



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meryem KARADAĞLI

KERATİNAZ ÜRETEEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARTTIRILMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2016

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KERATİNAZ ÜRETEEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU
VE ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARTTIRILMASI**

Meryem KARADAĞLI

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
MAYIS-2016**

TEZ ONAYI

KERATİN AZ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARTTIRILMASI

Meryem KARADAĞLI tarafından Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Prof.Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Yrd.Doç.Dr. Makbule BAYLAN
Su Ürünleri Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah Ali GÜRTEN
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Bu Çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: OKÜBAP-2014-PT3-006

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

MERYEM KARADAĞLI

ÖZET

KERATİNAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARTTIRILMASI

Meryem KARADAĞLI
Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Mayıs 2016, 72 Sayfa

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tavukçuluk Ünitesi'nden toplanan ve tavuk tüyü içeren toprak örneklerinden üç adet keratinolitik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 olarak isimlendirilmişlerdir. MK1 ve MK3 keratinazları optimum aktivitelerini 40°C'de gösterirken, MK2 keratinazı 50 °C'de göstermiştir. Yine MK1 ve MK3 keratinazları optimum aktivitelerini pH 9.0'da, MK2 keratinazı ise pH 8.0'de göstermiştir. MK1, MK2 ve MK3 bakterilerinin keratinazlarına ait spesifik aktiviteler 40 °C'de sırasıyla 2.76, 0.77 ve 5.48 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir. En yüksek düzeyde enzim üretimini inokülasyondan itibaren MK1 izolatu 36., MK2 ve MK3 izolatları ise 24-36. saatlerde gerçekleştirmişlerdir. İzolatların EtBr ile muamelesi sonucunda MK1'den MK1-M3, MK1-M4 ve MK1-M5, MK2'den MK2-M3 ve MK2-M4, MK3'den ise MK3-M1, MK3-M3, MK3-M4 ve MK3-M5 aşırı üretici mutant varyeteleri elde edilmiştir. MK1-M3, MK1-M4, MK1-M5, MK2-M3, MK2-M4, MK3-M1, MK3-M3, MK3-M4 ve MK3-M5 mutant varyeteleri kendi yabancı tip suşlarına göre sırasıyla %186, 117, 133, 144, 171, 122, 116, 214 ve 187 oranında enzim üretmişlerdir. PMSF, üre, CaCl₂, Tween 80 her üç enzim için de ortak aktivatör olarak belirlenmiştir. EDTA ise her üç enzimi de inhibe etmiştir. BLAST analizleri sonucunda *Bacillus* sp. MK1 bakterisi *B. subtilis* NCDO 1769 ile %96 oranında rDNA sekans benzerliği göstermiştir. Diğer taraftan *Bacillus* sp. MK2 ve MK3 bakterileri ise *B. subtilis* NRRL B-4219 ve *B. tequilensis* 10b bakterileri ile %99, *B. subtilis* SBMP4 bakterisi ile de %98 oranında rDNA sekans benzerliği göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., keratinaz, izolasyon, karakterizasyon, mutasyon, EtBr

ABSTRACT

ISOLATION OF KERATINASE PRODUCING BACTERIA AND INCREASING OF ENZYME PRODUCTION BY MOLECULAR METHODS

Meryem KARADAĞLI
M.Sc., Department of Biology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

May 2016, 72 Pages

In the present study, three keratinolytic *Bacillus* strains were isolated from the feather containing soil samples collected from the poultry enterprise of Çukurova University. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. MK1, MK2, and MK3, respectively. The optimum enzyme activities were observed at 40°C for MK1 and MK3 keratinases whereas 50 °C for MK2 keratinase. Similarly, optimum pH value for MK1 and MK3 keratinase was 9.0, whereas 8.0 for MK2 keratinase. The specific activities of MK1, MK2, and MK3 keratinases were 2.76, 0.77 and 5.48 U/mg protein at 40°C, respectively. Maximum enzyme productions of isolates were observed after 36 hours for MK1, and 24-36 hours for MK2, and MK3. Over-expressing mutant varieties MK1-M3, MK1-M4 and MK1-M5 from MK1, MK2-M3 and MK2-M4 from MK2, and MK3-M1, MK3-M3, MK3-M4 and MK3-M5 from MK3 were obtained after EtBr treatment. MK1-M3, MK1-M4, MK1-M5, MK2-M3, MK2-M4, MK3-M1, MK3-M3, MK3-M4 and MK3-M5 have produced 186, 117, 133, 144, 171, 122, 116, 214 and %187 keratinase according to their own wild type strains, respectively. PMSF, urea, CaCl₂ and Tween 80 were determined common activators for all enzymes. However, EDTA has also inhibited all these three enzymes. According to BLAST analysis, *Bacillus* sp. MK1 rDNA sequence was similar to *B. subtilis* NCDO 1769 rDNA sequence at the rate of 96%. On the other hand, *Bacillus* sp. MK2 and MK3 rDNA sequences were similar to *B. subtilis* NRRL B-4219 and *B. tequilensis* 10b rDNA sequences at the rate of 99%, and *B. subtilis* SBMP4 rDNA sequence at the rate of 98%.

Key Words: *Bacillus* sp., keratinase, isolation, characterization, mutation, EtBr



Canım aileme...

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma, Osmaniye Korkut Ata Üniwersitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü’de Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans çalıŐmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimini sabırla sunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN’a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, her adımda birlikte hareket ettiğim ve manevi desteğini sürekli hissettiğim Yüksek Lisans öğrencisi Zübeyde BAŐARAN’a, tavuk tüyü unu hazırlama aŐamasındaki katkılarında dolayı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu DURMAZ’a, yine ihtiyaç duyduğumda benden yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Hürü YÜCEL’e ve diğer laboratuvar çalıŐanlarına teşekkür ederim.

Canım aileme, bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu alıŐmayı Osmaniye Korkut Ata Üniwersitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje no: OKÜBAP-2014-PT3-006) desteklenmiŐ olup, ilgili birime de katkılarında dolayı teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET..	i
ABSTRACT	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikrobiyal Enzimler	3
1.2. Mikrobiyal Kökenli Proteazlar	4
1.3. Keratinler	4
1.4. Keratinazlar	6
1.4.1. Bakteriyal Keratinazlar	6
1.4.2. Keratinazların Biyokimyası	6
1.4.3. Keratinazların Üretimi	8
1.4.4. Keratin İçeren Atıkların Biyolojik Islahı	9
1.4.5. Keratinazların Diğer Uygulama Alanları	10
1.5. Amaç	11
1.6. Kapsam	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	22
3.1. Malzeme	22
3.1.1. Keratinolitik Bakterilerin İzolasyonu	22
3.1.1.1. Temel Tüylü Besiyeri	22
3.1.1.2. Luria Bertoni (LB) Broth	22
3.1.1.3. Skim Milk Agar	23
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler	23
3.1.3. Alet ve Cihazlar	23

3.2.	Yöntem	24
3.2.1.	Bakterilerin İzolasyonu ve Keratinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	24
3.2.2.	Enzimatik Analizler	37
3.2.2.1.	Etanol Presipitasyonu İle Enzimlerin Hazırlanması	27
3.2.2.2.	Enzim Aktiviteleri İçin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.2.3.	Enzim Aktiviteleri İçin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.2.4.	Enzimlere Ait Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	28
3.2.2.5.	Enzimlere Ait pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	29
3.2.2.6.	Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	29
3.2.2.7.	Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	30
3.2.2.8.	Oransal Aktivite	30
3.2.2.9.	Mutant Varyetelere Ait Oransal Aktiviteler.....	31
3.3.	Filogenetik Analizler	31
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1.	Keratinaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu	32
4.2.	Keratinazların Enzimatik Özellikleri	33
4.2.1.	Enzimlerin Optimum pH Değerleri.....	33
4.2.2.	Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri.....	35
4.2.3.	Enzimlerin pH Stabiliteleri	37
4.2.4.	Enzimlerin Sıcaklık Stabiliteleri	38
4.2.5.	Zamana Göre Enzim Aktiviteleri.....	39
4.2.6.	Enzimlerin Oransal ve Spesifik Aktiviteleri	40
4.2.7.	Bazı Kimyasalların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi	42
4.2.7.1.	Bazı Kimyasalların MK1 Keratinazı Üzerine Etkisi.....	42
4.2.7.2.	Bazı Kimyasalların MK2 Keratinazı Üzerine Etkisi.....	43
4.2.7.3.	Bazı Kimyasalların MK3 Keratinazı Üzerine Etkisi.....	43
4.2.8.	Mutant Varyantlara Ait Keratinaz Aktivite Düzeyleri.....	45
4.2.9.	Mutant Varyantlara Ait Spesifik Enzim Aktivite Düzeyleri.....	50
4.2.10.	Filogenetik Analizler.....	51
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
	KAYNAKLAR	61
	ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı bakteriyal keratinazların biyokimyasal özellikleri	8
Çizelge 4.1. Bazı keratinolitik <i>Bacillus</i> türleri ve keratinaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklık değerleri	36
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait spesifik aktivite değerleri	41
Çizelge 4.3. Yabani tip izolatlar ile mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri.....	51
Çizelge 4.4. <i>Bacillus</i> sp. MK1 bakterisine ait rDNA sekansı	52
Çizelge 4.5. <i>Bacillus</i> sp. MK2 bakterisine ait rDNA sekansı	52
Çizelge 4.6. <i>Bacillus</i> sp. MK3 bakterisine ait rDNA sekansı	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Reaksiyonlarda enzimli ve enzimsiz aktivasyon enerjisi seviyeleri	1
Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan bir görüntü.....	24
Şekil 3.2. Toprak numunelerinde bulunan <i>Bacillus</i> sporlarının LB besi ortamında çimlendirilmesi	26
Şekil 3.3. İzolatlardan gliserol stokların hazırlanması	26
Şekil 4.1. Temel tüylü besi ortamında izolatlara ait keratinaz aktivite zonları.....	32
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait pH optimum grafığı	34
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait sıcaklık optimum grafığı	36
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait pH stabilite grafığı..	38
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait sıcaklık stabilite grafığı.	39
Şekil 4.6. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait aktivite/zaman grafığı..	40
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının oransal aktivite grafığı	41
Şekil 4.8. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK1 keratinazı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.9. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK2 keratinazı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.10. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK3 keratinazı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.11. EtBr muamelesi sonucunda koloni gelişimi tamamlanan plakların görüntüsü	46
Şekil 4.12. <i>Bacillus</i> sp. MK1 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafığı	47
Şekil 4.13. <i>Bacillus</i> sp. MK2 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafığı	48
Şekil 4.14. <i>Bacillus</i> sp. MK3 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafığı	49
Şekil 4.15. <i>Bacillus</i> sp. MK1 izolatına ait dendrogram analizi.....	55
Şekil 4.16. <i>Bacillus</i> sp. MK2 izolatına ait dendrogram analizi.....	57
Şekil 4.17. <i>Bacillus</i> sp. MK3 izolatına ait dendrogram analizi.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

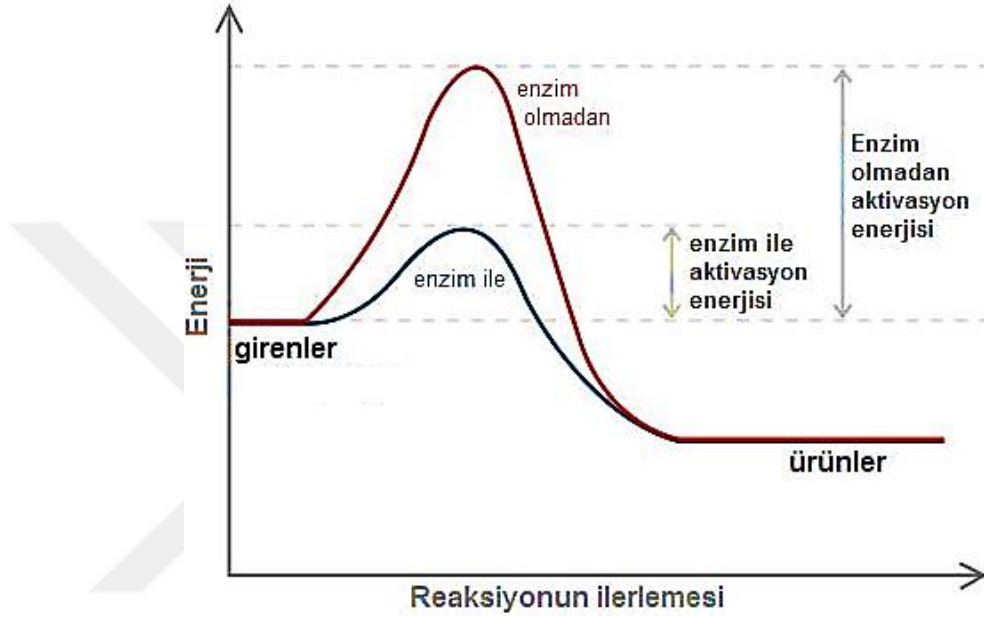
%	Yüzde
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C.T.	Katalitik tip
dk	Dakika
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
EMS	Ethyl methanesulfonate
EtBr	Ethidium bromide
gr	Gram
GRAS	Generally recognized as safe
kDa	Kilodalton
L	Luria besiyeri
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligram
mg/ml	Miligram/mililitre
ml	Mililitre
mM	milimolar
MW	Moleküler ağırlık (kDa)
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
OD	Optical density
PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride
rDNA	Ribozomal DNA
Rpm	Dakikada devir sayısı
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sp.	Tür
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre
UV	Ultra violet
v/v	Hacim/hacim

w/v	Ağırlık/hacim
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik reaksiyonların katalizörü olup, reaksiyonları diğer katalizörlere göre daha hızlı katalizlerler (Aehle, 2004). Diğer taraftan, aktivasyon enerjisi ise bir kimyasal tepkimedeki bütün molekülleri reaktif hale getirmek için ihtiyaç duyulan enerjidir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Reaksiyonlarda enzimli ve enzimsiz aktivasyon enerjisi seviyeleri

Aktivasyon enerjisi kavramı, kataliz ve enzim kavramları ile yakından ilgilidir. Biyokimyasal açıdan bakıldığında katalizörler, tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını arttıran maddelerdir. Katalizörler, tepkimeleri kolaylaştırırken tepkime esnasında değişikliğe uğratılmazlar veya tüketilemezler. İn vivo koşullarda tepkimelerin birçoğu katalizör olmaksızın gerçekleşmez (Aehle, 2004).

Enzimler protein yapısında olup belirli tepkimeler için özgülüdürler (Aehle, 2004). Her bir enzim genellikle tek tip bir kimyasal tepkimeyi katalizlerken, diğer bazı enzimler birbirleri ile benzerlik gösteren tepkime grubunu katalizleyebilmektedirler. Bu durum, enzim molekülünün kendine özgül üç boyutlu yapısından kaynaklanmaktadır. Enzim tarafından katalizlenen bir tepkimede enzim (E) ile

substrat (S) bir araya gelerek enzim-substrat kompleksini oluşturur. Tepkime sonucunda meydana gelen ürün (Ü) nihayetinde enzimden ayrılır ve enzim başlangıçtaki haline geri döner.

Enzimler genellikle substratlarla mukayese edildiğinde daha büyük olup, enzim ile substrat bir araya gelmesi, Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlarla mümkün olabilmektedir. Substrat, enzim üzerinde bulunan spesifik aktif bölgeye bağlanmaktadır.

Enzimlerin kullanımının tarihsel süreci incelendiğinde, eski çağlardan bugüne peynir, maya, sirke, bira, şarap gibi gıda ve içeceklerin yanısıra, keten, deri, çivit mavisi gibi ürünlerin üretilmesinde kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002).

Geçen yüzyılın sonlarına doğru modern biyoteknolojinin devreye girmesi özellikle enzimlerin üretimi için belirlenen uygun mikroorganizmaların kullanılmasıyla büyük ölçeklerde, iyi derecede karakterize edilmiş ve yüksek derecede saf enzim üretimi mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmelerin neticesinde, tekstil, nişasta ve deterjan gibi endüstrileri de içine birçok endüstriyel alanda enzimlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ise enzimlerin daha bol, saf ve ucuz bir şekilde üretilmelerine imkan sağlayarak ticarileştirilmesine ciddi katkılar getirmiştir (Kirk vd., 2002). Bütün bu gelişmeler enzimlerin yeni ve/veya farklı fonksiyonlarını belirlemek, yeni süreç koşullarına adaptasyonu sağlamak ve bunların endüstriyel boyutlarda kullanımlarını daha da geliştirmeyi mümkün hale getirmek amacıyla yapılmıştır. Günümüzde kullanılan enzimler farklı doğal maddelerin hidrolizlerini gerçekleştirmektedir (Kirk vd., 2002).

Proteazlar özellikle süt ve deterjan sanayindeki yaygın kullanımlarından dolayı enzim çeşitleri arasında daha popülerdir. Endüstriyel enzimlerin en yaygın kullanıldığı alanlar içinde nişasta, deterjan, tekstil ve fuel-oil başta gelmektedir. Endüstriyel enzimlerin dünya genelinde kullanımı 1995 yılında yaklaşık bir milyar dolar iken bu rakam 2000 yılında 1,5 milyar dolara yükselmiştir. Bu büyüme başta deterjan sanayinde olmak üzere son on yıl içinde en hızlı büyüme fırıncılık ve hayvan yemi endüstrisinde meydana gelmiştir. Bununla birlikte kâğıt, hamur ve kişisel bakımı

kapsayan diğer endüstriyel alanların zenginliği de büyümeye ciddi katkıları sağlamıştır (Kirk vd., 2002).

Enzim teknolojisi, ekonomik kooperatif ve gelişim kuruluşlarınca, sürdürülebilir endüstriyel gelişme bileşeni olarak tanınan multidisipliner bir alan olarak tanımlanmaktadır (van Beilen ve Li, 2002).

1.1. Mikrobiyal Enzimler

Mikroorganizmalar önemli primer ve sekonder metabolitleri üretmeleri sebebiyle vazgeçilmezdir. Çok çeşitli enzimlerin üretimlerini gerçekleştirmeleri bunların temelini oluşturur. Bahsi geçen değerli bileşikleri üretmek amacıyla, hayvan ve bitkisel kökenli enzimlerin kullanımı veya kimyagerlerce bu bileşiklerin sentetik olarak sentezlenmesi yerine mikroorganizmaların tercih edilmelerinin temel nedenleri şu şekilde sıralanabilir;

-Yüksek oranlarda biyosentez ve metabolizma sağlamak amacıyla hızlı besin tüketimini kolaylaştırmak için gerekli olan büyük hacim-yüzey alanı oranı,

-Aynı anda birbirinden farklı birçok reaksiyonu gerçekleştirebilmeleri,

-Farklı çevrelere kolay uyum sağlamaları ve laboratuarda zengin olmayan karbon ve azot kaynaklarıyla kültüre alınıp önemli bileşikleri üretebilmeleri,

-Genetik manipülasyonlarının kolay olması, in vivo ve in vitro koşullarda, yapı ve aktivitelerinin yüzlerce kata kadar arttırılabilmesi,

-Mevcut yöntemlerin çok fazla sayıda kültürü kısa bir zaman dilimine gözlemlene olanağı vermesi,

-Yüksek çeşitlilik; aynı reaksiyonu katalizleyen farklı türlerin bulunması ve bunların reaktördeki koşulları kontrol etmek adına esneklik sağlaması,

-Tarama prosedürlerinin kolay olması ve buna bağlı olarak çok kısa bir zaman diliminde denenmek üzere binlerce suşa ait saf kültürlerin elde edilebilmesi (Barredo, 2005).

Mikrobiyal enzimler, bitki ve hayvan kökenli enzime göre daha stabil olup, ekstrem koşullarda (yüksek sıcaklık, yüksek ve düşük pH koşulları, yüksek tuz konsantrasyonu vs) daha yüksek katalitik aktivite ve kararlılık göstermektedir. Bütün bu avantajları dolayısıyla endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin önemli bir kısmı mikrobiyal orjinlidir (Barredo, 2005;).

1.2. Mikrobiyal Kökenli Proteazlar

Proteazlar; gıda sanayinde, deterjan sanayinde, farmakolojide, biyoremediasyonda, deri sanayinde ve diğer pek çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Barredo, 2005).

Proteazlar, mikroorganizmalar başta olmak üzere bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilmektedirler (Rao vd., 1998). Mikrobiyal proteazlar, bitkisel ve hayvansal kökenli proteazların istenen talebi karşılamaması ve diğer birçok özelliklerince üstünlük göstermesi sebebiyle biyoteknolojik uygulamalarda yaygın kullanım alanı bulmuştur (Barredo, 2005).

Birçok mikroorganizma yaygın proteaz üreticisidir. Birçok ticari serin proteazlar çoğunlukla nötral ve alkali özelliktedir. Yaygın bir mikroorganizma olan *Bacillus*'lar çoğunlukla serin proteaz üreticisidirler. Diğer taraftan *Desulfurococcus mucosus*, *Thermus caldophilus*, *Aeromonas*, *Streptomyces* ve *Escherichia* suşları ile *Aspergillus oryzae* gibi funguslar önemli proteaz üreticileridir. Sistin proteazları Serin ve aspartik proteazların sistin proteazlarından daha yaygın bulunduğu bildirilmiştir (Barredo, 2005).

