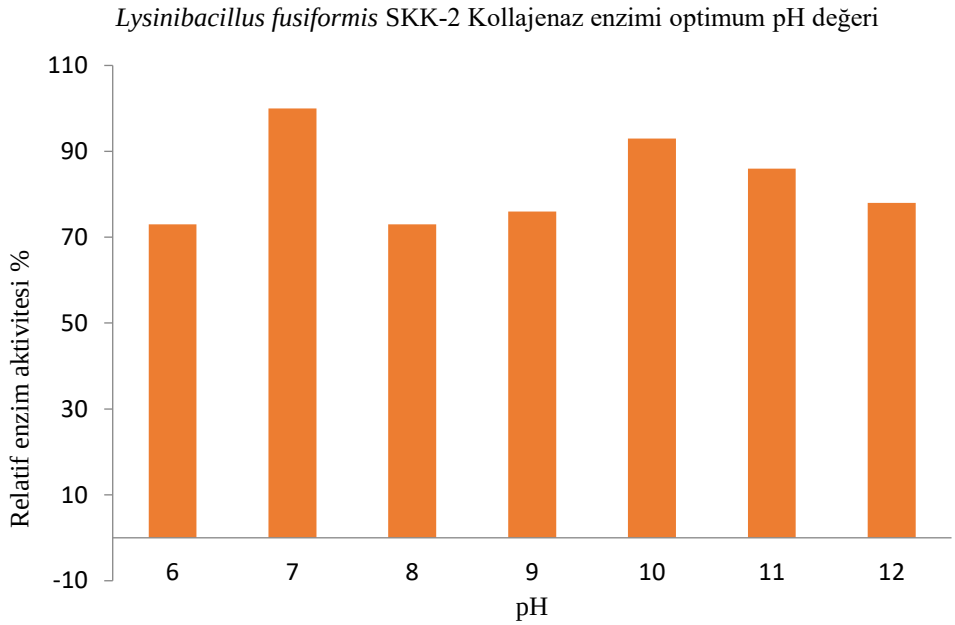
Hazırlanan reaksiyon karışımı 30 dk süreyle oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 578 nm dalga boyunda köre karşı absorbans okuması yapılmıştır.

4.8.1. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi optimum aktivitesini pH 7.0 de göstermiştir. Enzim pH 10.0 da yaklaşık %93 aktivite göstererek ikinci bir aktivite piki oluşturmuştur. Bu sonuç enzimin zimogram analizinde saptanan 3 farklı moleküler ağırlığa sahip bağımsız enzim bandının varlığı ile desteklenmiştir. Enzim bütün pH 6.0 da yaklaşık %73, pH 12.0 de yaklaşık %78, bütün pH değerlerinde ortalama %83 relatif aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar enzimin oldukça geniş bir pH aralığında yüksek düzeyde aktiviteye sahip olduğunu

göstermektedir. Bununla birlikte optimum aktivitenin pH 7.0 de elde edilmesinin yanısıra pH 6.0 da %73 ve pH 8.0 de %73 aktivite değerine ulaşılması, enzimin asido-alkali aralıkta güçlü aktiviteye sahip olduğunu, bununla birlikte nötral özelliğinin güçlü şekilde ön plana çıktığını göstermektedir (Şekil 4.55).

Bacillus subtilis suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktiviteyi pH 8.0 de gösterdiği, bununla birlikte pH 7.0-9.0 aralığında aktif olduğu belirtilmiştir (Rochima ve ark., 2016). *Bacillus licheniformisten* üretilen kollajenaz enziminin pH 8.0-9.0 aralığında optimum aktivite gösterdiği bulunmuştur (Rahmayanti, A., 2014). *Lysinibacillus sphaericus* VN3 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin aoptimum aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 bulunmuştur (Hoa Bach, 2020). *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole ettiğimiz kollajenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri, literatür verileri ile birebir uyum göstermiştir (Hoa ve ark., 2020).



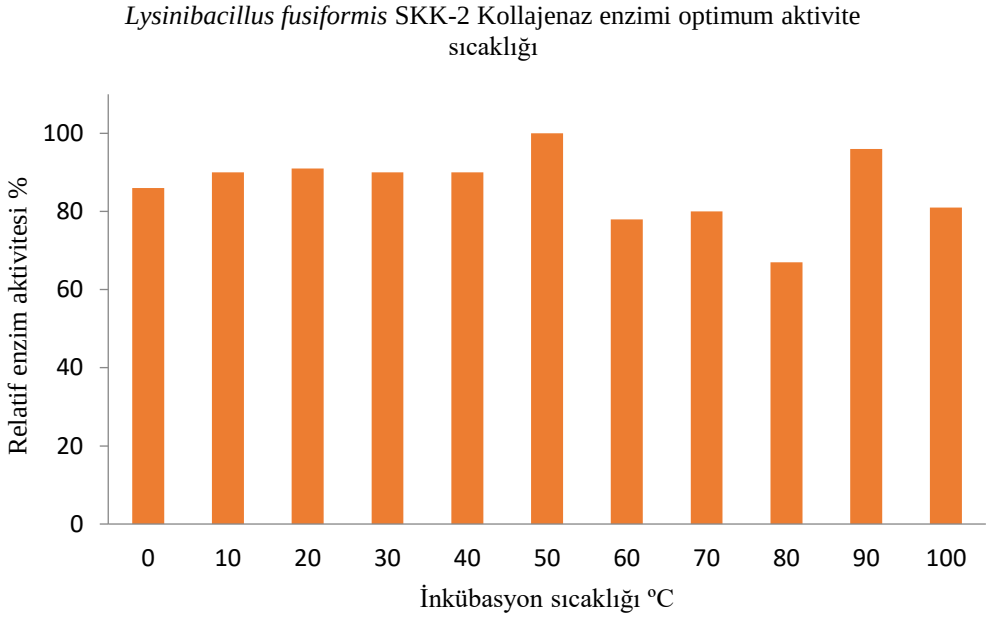
Şekil 4.55. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunndan izole edilen kollajenaz enziminin optimum pH aktivitesi bulguları.

4.8.2. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

Lysinibacillus fusiformis SSK-2 suşundan üretilen optimum aktivitesini pH 7.0 de gösteren asido-alkali aralıkta yüksek relatif aktivite değerine sahip enzim 0-100 ºC aralığındaki sıcaklıklarda 60 dakika süreyle test edilmiştir. Enzim optimum aktivitesini 50 ºC de göstermiştir. pH optimumum çalışmalarında elde edilen iki farklı pH değerindeki aktivite yüksekliği optimum sıcaklık araştırmalarında da ortaya çıkmıştır. Enzim %100 aktivitesini 50 ºC de gösterirken 90 ºC de %96 aktivite göstererek ikinci bir pik oluşturmuştur. Üretilen kollajenaz enzimi 0 ºC de %86, 10

ºC de %90, 20 ºC de %91, 30 ºC de %90, 40 ºC de %90, aktivite elde edilmiştir. 0-4ºC aralığındaki ortalama aktivite %89.4 olarak gerçekleşmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 60-100 ºC aralığında ortalama aktivite %80.4 olarak gerçekleşmiştir. Bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığında elde edilen aktivite değeri ortalama %86 olarak gerçekleşmiştir. Elde edilen bu sonuçlar enzimin cold-mezofil-hiper termofil karakterde olduğunun göstermektedir. Enzim 0-40 ºC aralığında %89 aktivite göstererek cold-mezofil ağırlıklı aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.56)

Literatürde *Bacillus subtilis* suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktivitesini 50°C de gösterdiği belirtilmiştir ((Roshima ve ark., 2016). Çalışmamızda izole ettiğimiz enzimin optimum aktivite sıcaklığı 50°C olup, literatürle tam bir uyum göstermektedir.



Şekil 4.56. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık

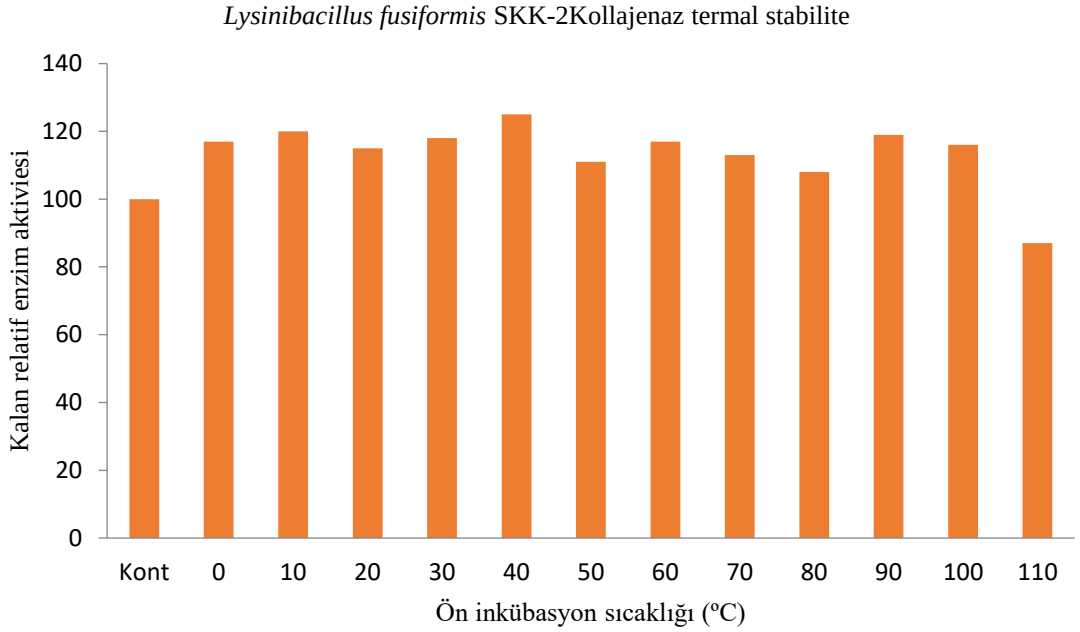
4.8.3. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Termal Stabilite Değerinin Saptanması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 enzimi ön inkübasyon uygulanan bütün sıcaklık değerlerinde (110ºC hariç) ortalama %116 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon uygulamasından sonra orijinal aktivitesine göre indüklenerek yüksek stabilite göstermiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollejenaz enzimi 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110°C de 60 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuş ve optimum aktivitenin elde edildiği substrat ile karıştırılarak en yüksek aktivitenin gerçekleştiği sıcaklık değerinde 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek kalan enzim aktivitesi saptanmıştır. Aktivite analizi sonunda sırası ile %117, 120, 115, 118, 125, 111, 117, 113, 108, 119, 116 ve 87 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon uygulanan 110°C dışındaki bütün sıcaklık değerlerinde stabil

kalmış ve enzim aktivitesi indüklenerek kontrolden daha yüksek değerlere ulaşmıştır. En yüksek aktivite değeri %125 ile 40°C de elde edilmiştir.

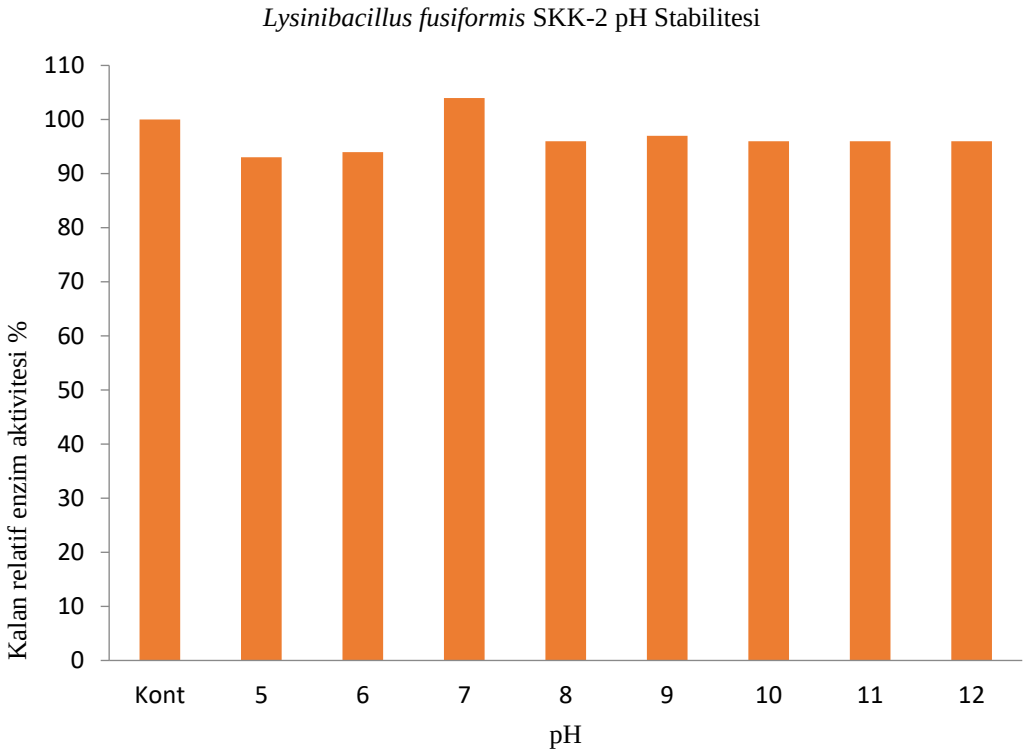
Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi optimum aktivite gösterdiği 10°C de de %120 aktivite değeri ile 40°C den sonra en yüksek stabiliteyi göstermiştir. Ön inkübasyon işlemi uygulanan 110°C de kalan enzim aktivitei %87 olarak bulunmuş ve enzim bu sıcaklıkta orijinal aktivitesini %87 oranında koruyarak ciddi düzeyde stabil kalmıştır. Ön inkübasyon gerçekleştirilen 110°C dışındaki sıcaklık değerlerinde enzimin güçlü şekilde indüklenerek ortalama %116 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim termal stabilite değerlerine göre sıcaklıkla indüklenen, psikro-hiper termal satbilite özelliğindedir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun termal satbilite bulguları.

4.8.4. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun pH Stabilite Değerinin Saptanması

Lysinobacillus fusiformis SSK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 20 ºC de 24 saat farklı pH çözeltilerinde bekletilerek, enzimin stabilitesi test edilmiştir. 24 saatlik ön inkübasyondan sonra optimum aktivitenin elde edildiği pH değerine sahip substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilip aktivite analizi yapılmıştır. Enzim pH 5.0-12.0 aralığında analiz edildiğinde orijinal aktivitesini ortalama %96.5 düzeyinde korumuş ve stabil kalmıştır. pH 5.0-6.0 aralığında yaklaşık %93 stabilite elde edilirken, pH 7.0 de aktivite %104 seviyelerine yükselerek, aktivtenin %4 oranında indüklendiği saptanmıştır. pH 8.0-12.0 aralığında ortalama %96.2 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim, asido-alkali koşullarda 24 saat süresince yüksek düzeyde stabil özellik göstermiştir. Sonuçlar enzimin mezo-alkali koşullarda asidik koşullara göre (ph 5.0-6.0) kısmen daha stabil kaldığını ve yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.58).

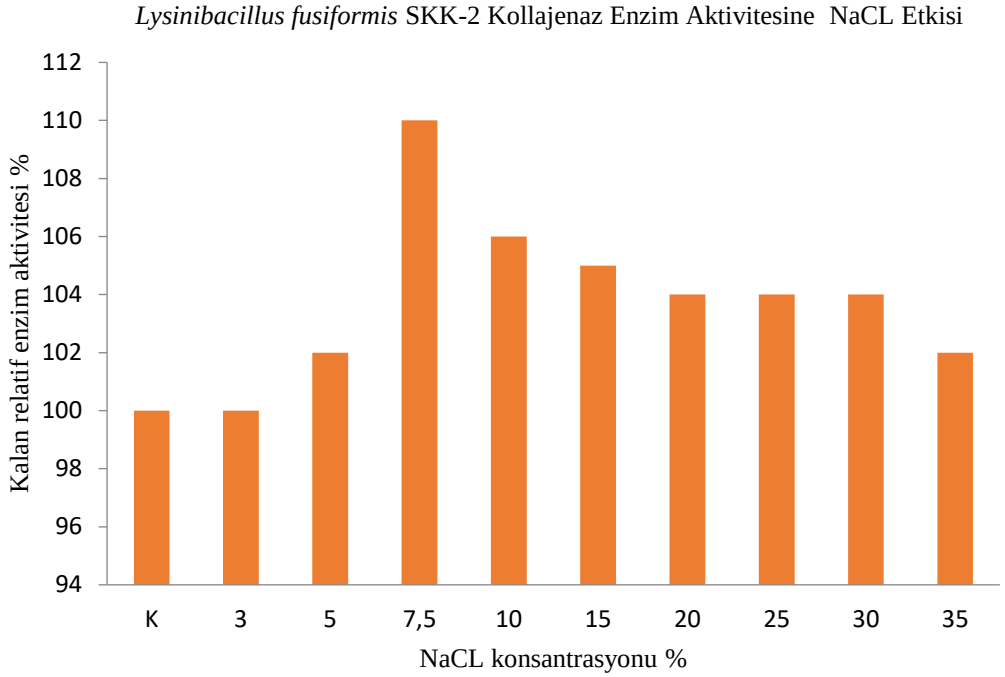


Şekil 4.58. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun pH satbilite bulguları

4.8.5. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz Enzimine NaCL Etkisinin Saptanması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin farklı NaCL konsantrasyonunda aktivite ve stabilite açısından analizi yapılmıştır. Enzim 60 dakika süreyle 37 ºC de farklı (%3-%35 NaCL) Nacl konsantrasyonlarıda ön inkübasyona bırakılmış ve daha sonra aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Enzim %3 te %100, %5 te %102, %7.5 te %109, %10 da %100 relatif aktivite göstermiştir. Enzim aktivitesi %3-7.5 aralığında indüklenmiştir.

Enzim aktivitesi %15 NaCL konsantrasyonunda bir miktar düşmüş (%93) fakat %20-30 konsantrasyon aralığında tekrar indüklenerek %104 aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim aktivitesi %35 konsantrasyonda ikinci pikini oluşturmuş ve aktivite %108'e yükselmiştir. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında ortalama %103 aktivite artışı elde edilmiş olup, indüklenebilir ekstrem halofil özellik göstermektedir (Şekil 4.59).



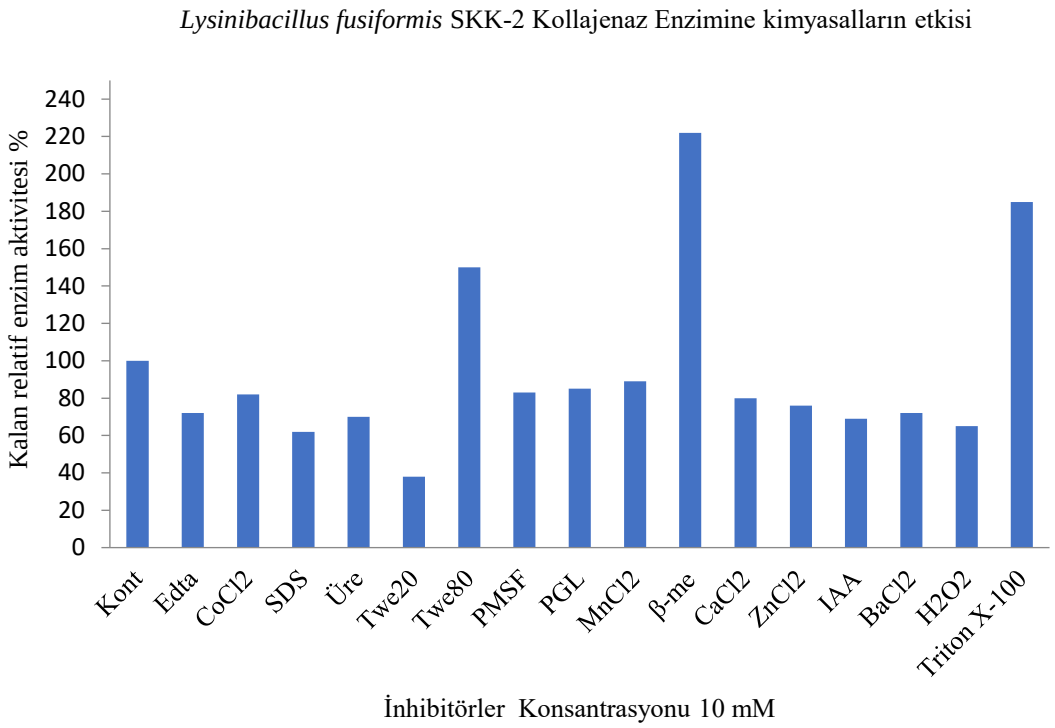
Şekil 4.59. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine NaCL etkisi

Bu sonuçlar enzimin, geniş bir NaCL konsantrasyonun aralığında yüksek düzeyde aktivite gösteren hiper halofilik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Aktivitede elde edilen iki farklı pik değeri, optimum pH ve optimum sıcaklık analizlerinde elde edilen bulguları desteklemektedir.

4.8.6. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz Enzimine Kimyasalların Etkisinin Saptanması (5 ve 10 mM)

Lysinobacillus fusiformis SSK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi 5 mM konsantrasyonda inhibitör, şelatör, metal iyonları, deterjanlar, okside edici ajanlar ve yüzey aktif bileşiklerle muamele edilerek orijinale göre enzim aktivitesindeki değişimler analiz edilmiştir. Bu amaçla enzim 10 ve 5 mM konsantrasyonda farklı ajanlarla 37ºC 40 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve optimum koşullarda aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Lysinobacillus fusiformis SSK-2 kollajenaz enzimi ile yapılan inhibisyon çalışmalarında 10 mM EDTA, $CoCL_2$, SDS, Üre, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCL_2$, β-merkaproetanol, $CaCL_2$, $ZnCL_2$, IAA, $BaCL_2$, H_2O_2 ve Triton X-100 e karşı 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda sırası ile %72, %82, %62, %70, %38, %150, %83, %85, %89, %222, %80, %76, %69, %72, %65 ve %185 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim Twen-80, β-merkaproetanol ve TritonX-100 ile güçlü şekilde aktive olmuştur. EDTA ve PMSF ile kısmen inhibe olduğundan metallo-serin özelliğe sahiptir (Şekil 4.60).



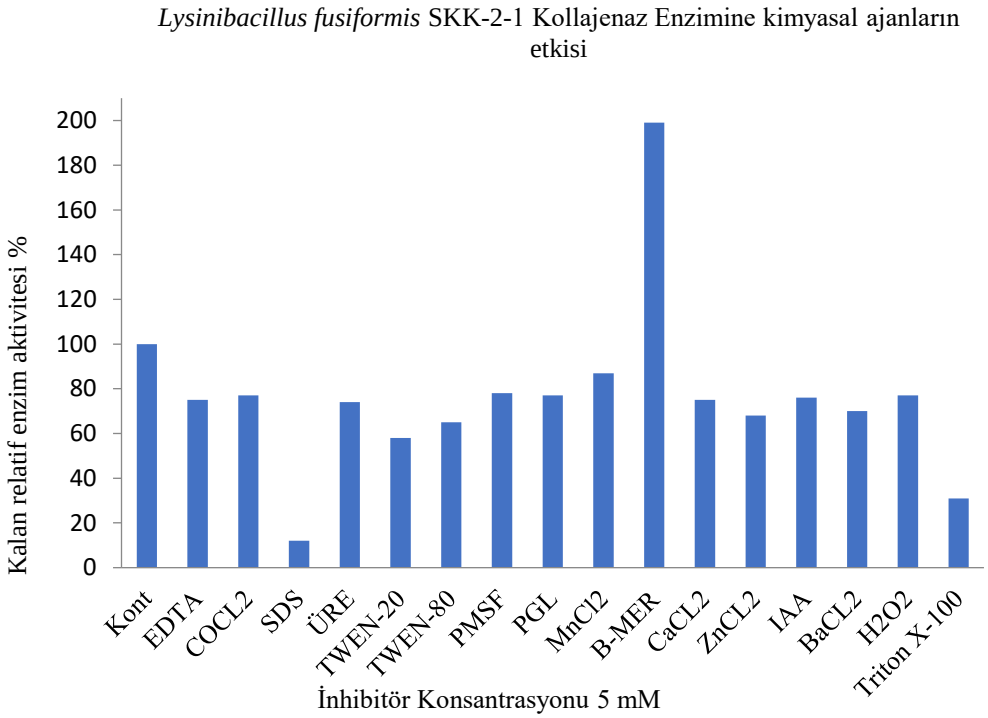
Şekil 4.60. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (10 mM)

Lysinibacillus fusiformis SSK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi 5 mM konsantrasyonda inhibitör, şelatör, metal iyonları, deterjanlar, okside edici ajanlar ve yüzey aktif bileşiklerle muamele edilerek orijinale göre enzim aktivitesindeki değişimLer analiz edilmiştir. Bu amaçla enzim 5 ve 10 mM konsantrasyonda farklı ajanlarla 37ºC 40 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve optimum koşullarda aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SSK-2 kollajenaz enzimi ile yapılan inhibisyon çalışmalarında 10 mM EDTA, $CoCL_2$, SDS, Üre, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCL_2$, β-merkaproetanol, $CaCL_2$, $ZnCL_2$, IAA, $BaCL_2$, H_2O_2 ve Triton X-100 e karşı 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda sırası ile %75, %77, %12, %74, %58, %65, %78, %77, %87, %199, %75, %68, %76, %70, %77 ve %31 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim β-merkaproetanol etkisi ile güçlü şekilde indüklenmiş ve %199 kalan aktivite elde edilmiştir.

Buna karşılık 10 mM konsantrasyonla karşılaştırıldığında, SDS ile güçlü şekilde inhibe olarak %12 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Benzer durum triton X-100 de görülmüş olup, 10 mM konsantrasyonda %185 kalan aktivite değeri elde edilirken, 5 mM da kalan aktivite değeri güçlü şekilde inhibe olarak %31 e düşmüştür. Enzimin 5 mM deterjan konsantrasyonlarında yüksek değerde inhibe olması deterjan uygulamaları için uygun olmadığını göstermektedir. İzole edilen enzim yaklaşık aynı düzeyde inhibe olarak sırası ile EDTA da %75, PMSF de %78 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim EDTA ve PMSF ile kısmen inhibe olduğundan metallo-serin özelliğe sahiptir.

β-merkaptoetanol ile aktivitenin indüklenmesi tiyol bileşiklerince zengin olduğunu düşündürmektedir. Enzim SDS ve TritonX-100 ile sırası ile %78 ve %69 inhibe olurken H_2O_2 e %77 direnç göstermiştir (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (5 mM)

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminin 10 mM ve 5 mM konsantrasyonda kimyasallara karşı österdiği davranış karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Enzimin inhibitörlere karşı davranışı incelendiğinde 10 mM konsantrasyonda 5 mM konsantrasyona göre daha yüksek dayanıklılık elde edilmiştir. Örneğin SDS ye karşı 5 mM konsantrasyonda %12 dirençlilik gerçekleşirken 10 mM konsantrasyonda %62 direnç saptanmıştır. Enzim aktivitesi Triton X-100 ile 10 mM da %185 indüklenirken, 5 mM konsantrasyonda %69 inhibe olmuştur. Twen-80 ile 10 mM da %150 indüklenirken, 5 mM konsantrasyonda %35 inhibe olmuştur. $ZnCL_2$ e karşı her iki konsantrasyondada birbirine yakın oranda inhibisyon söz konusudur. $MnCL_2$ e karşı her iki konsantrasyonda da yaklaşık %20 ler düzeyinde inhibisyon gerçekleşmiştir. $CaCL_2$ e karşı her iki konsantrasyonda yaklaşık %20 ler düzeyinde inhibisyon gerçekleşmiştir. Bu durum enzim aktivitesinin kalsiyuma bağımLı olmadığını göstermektedir.

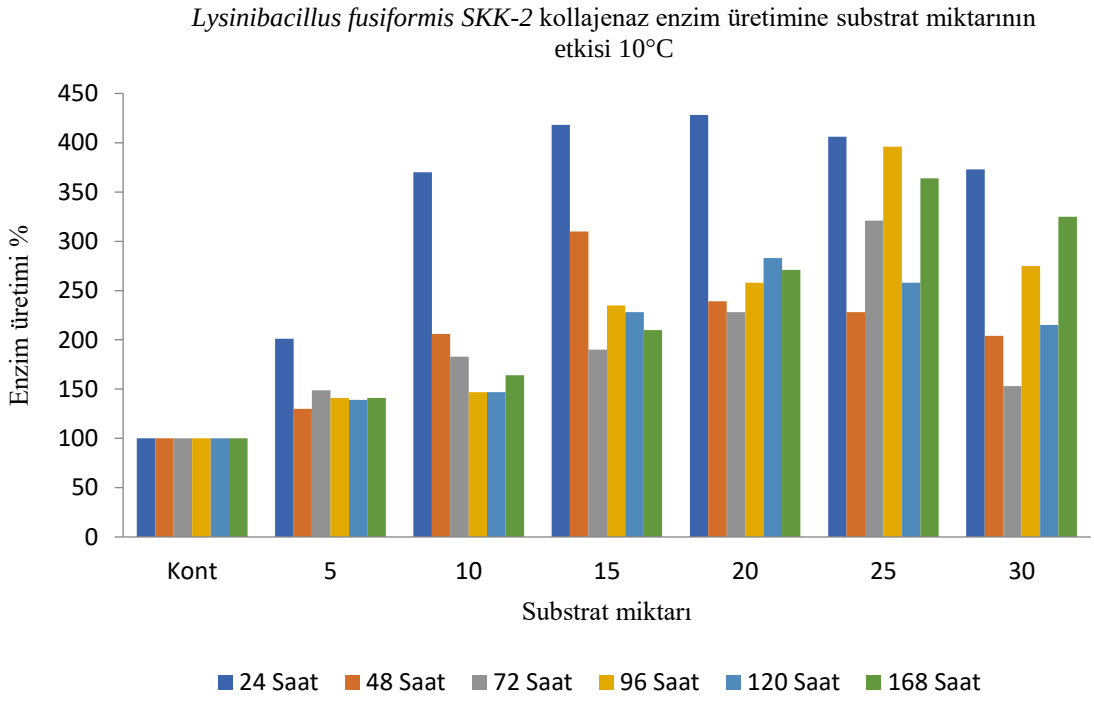
Enzim 10 mM konsantrasyonda non anyonik deterjan triton X-100'e anyonik deterjan SDS ye göre %258 daha dirençlidir.

4.8.7. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunda Kollajenaz Enzim Sentezine Farklı Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu 10°C de gerçekleştirilen enzim üretim çalışmasında, 24 saatlik inkübasyon periyodunda en yüksek enzim üretimini %20 substrat kullanıldığında gerçekleştirmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 substrat konsantrasyonlarında sırası ile %201, 370, 418, 428, 406 ve 373 oranında enzim üretimi gerçekleşmiştir. Substrat miktarı %15-25 aralığında üretilen enzim miktarı kontrole göre yaklaşık 4 kat daha yüksek değerlere ulaşmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.62).

Çizelge 4.1.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan Kollajenaz Enzim üretiminde Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (10°C)

	Substrat Konsantrasyonları					
İnkübasyon Süresi	%5	%10	%15	%20	%25	%30
24 Saat	201	370	418	428	406	373
48 Saat	130	206	310	239	228	204
72 Saat	149	183	190	228	321	153
96 Saat	141	147	235	258	396	275
120 Saat	139	147	228	283	258	215
168 Saat	141	164	210	271	364	325



Şekil 4.62.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (10°C de 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)

İnkübasyon sıcaklığı 10ºC, inkübasyon süresi 48 saat olarak uygulandığında optimum enzim üretimi %310 ile %15 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. En yüksek enzim %15 substrat konsantrasyonunda üretilmiş olmakla birlikte %5, 10, 20, 25 ve 30 substrat konsantrasyonlarında sırası ile %130, 206, 310, 239, 228 ve 204 enzim üretilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında elde optimum üretimin gerçekleştiği konsantrasyonda enzim sentezi yaklaşık 3 kat daha yüksektir. Bütün substrat değerlerinde 10ºC ve 48 saatlik inkübasyon sonunda enzim üretiminin kontrole göre ortalama 2.3 kat daha yüksek gerçekleştiği bulunmuştur.

Enzim üretimine substrat miktarının etkisinin araştırıldığı ve inkübasyon süresinin 72 saat olduğu çalışmada, optimum enzim üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiği bulunmuştur. En yüksek üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmekle birlikte %30 substrat konsantrasyonunda enzim üretiminin yaklaşık %50 azalarak %153 düzeyine düştüğü saptanmıştır. Optimum enzim üretiminin gerçekleştiği substrat değerinde kontrole göre yaklaşık %321 artış bulunmuştur. Bütün konsantrasyonlar değerlendirildiğinde ortalama enzim üretiminin %204 olduğu bulunmuştur. Enzim üretimindeki artış kontrole göre toplamda yaklaşık 2 kat daha yüksektir. Optimum üretimin meydana geldiği konsantrasyondaki artış ise 3.2 kat olmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kullanıldığı 10°C ve 96 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda %396 oranında gerçekleştiği saptanmıştır. Bununla birlikte %15, 20 ve 30 substrat konsantrasyonunda kontrole göre sırası ile %235, 258 ve 275 oranında enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bu konsantrasyonlarda ortalama enzim üretimi %256 olarak gerçekleşirken, üretimdeki artış kontrole göre 2.5 kat daha yüksektir. %15substrat konsantrasyondan itibaren enzim üretimi ani bir yükseliş göstermiş ve %25 konsantrasyonda kontrole gör yaklaşık %400 artış saptanmıştır. Substrat konsantrasyonu %25 olduğunda kontrole göre enzim üretimindeki artış 3.9 kat daha yüksektir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu kullanılarak 10ºC ve 120 saat inkübasyon gerçekleştirildiğinde en yüksek enzim üretimi %283 ile %20 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Enzim üretiminde %15 substrat konsantrasyonundan itibaren hızlı bir artış gerçekleşmiştir. %15-25 aralığında elde edilen enzim verimi ortalama %256 olarak gerçekleşmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği konsantrasonda ortalama 2.8 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur.

İnkübasyon süresinin 96 saat olarak gerçekleştirildiği periyota göre 10°C ve 120 saat inkübasyonda enzim üretimi yaklaşık 1 kat daha düşük gerçekleşmiştir.

İnkübasyon sıcaklığının 10 ºC ve 168 saat olduğu üretim periyodunda en yüksek enzim %25 substrat konsantrasyonunda yaklaşık %364 olarak gerçekleşmiştir. Kontrole göre enzim üretiminde ortalama 3.64 kat artış sözkonusudur. Substrat konsantrasyonu %30 a çıkarıldığında enzim üretimi %325 değerine düşmüştür.

Substrat konsantrasyonu artırıldıkça enzim üretimi de paralel olarak hızlı bir artış göstermiştir. Özellikle %20 substrat konsantrasyonundan başlayarak enzim sentezi hızlı bir artış

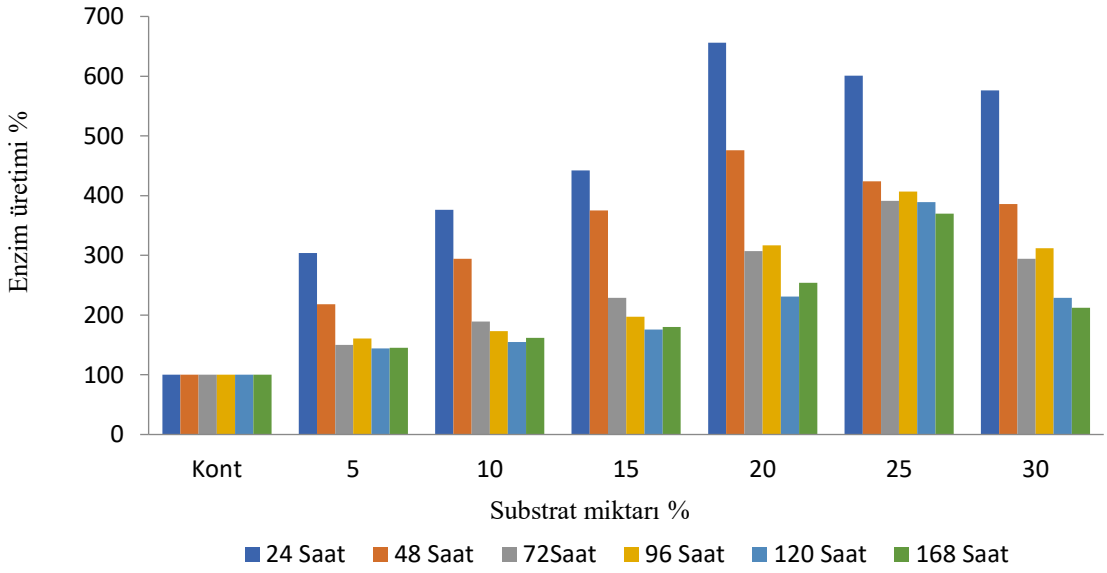
göstermiş ve %20-30 konsantrasyonlarda ortalama %320 değerine ulaşılmıştır. Bu inkübasyon sıcaklığı ve süresinde de en yüksek enzim üretimi %25 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 4.63).

İnkübasyon sıcaklığı olarak 30 ºC, inkübasyon süresi 24 saat uygulandığında optimum enzim üretimi %20 substrat kullanıldığında gerçekleşmiştir. Substrat miktarları ayrı ayrı değerlendirildiğinde %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyolarda sırası ile %304, 376, 442, 656, 601 ve 576 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman en yüksek enzim üretiminin elde edildiği substrat konsantrasyonunda üretilen enzim miktarı, kontrolün yaklaşık 6.7 katı daha fazla gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan Kollajenaz Enzim Üretiminde Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (30°C)

	Substrat Konsantrasyonları					
İnkübasyon Süresi	%5	%10	%15	%20	%25	%30
24 Saat	304	376	442	656	601	576
48 Saat	219	294	375	476	424	386
72 Saat	150	189	229	307	391	294
96 Saat	161	173	197	317	407	312
120 Saat	144	155	176	231	389	229
168 Saat	145	162	180	254	370	212

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 kollajenaz enzim üretimine substrat miktarının etkisi 30°C



Şekil 4.63.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (30°C de 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)

İnkübasyon sıcaklığı 30ºC, inkübasyon süresi 48 saat olarak uygulandığında optimum enzim üretiminin %476 ile %20 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiği bulunmuştur. Kontrolle karşılaştırıldığında %20 substrat konsantrasyonunda enzim üretimindeki artış yaklaşık 4.7 kat olarak bulunmuştur. Diğer substrat konsantrasyonları ayrı ayrı incelendiğinde %5, 10, 15, 25 ve 30 tip 1 kollajen (ham kemik unu) kullanılan besiyerlerinde sırası ile %219, 294, 375 ve 424 ve 386 enzim üretildiği saptanmıştır. Bütün substrat değerlerinde 30ºC ve 48 saatlik üretim periyodunda kontrole göre enzim üretiminde ortalama 3.6 kat artış gerçekleşmiştir.

İnkübasyon süresinin 48 saat olarak seçildiği enzim üretim çalışmalarında sıcaklığın 30ºC ye yükseltilmesi ile aynı bakteri suşunun 10ºC ye göre yaklaşık %64 daha fazla enzim ürettiği saptanmıştır. Bu sonuç *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen enzimin optimum aktivitesini 10ºC de göstermesine rağmen enzim üretiminin 30ºC de daha yüksek düzeyde gerçekleştiğini göstermektedir.

İnkübasyon süresinin 72 saat ve inkübasyon sıcaklığı 30 ºC olduğunda optimum enzim üretimi %25 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. %15 substrat konsantrasyonda kontrole göre enzim üretimi 3 kat artış göstermiş olmakla birlikte %25 substrat konsantrasyonunda yaklaşık 4 kat artış gerçekleşmiştir. Bütün konsantrasyonlarda elde edilen enzim üretimi ortalama %260 gerçekleşmiştir. Genel enzim üretimi kontrole göre ortalama 2.6 artmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu 30ºC ve 96 saatlik üretim periyodunda en yüksek enzim üretimi %25 substrat konsantrasyonunda %407 elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonunun %20-30 aralığında üretilen enzim miktarı ortalama %345 gerçekleşmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında %15 konsantrasyondan itibaren enzim üretiminde hızlı bir artış meydana gelmiş ve %25 substrat konsantrasyonunda 4.7 kat artış gerçekleşmiştir.

İnkübasyon süresinin 96 saat olarak seçildiği periyotta 10°C ye göre 30°C de daha yüksek enzim üretimi gözlenmiştir. Bununla birlikte 30ºC de en yüksek enzim üretimi %25 substrat konsantrasyonu kullanıldığında gerçekleşmiştir

Lysinibacillus fusiformis SKK 2 suşundan kollajenaz enzim üretimi için 30°C ve 120 saatlik inkübasyon periyodunda en yüksek enzim değerine %389 ile %25 substrat konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Enzim üretiminin %30 substrat konsantrasyonunda %229 a düştüğü saptanmıştır. Optimum üretimin gerçekleştiği substrat miktarına göre %30 konsantrasyonda enzim üretimindeki azalma yaklaşık %41 düzeyindedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında enzim üretimindeki artış %25 substrat konsantrasyonunda yaklaşık 3.9 kat yüksektir.

İnkübasyon süresinin 120 saat olduğu üretim .alışmasmda *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu 30°C de %25, 10ºC de %20 substrat konsantrasyonunda en yüksek enzim üretimi gerçekleştirmiştir. En yüksek enzim üretimLeri karşılaştırıldığında 30ºC de 10ºC ye göre %27 daha yüksektir.

Lysinibacillus fusiformis SSK-2 suşunun kollajenaz enzim üretiminde 30ºC ve 168 saatlik inkübasyon periyodunda izole edilen bakteri suşu en yüksek enzim üretimini %25 substrat

konsantrasyonunda elde edilmiştir. İzole edilen suş %370 enzim üretimi gerçekleştirmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında elde edilen enzim üretimi 3.7 kat artış göstermiştir.

Bütün konsnatrasyonlarda kontrole göre enzim üretiminde belirgin artış meydana gelirken, özellikle optimum üretimin gerçekleştiği %20-30 aralığında %279 enzim üretilmiştir. Substrat konsantrasyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyonlarda sırası ile %145, 162, 180, 254, 370 ve 212 enzim üretilmiştir.

İnkübasyon sıcaklıkları farklı olsada inkübasyon süresinin 168 saat olduğu üretim çalışmasında enzim üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiği ve elde edilen enzim miktarının 10ºC ve 30ºC de yaklaşık %370 ile bir birine oldukça yakın olduğu saptanmıştır. Her iki sıcaklık değerinde de en yüksek enzim değeri %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Bununla birlikte inkübasyon sıcaklığının 10°C olduğu üretim periyodunda %30 substrat konsantrasyonunda %325 enzim üretimi gerçekleşirken, inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu periyotta %212 enzim üretilmiştir.

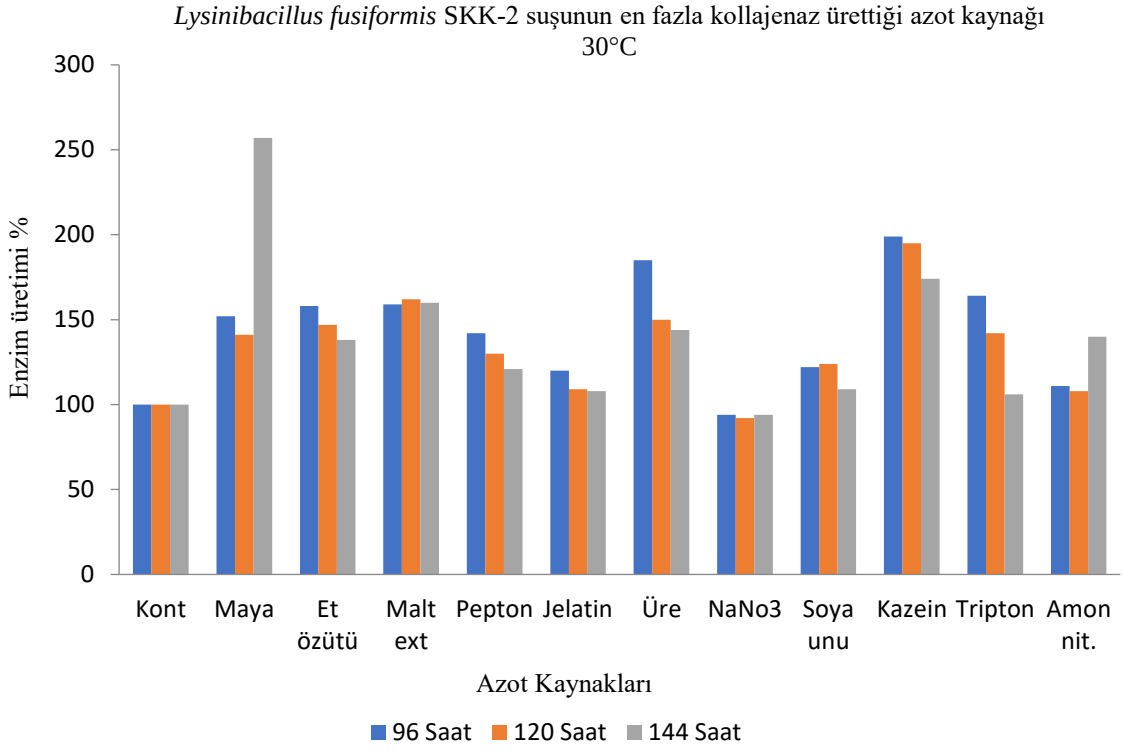
İnkübasyon sıcaklığının daha düşük olduğu koşullarda bakteri suşunun %30 substrat konsantrasyonunda yaklaşık %30 daha fazla enzim ürettiği görülmektedir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu kullanılarak 10 ve 30 ºC lik sıcaklıklarda yapılan çalışmalarda en yüksek üretim 24 saatte elde edilmiştir. Optimum enzim üretimi her iki inkübasyon sıcaklığında da %20 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Bununla birlikte inkübasyon 30ºC de gerçekleştirildiğinde enzim üretiminin 10 ºC ye göre yaklaşık %50 daha fazla gerçekleştiği götülmektedir (Kontrole göre 10 ºC de 4 kat, 30 ºC de 6.7 kat daha yüksek enzim elde edilmiştir).

4.8.8. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Kaynağının Etkisi

Çalışmada azot kaynağı olarak maya özütü, et özütü, malt özütü, pepton, jelatin, üre, sodyum nitrat, soya unu, kazein, tripton ve amonyum nitrat kullanılmıştır. Çalışmada minimal besiyerine azotkaynağı olarak sadece bir azot kaynağı eklenmiş ve 30°C de 150 rpm de inkübatörlü çalkalayıcı kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi olarak 96, 120 ve 144 saat seçilmiştir.

İnkübasyon süresinin 96 saat uygulandığı kollajenaz enzim üretim çalışmasında en yüksek enzim sentezi %148 ile malt özütünde gerçekleşmiştir. En düşük enzim üretimi ile %92 ile üre kullanıldığında elde edilmiştir. Kullanılan azot kaynaklarından maya özütü, et özütü, pepton, jelatin, $NaNO_3$, soya unu, kazein, tripton ve amonyum nitrattan sırası ile %134, 131, 127, 123, 104, 109, 109, 118 ve 101 enzim üretilmiştir. Bütün azot kaynaklarından elde edilen enzim ortalama %117,5 olmuştur. Enzim üretminde en etkili azot kaynağı malt özütü olurken bunu sırası ile maya özütü, et özütü, pepton, jelatin, tripton, soya unu, kazein, $NaNO_3$, amonyum nitrat ve üre izlemiştir (Şekil 4.64).



Şekil 4.64.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzim sentezine azot kaynağının etkisi (30°C 96 saat).

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimine 120 saatlik inkübasyon süresinde en etkili azot kaynağının %177 ile malt özütü olduğu bulunmuştur. İnkübasyon süresinin 120 saate çıkarılması ile birlikte enzim üretiminde belirgin düzeyde enzim artışı gerçekleşmiştir. Bununla birlikte 96 saatlik inkübasyon süresine göre kollajenaz enzim sentezinin triptonda %35, amonyum nitratta %24 düştüğü bulunmuştur.

İnkübasyon süresinin 120 saat uygulandığı dönemde de en yüksek enzim sentezi 96 saatlik dönemde olduğu gibi malt özütünde gerçekleşmiş fakat enzim miktarı %32 daha yüksek olmuştur. Azot kaynaklarıenzim sentezindeki etkisi incelendiğinde maya özünde kontrole göre %168, et özütünde %169, peptonda %172, jelatinde %142, soya ununda %142, kazeinde %138, $NaNO_3$ ta %111, ürede %108, triptonda %83 ve amonyum nitratta %77 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bütün azot kaynaklarının değerlendirilmesi sonunda ortalama enzim üretiminin %135 olduğu bulunmuştur. Elde edilen enzim değeri yaklaşık %17 daha yüksektir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu ile gerçekleştirilen çalışmada inkübasyon süresinin 144 saate çıkarılması ile enzim üretiminde ortalama %136 değerine ulaşılmıştır. Bu değer 120 saatlik inkübasyon süresinde elde edilen verimLilikle büyük ölçüde örtüşmektedir. Azot kaynaklarından elde edilen enzim verimi maya özütünde %176, et özütünde %164, malt özütünde %178, peptonda %149, jelatinde %151, ürede %93, $NaNO_3$ ta %96, soya ununda %135, kazeinde %120, triptonda %128 ve amonyum nitratta %107 gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu ile 30°C de 96, 120 ve 144 saatlik farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen ve kollajenaz enzim üretimine azot kaynaklarının araştırıldığı analizlerde her üç inkübasyon süresinde de en yüksek enzim üretimi malt özütünde gerçekleşmiştir. Üre farklı davranış göstermiş ve en yüksek enzim üretimi %108 ile 120 saatlik inkübasyon süresinde elde edilirken, 96 ve 144 saatlik inkübasyon sürelerinde yaklaşık %96 enzim sentezlenmiştir. Benzer davranış şekli tripton ve amonyum nitratta da görülmektedir. Her iki azot kaynağında da 120 saatlik dönemde enzim sentezinde sırası ile %83 ve 77 değerleri elde edilirken 96 saatte %118 ve %101, 144 saatlik dönemde %128 ve %107 değerleri elde edilmiştir. İnkübasyon süreinin 120 ve 144 saat olarak uygulandığı testlerde 96 saate göre yaklaşık %17,5 daha fazla enzim sentezlenmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun enzim üretim çalışmalarında besiyeri optimizasyonu için kullanılacak azot kaynağı net olarak malt özütü olmuştur.

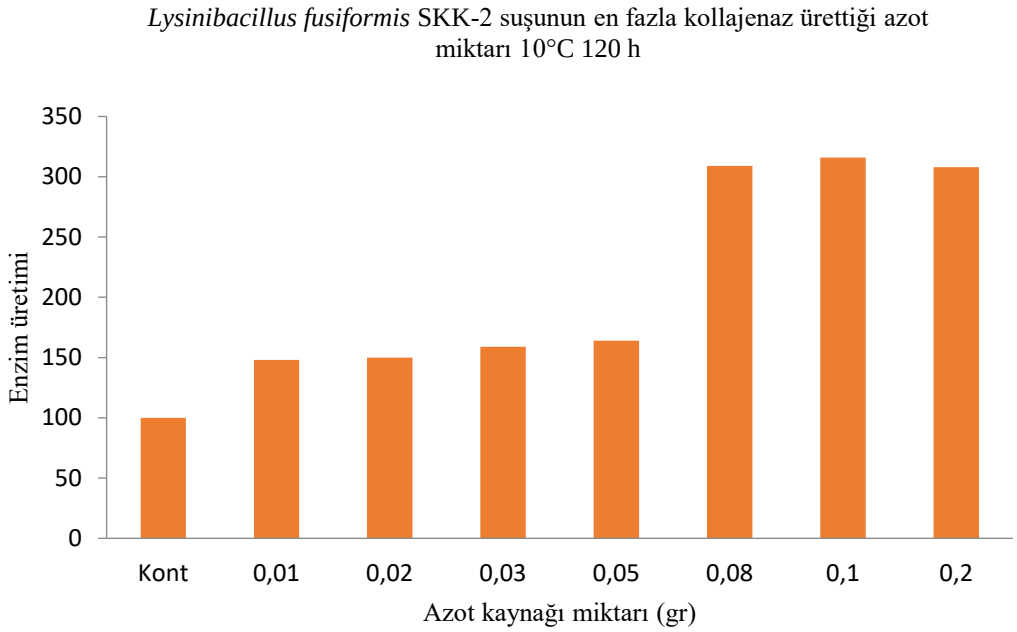
4.8.9. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Azot Miktarının Etkisi

Optimum enzim üretiminin gerçekleştiği azot kaynaklarının belirlenmesinden sonra *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının optimum enzim üretiminin gerçekleştiği azot miktarını saptamak için farklı miktarlarda azot içeren besiyerlerinde enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve standar analiz gerçekleştirilmiştir. Literatür verilerinde en yüksek enzim sentezinin beşinci günde gerçekleşmesi dikkate alınarak azot miktarının belirlenmesi için beşinci günde enzim aktivite analizi yapılarak optimum enzim üretimine en etkili azot kaynağı miktarı saptanmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunda kollajenaz enzim üretimi için azot kaynağı olarak malt özü seçilmiştir. Malt özü kullanılarak 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1 ve 0.2 g/L miktarda besiyeri hazırlanmış ve 10°C de inkübasyon sıcaklığında 120 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda en yüksek enzim sentezinin %316 ile 0.1 g/L maya özütü kullanılan besiyerinde gerçekleştiği bulunmuştur.

Kollajenaz enzim üretiminde 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.05 g/L maya özütü bulunan besiyerlerinde sırası ile %148, %150, %159 ve %164 enzim üretimi elde edilmiştir. Enzim sentezi 0.05 g/L substrat bulunan besiyerinden sonra 0.08, 0.1 ve 0.2 g/L maya özütü bulunan besiyerlerinde ciddi bir artış göstermş ve sırası ile %309, %316 ve %308 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Maya özütü 0.08, 0.1 ve 0.2 g/L kullanıldığında enzim üretimi 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.05 g/L ye göre %100 daha yüksek gerçekleşmiştir.

Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman enzim üretiminin kontrole göre minimum %48 maksimum %216 daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.65).



Şekil 4.65. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimine azot miktarının etkisi

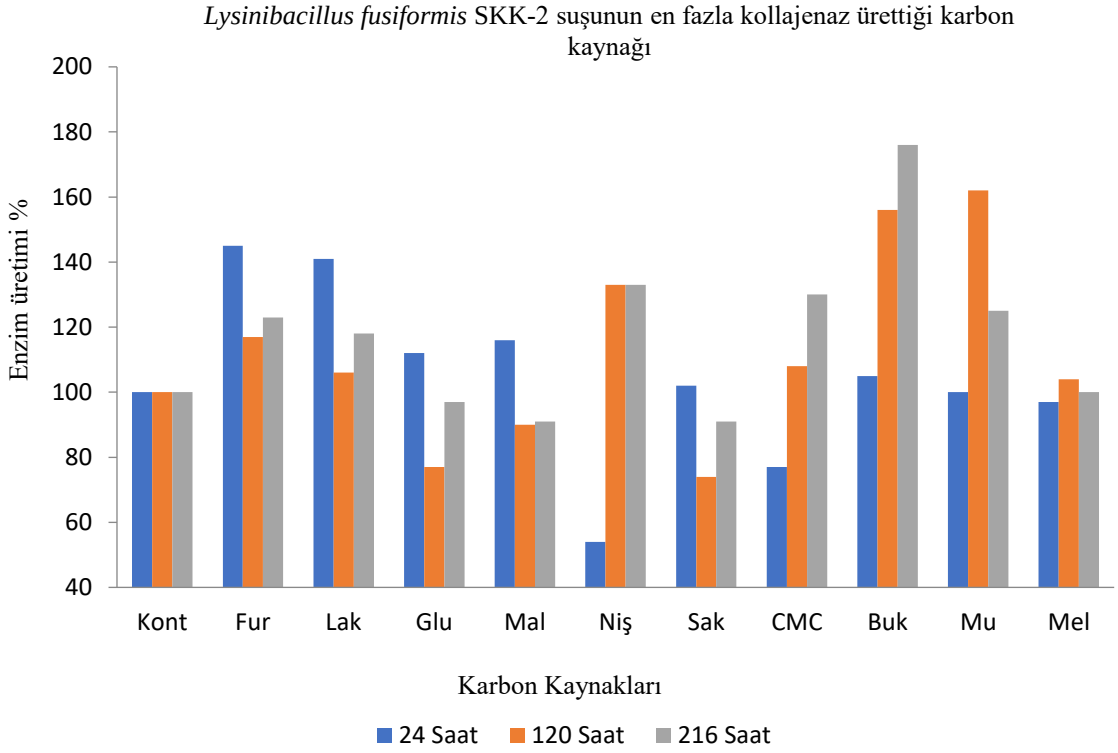
4.8.10. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşunun Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi

Çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, laktoz, maltoz, nişasta, sakaroz, cmc, buğday kepeği, melas ve mısır unu kullanılmıştır. Çalışmada minimal besiyerine karbon kaynağı olarak sadece bir ajan eklenmiş ve 30°C ve 150 rpm de inkübatörlü çalkalayıcıda üretim gerçekleştirilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezi üzerine karbon kaynağının etkisinin saptamak için farklı karbon kaynakları kullanılarak 30°C de 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek enzim sentezi %145 ile glukozda gerçekleşmiş, bunu sırası ile %141 ile fruktoz, %116 ile maltoz, %112 ile laktoz, %105 ile buğday kepeği izlemiştir. Mısır ununda elde edilen sonuç kontrol le aynıdır. Buna karşılık melas, CMC ve nişastada enzim sentezinde azalma meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlar melasta %97, CMC de %77 ve nişastada %54 olmuştur. Bu sonuçlar polisakkarit yapısında olan karbon kaynaklarının 24 saatlik periyotta yeterince kullanılamadığını, tercihini monosakkarit substratlar yönünde kullandığını ve bu nedenle enzim sentezinde mono ve disakkaritlere göre daha etkisiz olduğunu göstermektedir.

Karbon kaynakları birlikte değerlendirildiğinde mono ve disakkaritlerde enzim üretiminin ortalama %123 artış gösterdiği, polysakkaritlerde ise enzim sentezinin yaklaşık %65.5 düzeyinde kaldığı görülmektedir. Buğday kepeği ve mısır ununda ortalama %102.5 artış meydana gelmiştir. Nişasta ve CMC ile karşılaştırıldığında buğday kepeği ve mısır ununda yüksek miktarda protein bulunmasının 24 saatlik inkübasyonda enzim sentezinde etkili olduğu söylenebilir.

Bütün karbon kaynakları birlikte değerlendirildiği zaman enzim sentezi ortalama %104.9 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. *Lycinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezine karbon kaynağının etkisi (30°C de 24, 120 ve 216 saat)

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezi için inkübasyon süresi 120 saate çıkarıldığı zaman en yüksek kollajenaz üretimi %162 ile mısır ununda gerçekleşmiştir. Mısır ununu %156 ile buğday kepeği, %133 ile nişasta, %117 ile glukoz, %108 ile CMC, %106 ile fruktoz ve %104 ile melas izlemiştir. İnkübasyon süresinin 120 saate çıkarılması ile mono ve disakkaritlerin enzim sentezindeki etkisi azalmış, polisakkaritler tercih edilir duruma gelmiştir. Maltoz kullanıldığında %90, laktoz kullanıldığında %77 ve sakaroz kullanıldığında %74 enzim üretimi gerçekleşmiştir.

Bu sonuçlardan da görüleceği gibi inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte mono ve disakkaritlerin ortamdaki azalması sonucu, bakteri polisakkaritleri daha fazla kullanmış ve 24 saatlik inkübasyon süresine göre karbon kaynağı kullanımında polisakkaritlerden daha fazla yararlanılmıştır. Bu nedenle çok daha yüksek enzim değerlerine ulaşılmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezi saptamak için inkübasyon süresinin 216 saat olarak uygulandığı çalışmada, en yüksek enzim sentezinin %176 ile buğday kepeğinde gerçekleştiği görülmektedir. Buğday kepeğini sırası ile %133 ile nişasta, %130 ile CMC, %125 ile mısır unu, %123 ile glukoz, %118 ile fruktoz, %100 ile melaz izlemiştir. Buna

karşılık sakarozda %91, maltozda %91 ve laktozda %97 enzim sentezi gerçekleşmiştir. Sonuçlar ayrıntılı olarak incelendiğinde inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte enzim sentezinde polisakkaritlerin etkinliğinin artarak devam ettiği görülmekteir. Bununla birlikte monosakkarit olmasına rağmen glukoz ve fruktozda ortalama %121 değerinde enzim sentezi gerçekleşmiştir. Glikoz ve fruktozda ki farklılaşma diğer monosakkaritlerden ayrılmış ve inkübayon süresinin 120 saat olduğu periyotta, 24 saatlik inkübasyon dönemine göre daha düşük düzeyde de olsa enzim sentezinde artış gerçekleşmiştir.

Bütün substratlarda enzim sentenin ortalama %118.4 olarak gerçekleştiği görülmektedir. Bu durumun inkübasyon süresinin artması ile birlikte polisakkarit yapılarının belirli orandada olsa glikoza kadar parçalandığı ve organizmanın enzim üretiminde glikozu da tercih ettiğini düşündürmektedir.

İnkübasyon sıcaklığı değiştirilmediği halde inkübasyon süresinin değiştirilmesi ile birlikte enzim üretiminde kullanılan suşun aynı karbon kaynaklarını kullanarak farklı miktarlarda enzim ürettiği görülmektedir.

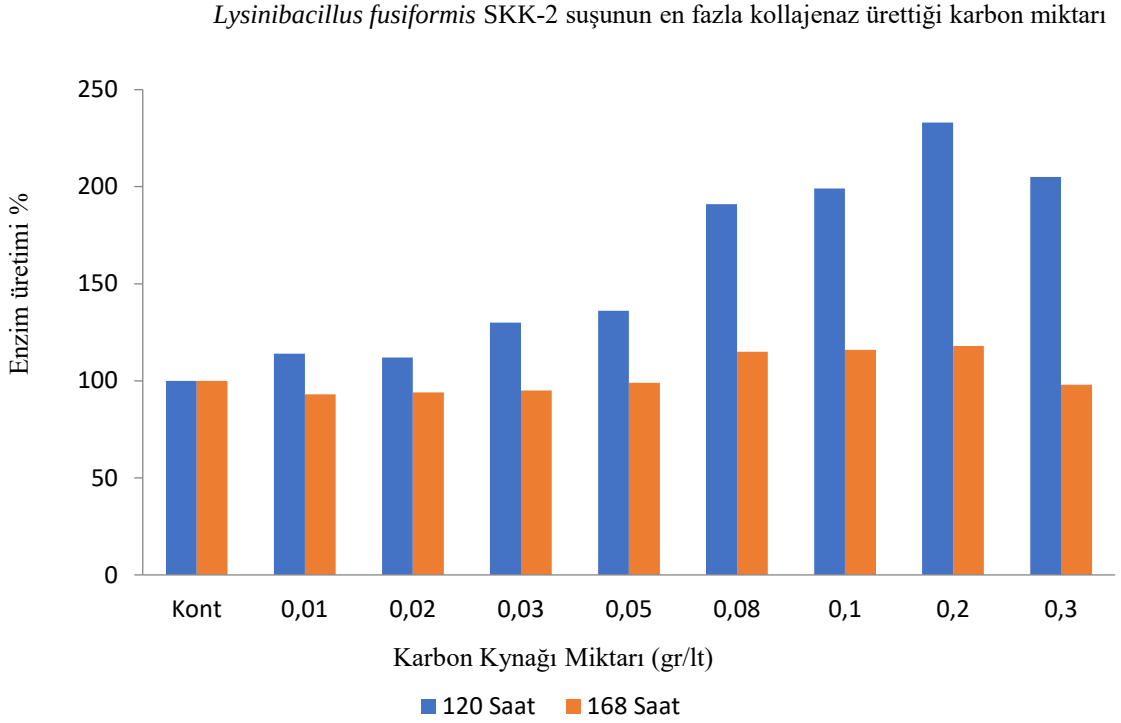
Bütün karbon kaynakları birlikte değerlendirildiğinde ortalama olarak 24 saatte %105, 120 saatte %113 ve 216 saatte % 118 enzim sentezi gerçekleştiği bulunmuştur. Bunun nedeninin polisakkarit yapıdaki karbon kaynaklarının çok sayıda glikoz molekülünden oluşması ve polisakkarit yapıların hidrolize olması ile birlikte serbest kalan glikoz moleküllerinin enzim sentezinde artışa neden olduğu düşünülmektedir

4.8.11. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşlarının Kollajenaz Enzim Üretimine Karbon Miktarının Etkisi

Optimum enzim üretiminin gerçekleştiği karbon kaynaklarının belirlenmesinden sonra *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının 0ptimum enzim üretiminin gerçekleştiği karbon miktarını saptamak için farklı miktarlarda karbon içeren üretim besiyerlerinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Literatür verilerinde en yüksek enzim sentezinin beşinci günde gerçekleşmesi dikkate alınarak karbon miktarının belirlenmesi için beşinci günde enzim aktivite analizi yapılıp, optimum enzim üretimine en etkili karbon kaynağı miktarı saptanmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu 30°C inkübasyon sıcaklığı ve 120 saat inkübasyon süresinde kollajenaz enzim üretimine en etkili karbon miktarının belirlenmesi için farklı miktarlarda karbon içeren besiyerlerinde üretim gerçekleştirilmiştir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu en yüksek enzim üretimini 0.2 g/L konsantrasyonda üretmiştir. Bakteri suşu 0.3 g/L karbon bulunan besiyerinde %205 oranında enzim sentezi gerçekleştirmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında 0.01 ve 0.02 g/L karbon kaynağı bulunan besiyerinde ortalama %113, 0.03 ve 0.05 karbon kaynağı bulunan besiyerinde, ortalama %133 enzim üretilmiştir. Besiyerindeki karbon kaynağı değeri 0.08 g/L'ye yükseltildiğinde enzim üretimi hızlı bir artış göstermiş ve %191 değerine ulaşmıştır. Enzim üretimindeki artış karbon miktarının artışına bağlı olarak 0.1 g/L'de %199, 0.2 g/L'de %233 ve 0.3

g/L'de %205 değerine ulaşmıştır. Enzim üretiminde en etkili olan karbon miktarı 0.2 g/L olmuştur (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. *Lycinibacillus fusifrmis* SKK-2 suşunun kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi (30°C 120 ve 168 saat)

İnkübasyon sıcaklığının 30°C de sabit tutulduğu fakat inkübasyon süresinin 168 saate yükseltildiği enzim üretim çalışmasında bütün parametrelerde 120 saatlik inkübasyon süresine göre belirgin şekilde enzim üretiminde düşüş meydana gelmiştir.

İnkübasyon süresinin 168 saat olarak uygulandığı üretimde çalışmaında en yüksek enzim sentezi 0.2 g/Lkarbon miktarı bulunan besiyerinde %118 olarak gerçekleşmiştir. En yüksek enzim sentezinin elde edildiği karbon miktarı 120 ve 168 saatlik inkübasyon süresinde farklılık göstermemiş ve 0.2 g/L karbon bulunan üretim besiyerinde elde edilmiştir. Besiyerindeki karbon miktarı 0.3 g/L'ye yükseltildiğinde enzim üretimi %98 e düşmüştür. Diğer karbon miktarı değerleri incelendiğinde 0.08, 0.1 ve 0.2 g/L karbon bulunan besiyerlerinde sırası ile %115, %116 ve %118 değerinde enzim üretimi elde edilmiştir. Buna karşılık 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.05 g/L karbon içeren besiyerlerinde kontrolden daha düşük enzim üretimi gerçekleşmiştir.

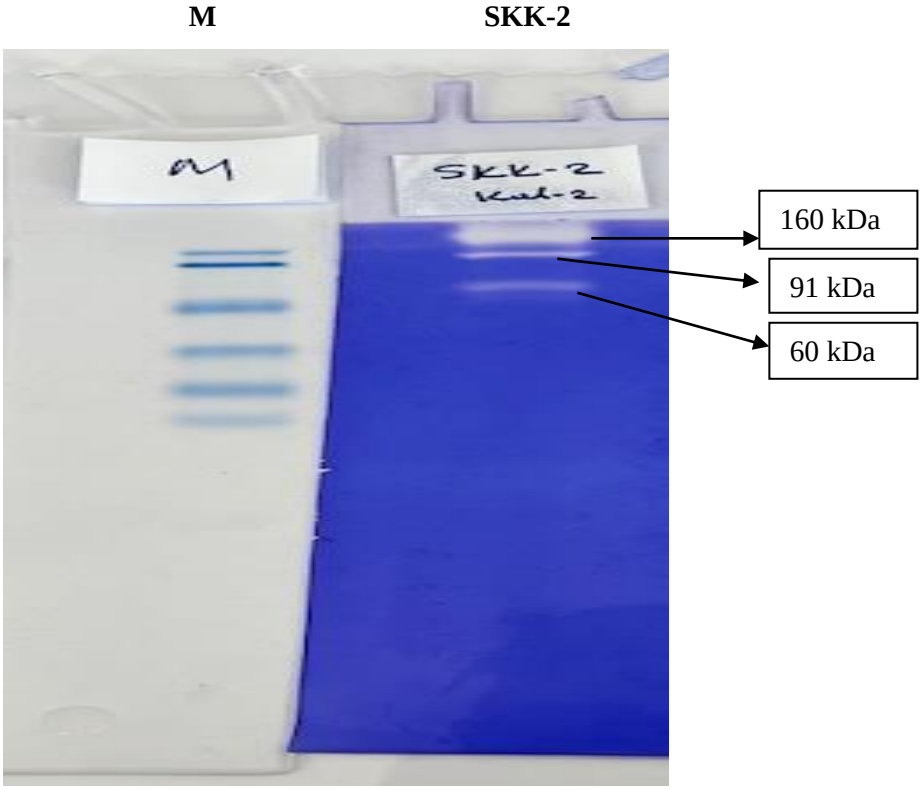
Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun enzim üretiminde en yüksek etkiyi gösteren karbon miktarının saptanması için gerçekleştirilen çalışmada 120 saatlik inkübasyon periyodunda 168 saatlik inkübasyon süresine daha yüksek enzim üretimi elde edilmiştir. Her iki inkübasyon süresinde de inkübasyon sıcaklığı 30°C de sabit tutulduğu halde inkübasyon süresinin uzatılması enzim üretimi üzerinde negatif etki yapmıştır. İnkübasyon süresinin 120 saat tutulduğu üretimde

ortalama enzim üretimi kontrole göre %168 daha yüksek enzim elde edilirken, inkübasyon süresi 168 saat tutulduğunda oralama enzim üretimi %103.5 gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin 120 saatten 168 saate çıkarılması ile %65 daha düşük enzim elde edilmiştir.

4.8.12. *Lysinibacillus fusiformis* SSK-2 Suşunun Sentezlediği Kollajenaz Enzimi Zimogram Analizi

Lysinobacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi %10 SDS-PAGE jelinde analiz edilmiştir. Enzimin zimogram analizi sonunda moleküler ağırlıkları 160 kDa, 91 kDa ve 59.5 kDa olan üç aktivite bandı oluşturduğu saptanmıştır. Enzimin aktivite olarak en etkin fragmentinin oldukça palak ve en kalın görüntüyü oluşturan 160 kDa ağırlığındaki bandın olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.72).

Lysinibacillus sphaericus VN3 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin SDS-PAGE zimogram analizinde 110 kDa ağırlıkta tek bir band oluşturduğu bulunmuştur (Hoa Bach ve ark., 2020).

