



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***TRICHOPHYTON* sp. SUŞUNDAN KERATİNAZ
İZOLASYONU ve KISMİ
KARAKTERİZASYONU**

Döne PARLAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2013

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***TRICHOPHYTON* sp. SUŞUNDAN KERATİNAZ**
İZOLASYONU ve KİSMİ
KARAKTERİZASYONU

Döne PARLAK

Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
Derecesi için hazırlanmıştır

KAHRAMANMARAŞ 2013

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Döne PARLAK tarafından hazırlanan”*Trichophyton sp. suşundan keratinaz izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu*” adlı bu tez, jürimiz tarafından 02/ 07 / 2013 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Tanış (DANIŞMAN)

Biyoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Sinan DAYISOYLU (ÜYE).....

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Döne PARLAK

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

**TRICHOPHYTON sp. SUŞUNDAN KERATİNAZ İZOLASYONU ve KISMİ
KARAKTERİZASYONU
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

ÖZET

Bu çalışmada, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Dermatoloji Polikliniğine başvuran hastaların deri ve saç yüzeylerinden *Trichophyton sp.* izolasyonu yapıldı. *Trichophyton sp.* suşları sabouraud dekstroz broth besiyerinde geliştirildi. Enzim üretimi mineral besiyerinde ve keratin tozunun karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Suşlar kazeinolitik aktiviteleri açısından kıyaslandı (skim-milk agarda). Suşlar içerisinde Tr-9 maksimum kazeinolitik aktivite gösterdi ve en iyi keratinaz üreticisi seçildi. Süpernatanttan enzimin saflaştırılması için Amonyum sülfat presipitasyonu, Sephadex G-100 ve DEAE Sepharose kolon kromatografisi uygulandı. Keratinaz enziminin moleküler ağırlığı SDS page ve zimogram uygulanarak yaklaşık 34 kDa olarak tahmin edildi. Keratinaz aktivitesi keratin azurun substrat olarak kullanılmasıyla belirlendi

Tr-9 keratinazın optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.5 ve 37°C olarak belirlendi. Tr-9 Keratinaz enziminin pH 5.5-8.0 aralığında ve 20°C den 40°C 'ye kadar stabil olduğu görüldü. Tr-9 Keratinaz tüy parçalama için de test edildi ve 15 gün içinde tavuk tüyünü başarılı bir şekilde parçaladığı sonucunu gösterdi.

Şelatör, inhibitörler ve metal iyonlarını içeren bazı kimyasalların keratinolitik aktivite üzerindeki etkileri enzimin 30 dk bu maddelerle (1-5 mM, %1) ön inkübasyonu yapılarak çalışıldı. CaCl₂ (5mM) keratinaz aktivitesini (%148) stimüle edici etki gösterdi. Diğer taraftan EDTA (5mM) ve SDS (%1) sırasıyla %49, % 49 etki göstererek kısmen inhibe etti, PMSF (1mM ve 5mM) ile tam inaktivasyon elde edildi. Bu durum enzimin serin proteaz olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar keratinaz enziminin nonpatojen endüstriyel mikroorganizmalara aktarılabilirse keratinolizis gerektiren endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar ve tüy unu (feather meal) üretimi gibi işlemler için daha kullanışlı olacağını göstermektedir.

**ISOLATION and PARTIAL CHARACTERIZATION OF KERATINASE
FROM *TRICHOPHYTON* sp.**

(M.Sc. THESIS)

SUMMARY

In this study, *Trichophyton* sp. was isolated from patients' skin and hair surface who applied to Kahramanmaraş Sutcu Imam University Dermatology polyclinic. *Trichophyton* sp. was grown in sabouraud dextrose broth medium. Enzyme production was accomplished in mineral medium and keratin powder served as a carbon source. Caseinolytic activities were compared between the strains (on skim milk agar). Among the strains Tr-9 showed the maximum caseinolytic activity and was selected the best keratinase producer. The supernatant was subject to Ammonium sulphate precipitation, Sephadex G-100 column and DEAE Sepharose column chromatography for purification of enzyme. The molecular weight of keratinase was estimated to be 34 kDa by SDS page and zymogram analyses were carried out. Keratinase activity was determined using keratine azure as a substrate.

The optimum pH and temperature Tr-9 keratinase were determined to be 7.5 and 37°C, respectively. The activity of keratinase was stable in the pH range 5.5-8.0 for 30 min and temperatures from 20-40°C. Tr-9 Keratinase was also tested for feather degradation and presented a result degrading chicken feathers successfully in 15 days.

The effect of some chemicals including chelating agents, inhibitors and metal ions on keratinolytic activity was studied pre incubating the enzyme in presence of substances (1mM, 5mM, 1%) for 30 min. CaCl₂ (5mM) showed a stimulatory effect on keratinase activity (148 %) on the other hand, EDTA (5mM) and SDS (1%) inhibited enzyme partially as 49 %, 49 % respectively. Complete inactivation of enzyme was obtained with PMSF (1mM and 5mM) which indicates that enzyme is a serin protease.

The results show that if Tr-9 keratinase gene is transferred to another non-pathogenic industrial microorganism it will be more functional, such as industrial and biotechnological applications requiring keratinolysis, producing feather meal.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olan danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TANIŞ'a, çalışmalarımın her aşamasında yanımda olup bana yol göstererek güven veren değerli hocam sayın Doç. Dr. Ashabil AYGAN'a ve desteğini esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU'na teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım ve sonrasında büyük bir sabırla yanımda olan Biyoteknoloji Laboratuvar ekibi arkadaşlarım Sedat KÖSTEKÇİ, Merva GÜNEŞ, Sevtap SARITÜRK, Gülay BATTALOĞLU ve Arş. Gör. Bekir Mehmet KELLEÇİ'ye teşekkürler.

Sonsuz desteği, sabrı ve güveni ve sevgisi için kıymetli annem Ümmü PARLAK'a ve babam Memili PARLAK'a, ilgisini ve manevi değerini hep üzerimde hissettiğim çok değerli ablam Cennet PARLAK DAL'a, kardeşlerim Mehmet, Ayşe, İsmail, Emine PARLAK'a sonsuz teşekkürü borç bilirim.

KAHRAMANMARAŞ 2013

Döne PARLAK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Özellikleri	2
1.2.Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması.....	5
1.3. Mikrobiyal Proteazlar	6
1.4. Keratin ve Keratinazlar	8
1.4.1.Keratin	8
1.4.2. Keratinazlar.....	9
1.4.4. Keratinaz üretim fizyolojisi ve keratinolizis.....	10
1.4.5. Keratinaz üreten mikroorganizmalar	11
1.5. Keratinolitik Funguslar	12
1.6.Dermatofitler ve <i>Trichophyton</i> sp.	14
1.6.1.Dermatofitlerin ekolojileri	16
1.6.2. <i>Trichophyton</i> sp.....	18
1.7. Keratinazların Biyoteknolojik Kullanım Alanları.....	18
1.8. Amaç	22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	23
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve tamponlar	32
3.1.1.1. Keratin-azure	32
3.1.1.2. % 15'lik KOH çözeltisi.....	32
3.1.1.3.Sabouraud dekstroz broth.....	33
3.1.1.4. Sabouraud dekstroz agar:	33

3.1.1.5. Mineral besiyeri	34
3.1.1.6. Skim-milk agar:	34
3.1.1.7. % 0.1 'lik Kazein:	34
3.1.1.8. Sitrat tamponu	35
3.1.1.9. Sodyum fosfat tamponu	35
3.1.1.10. Tris tamponu	36
3.1.2. Elektroforezde kullanılan solüsyonlar	36
3.1.2.1. Solüsyon A (Akrilamid stok solüsyonu)	36
3.1.2.2. Solüsyon B (1.5 M Tris-HCl, pH: 8.8)	36
3.1.2.3. Solüsyon C (0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8)	36
3.1.2.4. SDS % 10 (w/v)	37
3.1.2.5. Amonyum persülfat (AMPS) % 10	37
3.1.2.6. Elektroforez tamponu	37
3.1.2.7. Örnek yükleme tamponu (Sample buffer)	37
3.1.2.8. Protein marker	37
3.1.2.9. SDS page boyama (staining) solüsyonu	37
3.1.2.10. SDS page boyayı geri alma (destaining) solüsyonu	38
3.1.2.11. Gümüş boyama solüsyonları	38
3.1.2.11.1. Fiksasyon solüsyonu	38
3.1.2.11.2. Hassaslık artırıcı solüsyon	38
3.1.2.11.3. Gümüş boyama solüsyonu	38
3.1.2.11.4. Geliştirme solüsyonu	38
3.1.2.11.5. Durdurma solüsyonu	38
3.1.12. Triton X-100 (% 0.25 v/v) çözeltisi	38
3.1.3. DEAE-Sepharose kolon kromatografisi solüsyonları	39
3.1.4. Enzim inhibitörleri ve metal iyonları solüsyonları	39
3.1.5. Selofan band	39
3.1.6. Laktofenol pamuk mavisi boyası	40
3.2. METOT	41
3.2.1. <i>Trichophyton</i> sp .izolasyonu	41
3.2.1.1. Örneklerin direkt mikroskopik olarak incelenmesi	41
3.2.1.2. Örneklerin ekilmesi ve kültürü	41

3.2.1.3. Kültürde üreyen mantar kolonisinin identifikasyonu	41
3.2.1.3.1. Koloninin makroskopik incelenmesi	41
3.2.1.3.2. Selofan band ile yapılan preparasyon	41
3.2.1.3.3. Lam kültürü	42
3.2.2. <i>Trichophyton sp.</i> geliştirilmesi	42
3.2.3. Keratinaz enziminin üretilmesi	42
3.2.4. Maksimum kazeinolitik aktivite gösteren suşun seçilmesi	42
3.2.5. Keratinolitik aktivitenin belirlenmesi	43
3.2.6. Keratinaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	43
3.2.7. Sıcaklığın keratinaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	43
3.2.8. Termal stabilite	44
3.2.9. pH stabilite	44
3.2.10. Keratinaz aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi	44
3.2.11. Enzimlerin kısmi saflaştırılması	45
3.2.11.1. Enzim örneklerinin amonyum sülfat tuzu ile fraksiyonel presipitasyonu	45
3.2.11.2. Enzimlerin diyalize edilmesi	45
3.2.11.3. Diyalize edilen enzim örneklerinin aktivite kontrolünün yapılması	45
3.2.11.4. Enzim örneklerinin Sephadex G 100 kolondan geçirilmesi	45
3.2.11.5. Enzimlerin DEAE-sepharose kolondan geçirilmesi	46
3.2.12. SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması	46
3.2.13. Enzim örneklerinin jelle yüklenmesi ve yürütülmesi	47
3.2.14. SDS-PAGE jelinin boyanması	47
3.2.15. Gümüş boyama	48
3.2.16. Zimogram analizi	48
3.2.17. Enzimin Tüylü parçalama yeteneğinin araştırılması	48
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	49
4.1. <i>Trichophyton</i> Suşlarının Geliştirilmesi	49
4.2. Enzim Üretilmesi ve Maksimum Enzim Üreten Suşun Seçilmesi	50
4.3. Tr-9 Keratinaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	52
4.3.1. Tr-9 Keratinaz enziminin optimum pH aralığı	52
4.3.2. Tr-9 Keratinaz enziminin optimum sıcaklık aktivitesi	54
4.3.3. Tr-9 Keratinaz enziminin termal stabilitesi	57

4.3.4. Tr-9 Keratinaz enziminin pH stabilitesi.....	58
4.3.5. Tr9 Keratinaz enzim aktivitesine metal iyonları, inhibitör, deterjanlar ve şelatörlerin Etkisi	60
4.4.Tr -9 Keratinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	64
4.4.1.Enzim örneklerinin amonyum sülfat tuzu ile fraksiyonel presipitasyonu	64
4.4.2.Enzim örneklerinin diyaliz edilmesi.....	64
4.4.3. Diyaliz edilen enzim örneklerinin aktivite kontrolünün yapılması	65
4.4.4. Petride Aktivite Gösteren Enzimlerin Sephadeks G-100 Kromatografisinden Geçirilmesi	65
4.4.5. Enzimin DEAE- SEPHAROSE kolondan geçirilmesi ve aktivite kontrolü ...	66
4.4.6. Amonyum sülfat Presipitasyonu, Sephadeks G-100 kolon kromatografisi ve DEAE sepharose kolonu aşamalarından geçen enzimin SDS page analizi	66
4.4.7. DEAE-SEPHAROSE kolondan geçen ve aktivite görülen Tr-9 keratinaz enziminin zimogram analizi	67
4.8.Tr-9 Keratinaz Enziminin Tüv Parçalama Yeteneğinin Saptanması	70
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1.Gelişen <i>Trichophyton</i> sp. suşlarının inkübatördeki görüntüsü	49
Şekil 4.2.Mineral besiyerinde keratinaz enzimi üretimi	50
Şekil 4.3.Tr-9 suşundan izole edilen süpernatantın skim milk agardaki kazeinolitik etkisi	51
Şekil 4.4.Tr-9 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerine ait sonuçlar	52
Şekil.4.5.Tr-9 Keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine ait sonuçlar	54
Şekil 4.6.Tr-9 Keratinaz enzimine ait termal stabilite bulguları	57
Şekil 4.7.Tr-9 Keratinaz enziminin pH stabilite bulguları.....	58
Şekil 4.8.Tr-9 Keratinaz enzimi üzerine metal iyonları ,inhibitör,deterjanlar ve şelatörlerin etkisi	60
Şekil 4.9.Maksimum aktivite gösteren % 40 'lık diyaliz örneklerinin skim-milk agardaki görüntüsü.....	65
Şekil 4.10.0.5M'lık fraksiyonun skim-milk agardaki görüntüsü.....	66
Şekil 4.11.Tr-9 Keratinaz enziminin gümüş ve boyama zimogram görüntüsü.	67
Şekil 4.12.Tr-9 Keratinaz enzimi ile muamele edilen ve farklı periyotlarda inkübasyona bırakılan tavuk tüylerinin görüntüsü.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1.% 15'lik KOH İçeriği	32
Çizelge 3.2.Sabouraud dekstroz broth içeriği.....	33
Çizelge 3.3.Sabouraud dekstroz agar İçeriği.....	33
Çizelge 3.4. Mineral besiyeri içeriği.....	34
Çizelge 3.5. Skim-milk agar içeriği	34
Çizelge 3.6. Sitrik asit tampon çözeltilerinin bileşimi	35
Çizelge 3.7.Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin bileşimi	35
Çizelge 3.6. Tris tampon çözeltilerinin bileşimi.....	36
Çizelge.3.9.Kullanılan metal iyonları, inhibitörler, deterjanlar, şelatörler ve konsantrasyonları	39
Çizelge 3.10. Laktofenol pamuk mavisi boyası içeriği.....	40
Çizelge 3.10. Ayırıcı jelin bileşimi (BIORAD).....	46
Çizelge 3.11. Dengeleyici jelin bileşimi(BIORAD)	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPS	: Amonyum persülfat
dH₂O	: Distile su
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
g	: Gravity
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilodalton
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum di hidrojen fosfat
K₂HPO₄	: Di potasyum hidrojen fosfat
L	: Litre
M	: Molar
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum sülfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Di sodyum hidrojen fosfat
NaH₂PO₄	: Sodyum di hidrojen fosfat
Na₂SO₃	: Sodyum sülfat
NCBI	: National Center for Biotechnology Institute
µl	: Mikrolitre
PMSF	: PhenylmethanesulfonylFlouride
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
SDB	: Sabouraud dekstroz broth
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-page	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
sp.	: Tür
RPM	: Dakikada devir sayısı
TBE	: Tris –Borik asit- EDTA

TEMED : N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
U : Enzim ünitesi
 α : Alfa
 β : Beta

1.GİRİŞ

Enzimler, biyokimyasal olayların yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan katalizörlerdir. Diğer bir tanımla canlı organizmalar tarafından üretilen özelleşmiş katalitik fonksiyonlara sahip olan protein molekülleridir. Enzimler, yaşamın devamlılığı açısından hayati önem taşımaktadır. İnsanlar bu denli önemli olan enzimleri ne olduklarını ve nasıl çalıştıklarını bilmeden uzun yıllar kullanmışlardır. Bu şekilde enzimler kullanım alanlarını her geçen gün daha da arttırarak çeşitli amaçlarla günlük ve ekonomik hayata girmiştir, ekme ve bira yapımının yanısıra alkol fermantasyonu gibi önemli olaylar enzimlerin kullanım alanlarına örnek olarak gösterilebilir (Wiseman, 1987).

Enzim terimi ilk defa Kühne tarafından 1878 yılında ortaya atılmıştır (Aehle, 2007). Bu tarihten sonra bilim enzimlerin gizemini çözmüş ve elde edilen bu bilgilerle enzimler her geçen gün daha da büyüyen bir ivmeyle ihtiyaç duyulan alanlarda uygulama alanı bulmuştur.

Enzimler çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Bunlar bitkisel, hayvansal ve endüstriyel anlamda kullanılma potansiyeli çok yüksek olan mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Gupta ve ark., 2003). Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanda çok tercih edilmelerinin sebepleri ise; istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, katalitik aktivitelerinin hayli yüksek olması, oldukça stabil ve ucuz olmaları, yüksek oranda ve saflıkta elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin birçoğu hücre içinde aktif iken bazıları hücre dışına salgılanıp hücre dışında da aktif olabilir böyle enzimlere ekstraselüler enzimler denir. Ekstraselüler enzimler, mikroorganizmaların ihtiyacı olan besin kaynaklarını hidrolizleyerek kullanabilmelerini sağlayabilir. Bu enzimler Hidrolazlar olarak da bilinir. Biyoteknolojik alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık % 75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Kullanım sırası göz önüne alındığında proteaz grubu ilk sıradayken, karbonhidratları parçalayan enzimler ikinci sırada bulunmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlardır (Harwood, 1992; Bhat, 2000).

Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar USD dolayında olup, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve % 4-5 oranında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından biridir.

Endüstriyel enzim üretiminin % 75'i gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri içinde yer almaktadır (Cowan, 1996). Endüstriyel enzimler için; %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimler şeklinde bir dağılım belirlenmiştir (Rao ve ark., 1998). Enzimler başta gıda sanayisi olmak üzere deterjan endüstrisinde, kağıt üretiminde, deri işlenmesinde, tekstil endüstri gibi diğer endüstriyel alanlarda da kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Daniels, 1992; Kirk ve ark., 2002).

1.1. Enzimlerin Özellikleri

Enzimlerin etki ettiği maddeye substrat denir ve adlandırılmaları etki ettikleri maddelerin sonuna az (ase) eki getirilerek yapılır. Enzim genelde substrattan çok daha büyüktür. Enzim ile substrat birlikteliği, hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlara ihtiyaç duymaktadır, enzim üzerinde substratın bağlandığı kısım enzimin aktif bölgesi olarak isimlendirilir.

Enzimlerin de bütün proteinler gibi monomerleri aminoasitlerdir. Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran en önemli özelliği biyokimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğidir. Bu yeteneği sayesinde pek çok çalışma alanlarında ilgi uyandırmaktadır. Aktivasyon enerjisi, kimyasal tepkimedeki tüm molekülleri reaktif duruma getirmek için gerekli olan enerjidir. Aktivasyon enerjisi kavramı ise kataliz ve enzim kavramlarını akla getirmektedir, Reaksiyonlar, enzimler varlığında daha hızlı katalizlenir ve dengeye ulaşır (Aehle, 2004)

Katalizörler tepkimelerin gerçekleşmesini kolaylaştırır, fakat tepkime sırasında tükenmez ve değişikliğe uğramazlar. Katalizörlerin bir başka özelliği, tepkimelerin enerji eşiğini ya da denge durumunu etkilemeksizin ilerleme hızını etkilemeleridir. Canlı organizmalardaki tepkimelerin birçoğu katalizör olmadan gerçekleşemez (Aehle, 2004).

Enzimler, uygun oranlarda yüksek spesifite ile kimyasal reaksiyonları katalizler. Bu reaksiyonlar bütün canlı organizmaların metabolizmalarının temelidir. Enzimlerin endüstrileri verimli, mükemmel ve ekonomik biyokatalitik dönüşümleri gerçekleştirmek için muazzam fırsatlar sağlamaktadırlar (Pandey ve ark., 2008).

Enzim molekülü reaksiyonu katalizleyebilmek için substrat ile bir kompleks oluşturmasıyla, enzimin aktif merkezleri ve molekülün nüfuz eden bölgeleri karşı karşıya

gelmektedir. Böylece enzim substrata doğru ilerler ve her iki molekülün bir arada tutulmasına izin verir. Sonuç olarak bir enzim–substrat kompleksi oluşumu anahtar-kilit mekanizması ile başlamış olur. Reaksiyon, oluşan enzim-substrat kompleksindeki aktivasyon enerjisini düşürüp, reaksiyon hızının artmasıyla devam eder. Son olarak kompleks, reaksiyon ürünlerinin açığa çıkmasıyla parçalanır.

Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani reaksiyon geri dönüşümlüdür (Nelson ve Cox, 2004; Açikel ve ark., 2006). Orijinal enzim tekrar kullanıma elverişlidir. Bu kullanım, enzim kimyasal bir maddeyle veya çok uç bir pH ya da sıcaklık ile aktivitesini kaybedene kadar devam eder.

Bütün enzimlerin aktivitelerinin maksimum olduğu bir pH değeri vardır bu değere optimum pH denir. Bu değer üstünde ve altında enzim aktivitesi düşer. Bunun yanı sıra her enzimin pH aktivite eğrisi de aynı şekilde değildir (Bhat, 2000).

Enzimlerin yapısı sıcaklık ve pH'ya duyarlıdır bunun nedeni ise enzimlerin globüler yapıda bulunup, molekül içi veya moleküller arası bağlar ile sekonder veya tersiyer yapıda tutulmasıdır.

Katalitik aktiviteyi etkileyen diğer koşullar standart hale getirildiği zaman, ortamdaki sıcaklık yükseldikçe reaksiyonun hızı da belirli bir değere kadar artmaya devam eder enzimin katalitik düzeyinin en iyi olduğu sıcaklık değerine ise optimum sıcaklık denir. Bu değerden daha yüksek sıcaklıklarda molekül içi veya arası bağların kopmasıyla enzimlerin yapısı bozulur yani enzim denatürasyona uğrar. Denatürasyon dolayısıyla reaksiyon hızında düşüş meydana gelir. Bu değer dışında çok yüksek sıcaklıklarda enzimin protein yapısı bozulmalara uğrayacağından enzim aktivitesi de inhibe olur (Bhat, 2000).

Bazı maddeler de enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzimin yapısını bozup enzim aktivitesini düşürmekte ya da durdurabilmektedir. Bu tür maddelere ise **inhibitör** adı verilmektedir (Aehle, 2004).

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşmasına karşılık çoğu enzim yapı ve görev bakımından iki farklı gruptan oluşmaktadır. Bunlar; Apoenzim ve Koenzim / Kofaktör'dür. Apoenzim; enzimin yalnız belirli reaksiyonları katalizlemesini sağlayan yani enzimin spesifikliğini belirleyen kısmıdır. Bu grup protein yapısında olduğu için ısı ile kolayca denatüre olabilmektedir. Bazı enzimler aktivite için, protein yapısını oluşturan aminoasit rezidülerinden başka kimyasal komponente ihtiyaç duymazlar.

Bazı enzimler ise kofaktör diye adlandırılan bir ek kimyasal komponente ihtiyaç duyar. Kofaktör, ya Zn^{+2} Mn^{+2} Fe^{+2} , Mg^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim diye adlandırılan organik veya metalloorganik kompleks bir moleküldür.

Koenzim, organik ve inorganik maddelerden meydana gelmiş enzimin yardımcı ve etkin biçimi olup apoenzim varlığında etkinlik göstermektedir. Apoenzim gibi koenzim de tek başına etkin değildir en önemli yardımcı enzim grubunu vitaminler oluşturmaktadır.

Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayan grubuna ise prostetik grup denilmektedir. Koenzim (Prostetik grup) ve apoenzim birlikteliğine Holoenzim (aktif enzim) denir (Pandey ve Ramachandran, 2006).

Biyoteknolojinin gelişmesiyle enzimlerin gıda sektöründe bilinçli kullanımları hızla artmıştır. Gıda sektöründe enzim teknolojisi üç aşamadan geçtikten sonra kullanılmaktadır. Bunlar; enzimlerin üretimi, saflaştırılması, immobilizasyonu ve endüstriyel olarak Kullanılmasıdır (Murray ve ark., 2000). Enzimlerin saflaştırılmasının özellikle endüstriyel uygulamalar için önemli olmakla beraber amacı sadece proteini yalın halde elde etmek değildir daha sonra yapılacak uygulamalar için kullanıma hazır hale getirilmiş enzim kaynağı eldesidir. Elde edilen bu enzimle yapılabilecek çalışmalar ise enzim aktivitesinin saptanabilmesi ve bu enzimin biyoteknolojik alanlarda kullanılabilirliğinin sağlanması, enzim yapısının belirlenebilmesi, yapı fonksiyon ilişkisinin anlaşılabilmesi ve bunların yanında terapötik rollerinin belirlenmesi olabilir.

Bilimsel çalışmalar için çok düşük miktarlarda saf enzim yeterli olabilirken endüstriyel uygulamalar için çok daha fazla enzim üretimi gerekli olmaktadır. Eğer amaç protein aktivitesinin saptanması ise muhakkak aktif formda üretilmiş olmalıdır bu proses için az miktarda protein kafiyken amaç elde edilen proteinin aktivitesinden yararlanmaksa çok daha fazla miktarda protein gereklidir. Saflaştırmada işlemleri sırasında uygulanacak her basamak her seferinde zaman alacağı için aktivitede düşüşe yol açıp verimde düşüş meydana getirecektir bu durum ise maliyeti artıracaktır (Telefoncu, 1997).Yapı araştırma çalışmalarında ise oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir, fakat yapı fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimuma indirmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir (Telefoncu, 1997). Proteinin kullanım amacına bağlı olarak istenen saflık düzeyi de değişir. Terapötik amaçla kullanılacak protein

preparatının çok saf olması gereklidir. İşlemden nükleik asit kalıntıları ve diğer katkı maddelerinin muhakkak uzaklaştırılması gerekmektedir.

Maksimum saflığa yakalayabilmek için uygulanan saflaştırma basamakları protein verimini düşürmekle beraber maliyeti de arttırmaktadır. Çalışma bilimsel araştırma niteliği taşıyorsa saflaştırma adımları sayısı önemli olmayabilir fakat çalışma ticari boyut taşıyorsa en ekonomik şartlar uygulanarak çalışılmalıdır. Saflaştırılan protein enzim ise ve sadece enzimatik aktiviteden faydalanmak amaçlanıyorsa toplam protein oranının % 80-90 arasında olması yeterlidir. Yapı araştırmalarında kullanılacak proteinlerin saflık düzeyi en az % 95 saf protein içerecek oranda olmalıdır (Telefoncu, 1997).

Saflaştırma basamaklarında zamanın artmasıyla beraber verim azalmakta fakat saflık derecesi artmaktadır bu sebeple mümkün olduğu kadar az saflaştırma basamağı ile elverişli olan saflıkta enzim elde edilebilmelidir. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir (Telefoncu, 1996).

Endüstriyel kullanımlar için geliştirilmiş bir uygulama da immobilize enzim uygulamalarıdır, bu uygulamada enzimler bir destek materyaline bağlanır ve operasyonel kararlılığına bağlı olarak defalarca kullanılabilir. Destek materyaline bağlanmasındaki amaç aynı enzimden tekrar tekrar yararlanabilmek ve kullanılan enzim miktarını azaltarak maliyetide düşürmektedir, eğer enzim bir destek materyaline bağlanmazsa her bir işlem sonucunda enzim ürünle beraber alındığından enzim tekrar kullanılamamaktadır (Soetan, 2008)

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması

1961 Yılında Enzim komisyonunun hazırladığı rapora göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılır ve her bir sınıfta bulunan enzime 4 rakamdan oluşan bir enzim kod numarası (EC no) verilir (Aehle, 2007). Bu sisteme göre ilk rakamın ifade ettiği 6 sınıf ise;

1. Oksidoredüktazlar,
- 2) Transferazlar,
- 3) Hidrolazlar,
- 4) Liyazlar,
- 5) İzomerazlar,
- 6)Ligazlar,

Örneğin EC numarası 3.4.21.36 olan enzimin tanımlanması yapılacak olursa; İlk rakam tepkimenin sınıfını ya da 6 gruptan hangisine ait olduğunu bildirir (3: Hidrolaz).