1.3. Keratinler

Keratinler, fibriller yapıdaki çözünemeyen proteinlerdir (Kublanov vd., 2009). Doğada çoğunlukla saç, turnak, yün, tüy, pençe, telek, gaga, diken (karpillerde), pul

(balıklarda), toynak, boynuz, kaplumbağaların kabuğu gibi vücut bölgelerinde bulunan ve yüksek stabilite gösteren yapısal (Lehninger, 1984). Keratinler alfa (α) ve beta (β) keratinler olmak üzere iki temel gruba ayrılmıştır. Alfa-keratinler birçok omurgalı hayvanın epitelyumunda bulunur ve alfa helikal ikinci yapı bakımından zengindir. Moleküler ağırlıkları 40 ile 70 kDa arasında değişkenlik göstermektedir. Sürüngenlerin ve kuşların derisinde bulunan beta keratinlerin boyutları ise genellikle alfa keratinlerden küçük olup 10-20 kDa arasındadır. Beta keratin molekülleri, beta katlanmaları bakımından zengin olduğu için daha stabil olup hidrolize karşı daha dirençlidirler (Kublanov vd., 2009).

Keratin polipeptidi, gerek hidrojen bağları gerekse hidrofobik etkileşimler tarafından yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Keratinler kuvvetli bir stabilizasyon göstermeleri sebebiyle degradasyonları oldukça zordur. Ayrıca disülfid bağlarıyla çapraz bağlanan polipeptit zincirleri, ticari proteazlarca degradasyona yüksek derecede direnç göstermektedir. Bitişik zincirler, keratinin hidrolizine karşı dirençliliğinden sorumlu olup, disülfid bağları ile bağlanmışlardır. Keratin içeren materyallerin parçalanması medikal ve tarımsal alanda büyük önem taşımaktadır. Dünya genelindeki tavuk işletmelerinde atık olarak yılda milyonlarca ton tüy üretilmekte olup, bunun yaklaşık %90'ı keratinden meydana gelmektedir. Bu tüyler hidrolize edildiği takdirde, hayvan yemleri açısından potansiyel bir protein kaynağına dönüşmektedir (Allpress vd., 2002).

Kümes hayvanlarının üretimi ve işlenmesi tesislerinde büyük miktarlarda ortaya çıkan ve %90 oranında keratin içeren atık tüyler, çiftlik hayvanları için zengin içeriği ile potansiyel bir alternatif protein kaynağı oluşturmaktadır. Ancak üretiminin yüksek enerji gerektirmesi ve pahalı olması, hayvan besinleri için tüylerin protein kaynağı olarak kullanımını kısıtlamaktadır (Riffel vd., 2003a). Enzimlerce hidrolize edilen tüyler ise çoğunlukla gübrelere, kıvam artırıcı maddelere, yemlere ve filmlere dönüştürülebilirler (Riffel vd., 2003a).

1.4. Keratinazlar

Keratinazlar, keratin substratlarını parçalayabilme yeteneğine sahip proteolitik bir enzim sınıfıdır. Bu enzimlere başta keratin substratlarını hidroliz etmesi olmak üzere diğer bazı uygulama potansiyellerinden dolayı ilgi her geçen gün artmıştır (Brandelli, 2008).

Keratinolitik enzimler başta fungus, *Actinomycetes* ve bakteriler tarafından üretilmektedirler. Bu mikroorganizmalar çoğunlukla keratin materyalleri içeren çevreler başta olmak üzere topraklardan izole edilmektedirler (Riffel ve Brandelli, 2006). Bu sayede keratinolitik enzimler, tavuk ve deri endüstrilerinde ortaya çıkan ve keratin içeren atıkların biyoteknolojik olarak dönüşümünde sıklıkla kullanılmaktadır. Buna ilave olarak keratinaz enzimleri ilaç ve kozmetik uygulamalarında da kullanım alanı bulmuştur (Onifade vd., 1998; Brandelli vd., 2010).

1.4.1. Bakteriyal Keratinazlar

Bacillus ve *Streptomyces* cinslerine ait türler doğada en yaygın bulunan keratinaz üretici mikroorganizmalardır (Brandelli, 2008). Bununla birlikte, *Microbacterium* (Thys vd., 2004), *Vibrio* (Sangali ve Brandelli, 2000), *Lysobacter* (Allpress vd., 2002), *Stenotrophomonas* (Yamamura vd., 2002) ve *Chryseobacterium* (Riffel vd., 2003b) gibi farklı türlerde de keratinaz üretimi bildirilmiştir.

1.4.2. Keratinazların Biyokimyası

Mikroorganizma kökenli keratinazlar üretici tür ve suşlara bağlı olarak farklı özellikler gösterebilmektedirler. Şu ana kadar hücre içi enzimler izole edilmiş ve tanımlanmış olup çoğunlukla hücre dışıdır (Gupta ve Ramnani, 2006).

Mikrobiyal keratinazlar çoğunlukla 7.5-9.0 pH aralığında aktivite göstermekte olup, alkalik ve nötral proteazlar sınıfında yer alırlar. Buna rağmen bazı keratinazlar bu pH aralığının dışında alkalifilik veya asidik gibi ekstrem pH'larda optimum aktivite göstermektedir. Keratinazlar genellikle geniş pH aralıklarında kararlıdır (Brandelli

vd., 2010). Benzer şekilde, keratinazların aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, izole edildiği çevre koşullarına ve üretici mikroorganizmaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Mezofilik *Stenotrophomonas maltophilia* DHHJ optimum aktivitesini 40 °C’de gösterirken, termofilik *F. pennavorans* 80 °C’de göstermiştir. *F. islandicum* AW-1’den elde edilen enzimin optimum aktivitesi ise 100 °C olarak bildirilmiştir (Brandelli vd., 2010).

Farklı moleküler ağırlıklara sahip keratinaz enzimlerine sıklıkla rastlanılmaktadır. *S. albidoflavus* ve *K. rosea* tarafından üretilen enzimlerin moleküler ağırlıkları 18-240 kDa aralığında olmasına rağmen, çoğu bakteriyel kökenli keratinaz 50 kDa’dan daha küçük boyutlardadır.

Keratinazlar çoğunlukla monomerik olmasına rağmen multimerik keratinazlar da tanımlanmıştır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip keratinazlar ya metalloproteaz karakterli ya da termofilik mikroorganizmalardan elde edilen keratinazlardır (Brandelli vd., 2010).

Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ gibi metal iyonları çoğunlukla keratinazları stimule etmektedir (aktivitesini artırmaktadır) (Gupta ve Ramnani, 2006). Bu stimülasyonun sebebi olarak enzimin konformasyonunu koruması ve enzim-substrat kompleksinin kararlılığı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Frag ve Hassan, 2004; Suntornsuk vd., 2005; Cao vd., 2009). Cu²⁺, Ag⁺, Hg²⁺, ve Pb²⁺ gibi ağır metaller ise keratinolitik aktivitede azalmaya neden olmaktadır (Brandelli vd., 2010). İndirgeyici ajanların keratinazlar üzerinde daha çok stimülatör etki göstermediği de bildirilmiştir (Brandelli vd., 2010).

Bakteriyel kökenli bazı keratinazların biyokimyasal özellikleri Çizelge 1.1’de verilmiştir

Çizelge 1.1. Bazı bakteriyal keratinazların biyokimyasal özellikleri (Brandelli, 2008).

Üretici organizma	C.T.	MW (kDa)	Opt. pH	Kaynak
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Serin	33	7.5	Lin vd., 1992
<i>B. subtilis</i>	Serin	25.4	7.5	Suh ve Lee, 2001
<i>B. pseudofirmus</i> FA30-10	Serin	27.5	9.0-10.0	Kojima vd., 2006
<i>S. pactum</i> DSM40530	Serin	30	7.0-10.0	Böckle vd., 1995
<i>S. albidoflavus</i> K1-02	Serin	18	6.0-9.5	Bressolier vd., 1999
<i>F. pennavorans</i>	Serin	130	10.0	Friedrich ve Antranikian, 1996
<i>X. maltophilia</i> POA-1	Serin	36	8.0	De Toni vd., 2002
<i>Vibrio</i> sp. kr2	Serin	30	8.0	Sangali ve Brandelli, 2000a
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metallo	64	7.5	Riffel vd., 2007
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metallo	42	7.5	Thys ve Brandelli, 2006
<i>Kocuria rosea</i> LPB-3	Serin	240	10.0	Bernal vd., 2006

C.T.:Katalitik tip, MW: Moleküler ağırlık

1.4.3. Keratinazların Üretimi

Keratinazların biyoteknolojik uygulamalardaki önemi ve bu enzimlere olan talebin gün geçtikçe artması, bu enzimlerin ticari boyutlarda üretimini zorunlu hale getirmiştir. Besi ortamında keratin bulunması keratinaz enziminin üretimini teşvik etmektedir. Bu sebeple mikroorganizmaların üretildiği besi ortamlarına boynuz unu, tavuk tüyü unu, saç gibi keratinöz substratlar ilave edilmektedir. Her ne kadar besi ortamlarında keratin varlığı keratinaz enziminin üretimini teşvik etse de, keratinaz üretimi için besi ortamlarına her zaman keratinöz substratların ilavesi gerekli değildir. Besi ortamlarında soya fasulyesi yemi, soya unu, karides kabuğu unu, yağsız süt, peynir altı suyu, kazein ve jelatin gibi diğer keratinöz olmayan substratların da keratinaz üretimini teşvik ettikleri bildirilmiştir (Brandelli vd., 2010). Ayrıca farklı karbon ve azot kaynaklarının da keratin içeren ortama eklenmesi keratinaz üretiminin önemli düzeyde artmasına sebep olmaktadır. Örneğin; nişasta, glukoz, melas, sukroz, küspe gibi karbon kaynakları ile üre, tripton, pepton, amonyum klorür, maya özütü ve sodyum nitrat gibi azot kaynaklarının ilave edilmesinin enzim üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Brandelli vd., 2010). Ancak bazan, organik ve/veya inorganik azot kaynakları, karbonhidratlar gibi ek substratların eklenmesi bazı mikroorganizmaların keratinaz üretimini negatif yönde etkilediği de görülmektedir.

1.4.4. Keratin İçeren Atıkların Biyolojik Islahı

Tavukçuluk ve deri endüstrileri başta olmak üzere endüstriyel yan ürün olarak açığa çıkan keratince zengin ürünlerin biyolojik geri dönüşümünde keratinolitik mikroorganizmaların kullanılması önemli bir alternatif olarak görölmektedir (Brandelli, 2008). Birçok keratinaz enzimi farklı susbtratları hidrolize etme yeteneğinde olup (Lin vd., 1992; Böckle vd., 1995; Brandelli, 2005), keratince zengin atıkların hayvan yemlerine ve/veya diğere değerli ürünlere biyolojik dönüşümleri için bu enzimler büyük bir potansiyel oluşturmaktadır.

Keratin polimeri, toplam tavuk ağırlığının %10'unu, buna karşılık toplam tüy ağırlığının ise yaklaşık %90'nını oluşturmaktadır. Tüm dünyada yaygınlaşan ticari tavuk işletmeleri tarafından atık olarak üretilen tüylerin sürekli bir artış göstermesi ciddi kirlilik problemi oluşturmaktadır ve bu yüzden bu sorunun çözümünde doğru politikaların izlenmesi gerekmektedir (Shih, 1993).

Günümüzde tüyler, basınçlı buhar kullanılan pişirme yöntemiyle tüy yemine dönüştürölmektedir ve bu işlem yüksek enerji kullanımını gerektirmekte olup ekonomik değildir. Tüylerden elde edilen yemler (tüy yemleri), hayvan rasyonlarında triptofan, histidin ve methionin noksanlığı sebebiyle belirli oranlarda kullanılmaktadır (Papadopoulos vd., 1986; Wang ve Parsons, 1997). Keratinaz enzimlerinin kullanımı ile tüylerin ve tüy yemlerinin besinsel değerinde artış gözleendiği bildirilmiştir (Onifade vd., 1998; Grazziotin vd., 2006).

Deri endüstrisi organik kirliliğinin en önemli kaynaklarından ve bu endüstriyel atıkların önemli bir bölümü keratin içeren proteinlerce zengindir. Keratin içeren bu katı atıkların geri dönüşümü için bilim insanları yoğun mesailer harcamaktadırlar (Thanikaivelan vd., 2004). Sa ve yünün yapısında bulunan keratinleri hidroliz etme yeteneklerinden dolayı *Streptomyces* ve *Bacillus* türleri deri endüstrisi atıklarının biyodegradasyonunda öncelikli olarak kullanılmaktadırlar (Brandelli, 2008).

1.4.5. Keratinazların Diğer Uygulama Alanları

Mikrobiyal keratinazlar, keratince zengin biyolojik atıkların hidrolizinde ilk akla gelenleridir. Derinin tabaklanması esnasında sülfid kullanımına bağlı olarak bazı ciddi problemler meydana gelmektedir ve bunun çözümü olarak deri tüylerinin enzimatik yollarla uzaklaştırılması iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (Cantera, 2001; Thanikaivelan vd., 2004).

Ticari enzimler, etkinliği ve spesifik katalitik özellikleri sebebiyle deri üretiminde tercih edilmektedir (Brandelli, 2008). Diğer taraftan enzim kullanımının zaman ekonomisi sağlaması verimlilik artışını da beraberinde getirmektedir.

Tabaklama esnasında deri üzerinde bulunan tüy ve yünlerin enzimatik yollarla uzaklaştırılması ile tüyler tamamen uzaklaştırıldığı, sülfidin minimum düzeyde kullanılması ve tabaklama esnasında daha kaliteli atık suyun meydana gelmesidir (Brandelli, 2008). Keratinolitik mikroorganizmalarca üretilen proteolitik enzimlerin deri endüstrisinde tüy dökücü kimyasal ajanların yerine kullanılması ekonomik ve çevresel katkılar sağlamaktadır (Brandelli, 2008).

Hücre dışı (ekstraselüler) keratinaz üreten kimi mikroorganizmalar dehairing (tüy/yünlerin uzaklaştırılması) aktivitesi göstermektedir ve keratinolitik bakteriler içerisinde en çok çalışılanlar bazı *Bacillus* türleridir. Bunlardan *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in proteolitik aktivite gösteren suşlarının karakterizasyonu neticesinde deri endüstrisinde kullanılabilir özellikler taşıdıkları görülmüştür (Brandelli, 2008).

Keratinazların bir diğer kullanım alanı kozmetik sanayidir. Keratinazlar, tüy dökücü ürünlerin karışımlarına belirli oranlarda ilave edilmektedirler.

Keratinazlar farmasötük alanda da kullanılmak üzere kendine yer bulmuştur. Sedef hastalığı ve sivilcelerde meydana gelen keratini uzaklaştırmak amacıyla üretilen formüllerde ve nasırların ciltten uzaklaştırılmasında keratinaz enzimlerinin kullanılabilmesi bildirilmiştir (Brandelli, 2008). Keratinaz enzimlerinin son

zamanlarda ilaçların nüfuzunu geliştirmek amacıyla da kullanıldığı görülmüştür. Tırnak hastalıklarının tedavisinde lokal ilaçların kullanımı, tırnak plağına nüfuzunun kısıtlı olması sebebiyle sınırlıdır. *Paecilomyces marquandii* tarafından üretilen keratinaz enziminin insan tırnağına ilaç nüfuzunu önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (Mohorcic vd., 2007). 1990'lı yıllarda adını sıklıkla duyduğumuz prion proteinleri, kuru hastalığı ve kronik zayıflama hastalığı başta olmak üzere birçok bulaşıcı ve ölümcül hastalığa sebep olmaktadır. PWD-1 keratinazın geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu ve prion PrPsc'yi hidrolize ettiği bildirilmiştir. Yine benzer şekilde *Bacillus* sp. MSK 103 keratinazı da PrPsc'yi yok etmektedir Ayrıca anaerobik termofil bir bakterice üretilen keratinaz enzimlerinin sıcaklıkla yıkılmış bir amiloid prionunu hidroliz ettiği bulunmuştur (Suzuki vd., 2006). Bu şekilde prion proteinlerinin enzimatik hidrolizi mikrobiyal kökenli keratinazlar için umut verici farmasötik uygulamalar içermektedir (Brandelli, 2008).

Keratinlerin biyolojik olarak yıkılabilen filmlere ve tarımsal-biyomedikal uygulamalar için kaplamalara dönüştürülmesi son zamanlarda oldukça cazip hale gelmiştir. Kimyasal veya enzimatik yollarla muamele edilerek elde edilen modifiye keratinin tarımsal filmler, gübre paketlenmesi ya da tüketilebilir film üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Brandelli, 2008).

Bir diğer uygulama alanı olarak, keratinazların deterjanların formülüne ilavesi de önerilmiştir (Gupta ve Ramnani, 2006). Bu amaçla, çamaşırlarda bulunan keratin içerikli kirlerin uzaklaştırılması ve keratinli atıklarca tıkanan bölgelerin temizlenmesi için keratinaz enzimleri deterjanlara eklenebilir.

Son olarak keratinolitik enzimler yünlerin boyanmasında etkinin artırılması ve yünlerin sıkıştırma işlemleri gibi tekstil endüstrisinde kayda değer uygulamalara sahiptir (Sousa vd., 2007).

1.5. Amaç

Ülkemizde başta tavuk olmak üzere entansif hayvan yetiştiriciliği büyük bir sektör haline gelmiştir. Bu çiftliklerden elde edilen tüy ve kıllar hayvan yemi sektöründe

protein kaynağı olarak kullanılmakla birlikte, çevreye bırakıldığı takdirde kirliliğe de sebep olmaktadır. Bu sebeple, bu çalışmada doğal ortamlardan keratinaz enzimi üreten bakterilerin izole edilmesi ve enzimlerin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Böylece gerek yem sektöründe kullanılabilecek, gerekse çevreye atılan hayvan tüy ve kıllarının dekompozisyonunu sağlayacak yeni enzim kaynakları elde edilmiş olacaktır.

1.6. Kapsam

Çalışmanın kapsamı aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Tavukçuluk işletmeleri gibi keratinolitik aktiviteye sahip bakterilerin bulunabileceği alanlardan toprak numunelerini almak ve bu numunelerden keratinaz enzimlerini üreten *Bacillus* sp. bakterilerinin izolasyonunu gerçekleştirmek.
2. Toprak numunelerini 80 °C'de 10 dk inkübe ederek vejetatif hücreleri öldürmek (pastörizasyon).
3. Pastörize edilmiş numunelerden belirli miktarlarda LB zengin besiyerine aktararak bakteri sporlarının aerobik ortamda çimlenmesini sağlamak.
4. Çimlenen bakterilerin LB-agar plaklarında koloni oluşturmalarını sağlamak.
5. Herbir koloniyi tavuk tüyü tozu içeren LB-agar plağına aktararak keratinaz aktivitesine sahip bakterileri aktivite zonuna göre belirlemek.
6. Enzimlerin kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmek (sıcaklık optimumu, pH optimumu, sıcaklık direnci, pH stabilitesi, zamana göre enzim aktivitesi, enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi).

7. İzolatları kuvvetli bir mutajen olan EtBr ile muamele ederek yabani varyetelere göre daha fazla enzim üretimi gerçekleştiren mutant varyeteler elde etmek.
8. İzolatların rDNA sekanslarını belirleyerek dendrogramlarını oluşturmak.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Morihara vd. (1967), yaptıkları bir çalışmada on beş tanesi bakteri, yirmi bir tanesi *Actinomycetes* ve on sekiz tanesi mantar olmak üzere toplam 54 adet organizmada keratinaz aktivitesi belirlemişlerdir. Araştırmacılar koyunlardan aldıkları yünleri bu enzimlerle muamele etmişler ve en iyi hidrolizi *Streptomyces fradiae* keratinazının gerçekleştirdiğini bulmuşlardır.

Kunert (1973), sahip oldukları disülfid-hidrojen-tuz bağları ve diğer çapraz bağların keratinlere proteolitik parçalanmaya karşı yüksek direnç kazandırdığını bildirmiştir.

Lee vd. (1991), tavuk tüylerini *Bacillus licheniformis* bakterisinden elde ettikleri keratinaz enzimi ile muamele etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca tüyden elde edilen ve önemli bir amino asit kaynağı olan yemin (feathermeal) kümes hayvanları için bir alternatif olabileceğini bildirmişlerdir.

Lin vd. (1992), *Bacillus licheniformis* PWD-1 bakterisinden keratinaz enzimini izole etmişler ve tanımlamışlardır. Araştırmacılar saflaştırılmış keratinazda spesifik aktivitenin 70 kat arttığını, enzimin moleküler ağırlığının 33 kDa olduğunu, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 7.5 ve 50 °C olduğunu ve son olarak -20 °C'de aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir.

Böckle vd. (1995), *Streptomyces* sp.'den elde ettikleri keratinolitik serin proteazı, saflaştırmışlardır. Araştırmacılar enzimin moleküler ağırlığı ve isoelektrik noktasını sırasıyla 30 kDa ve 8.5 olarak bildirmişlerdir.

Cheng vd. (1995), *Bacillus licheniformis* PWD-1 bakterisini tüy yemi eklenmiş minimal besi yerinde üretmişler ve tüy yeminin keratinaz üretimini arttırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin moleküler ağırlığını ve isoelektrik noktasını sırasıyla 31,4 kDa ve 8.5 olarak belirlemişlerdir.