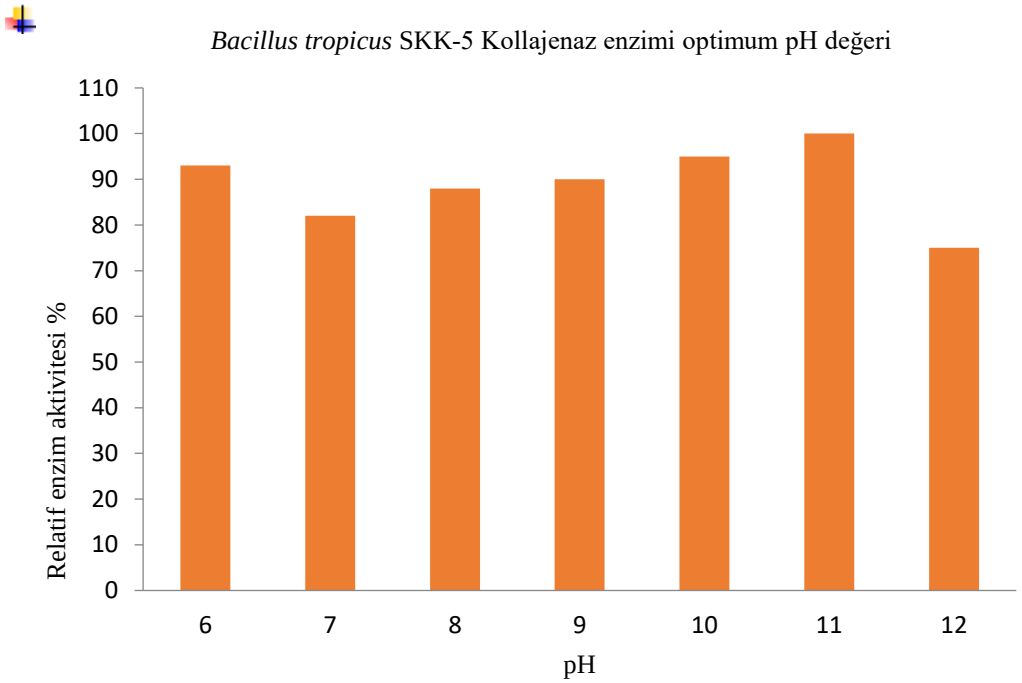


Şekil 4.68. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü

4.9. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimi Otimum pH Değerinin Saptanması

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun ürettiği kollajenaz enzimi optimum aktivitesini pH 11.0 de göstermiştir. Bütün pH değerleri dikkate alındığında ortalama aktivite değeri ortalama %89 olarak gerçekleşmiştir. Enzim pH 6.0 da %93 ve pH 11.0 de %100 aktivite değerinin saptandığı iki pik

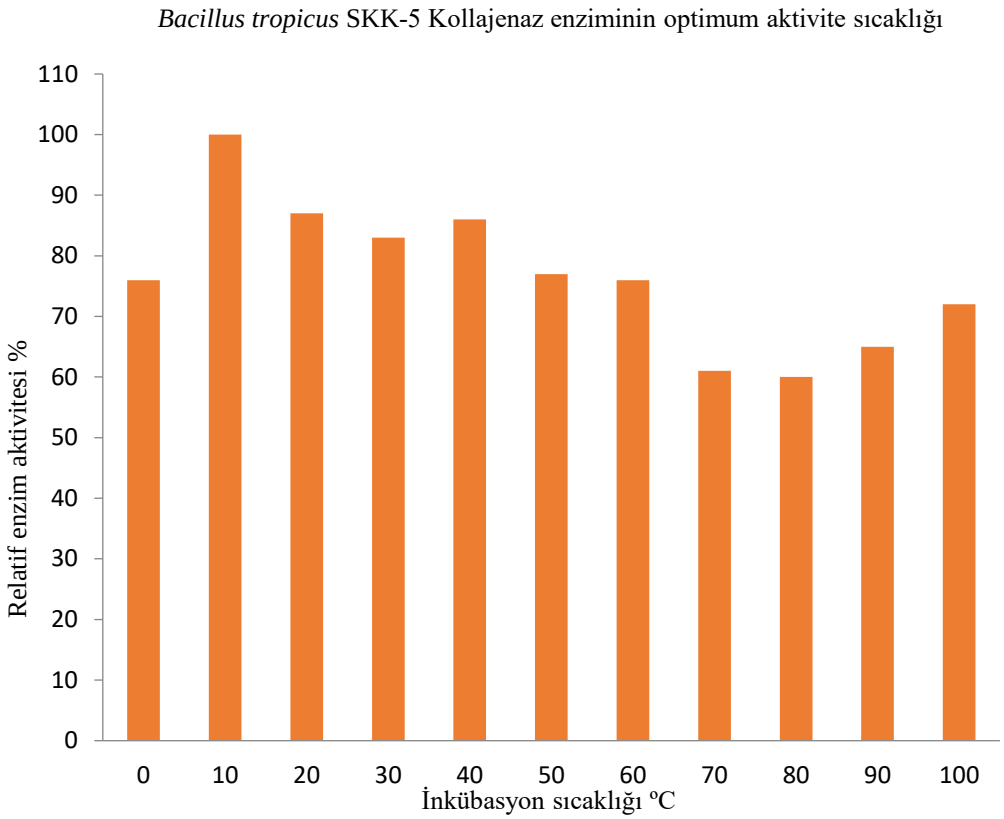
değeri göstermiştir. pH 79.0-11.0 aralığında ortalama %95 ktivite değeri elde edilmiştir. Enzim alkali bölgede yüksek aktivite göstermekle birlikte bütün pH koşullarında %89 aktivite elde edilmesi, enzimin asido-nötral-alkalin özellikte olduğunu göstermektedir (Şekil 4.69).



Şekil 4.69.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum pH değeri

4.9.1. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enziminin otimum sıcaklık değerinin saptanması

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100ºC de 60 dakika inkübe edildiğinde sırası ile %76, 100, 87, 83, 86, 77, 76, 61, 60, 65 ve 72 relatif aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim optimum aktivitesini 10 ºC de göstermiştir. Bütün sıcaklık değerlerinde ortalama aktive değeri %83 gerçekleşmiştir. Enzim 0-40 ºC aralığından ortalama %86.4 aktivite göstermiştir. Bununla birlikte 50-100 ºC aralığında ortalama %68.5 aktivite değeri elde edilmiştir. Bu sonuçlar enzimin cold-mezofil aralığında mezofil termofil aralığına göre yaklaşık %18 daha yüksek aktivite değerine sahiptir. Bununla birlikte enzimin psikrofilik aralık olan 0-20 ºC aralığında ortalama %88 aktivite göstermesi cold aktif kollajenolitik proteaz özellikte olduğunu kanıtlamaktadır. Enzim ağırlıklı olarak cold aktif etkiye sahipken cold-ekstrem-termofil aralığında yüksek düzeyde aktiviteye sahiptir (Şekil 4.70).

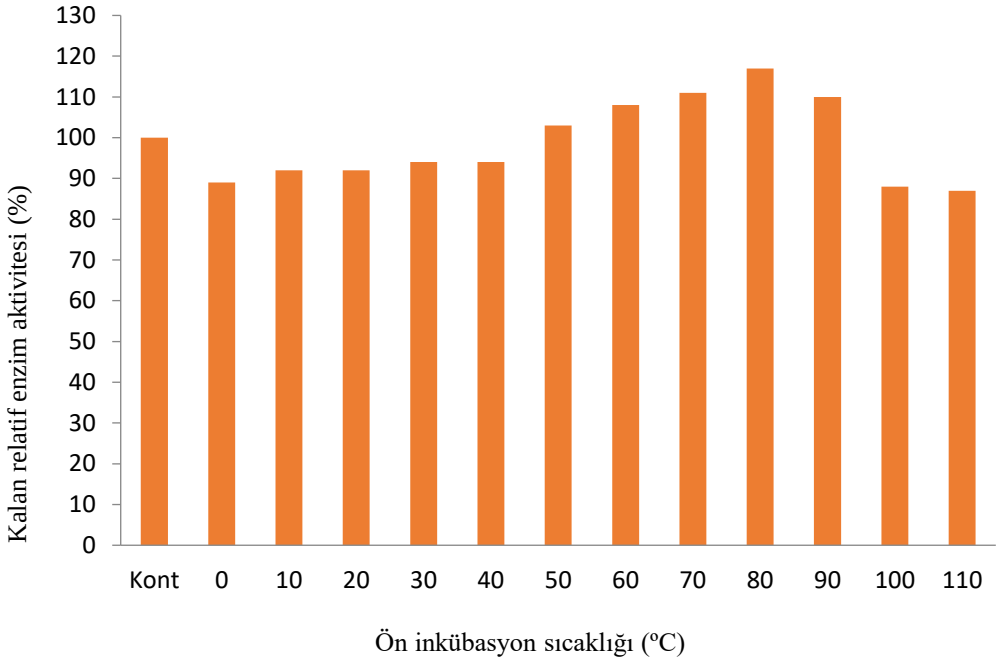


Şekil 4.70. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin optimum sıcaklık değeri

4.9.2. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enziminin Termal Stabilitesinin Saptanması

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzimi termal stabilite analizi için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 ºC sıcaklıklarda 60 dakika ön inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 60 dakika optimum sıcaklıkta aktivite analizi yapılmıştır. Enzim sırası ile %89, 92, 92, 94, 94, 103, 108, 111, 117, 110, 88 ve 87 kalan relatif aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim 50 ºC den itibaren kontrole göre indüklenerek 80 ºC ye kadar aktivitede artış devam etmiş, 90 ºC den itibaren aktivitenin azalarak ortalama %87 düzeylerine düşmüştür. Üretilen enzim 0-50 ºC aralığında yaklaşık %92 düzeyinde stabil kalmıştır. (Şekil 4.71).

Bacillus tropicus SKK-5 Kollajenaz Enzimi Termal Stabilite Sonuçları

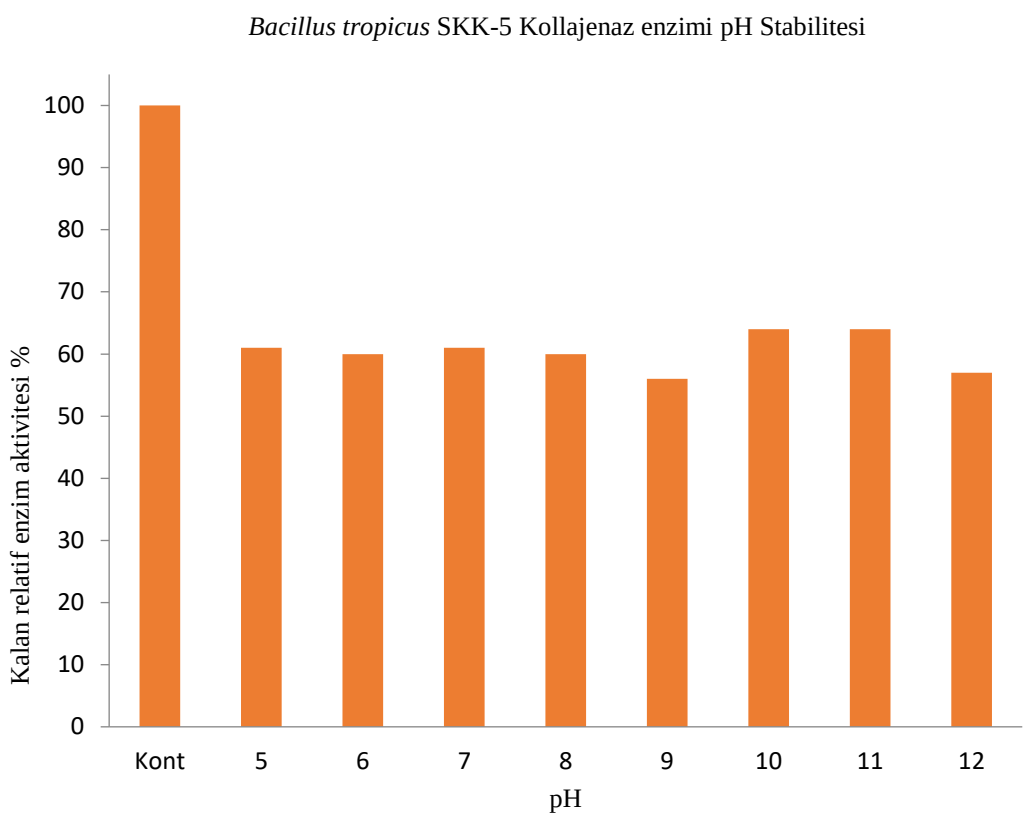


Şekil 4.71. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin termal stabilite değeri

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde enzimin termostabil özellikle olduğu, 50ºC den itibaren indüklenerek aktivitenin orijinal değere göre daha da arttığı görülmektedir. Enzim 70-90ºC aralığında ortalama %113 stabil kalmıştır. Aktivitenin indüklendiği sıcaklık değerlerinde ekstrem termostabil bir davranış sözkonusudur.

4.9.3. *Bacillus tropicus* SKK-5 Keratinaz Enziminin pH Stabilitesinin Saptanması

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzim üreticisi suştan izole edilen kollajenaz enzimi pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 değerine sahip farklı tampon çözeltilerinde ve 20 ºC de 24 saat süre ile ön inkübasyona bırakılmış ve aha sonra 60 dakika aktivite reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.72).



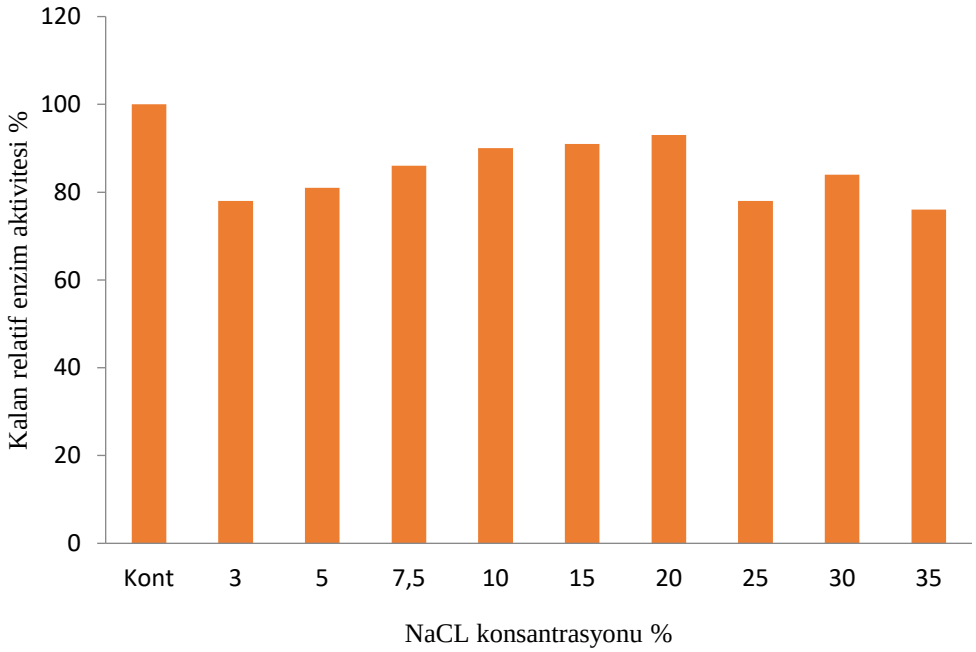
Şekil 4.72. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin pH stabilite değeri

Aktivite analizi sonunda sırası ile %61, 60, 61, 60, 56, 64, 64 ve 57 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. İzole edilen enzim bütün pH değerlerinde ortalama %60 stabil kalmıştır. Bu özellik enzimin pH stabil olduğunu, pH 10.0 ve 11.0 de diğer pH değerlerine göre yaklaşık %4 daha stabil kaldığını göstermektedir.

4.9.4. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimine NaCL Etkisinin Saptanması

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi %3-35 konsantrasyon aralığında farklı konsantrasyonlara sahip NaCL çözeltilerinde 60 dakika süre ile 37 ºC de ön inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizi ile kalan ektivite değeri saptanmıştır. İzole edilen enzimde en yüksek kalan aktivite değeri %93 ile %20 NaCL konsantrasyonunda elde edilmiş olup, enzim ekstrem halofilik özellik göstermiştir (Şekil 4.73).

Bacillus tropicus SKK-5 suşuna ait kollajenaz enzimine NaCL etkisi



Şekil 4.73 21. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimine NaCL etkisi

Yapılan analizlerde %3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 NaCL konsantrasyonlarında sırası ile %81, 78, 86, 90, 76, 93, 78, 84 ve 76 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Bütün konsantrasyonlarda ortalama kalan aktivite değeri %82.4 bulunmuştur. Bütün konsantrasyonlar değerlendirildiğinde enzimin ön işlemin uygulandığı her NaCL konsantrasyonunda 60 dakika sonunda aktivitesini yüksek düzeyde koruduğu ve işlevsel olduğu saptanmıştır.

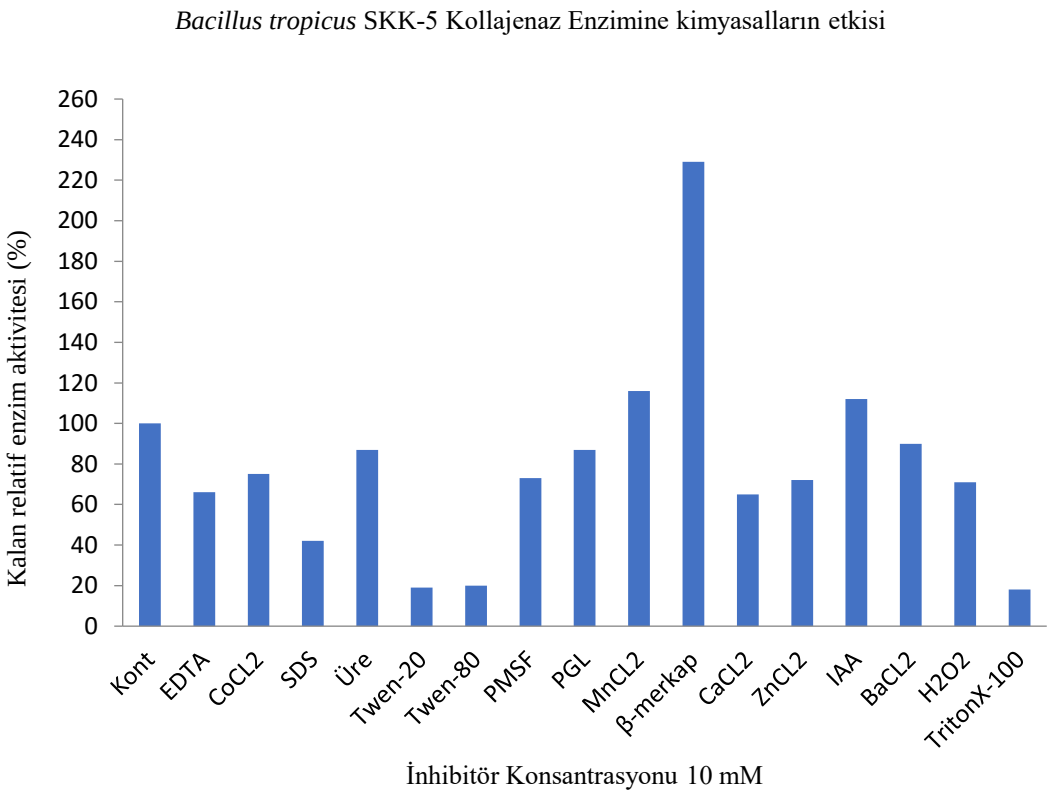
4.9.5. *Bacillus tropicus* SKK-5 Kollajenaz Enzimine Kimyasalların Etkisinin Saptanması (5 ve 10 mM)

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzimi 10 mM konsantrasyonda inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan, okside edici ve yüzey aktif bileşik gibi çok farklı ajanlarla 37 ºC de 40 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizi ile kalan enzim aktivitesi analizi gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen enzim optimum aktivite sıcaklığında 60 dakikalık inkübasyon sonunda EDTA, $CoCL_2$, SDS, Üre, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCL_2$, β-merkaproetanol, $CaCL_2$, $ZnCL_2$, IAA, $BaCL_2$, H_2O_2 ve TritonX-100 de sırası ile %66, 75, 42, 19, 20, 73, 87, 116, 229, 65, 72, 112, 90,71 VE 18 kalan enzim aktivitesi değeri elde edilmiştir.

İzole edilen enzim $MnCL_2$ ile %16, β-merkaproetanol ile %129, IAA ile %12 oranında indüklenerek orijinal aktiviteden stabilite yönünde ayrışmıştır. Enzim EDTA ile %66, PMSF ile %73 aktivite göstermiştir. Bu durum enzimin metallo-serin özellikte olduğunu göstermektedir. SDS ile %42, Triton X-100 ile %18 stabilite saptanması enzimin 10 mM konsantrasyonda non-anyonik deterjana karşı stabilitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Metal iyonları genel olarak

değerlendirildiğinde ortalama kalan aktivite değerinin %95 gbi oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç enzimin mineralce zengin su ortamlarında güçlü bir performansa sahip olduğunun göstergesidir. Twen-20 ve twen-80 e karşı sırası ile %19 ve 20 direnç göstermesi yüzey aktif bileşiklerde ciddi şekilde inhbe olduğunun göstergesidir. H_2O_2 e karşı %71 gibi güçlü bir direnç oluşması inkübasyon koşulları ve enzimin diğer özellikleri dikkate alındığında tekstil başta olmak üzere ağartma işlemlerinin yoğun uygulandığı radikal endüstri koları için güçlü bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.74).



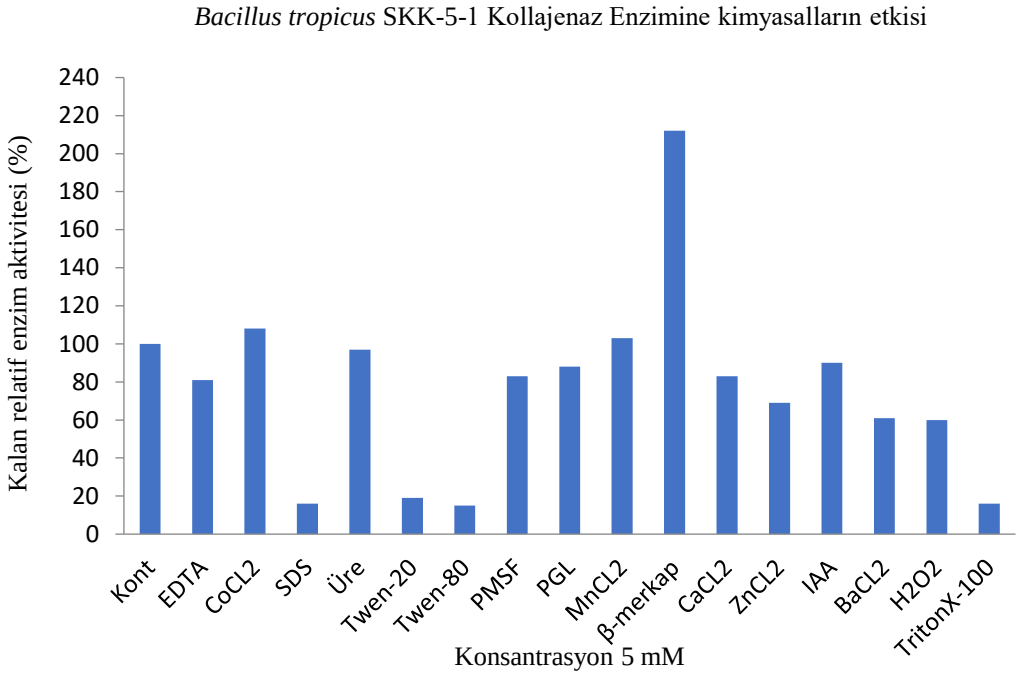
Şekil 4.74. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (10 mM) etkisi

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzimi 40 saat 37 ºC de 5 mM konsantrasyonda çeşitli kimyasallar ile ön inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi optimum aktivite sıcaklığında 60 dakikalık inkübasyonu sonunda EDTA, $CoCL_2$, SDS, Üre, Twen-20, Twen-80, PMSF, PGL, $MnCL_2$, β-merkaproetanol, $CaCL_2$, $ZnCL_2$, IAA, $BaCL_2$, H_2O_2 ve TritonX-100 de sırası ile %81, 108, 16, 97, 19, 15, 83, 88, 103, 212, 83, 69, 90, 61, 60 ve 16 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir.

Enzim β-merkaptoetanol ile muamele edildiğinde kontrole göre %212 gibi oldukça yüksek bir aktivite sergilemiş ve ciddi şekilde indüklenmiştir. Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi CoCl2 ve MnCl2 ile indüklenmiş ve sırası ile %108 ve %103 aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim SDS, Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20 ile muamele edildiğinde

ciddi şekilde inhibe olmuş ve sırası ile %16, %16, %15 ve %19 aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.75).



Şekil 4.75. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimine kimyasalların etkisi (5 mM)

İzole edilen enzim metal iyonları ile ortalama %85 stabil kalmıştır. Enzim EDTA ile %81, PMSF ile %83 oranında stabil kalarak, kısmen inhibe olmuştur. Bu sonuçlar enzimin, metallo-serin karakterde olduğunu göstermektedir. Üretilen enzim twen-20 ve twen-80 ile ortalama %17 stabil kalmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi farklı kimyasalların 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında gerçekleştirilen karakterizasyon çalışması sonunda 10 mM konsantrasyonda özellikle SDS, IAA, $BaCl_2$ ve H_2O_2 sırası ile %26, 22, 29 ve 11 daha yüksek stabilite göstermiştir. Analizler sonunda hem 5 hemde 10 mM konsantrasyonda β-merakaptoetanolde birbirne yakın (sırası ile 10 mM da %229, 5 mM da %212) aktivite değerleri elde edilmiştir. Bununla birlikte β-merakaptoetanolde her iki konsantrasyonda da enzim aktivitesinin yaklaşık %220 düzeyinde indüklendiği görülmektedir.

Düşük konsanrasyon uygulamasında (5 mM) EDTA, $CoCl_2$, Üre, PMSF, $CaCl_2$ de sırası ile %16, 33, 10, 10 ve 18 oranında stabilitede artış meydana gelmiştir. Non-anyonik deterjan olan Triton X-100 denemelerinde 5 ve 10 mM konsantrasyonda da düşük stabilite değeri elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar izole edilen ve kısmi saflaştırılan kollajenaz enziminin benzer kimyasalların farklı konsantrasyonlarından değişik oranlarda etkilendiğini, bu durumun enzimin kullanım alanını çeşitlendirdiğini söylemek mümkündür.

4.9.6. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunda Kollajenaz Enzim Sentezine Farklı Sıcaklık, İnkübasyon Süresi ve Substrat Miktarının Etkisi

Bu amaçla *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşları kullanılarak optimize edilmiş (Karbon ve azıt kaynakları açısından) enzim üretim besiyerine %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyonda ham kemik unu (kollajen kaynağı olarak) eklenerek 10 ve 30ºC de 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 inci saatlerde aktivite analizi gerçekleştirilip, sıcaklık ve zamana bağlı en yüksek enzim üretiminin elde edildiği substrat konsantrasyonu saptanmıştır.

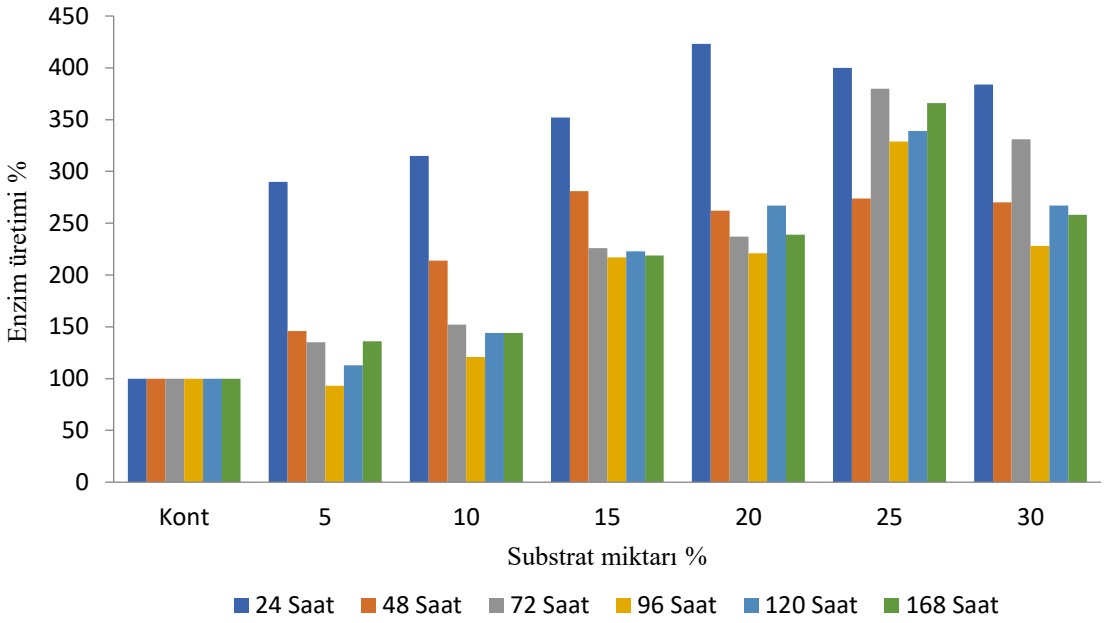
Bacillus tropicus SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimine substrat miktarının farklı sıcaklık ve inkübasyon süresindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.76) gösterilmiştir.

Çizelge 4.3.*Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunundan Kollajenaz Enzim Üretiminde Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (10°C)

	Substrat Konsantrasyonları					
İnkübasyon Süresi	%5	%10	%15	%20	%25	%30
24 Saat	290	315	352	423	400	384
48 Saat	146	214	281	262	274	270
72 Saat	135	152	226	237	380	331
96 Saat	93	121	217	221	329	228
120 Saat	113	144	223	267	339	267
168 Saat	136	144	219	239	366	258

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun 10°C ve 24 saat inkübasyon gerçekleştirilen periyotta %5 konsantrasyondan itibaren kontrole göre çok hızlı bir enzim sentezi gerçekleşmiş ve maksimum üretim seviyesine %423 ile %20 substrat konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Kontrole göre enzim üretiminin %5 konsantrasyonda yaklaşık 2.9, %10 konsantrasyonda 3.1, %15 konsantrasyonda 3.5, %20 konsantrasyonda 4.2, %25 konsantrasyonda 4 ve %30 konsantrasyonda 3.8 kat artış gerçekleştiği bulunmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzim üretimine substrat miktarının etkisi 10°C



Şekil 4.76. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (10°C 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)

Bacillus tropicus SKK-5 şunun kollajenaz enzim üretimine 10°C ve 48 saat inkübasyon süresinin enzim üretimine etkisinin araştırıldığı çalışmada kontrole göre %5 konsantrasyonda 1.4, %10 konsantrasyonda 2.1, %15 konsantrasyonda 2.8, %20 konsantrasyonda 2.6, %25 konsantrasyonda 2.7 ve %30 konsantrasyonda 2.7 kat enzim üretimi artmıştır. En yüksek enzim üretimi %281 ile %15 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Enzim üretimi %5 konsnatrasyonda %146 gerçekleşirken, %15 konsantrasyondan başlayarak %25 konsantrasyon dahil test edilen bütün substrat konsantrasyonlarında % 260 ın üzerinde enzim üretilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile yapılan enzim üretiminde 10°C ve 72 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiği bulunmuştur. Enzim üretiminin özellikle %25 ve 30 konsantrasyonda sırası ile %380 ve 331 değerlere ulaştığı, elde edilen verimin kontrole göre 3.8 ve 3.1 kat artış gösterdiği bulunmuştur. Enzim üretiminin daha düşük düzeyde gerçekleşse de %15 ve 20 konsantrasyonlarda kontrole göre 2.2 ve 2.3 kat arttığı bulunmuştur.

Substrat konsantrasyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde %5, 10, 15, 20 ve 25 te sırası ile %135, %152, %226, %237, %380 ve %331 düzeyinde enzim elde edilmiştir

Ortam sıcaklığının 10°C ve inkübasyon süresinin 96 saat olarak seçildiği çalışmada en yüksek enzim üretimi %25 konsantrasyonda %329 gerçekleşmiştir. Genel olarak enzim üretiminin %15-30 konsantrasyon aralığında kontrole göre ortalama 2 kat artış göstermiştir. Bununla birlikte %25 konsantrasyondaki üretimin ciddi şekilde ayrıştığı %20 konsantrasyonda %221 enzim elde

edilirken, %25 hızlı bir artış gerçekleşerek %329 a yükselmiş, %30 konsantrasyonada ise hızla düşerek %228 değeri elde edilmiştir. Buna karşılık %5 konsantrasyonda kontrole göre enzim üretiminin %7 düştüğü saptanmıştır.

İnkübasyon sıcaklığının 10°C ve inkübasyon süresinin 120 saat olarak uygulandığı çalışmalarda izole edilen suş en yüksek enzim üretimini %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştirmiştir. Substrat konsantrasyonundaki artışa paralel olarak %10 dan itibaren hızla sentezin arttığı görülmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında %10, 15, 20, 25 ve 30 substrat konsantrasyonlarında sırası ile %144, 223, 267, 339 ve 267 değerlerinde enzim üretimi gerçekleşmiştir. İstisnai olarak %30 substrat konsantrasyonunda enzim üretimi hızla azalarak %20 konsantrasyondaki değere düşmüştür.

Enzim üretimi için 10°C de ve 168 saatlik inkübasyon süresi uygulandığında en yüksek üretim %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında enzim üretim değerindeki artış 3.6 kat daha yüksektir. İzole edilen suşun enzim üretiminde %15 substrat konsantrasyonundan itibaren hızlı bir artış gerçekleşmiş, %25 konsantrasyonda maksimuma ulaşmış, %30 konsanrasyonda ise tekrar düşmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 substrat konsantrasyonlarında sırası ile %136, %144, %219, %239, %366 ve %258 enzim üretimi elde edilmiştir.

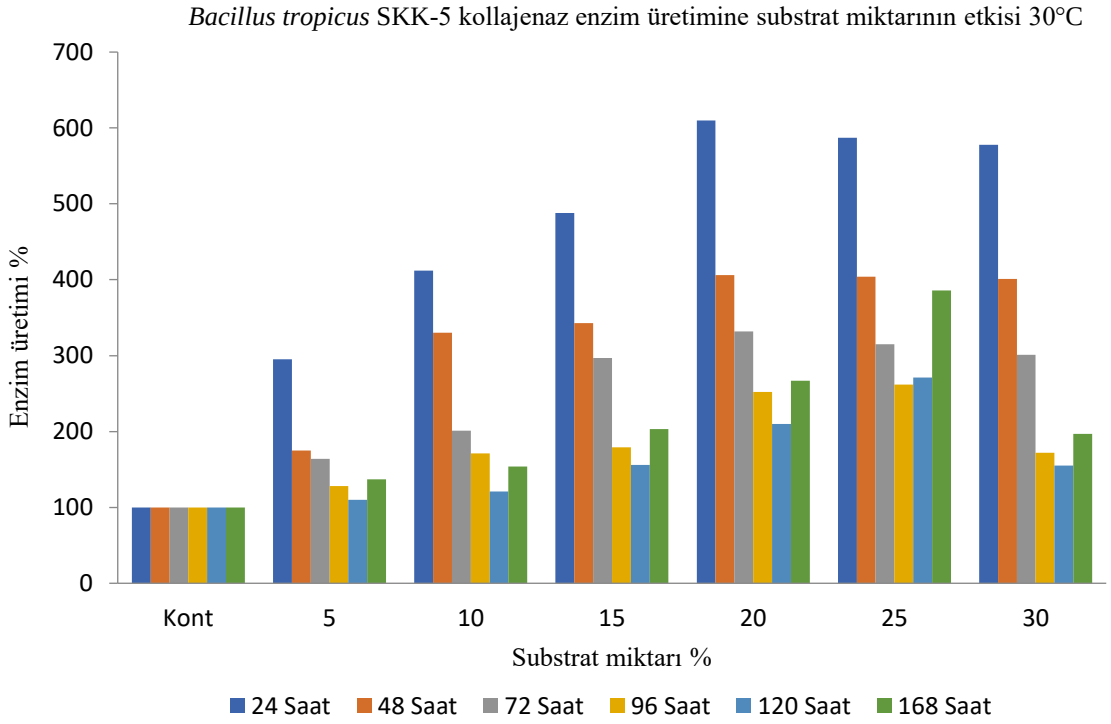
Çizelge 4.4.*Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunundan Kollajenaz Enzim Üretiminde Substrat Konsantrasyonunun Etkisi (30°C)

	Substrat Konsantrasyonları					
İnkübasyon Süresi	%5	%10	%15	%20	%25	%30
24 Saat	295	412	488	610	587	578
48 Saat	175	330	343	406	404	401
72 Saat	164	201	297	332	315	301
96 Saat	128	171	179	252	262	172
120 Saat	110	121	156	210	271	155
168 Saat	137	154	203	267	386	197

İnkübasyon sıcaklığının 30°C ve inkübasyon süresinin 24 saat olarak uygulandığı enzim üretim uygulamasında kontrole göre %5 konsantrasyonda 10°C ve 24 saatte elde edilenle yaklaşık aynı değere ulaşılmış ve 2.9 kat artış gerçekleşmiştir. Konsantrasyonun %10 a yükseltilmesi ile birlikte 10°C lik üretim işlemine göre enzim üretiminde ciddi bir artış meydana gelmiş ve üretilen enzim miktarı 4.1 kat artış göstermiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça enzim üretimi sürekli artış göstermiş ve %15'te 4.8, %20 de 6.1, %25 de 5.8 ve %30 da 5.7 kat artış meydana gelmiştir. Konsantrasyon %25 e yükseltildiğinde artış 5.8 kat olmakla birlikte %20 ye göre azda olsa düşüş

saptanmıştır. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında en yüksek enzim üretimi %610 ile %20 konsantrasyonda elde edilmiştir (Şekil 4.81).

İnkübasyon sıcaklığının enzim üretiminde ciddi bir farka neden olduğu görülmektedir. İnkübasyon süresi aynı olduğu ve en yüksek üretim %20 konsantrasyonda elde edildiği halde 30°C deki verim 10°C ye göre yaklaşık %31 daha yüksektir.



Şekil 4.77.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda kollajenaz enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisi (30°C 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat)

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun kollajenaz üretimine substrat konsantrasyonunun analiz edildiği çalışmada 30°C ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek enzim üretimi %406 düzeyinde %20 substrat bulunan üretim ortamında gerçekleşmiştir. Diğer substrat konsantrasyonlarındaki enzim üretimi kontrolle karşılaştırıldığında % 5 te 1.7 artış gösterirken, substrat konsantrasyonu %10 a yükseltildiğinde hızlı bir yükseliş göstermiş ve 3.3 kat üretim artışı meydana gelmiştir.

Konsantrasyon %20, 25 ve 30 düzeyine çıkarıldığında enzim üretiminde %10 ve 15 konsantrasyona göre yaklaşık %15 artış göstererek sırası ile %406, 404 ve 401 enzim elde edilmiştir. En yüksek üretimin gerçekleştiği %20 konsantrasyonda kontrole göre gerçekleşen üretim artışı yaklaşık 4 kat olmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimi için 30°C ve 72 saatlik inkübasyon süresinin uygulandığı çalışmada en yüksek enzim üretimi kontrole göre %332 ile %20 konsantrasyonda elde edilmiştir. Enzim üretiminin %15, 20,25 ve 30 konsantrasyon aralığında bir

birine yakın düzeyde gerçekleştiği ve sırası ile %297, 332, 315 ve 301 değerlerine ulaşıldığı saptanmıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında, konsantrasyona bağlı olarak elde edilen enzim üretimi %5, 10, 15, 20 ve 25 te sırası ile 1.6, 2.0, 2.9, 3.3, 3.1 ve 3 kat artış meydana geldiği bulunmuştur.

Substrat konsantrasyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde elde edilen enzim değeri %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 substratlı besiyerlerinde sırası ile %164, %201, %297, %332, %315 ve %301 olmuştur. Optimum enzim üretiminin elde edildiği %20 substrat konsantrasyonu %25 e yükseltildiği zaman enzim üretimi düşerek %315 e gerilemiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suş ile yapılan, 30°C ve 96 saatlik inkübasyon süresinde suş en yüksek enzimi%25 substrat konsantrasyonda üreilmiştir. İzole edilen suş %20 ve 25substrat konsantrasyonlarında kontrole göre sırası ile 2.52 ve 2.6 kat daha fazla enzim üretmiştir. Enzim üretimi %30 substrat konsantrasyonunda yaklaşık %35 oranında düşmüştür. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu %10 substrat konsantrasyonundan itibaren %30 konsantrasyona kadar ortalama %207 oranında enzim sentezi gerçekleştirmiştir. Bu değer kontrolle karşılaştırıldığında 2 kat daha yüksektir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim üretimine substrat konsantrasyonunun etkisinini belirlenmesi için 30°C ve 120 saat inkübasyon süresi seçilerek üretim işlemi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen suş en yüksek enzim sentezini %271 ile %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştirmiştir. Enzim üretiminde özellikle %20 ve %25 substrat konsantrasyonunda çok hızlı bir artış meydana gelmiş ve %10 konsantrasyona göre yaklaşık 2.2 kat daha fazla enzim üretilmiştir.

Substrat konsantrasyonu %30 a yükseltildiğinde enzim üretiminde optimum sentezin gerçekleştiği %25 konsantrasyona göre hızlı bir düşüş meydana gelmiş ve %15 konsantrasyon ile elde edilen enzim üretim seviyesine dönülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında %25 substrat konsantrasyonundaki enzim üretim artışı yaklaşık 2.7 kat daha yüksektir.

İzole edilen *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu ile 30° ve 168 saatlik koşullarda gerçekleştirilen kollajenaz enzim üretim çalışmalarında en yüksek üretimin %25 substrat konsantrasyonunda ve %386 oranında gerçekleştiği saptanmıştır. En yüksek enzim üretiminin kontrole göre yaklaşık 3.86 kat artış gösterdiği saptanmıştır. Substrat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak enzim üretiminin artış gösterdiği saptanırken, %30 konsantrasyonda üretimde hızlı bir düşüş meydana gelmiş ve enzim üretim değeri kontrole göre 1.97 kata gerilemiştir.

Substrat konsantrayonları tek tek değerlendirildiğindeelde edilen enzim miktarı %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyonda sırası ile %137, %154, %203, %267,%386 ve %197 bulunmuştur. Enzim üretiminde %30 konsantrasyonda optimum değerin elde edildiği konsantrasyona göre ani bir düşüş meydana gelmiş ve enzim verimi %197 ye gerilemiştir.

Bacillus tropicus suşu ile farklı sıcaklık, inkübasyon süresi ve substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen enzim üretim çalışmalarında 24 ve 48 saatlik dönem hariç diğer bütün çalışmalarda en yüksek enzim üretimi %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin 24

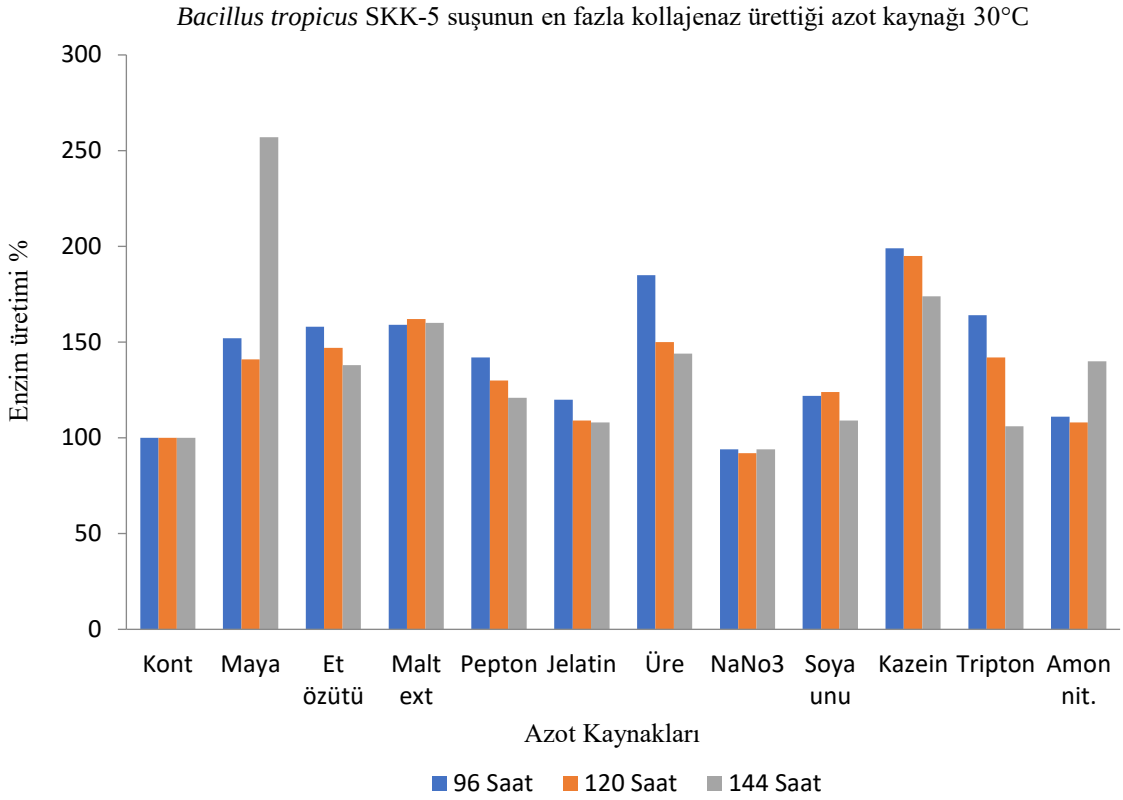
saat olduğu üretim döneminde kontrolle karşılaştırıldığı zaman hem 10 hemde 30°C de diğer inkübasyon sürelerine göre elde edilen enzim miktarı ortalama %400-600 aralığında gerçekleşmiştir. Buna karşılık 48, 72, 96, 120, 168 ve 216 saatlik üretim sürelerinde maksimum %386 enzim elde edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 10°C ve inkübasyon süresinin 72 saat olduğu üretim periyodundan başlayarak sonraki bütün üretim periyotlarında optimum aktivitenin elde edildiği konsantrasyondan sonraki konsantrasyonda enzim üretiminde düşüş meydana geldiği bulunmuştur. İnkübasyon süresi uzadıkça analiz edilen en yüksek konsantrasyondaki düşüş giderek hızlanmıştır. İnkübasyonun 30°C seçildiği üretim çalışmalarında 24 saat sonunda 120 saate göre 2.5 kat daha fazla enzim sentezlendiği saptanmıştır.

Enzim üretimi için inkübasyon sıcaklığının 30°C olarak seçildiği bütün dönemlerde 10°C lik koşullara göre daima daha yüksek enzim değerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar aynı inkübasyon sürelerinde inkübasyon sıcaklığındaki artışın suşun enzim üretiminde de artışa neden olduğunu göstermektedir. Özelliklede 24 ve 48 saatlik dönemlerde sırası ile %31 ve 32 daha fazla enzim üretilmiştir.

4.9.7. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Azot Kaynağının Etkisi

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin belirlenmesi için 30°C inkübasyon sıcaklığı ve 96, 120 ve 144 saatlik inkübasyon sürelerinde enzim üretim çalışmaları yapılmıştır.

Bacillus tropicus suşu ile gerçekleştirilen 96 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek enzim üretimi %199 ile kazein kullanıldığında gerçekleşmiştir. Kazeini sırası ile %185 ile üre, %164 ile tripton, %159 ile malt özütü, %158 ile et özütü, %152 ile maya özütü, %142 ile pepton, %122 ile soya unu, %120 ile jelatin, %111 ile amonyum nitrat ve %94 ile NaNO3 izlemiştir. Bütün substratlar birlikte değerlendirildiğinde ortalama %146 enzim sentezi elde edilmiştir (Şekil 4.78).



Şekil 4.78. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzim sentezine azot kaynağının etkisi (30°C 96-146 saat).

Bacillus tropicus SKK-5 suşun ile yapılan kollajenaz enzim üretimine azot kaynaklarının saptanması çalışmasında 120 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretimi %195 ile kazeinde elde edilmiştir. Soya unu hariç (96 saatlik inkübasyon süresine göre) kullanılan bütün azot kaynaklarında 120 saatlik inkübasyon sonunda enzim üretiminin kısmende olsa düştüğü gözlenmiştir. Azot kaynaklarından kollajenaz enzim üretimi için maya özütü, et özütü, malt özü, pepton, jelatin, üre, NaNO3, soya unu, tripton ve amonyum nitratta kullanıldığında sırası ile %141, 147, 162, 130, 109, 150, 92, 124, 142 ve 108 enzim elde edilmiştir. Bütün azot kaynakları birlikte değerlendirildiğinde üretilen ortalama enzim miktarı %136 bulunmuştur (Şekil 4.83).

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun kollajenaz enzim sentezinde en yüksek etkiyi gösteren azot kaynağının saptanması için gerçekleştirilen 144 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek üretimin % 257 ile maya özütünde gerçekleştiği bulunmuştur. Maya özütünün sırası ile %174 ile kazein, %160 ile malt özütü, %144 ile üre, %140 ile amonyum nitrat, %138 ile et özütü, %121 ile pepton, %109 ile soya unu, %108 ile jelatin, %106 ile tripton ve %94 ile $NaNO_3$ izlemiştir.

Bütün substratlardan elde edilen enzim üretim değerleri topluca değerlendirildiği zaman ortalama %141 enzim sentezi gerçekleştirildiği görülmektedir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile yapılan azot kaynağının saptanması çalışmasında 96, 120 ve 144 saatlik inkübasyon periyotlarının her üçünde de enzim üretiminde NaNO3 en az etki gösteren azot kaynağı olmuştur. Maya özütü 96 ve 120 saatlik inkübasyon dönemLerinde enzim

sentezinde ortalama %146 etki gösterirken, inkübasyon süresi 144 saate çıkarıldığında %257 gibi ciddi bir yükseliş göstermiştir.

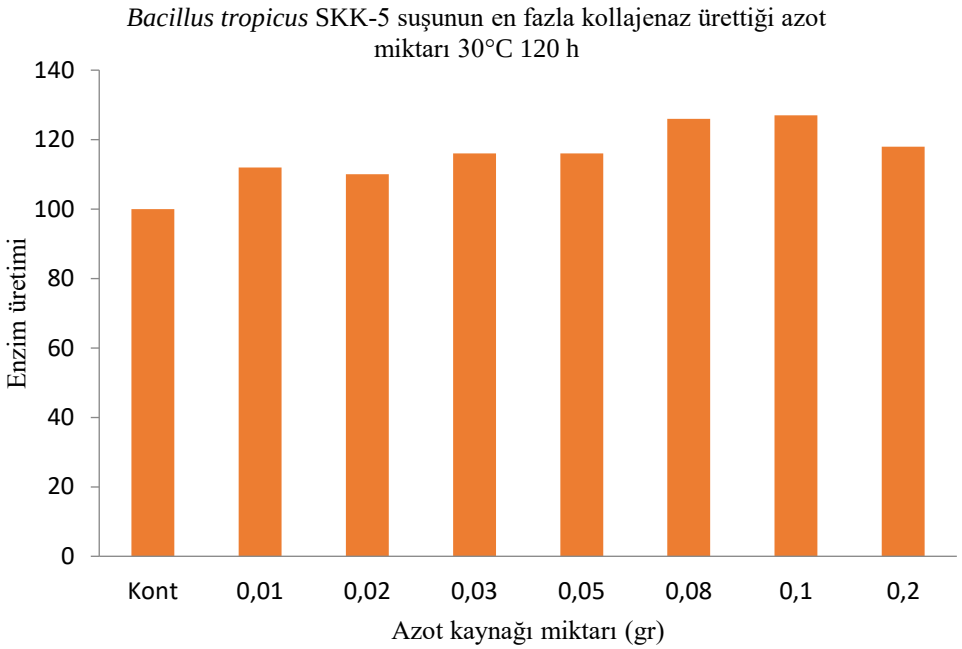
Her üç inkübasyon döneminde de toplam enzim sentezinde belirgin bir farklılaşma gözlenmemiş ve üretilen enzim miktarları birbirine yakın olmuştur. Bununla birlikte en yüksek üretimin 96 saatte gerçekleştiği görülmektedir. Substrat özelinde 96 ve 120 saatte kazein en etkili azot kaynağı olurken, 144 saatlik inkübayonda maya özütü yaklaşık %30 a yakın oranda daha etkili olmuştur.

Kollajenaz enzim üretimi için kullanılan suşlar karşılaştırıldığında *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının enzim üretiminde en etkili azot kaynağının saptanması çalışmalarında suş düzeyinde farklılık ortaya çıkmıştır. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda her üç inkübasyon süresinde de en yüksek verim malt özütünde elde edilirken, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda 96 ve 120 saatte kazein, 144 saatte maya özütünde elde edilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunda her üç inkübasyon döneminde de en az etkili azot kaynağı üre olurken (ortalama %98), ürenin *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda %160 gibi ciddi bir üretim artışna neden olduğu saptanmıştır. Benzer durum amonyum nitran ve triptonda gözlenmiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda her üç inkübasyon süresinde de ortalama enzim üretimi amonyum nitratta %120, triptonda %137 gerçekleşirken, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda triptonda %110, amonyum nitratta %95 enzim üretilmiştir.

4.9.8. *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Azot Miktarının Etkisi

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan kollajenaz enzimi üretmek için 30°C de 120 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin azot kaynağı olarak maya özütünün 0.1 g/L kullanıldığında %127 olarak gerçekleştiği bulunmuştur. Azot kaynağı olarak kullanılan substratın 0.2 g/L konsantrasyonunda enzim üretimi %118 değerine düşmüştür. Enzim üretimi 0.08 ve 0.1 g/L azot kaynağı değerlerinde birbirine son derece yakın gerçekleşmiştir. Benze durum 0.03 ve 0.05 g/L azot miktarının kullanıldığı zaman gerçekleşmiş ve her iki konsantrasyonda da %116 enzim üretimi saptanmıştır. Enzim üretimi için kullanılan azot kaynağının bütün konsnatrasyonlarında kontrole göre %110-127 arasında ve değişen oranlarda, yaklaşık %11-13 oranında artış meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.79).



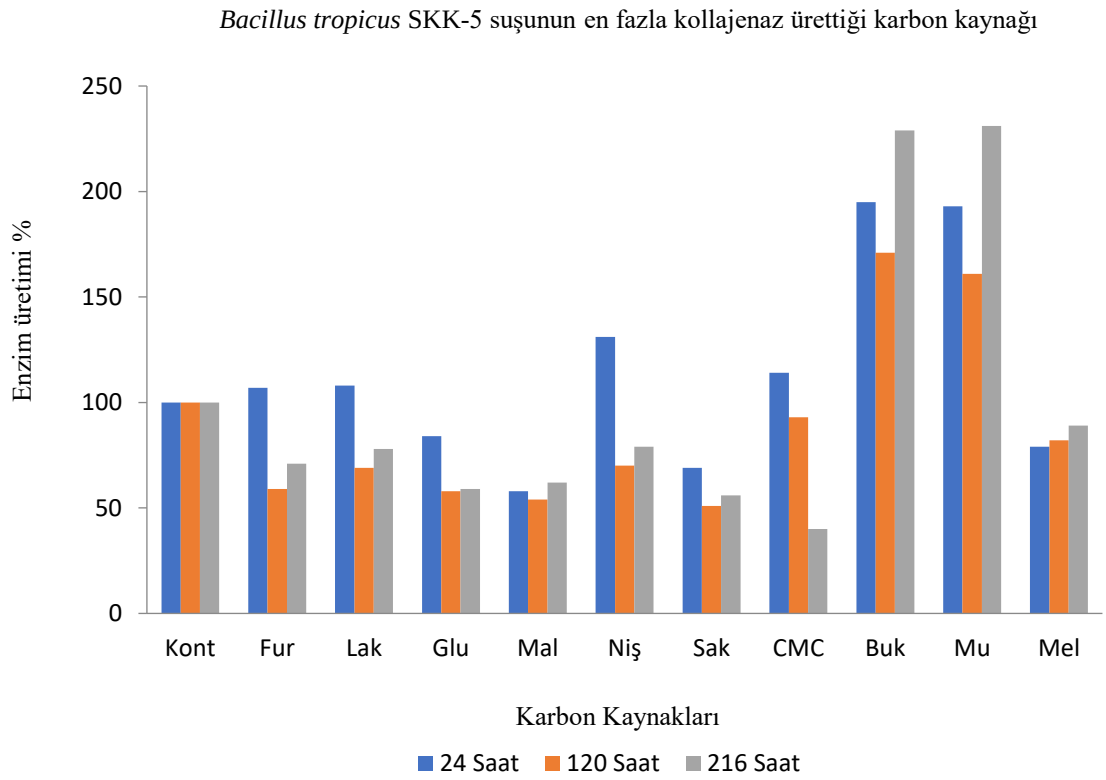
Şekil 4.79. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimine azot miktarının etkisi

4.9.9. *Bacillus trophicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Karbon Kaynağının Etkisi

Bacillus trophicus SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretimine farklı inkübasyon sürelerinin ve 30° lik inkübasyon sıcaklığının etkisinin araştırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar şekillerde gösterilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim sentezinde karbon kaynağının 30°C ve 24 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek enzim üretiminin %195 ile buğday kepeğinde gerçekleştiği saptanmıştır. Organzmanın ikinci sırada kullandığı substrat mısır unu olmuş ve %193 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Üçüncü sırada tercih edilen substrat nişasta olmuş ve %131 enzim üretimi saptanmıştır. Bu üç polisakkarit özellikli karbon kaynağını sırası ile %114 enzim sentezi ile CMC izlemiştir. Kullanılan substratlar arasında monosakkarit özellikli glikozda %107, fruktozda %108 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Laktoz, maltoz, sakaroz ve melaz enzim üretiminde kontrolden daha düşük etkinlik göstermiş ve sırası ile %84, 58, 69 ve 79 enzim üretilmiştir.

Her iki suşta kollajenaz enzimi üretmekle birlikte elde edilen sonuçlardan da görüleceği gibi *Baillus tropicus* SKK-5 suşunun 24 saatlik inkübasyon sonunda karbon kaynaklarını kullanma konusundaki tercihi *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan farklılık göstermiş ve öncelikli olarak polisakkarit yapılar kullanılarak, kontrole göre ciddi şekilde yüksek enzim üretimi gerçekleşmiştir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu 24 saatlik inkübasyon süresinde öncelikli olarak monosakkaritleri kullanırken, polisakkaritleri kullanmakta zorlanmıştır.



Şekil 4.80. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun kollajenaz enzim sentezine karbon kaynağının etkisi (30°C 24, 120 ve 216 saat)

İnkübasyon süresi 120 saat uygulandığında *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu en yüksek enzim üretiminde ilk sırada buğday kepeğini kullanmış ve %171 enzim üretimi gerçekleşmiştir. İkinci sırada mısır unu kullanılmış ve %161 enzim üretilmiştir. İnkübasyon süresinin 24 saat olduğu üretimde üçüncü sırada kullanılan ve %131 enzim üretilen nişastanın kullanımı hızla azalmış ve enzim üretimi %70 değerine düşmüştür.

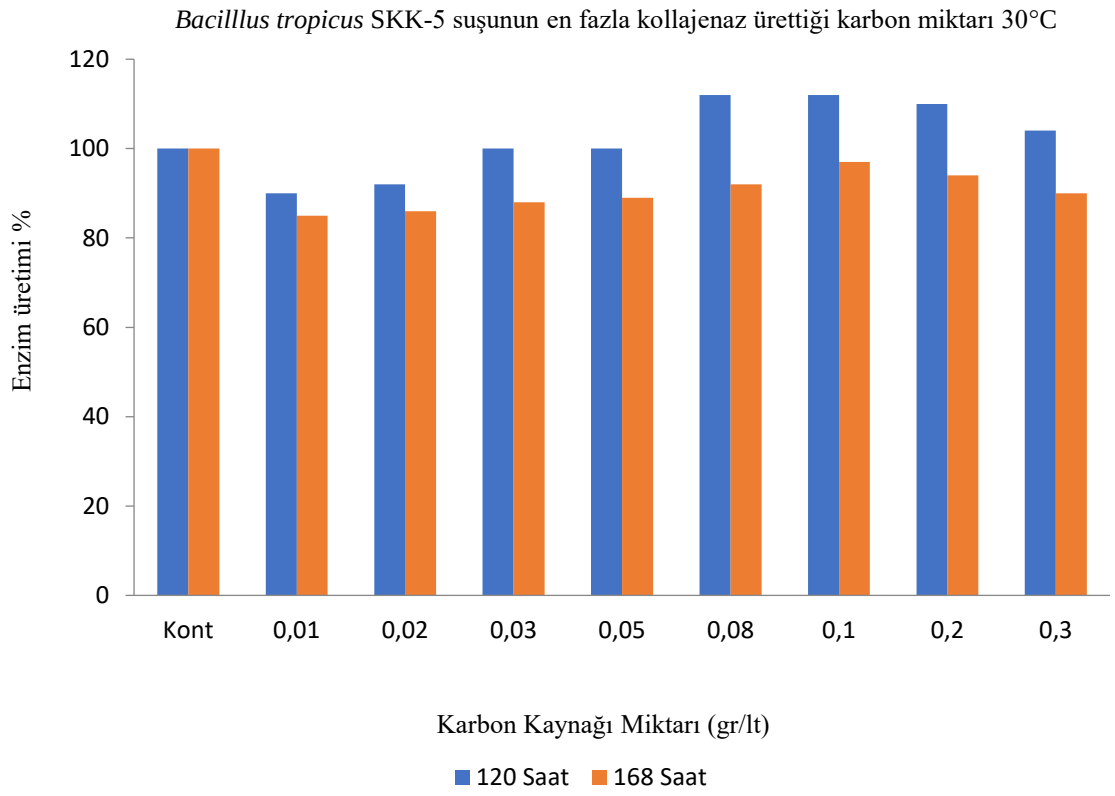
CMC dışındaki diğer karbon kaynaklarından üretilen enzim değerleri ciddi şekilde düşüş göstermiştir. Glukoz, fruktoz, laktoz, maltoz, sakaroz ve melas ile sırası ile %59, 69, 58, 54, 51 ve 82 enzim üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresinin 120 saate çıkarılması ile 24 saatlik döneme göre buğday kepeğinde yaklaşık %20, mısır ununda %30 enzim üretimi düşüş göstermiştir. Bununla birlikte buğday kepeği ve mısır ununda kontrole göre %171 ve 161 gibi oldukça yüksek enzim üretimi gerçekleşmiştir. Monosakkaritlerin enzim üretimindeki etkinliği yaklaşık %50'lere varan düşüşler göstermiştir.

Enzim üretimi için inkübasyon süresi 216 saat olarak uygulandığında en yüksek enzim üretimi %231 ile mısır ununda gerçekleşmiştir. Mısır ununu %229 ile buğday kepeği izlemiştir. İnkübasyon süresinin uzaması *Bacillus tr*opicus SKK-5 suşunun enzim üretiminde mısır unu ve buğday kepeğini daha fazla kullandığını göstermektedir. Monosakkarit özellikteki karbon kaynaklarınıdan enzim üretiminde fazla bir değişim olmamış ve 120 saatlik inkübasyon süresinde elde edilen sonuçlara benzer değerler elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim üretiminde en dikkat çeken değişim CMC substratında gerçekleşmiştir. CM'nin 24, 120 ve 216 saatlik inkübasyon süresinin tamamında enzim sentezindeki etkinliği sürekli düşmüş ve sırası ile %114, %93 ve %40 enzim elde eilmiştir.

4.9.10. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Kollajenaz Üretimine Karbon Miktarının Etkisi

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim üretimine besiyerindeki karbon miktarının etkisinin araştırılması için 30°C ve 120 saat inkübasyon süresinde enzim üretim çalışması grçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda en yüksek enzim üretimi %112 ile 0.08 ve 0.1 g/L miktarda karbon bulunan besiyerinde elde edilmiştir. Diğer karbon kaynaklarının bulunduğu üretim çalışmalarında elde edilensonuçlar 0.01 g/L de %90, 0.02 g/L de %92 ile kontrolden daha düşük değerde gerçekleşmiştir. Besiyerinde 0.03 ve 0.05 g/L karbon bulunduğunda organizma her iki değerdede %100 enzim üretmiştir. Ortamdaki karbon miktarı 0.2 g/L ye çıkartıldığında en yüksek enzim üretilen konsantrasyon değerine göre, enzim sentezi düşmüş ve %110 enzim elde edilmiştir. Karbon miktarı 0.3 g/L ye çıkartıldığında enzim üretiminin %104 değerine düştüğü bulunmuştur. Çalışmanın tamamında ortalama enzim üretimi %102.5 olmuştur (Şekil 4.81).



Şekil 4.81. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi (30°C 120-168 saat)

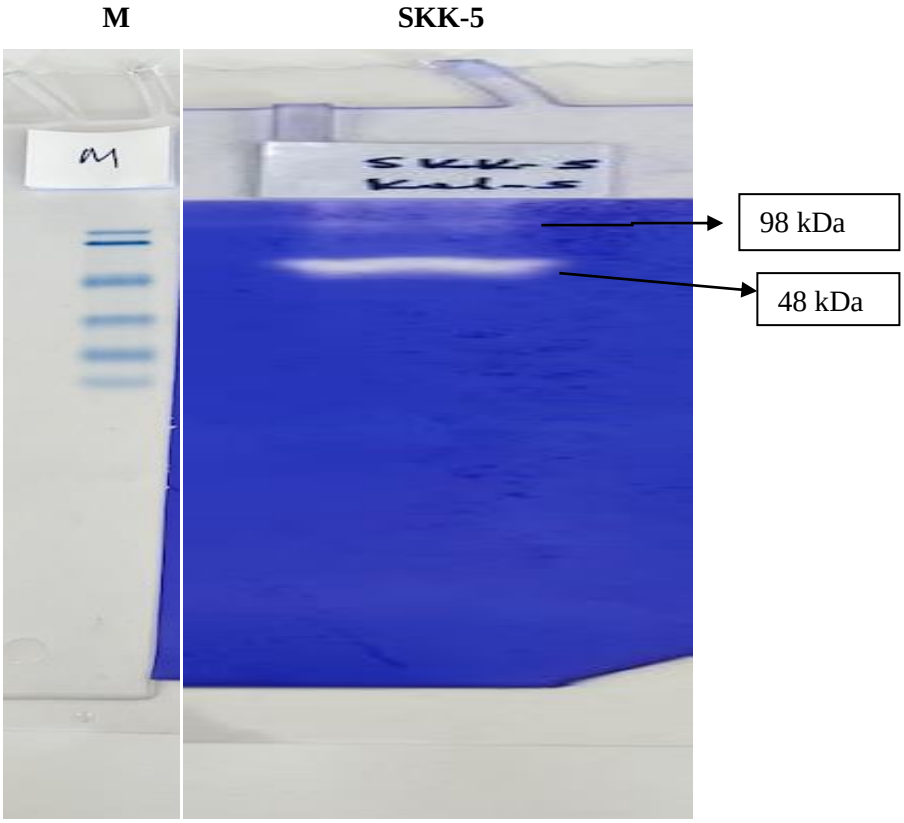
Bacillus tropicus SKK-5 suşunun enzim üretiminde en etkili karbon miktarının bulunması için 168 saat inkübasyon gerçekleştirildiğinde en yüksek üretim %94 ile 0.1 g/L karbon bulunan besiyerinde elde eilmiştir. En yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği karbon miktarı 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinde 0.1 g/L de gerçekleşmiştir. Bu açıdan inkübasyon süresinin farklılaştırıcı etkisi söz konusu değildir. Bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde ortalama %90 enzim üretimi gerçekleşmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile gerçekleştirilen ve enzim üretimine karbon miktarının etkisinin araştırıldığı 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinde inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte enzim üretimde düşüş meydana geldiği belirlenmiştir. İnkübasyon süresi 120 saat uygulandığında ortalama üretilen enzim miktarı %102.5, 168 saat uygulandığında ortalama enzim üretimi %90 gerçekleşmiştir. İnkübasyon süreinin 120 saatten 168 saate çıkarılması ile suşun enzim üretimi kontrolden %10 daha düşük gerçekleşmiştir.

Lysinobacillus fusiformis SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 sularının kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi karşılaştırıldığı zaman her iki inkübasyon süresinde de *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 suşunun daha yüksek enzim ürettiği saptanmıştır. Her iki suşta 0.1 -0.2 g/L karbon bulunan besiyerlerinde en yüksek enzim sentezi gerçekleştirmekle birlikte, 120 saatlik inkübasyon süresinde *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 suşu %168, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu %102.5 enzim üretmiştir. İnkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığı zaman *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 suşu %103.5, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu %90 enzim üretmiştir.

4.9.11. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşunun Sentezlediği Kollajenaz Enzimi Zimogram Analizi

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi %10 SDS-PAGE jelinde analiz edilmiştir. Enzimin zimogram analizi sonunda moleküler ağırlıkları 98 kDa ve 48 kDa olan iki aktivite bandı oluşturduğu saptanmıştır. Enzimin aktivite olarak daha etkin olan fragmentinin, oldukça paRlak ve daha kalın olan 48 kDa ağırlığındaki fragment olduğu düşünülmektedir (Şekil 81)



Şekil 4.82. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin %10 luk SDS-PAGE jelindeki zimogram görüntüsü

4.10. Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Sentesinden Sorumlu Genin Klonlama Verileri

4.10.1. *Lysinibacillus fusiformis* Kolajenaz Geninin Nükleotid Dizisi

Rekombinant DNA tekniği kullanılarak kollajenaz enzimi üreten doğal *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundaki gen E.coli konak organizmasına transformasyn ile klanlanmıştır. Klonlanan genin PCR analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi şekil 4.87 de verilmiştir. Genin 3219 nükleotidden oluştuğu, yaklaşık 90 nükleotidlik sinyal peptid bölgesi taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.82). Genin nükleotis dizisinin değerlendirilmesi sonuucu 1072 amino asitten oluşan bir protein olduğu saptanmıştır (Şekil 4.83). İzole edilen enzimi üreten sekanslar aynı zamanda 30 amino asitlik sinyal peptid üretmektedirler.