İkinci rakam enzimin alt sınıfını (subclass) ifade eder (4: Peptidazlar).

Üçüncü rakam ikinci alt sınıfı (Sub-Subclass) ifade eder (21:Serin proteazlar (endopeptidazlar)).

Dördüncü rakam ise enzimin Sub-Subclass içerisindeki seri numarasını ifade eder. (36: Elastaz).

1.3. Mikrobiyal Proteazlar

Proteazlar (E.C. 3.4.21-24 ve 99) doğada hemen hemen her alanda bulunabilen yaygın enzimlerdir. Bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilirler. Piyasada kullanılan proteazlar mikrobiyal kökenlidir bunun nedeni ise yüksek verimlilik, istediğimiz sınırlı kültür ortamı gerektirmesi, geniş biyokimyasal çeşitlilik sunması, kolay genetik manipulasyona imkan tanınmasıdır. Bu özellikleri proteazları biyoteknolojik uygulamalar için uygun kılmaktadır (Rao ve ark., 1998). Özellikle polipeptid zincirinde 2 aminoasit arasında bulunan peptid bağına parçalayabilme yeteneklerinden dolayı proteoliz olayı ile dikkat çekmektedir.

Proteazlar 4 ana grupta incelenir bunlar; **serin proteazlar, metalloproteazlar, aspartat ve sistein proteazlardır**. Mikrobiyal proteazlar genellikle serin veya metallo proteazlardır. Peptidil –peptid hidrolazlar olarak da bilinen endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından olan proteazlar aktif pH aralıklarına göre ise asidik, nötral ve alkalın proteazlar olmak üzere 3'e ayrılır. Endüstriyel alanda en çok kullanılan ve tercih edileni ise alkalın proteazlardır. Mikrobiyal proteazlar çok farklı proseslerde kullanılır. Bunlardan bazıları deterjan, deri, kozmetik, yiyecek, ipek endüstrisi, x-ray filmlerde kullanılan gümüşün geri dönüşümü gibi proseslerdir (Raninger ve ark., 2003).

Mikrobiyal proteazlar enzim sanayinde oldukça yaygındır, özellikle deterjan sektörünün 2/3'ünde kullanılmaktadır (Anwar ve ark., 2000). 1913 yılından itibaren pepsin deterjan içeriğinde kullanılmaktaydı fakat son dönemlerde deterjan içeriklerinde alkalın serin proteazların kullanımı önemli bir artış yakalamıştır. Bu artışın nedeni ise alkaline serin proteazların 50 -60 C° gibi sıcaklıklarda hem aktif hem de stabil olmaları, yüksek pH

ve oksitleyici ajanlara karşı dirençli olmaları ve surfaktanlarla olan uyumlarıdır (Haki ve ark., 2003).

Proteolitik enzimler, protein substratlarının hidrolizini içeren biyoteknolojik uygulamalar için endüstride yaygın kullanılır. Proteazlar, global enzim satışlarının önemli bir bölümünü oluşturur. Pazarındaki proteazların önemli bir bölümü ise mikrobiyal keratinazlardır (Rao ve ark., 1998).

Proteazlar deterjan ve süt ürünlerindeki geniş kullanımlarından dolayı enzim çeşitleri arasında daha yaygındır. Deterjan, nişasta, tekstil ve fuel-oil endüstrilerini kapsayan alanlar, endüstriyel enzimlerin en fazla kullanıldığı alanlardır.

Genel olarak endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki kullanımı 1995'te yaklaşık bir milyar dolarken 2000'de 1.5 milyar dolara çıkmıştır son zamanlarda 5 milyon dolaylarında seyrederken 2013'de 6.3 milyar dolar olması beklenmektedir. Proteazlar endüstriyel enzim piyasasının önemli bir bölümünü oluşturduğundan duyulan talebin dahada artması beklenmektedir (Singhal ve ark., 2012). Bu büyüme öncelikle deterjan endüstrisinde olmak üzere teknik endüstrilerde yavaşlamakla birlikte son on yıl içinde en hızlı büyüme fırıncılık ve hayvan yemi endüstrisinde görülmektedir bunların yanı sıra kâğıt hamur ve kişisel bakımı kapsayan diğer endüstrilerin zenginliği asıl büyümeyi oluşturmaktadır (Kirk ve ark., 2002).

Deterjan endüstrisinin ardından mikrobiyal alkalın proteazların diğer bir önemli alanı ise deri endüstrisidir. Deri yünleri keratinazla uzaklaştırılır (dehairing) ayrıca yiyecek, kimya ve tekstil endüstrisinde de oldukça etkili kullanım alanına sahiptir. Bu sektörlerdeki alkalın proteazlar kimyasal olarak serin veya metalloproteazlardır, sistin proteazlar, serin ve aspartik proteazlar kadar yaygın değildir.

Serin proteazlar daha çok *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından üretilir. Proteazlar ayrıca *Thermus caldophilus*, *Desulfurococcus mucosus*, *Streptomyces*, *Aeromonas* ve *Escherichia* suşları tarafından da üretilir (Barredo, 2005). Fungi, özellikle de *Aspergillus oryzae*'nin çeşitli suşları da önemli proteaz üreticisidir..

Mikrobiyal proteazlar, geniş bir şekilde keratinolitik funguslarda ve dermatofitlerde de birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Kunert, 1989; Singh, 1999).

1.4. Keratin ve Keratinazlar

1.4.1. Keratin

Keratin, doğada bulunan en önemli yapısal proteinlerden biridir ve yaygın olarak omurgalıların dış yüzeylerinde bulunur. Kollajenden sonra hayvanlarda karşılaşılan en önemli biyopolimerdir.

Keratinize materyaller fonksiyonlarına bağlı olarak değişik morfolojiler gösterir. Basit su geçirmez bir tabaka formunda olabileceği gibi (kaplumbağa kabuğu) çok dayanıklı bir yapıda da olabilir (boynuz). Benzerlik ve farklılıkları kollajenle oluşturduğu kompleksten kaynaklanır.

Keratin üreten hücrelerin en önemli özelliklerinden birisi keratin üretiminden hemen sonra hücrelerin ölmesi ve damarlı yapının bulunmamasıdır. Bu nedenle bu ölü hücreler üst üste yığılıp yoğun bir tabaka oluşturur (Mckittrick ve ark., 2012).

Keratin formları epidermin önemli komponentlerindendir, uzantıları ise saç, tırnak, boynuz, tüy, gaga, toynak, pul ve ok (kirpi) gibi yapıları oluşturur.

Sekonder konformasyon yapısının temeline göre ise keratin α ve β keratin olmak üzere 2'ye ayrılır. Keratini oluşturan temel yapı olan polipeptid zinciri ya kıvrılıp α keratini oluşturur (saç ve yünde α heliks yapı) ya da köşe köşeye bağlanıp pilili levhalar şeklinde β keratini oluşturur (tüydeki β katlanmaları) (Voet ve Voet, 2008).

İnsanda saç ve tırnakta olmak üzere yaklaşık 30 tane α keratin çeşidi vardır (Parry ve ark., 1998). Keratin fibrillerinin her 2 yapısında da fibriller mikro ve makro fibrilleri oluşturmak için paralel bir şekilde bükülerek stabiliteyi garantilemişlerdir (Kreplak ve ark., 2004).

Keratin büyük çapta tiyol grupları (-SH) içeren sistein residülerine sahiptir bu kovalent disülfid bağları hem polipeptid zinciri ile hem de matriks molekülleri ile çapraz bağ oluşturur. Bu durum ise sert yapı kazanmayı sağlar (Mckittrickve ark., 2012).

Keratinler, yapısındaki sülfür içeriğine göre ise sert ve yumuşak keratinler olarak gruplandırılabilir. Yumuşak keratinler cilt ve nasırda bulunup daha az disülfid bağı içerir ve daha esnektir, yumuşak keratinlerin aksine sert keratinler ise saç, tüy, boynuz ve tırnak gibi uzantıları oluştur ve yüksek oranda disülfid bağı içerir (Voet ve Voet, 2008).

α Keratinlerin molekül ağırlıkları 40-70 kDa arasında değişkenlik gösterir, çevresel sorunlara neden olan keratin formu α keratindir. Sürüngeçlerin ve kuşların derisinde bulunan β keratinlerin boyutları genellikle alfa keratinlerden küçüktür 10 kDa ile 20 kDa

arasında çeşitlilik gösterir. β keratin molekülleri, β katlanmaları bakımından zengindir, bu nedenle daha stabil ve hidrolize daha dirençlidirler (Kublanov ve ark., 2009).

Keratince zengin atıkların bozulmaları zordur çünkü polipeptidler yoğun bir şekilde paketlenmiş olan çok güçlü hidrojen bağlarının varlığıyla daha stabil olmuştur. Yanı sıra hidrofobik etkileşimler, protein zincirlerinin çarpaz bağlanmaları ve birçok disülfid bağı içermeleri nedeniyle oluşan yüksek mekanik stabilite keratinlerin yaygın birçok proteazca parçalanmalarına direnç sağlar (Kreplak ve ark., 2004). Keratinin bu yapısı pepsin, tripsin papain gibi proteolitik enzimler tarafından degrade edilmelerini önlemektedir (Papadopulos, 1986). Dirençlerine rağmen keratinler çok sayıda bakteri, fungus ve aktinomiset tarafından salgılanan keratinolitik protezlar tarafından etkili bir şekilde parçalanabilir (Onifade ve ark., 1998). Keratinler, insan ve diğer yüksek yapılı omurgalılar tarafından sindirilemez insanlar bu proteini alsalar dahi sindirilmeden vücutta bir yumru şeklinde birikir (Sharma ve Rajak., 2003).

Tüyler keratin formu halinde oldukça yüksek oranda ham keratin içerir. Bunlar çeşitli fiziksel ve kimyasal uygulamaların ardından hayvanlar için oldukça faydalı bir besin kaynağı olan tüy yemlerine (feather meal) dönüştürülmektedir. Biyolojik yöntemlerle yapılan tüy yıkımı ekolojik problemlere getirdiği çözümlerden dolayı oldukça ilgi çekici bir konum almıştır.

1.4.2. Keratinazlar

Keratinazlar (E.C.3.4.21/24/99.11) oldukça sert yapıda olan keratini parçalama yeteneğine sahip proteazların hidrolazlar sınıfında bulunan oldukça değerli enzimlerdir. Bu enzimlerin önemleri çözünmeyen keratinöz substratları parçalama yetenekleridir (Brandelli, 2008).

Mikrobiyal keratinazlar onları üreten mikroorganizmalara bakılmaksızın çoğunlukla proteazların serin veya metalloproteaz sınıfına aittir. Serin protezlar keratin rezidülerini degrade ettiklerinden diğer protezlar arasında öne çıkmıştır. Serin proteazların dizi homolojileri subtilisin ailesinin üyeleri ile benzer sekanslar taşımaktadır ve yapısal olarak benzerlikler göstermektedir. Keratinazlar genellikle monomerik yapıda enzimlerdir fakat multimerik yapıda olan keratinazlarda saptanmıştır (Xie ve ark., 2010).

Mikrobiyal keratinazlar genellikle alkalın ve nötr proteazlardır ve optimum pH aralıkları 7.5 – 9.0 arasında değişkenlik gösterir fakat bu aralığın dışında yer alan

enzimlerde vardır. Extrem alkalofilik pH aralığında aktif olanların yanı sıra nadiren asidik pH 'da aktif keratinazlar da vardır (Tsuboi ve ark., 1989; Takami ve ark., 1999).

Keratinaz üretim sıcaklığı 28-50°C arasında değişkenlik göstermektedir öyle ki bu sıcaklık *Thermoanaerobacter* ve *Fervidobacterium ssp.*'de 70°C'ye kadar çıkabilmektedir (Friedrich ve Antranikian, 1996).

1.4.4. Keratinaz Üretim Fizyolojisi ve Keratinolizis

Mikrobiyal keratinazlar, keratin yüzeylerde büyüdüklerinden çoğunlukla ekstraselülerdir (Friedrich ve Antranikian, 1996), fakat intraselüler olanları da bildirilmiştir (El-Naghy ve ark., 1998). İntraselüler fraksiyonlar esasen disülfid redüktazlarla sağlanırken ekstraselüler keratinazlar ise sülfid ve tiyosülfat redüktazların desteği ile disülfid bağlarını indirgeyerek keratinini parçalar.

Başka bir ifadeyle keratinoliziste 2 adım vardır bunlar disülfid bağlarının indirgenmesi yani sülfitolizis bir diğeri ise proteolizisdir. Sülfitolizisin canlı hücreler gerektirdiği yönünde iddialar ortaya konulmuştur (Ramnani ve ark., 2005).

Sodyum sülfid, DTT, merkaptoethanol, glutatyon, sistein ve tiyoglikolat gibi redüktantlar veya disülfid redüktazlar keratinin degradasyonu sırasında keratinolitik proteazlarla işbirliği içerisinde fakat bu olayların sırası ve niteliği hala tartışmalıdır (Onifade ve ark., 1998; Yamamura ve ark., 2002; Ramnani ve ark., 2005). Keratinolizisin mikrobiyal mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır fakat disülfid bağlarının indirgenmesinin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Bockle ve Muller, 1997; Ramnani ve Gupta, 2007).

Çoğu keratinaz üreten mikroorganizma keratinaz üretimini büyük bir ölçüde bazal bir ortam içerisinde gerçekleştirir. Karbon ve azot kaynağı olarak ise keratini kullanmaktadır (Williams ve ark., 1990; El-Naghy ve ark., 1998; Szabo ve ark., 2000; Gousterova ve ark., 2005). Keratinöz substratlar dışında jelatin, kazein, soya unu, soya fasulyesi yemi gibi keratinöz olmayan substratların varlığında keratinaz üretimini indüklemektedir (Brandelli ve ark., 2010)

Keratinazlarla ilgili raporların çoğu onların indüklenebilen enzimler olduğunu gösterebilir birkaç indüklenemeyen keratinaz tanımlanmıştır (Gessesse ve ark., 2003; Manczinger ve ark., 2003). İndüklenmeyen keratinazların yapısının keratinolitik özelliklerinden ziyade kazeinolitik özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuç

olarak keratinolitik aktivitenin çoğunlukla indüklenebilir olduğu anlaşılmaktadır. İndükleyicilerin yanı sıra keratinaz üretimi bazı maddelerin ortamda varlığı ile baskılanabilir. Glukoz gibi basit şekerlerin katabolit baskısından dolayı keratinaz üretimini baskıladığı bildirilmiştir. Özellikle mikrobiyal keratinazlar glukoz varlığında baskılanmaktadır (Thys ve ark, 2004).

Çoğu mikroorganizma alkali olan ve tiyol grupları içeren bir kültür ortamında keratinoliziste artış gösterir, tiyol gruplarının bırakılmasının sebebi ise geniş ölçüde kimyasal (sülfid veya tiyosülfat) ve enzimatik (disülfid redüktaz) mekanizmalarla disülfid bağlarının indirgenmesidir (Dozie ve ark., 1994; Cheng ve ark., 1995; Friedrich ve ark., 1999; Ignatova ve ark.,1999;Gradisar ve ark., 2000; De Toni ve ark.,2002; Riffel ve ark., 2003).

Alkali pH' nın çoğu mikroorganizmada keratinaz üretimini ve tüy degradasyonunu arttırdığı bildirilmiştir alkali pH muhtemelen keratin degradasyonunu desteklemektedir çünkü yüksek pH değeri ile pepsin sindirilebilirliği artmakla beraber sistin residülerinin lantionine dönüşümü de artmaktadır (Friedrich and Antranikian, 1996).

Çeşitli mikroorganizmaların keratinolitik aktivitelerini karşılaştırmak bir hayli güçtür çünkü herbirinin ihtiyaç duyduğu substratlar ve kullanılan keratinaz ünitelerinin tanımı farklıdır. Keratinaz üretimi için fiziksel parametreler göz önüne alındığında türe spesifiktir ve organizmadan organizmaya değişkenlik gösterir (Riffel ve ark., 2003).

1.4.5. Keratinaz Üreten Mikroorganizmalar

Keratinazlar mikrobiyal dünyada çok yaygındır. Ökaryotlar, bakteriler ve arkealardan elde edilirler. Bu mikroorganizmalar çok farklı bölgelerden izole edilir. Antartika toprakları gibi çok soğuk bölgelerden kaplıcalara kadar değişen farklı bölgelere kadar olabileceği gibi aerobik ve anaerobik ortamlarda da bulunabilirler. Bu nedenle, mikrobiyal keratinazların biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri büyük bir çeşitlilik sunmaktadır.

Keratinaz üreten mikroorganizmalar tüyleri parçalama yeteneklerine göre tanımlanmış ve bu organizmalar üzerinde yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır (Suntornsuk ve Suntornsuk, 2003).

Tüylerin yapısal keratinleri bazı mikroorganizmalar tarafından parçalanabilir olduğundan doğada birikmezler. Birçok araştırmacı bu proteolitik mikroorganizmalar

üzerine odaklanmıştır (Riffel ve ark., 2003). Dermatofitik fungusların keratinolitik potansiyelleri dikkat çekmektedir özellikle *Trichophyton* ve *Mikrosporium* gibi genusları bu proteolitik etkileri nedeniyle ilgi uyandırmaktadır (Asahi ve ark., 1985; Qin ve ark., 1992; Marchisio, 2000; Moallaei ve ark., 2006).

Dermatofitik funguslar başlıca tıbbi ve veterinerlik etkileri nedeniyle ilgi çekmektedirler (Anbu ve ark., 2008). Nondermatofitik funguslar arasından *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Doratomyces*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *skopulariopsis*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Curvularia*, ve *Penicillium* bulunmaktadır (Gradisar ve ark., 2005).

Bu funguslar tarafından üretilen keratinazların biyokimyasal özellikleri bakımından ilgi çekici olduğu bildirilmiştir (Marcondes ve ark., 2008).

Birçok keratinaz çok farklı bakteri gruplarından izole edilmiştir *Bacillus* spp. önemli bir keratinaz üreticisi olarak görülmektedir. Çeşitli *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* suşlarında keratinolitik aktivite görülmektedir (Suh ve Lee 2001; Manczinger ve ark., 2003; Balaji ve ark., 2008; Cai ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009).

Streptomyces cinsinden gelen aktinomisetler de keratinaz üreticileri arasında sayılmıştır ve bunlar çok farklı toprak bölgelerinden izole edilen mikroorganizmalardır ve geniş bir aralıktaki saç, tüy, yün gibi keratinöz substratı hidroliz edebilir (Gousterova ve ark., 2005).

1.5. Keratinolitik Funguslar

Doğal ortamlarında, keratinolitik funguslar, ekolojik probleme neden olan karbon, nitrojen ve sülfürün α keratinden geri dönüşümünü sağlarlar dolayısıyla bu funguslar keratin atıkların uzaklaştırılmasını sağlar (Moore, 1996). Keratinolitik fungusların varlığı ve dağılımı keratinin ortamda bulunup bulunmamasına bağlıdır. Özellikle insan ve hayvan popülasyonlarının yoğun oldukları bölgelerde keratinolitik fungus miktarı daha fazladır ve varlıkları için bu durum için seçici baskı oluşturur çünkü bu popülasyonların yoğun olduğu bölgelerde keratin ve keratin içerikli atıklar bolca bulunur. Diğer çevresel faktörler keratinolitik funguslar üzerinde çok etkili değildir çünkü funguslar diğer faktörlere karşı geniş tolerans gösterir (Böhme ve ark., 1969).

Fungusların keratini degrade etme yetenekleri biyokimyasal ve morfolojik açıdan araştırılmış olup araştırmalarda öncelikle keratinolizisin biyokimyasal mekanizması irdelenmiştir. İlk ele alınan konu ise salgılanan enzimin karakterize edilmesi olmuştur.

Çünkü bu enzimlerin patojen funguslarda olduğu gibi virulans belirleyici olarak önemli olabileceği düşünülmektedir. Bu durum tespit edildikten sonra ikinci aşamada biyoteknolojik açıdan kullanılıp kullanılmayacağına karar verilir, çünkü uygulama alanları arasında hayvan yiyecekleri, gübre üretimi, yapıştırıcılar, tavuk çiftliklerindeki atıklardan nadir aminoasitlerin üretimi vardır (Bockle ve ark., 1995; Friedrich, 1996).

Keratinolizis olayını görülebilir hale getiren çalışmalar morfolojik çalışmalar olmuştur. İlk yapılan çalışmalarda ışık mikroskobu kullanılmıştır ve dermatofitlerin saç enfeksiyonu sırasında hifalarında meydana gelen değişimleri ayrıntılı bir biçimde ele alınmıştır. Morfolojik çalışmalar dermatofitik keratinolitik fungusların mekanizmasını aydınlatmıştır. Diğer keratinolitik funguslar ise kendi substratları kullanılarak aynı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Vanbreuseghem, 1952). Morfolojik çalışmalarla keratinoliz mekanizması daha da iyi anlaşılmıştır.

1.6.Dermatofitler ve *Trichophyton* sp.

Dermatofitler, insan ve hayvanların saç, tırnak ve deri gibi keratinli dokularında enfeksiyon oluşturan Fungi imperfectii sınıfına dahil fungusların özel grubudur. Bir kısmı doğada saprofit olarak bulunabilen dermatofitler çeşitli yollarla insan ve hayvanlara bulaşabilir.

Ramond Sabouraud 1890 yılında dermatofitler konusunda araştırmalar yaparak dermatofitleri; *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Mikrosporum* ve *Achorion* olmak üzere 4 cinste sınıflandırıp morfolojilerine, laboratuvar tanılarına yer vererek dermatofitlerin taksonomisini aydınlatmıştır.

1930 yılında yapılan çalışmalarda ise *Trichophyton* ve *Achorion* cinslerinin birbirinin aynısı olduğunu fark edilmiştir. 1934 yılında ise dermatofitler konidyum morfolojisi ve mikroskopik özelliklerine göre tanımlanmış ve 3 cins olarak belirlemiştir.

Dermatofitler yüzeysel keratinize dokuları infekte ederek besin kaynağını bu dokuları sindirerek elde eden filamentöz funguslardır. Bu nedenle yüzeysel mantar enfeksiyonlarının en sık etkenlerindedir. Dermatofitlerin deri, kıl ve tırnakta yaptığı enfeksiyonlara ise dermatofitoz adı verilmektedir.

Dermatofitozda derinin tutulumu ile deride kepeklenme, vezikül oluşması ve bazen iltihaplanma, tırnakların tutulumu ile şekil bozukluğu meydana gelirken; kıl ve saçların tutulumu ile bunların kırılması ve dökülmesi oluşup "tinea" denilen tipik lezyonlar oluşur. "Tinea" güve yeniği anlamında saçlı deri lezyonlarını tanımlarken, artık tüm deri enfeksiyonları için kullanılmaktadır. Deri lezyonları yuvarlak ve çevrelerinin belirgin olmaları nedeniyle "ringworm" kelimesi ile de tanımlanır (Mitchell, 1984; Rippon, 1988)

Dermatofitoza neden olan dermatofit etkenlerinin belirlenmesi, mevcut dermatofitozların etkin tedavisini sağlamanın yanı sıra, epidemiyolojik takip programlarına yol göstermesi ve halk sağlığının korunmasına katkıda bulunması nedeniyle önemlidir (Martin ve ark., 1999 Bilgili ve ark., 2001;).

Dermatofitler iki tip hyalen konidyum oluşturabilir. Bunlar büyük, çok hücreli, düz ya da yuvarlak, ince ya da kalın duvarlı makrokonidyum ve daha küçük, tek hücreli düzgün duvarlı mikrokonidyumlardır. Bu iki konidyumun varlığına ya da yokluğuna göre üç cins tanımlanır; *Epidermophyton*, *Mikrosporum* ve *Trichophyton* (Weitzman, 1995; Weitzman, 1996; Saniç, 1999;)

Bu grup içinde bulunan mantarlar kutanöz yerleşim gösterdiklerinden solunum sistemi ile bulaşmazlar. Hastalığın oluşumunda çevre ve konakçıya ait hazırlayıcı nedenler oldukça önemlidir.

Dermatofitlerden sadece *Microsporum* ve *Trichophyton* cinsleri kıl tutulumuna sebep olmaktadır. Dermatofitozların etyolojik temele göre sınıflandırılmaları mümkün değildir çünkü bir dermatofit türü vücudun değişik bölümlerinde değişik klinik görünümlere sebep olabilir. Aynı klinik görünüm diğer birçok dermatofit tarafından meydana getirilebilmektedir (Aşçı, 1992)

Dermatofitler fırsatçı organizmalar olup doğada oldukça yaygındır. deride yaptıkları hastalıklar oldukça geniştir ve önemli etkileri vardır. Yüzeysel dokulara yerleşebilme yetenekleri sayesinde neden oldukları enfeksiyonlar nadiren derin dokuları da istila edebilir.

- Saçlı deri ve saç enfeksiyonu (tinea capitis): öncelikli olarak çocuklarda saçları etkiler.
- Sporcu kaşıntısı (tinea cruris): Kasıklardan uyluk iç yüzüne yayılabilir.
- Ayak parmakları arasında atlet ayağı (tinea pedis): Bu mantar enfeksiyonu bazen ayak tabanını tümüyle etkilemektedir.
- El veya ayak parmağı tırnağının enfeksiyonu (tinea unguium): Yaygın olarak ayak ve bazen el parmaklarını da etkileyebilir.
- Saçkıran (tinea corporis): vücudun her yerinde bulunabilir.
- Berber dermatiti (tinea barbae): Yüzdeki sakallı bölgeyi etkiler.

1.6.1.Dermatofitlerin Ekolojileri

Dermatofiler üzerinde yaşadıkları konaklar ve buldukları çevreye göre 3 grupta incelenir.

1) Zoofilik türler: Hayvansal orjinli türlerdir, semptomatik ve asemptomatik olarak insanlara bulaşabilir. Zoofilik infeksiyonlar; hayvancılık ile uğraşma, hayvan besleme ve hayvan temasının yanında, hijyenik koşullar ve sosyo-ekonomik düzey ile de ilişkili olabilir (Saniç,1999).

Bu grupta yer alan dermatofitler arasında *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton simii* vardır. Bu dermatofitler hayvanlarda hastalık oluşturur ve arasına da insanlara bulaşabilir. Zoofilik dermatofitler hayvanların deri parazitleridir. Genellikle genç hayvanlarda infeksiyona neden olurlar. Sıcak, nem, yetersiz beslenme ve travmalar yaygın etkenlerdir

2) Antropofilik türler: İnsandan insana doğrudan veya dolaylı olarak bulaşabilir. Bu grupta bulunan dermatofitler çoğunlukla insanlarda hastalık oluşturur. Saçsız deride infeksiyonlara yol açan bu mikroorganizmalar genellikle doğrudan temas sonucu bulaşır. Bu durum, daha çok banyo ve duşluk gibi nemli ortamlardan ya da insanların ortak eşya kullanımını sonucu oluşur. Kaynak insanlar olmasına rağmen ender olarak hayvanlarda da infeksiyon oluşturabilir Bu dermatofitler arasında *Trichophyton audouinii*, *T. concentricum*, *T. ferrugineum*, *T. gourvilii*, *E. floccosum*, *T. megninii*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. yaoundei* bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar çok nadir olarak hayvanlarda görülmekle beraber asıl konakları insanlardır. (Tümbay, 2002).