Lin vd. (1995), *B. licheniformis* PWD-1 bakterisi genomunda bulunan kerA genine ait nükleotid sekansını belirlemişlerdir.

Singh (1997), *Trichophyton smii* bakterisinde keratinaz aktivitesini belirlemişlerdir. Araştırmacı, enzim üretiminin keratin-tuz-buyyon besi yerinde, pH 7.0'de, 28±1°C'de üretildiğini, enzim üretiminin inkübasyonun 15. gününde en yüksek düzeyde gözlendiğini, asparajin ve keratin varlığında enzim üretiminin jelatin varlığına göre daha etkin olduğunu bildirmiştir.

Letourneau vd. (1998), *Streptomyces* sp., tüy yemi bulunan bir ortamda üretildiğinde yüksek keratinaz aktivitesi gösterdiğini, en yüksek keratin degradasyonunun 70°C sıcaklık ve 10.0 pH koşullarında gözlendiğini bildirmişlerdir.

Bressollier vd. (1999), *Streptomyces albidoflavus* olduğu belirlenen *Streptomyces* K1-02 bakterisinde 6 farklı ekstraselüler proteaz belirlemişlerdir. Araştırmacılar bakteriden moleküler ağırlığı 18 kDa olan keratinolitik serin proteazı saflaştırmışlardır.

Burt vd (1999), üzerinde çalıştıkları kuş tüyü örneklerinin tamamında tüyleri parçalayabilen basilleri belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalıştıkları toplam 1853 adet yabani kuşa ait tüy numunelerinden izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterilerin %8'inin keratinolitik *Bacillus licheniformis* olduğunu bildirmişlerdir.

Takami vd. (1999), alkali özellik gösteren keratinaz üreticisi *Bacillus* sp. AH-101 bakterisinin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır.

Kim vd (2001), tavuk üretim ve işletme tesislerinin atıklarından izole ettikleri *B. subtilis*, *B. pumilis* ve *B. cereus* bakterilerinde tüyleri parçalayan keratinolitik aktivite belirlemişlerdir.

Pissuwan ve Suntornsuk (2001), çalıştıkları keratinolitik bakterilerde maksimum keratinaz aktivitesinin 7.5 pH'sı olan, %1 oranında tüy unu içeren besi ortamında ve 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Rozs vd. (2001), 7.0 pH'da ve 47 °C sıcaklık koşullarında ürettikleri *B. licheniformis* K-508 bakterisinde tavuk tüyünü etkin bir şekilde hidrolize eden keratinolitik enzimi belirlemişlerdir.

Lee vd. (2002), soya atıklarından 134 kDa moleküler ağırlığında bir keratinaz enzimi üreten *Bacillus sp.* bakterisini izole etmişlerdir.

Nam vd. (2002), Endonezya'da bulunan bir jeotermal sıcak su kaynağından izole ettikleri termofilik anaerob *Fervidobacterium islandicum* AW-1 70°C sıcaklık ve 7.0 pH koşullarında tüyleri tamamen hidrolize ettiğini bildirmişlerdir.

Huang vd. (2003), yün ve tüyleri önemli derecede hidrolize eden ekstraselüler alkalın serin proteaz üreticisi *Bacillus pumilus* bakterisini izole etmişlerdir.

Korkmaz vd. (2003), optimum aktivitesini 50 °C ve 8.5 pH'da gösteren ve 30-60 °C arasında stabilitesini tamamen koruyan keratinaz enzimini üreten *Streptomyces* BA7 bakterisini Çukurova Üniversitesi kampüsünden aldıkları toprak numunesinden izole etmişlerdir.

Korkmaz vd. (2004), tüy içeren besi ortamında yüksek derecede keratinolitik aktivite gösteren *Bacillus licheniformis* HK-1 bakterisini bir tavuk üretim çiftliğine ait atıklarda izole etmişlerdir. Araştırmacılar bakteride en yüksek keratinaz aktivitesini pH'sı 8.0 olan besi yerinde ve 50 °C inkübasyon sıcaklığında gerçekleştiğini, enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 11.0 ve 60 °C olduğunu bildirmişlerdir.

El-Refai vd. (2005), yüksek düzeyde keratinolitik aktivite gösteren ve 16S rDNA gen sekansına göre *Bacillus pumilus* FH9 olarak belirlenen bakteriyi izole etmişlerdir. Araştırmacılar, filogenetik analiz sonucunda bakterinin *B. pumilus* AF526896 ve AF526898 ile büyük benzerlik gösterdiğini, enzimin 8.0 pH ve 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon periyodunda tavuk tüyünü tamamen parçalandığını bildirmişlerdir.

Hoq vd. (2005), bir tavuk üretim çiftliğine ait atıklarından yüksek keratinolitik aktiviteye sahip 8 adet *Bacillus* suşunu izole ederek tanımlamışlardır. Bunlardan 3 izolatın *B. licheniformis*, 2 izolatın *B. cereus*, 2 izolatın *B. subtilis* ve diğerinin ise *B. borstelensis* olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Suntornsuk vd. (2005), 35 kDa moleküler ağırlığa sahip, monomerik yapıda, optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60 °C ve 8.5 olan keratinazı üreten sıcaklığa dirençli *B. licheniformi* bakterisini izole etmişlerdir.

Joshi vd. (2007), tüyleri parçalama yeteneğine sahip *Bacillus sp.* PW-1 bakterisini izole etmişlerdir.

Paul vd. (2007), karbon ve azot kaynağı olarak keratinin kullanıldığı ortamda *B. licheniformis* MZK-03 bakterisinde keratinolitik aktivitenin indüklendiğini belirlemişlerdir.

Raju vd. (2007), keratinaz enzimi üreticisi dermatofit *Microsporum gypseum* bakterisini izole etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin moleküler ağırlığını 33 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerlerini ise sırasıyla 8.0 ve 35 °C olarak bildirmişlerdir.

Balaji vd. (2008), toynak ve boynuz yeminin substrat olarak kullanan proteolitik mikroorganizmaları izole etmişlerdir. Araştırmacılar *Bacillus subtilis* MTCC (9102) suşunun boynuz ununu tamamen parçaladığını, bu bakteriden elde edilen keratinazın moleküler ağırlığının 64-69 kDa aralığında, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 6.0 ve 40 °C olduğunu, enzim 70°C'ye kadar stabilitesini koruduğunu, bildirmişlerdir.

Cai vd. (2008b), tüy atıklarının bulunduğu bir ortamdan *Bacillus subtilis* bakterisini izole etmişlerdir. Araştırmacılar bu mutant varyantı KD-N2'de keratini hidrolize ettiğini, mutant varyanttan elde edilen saf enzimin moleküler ağırlığını 30.5 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 8.5 ve 55 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Cai ve Zheng (2009), saçın substrat olarak kullanıldığı besi ortamında *B. subtilis* KD-N2 bakterisinin üremesini ve keratinolitik aktivitesini optimize etmişlerdir. Araştırmacılar 6.5 pH, %10 inokulum ve %16 saç ilavesinde maksimum enzim üretiminin gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Kublanov vd. (2009), moleküler ağırlığı 150 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 9.3 ve 60°C olarak keratinazı üreten sıcaklığa dirençli anaerobik *Thermoanabacter genusuna* 1004-09 bakterisini izole etmişlerdir.

Zhang vd. (2009), *Bacillus* sp. 50-3 bakterisinden keratinaz enzimini saflaştırmışlardır. Araştırmacılar SDS-PAGE ve MALDI-TOFMS analizi ile enzimin moleküler ağırlığını 27.4 kDa olarak belirlemişlerdir.

Łaba ve Rodziejewicz (2010), mezofilik *Bacillus polymyxa* B20 ve *B. cereus* B5esz bakterilerinin etkin bir keratin parçalayıcı bakteriler olduklarını, bakterilerin %1 keratin varlığında en yüksek keratinolitik ve proteolitik aktivitelerini gösterdiklerini, *B. polymyxa* keratinazının 50 °C optimum aktivite sıcaklığı ile bir alkalın serin proteaz olduğunu, buna karşılık *B. cereus* keratinazının 45 °C optimum sıcaklık ile daha çok nötral proteaz karışımı olduğunu bildirmişlerdir.

Nagal ve Jain (2010), tüy atıklarının bulunduğu ortamdan izole ettikleri sekiz *Bacillus* bakterisinden *Bacillus cereus* KB043'nin en iyi tüy parçalayıcı izolat olduğunu bildirmişlerdir.

Prasad vd. (2010), Vellore (Hindistan)'da farklı tavuk tüyü işleme tesislerinden topladıkları toprak numunelerinden toplam 8 adet bakteri izole ettiklerini, bu bakterilerden sadece 1 tanesinin (H5) kazein agar ortamında keratinolitik aktivite gösterdiğini, H5 izolatının mikroskopik ve biyokimyasal deneyler sonucunda *Bacillus* sp. olarak tanımlandığını, son olarak H5 enzim aktivitesinin en iyi 7.0 pH ve 30 °C koşullarında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Kumar vd. (2011), daha önce izole etmiş oldukları *Bacillus altitudinis* GVC11 bakterisini çalışmışlar, bakterinin hem beyaz hem de koyu renkli tavuk tüylerini 48-

96 saat aralığında parçaladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca keratinaz üretimi ve tüyü parçalamasının en iyi 9.0 pH, 37 °C ve 200 rpm koşullarında gerçekleştiğini de bildirmişlerdir.

Agrahari ve Wadhwa (2012), ekstraselüler kazeinolitik ve keratinolitik enzimleri üreten *B. megaterium* bakterisini Ghazipur tavuk çiftliği (Hindistan) atıklarından izole etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin moleküler ağırlığını 30 kDa ağırlığında olduğunu, 72 saatlik inkübasyon neticesinde tavuk tüylerini tamamen parçaladığını, proteaz aktivitesinin 10 mM Mn²⁺ varlığında iki kat arttığını, buna karşılık Ba²⁺ ve Hg²⁺ varlığında ise inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Kumar vd. (2012), Ghari Mori District (Khairpur)'den keratinolitik aktivite gösteren ve fungus ve bakterilerden oluşan toplam 80 adet mikroorganizmayı izole ederek çalışmışlardır. Araştırmacılar keratinolitik mikroorganizmaların *Absidia* sp., *Chrysosporium asperatum*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Entomophthora coronata*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakteri ve funguslarını içerdiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *C. keratinophilum* ve *B. subtilis*'in tüm izolatlarda içinde en geniş aktivite zonu verdiklerini, *C. keratinophilum* keratinazının optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 30 °C ve 9.0; *B. subtilis* keratinazının 37 °C ve 7.0 olduğunu, *C. keratinophilum* ve *B. subtilis* keratinazlarının spesifik aktivitelerinin ise sırasıyla 220 U/ml ve 260 U/ml olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Sivakumar vd. (2012), izole ettikleri *Bacillus thuringiensis* TS2 bakterisi tarafından üretilen keratinaz enziminin moleküler ağırlığını 41 kDa, saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesini 970.15.54 U/mg olarak bildirmişlerdir.

Zhang (2012) keratinolitik *B. subtilis* bakterisini UV ışını ile mutasyona uğratmış ve yabancı varyeteden %75.9 daha fazla aktivite gösteren mutant varyeteyi elde etmiştir.

Lakshmi vd. (2013) *B. subtilis* BF11 ve *B. cereus* BF21 yabancı varyetelerini UV ışını, hidroksilamin hidroklorid ve etil metil sülfonat (EMS) ile mutasyona uğratmışlar, BF11'den MBF11 ve BF21'den ise MBF21 mutant varyeteleri elde

etmişlerdir. Araştırmacılar mutant varyetelerin laboratuvar koşullarında 518-520 KU/ml ile yabancı varyetelerden 50 kat daha fazla ürün verdiklerini bildirmişlerdir.

Selvan vd. (2013), yaptıkları morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda aktinobakter olduklarını tespit ettikleri 56 adet izolatı çalışmışlar, bu izolatlardan 9 tanesinin süt ve soya içeren ilk taramalarında proteolitik aktivite gösterdiklerini, tavuk tüyü içeren besiyerinde ikinci taramalarında ise bu 9 proteolitik bakteriden de üç tanesinin keratinolitik aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Chen vd. (2015), *Aspergillus niger* genomunda bulunan keratinaz genini (kerD) *E. coli* bakterisinde klonlayarak eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar rekombinant enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 8.0 ve 70 °C olarak belirlediklerini, enzimin 1,10-phenanthroline, EDTA ve SDS varlığında yüksek derecede inhibe olduğunu, fakat Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , dithiothreitol, Triton X-100, dimetil sülfoksit ve isopropil alkol varlığında ise aktive olduğunu bildirmişlerdir.

Femi-Ola vd. (2015), keratinolitik ve proteolitik enzim üreten tüy parçalayıcı bakterileri araştırmışlardır. Araştırmacılar tavukçuluk işletmesi atıklarından elde ettikleri izolatların %90'ının *Bacillus* türü, %10'unun ise *S. marcescens* olduğunu, *Bacillus*'ların dağılımının ise *B. subtilis* (%40), *B. coagulans* (%20), *B. cereus* (%20) ve *B. pumilus* (%10) şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. İzolatların proteaz aktivitelerinin 3.0-160 U/ml arasında olduğunu ve en yüksek proteaz aktivitesine *B. subtilis* A1 suşunun sahip olduğunu, diğer taraftan keratinaz aktivitelerinin ise 0.6-11 U/ml arasında olduğunu, en yüksek keratinaz aktivitesine *B. subtilis* A4 suşunun sahip olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar izolatların en yüksek proteaz ve keratinaz üretim seviyelerine üremenin geç logaritmik fazı veya durağan fazın başlangıcında ulaştıklarını da bildirmişlerdir.

Kazzaz vd. (2015) Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği Tavuk Üretim Ünitesi'nden proteolitik aktivite gösteren 8 adet *Bacillus* suşunu izole etmişlerdir. Araştırmacılar, *Bacillus licheniformis* H62 olarak tanımladıkları izolatın en yüksek düzeyde keratinolitik aktiviteye sahip olduğunu, enzimin optimum aktivitesini 40 °C ve 9.5 pH değerlerinde gösterdiğini, EDTA, SDS ve ürenin enzim

aktivitesini artırırken Tween20'nin azalttığını, son olarak enzimin moleküler ağırlığının 26 kDa olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Lateef vd. (2015) 120 saat inkübasyon periyodunda 35.4-50.4 U/ml keratinaz üreten yabani *Bacillus safensis* LAU 13 bakterisini mutasyonla geliştirmişler ve yine aynı zaman periyodunda mutant varyantın 64.4-108.5 U/ml keratinaz ürettiğini bildirmişlerdir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzeme

3.1.1. Keratinolitik Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan keratinolitik bakteriler MK1, MK2 ve MK3, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi'nde bulunan tavukçuluk ünitesindeki atık tüylerin bulunduğu toprak numunelerinden izole edilmiştir. Bakterilerin izolasyonunda kullanılan besi ortamları aşağıda verilmiştir:

3.1.1.1. Temel Tüylü Besiyeri

Bacillus cinsi bakterilerden ekstraselüler keratinaz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Kim vd, 2001).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
NH ₄ Cl	0,5
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1
Maya ekstraktı	0,1
<u>Tavuk tüyü unu</u>	<u>10</u>

Besiyeri pH=7.5

3.1.1.2. Luria-Bertoni (LB) Broth

Alınan toprak numunelerinden *Bacillus* sporlarının çimlendirilmesinde, ayrıca keratinolitik aktivite belirlenmesi dışında kalan diğer tüm bakteriyel üretim aşamalarında kullanılmış zengin içeriğe sahip bir besi ortamıdır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10

0.1 M NaOH ile pH 7.5'e ayarlanmış, sonrasında ise otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle sterilize edilmiştir. Katı besi yeri olarak kullanıldığında otoklavdan yapılmadan hemen önce %1.5 w/v oranında agar eklenmiştir.

3.1.1.3. Skim Milk Agar

Çalışma kapsamında elde edilen *Bacillus* izolatlarına ait proteaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Mohamedin, 1999).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Yağsız süt tozu	8
Agar	15

Yağsız süt tozu ayrı hazırlanmış ve sterilizasyondan sonra besiyerine ilave edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Ambresco, Axygen, Brand, Eppendorf, Fırat Plastik ve Isolab'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir.

3.1.3. Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyoları (Memmert), santrifüj (Hettich), manyetik karıştırıcı (Ika), vorteks (Ika), pH metre (Hanna),

otoklav (Hirayama), saf su cihazı (Labor Şimşek), buzdolapları (Arçelik), çalkalayıcı (Ika), elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto) çalışmanın yapıldığı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır (Şekil 3.1). Yine çalışmada kullanılan spektrofotometre (Pharmacia) ise ihtiyaç duyulduğu zamanlarda Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan bir görüntü

3.2. Yöntem

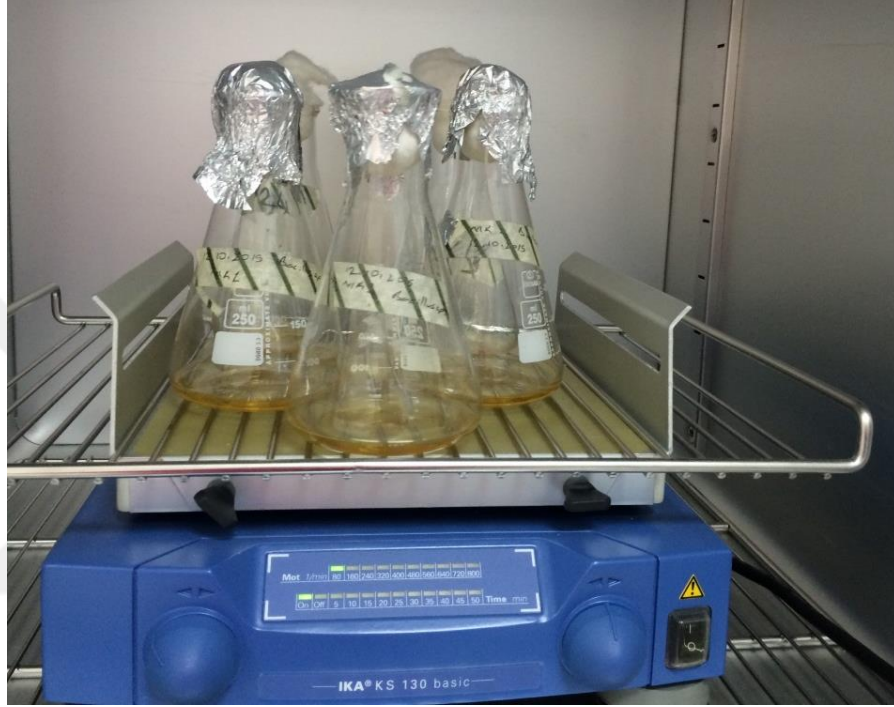
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Keratinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyonu aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

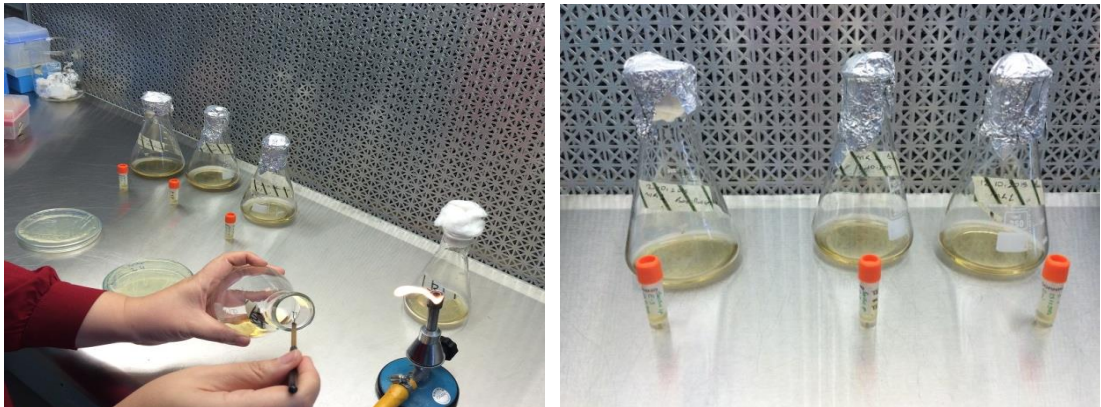
1. Adana ili Sarıçam ilçesinde bulunan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi tavukçuluk ünitesinde atık tüylerin bulunduğu ortamlardan toprak numuneleri alınmış vesteril kaplarla çalışmanın yürütüleceği laboratuvara taşınmıştır.