ATGAAGAAAAAATTTACATTCAATCAGTTGTTAATTGGGGTTAGTACAATGGCAATTT
CGTTAGGGGGGTTACAGGCGGAAGCATCTGCAatgGCAGAAAAAACGCCATATAATGT
ATTACAAATGAAACCTATTGGCATCGAAATGCCGAAAGATGAAATGGTGCATTCGACA
AAGGCTGAAGAAACATTATCCTATGAAGAACGTTTAGAAATTGGAGATTTTTCACAAC
ATCCAGCTCCCATTATAGAGCGCACGCATACACAGCAATTACAGGAGCAGTACTCGAT
GGCAGAGCTTAATAAAATGAACGATCGTGAGCTCATTCATACGCTCGGTAGTATACGT
TGGTACCAAATTACAGACTTATTCCAATTCAATGATGACACAAAAGCTTTTTATCAAA
ATGAAGAGCGCATGCAAGTAATCATTAATGAATTAGGGAATAGAGGAAGTTCGTTTAC
GAAAGATGATTCAAAGGGTATCGAAACATTTGTTGAGGTACTTCGTTCTGCATTTTATG
TAGCGTTTTATAATAATGAACTAGGTTATTTAAACGAGAGAAGTTTCCAAGATAAGTG
TTTACCAGCATTAAATAAAATAGCCAAAAATCCAAACTTTATACTTGGTACAGCTGAG
CAAGATAAAGTAGTATCTGCCTATGGGAAATTAATAGGTAATGCATCTAGTGATGTGG
AGACCGTTCAACATGCTACGAAGATTTTAAAACAATATAATGAAAATCTTTCTACCTA
TGAAAGTGAGAATTCAAAAGGACAAGCTATTTACGATTTAATACACGGCATTGATTAT
GATTTGCAGTCGTATTTATATGAGGCTCGTAAAGAGGCCAATACAACGATGTGGTATG
GGAAGATTGATAGCTTCATAGAGGAAGTTAATAGCATTGCTCTAATACATAATGTAAC
GGATAGCAATAGTTGGTTAATCAATAATGGCATTTATTATGCAGGGCGTTTAGGGCAG
TTCCATAGCAATCCGAATAAAGGTTTAGAAGTTGTTACACAAGCGATGCATATGTATC
CCTATTTAAGTGAAGCTTATTTTGTGGCAGTAGAGCAAATTACTACAAATTATGGTGG
ACATGACTTAAACGGAAATACGGTTGATTTACAAAGTGTACGTGAAGAAGGAAAAAA
ACAGTATCTACCGAAAACATATACATTTGATGATGGATCAATTGTATTCAAAACGGGA
GATCAAGTAGCGGAAGATAAAATTCAAAGATTATACTGGGCTGCAAAAGAGGTAAAG
GCACAGTATCATCGTGTAATCGGGAATGATAAAGCACTAGAGCCAGGTAATGCTGAC
GATGTCTTAACAGTTGTCATTTATAACTCTCCCGATCAGTATCGATTAAACCGTCAATT
GTACGGATATGAAACAAATAATGGTGGTATATATATTGAAGAGACAGGAACATTCTTT
ACATATGAACGTACACCTGAGCAAAGTATTTATAGCTTGGAAGAGCTGTTCCGTCATG
AATATACGCACTTTTTACAAGGCAGATTTGAGGTGCCTGGTCTATTCGGGACAGGTGA
TATGTACCAAAATGAGCGACTAACATGGTTCCAGGAAGGAAATGCAGAGTTTTTTGCT
GGGTCAACACGTACAAATGACGTTGTGCCTCGTAAGAGCATTATTAGTGGGTTGTCAC
AAGATCCATCACAACGTTATACAGCTGAACAAACAATGTTTGCAAAATATGGTTCCTG
GGATTTTTATAATTATTCATTTGCATTACAGTCTTATATGTATACTCATCAATTCGATAT
GTTTGATAGAATTCAAGATTTAATTCGCGCGAACGATGTGAAAAATTATGATGCCTAT
CGTGACACTTTAAGTAAAGATTCACAGTTGAATATGGAATATCAAGCGTATATGCAGC
AATTGATCGATAACCAAGAAACATACGAGGTGCCACAAGTAGCAGAAGATTATTTAA
TGCAGCATGAACCAAAATCGTTAAACGAGGTACAGCAAGAAATTGTCGATATTGCAC
ATGTGAAAGATGCAAACATGACCAAACACCAGTCTCAATTTTTTAATACGTTTACACT
CGAGGGGACGTATGTAGGTAGTGCAACACAGGGTGAATCTCAAGATTGGAAAACGAT
GAGTAAGCAAGTAAACCAAGTGCTGGAGCAACTGTCTCAAAAAGAGTGGAGCGGCTA
TAAAACAATGACTGCGTATTTTGTCAACTATCGTGTAAATGCGGCAAACCAGTTCGAG
TATGATGTAGTCTTCCACGGCGTTGCCACTGATGACGGAGAAACCCAAGCGACAATTG
TACAAGTAAATGGTCCATATACTGGCATCACCAATGAAAAAATTCAGTTTAACAGTGA
TGGGTCAAAAGATAAGGATGGAGAAATAGTTTCTTATCTTTGGGATTTTGGTGATGGA
ACAACAAGTGAAGAAGCAAATCCTACTCATGTATACGAAAAAGAAGGAACATACAAT
GTGACCTTAACAGTGAAAAATAACAAGGGATTAGAAAGTAAAGGGCAAACAACTGCC
ACTGTACGGAAAGGAGGACAGACAGAGCAAGAACATGCAACGATCATTCCCTTTAAT
AAACCACTAAAAGGTAGCTTGATTGATAATGATACAAATGTCTATCAATTTGACATTA
CGTCGCCTGAAGAAATAGATATTTCTGTCGTAAATGAAAATCAAATTGGCATGACATG
GGTGCTTTATCATGAATCTGATAAGCAAAACTATGTAGCGTATGGACAGGAAGATGGA
CAGACAATCAAAGGTAAGTTGAGTGCGGAACCTGGAAAGTATTATTTATACGTTTATA
AATTTGATGATGAGAATGGGACATATACCGTTCAAGTACAAAATGGTACAAAAACTGA
GGTAGAACCAAACAATCGTCCAGAAGAAGCCACTATGCTTCCATTTAATACACCACTA
AACGGTAGTTTAATGGATGATGATCATACGGATGTATACGAATTCAATGTTACATCTC
CAAAAGAAATAGATATTTCTGTTTTAAATGAAAACCGGATTGGCATGACATGGGTGCT
TTATCATGAATCAGATAGCCAAAATTATGCGTCTTTTGGACAGGAAGACGGAAACATG
ATTAATGGTAAATTGAATGCAGAGCCTGGAAAGTACTATTTATATGTATATAAATTTG
AGAATGAGAATGGAACATACACAGTTCATGTGCAGTAA

Şekil 4.83. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geninin nükleotid dizisi

MKKKFTFNQLLIGVSTMAISLGGLQAEASAAEKTPYNVLQMKPIGIEMPKDEMVHSTKAE
ETLSYEERLEIGDFSQHPAPIIERTHTQQLQEQYSMAELNKMNDRELIHTLGSIRWYQITDL
FQFNDDTKAFYQNEERMQVIINELGNRGSSFTKDDSKGIETFVEVLRSAFYVAFYNNELGY
LNERSFQDKCLPALNKIAKNPNFILGTAEQDKVVSAYGKLIGNASSDVETVQHATKILKQY
NENLSTYESENSKGQAIYDLIHGIDYDLQSYLYEARKEANTTMWYGKIDSFIEEVNSIALIH
NVTDSNSWLINNGIYYAGRLGQFHSNPNKGLEVVTQAMHMYPYLSEAYFVAVEQITTNY
GGHDLNGNTVDLQSVREEGKKQYLPKTYTFDDGSIVFKTGDQVAEDKIQRLYWAAKEVK
AQYHRVIGNDKALEPGNADDVLTVVIYNSPDQYRLNRQLYGYETNNGGIYIEETGTFFTY
ERTPEQSIYSLEELFRHEYTHFLQGRFEVPGLFGTGDMYQNERLTWFQEGNAEFFAGSTRT
NDVVPRKSIISGLSQDPSQRYTAEQTMFAKYGSWDFYNYSFALQSYMYTHQFDMFDRIQD
LIRANDVKNYDAYRDTLSKDSQLNMEYQAYMQQLIDNQETYEVPQVAEDYLMQHEPKS
LNEVQQEIVDIAHVKDANMTKHQSQFFNTFTLEGTYVGSATQGESQDWKTMSKQVNQVL
EQLSQKEWSGYKTMTAYFVNYRVNAANQFEYDVVFHGVATDDGETQATIVQVNGPYTG
ITNEKIQFNSDGSKDKDGEIVSYLWDFGDGTTSEEANPTHVYEKEGTYNVTLTVKNNKGL
ESKGQTTATVRKGGQTEQEHATIIPFNKPLKGSLIDNDTNVYQFDITSPEEIDISVVNENQIG
MTWVLYHESDKQNYVAYGQEDGQTIKGKLSAEPGKYYLYVYKFDDENGTYTVQVQNGT
KTEVEPNNRPEEATMLPFNTPLNGSLMDDDHTDVYEFNVTSPKEIDISVLNENRIGMTWVL
YHESDSQNYASFGQEDGNMINGKLNAEPGKYY

Şekil 84.Klonlanan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminin amino asit sekansı

4.10.2. *Brevibacillus agri* SK-27 Keratinaz Enzimi Sentezleyen Geninin Nükleotid Dizisi

Yapılan sekans analizi sonunda keratinaz sentezinden sorumlu genin 1152 nükleotidden meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.84). Nükleotid sekansından elde edilen bulgular değerlendirildiğinde keratinaz sentezleyen genin 383 amino asitten meydana gelen protein olduğu saptanmıştır (Şekil 4.85). Gende 92 adet sinyal peptid üretiminden sorumLu nükleotid sekansı bulunmaktadır. Sinyal peptid 31 amino asitten oluşmaktadır.

Literatürde *Bacillus subtilis* ES5 suşuna ait keratinaz sentezleyen genin yaklaşık 1100 bp uzunluğa sahip olduğu belirtilmiştir (Alamnia ve ark., 2023) İzole ettğiimiz suşun keratinaz sentezleyen geni literatür ile baz sayısı açısından bir birine oldukça yakındır.

ATGTGCGTGAAAAAGAAAAATGTGATGACAAGTGTTTTATTGGCTGTCCCTCTTCTGTT
TTCAGCAGGGTTTGGAGGATCCATGGCCAATGCCatgGAAAGGGTCTCCAAAACAGATA
GTGAAAAAAGCTATATTGTTGGTTTTAAAGCCTCTGCCACCACAAACAGCTCTAAGAA
ACAAGCTGTCATTCAAAATGGTGGAAAACTAGAAAAACAATACCGCCTCATTAATGCT
GCACAAGTGACAATGTCCGAACAAGCCGCCAAGAAACTTGAACATGACCCTAGCATT
GCTTACGTAGAAGAAGACCATAAAGCAGAAGCATATGCACAAACCGTCCCTTATGGA
ATCCCTCAAATCAAAGAACCAGCTGTACACGCTCAAGGTTATAAAGGTGCTAATGTCA
AAGTAGCTGTCCTTGATACTGGAATCCACGCTGCACACCCTGACTTAAATGTTGCAGG
GGGTGCGAGCTTCAAACCTTCAGAGCCAAATGCCACCCAAGACTTTCAATCACATGCA
ACTCACGTAGCAGGAACCATTGCTGCCCTTGATAACACAATTGGTGTTCTTGGGGTCG
CTCCAAGCGCTTCCCTATATGCTGTGAAAGTATTAGACCGTAATGGCGACGGACAAGA
CAGCTGGATTATTAGCGGTATTGAATGGGCTGTAGCGAATAACATGGATGTCATCAAT
ATGAGCTTAGGCGGACCAAACGGCTCCACAGCGCTTAAAAATGCTGTTGACACAGCG
AATAACCGCGGAGTAGTTGTCGTTGCCGCAGCAGGAAATTCAGGTTCATTTGGCTCTA
CTAGCACCGTTGGCTATCCAGCAAAATACGATTCTACAGGGGCTGTTGCCAATGTAAA
CTCTAACAATGTCAATAACTCATCTTCTAGCGCAGGTCCTGAATTAGATGTTTCTGCAC
CTGGTACTTCTATTTTAAGTACGGTGCCAAGCAGTGGATACACTTCTTATACTGCAACA
TCTATGGCGTCTCCTCATGTAGCAGGAGCAGCAGCGGTTATCCTTTCTAAGTATCCGAA
TCTAACAAATTCTCAGGTTCGCCAGCGCTTAGAAAACACGGCAACACCGCTTGGTGAC
TCATTCTATTACGGAAAAGGGTTAATCAATGTTCAAGCGGCTTCTAACTAA

Şekil 4.85. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda keratinaz sentezleyen genin nükleotid dizisi

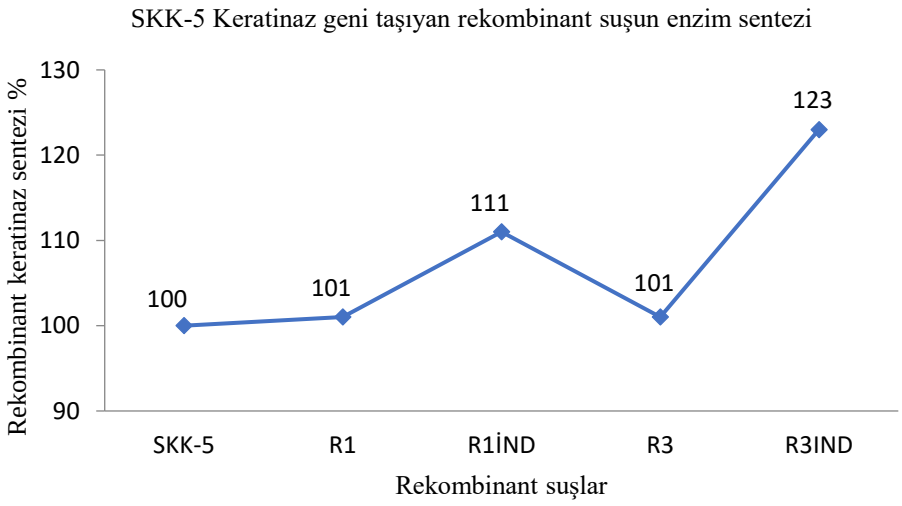
MCVKKKNVMTSVLLAVPLLFSAGFGGSMANAERVSKTDSEKSYIVGFKASATTNSSKKQ
AVIQNGGKLEKQYRLINAAQVTMSEQAAKKLEHDPSIAYVEEDHKAEAYAQTVPYGIPQI
KEPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGASFKPSEPNATQDFQSHATHVA
GTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRNGDGQDSWIISGIEWAVANNMDVINMSLGGP
NGSTALKNAVDTANNRGVVVVAAAGNSGSFGSTSTVGYPAKYDSTGAVANVNSNNVNN
SSSSAGPELDVSAPGTSILSTVPSSGYTSYTATSMASPHVAGAAAVILSKYPNLTNSQVRQR
LENTATPLGDSFYYGKGLINVQAASN

Şekil 4.86. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin amino asit sekansı

4.10.3. Klonlanan Kollajenaz Enzimlerinin Aktivite Analizi

Bakteri suşlarından *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan iki adet koloni seçilmiş ve enzim üretimi gerçekleştirilerek anktivite analizleri yapılmıştır. Seçilen suşlar da gen ekspresyonunun indüklenmesi için IPTG kullanılmıştır. Kontrol olarak hem indüklenmemiş suşlar hemde ana suştan üretilen enzimLer kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Kolonilerden R1 ve R3 indüklenmemiş, R1İND ve RÎND IPTG ile indüklenmişlerdir. (Şekil 4.86 ve Çizelge 4.5).

Yapılan aktivite analiz sonunda ana suşa göre indüklenmemiş R1 de %1, R3 te %1 olmak üzere aynı oranda enzim üretilmiştir. Örneklerden R1İND de %11, RÎND de ise %23 indüklenme gerçekleşmiş ve ana suşa göre enzim üretiminde belirgin artış elde edilmiştir.

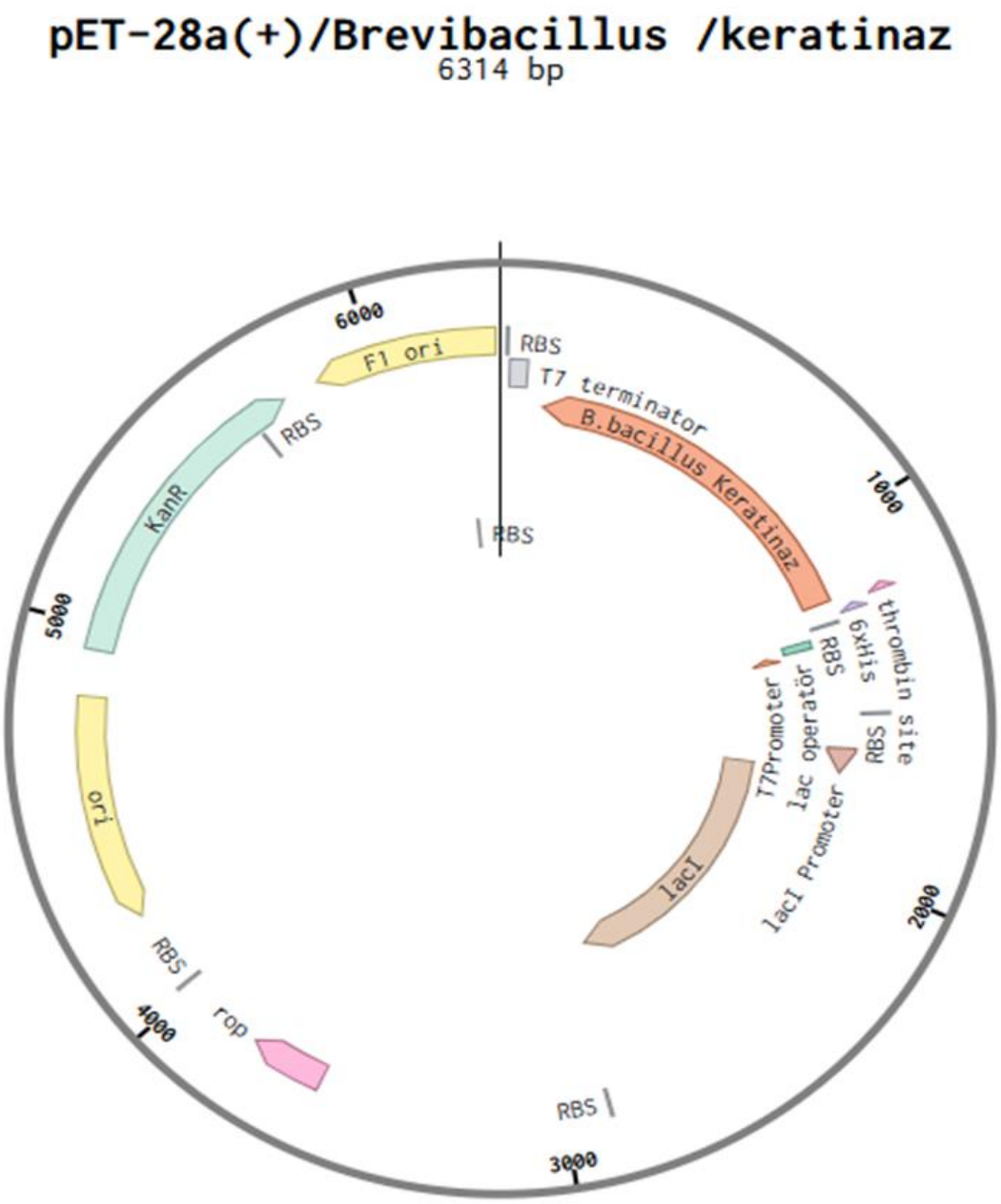


Şekil 4.4.86. Rekominant suşlardan kollajenaz enzim üretimi ve ana suşla karşılaştırılması

Çizelge 4.5.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen ve kollajenaz üreten rekombinant suşların enzim aktivite değerleri

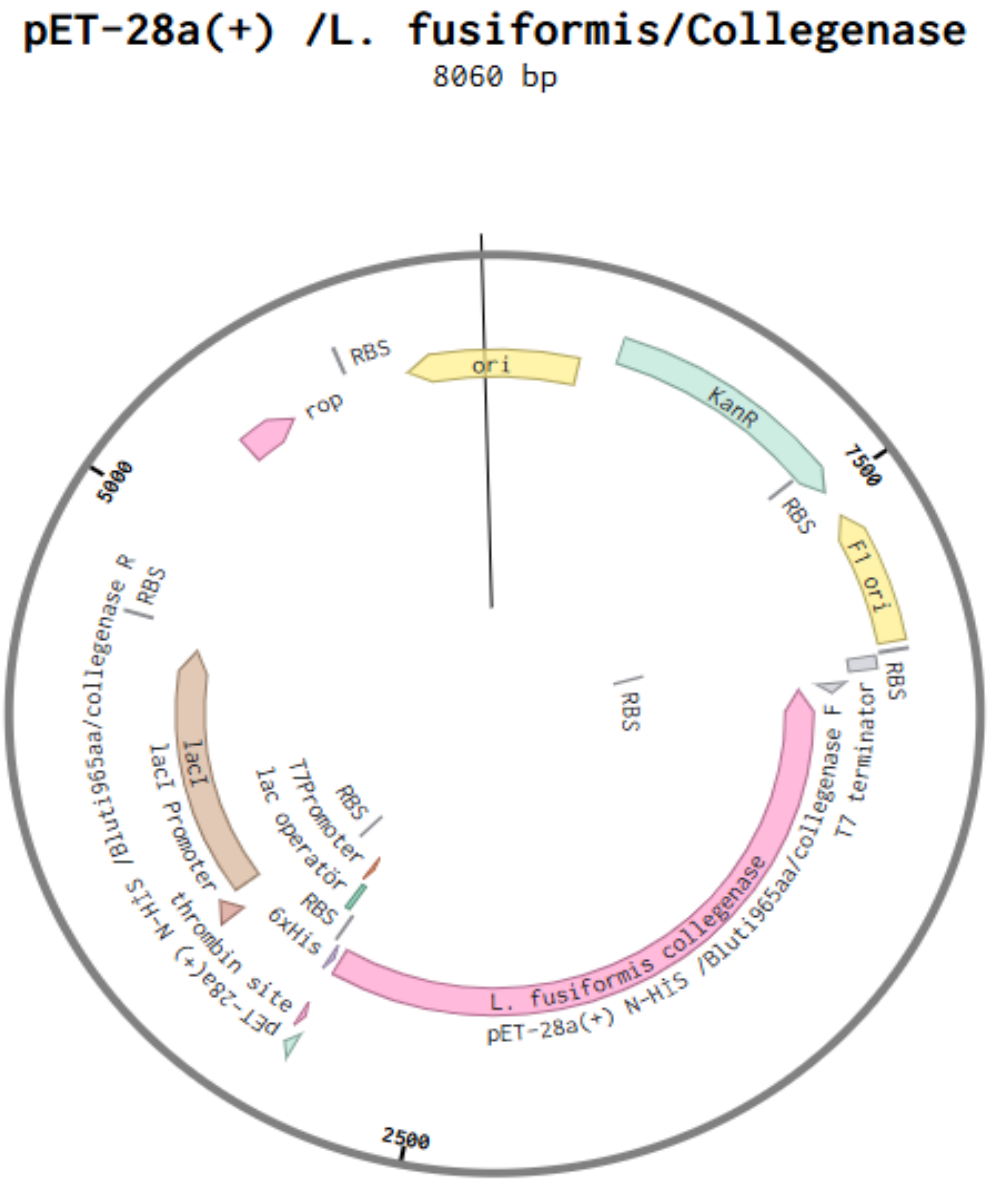
Örnek	Enzim aktivitesi (U/50µL)	Protein mg/50µL	Spesifik aktivite U/50µL
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	1144.65	108.13	10.58
Rekombinant 1	1161.42	110.8	10.48
Rekombinant 1IPTG	1306.39	134.13	9.73
Rekombinant 3	1165.56	111.47	10.45
Rekombinant 3 IPTG	1480.35	162.13	9.13

4.10.4. Keratinaz enzim geni taşıyan pET-28a Rekombinant DNA



Şekil 4.88. *Brevibacillus agri* SK-27 keratinaz geni taşıyan rekombinant DNA

4.10.5. Kollajenaz enzim geni taşıyan pET-28a Rekombinant DNA



Şekil 4.89. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz geni taşıyan rekombinant DNA

4.10.6. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacllus agri* SK-27, *Lysiniobacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Substrat Spesifiklinin Saptanması

Keratinaz ve kollajenaz enzim üreten *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının doğal keratin ve kollajen kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen hidoliz çalışmalarının sonuçları şekil lerde gösterilmiştir.

Substrat olarak BSA (Sığır serum albumini), Skimmilk, Jelatin, Balık pulu, Kazein, Doğal Tavuk Tüyü, Kıkırdak (keçi kürek kemiği uç kısmı), Balık Derisi, Koyun Yünü, Doğal Kemik Unu, İnsan Saçı ve Keçi Kılı kullanılmıştır. Kontrol olarak %1 konsantrasyonda kemik unu ve

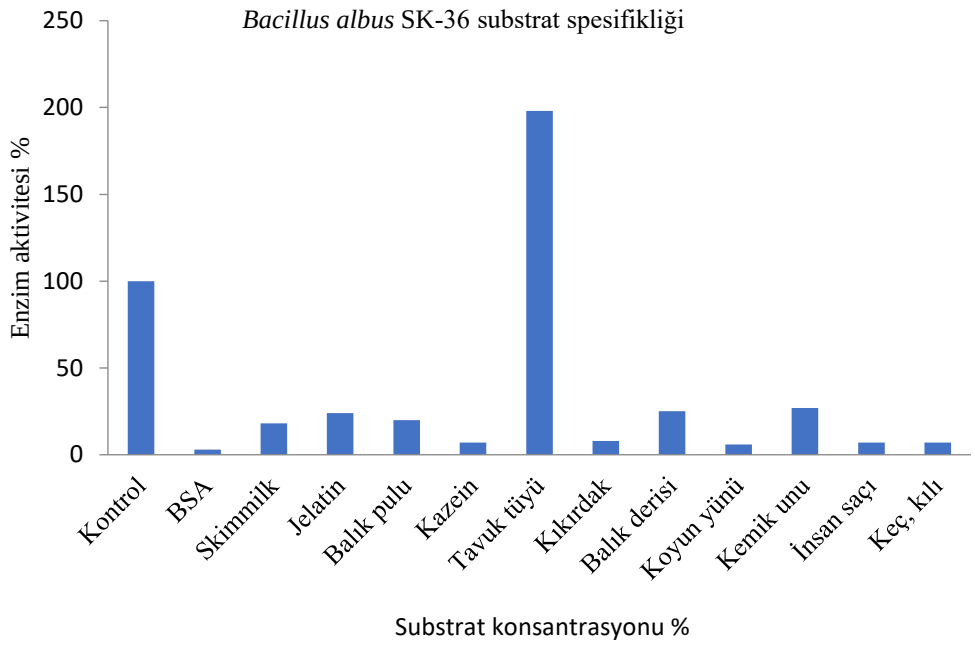
feather meal pH 7.0 ve pH 9.0 tamponlarında hazırlanıp otoklav edilerek kullanılmıştır. BAS, skimmilk, jelatin, balık pulu, kazein, kıkırdak, balık derisi ve doğal kemik unu %1 konsantrasyonda pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış ve otoklavda steril edilerek kullanılmıştır. Doğal tavuk tüyü, feather meal, koyun yünü, insan saçı ve keçi kılı %1 konsantrasyonda pH 9.0 glisin-sodyum hidroksit tamponunda hazırlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Doğal tavuk tüyü, koyun yünü ve keçi kılı deterjanlı suda yıkanıp, çeşme suyu ile durulandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuş ve kullanılmadan önce küçük parçalara (2 mm) kesilerek 25 mL hacımda uygun tamponlara eklenip otoklavlanarak kullanılmıştır. Tavuk tüyü kullanılmadan önce 3 mm gözenek çapına sahip elkten elenerek kaba yapılar ortamdan uzaklaştırılmış ve un haline gelmiş yapılar substrat olarak kullanılmıştır.

Balık pulu deterjanda yıkanıp çeşme suyu ile durulandıktan sonra güneş ısısında kurutulmuş ve (1-2 mm boyutlarında) öğütücüde çekilerek un haline getirilmiş, parçalanmayan büyük yapılar elekten geçirilip uzaklaştırılmıştır. Kıkırdak ve balık derisi deterjanda yıkanıp çeşme suyunda durulanmış ve güneşte kurutulduktan sonra 60°C'lik fırında kurutma işlemi (2 saat) devam etmiştir. Kıkırdak daha sert olmakla birlikte balık derisine göre daha küçük boyutlarda kesilebilmiştir. Balık derisi daha yumuşak olup kesme işleminde yeterince küçük boyutlar elde edilememiştir. Kıkırdak ve balık derisinden elde edilen substratın partikül büyüklüğü 5-7 mm boyutlarındadır. Doğal kemik unu, kemik unu fabrikasından alınan ham maddenin elenmesi ile elde edilmiştir.

Hazırlanan substratlar çalışmalarda kullanılan *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen enzimler ile uygun miktarlarda karıştırılıp, 30°C de 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

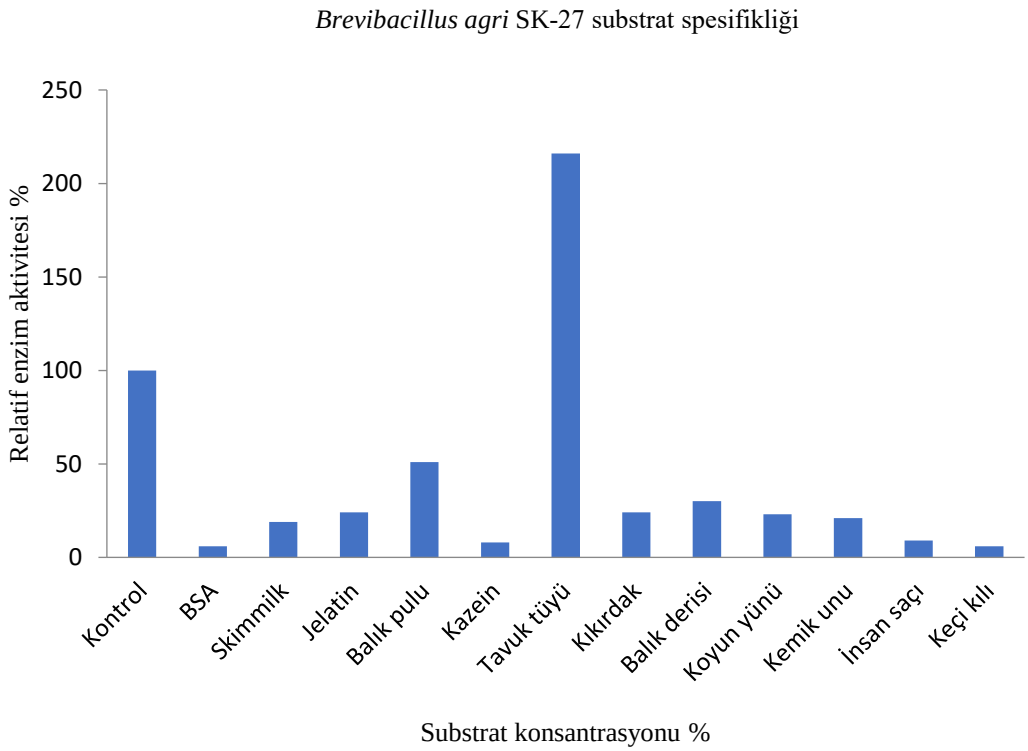
Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi, kontrole göre doğal tavuk tüyünde %198 aktivite göstermiştir. Enzim doğal kemik ununda %27, balık derisinde %25, jelatinde %24, balık pulunda %20 ve skimmilkte %18 aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim koyunyününde %6, insan saçında %7 ve keçi kılında %7 hidroliz aktivitesi göstermiştir. İzole edilen enzimin kollajen yapılı substratlarda çok düşük düzeyde aktivite göstermesi, doğal tavuk tüyünde yaklaşık %198 aktiviteye sahip olması nedeni ile keratinolitik enzim özelliği göstermektedir (Şekil 4.90).



Şekil 4.90. *Bacillus albus* SK-36 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi, kontrol (feather meal) ile karşılaştırıldığında en yüksek aktiviteyi doğal tavuk tüyünde %216 ile göstermiştir. Enzim balık pulunda %51 aktivite sergilemiş olup, *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen enzime göre yaklaşık 2.6 kat daha yüksek aktivite saptanmıştır. Enzim koyun yününde %23 hidroliz aktivitesi ile *Bacillus albus* SK-36 suşundan etki anlamında ciddi şekilde farklılaşmış ve etki yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. İnsan saçı ve keçi kılında sırası ile %9 ve 6 aktivite elde edilmiştir. İzole edilen keratinaz enziminin insan saçı ve keçi kılında *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi ile yaklaşık aynı düzeyde etki göstermiştir. Enzimin gösterdiği substrat davranışı keratinaz özelliğinin yanı sıra düşükte olsa kollajenolitik özellik göstermektedir.

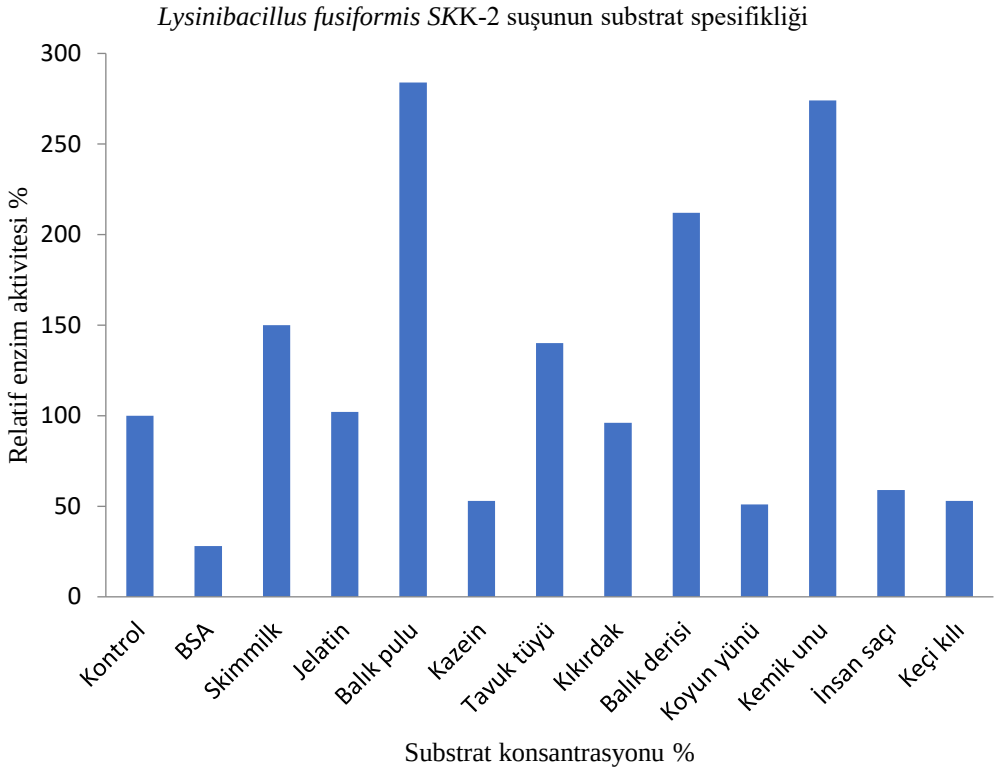
Keratinaz enzimlerinin jelatin, kazein, elastin ile birlikte tüy, kıllar gibi ham ve keratinli substratlara karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Verma ve ark., 2016)



Şekil 4.91. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimin güçlü bir kollajenolitik etkiye sahip olduğu bununla birlikte yaklaşık %40 lar düzeyinde keratinolitik özellik gösterdiği görülmektedir. Enzim kontrol olarak kullanılan kemik unu ile karşılaştırıldığında, balık pulunda %284, doğal kemik ununda %274, balık derisinde %212, jelatinde %102, kıkırdakta %96 katalitik hidrolik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. İzole edilen enzim keratinolitik suşlardan izole edilen enzimlerle karşılaştırıldığında diğer substratlarda da oldukça yüksek bir aktivite göstermiştir.

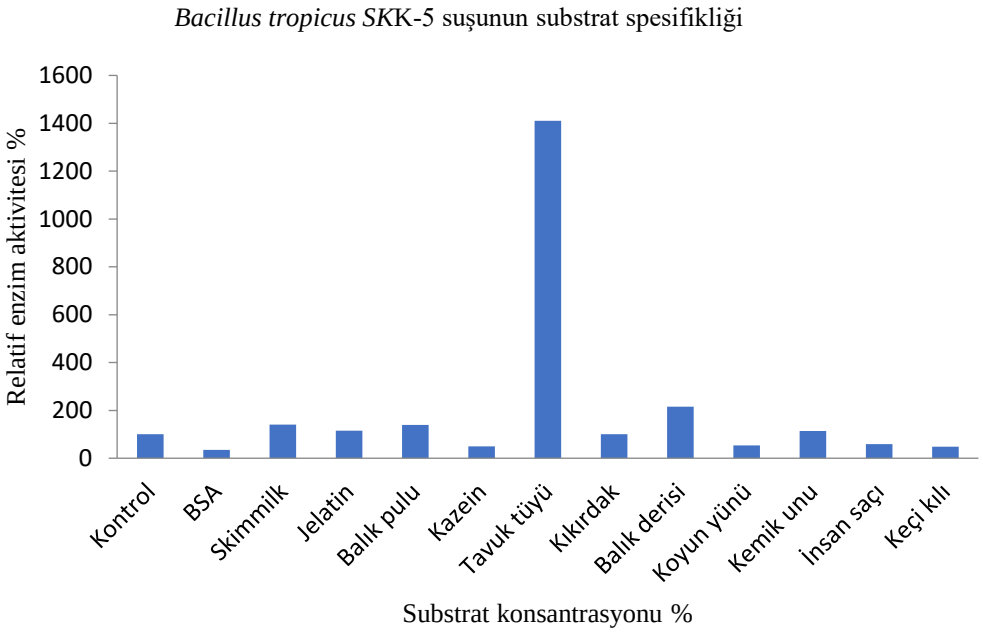
Enzim skimmilkte %150, kazeinde %53, koyun yününde %51, insan saçında %59 ve keçi kılında %53 aktivite değerine sahiptir. Enzimin kollajenolitik aktivitesi ortalama %194 gerçekleşirken %76 oranında da keratinolitik aktivesi olduğu saptanmıştır. Enzim skimmilk substratında da güçlü bir hidroliz etkisi göstermiştir. Yapılan analizlerde *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarından izole edilen keratinaz enzimlerinin skimmil substratında ortalama %18 hidroliz aktivitesi gerçekleşmiş, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enziminde ise %150 aktivite saptanmıştır (Şekil 4.92).



Şekil 4.92.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun kollajen ve keratin substratlarını hidrolizi

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi balık pulunda %139, jelatinde %115, kıkırdakta %101, balık derisinde %215 ve doğal kemik ununda %114 hidroliz aktivitesi göstermiştir. Enzim doğal tavuk tüyüne karşı çok güçlü bir keratinolitik etki göstermiş ve yaklaşık %1410 hidrolitik aktivite değerine ulaşılmıştır. Enzim kollajenolitik etki olarak kollajen kaynaklı substratda *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen enzimle benzr etkiyi göstermiştir.

İzole edilen enzimin diğer keratinli substratlarda gerçekleşen katalitik etki testlerinde, *Lysinibacillus fusiformis S*KK-2 suşundan elde edilen değerlerle büyük benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Doğal tavuk tüyüne karşı ortaya çıkan bu yüksek etki nedeni ile diğer substratlardan elde edilen katalitik etki göreceli olarak zayıf görünmektedir (Şekil 4.93).



Şekil 4.93. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun doğal keratin ve kollajen substratlarını hidrolizi

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi *Bacillus albus* SK-36 enziminden 7 kat, *Brevibacillus agri* SK-27 enziminden 6.5 kat daha yüksek katalitik etki göstermektedir. Bu veriler nedeniyle doğal tavuk tüyünün enzimatik hidrolizinde öncelikle kullanılması gereken *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimidir.

Kollajenaz enzimlerinin pratik uygulamasında özellikle deniz ürünleri kaynaklı atıkların hidrolizi için *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen enzimin öncelikle kullanılma potansiyeli vardır. Kemik unu (tip-1 kollajen) kullanılacak hidroliz uygulamaları için *Lysinibacillus fusiformis* KK-2 kollajenaz enzimi öncelikle tercih edilmelidir.

Skimmilk substrat olarak kullanıldığında kollajenolitik enzimlerin keratinolitik enzimLerden daha yüksek hidrolitik aktiviteye sahip oldukları, özelliklede *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenolitik enzimin büyük potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

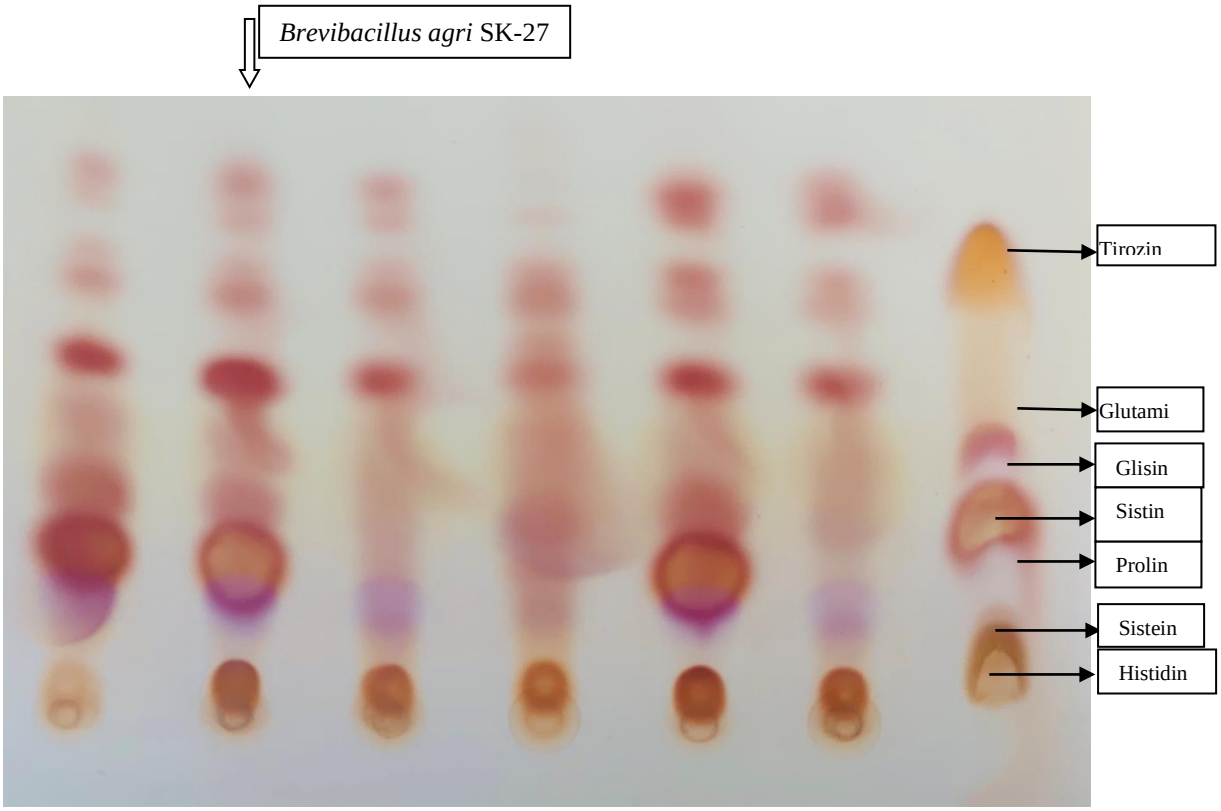
4.11. Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin TLC Analizi İle Farklı Substratlarda Açığa Çıkan Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması

Enzim substrat reaksiyonu sonucu açığa çıkan reaksiyon ürünlerinin (amino asitler) ince tabaka kromatografi analizi ile substratı neladar hidrolize edebildili analiz edilmiştir. Reaksiyon karışımı olarak 1.5 mL substrat (%1 kazein, keratin, jelatin, kollajen) ve 0.5 mL enzim şeklinde hazırlanmış ve yaklaşık 15°C de 5 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Analiz için plakalara 15 mikrolitre karışım yüklenmiş ve metod bölümünde belirtildiği şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Marker amino asit karışımı Glutamin, histidin, sistein, tirozin, sistin, glisin ve prolinden oluşmuştur.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi kazein ile reaksiyona bırakılmış ve TLC analizi sonunda substratın çok sayıda amino aside hidroliz olduğu saptanmıştır.

Markır amino asitler reaksiyon ürünü olarak markır amino asitlerle karşılaştırıldığında hidroliz sonunda histidin, sistein, sistin, glisin, prolin, glutamin ve tirozin dahil 9 farklı amino asidin açığa çıktığı görülmektedir (Şekil 4.94).

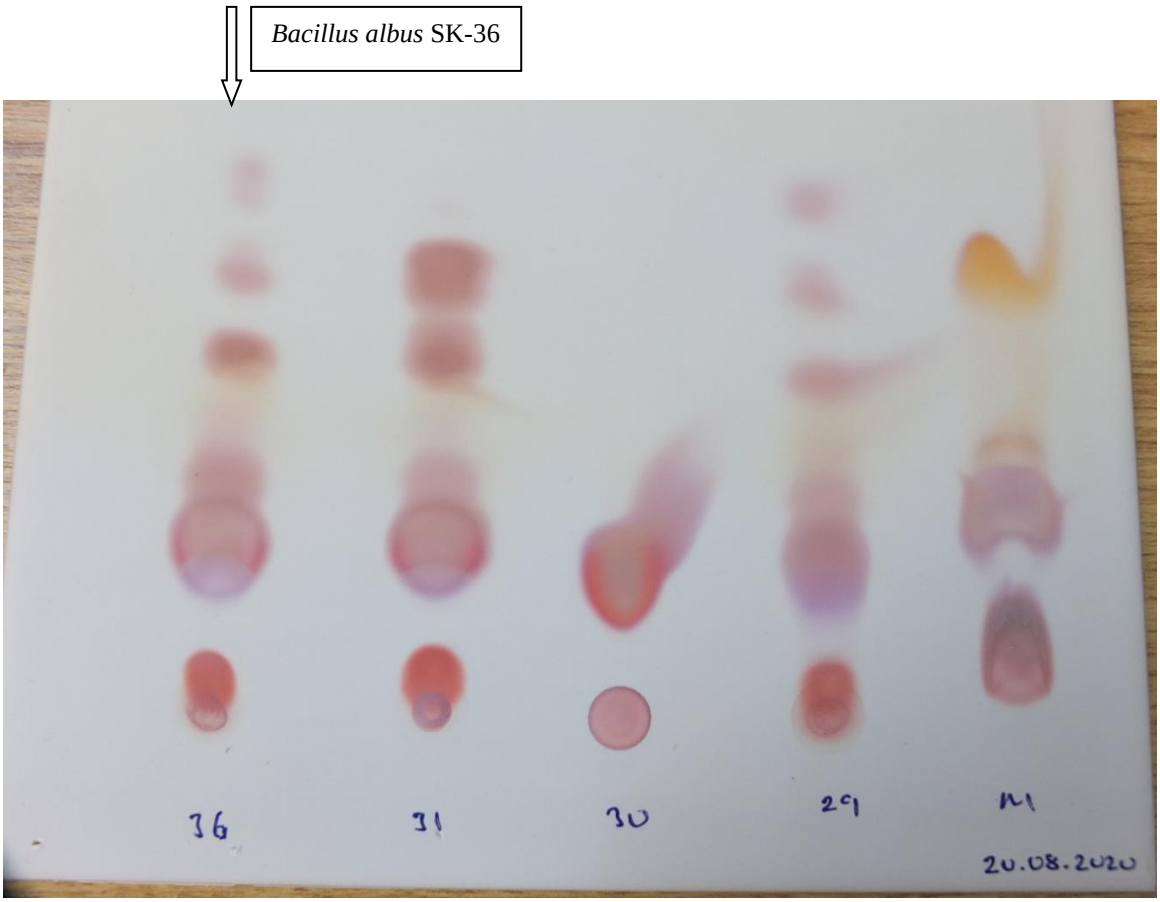
Nafady ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *B.licheniformis* suşundan üretilen keratinaz enziminin tüy tüyü valin, izolösin, prolin, triptofan, alanin, asparagin, serin ve glisin gibi diğer amino asitlere hidroliz ettiği saptanmıştır.



Şekil 4.94. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kazeini hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profilinin TLC görünümü

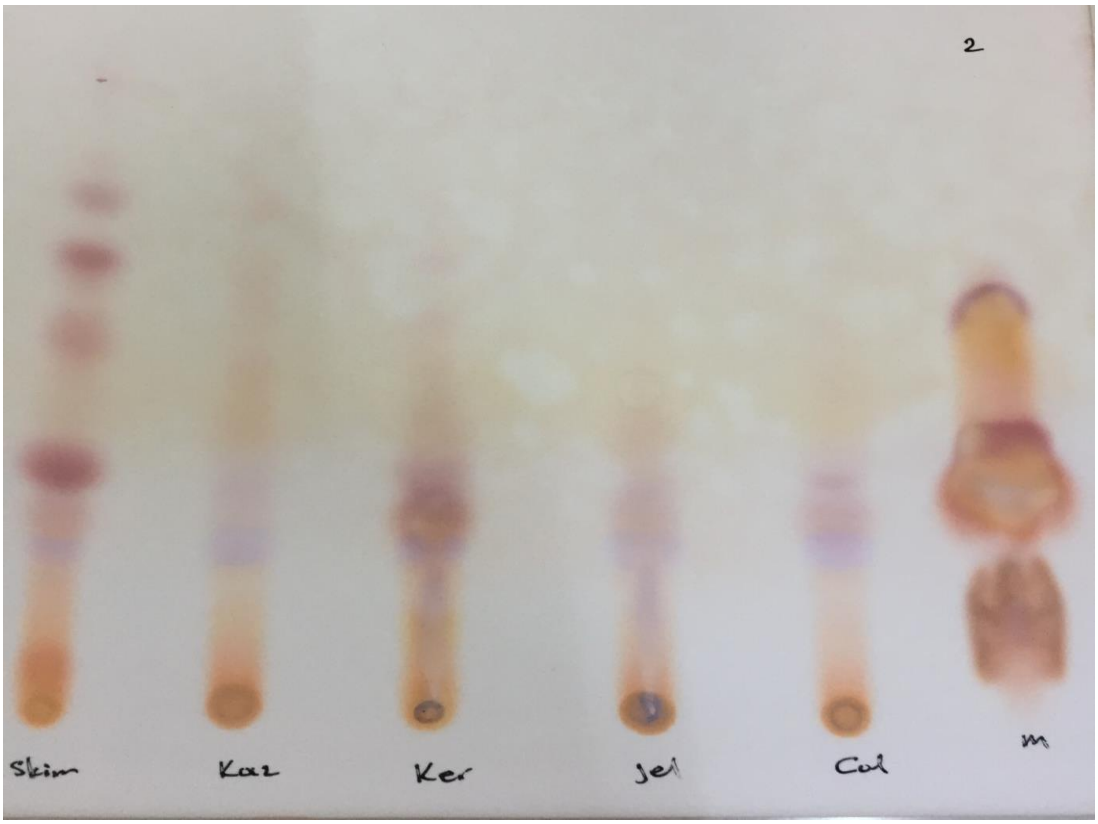
Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi ile kazeinin hidrolizi ürünleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. İzole edilen enzimin kazeini histidin, sistein, sistin, glisin, prolin, glutamin ve tirozin amino asidleri dahil görsel olarak saptanabilen enaz 11 amino aside hidrolize ettiği saptanmıştır.

Keratinaz enzimLeri karşılaştırıldığı zaman *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen enzimin kazeini *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen enzime göre daha başarılı hidroliz ettiği saptanmıştır.



Şekil 4.95. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kazeini hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profilinin TLC görünümü

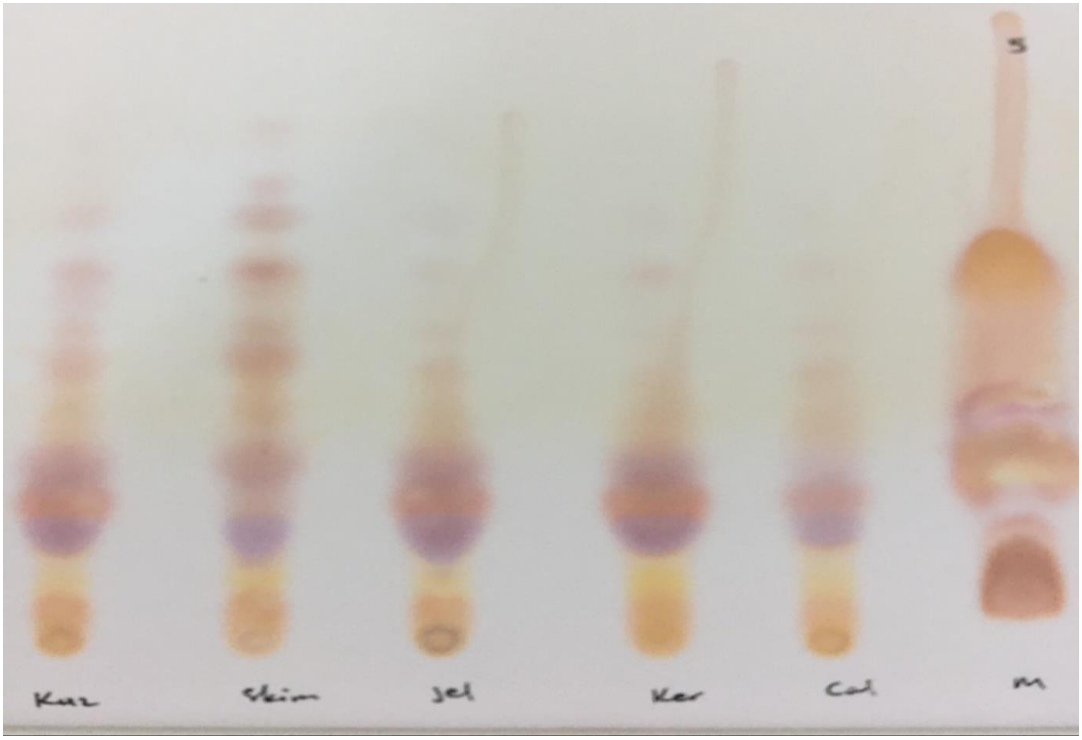
Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminin kazein, kollajen, keratin, jelatin ve skimmilki hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan reaksiyon ürünleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. En fazla hidroliz skimmilkte gerçekleşmiş ve 10 amino asid açığa çıkmıştır. Hidroliz sonunda kazein 4, keratin 6, jelatin 5 ve kollojen (kemik unu) 6 amino aside hidroliz olmuştur (Şekil 4.96).



Şekil 4.96. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kollajen (kemik unu), jelatin, keratin (tavuk tüyü unu), kazein ve skimmilki hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profilinin TLC görünümü

Bacillu tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kollajen (kemik unu), jelatin, keratin, kazein ve skimmilk substratlarını hidrolizi sonucu açığa çıkan reaksiyon ürünlerinin saptanması için ince tabaka kromatografisi analizi yapılmıştır. Analiz sonucu en fazla hidrolizin 11 amino asid ile skimmilkte gerçekleştiği görülmektedir. İzole edilen enzim kollajeni 10, jelatini 7, keratini 7 ve kazeini 10 amino aside hidroliz etmiştir. Skimmilk dışındaki bütün substratlarda prolin amnino asidi belirgin şekilde ortaya çıkmıştır.

Kollajenaz enzimLeri karşılaştırıldığında *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunundan üretilen enzimin *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen enzime göre daha yüksek hidroliz performansı gösterdiği saptanmıştır



Şekil 4.97. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kollajen (kemik unu), jelatin, keratin (tavuk tüyü unu),kazein ve skimmilki hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asit profilinin TLC görünümü

4.12. *Brevibacillus agri* SK-27, *Bacillus albus* SK-36, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşlarından İzole Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin HPLC Sonuçları

Brevibacillus agri SK-27 ve *Bacillus albus* SK-36 suşlarından izole edilen keratinaz enzimlerinden 1 mL alınarak 9 gr steril edilmiş tavuk tüyü unu ile (her enzimin optimum aktivite gösterdiği tamponda çözülmüş ve steril edilmiş) karıştırılarak 30°C de 3 ve 5 gün inkübasyona bırakılarak hidroliz uyglulanmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen ürünler 60°C de 2 saat kurutulup, havanda toz haline getirilmiş ve serbest amino asit yüzdesinin saptanması için HPLC sisteminde analiz ettirilmişlerdir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan elde edilen 3. güne ait bulgular çizelge 4.6, 5. güne ait bulgular çizelge 4.7 de gösterilmişlerdir.

Çizelge 4.6.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun tavuk tüyü unu ile 3 günlük inkübasyon periyodunda serbest kalan amino asit profilinin HPLC sonuçları

Örnek :*Brevibacillus agri* SK27-3. Gün

Enjection miktarı :20 µL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,704	9329	1605	0,133	%
2	Glutamic Acid	2,694	33385	728	2,369	%
3	Glycine	6,381	24916	939	2,729	%
4	Treonine	8,117	37690	877	2,301	%
5	Cystine	8,263	12288	863	5,331	%
6	Arginene	8,727	45344	2149	3,996	%
7	Alanine	9,198	50401	1764	2,870	%
8	Tryosine	9,921	18732	817	2,356	%
9	Valine	12,148	9380	353	2,006	%
10	Methionine	13,600	6204	462	1,978	%
11	Tryptophan	13,853	5474	428	1,255	%
12	Phenilalanine	14,123	12155	480	4,037	%
13	Leucine	15,084	21725	1087	2,455	%
14	Lysine	15,498	22569	1225	1,717	%
15	Hidroxy proline	15,501	58134	3391	0,062	%
16	Proline	17,307	60984	2981	**8,239**	%
Total			428710	20149	**43,833**	

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 3 günlük inkübasyon sonunda tavuk tüyü ununu hidroliz ederek toplam %43.883 serbest amino asitin açığa çıkarmıştır. Amino asitler düzeyinde incelendiği zaman %8.239 ile prolin en fazla serbest kalan amino asit olmuştur. Prolini sırası ile %5.331 ile sistein, %4.037 ile phenilalanin izlemiştir. Bu inkübasyon döneminde en az açığa çıkan amino asit %0.062 ile hidroksiprolin ve 0.133 ile aspartik asit olmuştur.

Çizelge 4.7.*Brevibacillus agri* SK-27 suşunun tavuk tüyü unu ile günlük inkübasyon periyodunda serbest kalan amino asit profilinin HPLC sonuçları

Örnek : *Brevibacillus agri* SK 27-5. Gün

Enjeksiyon miktarı :20 µL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,707	19096	1933	1,755	%
2	Glutamic Acid	2,698	56456	1418	6,753	%
3	Glycine	6,362	43911	1855	5,137	%
4	Treonine	8,097	40864	1118	4,482	%
5	Cystine	8,214	11921	843	2,369	%
6	Arginene	8,758	51175	2410	4,568	%
7	Alanine	9,186	84034	3678	5,811	%
8	Tryosine	9,913	29448	1375	3,351	%
9	Valine	12,152	7342	366	1,736	%
10	Methionine	13,562	16727	1128	3,817	%
11	Tryptophan	13,814	20257	601	2,957	%
12	Phenilalanine	15,069	22161	1981	7,291	%
13	Leucine	15,266	14114	1486	2,022	%
14	Lysine	15,480	46510	2493	3,534	%
15	Hidroxy proline	15,481	83925	4344	1,983	%
16	Proline	17,146	53726	2659	2,915	%
Total			601667	29688	**60,480**	

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 5 günlük inkübasyon sonunda tavuk tüyü ununu hidroliz ederek toplam %60.480 serbest amino asit elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin uzaması ile en fgenel olarak bütün amino asit miktarlarında belirgin artış meydana gelmiştir. Bu periyotta yüzde olarak serbest kalan en amino asit oranları sırası ile phenilalanin (7.291), glutamik asit (6.753), alanin (5.811), glycine (5.17), treonin (4.82), arginin (4.568), metionin (3.817), lysine (3.534) tryptofan (2.957), prolin (2.915), cyctine (2.369) hydroxiprolin (1.983), aspartic asit (1.755) ve valin (1.736).

İnkübasyon süresinin 3 günden 5 güne çıkartılması ile serbest kalan amino asit oranında yaklaşık %28 oranında artış gerçekleşmiştir. Diğer taraftan hydroxyprolin üçüncü günde 0.062 iken beşinci günde 2.915 (hidrolizde yaklaşık 43 kat artış gerçekleşmiştir) artış meydana gelmiştir. Metionin ve lizindeki artış sırası ile 1.92 ve 2.05 kat daha fazladır. Genel olarak hidrolize olup serbest kalan bütün amino asitlerde ortalama 2 kat artış sözkonusudur. Bu sonuçlar inkübasyon süresinin uzatılması ile hidrolizasyon oranı ve serbest kalan amino asit miktarında yüksek değerlere ulaşılacağını göstermektedir.

İnkübasyon süresinin uzatılması ile serbest kalan amino asit oranındaki artışın ve hidrolizdeki hızlanmanın, birinci inkübasyon periyodunda amino aside kadar hidrolize olamamış fakat dipeptid ve oligopeptid aşamasında kalmış ürünlerin polimer yapıya göre (ham keratin) daha kolay hidrolize olduğunu düşünmekteyiz.

Bacillus albus SK-36 suşunun tavuk tüyü hidroliz çalışmalarında üçüncü günde elde edilen bulgular çizelge 4.8, beşinci günde elde edilen bulgular çizelge 4.9 da gösterilmişlerdir.

Çizelge 4.8. *Bacillus albus SK-36* suşunun tavuk tüyü unu ile 3 günlük inkübasyon periyodunda serbest kalan amino asit profilinin HPLC sonuçları

Örnek : *Bacillus albus* SK-36-3. Gün

Enjeksiyonmiktarı :20 µL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,692	11474	1832	0,489	%
2	Glutamic Acid	2,496	57514	1268	6,954	%
3	Glycine	5,919	56590	1668	6,744	%
4	Treonine	7,794	42713	1117	5,752	%
5	Cystine	7,950	11973	820	2,785	%
6	Arginene	8,485	50258	2413	4,478	%
7	Alanine	8,986	73920	2860	4,927	%
8	Tryosine	9,741	24492	1121	2,891	%
9	Valine	12,190	9490	391	2,021	%
10	Methionine	13,517	7134	454	2,140	%
11	Tryptophan	13,891	17825	555	2,677	%
12	Phenilalanine	14,420	3805	331	1,322	%
13	Leucine	14,921	36193	1717	3,277	%
14	Lysine	15,364	38046	2091	2,892	%
15	Hidroxy proline	15,365	59034	3810	0,129	%
16	Proline	17,059	61760	2917	8,808	%
Total			562220	25365	**58,287**	

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin tavuk tüyü unu hidroliz çalışmalarında üç günlük inkübasyon sonunda toplam %58.287 serbest amino asit açığa çıkmıştır. Hidrolize olan tavuk tüyü unundan sırası ile prolin (8.808), glutamik asit (6.954), glycine (6.744), treonin (5.752), alanin (4.927), arginin (4.478), leucine (3.277), tyrptofan (2.677), lisine (2.892), tyrosine (2.891), sistin (2.785), metionin (2.140), valine (2.021), fenilalanin (1.322), aspartic asit (0.489) ve hydroxiprolin (0.129) amino asitleri serbest kalmıştır.

Çizelge 4.9.*Bacillus albus* SK-36 suşunun tavuk tüyü unun ile 5 günlük inkübasyon periyodunda serbest kalan amino asit profillerinin HPLC sonuçları

Örnek :*Bacillus albus* SK-36-5. Gün

Enjeksiyon miktarı :20 uL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,710	11461	1760	0,487	%
2	Glutamic Acid	2,721	45287	1208	4,631	%
3	Glycine	6,413	57667	1552	6,880	%
4	Treonine	8,142	35141	1469	0,549	%
5	Cystine	8,274	11684	852	0,459	%
6	Arginene	8,758	54900	2552	4,934	%
7	Alanine	9,207	69520	2953	4,542	%
8	Tryosine	9,935	28293	1187	3,244	%
9	Valine	12,191	9775	467	2,058	%
10	Methionine	13,624	12453	847	3,070	%
11	Tryptophan	13,907	7598	644	1,500	%
12	Phenilalanine	14,157	21658	757	7,127	%
13	Leucine	15,098	40739	1781	3,536	%
14	Lysine	15,511	43672	2147	3,319	%
15	Hidroxy proline	15,514	59652	3452	0,175	%
16	Proline	17,194	50228	2760	0,349	%
Total			559729	26386	**46,860**	

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin tavuk tüyü unu hidroliz çalışmalarında BEŞ günlük inkübasyon sonunda toplam %46.860 serbest amino asit elde edilmiştir. İnkübasyonun beşinci gününde saptanan en yüksek amino asit değeri %7.127 ile phenilalaninde elde edilmiştir. Phenilalinin inkübasyonun üçüncü gününde %1.322 olarak saptanmıştır. Her iki inkübasyon süresi karşılaştırıldığında phenilalaninde yaklaşık 5.39 kat artış gerçekleşmiştir.

İnkübasyonun beşinci gününde genel olarak üçüncü güne göre açığa çıkan amino asit değerlerinde belirgin bir düşüş meydana gelmiştir. Toplam amino asit düzeyinde %58 den %46 ya doğru bir azalma meydana gelmiştir. Bu durum amino asitler özelinde de açıkça görülmektedir. Örneğin glukamik asitte %6.954 ten 4.631, threoninde %5.752 den 0.549'a prolinde %8.808 den 0.349 a düşüş saptanmıştır. Liya, S.M., and Umesh, M. (2023), *Bacillus tropicus* LS27 bakterisinden izole edilen keratinaz enziminin HPLC analizinde keratini sistein, valin, metiyonin,

fenilalanin, izolösin, lizin ve prolin hidroliz ettiğini bulumuşlardır. İzolösin çözeltide en yüksek konsantrasyona, prolinin ise en düşük konsantrasyona sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bu sonuçlar *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enziminin ham tavuk tüyü ununu 3. Günde yaklaşık %59 düzeyinde serbest amino asitlere dönüştürdüğünü, inkübasyon süresinin uzatılmasının (beş günlük periyot) amino asite hidrolizde pozitif etk yapmadığını göstermektedir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole ettiğimiz keratinaz enzimi tavuk tüyü ununu 3 günlük inkübasyon sonunda pratikte kullanılacak oranda serbest amino asitlere, di-peptidlere ve oligo-peptidlere hidroliz etmiştir. Tüy hidrolizatının, oligopeptitler, dipeptitler ve amino asitlerin bir karışımından oluşan bir çözelti olduğu belirtilmiştir (Liya, and Umesh,. 2023).

Çalışmada izole edilen kollajenaz enzimleri kullanılarak ham kemik unu (tip-1 kollajen) ile enzim keratinaz enzimleri ile gerçekleştirilen uygulamadaki değerler temel alınarak hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Hidroliz çalışmasında inkübasyon süresi 3 ve 5 gün, inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak seçilmiştir. Uygulamada her enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerine sahip tampon kullanılmıştır. Çalışmada *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve Bacillus tropicus SKK-5 suşlarından üretilen kollajenaz enzimLeri kullanılmıştır. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu kollajenaz enzimine ait üçüncü gün hidroliz bulguları çizelge 4.10, beşinci gün bulguları çizelge 4.11 de gösterilmiştir. *Bacillus tropicuc* SKK-5 suşundan elde edilen üçüncü gün hidroliz bulguları çizelge 4.12 ve beşinci gün hidroliz bulguları çizelge 4.13 de verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Lysinibacillus fusiformis* SSK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 3 günlük inkübasyon sonunda kemik ununda (tip-1 kollajen) serbest kalan amino asit profillerinin HPLC sonuçları

Örnek : *Lysinibacillus fusifotmis* SSK-2 3. Gün

Enjeksiyon miktarı : 20 uL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,704	16207	1506	1,275	%
2	Glutamic Acid	2,646	32223	725	2,148	%
3	Glycine	6,254	28749	673	3,215	%
4	Treonine	7,683	35660	798	0,906	%
5	Cystine	8,212	11672	506	0,359	%
6	Arginene	8,651	28346	1392	2,327	%
7	Alanine	9,145	34532	1284	1,482	%
8	Tryosine	9,860	22000	842	2,660	%
9	Valine	12,046	4631	155	1,377	%
10	Methionine	13,489	2473	166	1,326	%
11	Tryptophan	14,009	6340	157	1,355	%
12	Phenilalanine	14,601	12943	1081	4,294	%
13	Leucine	15,028	8114	496	1,681	%
14	Lysine	15,451	12175	674	0,928	%
15	Hidroxy proline	15,450	65074	2186	0,579	%
16	Proline	17,285	55812	2700	4,445	%
Total			376952	15341	**30,355**	

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi ile gerçekleştirilen çalışmada üçüncü gün sonunda tip kollajen yapısının toplamda %30.355 serbest aminoasite hidroliz olduğu saptanmıştır. Enyüksek hidroliz değeri sırası ile prolin, phenilalanin, glycin, tyrosine, arginine ve glutamik asit te %4.445, 4.294, 3.215, 2.660, 2.327 ve 2.148 elde edilmiştir. En az serbest kalan amino asit ise %0.359 ile sistin olmuştur.

Çizelge 4.11. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 5 günlük inkübasyon sonunda kemik ununda (tip-1 kollajen) serbest kalan amino asit profillerinin HPLC sonuçları

Örnek : *Lysinibacillus fusiformis* SSK-2 5. Gün

Enjeksiyon miktarı : 20 uL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,696	12577	1413	0,673	%
2	Glutamic Acid	2,613	30934	691	1,903	%
3	Glycine	6,196	19855	573	2,088	%
4	Treonine	7,528	35616	646	0,875	%
5	Cystine	8,165	11879	619	2,030	%
6	Arginene	8,581	21403	973	1,645	%
7	Alanine	9,083	30033	979	1,088	%
8	Tryosine	9,791	21179	724	2,583	%
9	Valine	11,907	8588	220	1,901	%
10	Methionine	13,311	2118	122	1,264	%
11	Tryptophan	13,680	1799	130	0,832	%
12	Phenilalanine	14,508	35208	2052	11,533	%
13	Leucine	15,167	6586	590	1,594	%
14	Lysine	15,361	9445	519	0,721	%
15	Hidroxy proline	15,381	59939	2713	0,197	%
16	Proline	17,200	54653	2308	3,595	%
Total			361813	15271	**34,521**	

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi 5 günlük inkübasyon sonunda tip-1 kollajeni toplamda %34.521 oranında serbest amino asitlere hidroliz etmiştir. Aynı suştan elde edilen enzim kullanılarak yapılan 3 günlük inkübasyona göre yaklaşık %4 daha fazla serbest amino asit açığa çıkmıştır. Bu sonuç kollajenaz enziminde inkübasyon süresinin uzatılmasının hidrolizde olumlu etki yaptığını göstermeltedir.

Yapılan değerlendirmede phenilalanin amino asidinde %11.533 değerine ulaşılmıştır. Phenilalaninde üç günlük inkübasyon süresi ile karşılaştırıldığında 2.68 hat daha yüksek hidroliz gerçekleşmiştir. Metionin ve tyrosine amino asidlerinde her iki inkübasyon periyodunda da birbirine yakın değerler elde edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde kollajenaz enziminin tip-1 kollajenin hidrolizinde 3 güne göre 5 günlük inkübasyonda daha etkili olacağı görülmektedir.

Çizelge 4.12.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 3 günlük inkübasyon sonunda kemik ununda (tip-1 kollajen) serbest kalan amino asit profillerinin HPLC sonuçları

Örnek :*Bacillus tropicus* SSK-5 3. Gün

Enjeksiyon miktarı : 20 uL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,696	9337	1519	0,135	%
2	Glutamic Acid	2,510	34857	834	2,649	%
3	Glycine	5,952	29148	700	3,266	%
4	Treonine	7,796	36059	900	1,180	%
5	Cystine	7,998	12125	594	4,013	%
6	Arginene	8,490	55448	2591	4,988	%
7	Alanine	9,008	48269	1919	2,683	%
8	Tryosine	9,757	20337	1009	2,505	%
9	Valine	11,867	6842	292	1,670	%
10	Methionine	13,289	1887	160	1,223	%
11	Tryptophan	14,853	1864	217	0,840	%
12	Phenilalanine	14,959	3819	412	1,327	%
13	Leucine	15,156	11603	990	1,879	%
14	Lysine	15,386	14283	942	1,088	%
15	Hidroxy proline	15,385	60304	2623	0,224	%
16	Proline	17,065	57353	2458	5,576	%
Total			403535	18162	**35,245**	

Bacillus tropicus SSK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 3 günlük inkübasyon sonunda tip-1 kollajenden toplamda %35.245 serbest kalan amino asit açığa çıkacak şekilde hidroliz etmiştir. Enyüksek değer %5.576 ile prolin amino asitinde elde edilmiştir. Prolini %4.988 ile arginin, 4.013 ile sistin, 3.266 ile glisin, 2.683 ile alanin, 2.649 ile glutamik asit, 2.505 ile tyrosine izlemiştir. Amino asitler düzeyinde en düşük hidroliz %0.224 ile hidroksiprolin ve 0.135 ile aspartik asitte gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.13.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 5 günlük inkübasyon sonunda kemik ununda (tip-1 kollajen) serbest kalan amino asit profilinin HPLC sonuçları

Örnek : *Bacillus tropicus* SSK-5 5. Gün

Enjeksiyon miktarı : 20 uL

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Aspartic Acid	1,685	11084	1533	0,425	%
2	Glutamic Acid	2,493	37848	841	3,217	%
3	Glycine	5,905	36090	707	4,146	%
4	Treonine	7,692	35348	626	0,691	%
5	Cystine	7,953	11952	499	2,624	%
6	Arginene	8,465	40218	1735	3,492	%
7	Alanine	8,980	40084	1465	1,967	%
8	Tryosine	9,734	21994	985	2,659	%
9	Valine	11,822	7443	226	1,750	%
10	Methionine	13,529	1189	73	1,101	%
11	Tryptophan	13,991	3541	181	1,033	%
12	Phenilalanine	14,472	22179	1401	7,297	%
13	Leucine	15,133	10931	906	1,841	%
14	Lysine	15,353	11576	754	0,883	%
15	Hidroxy proline	15,367	59100	2234	0,134	%
16	Proline	17,038	57496	2611	5,680	%
Total			408074	16777	**38,939**	

Bacillus tropicus SSK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin 5günlük inkübasyon sonunda tip-1 kollajenden toplamda %38.939 düzeyinde serbest amino asit açığa çıkmıştır. İnkübasyon süresi beş güne çıkarıldığında *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenazında elde edilen bulguya benzer şekilde *Babillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimi ile elde edilen üründe de phenilalanin değerinde hızlı bir atış meydana gelmiştir. İnkübasyon süresinin uzama en fazla fenilalanin hidrolizi üzerinde olumLu etki yapmaktadır. Prolin üç günlük periyoda göre bir miktar artış göstermiş ve diğer amino asitlere göre beş günlük periyotta da ön plana çıkmıştır.