3)Geofilik türler: Toprak kökenlidirler ve toprakla temas halinde insanlara bulaşabilir. Kolonileri toprak renginde olan geofilik türler bol miktarda konidyum üretir ve kolaylıkla tanınır. Toprağa adapte olmuşlardır, yaşam alanları topraktır, ender olarak insan ve hayvanlardaki lezyonlardan izole edilirler.

Bu grupta bulunan dermatofitler arasında *Trichopyton terrestre*, *Keratinomyces ajelloi*, *Microsporum cookei*, *M. gypseum*, *M. nanum* gibi türler vardır.

Geofilik dermatofitlerin dayanıklılıkları hücre duvarları ve sporlarıyla olur. Hayvanlara geofilik mantarların bulaşması, makrokonidyumların toprağa saçılması sonucu, tekrar kontamine topraktan hayvanların tüylerine direkt temasla gerçekleşir. Batı Pasifik ve Orta Amerika'da ve bazı tropikal bölgelerde sıklıkla bulunur (Erturan, 2004; Padhye,

2005). İnfeksiyon sporadik seyirlidir ve bulaşma hayvanlar arasında kolaylıkla gerçekleşmez. Çoğunlukla sonbaharda oluşur, mantarlar yaz boyunca tüylerde çoğalır. Sinek ısırıklarının da bulaşmada payı vardır (Arda, 2000; Cabanes, 2000).

Antropofilik ve zoofilik dermatofitlerin göçlerle, seyahatlerle yer değiştirebilmesi, antropofilik dermatofitlerden olan *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in onikomikozlarda ve diğer dermatofitozlarda en sık karşılaşılan sebepler arasında yer alması, dermatofitlerin bölgelere göre epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinin önemini ortaya çıkarmaktadır (Kuştimur, 2004; Gupta, 2008).

Dermatofitler morfolojik özellikleriyle benzerlik gösterirken coğrafik dağılımlarında ise yaşadığı bölgelere spesifik tipik özelliklere sahiptir. Bazıları yaşadığı bölgelerde endemik olup bu bölgede yaşayan insanlarca diğer bölgelere taşınabilir bunun dışındakiler tüm dünyada yaygındır.

Yapılan birçok çalışma sonucunda dermatofitik fungusların proteolitik, keratinolitik ve lipolitik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Dermatofitler tarafından sentezlenen ve salgılanan serin proteazların derinin fungal invazyonunda büyük bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Kaufman ve ark., 2007).

Genellikle dermatofitler tarafından salgılanan keratinazların dermatofitlerin virulansı için önemli olduğu kabul edilmektedir. Dermatofitlerin keratinize olmuş dokuları invade edebilme yeteneği dermatofitlerin biyolojik bir özelliğidir (Monod ve ark., 2002)

Bu özel grup patojenik funguslar keratin substratını en iyi parçalayan mikroorganizmalar arasında yer alır. Bu nedenle keratin hidrolizi yapılması gereken, tıp, kozmetik, deterjan, deri endüstrisi gibi farklı alanlarda uygulanmalıdır (Friedrich ve ark., 2003). Keratinolitik funguslar, patojenitede önemli rol oynamasının yanı sıra aynı zamanda çevre kirlenmesine neden olan keratin atıklarının biodegradasyonunda da önemli rol oynar (Muhsin ve ark., 2002)

1.6.2. *Trichophyton* sp.

Funguslar içerisinde özel bir grup olan dermatofitlerin önemli genuslarında biri olan *Trichophyton* sp. ekstraselüler keratinaz üretebilme yeteneğinde olan insan ve hayvan patojeni fungusları kapsar. *Trichophyton* türleri Malmsten tarafından 1845 yılında tanımlanmıştır (Matsumoto, 1987)

Trichophyton sp. üreyebilmek için keratin dokuya ihtiyaç duyar bundan dolayıda saç, tırnak ve yüzeysel deri alanlarına yerleşir ve buralarda keratin dokuları parçalamak suretiyle lezyonlar oluşturur. Ayak ve tırnaklardaki infeksiyonun en önemli ve en yaygın nedenidir.

Trichophyton sp. dermatofitler içerisinde yoğun olarak onikomikoza sebep olan genustur. Özellikle *Trichophyton rubrum* insanlarda onikomikoz etkenidir.

Bu genusun üyeleri;

Hem mikrokonidyum hem de makrokonidyum oluşturur. Hakim olan ve tanıda temel alınan spor formu tek hücreli mikrokonidyumdur (Greer, 1994).

Makrokonidyum kalem ya da çomak, fuziform veya silindirimsi şekilde tek tek bulunabileceği gibi küme halinde de bulunabilir. Genellikle ince duvarlı 1-12 bölmeli olabilirken birçok tür de makrokonidyum yoktur. Mikrokonidyumlar 2,5-4 µm çaplı küremsi ve sayıca makrokonidyumlardan fazladır. Armut şeklinde, küresel yada lobut şeklinde olabilir.

Hifler yan kısımlarında ya da uçlarında tek tek veya üzüm salkımı şeklinde dizilebilir, bu dizilim tür teşhisinde oldukça önem arz etmektedir.

Tanıda temel alınan spor formu tek hücreli mikrokonidyumdur, kolonileri katı ortamlarda üreyebilme yeteneğindedir. Bu cinste yaklaşık 22 tür bulunmaktadır (Macura, 1993)

1.7. Keratinazların Biyoteknolojik Kullanım Alanları

Keratinazların biyoteknolojik olarak ilk kullanım alanları tarımsal ve endüstriyel faaliyetler sonucu açığa çıkan keratin atıkların biyodegradasyonu ile değerli ürünlere dönüştürülmesidir. Bu atıkların geri dönüşümünün sağlanması yoluyla çevre kirliliğinin minimal düzeye indirilmesi hedeflenmektedir (Daroit ve ark., 2009; Kublanov ve ark., 2009; Moreira-Gasparin ve ark., 2009; Syed ve ark., 2009). Biyodegradasyon işlemleri her geçen gün ilerlemekte ve çevreye atık olarak bırakılan biyolojik atıkların keratinaz ile enzimatik hidrolizi yapılarak çok değerli yeni ürünler insanların kullanıma hazır hale getirilmektedir (Gessesse ve ark., 2003; Brandelli, 2008; Tatineni ve ark., 2008; Daroit ve ark., 2009). Bu atıkların biyodönüşümü ayrıca azotlu gübre hazırlanması ve toprak ıslahı açısından da faydalı olabilmektedir. Keratinazlar bu uygulamanın dışında da biyoteknolojik açıdan farklı birçok uygulama alanı bulabilmektedir (Gousterova ve ark., 2005).

Keratinazlar tüy yan ürünü olan yem ve gübre için etkin maliyette uygulama alanı bulabilmektedir. Hayvan besleme açısından değerli olan tüy yemleri(feather meal) önemli miktarda besin değeri yüksek protein ve dolayısıyla aminoasit içermektedir ancak içeriğindeki yüksek keratin ve disülfid bağlarından dolayı % 5 gibi bir sindirilme oranına sahiptir bundan dolayı bu tüylerin besin değerinin bozulmadan ve en faydalı biçimde tüy yemine dönüştürülmeleri çok önemlidir. Bu tüyler yüksek enerji kullanımı gerektiren buhar basınçlı uygulama yöntemiyle tüy yemine dönüştürülürken tüy proteinleri denatüre olmaktadır ve bu sırada proteinlerin yaklaşık olarak %50 'si kaybolmaktadır Son zamanlarda ısı muamelesi ile tüylerin hayvan yemlerine dönüştürülmesi prosesinde bazı ısı duyarlı bazı aminoasitlerin (lizin, triptofan, metiyonin) kaybı söz konusudur. Kaybolan bu aminoasitlerin yerine besleyici olmayan bazı aminoasitler eklenmektedir (lysin, alanine ve lantionine) (Brandelli and Riffel, 2005). Kaybolan aminoasitlerle beraber bu hayvan yemleri hem besin verimi açısından azalmakta hem de maliyet artmaktadır. Bu aminoasitlerin eksikliği nedeniyle tüy yemlerinin hayvanlarca tüketimi kısıtlanmaktadır (Papadopoulos ve ark, 1986; Wang ve Parsons, 1997).

Bu duruma alternatif metod ise enzimatik ya da fermantatif metottur. Bu yöntemlerle üretilen hayvan yemleri nadir aminoasitler bakımından zengindir (cysteine, serine ve proline). Bu şekilde elde edilen ürün beslenme substratı olarak daha farklı kullanım alanları bulabilmektedir. Keratinaz kullanımı ile tüylerin pepsin sindirilebilirliği

de klasik yöntemlere göre daha fazla olmaktadır ve hayvan beslenmesindeki sınırlama da ortadan kalkmaktadır. Bu metodla ayrıca gübre, yapıştırıcı ve biyolojik olarak parçalanabilen filmler oluşturulabilmektedir (Brandelli, 2008).

Keratinazlar, deri endüstrisinde de özel enzimlerdir. Hayvan derilerini endüstriyel olarak kullanıma uygun hale getirmek için uygulanan tabaklama işlemi sırasında kılların uzaklaştırılması işlemi sırasında (enzimatik dehairing) keratinazlardan faydalanılmaktadır. Tabaklama işlemi sırasında bol su kullanılmaktadır (Cantera, 2001; Thanikaivelan ve ark, 2004).

Tabaklama işlemi sonrası oluşan atık su miktarı hayli fazladır. Örnek verilecek olursa 1 kg derinin işlenmesiyle 30-50 lt atık su oluşur. Bu atık sular çok fazla miktarda kirletici ajan içermektedir. Enzimatik olarak deri tüyü ya da yünlerin uzaklaştırılması sürecinin önemli bir özelliği tamamen tüylerin giderilmesi ve sülfidin minimal kullanımınıdır. Tabaklama sonrası oluşan kirli suyun yapısında bulunan ajanların mümkün olduğunca azaltılması işleminde keratinazların kullanımı önem arz etmektedir, bu enzimlerin ticari olarak kullanımlarıyla tüy yada yün uzaklaştırmaları sırasında yüksek derecede verim elde edilmektedir.

Minimal sülfid kullanımı ve tabaklama işlemi sonrası ortaya çıkan kirli su oluşumunun mümkün olduğunca azaltılması ve keratini parçalarken kollojen gibi diğer yapısal proteinlere zarar vermemesi bu proteolitik enzimleri deri endüstrisinde değerli kılar. Bu açıdan keratinazlar hem ekonomik hem de ekolojik olarak önemli enzimlerdir (Brandelli, 2008).

Tıp ve veterinerlik alanlarında keratinazlarla yapılan birçok çalışmada *Trichophyton* ve *Microsporum* gibi dermatofitik fungusların keratinolitik potansiyelleri dikkat çekmektedir. Bu fungusların biyoteknolojik potansiyelleri üzerinde bazı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, potansiyel patojenite faktörü olmalarından dolayı ticari ilgi yetersiz kalmıştır (Brandelli ve ark., 2010)

Keratinazların farmasötik ve kozmetik uygulamaları da tanımlanmıştır (Brandelli, 2008). Bazı keratinazlar, jelatini hidroliz etmemeleri ve kollojenaz için gerekli substrata dokunmamaları dolayısıyla kollojen yıkımına neden olmama gibi cezbedici özelliklerinden dolayı kozmetik ve farmasötik açıdan ilgi çekici hale gelmiştir. İnsan cildinin yapısal proteinlerinden olan kollojene zarar vermediğinden tıraşlama proseslerinin komponentlerinde tüy dökücü olarak bulunup kozmetik sanayinde yerini almıştır, ayrıca

keratinazlar aknelerde ve sedef hastalığında cilt yüzeyinde bulunan keratinin ve nasırların uzaklaştırılması için de kullanılabilir (Brandelli, 2008).

Keratinazın, keratin proteinin β pililerinde gösterdiği etkiyi prion plaklarını parçalama alanında da kullanılması ümit edilmektedir (Gupta ve Ramnani, 2007). Prion proteinlerinin keratinaz enzimi ile enzimatik olarak hidrolizi için önemli ve umut verici olduğu bildirilmiştir (Brandelli, 2008). Prion proteinleri hayvanlarda deli dana, insanlarda kuru hastalığı, kronik zayıflama hastalığı gibi ciddi rahatsızlıklara neden olmaktadır.

Bunların yanı sıra keratinazlar dermatofitoz tedavisi için aşuların hazırlanmasında da kullanılabilir (Vignardet ve ark., 2001; Friedrich ve ark., 2005; Gradisar ve ark., 2005; Mohorcic ve ark., 2007). Ek olarak keratinazlar tıpkı tıbbi bir yara ilacı gibi yara izlerinin uzaklaştırılması dolayısıyla iyileşme sürecinin hızlandırılmasında kullanılabilir (Chao ve ark., 2007).

Ayrıca araştırılması gereken diğer potansiyel ilginç bir alan da keratin içeren atıkların parçalanması sonucu elde edilen biyoaktif peptidlerdir (Riessen ve Antranikian 2001; Matsui ve ark., 2009).

Keratinazların alkali pH aralığında olmaları, düşük ve orta sıcaklıkta etkin olmaları, surfaktan ve deterjan uyumluluğunun yanı sıra beyazlatma etkinlikleri dolayısıyla deterjan formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (Rai ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2009; Prakash ve ark., 2010; Xie ve ark., 2010).

Diğer bir çalışmada ise keratin hidrolizatlarının metan gazının yanı sıra ısınma işlemleri için yakıt partiküllerini oluşturabileceği yönündedir. Keratinöz yan ürünlerin yakıtlara dönüşümü enerji geri dönüşümü konusunda ilgi çekici bir konu olmaktadır (Ichida ve ark. 2001)

Keratinazlar biyohidrojen üretiminde de kullanılabilir (Balint, 2005). Keratinazların diğer bir uygulama alanı ise immobilize keratinazlardır. Immobilize keratinazlar sınırlı proteoliz gerektiren uygulamalar için idealdir (Chen ve ark., 1994).

Tüm bunların dışında keratinazlar; tekstil alanında fiber modifikasyon, işlevsel protein modifikasyonu, agroendüstriyel alanda entamopatojen üretimi, yiyecek sağlanması, biyomedikal olarak dermatolojik tedavi sağlanmasında kullanılmaktadır (Brandelli, 2008).

1.8. Amaç

Dermatofitlere ait keratinazlar keratin substratını en iyi parçalayan enzimlerdir. Eğer bu patojen mikroorganizmaların keratinaz tanımlaması iyi yapılabilirse nonpatojen olan mikroorganizmalardan keratinaz izolasyonuna katkıda bulunup, keratini parçalama yeteneği arttırılabilir ve böylece endüstriyel enzim pazarına çok daha kaliteli ve verimli enzimler kazandırılabilir.

Trichophyton sp.'ye ait enzimin ilgili gen bölgesi nonpatojen mikroorganizmalara aktararak biyoteknolojik olarak kullanılma potansiyeli arttırılıp yeni bir gen kaynağı oluşturulabilir. Ayrıca enzim farklı özellikler barındıran yeni bir keratinaz olabilir ve henüz tam olarak aydınlatılmayan keratinolizis prosesini açıklamaya yardımcı olabilir.

Çalışmamızda dermatofitik funguslara ait *Trichophyton* sp.'den keratinaz izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu yaparak biyoteknolojik olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Endüstriyel biyoteknolojiden elde edilen ürünler; yaşayan hücreler, yenilenebilir kaynaklar ve enzimler kullanılarak üretilmektedir (Maury ve ark., 2005). Özellikle enzimler bu alanda kullanılmak üzere birçok araştırmacı tarafından uzun yıllardır çalışılmaktadır. Araştırmacılar çok farklı kaynaklardan enzim izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. Biyoteknolojik kullanım alanında proteazlara diğer enzimlerden daha fazla talep olması yapılan proteaz çalışmalarını daha da öne çıkarmıştır (Harwood, 1992; Bhat, 2000).

İlk olarak, Yu ve ark. (1971), *Trichophyton mentagrophytes*'den ekstraselüler keratinolitik proteaz izole ederek proteazın saflaştırma işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. saflaştırma basamaklarının ardından SDS page ile keratinaza ait 2 protein bandı tespit etmişlerdir. Keratinazlardan ilkinin moleküler ağırlığı 48 kDa ve optimum pH ise 7.0; ikinci keratinazın moleküler ağırlığı ise 34 kDa ve optimal pH ise 9.5-9.8 aralığında bulunmuştur.

Kunert (1973), Dermatofitlerin keratini parçalama mekanizmasını açıklamak amacıyla Dermatofit *Microsporum gypseum*'u mineral bir ortamda insan saçı üzerinde yetiştirerek filtratları sephadex jeller üzerinde kromatograflamış ve ardından daha ileri kimyasal analizler ve ince tabaka kromatografisi ile karakterize etmiştir. Çalışması sırasında keratin ayrışma ürünlerinin 2 fraksiyona ayrıldığını saptamıştır. İlk fraksiyonda proteinlerin düşük miktarda sülfür içerdiğini fakat 2. fraksiyonda bol miktarda sistin, S-sülfosistein, sisteik asit içerdiğini saptamıştır. S-sülfosisteinin hem serbest halde hem de peptitlerle birleşik halde bulunduğunu görmüştür bu sonuç ile dermatofitlerin keratindeki disülfid bağlarını parçalayarak sistin ve S sülfosisteine çeviren sülfid salgıladığını açıkça göstermiştir.

Asahi ve ark. (1985), Dermatofit *Trichophyton rubrum*'un proteinaz aktivitesini araştırmışlardır. Sephadex G 100 kromatografi yöntemini kullanarak keratinaz enzimini diğer non-proteolitik enzimlerden ayırmışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin moleküler ağırlığını 36 kDa ve optimum pH değerini ise 7.8 olarak tespit etmişlerdir.

Apodaca ve McKerrow (1985), Dermatofit *Trichophyton rubrum*'dan ekstraselüler proteinaz saflaştırmışlar ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. İyon exchange kromatografi tekniğini kullanıp ardından SDS page yaparak enzimin moleküler ağırlığını 44 kDa, optimum pH değerini ise 8.0 olarak tespit etmişlerdir.

Tsuboi ve ark. (1987), Dermatofit olmayan fakat insan vücut yüzeyinde Sporotrikoz'a neden olan bir fungus *Sporothrix schenckii* 'yi azot kaynakları farklı olan 2 ayrı kültür ortamında yetiştirmişler. Azot kaynağı olarak albuminin kullanıldığı kültür ortamından elde edilen ekstraselüler proteazı saflaştırmak amacıyla sırasıyla DEAE-Sephacryl S-200 kolon kromatografisinden geçirip ardından SDS page tekniğini kullanarak enzimin moleküler ağırlığı 36.5 kDa, optimum pH değerini ise 6.0 olarak tespit etmişlerdir. Azot kaynağı olarak kollojenin kullanıldığı kültür ortamından izole edilen enzimde de aynı saflaştırma basamakları kullanılmış ve bu proteazın moleküler ağırlığı 39 kDa ve optimum pH değeri ise 3.5 olarak bulunmuştur.

Tsuboi ve ark. (1989), Dermatofit *Trichophyton mentagrophytes*'den ekstraselüler keratinolitik proteaz izole edip enzimin asidik pH'da aktivitesini gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında enzimin karakterizasyon çalışmalarını da yapmışlardır. Enzimi DEAE-sepharose CL-6B kolondan geçirip ardından SDS page tekniğini uygulayarak enzimin moleküler ağırlığını 41 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Kunert (1989), keratinolitik 2 organizmayı prokaryot *Streptomyces fradiae* ve ökaryot fungus *Microsporum gypseum*'u keratin parçalama mekanizmalarını araştırmıştır. Mikroorganizmaları steril koyun tüyü içeren mineral çözeltisi içerisinde kültüre bırakarak substrattaki kayıpları incelemiştir ardından kültürdeki parçalanma ürünlerini analiz ederek *Microsporum gypseum*'un ortama sülfid salgıladığından substratın disülfid bağlarını parçaladığını yani keratinin ekstraselüler proteazlar vasıtasıyla sülfitolizise uğratılarak denatüre edildiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak sülfitolizis ürünleri olan sistin ve S-sülfosistein içeren peptid birikimini gözlemlemiştir.

Rojanavanich ve ark. (1990), Dermatofit *Hendersonula toruloidea*'den ekstraselüler proteaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Çalışmalarında CM Sephadex G-50 kolon kromatografisi ve Sephacryl S-200 kolon kromatografisi tekniklerini kullanılmıştır. Saf enzimin serin proteaza benzeyen kimotripsin olduğunu tespit edip optimum pH değerinin 9.0, moleküler ağırlığının 34 kDa olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu proteazın tırnak ve cilt gibi sıkı keratinize dokularda invazyona neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Qin ve ark. (1992), *Trichophyton schoenleinii*'den keratinaz izole edip tanımlamışlardır. Çalışmaları sonucunda elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını 38 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Nam ve ark. (1992), Termofil *Fervidobacterium islandicum* AW-1 suşuna ait keratinaz izole etmişler ve bu bakterinin literatürde bilinen en yüksek sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu ekstrem değeri ise 100 °C olarak saptamışlardır aynı zamanda bu enzimin 90 dakika boyunca stabil kalabildiğini saptamışlardır.

Dozie ve ark. (1994), Keratinolitik fungus *Chrysosporium keratinophilum*'dan keratinaz izole etmişlerdir, elde ettikleri keratinazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 90 °C olduğunu ve enzimin bu sıcaklıkta 30 dakika boyunca stabil kaldığını saptamışlardır.

Bockle ve ark. (1995), *Streptomyces pactum* DSM 40530'dan keratinaz enzimi üretmişlerdir. Enzimin karakterizasyon çalışmalarında ise moleküler ağırlığını 30 kDa olarak saptamışlar. Enzimin pH 7.0 ve pH 10.0 gibi geniş bir aralıkta aktif olduğunu, 40°C ve 70°C arasında stabil kalabildiğini saptamışlardır.

Friedrich ve Antranikian (1996), Termofil bir bakteri olan *Fervidobacterium pennavorans* 'dan keratinaz karakterizasyonu yapmış ve enzimin moleküler ağırlığını 130 kDa, optimum pH 10.0 olarak tanımlamışlardır. Ayrıca enzimin serin- proteaz ailesine dahil olduğunu belirtmişlerdir.

Bockle ve Muller (1997), *Sreptomyces pactum* ile yaptıkları araştırmada *S. Pactum*'un tavuk tüylerinin yapısında bulunan disülfid bağlarını indirgeyebildiğini göstermişlerir. Böylelikle *S. Pactum*'un keratinin hidrolizini sağlayan disülfid redüktaz üreticisi olduğu sonucuna varmışlardır.

Letourneau ve ark. (1998), *Streptomyces* sp'yi doğal olarak parçalanmış tüylerden izole edip tüy yeminde ürettiklerinde ise elde edilen keratinazın yüksek aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Jewell (2000), Nonobligat predatör olarak yaşamını sürdüren saprofitik bir bakteri olan *Burkholderia* 2.2 N suşundan yeni bir proteaz saflaştırıp karakterize etmiştir. Çalışmaları proteaz aktivitesinin pH 7.5'da pH 9.0'a göre 4 kat; pH 4.0'a göre 25 kat fazla olduğunu göstermiştir. Saflaştırma basamaklarında Amonyum sülfat presipitasyonunu uygulandığında proteaz aktivitesinin 20 kat arttığını, DEAE-Sepharose kolon kromatografisinin ardından ise bu artışın 50 kata ulaştığını belirlemiştir. Karakterizasyon çalışmalarında, kazein içeren polyakrilamid zimogram analizi sonucu 60 kDA hidroliz bandı gözlemlenmiş aynı zamanda SDS page ile de 60 kDA ağırlında 2 eş proteaz bandı bulunmuştur. Bu bantlara hem filtre edilmiş süpernatantta hemde amonyum sülfat

presitasyonu ve DEAE-Sepharose kolon kromatografisi uygulanmış saf proteaz örneğinde rastlanmıştır.

Rozs ve ark. (2001), *Bacillus licheniformis* K-508 suşunu tüylü besiyerinde üretmişlerdir. Çalışmalarında besiyerini pH 7.0'de ve sıcaklığını 47°C olarak kullanmışlardır. Üretilen enzimin tavuk tüyünü parçalamada oldukça etkin olduğu belirtmişlerdir.

Coral ve ark. (2003), *Aspergillus niger* Z1 suşundan termostabil bir proteaz tanımlamışlardır. Çalışmaları sonucunda SDS page analizi ile 2 protein bandı tespit etmişlerdir. Yapılan zimogram analizi ile enzimin moleküler ağırlığı 68 kDa tespit edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında ise enzimin optimum sıcaklığı 40 °C, optimum pH ise 9.0 olarak tespit edilmiştir, ayrıca enzimin 90°C'ye kadar stabilitesini koruyabildiği saptanmıştır.

Bernal ve ark. (2003), *Kocuria rosea*'dan farklı özellikte bir ekstraselüler keratinaz karakterize edip enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemleri sırasında öncelikle DEAE kolon kromatografisini kullanıp süpernatanta göre 24 kat fazla saflaştırma sağlanmış ardından ise jel filtrasyon kromatografisi tekniğini kullanmışlardır. Ardından yapılan SDS page ile enzimin doğal moleküler ağırlığını 240 kDa olarak saptamışlardır. Karakterizasyon çalışmalarında ise enzimin optimum pH değeri 10.0, optimum sıcaklık değeri 40°C saptanmış olup, pH 8.0-11.0 ve 10-60°C aralığında enzimin stabil kaldığı sonucuna varmışlardır.

Huang ve ark. (2003), *Bacillus pumilus*'tan serin proteaz tanımlamışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin moleküler ağırlığını 32 kDa, optimum pH değerini 10.0, optimum sıcaklık değerini ise 55 °C olarak bulmuşlardır. Bu serin proteazın derilerden yünlerin uzaklaştırılmasında(dehairing) oldukça etkin olduğunu belirtmişlerdir.

Korkmaz ve ark. (2003), Topraktan izole edilen ve tüylü besiyerinde yüksek keratinolitik aktivite gösteren doğal tip *Streptomyces* BA7 suşundan keratinaz izole etmişlerdir. Karakterizasyon çalışmalarıyla keratinolitik aktivitenin 30-60°C arasında %100 korunduğunu belirlemişlerdir. Yapılan SDS page analizi sonucunda ise enzimin moleküler ağırlığının 44 kDa olduğunu saptamışlardır.

Balint (2005), Biyohidrojen üretimi gerçekleştirmek amacıyla *Bacillus* suşunun keratin parçalama özelliğinden yararlanmışır. Bu amaçla 2 aşamalı fermantasyon sistemini uygulamıştır. Atıkların parçalanmasının ardından aminoasit ve peptid açısından zengin

ürünler elde edilmiştir. Bu ürünleri anaerobik *Thermococcus litoralis* için besin kaynağı olarak kullanıp fizyolojik yan ürün olarak ciddi ölçüde hidrojen üretilebildiğini göstermiştir.

Gradisar ve ark. (2005), İki keratinolitik fungus *Paecilomyces marquandi* ve *Doratomyces microsporus*'dan elde edilen keratinazların özelliklerini diğer bilinen proteazlarla karşılaştırmışlardır. *Paecilomyces marquandi*'den elde edilen keratinazın monomerik özellikte olduğu ve saflaştırmanın ardından yapılan SDS page analizi ile moleküler ağırlığının 33 kDa ve enzimin pH 6.0-11.0 arasında stabil olduğunu saptamışlardır. Bunununla beraber maksimum keratinaz aktivitesinin pH 8.0, optimum sıcaklığının ise 60-65°C arasında gözlemlendiği sonucuna varmışlardır. *Doratomyces microsporus*'dan elde edilen keratinazın ise moleküler ağırlığının 30 kDa ve pH 8.0' de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Moallaei ve ark. (2006), *Trichophyton vanbreuseghemii*'den keratinaz karakterize etmişlerdir. Karakterize ettikleri keratinazın moleküler ağırlığınının 37 kDa olduğu sonucuna varmışlardır.

TaePark ve JooSon (2007), Mezofilik *Bacillus megaterium* F7-1 suşunun tavuk tüyü parçalama ve keratinolitik enzim üretme yeteneğinin çevresel etkilerini araştırmışlardır. Enzim üretim pH 7.0-11.0 aralığında, enzim üretim sıcaklığının 25-40 °C aralığında olduğunu saptamışlardır.