2. Toprak numunelerinden 1'er gr tartılarak alınmış ve üzerlerine 10'ar ml steril saf eklenerek numunelerde bulunan bakteri sporlarının saf suya geçmelerini sağlamak amacıyla iyice karıştırılmıştır.
3. Tortunun dibe çökmesi amacıyla 30 dk kadar bekletildikten sonra üstte bulunan berraklaşmış sıvı kısımlardan 500'er µl alınarak 1.5 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır.
4. Mikrosantrifüj tüplerine alınan numuneler vejetatif bakterilerin ölmesini sağlamak amacıyla 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk süreyle inkübe edilmiştir (pastörizasyon).
5. Süre sonunda numuneler su banyosundan alınarak tamamı steril mikropipetler yardımıyla 25 ml hacimli LB besiyerlerine aktarılmıştır.
6. Besiyerleri 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve böylece bakteri sporlarının çimlenmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.2).
7. LB sıvı besi ortamında gelişen bakterilerden 1'er ml alınarak seri sulandırmalar yapılmış ve 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} oranlarında sulandırılmış örneklerden ön seçim amacıyla skim milk agar besi ortamına 100'er µl olacak şekilde cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır.
8. Plaklar ekimleri tamamlandıktan sonra 37 °C sıcaklık koşullarında 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.
9. Süt tozundan dolayı mat-beyaz renkli besi ortamında, etrafında berrak aktivite zonu bulunan koloniler proteaz pozitif olarak belirlenmiştir.
10. Proteaz pozitif olarak belirlenen bakteriler tek tek steril kürdanlarla toplanmış ve bu sefer temel tüylü besi ortamına aktarılmışlardır. Plaklar 37 °C sıcaklık koşullarında 72 saat süreyle inkübe edilmişlerdir.

11. Süre sonunda, etrafında berrak aktivite zonu bulunan bakteriler keratinaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir.
12. Keratinolitik aktivitesi belirlenen bakterilerden steril ortamda gliserol ve master stokları hazırlanarak (Şekil 3.3) uygun koşullarda (gliserol stoklar -20 °C'de, master stoklar +4 °C'de) muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.2. Toprak numunelerinde bulunan *Bacillus* sporlarının LB besi ortamında çimlendirilmesi



Şekil 3.3. İzolatlardan gliserol stokların hazırlanması

3.2.2. Enzimatik Analizler

Enzimatik analizler Akan (2010)'da verilen protokoller uyarınca yapılmıştır. Protokollerin bazı aşamalarında modifikasyon uygulanmıştır. Bir ünite (U) enzim verilen koşullarda, 1 saatte 595 nm'de örnek ve kontrol arasında 0.1 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.2.1. Etanol Presipitasyonu İle Enzimlerin Hazırlanması

Bakteriler daha önce hazırlanmış olan master plaklardan 50 ml hacimli LB sıvı besiyerlerine steril öze yardımıyla inoküle edilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde uygun çalkalama hızında 72 saat süreyle üremeye bırakılmışlardır. Süre sonunda bakteriler steril santrifüj tüpleri yardımıyla 5000 rpm hızında santrifüj edilerek pelet haline getirilmişlerdir. Santrifüj sonrası enzimi içeren hücre dışı sıvı kısım (süpernatant) kaba filtre kağıdı (Whatman, 5) ile süzölmüş ve üzerine hacmin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklendikten sonra -20 °C'de 24 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 10000 rpm'de çöktürölmüş ve enzimatik analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2.2. Enzim Aktiviteleri İçin Optimum pH Değeriinin Belirlenmesi

Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değeriinin belirlenmesinde;

Sitrat (pH 4.0-6.0)

Sodyum fosfat (pH 6.0-8.0)

Glisin-NaOH (pH 8.0-10.0)

Boraks-NaOH (pH 10.0-13.0) tamponları kullanılmıştır.

Her bir pH değeriine sahip tampondan 1 ml alınarak 1 ml enzim preparasyonu ile karışırılmıştır. Bu karışırılımların her birine 1'er ml keratin-azur (4 mg/ml konsantrasyonunda 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) ilave edildikten sonra 37 °C'de (bakterinin üretildiği sıcaklık) 60 dk süreyle bekletilmişlerdir. KÖr, keratin-azur ve tampon (1:2 v:v hacmen) kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler

4000 x g'de, 4 °C'de, 15 dk santrifüj edilerek substrat kısım uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbands değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait pH aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.3. Enzim Aktiviteleri İçin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlere ait sıcaklık optimum değerlerinin belirlenmesinde, 1 ml enzim preparasyonu 1 ml glisin-NaOH tamponu (MK1 ve MK3 enzimleri için pH 9.0, MK2 enzimi için pH 8.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 1'er ml keratin-azur ilave edildikten sonra sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde 60'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, keratin-azur ve tampon (1:2 v:v hacmen) kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 4000 x g'de, 4 °C'de, 15 dk santrifüj edilerek substrat kısım uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbands değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait sıcaklık aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.4. Enzimlere Ait Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlere ait sıcaklık stabilite değerlerinin belirlenmesi amacıyla, enzim preparasyonları ayrı olacak şekilde 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C'lerde 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 1 ml enzim preparasyonu 1 ml glisin-NaOH tamponu (MK1 ve MK3 enzimleri için pH 9.0, MK2 enzimi için pH 8.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 1'er ml keratin-azur ilave edildikten sonra sırasıyla MK1 ve MK3 örnekleri 40 °C, MK2 örnekleri ise 50 °C sıcaklık değerinde (enzimlere ait optimum sıcaklık değerleri) 60'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, keratin-azur ve tampon (1:2 v:v hacmen) kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 4000 x g'de, 4 °C'de, 15 dk santrifüj edilerek substrat kısım uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbands değerleri

okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait sıcaklık stabilite değerlerine ait grafikler oluşturulmuştur.

3.2.2.5. Enzimlere Ait pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim preparasyonları, saklandığı tampondan (pH 7.0) santrifüj işlemi ile kurtarılmış ve farklı pH değerlerindeki (7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0) tampon çözeltiler içinde resüspanse edilerek 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, ön inkübasyona bırakılan enzimler ile substrat (keratin azur) karıştırılarak, MK1 ve MK3 örnekleri 40 °C, MK2 örnekleri ise 50 °C sıcaklık değerinde 60'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, keratin-azur ve tampon (1:2 v:v hacmen) kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 4000 x g'de, 4 °C'de, 15 dk santrifüj edilerek substrat kısım uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait pH stabilite grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.6. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Farklı kimyasal malzemelerin enzim aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla PMSF, EDTA, üre, SDS, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, KCl, Tween 80 ve Triton X-100 kimyasalları 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Bu amaçla, 1 ml enzime söz konusu kimyasallar son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklere 1 ml glisin-NaOH tamponu (MK1 ve MK3 enzimleri için pH 9.0, MK2 enzimi için pH 8.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ve 1'er ml substrat (keratin-azur) ilave edildikten sonra 40 °C'de 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Kör, sadece keratin-azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır, herhangi bir kimyasal ilavesi yapılmamıştır. İnkübasyon sonrasında enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır.

Ölçüm değerleri kullanılarak yukarıda belirtilen kimyasalların enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

3.2.2.7. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zaman göre enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla LB sıvı besiyerinde 12 saat süreyle üretilmiş olan bakteri kültürlerinden 50'şer ml hacimli yeni sıvı besiyerlerine %1 olacak şekilde (500 µl) inoküle edilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında üremeye bırakılmışlardır. İnkübasyonun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir numune alınmış ve etanol presipitasyonu ile enzim örnekleri hazırlanmıştır. Bu işlem inkübasyondan itibaren 72. saate kadar her 12 saatte bir (12, 24, 36, 48, 60, 72) tekrarlanmıştır. 1 ml enzim preparasyonu 1 ml glisin-NaOH tamponu (MK1 ve MK3 enzimleri için pH 9.0, MK2 enzimi için pH 8.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 1'er ml keratin-azur çözeltisi ilave edildikten sonra 40 °C sıcaklık koşullarında 60 dk inkübe edilmişlerdir. Kör, keratin-azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak zaman göre enzim aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.8. Oransal Aktivite

Her üç izolat LB besi ortamında 24 saat üretildikten sonra elde edilen enzimler keratin-azur ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 60 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Kör, keratin-azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak üç enzimini birbirlerine göre oransal aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.2.9. Mutant Varyetelere Ait Oransal Aktiviteler

Her üç izolat ve mutant varyantları LB besi ortamında 24 saat üretildikten sonra elde edilen enzimler keratin-azur ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 60 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Kör, keratin-azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak izolatlar ile mutant varyantlara ait enzimlerin birbirlerine göre oransal aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

3.3. Filogenetik Analizler

İzolatlara ait 16S rDNA sekans analizleri hizmet alımı yoluyla RefGen Biyoteknoloji Ltd. Şti'ne (Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Bahçelievler Mah., 319 Sok., E Blok, Zemin Kat, No: Z14, Gölbaşı-Ankara) yaptırılmıştır. BLAST analizleri (16S rDNA sekanslarının karşılaştırılması ve filogeni ağaçlarının oluşturulması) “ncbi.nlm.nih.gov” veritabanı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Keratinaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi tavukçuluk ünitesinden tavuk tüyü içeren toprak numunelerinden keratinaz üreten 3 adet bakteri izole edilmiştir. Bakteriler aerobik ortamda spor çimlendirme yöntemi ile izole edilmelerinden dolayı *Bacillus* sp. olarak tanımlanmışlardır. İzolatlar sırasıyla *Bacillus* sp. MK1, *Bacillus* sp. MK2 ve *Bacillus* sp. MK3 olarak isimlendirilmişlerdir. Temel tüylü besi ortamına ekilerek 37 °C’de 72 saat süreyle inkübe edilen bakteriler keratinaz aktivite zonu üretmişlerdir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Temel tüylü besi ortamında izolatlara ait keratinaz aktivite zonları

Keratinaz üretimi başta *Bacillus*’lar olmak üzere mikroorganizmalar arasında oldukça yaygındır. Daha önce keratinolitik *Bacillus* izolasyonu ve karakterizasyonu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiş olup *Bacillus megaterium* (Saibabu vd., 2013), *Bacillus subtilis* (Kazi vd., 2015; Gupta vd., 2015), *Bacillus licheniformis* (Vigneshwaran vd., 2010) keratinazları bunlara ait birkaç örnek olarak verilebilir.

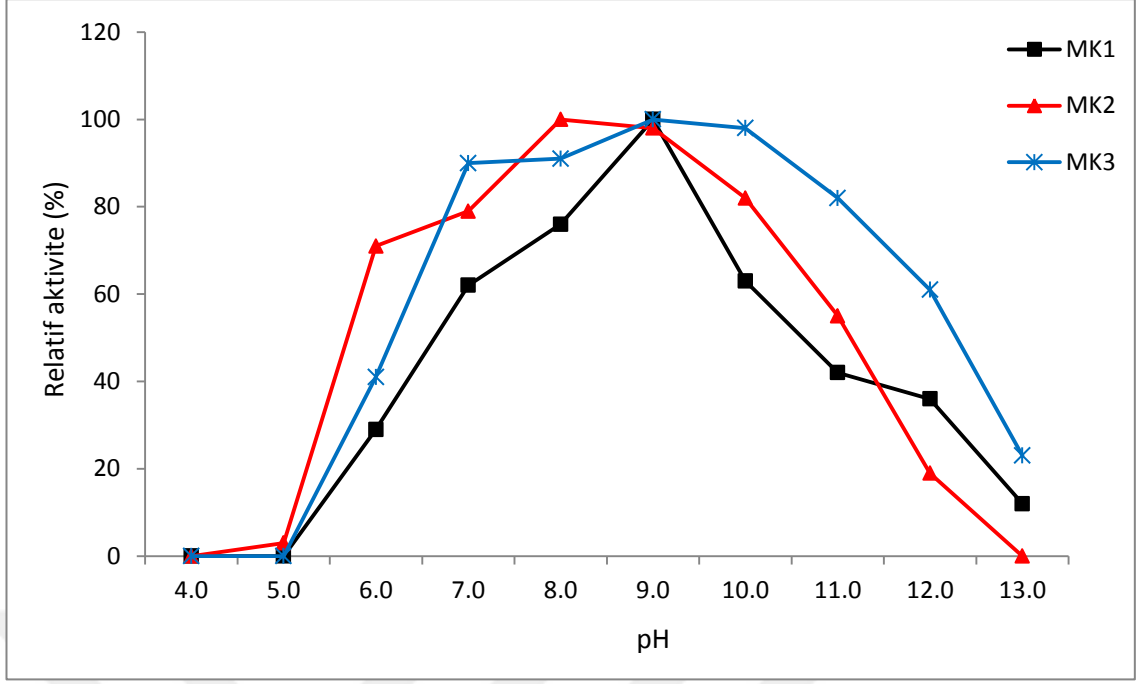
4.2. Keratinazların Enzimatik Özellikleri

4.2.1. Enzimlerin Optimum pH Değerleri

Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değerleri *Bacillus* sp. MK1, *Bacillus* sp. MK2 ve *Bacillus* sp. MK3 izolatları için sırasıyla 9.0, 8.0 ve 9.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). MK1 suşu 8.0 ve 10.0 pH değerlerinde aktivitesinin sırasıyla relatif olarak %76 ve 63'ünü göstermiştir. MK1 enzimi pH 4.0 ve 5.0 değerlerinde hiçbir aktivite göstermezken, 13.0'da aktivitesinin %88'ini kaybetmiştir. MK1 enziminin 6.0-12.0 pH aralığında ortalama oransal aktivitesi %58.3, 7.0-11.0 pH aralığında %68.6 ve 5.0-7.0 aralığında ise %30.3 olarak gerçekleşmiştir.

MK2 enzimi 6.0, 7.0, 9.0 ve 10.0 pH değerlerinde relatif olarak sırasıyla %71, 79, 98 ve 82 aktivite göstermiştir. Enzim, pH 4.0 ve 13.0 değerlerinde hiçbir aktivite göstermezken, 5.0 pH'da %97, 12.0 pH'da ise %81 oranında aktivitesini yitirmiştir. MK2 enziminin 6.0-12.0 pH aralığında ortalama oransal aktivitesi %74.4, 7.0-11.0 pH aralığında %82.8 ve 5.0-7.0 aralığında ise %51.0 olarak gerçekleşmiştir.

MK3 enzimi ise 7.0, 8.0, 10.0 ve 11.0 pH değerlerinde sırasıyla %90, 91, 98 ve 82 aktivite gösterirken, 13.0 pH değerinde ancak %23 aktivite göstermiştir. MK3 enzimi 4.0 ve 5.0 pH değerlerinde hiçbir aktivite gösterememiştir. MK3 enziminin 6.0-12.0 pH aralığında ortalama oransal aktivitesi %80.4, 7.0-11.0 pH aralığında %92.2 ve 5.0-7.0 aralığında ise %43.7 olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait pH optimum grafiği

Elde edilen veriler incelendiğinde her üç keratinazın da orta alkali bir özellik gösterdiği görülmektedir. Keratinaz enzimleri optimum pH değerleri bakımından farklı karakteristik özellikler sergilemektedir. Korkmaz vd., (2004) *B. licheniformis* HK-51 suşuna ait keratinaz enziminin optimum pH değerini 11.0 olarak bildirirken, Akan (2010) *Bacillus* sp. HSK21 suşuna ait keratinaz enziminin optimum pH değerini 12.0 olarak bildirmiştir. Yüksek alkali koşullarında aktivite göstermelerinden dolayı bu keratinazlar “yüksek alkali özellik gösteren keratinaz” (highly alkaline keratinase) olarak tanımlanmışlardır (Akan, 2010). Bununla birlikte bu çalışmada karakterize edilen enzimler pH optimumu bakımından daha çok *B. licheniformis* (optimum pH 8.5) (Suntornsuk vd., 2005), *B. subtilis* (optimum pH 8.5) (Cai vd., 2008) ve *Bacillus* sp. FK46 (optimum pH 9.0) (Suntornsuk ve Suntornsuk, 2003) ile benzerlik göstermektedir. *B. subtilis* MTCC (optimum pH 6.0) (Balaji vd., 2008), *B. subtilis* KD-N2 (optimum pH 6.5) (Cai ve Zheng, 2009), *B. licheniformis* K-508 (optimum pH 7.0) (Rozs vd., 2001) ve *B. licheniformis* PWD-1 (optimum pH 7.5) (Lin vd., 1992) keratinazları ayrıca hafif asidik ve nötral pH’larda aktivite gösteren enzimlere örnek olarak verilebilir. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının hafif asidik ortamdan (pH 6.0) yüksek alkali ortama kadar (pH 12.0) aktivite

gösteriyor olması, bu enzimleri farklı biyoteknolojik uygulamalarda cazip hale getirebilir.

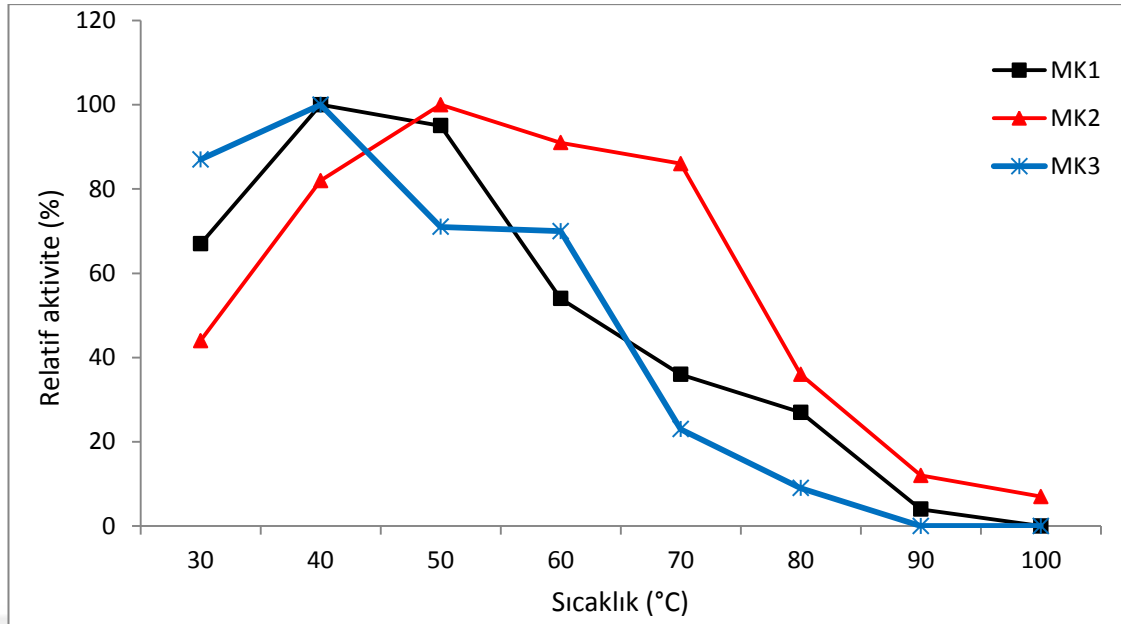
4.2.2. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri

Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum sıcaklık değerleri *Bacillus* sp. MK1 ve *Bacillus* sp. MK3 keratinazları için 40 °C, *Bacillus* sp. MK2 keratinazı için ise 50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). MK1 keratinazı 30 °C'de %67 aktivite gösterirken, 50 ve 60 °C'lerde sırasıyla %95 ve 54 aktivite göstermiştir. Relatif aktivitesi 70 °C'de ise %36'ya düşmüştür. Enzimin 50-90 °C arasındaki ortalama aktivitesi %43.2 olarak gerçekleşmiştir.

MK2 izolatı 40 °C'de %82 aktivite gösterirken, 60 ve 70 °C'lerde sırasıyla %91 ve 86 oransal aktivite göstermiştir. MK2 keratinazının 80 °C'deki aktivitesi ise %36'ya düşmüştür. Enzimin 50-90 °C arasındaki ortalama aktivitesi %65 olarak gerçekleşmiştir.

MK3 izolatı 30 °C'de %87 oransal aktivite gösterirken, 50, 60 ve 70 °C'lerde sırasıyla %71, 70 ve 23 oranında aktivite göstermiştir. Enzimin 50-90 °C arasındaki ortalama aktivitesi %34.6 olarak gerçekleşmiştir.