Her iki kollajenaz suşundan izole edilen enzimler performans açısından karşılaştırıldığında *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenazının üç ve beş günlük inkübasyon periyodunda ortalama %16 daha fazla hidroiz gerçekleştirdiği ve serbest amino asit açığa çıkardığı görülmektedir. B. amyloliquefaciens 3–2 suşundan üretilen keratinaz enzimi ile hidroliz gerçekleştirilmiş ve muamele edilen tüy ununda serbest amino asitler ve çözünür peptit içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir. Protein çözünürlüğü ve in vitro sindirilebilirlik de sırasıyla 20,75 ve 10,27 kat artmıştır. Bu sonuçlar, CEH'nin tüy atığının besin değerini iyileştirmek için umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir (Zhou ve ark. 2020)

Keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin performansları karşılaştırıldığında keratinaz enzimlerinin kollajenaz enzimlerine göre (kendi substratlarını) yaklaşık %100 oranında daha fazla hidroliz ettikleri ve serbest aminoaside dönüştürdükleri görülmektedir.

4.13. *Bacillus albus* SK-36, *Bacillus agri* SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşuna Ait EMS Mutasyon onuçları

Ön taramada katı skimmilk agar besiyerinde 20 mm ve üzeri zon oluşturan farklı zaman ve konsantrasyonda EMS uygulanarak elde edilmiş mutantlar saptanarak 1 mL sıvı N1 besiyerine toplu iğne başı büyüklüğünde aktarılıp 24 saat 20 °C de inkübe edilmişlerdir. Mutant suşların ana suşları da aynı koşullarda ve aynı miktarda 1 mL N1 besiyerine aktarılıp 24 saat 20 °C de inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon işemi sonunda katı skimmilk agar besiyerine ortaya ana suş olmak üzere en fazla iki farklı mutant 20µL miktarda aşılanarak 40 saat süre ile 20°C de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda oluşan toplam zon çapları ölçülerek aktivite değerleri mm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.14.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun EMS ile muamele edilmesi sonucu mutantlardan elde edilen net aktivite zonleri

BS	ES dk	KMM µL	AM µL	İS °C	İSÜ h	ASK mm	ASZ mm	NZ mm	1NK mm	1NZ mm	1NZÇ mm	2NK mm	2NZ mm	2NZÇ mm
SKK2	30	80	20	20	40	14	23	**9**				13	45	**32**
SKK2	60	20	20	20	40	14	23	**9**	13	50	**37**			
SKK2	60	80	20	20	40	15	25	**10**	20	38	**18**	17	43	**26**
SKK2	90	40	20	20	40	15	25	**10**				16	57	**41**

BS. Bakteri suşu, ES: Etki süresi, KMM: Kullanılan mutajen miktarı, AM: Aşılanan miktar, İS: İnkübasyon sıcaklığı, İSÜ: İnkübasyon süresi, ASK: Anasuş koloni çapı, ASZ: Anasuş zon çapı, NZ: Net zon çapı, 1NK: 1 numara koloni çapı, 1NZ: 1 numara zon çapı, 1NZÇ: 1 numara net zon çapı, 2NK: 2 numara koloni çapı, 2NZ: 2 numara zon çapı, 2NZÇ: 2 numara net zon çapı

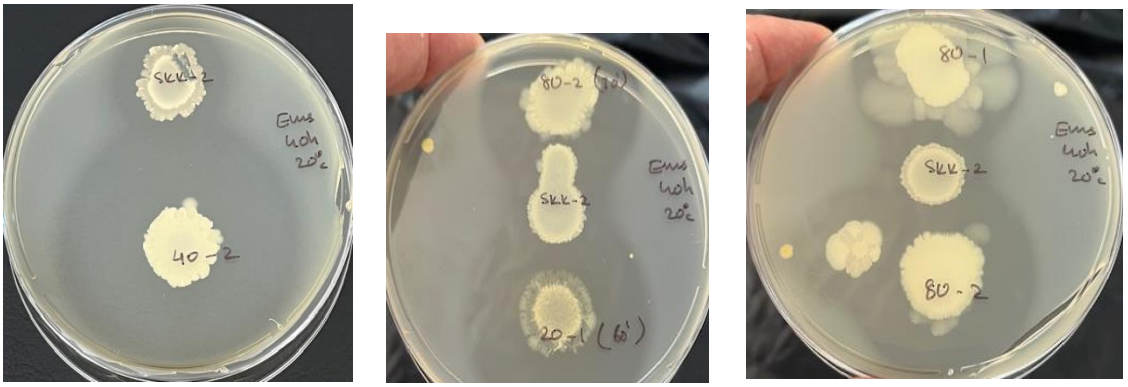
Lysinibacillus fusiformis SKK-2 kollajenaz üreten suştan elde edilen mutantlar ile yapılan ana suş karşılaştırmalı çalışmalarda mutantların oldukça yüksek enzim üretme yetenekleri kazandıkları görülmektedir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20 µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 9 mm olurken, mutant suşta 32 mm gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20 µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 9 mm olurken, mutant suşta 37 mm gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20 µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon

sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 10 mm olurken, 1 numaralı mutantta 18, 2 numaralı mutantta 26 mm gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 90 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20 µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 10 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 41 mm gerçekleşmiştir. Sonuçlar çizelge 4.15 ve şekil 4.98, de gösterilmiştir.



Şekil 4.98.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları

Çizelge 4.15.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun EMS ile muamele edilmesi sonucu mutantlardan elde edilen net aktivite zonları

BS	ES dk	KMM µL	AM µL	İS °C	İSÜ h	ASK mm	ASZ mm	NZ mm	1NK mm	1NZ mm	1NZÇ mm	2NK mm	2NZ mm	2NZÇ mm
SKK5	60	10	20	20	40	18	40	**22**	16	45	**29**			
SKK5	60	40	20	20	40	18	40	**22**	42	55	**13**			
SKK5	30	40	20	20	40	17	40	**23**				15	40	**25**
SKK5	30	80	20	20	40	17	40	**23**				16	46	**30**

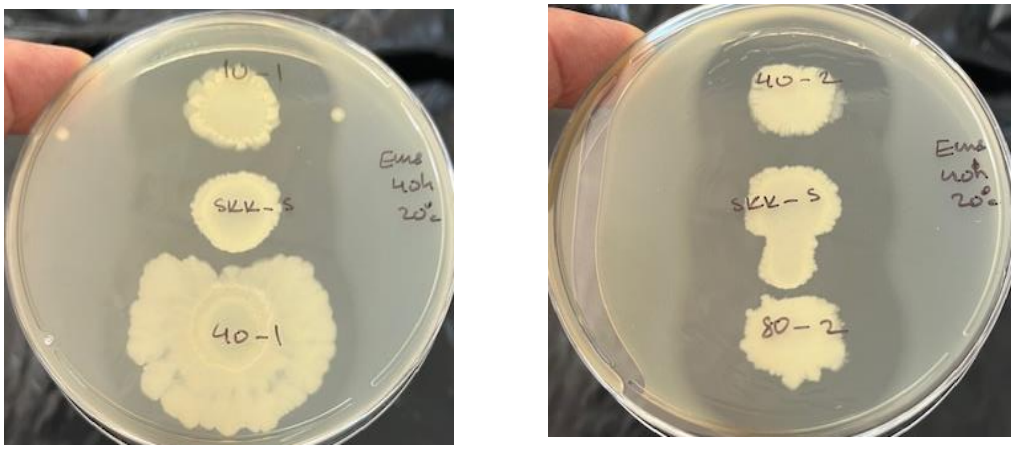
Bacillus tropicus SKK-5 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 10µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 22 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 29 mm gerçekleşmiştir

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 22 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 13 mm gerçekleşmiştir

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 23mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 25 mm gerçekleşmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta

net aktivite zon çapı 23 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 30 mm gerçekleşmiştir. Sonuçlar çizelge 4.16 ve şekil 4.99 da gösterilmiştir.



Şekil 4.99. *Bacillus tropicus* SKK-5 suuşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları

Çizelge 4.16. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun EMS ile muamele edilmesi sonucu mutantlardan elde edilen net aktivite zonları

BS	ES dk	KMM µL	AM µL	İS °C	İSÜ h	ASK mm	ASZ mm	NZ mm	1NK mm	1NZ mm	1NZÇ mm	2NK mm	2NZ mm	2NZÇ mm
SK27	30	20	20	20	40	23	38	**15**				23	41	**18**
SK27	60	10	20	20	40	23	40	**17**				15	45	**30**
SK27	60	20	20	20	40	23	40	**17**				15	50	**35**
SK27	60	40	20	20	40	35	45	**10**	15	42	**27**			
SK27	30	40	20	20	40	23	41	**18**	31	40	**9**	16	55	**39**
SK27	30	80	20	20	40	23	40	**17**	22	41	**19**	15	50	**35**

Not:Çalışmalarda HY olarak adlandırılan suş, tanımLandıktan sonra SK-27 şeklinde adlandırılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 15 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 18 mm gerçekleşmiştir.

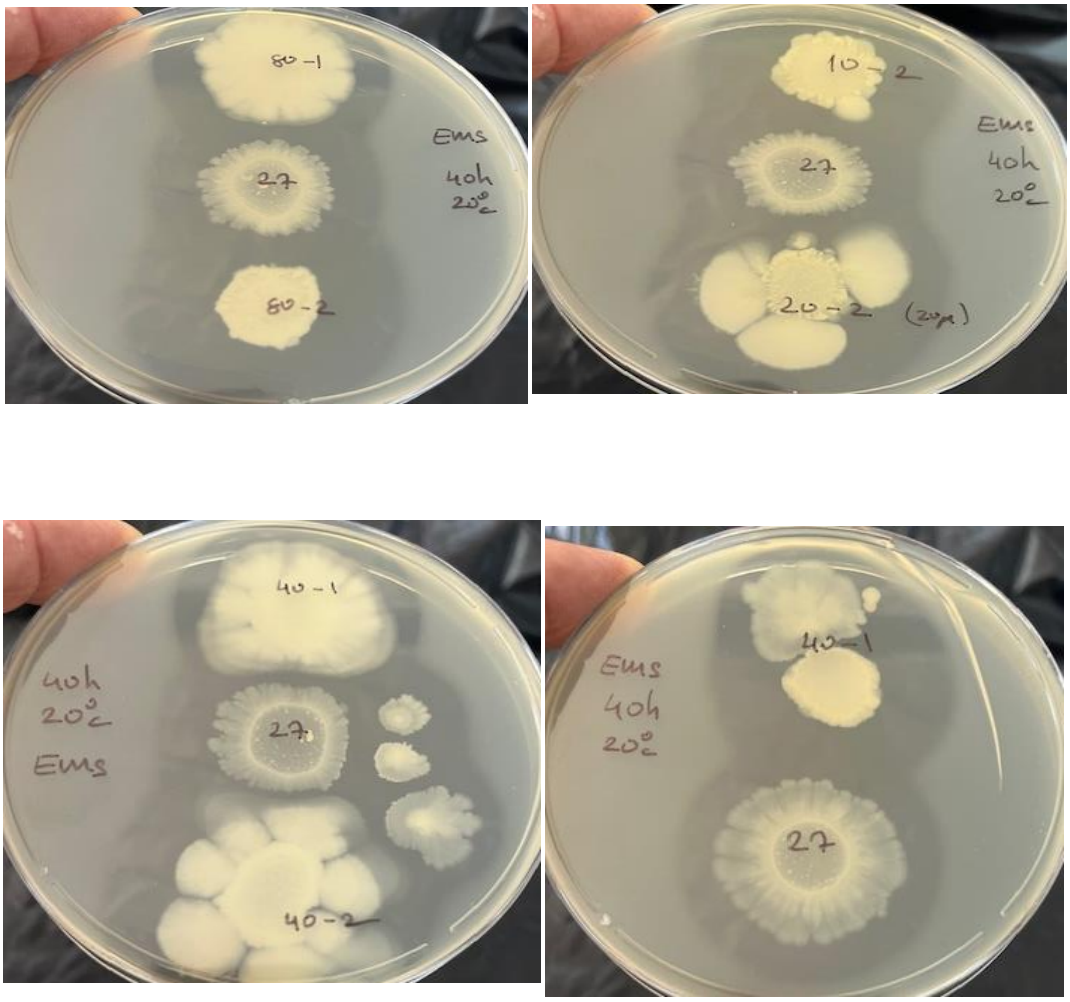
Brevibacillus agri SK-27 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 10µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 17 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 30 mm gerçekleşmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 17 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 35 mm gerçekleşmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 10 mm olurken, 21 numaralı mutant suşta 27 mm gerçekleşmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 18 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 9, 2 numaralı mutant suşta 39 mm gerçekleşmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 17 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 19, 2 numaralı mutant suşta 35 mm gerçekleşmiştir. Sonuçlar çizelge 4.17 ve şekil 4.100 de gösterilmiştir.



Şekil 4.100.*Brevibacillus agri* SK-27 suşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları

Çizelge 4.17.*Bacillus albus* SK-36 suşunun EMS ile muamele edilmesi sonucu mutantlardan elde edilen net aktivite zonları

BS	ES dk	KM M µL	AM µL	İS °C	İSÜ h	ASK mm	ASZ mm	NZ mm	1NK mm	1NZ mm	1NZÇ mm	2NK mm	2NZ mm	2NZÇ mm
SK36	30	20	20	20	40	20	35	**15**	16	42	**26**	20	48	**28**
SK36	30	40	20	20	40	22	41	**19**	22	45	**23**			
SK36	30	80	20	20	40	22	41	**19**	22	55	**33**			
SK36	60	10	20	20	40	20	33	**13**	15	22	**7**			
SK36	60	20	20	20	40	20	33	**13**				17	41	**24**
SK36	90	80	20	20	40	25	45	**20**				22	50	**28**
SK36	90	20	20	20	40	24	45	**19**				23	45	**22**
SK36	90	40	20	20	40	24	45	**19**	26	47	**21**			

Bacillus albus SK-36 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 15 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 26, 2 numaralı mutant suşta 28 mm gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 19 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 23 gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 30 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 19 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 33 gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 10µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 13 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 7 gerçekleşmiştir.

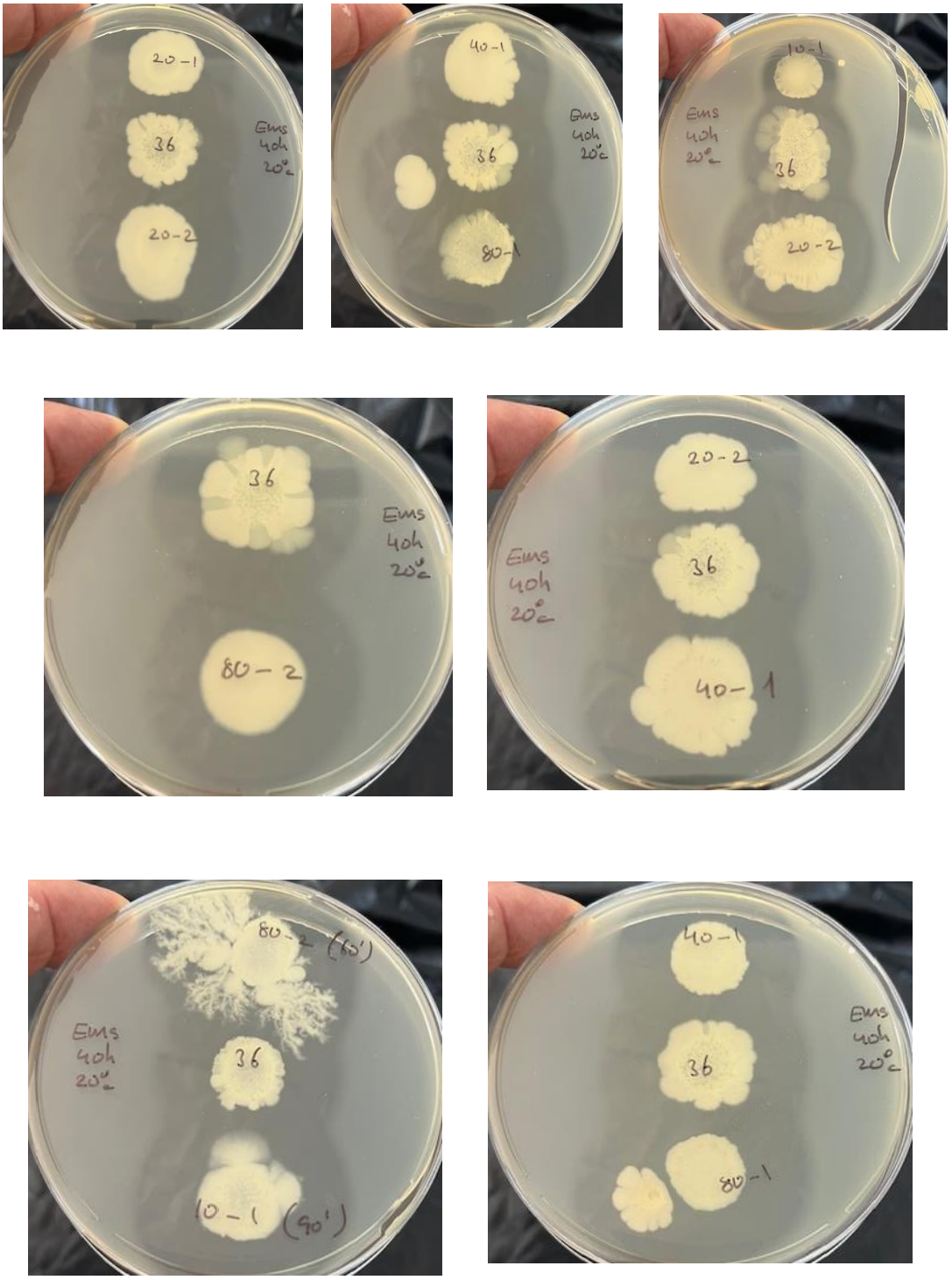
Bacillus albus SK-36 suşunun 60 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 13 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 24 gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 90 dakika mutajen etki süresi, 80µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 20 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 28 gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 90 dakika mutajen etki süresi, 20µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta net aktivite zon çapı 19 mm olurken, 2 numaralı mutant suşta 22 gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun 90 dakika mutajen etki süresi, 40µL mutajen kullanılarak yapılan çalışma sonunda suş 20µL miktarda aşılanmış ve 40 saatlik inkübasyon sonunda ana suşta

net aktivite zon çapı 19 mm olurken, 1 numaralı mutant suşta 21 mm gerçekleşmiştir. Sonuçlar çizelge 4.18 ve şekil 4.101 de gösterilmiştir.



Şekil 4.101.*Bacillus albus* SK-36 suşuna ait EMS mutantları ve orijinal suşun aktivite zon çapları

Lysinibacillus fusiformis SKK-2, *Bacillus atrophus* SKK-5, *Bacillus agri* SK-27 ve *Bacillus albus* SK-36 suşları ile gerçekleştirilen EMS mutasyon çalışması sonucunda özellikle SKK-2 suşundan elde edilen mutantlarda enzim üretiminin ana suşa göre ciddi miktarda artış gösterdiği saptanmıştır.

4.14. Bacillus albus SK-36, Brevibacillus agri SK-27*, Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşuna ait UV mutasyon sonuçları

Bacillus albus SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşları ile yapılan UV mutasyon çalışmasına ait sonuçlar tablolarda verilmiştir. UV ışınlama süresi 30, 60 ve 90 dakika olacak şekilde üç farklı periyotta gerçekleştirilmiştir. Işınlama işleminden sonra alüminyum folyo ile tamamen kapatılan petri besiyerlerinde üreyen koloniler numaralandırılarak 1 mL N1 sıvı besiyerine kürdan aracılığı ile aşılanıp 24 saat 20 °C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak ışınlanmamış ana suşlarda 1 mL N1 sıvı besiyerine ekilerek bir gecelik kültür elde edilmiştir.

Sıvı besiyerinde üreyen mutant ve ana suşlara ait örnekler 10µL miktarda skimmilk agar besiyerine aşılanarak petriler alüminyum folyo ile kapatılıp 20 °C 40 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda besiyerinde üreyen ana suş ve mutant suşların koloni ve zon çapları ayrı ayrı ölçülmüş ve net aktivite zonları bulunmuştur. Sonuçlar tablolarda gösterilmiştir.

Çizelge 4.181. *Bacillus albus* SK-36 suşunun UV mutasyon sonuçları

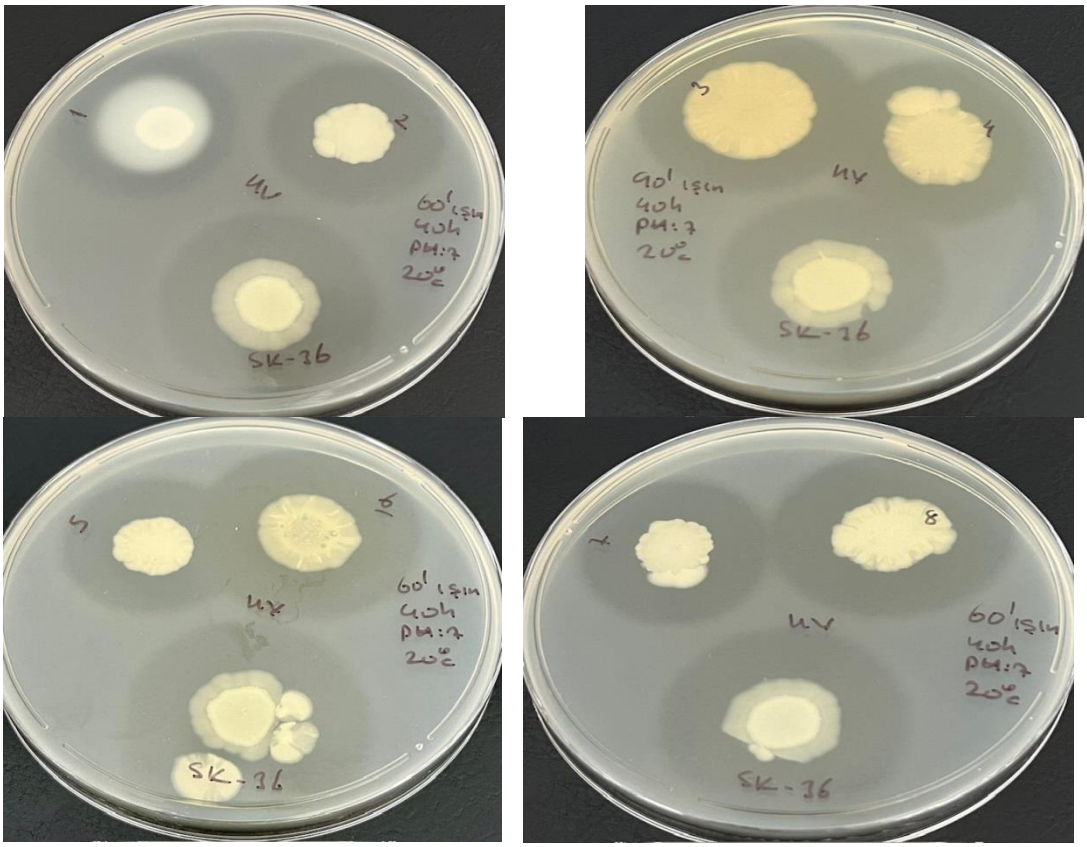
SUŞ	Işınlama süresi dk	İnkübasyon sıcaklığı °C	İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri çapı mm	Zon çapı mm	Net zon çapı mm
SK36 AS	-	20	40	20	35	15
SK-36 M1	60	20	40	10	32	**22**
SK-36 M2	60	20	40	12	32	20
SK-36 AS	-	20	40	20	34	14
SK-36 M3	90	20	40	22	40	18
SK-36 M4	90	20	40	17	37	20
SK-36 AS	-	20	40	20	35	15
SK-36 M5	60	20	40	10	27	17
SK-36 M6	60	20	40	15	40	**25**
SK-36 AS	-	20	40	17	35	18
SK-36 M7	60	20	40	11	30	19
SK-36 M8	60	20	40	13	38	**25**

Bacillus albus SK-36 suşu ile yapılan UV mutasyon çalışmalarında kontrol suşta elde edilen net zon çapı 15 mm iken 60 dakikalık ışınlama sonunda 1 numaralı mutant suşta 22, 2 numaralı mutant suşta 20 mm net zon elde edilmiştir.

Mutant 3 ve mutant 4 olarak adlandırılan suşlar 90 dakikalık UV ışınlaması sonunda elde edilmişlerdir. Orijinal suşta net zon çapı 15 mm iken 3 numaralı mutantta 18, 4 numaralı mutantta 20 mm net aktivite zonu elde edilmiştir.

Mutant 5 ve mutant 6 suşları 60 dakikalık UV ışınlaması sonunda elde edilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında 5 numaralı suşta 17, 6 numaralı suşta 25 mm aktivite zonu elde edilmiştir. 60 dakikalık ışınlama sonunda elde edilen 7 ve 8 numaralı mutant suşlarda sırası ile net aktivite zonları 19 ve 25 mm elde edilmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmalarında toplam 8 adet mutant elde edilmiş, bunların 6 adedi 60, 2 adedi 90 dakikalık ışınlama sonunda elde edilmiştir. Özellikle 6 ve 8 numaralı mutant suşlarında orijinal suşa göre aktivite zonu %60 daha geniştir. Bir başka ifade ile bütün mutantlarda orijinal suşa göre enzim üretiminde artış gerçekleşmekle birlikte 6 numaralı suşta yaklaşık %60, 8 numaralı suşta ise %38 artış gerçekleşmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşunda UV uygulaması ile gerçekleştirilen mutasyon çalışmalarında 60 dakikalık ışınlama süresinin mutant oluşumunda %75 etkili olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular şekil 4.102 de gösterilmiştir.



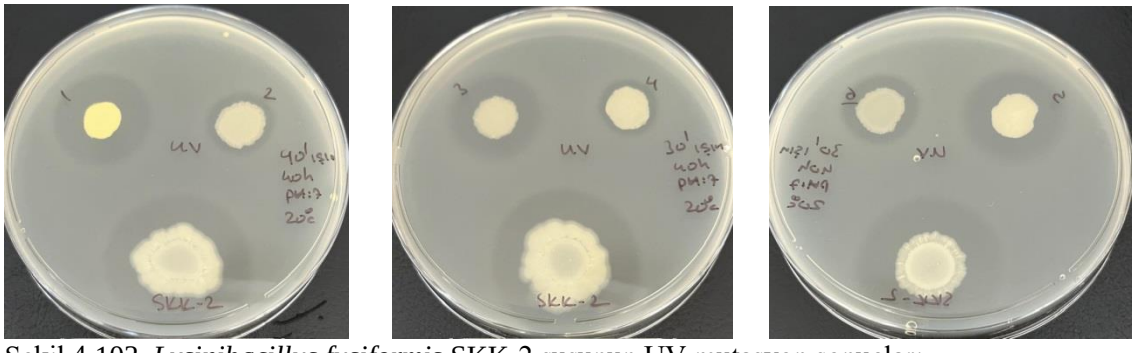
Şekil 4.102. *Bacillus albus* SK-36 suşunun UV mutasyon sonuçları

Çizelge 4.19. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun UV mutasyon sonuçları

SUŞ	Işınlama süresi dk	İnkübasyon sıcaklığı °C	İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri çapı mm	Zon çapı mm	Net zon çapı mm
SKK-2 AS	-	20	40	22	37	15
SKK-2 M1	90	20	40	12	16	**4**
SKK-2 M2	90	20	40	15	17	**2**
SKK-2 AS	-	20	40	21	31	10
SKK-2 M3	30	20	40	11	22	11
SKK-2 M4	30	20	40	11	14	**3**
SKK-2 AS	-	20	40	16	30	14
SKK-2 M5	30	20	40	10	25	**15**
SKK-2 M6	30	20	40	11	18	**7**

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmalarında 90 dakikalık ışınlama sonunda 2, 30 dakikalık ışınlama sonunda 4 olmak üzere toplam 6 mutant elde edilmiştir. Mutasyon çalışmasında 90 dakikalık UV ışınlaması sonucu elde edilen 1 ve 2 numaralı mutantlar ile 30 dakikalık ışınlama ile elde edilen 4 ve 6 numaralı suşlarda orijinal suşa göre enzim sentezi inhibe olmuştur. Orijinal suşla karşılaştırıldığında, orijinal suşta 15 mm net aktivite zonu elde edilirken, 1 numaralı suşta net aktivite zonu 4 mm, 2 numaralı suşta 2 mm, 4 numaralı suşta 3 mm ve 6 numaralı suşta 7 mm aktivite zonu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre enzim sentezi 1 numaralı suşta yaklaşık 4 kat, 2 numaralı suşta 7.5 kat inhibe olmuştur. Orijinal suş ile 10 mm net aktivite zonu elde edilen çalışmada 4 numaralı suşta 3 kat inhibisyon gerçekleşmiştir. Oriinal suştan elde edilen 14 mm net aktivite zonuna karşılık 6 numaralı suşta enzim sentezinin 2 kat inhibe olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda kollajenaz enzim sentezinin UV uygulaması ile büyük ölçüde inhibe edildiğini göstermektedir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmalarında ışınlama süresi olarak 30 dakikanın mutant verimi açısında yaklaşık %66 etkili olduğu görülmektedir. Bu suşta 60 dakikalık ışınlamada hiç mutant elde edilememiştir (Şekil 4.103)



Şekil 4.103. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun UV mutasyon sonuçları

Çizelge 4.202. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun UV mutasyon sonuçları

SUŞ	Işınlama süresi dk	İnkübasyon sıcaklığı °C	İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri çapı mm	Zon çapı mm	Net zon çapı mm
SK-27 AS	-	20	40	22	27	5
SK-27 M1	30	20	40	12	26	**14**
SK-27 M2	30	20	40	15	17	**2**

Brevibacillus agri SK-27'nin suşu ile yapılan ve UV ışını kullanılarak gerçekleştirilen mutasyon çalışmasında 30 dakikalık ışınlama sonunda iki adet mutant elde edilmiştir. Diğer ışınlama sürelerinde üreme gerçekleşmemiştir. Orijininal suşta 5 mm net aktivite zonu elde edilirken 1 numaralı mutant suşta 14 mm net aktivite zonu saptanmıştır. Mutant suştaki aktivite artışı orijinal suşa göre yaklaşık 3 kat (%280) daha fazla gerçekleşmiştir. Mutant 2 suşunda ise 2 mm aktivite zonu elde edilmiştir. Orijinal suşla karşılaştırıldığında mutant 2 suşunda enzim üretiminde 1.5 kat (%150) düşüş meydana gelmiştir. UV mutasyonu orijinal suşa göre mutant 2 suşunda enzim sentezini inhibe etmiştir (Şekil 4.104).



Şekil 4.104. *Brevibacillus agri* SK-27'nin (HY-27) suşunun UV mutasyon sonuçları

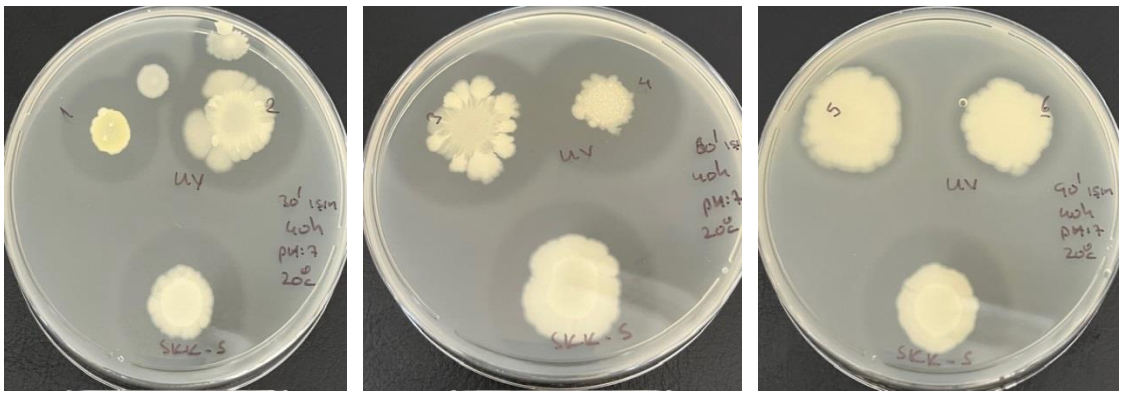
Çizelge 4.213. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun UV mutasyon sonuçları

SUŞ	Işınlama süresi dk	İnkübasyon sıcaklığı °C	İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri çapı mm	Zon çapı mm	Net zon çapı mm
SKK-5 AS	-	20	40	15	28	13
SKK-5 M1	30	20	40	10	27	17
SKK-5 M2	30	20	40	15	31	16
SKK-5 AS	-	20	40	20	30	10
SKK-5 M3	60	20	40	15	42	**27**
SKK-5 M4	60	20	40	11	35	**24**
SKK-5 AS	-	20	40	18	30	12
SKK-5 M5	90	20	40	25	27	**2**
SKK-5 M6	90	20	40	22	24	**2**

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmalarında 30 dakikalık ışınlamada 2, 60 dakikalık ışınlamada 2 ve 90 dakikalık ışınlamada 2 olmak zere toplam 6 mutant suş elde edilmiştir.

Yapılan değerlendirmelerde 60 dakikalık ışınlama sonunda elde edilen ve mutant 3 ve mutant 4 olarak adlandırılan suşlarda orijinal suşa göre enzim üretiminin ciddi şekilde indüklendiği saptanmıştır. Orijinal suşta 10 mm net aktivite zonu elde edilirken, 3 numaralı suşta 27, 4 numaralı suşta 24 mm net aktivie zonu ölçülmüştür. Enzim üretimindeki artış aktivite zon çapına göre 3 numaralı suşta 2.7 kat (%270), 4 numaralı suşta 2.4 kat (%240) gerçekleşmiştir.

Buna karşılık 90 dakikalık ışınlama sonunda elde edilen 5 ve 6 numaralı mutant suşlarda enzim üretimi orijinal suşa göre yaklaşık 6 kat inhibe olmuştur. Mutant eldesi bakımından 30, 60 ve 90 dakikalık ışınlamalar arasında her hangi bir farklılık gözlenmezken, 60 dakikalık ışınlamanın enzim üretimini artırıcı, 90 dakikalık ışınlamanın ise inhibe edici yönde etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.105).

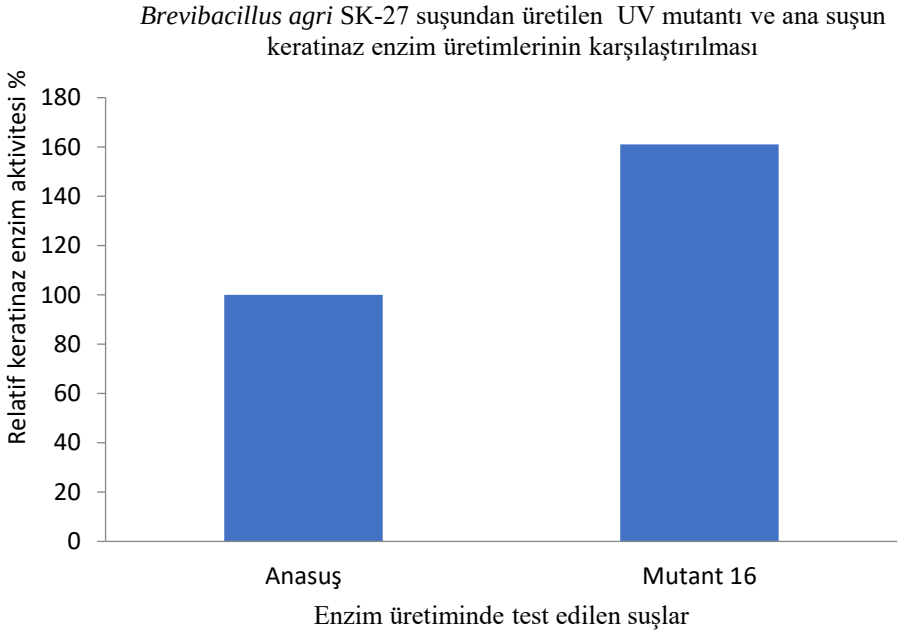


Şekil 4.105. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun UV mutasyon sonuçları

4.15. Keratinaz ve kollajenaz enzim üreticisi ana suşlar ve mutant suşların (EMS ve UV) enzim üretme yeteneklerinin karşılaştırılması

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen *Brevibacillus agri* SK-27/16 numaralı mutant suş ve ana suştan aynı koşullarda enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve feather meal kullanılarak standart aktivite analizi yapılarak enzim üretimindeki olası farklılaşma saptanmıştır.

UV mutasyonu ile elde edilen mutant suştan üretilen keratinaz enzimi ana suşa göre %61 daha fazla enzim sentezi gerçekleştirmiştir. Yapılan mutasyon uygulaması mutant suşun ana suştan %61 daha fazla enzim üretmesini sağlayacak mutasyon gerçekleştirmiştir. (Şekil 4.106)

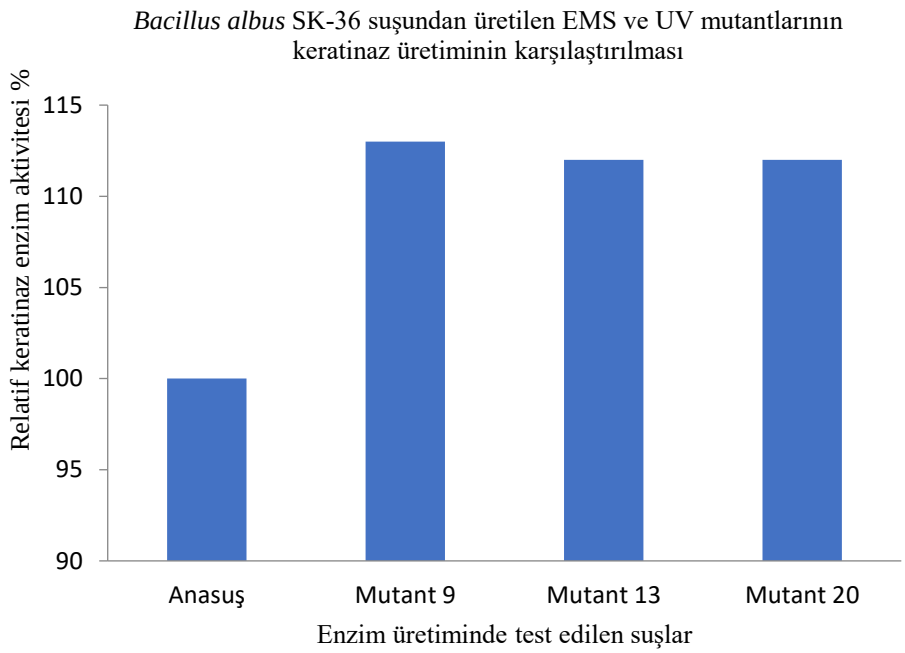


Şekil 4.106.*Brevibacillus a*gri SK-27 suşundan UV mutasyonu ile üretilen suşun enzim üretiminin ana suşla karşılaştırması

Bacillus albus SK-36 suşu ile yapılan EMS ve UV mutasyon çalışmaları sonunda izole edilen *Bacillus albus* SK-36/9, *Bacillus albus* SK-36/13 ve *Bacillus albus* SK-36/20 numaralı suşları ile ana suş aynı besiyeri kombinasyonu kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen enzim ile feather meal substratı kullanılarak standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Enzim üretimi için seçilen *Bacillus albus* SK-36/9 ve *Bacillus albus* SK-36/13 numaralı suşlar EMS, Bacillus albus SK-36/20 numaralı suş UV mutasyonu ile üretilmişlerdir.

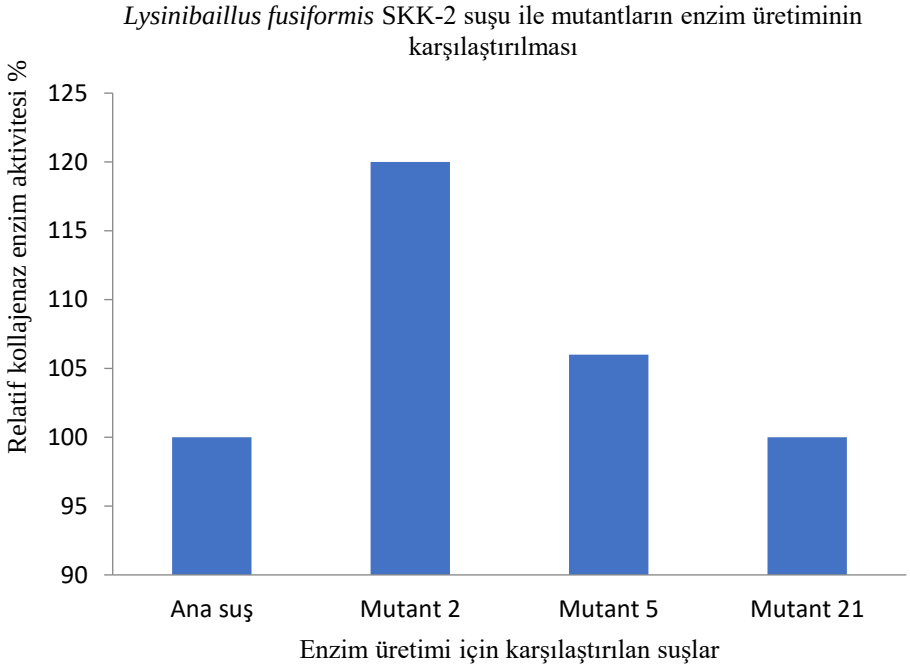
Yapılan aktivite analizleri sonunda kontrol ana suşa göre SK-36/9 numaralı suş yaklaşık %13 daha fazla enzim sentezi gerçekleştirirken SK-36/13 ve SK-36/20 numaralı suşlar aynı değerde ve yaklaşık %12 daha fazla enzim üretimi gerçekleştirmişlerdir (Şekil 4.107)



Şekil 4.107. *Bacillus albus* SK-36 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile üretilen suşlardaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan EMS ve UV mutasyonu sonunda *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/21 olarak adlandırılan üç suş elde edilmiştir.

Ana suş ve mutant suşlar aynı besiyeri kullanılark aynı koşullardan üretilip, sentezlenen enzim kısmi saflaştırma ile elde edilip aktivite analizlerinde kullanılmıştır. Ana suş ile karşılaştırıldığında *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2 suşunda yaklaşık %12 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/5 suşunda ise %6 üretim artışı gerçekleştiği bulunmuştur. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/21 suşunda ise herhangi bir artış saptanmamış, ana suşla aynı değerde enzim sentezi gerçekleşmiştir. Üretimde kullanılan mutant suşlardan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/5 numaralı suşlar EMS mutantlarıdırlar (Şekil 4.108).



Şekil 4.108.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile elde edilen enzim üretiminin ana suşla karşılaştırılması

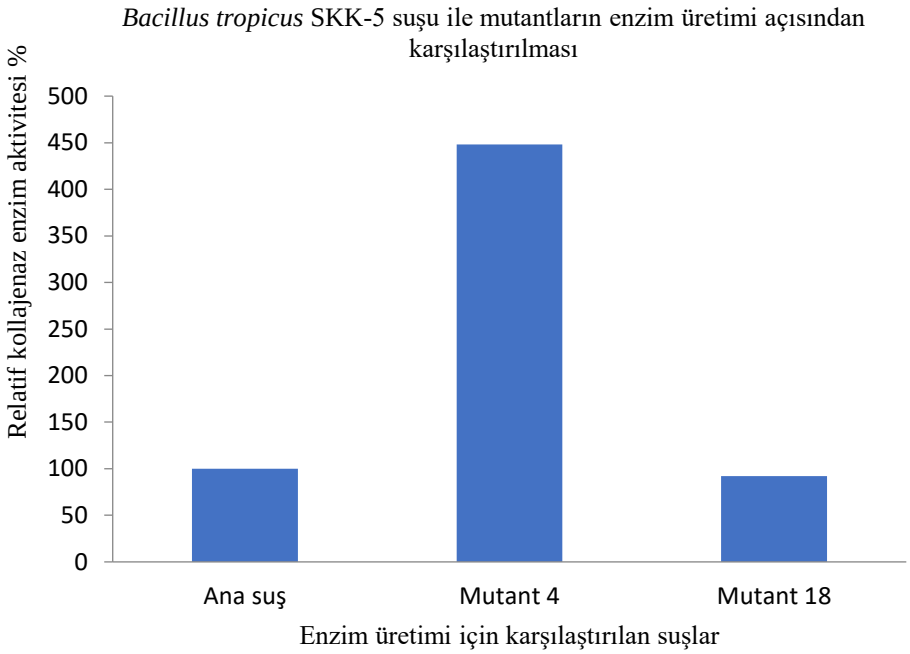
Bacillus tropicus SKK-5 suşu kullanılarak gerçekleştirilen EMS ve UV mutasyon çalışmaları sonunda *Bacillus tropicus* SKK-5/4 ve *Bacillus tropicus* SKK-5/18 olarak adlandırılan iki suş enzim üretiminde kullanılmıştır.

Mutant suşlar ve ana suş aynı içerikli besiyeri kullanılarak aynı koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiş ve üretilen enzim kısmı saflaştırma yöntemi ile kullanılabilir forma dönüştürülüp standart aktivite analizi yapılmıştır.

EMS mutasyonu sonunda elde edilen *Bacillus tropicus* SKK-5/4 suşu ana suşa göre yaklaşık %448 daha fazla enzim üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.112). Diğer mutant suş Bacillus tropicus SKK-5/18 suşunda ise ana suşa göre enzim üretiminde %8 düşme meydana gelmiştir.

EMS ve UV mutasyon çalışmaları sonunda keratinaz ve kollajenaz enzim üreticisi ana suşlardan izole edilen mutant saular arasında özellikle kollajenaz suşlarında EMS mutansyonunun daha etkili olduğu görülmektedir. UV mutasyonu açısından değerlendirdiğimizde *Brevibacillus agri* SK-27/16 mutantının ana suşa göre daha fazla miktarda enzim ürettiği görülmektedir. Buna karşılık *Bacillus albus* SK-36 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarında etkili bir artış gerçekleşmediği saptanmıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5/18 mutantında ise UV mutasyonunun enzim üretimi üzerinde negatif etki göstererek, ana suşa göre yaklaşık %8 oranında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

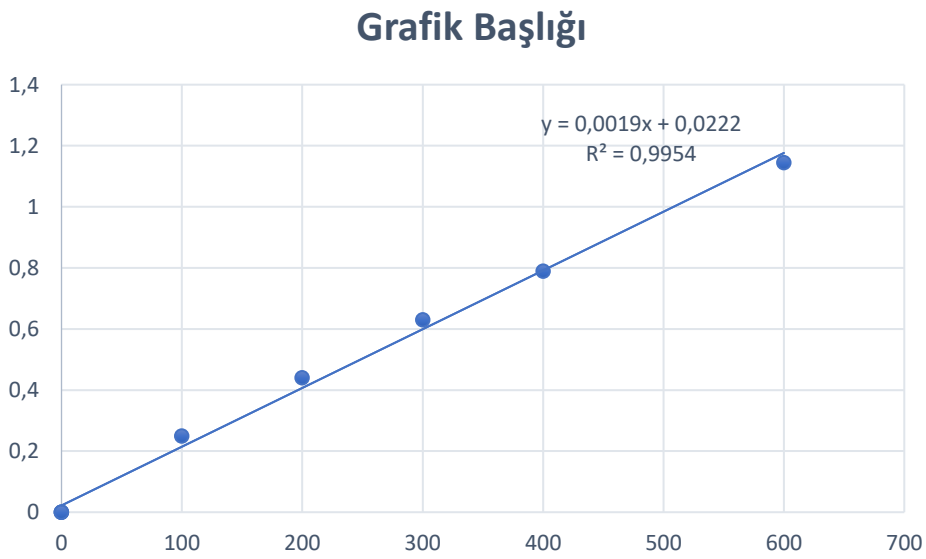
Aynı bakteri suşları kullanılarak yapılan EMS ve UV mutasyon çalışmalarında EMS mutasyonunun kollajenazda ve bir mutant hariç keratinazda daha etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.109).



Şekil 4.109. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan EMS ve UV mutasyonu ile elde edilen suşlardaki enzim üretiminin anasuşla karşılaştırması

4.16. Enzim Aktivitesinin Saptanması İçin Oluşturulan BSA Grafiği

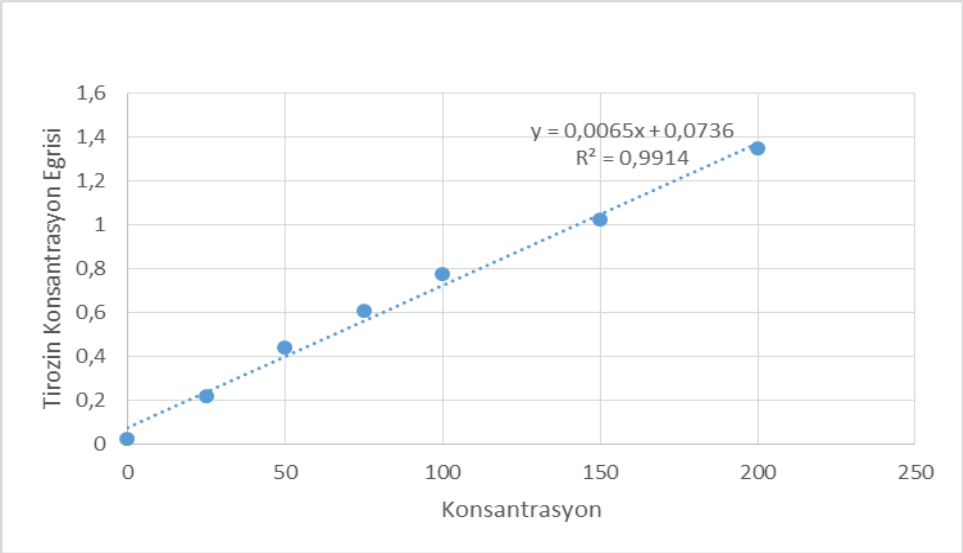
Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-600 µg/mL BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle oluşturulmuş, elde edilen formül kullanılarak analiz edilen örnekteki protein konsantrasyonu saptanmıştır (Şekil 4.110). BSA eğrisinin eğim denklemi y=0.0019X + 0.0222, regresyon katsayısı R2 =09954 bulunmuştur.



Şekil 4.110. BSA standart eğrisi

4.17. Enzim Aktivitenin Saptanması İçin Oluşturulan Trozinaz Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-200 µg/mL tirozin çözeltileri hazırlanmıştır. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle oluşturulmuş, elde edilen formül kullanılarak analiz edilen örnekteki tirozin konsantrasyonu saptanmıştır (Şekil 4.111). Tirozinaz eğrisinin denklemi y= 0,0065x + 0,0736, regresyon katsayısı R2 = 0.9914 bulunmuştur.



Şekil 4.111. Tirozinaz standart eğrisi

4.18. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzim aktivite değerleri

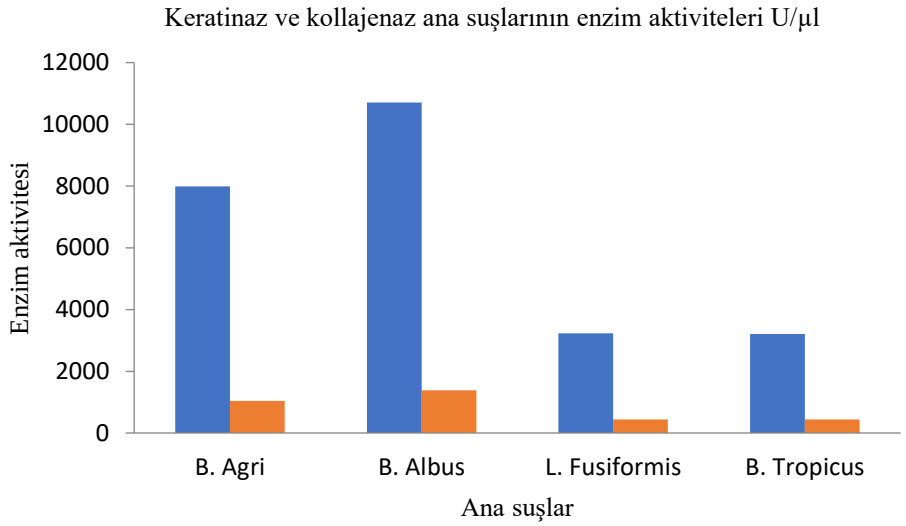
Bacillus albus SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzimLeri tavuk tüy unu ve kemik unu substratı ile reaksiyona sokularak enzim aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Keratinaz enzimLeri 100µL, kollajenaz enzimleri 50µL konsantrasyonda kullanılmışlardır.

Aktivite analizi sonunda, *Brevibacillus agri* SK-27 suşu 7992 U, *Bacillus albus* SK-36 suşu 10709 U, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu 3226 U ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu 3208 U aktivite göstermişlerdir. Kullanılan enzim miktarı mL ye dönüştürüldüğünde gerçekleşen aktivite değeri *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda 79920 U/mL, *Bacillus albus* SK-36 suşunda 107090 U/mL, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda 64520 U/mL ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda 64160 U/mL enzim aktivitesi gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan yaklaşık 27000 U/mL daha yüksek aktivite göstermiştir. Keratinaz ve kollajenaz enzimleri karşılaştırıldığında keratinaz enzimlerinin yaklaşık 3 kat daha yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmektedir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.112).

Çizelge 4.22.*Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Brevibacillus agri SK-27	Keratinaz	7992 (100µL)	1043	7.66
Bacillus albus SK-36	Keratinaz	10709 (100µL)	1388	7.71
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	Kollajenaz	3226 (50µL)	437	7.38
Bacillus tropicus SKK-5	Kollajenaz	3208 (50µL)	435	7.38



Şekil 4.112. *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından üretilen keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin aktivite değerleri

Keratinaz ve kolajenaz enzim üreticisi ana suşlar kullanılarak EMS ve UV mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her suştan izole edilen mutant suşlardan enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve enazim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

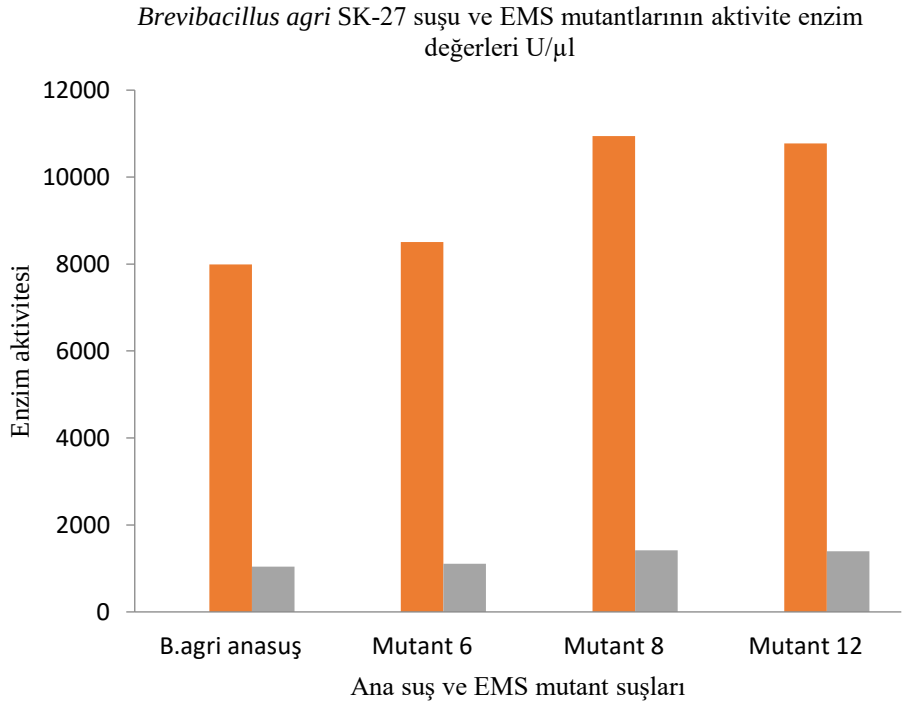
4.19. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri

Brevibacillus agri SK-27 suşundan EMS mutasyon çalışması sonunda mutant-6, mutant-8 ve mutant-12 şeklinde adlandırılan üç suş izole edilmiştir. Mutanat suşlar ve ana suşlardankullanılarak aktivite analizi yapılmıştır. İzole edilen mutant-6 suşuna ait enzim 85030 U/mL, muatnat-8 suşundan izole edilen enzim 109470 U/mL ve mutant-12 suşundan elde edilen enzim 107710 U/mL aktivite göstermiştir. Her üç mutant suşa ait enzimler ana suştan elde edilen enzimden daha yüksek aktivite göstermişlerdir.

Mutant-6 suşu 5110 U/mL, mutant-8 suşu 29500 U/mL ve mutant-12 suşu 27790 U/mL daha fazla aktivite göstermişlerdir. Mutant suşlar arasında en yüksek aktivite mutant-8 suşunda elde edilmiştir (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.113).

Çizelge 4.23.*Brevibacillus agri* SK-27 suşundan EMS mutasyonu ile izole edilen mutant organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Brevibacillus agri SK-27	Keratinaz	79920 (100µL)	1043	7.66
Mutant 6	Keratinaz	85030 (100µL)	1107	7.67
Mutant 8	Keratinaz	109470 (100µL)	1418	7.72
Mutant 12	Keratinaz	107710 (100µL)	1396	7.72



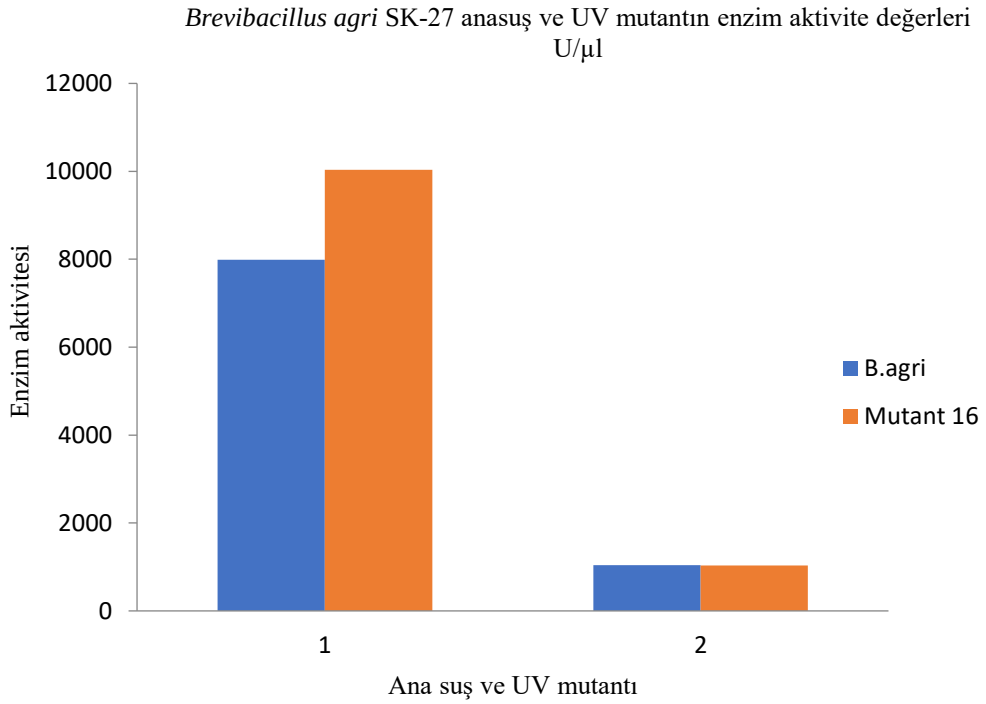
Şekil 4.113.*Brevibacillus agri* SK-27 suşundan EMS mutasyonu ile elde edilen organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

4.20. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan üretilen UV mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri

Brevibacillus agri SK-27 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmasında mutant-16 şeklinde adlandırılan bir adet suş izole edilmiştir. Mutant suştan üretilen keratinaz enzimi 100330 U/mL aktivite göstermiştir. Mutant suştan elde edilen enzim aktivitesi ana suştan 20410 U/mL daha yüksektir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.114).

Çizelge 4.24. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan UV mtasyonu ile üretilen organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Brevibacillus agri SK-27	Keratinaz	79920 (100µL)	1043	7.66
Mutant 16	Keratinaz	100330 (100µL)	1302	7.70



Şekil 4.114. *Brevibacillus agri* SK-27, suşundan UV mutasyonu ile üretilen organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

Brevibacillus agri SK-27 suşu ile gerçekleştirilen EMS ve UV mutasyon çalışması sonunda izole edilen mutant suşlardan üretilen enzimlerin aktivite değerleri karşılaştırıldığında, EMS mutasyonu ile üretilen suşlardan üretilen keratinaz enzimlerinin UV mutasyonu sonucu elde edilen suşlardan üretilen enzimden daha yüksek katalitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda EMS mutasyon çalışması daha başarılı olmuştur.

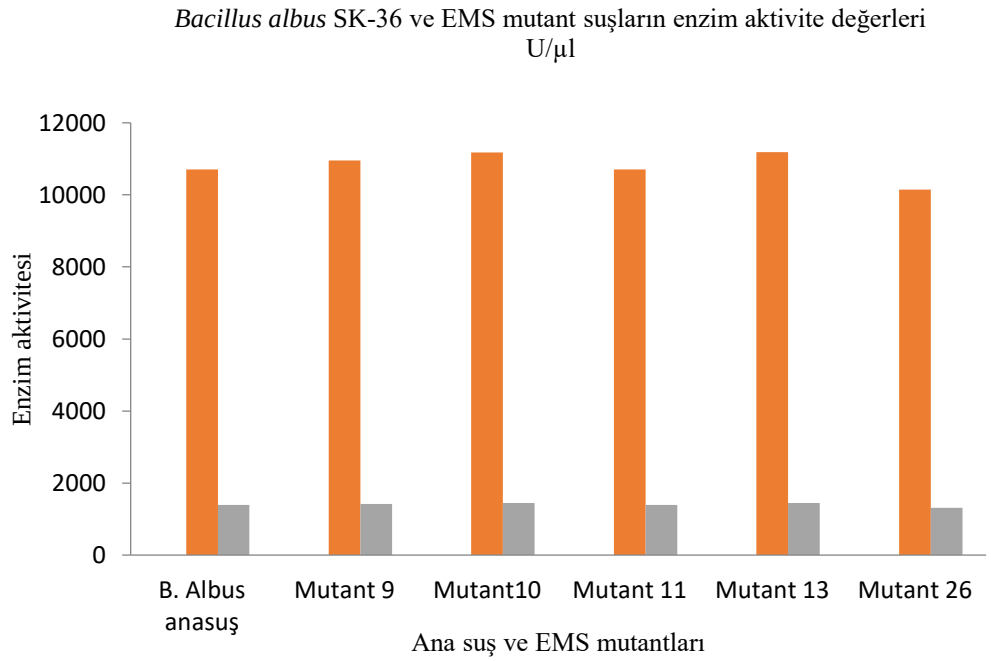
4.21. *Bacillus albus* SK-36, Suşlarından EMS Mutasyonu ile Üretilen Organizmaların Keratinaz Enzim Aktivite Değerleri

Bacillus albus SK-36 suşu kullanılarak gerçekleştirilen EMS mutasyon çalışmasında mutant-9, mutant-10, mutant-11, mutant-13 ve mutant-26 olmak üzere beş adet mutant izole edilmiştir. Aktivite analizi sonunda mutant-9 enzimi 109510 U/mL, mutant-10 enzimi 111770 U/mL, mutant-11 enzimi 107090 U/mL, mutant-13 enzimi 111890 U/mL ve mutant-26 enzimi 101430 U/mL aktivite göstermiştir.

Mutant-11 enzimi ana suştan izole edilen enzim ile aynı aktiviteyi göstermiştir. Mutantlardan mutant-10 enzimi 4680 U/mL ve mutant-13 enzimi 4800 U/mL aktivite değeri ile ana suştan daha yüksek aktivite göstermiştir. Mutant-26 suşundan üretilen enzim ana suştan üretilen enzimden 5660 U/mL daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Bu sonuç EMS uygulamasının mutant-26 suşundan üretilen enzim aktivitesini baskıladığını göstermektedir (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.114).

Çizelge 4.25.*Bacillus albus* SK-36 suşundan EMS mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Bacillus albus SK-36	Keratinaz	107090 (100µL)	1388	7.71
Mutant 9	Keratinaz	109510 (100µL)	1418	7.71
Mutant 10	Keratinaz	111770 (100µL)	1447	7.72
Mutant 11	Keratinaz	107090 (100µL)	1388	7.71
Mutant 13	Keratinaz	111890 (100µL)	1449	7.72
Mutant 26	Keratinaz	101430 (100µL)	1316	7.70



Şekil 4.115.*Bacillus albus* SK-36 suşundan EMS mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

4.22. *Bacillus albus* SK-36, Suşundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Keratinaz Enzim Aktivite Değerleri

Bacillus albus SK-36 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmalarında mutant-17, mutant-20 ve mutant-22 şeklinde adlandırılan üç adet mutant suş izole edilmiştir. Mutantlardan

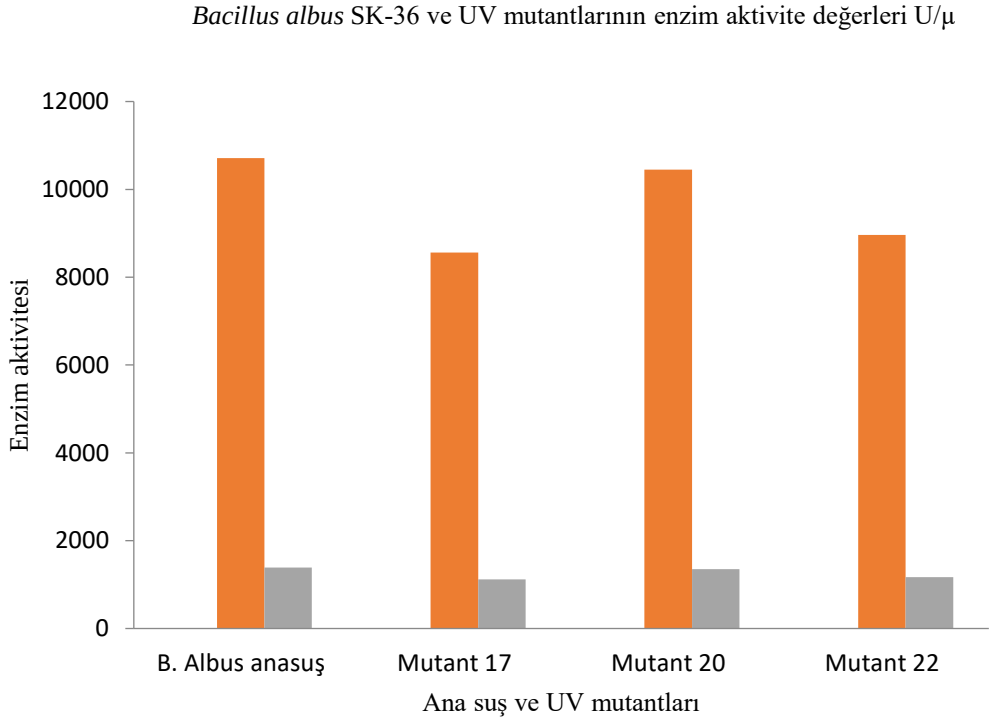
üretilen enzimlerin aktivite analizlerinde mutant-17 enzimi 85590 U/mL, mutant-20 enzimi 104480U/mL ve mutant-22 enzimi 89630 U/mL aktivite göstermişlerdir.

İzole edilen her üç mutant suşa ait enzimde aktivite açısından ana suştan elde edilen enzime göre daha düşük aktivite göstermişlerdir. Aktivite kaybı mutant-17 enziminde 21500 U/mL, mutant-20 enziminde 2610 U/mL ve mutant-22 enziminde 17460 ünite olarak gerçekleşmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşu ile gerçekleştirilen UV mutasyon uygulamasının keratinaz enzim aktivitesini önemli derecede baskıladığı saptanmıştır (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.116).

Çizelge 4.26. *Bacillus albus* SK-36, suşundan UV mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların keratinaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Bacillus albus SK-36	Keratinaz	10709 (100µL)	1388	7.71
Mutant 17	Keratinaz	8559 (100µL)	1115	7.67
Mutant 20	Keratinaz	10448 (100µL)	1355	7.71
Mutant 22	Keratinaz	8963 (100µL)	1166	7.68



Şekil 4.116. *Bacillus albus* SK-36, suşundan üretilen UV mutant organizmalarının keratinaz enzim aktivite değerleri

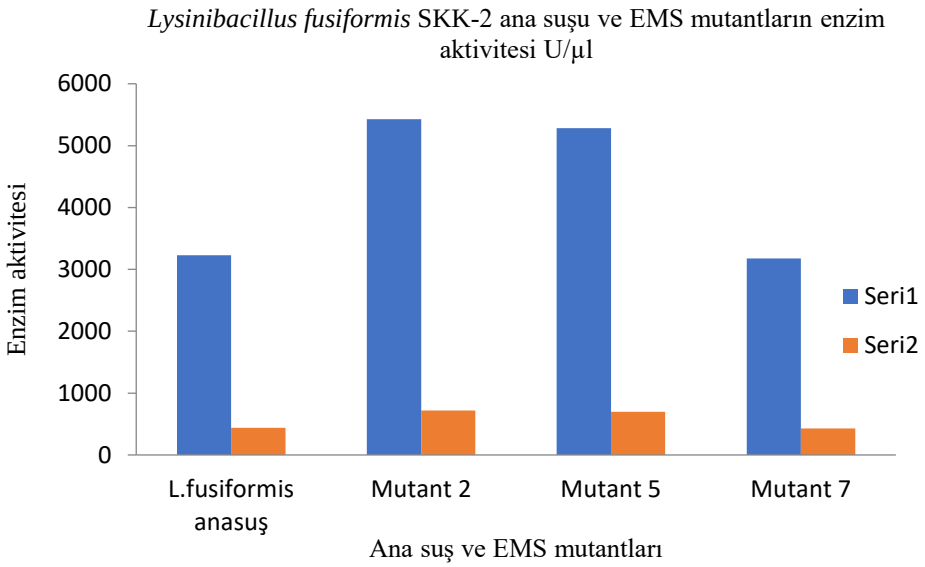
Bacillus albus SK-36 suşu ile gerçekleştirilen EMS ve UV mutasyon çalışmaları sonunda izole edilen mutantlara ait enzimler aktivite açısından karşılaştırıldığı zaman EMS mutasyon uygulamasından izole edilen suşlarda ait enzimlerin kısmi olarak aktivite artışı gösterdiği görülmektedir. Buna karşılık UV mutasyonu uygulaması sonunda izole edilen suşlardan elde edilen enzimlerde aktivitenin önemli düzeyde düşmesine neden olacak değişiklikler gerçekleştiği düşünülmektedir. UV mutasyon uygulaması enzim aktivitesini negatif etkilemiştir.