Moreira ve ark. (2007), Bitki patojeni fungus *Myrothecium verrucaria*'dan bitki patojeni funguslar arasında alışılmışın dışında keratinolitik bir proteaz tanımlamışlardır. Bu proteazın substratları 40°C ve pH 9.0 'da degrade ettiğini belirlemişlerdir. Farklı keratinöz substratları parçalama yeteneğini ise en yüksek olandan en düşük olana doğru sıralamışlardır. Çalışmalarına göre bu patojen fungustan üretilen keratinazın sırasıyla; tavuk tüyü, koyun yünü, insan tırnağı, insan saçını degrade edebilme yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ogino ve ark. (2007), Deri parçalama özelliğinde olan bir proteazı *Bacillus sp.* PN-13 suşundan izole ederek tanımlamışlardır. Çalışmaları sonucunda proteazın moleküler ağırlığı yaklaşık 30 kDa olarak bulunurken, optimum sıcaklık 40°C, optimum pH ise 10.0 olarak bulunmuştur.

Raju ve ark. (2007), Dermatofit fungus *Microsporum gypseum*'dan keratinaz izole edip keratinaz üretim potansiyelini araştırmışlardır. Ayrıca enzim karakterizasyon

çalışmalarını yapıp saflaştırılmasını sağlamışlardır. Saflaştırdıkları keratinazın moleküler ağırlığını 33 kDa tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin optimum pH değerini 8.0, optimum sıcaklığını ise 35°C olarak saptamışlardır.

Anbu ve ark. (2008), Hindistanda tüy atıklı topraklardan elde ettikleri *Trichophyton sp* HA-12 suşundan ekstraselüler keratinaz karakterize etmişlerdir. Çalışmaları sırasında kültüre karbon kaynağı olarak tavuk tüyü ilave ettiklerinde keratinaz üretiminde belirgin bir artış görmüşlerdir. Elde ettikleri keratinazı sırasıyla önce DEAE –Seluloz ve Sephadex G-100 kolon kromatografisinden geçirerek saflaştırmışlardır. Ardından SDS page uygulayarak enzimin moleküler ağırlığı 34 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH değerini 7.8; optimum sıcaklığını ise 40°C olarak saptamışlardır.

Mabrouk (2008), 70 farklı aktinomiset izole ederek keratinaz üretimi açısından değerlendirmiştir. Çalışmaları sonucunda 16S rRNA sekans analizi ile en yüksek keratinolitik aktivite gösteren suş *Streptomyces sp.* MS-2 olarak saptanmıştır. Enzimin optimum sıcaklık değeri ise 35 °C olarak bulunmuştur.

Pillai ve Archana (2008), Hindistanda, Mumbai bölgesinden sıcaklığı 45-50°C olan kaplıcadan *Bacillus subtilis* P13 suşunu izole etmişlerdir. Ardından karakterizasyon çalışmalarını yaparak enzimin optimum sıcaklığını 65°C olarak saptamışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin serin tip proteaz olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu proteazın keçilerde ve benzer diğer hayvanlarda kıl dökücü etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Biyoteknolojik uygulamalarda özellikle tüy ve deri endüstrisinde bu enzimin kullanılabilirliğini tartışmışlardır.

Balaji ve ark. (2008), Boynuz ve toynaklardan doğal proteolitik mikroorganizmaları izole etmek amacıyla bu substratlara yüksek buhar basıncı ile muamele etmiş ve izole ettiği mikroorganizmaları boynuz unu ihtiva eden tuzlu kültür ortamında geliştirerek keratinolitik aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda en fazla keratinolitik aktivite gösteren mikroorganizmanın *Bacillus subtilis* MTCC(9102) olduğunu belirlemişler ve bu ekstraselüler keratinaz üretme yeteneğinde olan mikroorganizmadan elde ettikleri keratinazı saflaştırıp karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Saflaştırma basamaklarında sırasıyla amonyum sülfat presipitasyonu, iyon exchange kromatografisi ve en son olarak da jel filtrasyon kromatografi tekniğini kullanmışlardır. Çalışmaları sonucunda yaptıkları SDS page ile enzimin moleküler ağırlığını 64-69 kDa arasında tespit

etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 40°C, optimum pH'nı ise 6.0 olarak tespit etmişlerdir.

Cai ve Zheng (2009), *Bacillus subtilis* KD-N2 suşundan keratinaz izole etmişlerdir. Keratinazı amonyum sülfat presipitasyonu, Sephadex G-75 ve DEAE Sepharose kromatografi tekniklerini kullanarak saflaştırmışlardır. Karakterizasyon çalışmalarında enzimin molekül ağırlığını 30.5 kDa, Optimum sıcaklığını 55°C, optimum pH: 8.5 olarak tespit etmişlerdir. Enzimin bazı metal iyonları, organik çözücüler ve serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile nispeten inaktive olurken tersi olarak SDS, EDTA ile aktivitede artış sağladığını bildirirlerken yanı sıra DTT, merkaptoethanol, L-sistein, sodyum sülfat, amonyum sülfamat, dimethylsulfoxide'in (DMSO) ise enzimi baskıladığını tespit etmişlerdir.

Syed ve ark. (2009), Isıya dayanıklı ve tüy parçalama yeteneğinde bir tür olan *Streptomyces gulbargensis*'in keratinaz enzimi üretme yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin optimum sıcaklığı 45°C olarak bulunurken, optimum pH değeri ise 9.0 olarak saptanmıştır. Ayrıca enzimin monomerik yapıda olduğu ve moleküler ağırlığının ise 46 kDa olduğu sonucuna varmışlardır.

Konwarh ve ark. (2009), İmmobilize keratinaz çalışmaları yapmışlardır. Çalışmalarında polimer destekli demir oksit nano partiküllerini içeren immobilize keratinaz keçi derisi üzerinde denenmiştir. Başarılı bir sonuç elde edilen çalışmada enzimatik dehairing gerçekleştirilmiştir.

Moreira ve ark. (2009), Filamentöz fungus *Myrothecium verrucaria*'nın doğal tüy parçalama yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin küçük monomerik yapıda olduğu sonucuna varmışlardır. Karakterizasyon çalışmalarıyla optimum pH 8.3 olduğu ve enzimin pH 5.0-12.0 aralığında stabil olduğunu ayrıca enzimin optimum sıcaklığını 37°C olarak saptamışlardır. Ayrıca enzimin 45°C'ye kadar stabilitesini koruyabildiği sonucuna varmışlardır. Enzimin saflaştırılması aşamasında ise sephadex G 100 kolon kromatografisi kullanılmıştır. Kromatografinin ardından SDS page ve gümüş boyamayla yaklaşık 23 kDa olan protein bandı gösterilmiştir.

Rai ve ark. (2009), *Bacillus subtilis* RM-01 suşundan tavuk tüyünü substrat olarak kullanıp elde ettikleri β keratinazın katı hal fermantasyonu üzerindeki etkileri üzerine çalışmışlardır. Elde ettikleri saf β -keratinazın moleküler ağırlığını 20.1 kDa olarak saptayıp serin proteaz olduğunu belirtmişlerdir. aktivitesinde Fe^{+2} dışında ki metal

iyonlarının aktiviteyi düşürdüğünü gözlemlemişler ayrıca β -keratinin substratları sınırlayarak önemli derecede stabilite ve sürfaktanlarla ve ticari deterjanlarla uyum yeteneği olduğunu göstermişlerdir bu uygulanabilirliği ile enzimin deterjan geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Dubey ve ark. (2010), *Aspergillus niger*'den 2 adımda alkalın proteaz tanımlamıştır. İlk olarak amonyum sülfat presipitasyonu kullanıp ardından ise Sephadex G-100 kolon kromatografisi tekniğini kullanarak enzimi saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Çalışmalar sonucunda enzimin moleküler ağırlığı 60 kDa, optimum pH 8.0, optimum sıcaklık 30°C olarak saptanmıştır. Ayrıca enzimin geniş bir pH aralığında (pH 8.0-10.0) stabil ve 37°C'ye kadar stabilitesini koruyabildiğini gözlemlemişlerdir.

Prakash ve ark. (2010), *Bacillus halodurans* PPKS-2 suşundan 2 ayrı özellikteki keratinazı ayrı ayrı saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırma basamaklarında amonyum sülfat presipitasyon tekniğini ardından DEAE Sephadex kolon kromatografisi ardından ise Sephadex G-200 kolon kromatografisi tekniğini kullanarak enzimi saflaştırmışlar. SDS page ve zimogram analizleriyle keratinaz 1 için moleküler ağırlığın 30kDa Keratinaz 2 için ise 66 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. 2 enziminde farklı seviyelerde de olsa disülfid redüktaz üretme yeteneğinde olduğunu belirlemişlerdir. Her 2 enziminde pH 7.0-13.0 gibi geniş bir aralıkta stabil olduğunu ve sıcaklık olarak da 70°C 'ye kadar aktivitelerini koruyabildikleri sonucuna varmışlardır.

Akan (2010), *Bacillus HSK-21* suşundan keratinaz karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. Çalışmaları sonucunda enzimin optimum pH değeri 12, optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuş ayrıca SDS-page analizinde proteolitik aktivite gösteren üç tane protein bandı bulunarak moleküler ağırlıkları sırasıyla 46.8 kDa, 26 kDa, 21.9 kDa olarak saptanmıştır.

Duarte ve ark. (2011), Patojen keratinolitik *Candida parapsilosis*'i Brezilya'da bir tavuk çiftliğinden izole etmişlerdir. Daha fazla keratinaz için mutant formlar oluşturmuşlardır. Mutant formlar azot ve karbon kaynağı olarak tavuk tüylerinden elde edilen ekstratlarla kültüre bırakılmıştır. Ardından 500 mutantı keratinolitik aktivite açısından doğal tipte karşılaştırıp tanımlamışlardır. 3 Mutant formda keratinolitik aktivite gözlemlemişlerdir. Doğal tipte keratinaz aktivitesi 80 U/mL iken 3 mutant formda sırasıyla 110 U/mL, 130 U/mL, 140 U/mL bulunmuştur. Proteolitik aktiviteyi ise zimogram analizinde farklı substratlar kullanarak saptamışlardır. Substrat olarak jelatin kullanılan

bandın 80 kDa, substrat olarak keratinin kullanıldığı bandın ise 100 kDa olduğunu saptamışlardır.

Cedrola ve ark. (2012), Brezilyada tavuk çiftliklerinden izole ettikleri *Bacillus subtilis* SLC suşunun keratinolitik enzim üretme potansiyelini ve bu enzimlerin tüy parçalama yeteneğinin ne ölçüde olduğunu araştırıp, bu yeteneğin tüy atıklarının geri dönüşümünde kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda elde ettikleri keratinazın geniş bir pH (2.0-12.0) aralığında aktif olduğunu ve maksimum aktivitenin pH 10.0, optimum sıcaklığın ise 60°C olduğunu saptamışlardır. Yapılan SDS page analizi sonucunda farklı protein bantları elde edildiği görülmüş elde edilen bantlardan moleküler ağırlıkları 40, 60, 100 kDa olan bantların keratininin yanında jelatin, hemogloblin ve kazeini de parçalarken 15 kDa olan bantın ise yalnızca keratini degrade ettiğini saptamışlardır.

Kumar ve ark. (2012), Tavuk tüyü parçalama yeteneğinde olan bir bakteriden keratinaz izole edip karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda elde edilen keratinazın optimum sıcaklığı 37°C, optimum pH değeri ise 7.0 bulunmuştur.

More ve ark. (2013), Yeni fungal alkali keratinazın *Cunninghamella echinulata*'dan saflaştırıp özelliklerini tanımladıkları çalışmalarında lektin agaroz afinite kolonunu ile enzimi saflaştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda enzimin moleküler ağırlığı 33 kDa, optimum pH 4.5 ve 10.0, optimum sıcaklık 30 ve 60°C bulunmuştur.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve tamponlar

3.1.1.1. Keratin-azure

Keratinaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla substrat olarak kullanılmıştır (Letourneau ve ark., 1998).

Bileşimi

Keratin-azure: 0,4 g

10 mM 100 mL Sodyum Fosfat

pH: 7.5

3.1.1.2. % 15'lik KOH çözeltisi

Trichophyton sp. izolasyonu sırasında saç ve deriden alınan kazıntı örneklerinin direkt mikroskopik olarak incelenebilmesi amacıyla kullanılmıştır (Toraman, 2003).

Çizelge 3.1.% 15'lik KOH İçeriği

Bileşimi	g/L
KOH	15
Distile su	1000

3.1.1.3.Sabouraud dekstroz broth

Trichophyton sp. suşunun geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Sabouraud Dextrose Broth 100 mL'lik erlenmayerlere 50 mL üretim ortamı olarak hazırlandı 121 °C de 1.5 atm de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmıştır (Tanış ve Cihangir, 2009).

Çizelge 3.2.Sabouraud dekstroz broth içeriği

Bileşimi	g/L
Glukoz	20
Et peptonu	5
Kazein peptonu	5
Distile su	1000
pH	5.6

3.1.1.4. Sabouraud dekstroz agar:

İzole edilen fungusların üremesi ve stok kültüre alınması amacıyla kullanılmıştır (Tümbay, 2003)

Çizelge 3.3.Sabouraud Dekstroz Agar İçeriği

Bileşimi	g/L
Glukoz	20
Et peptonu	10
Agar	17
Distile su	1000

3.1.1.5. Mineral besiyeri

Funguslardan keratinaz enzimi üretmek amacıyla kullanılmıştır, ve 121 °C de 1.5 atm de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmıştır (Marcondes ve ark., 2008)

Çizelge 3.4. Mineral besiyeri içeriği

Bileşimi	g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1
Keratin tozu	0.5

3.1.1.6. Skim-milk agar:

Funguslardan üremenin ardından keratinaz aktivite kontrolü yapmak amacıyla kullanılmıştır funguslar için modifiye bir yöntemdir(Mohamedin,1999)

Çizelge 3.5 Skim-milk agar içeriği

Bileşimi	g/L
Agar	15
Skim-milk	8

3.1.1.7. % 0.1 'lik Kazein:

Zimogram analizi için % 10'luk poliakrilamid jel içerisine substrat olarak eklenmiştir (Ferrero ve ark., 1996).

3.1.1.8. Sitrat tamponu

Enzimin pH: 4.0 – 5.6 arasında aktivitesini saptamak için kullanılır. (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.6. Sitrik asit tampon çözeltilerinin bileşimi

pH	0.1 M Sitrik Asit (19.21 g / L) mL	0.2 M Na₂HPO₄ (53.65 g / L) mL	Distile Su mL
4.0	61.4	38.6	100
4.6	53.4	46.6	100
5.0	48.6	51.4	100
5.6	42	58	100

3.1.1.9. Sodyum fosfat tamponu

pH: 6.0-7.5 arasındaki enzim aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.7.Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin bileşimi

pH	0,2 M NaH₂PO₄ (27.8 g / L) mL	0,2 M Na₂HPO₄ (53.65 g / L) mL	Distile Su mL
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39	61	100
7.5	16	84	100

3.1.1.10. Tris tamponu

pH 8.0-9.0 arasındaki enzim aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.8. Tris tampon çözeltilerinin bileşimi

pH	0.2 M Tris (mL)	0.2 M HCl (mL)	Son hacim (mL)
8.0	5	2.68	20
8.6	5	1.2	20
9.0	5	0.5	20

3.1.2. Elektroforezde kullanılan solüsyonlar

3.1.2.1. Solüsyon A (Akrilamid stok solüsyonu)

29.2 g Akrilamid, 0.8 g Bisakrilamid 50 mL distile suda çözülür ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile ayarlama yapılır. Monomer çözeltisi koyu renkli şişede ve buzdolabında +4°C saklanabilir (Dunbar,1990 ; Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.2. Solüsyon B (1.5 M Tris-HCl, pH: 8.8)

Ayırıcı jelin hazırlanmasında tampon çözelti olarak kullanılmıştır, 27.23 g Trizma, 80 mL distile su içerisinde karıştırıldıktan sonra pH 6N'lik HCl ile 8.8'e ayarlanır ve son hacim 150 mL'ye tamamlanır. Ardından otoklavda steril edilerek buzdolabında saklanır, karışım buzdolabında çok uzun süre stabilitesini koruyabilir (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.3. Solüsyon C (0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8)

Dengeleme jelinin hazırlanması aşamasında tampon çözelti olarak kullanılmıştır, 6g Trizma base 60 mL distile su ile karıştırıldıktan sonra pH 6.8'e ayarlanır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanarak otoklavda steril edilir ve buzdolabında saklanır (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.4.SDS % 10 (w/v)

10 g SDS tartılarak 90 mL distile su içerisinde karıştırıldıktan sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.5. Amonyum persülfat (AMPS) % 10

Jellerin polimerizasyonunu başlatmak amacıyla kullanılmıştır 0.5 g AMPS, 5 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır ve kullanılmadan önce taze olması gerektiğinden -20°C'de saklanır. (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.6. Elektroforez tamponu

3 g Tris, 14.4g Glisin, 1g SDS bileşikleri bir miktar distile suda çözülür ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenerek hazırlanır ve hazırlanan tampon +4°C'de saklanır (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.7. Örnek yükleme tamponu (Sample buffer)

Enzimin çözünürlüğü için kullanılmıştır, distile su 3.55 mL, Tris-HCL (0.5 M, pH: 6.8) 1.25mL, Gliserol 2.5 mL, SDS (% 10 w/v) 2 mL, Bromfenol Mavisi (% 0.5 w/v) 0.2 mL karıştırılarak oda sıcaklığında saklanır. Kullanıma göre 50 µL β-merkaptolanol 950 µL yükleme tamponuna eklenebilir. Örnek ½ oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırılır ve 95 °C'de 5 dakika hot plate (CS, Cleaver) de ısıtıldıktan sonra kullanılır (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.8. Protein marker

SDS page analizinin ardından enzimin moleküler ağırlığının saptanabilmesi amacıyla kullanılmıştır, Sigma, SDS-6H High Molecular Weights Standard Mixture Ticari olarak elde edilmiş protein karışımıdır ve içerisinde yer alan bazı standart molekül ağırlıkları ise Carbonic Anhydrase 29; Ovalbumin 45; Bovine Albumin 66; Phosphorylase 97.4; Galactosidase 116 ve Myosine 205 kDa 'dır.

3.1.2.9. SDS page boyama (staining) solüsyonu

Elektroforez sonrası protein bantlarının boyanarak görülebilir hale gelmesi amacıyla kullanılmıştır 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde

çözülüp filtre kağıdından süzöldükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL distile su eklenerek hazırlanır. (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.10. SDS page boyayı geri alma (destaining) solüsyonu

100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karışımından oluşur, jelde oluşan protein bantlarının net görünümünü engelleyen fazla boyanın geri alınması amacıyla kullanılmıştır (Bollag ve ark., 1996).

3.1.2.11. Gümüş boyama solüsyonları

3.1.2.11.1. Fiksasyon solüsyonu

60 mL etanol, 20 mL asetik asit ve 120 mL distile su karıştırılarak hazırlanır.

3.1.2.11.2. Hassaslık artırıcı solüsyon

1.53 g sodyum tiyosülfat 5 mL distile suda çözölür. Daha sonra bu çözeltiliden 500 µL alınır ve 500 mL distile su ile karıştırılır.

3.1.2.11.3. Gümüş boyama solüsyonu

0.3 g gümüş nitrat 200 mL suda çözölür ve üzerine 150 µL formaldehit ilave edilir.

3.1.2.11.4. Geliştirme solüsyonu

13 g potasyum karbonat 125 mL distile suda çözölür ve üzerine 20 µL % 10'luk tiyosülfat ve 40 µL formaldehit eklenir.

3.1.2.11.5. Durdurma solüsyonu

4 g Tris 98 mL distile suda çözölür ve üzerine 2 mL asetik asit ilave edilir.

3.1.2.12. Triton X-100 (%0.25 v/v) çözeltilisi

Zimogram analizinde elektroforezden sonra renatürasyon amacıyla kullanılmıştır (Ferrero ve ark., 1996).

3.1.3. DEAE-sepharose kolon kromatografisi solüsyonları

0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 1M ve 2 M olarak ayrı ayrı hazırlanan NaCl çözeltileri DEAE Sepharose kolondan sırasıyla geçirilir.

3.1.4. Enzim inhibitörleri ve metal iyonları solüsyonları

Enzim inhibitörleri ve metal iyonlarının keratinolitik aktivite üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla çeşitli kimyasallar çizelge 3.9.'da gösterildiği gibi enzim solüsyonuna 2 farklı konsantrasyonda ilave edilmiştir (Yuli ve ark., 2004; Suntornsuk ve ark., 2005; 2006; Balaji ve ark., 2008).

Çizelge 3.9. Kullanılan Metal İyonları, İnhibitörler, Deterjanlar, Şelatörler ve Konsantrasyonları

Metal İyonları	Konsantrasyon
CaCl ₂	1-5 mM
FeCl ₃	1-5 mM
ZnCl ₂	1-5 mM
PMSF	1-5 mM
EDTA	1-5 mM
Titon X-114	% 1
SDS	% 1
1-10 phenanthroline	1-5 mM

3.1.5. Selofan band

Trichophyton sp. izolasyonu sırasında kültürde üreyen mantar kolonisinin mikroskopik olarak identifikasyonu amacıyla kullanılmıştır (Toraman, 2003).

3.1.6. Laktofenol pamuk mavisi boyası

Trichophyton sp. İzolasyonu sırasında üreyen mantar kolonilerini boyayarak mikroskopik olarak identifikasyonu sağlamak amacıyla kullanılmıştır (Toraman, 2003).

Çizelge 3.10. Laktofenol pamuk mavisi boyası içeriği

Bileşimi	g/L
Laktik asit	20
Fenol kristalleri	20
Gliserin	40
Distile su	20
Pamuk mavisi (% 1)	2

3.2. METOT

3.2.1. *Trichophyton sp.* İzolasyonu

KSÜ tıp fakültesi dermatoloji polikliniğine başvuran ve mantar infeksiyonu taşıyan hastalardan deri ve saç kazıntı örnekleri alındı. Deri lezyonlarından steril bistüri ile steril kaplara alınan kazıntı örnekleri, saç lezyonlarında ise sağlam dokulara ulaşıncaya kadar alınan kazıntı örneklerinin parçaları incelendi. Alınan örnekler direkt mikroskopik incelendikten sonra Sabouraud dekstroze agar besiyerlerinde kültürleri yapıldı.

3.2.1.1. Örneklerin direkt mikroskopik olarak incelenmesi

Temiz bir lam üzerine % 15'lik KOH çözeltisinden bir iki damla damlatıldıktan sonra saç ve deri kazıntı örnekleri konularak lamel kapatıldı. Oda ısısında 20-25 dakika bekletildi, daha sonra mikroskopta hif parçaları, artrosporlar ve blastosporlar araştırıldı. Mikroskopta önce 10'luk sonra 40'luk büyültmede incelendi. Mantar elemanları gözlenen örnekler pozitif, görülmeyenler negatif olarak değerlendirildi (Toraman, 2003).

3.2.1.2. Örneklerin ekilmesi ve kültürü

Sabouraud dekstroze agar besiyerlerine delme yöntemiyle 3'lü ekim yapıldı. Kültürler inkübasyon sırasında haftada 2-3 kez kontrol edildi. Ekim yapılan kültürlerden ikisi oda sıcaklığında, biri ise 37°C'de en az 4 hafta bekletildikten sonra değerlendirilmeye alındı (Tümbay, 1983).

3.2.1.3. Kültürde üreyen mantar kolonisinin identifikasyonu

3.2.1.3.1. Koloninin makroskopik incelenmesi

Ekimi yapılmış kültürler inkübasyon süresi sonunda yüzeysel(havasal) miçel ve taban rengi, yüzey örgüsü (çıplak, mumsu, pudramsı granüler süet benzeri, kadifemsi, tüylü, kabarık) topografisi (düz,kabarık, dağınık), koloninin büklüm şekli (ışınsal, beyin krateri gibi) ve üreme hızına göre incelendi (Toraman, 2003).

3.2.1.3.2. Selofan band ile yapılan preparasyon

Preparasyonda kullanılacak selofan band lamdan daha kısa kesildi. Selofan bandın yapışkan yüzü koloninin yüzeyine bastırılarak çekildi. Lam üzerine konulan bir damla

laktofenol pamuk mavisi boyası üzerine selofan band sıkıca yapıştırılarak mikroskopta incelendi. (Toraman, 2003).

3.2.1.3.3. Lam kültürü

Petri kabı içine V şeklinde olan bir cam çubuk yerleştirildi. Üzerine bir lam yerleştirildi ve steril edildi. SDA'dan 1×1 cm ebadında kesilerek lam üzerine yerleştirildi. Steril iğne öze ile hif parçalarından alınarak besiyerinin kıyısının orta kısmına ekim yapıldı. Steril lamelden alınarak üzerine kapatıldı. Besiyerinin kurummasını engellemek için petri kabının içine uygun miktarda distile su konuldu. Üreme görüldüğünde lamel pens ile alınarak bir damla laktofenol pamuk mavisi konulmuş lam üzerine kapatıldı. Daha sonra preparat mikroskopta incelendi (Toraman, 2003).

3.2.2. *Trichophyton* sp. geliştirilmesi

Tespit edilen *Trichophyton* sp. suşları geliştirilmek amacıyla sıvı kültüre (SDB) aseptik teknikler gözönünde bulundurularak ekim yapılmıştır. Ekimin ardından 30°C de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Tanış ve Cihangir, 2009).

3.2.3. Keratinaz enziminin üretilmesi

Keratinaz enzimi üretmek amacıyla sıvı kültürde gelişen örnekten enzim üretimi için hazırlanan 100 mL'lik mineral besiyerlerine 0.1 mL olarak steril koşullarda ekim yapılmıştır. Ekimin ardından 30°C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür içeriği ve fungus hifaları (Whatman No:1) süzülerek enzimden ayrılmıştır (Tanış ve Cihangir, 2009)

3.2.4. Maksimum kazeinolitik aktivite gösteren suşun seçilmesi

Ayrıştırılan süpernatantlardan skim-milk agara 100'er µL damlatılarak kazeinolitik aktivite baz alınarak keratinolitik aktivite yorumlanmıştır. Besiyerinde en büyük zon oluşturan suş kazeinolitik aktivite yönünden maksimum kabul edilmiş dolayısıyla en iyi keratinolitik aktivite gösteren suş seçilmiştir.

3.2.5.Keratinolitik aktivitenin belirlenmesi

Keratinaz aktivitesini belirlemek amacıyla substrat olarak -20°C’de dondurulmuş ve mümkün olduğu kadar küçük parçalara ayrıldıktan kullanıma hazır hale getirilen keratin azure (Sigma Chemical, St, Louis, MO, USA) kullanılmıştır. Aktivite kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (Suntornsuk ve Suntornsuk, 2003; Letourneau ve ark., 1998; Akan, 2010). Keratin azure 4mg/mL konsantrasyonda 0.01 M sodyum-fosfat (pH: 7.5) tamponunda hazırlanmıştır (Esawy, 2007).

Reaksiyon karışımı

Enzim solüsyonu 1 mL

Keratin azure çözeltisi 1 mL

Reaksiyon 37°C’de 150 rpm ‘de 1saat inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra 4000 g’de, +4°C’de, 15 dakika santrifüj edilerek keratin azure uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1mL alınarak spektrofotometrede 595 nm’de okunup serbest kalan azoboyası ölçülmüştür. Tüm denemeler 3’lü tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bir ünite (U) keratinaz verilen koşullarda, 1 saatte 595 nm’de örnek ve kontrol arasında 0.1absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6.Keratinaz aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

Kısmi saflaştırma yöntemi ile elde edilen enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için öncelikle sitrat tamponu (pH: 4.0-5.6), ardından sodyum fosfat tamponu (pH: 6.0-7.5) son olarak da tris tamponu (pH: 8.0-9.0) hazırlanmıştır. Ardından keratin azure substrat olarak kullanılarak 1000 µl enzim ve 1000 µl substrat karışımı 1 saat inkübasyona bırakılmıştır inkübasyon süresinin ardından aktivite spektrofotometrik olarak 595 nm’de okunup grafiksel olarak ifade edilmiştir. (Letourneau ve ark, 1998; Gradisar ve ark, 2000; Balaji ve ark, 2008; Lateef ve ark, 2010).