MK1 ve MK3 izolatları 100 °C'de aktivitelerinin tamamını kaybederken MK2 %7 oranında aktivite göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait sıcaklık optimum grafiği

Keratinaz üreten bazı *Bacillus* türleri ve enzimlerin sıcaklık optimum değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bazı keratinolitik *Bacillus* türleri ve keratinaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklık değerleri

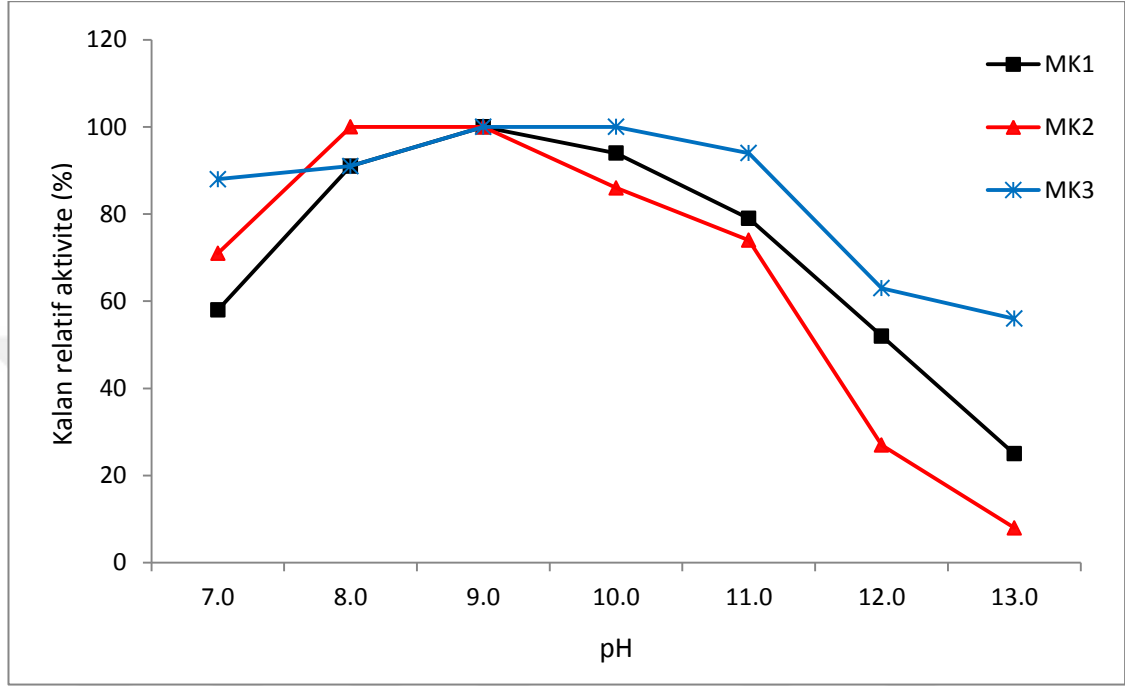
Bakteri	Opt. sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>B. subtilis</i> KD-N2	50	Cai vd. (2008a)
<i>B. licheniformis</i>	60	Vigneshwaran vd. (2010)
<i>Bacillus</i> sp. JB 99	65	Kainoor ve Naik (2010)
<i>B. megaterium</i> F7-1	30	Park ve Son (2009)
<i>B. subtilis</i>	40	Mousavi vd. (2013)
<i>Bacillus</i> sp. NTAP-1	60	Nakayama vd. (2000)
<i>B. licheniformis</i> HK-51	60	Korkmaz vd. (2004)
<i>B. licheniformis</i>	60	Suntornsuk vd. (2005)
<i>Bacillus</i> sp. P7	55	Correa vd. (2010)
<i>Bacillus</i> sp. MTS	40-70	Rahayu vd. (2012)
<i>B. licheniformis</i>	50	Gawade ve Bale (2013)
<i>Bacillus</i> sp. HSK-21	40	Akan (2010)

Bacillus'lar tarafından üretilen keratinazlar optimum aktivite için farklı sıcaklık değerlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu sıcaklık değerleri Çizelge 4.1'de verilen son 12 yıllık periyot içinden seçilen örnekler için 30-70 °C arasında değişmektedir. Bu çalışmada izole edilen izolatlar mezofilik olup ürettikleri keratinazlar 40-50 °C'lerde optimum aktivite göstermişlerdir. Mezofilik *Bacillus*'ların termo-stabil karakterde enzim üretmeleri daha önceki çalışmalarda karşılaşılan bir durum olmuştur. Örneğin mezofilik bir bakteri olan *B. subtilis*'in termo-stabil karakter gösteren keratinaz üretmeleri daha önce rapor edilmiştir (Cai vd., 2008). Mezofilik bakterilerce termo-stabil enzimlerin üretimi çoğunlukla avantaj olarak kabul edilir. Özellikle endüstriyel üretimlerde mezofilik bakterilere ait hücre dışı sıvının sıcaklık uygulaması ile mezofilik karakterli enzimlerin denatüre edilmesi ve bu sayede termo-stabil karakterli enzimlerin saflaştırılması düşük maliyetinden dolayı tercih edilir bir durumdur. Bu amaçla termostabil enzim genlerinin mezofilik bakterilerde klonlanması gerçekleştirilmiştir (Özcan ve Özcan, 2008; Özcan ve Özcan, 2010). Korkmaz vd. (2004), *B. licheniformis* HK-1 suşunun 50 °C ve 8.0 pH değerlerinde maksimum keratinaz ürettiğini ve bu özelliklerdeki keratinaz enziminin keratin hidrolizini içeren biyoteknolojik işlemlerde kullanılabileceğini bildirmiştir. 40-50 °C'lerde ve 8.0-9.0 pH değerlerinde optimum aktivite gösteren MK1, MK2 ve MK3 keratinazları benzer şekilde biyoteknolojik uygulamalar için uygun olabilir.

4.2.3. Enzimlerin pH Stabiliteleri

Enzimlerin farklı pH ortamlarında gösterdikleri stabiliteleri araştırılmış, her üç enzimin de pH 8.0 ile 10.0 pH değerlerinde oldukça kararlı oldukları ve aktivitelerini büyük ölçüde korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.4.). MK2 keratinazı pH 12.0'de ön inkübasyon sonucunda aktivitesinin %73'ünü kaybederken, bu pH değerlerinde MK1 ve MK3 keratinazları hemen hemen aktivitelerinin yarısını korumuşlardır. pH 13.0'da ön inkübasyon sonucunda MK1, MK2 ve MK3 enzimleri relatif aktivitelerini sırasıyla %75, 92 ve 54 oranlarında kaybetmişlerdir (Şekil 4.4). 7.0-13.0 pH aralıklarında ortalama kalan aktivite MK1, MK2 ve MK3 keratinazları için sırasıyla %71.3, 66.6 ve 84.6 olarak gerçekleşmiştir. 10.0-13.0 pH aralığında ise kalan aktivite yine aynı sırayla %62.5, 48.8 ve 78.3 olarak gerçekleşmiştir. Başta MK3 olmak üzere bu çalışmada izole edilen keratinazlar yüksek alkali koşullarında stabil

görülmektedir. Enzimlerin yüksek alkali koşullarında stabil kalabilmeleri özellikle yüksek alkali gerektiren proseslerde önemlidir. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının pH stabiliteyi ile optimum sıcaklık ve pH özellikleri birlikte düşünüldüğünde, endüstriyel uygulamalar için uygun olabilir.

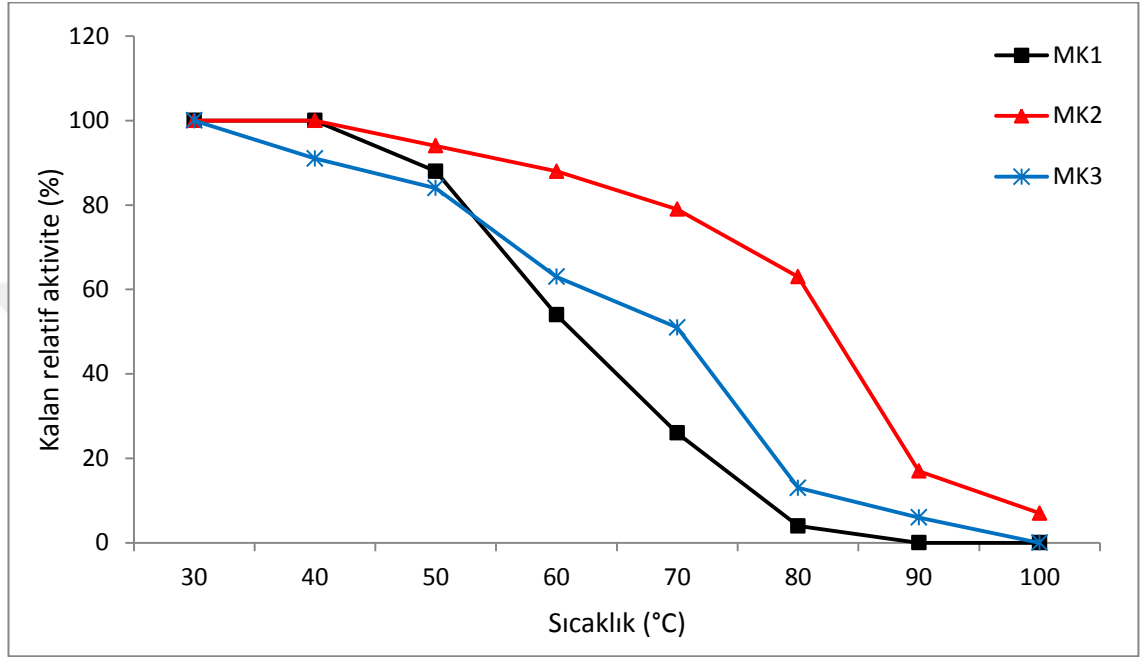


Şekil 4.4. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait pH stabilite grafiği

4.2.4. Enzimlerin Sıcaklık Stabiliteyi

İzolatlara ait keratinaz enzimleri 30-100 °C değerleri arasında her 10 °C aralıklarda 15 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuşlar ve sonrasında enzimatik aktivite seviyeleri belirlenmiştir. Her üç izolata ait keratinaz enzimleri 30 ve 40 °C değerlerinde ön inkübasyon sonucunda aktivitelerinin tamamına yakını muhafaza etmişlerdir. Her üç izolata ait enzim de 50 °C ön inkübasyonda sırasıyla %88, 94 ve 84 düzeyinde relatif kalan aktivite göstererek, aktivitelerini büyük ölçüde korumuşlardır. Enzimler 90 ve 100 °C’de ön inkübasyon sonrasında ise kalan aktivitelerinin önemli bir kısmını kaybetmişlerdir (Şekil 4.5). 50-100 °C arasında MK1, MK2 ve MK3 için kalan relatif aktivite sırasıyla %28.7, 58 ve 36.2 olarak belirlenmiştir. Bu değerler 50-90 °C arasında sırasıyla %34.4, 68.2 ve 43.4; 50-80 °C arasında ise sırasıyla %43, 81 ve 52.8 olarak gerçekleşmiştir. MK1, MK2 ve MK3

keratinazları sırasıyla 60, 80 ve 70 °C'lerde ön inkübasyondan sonra kalan aktivitelerini önemli ölçüde kaybetmişlerdir. Bu durum özellikle MK1 ve MK3 keratinazlarının ısıtılma işlemlerini gerektiren endüstriyel proseslerde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu durumda enzimlerin aktivatör metal iyonları ile birlikte kullanılması bir çözüm olabilir.

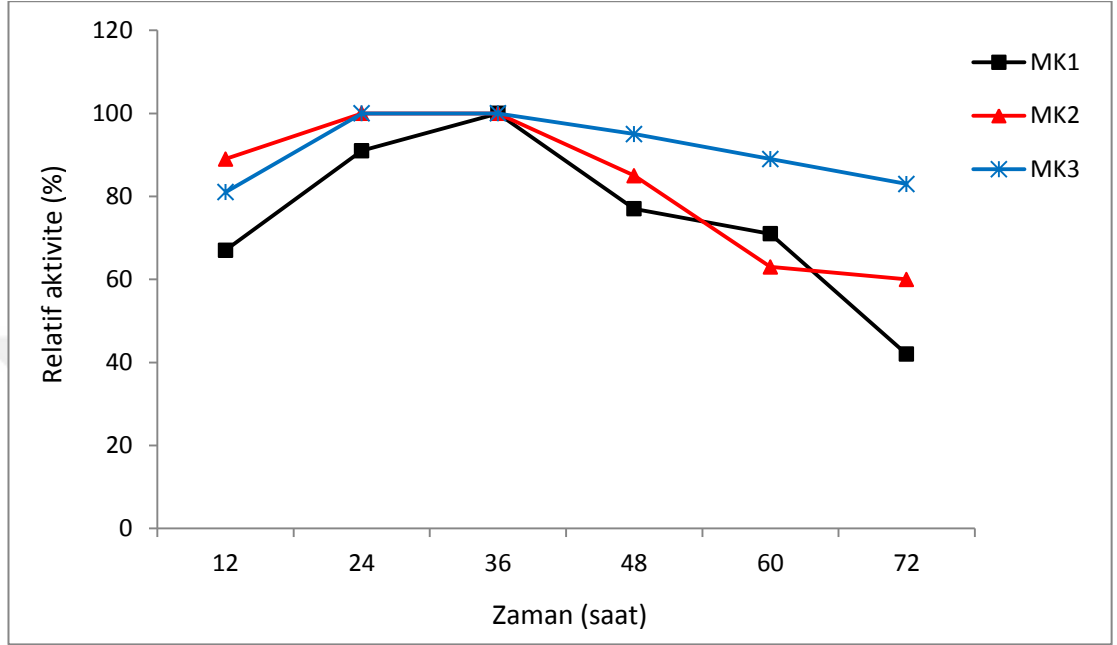


Şekil 4.5. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait sıcaklık stabilite grafiği

4.2.5. Zamana Göre Enzim Aktiviteleri

Bakterilerin LB-sıvı besiyerine inokülasyonlarından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere enzim numuneleri alınmış ve 72 saatlik periyotlar için enzim aktivite düzeyleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda inokülasyondan itibaren olmak üzere, MK1 36., MK2 24. ve MK3 24. saatte en yüksek aktivite seviyelerine ulaşmışlardır (Şekil 4.6). 12-72 saat aralığında ortalama enzim üretimi MK1, MK2 ve MK3 için sırasıyla %74.7, 82.3 ve 91.3 olarak belirlenmiştir. İlk 24 saatlik ortalama aktivite ise sırasıyla %79, 94.5 ve 90.5 olarak gerçekleşmiştir. Endüstriyel üretimlerde minimum masrafla maksimum kazanç hedeflendiği için, ilk 24 saatlik enzim üretim seviyeleri endüstriyel üretim için uygun görünmektedir. Fakat her bakteri endüstriyel üretimde kullanım için uygun değildir. Endüstriyel kullanıma uygun bakteriler GRAS

(Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenilir-Zararsız Kabul Edilen) kategorisinde olmak zorundadır. GRAS olarak tanımlanmış ve endüstriyel aşamalarda kullanılan bazı bakteriler bulunmaktadır. MK1, MK2 ve MK3 enzim genlerinin bu mikroorganizmalara klonlanması ile bu sorun aşılabilir.

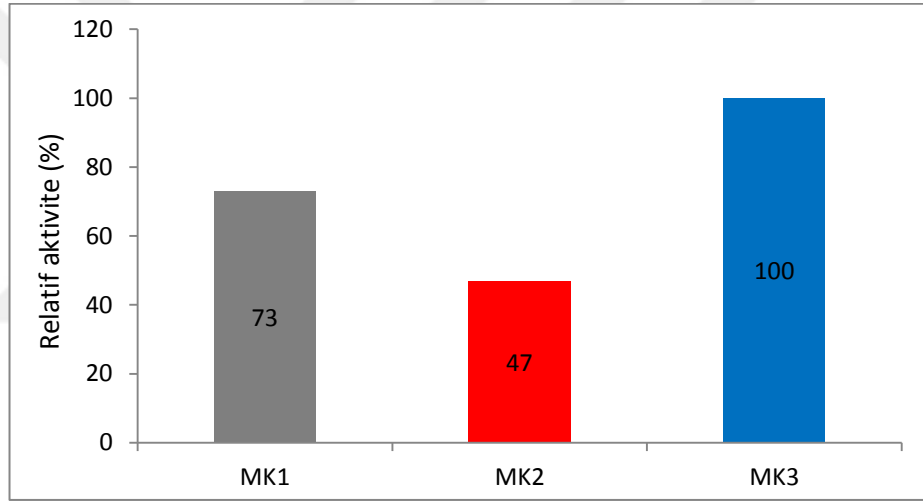


Şekil 4.6. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait aktivite/zaman grafiği

4.2.6. Enzimlerin Oransal ve Spesifik Aktiviteleri

Bacillus sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazları aynı anda substrat ile reaksiyona sokularak, enzimlerin kendi aralarında gösterdikleri aktivite seviyeleri birbirleri ile karşılaştırılmışlardır. Analiz sonucunda en yüksek aktiviteye sahip olan MK3 enziminin seviyesi %100 olarak kabul edilmiş, diğer iki izolata ait enzimler bu seviye üzerinden orantılanmıştır. Sonuçta, MK1 ve MK2 keratinazları MK3 keratinazına göre sırasıyla %73 ve %47 oranında aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.7). Her üç enzimin spesifik aktivite değerleri MK1, MK2 ve MK3 keratinazları için sırasıyla 2.76, 0.77 ve 5.48 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). MK3 keratinazının spesifik aktivitesi %100 olarak kabul edildiğinde MK1 ve MK1 keratinazlarının spesifik aktiviteleri oransal olarak sırasıyla %50.4 ve 14.1 olarak hesaplanmıştır.

Pandian vd. (2012) *Bacillus* sp. keratinazının spesifik aktivitesini >2.825 IU/mg, Agrahari ve Wadhwa (2012) 655.64 kat saflaştırdıkları *B. megaterium* SN1 keratinazının 544.7 U/mg, Pissuwan ve Suntornsuk (2001) *Bacillus* sp. FK 28 keratinazının 0.7-2.6 U/ml olarak bildirmişlerdir. Pissuwan ve Suntornsuk (2001) ayrıca Tayland'dan izole edilen toplam 65 adet *Bacillus* sp.'lerin (FK 1-FK 65) ürettikleri keratinaz enzimlerinin spesifik aktivite değerlerinin 0.73 ile 2.60 U/ml arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu bildiriler göz önünde bulundurulduğunda, özellikle MK3 keratinazının mg protein başına yüksek bir aktivite gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu enzimi üreten genin plazmit DNA aracılığı ile diğer *Bacillus subtilis* suşlarında klonlanması ile daha yüksek miktarlarda enzim üretimi söz konusu olabilir.



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının oransal aktivite grafiği

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarına ait spesifik aktivite değerleri

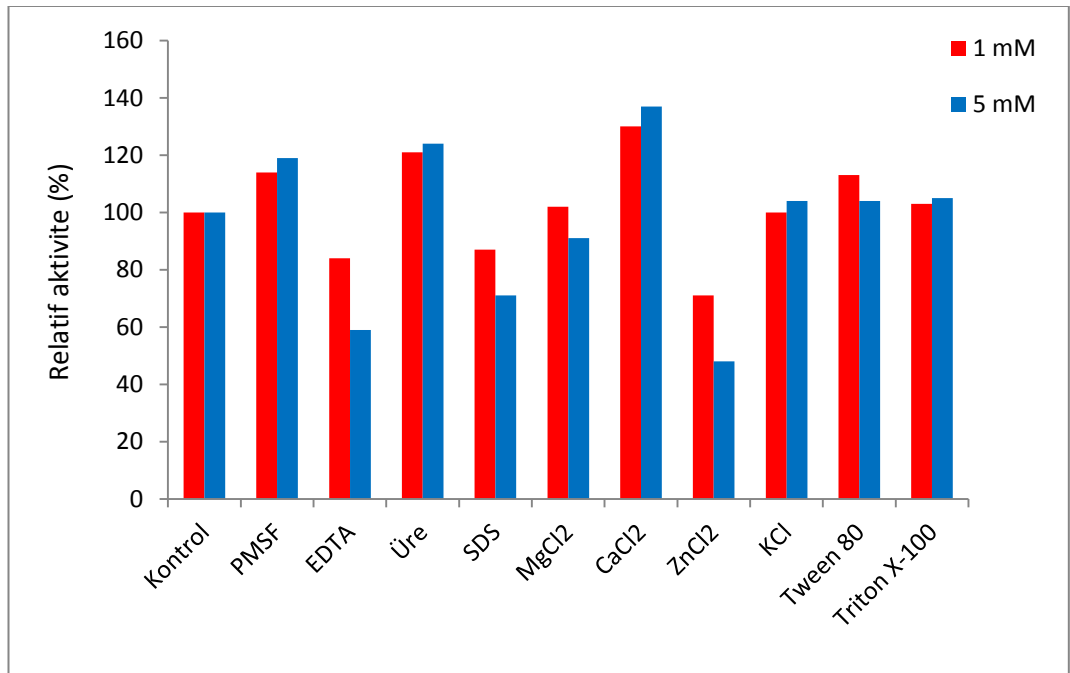
İzolant	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Spesifik aktivite (%)
<i>Bacillus</i> sp. MK1	2.76	50.4
<i>Bacillus</i> sp. MK2	0.77	14.1
<i>Bacillus</i> sp. MK3	5.48	100

4.2.7. Bazı Kimyasalların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

EDTA, PMSF, Üre, SDS, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, KCl, Tween 80 ve Triton X-100 son konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde enzim örneklerine ilave edilerek enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Metal iyonu ve kimyasal ilave edilmemiş olan kontrol grubunun aktivitesi %100 kabul edilerek metal iyonlarının etkisi sonucu ortaya çıkan aktivite düzeyleri bu değer ile karşılaştırılmıştır.