4.23. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan EMS mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen EMS mutasyon çalışması sonunda mutant-2, mutant-5 ve mutant-7 şeklinde adlandırılan üç adet mutant suş izole edilmiştir. Mutant-2 suşundan üretilen enzim 108560 U/mL, mutan-5 enzimi 105660 U/mL ve mutant-7 enzimi 63520 U/mL enzim aktivitesi göstermişleridir. EMS uygulaması mutant-2 suşunda 33040U/mL, mutant-5 suşunda ise 41140 U/mL aktivite artışına neden olurken mutant-7 suşunda 1000 U/mL aktivite düşüşü meydana gelmiştir. EMS mutasyonu mutant-2 suşundan üretilen enzimde ana suş enzimine göre yaklaşık 1.68, mutant-5 suşunda ise 1.63 kat aktivite artışı meydana getirmiştir (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.117).

Çizelge 4.27.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan EMS mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	Kollajenaz	3226 (50µL)	437	7.38
Mutant 2	Kollajenaz	5428 (50µL)	716	7.57
Mutant 5	Kollajenaz	5283 (50µL)	698	7.56
Mutant 7	Kollajenaz	3176 (50µL)	431	7.37



Şekil 4.11722.*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan EMS mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değerleri

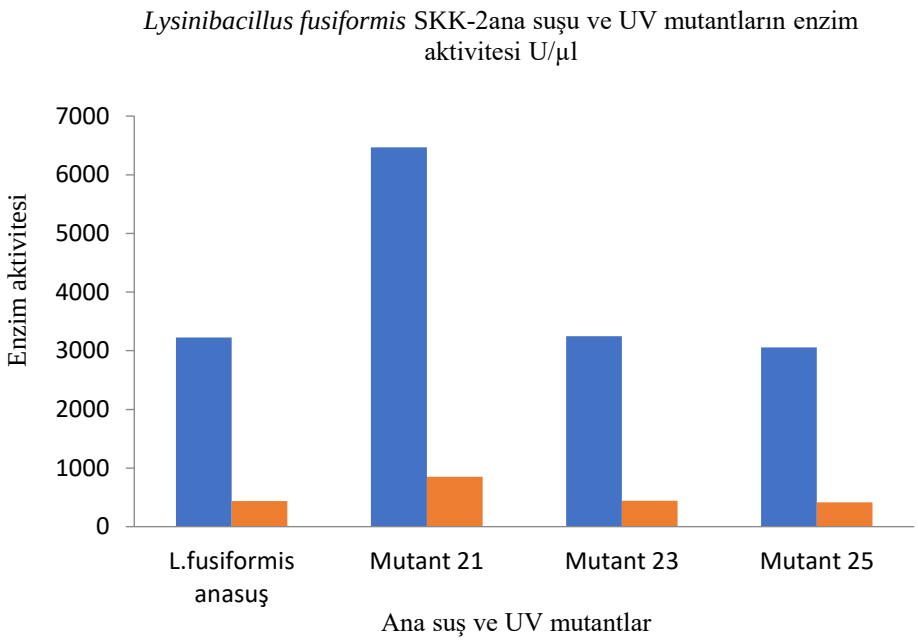
4.24. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Suşundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmasında mutant-21, mutant-23 ve mutant-25 şeklinde tanımlanan üç adet suş izole edilmiştir.

Mutant-21 suşundan üretilen enzim 129340 U/mL, mutant-23 enzimi 64940 U/mL ve mutant-25 enzimi 61160 U/mL aktivite elde edilmiştir. Ana suşa göre mutant-21 suşuna ait enzimde 64820 U/mL, mutant-23 enziminde 420 U/mL aktivite artışı gerçekleşirken, mutant-25 enziminde 3360 U/mL aktivite düşüşü gerçekleşmiştir. UV mutasyon uygulaması mutant-21 suşundan üretilen enzimde ana suştan izole edilen enzime göre 2 kat aktivite artışı meydana getirecek değişiklik yapmıştır (Çizelge 4.28 ve. Şekil 4.118).

Çizelge 4.28 .*Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan UV mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değeri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	Kollajenaz	3226 (50µL)	437	7.38
Mutant 21	Kollajenaz	6467 (50µL)	849	7.62
Mutant 23	Kollajenaz	3247 50µL)	440	7.38
Mutant 25	Kollajenaz	3058 (50µL)	416	7.35



Şekil 4.118.*Lysinibacillus fu*siformis SKK-2 suşundan UV mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değeri

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşu ile yapılan EMS ve UV mutasyon uygulamasında, UV mutasyonunun enzim aktivitesinde ciddi artışa neden olarak, daha etkili olmuştur. Bununla birlikte EMS mutasyon uygulamasınının daha fazla sayıda mutantta artışa neden olduğu görülmektedir.

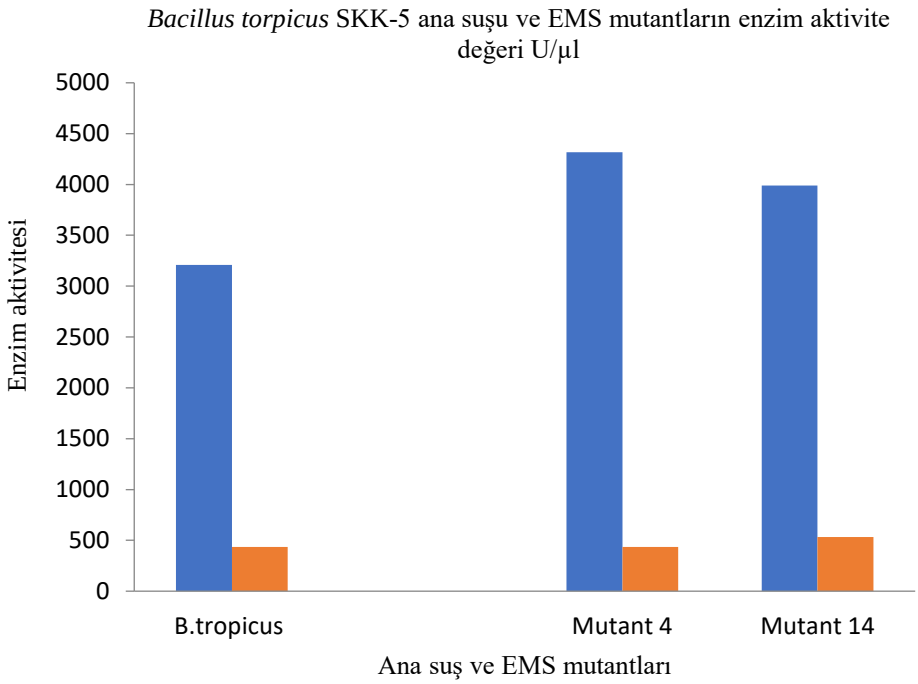
4.25. *Bacillus tropicus* SKK-5 Suşundan EMS Mutasyonu ile ÜretilenMutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile gerçekleştirilen EMS mutasyon çalışmasında mutant-4 ve mutant-14 olarak adlandırılan iki örnek izole edilmiştir. Mutant-4 suşundan izole edilen enzim 86360 U/mL, mutant-14 suşundan elde edilen enzim ise 78760 U/mL aktivite göstermiştir.

Mutant-4 suşundan izole edilen enzimde ana suş enzimine göre 22200 U/mL, mutant-14 suşundan üretilen enzimde ise 15600 U/mL aktivite artışı gerçekleşmiştir (Çizelge 4.29 ve şekil 4.119).

Çizelge 4.29.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan EMS mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değerleri

Suş	Enzim	Aktivite Ünite (Enzim miktarı)	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Bacillus tropicus SKK-5	Kollajenaz	3208 (50µL)	435	7.38
Mutant 4	Kollajenaz	4318 (50µL)	435	7.37
Mutant 14	Kollajenaz	3988 (50µL)	534	7.47



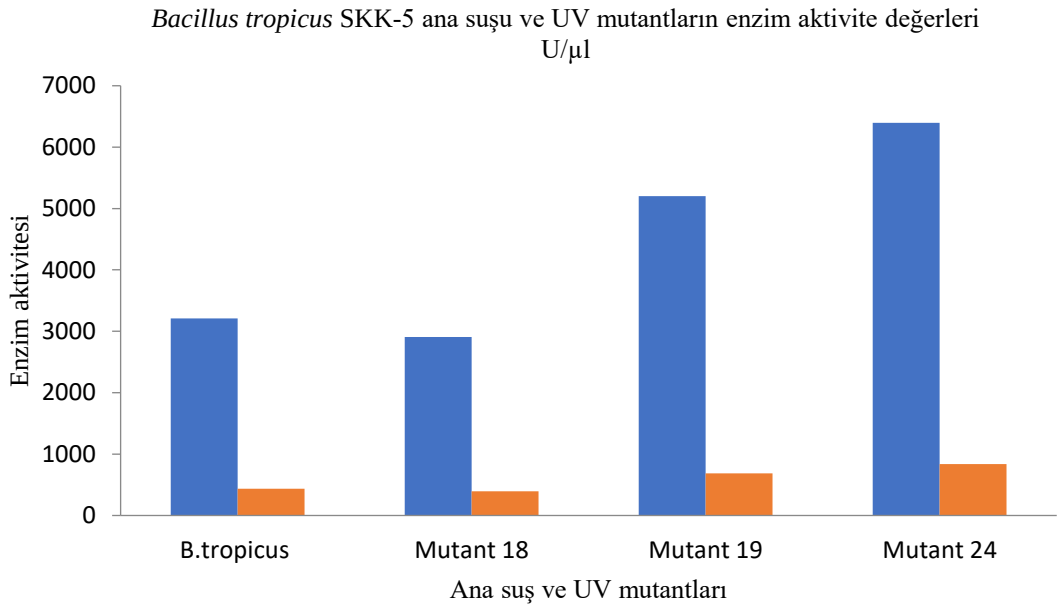
Şekil 4.119. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen EMS mutant organizmalarının kollajenaz enzim aktivite değerleri

4.26. *Bacillus tropicus* SKK-5 Sundan UV Mutasyonu ile Üretilen Mutant Organizmaların Kollajenaz Enzim Aktivite Değerleri

Bacillus tropicus SKK-5 suşu kullanılarak gerçekleştirilen UV mutasyon çalışması sonunda mutant-18, mutant-19 ve mutant-24 olarak adlandırılan üç suş izole edilmiştir. Mutant-18 suşundan üretilen enzim 58140 U/mL, mutant-19 suşundan üretilen enzimde 104080 U/mL ve mutant-24 suşundan izole edilen enzimde 127940 U/mL aktivite elde edilmiştir. Mutant-18 suşunda ana suşa göre aktivitede 6020 U/mL düşüş gerçekleşmiştir. Buna karşılık mutant-19 suşunda 39920 U/mL, mutant-24 suşunda ise 63780 U/mL aktivite artışı gerçekleşmiştir. Mutant-24 suşundaki aktivite artışı ana suştan üretilen enzime göre yaklaşık 1.99 kat daha yüksektir (Çizelge 4.30 ve Şekil 4.120).

Çizelge 4.30. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan UV mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değerleri

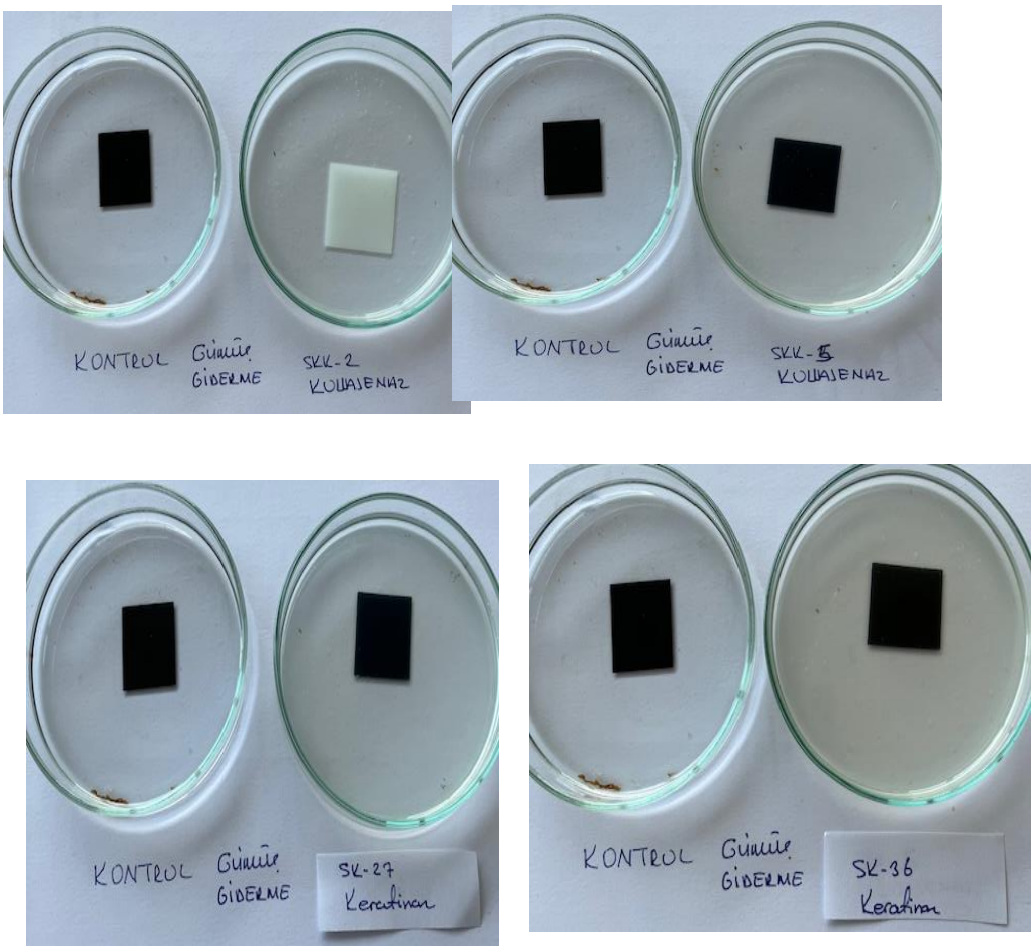
Suş	Enzim	Aktivite Ünite	Protein	Spesifik aktivite Ünite
Bacillus tropicus SKK-5	Kollajenaz	3208 (50µL)	435	7.38
Mutant 18	Kollajenaz	2907 (50µL)	396	7.33
Mutant 19	Kollajenaz	5204 (50µL)	688	7.56
Mutant 24	Kollajenaz	6397 (50µL)	840	7.61



Şekil 4.120.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan UV mutasyonu ile üretilen mutant organizmaların kollajenaz enzim aktivite değerleri

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile gerçekleştirilen EMS ve UV mutasyon çalışmaları sonunda UV mutasyonunun aktivite artışında mutant düzeyinde daha etkili olduğu saptanmıştır. İzole edilen suşların toplamında ise EMS mutasyonu enzim aktivitesinde daha etkili olmuştur.

4.27. Röntgen Filminden Gümüş Giderme Uygulaması



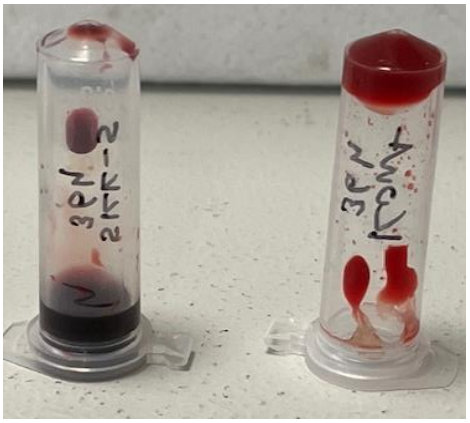
Şekil 4.121. İzole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimLerinin röntgen filminden gümüş giderim testi

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajeaz enzimi 24 saatte ve oda sıcaklığında röntgen filmindeki gümüşü tamamen gidermiş ve film beyaz bir renk almıştır. Test edilen *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan elde edilen kollajenaz enzimi ile yapılan testlerde aynı zaman diliminde röntgen filminde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

4.28. Doğal Suşlardan İzole Edilen Kollajenaz ve Keratinaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etkisi

Çalışmalarda kullanılan suşlarımızdan izole ettiğimiz kollajenaz ve keratinaz eznimLeri kan pıhtısını yaklaşık 36 saatte tamamen sıvılaştırmıştır. Özellikle *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Bacillus albus* SK-36 suşlarından üretilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin kullanıldığı tüplerde pıhtının sıvılaşması soncu tüplerdeki pıhtı tamamen sıvılaşmıştır. Kontrol olarak kullanılan tüpte ise pıhtıda farklılaşma meydana gelmemiştir (Şekil 4.122).

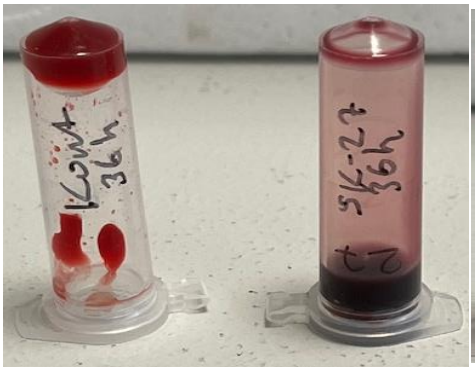
Bacillus spp. tarafından üretilen fibrinolitik enzimin, fibrin kan pıhtılarını parçalamak için benzersiz bir özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Nattokinase gibi fibrinolitik enzimlerin, terapötik ajanlar ve fonksiyonel gıda formülasyonu olarak ticari uygulamaları vardır. *Bacillus subtilis* natto'nun soya fasulyesi içeren bir ortamda fibrinolitik enzimLer ürettiği bilinmektedir. "Nattokinase" olarak bilinen bu kan pıhtısı çözücü enzim, fibrinolitik aktiviteye sahiptir (Yogesh ve Halami., 2015)



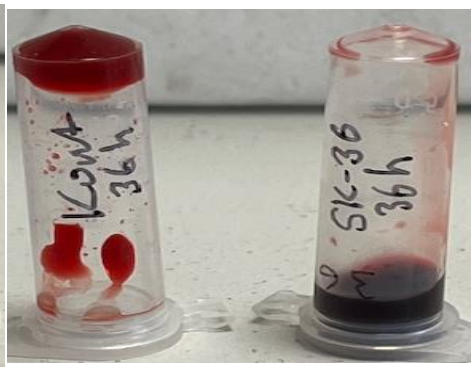
A



B



C



D

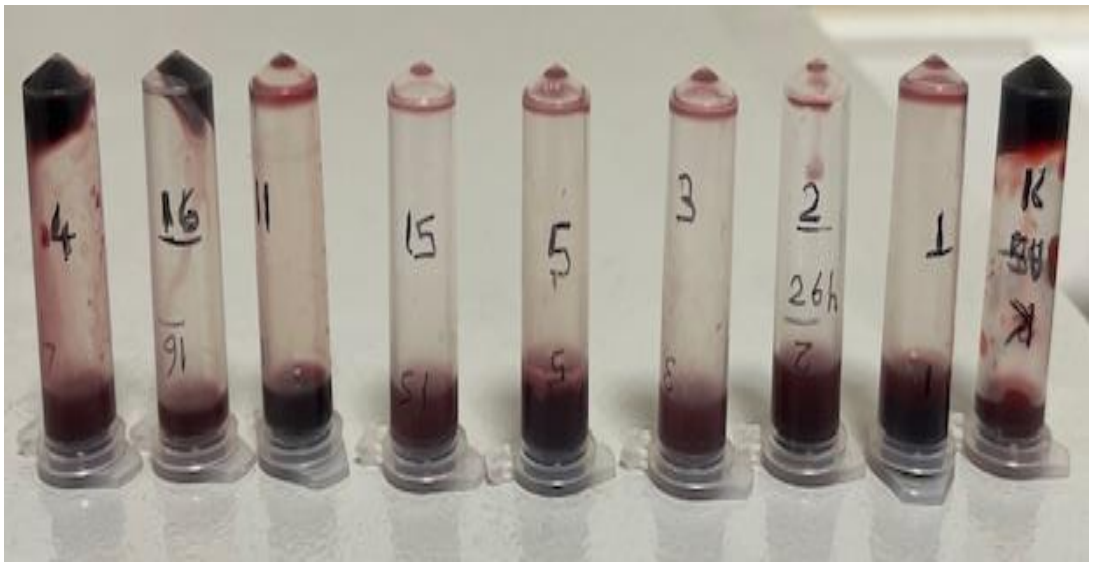
Şekil. 4.122.*Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarından izole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin pıhtı sıvılaştırma sonuçları

4.29. EMS ve UV Mutasyonu İle Oluşturulan Suşlar ve Doğal Suşlardan Üretilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Fibrinolitik Etkisinin Karşılaştırılması

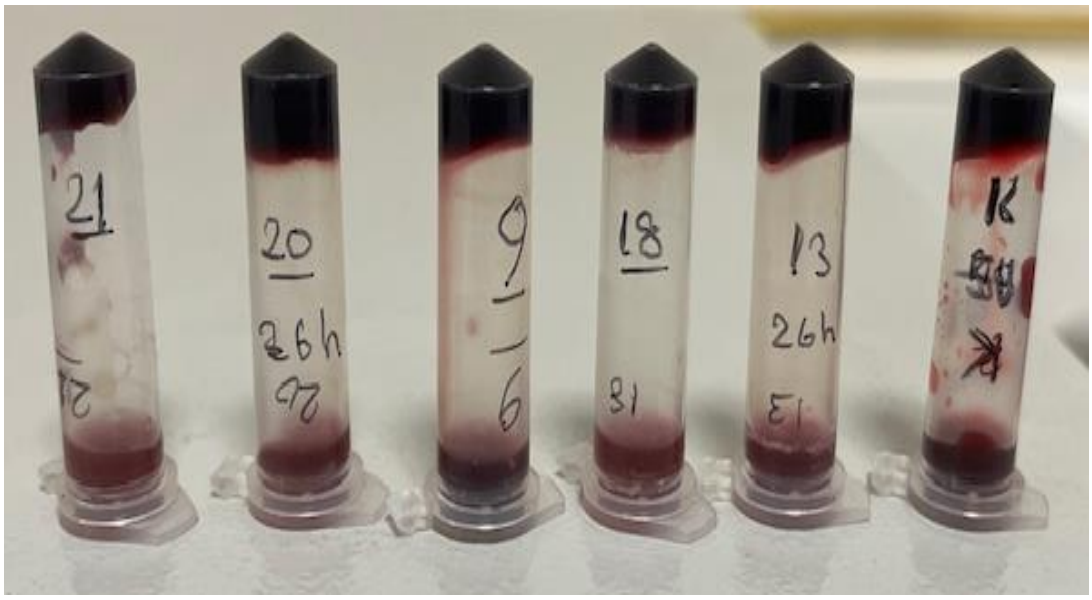
Bacillus albus SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşları ile EMS ve UV mutasyonu sonucu oluşturulan suşlardan üretilen keratinolitik ve kollajenolitik enzimler kullanılarak eppendorf tüplerinde pıhtılaşmış kanlar kullanılarak enzimlerin fibrinolitik aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla 500µL kan örneği bulunan tüpler 100µL ana suş ve mutant suşlardan üretilen keratinolitik ve kollajenolitik enzim eklenerek oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Belirli aralıklarla yapılan kontroller sonunda *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2, *Bacillus tropicus* SKK-5, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus albus* SK-36 suşlarından üretilen enzimLer ile kan pıhtısının 26'ıncı saatte %100 çözüldüğü saptanmıştır. Başlangıçta tüplerin dip kısmında toplanan kan, sıvılaşma ile birlikte tüpün dip kısmından ayrılmış ve akışkan bir sıvı şeklinde ters çevrilmiş tüpün kapak bölgesinde toplanmıştır. Bununla birlikte *Bacillus tropicus* SKK-5/4 ve *Brevibacillus agri* SK-27/16 numaralı suşlardan izole edilen enzimLerde yaklaşık %80 in üzerinde sıvılaşma saptanmıştır.

Analiz edilen mutant suşlardan 9, 13, 18, 20 ve 21 numaralardan izole edilen enzimLer ile 26 saatlik inkübasyon süresi sonunda pıhtı büyük ölçüde varlığını sürdürmüştür. Kan pıhtısını tamamen sıvılaştıran enzim örneklerinden *Brevibacillus agri* SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5, *Bacillus albus* SK-36 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ana suşlarından üretilen enzimLerdir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2, *Bacillus tropicus* SKK-5/4 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/5 numaralı örnekler EMS mutasyonu *Brevibacillus agri* SK-27/16 numaralı suş ise UV mutasyonu sonucunda izole edilen suşlardır (Şekil 4.123 ve 4.124).



Şekil 4.123. Kan pıhtısını 26 saatte oda sıcaklığında sıvılaştıran ana ve mutant suşların fibrinolitik etkisi



Şekil 4.124. Kan pıhtısında sıvılaştırma etkisi göstermeyen suşların fibrinolitik etkisi

4.30. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, *Bacillus tropicus* SKK-5, *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 Suşlarından Üretilen Kollajenaz ve Keratinaz Enzimerinin Yıkama Performansı

Kan ile kirletilmiş beyaz kumaştan kan lekesinin giderimi için deterjan olarak omo kullanılmıştır. Denemede çeşme suyu, doğal (denatüre edilmemiş) deterjan, 15 dakika otoklavda denatüre edilmiş deterjan, enzim ve denatüre edilmiş deterjan ile enzimin birlikte kullanıldığı leke giderme çalışması yürütülmüştür.

Denemelerde %1 doğal deterjan, %1 denatüre deterjan, %1enzim ve %0.5 denatüre deterjan+0.5 enzim karışımLarı hazırlanmıştır. Kan ile lekelendirilmiş 4x4 boyutlarındaki kumaş parçaları 48 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan kumaş parçaları, hazırlanan leke giderici karışımLarının bulunduğu 100 mL'lik şişelere konularak 20°C de 60 dakika süreyle 150 rpm hızda soğutmalı çalkalamalı inkübatör kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kumaşlar çeşme suyunda durulandıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir.

*Lysinibacillus fusi*formis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi ve deterjanın yıkama performansları kontrol ile karşılaştırıldığında, enzimin kan lekesini giderme performansının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Kontrol kumaş referans alındığında, çeşme suyu ve doğal deterjanın yüzeydeki lekeyi önemli miktarda giderdiği fakat dokuya nüfus etmiş yapıların varlığını yaklaşık yarı ya yakın düzeyde sürdürdüğü görülmektedir. Bu durumun yüzeydeki yapıların çalkalama ile uzaklaşması sonucu ortaya çıktığı değerlendirilmiştir. Denatüre edilmiş deterjanın, çeşme suyu ve doğal deterjana göre dokuya nüfuz etmiş kirleticileri daha iyi çıkardığı ve daha yüksek performans sergilediği izlenmiştir. (Şekil 4.125).



Şekil 4.125. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Kollajenaz enziminin kan lekesini giderme bulguları

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kan lekesi ve dokuya nüfuz etmiş yapıları çok başarılı düzeyde giderdiği görülmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında denatüre deterjan ve enzim karışımının performansını enzimin tek başına gösterdiği etkiye yakın olduğu bulunmuştur. Denatüre deterjan ve enzim+deterjan karışımının yıkama performanslarının birbirine yakın olduğu görülmektedir. Doğal deterjan ve çeşme suyu yıkamalarında yüzeydeki kirletici görüntünün kumaştan giderildiği fakat dokuya nüfuz eden yapıların ciddi şekilde varlığını sürdürdüğü belirlenmiştir. Enzimin tek başına deterjandan+enzim (%0.5 deterjan+0.5 enzim) karışımından daha yüksek yıkama performansı gösterdiği saptanmıştır. Dogal deterjan uygulamasından elde edilen görüntü enzimin deterjana göre oldukça güçlü performansa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Deterjan+enzim karışımının kullanıldı uygulamada, enzim konsantrasyonunun enzimin tek başına kullanıldığı uygulamaya göre yarıya yakın daha düşük olması, kumaş dokusunda görünür düzeyde leke kalması ile de görülmektedir. *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimi kan lekesini giderme de çok başarılı bir performans sergilemiştir (Şekil 4.126).



Şekil 4.126.*Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin kan lekesini giderme bulguları

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme performansının görsel kontrolde çok yüksek olduğu bulunmuştur. Enzim+deterjan karışımı, enzimin tek başına kullanıldığı uygulamaya en yakın performansı göstermiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi kollajenaz enzimine göre daha güçlü yıkama performansı ortaya koymuştur (Şekil 4.127).

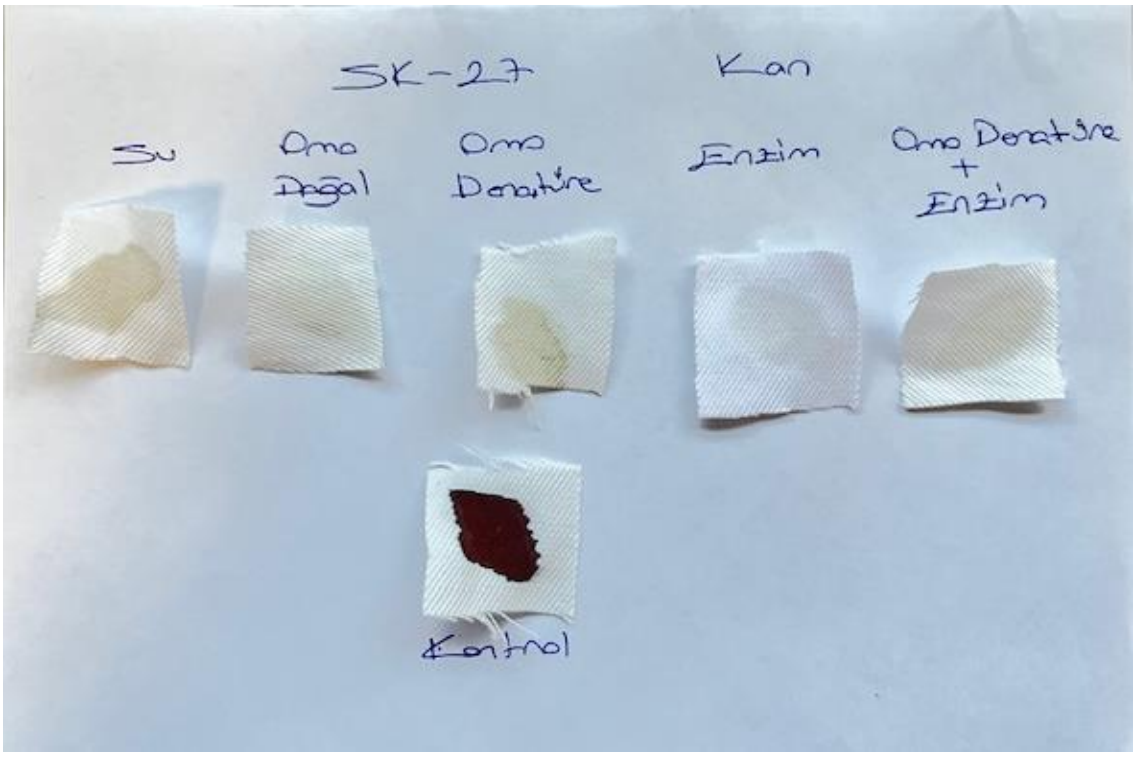


Şekil 4.127. *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme bulguları

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme çalışmasında en güçlü performansı enzimin tek başına kullanıldığı uygulamada elde edilmiştir. Bununla birlikte performansın diğer enzimlere göre daha düşük olduğu ve kan lekesinin daha zayıf düzeyde giderdiği görülmektedir. Denatüre ve doğal deterjanla yapılan uygulamada, yıkama performansının enzim kadar güçlü olmadığı saptanmıştır. Sonuçlar literatür ile desteklenmektedir (Baweja ve ark. 2016) .

Genel olarak değerlendirildiğinde *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarından üretilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerine göre daha yüksek yıkama performansı gösterdikleri saptanmıştır. En düşük yıkama performansının *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminde gerçekleştiği saptanmıştır.

Literatürde, yalnızca ham enzim kullanılarak elde edilen kan ve çikolata lekesi giderme seviyelerinin, deterjan ile elde edilenlerden daha etkili olduğunu ortaya çıkardı (Goda ve ark., 2020).

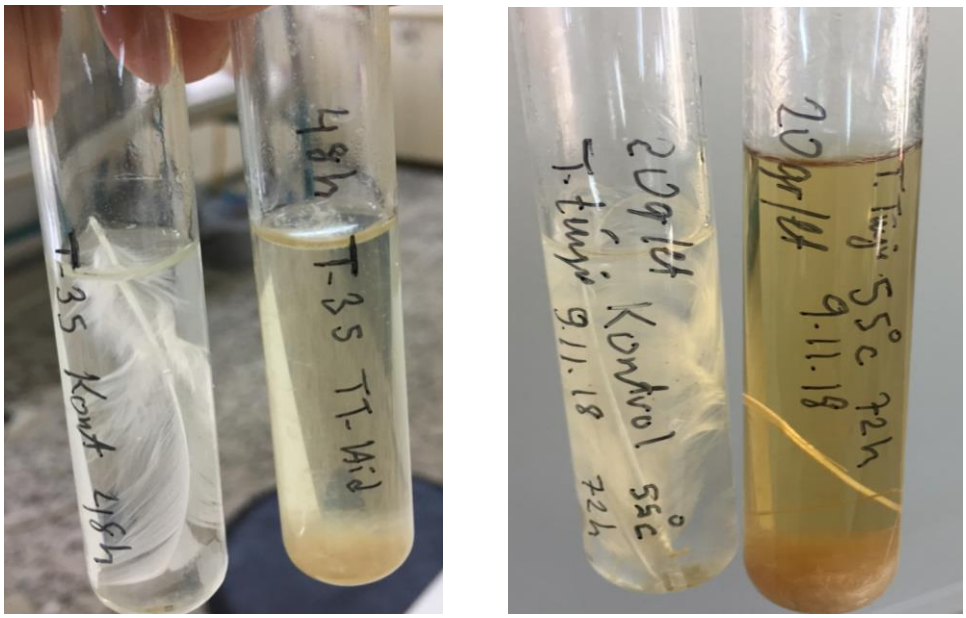


Şekil 4.128.*Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme bulguları

4.31. Ham tavuk tüyünün enzimatik hidroliz uygulamaları

Ham tavuk tüyü laboratuarda yıkandıktan sonra enzimin optimum etki gösterdiği tampon çözelti bulunan tüp ve şişelere farklı miktarlarda eklenmiştir. Tüplerde hazırlanan tampona 1 mL enzim ve 9 mL tampondan oluşan karışım ilave edilmiş ve 20 g/L miktarda tavuk tüyü konularak inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.128).

Şişelerde yapılan uygulamada ise 50 g/L, 100 g/L, 150 g/Lve 300 g/L miktarlarda tavuk tüyü enzimin optimum aktivite gösterdiği tampon içerisinde hazırlanmış ve 50 g/L tavuk tüylü karışımına 10 mL, 100 g/L tavuk tüylü karışımına 10 mL, 150 g/L tavuk tüylü karışımına 20 mL ve 300 g/L tavuk tüyü içeren karışımına 25 mL keratinaz enzimi eklenerek inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.129).



A **B**

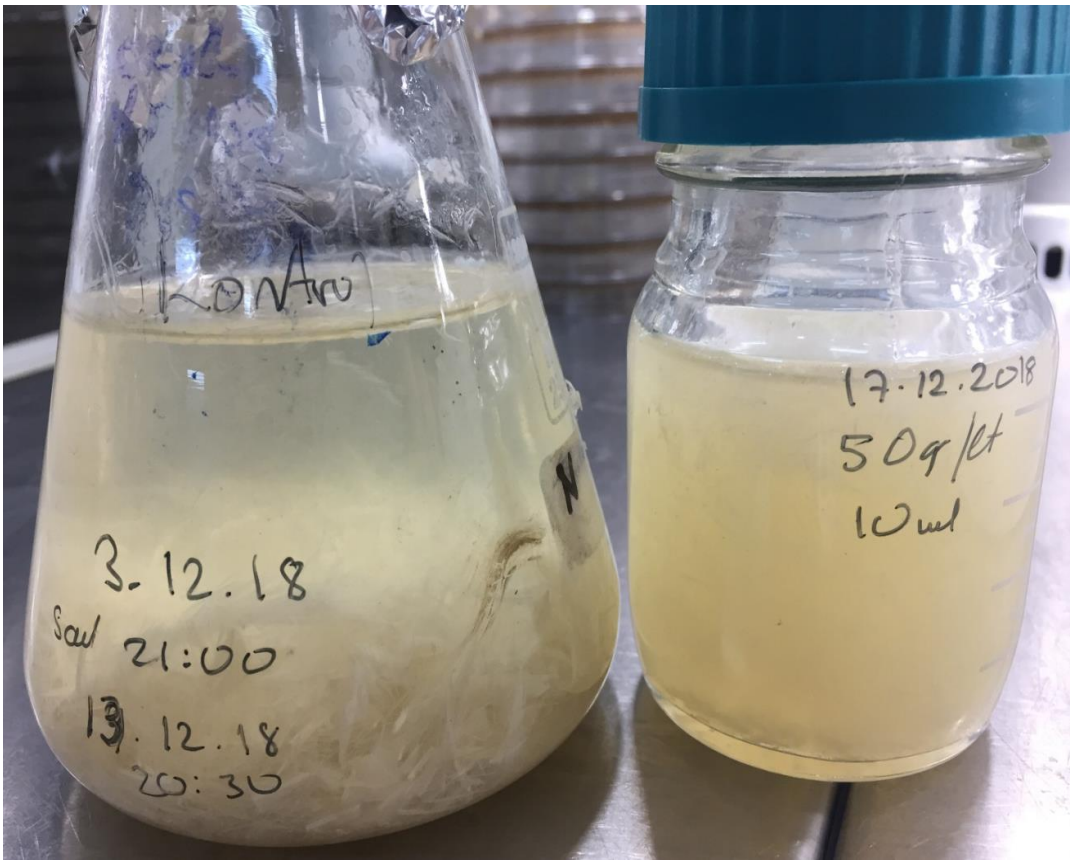
Şekil 4.129. Cold (T35) ve Termofil TT suşların ham tavuk tüyünü hidroliz çalışması

Tüplerde yapılan uygulamada T-35 suşu (soğukta aktif enzim) kontrole göre 48 saat içinde tüy ve ortada bulunan sert keratin yapısını tamamen hidrolize ederek amino aside dönüştürmüştür (A). T-35 olarak tüpte tüy eritme suşu olarak kullanılan örnek *Bacillus albus* SK-36 olarak tanımLanmış, enzim üretimi, karakterizasyonu ve uygulama çalışmalarında kullanılmıştır.

Tavuk tüyü 55°C olarak adlandırılan ve termofil özellikteki suş, 20 g/Ltavuk tüyünü 55°C de 72 saatlik inkübasyon sonunda tamamen amino aside dönüştürmüştür (B). Bu suş *Brevibacillus agri* SK-27 olarak tanımlanmış, enzim ile gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılmıştır. Literatürde *Bacillus tropicus* LS 27'nin bakteriyel proteazı, 72 saatlik inkübasyondan sonra küçük yapıları (tüyler ve tüycükler) tamamen hidrolize edebildi, ancak rachis ve şaftlar gibi sert yapılar tamamen hidrolize edilmediği belirtilmiştir (Liya, and Umesh, 2023). İzole ettiğimiz keratinaz enzim sonuçları literatür ile uyumLudur.

Çalışmamızda keratinaz enzim üreticisi olarak seçtiğimiz ve enzimatik karakterizasyon çalışmalarında kullandığımız Bacillus albus SK-36 ve Brevibacillus agri SK-27 bakteri suşlarından üretilen enzimler 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Caf, Y. (2015).ın verilerinden çok daha başarılıdır.

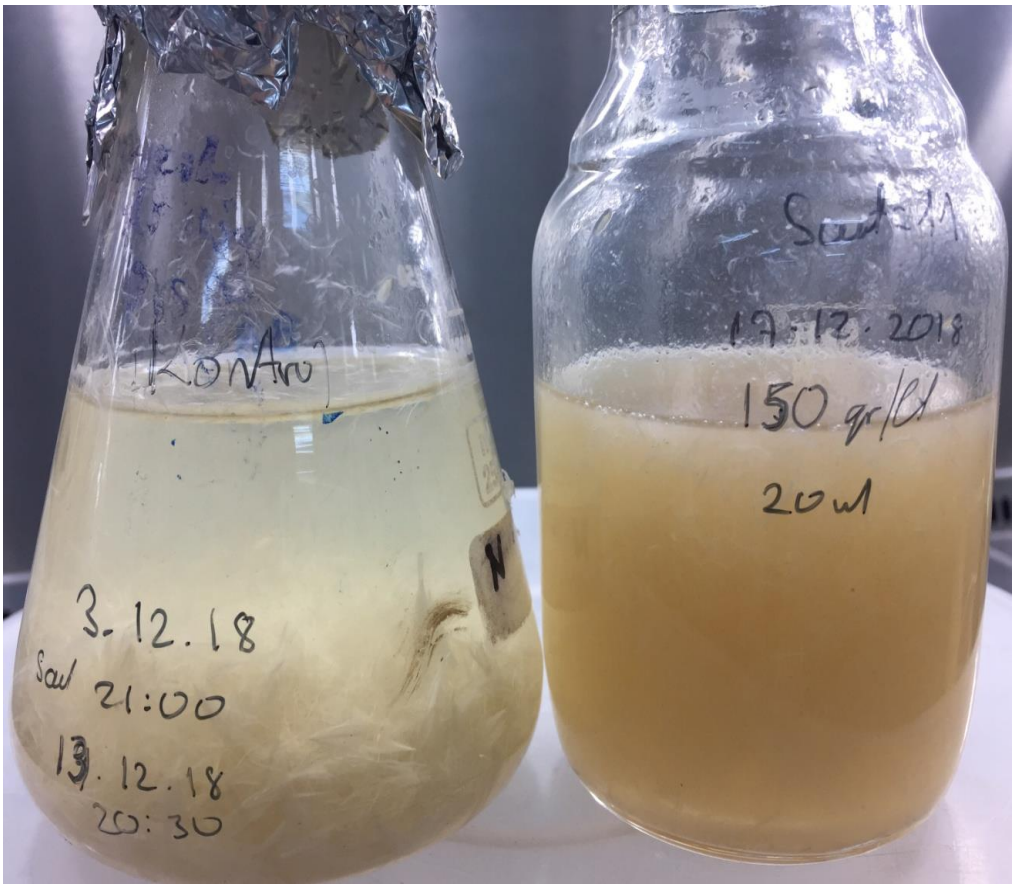
Şişelerde uygulamalarında daha büyük hacımlı ve daha fazla miktarda tavuk tüyü kullanılarak hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Hidroliz denemelerinde ham tavuk tüyü yıkama ve kurutma ön işleminden sonra bütün olarak şişelere konulup (Şişelerin üzerinde yazılan miktarda), pH'sı 9.0 a ayarlanmış steril distile su eklendikten sonra, uygun miktarda enzim (şişelerin üzerinde yazılan miktarda) eklenerek oda sıcaklığında 5 gün inkübasyona bırakılarak, hidroliz gerçekleştirilmiştir.



A (50 g/L ham tavuk tüyü ve 10 mL enzim kullanılan uygulama)



B (100 g/L ham tavuk tüyü ve 10 mL enzim kullanılan uygulama)



C (150 g/L ham tavuk tüyü ve 20 mL enzim kullanılan uygulama)



D (300 g/L tavuk tüyü ve 20 mL enzim kullanılan uygulama)

Şekil 4.130. Ham tavuk tüyünün şişelerdeki hidroliz denemeleri

Uygulamalarda ortalama 5 gün içerisinde kontrole göre kullanılan bütün tavuk tüyleri enzim tarafından hidrolize edilerek tamamen amino asitlere dönüştürmüşlerdir. Bacillus paralicheniformis suşundan üretilen keratinaz enziminin tavuk tüyünü dördüncü günde tamamen hidrole ettiği bulunmuştur (Aktayeva ve Khassenov., 2024).

4.32. *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 Suşlarından Üretilen Keratinaz Enzimi İle Tavuk Tüy Ununun (Feather meal) Hidroliz Sonuçları

Tavuk tüy ununun *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarından üretilen keratinaz enzimLeri kullanılarak hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Tavuk tüy unu, enzim ve distile sudan oluşan kombinasyon hidroliz süresi sonunda whatman filtre kağıdından süzülmüş, 60°C de kurutulmuş ve tartılarak kalan tüy unu miktarı bulunmuştur. Hidroliz öncesi kullanılan tüy ununda hidroliz sonucu kalan tüy unu çıkartılarak net tüy unu bulunmuştur. Başlangıç değeri 100 olarak kabul edilip kalan tüy unu ile oranlanarak % hidroliz değeri bulunmuştur (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. Doğal tavuk tüyü ununun hidroliz denemeleri

Suş	T.tüyü+Enz+Su	Kalan tüy unu miktarı (gr)	Hidroliz %	İnk. süresi
Bacillus albus SK-36	10 gr+10 mL+90 mL	6.9	31	72 saat
Bacillus albus SK-36	10 gr+5 mL+95 mL	7.27	27.3	72 saat
Bacillus albus SK-36	20 gr+10 mL+90 mL	17.73	11,35	72 saat
Brevibacillus agri SK-27	10 gr+10 mL+90 mL	6.30	37	72 saat
Brevibacillus agri SK-27	10 gr+5 mL+95 mL	6.91	30.9	72 saat
Brevibacillus agri SK-27	20 gr+10 mL+90 mL	14.12	29.4	72 saat

Tavuk tüy unu ile yapılan hidroliz denemelerinde en yüksek hidroliz değerine *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi kullanılarak oluşturulan 10 gr tavuk tüy unu, 10 mL enzim ve 90 mL distile su kullanıldığında ulaşılmıştır. Hidroliz oranı %37 olarak gerçekleşmiştir.

Brevibacillus SK-27 suşundan elde edilen keratinaz enziminin kullanıldığı 10 gr tavuk tüy unu, 5 mL enzim ve 95 mL distile su kombinasyonundaki hidroliz çalışması yer almaktadır. Hidroliz oranı yaklaşık %31 bulunmuştur.

.Bu suşu sırası ile *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun 20 gr tavuk tüy unu, 10 mL enzim ve 90 mL distile su karışımının yaklaşık %29.4 hidroliz değeri ile izlediği bulunmuştur. Genel olarak *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi ortalama %32.43 hidroliz gerçekleştirmiştir.

Hidroliz denemelerinde ikinci en yüksek hidroliz değeri *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi kullanılarak oluşturulan 10 gr tavuk tüy unu, 10 mL enzim ve 90 mL distile su kombinasyonunda elde edilmiştir. Hidroliz değeri %31 bulunmuştur.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi ile toplamda %23.21 hidroliz gerçekleştiği saptanmıştır. Özellikle 20 gr tavuk tüy unu, 10 mL enzim ve 90 mL su kombinasyonunda hidrolizde diğer kombinayonlara göre ciddi bir düşüş gerçekleşmiş ve %11.35 hidroliz değeri elde edilmiştir.

4.33. Kemik Unununun Hidroliz Denemeleri

Kemik unu ile *Bacillus tropicus SKK-5 ve Lysinibacillus fusiformis SKK-2* suşlarından üretilen kollajenaz enzimLeri kullanılarak hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Hidroliz çalışması her iki suşa ait enzimLerin substrat konsantrasyonları ile yapılan çalışmada, ortalama %633 ile en yüksek aktivitenin elde edildiği 24 saat ve 30°C de gerçekleştirilmiştir. Kemik unu, enzim ve distile sudan oluşan kombinasyon hidroliz süresi sonunda whatman filtre kağıdından süzülmüş, 60°C de kurutulmuş ve tartılarak kalan kemik unu miktarı bulunmuştur. Hidroliz öncesi kullanılan kemik unundan hidroliz sonucu kalan kemik unu çıkartılarak hidrolize olmayan miktar bulunmuştur. Başlangıç değeri 100 olarak kabul edilip kurutma işleminden sonra kalan tüy unu ile oranlanarak % hidroliz değeri bulunmuştur (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.32. Kemik ununun hidroliz denemeleri

Suş	Kemik unu + Enz +Su	Kalan kemik unu miktarı (gr)	Hidroliz %	İnk. süresi
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	40 gr+10 mL+90 mL	19.87	50.33	24 saat
Bacillus tropicus SKK-5	40 gr+10 mL+90 mL	13.71	65.72	24 saat

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole eddilen kollajenaz enzimi kullanılarak, 40 gr kemik unu + 10 mL kollajenaz enzimi ve 90 mL distile su karışımından oluşan Tip-I kollajenin hidroliz çalışmalarında 72 saatlik inkübasyon sonunda yaklaşık %50.33 hidroliz gerçekelştiği saptanmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajinaz enzimi kullanılarak 40 gr kemik unu + 10 mL kollajenaz enzimi ve 90 mL distile su karışımı ile gerçekleştirilen Tip-I kollajen hidroliz çalışmalarında yaklaşık %65.72 hidroliz gerçekleştiği bulunmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi *Lysinibcillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen enzime göre 40 gr Tip-I kollajeni yaklaşık %16 daha fazla hidrolize ederek amino aside dönüştürmüş.

4.34. *Bacillus albus* SK-36, *Bacillus atropus* SKK-5, *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antioksidan Etkisi

Analiz sonucunda *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşuna ait kollajenaz enzimi %44.59, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşuna ait kollajenaz enzimi %37.18, *Bacillus albus* SK-36 suşuna ait keratinaz enzimi %49,98 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşuna ait keratinaz enzimi %58,38 antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır. Kontrol örneğin antioksidan değeri ile izole edilen suşlara ait keratinaz ve kollajenaz enzimleri karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan aktivite *Brevibacillus agri* SK-27'den (ortalama %58.38) izole edilen keratinaz enziminde saptanmıştır (Keçeli ve Harp, 2014). İzole edilen suşlar içerisinde en düşük antioksidan etkisi *Bacillus atrophus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminde elde edilmiştir (Çizelge 4.33).

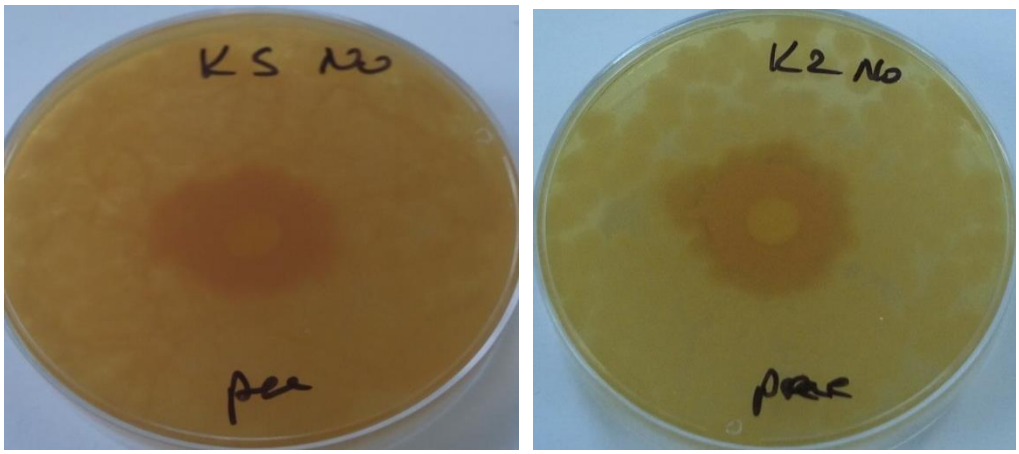
Çizelge 4.33. Keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin antioksidan analizi

Örnek	**Absr.**	**Antioksidan akt.**	**Ortalama (%)**
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	**0.8783**	**43.23**	**44.59**
Lysinibacillus fusiformis SKK-2	**0.836**	**45.96**	
Bacillus atropus SKK-5	**0.9771**	**36.84**	**37.18**
Bacillus atropus SKK-5	**0.9666**	**37.52**	
Brevibacillus agri SK-27	**0.6342**	**59.00**	**58.38**
Brevibacillus agri SK-27	**0.6534**	**57.76**	
Bacillus albus SK-36	**0.7628**	**50.69**	**49.98**
Bacillus albus SK-36	**0.7848**	**49.27**	**49.98**
Kontrol			**64.2**

4.35. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Brevibacillus* SK-27 Suşlarından İzole Edilen Keratinaz ve Kollajenaz Enzimlerinin Antibakteriyel Aktivite Bulguları

İzole edilen suşlardan üretilen kollajenaz ve keratinaz enzimleri alkol presipitasyonu ile yoğunlaştırıldıktan sonra katı besiyerlerine 10^2 sulandırılarak yayma şeklinde aşılan test bakteri suşlarının bulunduğu ortama 15 µL miktarda damLatılmış ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek enzimlerin antibakteriyel etkinlikleri mm olarak belirlenmiştir.

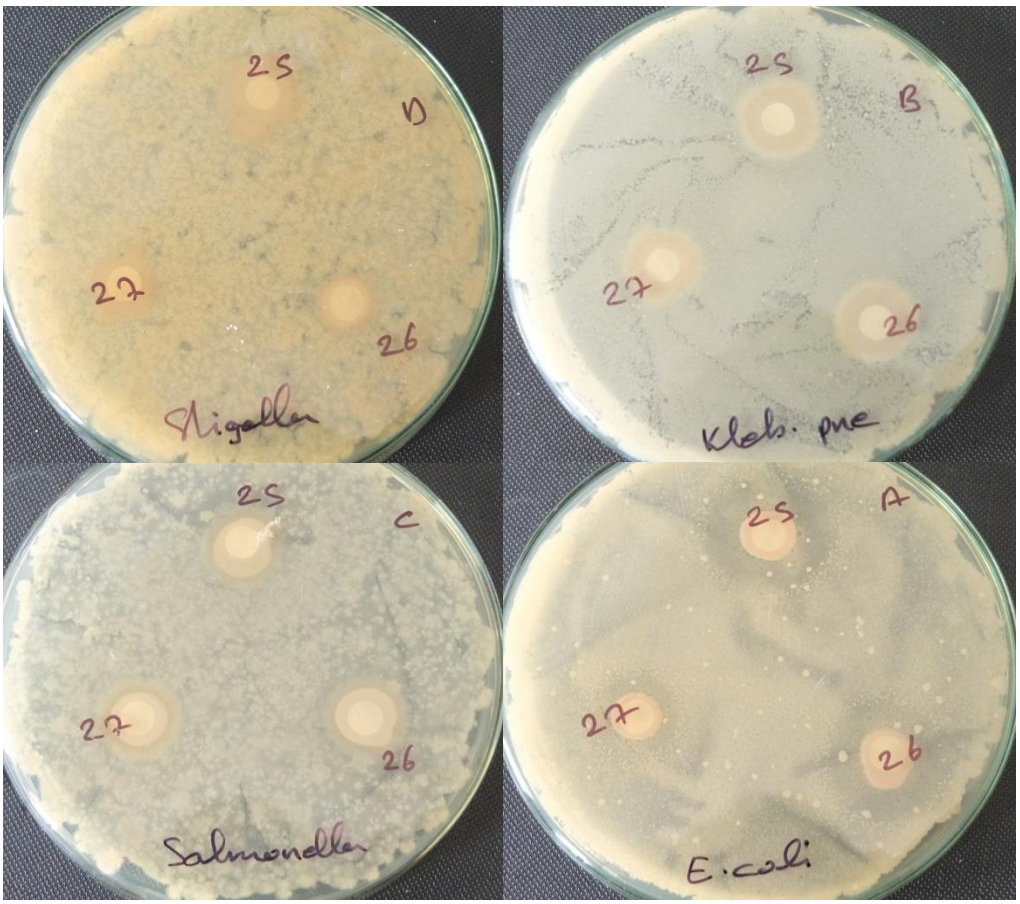
Kollajenaz enzimi sentezleyen *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarından izole edilen kollajenaz enzimlerinin *Pseudomonas aeruginosaya* karşı yaklışık ortalama 32 mm çapında aktivite zonu oluşturduğu saptanmıştır. Bu drum güçlü bir antibakteriyel etkiyi göstermektedir (Şekil 4.131).



Bacillus tropicus SKK-5 (K5) *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 (K2)

Şekil 4.131. *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarından izole edilen kollajenaz enzimLerinin *Pseudomons aeroginosaya* karşı antibakteriyel etkisi

Brevibacillus agri-SK27 suşundan üretilen keratinaz enzimi, *Shigella sonneii de 18 mm, Salmonella typhimurium da 21 mm, E.coli* de 20 mm ve *Klebsiella pneumoniae* de 22 mm çapında antibakteriyel inhibisyon zonu meydana getirmiştir. Özellikle bu etki *Salmonella* ve *Klebsiellaya* karşı daha belirgindir (Şekil 4.132).



Şekil 4.132.*Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin *Shigella sonnai, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibaklteriyel etkisi

4.36. Antibakteriyel Etkinlik Analizlerinde Kullanılan Kollajenaz ve Keratinaz Enzimlerinin Keçi Ağız ve Göz Yarası İle Fıtık Amaliyat Yarasında Uygulanması

Brevibacillus agri SK-27, *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 bakteriyel suşlarından izole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimLerinin in vitro antibakteriyel etkinliklerinin saptanmasından sonra hayvan ve gönüllü insanda antibakteriyel ve yara iyileştirme uygulaması gerçekleştirilmiş.

Bu amaçla keçi sürüsünde ağırlıklı olarak ağız ve göz bölgesinde çok farklı görünüme sahip (muhtemelen karışık antimikrobiyal flora etkili) açık yara dokusu gelişmiş ve sürüde salgın boyutlarına ulaşacak şekilde diğer hayvanlara da yayılmıştır. Üretici, hayvanların bahar ayında ağız bölgesinden başlayarak gözü de etkileyen yara oluşmasına bağlı olarak hastalanan hayvanların bir hafta içinde öldüklerini beyan etmiştir (Şekil 4.133 A ve B). Hasta hayvanın ağız ve göz görüntüsü). Veteriner müdahalesine rağmen iyileşme görülmediği, kendilerinin yanağın her iki yanından ve burun bölgesinden kızgın demir ile yakarak iyileştirmeye çalıştıklarını belirtmiştir. Literatürde keratinazların akne ve nasır giderme için potansiyel özellikte olduğu balirtilmiştir (Vidmar ve Vodovnik 2018).

Üreticinin talebi üzerine üretimi gerçekleştirerek moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonunu tamamlanan, in vitro antibakteriyel etkinliğini test bakterilerine karşı gösterdiğimiz, keratinaz ve kollajenaz enzimlerinden oluşan kokteyl ürün hazırlanmıştır. Ürün (1 hacım *Brevibacillus agri* SK-27 keratinaz enzimi, 1 hacım *Bacillus tropicus* SKK-5 kollajenaz enzimi ve 1 hacım *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzimi) yara bölgesine (ağız ve göz) 10 mL miktarda sprey şeklinde uygulanmıştır. Bir hafta sonra sürü kontrolü yapıldığında, ağız ve gözdeki enfeksiyon odağının yok olduğu, yaranın tamamen iyileştiği ve yara dokusunda rejenerasyonunun tamamlandığı saptanmıştır (Şekil 4.133 C ve D).

Mikrobiyal kollajenazlar embriyo gelişimi, morfogenez, doku yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, artrit, kanser ve ateroskleroz gibi insan hastalıklarında önemli roller oynadıkları bildirilmiştir. Kollajenolitik proteazların kollajen yapılarının hidrolizi ve kollajen türevlerinin tıpta, tarımda, gıda takviyelerinde, kozmetikte ve deri endüstrisinde önemli oranda kullanılması sözkonusudur (Lorena ve ark. 2015).



A B



C D

Şekil 4.133. Ağız ve göz bölgesinde enfeksiyona bağlı yara dokusu gelişmiş keçi (A ve B). Aynı keçinin bir kes sprey şeklinde keratinaz ve kollajenaz enzim karışımı uygulamasından bir hafta sonraki görünümü (C ve D).

Keçide elde edilen olumLu sonuç sonrası, yıllar önce kasık bölgesinde fıtıktan ameliyat olmuş fakat enfeksiyon gelişmesi nedeni ile sürekli akıntı (mikrobiyal kökenli) ve kapanmayan yara dokusu gelişmiş erkek bir hastada, hastanın isteği üzerine uygulama gerçekleştirilmiştir. Uygulamada keçide kullanılan kombinasyona sahip enzim kokteyl ürünü kullanılarak 5 mL sprey şeklinde yüzeyden uygulama gerçekleştirilmiştir.

Literatürde yara iyileşmesinde keratinaz enziminin uygulanmasına ilişkin geleneksel görüşün devam ettiği, tavuk tüylerinden elde edilen enzim ekstraktlarının yara iyileşmesi tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Wang ve ark., 2017). Keratin hidrolizatları ve keratinaz karışımLarı, topikal yüzeyi sağlamak için hücre debridmanı, antioksidan, antibakteriyel, antifungal gibi farklı yara iyileştirme özelliklerinin yanı sıra gerilme mukavemeti, su şişmesi, biyolojik olarak

parçalanabilirlik ve gözeneklilik de, daha hızlı yara iyileştirme uygulaması için optimum koşulu sağlamak üzere incelenmiştir. Keratin hidrolizatlarının yara iyileşmesi için pansuman malzemesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Nayak ve Gupta, 2017).

Uygulamanın ikinci gününden itibaren yara dokusundaki mikrobiyal akıntı azalmış (A) ve ikinci günde tamamen kaybolmuştur (B). Aynı zamanda yara dokusunda hızlı bir rejenerasyon gerçekleşmeye başlamıştır (C). Enfekte akıntının durması ile birlikte yara bölgesindeki rejenerasyon hızlanmış ve uygulamanın üçüncü gününde gözle görülür iyileşme gerçekleşmiştir. Bu aşamadan sonra uygulama yapılmamış ve hasta açısından yıllar süren sıkıntı son bulmuştur. Enzim kokteyli uygulaması bir, iki ve üçüncü gün dahil günde bir kez, aynı miktarda ve aynı şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.133).



A B C

Şekil 4.134.Fıtık amaliyatı sonrası kapanmayan ve sürekli enfekte olan yara (A) keçiye uygulanan enzim kokteyli uygulandıktan sonraki yaranın görünümü (B) ve enzim kokteyli uygulandıktan 3 gün sonraki yara görünümü (C)

Yara iyileşmesi, iltihaplanma, epidermal restorasyon, yara büzülmesi ve yeniden şekillenmenin örtüşen fazları yoluyla ilerler. Enflamasyon, fibroblastların ve keratinositlerin salgılanmasına ve matris metalloproteinazın ekspresyonuna izin verecek şekilde hızla çözülebilir ve bu da yeniden epitelizasyonun ve doku yeniden şekillenmesinin teşvik edilmesine yol açar (Hoa bach ve ark., 2020). Doğal üçlü sarmal yapısından yoksun olmasına rağmen, hidrolize kollajen membranın nötrofillerin toplanmasını teşvik ettiği ve makrofaj konsantrasyonunu ve inflamatuar yanıtı stabilize ederek iyileşmenin gerçekleşebileceği kanıtlanmıştır (Hoa bach ve ark., 2020). Çalışmamızda gerçekleşen gelişme literatürle tam bir uyum göstermektedir.

4.37. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Biber Uygulaması

Bitkisel üretim uygulamaları için kullanılan amino asit hidrolizat, 1 amino asit + 3 steril distile su ile karıştırılarak stok ürün hazırlanmıştır.

Uygulama aşamasında keratin ve kollajenden elde edilen stok üründen, 1 hacım amino asit hidrolizatı ve 9 hacım çeşme suyu karıştırılarak enzimatik yöntem ile üretilmiş hidrolize amino asit karışımı elde edilmiştir. Hazırlanan üründen seçilen iki biber saksısından birine 20 mL hidrolizat diğerine 20 mL çeşme suyu verilmiştir. Uygulama takvimi toplam 14 gün sürmüş ve aşağıdaki adımLar ve tarihlerde gerçekleştirilmiştir.

Literatürde %20 (h/h) tüy hidrolizatı ile muamele edilen patlıcan ve acı biber tohumları erken çiçeklenme ve iyileştirilmiş ürün verimi ile birlikte maksimum büyüme göstermiştir (Gurav ve ark. 2020). 20 mL tüy hidrolizatı ile muamele edilen yeşil fasulye tohumları, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve bakla sayısı açısından en yüksek değeri gösterdi (Kaur ve ak., 2011). Biberde gerçekleştirdiğimiz tavuk tüyü ve kollajen hidrolizat karışımından elde edilen bulguğar literatürle uygumludur.

1-BAŞLANGIÇ 18.09.2020 (ilk uygulama yapılmıştır)

2-İKİNCİ 21.09.2020 Bir adet çiçek

3-ÜÇÜNCÜ 23.09.2020 Bir çiçek ve bir çiçek gözü (İkinci uygulama yapılmıştır.

4-DÖRÜNCÜ 25.09.2020 Üç adet çiçek ve üç çiçek gözü

5-BEŞİNCİ 02.10.2020 Beş adet çiçek ve üç çiçek gözü



A B

Başlangıç su uygulanan (ÇS) Başlangıç amino asit uygulanan

Şekil 4.135. Amino asit karışımı uygulanan deney biber ve su uygulanan kontrol biberlerinin başlangıç görünümü (18.09.2020)

Kontrol biberde başlangıç aşamasında 5 adet olgun ve yeşil görünümlü biber bulunmaktadır (A). Özellikle alt kesimlerde olmak üzere geniş ayalı yapraklar bulunmakta olup, canlı ve yeşil

görünüm mevcuttur. Amino asit uygulaması için seçilen biberde (B) başlangıçta biri kırmızı üç adet yeşil olgun biber bulunmaktadır (Şekil 4.134).



A
Amino asit uygulanan



B
Su uygulanan

Şekil 4.136.Amino asit karışımı uygulanan kontrol (A) ve deney (B) biberlerinin üçüncü uygulama sonundak görünümüleri

Çalışmaların başlatıldığı 18.09.2020 tarihinden beş gün sonra (23.09.2020 üçüncü uygulama) amino asit uygulaması yapılan biberde hızla artan bir yapraklanma görülmektedir. Yoğun yaprak oluşumuna parallel olarak ikinci çiçek gözü oluşmuş ve bir adet de yeni biber ortaya çıkmıştır. Başlangıçtaki üç yeşil biber olgunlaşarak kızarmıştır. Var olan kırmızı biber ise koparak dökülmüştür (Şekil 136).

Kontrol biberde aynı dönemde (23.09.2020) biberin yaprak ve gövde bölümünde gözle görülür şekilde kuruma, yapraklarda ciddi oranda dökülme meydana gelmiş ve başlangıçta yeşil olan biberler soluk kırmızı renkli görünüm oluşturup kurumaya başlamışlardır.

Amino asit uygulamasına ikişer gün ara ile devam edilmiş ve dördüncü uygulamada (25.09.2020) amino asit uygulanan biberde üç adet yeni çiçek açmış, üç adet çiçek gözü meydana gelmiştir. Yapraklanma ve gelişim devam etmiştir. Kontrol biberde ise kuruma davranışı daha belirgin hale gelmiştir. Protein hidrolizatlarının çoğunlukla büyümeyi teşvik eden önemli fitohormonların biyosentezi için öncü moleküller içerdiği belirtilmiştir (Tamreihao ve ark. 2019). Tavuk tüyü hidrolizatlarının topraktaki azot içeriğini, organik karbonu ve mikrobiyal aktiviteleri iyileştirdiği saptanmıştır (Adelere ve Lateef, 2023).

02.10.2020 tarihinde yapılan beşinci uygulamada , amino asit uygulanan biber 5 adet yeni çiçek açmış, üç adet çiçek gözü meydana gelmiştir. Başlangıçta var olan üç adet biber tamamen kızarmıştır. Biberlerdeki kırmızı renk oldukça yoğun görünmektedir. Bitkide yoğun ve büyüklükleri bir birine eşit yaprak gelişmi izlenmektedir. Kontrol biberde, bitki tamamen kurumuş, yaprak kalmamış, başlangıçta var olan biberler sarımsı bir kızarma göstermiş, iki adedi kurumuştur.

Oluşan bu son durum ile birlikte denemeler sonlandırılmıştır. Toplam 14 günlük sure sonunda başlangıca göre amino asit uygulanan biberde verimLilik, yapraklanma, gelişim ve biberin kızarması parametrelerinde kontrole gore çok büyük başarı elde edilmiştir. Özellikle çiçeklenme ve çiçek gözü oluşumunda bu dönemde ortalama %60 verim artışı görülmektedir (Şekil 4.137).

Literatürde tüy hidrolizatının bitki büyümesini teşvik ettiği belirtilmiştir (Adelere ve Lateef 2023). Amino asitlerin dışadan uygulamasının, özellikle daha yüksek azot ihtiyacı olan bitkilerde bitki büyümesi için faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Khan ve ark., 2019). Literatürde tavuk tüy hidrolizatının sürdürülebilir tarımsal üretim için biyolojik gübre olarak kullanılacak potansiyele sahip olduğu bildirilmektedi (Tamreihao ve ark., 2019).



Şekil 4.137. Amino asit karışımı uygulanan deney ve kontrol biberlerinin 14 günlük deneme sonundaki görünümleri (02.10.2020)

Bacillus cereus NSMk2 suşundan izole edilen tüy hidrolizatlarının bakla tohumlarında çimlenmeyi çok artırdıkları ve hızlı bir gelişim gösterdikleri saptanmıştır. Bu nedenle keratin

hidrolizatlarının bitkisel üretimde biyositümülant olarak kullanılacak, kimyasal sentez ürünlerine güçlü bir alternatif oluşturacak potansiyelde olduğu belirtilmektedir (Kaur ve ark. 2021). Biber uygulamasında kullandığımız keratin ve kollajen hidrolizatlarının verimlilikte gösterdiği yaklaşık %60 performans artışı litetarür ile benzerlik göstermektedir.

4.38. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Karanfil Uygulaması

Keratinaz ve kollajenaz amino asit karışımLarının karanfildeki gelişime etkisinin araştırılması için kök bölgesinden 8.10.2021 tarihinde birinci, 15.10.2021 tarihinde ikinci uygulama yapıldı. Uygulamalarda üretilen amino asit karışımına ait stoktan 1:9 sulandırma ile elde edilen uygulama dozundan, 20 mL kullanılmıştır.



A

(8.10.2021 Saat 10.20



B

(8.10.2021 Saat 13:16)

Amino asit uygulaması ile birlikte karanfilde çok hızlı bir değişim meydana gelmiş ve saatler içerisinde (yaklaşık üç saat sonra) başlangıçta var olan çiçekte parlaklık, açılma ve dikleşme dikkat çekmektedir. İlk aşamada mevcut olan tomurcuk belirgin hale gelmiştir.



C

(8.10.2021 Saat 16:03)



D

(8.10.2021 Saat 18:46)

Amino asit uygulamasında yaklaşık 6 saat sonra çiçekteki gelişim dahada belirginleşmiş ve tomurcuk dikleşmiştir. Amino asit uygulamasının yaklaşık 9 saat sonra çiçek tamamen açılmış, yapraklardaki kurumuş yapılar dökülmeye başlamış ve yaprakların görünümündeki canlılık belirginleşmiştir.



E

(9.10.2021 07:41)



F

(9.10.2021 16:09)



G

(15.10.2021 Saat 14:18).

Şekil 4.138.Keratin ve kollajen substratlarının enzimatik hidrolizi ile elde edilen amino asit kokteyllerinin karanfil denemeleri (Üretilen amino sitler 1:1 oranında karıştırılmış ve 1:9 oranında çeşme suyu ile sulandırıldıktan sonra 20 mL hacimde kökten uygulama gerçekleştirilmiştir).

Amino asit uygulamasının yedinci gününde karanfilde oluşan tomurcukların açtığı ve çiçek sayısının üçe çıktığı görülmektedir. İlk uygulamadan 15.10.2021 tarihine kadar geçen yedi günlük dönemde başlangıçta uygulanan amino asid karışımdan sonra her hangi bir uygulama yapılmamıştır. Elde edilen sonuçlar bir kez yapılan amino asit uygulamasına ait olup, yedi günlük dönemde gerçekleşmiştir (Şekil 4.137).

Literatürde %20 (h/h) tüy hidrolizatı ile muamele bitkilerde erken çiçeklenme ve iyileştirilmiş ürün verimi ile birlikte maksimum büyüme göstermiştir (Gurav ve ark. 2020).