3.2.7.Sıcaklığın keratinaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

1000 µl enzim ve 1000 µl substrat karışımı farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 37, 40, 45°C) 1 saat inkübasyona bırakılmıştır İnkübasyonun sonunda aktivite spektrofotometrik yöntemle 595 nm’de okunmuştur ve keratinaz aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklık seçilmiştir (Bockle ve ark., 1995; Letourneau ve ark., 1998;Gradisar ve ark., 2000; Balaji ve ark., 2008; Lateef ve ark., 2010).

3.2.8. Termal stabilite

1000 µL enzim 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde 30 dakika bekletildikten sonra, üzerine 1000 µL substrat eklenmiştir ve 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun ardından keratinolitik aktivite ölçülmüş, kontrol olarak kullanılacak grupta ise enzimin orijinal aktivitesini tespit etmek amacıyla ön inkübasyona tabi tutulmamıştır. Enzim ve substrat karıştırılmış ve optimum sıcaklıkta (37°C) aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzimin kalan aktivitesi saptanmıştır (Letourneau ve ark., 1998; Esawy, 2007)

3.2.9. pH stabilite

Enzim örneği farklı pH'lardaki tamponlar (4.0- 9.0) ile karıştırılarak 30 dakika 37 °C bekletilmiş ardından, 1000 µL substrat eklenerek 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun ardından 595 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Esawy, 2007).

3.2.10. Keratinaz aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi

Enzim aktivitesindeki etkilerini saptamak amacıyla belirlenen kimyasallar 1mM ve 5mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda enzime ilave edilerek 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1 saatlik standart enzim substrat karışımının inkübasyonun ardından keratinolitik aktivite tayini yapılarak enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir (Letourneau ve ark., 1998; Bressollier ve ark., 1999; Allpressve ark., 2002).

3.2.11. Enzimlerin kısmi saflaştırılması

3.2.11.1. Enzim örneklerinin amonyum sülfat tuzu ile fraksiyonel presipitasyonu

20 mL enzim örneği alınıp www.enchorbiotechnology.com adresi baz alınarak belirtilen miktarlarda amonyum sülfat tuzu ile + 4 °C'de fraksiyonel presipitasyona bırakılmıştır. Enzimler %40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'luk konsantrasyonlarda fraksiyonel olarak ayrı ayrı toplanmıştır. Her bir grup 4 °C'de, 4020 g'de, 20 dk santrifüj (Hettich; MICRO 22R) edilmiştir ve pellet toplam 3 mL optimum pH tamponu ile çözülüp daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere - 20° C'de saklanmıştır.

3.2.11.2. Enzimlerin diyaliz edilmesi

Enzim örnekleri uygun koşullarda yıkanarak hazırlanan hazırlanan diyaliz torbalarına %40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'luk fraksiyonel olarak ayrı ayrı bırakılmış ve optimum pH tamponunda günde 5-6 kez değiştirilerek bekletilmiştir.

3.2.11.3. Diyaliz edilen enzim örneklerinin aktivite kontrolünün yapılması

% 1.5 agar ve % 0.8 skim-milk içeren besiyerlerine diyalize edilen enzimlerden 100 µl damlatılarak 2 saat inkübasyona bırakılmıştır ve aktivite kontrolü yapılmıştır.

3.2.11.4. Enzim örneklerinin sephadeks G 100 kolondan geçirilmesi

Aktivite kontrolünün ardından fraksiyonlara SDS page uygulanıp bant sayısı en az görülen fraksiyon seçilmiştir ve ardından Sephadex G 100 kolondan geçirilmiştir. Öncelikle enzim örneğinden 0.5 mL alınarak Sephadex G 100 (sigma) kolona bırakılmıştır ve enzim örneğinin kolona tamamen absorblanmasıyla beraber optimum pH tamponu olan pH 7.5 tampon kolona ilave edilmiştir ve bu şekilde eluatlar her biri 1'er mL olmak üzere 70 fraksiyonda toplanmıştır. Her bir fraksiyonun aktivite kontrolü öncelikle skim milk agarda yapılmıştır aktivite görülen fraksiyonlar bir araya getirilerek SDS page yapılmıştır.

3.2.11.5. Enzimlerin DEAE-sepharose kolondan geçirilmesi

Enzimler Sephadex G-100 kolon kromatografisi ve ardından aktivite kontrolünün yapılmasından sonra toplanan fraksiyon daha fazla saflaşmanın sağlanabilmesi adına DEAE-Sepharose kolondan geçirilmiştir.

Öncelikli olarak 0.5 mL enzim örneği hazırlanmıştır ve hazırlanan örnek DEAE-sepharose (Sigma) kolonun içine ilave edilmiştir ve üzerine 4 mL optimum pH tamponu eklenerek kolondan geçirilmiştir. Daha sonra sırasıyla 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 ve 2 Molarlık NaCl çözeltisi ile örnekler toplanmıştır.

3.2.12. SDS-PAGE sisteminin hazırlanması

Ayırıcı jel (% 10):

Çizelge 3.10. Ayırıcı jelin bileşimi (BIORAD)

Solüsyonlar	Miktar(mL)
dH ₂ O	4.1
Sol A	3.3
Sol B	2.5
% 10 SDS	0.1
AMPS	0.1
TEMED	0.01

Dengeleyici jel (% 4) :

Çizelge 3.11. Dengeleyici jelin bileşimi(BIORAD)

Solüsyonlar	Miktar(mL)
dH ₂ O	6.1
Sol A	1.3
Sol C	2.5
%10 SDS	0.1
AMPS	0.1
TEMED	0.01

% 10'luk ayırıcı jel belirlenen oranlarda hazırlanır SDS page kasetine polimerize olmak üzere dökülür. Dengeleyici jelin dökülmesinin ardından jel tarakları dikkatlice yerleştirilir ve jel polimerize olmak üzere beklenir.

3.2.13. Enzim örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütülmesi

Örnek yükleme tamponu ile örnek dikkatli bir şekilde kuyucuklara yüklenir. Elektroforez işlemlerinde ayrıca moleküler ağırlıkları saptamak için ilk kuyucuğa içeriği ve moleküler ağırlığı bilinen protein standart'ı (marker) yüklenir. Örnek yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez (Major science MP-300 V) uygulaması başlatılır.

3.2.14.SDS-PAGE jelinin boyanması

Elektroforezin tamamlanmasının ardından jel kasetten dikkatli bir şekilde çıkarılır ve SDS jel boyama solüsyonuna (staining) alınıp 1 saat oda sıcaklığında bekletilir. Sürenin sonunda jel birkaç kez saf sudan geçirilir ve daha sonra da jelden fazla boyanın uzaklaştırılması için jel boyayı geri alma solüsyonuna (destaining) bırakılır .

3.2.15. Gümüş boyama

Proteinlerin boyanması için oldukça duyarlı bir boyama metodudur. Elektroforezin tamamlanmasının ardından cam plakalar arasından dikkatlice alınan jel daha sonra fiksasyon solüsyonunda oda sıcaklığında 1 gece bekletilir, bunun ardından jel 10 dk saf suda bekletilir ve bu işlem 3 kez tekrarlanır. Daha sonra jel hassaslık artırıcı solüsyonda 2 dk hafif çalkalanarak bekletilir. Jelin üzerine gümüş boyama solüsyonu dökülerek 2-3 saat bekletilir. Bu sürenin ardından bu solüsyon da uzaklaştırılarak jel 1 kez sudan geçirilir. Daha sonra geliştirme solüsyonundan jelin üstüne dökülür ve bantlar belli oluncaya kadar bekletilir.

3.2.16. Zimogram analizi

Zimogram analizi için % 10 'luk ayırıcı jele içerisine AMPS eklenmeden hemen önce yani jel polimerize olmaya başlamadan % 0.1 'lik kazein eklenerek hazırlanır. Elektroforezin ardından jel 1 saat % 0.25 'lik Triton X-100 ile yıkanır ve ardından proteoliz için pH 7.5 tampon içerisinde 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından Coomassie Blue R250 ile boyanıp(staining) daha sonra jelden metanol, asetik asit, distile su karışımıyla boya geri alınır (destaining) (Ferrero ve ark.,1996).

3.2.17. Enzimin tüy parçalama yeteneğinin araştırılması

Enzimin tüy (tavuk tüyü) parçalama yeteneğinin araştırılması için 10 mL enzim örneği 5 deney tüpüne ayrı ayrı eklenmiştir. Herbirinin içerisine ayrı ayrı 1'er tane tavuk tüyü eklenmiştir ve deney tüpleri 37 ° C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

1. tüp 3 gün, 2. tüp 6 gün, 3. tüp 9 gün, 4. tüp 12 gün, 5. Tüp 15 gün süreyle olmak üzere farklı periyotlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüylerdeki parçalanma oranlarına göre yorum yapılmıştır (Thys ve ark., 2004)

4 BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Trichophyton sp.* suşlarının geliştirilmesi

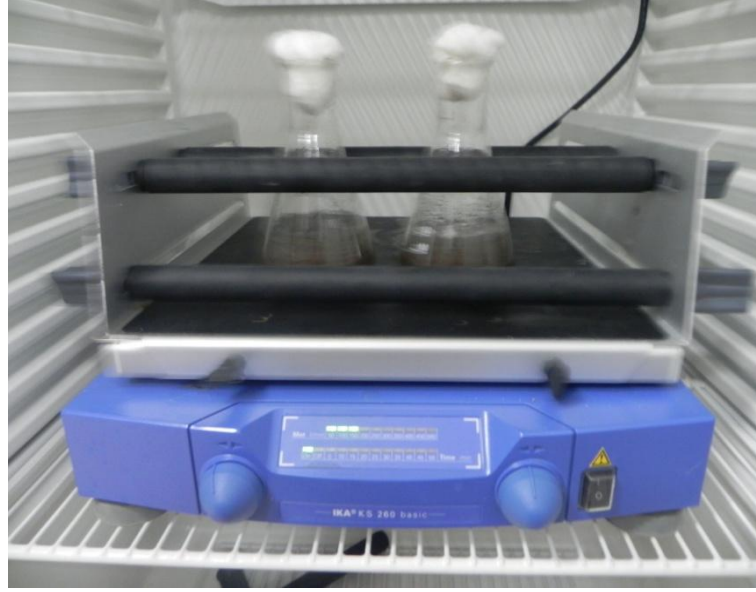
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi dermatoloji polikliniğinden elde edilen *Trichophyton sp.*'ye ait Tr-2, Tr-3, Tr-5, Tr-7, Tr-9 numaralı suşlar geliştirilmek amacıyla sıvı stok kültüre (SDB) ekim yapılmıştır. Ekimin ardından 30°C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Tanış ve Cihangir, 2009)



Şekil 4.1. Gelişen *Trichophyton sp.* suşlarının inkübatördeki görüntüsü

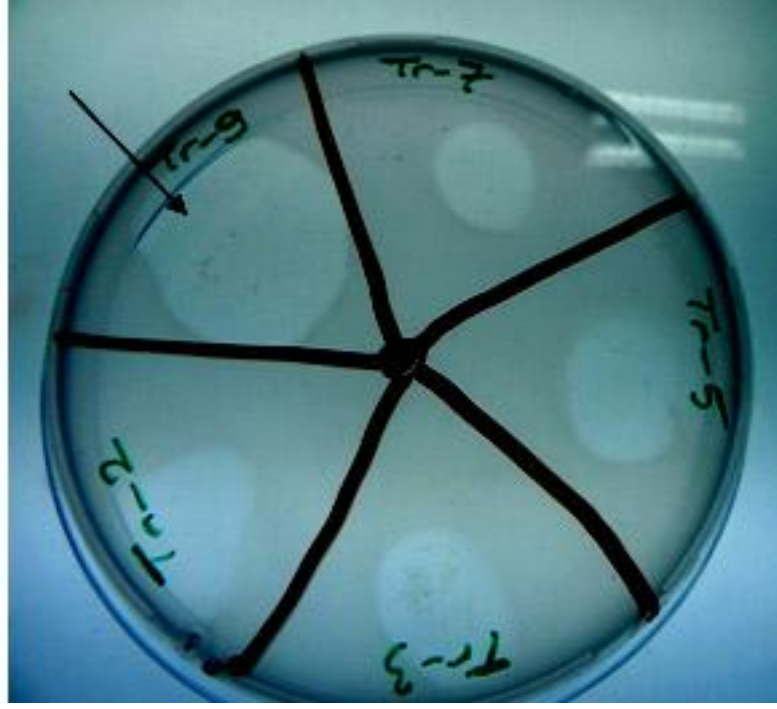
4.2. Enzim Üretimi ve Maksimum Enzim Üreten Suşun Seçilmesi

Gelişen suşlardan enzim üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi ve en iyi enzim üreten suşun belirlenebilmesi için keratinaz üretimine uygun özel enzim üretme besiyeri olan mineral besiyerine farklı periyotlarda inkübasyon yapılmıştır. Her bir suş sırasıyla 5, 7, 10, 12, 14 günlük inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.2. Mineral besiyerinde keratinaz enzimi üretimi

İnkübasyonun ardından her bir örnek filtre edilmiş ve elde edilen süpernatantlardan keratinaz aktivite tayini yapılmıştır. Bu amaçla skim milk agara her bir örnekten ayrı ayrı 100µl damlatılmıştır. Sonuçlara göre keratinolitik aktivite hakkında yorum yapılmıştır. 10 günlük inkübasyon sonucunda her bir suş için keratinaz üretiminin maksimum olduğu görülmekle beraber en fazla kazeinolitik aktivite Tr-9 suşunda görülmüş ve keratinaz üretimi için en uygun suşun Tr-9 suşu olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara Tr-9 suşu ile devam edilmiştir.



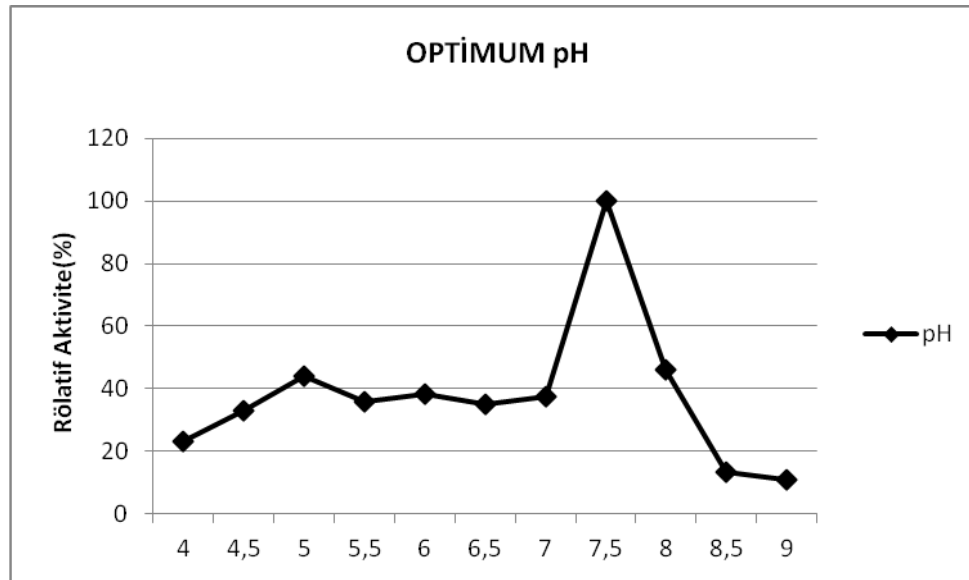
Şekil 4.3 Tr-9 suşundan izole edilen süpernatantın skim milk agardaki kazeinolitik etkisi

4.3. Tr-9 Keratinaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

Tr-9 suşuna ait süpernatant filtre edildikten sonra ultra santrifüj tüpler ile 4000g'de ,+4°C'de, 20 dk. santrifüj edilmiş ve yoğunlaştırma sağlanmıştır. Yoğunlaşan enzim örnekleri -20°C'de saklanmış ve bundan sonraki çalışmalar için kullanılmıştır.

4.3.1. Tr-9 Keratinaz enziminin optimum pH aralığı

Tr-9 keratinaz enzimi farklı pH aralıklarında tampon sistemleri kullanılarak; Sitrat (pH: 4.0-5.5), Sodyum Fosfat (pH: 6.0-7.5), Tris (pH:8.0-9.0) tampon sistemleri ile aktivite analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.4. Tr-9 Keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerine ait sonuçlar

Tabloya göre Tr-9 keratinaz enziminin rölatif aktivitesi pH 4.0-5.0 arası artış göstermektedir, pH 5.0'de rölatif aktivite %50 civarında gözlenmiştir. pH 5.5-6.0-6.5-7.0 aralıklarında ise rölatif aktivite de belirgin bir değişim olmamakla beraber pH 7.5 değerinde ise rölatif aktivite %100'e ulaşmıştır. pH 8.0'den sonra ise rölatif aktivitede belirgin bir düşme başlamıştır pH 9.0 dolaylarında rölatif aktivite % 10 gibi bir değer almıştır.

Bu sonuçlar ışığında Tr-9 suşunun optimum pH değeri 7.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarımızın bundan sonraki adımlarında Tr-9 suşunun keratinaz enzimi için optimum pH 7.5 değeri baz alınıp yapılan çalışmaya bu doğrultuda devam edilmiştir.

Literatüre bakıldığında keratinazların birçoğunun alkali ve nötral pH aralığında aktif olduğu görülmektedir nadiren asidik pH aralıklarında aktiftirler (Takami ve ark., 1999).

Trichophyton mentagrophytes'den keratinolitik proteaz izole eden Yu ve ark. (1971) elde ettikleri 2 protein bandından ilkinin optimum pH değerini yapılan çalışmayla benzer şekilde 7.0 olarak saptamışlardır. İkincisinin optimum pH değerini ise farklı olarak 9.5-9.8 aralığında saptamışlardır. Asahi ve ark. (1985), ise *Trichophyton rubrum*'dan elde ettikleri proteazın optimum pH değerini bu çalışmaya paralel olarak 7.8 olarak saptamışlardır. McKerrow ve Apodaca, (1985) ise *Trichophyton rubrum* ile yaptıkları diğer bir çalışmada enzimin optimum pH değerini 8.0 olarak saptamışlardır. Benzer olarak Bernal ve ark. (2003), *Kocuria rosea*'dan elde ettikleri keratinazın optimum pH değerini 8.0 olarak saptamışlardır. Riffel ve ark. (2003), keratinolitik bakteri *Chryseobacterium* kr6 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum pH değerini çalışmayla aynı değer olan 7.5 olarak saptamışlardır.

Lee ve ark. (2004), *Paracoccus* sp. WJ-98 suşundan elde edilen keratinazın optimum pH değerini nötrüye yakın 6.8 olarak saptamışlardır. Paralel bir çalışmayla Gradisar ve ark. (2005), *Paecilomyces marquandi*'den elde edilen keratinazın ve *Doratomyces microsporus*'dan elde edilen keratinazın optimum pH değerlerinin her 2 keratinaz içinde pH 8.0 dolaylarında olduğunu bildirmişlerdir. Raju ve ark. (2007), ise dermatofit fungus *Microsporum gypseum*'dan izole edilen keratinazın optimum pH değerini 8.0 olarak bulmuşlardır.

Anbu ve ark. (2008), *Trichophyton* sp. HA-12 suşundan elde edilen ekstraselüler keratinazın optimum pH değerini bu çalışmayla hemen hemen aynı değer olan 7.8 olarak tespit etmişlerdir. Balaji ve ark. (2008), ise *Bacillus subtilis* MTCC (9102)'den elde edilen keratinaz enzimi için optimum pH değerini 6.0 olarak bulmuşlardır. Kalpana ve ark. (2008), *Aspergillus flavus*'un optimum proteaz üretme aralığının benzer olarak pH 7.0 dolaylarında olduğunu belirtmişlerdir.

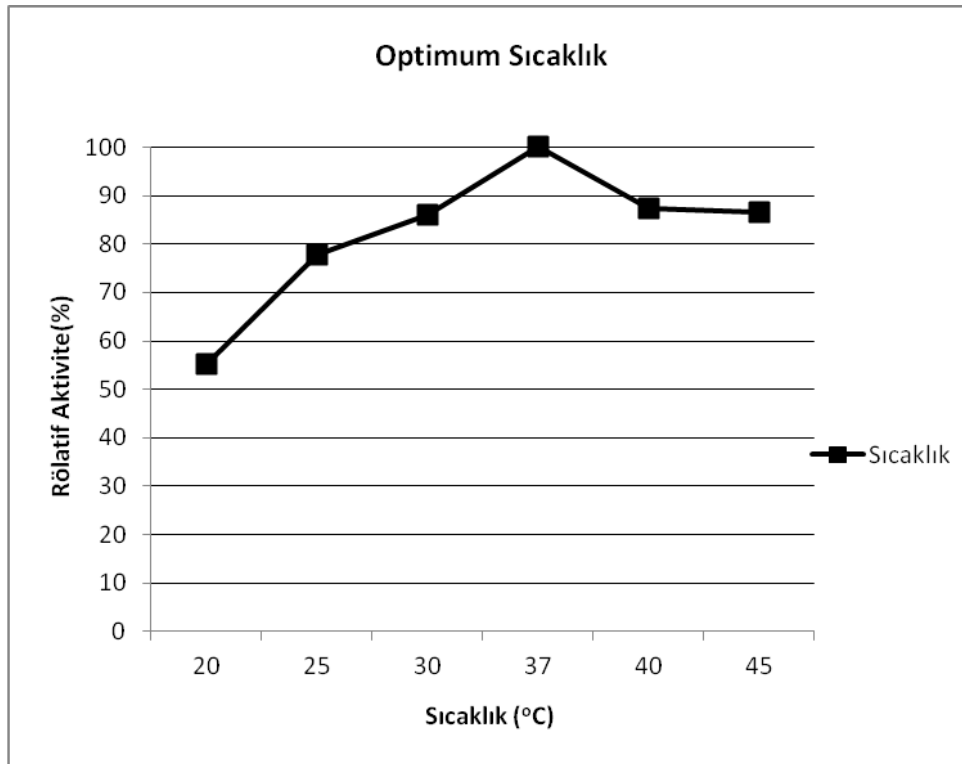
Bunlardan farklı olarak Cai ve Zheng, (2009), *Bacillus subtilis* KD-N2 suşundan elde edilen keratinazın optimum pH değerini 8.5 olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde

Correa ve ark. (2010), *Bacillus* sp. P7 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum pH değerini 9.0 olarak saptamışlardır. Cedrola ve ark. (2012), ise *Bacillus subtilis* SLC suşundan elde ettikleri keratinazın optimum pH değerini 10.0 olarak saptamışlardır. Kumar ve ark. (2012), tüy parçalama yeteneğinde olan bakteriden izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini 7.0 bulmuşlardır.

Bu sonuçlar ışığında Tr-9 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 7.5 olarak tespit edilmiştir. Tr-9 keratinaz enziminin nötre yakın alkali özellik gösterdiği görülmektedir bu açıdan bakıldığında çoğu keratinazla uyum göstermektedir.

4.3.2. Tr-9 keratinaz enziminin optimum sıcaklık aktivitesi

Tr-9 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenebilmesi amacıyla 20-45°C aralığında aktivite analizleri yapılmıştır. Bu analizler için kullanılan substrat optimum aktivitenin gerçekleştiği pH: 7.5 değerinde hazırlanmıştır. Analizler için kullanılan inkübasyon süresi 60 dk olarak seçilmiştir. Enzim denemeleri sonucunda çıkan değerler şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Tr-9 keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine ait sonuçlar

Tr-9 Keratinaz enzimine ait tablodaki bulgulara göre enzim 20°C'de %52 rölatif aktivite gösterirken daha sonraki sıcaklık değerlerinde kademeli bir artış göstermiş ve 37°C'de ise %100'e ulaşmıştır, 37°C'den sonra ise rölatif aktivitede düşme yaşanmıştır.

Bu veriler doğrultusunda Tr-9 Keratinaz enziminin optimum sıcaklık değeri 37°C olarak tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda optimum inkübasyon sıcaklığı olarak 37°C kullanılmıştır.

Keratinaz enzimi ile yapılan diğer optimum sıcaklık çalışmalarında ise; *Aspergillus fumigatus*'dan keratinaz izole eden Santos ve ark. (1996) enzimin optimum sıcaklığını farklı olarak 45°C olarak tespit etmişlerken, Qin ve ark. (1992) *Trichophyton schoenleinii*'den elde ettikleri keratinazın optimum sıcaklığını bu çalışmaya oranla yüksek bir değer olan 50°C olarak bulmuşlardır. Lee ve ark. (2002), ise *Bacillus sp.* SCB-3 suşuna ait keratinazın optimum sıcaklık değerini yakın bir değer olan 40°C olarak belirlemişlerdir. Farklı olarak, Nam ve ark. (2002), *Fervidobacterium islandicum* AW-1 suşundan elde edilen keratinazın optimum sıcaklığını ekstrem bir şekilde 100°C saptamışlardır. Riffel ve ark. (2003), *Chryseobacterium kr6* suşundan elde ettikleri keratinazın optimum sıcaklık değerini 55°C saptamışlardır. Coral ve ark. (2003), ise *Aspergillus niger* Z1 suşundan elde ettikleri proteazın optimum sıcaklığını 40°C olarak bulmuşlardır. Gradisar ve ark. (2005), *Paecilomyces marquandii*'den elde edilen keratinazın optimum sıcaklık değerini oldukça yüksek bir değer olan 60-65°C saptamışlardır aynı çalışmada *Doratomyces microsporum*'dan elde edilen keratinazın optimum sıcaklığını aynı şekilde 50°C olarak bulmuşlardır.

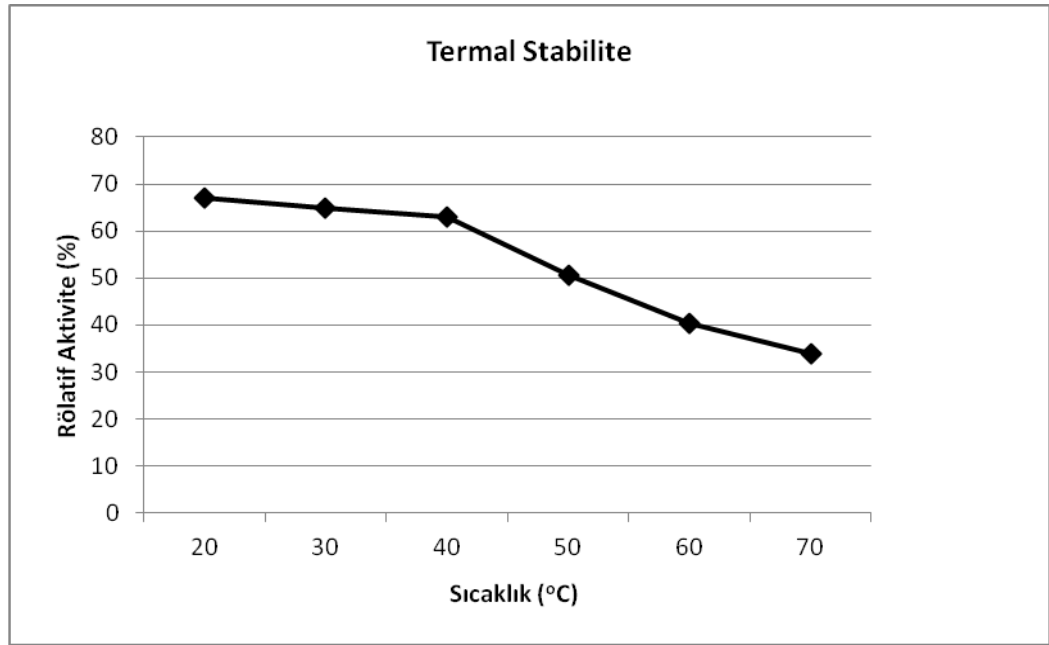
Benzer çalışmalar olarak, Anbu ve ark. (2005), *Scopulariopsis brevicaulis*'den elde ettikleri keratinazın optimum sıcaklığını çalışmamıza yakın bir değer olan 40°C saptamışlardır. Bernal ve ark. (2003), *Kocuria rosea*'dan elde ettikleri keratinazın optimum sıcaklık değerini paralel bir şekilde 40°C olarak saptamışlardır. Raju ve ark. (2007), ise Dermatofit fungus *Microsporum gypseum*'un izole edililerek keratinaz üretme potansiyelinin araştırıldığı çalışmada elde edilen keratinazın optimum sıcaklığını 35°C bulmuşlardır. Anbu ve ark. (2008), izole ettikleri *Trichophyton sp.* HÁ-2'den tanımladıkları keratinaz enziminin optimum sıcaklığını 40°C saptamışlardır.