4.2.7.1. Bazı Kimyasalların MK1 Keratinazı Üzerine Etkisi

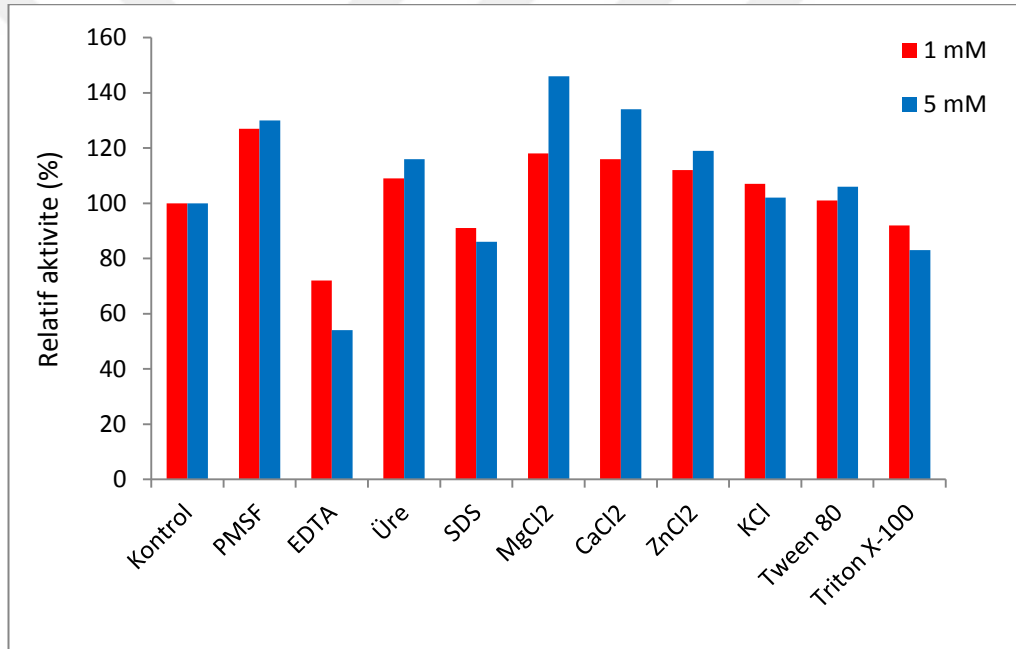
CaCl₂ %130 (1 mM) ve %137 (5 mM) ile MK1 keratinazı üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir. PMSF, üre, Tween 80, MgCl₂ ve Triton X-100 1 mM konsantrasyonlarda sırasıyla %114, 121, 113, 102 ve 103'lük aktivite değerleri ile MK1 keratinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir. ZnCl₂, EDTA ve SDS ise enzim aktivitesi üzerinde sırasıyla %29, 16 ve 13'lük aktivite kaybı ile inhibitör etki göstermişlerdir (Şekil 4.8). 5 mM konsantrasyonlarda ise CaCl₂'e ilave olarak PMSF ve üre de %119 ve 124'lük oransal değerlerle enzim aktivitesinde kayda değer bir artış sağlamışlardır. ZnCl₂ ise 5 mM konsantrasyonunda %52'lik aktivite kaybı ile en fazla inhibisyon etkisi gösteren metal iyonu olmuştur.



Şekil 4.8. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK1 keratinazı üzerine etkisi

4.2.7.2. Bazı Kimyasalların MK2 Keratinazı Üzerine Etkisi

1 mM konsantrasyonlarda PMSF %127'lik değer ile enzim aktivitesi üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir. Üre, MgCl₂, CaCl₂, Tween 80, ZnCl₂ ve KCl sırasıyla %109, 118, 116, 101, 112 ve 107'lik aktivite değerleri ile MK2 keratinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir. EDTA ve Triton X-100 enzim aktiviteleri ise sırasıyla %28 ve 8'lik bir aktivite kaybına sebep olmuştur (Şekil 4.9). 5 mM konsantrasyonlarda MgCl₂ %134'lük artışla en yüksek aktivatör olmuştur. MgCl₂'ü sırasıyla CaCl₂, PMSF, ZnCl₂ ve üre %134, 130, 119 ve 116'lık oranlarla takip etmişlerdir. 5 mM konsantrasyonda EDTA %46'lık aktivite kaybı ile en yüksek inhibisyon etkisini göstermiştir.

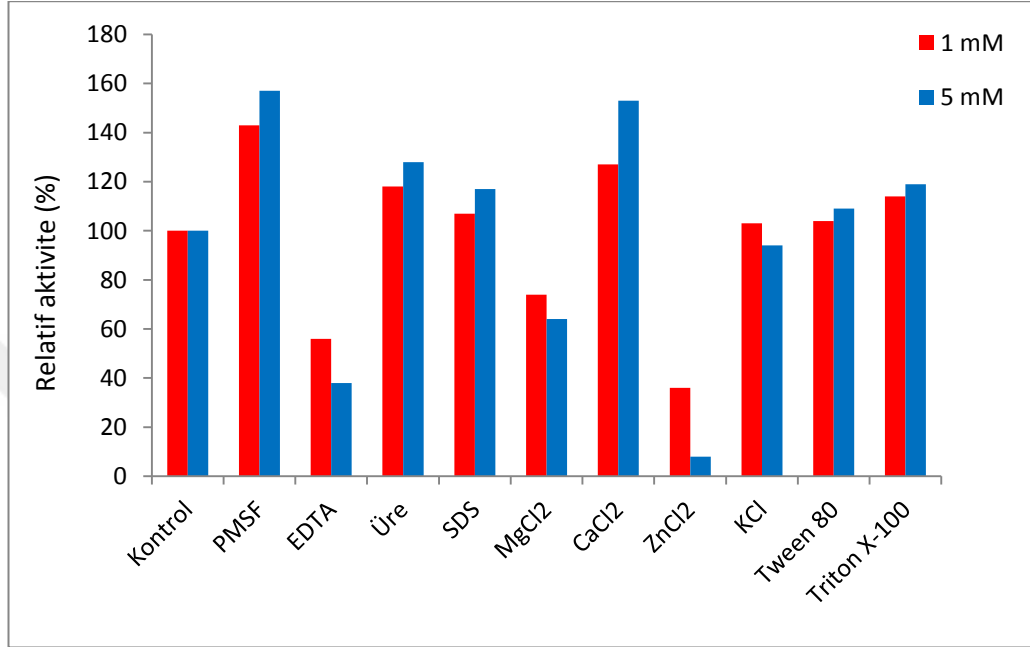


Şekil 4.9. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK2 keratinazı üzerine etkisi

4.2.7.3. Bazı Kimyasalların MK3 Keratinazı Üzerine Etkisi

1 mM konsantrasyon uygulamasında PMSF %143'lik değer ile MK3 keratinazı üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir. Üre, SDS, KCl, Tween 80, Triton X-100 ve CaCl₂ sırasıyla %118, 107, 103, 104, 114 ve 127'lik aktivite değerleri ile MK3 keratinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir. ZnCl₂ enzim aktivitesinde %64'lük bir inhibisyona sebep olurken, EDTA enzim %44'lük bir inhibisyona sebep

olmuştur. 5 mM konsantrasyonlarda ise yine PMSF %157'lik oranla en yüksek aktivasyon artışına sebep olmuştur. PMSF'yi %153, 128, 119 ve 117'lik artışla CaCl₂, üre, Triton X-100 ve SDS takip etmiştir. ZnCl₂ %92'lik inhibisyonla en fazla aktivite kaybına sebep olmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Bazı metal iyonları ve kimyasalların MK3 keratinazı üzerine etkisi

İçinde bulunduğumuz inorganik çevre ve canlı organizmalar geniş bir metal iyonu varyetesine sahiptir. Bu metal iyonları proteinlerin yapı ve modifikasyonlarında rol oynayarak fonksiyonlarına etki etmektedirler. Bu etkiler bir takım enzim aktivasyonun yükselmesi şeklinde ortaya çıkarken, bir takım enzimlerde inhibisyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bazı durumlarda da çeşitli metal iyonları enzimlerin ekstrem çevre koşullarına dayanıklılığını (stabilitesini) artırmaktadır. Örneğin, Ca²⁺ ve Mn²⁺'nin *Bacillus* EA.1 proteinazının 80 °C'de stabilitesini artırdığı bildirilmiştir (Coolbear vd., 1992).

Gupta vd. (2015), *B. subtilis* RSE163 keratinazının Mn²⁺, β-merkaptöethanol ve surfaktanlarca (Triton-X ve Tween-80) stimüle olduğunu, Fe³⁺, Cd²⁺, K⁺, PMSF ve diğer çelatin ajanlarca da inhibe olduğunu bildirmiştir. Triton X-100 MK1 ve MK3 keratinazlarını stimüle ederken, Tween 80 her üçünü de stimüle etmiştir. Gupta vd. (2015)'den farklı olarak MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının her üçü de PMSF

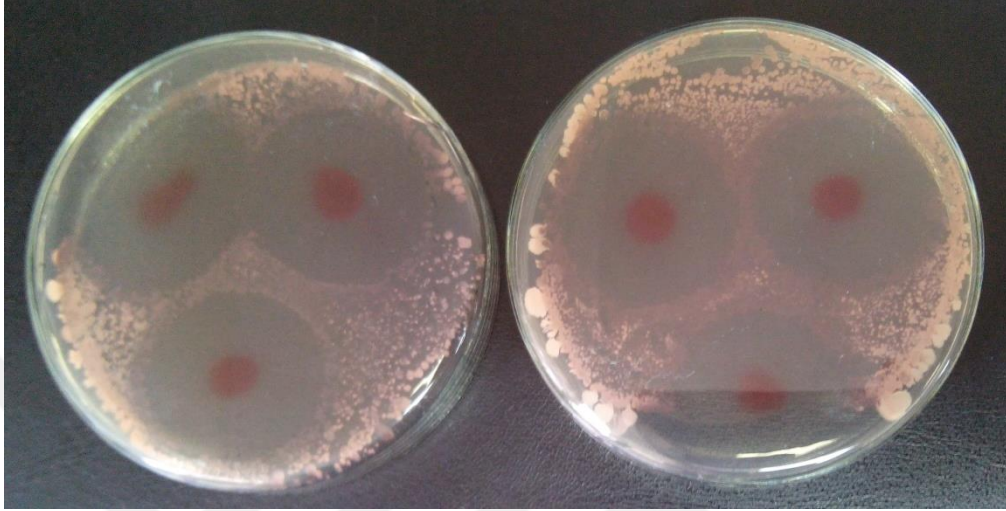
tarafından orta düzeyde, KCl tarafından ise düşük düzeyde stimüle olmuştur. Vigneshwaran vd. (2010) *B. licheniformis* keratinazının aktivitesini çinko ve magnezyumun artırdığını, bakır, kadmium, EDTA ve civanın ise tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Oysa mevcut çalışmada $ZnCl_2$ MK2 keratinazının aktivitesini kısmen artırırken MK3 keratinazını önemli düzeyde inhibe etmiştir. Kainoor ve Naik (2010) *Bacillus* sp., JB 99 serin keratinazının PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} ile aktivitesinin azaldığını, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} ve Ba^{2+} ile de stimüle olduğunu bildirmişlerdir. Kainoor ve Naik (2010) ayrıca EDTA'nın bir metalloproteaz inhibitörü olduğunu ve serin proteaz sınıfında yer alan keratinazlar üzerinde ki inhibisyon ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Metalloproteazlar aktif merkezlerinde aktiviteden sorumlu Zn, Co ve Mg gibi metal iyonları bulunmakta olup, genellikle nötral bakteriyel proteazlar (pH 6.0-9.0 arasında aktif olan proteazlar) bu gruba girerler. MK1, MK2 ve MK3 keratinazlarının her üçünün de pH 6.0-9.0 arasında optimum aktivite göstermesi ve EDTA tarafından değişik oranlarda inhibe olması bu keratinazların metalloproteaz olabileceğini düşündürmektedir.

$MgCl_2$ özellikle MK2 keratinazını önemli ölçüde stimüle etmiştir. Mn^{2+} gibi metal iyonlarının varlığında keratinaz enzimlerinin stimüle olması, enzim-substrat kompleksinin sürekliliğini sağlayan tuz veya iyon köprülerinin formasyonu sayesinde (Balaji vd., 2008). Keratinaz enzimlerinin metal iyonlarınca inhibisyonu ise, metal monohidroksit ile katalitik bölgedeki katalitik iyonlar arasındaki köprü şekillenmesine bağlanabileceği bildirilmiştir (Sivakumar vd., 2013).

4.2.8. Mutant Varyantlara Ait Keratinaz Aktivite Düzeyleri

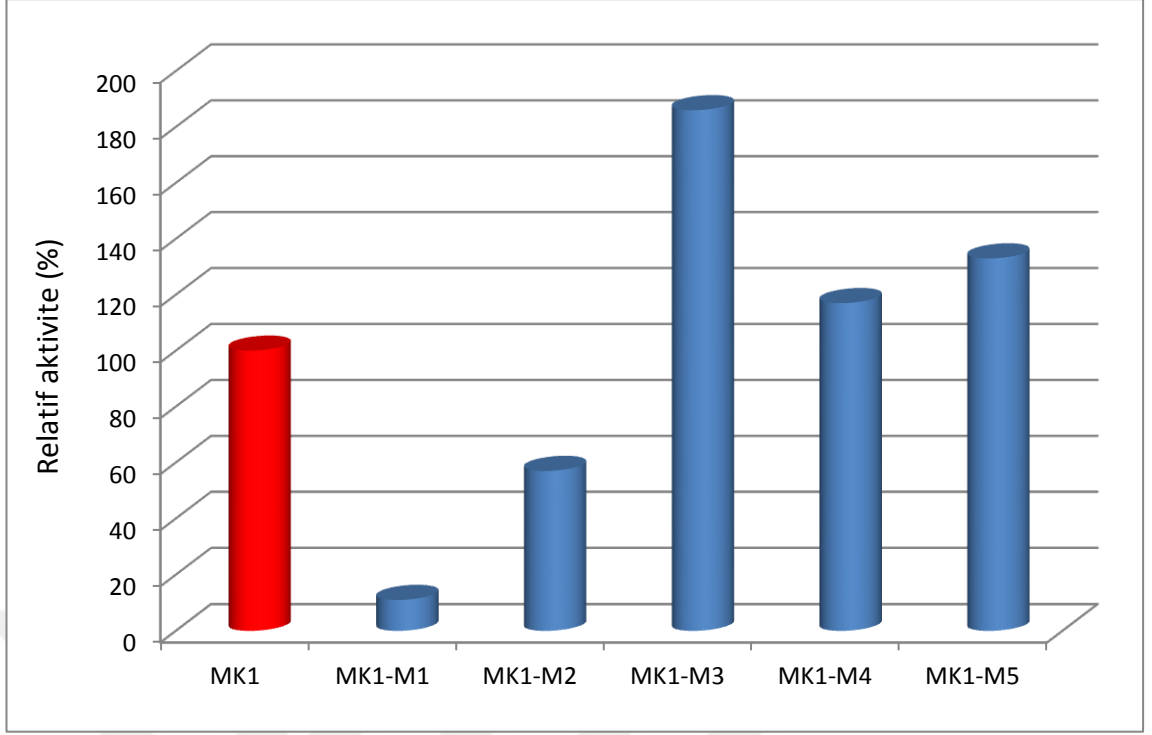
Bacillus sp. MK1, MK2 ve MK3 izolatları EtBr ile muamele edilmişlerdir. EtBr ile muamele edilen plaklarda, EtBr damlatılan bölgelerde koloni gelişiminin gözlenmediği (ölüm zonu), EtBr etkisinin zayıfladığı kıyı bölgelerden itibaren ise koloni gelişiminin başladığı görülmüştür (Şekil 4.11). EtBr'ün yayıldığı alanın kıyı kesimlerinden EtBr ile temas etmiş olan koloniler toplanarak tavuk tüyü unu içeren LB-agar plaklarına aktarılmıştır. Uygun koşullarda inkübasyon sonucunda aktivite

zonu büyüklükleri dikkate alınarak her bir izolata ait birer adet küçük, dörder adet büyük zona sahip olmak üzere beşer adet mutant varyant belirlenmiş ve bu mutant varyantların enzim üretim düzeyleri yabani tip izolatların enzim üretim düzeyleri ile relatif olarak karşılaştırılmışlardır.



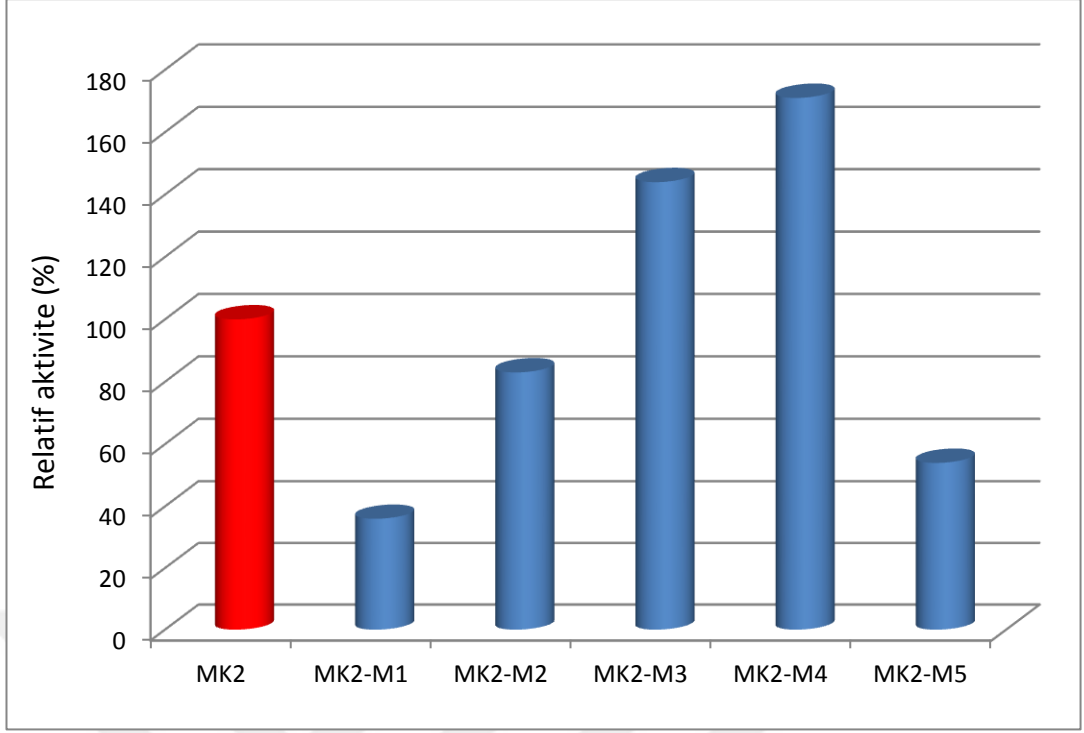
Şekil 4.11. EtBr muamelesi sonucunda koloni gelişimi tamamlanan plakların görüntüsü

Bacillus sp. MK1 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla MK1-M1, MK1-M2, MK1-M3, MK1-M4 ve MK1-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük aktivite zonu veren MK1-M1 mutant varyantı yabani varyanta göre sadece %11 oranında aktivite gösterebilmiştir. Buna karşılık MK1-M2 varyantı da enzim üretim düzeyleri bakımından yabani varyantın enzim üretim düzeyinin gerisinde kalmış ve %57 oranında aktivite göstermiştir. EtBr ile muamele MK1-M3, MK1-M4 ve MK1-M5 mutant varyantlarda ise enzim üretim düzeylerini artırmış ve bu mutant varyantlar sırasıyla %186, 117 ve 133 oranlarında enzim aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.12).