4.39. Keratinaz ve Kollajenaz İle Üretilmiş Aminoasit Hidrolizatlarının Hayvan Yeminde Kullanılması

Aminoasit kokteyllerinin hayvansal üretimde etkisini saptamak için etlik piliç üretim tesislerinde uygulama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10000 civciv kapasiteli iki çiftlik seçilmiştir. Çiftliklerin her ikiside standart yem kulanmışlardır. Çiftliklerden birisine haftada bir kez tüketilen toplam yemin %2 si kadar içme suları aracılığı ile amino asit kokteyli eklenmiş ve hayvanların tüketimi sağlanmıştır. Kullanılan amin oasit kokteyli bitkisel üretim uygulamalarında kullanılan formülasyondaki gibi oluşturulmuştur (Tavuk tüyü, kemik unu, balık pulu, balık derisi ve kıkırdaktan üretilen amino asitler 1:1 oranında karıştırılmış ve 1:9 oranında çeşme suyu ile sulandırıldıktan sonra kullanılmıştır). Ülkemizin yıllık yem üretimi yaklaşık 29 milyon ton olup, yem rasyonlarına %2 ile 4 oranında ham protein karıştırılmaktadır. Kullanılan protein genellikle

soya kaynaklı olup, GDO'lu ürünlerdir. Keratinaz ve kollajenaz enzimLerimiz ile ürettiğimiz amino asitler kullanılan ham maddeler nedeni ile çoğunlukla atık özellikli doğal biyolojik ürünlerden üretilmişlerdir. Etlik piliçlerde, Versazyme takviyesi yem dönüşüm oranını, göğüs eti verimini ve vücut ağırlığını iyileştirmiştir (Wang vd. 2006). Dahası, enzim ve hidrolizat yem bileşenlerinin (örn. nişasta) sindirilebilirliği ve tavukların bağırsak gelişimi iyileşmiştir (Wang vd. 2008).

Standart yem ile birlikte teimizde ürettiğimiz amino asit ürünün kullanıldığı çiftliklerde (10000 tavuk) uygulamanın 32 inci gününde 2200 gr ortalama ağırlığa ulaşılırken yem tüketimi ortalama 2600 gr/hayvan olarak gerçekleşmiş, yemin ete dönüşümü yaklaşık %83 düzeyinde olmuştur (Şekil 139 A). Amino asit karışımı kullanılmayan 10000 kapasiteli kontrol çiftliğinde 32 inci günde 2600 gr/hayvan yem tüketildiği halde 1250 gr ortalama ağırlığa ulaşılmıştır. Yemin ete dönüşüm oranı yaklaşık %48 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 139 B). Keratinaz ve hidrolizatın toplam kanal kuru madde, enerji, ham protein ve fosforun sindirilebilirliği iyileştirdiği ve bunun da kilo alımı ve yem dönüşümünde artışa yol açtığı belirtilmiştir. Ayrıca, sütten kesilmiş domuz yavrularının ölüm nedenlerinden biri olan ishal insidansının olumLu yönde azaldığı saptanmıştır (Wang ve ar., 2011).

Aminoasit kullanımı ile hayvanın yemde kullanılan ham proteini amino aside parçalaması için kullanacağı enerjiden ve zamandan önemli tasarruf sağlanmış olacaktır. Hayvan doğrudan amino asidi alarak ürüne dönüştürecek, üretim sürecinin kısalmasının yanı sıra, daha az yem tüketimi, daha az dışkı atımı gerçekleşmiş olacaktır (civcivlerde enzimlerin eksik olması nedeni ile yeterince hidroliz gerçekleşmez ve önemli bir kısmı sindirilmeden dışarı atılır).

Etlik piliç üreticilerinin performans beklentisi 4 Kg yem tüketimi ile 2 Kg canlı ağırlığa ulaşmak şeklindedir. Uygulamadada görüldüğü gibi amino asit kokteyli kullanılmayan çiftlikte %48 verime ulaşılması üreticilerin beklentisi ile örtüşmektedir. Bu durumda yemin yaklaşık %52 si kullanılmadan dışkı şeklinde atılmış olup ciddi bir kayıp sözkonusudur. Amino asit kullanılan çiftlikte ise elde edilen performans artışının amino asitlerin hızla ürüne dönüşmesi ile yeterli gelişim sağlandığı için yem tüketiminde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Bir başka ifade ile hazır alınan amino asitler hayvanda hızla ete dönüşmüş ve hazır amino asit kullanımının etkisi ile yem tüketme ihtiyacının azalmasından dolayı tüketilen toplam yem miktarı azalmış, buna karşılık et verimi artmıştır. Amino asit karışımı içerisinde üretim aşamasında kullanılan hidrolize edici enzimler varlıklarını sürdürdükleri için verimlilikte ayrıca pozitif etki yapmıştır. Böylece yemin daha iyi sindirilmesi ve değerlendirilmesine katkı yapılmıştır. Bunun sonucu olarak hazır amino asit kullanımı ve enzimlerin etkisi ile yemin sindirilirliğinin artması daha az yem kullanılarak daha yüksek performans elde edilmesini sağlamış, buda tüketilen toplam yemin değerlendirilebilirliğini artırarak %83 seviyesine ulaştırmıştır.

Literatürde eratinazların, hayvan yemlerinde protein parçalanması için katkı maddesi olarak kullanılabileceği, sindirilebilirliği iyileştirmeye yardımcı olacağı ve hayvan ağırlığının artmasına

katkıda bulunacağı bulunmuştur (Wang ve ar., 2011) Çalışmamızda elde ettiğimiz kilo artış verisi literatür tarafından desteklenmiştir. Hayvan yemine eklenen keratinaz hidrolizatların, domuz yavrularının bağırsak morfolojisi ve ekolojisinin iyileştirilmesine katkıda bulunduğu saptanmıştır (Ambrosio de Menezes,.2021).



A B

AA Uygulanmış 32 inci gün 2230 gr AA uygulanmamış 32 inci gün 1250 gr

Şekil 4.139.Amino asit uygulamasından 32 gün sonraki tavukların görünümleri (A ve B).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Küresel nüfusun istikrarlı artışı, 2050 yılına kadar 9,7 milyar kişiye ulaşacağını gösteriyor. Bu, insanların hayatta kalması için çok büyük temel ve sağlıklı gıdalar gerekecektir. Şu anda, tarım sektörü, sürekli artan dünya nüfusunun varlığını uygun maliyetli ve çevre dostu bir şekilde sürdürmek için gıda üretimini nasıl artıracağı zorluğuyla karşı karşıyadır (Rouphael ve Colla., 2020). Bitkisel üretim için sentetik kimyasal gübrelerin kullanılması yaygın bir uygulama olup, toprak ve çevre kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, yavaş salınımlı azotlu organik gübrelerin uygulanmasının, Birleşmiş Milletler'in Sürdürülebilir Kalkınma Hedefi 2'nin (SDG 2; sıfır açlık) gerçekleştirilmesi için tarımsal üretkenliği artırmak için daha güvenli ve daha iyi bir alternatif olduğu kanıtlanmıştır (Chatzistathis ve ark., 2021).

Dünya genelinde, tarımsal-endüstriyel işletmelerden her yıl yaklaşık 8,5 milyon ton tavuk tüyü atığı üretilmektedir (Da Silva 2018). Kümes hayvanı tüyleri gibi azotlu organik atıkların mikrobiyal dönüşüm yoluyla biyoteknolojik olarak değerlendirilmesi (Adelere ve Lateef 2016a) sürdürülebilir tarımsal uygulama için hayvan yemi takviyeleri ve organik gübreler gibi değerli ürünler elde etmek için araştırılmaktadır (Sobucki ve ark., 2019).

Meyve ve sebze üretimindeki verim artışı ve bireylerin ürüne ulaşma ile ilişkili büyük değişimlere rağmen, üretimdeki boşluk nedeniyle küresel tüketim seviyeleri hala DSÖ tavsiyesinin altındadır. Bu nedenle, BM'nin (FAO 2020) Sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşma yönünde konforlu sağlık ve refahı teşvik etmek için meyve ve sebzelerin önemi konusunda farkındalık yaratılmıştır. 2050 yılına kadar Sahra Altı Afrika'da 800 milyon ile 1,9 milyar arasında insanın DSÖ tarafından önerilen, günde 400 gr meyve ve sebzeye erişemeyeceği tahmin edilmektedir (Mason-D'Croz vd. 2019). Meyve ve sebzeleri insan tüketimine sunma stratejileri düşük maliyetle ve çevresel olarak sürdürülebilir bir şekilde üretimlerini artırmaktır. Bu nedenle, besleyici sebzelerin üretimLerini artırma stratejilerinden biri olarak, keratinli atıklar organik gübre üretmek için değerlendirilebilir.

Tüy hidrolizatları, serbest amino asitler, amonyak, peptitler ve toprak mikrobiyal aktivitesini uyarabilen ve buna bağlı olarak bitkilerin daha iyi büyümleri için besinleri özümsemesini kolaylaştıran, temel ve temel olmayan amino asitleri serbest bırakarak (Bokveld ve ark., 2021) üstün nitelikli biyogübre üretimini sağlayan, biyolojik olarak önemLi ürünler açısından zengindir (Bhari ve ark., 2021).

Dünya nüfusundaki hızlı artış ve sağlıklı gıda üretimi ile gıdaya ulaşımda ortaya çıkan sorunlar, sürdürülebilir tarımsal üretimin ve tüketicilerin sağlıklı gıdaya ulaşımının önemini ön plana çıkarmıştır. Küresel düzeyde ortaya çıkan ve her geçen gün yeni sıkıntılarla gıda tedariğinde karşılaşılan zorluklar, ülkeleri öncelikli olarak ulusal düzeyde tarımsal üretimin sürdürülebilir olması için yeni planlama stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir. Gıda ihtiyacındaki artış ve gıdaya

ulaşmadaki zorlukların öz kaynaklarla çözüme ulaştırılması, ulusal ve uluslar arası alanda ülkelerin etkinliğini artıracak stratejik bir avantaj ve güç sağlayacaktır.

Gıdanın sadece üretimi değil sağlıklı gıdanın üretimi ve tüketicilere ulaştırılması dikkate değer diğer bir öncelik olarak değerlendirilmektedir. Avrupa Yeşil Mutabakatı çerçevesinde varılan fikir birliği ve imza altına alınan gelecek hedefleri, oldukça radikal dönüşümü hedeflemektedir.

Bu mutabakat metnine göre 2030 yılına kadar tarımsal üretimde kullanılan kimyasal gübre kullanımının %20, bitkisel üretimde zararlılarla mücadelede pestisit kullanımının %50 ve hayvansal üretimde antibiyotik kullanımının %50 azaltılması hedeflenmektedir.

Tarımsal üretimde verim artışı ve zararlılarla mücadelede kullanılan kimyasal kökenli ürünler toprak, su, bitki, hayvan ve bunlardan elde edilen ürünlerde kirlenme ve birikime neden olarak gezegenimizi ve canlı sistemleri her geçen gün daha ciddi şekilde olumsuz etkilemektedir. Topraktan son kullanıcılara kadar ulaşan zincirde meydana gelen çevre kirliliği ve ortaya çıkan olumsuzluklar, giderek ağırlaşan sorunların hızla artmasına neden olmaktadır. Bu sonuçlar ciddi bir çevre sorunu yaratmasının ötesinde yeterince üretilemeyen gıda ürünlerinin tüketicilerde birçok rahatsızlığın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu noktadaki son aşama tedavi edilemeyen yeni hastalıklar ve özelliklede kanser olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum toplumların yaşam kalitesi ve maliyetlerini ciddi boyutlarda artırmakta, iş verimLiliğini ciddi şekilde düşürmekte ve toplam maliyetin bireyler ve ülkelerin karşılayamayacağı değerlere ulaşmaktadır.

Genel olarak tarımsal üretim söz konusu olduğunda gerek hayvan ve gerekse bitkisel üretim için amino asit, dolayısı ile eksternal protein katkısı üretim performansı için oldukça kritiktir.

Dünya nüfusunun hızla artması sonucu en fazla sıkıntı çekilen alan protein içerikli ürünlere ulaşma olmaktadır. İnsanlar için yeterince hayvansal protein kaynağı sağlanamazken, üretim amacı ile protein kullanılması insanlar açısından sıkıntıyı artıracaktır. Bu durumda üretim alanında kullanılacak protein kaynakları için alternatif arayışları ve değerlendirilmesi oldukça önem kazanmaktadır.

Hayvansal üretim (kanatlı, küçük ve büyük baş hayvanlar ile deniz ürünleri atıklarının) işletmelerinde açığa çıkan ve doğrudan beslenme amaçlı kullanılması mümkün olmayan, bu nedenle aynı zamanda ciddi şekilde çevre sorunu yaratan atıklar, doğal protein kaynaklarıdır. Hayvan yemlerinde (ham protein yerine) ve gübre içerisinde amino asit karışımLarının kullanılması (üre yerine), amino asitlerin hem hayvan hemde bitki tarafından direk olarak alınması nedeniyle, ham protein katkısına göre performansta önemli bir avantaj sağlanacaktır.

Sağlıklı ve konforlu yaşamın sürdürülebilir olabilmesi için çevre dostu ürünlerle beslenme ve bunun devamlılığının sağlanması ile kirletilmemiş çevre koşullarına sahip ortamlarda ikamet etme ve çalışma, insanların sosyal çevreleriyle pozitif iletişim kurabilmeleri ve sağlıklı bir toplum oluşturmada en etkili temel kriterler arasındadır.

Bunların gerçekleşebilmesi için günümüzde yeşil dönüşüm yada Avrupa yeşil mutabakatı şeklinde ifade edilen çevre dostu, biyouyumLu ve biyobozunur üretime dayalı beslenme, her türlü

atık ve zararlı kimyasalların etkisinden uzak yaşam alanları, çevreyi ve dolayısı ile bütün canlı yaşamını olumsuz etkileyecek antibiyotik, insektisit, pestisit ve plastik temelli ürünlerin biyolojik alternatiflerinin oluşturulduğu, kozmetik başta olmak üzere giderek yaygınlaşan kimyasal kaynaklı kişisel bakım ürünlerinin biyolojik siteme uygun ve onu destekleyen alternatifleri ile değiştirilmesini sağlayacak, yeni bir yaşamı oluşturma yolunda çalışılması zorunludur.

Yeşil malzemelerin geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yine de, farmasötik ve diğer endüstrilerde kimyasal olarak sentezlenmiş ürünleri biyolojik olarak parçalanabilen ve çevre dostu biyomateryallerle değiştirecek çok şey yapılabilir ve kaynak doğada çoğu zaman atık şeklinde vardır. Her yerde bulunan biyolojik materyaller keratin ve kollajen, biyolojik dokularda yaygın olarak bulunan sistein, prolin ve hydroksi prolin açısından zengin protein kaynaklarıdır. Tavuk tüyü, koyun yünü, keçi kılı, kemik, sığır derisi, balık pulu, dersi ve kılçığı bol miktarda üretilen ve önemli bir çevre kirliliği yaratan biyolojik kökenli yüksek protein içerikli atık ürünlerdir. Tavuk tüyü yaklaşık %90, kemik %90-92 ve koyun yünü %98 saf protein içermektedirler.

Keratin içeren atıklar doğada bol miktarda bulunur ve yüksek protein içeriğine sahiptir. Ancak keratin atıklarının birikmesi genellikle çevre kirliliğine ve değerli protein rezervlerinin israfına yol açmaktadır (Mukherjee ve ark. 2011). Keratin atıkları, amino asit bakımından zengin hayvan yemi takviyesi olarak kullanılabilecek protein hidrolizatına dönüştürülebilir. Ayrıca protein hidrolizatı, lizin gibi çeşitli esansiyel amino asitlerin üretimi için kullanılabilir. Villa ve ark. (2013), tüylerden üretilen keratin hidrolizatlarının saç şampuanlarının formülasyonunda kullanılma potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir.

Keratin, doğal yapısında, çok sayıda disülfit bağına sahip, sıkı bir şekilde paketlenmiş helikslerin ve tabakaların varlığı nedeniyle oldukça stabil olup, trypsin, papain ve pepsin gibi yaygın olarak kullanılan proteolitik enzimler tarafından kolayca parçalanmaz (Daroit ve ark. 2011). Keratin doğada esas olarak tüy, saç, boynuz, tırnak ve kornifiye doku şeklinde bulunur (Gupta ve Nayak 2015). Tüyler zengin bir protein kaynağı olup içeriğinde yaklaşık %90 protein bulunur ve protein açısından zengin hidrolizat üretimi için kullanılabilir. Dünya genelinde her yıl 24 milyar tavuk kesilmekte ve yaklaşık 8,5 milyar ton kümes hayvanı tüyü üretilmektedir. Kümes hayvanlarının tüyleri çoğunlukla atılmakta olup, bu sadece çevre kirliliğine katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda protein açısından zengin rezervin israfına da neden olmaktadır (Agrahari ve Wadhwa 2010).

Bu atık materyallerin keratinaz ve kollajenaz enzimleri kullanılarak hidrolize edilmesi ile zengin bir amino asit hidrolizatı elde etmek mümkündür. Amino asit formunda elde edilen hidrolizat, hayvan yemi, biyofertilizer, kişisel bakım ürünleri (hidrojeller, şampuanlar, kremLer, yara iyileştirici merhemler, cilt bakım ürünleri) başta olmak üzere sağlık alanında kullanılan bir çok ürünün eldesinde hayvansal ve bitkisel protein kaynaklarına çok güçlü bir alternatiftir. Ham protein, beslenme amacı ile kullanıldığında önce aminoaside dönüştürülmek zorundadır. Bu işlem

için enerji kullandığı düşünülürse, canlıda yeterince performans artırıcı etki elde etmek oldukça güçtür. Oysaki keratin ve kollajen atıklarından enzimatik hidroliz yolu ile üretilen amino asit hidrolizatı kullanıldığında, canlı sindirim için hem enerji kullanmayacak hemde zamandan tasaaruf sağlanacaktır. Hazır aminoasitlerin canlı tarafından hızla emilimi ve gerekli sistemlerde ürüne dönüştürülmesi çok kısa sürede gerçekleştiği gibi sindirim sorunlarıda by pass edileceği için üründen %100 yararlanma gerçekleşecek ve değerlendirilmeyen ürün miktarı minumum düzeyde olacaktır. Sonuçta atık bir ürün yeni ürünlerin eldesinde tranasformasyona uğrarken, aynı zamanda arıtma gerçekleştiği için çevre kirliliği ve ona bağlı ortaya çıkabilecek sorunlarda önlenmiş olacaktır.

Geleneksel tüy işleme yöntemleri maliyet ve enerji yoğun olup, yüksek basınç ve sıcaklık gibi zorlu işlem koşullarını içerir ve besin değeri kaybına neden olur (Grazziotin ve ark. 2006). Bu nedenle, keratin atıklarının işlenmesi için çevre dostu, enzim bazlı bir teknolojinin geliştirilmesi günümüzün temel ihtiyacıdır.

Tüy unu azot açısından zengin, ucuz ve kolayca bulunabilen bir kaynak olup guano için potansiyel bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Brandelli ve ark. 2010). Tarımda, kümes hayvanları, et ve balık endüstrisinden kaynaklanan atıklar gibi konvansiyonel olmayan kaynaklardan, düşük maliyetli proteinli gıda talebini karşılamak için yararlanılmaktadır. Çalışmalar, keratin hidrolizatlarının iyi organik gübreler olarak (Gousterova ve ark. 2005) ve sağlıklı gıdalar ve evcil hayvan gıdaları için amino asit takviyesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Gupta ve Ramnani 2006). *B. licheniformis* PWD-1 tarafından üretilen iki keratinaz, piliç gelişiminde iyi performans göstermiştir (Wang ve ark. 2011). Bu nedenle keratin atıklarının biyoişlenmesiyle üretilen enzimatik hidrolizatların gıda, yem ve kozmetik endüstrilerinde uygulama potansiyeli olabileceği belirtilmiştir. Süreç sadece 'atıkların zenginliğe' dönüştürülmesi için çevre dostu ve sürdürülebilir bir yaklaşım olmakla kalmamakta, aynı zamanda çevre sağlığı için güçlü potansiyel olan yeni biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesi için sürüdrülebilir yeşil dönüşümün gerçekleştirilmesi için alternatif yollar açmaktadır.

Doktora çalışmamızda keratinaz ve kollajenaz enzimi üreten ikişer adet doğal suşun izolasyonu, morfolojik ve 16S moleküler tanımlanması, suşlardan enzim izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve elde edilen hidrolizat kokteylleri ile etlik piliçler, biber üretimi, hayvan ve gönüllü insanlarda (antibakteriyel, antioksidan ve doku rejenerasyon etkisine bağlı yara iyileştirme) antibakteriyel ve yara iyileştirme uygulamalaır gerçekleştirilmiş ve güçlü çözümler üretilmiştir. Literatürlerde keratinaz enzimLerinin biyomedikal uygulamalar için biyomalzeme üretiminde kullanımına ilişkin uygulamalar gerçekleştirilmştir. Örneğin, enzimatik olarak üretilen keratin hidrolizatının, yara iyileştirme uygulaması için hidrojel üretiminde kullanılma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Su ve ark. 2020b). Buradan hareketle, keratinaz ve kollajenaz enzimLeri kullanarak elde ettiğimiz hidrolizat kokteyli kullanılarak keçi ağız ve fıtık amaliyatı yarasında güçlü bir

iyileşme sağlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuç Pal ve Suresh, (2016) ile Sedghi ve ark. (2025)'nın literatür verileri ile desteklemektedir.

Cilt yaralanmaları sıklıkla yara izine neden olur ve bu da etkili yara iyileşmesi için büyük bir zorluk oluşturur. Bu durum yara iyileşmesindeki büyük ilerlemelere rağmen hala karmaşık bir süreç olmaya devam etmektedir. Özellikle estetik ve duygusal önemi olan vakalarda yara izlerinin en aza indirilmesi çok önemlidir. Kollajenin parçalanmasında önemli bir enzim olan kollajenaz, yara iyileşme sürecinde umut verici bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. Metaloproteinazlar olarak sınıflandırılan bakteriyel kollajenazlar, hücre dışı matrisleri parçalama yeteneği göstererek kollajenazları yara izi gidermede değerli kılmaktadır (Pal ve Suresh, 2016; Sedghi ve ark. 2025). Üretimini gerçekleştirdiğimiz keratin ve kollajen hidrolizatları, ki içerisinde keratinaz ve kollajenaz enzimLeride vardır, ile gerçekleştirdiğimiz yara iyileştirme uygulamalarında tam bir iyileşme sağlanmıştır. Özellikle keçi ağız yarası uygulamasında elde edilen sonuçlar, yara izi gidermede dene denli başarı elde ettiğimizin göstergesi olup, Sedghi ve ark. (2025) nın bulguları ile tam bir uyum göstermektedir.

Biyouyumluluk, biyobozunurluk, biyoaktivite, toksik olmama, düşük maliyet ve kolay işlenme dahil olmak üzere keratin ve kollajenin çözünürlüğü ve yapısal bütünlüğü onları ideal bir polimer yapmaktadır (Varma ve ark., 201).

Sürdürülebilir kimya olarak da adlandırılan yeşil kimya, tercihen yenilenebilir hammaddelerin kullanılmasını, toksik ve tehlikeli kimyasallardan kaçınılmasını, böylece ticari üretim ve imalat sırasında minimum atık üretilmesini amaçlamaktadır (Sheldon ve diğerleri 2007; Sharma ve Bajaj 2017). Ayrıca, giderek artan dünya enerji talebi, sanayileşme, hızla tükenen fosil yakıt rezervleri ve çevre sağlığı sorunları göz önüne alındığında, çevre açısından güvenli ve minimum emisyon içeren sürdürülebilir endüstriyel teknolojilerin geliştirilmesine vurgu yapılmaktadır (Jegannathan ve Nielsen 2013; Vaid ve Bajaj 2017). Sonuç olarak, geleneksel kimyasal bazlı üretim ve imalat kavramLarından, eşit derecede verimli ve ekonomik olan çevre dostu süreçlere doğru bir paradigma değişimi söz konusudur (Sarrouh ve ark. 2012; Nargotra ve ark. 2016).

Bu noktada enerjiden gıdaya, sanayi üretiminden çevre sorunlarının çözümüne kadar çok geniş bir yelpazede en etkili çözüm doğada bulunmaktadır. Doğada hemen her gün gerçekleşen dönüşüm olaylarının nasıl olduğunu, nelerin nasıl dönüştüğünü, bu dönüşümde rol alan iş yapıcıların kimLer olduğunu bilimsel bir bakış ile yeterince değerlendirebilir ve bütün bunları kontrollü koşullarda hızlandırabilirsek, her alanda etkili ve verimli çözümler oluşturabiliriz.

Enzimler metabolizmanın temel taşlarıdır ve yaşamın varlığının temelini oluşturur. Bununla birlikte, son zamanlarda enzimler, substratın ürüne verimli bir şekilde biyodönüşümünü sağlayan spesifik ve hızlı etkileri ve çeşitli üretim prosesleri için ham madde, enerji ve kimyasallardan tasarruf etme yetenekleri nedeniyle, çeşitli endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Enzimler, potansiyel olarak endüstriyel işlemlerde tehlikeli kimyasalların tamamen değiştirilmesine veya

kullanımının azaltılmasına yardımcı olabilecek, dolayısıyla sürdürülebilir üretim ve üretim vaat eden çevre dostu (yeşil) biyokatalizörler olarak kabul edilir. Çeşitli endüstriyel enzimLer arasında mikrobiyal proteazlar, gıda, ilaç, tekstil, fotoğrafcılık, deri ve deterjan gibi çeşitli biyoendüstriel alandaki çok yönlü uygulama potansiyelleri nedeniyle dünya enzim pazarına hakimdir (Singh and Bajaj, 2017).

Örneğin tarım sektöründe proteazların gelecek vaat eden uygulamaları arasında zararlıların biyolojik kontrolü, ipek gamının giderilmesi, kenevirin seçici delignifikasyonu ve yün işleme yer alabilir. Bununla birlikte, başarılı endüstriyel uygulamalar gerçekleştirebilmek için proteaz enzimlerinin, genellikle zorlu proses koşullarına uyacak kadar dayanıklı ve stabil olması gerekir. Endüstriyel uygulamalara yönelik proteazlar, geniş sıcaklık ve aşırı pH aralıklarında, uzun süreler boyunca ve hatta çeşitli potansiyel enzim inhibitörlerinin varlığında bile aktiviteye ve stabiliteye sahip olmalıdır. *Bacillus* spp. endüstriyel proses koşullarına uygun olabilecek ekstrem koşullarda yüksek katalitik aktivite ve stabilite gösteren enzimler üretme yetenekleriyle, enzim biyoteknolojisinde özel bir öneme sahiptir.

EnzimLerin endüstriyel süreçlere uygulanması, çevreye duyarlı süreçlerin geliştirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Enzim bazlı teknolojiler, hammaddelerin verimli kullanımını, minimum düzeyde atık oluşmasını veya hiç atık oluşmamasını ve toksik kimyasalların kullanımından kaçınmayı sağlamaktadır (Nigam ve ark. 2012; Singh ve Bajaj 2017).

Proteazlar ilaç endüstrisinde (Kumar ve ark. 2015), peptid sentezi için gıda endüstrisinde (Kumar ve Bhalla 2005), kıl giderme için deri endüstrisinde (Pillai ve ark. 2011), gümüş geri kazanımı için fotoğraf endüstrisi ile deterjan formülasyonunda katkı maddesi olarak (Giri ve ark. 2011) ve keratin kalıntılarının işlenmesinde (Harde ve ark. 2011) kullanılmaktadır. Ayrıca kontakt lens temizleme ve zararlı böcek ve sineklerin kontrolünde de kullanılma potansiyelleri yüksektir (Joshi ve Satyanarayana 2013).

Günümüzde enzimler, tozların yanı sıra sıvı deterjanların, leke çıkarıcıların, çamaşırlarda ön yıkama işlemlerininn, otomatik bulaşık yıkama deterjanlarının ve diğer endüstriyel ve tıbbi temizlik ürünlerinin temel bileşenleridir. EnzimLer, ter, çimen, süt, yumurta, kan vb. ile kirlenmiş kumaşlardan proteinlerin çıkarılmasında deterjanların etkinliğini artırmaktadırlar (Ida ve ark. 2016).

Enzimatik olmayan deterjanlar, enzimli deterjanların aksine, organik lekelerin tekstil liflerine güçlü bir şekilde yapışması, ağartma ve kurutma işlemleri sırasında oluşan oksidasyon ve denatürasyon nedeniyle kalıcı hale gelmesinden dolayı proteinleri kumaşlardan çıkarmada yetersiz kalmaktadır. Çamaşır deterjanlarında kullanılan proteaz enzimlerinin performansının lipaz, amilaz ve selülaz ile kombinasyon halinde uygulandığında arttığı bildirilmiştir (Khan 2013).

Deterjanda kullanılan ideal proteaz enzimi, kan, yiyecek ve diğer vücut salgılarından kaynaklanan çeşitli lekelerin çıkarılmasını kolaylaştırmak için geniş substrat spesifikliğine sahip olmalıdır. Yüksek pH ve sıcaklıkta aktivite ve stabilite (Giri ve ark. 2011) ile deterjanların

şelatlayıcı ve oksitleyici maddeler gibi diğer bileşenleriyle uyumLuluğu proteazlar için gerekli olan (Nascimento ve Martins 2006) başlıca özellikler arasındadır (Giri ve ark. 2011). *B. subtilis, B. cohnii, B. clausii, B. licheniformis ve B. brevis* gibi çeşitli *Bacillus* türlerinden izole edilen proteaz enzimLeri deterjan katkı maddeleri olarak kullanım açısından iyi karakterize edilmiştir (Guleria ve ark. 2016).

Keratin ağırlıklı olarak sürüngenlerin, kuşların, amfibilerin ve memelilerin dokularında bulunur. Tüy, saç, tırnak, boynuz, toynak, kemik, kürk, pençe, post, kuş gagası, deri, yün, pul ve kılların yapısal bileşeni keratindir. α-keratinler (alfaheliks) genellikle memelilerin saçlarında, yünlerinde, boynuzlarında, tırnaklarında, pençelerinde ve toynaklarında bulunurken, daha sert olan β-keratin (beta tabakaları) kuş tüylerinde, gagalarında ve pençelerinde bulunur. (Gopinaht ve ark., 2015)

Keratin materyali, moleküle çözünmez bir yapı kazandıran disülfid köprülerine sahip kükürt bileşikleri açısından zengindir. Ayrıca, ağırlıklı olarak sistin, lizin, prolin ve serin olmak üzere çeşitli amino asitler içerir. İnsanlar da dahil olmak üzere daha yüksek omurgalılar, keratinli malzemeleri sindiremezler (Gopinaht ve ark., 2015).

Keratinolitik proteazlar (keratinazlar), saç gibi katı substratları hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Singh ve ark. 2014). Keratinolitik potansiyel, protein substratlarının katı yüzeylerden uzaklaştırılmasına yardımcı olabilecek, deterjan enzimlerinde aranan önemli bir özelliktir. Keratinolitik proteazlar, özellikle sert yüzeylerin temizliğinde deterjanlar için cazip katkı maddeleridirler (Brandelli ve ark. 2010). Ayrıca keratinazlar, çoğu proteazın etki göstermediği, özellikle gömlek yakalarındaki keratinli kirlerin uzaklaştırılmasına da yardımcı olabilir (Gessesse ve ark. 2003).

Keratinazlar, ölü deri hücrelerini parçalamak, kan dolaşımını iyileştirmek, cildi derinlemesine temizlemek ve besinlerin emilimine hazırlamak için kullanılır: Maskeler, kremLer ve ayrıca kuru ve hassas ciltler için son derece yararlı olan ampul ürünleri ve serumLar şeklinde kullanılması sözkonusudur (Sharma, ve Gupta., 2016).

Saç esas olarak keratinden meydana gelirken (%90) az miktarda lipidden (%1-9) oluşur. Keratin hidrolizatları saç bakım sürecinde etkili onarıcılardır. Bu amaç için kullanılan keratin hidrolizatlarının çoğu, son zamanlarda mikrobiyal keratinazların kullanımının popüler hale gelmesine neden olmuştur. S. maltophilia dan elde edilen keratinolitik enzimLe muamele edilen tavuk tüylerinden elde edilen hidrolizatın, hem normal hem de hasarlı saçın gücü, parlaklığı ve yumuşaklığının geliştirilmesini kanıtladığı gibi, saç üzerinde olumLu bir etkiye sahiptir (Kanoksilapatham ve Intagun., 2017). Keratinazın en yaygın kullanıldığıiki hastalığın onikomikoz ve sedef olduğu belirtilmiştir.

Keratinaz enziminin keratini hidrolize etme yeteneği yaraları iyileştirmek için de kullanılabilir. Üçüncü derece yanıklarda yaraların avasküler yapısı, mikroorganizma sayısının genellikle çok yüksek olduğu yarada sistemik antimikrobiyal ajanların etkin difüzyonunu

engelleyebilir. Yaranın keratinaz kullanılarak enzimatik tedavisi, lokal antibiyotiklerin penetrasyonunu arttırır ve yara iyileşmesini uyarır (Sahni ve ark. 2015). Keratinaz ve kollajenaz enzim kombinasyonu ile gerçekelştirdiğimiz yara iyileştirme uygulamasında elde ettiğmiz sonuç, literatür verileri ile örtüşmektedir. Enzimatik hidroliz sonucu ürettiğimiz aminoasit karışımı ve kokteylde bulunan keratinaz ve kollajenaz enzimleri özellikle kapanmayan ve dejenere hale gelmiş yaraların hızlı iyileşmesi ve doku rejenerasyonu için öncelikle kullanılabilecek güçlü bir alternatif üründür.

B. pumilus ve *Staphylococcus auricularis suşlarından izole edilen* alkali keratinaz enzimLerinin biyofilm oluşumunu sırasıyla %86 ve %50 oranında engellediği ve ayrıca 1 g X-ışını ve fotoğraf filminden 0.4013 g ve 0.3823 g gümüşü çıkardığı saptanmıştır (Isake ve ark.,2016). Keratinaz enzimlerinin yeni uygulamaları arasında, kulak kirinin uzaklaştırılması, incilerin beyazlatılması, kontakt lenslerin temizlenmesi ve mikrobiyal keratinazların gümüş nanopartiküllerin oluşumuna katılımı yer almaktadır. Günümüzde keratinaz preparatlarının oldukça pahalı olduğu (Merck tarafından üretilen keratinaz gibi) ve bu enzimLerin artan ihtiyaçları karşılayamadığı ifade edilmektedir (*Purchase D. 2014).*

EnzimLerin deterjanlara uygulanması, özellikle sert biyomateryaller için yalnızca temizleme etkinliğini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda yıkamanın nispeten düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesine olanak tanır, böylece enerji tasarrufu sağlar ve süreci ekonomik hale getirir (Rehman ve ark. 2017).

Bacillus spp.'den alkalin keratinazların deri endüstrisinde deriden kılların uzaklaştırılması için uygun olduğu belirtilmiştir. Kıl giderme işleminde tercihen kollajenolitik aktivitesi olmayan, bununla birlikte hafif elastolitik aktivitesi olan keratinolitik proteazlar kullanılır. Keratinaz, folikülün keratin dokusunu seçici olarak kırar, böylece derinin gerilme mukavemetini etkilemeden sağlam tüyleri çıkarır (Macedo ve ark. 2008). Geleneksel deri işlemeyle ilgili yüksek riskler göz önüne alındığında, daha temiz ve daha güvenli enzimatik yaklaşımların geliştirilmesine büyük önem verilmektedir. Bu tür biyobazlı süreçler emisyonların azaltılmasına yardımcı olacaktır. Bu nedenle, deri işleme için enzimlerin kullanılması, gelişmiş işlem verimliliği, yüksek düzeyde spesifik enzim bazlı kataliz, geliştirilmiş deri çıktısı ve üstün deri kalitesi açısından faydalıdır.

Yün, yünü oluşturan lifinin eksokütikülünde yüksek konsantrasyonda sistein çapraz bağlarına sahip olan özel bir keratin türüdür. *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798'den elde edilen keratinaz enzimi saflaştırılmış ve yün işlemeye yönelik mükemmel potansiyele sahip olduğu karakterize edilmiştir (Zhang ve ark. 2016a). Keratinazların, tekstil işlemesinde uygulanab,leceği ve çevre açısından sağlıksız olan fizikokimyasal yöntemLerin yerine kullanılabileceği belirtilmiştir (Tahara ve ark. 2003).

Keratinazların bilimsel önemi ve yeşil teknolojilerde potansiyel kullanımLarı nedeniyle, bu enzimLeri verimli bir şekilde üreten bakteri ve mantar türlerinin araştırılması, endüstrilerin sürdürülebilirliğine katkıda bulunabilir. Mikrobiyal keratinolitik enzimler, keratini amino asitler ve

peptitleri içeren keratin hidrolizatlarına dönüştürme yeteneğine sahiptir (Ambrosio de Menezes ve ark. 2021). Keratinaz enzimlerinin keratinli proteinlerin enzimatik hidrolizini gerçekleştirerek ekonomik gelişmeye çevresel olarak sürdürülebilir bir katkısı olduğu kanıtlanmıştır (Nnolim ve Nwodo 2021).

Çalışmamızda keratinaz ve kollajenaz enzim üreticilerinin doğadan izolasyonu, ve enzim üretme yeteneklerinin saptanması için toplam 568 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiştir. Bakteri izolasyonları coğrafik ve iklimsel farklılık gösteren Tuz gölü, Saklı göl, Tarsus Ardıçlı köyü ve civarında üretim yapan tavuk işletmeleri ile koyun ve keçi üretimi yapan hayvan üretim alanlarından alınan tavuk tüyü, koyun derisi, koyun yünü, kıl, keçi ayağı, çekirge, gergedan böceği ile Adana Karataş ve Mersin bölgelerinden deniz suyu ve sedimentinde bulunan balık pulu, kılçık ve derisinden oluşan atıklardan alınan örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Özellikle Tuz gölü ve Ardıçlı köyü bölgesinde ortam sıcaklığının 0-10ºC olduğu dönemlerde alınan örneklerden, cold aktif, alkali ve halofilik keratinaz ve kollajenaz enzim üreticileri izole edilmiştir.

Proteolitik aktivitenin saptanması ile ilgili çalışmalarda, izole edilen suşların yaklaşık %87.5 inin skimmilk ve kollejenaz besiyerinde proteolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Proteolitik aktivite gösteren suşlar içerisinde pH 5.0-12.0 aralığındaki ortamlarda en geniş ativite zonu oluşturan suşlar, aday organizmalar olarak seçilmiştir. Seçilen suşlar içerisinde pH 10.0 ve düşük sıcaklık (10°C) koşullarında en geniş aktivite zonu meydana getiren iki *Bacillus* sp. suşu keratinaz enzim çalışmaları için tercih edilmiştir. Kollejenaz enzim üretimi için pH 7.0 ve psikro-mezofil koşullarda en geniş aktivite zonu oluşturan suşlar seçilerek kullanılmıştır.

Keratinaz ve kollajenaz enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilen suşların morfolojik ve biyokimyasal testlere dayalı ön tanılamaları yapılmıştır. Suşların tamamının gr (+) ve katalaz pozitif oldukları, spor meydana getirdikleri saptanmıştır.

Morfolojik tanımlama çalışmalarından sonra 16S rDNA analizi ile moleküler tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler tanılanama sonunda keratinaz enzimi için seçilen aday suşlar, *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 olarak adlandırılmıştır. Kollajenaz üretici olarak seçilen suşlar ise *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 şeklinde tanımLanmışlardır.

Enzim üretimi için seçtiğimiz ve moleküler tanılama sonunda *Bacillus albus SK-36, Bacillus tropicus SKK-5, Lysinibacillus fusiformis SKK-2* ve *Brevibacillus agri* SK-27 olarak tanımLanan suşlar kullanılarak, keratinaz ve kollajenaz enzimleri üretilmiştir.

Üretilen enzimler ayrı ayrı moleküler ağırlık, optimum aktivite sıcaklığı, optimum aktivite pH değeri, pH stabilitesi, termal stabilite, NaCL ile enzim aktivitesinde olası değişimler, TLC uygulaması ile reaksiyon ürünlerinin saptanması, metal iyonları, inhibitörler, şelatörler, yüzey aktif bileşikler ve deterjanlar ile enzim aktivitesinde meydana gelecek değişimLerin saptanması için analiz edilmişlerdir.

İzole edilen suşların enzim üretme kapasitelerine substrat miktarı, sıcaklık, inkübasyon zamanı gibi parametrelerin etkisi araştırılmıştır. İzole edilen suşların enzim üretme kapasitelerinin optimize edilmesi için karbon kaynağı, azot kaynağı, karbon miktarı ve azot miktarının etkileri analiz edilerek verimLilik optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Üretilen enzimler ile keratinli tüy, yün, kıl, saç ve kollajen yapılı kemin unu, balık pulu ve kıkırdak gibi substratlar hidrolize edilerek, aminoasit üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen aminoasit kokteyleri hazırlanmış ve geliştirilen dormülasyon ile ön uygulama amaçlı denemeler gerçekleştrilerek, hidrolizat karışımının bitki performansına etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla biber ve karanfilde yapılan saksı uygulamaları ile hem verimlilik artışı sağlanmış hemde uzun vadede bitkinin performansının devam etmesi olumlu yönde gerçekleşmiştir.

Enzimler ile röntgen filmlerindeki gümüşün geri kazanılması ve fibrinolitik etki ile pıhtının çözülmesi denemeleri yapılmış ve ortalama 36 saatte kan pıhtısı karakterize edilen keratinaz ve kollajenaz enzimleri ile tamamen çözünmüştür. Röntgen filminden gümüşün uzaklaştırılması çalışmasında *Lysinobacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi %100 başarılı olurken, diğer enzimLerde yeterli performans elde edilememiştir.

Çaışmalar sırasında UV ve EMS kullanılarak rastgele mutasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve ana suşa göre yüksek miktarda enzim üreten mutantlar (katı besiyerindeki net aktivite zonlarına göre) elde edilmiştir.

İzole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin antioksidan özellikleri test edilmiş ve standart kontrol ajanına çok yakın düzeyde antioksidan özellik saptanmıştır (Standart üründe %64, enzimLerimizde biri hariç ortalama %60 antioksidan özellik belirlenmiştir).

İzole edilen enzimler cold ve mezofil koşullarda ve alkali pH değerlerinde yüksek aktivite göstermişlerdir. Enzimler yüksek termal stabilite ve pH stabilitesi göstermişlerdir. İnhibitörler ile yapılan çalaışmalarda 5 ve 10 mM konsantrasyonda 16 farklı ajan denenmiş ve bütün enzimLerin çok güçlü stabilite gösterdikleri saptanmıştır. Enzimlerin 10 mM konsantrasyonda inhibe olma yerine çoğu zaman indüklendikleri saptanmıştır.

Ham tavuk tüyü ile yapılan hidroliz denemelerinde 50-300 g/L konsantrasyonda gerçekleştirilen çalışmalarda ortalama beş günde tüylerin tamamen sıvılaştıkları saptanmıştır.

Keratinaz enzim üretiminde kullanılan *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun en yüksek üremeyi ve enzim sentezini gerçekleştirdiği inkübasyon zamanının saptanması için %5 aşılama yapılarak 180 dev/dk da çalkalamalı inkübatörde üretim gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon başladıktan altı saat sonra suşun logaritmik üreme dönemine girdiği ve otuz altıncı saatte maksimum üreme ve enzim sentezinin gerçekleştiği saptanmıştır. İnkübasyonun otuz altıncı saatinden başlayarak yetmiş ikinci saate kadar üreme stabil kalmış, yetmiş ikinci saatten sonra üremenin düşüşe geçmesi ile birlikte enzim sentezininde düştüğü saptanmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşu inkübasyonun ilk altı saatinde latent süreci geçirmiş, on ikinci saatten başlayarak otuz altıncı saate kadar giderek artan üreme ve enzim sentezi gerçekleştirmiştir.

Suş otuz altıncı saat ile kırk sekizinci saatler arasında maksimum düzeyde enzim üretimi gerçekleştirmiş ve stabil bir davranış göstermiştir. Yetmiş ikinci saatten başlayarak yüz yirminci saate kadar üreme ve enzim üretimi azalmıştır. Keratinaz enzim üreticisi suşlar aynı zaman diliminde üreme ve enzim üretimi için pik noktaya ulaşmış olsalar da stasyoner faz *Bacillus albus* SK-36 suşunda kırk sekizinci saate tamamLanırken, *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda yetmiş ikinci saate kadar devam etmiştir.

Kolajenaz üretiminde kullanılan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu birinci saat ile altıncı saat arasında loğaritmik üreme fazını tamamlamış ve altıncı saatte maksimum üreme ve enzim sentezi değerine ulaşılmıştır. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu, keratinaz üreticisi suşlarda görülen stasyoner fazdaki davranıştan farklı olarak, kısa sürede üremenin ve enzim sentezinin düşüş gösterdiği faza girmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu birinci saatten itibaren hızlı bir üreme dönemine girmiş ve altıncı saatte %85 üreme noktasına ulaşmıştır. İnkübasyonun on beşinci saatinde maksimum seviyeye ulaşılırken on sekizinci saatten itibaren üremenin hızla azalarak %87 seviyesine doğru düştüğü saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşu optimum aktivitesini pH 10.0 da göstermiştir. Enzim pH 9.0-10.0 aralığında yaklaşık %96.5 aktiviteye sahip olup aktivitesi özellikle ekstrem alkali değerlerde daha yüksektir. Diğer taraftan enzim pH 6.0-9.0 aralığında %81.5 aktivite göstermiştir. Bu özellikleri, enzimin asido-ekstrem alkali karaktere sahip olduğunu göstermektedir.

Bacillus albus SK-36 suşunun optimum aktivitesini pH 10.0 da gösterdiği saptanmıştır. Enzim pH 9.0-10.0 aralığında ortalama %90 ın üzerinde aktivite değerine sahiptir. İzole edilen enzimin pH 6.0-12.0 aralığında ortalama aktivite değeri %89'lar seviyesindedir. *Bacillus albus* SK-36 enzimi ekstrem asido-alkal karaktere sahiptir. Özellikle alkali ve ekstrem alkali koşullardaki yüksek aktivite değeri ve ekstrem halofilik özelliğe sahip olması, enzimin deri endüstrisi, deterjan endüstrisi ve alkali özellik gösteren atık suların enzimatik arıtılması için ideal özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra enzimin geniş pH aralığında yüksek aktivite göstermesi, içecek ve yem üretimi alanında öncelikle uygulama potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Utangi ve Aruna (2018), Bacillus thurungiensis strain Bt407 suşundan izole edilen keratinaz enziminin optimum aktivitesini 55°C ve pH 8.0 de gösterdiğini bulmuşlardır. Ca+2, Mg+2 ve Ba+2 gibi metal iyonları enzim aktivitesini arttırmıştır. Enzim SDS ile muamele edildiğinde stabil kalmış, β-merkaptoetanol, DMSO ve EDTA ise enzimi inhibe etmiştir. İzole edilen enzim SDS-PAGE analizinde 33 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandı oluşturmuştur. İzole ettiğimiz *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enzimi litertür ile uyumLudur.

Brevibacillus agri SK-27 ve *Bacillus albus* SK-36 suşlarından elde edilen keratinaz enzimlerinin asido-alkali spektrumda yüksek katalitik aktivite göstermelerine rağmen, *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen enzimin katalitik aktivite değerinin, *Bacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen enzime göre yaklaşık %10 daha yüksek olduğu görülmektedir. Bugüne kadar

tanımlanan keratinazların çoğunun serin proteaz olduğu ve birkaç metalloproteazın keratinolitik aktivite gösterdiği bulunmuştur. *Bacillus licheniformis* ER-15'ten elde edilen dimerik keratinaz kullanılarak pH 8.0 ve 50ºC'de 8 saat içinde tam hidroliz sağlanmıştır. 1200 ünite keratinaz enzimi ile 25 gr tavuk tüyü parçalanmıştır (Gopinaht ve ark., 2015). Keratinaz enziminin kozmetik uygulamalarda kullanılması, tıraşa yönelik tüy dökücü bileşimlerin bir parçası olarak kullanılabilecek özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Keratinaz enzimlerinin ayrıca, akne veya sedef hastalığında keratinin ortadan kaldırılması ve insan kallusunun giderilmesi için topikal formülasyonlarda da yararlı olabileceği bildirilmiştir (Vignardet ve ark. 2001). Tırnak hastalıklarının topikal tedavisinin etkinliği genellikle ilaçların tırnak plağı boyunca çok düşük geçirgenliği nedeniyle sınırlıdır. Paecilomyces marquandii'den elde edilen keratinazın, ilacın insan tırnak kırpıntıları yoluyla nüfuzunu önemLi ölçüde artırdığı bulunmuştur (Mohorcic ve ark. 2007)..

Keratinolitik enzimler, yünlü tekstil endüstrisinde, yünün büzülmesine karşı koruma ve yün boyamanın iyileştirilmesi için bir yöntem olarak potansiyel uygulamaya sahip olabileceği bulunmuştur (Sousa ve ark. 2007).

Toplam kabuklu deniz ürünleri deniz endüstrisi atıklarının %50-60'ını oluşturur; atıklar protein (%35-50) ve kitinden (%15-25 kuru ağırlık) oluşur ve bu atıklar kontrolsüz atık dökümü nedeniyle önemli çevre kirleticileri olarak kabul edilir. Şimdiye kadar deniz atıkları, metaloproteazlar, kitinazlar, antifungal hidrolitik enzimler, karotenoidler, amino asitler, lipazlar ve antioksidan özelliklere sahip peptitlerin ve kitin oligomerlerinin üretilmesi için kullanılmıştır (Annamalai ve ark., 2014; Pal, and Suresh., 2016.)

Kollajen, her bir α zincirinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıya sahip sarmal yapının bir arada tutunmasını sağlayan, ağırlıklı olarak tekrarlayan Glycine-Proline-Hidroksiprolin dizilerinden oluşan üç α zincirinden oluşur.

Kolajenin proteolizi, doku rejenerasyonu, morfogenez ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik fonksiyon için gereklidir. Kollajen hidrolizinin ürünü olan kollajen peptitlerin endüstriyel, gıda, beslenme ve osteoporoza yönelik ajanlar, mide ülseri, hipertansiyon, cilt nemLendiricileri ve koruyucular gibi biyomedikal açıdan çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kollajen hiroliz ürünlerinin çeşitli tıbbi ve farmasötik alanlarda büyük ilgi gördüğü bildirilmektedir: Kollajen hidroliz ürünleri, düşük viskozitesi ve suda yüksek çözünürlüğü nedeniyle herhangi bir üretim sorununa neden olmadan, yiyecek ve içecek ürünlerinin fonksiyonel ve besleyici özelliklerini geliştirmek için katkı olarak kullanılabilir (Pal ve Suresh., 2016).

Tip-I kollajen, en bol bulunan ve ticari açıdan önemli olan kollajen türüdür ve mükemmel hücre yapışma özellikleri, yüksek biyouyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve zayıf antijenitesi nedeniyle gıda, biyomedikal, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal kollajenler, üçlü sarmal yapılarından dolayı en yaygın proteazlara karşı dirençlidir. Ancak kollajenaz enzimi tarafından kolayca parçalanır (Pal ve Suresh., 2016)..

Mikrobiyal kollajenaz enzimleri benzersiz özelliğe sahip olup, fizyolojik koşullarda doğal kollajeni hidrolize etme kapasitesine sahiptirler. Hem suda çözünmeyen 'doğal' kolajenleri hem de suda çözünür denatüre kollajenleri parçalamak için geniş substrat spektrumuna sahiptirler. Bu eşsiz aktivite özellikleri nedeniyle, mikrobiyal kollajenazlar embriyo gelişimi, morfogenez, doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi, artrit, kanser ve ateroskleroz gibi insan hastalıklarında önemli roller oynarlar. Bu yüzde mikrobiyal 'gerçek' kollajenazlar sayısız endüstriyel, biyoteknolojik, farmakolojik, tıbbi ve gıda uygulamalarında büyük ilgi görmüşlerdir (Pal ve Suresh., 2016).

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enzimi optimum aktivitesini pH 7.0 de göstermiş, pH 10.0 da ikinci bir pik oluşturmuştur. Enzim optimum aktivitesini pH 7.0 de gösterse de ikinci pikin gözlendiği pH 10.0 ve alkali bölgede, ortlama aktivite %86 değeri ile %4 daha yüksektir. Asido-nötral aralıktaki aktivite ise yaklaşık %82 ler düzeyindedir. Enzimin zimogram analizinde moleküler ağırlıkları birbirinden farklı birden fazla bağımsız aktivite bandı oluşturması, pH analizinde gözlenen iki farklı pik değeri ile örtüşmektedir. Zimogram analizinde diğer aktivite bandlarına göre daha parlak ve miktarsal olarak daha kalın olan fragmentin, alkali bölgede daha yüksek katalitik aktiviteyi gösteren fraksiyon olduğu düşünülmektedir. Sedgi ve ark.(2025) tarfından izole edilen kollajenaz enziminin 72 kDa moleküler ağırlığa sahip tek aktivite bandından oluştuğu belirtilmiştir.

İzole edilen enzim, optimum aktivitsini pH 7.0 de göstermesi ve nötral aralıkta güçlü aktiviteye sahip olması nedeni ile özellikle, yara debrimenti ve rejenerasyonu ile ilgili alan başta olmak üzere, kişisel bakım ürünlerinin üretimi ve kıkırdak rejenerasyonu uygulamalarında kullanılacak potansiyele sahiptir. Alkali koşullardaki aktivitesi ile kollajen özellikli kaynakların hidrolizi ile amino asit üretmek için tercih edilecek potansiyele sahiptir. Bu nedenlerle enzimin kullanım spektrumunun oldukça geniş ve çok yönlü olduğu görülmektedir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenolitik proteaz enzimi, optimum aktivitesini pH 11.0 de gösterdiği için ekstrem alkali özelliğe sahiptir. İzole edilen enzim *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenolitik proteaz enziminde olduğu gibi, optimum aktivite gösterdiği pH değerinin yanı sıra pH 6.0 da ikinci ve güçlü bir aktivite piki daha oluşturmuştur. Bu durum enzimin zimogram analizinden elde edilen farklı moleküler ağırlıktaki iki bağımsız aktivite bandı ile uyum göstermektedir. Enzim aktivitesinin özellikle pH 9.0-11.0 aralığında çok güçlü aktivite göstermesi, zimogram analizinde görülen daha kalın ve parlak görünüme sahip fraksiyonun ekstrem alkali aralıkta aktivite gösteren enzime ait olduğunu düşündürmektedir.

Enzim asido-ekstrem-alkali aralıkta yüksek düzeyde katalitik aktiviteye sahiptir. Enzimin asidik bölgedeki yüksek katalitik aktivitesi, enzimi özellikle kanatlı hayvan yemi üretiminde kullanım için güçlü bir aday yapmaktadır. Yem kanatlı hayvanların kursak (taşlık) adı verilen bölgesinde yaklaşık 5 saat beklemektedir. Bu bölgenin pH değeri asidik olduğu için yem üretiminde kullanılacak enzimin asidik ve asit stabil olması önemlidir. Diğer taraftan, enzimin

alkali ve ekstrem alkali koşullarda daha yüksek katalitik aktivite göstermesi nedeni ile deterjan formülasyonları, alkali özellikli deri endüstrisi atıksularının enzimatik arıtımı ve deri, balık pulu ve kemik gibi tip-1, tip-2 ve tip-3 kollajen yapılarının hidrolizi ve amino asit üretimi alanlarında kullanılma potansiyelini öncelikli hale getirmektedir.

Brevibaillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi 30-110°C aralığındaki yüksek katalitik aktivitesi nedeni ile mezo-ekstermofil karaktere sahiptir. Enzim bu aralıktaki bütün endüstriyel proseslerde yüksek verimlilikte çalışabilecek potansiyeldedir.

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi, optimum aktivitesini 10°C de göstermiştir. Enzim 5 ve 10°C arasındaki koşullarda %98 aktivite göstermektedir. İnkübasyon sıcaklığınının 15°C ye yükseltilmesi ile birlikte optimum koşullara göre aktivite %15 düşmekte, aktivite 20-30°C'lerde %82, 40°C de %79 değerine gerilemektedir. Enzim aktivitesinin 30°C den daha yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite sıcaklığına gör yaklaşık %21 azalması, enzimin cold aktif olduğunun göstergesi olup, literatür ile tam uyum göstermektedir. Literatürde cold aktif enzimlerde aktivitenin 30°C'den itibaren düştüğü belirtilmektedir (Hui ve ark., 2009).

İzole edilen enzim optimum 10°C de katalitik aktiviteye sahip olmakla birlikte 0°C de %79 aktivite değeri ile 40°C deki değere benzer aktivite göstermektedir. Enzimin bu özellikleri şu an 30°C olan ve düşük sıcaklık olarak adlandırılan deterjan sektöründen çok daha düşük sıcaklıklarda kullanılabilecek özellikte yeni bir alternatif olabilecek güçlü bir potansiye sahiptir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 10.0 ve optimum aktivite sıcaklığının 10°C olmasıi, enzimi gelecekte çok düşük sıcaklıklarda yıkama yapabilecek deterjan formülasyonları için güçlü bir aday yapmaktadır.

Diğer taraftan toprak sıcaklığının düşük olduğu ve bu nedenle gerek bitkisel üretim gerekse biyoremediasyon uygulamalarında yeterli başarının elde edilemediği uygulamalar için güçlü bir adaydır. Toprak enzimleri arasında yer alan proteaz, lipaz, amilaz, selülaz ve ksilanaz, bitkisel üretimde verimlilik ve stres koşullarına uyumda oldukça önemlidirler. Sıcaklığın düşük olduğu ve psikrofilik koşulların hakim olduğu toprak ortamlarında, sürdürülebilir üretim ve biyoremediasyon uygulamaları için *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinolitik proteaz enzimi büyük hedeflere ulaşmak için önemli bir avantaj sağlayacaktır. Enzim bu özelliği ile ekstrem psikrofilik ve mezofilik aktivite davranışı göstermektedir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz (kollajenolitik proteaz) enzimi optimum katalitik aktiviteyi 50°C de göstermiştir. Bununla birlikte enzim 0-50°C aralığında yaklaşık %91 gibi oldukça yüksek aktiviteye sahiptir. Enzim aktivitesi 60-80°C aralığında nisbeten azalarak ortalama %75 değerlerine düşmektedir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 enzimi 90°C de %96 aktivite ile ikinci bir pik oluşturmakta, 100°C de tekrar %81 değerine düşmektedir.

Enzimin optimum aktivitesini 50°C de göstermesine rağmen 90°C de ikinci ve güçlü bir aktivite göstermesi, zimogram analizindebirden fazla sayıda bağımsız aktivite bandının oluşması

ile uyum içindedir. Muhtemeldir ki parlak ve daha kalın görünen protein bandı (miktarsal olarak daha fazla enzim bulunan) 0-50°C aralığında %91 aktivitenin gerçekleştiği fragmente aittir.

İzole edilen enzim aktivite değerleri ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı dikkate alındığında, psikro-termofilik ve psikro-mezo-termofil aralıkta daha yüksek aktiviteye sahip kollajenolitik proteaz olarak tanımlanabilir. Enzim aktivite gösterdiği bütün sıcaklık değerlerinde pratikteki uygulamalar için çok güçlü bir çözüm potansiyeli oluşturmaktadır. Bununla birlikte özellikle et ürünlerinin hazırlaması, saklanması ve sürdürülebilir gıda üretimi başta olmak üzere, deterjan, yem üretimi, içecek ve tekstil sektörü gibi alanlarda kullanılabilecek güçlü bir potansiyele sahiptir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 10°C de optimum aktivite göstermiştir. Enzim 100°C de ikinci bir aktivite piki oluşturmuş olup, bu durum enzimin zimogram analizinde iki farklı aktivite bandının oluşması ile açıklanabilir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan elde edilen enzim 0°C ile 70°C arasındaki sıcaklık değerlerinde ortalama %84 katalik aktiviteye sahiptir. Enzimin 0-40 ºC aralığında ortalama %86.4 aktivite göstermesi, enzimin soğuk koşullarda nedenli yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Enzimin özellikle 0-20 ºC aralığında ortalama %88 aktivite göstermesi ekstrem cold aktif kollajenolitik proteaz özellikte olduğunu kanıtlamakta olup, oldukça dikkat çekicidir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi, termofil koşullarda da güçlü bir aktivite göstermektedir.

Kollajenolitik proteaz özelliği gösteren enzim, ağırlıklı olarak 0-20°C aralığında yüksek katalitik aktivite göstermesi nedeni ile ekstrem cold aktif olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte analiz edilen 0-100°C aralığında güçlü bir aktivite yeteneğine sahip olması, enzimin ekstrem cold-mezofil-termofil koşulların her üçünde de kullanılabilecek potansiyelde olduğunu göstermektedir. İzole edilen enzimin, düşük sıcaklık koşullarında güçlü aktivite göstermesi, başta cold aktif biyolojik deterjan ürünleri gibi deterjan formülasyonları, yara iyileştirme ve rejenerasyon uygulamaları, kollojen atıklarının neredeyse enerji harcamadan hidroliz edilmesini sağlayacak amino asit üretim çalışmaları ve kişisel bakım ürünü formülasyonları ile kollojen kaynaklı atıkların doğal ortamda bertaraf edilmesi uygulamaları için güçlü bir potansiyele sahiptir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi 20-80°C aralığındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen 60 dakikalık ön inkübasyon sonucunda kontrole göre aktivitede kısmen de olsa indüklenme gerçekleşmiş ve %100'ün üzerinde stabil kalmıştır. Enzim 90 ve 100°C lerde gerçekleştirilen ön inkübasyon işleminden sonra orijinal aktivitesini sırası ile %93 ve %91 düzeyinde korumuştur. Bu sonuçlar enzimin 90 ve 100°C'ler de orijinal aktivitesini yaklaşık %7 ile 9 oranında kaybettiğini göstermektedir. Enzimin katalitik aktivitesi dikkate alındığında, psikrotolerant-mezofil-termofil aralıkta güçlü bir termostabiliteye sahip olduğu görülmektedir.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi 5, 10 ve 15°C de 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda indüklenmiş ve orijinal aktivitesini %101 koruyarak tam stabil kalmıştır. İzole

edilen enzim 20, 30 ve 40°C'lik ön inkübasyon sıcaklıklarındaki iinkübasyonlardan sonra aktivitesini %100 korumuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan elde edilen kollajenaz enzimi, ön inkübasyon gerçekleştirilen 110°C hariç 0-110°C aralığındaki bütün sıcaklık değerlerinde, inhibisyon yerine ciddi şekilde indüklenmiştir. Enzimin kısmen inhibe olduğu 110°C dışındaki sıcaklıklar dikkate alındığında kalan aktivite değerinin, kontrole göre ortalama %16 daha yüksek olduğu görülmektedir.

İnkübasyon sıcaklıkları arasında en yüksek indüklenmenin %125 ile 40°C de gerçekleştiği, bunu %120 ile 10°C ve %119 ile 90°C'nin izledikleri görülmektedir. Üç farklı sıcaklık değerinde gerçekleşen birbirine yakın değerlerdeki indüklenmeler, enzimin bütün sıcaklık değerlerinde stabilitesini koruduğunu ve ısısal ön işlemin enzim aktivitesini artırıcı yönde etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ortaya çıkan bu sonuç, enzimin aktif merkezini kuşatan kovalent ve hidrojen bağlarının ısı ile kopması sonucu enzim substrat etkileşimini daha güçlü gerçekleşmesi sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilerek karakterize edilen kollajenaz enzimi 60 dakika ısısal ön inkübasyon işlemi yapılan sıcaklıklardan 0-40°C aralığında orijinal aktivitesini ortalama %92 korumuştur. Enzim aktivitesi 50°C den başlayarak 100°C'ye kadar ısısal ön işlem uygulanan sıcaklık değerlerinde ciddi şekilde indüklenmiş ve katalitik aktivitesi kontrole göre belirgin şekilde artmıştır. Enzimdeki en güçlü indüklenme 80°C de gerçekleşmiş ve %117 enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzimde gerçekleşen indüklenme ve buna bağlı oluşan aktivite artışı 70, 80 ve 90°C lerde dikkati çekecek düzeyde belirginleşmiş ve ortalama %113 enzim aktivitesi gerçekleşmiştir. Ön inkübasyon sıcaklığı olarak kullanılan 100 ve 110°C'lerde ise enzim aktivitesi sırası ile %12 ve %13 oranında inhibe olarak %88 ve %87 kalan aktivite elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan elde edilen kollajenaz enzimi, izole edilen diğer enzimlerden oldukça farklı bir termal stabilite davranışı göstermiş ve aktivite termofil koşullarda indüklenmiştir. Ön inkübasyon uygulanan sıcaklık değerlerinin toplamında, enzim güçlü şekilde stabilitesini korumuş ve ortalama %99 stabil kalmıştır. Enzim bu özelliği ile ekstrem cold-termofil aralıkta güçlü termostabiliteye sahip olup, ekstremofil özellik göstermektedir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi 40 saatlik ön inkübasyon işleminden sonra yapılan aktivite analizinde, bütün pH değerlerinde stabilitesini korumuştur.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi pH 6.0-13.0 aralığındaki pH değerlerinde 40 saat ön inkübasyon uygulandıktan sonra standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Enzim bütün pH değerlerinde stabil kalmış ve indüklenmiştir. En yüksek indüklenme pH 6.0 da gerçekleşmiş ve aktivite %114 e yükselmiştir. pH 6.0-9.0 aralığında ortalama %110 aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim pH 12.0 ve 13.0 değerlerinde %1 indüklenerek ekstrem pH değerlerinde de stabilitesini tam korumuştur. Bu özellikleri ile asidik

koşullarda daha yüksek olmak üzere asido-ekstrem alkali koşullarda stabil enzim özelliği göstermektedir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 kollajenaz enzimi pH 7.0 de indüklenerek %104 aktivite değeri elde edilmiş, diğer bütün pH değerlerinde ortalama %5 inhibe olmuştur. Bir başka ifade ile enzim asido-ekstrem alkali pH aralığında %95 stabil kalmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi, pH stabilitesi açısından analiz edilen diğer enzimlerden büyük farklılık göstermiş ve bütün pH değerlerinde yaklaşık %40 inhibe olmuştur. İnhibisyon bütün pH değerlerinde birbirine çok yakındır. Enzimin pH stabilitesi diğer enzimLere görse düşüktür.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi %3-35 konsantrasyonda NaCl kullanılarak 60 dakika ön inkübasyona bırakılmış ve kalan enzim aktivitesi saptanmıştır. Enzim %35 dışındaki bütün NaCL konsantrasyonlarında kontrolden daha yüksek aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim %10 ve %15 NaCL konsantrasyonunda %104 aktivite göstermiştir. Enzim en yüksek aktivitenin gerçekleştiği konsantrasyon dikkate alındığında orta düzeyde halofilik olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte %3 ve %30 arasındaki bütün konsantrasyonlarda ortalama %103 enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim bu özellikleri ile özellikle deri işleme endüstrisinde kullanılma potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra, deri endüstrisi atıksularının enzimatik arıtılması ve çoraklaşmış topraklardaki biyoremediasyon uygulamaları için güçlü bir adaydır.

Bacillus albus SK-36 suşu kullanılarak üretilen ve kısmi saflaştırma ile izole edilen keratinaz enziminin farklı %NaCL konsantrasyonlarındaki davranışı analiz edilmiş ve en yüksek aktivitenin %113 ile %10 ve %15 NaCL konsantrasyonlarında gerçekleştiği bulunmuştur. Enzim %7.5-20 aralığındaki konsantrasyonlarda ortalama %113 aktivite değerine sahiptir. Enzim %25 ve %30 NaCL konsantrasyonlarında kontrolden daha yüksek aktivite göstererek sırası ile %105 ve %104 aktivite değeri elde edilmiştir.

Enzimin %3-%30 aralığındaki katalitik aktivite etkinliği ortalama %108 olmuştur. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enzimi ekstrem halofilik ve indüklenebilir özelliktedir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi ile karşılaştırıldığında % 3-30 aralığındaki NaCL konsnatrasyonlarında %4 daha yüksek katalitik aktivite sergilemiştir. Enzimin yüksek tuz konsantrasyonları ile çalışan endüstriyel uygulamalarda, özellikle deri endüstrisi uygulamalarında kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin en yüksek aktiviteyi %110 ile %7.5 NaCL konsanttrasyonda gösterdiği bulunmuştur. İzole edilen enzim çalıştığımız enzimLer içerisinde %35 konsantrasyonda %102 aktivite gösteren tek enzim olmuştur. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzimi %7.5 ile %35 arasındaki değerlerde ortalama %105 katalitik aktivite göstermesi neden ile ekstrem halofil özelliğe sahiptir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi, en yüksek aktivitesini %93 ile %20 NaCL konsantrasyonunda göstermiştir. Kollajenaz enzimi %10-20 aralığındaki NaCL

konsantrasyonlarında ortalama %91 katalitik aktiviteye sahiptir. İzole edilen enzim %3-%35 aralığındaki NaCL konsantrasyonlarında ortalama %84 aktivite göstermiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen enzim, *Brevibacillus agri* SK-27, *Bacillus albus* SK-36 keratinaz ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzimLerinden oldukça farklı bir davranış göstermiş ve kontrole göre %16 inhibe olmuştur. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi ile karşılaştırıldığında yaklaşık %20 daha düşük aktiviteye sahiptir.

Keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin 5 ve 10 mM konsantrasyonda inhibitör, metal iyonları, şelatör bileşikler, deterjanlar, okside edici ajanlar, kaotropik ajan ve yüzey aktif bileşiklere karşı etkinliğinin saptanması için 60 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve kalan aktivite değerleri açısından değerlendirme yapılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 10 mM konsantrasyondaki ajanlara karşı farklı davranışlar göstermiştir. Enzim EDTA ile muamele edildiğinde stabilitesini %100 korumuş, PMSF de ise indüklenerek aktivitesi %103 e yükselmiştir. Keratinaz enzimi SDS ile muamele edildiğinde aktivitesini %100 korumuş, H_2O_2 ile %101, triton X-100 ile %102 oranında indüklenmiştir. Enzim anyonik ve non anyonik deterjanlar ile okside edici ajandan etkilenmemiş tam tersi indüklenmiştir. $ZnCL_2$ ile %102, $BaCL_2$ ile %101 indüklenme gerçekleşmiştir. Enzim $CaCL_2$ ile %7, Üre ile %8 ve tween-20 ile %10 inhibe olurken, tween-80 ile indüklenmiş ve %101 aktivite değeri elde edilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 5 mM konsantrasyonda aynı ajanlarla 60 dakikalık ön inkübasyona bırakılmış ve aktivite analizi gerçekleştirmiştir. Daha düşük konsantrasyonda enzim aktivitesinde 10 mM a göre farklılıklar meydana gelmiştir. Enzim EDTA ile indüklenerek %101 aktivite gösterirken PMSF ile 10 mM da elde edilen sonuçla aynı değer elde edilmiş ve %103 aktivite saptanmıştır. Tween-20 ile indüklenerek %103 aktivite elde edilmiştir. Tween-20, 10 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini yaklaşık %10 inhibe etmiştir. Enzimin deterjanlara karşı davranışı incelendiğinde SDS de değişiklik saptanmazken, triton X-100 de aktivitenin yaklaşık %9 inhibe olduğu görülmektedir. Enzim 5 mM $CaCL_2$ konsantrasyonunda yaklaşık %101 aktivite değerine ulaşmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin farklı kimyasal ajanlarla gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan elde edilen keratinaz enzimine göre oldukça farklı davranış gösterdiği saptanmıştır.