Cao ve ark. (2008), *Trichoderma atroviride* F6'dan elde edilen keratinazın optimum sıcaklığının farklı olarak 50-60°C olarak saptamışlardır. Moreira ve ark. (2009) filamentöz fungus *Myrothecium verrucaria*'dan elde ettikleri keratinazın optimum

sıcaklığını bu çalışmayla aynı değer olan 37°C saptamışlardır. Kumar ve ark. (2012), tüy parçalama yeteneğinde olan bakteriden izole ettikleri keratinazın optimum sıcaklığını aynı değer olan 37°C olarak saptamışlardır. More ve ark. (2013), *Cunninghamella ecninulata*'dan saflaştırtıkları keratinazın optimum sıcaklığını 30 ve 60°C bulmuşlardır. Çalışmalara bakıldığında Tr-9 keratinaz enziminin optimum sıcaklığının bazı termofilik bakteriler dışında özellikle funguslar arasında ve diğer mezofilik karakterli bakterilerden elde edilen keratinazlarla tutarlı bir değer gösterdiği sonucuna varılabilir. Tr-9 Keratinaz enziminin insan ve hayvan vücut yüzeylerinde aktif olduğu düşünülecek olursa 37°C gibi bir optimum sıcaklık değerinin normal olduğu düşünülebilir. Ayrıca enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivitesi büyük çapta kaybolduğundan Tr-9 Keratinaz enziminin mezofilik karakterde bir enzim olduğu da söylenebilir.

4.3.3. Tr-9 Keratinaz enziminin termal stabilitesi

Tr-9 keratinaz enziminin termal stabilitesini tespit edebilmek amacıyla 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde 30 dk. ön inkübasyon uygulanmıştır daha sonraki aşamada ise enzimin optimum sıcaklığı olan 37°C'de ve optimum pH: 7.5 olan tampon –substrat kompleksi ile normal inkübasyon süresi olan 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen veriler şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Tr-9 keratinaz enzimine ait termal stabilite bulguları

30 dk. Ön inkübasyon süresinin ardından veriler yorumlanacak olursa; 20°C'de enzimin aktivitesinin % 70'e yakın korunduğu, 30°C'de % 65 korunduğu, 40°C'de % 63 oranında korunduğu 40°C'nin altındaki değerlerde ise enzim aktivitesinin kademeli olarak düştüğü görülmektedir. Sonuçlar doğrultusunda 20-40°C aralığında enzimin aktivitesinin % 60 üzerinde korunduğu söylenebilir.

Aspergillus niger Z1 suşundan keratinolitik proteaz karakterizasyon çalışmaları yapan Coral ve ark. (2003), bu çalışmadan farklı olarak enzimin 90 °C'ye kadar stabil olduğunu saptamışlardır. Bernal ve ark. (2003), farklı özellikte bir ekstraselüler keratinaz tanımlamışlar ve elde edilen keratinazın 10-60°C aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Anbu ve ark. (2008), ise *Trichophyton* HA-2 suşundan elde ettikleri ekstraselüler keratinazın 20-45°C aralığında stabil olduğunu bildirerek bu çalışmayla hemen hemen aynı

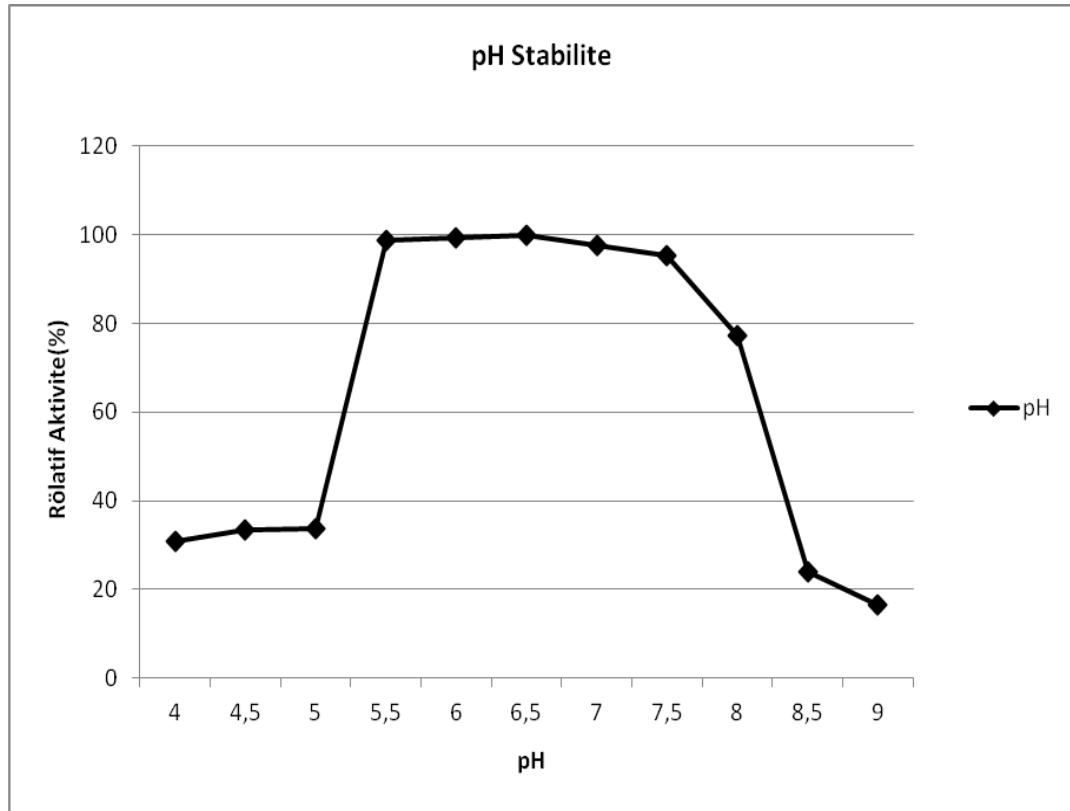
sonucu elde etmişlerdir. Moreira ve ark. (2009), Bitki patojeni fungus *Myrothecium verrucaria*'dan elde edilen keratinolitik bir proteazın 25-70°C aralığında etkin olduğunu saptamışlardır.

Mukherjee ve ark. (2011), Mutant *Brevibacillus* sp. AS-S10-II suşundan elde ettikleri alkalik β keratinazın benzer şekilde 25-55°C aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Bu sonuçlar doğrultusunda; Tr-9 keratinaz enziminin sıcaklığa duyarlı bir enzim olduğu yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonunun bozulduğu ve enzimin sıcaklık spektrumunun dar olduğu söylenebilir.

4.3.4. Tr-9 Keratinaz enziminin pH stabilitesi

Tr-9 Keratinaz enziminin pH stabilite çalışmaları amacıyla enzim pH: 4.0-9.0 aralığında olan tampon çözeltilerde 30 dakika, 37°C'de ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyonun ardından 37°C ve pH: 7.5 değerindeki substrat ile yapılan analiz sonuçları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



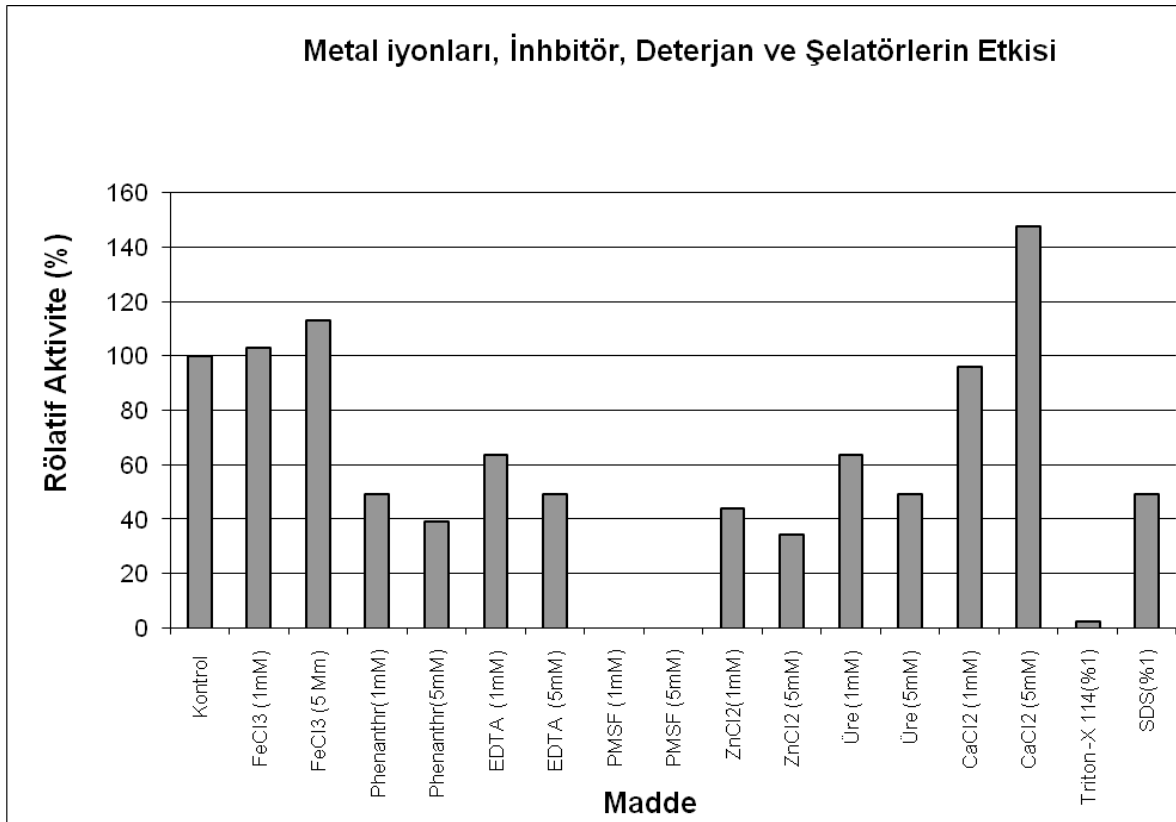
Şekil 4.7.Tr-9 keratinaz enziminin pH stabilite bulguları

Tr-9 Keratinaz enziminin 30 dakika ön inkübasyon ardından 1 saat normal inkübasyon işleminden sonra pH: 4.0-4.5-5.0 aralığında %30 dolaylarında aktivitesinin kaldığı pH 5'den sonra aktivitenin arttığı pH 5.5 'da %100'e ulaştığı görülmektedir. Enzimin pH: 5.5-7.5 aralığında aktivitesini yaklaşık olarak % 100 oranında koruduğu görülmektedir. pH 8.0'den itibaren enzimin aktivitesinde kademeli bir düşüş yaşanmaktadır öyle ki pH: 9.0 'da enzim aktivitesini %85 oranında kaybettiği görülmektedir.

Benzer şekilde, *Streptomyces pactum* DSM 40530'dan keratinaz enzimi izole eden Bockle ve ark. (1995), enzimin pH 7.0-10.0 aralığında stabil olduğunu saptamışlarken, Gradisar ve ark. (2005), keratinolitik fungus *Paecilomyces marquandi*'den elde ettikleri keratinazın pH 6.0-11.0 aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Anbu ve ark. (2008), izole ettikleri keratinazın pH 7.0-11.0 aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Moreira ve ark. (2009), filamentöz fungus *Myrothecium verrucaria*'dan elde edilen keratinazın pH 5.0-12.0 aralığında stabil olduğu bildirmişlerdir. Veriler doğrultusunda Tr-9 Keratinaz enziminin pH: 5.5-8.0 aralığında stabil bir enzim olduğu söylenilebilir.

4.3.5. Tr-9 keratinaz enzim aktivitesine metal iyonları, inhibitör, deterjanlar ve şelatörlerin Etkisi

İnhibitör, şelatör, metal iyonunları, deterjanların enzim aktivitesi üzerinde ne yönde etkili olduğunu saptamak amacıyla Tr-9 keratinaz enzimine çeşitli kimyasallarla muamele edilmiştir, aynı kimyasaldan 2 farklı konsantrasyonda (1mM, 5mM) olmak üzere 30 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Tr-9 Keratinazenzimi üzerine metal iyonları, inhibitör, deterjanlar ve şelatörlerin etkisi

Tablodaki verilere göre FeCl₃ ve CaCl₂ 'nin enzim aktivitesini hem 1mM hem de 5mM konsantrasyonlarda arttırdığı özellikle CaCl₂ 'nin 5mM konsantrasyonda aktiviteyi % 148 oranında arttırdığı görülmektedir, ZnCl₂'nin ise 1mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %56 oranında azalttığı, 5mM konsantrasyonda ise aktiviteyi %66 oranında azalttığı görülmektedir.

Non-iyonik deterjanlardan Triton-X 114 'ün % 1'lik konsantrasyonda enzimde % 98 gibi ciddi bir aktivite kaybına sebep olarak enzimi çok büyük çapta inhibe ettiği

görülmektedir. SDS'nin ise % 1 konsantrasyonda muamale sonrası ise enzimde % 51 oranında aktivite kaybına sebep olduğu görülmektedir.

PMSF 'nin ise enzimi tamamen inhibe ettiği görülmektedir, EDTA 1mM konsantrasyonda % 39 aktivite kaybına sebep olurken; 5mM konsantrasyonda % 51 aktivite kaybına neden olmuştur.

1-10 Phenanthroline Monohidrat ise 5mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %69 oranında düşürmüştür. Üre 1mM konsantrasyonda aktiviteyi % 36 oranında düşürürken; 5mM konsantrasyonda ise aktivite kaybını %51'e yükselmiştir.

PMSF tarafından çok ciddi bir şekilde inhibe edilen proteazların serin-proteazlar olduğu belirtilmiştir. Giongo ve ark. (2007), *Bacillus* türünden yeni tanımlanan keratinolitik enzimlerin büyük ölçüde PMSF tarafından inhibe edildiği ve bu nedenle enzimlerin serin-proteaz ailesine dahil olduğunu bildirmişlerdir. PMSF, Tr-9 keratinaz enzimini hem 1 mM hem de 5 mM konsantrasyonda % 100 inhibe ettiğinden enzimin serin tip proteaz olduğu sonucuna varılmaktadır. Fungi ve bakteriler tarafından serin proteazların yanı sıra metalloproteazların da üretilebildiği bilinmektedir (Frag ve Hassan, 2004; Riffel ve ark., 2003). Serin proteazlar için PMSF'nin ardından diğer bir inhibe edici kimyasalın da 1-10 Phenanthroline olduğu bildirilmiştir (Dozie ve ark., 1994; Riffel ve ark., 2003).

Genellikle yapılan çalışmalarda CaCl_2 gibi divalent katyonların keratinaz aktivitesini arttırıcı yönde etki yaptığı görülmektedir, bu durum sıklıkla bu metal iyonlarının enzimin konformasyonunu koruyabileceği ve enzimi denatürasyona karşı koruyabileceği fikriyle ilişkilendirilmiştir (Frag ve Hassan, 2004; Suntornsuk ve ark., 2005; Cao ve ark., 2009), bu sonuç ışığında Tr-9 keratinaz konformasyonunun CaCl_2 tarafından korunduğu düşünülebilir.

Apodaca ve McKerrow (1985), benzer sonuçlarla *Trichophyton rubrum*'dan izole ettikleri ekstraselüler proteaza 2mM CaCl_2 ile muameleyle paralel bir şekilde enzim aktivitesinde artış gözlemlemişlerken; enzimin PMSF ile inhibe edildiğini saptamışlardır. Asahi ve ark. (1985), *Trichophyton* sp'ye ait *Trichophyton rubrum*'un ürettiği ekstraselüler proteazın CaCl_2 ile benzer olarak aktivitesini arttırdığı, yine aynı çalışmada PMSF'nin ise aktiviteyi bu çalışmada olduğu gibi %95 gibi büyük bir oranında inhibe ettiği, 1-10 Phenanthroline Monohidratın ise enzim aktivitesinde düşüş meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde Tsuboi ve ark. (1989), ise *Trichophyton mentagrophytes*'den elde edilen ekstraselüler bir protezla yapılan bir çalışmada şu sonuçları tespit etmişlerdir; 1mM CaCl₂ 'nin enzim aktivitesini %220 arttırdığı, 1mM PMSF'nin enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği, bununla beraber 1mM ZnCl₂'nin enzim aktivitesinde % 56 azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 5mM EDTA'nın ise yapılan çalışmaya paralel bir şekilde enzimde % 41 aktivite kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir. Rojanavanich ve ark. (1990), *Hendersonula toruloidea* 'den elde edilen ekstraselüler proteazın PMSF tarafından benzer olarak güçlü bir şekilde inhibe edildiğini saptamışlardır. Gradisar ve ark., (2005), bu çalışmayla paralel sonuçlar elde ettikleri araştırmalarında *Paecilomyces marquandi* ve *Doratomyces microsporus*'dan elde edilen her 2 keratinazın da 1 mM PMSF varlığında tamamen aktivitesini kaybederken; 5mM EDTA ile *P. Marquandi*'ye ait keratinazda %30, *D. Microsporus*'da ise % 25 aktivite kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada %1 SDS'in *P. Marquandi*'ye ait keratinazda %71, *D. Microsporus*'da ise %77 aktivite kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Huang ve ark. (2003), *Bacillus pumilus* ile yaptıkları bir çalışmada elde edilen keratinazın PMSF ile tamamen inhibe olduğunu saptamışlardır. Moreira ve ark. (2007), *Myrothecium verrucaria*'dan elde edilen keratinolitik proteazın 1mM PMSF ile güçlü bir şekilde inhibe edildiği ve enzimin %80 dolaylarında aktivite kaybına uğratıldığını bununla beraber 5mM EDTA ile muamele edildiğinde ise enzim aktivitesinin % 40 dolaylarında azaldığını bildirmişlerdir. Enzimin PMSF ile güçlü bir şekilde inhibe edilmesi serin proteaz olduğu fikrini güçlendirmekle beraber EDTA ile kısmi inhibisyon görülmesi metalloproteaz olabileceğini düşündürmüştür. Bu durumun her zaman geçerli olmayacağıda belirtilerek bu kısmi inhibisyonu divalent katyonların sağlamış olabileceği belirtilip divalent katyonların stabiliteyi korumadaki önemine dikkat çekmişlerdir. Anbu ve ark. (2008), elde ettikleri ekstraselüler keratinazın çalışmamıza benzer şekilde PMSF tarafından tamamen, EDTA ile kısmen inhibe edildiği ve bu keratinazın serin tip proteaz olduğunu belirtmişlerdir.

Balaji ve ark. (2008), farklı olarak *Bacillus subtilis* MTCC(9102) suşuna ait ekstraselüler keratinaz aktivitesinin metalloproteaz inhibitörleri olan EDTA ve 1-10 phenanthroline ile muamele sonucu tamamen kaybolduğu belirtilerek enzimin bir metalloproteaz olduğu sonucuna varmışlardır. Kalpana ve ark. (2008), *Aspergillus niger*'le yapılan diğer bir çalışmada ise 5mM CaCl₂'nin yapılan çalışmayla benzer olarak alkalın proteaz aktivitesinde % 105 aktivite artışı sağladığını belirtmişlerdir. Benzer bir

çalışmayla; Moreira ve ark. (2009), elde ettikleri alkalın proteaza divalent katyonlardan CaCl_2 'nin aktive edici etkisi olduğunu saptamışlardır. Çalışmaları sonucunda 5mM CaCl_2 'nin enzim aktivitesini % 135 arttırdığı, ZnCl_2 'nin ise enzimde % 11 aktivite kaybına neden olduğu belirtilmiştir. Bununla beraber 1mM PMSF'nin enzim aktivitesinde büyük çapta azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Rai ve ark. (2009), yaptıkları diğer bir araştırmada ise *Bacillus subtilis* RM-01 suşundan elde edilen β keratinazın 1mM Fe^{+2} ile muamele sonrasında aktivitesinde % 50 artış gösterdiği, PMSF kimyasalının 1mM konsantrasyonunda ise yaklaşık % 90 aktivite kaybı meydana getirdiği sonucuna ulaşmışlardır. Syed ve ark. (2009), *Streptomyces gulbargensis*'den elde edilen keratinaza 5mM EDTA ile yapılan muamelede enzimin aktivitesinde yaklaşık olarak %13 'lük bir aktivite kaybı olduğunu bildirmişlerdir.

Paralel bir çalışmayla; Dubey ve ark. (2010), *Aspergillus niger*'den elde edilen alkalın proteazın; PMSF, SDS, EDTA ile inhibe edildiği, CaCl_2 ile ise tam tersi yönünde proteazın aktivitesinde artış gözlemlendiğini saptamışlardır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak proteazın serin tip proteaz olduğu sonucuna varmışlardır. Prakash ve ark. (2010), Elde ettikleri 2 ayrı keratinazın her ikisinde tıpkı bu çalışmada olduğu gibi 1 mM PMSF varlığında tamamen inhibe olduğu, 10 mM 1,10 phenanthroline ile keratinaz 1'in %3, keratinaz 2 'nin de %3 aktivite kaybına uğradığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 1 mM CaCl_2 varlığında %100 aktivite sağlandığı, 10 mM EDTA ile sırasıyla % 5 ve % 10 aktivite kaybı olduğunu bildirmişlerdir. Cedrola ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* SLC suşundan elde edilen keratinazın PMSF ile benzer şekilde büyük çapta inhibisyona uğradığı ve enzimin serin tip proteaz olduğunu bildirmişlerdir. More ve ark. (2013), *Cunninghamella echinulata*'dan elde edilen keratinazın PMSF ile inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bu inhibisyonu enzimin serin proteaz olmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Tr-9 Keratinaz enziminin, serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile inhibe olması enzimin serin tip proteaz olduğunu göstermektedir, enzime ait bulgular diğer serin tip proteazlara ait sonuçlarla büyük paralellik göstermektedir, ayrıca bir metalloproteaz inhibitörü olan EDTA ile kısmi inhibisyon göstermesi bu fikri güçlendirmektedir.

4.4.Tr 9 Keratinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

4.4.1.Enzim örneklerinin amonyum sülfat tuzu ile fraksiyonel presipitasyonu

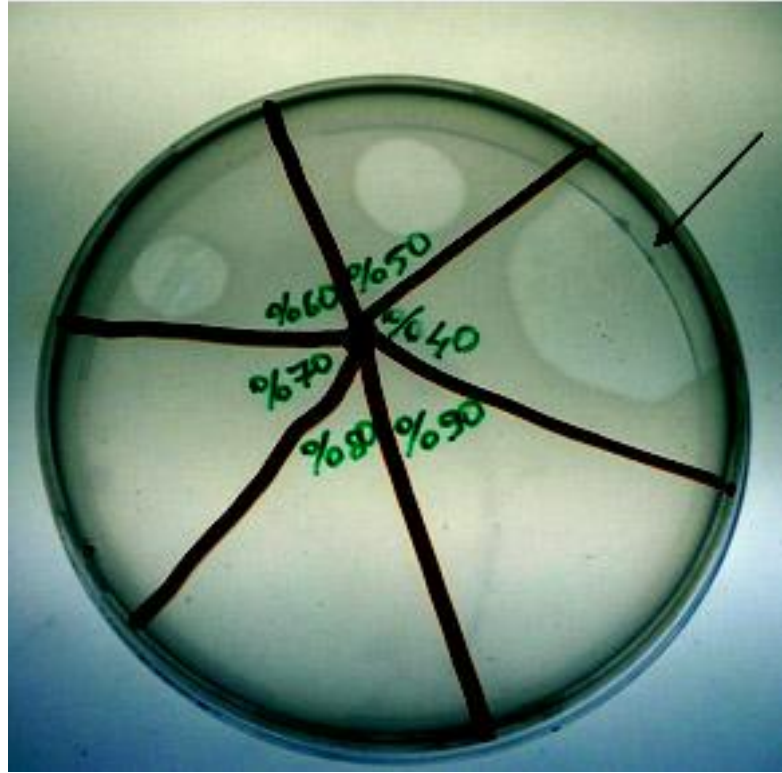
Kısmi saflaştırma işlemlerine ilk olarak amonyum sülfat tuzu ile fraksiyonel presitasyon ile başlanmıştır. Bu amaçla Tr-9 keratinaz enziminden 20 mL alınıp, istenilen konsantrasyon göz önünde bulundurularak bu miktara karşılık gelen amonyum sülfat tuzu ile biraraya getirilip optimum pH tamponuna (pH:7.5) bırakılmıştır. Presipitasyona bırakılan enzim örnekleri % 40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'lık fraksiyonlar halinde hergün ayrı ayrı toplanmıştır.

4.4.2. Enzim örneklerinin diyaliz edilmesi

Amonyum sülfat tuzu ile presipite edilen enzim gruplarını (% 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90) tuzdan arındırabilmek amacıyla her bir grup diyaliz torbasına ayrı ayrı bırakılmıştır. Diyaliz torbaları pH: 7.5 sodyum fosfat tamponuna bırakılarak + 4 °C'ye yerleştirilmiştir. Tamponlar günde 5-6 kez değiştirilmiştir.

4.4.3. Diyaliz edilen enzim örneklerinin aktivite kontrolünün yapılması

Diyaliz edilen enzimlerin aktivite kontrolünün yapılması için distile suda hazırlanan % 1 'lik skim-milk ve % 1.5 agar içeren besiyerlerine 100 µl enzim damlatılarak 2 saat ve 37 °C'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonucunda en fazla aktivite gösteren grup % 40 'lık grup olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Maksimum aktivite gösteren % 40 'lık diyaliz örneklerinin skim-milk agardaki görüntüsü.

4.4.4. Petride aktivite gösteren enzimlerin sephadeks G-100 kromatografisinden geçirilmesi

% 40'lık amonyum sülfat ile elde edilen enzim ekstra saflaştırma için sephadeks G-100 kolon kromatografisinden geçirilmiştir. Sonuçlar SDS page sonrası yapılan gümüş boyamayla kıyaslanmıştır (Şekil 4.11)

4.4.5. Enzimin DEAE-sepharose kolondan geçirilmesi ve aktivite kontrolü

Aktivite gösteren enzim fraksiyonları DEAE-sepharose kolondan geçirilmiştir. Öncelikle 0,5 mL enzim örneği DEAE-sepharose kolona eklendikten sonra sırasıyla; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 ve 2 M'lık NaCl çözeltileri kolona eklenmiştir. Öncelikli olarak üst sıvı olmak kaydıyla her konsantrasyondaki eluatlar ayrı ayrı toplanmıştır. Üst sıvının alımında optimum pH tamponu kullanılmıştır. Toplanan fraksiyonların aktivite kontrolünün sonucunda 0.5 M'lık fraksiyonlarda aktivite görülmüştür (Şekil 4.10).