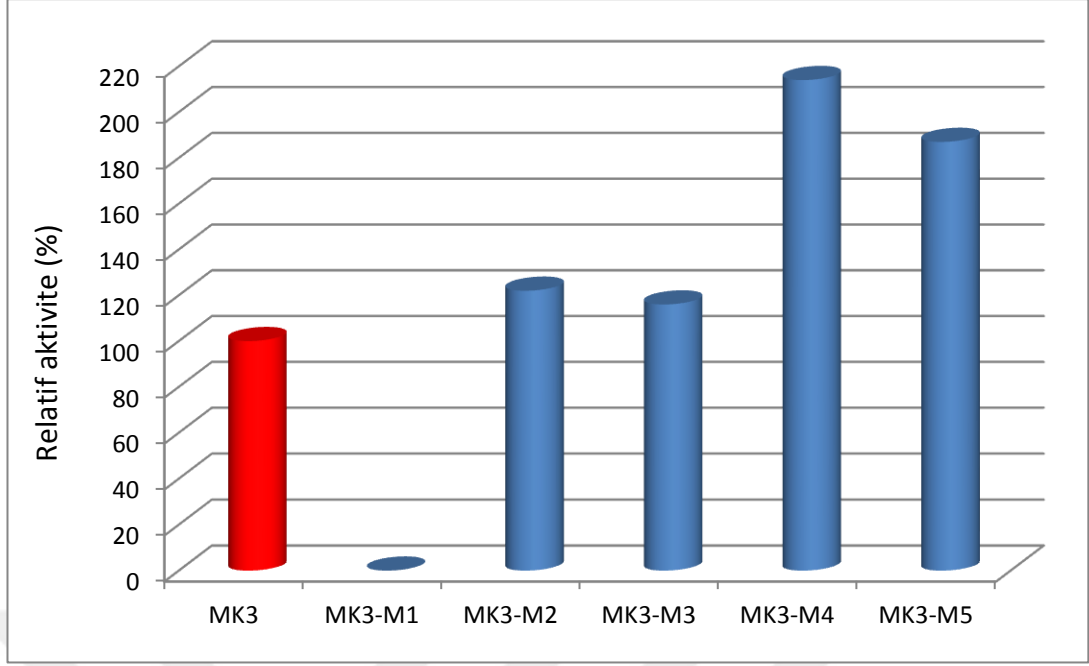
Şekil 4.12. *Bacillus* sp. MK1 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği

Bacillus sp. MK2 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla MK2-M1, MK2-M2, MK2-M3, MK2-M4 ve MK2-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük aktivite zonu veren MK2-M1 mutant varyantı yabancı varyanta göre %36 oranında aktivite gösterebilmiştir. Buna karşılık geniş aktivite zonu vermelerine rağmen MK2-M2 ve MK2-M5 varyantları da enzim üretim düzeyleri bakımından yabancı varyantın enzim üretim düzeyinin gerisinde kalmışlar ve sırasıyla %83 ve 54 oranında aktivite göstermişlerdir. EtBr ile muamele MK2-M3 ve MK2-M4 mutant varyantlarda enzim üretim düzeylerini artırmış ve bu mutant varyantlar sırasıyla %144 ve 171 oranlarında enzim aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Bacillus* sp. MK2 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği

Bacillus sp. MK3 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla MK3-M1, MK3-M2, MK3-M3, MK3-M4 ve MK3-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Aktivite zonu vermeyen MK3-M1 mutant varyantı enzim analizinde de hiçbir aktivite göstermemiştir (%0). MK3-M2, MK3-M3, MK3-M4 ve MK3-M5 varyantları ise sırasıyla %122, 116, 214 ve 187 oranında aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Bacillus* sp. MK3 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği

Mutasyon çalışmaları moleküler biyolojide in vitro olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Mutasyon bir genin fonksiyonunu belirlemek, bir geni köreltmek veya aktivitesini artırmak amacıyla kullanılabilir. Özcan (1996a) mezofilik *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşuna α -amilaz genini EtBr ile körelterek bu bakteriyi önce α -amilaz negatif (-) haline dönüştürmüştü, sonrasında aynı bakteriye bu sefer termofil *B. stearothermophilus* bakterisine ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini aktararak mezofilik suşta termostabil α -amilaz genini ürettirmiştir (Özcan, 1996b). Mutasyon genellikle genleri susturmakla birlikte nadiren gen aktivitesinin artması ile de neticelenebilir. Bu, muhtemelen gen üzerinde negatif baskı oluşturan kontrol genlerinin mutasyon neticesinde körelmesi ve böylece hedef genin üzerindeki baskının kalkarak normalden daha yüksek düzeyde transkribe olması ile açıklanabilir. Bu yöntemle Cai vd. (2008b), Lakshmi vd. (2013), Zhang (2012), Lateef vd. (2015) in vitro mutagenesis ile keratin üretimi artırılmış mutant varyeteler elde etmişlerdir. Cai vd. (2008) *B. subtilis* bakterisini N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine uygulaması ile mutasyona uğratmışlar ve elde ettikleri KD-N2 mutant varyetenin yabani tip varyeteden 2.5 kat daha fazla keratinaz ürettiğini bildirmişlerdir. Lakshmi vd. (2013) *B. subtilis* BF11 ve *B. cereus* BF21 yabani

varyetelerini UV ışını, hidroksilamin hidroklorid ve etil metil sülfonat (EMS) ile mutasyona uğratmışlar, elde ettikleri MBF11 ve MBF21 mutant varyetelerin laboratuvar koşullarında yabancı varyetelerden 50 kat daha fazla ürün verdiklerini bildirmişlerdir. Zhang (2012) keratinolitik *B. subtilis* bakterisini UV ışını ile mutasyona uğratmış ve yabancı varyeteden %75.9 daha fazla aktivite gösteren mutant varyeteyi elde etmiştir. Yine Lateef vd. (2015) 35.4-50.4 U/ml keratinaz üreten yabancı *Bacillus safensis* LAU 13 bakterisini mutasyonla geliştirmişler ve mutant varyantın 64.4-108.5 U/ml keratinaz ürettiğini bildirmişlerdir. Görüldüğü üzere bu çalışmadan önce de bazı keratinolitik *Bacillus* türlerinden in vitro mutagenesis ile daha fazla ürün veren mutant varyeteler geliştirilmiştir. Bu çalışmada oransal olarak MK1-M3 mutant varyetesi MK1'den %86, MK2-M4 mutant varyetesi MK2'den %71 ve MK3-M4 mutant varyetesi MK3'den %114 daha fazla aktivite göstermişlerdir. Bu oranlar yabancı varyetelere göre yaklaşık 1.7 ile 2.1 kat arasında değişmektedir. Yeni mutasyon çalışmaları ile daha fazla enzim üreten mutant varyeteler elde edilebileceği gibi, bu keratinaz genlerinin uygun konukçu bakterilere klonlanması ile de daha fazla ve daha saf enzim üreten rekombinant mikroorganizmalar geliştirilebilir.

4.2.9. Mutant Varyantlara Ait Spesifik Enzim Aktivite Düzeyleri

Yabancı tip izolatlar ile bu izolatlardan EtBr uygulaması ile elde edilen mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri U/mg protein ve % olarak Tablo 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Yabani tip izolatlar ile mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri

İzolat	Enzim üretici varyete (yabani ve mutantları)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Spesifik aktivite (%)
<i>Bacillus</i> sp. MK1	MK1	2,76	100
	MK1-M1	0,09	3.3
	MK1-M2	1,17	42.4
	MK1-M3	5,62	203.6
	MK1-M4	3,01	109.1
	MK1-M5	3,27	118.5
<i>Bacillus</i> sp. MK2	MK2	0,77	100
	MK2-M1	0,34	44.2
	MK2-M2	0,62	80.5
	MK2-M3	1,44	187.0
	MK2-M4	1,77	229.9
	MK2-M5	0,48	62.3
<i>Bacillus</i> sp. MK3	MK3	5,48	100
	MK3-M1	0	0
	MK3-M2	5,51	100.6
	MK3-M3	5,68	103.7
	MK3-M4	7,84	143.1
	MK3-M5	7,36	134.3

4.2.10. Filogenetik Analizler

Çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 bakterilerinin 16S rDNA sekansları sırasıyla Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. MK1 bakterisine ait rDNA sekansı

1	ATGGGCGGCC	CCGTCAATCC	TTGAGTTCAG	TCTTGCGGAC
41	CGTACTCCCC	AGGCGGAGTG	CTAATGCGTA	GCTGCAGCAT
81	AAGGGCGGAA	ACCCCTACAC	TAGCCATCAT	CGTTTACGGC
121	GGTGGACTAC	AGGGTATCTA	ATCCTGTGCG	CTCCCCACGC
161	TTCGCTCCTC	AGCGTCAGTT	ACAGACCAGA	GGAGTCGCAT
201	CGCACTGGTG	TCCTCCACAT	CTCTACGCAT	TTCACCGCTA
241	CACGTGGAAT	CACTCTCCTC	CTCTGCACTC	AAAGTTCCCCA
281	GTTCCAATGA	CCCTCCCCGG	GTGAGCCGGG	GGCTTTCACA
321	TCAGACTAAG	AAACCGCCTG	CGAGCCCTTT	ACGCCCAATA
361	ATTCCGGACA	ACGCTTGCCA	CCTACGTATT	ACCGCGGCTG
401	CTGGCACGTA	GTTAGCCGTG	GCTTTCTGGT	TAGGTACCGT
441	CAAGGTACCG	CCCTATTCGA	ACGGTACTTG	TTCTTCCCTA
481	ACAACAGAGC	TTTACGATCC	GAAAACCTTC	ATCACTCACG
521	CGGCGTTGCT	CCGTGAGACT	TTCGTCCATT	GCGGAAGATT
561	CCCTACTGCT	GCCTCCCGTA	GGAGTCTGGG	CCGTGTCTCA
601	GTCCCAGTGT	GGCCGATCAC	CCTCTCAGGT	CGGCTACGCA
641	TCGTTGCCTT	GGTGAGCCGT	TACCTCACCA	ACTAGCTAAT
681	GCGCCGCGGG	TCCATCTGTA	AGTGGTAGCC	GAAGCCACCT
721	TTTATGTTTG	AACCATGCGG	TTCAAACAAC	CATCCGGTAT
761	TAGCCCCGGT	TTCCCGGAGT	TATCCCAGTC	TTACAGGCAG
801	GTTACCCACG	TGTTACTCAC	CCGTCCGCCG	CTAACATCAG
841	GGAGCAAGCT	CCCATCTGTC	CGCTCGACAT	GCAACACTAG
881	GCGGTACCTG	TTACTGTAC		

Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. MK2 bakterisine ait rDNA sekansı

1	GGGACGTAAG	GTAGCGGCTA	GTGTTTGCAT	GTCGAGCGGA
41	CAGATGGGAG	CTTGCTCCCA	TGATGTTAGC	GGCGGACGGG
81	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCTGTAAG	ACTGGGATAA
121	CTCCGGGAAA	CCGGGGCTAA	TACCGGATGG	TTGTTTGAAC
161	CGCATGGTTC	AAACATAAAA	GGTGGCTTCG	GCTACCACTT
201	ACAGATGGAC	CCGCGGCGCA	TTAGCTAGTT	GGTGAAGTAA
241	CGGCTCACCA	AGGCAACGAT	GCGTAGCCGA	CCTGAGAGGG
281	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
321	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA
361	GTCTGACGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAAGTTTTTCG
401	GATCGTAAAG	CTCTGTTGTT	AGGGAAGAAC	AAAGTACCGTT
441	CGAATAGGGC	GGTACCTTGA	CGGTACCTAA	CCAGAAAAGCC
481	ACGGCTAACT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTAGGT
521	GGCAAGCGTT	GTCCGGAATT	ATTGGGCGTA	AAAGGCTCGC
561	AGGCGGTTTC	TTAAGTCTGA	TGTGAAAAGCC	CCCGGCTCAA
601	CCGGGGAGGG	TCATTGGAAA	CTGGGGAACT	TGAGTGCAGA
641	AGAGGAGAGT	GGAATTCCAC	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA
681	GAGATGTGGA	GGAACACCAG	TGGCGAAGGC	GA CTCTCTGG
721	TCTGTA ACTG	ACGCTGAGGA	GCGAAAAGCGT	GGGGAGCGAA
761	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
801	GTGCTAAGTG	TTAGGGGTTT	CCGCCCCTTA	GTGCTGCAGC
841	TAAACGCATTA	AGCACTCCGC	CTGGGGGAGT	ACGGTCCGCA
881	AGACTGAAAAC	CCAA		

Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. MK3 bakterisine ait rDNA sekansı

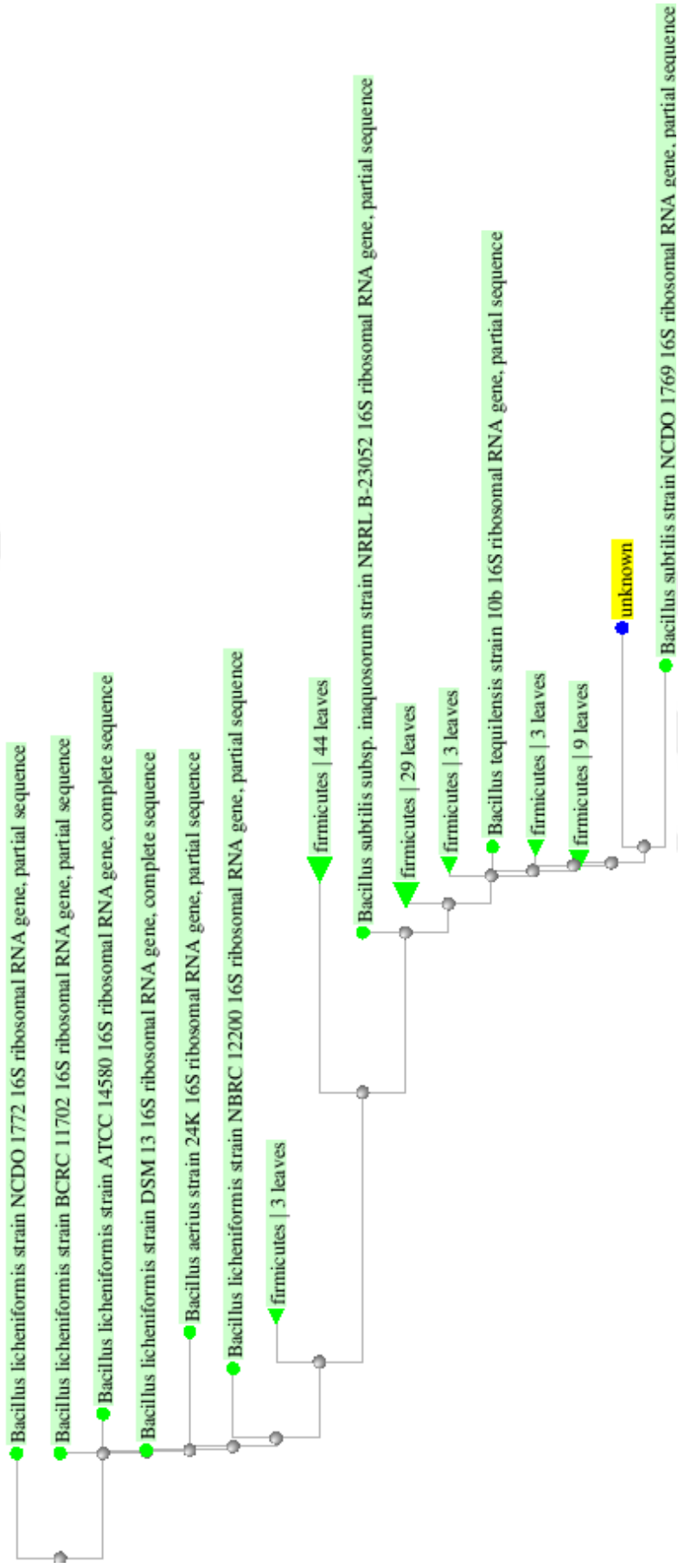
1	GGACCGAAAA	GGTAACCGCC	TAAATGTTGC	ATGTCGAGCG
41	GACAGATGGG	AGCTTGCTCC	CATGATGTTA	GCGGCGGACG
81	GGTGAGTAAC	ACGTGGGTAA	CCTGCCTGTA	AGACTGGGAT
121	AACTCCGGGA	AAACCGGGCT	AATACCGGAT	GGTTGTTTGA
161	ACCGCATGGT	TCAAACATAA	AAGGTGGCTT	CGGCTACCAC
201	TTACAGATGG	ACCCGCGGCG	CATTAGCTAG	TTGGTGAGGT
241	AAACGGCTCAC	CAAGGCAACG	ATGCGTAGCC	GACCTGAGAG
281	GGTGATCGGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC
321	CTACGGGAGG	CAGCAGTAGG	GAATCTTCCG	CAATGGACGA
361	AAGTCTGACG	GAGCAACGCC	GCGTGAGTGA	TGAAGGTTTT
401	CGGATCGTAA	AGCTCTGTTG	TTAGGGAAGA	ACAAGTACCG
441	TTCGAATAGG	GCGGTACCTT	GACGGTACCT	AACCAGAAAG
481	CCACGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG
521	GTGGCAAGCG	TTGTCCGGAA	TTATTGGGCG	TAAGGGCTCG
561	CAGGCGGTTT	CTTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCCCGGCTCA
601	ACCGGGGAGG	GTCATTGGAA	ACTGGGGAAC	TTGAGTGCAG
641	AAAGAGGAGAG	TGGAATTCCA	CGTGTAGCGG	TGAAATGCGT
681	AGAGATGTGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	CGACTCTCTG
721	GTCTGTA ACT	GACGCTGAGG	AGCGAAAGCG	TGGGGAGCGA
761	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG
801	AGTGCTAAGT	GTTAGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG
841	CTAACGCATT	AAGCACTCCG	CCTGGGGGAG	TACGGTCGCA
881	AGACTGAAAC	CCAATA		

Organizmaların filogenetik ilişkilerinin sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi, genomda bulunan genetik şifrenin değişmeyen bölgelerine ait sekansların kıyaslanması ile mümkündür (Woese vd., 1985; Woese, 1987). Bu diziler bakterilerde 5S, 16S ve 23S rDNA'yı şifreleyen genlere ait dizilerdir olmakla birlikte taksonomik amaçlar için en çok kullanılanı 16S rDNA genine ait dizidir (Bottger, 1989; Palys vd., 1997; Tortoli, 2003; Harmsen ve Karch; 2004). 16S rDNA genlerine ait sekans dizileri sadece bakteriler arasında değil, aynı zamanda arkebakterilerin 16S rDNA geni ve ökaryotların 18S rDNA geni ile de karşılaştırılabilir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). 16S rDNA genlerinde meydana gelen mutasyonlar, rDNA kadar önemli olmayan yapıları etkilediğinden sıklıkla tolere edilebilir. Örneğin, bir bakteri laktozu kullanmak için gerekli enzimi üretecek geni taşııyorsa enerji kaynağı olarak başka bir şeker veya proteini kullanabilir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). 16S rDNA genindeki değişim oranı kesin olarak bilinmemekle birlikte, organizmalar arasındaki bağlantıyı ve evrimsel mesafeyi göstermektedir (Kimura, 1980; Pace, 1997; Harmsen ve Karch, 2004; Çetinkaya ve Ayhan, 2012). 16S rDNA geninin bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli rol oynamasının bir diğer sebebi,

bakterilerde ortak olarak bulunmasıdır (Woese vd., 1985; Wose 1987). 16S rDNA sekansının bakterilerde filogenetik ilişkilerde ki bu belirtilen önemlerinden dolayı, *Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3 bakterilerinin filogenetik yerlerinin belirlenmesinde 16S rDNA sekanslarının kullanılması tercih edilmiştir.

Bacillus sp. MK1, MK2 ve MK3 bakterilerinin 16S rDNA sekansları NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında Blast analizine tabi tutularak diğer yakın mikroorganizmalarla sekans benzerlik düzeyleri ortaya çıkarılmış ve buna bağlı olarak da filogenetik dendrogramları oluşturulmuştur.

Blast analizleri *Bacillus* sp. MK1 bakterisinin 16S rDNA sekansının *B. subtilis* NCDO 1769 suşunun 16S rDNA sekansı ile %96'lık bir benzerlik gösterdiği görülmüş olup dendrogramda bu iki bakteri birbirlerine yakın pozisyonda yer almışlardır (Şekil 4.15).