İzole edilen enzim kullanılan bütün ajanlar ile indüklenmiş ve aktivite artışları meydana gelmiştir. En yüksek indüklenme $ZnCL_2$ ile %117 olarak gerçekleşmiştir. İnhbitörler arasında PMSF ile yaklaşık %112 indüklenirken EDTA da %102'lik aktivite artışı gerçekleşmiştir. Deterjanlardan SDS de %111, triton X-100 de %101 aktivite artışı gözlenmiştir. Okside edici ajan H_2O_2 ile %112 aktivite artmıştır. Metal iyonları arasında $CoCL_2$ de %112, $CaCl_2$ de %105, $BaCL_2$ de %113 aktivite artmıştır. Tween-20 ve Tween-80 enzim aktivitesini sırası ile %113 ve %114 artırmıştır. Kaotropik ajan olan üre enzim aktivitesinde %113 artışa neden olmuştur. *Bacillus albus*

SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi 10 mM konsantrasyonda kullanılan kimyasallara karşı ortalama %111 aktivite artışı göstermiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 5 mM konsantrasyondaki kimyasal ajanlara karşı 10 mM konsantrasyondakilerden daha yüksek aktivite artışı göstermiştir. Enzim en yüksek aktivite artışını %129 ile $CaCL_2$ e karşı göstermiştir. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde Ca^{+2} bulunduğunun göstergesidir. 10 mM ile karşılaştırıldığında gerçekleşen artış yaklaşık %24 daha yüksektir. İzole edilen enzim EDTA ya karşı %116 aktivite artışı gösterirken, PMSF ile muamele edildiğinde %103 aktivite saptanmıştır. Her iki inhibitör ile 5 mM konsantrasyonda elde edilen değer, 10 mM konsantrasyona göre oldukça farklı olup, EDTA da %14 aktivite artışı meydana gelirken, PMSF de %7 düşüş gerçekleşmiştir. Enzim serino-metallo özelliktedir. Benzer durum tween-80 için söz konusu olup, 10 mM konsantrasyona göre aktivitede yaklaşık %10 düşüş meydana gelmiştir. Deterjan ve okside edici ajanlarda da aktivitede artış gerçekleşmiş ve triton X-100 de daha yüksek artış görülmüştür. Nonanyonik triton X-100 deki aktivite artışı 10 mM konsantrasyona göre yaklaşık %12 düzeyindedir. Enzimde 5 mM konsantrasyonda kullanılan kimyasallara karşı genel olarak %114 aktivite artışı meydana gelmiştir.

İki farklı suştan izole edilen keratinaz enzimleri içerisinde *Bacillus albus* SK-36 suşuna ait olan enzim *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen enzime göre kullanılan kimyasal ajanların 5 ve 10 mM konsantrasyonlarının her ikisinde de genel olarak daha stabil kalmış ve enzim aktivitesi inhibe olma yerine indüklenmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen enzim toplamda 5 mM konsantrasyonda %114, 10 mM konsantrasyonda %111 aktivite artışı yönünde etki göstermiş ve hiçbir ajanda kontrole göre inhibisyon saptanmamıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminde bütün ajanlara karşı 5 mM konsantrasyonda ortalama %100 aktivite gerçekleşmiş, 10 mM konsantrasyonda ise %99 aktivite elde edilmiştir. Kullanılan ajanlar içerisinde 10 mM konsantrasyonda $CaCL_2$, üre ve tween-20 de sırası ile %7, %8 ve %10 inhibisyon saptanmıştır. Enzim 5 mM triton X-100 de %11, tween-80 de %6 inhibe olmuştur. En önemli farklılıklardan bir diğeri $CaCL_2$ de gözlenmiş ve 10 mM konsantrasyonda %7 inhibe olmuştur.

İzole edilen her iki suşa ait keratinaz enziminin her iki konsantrasyonda inhibitörlerle inhibe olmaması, özellikle *Bacillus albus* SK-36 suşundan elde edilen enzimde ciddi şekilde aktivite artışı meydana gelmesi, enzimLerin daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini ve amino asid sekans analizi ile aydınlatılmasının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bunların ötesinde özellikle *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin deterjanlar ve okside edici ajanla indüklenmesi, enzimin deterjan endüstrisi, tekstil endüstrisi ve ağartıcıların kullanıldığı bütün üretim proseslerinde öncelikle kullanılabilecek çok güçlü bir potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen enzim 10 mM konsantrasyonda kimyasal ajanlarla analiz edildiğinde birçok ajanda inhibe olduğu, bazılarında ise ciddi şekilde indüklendiği görülmektedir. Enzim β-merkaptoetanolün 10 mM konsantrasyonunda güçlü şekilde

indüklenerek %222 aktivite değeri elde edilmiştir. Enzimin merkaptoetanol ile indüklenmesi, molekülde tiol grupları olduğunu göstermektedir. Triton X-100 deterjanına karşı %185 aktivite artışı gözlenmiştir. Tween-80 bileşiğinde %150 aktivite artışı bulunmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi EDTA ile %28, PMSF ile %17 oranında inhibe olmuştur. Her iki inhibitör ile de kısmi olarak gerçekleşen inhibisyona göre enzim metallo-serin karakterdedir. Enzimin $CaCL_2$ ile %20 inhibe olduğu görülmektedir. Bu durum enzimin kalsiyum bağımLı olduğunu göstermektedir. Yüzey aktif bileşiklerden tween-20 enzim aktivitesini %62 inhibe ederken, tween-80 aktiviteyi %50 artırmıştır. Enzim aktivitesinde anyonik deterjan SDS ile %38 inhibisyon gerçekleşirken, nonanyonik deterjan triton X-100 ile aktivite %85 artış göstermiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin davranışında 5 mM konsantrasyondaki kimyasal ajanlara karşı 10 mm konsantrasyona göre oldukça farklılıklar saptanmıştır. Enzim yaklaşık %50 düşüş olsa da en yüksek aktiviteyi β-merkaptoetanole karşı %199 düzeyinde göstermiştir. Buna karşılık 10 mM konsantrasyonda güçlü şekilde tween-80 ve triton X-100 ajanlarında ciddi inhibisyon meydana gelmiştir. Tween-80 de %65, triton X-100 de %31 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Her iki ajanda görülen aktivite düşüşü 5 mM da sırası ile %85 ve %154 olarak gerçekleşmiştir. İnhibitör etkisi gösteren ajanlardan EDTA da %75, PMSF de %78 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. PMSF 5 mM konsantrasyonda %5 daha fazla inhibe olmuştur. Her ne kadar inhibisyon değerinde düşüş olsa da enzimin metallo-serin özelliğini değiştirecek düzeyde değildir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 10 mM konsantrasyondaki ajanlarla 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra analiz edildiğinde enzim, en yüksek aktiviteyi %229 ile β-merkaptoetanol ajanında göstermiştir. Enzim EDTA ile % 34, PMSF ile %27 oranında inhibe olmuştur. Yüzey aktif ajanlar enzimi ortalama %80 inhibe etmişlerdir. Deterjanlardan SDS %58, triton X-100 %82 inhibe etmiştir. Enzim H_2O_2 e karşı %71 oranında kararlılığını korumuştur. Enzim IAA ve $MnCL_2$ tarafından indüklenmiş ve sırası ile %112 ve %116 aktivite değeri elde edilmiştir. İzole edilen enzim $CaCL_2$ tarafından %35, $ZnCL_2$ tarafından %28 inhibe edilmiştir. Metal iyonları arasında $CoCl_2$ aktiviteyi %25 inhibe etmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzim aktivitesi $CoCL_2$, β-merkaptoetanol, ve $MnCL_2$ ile indüklenmiş ve sırası ile enzim aktivitesinde %108, %212 ve %103 artış gerçekleşmiştir. Deterjanlardan SDS %84 ve triton X-100 %84 ile enzimi aynı oranda inhibe etmişlerdir. Kollajenaz enzimi 10 mM IAA konsantrasyonunda indüklenirken 5 mM konsantrasyonda %10 inhibe olmuştur. Enzim 5 mM konsantrasyondaki bir çok ajan tarafından 10 mM konsantrasyona göre daha fazla inhibe edilmişlerdir. Bu durum oldukça farklı bir davranıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi 5 mM konsantrasyonda EDTA ile %81, PMSF ile %83 stabil kalmıştır. Enzim metallo-serin karakterindedir.

Çalışmada karakterize edilen keratinaz ve kolojenaz enzim aktivitesine farklı konsantrasyondaki farklı kimyasal ajanların etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, keratinaz ve kollajenaz enzimlerinde oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Keratinaz enzimlerinden *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enzimi 10 mM konsnatrasyonda genel olarak ve ajan düzeyinde *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen enzime göre daha fazla inhibe olmuştur. Aynı konsantrasyonda *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi bütün ajanlar düzeyinde hiç inhibe olmamış, tam tersi ciddi şekilde indüklenmiştir. Bütün ajanların ortalaması alındığında %111 aktivite artışı söz konusudur. Her iki suştan izole edilen keratinaz enzimLerinin 5 mM konsantrasyondaki ajanlarda 10 mM a göre daha stabil kaldıkları görülmektedir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen enzim, 5 mM da genel olarak %100 stabil kalmıştır. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen enzim ise 5 mM konsantrasyonda 10 mM konsantrasyona göre daha fazla indüklenmiş ve ortalama aktivite %114 değerine ulaşmıştır.

Kollajenaz enzimleri analiz edildiğinde *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 kollajenaz enzimLerinin genel olarak her iki konsantrasyonda da inhibe oldukları görülmektedir. Bununla birlikte her iki suştan elde edilen kollajenaz enzimi β-merkaptoetanol ile ciddi şekilde indüklenmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunda 10 mM ve 5 mm konsantrasyonda kullanılan ajan özelinde oldukça ilginç davranış farklılıkları saptanmıştır. Triton X-100 enzim aktivitesini 10 mM konsantrasyonda güçlü şekilde indüklemiş ve %185 aktivite değeri elde edilmişken, 5 mM konsantrasyonda %69 oranında inhibe etmiştir. Tween-80, enzimi 10 mM konsantrasyonda güçlü şekilde indüklemiş ve %155 aktivite elde edilmişken, 5 mM konsantrasyonda %35 inhibe etmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi β-merkaptoetanol ile güçlü şekilde indüklenmiştir. Enzim 10 mM konsantrasyonda IAA ile indüklenmiş ve %112 aktivite değeri elde edilmişken, 5 mm konsantrasyonda IAA ile %10 inhibe olmuştur. Buna karşılık $CoCL_2$ 10 mM konsnatrasyonda enzimi %25 inhibe ederken, 5 mM konsantrasyonda indüklemiş ve %108 aktivite elde edilmiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan elde edilen kollajenaz enzimi 5 mM konsantrasyonda 10 mM konsantrasyona göre SDS ve triton X-100 de inhibisyon açısından daha etkili olmuştur.

Genel olarak değerlendirildiği ve enzimler düzeyinde karşılaştırıldığı zaman *Bacillus albus* SK-36 suşuna ait keratinaz enziminin kullanılan kimyasalların her iki konsantrasyonunda da indüklendiği ve aktivite artışı gerçekleştiği görülmektedir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enziminin kullanılan ajanlara karşı stabilitesini %100 koruduğu ve genelde aktivitenin indüklendiği saptanmıştır.

Kollajenaz enzimlerinde genel olarak enzim aktivitesinin kimyasal ajanlarla inhibe olduğu görülmektedir. Bununla birlikte her iki suştan izole edilen enzimlerin β-merkaptoetanol ile çok güçlü şekilde indüklendikleri ve diğer deterjanlardan olumsuz yönde etkilendikleri belirlenmiştir.

Substrat miktarın enzim üretimine etkisini saptamak için *Brevibacillus agri* SK-27, *Bacillus albus* SK-36, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşları farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak keratinaz suşları için tavuk tüyü unu, kollajenaz suşları için kemik unu kullanılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin üretimi üzerine substrat miktarının zamana ve farklı inkübasyon sıcaklığına göre nasıl etki gösterdiğinin saptanması için 30°C de 72 ve 120 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresinin yetmiş iki saat olduğu enzim üretim çalışmasında kullanılan bütün substrat konsantrasyonlarında kontrole göre daha düşük üretim gerçekleşmiştir. Elde edilen ortalama enzim değeri %98 olmuştur. İnkübasyon süresi yüz yirmi saat uygulandığı zaman kullanılan bütün substrat konsantrasyonlarında kontrole göre yaklaşık %11 daha fazla enzim üretilmiştir. Literatürde optimum keratinaz üretiminin ortalama 120 saatte gerçekleştiği belirtilmektedir (Saibabu ve ark., 2013). *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan elde edilen veriler literatür ile tam uyum içindedir.

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimine substrat, sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisinin saptanması için yapılan çalışmalarda yetmiş iki saatlik inkübasyon periyodunda %3-30 konsantrasyonda substrat kullanılmış ve inkübasyon 30°C de gerçekleştirilmiştir.

Kontrol ile karşılaştırıldığında %3, 5 ve 7.5 substrat konsantrasyonunda %106 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Yüzde 10 substrat konsantrasyonundan başlayarak %30 a kadar enzim üretiminin giderek düştüğü görülmektedir. Yapılan analizlerde %15, 20, 25 ve 30 substrat ile sırası ile %103, 102, 101, 98 ve 96 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman bütün substrat konsatrasyonlarında ortalama %103 daha fazla enzim üretildiği saptanmıştır.

İnkübasyon süresinin yüz yirmi saat uygulandığı üretim denemelerinde %3 konsantrasyonda enzim üretiminin kotrole göre oldukça düşük gerçekleştiği ve %87 enzim elde edildiği saptanmıştır. Substrat konsantrasyonu %5-30 aralığında enzim üretiminin hızlı bir artış gösterdiği ve %10-15 substrat kullanıldığı zaman kontrole göre %25 daha fazla enzim elde edildiği bulunmuştur. %20, 25 ve 30 konsantrasyonda optimum üretim değerine göre kısmen düşüş görülse de ortalama %121 enzim elde edilmiştir. %5 ve 7.5 konsantrasyonlarda optimum üremenin gerçekleştiği değerden yaklaşık %9 daha düşük enzim üretilmiştir. Üretim için kullanılana %3 susbstrat dışındaki substrat değerlerinde elde edilen ortalama enzim üretimi ortalama %121 gerçekleşmiştir.

Keratinaz suşları karşılaştırıldığında her iki inkübasyon periyodunda da enzim üretiminin *Bacillus albus* SK-36 suşunda kontrole göre arttığı, 72 saatte ortalama %103, 120 saatte ortalama %121 enzim üretildiği saptanmıştır. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda 72 saatlik inkübasyonda %98 enzim üretildiği, 120 saatlik dönemde ise kontrole göre %11 daha fazla enzim elde edildiği saptanmıştır.

Kollajenaz enzim üretimine substrat miktarının etkisinin saptanması için iki farklı sıcaklıkta farklı inkübasyon sürelerinin etkisi araştırılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı olarak 10 ve 30°C, inkübasyon süresi olarak 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saatlik periyotlarda inkübasyon ve analizler gerçekleştirilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 10°C inkübasyon sıcaklığında 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinde en yüksek enzim üretimi sırası ile %20 substratta %428, %15 konsnatrasyonda %310, %25 konsantrasyonda %321, %25 konsantrasyonda %396, %20 konsantrasyonda %283 ve %25 konsnatrasyonda %364 enzim üretilmiştir. En yüksek enzim üretiminin 24 saatlik süreçte ve %20 substrat konsantrasyonunda %428 gerçekleştiği bulunmuştur. Kontrole göre enzim üretiminde yaklaşık %4 artış meydana gelmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 30°C inkübasyon sıcaklığında 24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saatlik inkübasyon dönemLerinde en yüksek enzim üretimi sırası ile %20 konsantrasyonda %656, %20 konsantrasyonda %476, %25 konsantrasyonda %391, %25 konsnatrasyonda %407, %25 konsantrasyonda %389, %25 konsantrasyonda %370 enzim üretimi elde edilmiştir. En yüksek enzim üretimi 24 satlik inkübasyon süresinde %20 substrat kullanıldığı zaman %656 enzim üretilmiştir. Bu inkübasyon süresinde enzim üretimindeki artış kontrole göre yaklaşık 7 kat daha yüksektir. Farklı inkübasyon süreleri incelendiğinde 48 saatte 4.8, 72 saatte 3.9, 96 saatte 4, 120 saatte 3.9 ve 168 saatte 3.7 kat enzim artışı gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunda her iki inkübasyon sıcaklığında da 24 saatlik inkübasyon süresinde diğer inkübasyon sürelerinden daha fazla miktarda enzim üretilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 10°C olduğu üretim sürecinde 24 saatlik dönemde diğer inkübasyon sürelerine göre yaklaşık %26, 30°C de yaklaşık %42 daha yüksek enzim üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon sıcaklıkları karşılaştırıldığında 30°C nin suşun enzim üretiminde oldukça etkili olduğu ve toplamda %508, 10°C de toplamda %350 enzim elde edildiği bulunmuştur. İnkübasyon sıcaklığının 30°C olması ile 10°C ye göre enzim üretimi yaklaşık %69 daha fazla gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun 168 saat sürdürülen enzim üretim çalışmasında en yüksek üretimin ilk 24 saatte oldukça yüksek düzeyde gerçekleşmesi, suşun üreme eğrisinden elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir. Üreme eğrisi sonuçlarında optimum üremenin 6 inci saatte gerçekleştiği bulunmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 24 saatlik üretim süresinde her iki sıcaklıktada en yüksek enzim sentezi %20 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin 48 saat olarak uygulandığı süreçte 10°C de %15, 30°C de %20 substrat konsantrasyonunda en fazla enzim üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi 72, 96 ve 168 saat uygulandığında her iki sıcaklık değerinde de optimum enzim üretiminin %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiği bulunmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile gerçekleştirilen çalışmalarda 24 saatlik inkübasyon periyodunda 10°C de %20 substrat konsantrasyonunda %423 enzim elde edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 30°C olduğunda %20 substrat konsantrasyonunda %610 enzim elde edilmiştir.

İnkübasyon süresi 48 saat uygulandığı zaman 10°C de %15 substrat konsantrasyonunda %281 enzim üretilmişken, 30°C de %20 substrat konsantrasyonundaki enzim üretimi %406 olmuştur. Enzim üretimi için 72 saatlik inkübasyon süresi kullanıldığında 10°C de %25 substrat bulunan besiyerinde %380 enzim üretilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 30°C ye yükseltildiğinde en yüksek enzim sentezi %20 substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sentezlenen enzim miktarı %332 bulunmuştur.

İnübasyon süresi olarak 96 saat uygulandığı zaman 10°C'lik inkübasyon sıcaklığında en yüksek enzim sentezi %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiş ve üretilen enzim %329 a ulaşmıştır. Enzim üretimi için 120 saatlik inkübasyon süresi uygulandığı zaman en yüksek enzim üretimi 10°C de %25 substrat konsantrasyonunda ölçülmüş ve %339 enzim elde edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 30°C olarak uygulandığı zaman en yüksek üretim %25 substrat konsantrasyonun elde edilmiş ve %271 enzim değerine ulaşılmıştır. İnkübasyon süresi 168 saate çıkartıldığında 10°C de en yüksek enzim %25 substrat konsantrasyonunda gerçekleşmiş ve %386 enzim değeri elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunda en yüksek en fazla enzim üretimi %20 substrat konsantrasyonunda ve 24 saatlik inkübasyon süresinde gerçekleşmiştir. İnkübasyon sıcaklığı olarak 30°C uygulandığında 24 saatlik inkübasyon süresinde 10°C ye göre yaklaşık %30 daha fazla enzim üretimi elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunda 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinin her ikisinde ile 10 ve 30°C'lik inkübasyon sıcaklıklarında 96'ıncı satte düşüş gösteren enzim üretimi tekrar artışa geçmiştir. Bununla birlikte 96, 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinin üçünde de en yüksek enzim üretimi her iki inkübasyon sıcaklığında da %25 substrat knsantrasyonunda elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun üreme ve en yüksek enzim üretimini gerçekleştirdiği zamanın inkübasyon eğrisinde 6.cı saatte %85, 15'inci saate %100 seviyesine ulaştığı saptanmıştır. Enzim üretimine inkübayon zamanının etkisinden elde edilen bulgular ile (24 saatte en yüksek enzim üretilmiştir) üreme eğrisi ve en yüksek enzim sentezleme zamanına ait bulgular aynı zaman diliminde olup, elde edilen bulgular birbirini desteklemektedir.

Kollajenaz üretiminde kullanılan *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşlarının her ikisi de en yüksek enzim sentezini 24 saatlik inkübasyon süresinde gerçekleştirmişlerdir. Her iki suşta da 30°C inkübasyon sıcaklığında de 10°C ye göre yaklaşık %40 daha fazla enzim üretmiştir.

Enzim üretiminde azot kaynaklarının etkisini saptanması için maya özütü, et özütü, malt ektraktı, pepton, jelatin, üre, sodyum nitrat, soya unu, kazein, tripton ve sodyum nitrat substrat olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan dört bakteri suşunda da aynı substratlar kullanılarak farklı inkübasyon sürelerinde en yüksek enzim sentezinin sağlayan substrat saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşu ile yapılan üretimde 72 saatlik inkübasyonda en yüksek enzim üretimi %111 ile amonyum nitratta elde edilmiştir. Elde edilen sonuç diğer substratlara göre açık

ara yüksektir. İnkübasyon süresi 120 saat olarak belirlendiğinde en yüksek enzim üretiminin %108 düzeyinde peptonda gerçekleştiği, bunu %107 ile amonyum nitrat, tripton, üre, jelatin ve et özütünün izlediği görülmüştür. Enzim üretimi için inkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığı zaman 120 saate göre düşüş olmakla birlikte en yüksek etkinin %103 ile peptonda gerçekleştiği bulunmuştur. Bütün substratlar birlikte değerlendirildiğinde en yüksek enzim üretimi 120 saatlik inkübasyon süresinde elde edilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşu 72 saatlik periyotta %101, 120 saatlik periyotta %105 ve 168 saatlik inkübasyonda %100 enzim sentezi gerçekleşmiştir. Yetmiş iki saatlik inkübasyon süresinde amonyum nitrat dışındaki bütün substratlarda yaklaşık %100 enzim üretimi gerçekleşirken, 120 satlik dönemde enzim üretiminin soya dışındaki bütün substratlarda yaklaşık %6 yükseldiği, soyada ise %98 e düştüğü görülmüştür. İnkübasyon süresinin 168 saat uygulandığı periyotta 120 saatlik sürece göre sodyum nitrat dışındaki bütün substratlarda ortalama %103 düzeyinde artış meydana gelmiştir. Sodyum nitratta ise enzim üretimi %89 seviyesine düşerek ciddi bir azalma meydana gelmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimine farklı azot kaynaklarının etkisinin saptanması için yapılan çalışmalarda 72 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek enzim üretimi %%101 ile et özütünde gerçekleşmiştir. Et özütü dışındaki diğer substratlarda dalgalanma gözlenmiştir.

İnkübasyon süresi 120 saate çıkarıldığında en yüksek enzim üretimi %102 ile sodyum nitratta elde edilmiştir. Substratların enzim üretimine etkisi daha dengeli duruma gelmiş ve ortalama %99 enzim üretimi sağlanmıştır. İnkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığında en yüksek enzim üretiminin %101 ile maya ve et özütünde gerçekleşmiştir.

Bacllus albus SK-36 suşunun en fazla keratinaz ürettiği inkübasyon periyodu %99 ile 120 saat olurken, 72 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinde %98 enzim üretilmiştir. Keratinaz üretici olarak kullanılan *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun enzim üretimi *Bacillus albus* SK-36 suşundan daha yüksek gerçekleşmiş, fakat her iki suştada en fazla enzimin 120 saatte üretildiği bulunmuştur.

Kollajenaz enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin saptanması için yapılan üretim çalışmalarında 96, 120 ve 144 saatlik inkübasyon süreçleri kullanılmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretiminde 96 saatlik inkübasyonda en yüksek enzim sentezi %145 ile malt ekstraktında elde edilmiştir. Üre kullanılan üretimde %92 enzim elde edilirken, diğer bütün substratlarda kontrolden oldukça yüksek değerlerde gerçekleşmiştir. Malt ekstraktını sırası ile maya ekstraktı, et özütü, pepton, jelatin, tripton, kazein ve soya unu izlemiş ve %134, %131, %124, %123, %118, %109 ve %109 enzim üretimi gerçekleşmiştir.

İnkübasyon süresinin 120 saat olarak uygulandığı enzim üretim çalışmasında en yüksek enzim sentezi %177 ile malt özütünde elde edilmiştir. Malt özütünü sırası ile pepton %172, et özütü %169, maya özütü %168, jelatin %142, soya unu %142, kazein %138, sodyum nitrat %111

ve üre %108 enzim sentezi gerçekleşerek izlemişlerdir. Buna karşılık 96 saatlik üretim periyodunda tripton ile %118, amonyum nitrat %101 enzim üretimi gerçekleşirken, 120 saatlik periyotta tripton ve amonyum nitrat etkisiz kalmış ve enzim üretimi ciddi şekilde düşerek sırası ile %83 ve %77 gerçekleşmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun keratinaz sentezinde azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmada 144 saatlik inkübasyonda en yüksek enzim üretimi %178 ile malt özütünde elde edilmiştir. Diğer substratlarda sırası ile maya %176, et özütü %164, jelatin %151, pepton %149, soya unu %135, tripton %128, kazein %120 ve amonyum nitrat %107 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Enzim üretiminde 120 saatlik inkübasyon sürecinde üre ve sodyum nitrat sırası ile %108 ve %111 etki gösterirken, 144 saatlik inkübasyon sürecinde belirgin şekilde düşerek %93 ve %96 enzim elde edilmiştir. Buna karşılık 120 saatlik inkübasyonda enzim üretiminde tripton %83, amonyum nitrat %77 etki gösterirken, 144 saatlik inkübasyonda tripton %128, amonyum nitrat %107 etkili olmuştur.

İnkübasyon süreleri arşılaştırıldığında her üç inkübasyon süresinde de en yüksek enzim üretimi malt özünde gerçekleşmiştir. Üç inkübasyon süresi arasında 120 ve 144 saatlik sürelerde 96 saatlik döneme göre yaklaşık %35 daha fazla enzim üretilmiştir.

Bacillus tropicus suşu ile gerçekleştirilen 96 saatlik inkübasyon süresinde en fazla enzim üretimi %199 ile kazein kullanıldığında elde edilmiştir. Kazeini sırası ile %185 ile üre, %164 ile tripton, %159 ile malt özütü, %158 ile et özütü, %152 ile maya özütü, %142 ile izlemiştir. Sodyum nitrat farklı bir davranış sergilemiş ve enzim üretime kontrole göre %4 daha düşük etki göstermiştir.

İnkübasyon süresinin 120 saat uygulandığı üretim sürecinde en yüksek en üretimi %195 ile kazeinde elde edilmiştir. Kazeini sırası ile %162 malt özütü ve %150 ile üre izlemiştir. Sodyum nitrat bu sıcaklıkta da en düşük etkiyi göstermiş ve %92 enzim üretimi elde edilmiştir. İnkübasyon süresi 144 saat olarak uygulandığında en yüksek enzim üretimi %257 ile maya özünde gerçekleşmiştir. Maya özütünü %174 ile kazein, %160 ile malt özü, %144 ile üre izlemiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunun kollajenaz enzim üretiminde 96 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerinde kazein yaklaşık %199 ile en etkili substrat olurken, 144 saatlik inkübasyonda maya özütü %257 ile kazeinden ciddi şekilde ayrılmıştır.

Kollajenaz enzim üretimi için kullanılan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda bütün inkübasyon sürelerinde en yüksek enzim sentezinin malt özünde gerçekleştiği saptanmıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda 96 ve 120 saatlik inkübasyon süresinde kazein ve 144 saatlik inkübasyonda maya özütü en fazla enzim sentezi gerçekleştiren azot kaynağı olmuştur.

Enzim üretimine en yüksek katkıyı yapan azot kaynağı kullanılarak keratinaz ve kollajenaz üreticisi suşlar ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında en yüksek enzim sentezinin elde edildiği miktarın saptanması için analizler yapılmıştır. Seçilen substrat 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 ve 0.3 g/Lkonsantrasyonlarda kullanılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşu ile gerçekleştirilen çalışmada substrat olarak pepton seçilmiş ve 72 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek enzim üretiminin %103 ile 0.2 g/L miktarda elde edilmiştir. İnkübasyon süresi 120 saat uygulandığında en yüksek enzim üretiminin %101 ile pepton kullanıldığında gerçekleştiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra 0.08-0.3 g/L miktardaki pepton konsantrasyonlarının tamamında %100 enzim üretimi elde edilmiştir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda enzim üretimi için kullanılacak azot kaynağı pepton, substrat miktarı 0.2 g/Lve inkübasyon süresi 72 saat bulunmuştur.

Bacillus albus SK-36 suşu ile yapılan azot kaynağı miktarının saptanması için substrat olarak azot kaynağı çalışmalarındaki sonuçlar dikkate alınarak et özütü kullanılmıştır. Enzim üretimi için 72 saatlik inkübasyon süresinde tek bir miktarda farklılaşma meydana gelmemiş, 0.01, 0.03, 0.08 ve 0.1 g/Lmiktarlarda %102 enzim üretimi elde edilmiştir. 0.02, 0.05 ve 0.2 g/L miktarda ise %101 enzim üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi olarak 120 saatlik üretim periyodu kullanıldığında en yüksek üretimim %101 ile 0.05 g/L et özütü ile elde edildiği bulunmuştur. Diğer parametrelerde kontrol ile aynı miktarda enzim üretimi gerçekleşmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşunda enzim üretimi için kullanılacak azot kaynağı et özütü, inkübasyon süresinin 72 saat substrat miktarının ise aynı miktarda enzim üretildiği için 0.01, 0.03, 0.08 ve 0.1 g/L değerlerinden her hangi birinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Her iki keratinaz üreticisi suşun ortak özelliği olarak en yüksek enzim üretiminin 72 saatlik periyotta gerçekleştiği görülmektedir. Bununla birlikte *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda *Bacillus albus* SK-36 suşuna göre %1 daha fazla enzim üretimi söz konusudur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz sentezi için en etkili azot kaynağının malt özütü olduğu saptanmış ve miktar belirleme çalışmalarında kullanılmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunda en yüksek enzim üretimi 120 saatlik inkübasyon sonunda %316 ile 0.1 g/L malt özütü kullanıldığında elde edilmiştir. Kullanılan bütün malt özütü değerlerinde kontrole göre enzim üretiminin arttığı görülmektedir. Özellikle 0.08, 0.1 ve 0.2 g/L miktarlarda malt özütü bulunan besiyerlerinde enzim üretimi kontrole göre yaklaşık 3 kat artış göstermiş ve ortalama %311 enzim üretimi gerçekleşmiştir. En yüksek enzim üretimi 0.1 g/L de gerçekleşirken, 0.2 g/L substrat kullanıldığında enzim üretiminin %308 e düştüğü görülmektedir. Enzim üretimindeki düşüş nedeni ile 0.3 g/L substrat denemesi yapılmamıştır. Substrat miktarı belirleme çalışmasında 0.01-0.05 g/L arasındaki substrat değerlerinde ortalama enzim üretimi %155 düzeyinde gerçekleşmiştir. Enzim üretimi substrat miktarındaki artışa paralel olarak düşük düzeyde artış göstermiş, substrat miktarının 0.08 e çıkarılması ile birlikte hızlı bir yükseliş göstererek %309 seviyesine ulaşmıştır. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun enzim üretim çalışmaları için azot kaynağı olarak malt özütünün, substrat miktarının 0.1 g/L ve inkübasyon süresinin 120 saat olması gerektiği saptanmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunda enzim üretimi için azot kaynağı olarak kazein seçilmiştir. Enzim üretimi için 120 saatlik inkübasyon süresi uygulanmış ve en yüksek enzim üretiminin %127

ile 0.1 g/L substrat kullanıldığında elde edilmiştir. Substrat miktarı 0.2 g/L ye yükseltildiğinde enzim üretimi optimum değere göre azalarak %118 ‘e düşmüştür. Bu nedenle 0.3 g/L değeri test edilmemiştir. Enzim üretimi için kullanılan bütün substrat miktarlarında ortamdaki substrat arttıkça enzim üretiminin de artarak 0.08 g/L’de %126’ya, 0.2 g/L de maksimum değere ulaşmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında enzim üretiminin yaklaşık 1.3 kat artış gösterdiği görülmektedir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu ile gerçekleştirilecek enzim üretim çalışmalarında, besiyerinde kullanılacak azot kaynağı kazein, substrat miktarının 0.1 g/L ve üretim süresinin 120 saat olduğu bulunmuştur.

Kollajenaz enzim üretim çalışmalarında verimLilik açısından azot kaynağı ve miktarının suş düzeyinde çok büyük etki gösterdiği görülmektedir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarının her ikisi içinde optimum enzim üretimi için 120 saatlik inkübasyon süresinde 0.1 g/L substrat konsantrasyonu etkili olmuştur. Bununla birlikte *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda kontrole göre enzim üretimi 3.1 kat artarken, *Bacillus tropicus* ta 1.3 kat artış gerçekleşmiştir.

Keratinaz ve kollajenaz enzim üretiminde üretim besiyerinde kullanılan karbon kaynaklarının saptanması için çalışmamızda kullandığımız dört suşumuzda enzim üretimi açısından ayrı ayrı analiz edilmiştir.

Karbon kaynakları olarak Fruktoz, Laktoz, Glukoz, Maltoz, Sukroz, Nişasta, CMC, Buğday kepeği, Mısır unu ve Melas kullanılmıştır. Analizler 30°C’lik inkübasyon sıcaklığında ve 72, 120 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 sununun keratinaz enzim üretimi için inkübasyon süresi olarak 120 saat kullanıldığında en yüksek enzim üretiminin %101 ile früktoz ve buğday kepeğinde gerçekleşmiştir. Bu inkübasyon süresinde de melas %98 ile en düşük etkiyi göstermiştir. Nişasta dışındaki diğer substratlarda yaklaşık %99 enzim üretimi meydana gelmiştir. Bu inkübasyon sürecinde nişasta %96 ile en düşük verimin alındığı substrat olmuştur. İnkübasyon süresinin 168 saate yükseltildiği uygulamada en yüksek etki %102 ile glukoz ve melasta ortaya çıkmıştır. Diğer substratların enzim üretiminde yaklaşık %99 etkili olduğu görülmektedir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunun keratinaz üretimi için karbon kaynağı olarak glukoz ve inkübasyon süresinin 168 saat olduğu saptanmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşunun 120 saatlik inkübasyon periyodunda en fazla enzim üretimi %103 ile laktozda gerçekleşmiştir. Laktozu %102 enzim üretimi ile glikoz, maltoz, nişasta ve CMC nin izlediği bulunmuştur. Sukroz ve buğday kepeğinde %98 etki görülmüştür.Enzim üretiminde diğer substratların etkisi kontrol ile aynı düzeyde gerçekleşmiştir.

İnkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığında en yüksek enzim üretiminin %101 ile früktozda elde edildiği görülmektedir. Melasta %100 etki saptanırken, diğer substratlarda kontrolden daha düşük enzim üretimi gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Bacillus albus* SK-36 suşunun keratinaz enzim üretimi için karbon kaynağının laktoz, inkübasyon süresinin 120 saat olduğu bulunmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun kollajenaz enzim üretimde en etkili karbon kaynağı ile ilgili yapılan çalışmalar 24, 120 ve 216 saatlik üç inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin 24 saat seçildiği periyotta en yüksek enzim üretimi %145 ile glukozda elde edilmiştir. Glukozu sırası ile %141 ile fruktoz, %116 ile maltoz, %112 ile laktoz, %105 ile buğday kepeği izlemiştir. Nişasta da %54 ve CMC de %77 ile kontrolden daha düşük enzim üretimi elde edilirken, enzim üretimi buğday kepeği, mısır unu ve melasta %100'ler düzeyindedir. Bütün karbon kaynaklarının enzim sentezindeki etkisi ortalama %105 bulunmuştur.

Kollajenaz enzim üretimi için 120 saatlik inkübasyon gerçekleştirildiğinde en yüksek sentezin %162 ile mısır ununda gerçekleştiği bulunmuştur. Mısır ununu %156 ile buğday kepeği, %133 ile nişasta, %117 ile glukoz, %108 ile CMC, %106 ile fruktoz ve %104 ile melas izlemiştir. İnkübasyon süresinin artırılması ile birlikte karbon kaynağı kullanımında suşun tercihinin polisakkarit yapılara doğru kaydığı görülmektedir. Buna karşılık 24 saatlik dönemde ön plana çıkan monosakkaritlerin etkisinde düşüş gözlenmiştir. İnkübasyon süresi 120 saat olarak uygulandığında enzim sentezinin ortalama %113 düzeyinde gerçekleştiği görülmektedir.

Enzim üretiminde inkübasyon süresi olarak 216 saatlik süre uygulandığında en yüksek sentezin %176 ile buğday kepeğinde gerçekleştiği saptanmıştır. Buğday kepeğini sırası ile %133 ile nişasta, %130 ile CMC, %125 ile mısır unu izlemiştir. Bu inkübasyon sürecinde glikoz hariç bütün mono sakkaritler 24 saate göre oldukça düşük etki gösterirken mikroorganizmanın tercihi tamamen polisakkarit yapılar yönünde gerçekleşmiştir. Bütün substratlar da enzim sentezinin ortalama %118 olarak gerçekleştiği görülmektedir

Her üç inkübasyon süresi karşılaştırıldığında inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte organizmanın polisakkaritleri daha fazla kullandığı ve buna bağlı olarak enzim üretiminin de aynı süreçte artış gösterdiği bulunmuştur. Bunun organizmanın inkübasyon süresinin kısa olduğu dönemLerde (24 saat) öncelikli olarak monosakkaritleri kullandığı, inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte ortamda monosakkarit yapılarının tükenmesine bağlı olarak polisakkaritlere yöneldiği, polisakkarit yapıların glikoza hidrolize olması sonucu glikozun enzim üretiminde diğer monosakkaritlerden artış yönünde ayrıldığı düşünülmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde karbon kaynağı olarak inkübasyon süresine göre tercik yapılmasının uygun olduğu ortaya çıkmıştır. Buna göre 24 saatlik üretim için karbon kaynağı olarak glikoz, 120 saatlik süreç için mısır unu, 216 saatlik süreç için buğday kepeği kullanılacak substratlardır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan kollajenaz enzim üretimi için en etkili karbon kaynağının saptanması amacı ile yapılan çalışmalarda 24 satlik inkübasyonda en yüksek enzim üretiminin %%195 ile buğday kepeğinde gerçekleştiği bulunmuştur. İkinci sırada %193 enzim üretiminin elde edildiği mısır unu kullanılmıştır. Üçüncü sırada ise %131 ile nişasta yer almıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu 24 saatlik inkübasyon süresinde monosakkaritleri polisakkaritlere göre daha düşük düzeyde kullanmış ve bu yapılardan elde edilen enzim üretimi oldukça düşük kalmıştır.

İnkübasyon süresinin 120 saat olarak uygulandığı enzim üretim periyodunda en fazla enzim sentezi %171 ile buğday kepeğinde gerçekleşmiştir. Bunu %161 ile mısır unu izlemiştir. Diğer karbon kaynaklarının kontrole göre enzim üretiminin belirgin şekilde düştüğü ve ortalama %67 enzim sentezlendiği saptanmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu ile 216 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiş ve en yüksek enzim üretiminin %231 ile mısır ununda gerçekleştiği bunu %229 ile buğday kepeğinin izlediği bulunmuştur. Diğer karbon kaynakları incelendiğinde enzim üretiminde 120 saatlik süreçte elde edilen değerlere yakın enzim sentezlendiği görülmüştür. Kollajenaz üretimi için kullanılan karbon kaynakları içerisinde her üç inkübasyon süresinde de en yüksek üretim buğday kepeği ve mısır ununda gerçeklemiş ve diğer karbon hidratlardan ciddi şekilde ayrışmıştır. Mısır unu ve buğday kepeği ikilisi arasında her üç inkübasyon süresinde de birbirine çok yakın değerlerin elde edilmesi her iki subtratında üretim için kullanılabileceğini göstermektedir.

Kollajenaz üreticileri arasında karbon kaynakları açısından karşılaştırma yapılacak olursa, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda bütün inkübasyon süreçlerinde buğday kepeği ve mısır unu dışındaki karbon kaynaklarının çok fazla tercih edilmediği açıkça görülmektedir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda ise 24 saatlik inkübasyonda öncelikle monosakkaritlerin etkili olduğu, inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte polysakkaritlerin tercih edildiği, buna karşılık glikoz dışındaki mono sakkaritlerin düşük etki gösterdikleri bulunmuştur.

Keratinaz ve kollajenaz enzim üretiminde karbon miktarının etkisinin saptanması için 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 ve 0.3 g/L konsantrasyonda substratlar kullanılarak, enzim üretiminde en etkili değerin belirlenmesi amacı ile farklı inkübasyon sürelerinde analizler yapılmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşunda karbon kaynağı olarak glukoz kullanılarak 0.01-0.3 g/Laralığında substrat içeren besiyerinde 72 saatlik inkübasyonda en fazla enzim üretimi %99 düzeyinde gerçekleşmiş ve 0.02 ve 0.05 g/L glukoz kullanıldığı zaman elde edilmiştir. Substrat miktarı olarak 0.3 g/L glukoz kullanıldığında %96 enzim üretimi gerçekleşmiş ve kontrolden daha az enzim elde edilmiştir.

İnkübasyon süresi 120 saat uygulandığında en yüksek enzim üretimi %101 ile 0.01 g/L glukoz kullanıldığı zaman gerçekleşmiştir. Substrat miktarı arttıkça enzim üretiminin ortalama %99 seviyelerinde kaldığı bulunmuştur.

İnkübasyon süresi 168 saate yükseltildiğinde enzim üretiminde genel olarak artış gözlenmiş ve en yüksek enzim üretiminin %105 ile 0.08 g/L substrat miktarında elde edildiği bulunmuştur. Optimum üretim değerinin yanı sıra 0.05 ve 0.2 g/Lsubstrat miktarlarında %104 enzim üretimi gerçekleşmiştir.

Bacillus albus Sk-36 suşunda keratinaz enzim üretimi için karbon kaynağı olarak laktoz kullanılmıştır. İnkübasyon süresi 72 saat uygulandığında en yüksek enzim üretimi %103 ile 0.1 g/L substrat kullanıldığında gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi 120 saat uygulandığı zaman en fazla

enzim üretimi %100 ile 0.01-0.05 g/L aralığındaki substrat miktarları kullanıldığında elde edilmiştir. Substrat miktarının artması ile birlikte enzim üretiminde de düşüş meydana gelmiştir. Özellikle 0.3 g/L substrat kullanıldığında enzim üretimi %94 seviyelerine gerilemiştir.

İnkübasyon süresi olarak 168 saat kullanıldğı zaman en fazla enzim üretimi %102 ile 0.02 g/L substrat miktarında gerçekleşmiştir. Her üç inkübasyon süresi karşılaştırıldığında en fazla enzimin 120 saatlik dönemde üretildiği saptanmıştır.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşunun enzim üretimi için substrat olarak buğday kepeği kullanılmıştır. İnkübasyon süresi olarak 120 saatlik periyot kullanıldığı zaman, en yüksek enzim üretimi %%233 ile 0.2 g/L substrat miktarında gerçekleşmiştir. İnkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığı zaman enzim üretimi genel olarak düşüş göstermiştir. En fazla enzim üretimi %118 ile 0.2 g/L substrat kullanıldığında elde edilmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunda kollajenaz enzim üretimi için karbon kaynağı olarak mısır unu kullanılmıştır. Suş 120 saat inkübasyona bırakıldığında en fazla enzim üretimi %112 ile 0.08 ve 0.1 substrat miktarlarında gerçekleşmiştir. Substrat miktarı artırıldığı zaman (0.3 g/L) enzim üretiminin %104 e düştüğü saptanmıştır.

İnkübasyon süresi 168 saat uygulandığında en fazla enzim üretiminin %97 ile 0.1 g/L substrat miktarında elde edildiği bulunmuştur. Genel olarak 168 saatlik inkübasyon döneminde enzim üretimi düşmüştür.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 sularının kollajenaz enzim sentezine karbon miktarının etkisi karşılaştırıldığı zaman her iki inkübasyon süresinde de *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun daha yüksek enzim ürettiği saptanmıştır. Her iki suşta 0.1 -0.2 g/L karbon bulunan besiyerlerinde en yüksek enzim sentezi gerçekleştirmekle birlikte, 120 saatlik inkübasyon süresinde *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşu toplamda %168, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu ise %102.5 enzim üretmiştir. İnkübasyon süresi 168 saate çıkarıldığı zaman *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunun bütün substrat miktarlarında %103.5, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunun %90 enzim ürettiği görülmektedir.

Keratinaz ve kollajenaz üreticisi suşlar SDS-PAGE sistemi kullanılarak zimogram analizi yapılıp, enzimin moleküler ağırlığı saptanmıştır. *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda moleküler ağırlıkları 240 ve 116 kDa olan iki bağımsız aktivite bandı saptanmıştır. *Bacillus albus* SK-36 suşunun SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 36 kda olan tek bir aktivite bandı elde edilmiştir.

Kollajenaz üreticisi suşlardan izole edilen enzimlerin molekülar ağırlıklarının saptanması için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen kollajenaz enziminde SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlıkları 160 kDa, 91 kDa ve 60 kDa olan üç bağımsız aktivite bandı elde edilmiştir. Zimogram analizinde 160 kDa büyüklükteki band, oldukça kalın ve geniş bir aktivite hattı oluşturmuştur. Enzimin katalitik aktivitesinde oldukça yüksek ve belirleyici bir yere sahip olduğu düşünülmektedir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminde SDS-PAGE analizi sonunda moleküler ağırlıkları 98 kDa ve 48 kDa olan iki bağımsız aktivite bandı saptanmıştır. Moleküler ağırlığı 48 kDa olan bandın genişliği ve parlaklığı dikkate alındığında enzimin aktivitesinde güçlü ve etkin role sahip olduğu değerlendirilmektedir.

Çalışmada karakterize edilen keratinaz ve kollajenaz enzimlerinin substrat spesifikli açısından analizleri yapılmış, suşlardan izole edilen kollajenaz ve keratinaz enzimLeri kullanılan bütün substratlar ile reaksiyona sokularak, substrat düzeyinde en yüksek enzimin üretildiği, dolayısı ile en fazla hidrolize olan substrat saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi kullanıldığında 60 dakikalık inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretiminin %216 ile doğal tavuk tüyünde gerçekleştiği saptanmıştır. Enzim balık pulunda %51, koyun yününde %23, balık derisinde %30 hidroliz gerçkelştirmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan elde edilen enzim en yüksek aktiviteyi %198 ile doğal tavuk tüyünde göstermiştir. İzole edilen enzim kemik unu ve balık derisinde %27 ve %25 hidroliz etkisi gösterirken, koyun yününde %6, keçi kılı ve insan saçında %7 hidroliz değeri elde edilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan kısmi saflaştırma ile elde edilen kollajenaz enzimi farklı tipte kollajen kaynaklarında en yüksek aktiviteyi %284 ile balık pulunda göstermiştir. Kollajen kaynaklı diğer substratlarda elde edilen hidroliz değerleri kemik ununda %274, balık derisinde %212, jelatinde %102 ve kırkırdakta %96 bulunmuştur. Enzim güçlü bir keratinolitik aktivite göstermiş ve tavuk tüyünde %140 aktivite elde edilmiştir. Enzimin bir diğer etkili olduğu subtrat %150 ile skimmilk olmuştur. Enzim kollajen içerikli substratlara karşı ortalama %194 düzeyinde aktivite göstermiş ve hidroliz gerçekleştirmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi kollojen içerikli substratlardan balık pulunda %215, kemik ununda %114, balık derisinde %215, jelatinde %115 ve kıkırdakta %101 gibi oldukça yüksek hidroliz aktivitesi sergilemiştir. Enzim insan saçında %59, koyun yününde %54 ve keçi kılında %48 aktivite göstererek *Bacillus albus* SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarından üretilen keratinaz enzimlerinde daha fazla hidroliz ürünü açığa çıkarmıştır. Enzim kollajenaz olmakla birlikte doğal tavuk tüyünde %1410 gibi çok yüksek bir katalik etki göstermiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi ham tavuk tüyü hidroliz çalışmaları için çok güçlü bir keratinolitik aktiviteye sahiptir. Enzimin kollajen içerikli substratlarda ortalama %152 hidroliz aktivitesi olduğu saptanmıştır.

Kollajenaz enzimLeri arasındaki karşılaştırmada *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen enzimin Balık pulu ve kemik ununa karşı *Bacillus tropicus* SKK-5 suşuna ait enzime göre ortalama olarak, balık pulunda %25, kemik ununda %58 daha yüksek katalitik etki gösterdiği bulunmuştur.

Keratinaz ve kollajenaz enzimi üreten ana suşlarda EMS ve UV mutajenleri kullanılarak mutant suş üretimi gerçekleştirilmiştir. EMS ve UV uygulaması sonucu seçilen mutant ve anasuşlar

sıvı N1 besiyerlerine aşılanarak 24 saatlik kültürleri oluşturulmuştur. Sıvı kültürlerden skimmilkli katı besiyerine 10µL örnek ekimi yapılarak inkübasyon sonucu oluşan proteolitik zonlar ölçülüp ana suşlara göre daha geniş/darlmış aktivite zonu oluşturanlardan stok kültürler hazırlanmıştır.

Mutant ve ana suşların 24 saatlik sıvı kültürleri hazırlanıp enzim üretimi için kollajen ve keratin içeren besiyerlerine %10 aşılama yapılarak 150 dev/dk da 120 saat enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzimler uygun şekilde bakterilerden ayırılarak kısmi saflaştıma yöntemi ile elde edilip kollajenazlar pH 7.0, keratinazlar pH 9.0 tamponunda sıvılaştırılarak aktivite analizleri yapılmıştır.

UV mutasyonu ile *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen suş ana suşa göre %61 daha fazla enzim sentezi gerçekleştirmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen EMS mutasyonu ile 9 ve 13, UV mutasyonu ile 20 numaralı suş izole edilmiştir. Ana suş ve mutantlara ait enzimler ile gerçekleştirilen aktivite çalışmaları sonunda ana suşa göre 9 numaralı suşun %13, 13 numaralı suşun %12 ve 20 numaralı suşun %12 daha fazla enzim ürettiği saptanmıştır. EMS mutasyonu UV mutasyonundan daha etkili olmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan EMS mutasyon çalışması ile 2 ve 5 numaralı iki adet mutant, UV uygulaması sonucu 21 numaralı bir adet mutant elde edilmiştir. Enzim aktivite analizi sonunda kontrole göre 2 nmaralı suşta %20, 5 numaralı suşta %5 daha fazla enzim üretimi gerçekleşmiştir. UV mutasyonu ile elde edilen 21 numaralı suş ana suşla aynı miktarda enzim üretmiş ve mutasyon enzim üretiminde değişikliğe neden olmamıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 numaralı ana suş ile gerçekleştirilen mutasyon çalışmasında 4 numaralı EMS mutantının ana suşa göre %448 daha fazla enzim ürettiği bulunmuştur. Buna karşılık 18 numaralı UV mutantı suşta enzim üretiminin kontrole göre azaldığı ve %92 enzim sentezi gerçekleştiği bulunmuştur.

EMS ve UV mutasyon uygulamalarının enzim üretimine etkileri karşılaştırıldığında, UV mutasyonunun keratinaz enzim üretimini artırdığı, kollajenaz enzim üretiminde ise *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen mutant örnekte olumLu yada olumsuz etki yapmadığı, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan elde edilen mutantta ise enzim üretimini düşürdüğü saptanmıştır.

EMS uygulaması ile elde edilen keratinaz ve kollajenaz mutantlarında enzim üretimini artırma yönünde etki gösterdiği saptanmıştır. Özellikle *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan elde edilen mutant suşta kontrole göre %448 daha fazla enzim sentezi gerçekleşmiştir. EMS mutasyon uygulamasının keratinaz ve kollajenazda enzim sentezinde pozitif etki yapmıştır.

Mutasyon çalışmalarında UV uygulamaları sonucu seçilen mutant ve anasuşlara ait sonuçlar karşılaştırıldığında özellikle kollajenaz üreticisi mutantlarda enzim üretiminde inhibe edici yönde etki ortaya çıkmıştır. Yapılan değerlendirmelerde *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan seçilen altı örneğin dördünde ana suşa göre zon çapında daralma gerçekleşmiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5

suşundan izole edilen altı mutant örneklerin dördünde ana suşa göre zon çapında artış ikisinde daralma saptanmıştır. Özellikle 4 numaralı mutantta ciddi bir artış dikkati çekmektedir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan iki adet mutant elde edilmiştir. Mutant-1 olarak adlandırılan suşta zon çapının belirgin şekilde arttığı görülmektedir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan seçilen mutantların hiç birinde zon daralması olmamıştır.

EMS ile yapılan mutasyon uygulamalarında *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan seçilen ve 40-2 şeklinde adlandırılan örnekte ana suşa göre 41 mm daha geniş aktivite zonu elde edilmiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan seçilen 80-2 mutantında ana suşa göre 30 mm, 10-1 mutantında 29 mm daha geniş aktivite zonu gerçekleşmiştir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan seçilen örneklerden 40-2 mutantında 39 mm, 80-2 mtantında 35 mm, 20-2 mutantında 35 mm ve 10-2 mutantında 30 mm aktivite zon çapında artış gerçekleşmiştir. *Bacillus albus* SK-26 suşundan elde edilen mutant suşlardan 80-1 mutantında zon çapında 33 mm artış, 10-1 suşunda ise 7 mm daralma saptanmıştır. EMS ile yapılan mutasyon uygulamalarında suşların hiç birinde enzim üretiminde negatif etki saptanmamıştır.

Keratinaz ve kollajenaz enzimi üreten ana suş ve mutantlardan üretilen enzimLerin aktivite analizlerinde oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan elde edilen *Brevibacillus agri* SK-27/16 numaralı mutantta %161 enzim üretimi gerçekleşmiştir. Ana suşa göre %61 daha fazla enzim üretilmiştir. *Bacillus albus SK-36 suşundan seçilen üç mutantta da aktivite artışı gerçekleşmiştir. Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen 2 numaralı mutantta enzim üretimi yaklaşık %20 artmıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan seçilen iki suştan 4 numaralı matantta %448 enzim üretimi gerçekleşirken, 18 numaralı mutantta %8 düşüş meydana geliş ve %92 enzim üretilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan keratinaz ve kollajenaz ana suşları ve EMS ve UV mutasyon uygulamaları sonucu izole edilen suşlardan üretilen enzimLerin tavuk tüy unu ve kemik unu kullanılarak aktivite analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Ana suşlarla yapılan analizlerde *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda 79920 U/mL, *Bacillus albus* SK-36 suşunda 107090 U/mL, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda 64520 U/mL ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda 64160 U/mL enzim aktivitesi gerçekleşmiştir. Keratinaz üreticisi ana suşlardan Bacillus albus SK36 da 27000 U/mL daha fazla aktivite elde edilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27 ana suşundan EMS mutasyonu ile izole edilen mutant-8 suşuna ait enzim anaa suştan üretilene göre 29500 U/mL ve mutant-12 suşuna ait olan enzim ise 27790 U/mL daha fazla aktivite göstermiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan EMS mutasyonu sonunda izole edilen suşlardan üretilen enzimlerle yapılan aktivite çalışması sonunda ana suşla karşılaştırıldığı zaman, mutant-10 enzimi 4680 U/mL ve mutant-13 enzimi 4800 U/mL aktivite değeri ile ana suştan daha yüksek aktivite göstermiştir. Mutant-26 suşundan üretilen enzim ana suştan üretilen enzimden 5660 U/mL daha

düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Bu suşta enzimin moleküler yapısında meydana gelen değişiklik nedeni ile aktivitenin düştüğü görülmektedir.

Brevibacillus agri SK-27 ve Bacillus albus SK-36 suşlarında UV kullanılarak yapılan mutasyon sonunda izole edilen suşlardan mutant-16 enzimi ana suşa göre M 20410 U/mL daha yüksek aktivite göstermiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen mutant-17, 20 ve 22 suşlarında enzim aktivitesi düşmüştür. UV mutasyonu *Bacillus albus* SK-36 suşunda genetik düzeyde yaptığı değişiklik ile enzim aktivitesini düşürecek yönde etki göstermiştir.

Kollajenaz üreticisi ana suşlara *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşları kullanılarak yapılan EMS mutasyon çalışmasında izole edilen mutantlarda enzim aktivitesinde genelde artış meydana gelirken aktivite de kısmende olsa düşüşte gerçekleşmiştir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan üretilen örneklerden EMS uygulaması mutant-2 suşunda 33040 U/mL, mutant-5 suşunda ise 41140 U/mL aktivite artışına neden olurken mutant-7 suşunda 1000 U/mL aktivite düşüşü meydana gelmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 ana suşundan izole edilen iki EMS mutantının her ikisinde de enzim aktivitesinde belirgin artış meydana gelmiştir. Mutant-4 suşundan izole edilen enzimde ana suş enzimine göre 22200 U/mL, mutant-14 suşundan üretilen enzimde ise 15600 U/mL aktivite artışı gerçekleşmiştir.

Kollajenaz ana suşları ile gerçekleştirilen UV mutasyon çalışmasında *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ana suşundan izole edilen mutant-21 suşundan üretilen enzimde ana suştan izole edilen enzime göre 2 kat aktivite artışı meydana getirecek değişiklik yapmıştır. Buna karşılık mutant-25 suşundan üretilen enziminde 3360U/mL aktivite düşüşü gerçekleşmiştir.

Bacillus trophicus SKK-5 suşundan UV mutasyon uygulaması sonucu izole edilen mutant-24 suşunda ana suşa göre 63780 U/mL aktivite artışı gerçekleşmiştir. Mutant-24 suşundaki aktivite artışı ana suştan üretilen enzime göre yaklaşık 1.99 kat daha yüksektir.

Bacillus albus SK-36 ve *Brevibacillus agri* SK-27 ana suşlarından izole edilen keratinaz enzimleri kullanılarak farklı kombinasyonlar oluşturulmuş ve tavuk tüy ununun (feather meal) enzimatik hidrolizi çalışılmıştır. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan elde edilen enzim ile yapılan analizlerde, 10 gr feather meal + 10 mL enzim + 90 mL distile su kombinasyonunda 72 saatlik inkübasyon sonunda %37 hidroliz gerçekleştiği saptanmıştır. Buna karşılık *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen enzim kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, 20 gr feather meal + 10 mL enzim + 90 mL distile su kombinasyonunda 72 saatlik inkübasyon sonunda %11 hidroliz saptanmıştır.

Kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada en yüksek antioksidan aktivitesi ortalama %58.38 ile *Brevibacillus agri* SK-27 suşunda elde edilmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşunda ortalama aktivite %49.98, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşunda ortalama %37.18 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşunda ortalama %44.59 antioksidan etki saptanmıştır. Keratinaz enzimleri ortalama %54,18, kollajenaz enzimleri ise

%40,88 antioksidan aktivite göstermişlerdir. İzole edilen keratinaz enzimlerinin kollajenaz enzimlerinde göre %25 daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

Kolajenaz ve keratinaz enzimlerinin antibakteriyel etkinliklerinin saptanması için hastane enfeksiyonu örneklerden izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella sonneii ve Klebsiella pneumoniae* suşları kullanılarak antibakteriyel aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Patojen suşlarının 24 saatlik kültürlerinden N1 agar besiyerine aşılama yapılıp 2 saat sonra 15µL enzim damLatılarak 37°C de 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Test için kullanılan bakteri suşları 12 ile 16 farklı antibiyotiğe karşı çoklu direçlilik göstermektedirler.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 suşlarından izole edilen kollajenaz enzimLerinin *Pseudomonas aeruginosaya* karşı ortalama 32 mm çapında aktivite zonu oluşturduğu saptanmıştır. *Brevibacillus agri*-SK27 suşundan üretilen keratinaz enzimi, *Shigella sonneii de 18 mm, Salmonella typhimurium da 21 mm, E.coli* de 20 mm ve *Klebsiella pneumoniae* de 22 mm çapında antibakteriyel inhibisyon zonu meydana getirmiştir. Kollajenaz enzimLerinin keratinazdan yaklaşık iki kat daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Kolajenaz ve keratinaz enzimlerinin güçlü antibakteriyel etki göstermelerinin yanı sıra yüksek düzeyde antioksidan özelliklerinin saptanması ve literatürde özellikle kollajenazın yüksek rejenerasyon ve yara iyileştirme gücünün belirtilmesinden yola çıkılarak hazırlanan ve filtre ile steril edilen kokteyl ürün tedavi amacı ile keçi ve gönüllü insanda denenmiştir.

Sürü halinde yaşayan keçilerde görülen, özellikle ağız ve gözde enfeksiyona bağlı ileri derecede yara oluşumu ile seyreden ve ortalama bir haftada ölümle sonuçlanan yara oluşumuna sprey şeklinde bir kez uygulama yapılmış ve bir hafta sonraki kontrolde keçinin tamamen iyileştiği saptanmıştır (Şekil 135). Keçide elde edilen sonucun oluşturduğu etki nedeni ile yaklaşık 20 yıl önce kasık fıtığı amaliyatı olan fakat enfek olduğu için iyileşmeyen ve sürekli akıntı şeklinde seyreden fıtık yarasına sprey ve krem şeklinde üretilen form kullanılmıştır. Günde bir kez lmak üzere yapılan uygulama sonunda takibeden üçüncü günde enfeksiyon bitmiş, yara dokusu hızla rejenere olmuş ve kapanmıştır (Hastanın isteği ve rızası ile yapılmıştır).

Tavuk tüy unu ve kemik unu *Bacillus albus* SK-36, *Brevibacillus agri* SK-27, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK_5 suşlarından izole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimleri kullanılarak hidroliz edilmişlerdir. Hidroliz işlemleri için 30°C de 3 ve 5 gün inkübasyon gerçekleştirilmiş, kurutularak toz haline getirilmiş hidrolizatlar serbest amino asit içeriklerinin saptanması için HPLC de analiz edilmişlerdir.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi ile 3 günlük inkübasyon sonunda tavuk tüy ununda %43.833 serbest amino asit elde edilmiştir. En yüksek verim %8,239 ile prolin amino asidinde gerçekleşmiştir. İnkübasyonun 5 inci gününde yapılan analizde tavuk tüy ununda %60,480 serbest amino asit üretilmiştir. Beş günlük inkübasyonda en yüksek amino asit değeri %7.291 ile phenilalanin de elde edilirken, bunu %6.753 ile glutamik asit izlemiştir. Üç günlük inkübasyonda %1.978 miktarda metionin değeri elde edilirken, 5 günlük inkübasyon sonunda %3.817

değerine ulaşmıştır. Lizin en fazla önemsenen özellikle hayvan beslemede ön plana çıkan bir amino asittir. İzole edilen enzimtavuk tüy unundan inkübasyonun 3. Gününde %1,717, 5.ci gününde %3,534 lizin amino asidinin açığa çıkmasını sağlamıştır. Tavuk tüy unundan 3.cü günde %0,062, 5.ci günde %1,983 hydroksiprolin amino asidi açığa çıkmıştır.

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi ile gerçekleştirilen tavuk tüy unu hidroliz çalışmaları sonunda, 3 günlük inkübasyonda %58,287 serbest amino asit elde edilirken, 5 günlük inkübasyonda %46,860 serbest amino asit elde edilmiştir. İzole edilen enzim inkübasyonun 3.cü gününde %0,129, 5.ci gününde 0,175 hydroksiprolin elde edilmiştir. Her iki keratinaz enzimi ile aynı miktarda tavuk tüy unu hidroliz edildiği halde hydroksiprolin amino asidi üretiminde *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan üretilen keratinaz enzimi, *Bacillus albus* SK-36 dan elde edilen enzime göre özellikle beşinci günde yaklaşık 11 kat daha fazla etki göstermiştir. Lizin üretimi her iki inkübasyon süresinde de birbirine yakın değerde gerçekleşmiş olmakla birlikte beş günlük inkübasyon süresinde daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Keratinaz enzimi ile gerçekleştirilen tavuk tüy unu hidroliz çalışmasında *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen enzim inkübasyon süresinin beşinci gününde üçüncü güne göre daha fazla hidroliz gerçekleştirmiş ve serbest amino asit miktarında yaklaşık %28 artış meydana gelmiştir. *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi üç günlük inkübasyonda daha fazla hidroliz gerçekleştirirken inkübasyonun beş güne çıkarılması ile enzimin hidroliz etkisi yaklaşık %20 düşmüştür. *Bacillus albus* SK-36 keratinaz enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz çalışmasında %8,808 ile en fazla açığa çıkan amino asit prolin olmuştur. İnkübasyonun beşinci gününde prolin değeri hızla düşmüş ve %0,349 düzeyinde amino asit elde edilmiştir. Metionin amino asidi üçüncü günde %2,140 üretilirken, beşinci günde artarak %3,070 değerine ulaşmıştır.

Keratinaz enzimlerinin tavuk tüy ununu hidrolize ederek serbest amino aside dönüştürme yetenekleri bir birinden farklılık göstermiş, *Brevibacillus agri* SK-27 keratinaz enzimi tavuk tüy ununu beşinci günde daha fazla hidrolize ederek yaklaşık %60 serbest amino asite dönüştürmüştür. *Bacillus albus* SK-36 suşundan üretin keratinaz enzimi üçüncü günde daha yüksek hidroliz gerçekleştirerek tavuk tüy ununu yaklaşık %58 serbest amino aside dönüştürmüş. Kullanılan her iki keratinaz enzimide, zaman farklı olsada en yüksek hidroliz sürecinde di ve oligo peptidler hariç yaklaşık %60 serbest amino asit oluşturmuşlardır. *Bacillus albus* SK-27 suşuna ait keratinaz enzimi 3 günlük periyotta yeterli sonucu ortaya çıkardığı için zaman ve enerji kullanımı düşünüldüğünde keratin hidrolizatlarının üretiminde öncelikle tercih edilecek potansiyeldedir.

Kollajenaz enzimLerinin kullanıldığı ve kemik ununun hidroliz edildiği çalışmalarda açığa çıkan serbest amino asit değerleri keratinaz enzimine göre daha düşük değerde elde edilmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi ile üç günlük inkübasyonda %30,355 serbest amino sit oluşurken, beş günlük inkübasyonda %34,521 amino asit üretilmiştir. İnkübasyon süresinin uzaması ile amino asit miktarında yaklaşık %4.5 artış gerçekleşmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi ile üç günlük inkübasyonda %35,245, beş günlük inkübasyonda ise %38,939 serbest amino asit üretilmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak amino asit üretiminde yaklaşık %4 artış gerçekleşmiştir. Kollajen yapılarından üçüncü güne göre beşinci günde yaklaşık 5.5 kat daha fazla phenilalanin üretilmiştir.

Kollajenaz enzimleri ile yapılan hidroliz denemelerinde her iki suştan üretilen enzimLer 5 günlük inkübasyon daha fazla etki göstermiş. Serbest amino asit üretim çalışmalarında keratinaz enzimleri (tavuk tüyü ve kemik unu yaklaşık %90 saf protein içermektedirler) kollajenaz enzimLerine göre yaklaşık %35 daha etkili olmuşlardır.

Nafady ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *B.licheniformis* bakterisinden izole edilen keratinaz enziminin tüyleri parçalayabildiğini ve hidrolizatta valin, izolösin, prolin, triptofan, alanin, asparagin, serin ve glisin gibi diğer amino asitlein saptandığını belirtmiştir. Çalışmamızda keratinaz ve kollajenaz enzimleri ile elde edilen tüy ve kemik unu hidrolizatlarında literatür verilerinden çok daha fazla sayıda amino asit elde edilmiştir.

Brevibacillus agri SK-27, *Bacillus albus* SK-36, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 ana suşlarından izole edilen keratinaz ve kollajenaz enzimleri kullanılarak kan ile lekelenmiş kumaş parçasındaki kan lekesinin giderilmesi çalışması gerçekleştirilmiştir. Deterjan olarak doğal ve denatüre (15 dakika 121°C de) edilmiş sıvı OMO kullanılmıştır.

*Lysinibacillus fusi*formis SKK-2 suğundan izole edilen kollajenaz enzimi ve deterjanın yıkama performansları kontrol ile karşılaştırıldığında, enzimin kan lekesini giderme performansının %99 a yakın olduğu görülmektedir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin kan lekesi ve dokuya nüfuz etmiş yapıları %100 e yakın düzeyde giderdiği görülmektedir.

Bacillus albus SK-36 suşundan üretilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme performansı görsel kontrolde %100 e çok yakın bulunmuştur. *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen keratinaz enzimi kollajenaz enzimine göre daha güçlü yıkama performansı ortaya koymuştur.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminin kan lekesini giderme çalışmasında en güçlü performans enzimin tek başına kullanıldığı uygulamada elde edilmiştir. Bununla birlikte performansın diğer enzimlere göre dah düşük olduğu ve kan lekesinin yaklaşık %80 ve üzeri düzeyde giderildiği görülmektedir

Genel olarak değerlendirildiğinde *Bacillus tropicus* SKK-5 ve *Bacillus albus* SK-36 suşundan izole edilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin, *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Brevibacillus agri* SK-27 suşlarından üretilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerine göre daha yüksek yıkama performansı gösterdikleri saptanmıştır. En düşük yıkama performansının *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan izole edilen keratinaz enziminde elde edilmiştir.

Günümüzde enzimLer, toz formların yanı sıra sıvı deterjanların, leke çıkarıcıların, çamaşır ön yıkama makinelerinin, otomatik bulaşık yıkama deterjanlarının ve diğer endüstriyel ve tıbbi

temizlik ürünlerinin temel bileşenleri haline gelmişlerdir. Enzimlerin deterjanlara uygulanması, özellikle sert biyomateryaller için yalnızca temizleme etkinliğini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda yıkamanın nispeten düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesine olanak tanır, böylece enerji tasarrufu sağlar ve süreci ekonomik hale getirir (Rehman ve ark. 2017).

Çalışmamızda kullandığımız ve kan lekesini %100 e yakın gideren keratinaz ve kollajenaz enzimlerimizin her ikiside düşük sıcaklık ve alkali pH değerlerinde optimum aktivite göstermektedirler. *Bacillu albus* SK-36 suşundan üretilen keratinaz enzimi optimum aktivitesini 10°C, ve pH 9.0-10.0, *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin optimum aktivitesini 10°C ve pH 11.0 de göstermiştir. Özellikle 10°C de elde edilen bu sonuçlar, düşük sıcaklık (soğukta yıkayın) hedeflerinin ön plana çıktığı ve yoğun araştırmaların gerçekleştirildiği deterjan endüstrisi için enzimlerimizin güncelin çok ilerisinde performansa sahip olduklarını göstermektedir. Sonuçlarımız literatürlerden çok daha iyidir.

X-ışını filmleri, filmin kg'ı başına yaklaşık 5-15 g gümüş içerir (Marinkovic ve ark. 2006). Atık fotofilmlerden gümüşün geri kazanılması büyük bir iştir. Dünyanın gümüş ihtiyacının yaklaşık %18-20'si fotoğraf atıklarının geri dönüştürülmesiyle karşılanmaktadır (Shankar ve ark. 2010). Her yıl göğüs röntgeni, mamogram ve BT taramaları da dahil olmak üzere yaklaşık 2,0 milyar radyografi çekilmektedir (Cavello ve ark. 2013). Gümüş, emülsiyon tabakasındaki jelatine bağlı olduğundan, bunu kırıp ikincil gümüş kaynağı olarak kullanılabilecek gümüşü açığa çıkarmak mümkündür. Kollajenazların (kollajenolitik proteazların), gümüşün X-ışını filmlerinden başarılı bir şekilde geri kazanılması için mükemmel jelatinolitik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yüksek sıcaklık ve hafif alkali koşullar, jelatin tabakasının sıyrılmasını kolaylaştırır. Böylece *Bacillus* spp.'den elde edilen termostabil alkalin kollajenaz ve proteazların uygulama için çok uygun olduğu bildirilmiştir (Singh ve Bajaj 2017).

Röntgen filminden gümüş iyonlarının giderimi ve atık gümüşün ekonomiye kazandırılması için yapılan uygulamada *Lysinibacillus fusiformis* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi 24 saatlik inkübasyon sonunda %100 etkili olmuştur. Buna karşılık diğer suşlardan üretilen kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin etki göstermedikleri bulunmuştur. *Lysinibacillus fus*iformis SKK-2 suşundan izole ettiğimiz kollajenaz enzimi röntgen filminden gümüşü %100 çıkarmıştır. Elde ettiğimiz sonuç literatür ile tam bir uyuymluluk göstermektedir.