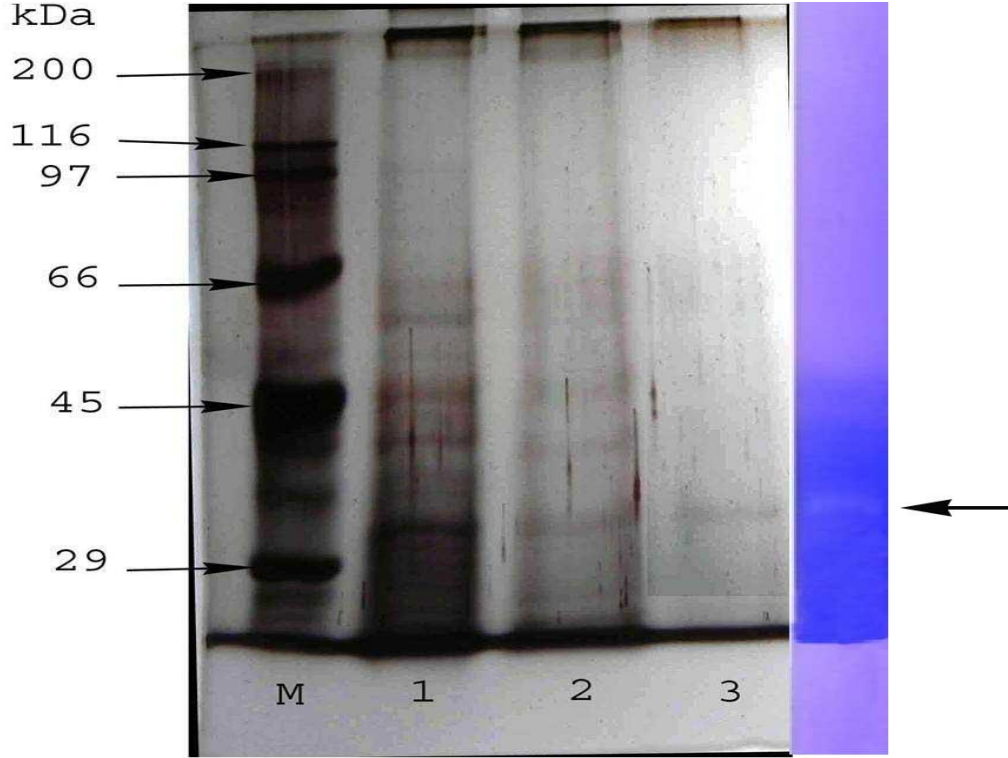
Şekil 4.10. 0.5M'lık fraksiyonun skim-milk agardaki görüntüsü

4.4.6. Amonyum sülfat presipitasyonu, sephadex G-100 kolon kromatografisi ve DEAE-sepharose kolonu aşamalarından geçen enzimin SDS Page analizi

Öncelikle amonyum sülfat presipitasyonu sonucu en iyi aktivite görülen % 40 'lık grubun sephadex G-100 kolondan geçirilmesiyle elde edilen enzim örnekleri daha sonra bu enzim örneklerinin DEAE-sepharose kolondan geçirilmesiyle elde edilen 0.5 M'lık grup ve süpernatant birarada SDS page yapıp gümüş boyamaya alınmıştır. Boyama sonrası sonuçlar yorumlanmıştır (Şekil 4.11)

4.4.7. DEAE-sepharose kolondan geçen ve aktivite görülen Tr-9 keratinaz enziminin zimogram analizi

Petride aktivite görülen 0.5 M'lık fraksiyonların zimogram analizi yapıp, gümüş boyama yapılan jelle kıyaslanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Tr-9 Keratinaz enziminin gümüş ve boyama zimogram görüntüsü.

M)Marker

1)Süpernatant

2)Amonyum sülfat presipitasyonunun (%40'lık grup) ardından Sephadex G 100 kolon kromotografisinden geçirilen enzim örneği.

3) Amonyum sülfat presipitasyonunun (%40'lık grup) ardından sırasıyla Sephadex G 100 kolon kromotografisi ve DEAE sepharose kolon kromotografisinden (0.5 M'lık eluat) geçirilen enzim örneği.

Yapılan çalışma sonucunda Tr-9 keratinaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 34 kDa olarak tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında keratinaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları üretildiği organizmaların orjinlerine göre farklılıklar göstermekle beraber genel anlamda 18-200 kDa arasında değiştiği bildirilmektedir (Nam ve ark., 2002). Fakat

genellikle keratinazların moleküler ağırlığı 50 kDa altında yer alır. Patojen funguslarda ise ekstrem olarak 440 kDa kadar çıkabilmektedir (Kim ve ark., 2004)

Genellikle yüksek moleküler ağırlıklı keratinazlar metalloproteaz sınıfında bulunurlar ve enzim termofilik karakterdedir Farag ve Hassan, (2004). Bu çalışma sonucu elde edilen Tr-9 keratinaz enzimi serin tip proteaz ve mezofilik karakterli bir enzim olduğundan bu veriyi desteklemektedir. Enzimin moleküler ağırlığının 50 kDa'dan daha düşük olması genel bir keratinaz profili sunduğunu göstermektedir. Literatürde yapılan diğer çalışmalara bakıldığında ise;

Dermatofit *Trichophyton granulosum*'dan proteaz elde eden Day ve ark., (1968), enzimin moleküler ağırlığını yapılan çalışmayla hemen hemen aynı değer olan 34.3 kDa olarak tespit etmişlerdir. Apodaca ve McKerrow (1985), *Trichophyton rubrum*'dan üretilen keratinazın moleküler ağırlığını 44 kDa olarak saptamışlardır. Benzer olarak, Asahi ve ark. (1985), *Trichophyton rubrum*'dan moleküler ağırlığını 36 kDa olan keratinaz tanımlamışlardır. Sanyal ve ark. (1985), ise bu çalışmaya paralel olarak *Trichophyton rubrum*'dan moleküler ağırlığı 34.7 kDa olan keratinolitik proteaz tanımlamışlardır. McKerrow ve Apodaca (1985), *Trichophyton rubrum*'dan elde ettikleri ekstraselüler proteinazın moleküler ağırlığını 44 kDa olarak saptamışlardır. Tsuboi ve ark. (1987), yaptıkları diğer 2 çalışmada bu çalışmaya yakın değerler elde etmişlerdir. *Sporothrix schenckii* 'den 2 ayrı ekstraselüler proteaz elde edip, bunlardan ilkinin moleküler ağırlığını 36.5 ikincisinin moleküler ağırlığını ise 39 kDa olarak tespit etmişlerdir. *Trichophyton mentagrophytes* ile yaptıkları çalışmalarda (1989), ise keratinaz enzimin moleküler ağırlığının 38-41 kDa arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı sonucu elde eden Rojanavanich ve ark. (1990), Dermatofit *Hendersonula toruloidea*'dan elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını 34 kDa olarak bulmuşlardır. Qin ve ark. (1992), *Trichophyton schoenleinii*'den elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını 38 kDa olarak tespit ederek paralel bir sonuca ulaşmışlardır. Bockle ve ark. (1995), ise *Streptomyces pactum* DSM 40530'dan keratinaz enzimi üretilen enzimin moleküler ağırlığını paralel bir değer olan 30 kDa olarak saptamışlardır.

Huang ve ark. (2003), *Bacillus pumilus*'tan elde ettikleri serin proteazın moleküler ağırlığını 32 kDa olarak saptamışlardır. Korkmaz ve ark. (2003), Topraktan izole ettikleri *Streptomyces* BA7 suşundan ürettikleri keratinazın moleküler ağırlığını 44 kDa olarak tespit etmişlerdir. Gradisar ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada 2 nonpatojenik filamentöz

fungusdan keratinaz tanımlamışlardır Keratinazlardan ilkinin moleküler ağırlığını 33 kDa, ikincisinin moleküler ağırlığını ise 30 kDa olarak bulup paralel sonuçlar elde etmişlerdir. Suntornsuk ve ark. (2005), *Bacillus licheniformis*'den elde edilen keratinazın moleküler ağırlığını 35 kDa saptayıp hemen hemen bu çalışmayla aynı sonucu bulmuşlardır.

Moallaei ve ark. (2006), *Trichophyton vanbreuseghemii*'den karakterize ettikleri keratinazın moleküler ağırlığınının benzer şekilde 37 kDa olarak saptamışlardır.

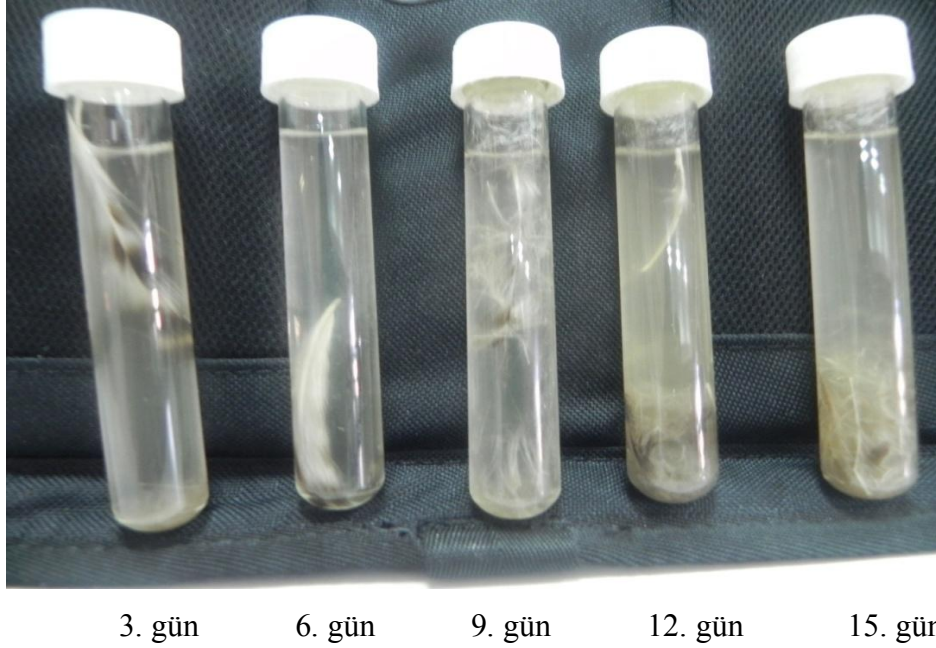
Paralel çalışmalarla, Ogino ve ark. (2007), *Bacillus* sp. PN-13 suşundan elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını yaklaşık 30 kDa bulmuşken, Raju ve ark. (2007), dermatofit fungus *Microsporum gypseum*'dan elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını ise 33 kDa olarak tespit etmişler, Anbu ve ark. (2008), ise *Trichophyton* sp. HÁ-2'den elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını yapılan çalışmayla aynı değer olan 34 kDa olarak bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Cai ve Zheng (2009), *Bacillus subtilis* KD-N2 suşundan ürettikleri keratinazın molekül ağırlığını 30.5 kDa olarak bulmuşlardır.

Farklı olarak, Moreira ve ark. (2009), filamantöz fungus *Myrothecium verrucaria*'dan elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını yaklaşık 23 kDa olarak tespit etmişlerken, Dubey ve ark. (2010), ise *Aspergillus niger*'den elde ettikleri keratinazın moleküler ağırlığını 60 kDa olarak tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmayla, Prakash ve ark. (2010), ise *Bacillus halodurans* PPKS-2 suşundan salgılanan 2 ayrı özellikteki keratinaz üretilen ilk keratinazın moleküler ağırlığını 30 kDa, ikinci keratinazın moleküler ağırlığını ise farklı olarak 66 kDa saptamışlardır.

Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda *Trichophyton* sp.'ye ait keratinazların serin tip proteaz olduğu ve moleküler ağırlıklarının 50 kDa altında olduğu sonucu açığa çıkmaktadır. Yapılan çalışma sonucu elde edilen Tr-9 Keratinaz enziminin moleküler ağırlığının diğer serin proteazlarla büyük bir uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

4.9. Tr-9 Keratinaz Enziminin Tüy Parçalama Yeteneğinin Saptanması

Tr-9 Keratinaz enziminin tüy parçalama yeteneğinin araştırılması için elde ettiğimiz keratinazdan tavuk tüyleri üzerine eklenmiştir ve ardından 37°C ve 150 rpm'de 3, 6, 9, 12, 15 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından elde edilen sonuçlar şekil 4.12'de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Tr-9 Keratinaz enzimi ile muamele edilen ve farklı periyotlarda inkübasyona bırakılan tavuk tüylerinin görüntüsü

Dermatofitlerden özellikle *Trichophyton* sp' den elde edilen keratinazın tavuk tüyünü parçalamada oldukça başarılı ve önemli bir rolünün olduğu belirtilmiştir, Okafor ve Ada, (2000). Bitki patojeni fungus *Myrothecium verrucaria*'dan keratinaz elde eden Moreira ve ark. (2007), bu keratinazın tavuk tüyü, koyun yünü, insan tırnağı, insan saçını parçalayabildiğini bildirmişlerdir. Anbu ve ark. (2008), benzer bir sonuçla *Trichophyton* sp. HA suşundan elde edilen ekstraselüler keratinazın tavuk tüyünü parçalamada oldukça etkin olduğunu bildirmişlerdir. Pandian ve ark. (2012), Funguslar arasından *Microsporum* sp. ve *Trichophyton* sp.'nin tüy parçalama yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca keratinaz üretebilen mikroorganizmaların aynı zamanda tüy parçalayıcı etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda Tr-9 Keratinaz enziminin tavuk tüyleri üzerinde parçalayıcı etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikrobiyal keratinazlar oldukça sert yapıda olan, güçlü çarpaz bağlara sahip, çözünmesi hayli güç yapısal bir polipeptid olan keratini parçalama yeteneğinde olmalarından dolayı biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önem arz etmektedirler (Selvam ve Vishnupriya, 2012). Hayvan besleme açısından önemli olan tüy yemlerinin elde edilmelerinde keratinazlar oldukça önemlidir.. Bu uygulama oldukça ucuz ve alternatif bir yöntem olmaktadır. (Papadopoulos ve ark., 1986).

Hayvan derilerini endüstriyel olarak kullanıma uygun hale getirmek için uygulanan tabaklama işlemi sırasında kılların uzaklaştırılması işlemi (enzimatik dehairing) keratinazlardan faydalanılmaktadır (Cantera, 2001; Thanikaivelan ve ark., 2004).

Keratinlerin biyolojik yıkıma uğrayabilen filmlere ve tarımsal-biyomedikal uygulamalar için kaplamalara dönüştürülmesi konusunda ilgi oldukça artmıştır. Keratinin enzimatik ya da kimyasal olarak muameleyle, gübre paketlenmesi, modifiye keratin tarımsal filmler ya da tüketilebilir film oluşumunda kullanılabileceği bildirilmiştir. Bazı keratinazlar kozmetik ve farmasötik açıdan ilgi çekici hale gelmiştir (Brandelli, 2008). Ayrıca dermatofitoz tedavisi için aşuların hazırlanmasında da kullanılabilirler (Friedrich ve ark., 2005; Gradisarve ark., 2005; Mohorcic ve ark., 2007). Keratinazların alkali pH aralığında olmaları, düşük ve orta sıcaklıkta etkin olmaları, surfaktan ve deterjan uyumluluğunun yanı sıra beyazlatma etkinlikleri dolayısıyla deterjan formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanılabilir (Rai ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2009; Prakash ve ark., 2009; Xie ve ark., 2010).

Keratinazlar biyohidrojen üretiminde de kullanılabilirler (Balint, 2005) Yakın zamanlarda keratinazın dikkat çeken önemli bir alanı ise ilaçların vücutta geçirgenliğini arttırması olmuştur (Mohorric ve ark., 2007).

Mikrobiyal keratinazların biyokimyasal özellikleri ürettikleri mikroorganizmalara göre farklılık gösterir, bu enzimler ağırlıklı olarak ekstraselüler olsalar da yine de intraselüler ve hücre ile ilişkili olanları da tanımlanmıştır (Gupta ve Ramnani, 2006).

Mikrobiyal keratinazlar genellikle alkalın ve nötral proteazlardır ve optimum pH aralıkları 7.5-9.0 arasında değişkenlik gösterir fakat bu aralığın dışında yer alan enzimler de vardır (Takami ve ark., 1999).

Keratinazların aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, izolatin habitatına ve üretildiği mikroorganizmaya bağlı olarak çok değişkendir, genel olarak keratinazların optimum sıcaklığı 30-80°C arasında değişmektedir.

Keratinazların moleküler ağırlığı çoğunlukla 50 kDa altında yer alır, fakat patojenik funguslar söz konusu olduğunda moleküler ağırlık 440 kDa kadar yükselebilmektedir (Kim ve ark., 2004). Yine de genel anlamda bakıldığında keratinazların moleküler ağırlıklarının 18-200 kDa arasında olduğu bildirilmiştir (Nam ve ark., 2002; Bernal ve ark., 2003)

Birçok çalışma dermatofitik fungusların keratinolitik potansiyelleri üzerinde odaklanmıştır. Özellikle *Trichophyton* ve *Microsporum* gibi genuslar ilgi uyandırmaktadır (Asahi ve ark., 1985). Dermatofitik funguslar başlıca tıbbi ve veterinerlik etkileri nedeniyle ilgi çekmektedirler (Anbu ve ark., 2008). En iyi çalışılan keratinazlar dermatofitlerin *Trichophyton*, *Microsporum* cinslerine aittir (Tsuboi ve ark., 1989; Qin ve ark., 1992). Dermatofitler tarafından salgılanan serin proteazların derinin fungal invazyonunda büyük bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Kaufman ve ark., 2007; Monod ve ark., 2002). Bu özel grup patojenik funguslar keratin substratını en iyi parçalayanlar arasında yer alır bu nedenle keratin hidrolizi yapılması gereken, tıp, kozmetik, deterjan, deri endüstrisi gibi farklı alanlarda uygulanmalıdır (Friedrich ve ark., 2003).

Dermatofitlerin önemli bir genusu olan *Trichophyton* sp. ekstraselüler keratinaz üretebilme yeteneğinde olan insan ve hayvan patojeni fungusları kapsar. *Trichophyton* sp. üreyebilmek için keratin dokuya ihtiyaç duyar bundan dolayı da saç, tırnak ve yüzeysel deri alanlarına yerleşip buralarda keratin dokuları parçalamak suretiyle lezyonlar oluşturur. Ayak ve tırnaklardaki infeksiyonun en önemli ve en yaygın nedeni olan patojen mikroorganizmadır.

Yapılan çalışmada Kahramanmaraş sütçü imam üniversitesi dermatoloji bölümüne başvuran hastalardan elde edilen *Trichophyton* Tr-9 suşundan izole edilen keratinazın karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çeşitli metal iyonları, inhibitör, şelatör ve deterjanların enzim üzerindeki etkileri incelenip, enzimin saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Ek olarak bu keratinazın tavuk tüyleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk adımında Kahramanmaraş sütçü imam üniversitesi dermatoloji Polikliniğine başvuran hastaların saç ve derilerinden alınan kazıntı örneklerinden *Trichophyton* sp. izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası Tr-2, Tr-3, Tr-5, Tr-7, Tr-9 numaralı suşlar geliştirilmek amacıyla sıvı stok kültüre (SDB) ekim yapılmıştır. Ekimin

ardından 30°C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Taniş ve Cihangir, 2009).

7 günlük inkübasyonun ardından gelişen Tr-2, Tr-3, Tr-5, Tr-7, Tr-9 numaralı suşlardan enzim üretme besiyerine ekim yapılarak ayrı ayrı her bir suş 5, 7, 10, 12, 14 günlük inkübasyona bırakılmıştır burada gözlenmeye çalışılan durum ise keratinaz üretimi için en uygun sürenin belirlenmesi olmuştur. 5, 7, 10, 12, 14 günlük inkübasyonun ardından her bir örnek filtre edilmiş ve elde edilen süpernatantlardan keratinaz aktivite tayini yapılmıştır bu amaçla skim milk agara her bir örnekten ayrı ayrı 100 µl damlatılmıştır ve sonuçlara göre keratinolitik aktivite hakkında yorum yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda keratinaz enzimi üretmek için en uygun suşun Tr-9, maksimum enzim üretimi için gerekli olan sürenin ise 10 gün olduğu belirlenmiştir. Tr-9 suşuna ait süpernatant filtre edildikten sonra ultra santrifüj tüpler ile 4000g'de, +4°C'de, 20 dk. santrifüj edilmiş ve yoğunlaştırma sağlanmıştır. Ardından yoğunlaşan enzim örnekleri -20°C de saklanmıştır. Tr-9 keratinaz enziminin karakterizasyon çalışmalarına bu enzim örnekleriyle devam edilmiştir.

Yapılan karakterizasyon çalışmalarında; Tr-9 Keratinaz enziminin optimum pH: değeri 7.5 olarak tespit edilmiştir. Tr-9 Keratinaz enziminin rölatif aktivitesi pH: 4.0-5.0 aralığında artış göstermektedir, pH 5.0'de rölatif aktivite %50 civarında gözlenmiştir, pH: 5.5-6.0 6.5-7.0 aralıklarında ise rölatif aktivite de belirgin bir değişim olmamakla beraber pH: 7.0-7.5 aralığında ise rölatif aktivite % 100'e ulaşmıştır. pH 8.0'den sonra ise rölatif aktivitede belirgin bir düşme başlamıştır pH 9.0 dolaylarında rölatif aktivite % 10'a düşmüştür.

Tr-9 Keratinaz enzimini optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 37 °C olarak bulunmuştur. Enzim 20°C'de % 52 rölatif aktivite gösterirken ondan sonraki sıcaklık değerlerinde kademeli bir artış göstermiş ve 37°C'de % 100'e ulaşmıştır, 37°C'den sonra ise rölatif aktivitede düşme yaşanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda Tr-9 keratinaz enziminin mezofilik karakterde bir enzim olduğu görülmektedir. Enzimin insan vücudunda etkin olduğu düşünülürse bu sıcaklığın ideal olduğu söylenebilir, ayrıca enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivitesini büyük ölçüde kaybettiğinden yüksek sıcaklık içeren uygulamalar için uygun olmadığı söylenebilir.

Tr-9 Keratinaz enziminin termal stabilite çalışmalarında ise; enzime 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'lerde 30 dk. ön inkübasyon uygulanmıştırdaha sonraki aşamada ise enzimin

optimum sıcaklığı olan 37°C’de ve optimum pH 7.5 olan tampon –substrat kompleksi ile inkübasyona bırakılmıştır. 20°C’de enzimin aktivitesinin % 70’e yakın korunduğu, 30°C’de % 65 korunduğu, 40°C’de %63 oranında korunduğu 40°C’nin altındaki değerlerde ise enzimin aktivitesinin kademeli olarak düştüğü görülmektedir.

Sonuçlar doğrultusunda 20-40°C aralığında enziminin aktivitesinin % 60 üzerinde korunduğu ve Tr-9 Keratinaz enziminin sıcaklık stabilitesi spektrumunun dar olduğu söylenebilir.

Tr-9 Keratinaz enziminin pH stabilite çalışmalarında; Enzimin pH: 4.0-4.5-5.0 aralığında % 30 dolaylarında aktivitesinin kaldığı pH 5.0’den sonra aktivitenin arttığı pH 5.5 ’da %100’e ulaştığı görülmektedir. Enzimin pH: 5.5-7.5 aralığında aktivitesini yaklaşık % 100 oranında koruduğu görülmektedir. pH 8.0’den itibaren enzimin aktivitesinde kademeli bir düşüş yaşanmaktadır. pH 9.0 ‘da enzim aktivitesini %85 kaybetmiştir. Veriler doğrultusunda Tr-9 Keratinaz enziminin pH: 5.5.-8.0 aralığında stabil olduğu söylenebilir.

Tr-9 Keratinaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, metal iyonları ve deterjanların etkilerini saptamak amacıyla belirlenen kimyasallar 1mM ve 5mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda enzime ilave edilerek, enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir..

FeCl₃ ve CaCl₂ ‘nin enzim aktivitesini hem 1mM hem de 5mM konsantrasyonda arttırdığı özellikle CaCl₂’nin 5mM konsantrasyonda aktiviteyi % 148 arttırdığı görülmektedir, ZnCl₂’nin ise 1mM konsantrasyonda enzim aktivitesini % 56 azalttığı, 5mM konsantrasyonda ise aktiviteyi % 66 azalttığı görülmektedir. Üre 1mM konsantrasyonda % 36; 5mM konsantrasyonda ise %51 aktivite kaybına yol açmıştır.

Deterjanlardan Triton-X 114 % 1 konsantrasyonda enzimde % 98 gibi ciddi bir aktivite kaybına sebep olarak enzimi çok büyük çapta inhibe etmiştir. SDS ise % 1 konsantrasyonda % 51 oranında aktivite kaybına neden olarak enzimi kısmen inhibe etmiştir. PMSF’nin ise enzimi tamamen inhibe ettiği görülmektedir, EDTA 1mM konsantrasyonda % 39 aktivite kaybına sebep olurken, 5mM konsantrasyonda ise % 51 aktivite kaybına neden olmuştur. 1-10 Phenanthroline Monohidrat 5mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %69 oranında düşürmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda Tr-9 Keratinaz enziminin serin proteaz olduğu anlaşılmaktadır. PMSF tarafından tamamen inhibe olması bu durumu doğrulamaktadır bu durum ilgili çalışmalarla gösterdiği paralelikten de anlaşılmaktadır.

Tr-9 Keratinaz enziminin tüy parçalama yeteneğinin saptanması çalışmalarında ise tavuk tüyü 37°C'de 150 rpm'de farklı periyotlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri ise 3, 6, 9, 12, 15 gün olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda ise 9. günden itibaren etkili bir parçalama görülmekle beraber 15. günün sonunda tavuk tüyünün tamamen parçalandığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre Tr-9 Keratinaz enzimi tavuk tüyü parçalamada etkindir ve tavuk tüylerinden feather meal (tüy yemi) elde edilmesi gibi endüstriyel işlemler için kullanılabilir. Böylelikle tavuk tüylerin biodegradasyonuna katkıda bulunabilir.

Tr-9 Keratinaz enziminin kısmi saflaştırma işlemlerinde ise sırasıyla amonyum sülfat presipitasyonu ardından diyaliz, Sephadex G 100 Kolon kromatografisi ve DEAE Sepharose kolon kromatografisi teknikleri uygulanmıştır. Bu saflaştırma adımlarının her birinden sonra yapılan SDS page ve zimogram analizi sonucunda enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 34 kDa olarak tespit edilmiştir. Genel anlamda keratinazların moleküler ağırlığının 50 kDa altında olduğu düşünülürse Tr-9 Keratinaz enzimi bu değer içerisinde yer almaktadır. Tr-9 Keratinaz enziminin moleküler ağırlığının *Trichophyton sp.*'ye ait tanımlanmış diğer keratinazla uyum gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak; Tr-9 Keratinaz enziminin; moleküler ağırlığı yaklaşık 34 kDa, optimum pH: 7.5, optimum sıcaklığı 37°C olarak saptanmıştır. Enzim, pH: 5.5-8.0 ve 20-40°C aralığında stabil ve tavuk tüyü parçalamada etkindir. Ayrıca enzimin ilgili gen bölgesi non-patojen mikroorganizmalara aktararak biyoteknolojik kullanılma potansiyeli arttırılabilir. Bu uygulamalar arasında mezofilik aktivite gerektiren keratinolizis işlemleri, enzimin tavuk tüyü parçalamasındaki etkinliği nedeniyle hayvan beslenmesine alternatif bir yöntem olan tüy yemi (feather meal) üretimi, Ekolojik problemlere neden olan keratinöz substratların biyodegradasyonu gösterilebilir.

Daha ileri çalışmalarla enzimin 16S rRNA sekans analizi yapılarak hangi türe ait olduğu, enzimin farklı substratlar üzerindeki etkileri saptanarak farklı kullanım alanları saptanabilir.