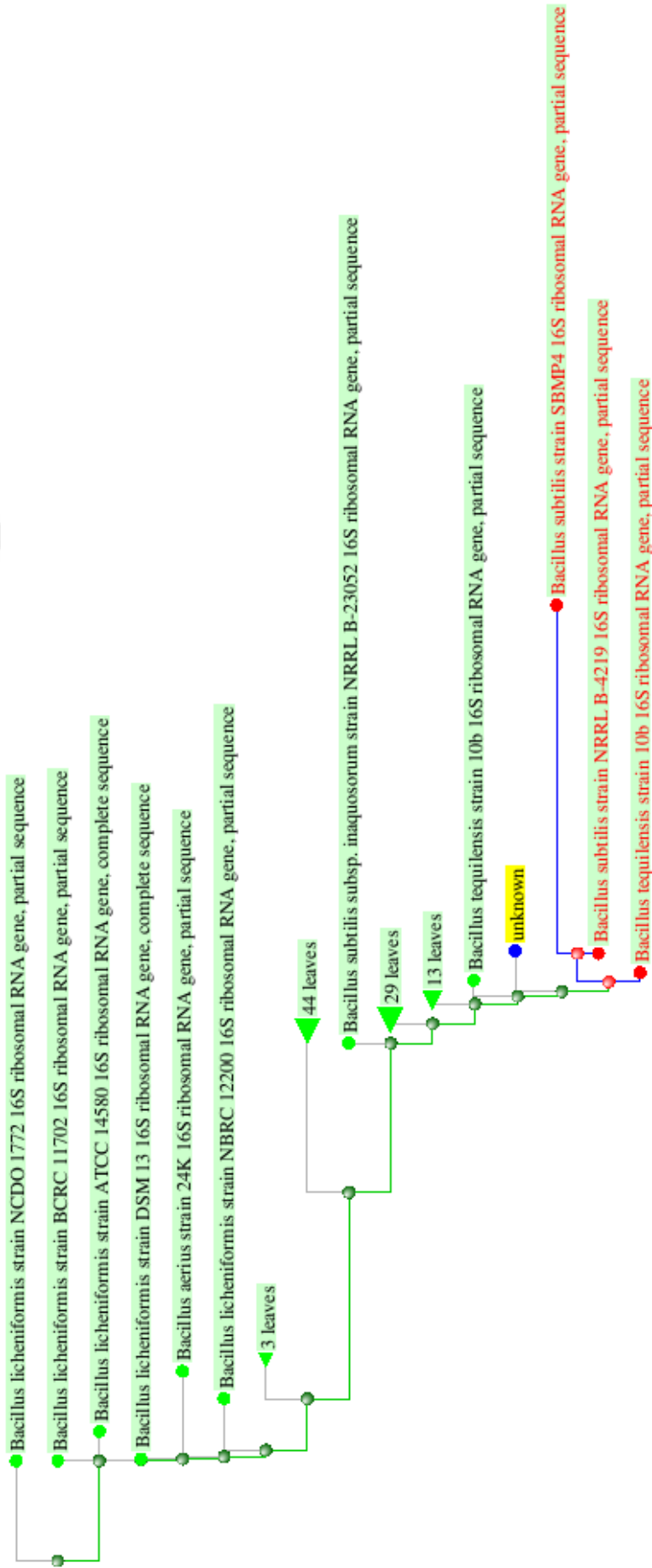


Şekil 4.15. *Bacillus* sp. MK1 izolatına ait dendrogram analizi

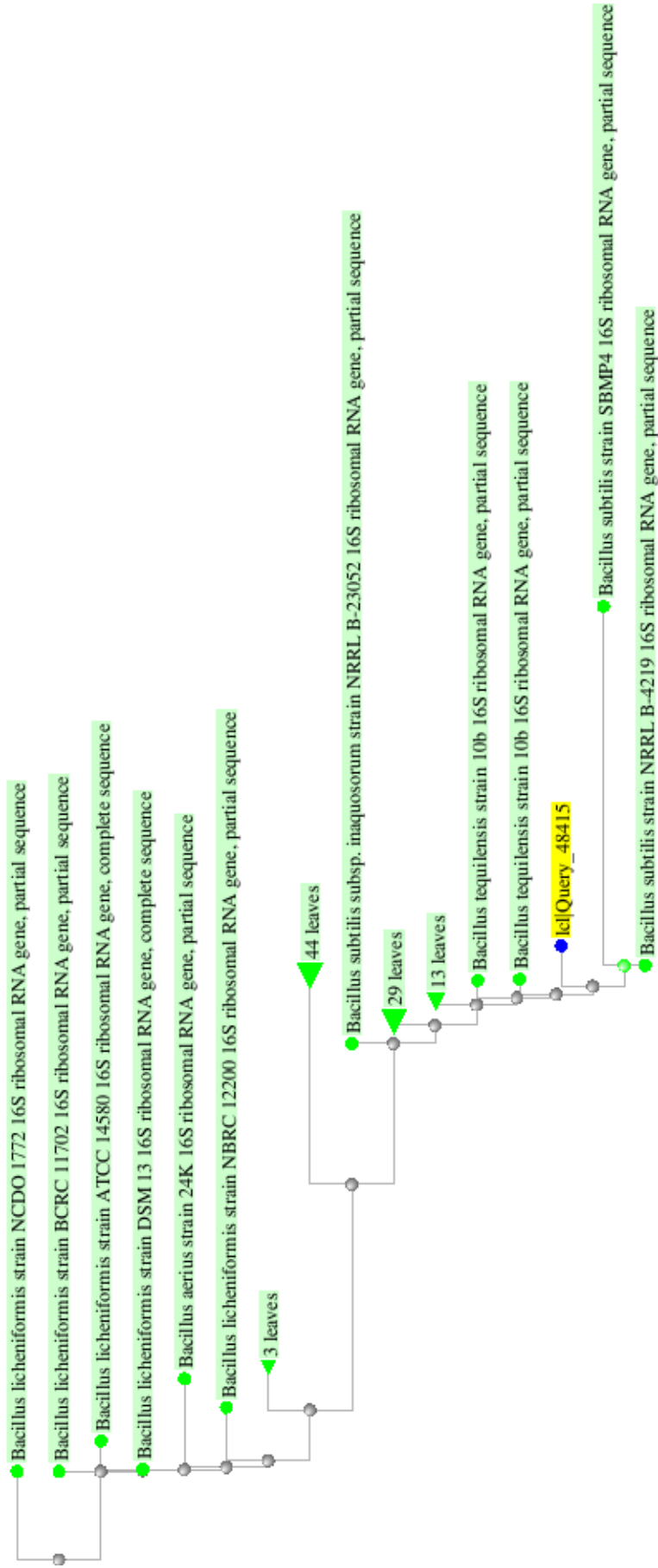
Bacillus sp. MK2 bakterisinin 16S rDNA sekansının *B. subtilis* NRRL B-4219 ve *B. tequilensis* 10b suşlarının 16S rDNA sekansı ile %99, *B. subtilis* SBMP4 suşunun 16S rDNA sekansı ile de %98 oranında benzerlik olduğu görülmüş olup, her dört bakteri de dendrogramda birbirlerine yakın pozisyonda yer almışlardır (Şekil 4.16).

Bacillus sp. MK3 bakterisinin 16S rDNA sekansının *B. subtilis* NRRL B-4219 ve *B. tequilensis* 10b suşlarının 16S rDNA sekansı ile %99, *B. subtilis* SBMP4 suşunun 16S rDNA sekansı ile de %98 oranında benzerlik olduğu görülmüş olup, her dört bakteri de dendrogramda birbirlerine yakın pozisyonda yer almışlardır (Şekil 4.17).

Hem MK2 hem de MK3 izolatının *B. subtilis* NRRL B-4219, *B. tequilensis* 10b ve *B. subtilis* SBMP4 bakterileri ile ortak benzerlikler göstermesi, muhtemelen MK2 ve MK3 izolatlarının aynı türden köken aldığı, bir tanesinin keratinaz geninde meydana gelen bir mutasyon sonucunda enzimatik özellikleri değişmiş diğer suşun meydana geldiği ve tesadüfen bu iki bakterinin aynı toprak numunesinden izole edildiği kanısını oluşturmuştur.



Şekil 4.16. *Bacillus* sp. MK2 izolatına ait dendrogram analizi



Şekil 4.17. *Bacillus* sp. MK3 izolatına ait dendrogram analizi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Bu çalışma ile keratinaz aktivitesine sahip 3 adet *Bacillus* sp. izolasyonu (*Bacillus* sp. MK1, MK2 ve MK3) yapılmıştır.
2. İzolatlarca üretilen enzimleri kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.
3. *Bacillus* sp MK1 izolatına ait keratinaz enziminin sıcaklık optimumu 40 °C, pH optimumu 9.0, spesifik aktivitesi ise 2.76 U/mL olarak belirlenmiştir.
4. *Bacillus* sp MK2 izolatına ait keratinaz enziminin sıcaklık optimumu 50 °C, pH optimumu 8.0, spesifik aktivitesi ise 0.77 U/mL olarak belirlenmiştir.
5. *Bacillus* sp MK3 izolatına ait keratinaz enziminin sıcaklık optimumu 40 °C, pH optimumu 9.0, spesifik aktivitesi ise 5.48 U/mL olarak belirlenmiştir.
5. *Bacillus* sp MK1 en yüksek enzim üretim seviyesine bakterinin inokülasyonundan itibaren 36. saatte ulaşırken, *Bacillus* sp MK2 ve *Bacillus* sp MK3 24. saatte ulaşmışlardır.
6. CaCl₂, PMSF, üre ve Tween 80 her üç enzim için de ortak aktivatör olurken, EDTA ortak inhibitör olmuştur. ZnCl₂ 5 mM konsantrasyonda MK3 keratinazını %92 düzeyinde inhibe ederek en yüksek inhibisyon seviyesine sahip olmuştur.
7. İzolatlar çerçeve kayması mutasyonuna sebep olan EtBr ile muamele edilerek enzim üretimi artırılmış mutant varyantlar elde edilmiştir. MK1 mutantlarından elde edilen MK1-M3 %186, MK2'den üretilen mutantlardan MK2-M4 %171 ve MK3 mutantlarından MK3-M5 %187 ile yabani varyantlarına göre en yüksek düzeyde enzim üreten mutant varyantlar olmuştur.

8. BLAST analizleri sonucunda *Bacillus* sp. MK1 bakterisi *B. subtilis* NCDO 1769 ile %96, *Bacillus* sp. MK2 ve MK3 bakterileri ise *B. subtilis* NRRL B-4219 ve *B. tequilensis* 10b bakterileri ile %99, *B. subtilis* SBMP4 bakterisi ile de %98 oranında rDNA sekans benzerliği göstermişlerdir.

Çalışmaya ait öneriler ise aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Keratinaz enzimleri özellikle tavukçuluk işletmelerinde ortaya çıkan atık tavuk tüylerinin hidrolizi ile çevre kirlenmesinin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.
2. Elde edilen mutant varyantlar yabani varyantlara göre yaklaşık olarak 1.2 katı ile 2.1 katı arasında değişen oranlarda daha fazla enzim aktivitesi göstermişlerdir. Bu artış endüstriyel uygulamalar için yeterli görünmeyip daha ekonomik boyutlarda enzim üretiminin sağlanması gerekmektedir. Bu artış, mutasyon çalışmalarının sürdürülerek enzim aktivitesi daha da yükseltilmiş yeni mutant varyetelerin elde edilmesi veya moleküler klonlama yöntemleri ile bu enzim genlerinin endüstriyel bakteri suşlarına klonlanarak yeni rekombinant bakterilerin geliştirilmesi ile sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry. Production and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- Agrahari, S., Wadhwa, N., 2012. Isolation and characterization of feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 48(2): 199-205.
- Akan, S., 2010. Keratinolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, keratinaz üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Allpress, J.D., Mountain, G., Gowland, P.C., 2002. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 337-342.
- Balaji, S., Kumar, M., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R., Sehga, P.K., 2008. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11): 2741-2745.
- Barredo, J.L., 2005. Microbial Enzymes and Biotransformations. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- Bernal, C., Cairo, J., Coello, N., 2006. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 49-54.
- Bottger, E.C., 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 65: 171-176.
- Böckle, B., Galunsky, B., Muller, R., 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3705-3710.
- Brandelli, A., 2005. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium* sp. *Annals of Microbiology*, 55(1): 47-50.
- Brandelli, A., 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol.*, 1: 105-116.

- Brandelli, A., Daroit, D.J., Riffel, A., 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1735–1750.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdacı, M., Verneuil, B., 1999. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2570-2576.
- Burt, J.R., Edward, H., Ichida, J.M., 1999. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 768227.
- Cai, C., Zheng, X., 2009. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 875-883.
- Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.J., Yin, Y., Zheng, X.D., 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(9): 713-720.
- Cai, C.G., Lou, B.G., Zheng, X.D., 2008. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(1): 60-67.
- Canera, C.S., 2001. Hair saving unhairing process. Part 4. Remarks on the evolution of the investigation on enzyme unhairing. *Journal of the Society of Leather Technology Chemists*, 85: 836-841.
- Cao, Z.J., Zhang, Q., Wei, D.K., Chen, L., Wang, J., Zhang, X.Q., Zhou, M.H., 2009. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 181-188.
- Chen, X., Zhou, B., Xu, M., Jia, G., Huang, Z., Zhao, H., Liu, G., 2015. Prokaryotic expression and characterization of a keratinolytic protease from *Aspergillus niger*. *Biologia*, 70(2): 157-164.
- Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C., 1995. Production and characterization of keratinase of a featherdegrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(12): 2239- 2243.

- Coolbear, T., Whittaker, J.M., Daniel, R.M., 1992. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA.1. *Biochemical Journal*, 287: 367-374.
- Correa, A.P.F., Daroit, D.J., Brandelli, A., 2010. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64: 1-6.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K., 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1): 53-62.
- de Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A.P., Termignoni, C., 2002. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(4): 342–348.
- El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballa, A., El-Araby, M.H., Abdel Fattah, A.F., 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40: 2325-2332.
- Farag, A.M., Hassan, M.A., 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 85-93.
- Femi-Ola, T.O., Akinbobola, O.S., Oluwaniyi, T.T., 2015. Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry soil. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 6(5): 146-154.
- Friedrich, A.B., Antranikian, G., 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2875–2882.
- Gawade, A.E., Bale, S.R., 2013. Characterization of a thermostable serine keratinase from newly isolated thermophilic *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 2(9): 14-25.
- Grazziotin, A., Pimentel, F.A., De Jong, E.V., Brandelli, A., 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, 126(1): 135-144.
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 21-33.

- Gupta, S., Nigam, A., Singh, R., 2015. Purification and characterization of a *Bacillus subtilis* keratinase and its prospective application in feed industry. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(2): 197-204.
- Harmsen, D., Karch, H. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *American Society for Microbiology*, 70: 19–24.
- Hoq, M.D.M., Siddiquee, K.A.Z., Kawasaki, H., Seki, T., 2005. Keratinolytic activity of some newly isolated *Bacillus* species. *Journal of Biological Sciences*, 5(2): 193-200.
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang, Y., 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46: 169-173.
- Joshi, S.G., Tejashwini, M.M., Revati, N., Sridevi, R., Roma, D., 2007. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *International Journal of Poultry Science*, 6(9): 689-693.
- Kainoor, P.S., Naik, G.R., 2010. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus* sp. JB 99. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 384-390.
- Kazi, Y.F., Kumar, P., Soomro, I.H., 2015. Characterization of the keratinolytic activity of indigenous *Bacillus licheniformis* keratinase. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(4): 800-809.
- Kazzaz, A.E., Feizi, Z.H., Guvenmez, H.K., 2015. Keratinolytic protease production and characterization from *Bacillus* sp. isolated from poultry wastes. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(4): 63-73.
- Kim, J.M., Lim, W.J., Suh, H.J., 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 37: 287-291.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.

- Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A., Horikoshi, K., 2006. Isolation and characterization of a featherdegrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles*, 10: 229-235.
- Korkmaz, H., Hur, H., Dincer, S., 2004. Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste. *Annals of Microbiology*, 54(2): 201-211.
- Korkmaz, H., Unaldi, M.N., Aslan, B., Coral, G., Arıkan, B., Dincer, S., Colak, O., 2003. Keratinolytic Activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*, 53: 85-93.
- Kublanov, I.V., Tsirolnikov, K.B., Kaliberda, E.N., Rumsh, L.D., Haertle, T., Bonch-Osmolovskaya, E.A., 2009. Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift Zone. *Microbiology*, 78(1): 67-75.
- Kumar, E.V., Srijana, M., Chaitanya, K., Reddy, Y.H.K., Reddy, G., 2011. Biodegradation of poultry feathers by a novel bacterial isolate *Bacillus altitudinis* GVC11. *Indian Journal of Biotechnology*, 10: 502-507.
- Kumar, P., Kazi, Y.F., Soomro, I.H., 2012. A comparative characterization of indigenous keratinase enzymes from district Khairpur, Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1): 73-79.
- Kunert, J., 1973. Keratin decomposition by dermatophytes: 1. sulphite production as a possible way of substrate denaturation. *Zeitschrift fuer Allgemeine Microbiologie Morphologie, Genetic und Oekologie der Microorganismen*, 13: 489-498.
- Łaba, W., Rodziewicz, A., 2010. Keratinolytic potential of feather-degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2): 371-378.
- Lakshmi, P.J., Chitturi, C.M.K., Lakshmi, V.V., 2013. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. *International Journal of Microbiology*, Article ID 608321, 7 pages.
- Lateef, A., Adelere, I.A., Guegum-Kana, E.B., 2015. *Bacillus safensis* LAU 13: a new source of keratinase and its multi-functional biocatalytic applications. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(1): 54-63.

- Lee, G.G., Ferket, P.R., Shih, J.C.H., 1991. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. *The FASEB Journal*, 59: 1312- 1315.
- Lee, H., Suh, D.B., Hwang, J.H., Suh, H.J., 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97: 123-133.
- Lehninger, A.L., 1984. *Principles of Biochemistry*. USA.
- Letourneau, F., Soussotte, V., Bressollier, P., Branland, P., Verneuil, B., 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Letters in Applied Microbiology*, 26(1): 77-80.
- Lin, X., Kelemen, D.W., Miller, E.S., Shih, J.C.H., 1995. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1469-1474.
- Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S., Shih, J.C.H., 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10): 3271-3275.
- Mohamedin, A.H., 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43: 13-21.
- 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.
- Moriyama, K., Tatsushi, O., Tsuzuki, H., 1967. Multiple proteolytic enzymes of *Streptomyces fradiae*, production, isolation and preliminary characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 139: 382-397.
- Mousavi S., Salouti, M., Shapoury, R., Heidari, Z., 2013. Optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(8): e7160.
- Nagal, S., Jain, P.C., 2010. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 196-200.
- Nakayama, T., Tsuruoka, N., Akai, M., Nishino, T., 2000. Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6): 612-614.

- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R., 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178: 538-547.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., and Al-Zarban, S., 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratindegrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66: 1-11.
- Özcan, B.D., Özcan, N., 2008. Expression of thermostable α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in various *Bacillus subtilis* strains. *Annals of Microbiology*, 58(2): 265-268.
- Özcan, B.D., Özcan, N., 2010. Cloning and expression of thermostable beta-amylase gene of *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* BR151. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(6): 1011-1016.
- Özcan, N., 1996a. Ethidium Bromid uygulaması ile α -Amilaz negatif *Bacillus subtilis* mutant suşlarının oluşturulması ve karakterizasyonu. *Ç. Ü. Z. F. Dergisi*.
- Özcan, N., 1996b. Protoplast füzyonu ile *Bacillus stearothermophilus*'a ait sıcaklık dirençli α -amilaz geninin *Bacillus subtilis* kromozomuna aktarılması. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi*, 11(4): 97-106.
- Pace, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734–740.
- Palys, T., Nakamura, L.K., Cohan, F.M., 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 1145–1156.
- Pandian, S., Sundaram, J., Panchatcharam, P., 2012. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. *European Journal of Experimental Biology*, 2(1): 274-282.
- Papadopoulos, M.C., El Boushy, A.R., Roodbeen, A.E., Ketelaars, E.H., 1986. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. *Animal Feed Science and Technology*, 14(3): 279-290.

- Park, G.T., Son, H.J., 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research*, 164(4): 478-485.
- Paul, D., Rahman, A., Ilias, M., Hoq, M.M., 2007. Production and characterization of keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* MZK-03N grown on feather mill. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24: 57-61.
- Pissuwan, D., Suntornsuk, W., 2001., Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart Journal*, 35: 171-178.
- Prasad, H., Kumar, G., Karthik, L., Rao KV, B., 2010. Screening of extracellular keratinase producing bacteria from feather processing areas in Vellore, Tamil Nadu, India. *Journal of Scientific Research*, 2(3): 559-565.
- Rahayu, S., Syah, D., Suhartono, M.T., 2012. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1: 152-158.
- Raju, K.C., Neogi, U., Saumya, R., Goud, N.R., 2007. Studies on extra cellular enzyme keratinase dermatophyte *Microsporium gypseum*. *International Journal of Biological Chemistry*, 1(3): 174-178.
- Rao, M.B., Tanksale, A.P., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597-635.
- Riffel, A., Brandelli, A., 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 395-399.
- Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C.M., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Tavares, F.C.A., 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*, 128: 693-703.
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., Brandelli, A., 2003b. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, 179: 258-265.
- Riffel, A., Ortolan, S., Brandelli, A., 2003a. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(8): 855-859.

- Rozs, M., Manczinger, L., Vagvolgyi, C.S., Kevei, F., Hochkoepler, A., Varay Rodríguez, A.G., 2001. Fermentation characteristics and secretion of proteases of a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 23: 1925-1929.
- Saibabu, V., Niyonzima, F.N., More, S.S., 2013. Isolation, partial purification and characterization of keratinase from *Bacillus megaterium*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(2): 13-20.
- Sangali, S., Brandelli, A., 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5): 735-743.
- Selvam, K., Vishnupriya, B., Yamuna, M., 2013. Isolation and description of keratinase producing marine actinobacteria from South Indian Coastal Region. *African Journal of Biotechnology*, 12(1): 19-26.
- Shih, J.C.H., 1993. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization – a review. *Poultry Science*, 72: 1617-1620.
- Singh, C.J., 1997. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia*, 137: 13–16.
- Sivakumar, T., Balamurugan, P., Ramasubramanian, V., 2013. Characterization and applications of keratinase enzyme by *Bacillus thuringiensis* TS2. *International Journal of Future Biotechnology*, 2(1): 1-8.
- Sivakumar, T., Shankar, T., Ramasubramanian, V., 2012. Purification properties of *Bacillus thuringiensis* TS2 keratinase enzyme. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12(12): 1553-1557.
- Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., Gubitza, G. M., 2007. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7): 1772- 1781.
- Suh, H.J., Lee, H.K., 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal of Protein Chemistry*, 20(2): 165–169.
- Suntornsuk, W., Suntornsuk, L., 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86: 239-243.
- Suntornsuk, W., Tongjun, J., Onnim, P., Oyama, H., Ratanakanokchai, K., Kusamra, N.T., Oda, K., 2005. Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 1111–1117.

- Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe, K., 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2): 73-81.
- Takami, H., Nogi, Y., Horikoshi, K., 1999. Reidentification of the keratinase producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles*, 3: 293-296.
- Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T., 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, 22(4): 181-188.
- Thys, R.C., Brandelli, A., 2006. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6): 1259-1268.
- Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P., Brandelli, A., 2004. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2): 181-186.
- Tortoli, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 319–354.
- van Beilen, J.B., Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4): 338-344.
- Vigneshwaran, C., Shanmugam, S., Kumar, T.S., 2010. Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from Namakkal Poultry Farm. *Researcher*, 2(4): 89-96.
- Wang, X., Parsons, C.M., 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Science*, 76(3): 491- 496.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox, G.E., 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6: 143-151.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., Tamiya, E., 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(5): 1138-1143.

Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D., Niu, T.G., 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2598-2603.

Zhang, X., 2012. Applying the mutation of *Bacillus subtilis* and the optimization of feather fermentation medium to improve keratinase activity. Advances in Biological Chemistry, 2: 64-69.



ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Meryem KARADAĞLI

2. Doğum Tarihi : 01.01.1991

3. Unvan : Biyolog

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lise	Osmaniye Atatürk Anadolu Lisesi		2009
Lisans	Biyoloji Bölümü Fen-Edebiyat Fakültesi	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2014