Kollajenaz ve keratinaz enzimLerinin fibrinolitik etkilerinin saptanması için ana suş ve mutant suşlarda elde edilen enzimler kullanılarak kan pıhtısı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak kan bulunan tüplere enzim miktarı kadar distile su eklenmiştir. Ana suşların tamamında ve mutant suşlardan *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/2 ve *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2/5 numaralarda oda sıcaklığında 26 satlik inkübasyon sonunda %100 sıvılaşma gerçekleşmiştir. Mutant suşlardan 16 numaralı örnekte yaklaşık %80, 4 numaralı örnekte ise %50 sıvılaşma gerçekleşmiştir (Şekil).

Doğal tavuk tüyünün hidolizi çalışmalarında farklı sıcaklıklarda aktivite gösteren suşlar ile tüp deneyleri gerçekleştirilmiştir.İzole edilen suşlar içerisinden seçilen T-35 suşu soğukta aktif keratinaz

enzimi üretmektedir. T-35 suşunun izolasyon sıcaklığı 10°C olup, izolasyonda kullanılan örnekler Tarsus/Ardıçlı mahallesi kırsalında orman içine atılmış tavuk tüyü depolarından, ortam sıcaklığının 0-10° olduğu dönemde alınmıştır. Hidroliz denemesinde yıkanarak kurutulmuş tavuk teleği kullanmış ve T-35 suşundan izole edilen enzim 10°C 'lik koşullarda 48 saatte %100 hidroliz gerçekleştirmiştir (Şekil 137A).

Çalışmalarda izole elden çok sayıda termofilik keratinaz üreten suşlardan T-tüyü şeklinde kodlanan suş kullanılarak tavuk tüy hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz için 20 g/L tüy kullanılmış ve 55°C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Suştan üretilen enzim termofil koşullarda ve 72 saatte doğal tavuk tüyünü %100 hidrolize etmiştir (Şekil 137B).

Tüplerde elde edilen sonuçlardan sonra 50, 100, 150 ve 300 g/L doğal tavuk tüyü kullanılarak enzimatik hidroliz çalışması gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler soğukta aktif enzim kullanılarak inkübasyona bırakılmış ve 120 saat sonunda tüylerin tamamen hidroliz edildikleri bulunmuştur.

Keratinaz ve kollajenaz enzimleri ile tavuk tüyü, kemik unu ve balık atıklarının hidrolizi sonucu elde edilen amino asit örneklerinden kokteyl hazırlanmış ve bitkisel üretimdeki etkisini görmek için biber ve karanfil denemesi gerçekleştirilmiştir. Her iki denemede de ortalama 15 gün içerisinde iki kez uygulama yapılmış ve gün gün farklılaşmalar gözlenmiştir.

Biber denemesinde toplam 14 günlük sure sonunda başlangıca göre amino asit uygulanan biberde verimlilik, yapraklanma, çiçeklenme, biber tutması ve biberin kızarmasında kontrole gore çok büyük başarı elde edilmiştir. Sadece su kullanılan kontrol biberde 14 günlük süreçte tamamen kuruma gerçekleşmiştir. Amino asit kokteylinin kullanıldığı biberde zellikle çiçeklenme ve çiçek gözü oluşumunda ile yeni biber oluşumunda ortalama %60 verim artışı elde edilmiştir (Şekil 144, 145 ve 146).

Karanfil uygulamasında başlangıç ve ikinci uygulama arasında 7 gün süre geçmiştir. Yedi günlük sürede karanfilde saat saat çiçek ve tomurcuk davranışında belirgin farklılaşma meydana gelmiştir. Başlangıçta saksıüst bölümünden aşağıda konumLanan ve gevşek görünüme sahip karanfil çiçeği uygulamadan bir kaç saat içerisinde dikleşmiş, çiçek parlaklık ve canlılık kazanmış, kurumuş yaprakların yerine yenileri gelişmiş ve yedi gün sonunda üç çiçekli görünüm ortaya çıkmıştır. Sadece başlangıç çiçek durumu dikkate alındığında amino asit kokteylinin etkisi yaklaşık %60 pozitif yönde gerçekleşmiştir.

Tüyler yaklaşık %15 (ağırlık/ağırlık) azot içermesine rağmen, hidrolize direnç göstermeleri nedeniyle topraktaki azotun yavaş bir şekilde parçalanmasına ve mineralleşmesine yol açarak, bunların doğrudan gübre olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Jain ve ark. 2016). Bununla birlikte, tüylerin enzimatik hidrolizi ile elde edilen hidrolizatların, tüy bileşiminde yer alan peptitler, amino asitler ve bazı mineraller (P, K, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu) açısından zengin olduğu ve doğal bitki gübreleri olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Kshetri ve ark. 2019; Nurdiawati ve ark. 2017). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz biber ve karanfil uygulamalarından elde edilen yaklaşık %60 verim artışı ürettiğimiz hidrolizatların gübre olarak kullanılabileceğini kanıtlamış

olup, literatür ile uyum göstermektedir.

Keratin hidrolizatları, toprak mikrobiyal aktivitesini iyileştirme avantajına sahipti. Protein hidrolizatları, bitkiler tarafından emilebilen azotu serbest bırakarak toprak mikrobiyotası tarafından mineralize edilebilir (Nurdiawati ve ark. 2019). Peptitler ve amino asitler ayrıca bitki kökleri ve yaprakları tarafından doğrudan emilebilir, diğer bitki dokularına taşınabilir ve büyüme uyarıcıları olarak etki edebilir. Triptofan, önemLi bitki büyüme fonksiyonlarına sahip bir hormon olan indolasetik asitin (IAA) sentezi için temel bir amino asittir (Kshetri ve ark. 2019).

Keratinaz ve kollajenaz enzimleri kullanılarak tavuk tüyü, kemik unu ve balık atıklarının hidrolizi sonucu elde edilen aminoasit hidrolizatları kullanılarak etlik piliç üretimde önemli bir performans artışı sağlanmıştır. Protein hidrolizatları, protein açısından zengin bir substratın hidrolizinden elde edilen peptit ve amino asitlerin karmaşık karışımları olup, hayvan yeminde katkı maddesi olarak, biyogaz üretimi ve biyogübre uygulamalarında kullanılabilir (Nafady ve ark. 2018). Keratinaz kullanılmadığı zaman glisininin yalnızca %11,81'i ve β-konglisininin %24,20'si hidrolize olurken, keratinaz kullanıldığında bu değerler sırasıyla %94,74 ve %88,89'a yükselmiştir. Hayvan yemine keratinaz eklenmesiyle elde edilen hidrolizatların, domuz yavrularının bağırsak morfolojisi ve ekolojisinin iyileştirilmesine katkıda bulunduğu saptanmıştır (Wang ve ark. 2011).

Bacillus licheniformis PWD-1'den elde edilen Versazyme keratinazının (BioResource International) hayvan sindirilebilirliğini iyileştirmek için yem katkı maddesi olarak kullanıldığına dair bulgular vardır (Chen ve ark. 2017)**.** Versazyme takviyesi yem dönüşüm oranını, göğüs eti verimini ve vücut ağırlığını iyileştirmiştir (Wang vd. 2006). Keratinaz enzimi kullanıldığında yem bileşenlerinin (örn. nişasta) sindirilebilirliği ve tavukların bağırsak gelişimi iyileşmiştir (Wang vd. 2008).

B. amyloliquefaciens elde edilen keratinaz enzimi kullanılarak tüy unu hidroliz edildiğinde serbest amino asitler ve çözünür peptit içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir. Protein çözünürlüğü ve in vitro sindirilebilirlik sırasıyla 20,75 ve 10,27 kat artmıştır. Bu sonuçların, tüy atığının besin değerini iyileştirmek için umut verici bir yaklaşım olabileceğini belirtilmiştir (Zhou ve ark. 2020). Çalışmamızda hayvan yemi olarak keratinza ve kollajenaz enzim hidrolizatları kullanıldığında yem değerlendirme oranının %85 değerine yükselmesi, literatür bilgileri ile uyumluluk göstermektedir.

Son yapılan çalışmalarda sığır, koyun ve keçilerden dag'ın uzaklaştırılması için keratinaz kullanımı önerilmiştir. Dag, dışkı, saç, toprak, idrar, yem ve saman gibi organik maddelerden oluşan dirençli tortulardır (Navone ve Speight 2020). Kesimden önce hayvandan uzaklaştırılması, mikrobiyal et kontaminasyonunu ve deri hasarını azaltabilir. Keratinaz kullanımı, dag'ın hayvan kılı ile etkileşimlerini zayıflatabilir ve diğer enzimlerin (örneğin selülaz, ksilanaz, lipaz, lakkaz) dag'a erişmesine katkıda bulunarak yıkama yoluyla uzaklaştırılmasını kolaylaştırabilir (Navone ve Speight 2019).

Mikroorganizmalar yoğun bir şekilde incelenmiş ve farklı enzimlerin üretimi için değerli kaynaklar olarak gösterilmiştir. Mikrobiyal çeşitliliğin kullanılması, lignoselüloz, kitin, kollajen ve

keratin gibi karmaşık biyokütle kalıntılarının değerlendirilmesine ve katma değeri yüksek ürünler oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Henüz keşfedilmemiş mikrobiyal türler göz önüne alındığında, enzimlerin araştırılmasının önemli giderek daha önemli hale gelmektedir. Keratin ve kollajen kaynaklı atıkların biyoproses uygulamaları ile değerlendirilmesi sonucu çevresel sorunların çözümüne katkıda bulunabilir. Keratinaz ve kollajenazların kullanılması ile elde edilen protein hidrolizatlarının gübre, hayvan yemi, kozmetik, tedavi, ve ilaç gibi alanlarda uygulanması için fırsatlar elde edilebilir.

Sonuç olarak;

Çalışmalarımızda çok farklı ortamlardan, sıcaklığın 10 ve 30°C olduğu dönemlerde alınan materyallerden izole edilen toplam 568 bakteri örneğinden 497'si skimmilk agar besiyerinde proteaz aktivite zonu oluşturmuştur. Proteaz üreten örnekler feather meal ve Tip-I kollajenli katı besiyerlerine aşılanarak keratinolitik ve kollajenolitik analizleri yapılmıştır. Keratinaz ve kollajenaz üreten örnekler gram boyama, spor oluşumu, katalaz ve biyokimyasal testler ile tanılamaları yapılarak *Bacillus sp*. şeklinde ön adlandırma yapılmıştır.

Ön tanılaması yapılan, keratinaz ve kollajenaz üreten toplam 50 suş kullanılarak (40 adet keratinaz ve 10 adet kollajenaz üreticisi) katı besiyerinde farklı sıcaklık ve pH değerlerinde enzim üretme yetenekleri taranmıştır. Seçilen suşlar 16S moleküler tanılama ile tür düzeyinde adlandırılmışlardır. 16S tanılama sonuçlarına göre keratinaz enzimi üreten suşlar; *Brevibacillus agri* SK-27 ve *Bacillus albus* AK-36, kollajenaz üreten suşlar ise; *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 ve *Bacillus tropicus* SKK-5 olarak adlandırılmışlardır.

Moleküler tanılama ile adlandırılan suşlardan enzim üretimi yapılmış, karakterizasyon çalışmaları ve farklı alanlara dönük uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Her suştan üretilen enzimler kullanılarak; optimum pH, optimum sıcaklık, termal stabilite, pH stabilitesi, NaCL'ün aktiviteye etkisi, kimyasalların etkisi, HPLC analizi ile enzimlerin hidroliz etkisi, antiokidan etkileri, kan pıhtısını çözme etkisi, röntgen filminden gümüş çıkarma etkisi, kan lekesini giderme etkisi ve TLC parametreleri ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Enzim ve enzim hidrolizatları kullanılarak keçi ve gönüllü insanda yara iyileştirme, biber ve karanfilde gübre yerine kullanılarak bitkisel performanstaki etki ve etlik piliçlerde yem yerine kullanılarak yem değerlendirme ve performansa etki uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Suş düzeyinde elde edilen sonuçları şu şekilde sıralamak mümkündür.

Brevibacillus agri SK-27 suşu optimum enzim üretimini 36-72 inci saatlerde gerçekleştirmiştir. Enzimin optimum aktivitsini pH 10.0 ve 50°C de göstermiştir. Enzimin 20-100°C de %100 stabil kalmıştır. Enzim pH 6-13.0, aralığında stabil kalmış, 40 saatlik ön inkübasyon sonunda pH10.0 da aktivitesi indüklenerek %103 değerine yükselmiştir.

Enzimin %3-30 NaCL'de konsantrasyonda %100'ün üzerinde aktivite göstermiş, %10-15 aralığında aktivite %104 gerçekleşmiştir. Enzim 10 mM konsantrasyondaki kimyasallara yaklaşık %100 direnç göstermiş, PMSF ile %103, EDTA ile %100 aktivite elde edilmiştir. Enzim 5

mM konsantrasyondaki kimyasallara daha yüksek stabilite göstermiştir.

Brevibacillus agri SK-27 suşu %3-30 substrat bulunan ortamda 72 saatte ortalama %98, 120 saatte %110 enzim üretmiştir. Suş en fazla enzim üretimini 120 saatlik inkübasyon süresinde %108 ile peptonu kullanarak gerçekleştirmiştir. Suş en fazla enzimi %103 ile 0.2 gr/lt azot kaynağı kullanıldığında üretmiştir. Suş en fazla enzimi 120 saatlik inkübasyonda %101 ile fruktoz ve buğday kepeği kullanıldığında üretmiştir. Suş en fazla enzimi 120 saatlik inkübasyonda %101 ile 0.01 gr/lt karbon kaynağı kullanıldığında ürettiği saptanmıştır.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen enzim SDS-PAGE analizinde 240 ve 116 kDa büyüklükte iki bağımsız aktivite bandı oluşturmuştur. Klonlama çalışmasında keratinaz sentezleyen genin 1152 nükleotid büyüklükte olduğu, genin 383 amino asitten oluşan enzim ürettiği bulunmuştur.

Brevibacillus agri SK-27 suşundan izole edilen enzimin substrat spesifikliği analizlerinde en yüksek aktiviteyi %216 ile tavuk tüyünde gösterdiği, koyun yünü ve keçi kılında ise ortalama %20 akivite elde edildiği bulunmuştur. Yapılan TLC analizinde enzimin kazeini histidin, sistein, sistin, glisin, prolin, glutamin ve tirozin dahil 9 dan fazla amino aside hidroliz ettiği bulunmuştur. HPLC analizinde tavuk tüyünü 72 saatte %43.833, 120 saatte %60.480 serbest amino asite hidroliz ettiği bulunmuştur.

Doğal suştan izole edilen keratinaz enzim aktivitesinin 7992 U/0.1 ml spesifik aktivitesinin ise 7.66 U/0.1 ml olduğu saptanmıştır. *Brevibacillus agri* SK-27 suşundan EMS mutasyonu ile elde edilen mutant-8, 10947 U/0.1 ml genel, 7.72 U/0.1 ml spesifik aktivite göstermiştir. İzole edilen enzim oda sıcaklığında 26 saatte kan pıhtısını tamamen sıvılaştırmıştır. Enzimin yıkama performansı diğer enzimlere göre daha zayıf gerçekleşmiştir. Enzim, 20 gr/lt ham tavuk tüyünü oda sıcaklığında 72 saatte %100 hidrolize etmiş, antioksidan etkisi %58.38 bulunmuştur.

Enzim *Shigella sonneii de 18 mm, Salmonella typhimurium da 21 mm, E.coli* de 20 mm ve *Klebsiella pneumoniae* de 22 mm inhibisyon zonu oluşturarak güçlü bir antibakteriyel etki göstermiştir.

Bacillus albus SK-36 suşu, optimum enzim üretimini 36-48 inci saatler arasında gerçekleştirmiştir. Enzimin pH değeri 10.0 ve 10°C de optimum aktivite göstermiştir. Enzimin 0-30°C de %101 ve pH 6-13.0 aralığında stabil kalmış ve aktivite indüklenmiştir. Enzimde 40 saatlik ön inkübasyon sonunda pH 6.0 da %114, pH 10.0 da %105 aktivite artışı gerçekleşmiştir.

Enzimin %3-30 NaCL konsantrasyonda %100'ün üzerinde aktivite göstermiştir. Enzimin %7.5-20 aralığındaki aktivitesi konsantrasyonda %112 düzeyinde gerçekleşmiştir. Enzim 10 mM kimyasal konsantrasyonda indüklenmiş ve ortalama %111 aktivite değerine ulaşılmıştır. Enzim inhibisyon yerine indüklenerek, PMSF ile %112, EDTA ile %102 aktivite elde edilmiştir. Enzim 5 mM konsantrasyonda kullanılan kimyasallar ile indüklenmiş ve ortalama %115 enzim üretimi gerçekleşmiştir. En yüksek artış %129 ile $CaCL_2$ de elde edilmiştir. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde metal iyonu bulunduğunu ve metallo-serin özellikte olduğunu göstermektedir.

Bacillus albus SK-36 suşu %3-30 substratlı ortamda gerçekleştirilen analizde 72 saatte ortalama %103, 120 saatte %116 enzim üretmiştir. Suş en fazla enzim üretimini 120 saatlik inkübasyon süresinde sodyum nitrat kullanarak gerçekleştirmiştir. Suş en fazla enzimi %102 ile 0.01, 0.03, 0.08 ve 0.1 gr/lt azot kaynağı kullanıldığında üretmiştir. Suş en fazla enzimi 120 saatlik inkübasyonda %103 ile 0.1 gr/lt karbon kaynağı kullanıldığında üretmiştir.

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen enzim SDS-PAGE analizinde 36 kDa büyüklükte bir aktivite bandı oluşturmuştur. İzole edilen keratinaz enzimi, en yüksek aktiviteyi %198 ile tavuk tüyünde göstermiş, koyunyününde %27 aktivite gerçekleşmiştir. TLC analizinde kazeini, histidin, sistein, sistin, glisin, prolin, glutamin ve tirozin dahil görsel olarak saptanabilen en az 11 amino aside hidroliz etmiştir. Enzim HPLC analizinde tavuk tüyünü 72 saatte %58.287, 120 saatte %46.860 serbest amino asite dönüştürmüştür.

Bacillus albus SK-36 suşundan izole edilen doğal enzim 10709 U/0.1 ml toplam, 7.41 U/0.1 ml spesifik aktivite göstermiştir. Ana suştan EMS mutasyonu ile elde edilen mutant-13, 11189 U/0.1 ml genel, ve 7.72 U/0.1 ml spesifik aktivite göstermiştir.

Enzim oda sıcaklığında 26 saatte kan pıhtısını tamamen sıvılaştırmıştır. Kan lekesini giderme performansı görsel kontrolde çok yüksek gerçekleşmiştir. Doğal enzim 20 gr/lt ham tavuk tüyünü oda sıcaklığında 48 saatte %100 hidrolize etmiş, antioksidan etkisi %49.98 bulunmuştur.

Lysinobacillus fusiformis SKK-2 suşu enzim üretiminde altıncı saate maksimum seviyeye ulaşmıştır. Enzim pH 7.0 de optimum aktivite gösterirken pH 10.0 ikinci bir pik oluşturmuştur. Benzer durum optimum aktivite sıcaklığında gerçekleşmiştir. Enzim 50°C optimum aktivite gösterirken 90°C ikinci bir pik oluşturmuştur.

Enzim 0-100°C de stabil kalmış ve indüklenerek ortalama %116 aktivite değeri elde edilmiştir. Bununla birlikte 40°C %125 ve 90°C %119 aktivite değeri ile iki pikleşme göstermiştir. Enzimin 40 saatlik ön inkübasyon sonunda pH 6-13.0, aralığında %96 stabili kalmış, pH 7.0 de indüklenerek %104 aktivite artışı elde edilmiştir.

Enzimin %3-35 NaCL konsantrasyonunda %100'ün üzerinde aktif ve stabil kalmış, %7.5 konsantrasyonda %110 ile en yüksek aktivite değerine ulaşılmıştır. Enzimi 10 mM konsantrasyondaki kimyasallardan bazıları indüklemiştir. Tween-80 de %150, β-merkaptoetanolde %222 ve triton x-100 de %185 aktivite gerçekleşmiştir. Buna karşılık PMSF ile %17, EDTA ile %28 inhibe olmuştur. İzole edilen enzim 5 mM konsantrasyondaki kimyasallar ile β-merkaptoetanolde indüklenmiş ve %199 aktivite elde edilmiştir. Enzimi EDTA, PMSF ve SDS sırası ile %25, %22, ve 78 inhibe etmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar ile ortalama %25 inhibisyon gerçekleşmiştir. Enzim metallo-serin özelliktedir.

Lysinobacillus fusiformis SKK-2 suşu, %3-30 substratlı ortamda gerçekleştirilen analizde en yüksek üretim 24 saatlik inkübasyonda, %20 konsantrasyon, ve 10°C %428, 30°C de %656 elde edilmiştir. Suş en fazla enzim üretimini azot kaynağı olarak malt özütü bulunan ortamda 120 saatlik inkübasyon sonunda %177 aktivite ile gerçekleştirmiştir. Suş 0.1 gr/lt azot kaynağı bulunan

ortamda %326 ile en fazla enzim üretimi yapmıştır. Karbon kaynağı olarak mısır unu bulunan ortamda 120 saatlik inkübasyon sonunda %162 ile en fazla enzim üretimi gerçekleşmiştir. Karbon kaynağı optimizasyonunda en fazla enzim 0.2 gr/lt mısır unu kullanıldığında 120 saatlik inkübasyonda %233 ile elde edilmiştir.

İzole edilen enzim SDS-PAGE analizinde 160 kDa, 91 kDa ve 60 kDa büyüklükte üç bağımsız aktivite bandı oluşturmuştur. Klonlama çalışmasında kollajenaz geninin 3219 nükleotidden oluştuğu ve 1072 amino asit büyüklüğünde enzim üretildiği bulunmuştur.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi kullanılan substratlar arasında en yüksek aktiviteyi %284 ile balık pulunda göstermiş, bunu %274 ile kemik unu, %212 ile balık derisi izlemiştir. TLC analizinde en fazla hidroliz skimmilkte gerçekleşmiş ve 10 amino asid açığa çıkmıştır. Hidroliz sonunda kazein 4, keratin 6, jelatin 5 ve kollojen (kemik unu) 6 amino aside hidroliz olmuştur. İzole edilen enzim HPLC analizinde kemik ununu 72 saatte %30.355, 120 saatte %34.521 serbest amino asite hidroliz etmiştir.

Lysinibacillus fusiformis SKK-2 suşundan izole edilen doğal **e**nzim 3226 U/0.05 ml toplam aktivite ve 7.38 U/0.05 ml spesifik aktivite göstermiştir. Ana suştan EMS mutasyonu ile elde edilen mutant-2, 5428 U/0.05 ml toplam, 7.57 U/0.05 ml spesifik aktivite göstermiştir.

Enzim oda sıcaklığında 26 saatte kan pıhtısını tamamen sıvılaştırmıştır. Kan lekesini giderme performansı görsel kontrolde çok yüksek gerçekleşmiştir. Doğal enzim 40 gr/lt kemik ununu oda sıcaklığında 24 saatte %51 hidrolize etmiş ve %44.59 antioksidan aktivitesi göstermiştir. *Lysinibacillus fusiformis* SKK-2 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin *Pseudomonas aeruginosaya* karşı ortalama 32 mm çapında aktivite zonu oluşturarak güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Bacillus tropicus SKK-5 suşunda optimum enzim üretimine 15 saatte ulaşmıştır. Enzimin pH 11.0 ve 10°C de optimum aktivite göstermiştir.

Enzim 0-100°C de %100 ün üzerinde stabil olup, 80°C de %117 aktivite değerine ulaşılmıştır. Enzim sıcaklık ile indüklenebilen özelliktedir. İzole edilen enzimin pH 10.0 da %64 stabil kalmıştır. Enzim %3-35 NaCL'de en yüksek aktiviteyi %93 ile %20 konsantrasyonda göstermiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 kollajenaz enzimi 10 mM konsantrasyondaki kimyasallardan β-merkaptoetanolde %229, 5 mM konsantrasyonda β-merkaptoetanol ile %212 indüklenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki indüklenme daha yüksektir. Enzim, SDS ve triton X-100 ile %84 inhibe olmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 suşu %3-30 substrat konsantrasyonunda en yüksek enzim üretimini üretimi 24 saatlik inkübasyonda gerçekleştirmiştir. Suş, %20 konsantrasyonda ve 30°C de %610 enzim değerine ulaşmıştır. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşu en fazla enzim üretimini azot kaynağı olarak kazein kullanıldığında, 120 saatlik inkübasyon sonunda %199 ile gerçekleştirmiştir. Optimizasyon çalışmasında azot miktarı olarak 0.1 gr/lt substrat kullanıldığında en fazla enzim

değerine 120 saatlik inkübasyon sonunda %127 ile ulaşılmıştır. Karbon kaynağı olarak en fazla enzim üretimi buğday kepeği kullanıldığında gerçekleşmiş, 120 saatlik inkübasyon sonunda %171 değeri elde edilmiştir. Karbon miktarının saptanması çalışmasında en fazla üretim değeri 012 gr/lt karbon kaynağı kullanıldığı zaman, 120 saatlik inkübasyon sonunda %112 elde edilmiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen doğal kollajenaz enzimi SDS-PAGE analizinde 98 ve 48 kDa büyüklükte iki bağımsız aktivite bandı oluşturmuştur.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enzimi kullanılan substratlar arasında en yüksek aktiviteyi %1410 ile tavuk tüyünde göstermiştir. *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enzimi kollajenaz substratlarını yüksek düzeyde hidroliz etmiş fakat sıra dışı bir davranış göstererek tavuk tüy ununu keratinaz enzimlerinden daha yüksek düzeyde hidroliz etmiştir. Bununla birlikte diğer keratin içerikli (koyun yünü, keçi kılı ve insan saçı) substratlarda oldukça düşük hidroliz meydana gelmiştir. Bu sonuçlar *Bacillus tropicus* SKK-5 suşundan üretilen kollajenaz enziminin tavuk tüy unu için keratinaz enzimlerine göre öncelikle kullanılacak özellikte olduğunu göstermektedir. Tavuk tüyü özelinde *Bacillus albus* Sk-36 ve Brevibacillus agri SK-27 suşlarından üretilen keratinaz enzimleri substratta sırası ile %198, %216 aktivite göstermişlerdir.

TLC analizinde enzimi kazein, skimmilk, kemik unu, keratin ve jelatin substratlarından en fazla hidrolizi skimmilkte gerçekleştirmiş ve 11 amino asid açığa çıkmıştır. Enzim, HPLC analizinde kemik ununu 72 saatte %35,245, 120 saatte %38,939 serbest amino asite hidroliz etmiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan üretilen doğal enzim 3208 U/0.05 ml toplam, 7.38 U/0.05 ml spesifik aktivite göstermiştir. Enzim oda sıcaklığında 26 saatte kan pıhtısını tamamen sıvılaştırmıştır. Enzimin kan lekesini giderme performansı görsel kontrolde çok yüksek gerçekleşmiştir. Enzim, 40 gr/lt kemik ununu oda sıcaklığında 24 saatte %65.72 hidrolize etmiş ve %37.18 antioksidan etki göstermiştir.

Bacillus tropicus SKK-5 suşundan izole edilen kollajenaz enziminin *Pseudomonas aeruginosaya* karşı ortalama 30 mm çapında aktivite zonu oluşturarak güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Koktey enzim ve hidrolizatları ile yapılan iki uygulama sonunda biberde 14 günlük periyot sonunda yaklaşık %60 performans artışı elde edilmiştir. Etlik piliç denemelerinde ise yem değerlendirme de %83 performans elde edilirken, standart beslenenlerde bu oran %48 ler düzeyinde kalmıştır. Hidrolizat uygulanan tavuklarda 32 inci günde 2230 gr, standart yemle beslenen tavuklarda 1250 gr canlı ağırlığa ulaşılmıştır.

İzole edilen bütün enzimlerin çok farklı alanlarda kullanılabilecek potansiyele sahip oldukları, enzim ve hidrolizatların yem ve gübre olarak doğrudan kullanılma potansiyeline sahip oldukları ve güçlü antibakteriyel ve yara iyileştirme potansiyelleri nedeni ile insan ve hayvan sağlığı açısından standart tedavilere ciddi bir alternatif olmaları söz konusudur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda ileriye dönük önerileri şu şekilde sıralayabiliriz.

1-Klonlama çalışmaları ile enzim üretiminde önemli artış sağlanarak, doğal suşa göre verimde önemli artışlar sağlanarak, maliyetlerin düşürülmesi yönünde araştırma yapılmalıdır. Klonlamanın yanı sıra elde edilen enzimlerin stabilitelerini artırmak için nükleotid düzeyinde in vitro değişikliklerin yapılması ile enzimlerin kullanım alanlarına göre şekillendirilmeleri ve yeniden dizayn edilmeleri gerçekleştirilmelidir.

2-Enzim üretiminde alternatif substrat kaynakları araştırılarak özellikle değerlendirilmeyen tarımsal atıklardan yararlanılmalı ve maliyetlerde avantaj sağlanarak, piyasalaşma noktasında rekabet gücü artırılmalıdır.

3-Proje ve araştırmalarda üretilecek enzimlerin ve enzim kullanılarak elde edilecek ürünlerin yeşil dönüşüme katkı yapması, özellikle tarımsal üretimde sürdürülebilir biyo uyumlu ürünlerin kullanımının yaygınlaştırılması sağlanmalıdır.

4-Moleküler biyolojik uygulamaların yaygın ve etkin şekilde kullanılması ile her geçen gün daha çeşitli ürünlerin eldesi ve farklı alanlarda kullanımları yaygınlaşan enzimler ile yüksek katma değerli ürünlerin üretilmesi hedeflenmelidir.

5-Enzimlerin sağlık alanında giderek artan şekilde ve sorun çözümünde aktif kullanılması yönünde araştırmalar gerçekleştirip, klasik çözümlere alternatifler oluşturulması yönünde ürünler ortaya konulmalıdır. Örneğin, pıhtıların sıvılaştırılmasında kullanılacak katalitik etkisi yüksek enzimlerin üretimi, amilaz gibi antibakteriyel enzimlerin tadavide kullanılması yada antibiyotiklerle enzimlerin kombine edilerek biyofilm yapılarının ortadan kaldırılması ile antibiyotiklerin etkinliğinin arttırılmasını ve kanser başta olmak üzere tedaviye dönük alternatifleri oluşturacak çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

Abood, A., Salman, A.A.M., Abdelfattah, A.M., Hakim, A.E.E., Abdel-Aty, A.M., and Hashem, A.M. 2018. Purification and characterization of a newthermophilic collagenase from Nocardiopsis dassonvillei NRC2aza and its application in wound healing. International Journal of Biological Macromolecules 116 (2018) 801–810 activity of the new strain of *Bacillus paralicheniformis*. PLOS ONE https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312679

Adelere IA, Lateef A., 2016a. Keratinases: emerging trends in production and applications as novel multifunctional biocatalysts. Kuwait J Sci 43(3):118–127

Adelere IA, Lateef A., 2023. Valorization of feather by Bacillus safensis and Aquamicrobium defluvii for growth promotion in leafy vegetables. Waste Biomass Valoriz 14:723–737. https://doi.org/10.1007/s12649-022-01904-9

Agrahari S, Wadhwa N.,2010. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant. Int J Poult Sci 9:482–489

Aktayeva, S., and Khassenov, B., 2024. High keratinase and other types of hydrolase

Alamnie, G., Gessessec, A., Bitew, M., Dawud, N., Andualem, B., and Girma, A. 2023. Production and biochemical characterization of keratinase enzyme from *Bacillus subtilis* ES5 and its potential application in leather dehairing process: a clean leather tanning process. Biotechnology & Biotechnological Equipment. https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2288691

Ambrosio de Menezes, C.L., do Couto Santos, R.C., · Marisa Viegas Santos, M.V., · Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., ·da Silva, R.R.,2021. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37:86

Anatoly B.S., Anastasia V. Balakireva, A.V., Kuznetsova, V., 2019. Collagenolytic Enzymes and their Applications in Biomedicine, *Current Medicinal Chemistry, 26*: 487-505

Annamalai, N., Rajesari, M.V., and Balasubramanian, T. 2014. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5using marine wastes. food and bioproducts processing, 9 2: 335–342

Arabaci, N.; Arikan, B.,2018. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α-amylase from a novel bacterium Bacillus subtilis N8. Prep. Biochem. Biotechnol. 48: 419–426

Arıkan, 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. Bioresource Technology, 99(8):3071-3076.

Avdiyuk, K.V., and Varbanets, L.D. 2019. Keratinolytic enzymes: Producers, physical and chemical properties. Application for biotechnology. Biotechnologia Acta, https://doi.org/10.15407/biotech12.02.027

Aygan, A., 2008. Haloalkalofil Bacillus sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FEB. Doktora Tezi.

Azza M. Abdel-Fattah. 2013. Novel keratinase from marine *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza exhibiting remarkable hide dehairing. Egyptian Pharmaceutical Journal. 12:142–147

Bajaj BK, Jamwal G., 2013. Thermostable alkaline protease production from Bacillus pumilus D-6 by using agro-residues as substrates. Adv Enzyme Res 1:30–36

Banarje, G. And Ray, A., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. Biotechnology and Genetic engineering Rewievs, 33 (2): 119-143.

Baweja M, Tiwari R, Singh PK, Nain L, Shukla P., 2016. An alkaline protease from Bacillus pumilus MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. Front Microbiol 7:1195

Bezus, B., Ruscasso, F., Garmendia, G., Vero, S., Cavello, I., and Cavalitto, S., 2021. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium, Biocatal. Agric. Biotechnol. 32: 01925, https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101925.

Bhari R, Kaur M, Singh R.S., 2021. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. Curr Microbiol 78:2212–2230. https:// doi. org/ 10. 1007/ s00284- 021-02491-z

Białkowska A, Gromek E, Florczak T, Krysiak J, Szulczewska K, Turkiewicz M., 2016. Extremophilic proteases: developments of their special functions, potential resources and biotechnological applications. In: Rampelotto P (ed) Biotechnology of extremophiles. Springer, Switzerland, pp 399–444

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.

Bokveld A, Nnolim N.E, Digban T.O, Okoh A.I, Nwodo U.U.,2021. *Chryseobacterium aquifrigidense* keratinase liberated essential and nonessential amino acids from chicken feather degradation. Environ Technol. https:// doi. org/ 10. 1080/ 09593 330. 2021. 1969597

Boominadhan, U., Rajakumar; R., Sivakumar, P.K.V. and Melvin, M.J.,2009. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes.Bot Res Intl., 2: 83-87.

Bouacem K., Bouanane-Darenfed A., Zaraî Jaouadi N., Joseph M., Hacene H., Ollivier B., Fardeau M . L ., Bejar S ., Jaouadi B., 2016. Novel serine keratinase from Caldicoprobacter algeriensis exhibiting outstanding hide dehairing abilities. Int. J. Biol. Macromol . 86: 321–328. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074

Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A.,2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Appl Microbiol Biotechnol 85:1735–1750

Brandelli, A., 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. Food Bioprocess Technol. 1:105–116, DOI 10.1007/s11947-007-0025-y

Burhan, A., Ünaldı, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A. ve Gülnaz, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. Process Biochemistry. 38:1397-1403.

Caf, Y., 2015. 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. Ç.Ü. Fen BilimLeri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Caf, Y., Maaşoğlu, Y., Valipour, E., and Arıkan, 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.

Cavello I.A, Hours R.A, Cavalitto S.F., 2013. Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from Purpureocillium lilacinum LPS # 876. J Microbiol Biotechnol 23:1133–1139

Chatzistathis T, Fanourakis D, Aliniaeifard S, Kotsiras A, Delis C, Tsaniklidis G.,2021. Leaf age-dependent effects of boron toxicity in two *Cucumis melo* varieties. Agronomy 11(4):759. https:// doi.org/ 10. 3390/ agron omy11 040759

Chauhan, A., and Prabha. V.,2017. Production and partial purification of collagenase from Bacillus sp. isolated from soil sample . International Journal of Advanced Research and Development. 2 (5): 60-65.

Chauhan, S., Gautam, M. ve Azmi, W.,2017. An overview on therapeutic potential and various applications of microbial collagenases. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 7 (6): 17-29

Chen H, Zhang S, Park I, Kim SW., 2017. Impacts of energy feeds and supplemental protease on growth performance, nutrient digestibility, and gut health of pigs from 18 to 45 kg body weight. Anim Nutr 3:359–365. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.005

Da Silva R.R., 2018. Keratinases as an alternative method designed to solve keratin disposal on the environment: its relevance on agricultural and environmental chemistry. J Agric Food Chem 66:7219–7221. https:// doi. org/ 10. 1021/ acs. jafc. 8b031 52

Danilova, I., and Sharipova, M., 2020. The practical potential of *Bacilli* and their enzymes for industrial production, Frontier Microbiolgy 11:1782, https://doi.org/10.3389/ fmicb.2020.01782.

Daroit DJ, Anna VS, Brandelli A., 2011. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. Appl Biochem Biotechnol 165:1740–1753

Ekram, H.A., and 1 and Prasetyo, E.N., 2016. Beef Tenderization Using Bacterial Collagenase Isolated from Slaughterhouse. International Conference on Mathematics, Science, and Education2016 (ICMSE 2016)

Elhamdi, M., Belhadjletaief, C., Hmidet, N., and Ghorbel, S.,2025. Proteases and keratinases from Bacillus zhangzhouensis MH1: Practical use in detergent, leather, and waste management processes. International Journal of Biological Macromolecules 284:

Furhan, J., 2020. Adaptation, production, and biotechnological potential of cold-adapted proteases from psychrophiles and psychrotrophic: A recent overview. J. Genet. Eng. Biotechnol. 18:36.

Furhan, J. Salari, N., Jabeen, M., and Qadri, J., 2019. Partial purification and characterisation of cold active metalla protease by Bacillus sp. AP1 from Apharwat peak, Kashmir. Pak. J. Biotechnol. 16 (1) 47-54.

Gayatri, G.G; Sonawane, P.R., and Shubhangi R., 2018. Pharmaceutical and Cosmetical Application of Keratin Protein Obtaining from Biowaste- A Review. Am.J.PharmTech Res, 8 (5): 20-32

Gessesse A, Rajni HK, Gashe BA., 2003 Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme Microb Technol 32:519–524

Giongo, A., Lucas, J.L., Casarin, F.S., Heeb, F., Brandelli, P., 2007. Keratinolytic proteasesof Bacillus species isolated from the Amazon basin showing remarkablede-hairing activity, World J. Microbiol. Biotechol. 23: 375–382.

Giri SS, Sukumaran S, Sen SS, Olive M, Banu N, Jena PK., 2011. Oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated Bacillus subtiis VSG-4 of tropical soil. J Microbiol 49:455–461

Goda, D.A., Bassiouny, A.R.,, Abdel Monem, N.M.,, Nadia A. Soliman, N.A., and Fattah, Y.R.A.,2020. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 18:23:2-12 https://doi.org/10.1186/s43141-020-00037-7

Gopinaht, S.C.B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Tang, T.H., Chen, Y., Hashim, A., Ruslinda, R., and Md.Arshadi, M.K., 2015. Review Article Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research, http://dx.doi.org/10.1155/2015/140726

Gousterova A, Braikova D, Goshev I, Christov P., 2005. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. Lett Appl Microbiol 40:335–340

Gradisar, H., Friedrich, J., Kriza, 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 FA, de Jong EV, Brandelli A., 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Anim Feed Sci Technol 126:135–144

Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK., 2016. Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from Bacillus amyloliquefaciens SP1 isolated from apple rhizosphere. J Basic Microbiol 56:138–152

Gupta P, Nayak K.K., 2015. Characteristics of protein-based biopolymer and its application. Polym Eng Sci 55:485–498

Gupta R, Ramnani P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl Microbiol Biotechnol 70:21–33

Gurav R, Nalavade V, Aware C, Vyavahare G, Bhatia SK, Yang Y-H, Bapat V, Jadhav J., 2020. Microbial degradation of poultry feather biomass in a constructed bioreactor and application of hydrolysate as bioenhancer to vegetable crops. Environ Sci Pollut Res Int 27:2027–2035. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06536-6

Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., Hattab, M.E. and Jaouadi,B., 2018. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. Intternational Journal Biological Macromolecule. 114: 1033 – 1048, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167.

Hakim, A., Bhuiyan, F.R., Iqbal, A., Emon, T.H., Ahmed, J., and Azad, A.K., 2018. Production and partial characterization of deharing alkaline protease from Bacillus subtilis AKAL7 and Exiguabacterium indicum AKAL11 by using organic municipal solid wastes. Heliyon, 4 (6):1-27

Hamilton, K.M., SE, Guddat, S.E., 2007. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. Biochim Biophys Acta 1770:627-1635.

Harde SM, Bajaj IB, Singhal RS., 2011. Optimization of fermentative production of keratinase from Bacillus subtilis NCIM 2724. Agric Food Anal Bacteriol 1:54–65

Harrington DJ., 1996. Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease. Infect Immun 64:1885-1891.

Hoa Bach, T.M., Pham, T.H., Dinh, T.S. and Takagi, H., 2020.Characterization of collagenase found in the nonpathogenic bacterium Lysinibacillus sphaericus VN3, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *84*: 2293-2302

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.

Huı, Y.Z., Yong,T., Yun,H.H. and Tian, H.W., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkalineprotease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. Mol Biol Rep, 36: 2169–2174.

Ida E´L, da Silva RR, de Oliveira TB., 2016. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by Aspergillus fischeri and Penicillium citrinum. Prep Biochem Biotechnol. doi:10.1080/10826068.2016.1224247

Isiaka A.A., ve Lateff, A., 2016. Keratinases: emerging trends in production and applica tions as novel multifunctional biocatalysts. Kuwait J. Sci. 43 (3): 118–127.

Jain R, Jain A, Rawat N, Nair M, Gumashta R., 2016. Feather hydrolysate from Streptomyces sampsonii GS 1322: a potential low cost soil amendment. J Biosci Bioeng 121:672–677. https://doi.org/10. 1016/j.jbiosc.2015.11.003

Jaouadi Zaraî N, Rekik H, Ben Elhoul M, *et al.*, 2015. A novel keratinase from *Bacillus* tequilensis strain Q7 with promising potential for the leather bating process. Int J Biol Macromol.79, 952-964. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.038.

Joshi S, Satyanarayana T., 2013. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis. Bioresour Technol 131:76–85

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.

Kanoksilapatham W., Intagun W., 2017.A Review: biodegradation and applications of keratin degrading microorganisms and keratinolytic enzymes, focusing on thermophiles and thermostable serine proteases. Amer. J. Appl. Sci. 14 (11): 1016–1023. https://doi.org/10.3844/ajassp.2017.1016.1023

Kate Savita. K., and, Arachana2, P., 2015. Production of collagenase by *Bacillus* KM369985 isolated from leather sample. Int. J. Res. Biosciences, 4(4), 81-87

Kaur M, Bhari R, Singh RS., 2021. Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. Biologia 76:1807–1815. https://doi.org/10.1007/s11756-021-00724-x

Keçeli M, T. and Harp, F., 2014. The Antioxidative Role Of Olive Leaves At Different Harvest Time For Olive Oil Stability QAS. 149p

Khan F., 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. Innov Res Chem 1:1–6

Khan S, Yu H, Li Q, Gao Y, Sallam BN, Wang H, Liu P, Jiang W., 2019. Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. Agronomy 9:266. https://doi.org/10.3390/agronomy9050266

Khardenavis AA, Kapley A, Purohit HJ., 2009. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from Serratia sp. HPC 1383. Waste Manage. 29:1409–1415.

Kim M, Hamilton SE, Guddat LW., 2007. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. Biochim Biophys Acta 1770:627-1635.

Kim, J.M., Lim, W.J., Suh,H.J., 2001. Feather-degrading Bacillus species from poultrywaste, Process Biochem. 37:287–291.

Kshetri P, Roy SS, Sharma SK, Singh TS, Ansari MA, Prakash N, Ngachan SV., 2019. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium Chryseobacterium sediminis RCMSSR-7. Waste Biomass Valor 10:1–11. https://doi.org/10.1007/ s12649-017-0037-4

Kublanov I. V., Tsiroulnikov K. B., Kaliber da E. N., Rumsh L. D., Haertlé T., Bonch-Osmol ovskaya E . A., 2009. Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium Thermoanaerobacter strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal rift zone. Microbiol . 78 (1), 67–75. https://doi.org/10.1134/S0026261709010093

Kuddus, M., Naushin Bano, R., Sheik. G.B., Joseph, B., Hamid, B., Sindhu, R., MadhavaN, A., 2024. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications. Microbial Biotechnology, 17: p14467. doi.org/10.1111/1751-7915.14467

Kumar D, Bhalla TC., 2005. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. Appl Microbiol Biotechnol 68:726–736

Kumar Pal, G., and Suresh P. V., 2016. Microbial collagenases: Challenges and prospect in production and potential applications in food and nutrition. ***RSC Adv.*** **6**:33763-33780. **https://doi.org/10.1039/C5RA23316J**

Kumar RS, Rajesh R, Gokulakrishnan S, Subramanian J., 2015. Screening and characterization of fibrinolytic protease producing Bacillus circulans from mangrove sediments Pitchavaram, South East Coast of India. Int Lett Nat Sci 1:10–16

Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., Sekaran, G., 2008. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated Bacillus pumilus, J. Appl. Microbiol. 104:411–420.

Kumari, M., Padhi, S., Sharma, S., Phukon, L.C., Shingh, S.P., and Rai, A.K., 2021. Biotechnological potential of psychrophilic microorganisms as the source of cold-active enzymes in food processing applications. 3 Biotech, 11 (11):479.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

Letourneau, B., Soussotte, F., Bressollier, V., Branland, P., Verneuil, P., 1998.Keratinolytic activity of Streptomyces sp. SK1-02: a new isolated strain, Lett.Appl. Microbiol. 26:77–80.

Lin X, Tang J, Koelsch G, Monod M, Foundling S., 1993. Recombinant Canditropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. J Biol Chem 268:20143–20147

Liu, L., Ma. M., Cai, Z., Yang, X., and Wang, W., 2010. Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain. Food Technol. Biotechnol. 48 (2) 151–160

Liya, S.M., and Umesh, M., 2023. Bioconversion of chicken feather waste into feather hydrolysate by multifaceted keratinolytic *Bacillus tropicus* LS27 and new insights into its antioxidant and plant growth-promoting properties. Biomass Conversion and Biorefinery. https://doi.org/10.1007/s13399-023-04664-1

Lorena A. Lima, Raimundo F. Cruz Filho, Januário G. dos Santos, Wilson C. Silva., 2015. Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus* sp. DPUA 1728 from Amazonian soil. Brazilian Journal of Microbiology 46, (4): 1217-1223

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J., 1951.Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193:265–275.

Macedo AJ, Silva WOB, Termignoni C., 2008. Properties of a non collagen-degrading Bacillus subtilis keratinase. Can J Microbiol 54:180–188

Manpreet Kaur, M., Bhari, R., and Singh, R.S., 2021. Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. Biologia, 76:1807–1815

Margesin, R.; Collins, T., 2019.Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): Current knowledge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103: 2537–2549.

Marinkovic J, Korac M, Kamberovic Z, Matic I., 2006. Recycling of silver from exposed X-ray films. Acta Metall Slovaca 12:262–268

Mason-D'Croz D, Bogard JR, Sulser TB, Cenacchi N, Dunston S, Herrero M, Wiebe K., 2019. Gaps between fruit and vegetable production, demand, and recommended consumption at global and national levels: an integrated modelling study. Lancet Planet Health 3(7):e318–e329. https:// doi. org/ 10. 1016/ S2542- 5196(19) 30095-6

Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J., & Murdan, S., 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 332, 196–201

Mokrejs, P., Hutta, M., Pavlackova, J., Egner, P., and Benicek, L., 2017. The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate. J Cosmet Dermatol. 1–7, DOI: 10.1111/jocd.12319

More, S. S., Sridhar, D. L., Prakash, S. N., Vishakarma, 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.

Mukherjee AK, Rai SK, Bordoloi NK., 2011. Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline b-keratinase (Mukartinase) purified from a mutant Brevibacillus sp. strain AS-S10-II. Int Biodeterior Biodegrad 65:1229–1237

Mukherjee, P. , Mondal, I. , Debjani Dey, D., Esita Dan, E., Khatun, F. and Souvik Tewari, S., 2023. An Overview on Microbial Enzymes and their Industrial Applications. Journal of Survey in Fisheries Sciences. 10(1S) 6154-6160

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.

Nafady NA, Hassan EA, Abd-Alla MH, Bagy MMK., 2018. Efectiveness of eco-friendly arbuscular mycorrhizal fungi biofertilizer and bacterial feather hydrolysate in promoting growth of Vicia faba in sandy soil. Biocatal Agric Biotechnol 16:140–147. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.024

Nascimento WCA, Martins MLL., 2006. Studies on the stability of protease from Bacillus sp. and its compatibility with commercial detergent. Braz J Microbiol 37:307–311

Navone L, Speight R., 2019. Enzyme systems for effective dag removal from cattle hides. Anim Prod Sci 59(7):1387–1398

Navone L, Speight R., 2020. Enzymatic removal of dags from livestock: an agricultural application of enzyme technology. Appl Microbiol Biotechnol 104:5739–5748. https://doi.org/10.1007/ s00253-020-10656-2

Nayak, K. K., & Gupta, P., 2017. Study of the keratin-based therapeutic dermal patches for the delivery of bioactive molecules for wound treatment. Materials Science and Engineering C, 77, 1088–1097. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.042.

Nigam ,V.K., Singhal, P. and Vidyarthi AS., 2012. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. Int J Adv Biotechnol Res 3:653–669

Nnolim NE, Nwodo UU., 2021. Microbial keratinase and the bioeconomy: a three-decade meta-analysis of research exploit. AMB Expr 11:12. https://doi.org/10.1186/s13568-020-01155-8

Nurdiawati A, Nakhshiniev B, Gonzales HB, Yoshikawa K., 2019. Nitrogen mineralization dynamics of liquid feather hydrolysates obtained by hydrothermal treatment. Appl Soil Ecol 134:98– 104. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.10.021

Nurdiawati A, Nakhshiniev B, Zaini IN, Saidov N, Takahashi F, Yoshikawa K., 2017. Characterization of potential liquid fertilizers obtained by hydrothermal treatment of chicken feathers. Environ Prog Sustain Energy 37:375–382. https://doi.org/10.1002/ep.12688

Nursinatrio and Nugroho, R.A., 2019. Hydrolyzed Chicken Feather Meal as Protein Source for Red Tilapia (*Oreochromis* sp.) Aquafeeds. *Pakistan J. Zool., vol. 51(4), pp 1489-1496,* DOI: http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.4.1489.1496

Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y ve Watanabe, K., 2001. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic Bacillus sp. strain MO-1. Appl Microbiol Biotechnol (2001) 57:103–108

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.

Okpara, M.O., 2022. Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry. Advances in Enzyme Research,10: 23-47

Oluseun Adejumo, I., Oluwaseun Adetunji, C., Ogundipe, K., and Ndudi Osademe, S., 2016. Chemical compositiob and amino acid profile of differentialy processed feather meal. Journal of Agricultural Sciences, 61 (3): 237-246

Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Musallam, S., Al-Zarban, S., 1998. Potential for biotechnological application of keratin-degradingmicroorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathersand other keratins as livestock feed resources, Bioresour. Technol. 66: 1–11.

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

Pal, G.K., and Suresh, P., 2016. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition, *RSC Advances, 6*: 33763-33780.

Pathak AP, Deshmukh KB., 2012. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate. Indian J Exp Biol. 50 (8):569-576. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016494.

Pequeno, A. C., Arruda, A. A., Silva, D. F., Duarte Neto, J. M., Silveira Filho, V. M., Converti, A., ... & Lima, C. A., 2019. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian Bacillus cereus strain. *Preparative Biochemistry & Biotechnology, 49* (5): 501-509.

Pillai P, Mandge S, Archana G., 2011. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from Bacillus subtilis P13. Process Biochem 46:1110–1117

Pillai, P., Archana, G., 2008. Hide depilation and feather disintegration studies withkeratinolytic serine protease from a novel Bacillus subtilis isolate, Appl.Microbiol. Biotechnol. 78: 643–650.

Popko, M., Wilk, R., Górecka, H., Chojnacka, K., and Górecki, H., 2015. Assessment of New NKSMg Fertilizer Based on Protein Hydrolysate of Keratin in Pot Experiments. Pol. J. Environ. Stud. 24 (4): 1765-1772

Purchase D., 2016. The handbook of microbial bioresources. Microbial keratinases: characteristics , biotechnological applications and potential . Gupta V. K., Sharma G. D., Tuohy M. G., Gaur R. (Eds.). CAB International. 634–674.

Qiu J, Wilkens C, Barrett K, Meyer AS., 2020. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: classification, structure, function. Biotechnol Adv 44:107607. https:// doi. org/ 10. 1016/j. biote chadv.2020. 107607

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.

Rahman, C.H., Soltana, F., and Abdelwaheb, C., 2017. Enhancement of protease production by Bacillus sp. and Micrococcus varians induced by UVmutagenesis. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB). http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.5.10.

Rahmayanti, A., 2014. Ekstraksi Kolagen dari Kulit Ikan Gabus (*Channa sriata*) serta Aplikasinya untuk Skrining dan Karakterisasi Kolagenase Bakteri Asal Indonesia. (Collagen Extraction of Gabus (*Channa sriata*) Fish Skin and It's Application for Screening and Characterization of Indonesia Bacteria). (Thesis). Bogor. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bahasa Indonesia.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. and Ashraf, M.. 2019. Microbial proteases applications. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 7:110.

Rehman R, Ahmed M, Siddique A., 2017. Catalytic role of thermostable metalloproteases from Bacillus subtilis KT004404 as dehairing and destaining agent. Appl Biochem Biotechnol 181:434–450

Rochima, E.,, Sekar, N., Buwono, I.D., Afrianto, E., and Pratama, R.I., 2016. Isolation and Characterization of Collagenase from *Bacillus subtilis*(Ehrenberg, 1835); ATCC 6633 for Degrading Fish Skin Collagen Waste from Cirata Reservoir, Indonesia. *Aquatic Procedia 7:76 – 84*

Rouphael Y, Colla G., 2020. Biostimulants in agriculture. Front Plant Sci 11:40. https:// doi. org/ 10. 3389/ fpls. 2020. 00040

Sahni N., Sahota P. P., Phutela U. G., 2015. Bacterial keratinases and their prospective applications: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 4 (6), 768–783.

Sahni, N., Pal Sahot, P., and Gupta Phutela, U., 2015. Bacterial keratinases and their prospective applications. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 4(6): 768-783

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.

Salamonea, M., Cuttittab. A., Seiditac. G., Mazzolad, S., Bertuzzie. F., Ricordif. C., and Ghersi, G., 2012. Characterization of Collagenolytic/Proteolytic Marine Enzymes. Chemical Engineering Transactions. 27:1-12

Sanchez, S., ve Demain, A. L., 2017. Chapter 1 - Useful Microbial Enzymes An Introduction. Biotechnology of Microbial Enzymes, Academic Press, ISBN 9780128037256,

Sanghvi, G., Patela, H., Vaishnava, D., Ozaa, T., Daveb, G., Kunjadiac, P., Shethaa, N., 2016. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potentialutility in cosmetic formulation. International Journal of Biological Macromolecules, 87: 256–262

Santiago, M.; Ramírez-Sarmiento, C.A.; Zamora, R.A.; Parra, L.P., 2016. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. Front. Microbiol., 7: 1408.

Sedghi, M., Hosseini, F., and Saeed Farzad-Mohajeri, S., 2025. A newly isolated bacterium with collagenase therapeutic impact on wound healing. *J. Med. Pharm. Chem. Res.* 7: 74-88

Sela S., Schickler H., Chet I., 1998. Purification and characterization of a Bacillus cereus collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins.Eur J Plant Pathol 104:59-67

Sela, Ş., Schickler, H., Chet, I., and Spiegel, Y., 1998. Purification and characterization of a B*acillus cereus* collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins. European Journal of Plant Pathology 104: 59–67

Shankar S, More SV, Laxman RS., 2010. Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from Conidiobolus coronatus. J Sci Eng Technol 6:60–69

Sharma S., Gupta A., 2016. Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. *Braz. Arch. Biol. Technol*. V. 59, e16150684

Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., and Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimisation of production parameters and their properties. Journal of genetic engineering and biotechnolgy, 15 (1):115-126

Singh S, Gupta P, Sharma V et al (2014) Multifarious potential applications of keratinase of Bacillus subtilis K-5. Biocatal Biotransform 32:333–342

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Kumar Mehta, P., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6, 174.

Singh, R., Mitta, A., Kumar, M., and Mehta, P.K., 2016. Microbial Proteases in Commercial Applications. J Pharm Chem Biol Sci. 4(3):365-374.

Singh, S., and Bajaj, B. K., 2017. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy Ecol. Environ.* 2, 370–386.

Sobucki L, Ramos RF, Gubiani E, Brunetto G, Kaiser DR, Daroit DJ., 2019. Feather hydrolysate as a promising nitrogen-rich fertilizer for greenhouse lettuce cultivation. Int J Recycl Organ Waste Agric 8(1):493–499. https:// doi. org/ 10. 1007/ s40093- 019- 0281-7

Song, S., Xue Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., and Wei, F., 2023. Microbial proteases and their applications. 10.3389/fmicb.2023.1236368

Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., & Gubitz, G. M., 2007. A novel metalloprotease from Bacillus cereus for protein fibre processing. Enzyme and Microbial Technology, 40, 1772–1781.

Srisattha, R.W., Kageyama, H., and Takabe, T., 2016. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. AIMS Microbiology, 2 (1): 42-54

Stamenković, S.S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., and Lazić, M., 2019. *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. *Hem. Ind. 73 (3) 169-182*

Stiborova H, Branska B, Vesela T, Lovecka P, Stranska M, Hajslova J, Jiru M, Patakova P, Demnerova K., 2016. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. J Chem Technol Biotechnol 91:1629–1637

Su C, Gong J-S, Ye J-P, He J-M, Li R-Y, Jiang M, Geng Y, Zhang Y, Chen J-H, Xu Z-H, Shi J-S., 2020b. Enzymatic extraction of bioactive and self-assembling wool keratin for biomedical applications. Macromol Biosci 20:2000073

Suneetha, V., Khan, Z. A., Shukla, G., and Varma, A.(Eds), 2011.Soil Enzymology. Springer, Germany, 259-268.

Tahara M, Mabuchi N, Takagishi T., 2003. Shrink proofing of wool fabrics by pulse corona discharge and enzymes. Sen-I Gakkaishi 59:153–157

Tamreihao K, Mukherjee S, Khunjamayum R, Devi LJ, Asem RS, Ningthoujam DS., 2019. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. J Basic Microbiol 59:4–13. https:// doi. org/ 10. 1002/jobm. 20180 0434

Thanzami,K., and Roy, I., 2008. A sensitive, rapid and specific technique for the detection of collagenase using zymography, *Electrophoresis*, *29*:1585-1588.

Tian, J., Long, X., Tian, Y., and Shi, B., 2019. Eco-friendly enzymatic dehairing of goatskins utilizing a metalloprotease high-effectively expressed by Bacillus subtilis SCK6. Journal of Cleaner Production 212: 647-654

Tsai G.J and SuW.H.,1999.Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. J Food Prot. 62:239–43.

Tyas, S.D.r., and Nilamsari, N.R., 2019. Isolation and characterization of a newly keratinase producing *Bacillus sp* N1 from tofu liquid waste. Earth and Environmental Science 230 012088. doi:10.1088/1755-1315/230/1/012088

Uchida, H., Conda, D., Yamaşhita, S., Tanaka, T., Tran, L. H., Nagano, H., and Uwajima, T., 2004. Purification and properties of a protease produced by Bacillus subtilis CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 579–582, 2004.

Uttangi, V., and Aruna, K., 2018. Optimization of Production and Partial Characterization of Keratinase Produced by *Bacillus thuringiensis* strain Bt407 Isolated from Poultry Soil. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 7*(4): 596-626

Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S., and Dhilon, G.S., 2016. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. Critical Reviews in Biotechnology, http://dx.doi.org/10.1080/07388551

Vidmar B, Vodovnik M., 2018. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. Food Technol Biotechnol 56:312–328. https:// doi. org/ 10. 17113/ ftb. 56. 03. 18. 5658

Vignardet, C., Guillaume, Y. C., Michel, L., Friedrich, J., & Millet, J., 2001. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. International Journal of Pharmaceutics, 224:115–122.

Villa A.L.V, Aragao M.R.S, dos Santos E.P., 2013. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. BMC Biotechnol 13:15

Wang D, Piao XS, Zeng ZK, Lu T, Zhang Q, Li PF, Xue LF, Kim SW.,2011. Ef fects of keratinase on performance, nutrient utilization,intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crudeprotein. Asian-Aust J Anim Sci 24:1718–1728. https:// doi. org/ 10.5713/ ajas. 2011. 11132

Wang D, Piao XS, Zeng ZK, Lu T, Zhang Q, Li PF, Xue LF, Kim SW., 2011. Efects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and infammatory response of weaned piglets fed diets with diferent levels of crude protein. Asian-Aust J Anim Sci 24:1718–1728. https://doi.org/10. 5713/ajas.2011.11132.

Wang H, Guo Y, Shih JCH., 2008. Efects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. Anim Feed Sci Technol 140:376–384. https:// doi.org/10.1016/j.anifeedsci.04.003

Wang J.J. Garlich J.D., and Shih J.C.H., 2006. Benefcial efects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. J Appl Poult Res 15:544–550

Wang SL, Wu YY, Liang TW., 2011. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with Bacillus subtilis TKU007. New Biotechnol 28:196–202

Wang, J., Hao, S., Luo, T., Cheng, Z., Li, W., Gao, F. Wang, B., 2017. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 149, 341–350. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.10.038

Warinda Suphatharaprateep1, Benjamas Cheirsilp1, and Akkasit Jongjareonrak., 2011.Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. New Biotechnology 28 (6): 649-655 doi:10.1016/j.nbt.2011.04.003

Yadav, A.N.; Verma, P.; Kumar, M.; Pal, K.K.; Dey, R.; Gupta, A.; Padaria, J.C.; Gujar, G.T.; Kumar, S.; Suman, A.; et al., 2015. Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific bacilli from extreme environments of India. Ann. Microbiol. 65:611–629.

Zhang, R.X, Gong, J.S, Su, C., 2016a. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from Brevibacillus parabrevis CGMCC 10798. Int J Biol Macromol 93:843–851

Zhou L, Xie X, Wu T, Chen M, Yao Q, Zhu H, Zou W., 2020. Compound enzymatic hydrolysis of feather waste to improve the nutritional value. Biomass Conv Bioref. https:// doi. org/ 10. 1007/s13399- 020- 00643-y

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Süreyya KOCAMAZ

EĞİTİM:

2018	**Doktora:** Doğal *Bacillus* sp. Suşlarından Halofilik Mezofil ve Cold aktif alkaline ve nötral Keratinaz ve Kollajenaz Enzim Eldesi, Karakterizasyonu, Tavuk Tüyü, Yün ve Kollajenin Enzimatik hidrolizi, Hidrolizatların Yem, Gübre, Kozmetik ve Tedavide kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji Anabilim dalı). (**FDK-2019-12012)DEVAM EDİYOR**
2013-2017	**Yüksek Lisans**: ***E.coli, Klebsiella sp, Pseudomonas aeroginosa* ve *Staphylococcus aureus* da antibiyotik dirençlilik dağılımı ve biyoaktif molekül karışımının etkisi**. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji Anabilim dalı). Yüksek Lisans Tezi **(FLY-2015-5237) TamamLandı. ARALIK 2017**
2009-13	**Lisans:** Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
2007-11	**Lisans:** Anadolu Üniversitesi İktisadi İdari BilimLer Fakültesi İktisat Bölümü
1996-98	**Ön Lisans**: Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü
1992-96	**Lise:** Çukurova Üniversitesi Sağlık Koleji Laboratuvar Bölümü

İŞ:

1998-Halen	Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı (Mikrobiyoloji, Hemokültür, Biyokimya, Hematoloji, Tüberküloz)

BİLGİSAYAR:

ProgramLar	Microsoft Office suite, Internet explorer, Adobe Photoshop
İşletim Sistemi	Windows XP/Vista/7

YAYINLAR

1.**Süreyya KOCAMAZ**. *E.coli, Klebsiella sp, Pseudomonas aeroginosa* ve *Staphylococcus aureus* da antibiyotik dirençlilik dağılımı ve biyoaktif molekül karışımının etkisi. Yüksek Lisans Tezi **(FLY-2015-5237) Tamamlandı. Aralık 2017**

2.**Süreyya KOCAMAZ**., Burhan ARIKAN. 2018. E.coli'de Antibiyotik Dirençlilik Dağılımı ve Biyoaktif Molekül Karışımının Etkisi. Ç.Ü. Fen BilimLeri Dergisi. 36 (3): 1-8

3.**Sureyya Kocamaz** and Derya Kocamaz. 2019 .Isolation and Characterisatıon of Acidic Cellulase Enzyme from Native Bacillus Sp. S-41 Strain. Journal of Applied Biological Sciences. 13 (1): 01-05

4.**Sureyya Kocamaz**, Derya Kocamaz and Burhan Arikan, 2020. Antibacterial Effect of a bioactive molecule againstnosocomial infection agent Escherichia coliisolated from cukuroca university hospital. Fresenius Environmental Bulletin. 29 (6):4526-4534

5.Nihan Arabacı., Ebrahim Valipour., Ozge Diniguzel, Nurdan Saracoglu, Yasemin Caf, **Süreyya Kocamaz** and Burhan Arikan. 2014. **An alkaline, thermostable and thermophile serine protease from Bacillus sp.AB12**, 3th international congress of the molecular biology association-İzmir Institute of Technology; 10-20 september.

6.Burhan Arıkan, **Süreyya Kocamaz** ve İbrahim Valipour. 2015. **Antibiyotiklere alternative olarak üretilmiş BAM 'ın biyofilm üreten antibiyotik dirençli *olan E. coli, P. aeroginosa ve K. pneumonia* üzerine etkisinin araştırılması.** 4. Ulusal Moleküler Biyoloji Biyoteknoloji Kongresi, 22.25 Ağustos 2015, Afyonkarahisar.

7.**Süreyya Kocamaz**, Selma Gürz and Burhan Arıkan. 2019. Characterization of Alkaline and Thermophile Protease Enzyme Produced from Bacillus sp. SB-23 Strain Isolated from Salt Lake Turkey. International Biological, Agricultural and Life Science Congres**. November 7-9, Liviv, UKRAINE.**

8.Aylin Gazdağlı, Burhan Arıkan, Deniz Sezlev Bilecen, Kıvanç Bilecen, **Süreyya Kocamaz,** Tamer Kayar, Cumhur Çökmüş, Behiç Coşkun. Effects of Bacterial Enzyme Combinations Added to Drinking Water on Cattle Fattening Performance. **II. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2020, 01– 03 September 2020, Gebze, Turkey**

9.Aylin Gazdağlı, Burhan Arıkan, Ramazan Solmaz, **Süreyya Kocamaz**, Deniz Sezlev Bilecen, Kıvanç Bilecen, Cumhur Çökmüş, Behiç Coşkun. Effects of an Enzyme Combination on Calves' Growth Performance. **II. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2020, 01– 03 September 2020, Gebze, Turkey.**

10. Behiç Coşkun, Aylin Gazdağlı, Burhan Arıkan, **Süreyya Kocamaz**, Deniz Sezlev Bilecen, Kıvanç Bilecen, Musa Kuzu, CumhurÇökmüş. Effects of Bacterial Enzyme Combinations Added to Total Mix Ration on Cattle Fattening Performance. **II. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2020, 01– 03 September 2020, Gebze, Turkey.**

11.Sureyya KOCAMAZ, Derya KOCAMAZ, and Burhan ARIKAN. A New Alkaline, Thermophile, Halophilic Protease Enzyme Isolated *Bacillus sp*. SKAHB-19 from Salt Lake in Turkey. **II. International Enzyme and Bioprocess Days EBDays 2020, 01– 03 September 2020, Gebze, Turkey.**

12. Sureyya KOCAMAZ, Burhan ARIKAN, , Derya KOCAMAZ, Selma UGURLUER. Isolation and Characterization of Extremophilic Alkaline Keratinase Enzyme from Alkalophilic *Bacillus sp*. SK-31 Salt Lake in Turkey. European Biotechnology Congress 2021 which will be held between September 23-25, 2021 in **Sofia, Bulgaria.** VOLUME 5 ISSUE 3. DOI: 10.2478/ebtj-2021-0031.

13. Mahmut Tör , Emeka C. Okechuk wu , Deniz Göl , Rachel Osborn , Yiguo Hong , Ömür Baysal , **Süreyya Kocamaz** , Burhan Arikan , Sanu Arora , Claire Domoney , Jane Thomas , Tom Wood , David Studholme , John McDowell. Fundamental and translational research on downy mildews: Reverse genetics, pathogenomics and biologics. 21st Annual Meeting of the Oomycete Molecular Genetics Network - OMGN2022. Session 8 - Oomycete Genetics and Genomics. Oral Presentation 8.1. Phytophthora Research Centre, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno. 22nd - 25th **August 2022**. Prag, Çekya.

PROJELER

1.*E.coli, Klebsiella sp, Pseudomonas aeroginosa* ve *Staphylococcus aureus* da antibiyotik dirençlilik dağılımı ve biyoaktif molekül karışımının etkisi. **FLY-2015-5237. Araştırmacı, Tamamlandı.**

2.Doğal *Bacillus* sp. Suşlarından Halofilik Mezofil, Cold Aktif Alkaline Nötral Kollajenaz ve Keratinaz Enzim Üretimi, Tüy, Yün ve Kollajenin Enzimatik hidrolizi, Hidrolizatların Yem, Gübre ve Kozmetikte kullanılabilirliği. **Doktora Tez Projesi FDK-2019-12012 (Devam ediyor).**

3.Doğal Bacillus sp Suşlarından Halofilik Mezofil ve Cold aktif alkaline Keratinaz Enzim Eldesi Karakterizasyonu Tavuk Tüyü Enzimatik hidrolizi Amino asitlerin Yem ve Gübre Katkısı olarak kullanılması. FBA-2020-13103 (Ç:Ü. BASPB, Araştırmacı, Devam Ediyor)

4.Bakteriyel keratinolitik enzimler aracılığıyla hidrolize edilen tavuk tüyü hidrolizatlarının balık yem kompozisyonlarında alternatif protein kaynağı olarak kullanımı. FBA-2023-15248. Araştırmacı

5.ANTİBAKTERİYEL KUMAŞ ÜRETİMİ (iç çamaşırı, ped, yara bandı, sargı bezi, hastane, askeriye, yurt yatak takımları, Radyoloji önlüklükleri, maske, giysiler, ,araç koltuk kılıfları). 2220214, TUBİTAK 1512 PROJESİ. [**Tamamlandı**]. Proje **Yürütücüsü**. Melcure Biyoteknoloji Şirketi (Şirket sahibi).

6.Akdeniz Sineği İle Mücadele ve Sürdürülebilir Tarımsal Üretim İçin AB Yeşil Mutabakatına Uygun Biyoteknolojik Ürün Geliştirilmesi. Biocera Biyoteknoloji Şirketi AR-GE personeli ve Şirket Ortağı KOSGEB AR-GE ÜRGE Projesi [**Tamamlandı**]

7.Farklı Bakteriyel Enzim Kombinasyonlarının Buzağılarda, Besi Sığırlarında ve Süt İneklerinde Büyüme ve Verim Performansı Üzerine Etkisi. Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Yönlendirilmiş Proje. (TORKU Üniversitesi,1.1.2019-31.12.2020), [**Tamamlandı**] **Araştırmacı**

8.Bakteriyel keretinolitik enzimler aracılığıyla hidrolize edilen tavuk tüyü hidrolizatlarının balık yem kompozisyonlarında alternatif protein kaynağı olarak kullanımı (Araştırma Üniversitesi, FBA-2023-15248) **Araştırmacı**