KAYNAKLAR

- Açıkel, Y.Ş., Çelebi, B., 2006. R. Delemarile Lipaz üretimi. Tübitak Projesi, MİSAG-282.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Applications. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry, Wiley-VCH Verlag Weinheim, 489s.
- Akan, S., 2010. Keratinolitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Keratinaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Ç.U. FBE Yüksek lisans tezi.
- Alpress, J. D., Mountain, G., and Golwand, P. C., 2002. Production, Purification and Characterization of an Extracellular Keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. Letters in Applied Microbiology, 34: 337-342.
- Ammonium Sulfate Calculator from EnCOR Biotechnology Inc. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>.
- Anbu, P., Hilda A., Sur, H.W., Hur, B.K., Jayanthi, S., 2008. Extracellular Keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 Isolated from Feather Dumping Soil. Int. Biodeterior. Biodegrad., 62: 287–292
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 2000. Alkaline Protease from *Spilosoma obliqua*: Potential Applications in Bio-formulations, Biotechnol. Appl. Biochem., 31: 85–89.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan Yayınevi, 333-335.
- Apodaca, G., McKerrow, J.H., 1985. Purification and Characterization of a 27,000- Mr Extracellular Proteinase from *Trichophyton rubrum*. Infect. Immun, 57(10): 3072–3080.
- Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama K, Apodaca, G., Epstein, W.L., McKerrow JH. 1985. Purification and Characterization of Major Extracellular Proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem. J., 232:139–144.
- Aşçı, Z., 1992. Elazığ Yöresinde İzole edilen Dermatofit Etkenleri ve İnvitro Duyarlılıklarının Araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ.
- Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar R., Sehgal P.K., 2008. Purification and Characterization of an Extracellular Keratinase from a Hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). World J. Microbiol. Biotechnol., 24: 2741-2745.

- Balint, B., Bagi, Z., Toth, A., Rakhelye, G., Perei, K., and Kovacs, K. L., 2005. Utilization of Keratin-Containing Biowaste to Produce Biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:404-410.
- Barredo, J.L., 2005. *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- Bernal, C., Vidal L., Valdivieso, E., Coello, N., 2003. Keratinolytic Activity of *Kocuria rosea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19:255–261
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes Inbiotechnology. *Biotechnology Advances*, 18:355-383.
- Bilgili, M.E., Sabuncu İ., Saraçoğlu, N.Z., 2001. Kliniğimize Başvuran Dermatofitozlu Olgulardan İzole Edilen Dermatofitler. *T. Klin. Dermatol.*, 11:185-90.
- Bockle, B., Galunsky, B., Muller. R., 1995. Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:3705–3710.
- Bockle, B., Müller R., 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during Growth on Chicken Feathers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:790–792.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. *Protein Methods* (2nd Edt). Wiley-Liss Press, USA, 414s.
- Böhme, H., Ziegler H., 1969. The Distribution of Geophilic Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi in Relation to the pH of the Soil. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 38:247-255.
- Brandelli, A., Riffel, A., 2005. Production of an Extracellular Keratinase from *Chryseobacterium sp.* Growing on Raw Feathers. *Electron. J. Biotechnol.*, 8:35–42.
- Brandelli, A., 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food. Bioprocess. Technol.*, 8: 105–116.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Riffel, A., 2010. Biochemical Features of Microbial Keratinases and their Production and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:1735–1750.
- Bressollier, P., Letourneau F., Urdaci, M., Verneuil B., 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase From *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:2570–2576.

- Cai, C.G., Lou, B.G., Zheng, X.D., 2008. Keratinase Production and Keratin Degradation by a Mutant Strain of *Bacillus subtilis*. *Zhejiang Univ. Sci. B*, 9:60–67
- Cabanes, F.J., 2000. Dermatophytes in Domestic Animals. *Revista Iberoamericana de Micología*, 13:104-108.
- Cantera, 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, L., Tan, H., Liu Y., Xue, X., Zhou, S., 2008. Characterization of a New Keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that Completely Degrades Native Chicken Feather. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46:389–394.
- Cedrola, S., De Melo, A., Mazotto, A.M., Lins, U., Zingali, R.B., Rosado, A., Peixoto, R., Vermelho, A., 2012. Keratinases and Sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to Recycle feather waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28:1259–1269.
- Chao, Y.P., Xie F.H., Yang, J., Lu, J.H., Qian, S.J., 2007. Screening for a New *Streptomyces* Strain Capable of Efficient Keratin Degradation. *J. Environ. Sci.*, 19:1125–1128.
- Chen, S., Swaisgood, H.E., Foegeding, E.A., 1994. Gelatin of the β Laktoglobulin Treated with Limited Proteolysis by Immobilization Trypsin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 234-239.
- Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C., 1995. Production and Characterization of a Feather Degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59:2239–2243.
- Coral, G., Arıkan B., Unaldı, M.N., Güvenmez, H., 2003. Thermostable Alkaline Protease Produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4), 491-498
- 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.
- Cowan, D., 1996. *Industrial Enzyme Technology*, TIBTECH, 14: 177-178.
- Daniels, M.J., 1992. *Paper Technology*, 33(6): 14.
- Daroit D.J., Correa, A.P.F., Brandelli, A., 2009. Keratinolytic Potential of a Novel *Bacillus* sp. P45 Isolated From the Amazon Basin Fish *Piaractus Mesopotamicus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63: 358–363.

- Day, W.C., Toncic, P., Stratman, S.L., Leuman, U., Harmon, S.R., 1968. *Biochim. Biophys. Acta*, 167: 596-606.
- 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 *Xanthomonasmaltophila* strain. *Can. J. Microbiol.*, 48:342–348.
- Dozie, I.N.S., Okeke, C.N., Unaeze, N.C., 1994. A Thermostable, Alkaline Active, Keratinolytic Proteinase from *Chrysosporiumkeratinophilum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 563–567.
- Duarte, F.R.S., Bach, E., Cannavan, F.S., Tafferel, J.A.S., Tsai, S.M., Brandelli, A., 2011. Characterization of Feather Degrading Bacteria from Brazilian soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1):102-107.
- Dubey, R., Adhikary S., Kumar J., Sinha, N., 2010. Isolation, Production, Purification, Assay and Characterization of Alkaline Protease Enzyme from *Aspergillus niger* and Its Compatibility with Commercial Detergents, *Developmental Microbiology and Molecular Biology*, 1(1):75-94.
- Dunbar, B.S., 1990. *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. 2th ed.
- El-Naghy, M.A., El-Ktatny, M.S., Fadel-Allah, E.M., Nazeer, W.W., 1998. Degradation of Chicken Feathers by *Chrysosporium georgiae*. *Mycopathologia*, 143:77–84.
- Erturan, Z.E., 2004. Dermatofitlerin Dünyada Dağılımı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, 48:16-23.
- Esawy, M.A., 2007. Isolation and Partial Characterization of Extracellular Keratinase from a Novel Mesophilic *Streptomyces albus* AZA. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6):808-817.
- Farag, A.M., Hassan, M.A., 2004. Purification, Characterization and Immobilization of a Keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 34:85–93.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F., 1996. Thermostable Alkaline Proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, Production and Characterization. *Appl Microbiol/Biotechnol.*, 45:327-332.
- Friedrich, A.B., Antranikian, G., 1996. Keratin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2875–2882.

- Friedrich, J., Gradisar, H., Mandin, D., Chaumont, J.P., 1999. Screening Fungi for Synthesis of Keratinolytic Enzymes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28:127–130.
- Friedrich, J., Gradisar, H., Vrecl, M., Pogacnik, A., 2005. In vitro Degradation of Porcine Skin Epidermis by a Fungal Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 36:455–460.
- Friedrich, J., Kern, S., 2003. Hydrolysis of Native Proteins by Keratinolytic Protease of *Doratomyces microsporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21:35-37.
- Gessesse, A., Kaul, R.H., Gashe ,B.A., Mattiasson, B., 2003. Novel Alkaline Proteases from Alkalophilic Bacteria Grown on Chicken feather. *Enzyme Microb. Technol.*, 32:519–524.
- Giongo, J.L., Lucas, F.S., Casarin, F., Heeb, P., Brandelli, A., 2007. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species Isolated from the *Paecilomyces marquandii* Amazon Basin Showing Remarkable De-hairing Activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:375–382.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Tonkova, V.E., Haertle, T., Nedkov, P., 2005. Degradation of Keratin and Collagen Containing Wastes by Newly Isolated Thermoactinomycetes or by Alkaline Hydrolysis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40:335–340.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaji, I., Jerala, R., 2005. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3420–3426.
- Gradisar, H., Kern, S., Friedrich ,J., 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53:196–200
- Greer, D.L., 1994. An Overview of Common Dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 31:112-116.
- Gupta, A.K., Cooper, E.A., 2008. Dermatophytosis (Tinea) and Other Superficial Fungal Infections. *Diagnosis and Treatment of Human mycoses*. New Jersey: Humana Press Inc., p. 355-82.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α amylases: a Biotechnological Perspective. *Process Biochem.*, 1-18.
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial Keratinases and their Prospective Applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70:21–33.

- Gupta, R., Ramnani P., Gupta R., 2007. Keratinases Vis-à-vis Conventional Proteases and Feather Degradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:1537–1540.
- Harwood, C.R., 1992. *Bacillus subtilis* and Its Relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses. Elsevier Science Publishers Ltd (U.K.), 10:247-256.
- Haki, G.D. ,Rakshit, S.K. , 2003 Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes. *Bioresour. Technol.*, 89:17–34.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol. Bio.*, 63:735-750.
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wangh, H., Zhang, Y., 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46:169-173.
- Ichida, J.M., Krizova, L., LeFevre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L., Burt, E.H., 2001. Bacterial Inoculum Enhances Keratin Degradation and Biofilm Formation in Poultry Compost. *Journal of Microbiology Methods*, 47:199–208
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G., Nedkov, P., 1999. Isolation and Partial Characterization of Extracellular Keratinase from a Wool Degrading Thermophilic Actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can J. Microbiol.*, 45:217–222.
- Jewell, S.N., 2000. Purification and Characterization of a Novel Protease from *Burkholderia* strain 2.2 N. Master of Science Microbiology, GPA; 3.70 (4.0 scale).
- Kalpana, M., Devi. A., Rasheedha Banu. G.R., Gnanaprabhal. B.V., Palaniswamy, M., 2008. Purification, Characterization of Alkaline Protease Enzyme from Native Isolate *Aspergillus niger* and its Compatibility with Commercial Detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol.1 No 7: 1-7.
- Kaufman, G., Horwitz, B.A., Duek, L., Ullman, Y., Berdicevsky, I., 2007. Infection Stages of the Dermatophyte Pathogen *Trichophyton*: Microscopic Characterization and Proteolytic Enzymes. *Medical Mycology*, 45: 149-155.
- Kim, J.S., Kluskens ,L.D., De Vos, W.M., Huber, R., Van der Oost, J., 2004. Crystal Structure of Fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a Keratinolytic Enzyme Related to Subtilisin. *J. Mol. Biol.*, 335:787–797.
- Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351.

- Konwarh, R., Karak, N., Rai, S.K., Mukherjee, A.K., 2009. Polymerassisted Iron Oxide Magnetic Nanoparticle Immobilized Keratinase. *Nanotechnology*, 20:225107:10.
- Korkmaz, H., Unaldı, M. N., Aslan, B., Coral, G., Arıkan, B., Dinçer, S., Çolak, O., 2003. Keratinolytic Activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*, 53: 85-93.
- Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P., Briki, F., 2004. New Aspects of the α - helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers. *Biophys. J.*, 87:640–647.
- Kublanov, I.V., Perevalova, AA., Slobodkina, G.B., Lebedinsky, A.V., Bidzhieva, S.K., Kolganova, T.V., Kaliberda, E.N., Rumsh, .LD., Haertlé, T., Bonch-Osmolovskaya, E.A., 2009. Biodiversity of Thermophilic Prokaryotes with Hydrolytic Activities in Hot Springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl. Environ. Microbiol.*,75:286–291.
- Kumar, A., Lakshmi, A., Rani, S.V., Sailaja, B., 2012. Isolation and Characterization of Feather Degrading Bacteria From Poultry Waste. *Journal of Research in Biology*, 2(7): 676-682.
- Kunert, J., 1973. Keratin Decomposition by Dermatophytes: 1. Sulphite Production as a Possible Way of Substrate Denaturation. *Zeltschrife Fuer Allgermerine Microbiologie Morphologie, Genetic und Oekologie der Microorganismen*, 13:489-498.
- Kunert, J., 1989. Biochemical Mechanism of Keratin Degradation by the *Actinomycetes Streptomyces fradiae* and the Fungus *Microsporium gypseum*: a Comparison. *J. Basic. Microbiol.*, 29(9):597-604.
- Kuştimur, S., 2004. Dermatofitlerin Patogenezi ve Virulans faktöleri. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyumu: Dermatomikoz etkenleri ve dermatomikozlar. Kayseri, Türk Mikoloji Cemiyeti yayını, 48:16-22.
- Lateef, A., Oloke, J.K., Kana, E.B.G., Sobowale, B.O., Ajao, S.O., Bello, B.Y., 2010. Keratinolytic Activities of a New Feather Degrading İsolate of *Bacillus cereus LAU 08* isolated Nigerian Soil. *İnternational Biodeterioration & Biodegratadion*, 64: 162-165.
- Lee, H., Suh, D.B. Hwang, J.H., Suh, H.J., 2002. Characterization of a Keratinolytic Metalloprotease from *Bacillus* sp. SBC-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97: 127-133.

- Lee, Y.J., Kim, J.H., Kim, H.K., Lee, J.S., 2004. Production and Characterization of Keratinase from *Paracoccus* sp. WJ-98. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9: 17-22.
- 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.
- Mabrouk, M.E.M., 2008. Feather Degradation by a New Keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:2331–2338.
- Macura, A.B., 1993. Dermatophyte Infections. *Int. J. Dermatol.*, 32:313-323.
- Manczinger, L., Rozs, M., Vagvolgyi, C.S., Kevei, F., 2003. Isolation and Characterization of a New Keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19:35–39.
- Marchisio, V.F., 2000. Keratinophilic Fungi: Their Role in Nature and Degradation of Keratinic Substrates. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., *Biology of dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, p 86–92.
- Marcondes, N.R., Taira, C.L., Vandresen, D.C., Svidzinski, T.I.E., Kadowaki, M.K., Peralta, R.M., 2008. New Feather-Degrading Filamentous Fungi. *Microb. Ecol.*, 56:13–17.
- Martin, A.G., Kobayashi, G.S., 1999. Superficial Fungal Infection: Dermatophytosis, Tinea Nigra, Piedra. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, *Dermatology in General Medicine*. New York: p:2337-57.
- Matsui, T., Yamada, Y., Mitsuya, H., Shigeri, Y., Yoshida, Y., Saito, Y., Matsui, H., Watanabe, K., 2009. Sustainable and Practical Degradation of Intact Chicken Feathers by Cultivating a Newly Isolated Thermophilic *Meiothermus ruber* H328. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82:941–950.
- Matsumoto, T., Ajello, L., 1987. Current Taxonomic Concepts Pertaining to the Dermatophytes and Related Fungi (Review). *Int. J. Dermatol.*, 26: 491-499.
- Maury, J., Asodollahi, M.A., Moller, K., Clark, A., Nielsen, J., 2005. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 100: 19-51.

- Mckittrick, J., Chen, P.Y., Bodde, S.G., Yang, W., Novitskaya, E.E., Meyers, M.A., 2012. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. *JOM*, Vol. 64, No. 4.
- Mitchell, T.G., 1984. Dermatophytosis and other Cutaneous Mycoses. *Zinsser Microbiology*, 1173-1181.
- Moallaei, H., Zaini, F., Larcher, G., Beucher, B., Bouchara, J.P., 2006. Partial Purification and Characterization of a 37 kDa Extracellular Proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia*, 161:369–375.
- Mohamedin, A.H., 1999. Isolation, Identification and some Cultural Conditions of a Protease Producing Thermophilic *Streptomyces* strain Grown on Chicken Feathers as a substrate. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 43:13–21.
- Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J., Murdan, S., 2007. An Investigation into Keratinolytic Enzymes to Enhance Ungual Drug Delivery. *Int. J. Pharm.*, 332:196–201.
- Monod, M., Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., Jousson, O., 2002. Secreted Proteases from Pathogenic Fungi. *International Journal of Medical Microbiol.*, 292: 405-419.
- Moore-Landecker E., 1996. *Fundamentals of the Fungi*. New Jersey, London, Sydney, Prentice Hall, Upper Saddle River.
- More, S.S., Lakshmi, S.D., Prakash, S.N., Vishwacarma, J., Umashankar, S., 2013. Purification and Properties of a Novel Fungal Keratinase from *Cunninghamella echinulata*. *Turk. J. Biochem.*, 38(1): 68-74.
- Moreira, F.G., Souza, C.G.M., Costa, M.A.F., Reis, S., Peralta, R.M., 2007. Degradation of Keratinous Materials by the Plant Pathogenic Fungus *Myrothecium verrucaria*. *Mycopathologia*, 163:153–160
- Moreira-Gasparin, F.G., Souza, C.G.M., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., Bracht, C.K., Boer, C.G., Peralta, R.M., 2009. Purification and Characterization of an Efficient poultry Feather Degrading-Protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, 20:727–736
- Muhsin, T.M., Hadi, R.B., 2002. Degradation of Keratin Substrates by Fungi Isolated from Sewage Sludge. *Mycopathologia*, 154: 185-189.

- Mukherjee, A.K, Sudhir, K.R., Naba, K. B., 2011. Biodegradation of Waste Chicken-Feathers by an Alkaline β -keratinase(Mukartinase) Purified from a Mutant *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 :1229-1237
- Murray, R.K., Granner ,D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2000, Haper's Biochemistry, 25th Edition, McGraw-Hill, Health Profession Division, U.S.A.
- Nam, G., W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, MT., Pyun, YR., 2002. Native-Feather Degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a Newly Isolated Keratinase-Producing Thermophilic Anaerobe. *Arch. Microbiol.*, 178:538–547.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M., Ishikawa, H., 1999. Purification and Characterization of Organic Solvent-Stable Protease from Organic Solvent-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *J. Biosci. Bioeng.*, 87:61-68.
- Ogino, H., Otsubo, T., Ishikawa, H., 2007. Screening, Purification, and Characterization of a Leather-Degrading Protease. *Biochemical Engineering Journal*, 38:234–240.
- Okafor, J.I., Ada, N., 2000. Keratinolytic Activity of five Human Isolates of the Dermatophytes. *Journal of Common Diseases*, 32,300–305.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S., 1998. Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganisms and their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources. *Bioresour. Technol.*, 66:1–11.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., 2008. *Enzyme Technology*. Springer Science and Business Media, Inc. and Asiatech Publishers.
- Pandey, A., and Ramachandran, S., 2006. *Enzyme Technology: General Introduction*, A. Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p:1-11.
- 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.
- Parry, D.A.D., North, A.C.T., 1998. Hard α -Keratin Intermediate Filament Chains: Substructure of the N- and C-terminal Domains and the Predicted Structure and Function of the C-Terminal Domains of type I and type II Chains. *J. Struct. Biol.*, 122:67–75
- Pillai, P., Archana, G., 2008. Hide Depilation and Feather Disintegration Studies with Keratinolytic Serine Protease from a Novel *Bacillus subtilis* Isolate. *Microbiology and Biotechnology*, Volume 78, Issue 4 pp: 643-650.
- Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K., 2010. Purification and Characterization of Extrem Alkaline Keratinase and Keratin disulfide Reductase Produced by *Bacillus halodurans* strain PPKS-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87:625-633.
- Qin, L.M., Dekio, S., Jidoi, J., 1992. Some Biochemical Characteristics of a Partially Purified Extracellular Keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. *Zentralbl. Bakteriologie*, 277:236–244.
- Rai, S.K., Konwarh, R., Mukherjee, A.K., 2009. Purification, Characterization and Biotechnological Application of an Alkaline β - Keratinase Produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in Solid-State Fermentation Using Chicken-Feather as substrate. *Biochem. Eng. J.*, 45:218–225.
- Raju, K. C., Neogi, U., Saumya, R., and Goud, N. R., 2007. Studies on Extracellular Enzyme Keratinase Dermatophyte *Microsporium gypseum*. *International Journal of Biological Chemistry*, 1(3): 174-178.
- Raninger A., Steiner, W., 2003 .Accelerated Process Development for Protease Production in Continuous Multi-Stage Cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 5;82(5):517-24.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3):597-635.
- Ramnani, P., Gupta, R., 2007. Keratinases Vis-à-vis Conventional Proteases and Feather Degradation. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:1537–1540.

- Ramnani, P., Singh, R., Gupta, R., 2005. Keratinolytic Potential of *Bacillus licheniformis* RG1: Structural and Biochemical Mechanism of Feather Degradation. *Can. J. Microbiol.*, 51:191–196.
- Riffel, A., Ortolan, S., Brandelli, A., 2003. De-hairing Activity of Extracellular Proteases Produced by Keratinolytic Bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(8): 855-859.
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., Brandelli, A., 2003. Characterization of a New Keratinolytic Bacterium that Completely Degrades Native Feather Keratin. *Arch. Microbiol.*, 179:258–265.
- Rippon, J.W. ,1988. Cutaneous infections: Dermatophytosis and Dermatomycosis. In: *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes* WB Saunders, Philadelphia p:169-275.
- Rissen, S., Antranikian, G., 2001. Isolation of Thermoanaerobacter *Keratinophilus* sp. Nov. A novel Thermophilic, Anaerobic Bacterium with Keratinolytic activity. Springer-Verlag, Presented at the Third International Congress on Extremophiles. Hamburg.
- Rojanavanich, V., Yoshiike, T, Tsuboi, R., Takamori, K., Ogawa, H., 1990. Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from *Hendersonula toruloidea*. *Infect. Immun.*, 58(9): 2856–2861.
- Rozs, M., Manczinger, L., Vagvolgyi, C., Kevei, F., 2001. Secretion of a Trypsin-like Thiol Protease by a New Keratinolytic Strain of *Bacillus licheniformis* FEMS. *Microbiol. Lett.*, 205:221–224.
- Santos, R.M.D.B., Firmino, A.A.P., Sa. CM., Felix, C.R., 1996. Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr. Microbiol.*, 33:364–370.
- Saniç, A., 1999. Dermatofitler. n: Ustaçelebi Ş, Ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi : 1031-1044.
- Sanyal, A.K., Das, S.K., Banerjee, A.B., 1985. Purification and Partial Characterization of an Extracellular Proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 23:65– 178.
- Selvam, K., Vishnupriya, B., 2012. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(2): 267-275.

- Sharma, R., Rajak, R.C., 2003. Keratinophilic Fungi: Nature's Keratin Degrading Machines. C.V. Raman Avenue, Post Box No:8005.
- Singh, C.J., 1997. Characterization of an Extracellular Keratinase of *Trichophyton simii* and Its Role in Keratin Degradation. *Mycopathologia*, 137: 13-16.
- Singh, C.J., 1999. Exocellular Proteases of *Malbranchea gypsea* and Their Role in Keratin Deterioration. *Mycopathologia*, 143: 147-150.
- Singhal, P., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S., 2012. Studies on Production, Characterization and Applications of Microbial Alkaline Proteases. Vol 3, Issue 3 pp.653-669.
- Soetan, K.O., 2008. The Dynamic and Ubiquitous Nature of Biotechnology. *Afr. J. Biotechnol.*, 7:2768-2772.
- Suh, H.J., Lee, H.K., 2001. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J. Protein Chem.*, 20:165-169
- Suntornsuk, W., Suntornsuk, L., 2003. Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in Submerged Cultivation. *Bioresour. Technol.*, 86:239-243.
- Suntornsuk, W., Tongjun, J., Onnim P., Oyama, H., Ratanakanokchai, K., Kusamran, T., Oda, K., 2005. Purification and Characterization of Keratinase from a Thermotolerant feather degrading bacterium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 1111-1117.
- Syed, G.D., Lee, J.C., Li, W.J., Kim, C.J., Agasar, D., 2009. Production, Characterization and Application of Keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour. Technol.*, 100:1868-1871.
- Szabo, L., Benedek, A., Barabas, G., 2000. Feather Degradation with a Thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16:252-255.
- Tae-Park, G., JooSon, Hong., 2009. Keratinolytic Activity of *Bacillus megaterium* F7-1 a Feather-Degrading Mesophilic Bacterium. *Microbial Res.*, 164(4): 478-85.
- Takami, H., Nogi, Y., Horikoshi, K., 1999. Reidentification of Keratinase Producing Facultatively Alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles*, 3:293-296.
- Tanış, H., Cihangir, N., 2009. Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in Proteaz Aktivitelerinin Araştırılması. *F.Ü. Saç.Bil. Tıp Derg.*, 23(3):137-144.

- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M.T., Kolli, N., Mangamoori, L.N., 2008. Purification and Characterization of an Alkaline Keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*, 99(6):1596-1602.
- Telefoncu, A., 1996. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, İzmir.
- Telefoncu, A., 1997. İmmobilize Enzimler, 193-248, *Enzimoloji, Biyokimya Yaz Okulu*, Aydın, pp. 446.
- Temizkan, G., ve Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı. İstanbul.
- 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.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P., Brandelli, A., 2004 Characterization of a Protease of a Feather-Degrading *Microbacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39:181–186.
- Tsuboi, R., Ko, I.J., Takamori, K., Ogawa, H., 1989. Isolation of a Keratinolytic Proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with Enzymatic Activity at Acidic pH. *Infect. Immun.*, 57:3479–3483.
- Tsuboi R., Sanada T., Takamori, K., Ogawa, H., 1987. Isolation and Properties of Extracellular Proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J. Bacteriol.*, 169(9):4104–4109.
- Toraman, Z. A., 2003. Doğrudan Tanı Yöntemleri ve Önemi, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 27-30 , Bodrum.
- Tümbay, E., 2002. Dermatofitler. In: Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 1785-1796.
- Tümbay, E., 1983. *Pratik Tıp Mikolojisi*, İzmir-Bornova; Bilgehan Basımevi 1. Baskı s: 3-30.
- Vanbreuseghem, R., 1952. Keratin Digestion by Dermatophytes: a Specific Diagnostic Method. *Mycologia*, 44: 176-182.
- Vignardet, C., Guillaume, Y.C., Michel, L., Friedrich, J., Millet, J., 2001. Comparison of two Hard Keratinous Substrates Submitted to the Action of a Keratinase Using an Experimental Design. *Int. J. Pharm.*, 224:115–122.

- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., ,2008. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level.3rd. ed. New York: Wiley.
- 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.
- Weitzman, I., Kane, J., Summerbell, R.C., 1995. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and Agents of Superficial Mycoses. Manual of Clinical Microbiology, Washington DC: p.791-808.
- Weitzman, I., Padhye, A.A., 1996. Dermatophytes; Gross and Microscopic. Dermatologic Clinics,14: 9-22.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Ed. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373 p.
- Williams, C.M., Richter, C.S., Mackenzie, J.M., Shih, J.C.H., 1990. Isolation, Identification and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 56:1509–1515.
- Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y., Qian, S., 2010. Purification and Characterization of four Keratinases produced by *Streptomyces sp.* strain 16 in Native Human Foot Skin Medium. Bioresour. Technol.,101:344–350.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Rao, S.R., Murakami, Y., Yokoyama, K., Tamiya, E., 2002. Characterization of a New Keratin-Degrading Bacterium Isolated from Deer fur. J. Biosci. Bioeng., 93:595–600.
- Yu, R.J., Harmon, S.R., Grappel, S.F., Blank F., 1971. Two Cell-bound Keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. J. Invest. Dermatol.,56(1):27–32.
- Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., Pyun, Y.R.Y., 2004. Characteristic of Thermostable Chitinase Enzymes from Indonesian *Bacillus sp.* 13.26. Enzyme and Microbial Technology, 35:147-153.
- Zhang, B., Jiang, D.D., Zhou, W.W., Hao, H.K., Niu, T.G., 2009. Isolation and Characterization of a New *Bacillus sp.* 50-3 with Highly Alkaline Keratinase Activity from *Calotes versicolor* faeces. World J. Microbiol. Biotechnol., 25:583–590.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Döne Parlak
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 1985 - Kırıkhan
Medeni hali : Bekar
e-posta : donay_parlak@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Kahramanmaraş Sütçü imam Üniversitesi Genel Biyoloji	2013
Lisans	Çukurova Üniversitesi / Biyoloji	2008
Lise	İslahiye Opet Anadolu Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce