



***Bacillus licheniformis* EY2 ile KOYUN YÜNÜNDE
HAZIRLANAN PROTEİN HİDROLİZATININ
BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Elanur TUYSUZ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Doç. Dr. Hakan ÖZKAN
2020
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus licheniformis EY2 ile KOYUN YÜNÜNDE HAZIRLANAN
PROTEİN HİDROLİZATININ BİYOTEKNOLOJİK
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Elanur TUYSUZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

ERZURUM
2020

Her Hakkı Saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**BACILLUS LICHENIFORMİS EY2 İLE KOYUN YÜNÜNDE HAZIRLANAN
PROTEİN HİDROLİZATININ BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN danışmanlığında, Elanur TUYSUZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 08/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği / oy~~ ~~çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Üye : Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 16.01/2020 tarih ve ..03.../..56..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü 25240 ERZURUM Telefon: +90 (442) 2314742 Faks: +90 (442) 2314741

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Bacillus licheniformis* EY2 ile KOYUN YÜNÜNDE HAZIRLANAN PROTEİN HİDROLİZATININ BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elanur TUYSUZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Bu tez çalışmasında; öncelikle yün degrade edebilen, keratinaz enzim aktivitesine sahip 48 adet bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Bu bakteriler arasında en yüksek keratinaz aktivitesi gösteren ve maksimum seviyede yün parçalama potansiyeline sahip olan EY2 kodlu izolat *Bacillus licheniformis* (Gen Bank No: MN809476) olarak tespit edildi. Daha sonra bu izolat kullanılarak koyun yününden protein hidrolizati hazırlamak için kültür şartlarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Yün protein hidrolizati için elde edilen optimum pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi değerleri sırasıyla 7, 55°C ve 6 gün olarak belirlendi. Hidrolizat eldesi için KH_2PO_4 , MgSO_4 ve NaCl 'nin optimum konsantrasyonlarının, sırasıyla; 1,5, 0,5, 2 g/l olduğu tespit edildi. Optimum koşullar altında üretilen hidrolizatın; antioksidan, antimikrobiyal ve antikanserojen özellikleri araştırıldı. Deneyler sonucunda yün hidrolizatının antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin olmadığı görüldü. Hidrolizatın antikanserojen özelliğinin araştırılması için insan kolon kanser hücreleri (HT-29, Caco-2), insan prostat kanser hücreleri (DU-145) ve insan akciğer kanser hücreleri (A-549) kullanıldı. HT-29 hücrelerinde; 1,00 mg/ml ve 1,25 mg/ml, DU-145 hücrelerinde; 2,5 mg/ml, A-549 hücrelerinde ise 0,01 mg/ml konsantrasyonlarında verilen hidrolizatın, bahsedilen kanser hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği, Caco-2 hücreleri üzerinde ise herhangi bir sitotoksik etki göstermediği gözlemlendi. Çalışmada ayrıca, hazırlanan peptonun çeşitli test mikroorganizmaları için pepton kaynağı olarak kullanılabilir potansiyeli araştırıldı. *E. coli* (1,4 g/l) ve *A. niger* (8 g/l) için maksimum hücre konsantrasyonlarına yün protein hidrolizatlı ortamda ulaşılırken, *S. cerevisiae* için maksimum hücre konsantrasyonuna (2,4 g/l) ticari tripton pepton ortamında ulaşıldı. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında lokal olarak izole edilen *Bacillus licheniformis* EY2 bakterisi ile koyun yünlerinden biyoteknolojik önemi olan bir protein hidrolizatının hazırlanabileceği gösterilmiştir.

2020, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillus licheniformis* EY2, koyun yünü, protein hidrolizati, pepton, antikanser

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF PROTEIN HYDROLYSATE PREPARED FROM SHEEP WOOL USING *Bacillus licheniformis* EY2.

Elanur TUYSUZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Genetic Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan OZKAN

In this thesis study; 48 bacteria capable of degrading wool and having keratinase enzyme activity were firstly isolated. Among these bacteria, the isolate EY2 having the highest keratinase activity and maximum wool degradation potential was identified as *Bacillus licheniformis* (Gen Bank No: MN809476). The culture conditions were then optimized to prepare protein hydrolyzate from sheep wool using this isolate. The optimum pH, temperature and incubation time values for preparation of protein hydrolyzate from sheep wool were determined as 7, 55, C and 6 days, respectively. Optimum concentrations of KH_2PO_4 , MgSO_4 and NaCl were found to be 1.5, 0.5, 2 g / l, respectively.

Antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of the hydrolyzate produced under optimum conditions were investigated. As a result of the experiments, it was found that wool hydrolyzate had no antioxidant and antimicrobial effect. Human colon cancer cells (HT-29, Caco-2), human prostate cancer cells (DU-145) and human lung cancer cells (A-549) were used to investigate the anticancer properties of the hydrolyzate. It was observed that hydrolyzate concentrations of 1,00 mg/ml and 1,5 mg/ml in HT-29 cells, 2,5 mg/ml in DU-145 cells and 0,01 mg/ml in A-549 cells were highly cytotoxic on mentioned cancer cells and there was no effect on Caco-2 cells. The study also investigated the potential of the hydrolyzate as a peptone source for various test microorganisms. The maximum biomass concentrations for *E. coli* (1.4 g / l) and *A. niger* (8 g / l) were reached in the wool protein hydrolyzate medium, while the maximum cell concentration (2.4 g / l) for *S. cerevisiae* was in commercial tryptone peptone medium. As a consequence, in this thesis study, it was shown that a protein hydrolyzate which have biotechnological importance can be prepared from sheep's wool by using locally isolated bacteria of *Bacillus licheniformis* EY2.

2020, 71 pages

Keywords: *Bacillus licheniformis* EY2, sheep wool, protein hydrolyzate, peptone, anticancer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle, çalışmalarımda yardım ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren, beni her zaman cesaretlendiren ve stresli tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri, gerek deneysel çalışmalarım, gerekse tez yazım sürecinde bana her zaman yol gösteren, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, büyük bir özveriyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her daim hoşgörü ve sabırla benimle ilgilenen çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Bana Erzurum Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarını kullanma imkanı veren ve özellikle deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerin temini açısından desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında, takıldığım her konuda bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman kaçınmayan Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTAÇI'ya, çalışma arkadaşım Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU'na, özellikle tezimin yazım sürecinde her sıkıştığım konuda danıştığım ve stresli tez dönemimde her zaman yanımda olan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Melike YILDIZ'a, Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a ve Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT'a, tezin özellikle hücre kültürü kısmında her türlü yardımından dolayı Sayın Arş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU'na,

Hayatım boyunca her daim yanımda olan, sabırla ve büyük bir özveriyle beni destekleyip cesaretlendiren, maddi-manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan en değerli varlıklarım annem Fethiye TUYSUZ ve babam Ferruh TUYSUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Elanur TUYSUZ

Ocak, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Protein Hidrolizatları ve Kullanım Alanları.....	3
1.2. Protein Hidrolizatlarını Elde Etme Yöntemleri.....	4
1.3. Keratinlerin Yapısı ve Oluşumu.....	6
1.4. Keratinlerin Çözünürlüğü.....	9
1.5. Keratin İzolatlarının Üretimi.....	9
1.5.1. Kimyasal hidroliz	10
1.5.2. Enzimatik hidroliz	11
1.5.3. Mikrobiyal hidroliz.....	12
1.6. Keratin Ürünlerinin Çeşitli Biyoaktif Özellikleri.....	13
1.6.1. Antioksidan aktivite	13
1.6.2. Antimikrobiyal aktivite	14
1.6.3. Antikanserojen aktivite.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL ve METOD.....	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar.....	21
3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler	22
3.1.3. Koyunyünü	23
3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Yün parçalayan bakterilerin izolasyonu	24
3.2.2. Yün parçalayan bakterilerin taranması	25

3.2.3. Keratinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	26
3.2.4. Test suşunun karakterizasyonu.....	26
3.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu	26
3.2.4.b. 16S rRNA PCR İşlemi	28
3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi	30
3.2.4.d. Klonlama	30
3.2.5. Hidrolizat eldesi optimizasyon çalışmaları	35
3.2.5.a. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal pH'nın belirlenmesi	36
3.2.5.b. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal sıcaklığın belirlenmesi.....	36
3.2.5.c. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal KH_2PO_4 miktarının belirlenmesi	36
3.2.5.d. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal $MgSO_4$ miktarının belirlenmesi	37
3.2.5.e. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal NaCl miktarının belirlenmesi	37
3.2.5.f. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi	37
3.2.6. Optimal parametreler ile yüksek miktarda protein hidrolizat eldesi	38
3.2.7. Elde edilen hidrolizatın antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi.....	38
3.2.8. Elde edilen hidrolizatın antioksidan özelliğinin belirlenmesi	39
3.2.8.a. DPPH radikal temizleyici test.....	39
3.2.9. Hazırlanan yün hidrolizatının pepton olarak değerlendirilmesi	39
3.2.10. Hücre hatlarının çözülmesi, pasajlanması ve dondurulması	40
3.2.11. Hücre sayımı ve ekimi.....	41
3.2.12. Elde edilen hidrolizat için WST-1 analizi	41
3.2.13. İstatistiksel Analiz	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. Yün Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu	43
4.2. Yün Parçalama Miktarı ve Keratinaz Enzim Aktivitesine Göre Uygun Bakterinin Seçilmesi	44
4.3. Sekans Analizi Sonuçları.....	45
4.4. Optimizasyon Çalışmaları	46

4.4.1. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal pH'nın belirlenmesi.....	47
4.4.2. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	48
4.4.3. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal KH_2PO_4 , MgSO_4 ve NaCl konsantrasyonlarının belirlenmesi	49
4.4.4. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	51
4.4.5. Optimal parametreler ile yüksek miktarda protein hidrolizat eldesi	53
4.4.6. Elde edilen hidrolizatın antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi.....	55
4.4.7. Elde edilen hidrolizatın antioksidan özelliğinin belirlenmesi	55
4.4.7.a. DPPH radikal temizleyici test.....	55
4.4.8. Test mikroorganizmalarının gelişme performansları açısından yün protein hidrolizatı ve ticari peptonun karşılaştırılması	55
4.4.9. WST 1 assay hücre canlılığı analizi	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
g	Gram
h	Saat
HCl	Hidroklorik asit
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
Kb	Kilobaz
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
lt	Litre
M	Molarite
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
N	Normalite
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDB	Potato dextrose broth
RNaz	Ribonükleaz Enzimi
rpm	Dakika/devir
sp.	Cins
TP	Tripton pepton
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteinlerin üç boyutlu yapısı.....	2
Şekil 1.2.Yün lifinin şematik gösterimi	8
Şekil 4.1. 6 kat seyreltilen besiyerinin TSA'ya aktarıldığı karışık kültür	43
Şekil 4.2. EY2 kodlu bakterinin saflaştırılmış petri görüntüsü.....	45
Şekil 4.3. EY2 kodlu izolatanın, 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joiningfilogenetik ağacı	46
Şekil 4.4. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal pH'nın belirlenmesi	47
Şekil 4.5. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi	48
Şekil 4.6. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal KH_2PO_4 miktarının belirlenmesi	49
Şekil 4.7. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal $MgSO_4$ miktarının belirlenmesi	50
Şekil 4.8. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal NaCl miktarının belirlenmesi	51
Şekil 4.9. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi....	52
Şekil 4.10. Başlangıçtaki yünlü besiyeri/ Parçalanmanın olduğu yünlü besiyeri.....	53
Şekil 4.11. Liyofilizasyon işleminin ardından elde edilen yün protein hidrolizatı.....	54
Şekil 4.12. İnkübasyon öncesi ticari pepton ve yün protein hidrolizatı ile hazırlanmış besiyerlerinde mikroorganizma kültürleri.....	56
Şekil 4.13. İnkübasyon sonrası ticari pepton ve yün protein hidrolizatı ile hazırlanmış besiyerlerinde mikroorganizma kültürleri	57
Şekil 4.14. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı HT-29 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu	57
Şekil 4.15. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı DU-145 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu	58
Şekil 4.16. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı A-549 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu	59
Şekil 4.17. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı Caco-2 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	22
Çizelge 3.2. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyon ve miktarları	29
Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR işlemi için uygun sıcaklık, süre ve döngü sayısı.....	29
Çizelge 3.4. Koloni PCR programı	33
Çizelge 4.1. Saflaştırılan bakterilerin keratinaz enzim aktivitesi ve parçalayabildikleri yün miktarı değerleri	44
Çizelge 4.2. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteri ve benzerlik oranı	46
Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerinde elde edilen keratinaz enzim aktivitesi sonuçları	47
Çizelge 4.4. İnkübasyon sıcaklığının hidrolizat eldesi verimi üzerindeki etkisi	48
Çizelge 4.5. KH ₂ PO ₄ miktarının etkisi	50
Çizelge 4.6. MgSO ₄ miktarının etkisi	50
Çizelge 4.7. NaCl miktarının etkisi	51
Çizelge 4.8. İnkübasyon süresinin hidrolizat eldesi verimi üzerindeki etkileri.....	52
Çizelge 4.9. Test mikroorganizmalarının ticari peptonla ve yün protein hidrolizatıyla hazırlanmış besiyerlerinde büyüme oranları	55
Çizelge 4.10. Test mikroorganizmalarının kuru ağırlık ölçüm sonuçları	56

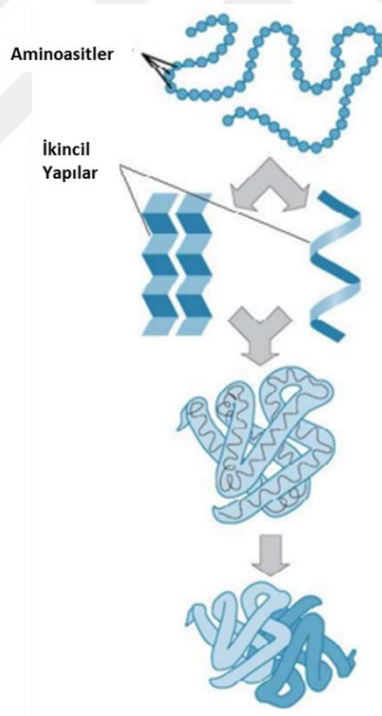
1. GİRİŞ

Proteinler, amino asit monomerlerinden oluşmuş ve bilinen en karmaşık yapıları polimerlerdir. Birçok hücrede kuru ağırlığın %50'sinden fazlasını oluşturlar ve organizmalarda birçok kritik rol oynarlar. Bilinen en temel katalitik özelliklerinin yanı sıra organizmalarda gerçekleşen; yapısal, destek, depolama, taşıma, sinyal iletimi, savunma gibi çok çeşitli metabolik olaylarda da görev alırlar. Büyük çoğunluğu 20 temel amino asitten oluşan proteinlerin üç boyutlu yapıları (konformasyon) birbirlerinden farklıdır. Amino ve karboksil grubu içeren monomerler olan amino asitler genel olarak α -karbon atomuna bağlı amino grubu (imino asit olarak adlandırılan prolinde imino grubu bulunmaktadır), hidrojen atomu, karboksil grubu ve R ile ifade edilen bir değişken (R=Radikal) grup olmak üzere 4 farklı grup içerir. Bu nedenle α -karbonu bir kiral merkezdir. R grubu, amino asidin özelliklerine göre değişkenlik gösterir (Demiralp *et al.* 2014).

Peptitler/proteinler, amino asit polimerleridir. İki amino asit molekülü, değişken bir amit bağı olan peptit bağı ile kovalent olarak bağlanarak dipeptit oluşturur. Birkaç amino asit birleşerek, oligopeptitleri (dipeptit, tripeptit, tetrapeptit vs.) oluştururken, birçok amino asidin bir araya gelmesiyle de polipeptitler oluşur. Bir peptidin en uçta bulunan serbest α - amino kısmı amino ucu (N-terminal ucu), diğer uçta bulunan karboksil grubu ise karboksil ucu (C-terminal ucu) olarak adlandırılır. Proteinler; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül yapı (kuarterner) olmak üzere dört yapısal düzeyde bulunur (Allison 2014; Demiralp *et al.* 2014).

Amino asitlerin peptit bağları aracılığıyla birbirlerine bağlanarak oluşturdukları düz polimer (polipeptit) zinciri, proteinin birincil yapısını oluşturur ancak polipeptit zincirinin biyolojik olarak aktif olabilmesi için özgül 3 boyutlu yapısını kazanması gerekmektedir. Birincil yapı, proteinin 3 boyutlu yapısını belirler. Birincil yapıdaki amino asit değişiklikleri proteinin üç boyutlu konformasyonunu ve fonksiyonunu etkileyebilir. Proteinin ikincil yapısında hidrojen bağları ile kurulan kıvrımlar, katlanmalar bulunur. α -heliks ve β -tabaka en yaygın olarak gözlenen ikincil yapılarıdır.

İkincil yapı elemanlarının daha ileri düzeyde katlanmalarıyla üçüncül yapı oluşur ve üçüncül yapı özellikle R grupları arasındaki etkileşimlerden kaynaklanır. Hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri, üçüncül yapı ile üç boyutlu yapının oluşumuna katılan başlıca etkileşimlerdir. Üçüncül yapıda bunların yanısıra; iyonik bağlar, tuz köprüleri ve hidrojen bağları bulunur. Proteinin üç boyutlu konformasyonu, sistein amino asitleri arasında oluşan disülfid kovalent bağlarıyla da desteklenir. Bazı proteinlerin işlevsel hale gelebilmeleri için iki veya daha çok polipeptit zincirinin alt birimlerinin bir araya gelmesi gerekir. Bu noktada proteinin dördüncül yapı düzeyi oluşur. Bir proteinin kuarterner (dördüncü) yapısı; primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapıları halinde biraraya gelmesiyle oluşur. Her proteinin kuarterner yapısı olmayabilir (Alberts *et al.* 2002; Allison 2014; Demiralp *et al.* 2014).



Şekil 1.1. Proteinlerin üç boyutlu yapısı (Avissar *et al.* 2017)

1.1. Protein Hidrolizatları ve Kullanım Alanları

Proteinler; bir hücrede meydana gelen olayların çoğunu katalizleyen, düzenleyen, kontrol eden, esansiyel amino asit ve enerji kaynağı olarak kullanılan en önemli makrobeyinlerdendir. Makrobeyin olmalarının yanısıra bazı proteinler, dizilerinde şifrelenmiş biyoaktif peptidlerin salınması ile ekstra faydalar sağlayabilmektedirler.

Biyoaktif peptitler genel olarak; protein molekülü sekansı içinde inaktif olan, ancak enzimatik hidroliz, fermentasyon ve gastrointestinal sindirim yoluyla serbest bırakılabilen oligopeptitlerdir. Düşük moleküler ağırlıklı peptitler, insan vücudunun çeşitli fizyolojik fonksiyonları için proteinlerden daha biyoyararlı olabilmektedirler ve genellikle ana proteinden daha fazla biyoaktiftirler (Gousterova *et al.* 2005; Sarmadi and Ismail 2010; Chalamaiah *et al.* 2018). Bu nedenle özellikle fenolik bileşikler, biyoaktif peptitler gibi çeşitli besin kaynaklarına sahip yeni fonksiyonel bileşenler üzerine yapılan çalışmaların sayısı önemli ölçüde artmaya başlamıştır (Callegaro *et al.* 2018; Kshetri *et al.* 2019). Protein hidrolizatları; balık atıkları, soya, bezelye, istiridye, midye, peynir altı suyu, tüy ve yün gibi protein açısından zengin kaynaklardan; enzim, asit / alkali muamelesi ve fermentasyon yoluyla proteinlerin hidrolizi ile üretilen, aminoasitlerden ve/veya peptitlerden oluşan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Sarmadi and Ismail 2010; Chalamaiah *et al.* 2018). Bu peptitler, gastrointestinal sindirim, enzimatik işlem veya mikrobiyal fermentasyon sırasında serbest bırakıldıktan sonra; antioksidan, ACE inhibitörü ve antimikrobiyal etki gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilerler (Sinkiewicz *et al.* 2018). Protein hidrolizatlarının; tıp (parkinson, alzheimer, kanser, ülser, diyabet, akut ve kronik karaciğer hastalıklarında, fenilketonüri, bağırsak sendromunda, ateşli bağırsak hastalığında, obezite, pankreasla ilgili hastalıkların tedavisinde), farmakoloji, ziraat (hayvan yemi, bitki gübresi), mikroorganizmalar için pepton kaynağı, kozmetik ve gıda endüstrisi (enerji içeceklerinde, diyet ürünlerinde) başta olmak üzere geniş uygulama alanları bulunmaktadır (Eremeev *et al.* 2009; Fakhfakh *et al.* 2011).

1.2. Protein Hidrolizatlarını Elde Etme Yöntemleri

Protein hidrolizatları,, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle üretilmektedirler. Proteinlerin kimyasal hidrolizi, asit veya baz ile peptit bağlarının kırılmasıyla gerçekleştirilir. Kimyasal yöntemle üretimde yüksek sıcaklık ve basınç altında asit ve alkali koşullar kullanılır. Kimyasal hidroliz, kontrol edilmesi zor bir süreçtir. Kuvvetli kimyasallar ve çözücülerle, aşırı sıcaklıklarda ve yüksek pH'ta gerçekleştirilmesi, hidrolizatta arzu edilen fonksiyonel özelliklerin kaybolabilmesi, çevreye zararlı ve bertaraf edilmesi ciddi maliyetler gerektiren atıkların oluşması gibi problemler nedeniyle özellikle son yıllarda çok fazla tercih edilmemektedir (Barba *et al.* 2008). Bunun aksine; 5-8 arası pH, daha düşük sıcaklık- basınç gereksinimi ve daha çevre dostu olması bakımından, kimyasal yöntemle üretimde karşılaşılan dezavantajların büyük çoğunluğunu barındırmaması, enzimatik yöntemle hidrolizat üretimini daha popüler hale getirmiştir (Fakhfakh *et al.* 2012). Protein hidrolizatlarının hazırlanmasında parçalayıcı özelliğe sahip olan alkalaz, kimotripsin, papain, pepsin, plazmin, pankreatin, flavourenzim, nötraz, katapsin, alfa-kimotripsin, pronaz, nötraz, proteaz ve tripsin gibi enzimler kullanılmaktadır (Fontoura *et al.* 2014; Taskin *et al.* 2016). Bu saf enzimlerin, oldukça pahalı olması nedeniyle son yıllarda protein hidrolizatlarının hazırlanmasında enzim üretme kapasitesine sahip olan mikroorganizmaların doğrudan kullanımına yönelim vardır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal enzimler; daha düşük maliyetle, kısa sürede elde edilebilmeleri, daha az iş yükü gerektirmeleri, güvenli kullanımları ve hidrolizat verimlerinin çok yüksek olmaları açısından avantajlıdır (Patkowska-Sokoła *et al.* 2009).

Literatürde protein hidrolizatlarının genellikle besin kaynaklarından (soya, yumurta, bezelye, istiridye, midye) elde edilebildiği bildirilmiştir. Bölgesel artış ve azalış eğilimlerine ilişkin yapılan son araştırmalarda, 2 bin yıl önce 300 milyon olan dünya nüfusunun, bugün yaklaşık 7,71 milyara ulaştığı belirtilmiştir. Uzmanlar, dünya nüfusunun 2075 yılına kadar 30 milyara yükseleceğini tahmin etmektedirler (Beyhan 2011). Gün geçtikçe artan dünya nüfusu insanları alternatif besin kaynakları bulmaya ve bunlardan yararlanmaya teşvik etmekte olup, bu yönüyle mevcut besin kaynaklarının

biyoteknolojik süreçlerde kullanılması istenmeyen bir durumdur. Artan insan popülasyonu ve değişen beslenme alışkanlıkları sadece besin kaynaklarını tüketmekle kalmamakta, aynı zamanda çevreye bırakılan atık madde miktarında artmasına sebep olmaktadır (Chalamaiah *et al.* 2018; Tripathi *et al.* 2019). Çevresel atıklar birçok ülkede büyük miktarlarda bulunmaktadır ve bu atıkların doğada birikmesi, ciddi bir kirlilik oluşturmakla birlikte toplum sağlığını da önemli derecede tehdit etmektedir. Bu nedenle, atıkların uygun şekilde yok edilmeleri, çevre kirliliğinden kaçınmanın bir aracı olarak düşünülmektedir. Diğer taraftan bu atıkların bazıları, yüksek miktarda protein ve çeşitli karbon bileşikleri içermekle birlikte, bu özelliklerinin biyoteknolojik süreçler sonucunda kullanılmasına veya geri dönüştürülmesine yönelik çok az çalışma yapılmıştır. Dolayısıyla bu yönde yapılacak çalışmalar; atık maddelerin değerlendirilebilmesi ve işe yarar hale dönüştürülmesi açısından oldukça faydalı olacaktır.

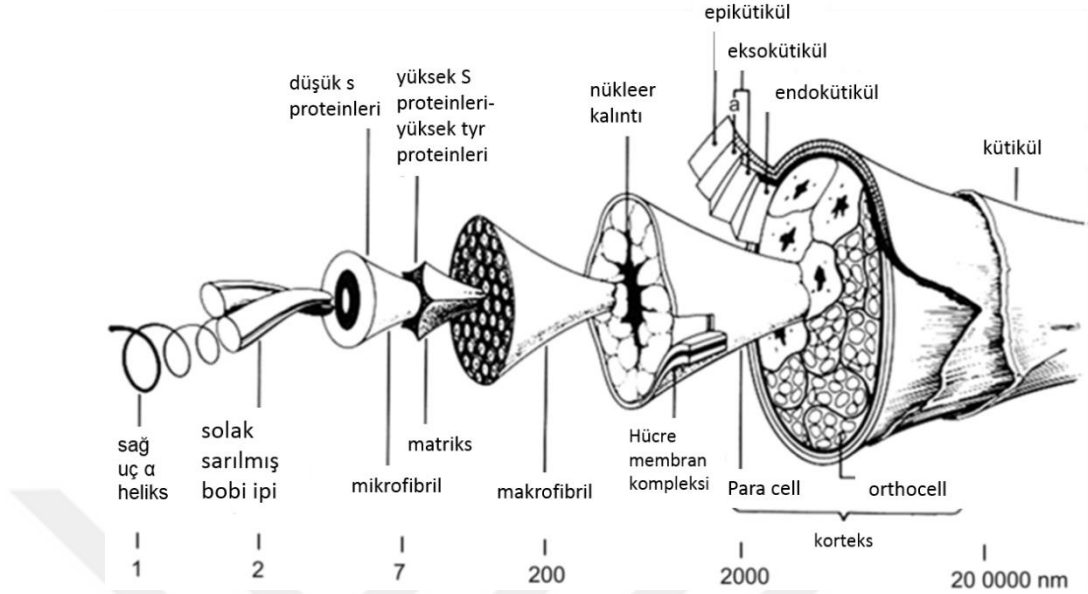
Son yıllarda yapılmaya başlayan, atık ürün kaynaklı hidrolizat üretimi ile ilgili araştırmalar bu açıdan dikkat çekmektedir. Özellikle yün, tüy gibi atıkların protein hidrolizatı eldesinde kullanılabileceğinin ortaya çıkması ile bu yönde yapılan çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. Hayvansal atık ürünlerin yüksek miktarda keratin içermeleri ve keratin bazlı malzemelerin geniş kullanım alanlarına sahip olması yapılan ve yapılacak çalışmaların değerini daha da artırmaktadır. Keratin atıkları, büyük hacimlere ve yüksek kirletici özelliklere sahip olup, yünlü tekstil endüstrisinde ve kanatlı kesimhanelerinde istenmeyen yan ürünler olarak karşımıza çıkmaktadır (De Oliveira *et al.* 2016). Et ve deri işleme endüstrileri, büyük miktarlarda keratin atıkları üretmektedir, bu atıkların geri kazanımları ise oldukça düşüktür. Özellikle mikrobiyal yolla, atık ürün kaynaklı keratin hidrolizatı üretimi, kümes hayvanı kesimhaneleri gibi yerlerde oluşan atık yan ürünlerin bertaraf edilmesi için ciddi bir potansiyel olarak ortaya çıkmaktadır (Sinkiewicz *et al.* 2018). Tekstil endüstrisinde kullanılmaya uygun olmayan koyun yünü en önemli keratin atıklarından biridir (Mokrejš *et al.* 2011). Keratin içerikli atıkların giderilmesi ise sadece potansiyel; parasal, çevresel, sağlık risklerini azaltmak (De Oliveira *et al.* 2016) için değil, aynı zamanda keratinlerin mevcut; biyolojik aktivite, biyoyumluluk, biyobozunurluk, mekanik dayanıklılık,

hücre yapışmasını, çoğalmasını kolaylaştırabilme gibi özelliklerinden faydalanabilmek adına da oldukça önemlidir (Mokrejš *et al.* 2011). Yapılan çalışmalar, keratin içerikli maddelerin; anjiyotensin I dönüştüren enzim inhibitörü, dipeptidil peptidaz IV inhibitörü, antimikrobiyal, antioksidan gibi özelliklere sahip, biyolojik aktiviteleri yüksek olan amino asit dizileri içerdiğini göstermiştir (Mokrejš *et al.* 2011; Sinkiewicz *et al.* 2018). Bu özellikler; biyomedikal (yara iyileşmesi, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği), kozmetik sanayii (şampuanlarda, saç ve tırnaklar için yapılan kremlerde), gıda endüstrisi ve tarımsal kullanımlar gibi çeşitli uygulamalarda biyoaktif peptitler için sayısız uygulama alanı yaratmıştır. Ancak keratin bakımından zengin malzemelerin endüstriyel uygulamaları, sahip oldukları proteinlerin çapraz bağlanmaların ve sıkı paketlenmiş mikro-iplikçiklerin çözünme zorlukları nedeniyle henüz istenilen seviyede değildir (Matsui *et al.* 2009; Mokrejš *et al.* 2011; Sinkiewicz *et al.* 2018).

1.3. Keratinlerin Yapısı ve Oluşumu

Keratinler, omurgalıların belirli epitel hücrelerinde üretilen, ara filament proteinlerinin süper ailesine ait olan bir grup çözünmeyen proteinlerdir (Patrucco *et al.* 2019). Keratinler; saç, kıl, yün, tüy, pençe ve boynuz gibi kısımlarda bolca bulunurlar (Mokrejš *et al.* 2011; Patrucco *et al.* 2019). Doğal olarak biyo-uyumludurlar. Lösin, arginin, glutamik asit, aspartik asit, valin, glisin, serin vb. aminoasitlere sahiptirler (Lee *et al.* 2002; Patrucco *et al.* 2019). Oldukça sert, elastik, esnek ve dayanıklı olan keratinlerin; su geçirmeme, atıkların atılımı ve sıcaklığın düzenlenmesi, daha derin dokuları mekanik şok ve enfeksiyonlara karşı koruma gibi çeşitli özellikleri vardır (Sinkiewicz *et al.* 2018). Keratin bazlı malzemeler, diğer proteinlere kıyasla yüksek sistein içeriği ile karakterize edilir. Keratin içindeki toplam kükürt içeriği %2 ile %5 arasında değişmektedir. Yüksek sülfürlü amino asit içeriğinin neticesinde oluşan, disülfid bağları nedeniyle keratinler suda, zayıf asitlerde, alkalilerde ve ayrıca organik çözücülerde çözünmezler (Mokrejš *et al.* 2011; Sinkiewicz *et al.* 2018). Alt birimleri, sarmal yapıya sahip merkezi bir alandan ve 15-30 amino asit kalıntısından oluşan küresel N- ve C-terminal domainlerinden ve β -levha bölgelerinden oluşur. Yüksek oranda korunmuş merkezi domainler, tekrar eden dizilerde düzenlenmiş 310–315 kalıntı

içerir. Keratin alt birimleri, matriks içine gömülü, çift sarmallı bir süper heliks, mikrofibril ve makrofibril oluşturan yüksek dereceli bir yapıya bağlanır ve çok sayıda disülfid bağları içerir. Bu nedenle; tripsin, pepsin ve papain gibi yaygın proteolitik enzimler tarafından kolayca parçalanamazlar (Mokrejš *et al.* 2011; Sinkiewicz *et al.* 2018). Keratinler, amino asitlerin bileşimindeki ve ikincil yapıdaki varyasyonlar nedeniyle heterojen yapıda olan proteinlerdir. %10 - %14 arasında sistein içeren; yün, saç, ciltte bulunan keratinler yumuşak ve esnektir ancak %22'ye kadar yüksek oranda sistein içerikleri nedeniyle tüylerden, gagalardan, pençelerden ve boynuzlardan elde edilen keratinler daha serttir (Sinkiewicz *et al.* 2018). Keratinlerdeki polipeptidler zinciri α -, β - ve γ -keratinler olarak adlandırılan üç farklı konfigürasyona sahiptir. α keratinler yapısaldır, alfa heliks üçüncül bir yapıya sahiptir ve ortalama 60-80 kDa aralığında bir molar kütle sahiptir (Hill *et al.* 2010). Memelilerde kılların (lif korteksi), tırnakların, toynakların, boynuzların, tüylerin ve derinin epidermal tabakasının birincil bileşeni olarak ortaya çıkar (Sinkiewicz *et al.* 2018). β -keratinler öncelikle koruyucudur ve epidermin çoğunluğunu oluşturur. Beta keratinleri ekstrakte etmek zordur. β -Keratinler kuşların ve sürüngenlerin pullarında, pençelerinde, gagalarında, tüylerinde ve kütikül kıllarında bulunur. Glisin, alanin, serin ve prolin kalıntıları bakımından zenginlerdir ancak sistein içermez, bu nedenle yapı sadece hidrojen bağları ile stabilize edilir (Sinkiewicz *et al.* 2018). Gama-keratinler küreseldir, sülfür içeriği yüksektir ve diğer keratin tiplerine göre daha düşük moleküler ağırlığına (yaklaşık 15 kDa) sahiptir (Hill *et al.* 2010).



Şekil 1.2. Yün lifinin şematik gösterimi (Hill *et al.* 2010)

Kayda değer sert bir keratin örneği olan temiz bir yün lifi, yüksek miktarda sistin ihtiva eder ve yaklaşık %82 oranında keratinli protein içerir. Yaklaşık %17'si, esas olarak hücre zarı kompleksi içinde bulunan proteinlerdir. Geriye kalan %1'lik kısmı ise lipitlerden ve polisakaritlerden oluşur (Lewis and Rippon 2013).

Yün keratinlerinin moleküler ağırlık dağılımı, tipik alfa heliks sekonder yapılı, 60.000-45.000 Da arasında iki protein fraksiyonu ve 28.000-11.000 Da arasında düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlar serisi gösterir (Zoccola *et al.* 2009).

Yün ve kıl keratinlerinin amino asitleri, tüy ve boynuz keratinlerine kıyasla daha yüksek bir sistin içeriğine sahipken; arginin içeriği ise hepsinde birbirine oldukça benzerdir.

Yüksek kükürtlü proteinlerin amino asit kalıntılarının yarısından fazlasını oluşturan sistin, prolin, serin ve treonin en çok yün içinde bulunur (Lewis and Rippon 2013). Yine yün liflerinin hücre yapıları arasındaki protein malzemesini karakterize eden glisin ve tirozin miktarı, yün içinde boynuz / toynaktan daha yüksektir (Zoccola *et al.* 2009).

1.4. Keratinlerin Çözünürlüğü

Reaktif olmayan karakteri ve güçlü esnekliği nedeniyle keratin ancak büyük zorluklarla işlenebilir; bu nedenle kısmen hidrolize edilmesi gerekir (Mokrejš *et al.* 2011). Ham keratin bazlı malzemelerin işleme prosesi, keratin çözünme ürününün kullanım amacına bağlı olup; bazı organik çözücülerde ısı işlem, disülfid bağlarının indirgenmesi veya yükseltgenmesi, alkalik, asit veya enzimatik hidroliz, çeşitli hidrotermal yöntemler, termo-kimyasal ve enzimatik işlemlerin bir kombinasyonunu içerir (Sinkiewicz *et al.* 2018).

1.5. Keratin İzolatlarının Üretimi

Doğal keratin izolatlarının elde edilmesi; keratinlerin, içerisinde bulunan proteinlerin bozulmasına neden olmayacak çözeltilerde çözünmemesi ve dolayısıyla bu çözeltilerin kullanılamaması nedeniyle pratikte zor bir süreçtir. Ekstraksiyon için birincil zorluk, keratinlerin peptid bağlarını kırmadan çözülmesini sağlamak için disülfid bağlarının kırılmasıdır. Aslında, özütleme işlemleri, özellikle de yüksek sisteini içeren yün ve saçlar söz konusu olduğunda, indirgeyici veya oksitleyici ajanlar ile yapılır (Patrucco *et al.* 2019). Keratin için örneğin N, N-dimetilformamid (DMF) veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerin kullanıldığı çözdürme yöntemleri geliştirilmiştir. DMSO ile ekstraksiyon için, çözülmüş proteinin aseton veya benzen ile çöktürülmesi gerekir. Daha sonra çözücü uzaklaştırılarak protein eldesi gerçekleştirilir. Bu prosedür protein yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ancak uzun bir özütleme süresi ve çözücü geri kazanımı ihtiyacından kaynaklanan yüksek maliyet gerektirir. Disülfid bağlarının azaltılması ve oksidasyonu ise keratin izolasyonu için yaygın yöntemlerdendir. Keratinin indirgenmesi; 2-merkaptöetanol, ditiyotreitöl (DTT), ditioeritritöl, tiyoglikolik asit, glutatyon, hidrokiyanik asit tuzları, bisülfid ve proteini çözdürmek için m-bisülfidlerin kullanımını içerir. Koruyucu yapı içerisinde birçok keratin sıkışıp kalabilir ve genellikle üre, tiyöüre, geçiş metali hidroksitleri, yüzey aktif cisimleri ve bunların kombinasyonları gibi bir hidrojen-bağ kırıcı madde, proteini açmak veya denatüre etmek için özütleyiciye dahil edilir. 0.1 ila 1.0 M arasındaki

konsantrasyonlarda sulu tris (hidroksimetil) aminometan çözeltileri ve 0.1-10 M üre çözeltileri kullanılır. Keratin çözeltisi, reaktifleri çıkarmak için diyaliz edilir. Diyaliz sırasında, geniş protein toplanması meydana gelebilir, ancak bu genellikle sodyum dodesilsülfat (SDS) eklenmesiyle önlenir. İndirgeme sonrasında disülfid bağları, sistein tiyol (indirgenmiş keratin) ve sistein-S-sülfonat (Bunte tuzu) tortuları vermek üzere parçalanır.

Keratinler indirgeme ile ekstrakte edilirse, daha az polar, suda daha az çözünen, fakat asidik ve alkali çözeltilerde daha kararlı olan, kerainler denilen ürünler ortaya çıkar. Keratin çıkarmak için oksidasyon uygulandığında; hidrojen peroksit, potasyum permanganat, amonyum bakır hidroksit ve organik perasitler gibi güçlü oksidanlar kullanılır. Disülfid bağları, sülfonik asit gruplarına dönüştürülür ve “keratoz” olarak adlandırılan sisteik asit türevleri oluşturulur. Bu keratozlar suda çözünür, nondisülfür çapraz bağlanabilir ve in vivo olarak nispeten hızlı bir şekilde bozular (Hill *et al.* 2010).

1.5.1. Kimyasal hidroliz

Keratinli proteinlerden, protein hidrolizatı hazırlamak için kullanılan yöntemlerden bir tanesi, kimyasal (asidik veya alkalın) hidrolizdir. Asit hidrolizi genellikle H_2SO_4 ve HCl kullanılarak gerçekleştirilirken alkalın hidrolizde en çok $Ca(OH)_2$, NaOH ve KOH kullanılmaktadır. (Mokrejš *et al.* 2011; Taskin and Kurbanoglu 2011).

Kimyasal hidroliz sırasında bazı amino asitler kaybolur. Keratinler, güçlü asitlerde veya alkalilerde hidrolizle kolayca çözünebilirler ancak özellikleri, doğal keratininkilerden önemli ölçüde farklı olan amino asitler, peptitler, peptonlar ve proteozlar ortaya çıkar. Keratinli malzemelerin alkali ile ısıl kimyasal olarak işlenmesi; asparagin, arginin, serin, treonin ve glutamin gibi aminoasitlerin bozulmasına neden olur. Keratin yününün $70^\circ C$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda 9-11 arasında bir pH aralığında, 4-12 saat boyunca aşırı alkali varlığında çözünmesi disülfid gruplarının sistein kalıntılarına dönüşmesine ve ardından sistein kalıntılarının tiyoeter gruplarına dönüşmesine neden olabilir. Ayrıca, keratinlerin güçlü alkali çözeltilerde indirgeyici ajanlarla işlenmesi, sistin ve hidroksi

amino asit kalıntılarını yok eden koşullar yaratır. Keratinler aynı zamanda metalik sülfidlerin alkalın çözeltilerinde çözünebilirler. Bu reaktifler genellikle kozmetik tüy dökücülerinde ve tabaklama endüstrisindeki tüylerin deriden çıkarılmasında kullanılır.

Asidik hidroliz yüksek düzeyde etkilidir, ancak bazı amino asitlerin, örneğin; serin, treonin, tirozin, sistinin kaybı ve ayrıca asparagin, glutamin ve triptofanın başka ürünlere dönüştürülmesi nedeniyle önerilmez. Ayrıca, valin ve izolösin gibi amino asitler arasındaki bağların yavaş yavaş bozulmasına sebep olur. Keratin, uygun yüksek sıcaklık kullanılarak hidroklorik asit, sülfürik asit ve formik asit içinde çözünebilir (Sinkiewicz *et al.* 2018).

1.5.2. Enzimatik hidroliz

Keratin atıklarının çözündürülmesinde; zararlı kimyasal yöntemlere alternatif olan enzimatik ve / veya mikrobiyolojik yöntemler, daha ucuz ve daha ılımlı koşullar altında gerçekleştirilebilmektedir. Bu noktada devreye giren proteolitik enzimler, endüstride büyük ölçüde protein substratlarının hidrolizini içeren biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (Khardenavis *et al.* 2009). Proteazlar, küresel enzim pazarlarının önemli bir bölümünü oluşturur ve bu pazarın büyük bir kısmını bakteriyel proteazlar oluşturur (Rao *et al.* 1998). Bakteriyel keratinazlar ise çözünmeyen keratin substratları ve genel olarak geniş bir yelpazede protein substratları üzerindeki etkisinden dolayı önem kazanan, keratinlerin hidrolizini katalizleyen, özel bir proteaz enzim grubudur. Bu enzimler çözünmeyen keratini; yemlere, gübrelere ayrıca kozmetik, tıbbi ve farmasötik uygulamalar için uygun malzemelere dönüştürür. Mikrobiyal keratinazlar, keratin atıklarının, örneğin kullanılmamış tavuk tüyünün, koyun yününün, katma değerli ürünlere dönüştürülmesinde biyoteknolojik alternatiflerin geliştirilmesine yönelik büyük bir talep olduğu gerçeğinden dolayı, enzim piyasasında büyük ilgi uyandırmaktadır.

1.5.3. Mikrobiyal hidroliz

Keratinli atıklar doğada bazı mikroorganizmalar tarafından direkt olarak bozunabilir. Çünkü bazı bakteriler, aktinomisetler, mantarlar; karbon, kükürt, azot ve enerji kaynağı olarak doğal keratini kullanırlar (Kaul and Sumbali 1997). Salgıladıkları proteazlar ile, hücre dışı proteinleri büyük peptidlere, küçük peptidlere ve serbest aminoasitlere hidrolize edebilirler (Smid and Lacroix 2013). Bu özelliğe sahip olan sınırlı sayıda mikroorganizma, keratin demetlerini parçalayabilen özel keratinazları salgırlar ve büyüme için, substrat kaynağı olarak keratini kullanırlar. Mikroorganizmaların ürettiği keratinazın genellikle alkalın pH ve termofilik sıcaklıklarda üretildiği görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda; *Pseudomonas aeruginosa* (Han *et al.* 2012), *Microsporum fulvum* IBRL SD3 (Darah *et al.* 2013), *Aspergillus niger* (Lopes *et al.* 2011), *Fervidobacterium pennavorans* (Friedrich and Antranikian 1996), *Bacillus licheniformis* (Fakhfakh *et al.* 2009), *Streptomyces pactum* DSM40530 (Boeckle *et al.* 1995) *Thermoactinomyces candidus* (Ignatova *et al.* 1999), *Bacillus pumilus* (El-Refai *et al.* 2005), *Bacillus cereus* (Lateef *et al.* 2010), *Bacillus subtilis* (Cai *et al.* 2008), *Stenotrophomonas sp.* (Jeong *et al.* 2010), *Fervidobacterium islandicum* (Nam *et al.* 2002) gibi mikroorganizmaların keratini degrade ederek kullanabildikleri gözlenmiştir.

Yün ve diğer keratin atıkları hidrolize etme kabiliyetine sahip termofillerin izolasyonu üzerine çok az sayıda çalışma bildirilmiştir. Mikrobiyal dönüşüm, genellikle ılımlı koşullarda meydana geldiğinden, düşük maliyetli olduğundan ve ekolojik olarak güvenli bir işlem olarak kabul edildiğinden, diğerlerine kıyasla daha uygun bir yöntem olarak düşünülmektedir (De Oliveira *et al.* 2016).

1.6. Keratin Ürünlerinin Çeşitli Biyoaktif Özellikleri

1.6.1. Antioksidan aktivite

Oksidasyon, tüm canlı organizmalarda, yan etkisi serbest radikallerin üretimi olmasına rağmen, hayati bir süreçtir. Serbest radikaller doğal olarak metabolizma sırasında ve aerobik organizmalarda solunum sırasında ortaya çıkar. Enerji üretimi, lipidlerin bozulması, stres ve enflamatuvar süreçler gibi normal reaksiyonların yan ürünleridir (Ren *et al.* 2008). Solunum gibi normal vücut reaksiyonları sırasında, süperoksit anyon radikalleri (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekli oksijen (1O_2) gibi serbest olmayan radikal türler oluşur (Gülçin 2009). Serbest radikaller fazla üretildiğinde veya üretilip erozyona uğramadığında, bir zincir reaksiyonu başlatan en yakın moleküllere saldırabilirler. Yapılan çalışmalarda, serbest radikal oluşumunun kalp hastalığı, felç, arteriyoskleroz, diyabet ve kanser gibi birçok hastalığa sebep olduğu bildirilmiştir. İnsan vücudunda; katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi çeşitli enzimatik antioksidanlar, oksidasyon işlemleri üzerinde bazı kontrollerin sağlanmasına yardımcı olur. Bununla birlikte, fazla miktarda serbest radikal oluştuğunda, vücudun doğal koruyucu antioksidan enzimatik sistemi aşırı güçlenebilir ve lipidleri, proteinleri, DNA ve enzimleri oksitleyerek yıkıcı ve öldürücü hücresel etkilere neden olabilir (Davalos *et al.* 2004; Dimitrios and Technology 2006; Pihlanto 2006).

Çeşitli peptitlerin veya hidrolizatların antioksidan özelliklerine ilişkin çok sayıda rapor bulunur, ancak keratinle ilgili çalışmalar çok daha azdır. Bu yönde yapılan bazı çalışmalar aşağıdaki gibidir.

Örneğin; Fakhfakh ve arkadaşları (2011), tavuk tüyünün bakteriyel fermantasyonundan sonra elde edilen hidrolizatta, yüksek antioksidan aktivite bulmuşlardır (Fakhfakh *et al.* 2011). Keratin atıkları, DPPH radikal temizleyici tahlili kullanılarak kollajen atıklarından daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Yazarlar, balık yemi formülasyonlarında tüy protein hidrolizat kullanımının yemin biyolojik özelliklerini

iyileştirmek için uygun olabileceğini öne sürmüştür. Kumar ve arkadaşları (2012), Fakhfakh ve ark.(2011) tarafından gösterilene benzer şekilde *Bacillus pumilus* A1 soyunu kullanarak yüksek bir DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi olan tüy protein hidrolizatını üretmiştir (Kumar *et al.* 2012). Fontoura ve arkadaşları (2014), *Chryseobacterium sp.* kr6 kullanarak, çiğ tavuk tüylerinden hidrolizat elde etmişlerdir (Fontoura *et al.* 2014) Bu hidrolizatların; yem, gıda ve ilaç üretimi için bir biyoaktif bileşen kaynağı olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir. Bir antioksidan peptit, bakteriyel fermantasyon yoluyla elde edilen tavuk tüyü hidrolizatından izole edilmiş ve Ser-Asn-Leu-Cys-Arg-Pro-Cys-Gly olarak tanımlanmıştır (Wan *et al.* 2016)

1.6.2. Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite, hastalığa neden olan mikroorganizmaların öldürülmesi veya engellenmesi sürecini belirtir. Bu amaçla günümüzde çeşitli antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Antimikrobiyal maddeler; doğal veya sentetik olarak elde edilebilmektedir. Kuaterner amonyum bileşikleri, biguanitler, nhalaminler, gümüş gibi metaller ve kitosan gibi doğal olarak türetilmiş biyopolimerler gibi sentetik organik maddeler, son yıllarda en çok çalışılan antimikrobiyal maddeler arasındadır. Bununla birlikte, bu ajanlar yan etkilere, çevre kirliliği sorunlarına, mikroorganizmalar için direnç, düşük dayanıklılık ve geniş yelpazedeki mikroorganizmalar için sınırlı etkinliğe sahip olabilme gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle; mikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek amacıyla, yeni ve etkili antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalarda; protein hidrolizatlarının farklı tiplerde antimikrobiyal peptitler içerdikleri gözlenmiş ve bu özellikleri ile yeni antimikrobiyal maddeler olarak dikkat çekmişlerdir (Zhang *et al.* 2008). Antimikrobiyal peptitler, doğrudan bakteri ile etkileşime girip, onları öldürerek doğal immünyetede kilit rol oynar. Bu antimikrobiyal peptitler, bakterilerin hücre zarlarına zarar verir, hücre içi proteinlerinin fonksiyonlarına müdahale ederler (Hou *et al.* 2017). Birçok farklı organizma, birincil bir immün strateji olarak antimikrobiyal peptitler üretir. Tıbbi uygulamalarda bazı zamanlarda; antimikrobiyal peptitler, geleneksel bakterisit antibiyotiklere tercih edilir. Çünkü bu peptitler, bakterileri daha hızlı öldürürler ve

antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmezler. Ayrıca antimikrobiyal peptitler; geniş bir aktivite spektrumu, çok düşük konsantrasyonlarda yüksek etkinlik gösterme ve direnç gelişimi için düşük eğilim sergileme gibi avantajlara sahiplerdir (Mouro and Gouveia 2016).

1.6.3. Antikanserojen aktivite

Proteinler, peptidler ve amino asitler farklı kanser türlerinin gelişmesini önlemede rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, çeşitli kaynaklarda bulunan farklı boyutlardaki peptitlerin antikanser özelliklerinin bulunduğu; bu peptitlerin; farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisinin yanı sıra yaşayabilirliğini de etkilediği görülmüştür (Bhat *et al.* 2015). Son zamanlarda, sıklıkla sentetik antikanser ilaçlara karşı direnç gözlemlendiğinden dolayı, doğal olarak elde edilebilen, daha etkili ve daha az toksik antikanser ilaçlarına olan ilgi, büyük oranda artmıştır. Bu amaçla, doğal antitümör ajanları tanımlamaya ve karakterize etmeye ihtiyaç vardır. Farklı kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatları ve peptidleri bu ihtiyaca cevap vermeye başlamıştır. Çalışmalar sonucunda; protein hidrolizatlarının, çeşitli kanser türlerine (kolon, meme, mide, prostat kanseri vb) karşı biyoaktivite gösterebildikleri ve kanserin önlenmesi, tedavisi için potansiyel terapötik değere sahip olabilecekleri bildirilmiştir. Ancak şimdiye kadar farklı kaynaklardan özellikle atık kaynaklardan elde edilebilen protein hidrolizatlarının antikanser aktivitesi üzerine yeterince çalışma yapılmamıştır (Markowicz *et al.* 2014; Damps *et al.* 2017; Ishak *et al.* 2018).

Atıktan çıkarılan keratin; biyolojik, gıda ve biyomateryal uygulamalar için bir biyoaktif bileşik kaynağıdır. Keratinlerin biyolojik olmayan fonksiyonları hakkında, biyoaktif özelliklerden daha fazla bilgi vardır. Bu nedenle, yararlı yeni biyoürünlerin oluşumunda, kullanılacak keratin atıklarını biyoaktif peptitlere dönüştürmeye yönelik çok daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Sinkiewicz *et al.* 2018).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gousterova *et al.* (2005), deri ve kürk endüstrisi tarafından atılan kollajen ve keratin atıklarının örnek bir karışımı olduğu için, çalışmalarında yerli koyun derisi ve yünü kullanmışlardır. Çalışmalarının ilk aşamasında, dört tane yeni izole edilmiş termoaktinomiset suşu ile bu karışımın hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra başka bir deney düzeneği kurmuş ve keratin atıklarını, alkali koşullarda hidrolize etmişlerdir. Mikrobiyal hidrolizatların, esasen düşük molekül ağırlıklı peptidleri ve amino asitleri içerdiğini, alkalın hidrolizin ise ağırlıklı olarak daha yüksek molekül ağırlıklı peptitler ürettiğini göstermişlerdir. Termoaktinomiset suşlarını kullanarak, keratin atıklarının hidrolizinin daha basit, hızlı, etkili ve düşük maliyetli olduğunu göstermiş; önerilen yöntemin, tarımda değerli peptidleri ve amino asitleri içeren karışımları hazırlamak için uygulama bulabileceğini belirtmişlerdir.

Picot *et al.* (2006), yaptıkları çalışmada, iki insan meme kanseri hücre hattında, 18 tane balık proteini hidrolizatının antiproliferatif aktivitesini ölçmüşlerdir.

Barba *et al.* (2008), yaptıkları çalışmada; yünü kullanmış ve yünü hidrolize ederek bir keratin peptidi hazırlamışlardır. Daha sonra bu peptidi, cilt üzerinde test etmişler ve in vivo çalışmalar yapmışlardır. Muamele süresince hidrasyon ve elastikiyeti belirlemişlerdir. Tedavi edilen farklı cilt bölgelerinin higroskopik özelliklerini ve su tutma kapasitesini değerlendirmek için bir sorpsiyon-desorpsiyon testi de yapmışlardır. Kontrol ve muamele edilen yerler arasında önemli farklılıklar bulmuşlardır. Muamele edilen alanlar, keratin peptidi uygulamasının bir sonucu olarak hidrasyon ve elastikiyet artışı göstermiştir. Ölçümler ayrıca keratin formülasyonlarının cilt bariyer bütünlüğünü güçlendirerek su tutma kapasitesini arttırdığını göstermiştir.

Patkowska-Sokoła *et al.* (2009), Polonya, Yunanistan ve Suriye menşeli koyunlardan alınan koyun yünlerinin analizini kimyasal olarak gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonucunda, yünlerin kimyasal bileşimlerinde makroelementler (Na, K, Ca, Mg, P,S), iz

elementleri (Al, Co, Ba, Mo, Cu, Mn, Zn, Fe, Sr, Ti,) ve ağır metaller (Pb, As, Cd, Hg,) tespit etmişler ve farklı ülkelerdeki koyun yünlerinin içerdikleri element miktarları arasında da farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir.

Lv *et al.* (2010), yeni izole edilmiş *Chryseobacterium* L99 sp.'den keratinazın ortam optimizasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu ve uygulaması işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada; sukroz, malt şekeri, glikoz, nişasta, tripton, Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} ve Cu^{+2} 'nin keratinaz üretimini teşvik ederken; ekzojen üre, NH_4Cl ve maya ekstresinin, güçlü inhibisyon etki sergilediği görülmüştür. Tepki yüzey metodolojisi kullanarak 16,8 g/l sakkaroz, 1,9 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 40,0 g/l tüy keratin, 6,0 g/l $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 1,0 g/l $K_2HP0_4 \cdot 6H_2O$ ile maksimum keratinaz verimini 213.8 U / mL olarak tahmin etmişlerdir. Daha sonra yaklaşık 33 kDa'lık bir serin keratinaz saflaştırmışlar ve optimal aktiviteyi, 40°C'de ve pH 8.0'da K^{+1} , Zn^{+2} veya Co^{+2} ile elde etmişlerdir.

Fakhfakh *et al.* (2011), bir keratinolitik bakteri olan *Bacillus pumilus* A1 suşunu kullanarak tüy proteini hidrolizatı üretmişlerdir. Yaptıkları çalışmada; 50 g / l tüyün iki gün boyunca, 45°C'de ve pH 10.0 koşullarında maksimum amino asit ve peptid üretimi ile sonuçlandığını gözlemlemişlerdir (42,4 g / l). Tüy proteini hidrolizatının (FPH), muamele edilmemiş tüylere (%2) kıyasla çok yüksek bir in vitro sindirilebilirlik (%98) gösterdiğini bildirmişlerdir.

Fakhfakh *et al.* (2012), bir sonra ki çalışmalarında; *Bacillus pumilus* suşu A1'i kullanarak fermentasyon ile ürettikleri tüy protein hidrolizatının (FPH) in vitro ve in vivo antioksidan aktivitelerini değerlendirmişler ve FPH'nin önemli bir antioksidan potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir. Bu hidrolizatı, (%2,5 ve %5) sıçanların besin maddelerine ekledikten sonra hayvanlar üzerinde yaptıkları analiz ile; sıçanların karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve serebelladaki tiyobarbütirik asit reaktif maddelerinin (TBARS) ve enzimatik antioksidanların aktivitelerinde (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz), kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir azalma olduğunu

gözlemlenmişlerdir. Bu sonuçlar FPH'nin hayvan yemi formülasyonunda tamamlayıcı proteinler ve doğal antioksidanlar olarak yararlı olabileceğini göstermiştir.

Fontoura *et al.* (2014), *Chryseobacterium sp.* kr6 bakterisi ile elde edilen tüy hidrolizatlarının antioksidan ve antihipertansif aktivitelerini incelemişlerdir. Keratin hidrolizatları; farklı konsantrasyonlarda, termal olarak denatüre edilmiş tüylerden 10 - 75 g/l ve başlangıç pH değerleri (6.0-9.0) ile üretilmiştir. Çözünür proteinler, 50 ve 75 g /1 tüye sahip ortamlarda yüksek miktarlarda birikmiş, 48 saatlik kültürden sonra sırasıyla 18.5 ve 22 mg/ ml değerlerine ulaşmıştır. *In vitro* antioksidan özellikler sergileyen tüy hidrolizatları ve en uygun antioksidan aktiviteler, 50 g / 1 tüylü kültürlerde, ilk pH 8.0' da, 30°C'de, 48 saat büyümenin ardından gözlenmiştir. Ayrıca; tüy hidrolizatlarının, anjiotesin I-dönüştürücü enzimi %65 ve dipeptidil peptidaz-IV'ü %44 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir.

Demir *et al.* (2015), *Streptomyces sp.* 2M21 suşu ile düşük maliyetli substrat kaynağı olan tavuk tüyünü kullanıp, keratinaz enzimini üreterek, kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda, optimum 28°C, 5.0 g /l tavuk tüyü ve 5.5 gün inkübasyon süresi koşullarında, maksimum keratinaz enzim aktivitesi elde etmişlerdir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, iyileştirilmemiş koşullara kıyasla keratinaz aktivitesinde 15 kat artış sağlamışlardır.

De Oliveira *et al.* (2016), yaptıkları çalışmada atık tüy içeren bir bölgeden 15 bakteri suşu izole etmiş ve bu bakterileri proteolitik, keratinolitik potansiyelleri açısından değerlendirmişlerdir. Bu bakteriyel izolatların tercihen 7 ila 9 arasındaki pH değerlerinde, 30- 37°C'de tüy unu agar plaklarında büyüme kabiliyeti gösterdiğini ve CL33A isimli izolatın, nitel tahlillerde tüy bozunması için yüksek verimlilik sergilediğini bildirmişlerdir. CL33A, sırasıyla 96, 144 ve 216 saat büyümenin ardından tüylerin %29, %75 ve %95'ini bozmuştur. Tüy degradasyonu, çözünebilir protein konsantrasyonundaki ve ortam pH'ındaki artışlarla desteklenmiştir. 16S rRNA gen dizilimi ile bu izolatın *Bacillus sp.* CL33A. olduğunu belirlemişlerdir.

Taskin *et al.* (2016), yeni bir kimyasal işlem kullanarak koyun yününden mikrobiyal pepton üretmişlerdir. Yün peptonun (WP); yüksek protein ve kül içeriğine sahip olduğunu, glutamik asitin WP'de 100 g başına 8175 mg içerikli en bol bulunan amino asit olduğunu, ayrıca kükürt içeren amino asit olan sistin içerdiğini bulmuşlardır. Optimum WP konsantrasyonunu, mantarlar için 5 g / l^{ve} bakteriler için 6 g / l olarak belirlemişlerdir. Yün peptonunun (WP), özellikle *E. coli* ve *A. niger* için iyi bir büyüme substratı olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışma, mikroorganizmalar için yünün pepton kaynağı veya substrat olarak kullanımı üzerine ilk araştırma olarak literatüre kazandırılmıştır.

Maciel *et al.* (2017), *Chryseobacterium sp.* kr6 ve *Bacillus sp.* kr16 bakterilerinin, keratinolitik aktiviteleri ile tüyleri kullanarak protein hidrolizatları üretmişlerdir. Artan tüy konsantrasyonlarını denemişler (10, 20 veya 50 g / L) ve bu bakterilerin tüy degradasyon potansiyellerini araştırmışlardır. 50 g / L'de, kr6 suşunun, 96 saat sonra tüylerin %75'ini ve kr16 suşunun, tüyleri %21 oranında degrades ettiğini gözlemlemişlerdir. Tüy hidrolizatlarını hayvan yemi takviyeleri olarak göstermek için in vitro analizler yapmışlar ve atık tüyleri değerlendirmek amacıyla bir alternatif sunmuşlardır.

Damps *et al.* (2017), yaptıkları çalışmada kimyasal yöntemle elde ettikleri yün hidrolizatının ve 5-florourasil, ingenol mebutat, diklofenak sodyum tuzu gibi ticari olarak temin edilebilen bileşiklerin cilt kanseri hücre hattı üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler, seçilen yün hidrolizatlarının ticari bileşiklere kıyasla hücrelerin canlılığı üzerinde önemli ölçüde daha güçlü bir etki gösterdiğini ve yün hidrolizatlarının, karsinom hücrelerinin yaşayabilirliğini %67'ye kadar azalttığını bildirmişlerdir.

Callegaro *et al.* (2018) ise tüyleri, tüy hidrolizatlarına (FH) dönüştürmek için üç tüy dönüştürücü *Bacillus* suşu (CL18, CL33A, CL14) kullanmış ve FH'lerin in vitro biyoaktivitelerini değerlendirmişlerdir. *Bacillus sp.* CL18 tarafından ortaya çıkarılan FH'nın (10 g/l tüy), yüksek antioksidan aktivite sergilediği ve artan tüy

konsantrasyonları (40 g/l) ile bu antioksidan aktiviteninde arttığı görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda, FH'lerin antioksidan, antidiyabetik ve antihipertansif potansiyelleri ile mikrobiyal dönüşümü, biyolojik ıslah kavramında tüylerin ıslahı ve geçerliliği için uygun çevre dostu özellikleriyle biyoteknoloji de önemli bir yer tutabileceği belirtilmiştir.

Kalaikumari *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada atık yönetimi ve deri işleme uygulamaları için substrat olarak tüy kullanmış, *Bacillus paralicheniformis* MKU3'ten keratinaz üretmişlerdir. Bu çalışmada; tüy atığı kullanılarak keratinazın verimli üretimi için istatistiksel yaklaşımla ortam optimizasyonu yapılmış, üretilen keratinaz, hidrolize kuş tüyü ve cildin epilasyonunda etkinliği bakımından araştırılmış, enzimatik olarak tüyleri giderilmiş deri kabuğunun kalitesi incelenmiştir.

Kshetri *et al.* (2019), Hindistan'ın tüy dökümü alanlarından 26 tane keratinolitik bakteri suşu izole etmiş, bunlardan RCM-SSR-7 izolatının, tüy degradasyonu, antioksidan ve indol-3-asetik asit üretimi sergileyen en umut verici tür olduğunu bulmuşlardır. Tür, *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7 olarak tanımlanmıştır. Bu bakteri türünün, büyüme için tek karbon ve azot kaynağı olarak tavuk tüyünü kullandığı belirtilmiştir. Yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) ile tüy proteini hidrolizatının (FPH) hazırlanmasını optimize etmek için üç parametre (tüy konsantrasyonu, pH ve inkübasyon süresi) çalışmışlardır ve FPH hazırlığı için optimum koşulun; %5 tüy konsantrasyonunda, pH 7.5, 30°C sıcaklık ve 84 saat inkübasyon süreciyle sağlandığı bulunmuştur. FPH'nin esansiyel amino asitler ve iz elementler (potasyum, fosfor, demir ve kalsiyum) bakımından zengin olduğu, IC50 değeri 0.102 mg / ml olan radikal temizleme aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışma, *C. sediminis* RCM-SSR-7 tarafından üretilen FPH'nin hayvan yemi ve organik gübre olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

- UV-Spektrofotometre : Beckman Coulter
- pH metre : Mettler-Toledo
- Buzdolabı : Vestel
- Etüv : BINDER
- Otoklav : HMC Hirayama
- Elektroforez güç kaynağı : Thermo EC135-90
- Elektroforez tankı : Biorad -dikey
- Hassas Terazı : Ohaus Pioneer
- Çalkalamalı İnkübatör : ZHWY 2102C
- Kar makinesi : Scotsman AF-20
- Magnetik karıştırıcı : Heidolph
- Mikropipet takımı : Eppendorf
- Mikroskop : BOECO
- PCR cihazı : Sensoquest Labcycler
- Görüntüleme cihazı : Quantum Vilber Lournat
- Saf su cihazı : MP Minipure
- Santrifüj : Hettich
- Steril kabin : Telstar Bio-II-A
- Vorteks : Wisemix VM-10
- Çoklu blok ısıtıcısı : Lab-Line
- Su banyosu : Grant 6G)

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

Kimyasallar	Şirket
Amfisilin	Sigma
Distile su	Thermo
DNA Marker	Thermo
Agaroz	Sigma
Etil alkol	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Tripan blue boyası	Gibco
Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma
dNTP	Sigma
Gliserol	Thermo
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Sigma
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
Kristal violet	Sigma
Keratin Azure	Sigma
Lizozim	Sigma
Promega wizardR genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti)	Promega
Tris Asetat EDTA (TAE)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
Triklorik asit (TCA)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
RNaz A	İnvitrogen
5-Bromo-4-Choloro-3-Indoly β -D-Galactopyranoside (Xgal)	Acros Organics
KH_2PO_4	Sigma

MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma
FeSO ₄	Sigma
MnSO ₄	Sigma
CuSO ₄	Sigma
Nutrient Agar	Oxoid
Nutrient Broth	Oxoid
NaCl	Sigma
HCl	Sigma
DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Sigma
6X Yükleme tamponu	Thermo
Askorbik asit	Sigma
İmmersiyonyağı	Sigma
Potato dextrose agar	Sigma
Tripton pepton	Oxoid
Potato dextrose broth	Oxoid
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Oxoid
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Thermo
Tripsin/EDTA	Sigma
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Gibco
WST-1 assay kit	BosterBio

3.1.3. Koyunyünü

Bu tez çalışmasında Erzurum ilinde satılan, herhangi bir deterjanla muamele edilmemiş kuru koyunyünü kullanıldı.

3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

1.1X TAE Tamponu: 10X TAE'den 100 ml alınarak, hacmi distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

2. %70'lik EtOH: 70 mL EtOH'ın üzerine, 30 mL distile su konularak hazırlandı.

3. CaCl₂ Solüsyonu: 100 ml saf su içerisine, 1,11 gr CaCl₂ konularak (100 mM olacak şekilde), çözdürüldükten sonra otoklavlanarak steril edildi.

- 4. %0,9'luk NaCl Çözeltisi:** 100 ml saf suda içerisinde 0,9 gr NaCl çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.
- 5. IPTG Solüsyonu (Isopropyl-β-D-1 thiogalactopyranoside):** Distile su içerisinde 23,8 mg/ml olacak şekilde hazırlanan solüsyon sterilizasyon amacı ile 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Ardından kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.
- 6. Amfisilin Solüsyonu:** Distile su içerisinde 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanan amfisilin solüsyonu, 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Sterilizasyon basamağından sonra, çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
- 7. 50 mM EDTA Solüsyonu:** 100 ml distile suda 1,46 g EDTA çözdürüldükten sonra pH'sı 8'e ayarlandı.
- 8. X-Gal Solüsyonu (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside):** 40 mg/ml olacak şekilde hazırlanan solüsyon ışıktan muhafaza edilerek, -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.
- 9. Keratinaz enzim aktivitesi substratı:** 0,5 gr keratin azure tartılarak -20°C'ye kaldırıldı. Donduktan sonra sıvı azot kullanılarak toz haline getirilinceye kadar öğütüldü. Ardından 10 ml 50 mM Tris HCl (pH: 8) içerisinde çözüldü.
- 10. Tris HCl Çözeltisi:** 0,6 gr Trizma base tartıldı. 90 ml didistile suda iyice çözüldükten sonra pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- 11. TCA (Trikloroasetik Asit) (0,4 M):** 6,5 gr TCA tartıldıktan sonra 100 ml didistile suda çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yün parçalayan bakterilerin izolasyonu

Çalışmada kullanılacak bakterileri elde edebilmek amacıyla; öncelikle, 1'er gr koyun yünü tartılarak farklı toprak ortamlarına (yaklaşık 1 cm derinlikte) yerleştirildi. Yaklaşık 1 ay süreyle toprakta bekletildi. Bu sürenin sonunda koyun yünleri topraktan çıkartıldı ve kendisine tutunmuş olan toprakla birlikte 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 1 g/l NaCl, 0.03 g/l FeSO₄, 0.003 g/L MnSO₄, 0.003 g/L CuSO₄ mineral maddeleri içeren 100 ml besiyeri içerisine aktarıldı (pH 8.0). Ağzı kapatıldıktan sonra, erlenler 10 gün süreyle

150 rpm'de 55°C'de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, kültürlerden alınan 1 ml'lik örneğin, steril %0,9'luk fizyolojik su (NaCl) ile seri dilüsyonları hazırlandı (10⁻¹'den 10⁻⁶ ya kadar). Bu dilüsyon tüplerinden 10⁻⁶'lık dilüsyon tüpündeki örnek kullanıldı. Örneğin 0.1 ml'si TSA (Tryptone Soy Agar) besiyeri üzerlerine yayıldı ve 55°C'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, petrielerde gelişen ve birbirlerinden farklı koloni morfolojisi gösteren bakteriler seçilerek, alt kültüre alındı. Saflaştırılan izolatlar TSB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 55°C'de 48 saat boyunca geliştirildi. Süre sonunda her bir test suşu gliserol içeren stok kültürlerine alınarak -86°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Yün parçalayan bakterilerin taranması

Yün parçalama deneyleri için; 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 1 g/l NaCl, 0.03 g/l FeSO₄, 0.003 g/l MnSO₄, 0.003 g/l CuSO₄, içeren 100 ml'lik besiyerleri hazırlandı. Her 100 ml'lik besiyeri içerisine 1 gr koyun yünü ilave edildi ve pH'ları 8'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavda steril edildi. TSB (Tryptic Soy Broth) ön kültüründe (OD₆₀₀ 2.0) hazırlanan bakteri kültürlerinden 1'er ml alınarak, yukarıda bahsedilen tarama besiyerlerine inoküle edildi. (Ön kültürler, saflaştırılmış bakterilerin ayrı ayrı 100 ml TSB içeren besiyerlerinde 24 saat süreyle 55°C'de 150 rpm'de büyütülmeleri ile elde edildi). İnoküle edilen besiyerleri 5 gün süreyle 150 rpm'de 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kültürlerden alınan 1 ml örnekte keratinaz enzim aktivitesi (spektrofotometrik olarak) ölçüldü ve yün parçalama miktarı (kuru ağırlık) belirlendi. Yünlerin kuru ağırlığını belirlemek için, besiyerlerinde geriye kalan yün 100°C'de sabit ağırlığa kadar kurutuldu ve hassas terazide tartım yapıldı. Maksimum keratinaz enzim aktivitesi ve yün parçalama potansiyeli gösteren izolatın 16S rRNA sekans analizine göre moleküler identifikasyonu gerçekleştirildi ve bu izolat çalışmanın sonraki aşamalar için seçildi.

3.2.3. Keratinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Keratinaz enzim aktivitesi belirlenirken öncelikle, kültür örnekleri 8000 g'de 4°C'de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından üst kısımda kalan süpernatantlardan 1'er ml alınarak steril 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. Daha sonra üzerlerine, 10 ml 50 mM Tris HCl (pH: 8) çözeltisiyle hazırlanmış, 1'er ml keratin azure solüsyonu eklendi. Karışım 50°C'de 200 rpm'de 30 dk süreyle çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, karışıma 0,4 M TCA (Trikloroasetik Asit)'dan 2 ml eklendi. Ardından 3000 g'de 20 dk süre ile santrifüj edildi ve köre karşı, örneklerin keratinaz enzim aktivitesi 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. (Körde örnek yerine Tris HCl Buffer kullanıldı) (Sivakumar and Raveendran 2015; Navone and Speight 2018; Navone *et al.* 2020).

3.2.4. Test suşunun karakterizasyonu

3.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu

En iyi keratinaz enzim aktivitesi gösteren yerel izolatın TSB sıvı besiyerinde ön kültürü hazırlandıktan sonra, Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne uygun olarak genomik DNA'sı izole edildi.

DNA izolasyon prosedürü;

❖ TSB sıvı besiyerinde geliştirilen hücrelerden 2 ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı ve 13.000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra, altta bulunan pelet üzerine 480 µl, 50 Mm EDTA (pH=8) eklendi. Pipetajla çözdürme işleminin ardından homojenat üzerine 120 µl, 10 mg/ml lizozim ilave edildi ve iyice karışımı sağlandı. Ardından tüpler, 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edildi.

❖ İnkübasyondan sonra, homojenat 2 dk boyunca 13000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı, peletin üzerine 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonu eklendi, ardından hafifçe pipetaj yapıldı.

- ❖ Elde edilen homojenat 80°C'de 5 dk süre ile inkübe edildi. Sonrasında oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Ardından üzerine 3 µl RNase A eklendi ve birkaç kez alt üst edildi. Daha sonra 30 dk süreyle 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Ardından üzerine, protein presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklendi ve 20 saniye vortekslendi. Daha sonra 5 dk buzda bekletildi.
- ❖ Buzdan alınan test tüplerine, 13000 rpm'de 30 saniye boyunca çöktürme işlemi uygulandı ve ardından üstte kalan süpernatant, içerisinde 600 µl izopropanol bulunan yeni ependorf tüplerine alındı. Ependorflar, pelet oluşuncaya kadar birkaç kez alt üst edildi.
- ❖ Pelet oluşumu gözlemlendikten sonra, tüpler 2 dk süreyle 13000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
- ❖ İçerisinde DNA bulunan ependorflara %70'lik EtOH'dan 600 µl eklendi ve tüpler hafifçe alt üst edildikten sonra 2 dk süre ile 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından EtOH döküldü ve etanolün tamamen uzaklaşması için 37°C'de 20-30 dk süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Tüplerin üzerine 100 µl DNA rehidrasyon solüsyonu eklendi ve 1 saat boyunca 65°C'de inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon süresinin sonunda, içlerinde genomik DNA bulunan ependorflar kullanılmaya kadar +4°C'de saklandı.

DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

İzole edilen DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, elde edilen genetik materyalin protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. Ölçüm işlemi için, kuvars küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülerek, elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Daha sonra, küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışım homojen hale getirildi ve yeniden 260 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Okunan bu değerden, köre ait değer çıkarıldı ve DNA'nın absorbans değeri bulundu. Yapılan işlemlerin aynısı sırasıyla 280 nm için de tekrarlandı. A260 ve A280 değerleri

kontrol edildi ve $A_{260}/A_{280} = 1-1,7$ olan DNA örneğinin çalışma solüsyonu hazırlanarak, kullanıldı (Albayrak 2018).

DNA Örneğinin ve DNA Çalışma Solüsyonunun Konsantrasyonunun Belirlenmesi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Stok DNA solüsyonunun konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü (500)} \times 50$ (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak belirlendi. Daha sonra, DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu; İstenen Konsantrasyon ($100\text{ng}/\mu\text{l}$) x İstenen Hacim ($200 \mu\text{l}$) / Stok DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}$) formülüne göre ayarlandı ve DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Elde edilen miktar, TE çözeltisi ile $200 \mu\text{l}$ 'ye tamamlandı ve $100 \text{ng}/\mu\text{l}$ konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından kullanılıncaya kadar -86°C 'de saklandı (Baltacı 2015).

3.2.4.b. 16S rRNA PCR İşlemi

16S rRNA bölgesi, hedef bölge olarak bakteri sistematığı açısından önem taşıması ve evrimsel açıdan korunmuş bölge olması özelliklerinden dolayı, bu bölge in vitro koşullar altında evrensel primerler kullanılarak çoğaltıldı.

PCR Reaksiyon ortamı

PCR reaksiyonu için, $30 \mu\text{l}$ 'lik reaksiyon tüpüne eklenen kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları Çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyon ve miktarları

REAKTİF	KONSANTRASYON	MİKTAR (µl)
PCR Buffer (sigma)	10X	3
MgCl ₂	25 mM	1,8
dNTP	25 mM	0,6
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
ddH ₂ O	-	12,1
DMSO	%99	1,2
Taq		0,3
Kalıp DNA	100 ng	5

Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR işlemi için uygun sıcaklık, süre ve döngü sayısı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	52	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

PCR programı: PCR tüpü termal döngü cihazına yerleştirildi. Cihaz, çizelge 3.3'de verilen program koşullarına göre ayarlandı ve istenilen DNA bölgesi çoğaltıldı (Baltacı 2015).

3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforezi için, 1X TAE ile %1'lik olacak şekilde hazırlanan agaroz jelin, ilk kuyucuğuna 10 kb'lık DNA markırından [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (New England Bio Labs, N0550S) 4 µl yüklendi ve ardından takip eden diğer kuyucuklara her bir örnek için 1 µl 6X yükleme tamponu + 4 µl PCR ürünü yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler; 90 voltta, 100 dk süreyle yürütüldü. Süre sonunda jel, elektroforez tankından çıkarılarak jel dökümantasyon sistemi (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) ile görüntülendi ve DNA bantları analiz edildi (Albayrak 2018).

3.2.4.d. Klonlama

Kompotent hücrenin hazırlanması

- Stoktan canlandırılan (3-4 faz ekim) *Escherichia coli* JM101 suşu geliştirildikten sonra kültürden tek bir koloni alınarak, içerisinde 4 ml steril LB broth bulunan tüpe inoküle edildi ve 37°C'de 1 gece süre ile çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- Hazırlanan kültürden alınması gereken miktar,

$$\frac{(30 \times 0,1)}{(Absorbans Değeri \times 10)}$$

formülü ile hesaplandı (Bu formülde, 30 hazırlanacak miktar (ml), 0,1 sabit değer, 10 ise seyreltme faktörünü temsil etmektedir).

- Hesaplamadan çıkan değer kadar kültür, önceden hazırlanarak otoklavda steril edilmiş 30 ml LB broth üzerine eklendi ve 37°C’de 0,44-0,55 değerlerine ulaşılıncaya kadar 60 – 90 dk süre ile inkübasyona bırakıldı.
- Uygun OD değerini veren kültür 5 - 10 dk 4400 rpm’de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminin ardından, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisi üzerine soğuk 10 ml, 100 mM CaCl₂ eklendi. Ardından 30 – 45 dk süre ile buzda bekletildi.
- Süre sonunda karışım 4°C’de 10 dk süre ile 4400 rpm’de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Ardından süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. 2 ml 100 mM CaCl₂ geriye kalan hücre çökeltisi üzerine eklendi ve buzdolabında bir gün süre ile bekletildi (Baltacı 2015).

Ligasyon işlemi

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T₄ DNA ligaz
- 0,2 ml lik tüplerde mix haline getirilen karışım 1 gece 16°C’de 13-15 saat bekletildi ardından +4°C’ye kaldırıldı.

Transformasyon işlemi

- Transformasyon işlemi için, öncelikle her bir ependorf tüpüne bir gün öncesinden hazırlanan kompetentten 200µl konuldu.
- Daha sonra üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. Hemen ardından, 2 dk süre ile 42°C’ye ayarlı su banyosunda sıcaklık şokuna uğratıldı.
- Daha sonra üzerlerine yavaş yavaş 200 µl LB eklenerek, yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C’de bekletildi.

- Ardından önceden hazırlanan amfisilinli katı besi yerine, 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG yayıldı.
- Yüzey yeterince kuruduktan sonra, ligasyon ürünü + Kompotent hücre karışımından 150 µl alınarak petriye aktarıldı ve drigalski özesi yardımı ile petrinin her tarafına dağıtıldı. Petriler, 37°C'de yaklaşık 12-14 saat süre ile inkübe edildi.

Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım

12-14 saatlik inkübasyonun ardından, petriler inkübatörden çıkarıldı ve bu kezde +4°C'de bir gece bekletildi. Sonrasında petrilerde oluşan beyaz ve mavi koloniler içerisinde, beyaz olanlar seçildi. Ardından hemen öncesinde hazırlanmış ve içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth bulunan tüplere aktarıldı. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR

- ❖ Amfisilinli LB broth'da geliştirilen kültürden 4 µl alınarak, içerisinde 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı ve tüpler daha sonra 10 dk süre ile kaynayan su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Hemen ardından 2 dk süre ile buzda ısı şokuna uğratılan tüpler daha sonra 5 dk 12000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve PCR işlemine geçildi.
- ❖ PCR işlemi için aşağıda belirtilen kimyasallar kullanıldı.

- 16,1 µl dH₂O
- 0,6 µl dNTP mix
- 3 µl tampon (MgCl₂'li)
- 1,8 µl MgCl₂ (25mM)
- 1,2 µl DMSO
- 2 µl 5 µM primer T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3')
- 2 µl 5 µM primer SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3')
- 3 µl süpernatant

- 0,3 µl Taq DNA polimeraz

PCR programı: PCR örnekleri cihaza konulduktan sonra, cihaz koloni PCR programı için programlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Koloni PCR programı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk, sn)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

%1'lik agaroz jelin kuyucuklarına sırasıyla; markır, istenen geni içeren (pozitif) ve içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklendi. Ardından, 90 voltta 1 saat yürütüldü. PCR görüntülerine göre, istenen geni taşıyan koloniler seçildi ve plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a ekildi.

Plazmit İzolasyonu

Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanılarak, plazmit izolasyonu işlemi gerçekleştirildi için ve aşağıdaki prosedür takip edilerek izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

- ❖ 4 ml amfisilinli LB broth da geliştirilen kültürler, 10000–12000 rpm'de 10 dk üre ile santrifüj edildi ve santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldı.

- ❖ Geriye kalan pelletin üzerine, 250 µl cell resuspension solüsyon eklendi ve pipetlenerek homojenize hale getirildi.
- ❖ Ardından üzerine 250 µl cell lysis solution ilave edilerek, karışım alt üst edildi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- ❖ Karışıma daha sonra 10 µl alkaline protease solüsyonu eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından üzerine, 350 µl neutralization solution ilave edildi ve 12000-14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- ❖ Süpernatanttan yaklaşık 650–750 µl alınarak, içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ve 12000-14000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- ❖ Daha sonra kolonun üzerine 750 µl wash solution eklendi ve yeniden 1 dk süre ile 12000-14000 rpm'de santrifüj edildi.
- ❖ Ardından 250 µl daha wash solution ilave edilerek, tekrar 2 dk 12000-14000 rpm'de santrifüjlendi ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- ❖ Daha sonra 1 dk süre ile 12000-14000 rpm'de oda ısısında bir kez daha santrifüj edildi.
- ❖ Son basamakta kolon yeni bir tüpe alındı. Üzerine 100 µl nuclease-free water eklendi ve 1 dk 12000-14000 rpm'de santrifüjlendi.
- ❖ Kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler ölçüm yapılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (Baltacı 2015).

Plazmitlerin Kontrol Edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsada, elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla örnekler *EcoRI* ile kesildi ve agaroz jelde yürütüldü.

Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

- ❖ 998 µl saf su + 2 µl plazmit konularak OD260 da ölçüldü.
- ❖ $A_{260} \times 50$ (sabit) $\times 500$ (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu 100 – 200 ng olacak şekilde ayarlandı.

- ❖ 30–50 µl uygun konsantrasyona sahip plazmit örneği seçilerek sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

DNA Dizi Analiz Sonuçlarının İşlenmesi

Firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak analiz edildi ve FASTA formatına dönüştürüldü. Öncelikle primerler bulundu, primerlerin önünde ve arkasında kalan vektöre ait kısımlar çıkarıldı ve ardından diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin blast çalışması http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak yapıldı ve % benzerlik oranları belirlendi. Elde edilen sonuçlar baz alınarak, bilgileri Genbank'a girildi.

3.2.5. Hidrolizat eldesi optimizasyon çalışmaları

Bu aşamada maksimum yün parçalaması sağlamak için; farklı pH aralıkları, inkübasyon sıcaklıkları, besiyerine katılan minerallerin farklı konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri test edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları 250 mL'lik erlenler içerisinde 100 mL steril besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bütün besiyerlerine 1 g/L yün, 0.03 g/l FeSO₄, 0.003 g/l MnSO₄ ve 0.003 g/l CuSO₄ konulmuş, her besiyerine farklı konsantrasyonlarda KH₂PO₄, MgSO₄ ve NaCl ilave edilmiştir.

3.2.5.a. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal pH'nın belirlenmesi

Optimal pH belirleme aşaması için, bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi 100'er ml'lik yünlü besiyerlerinden 5 adet hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerinin pH'ları sırasıyla 5,6,7,8 ve 9'a ayarlandı. Daha sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavda steril edildi. Sterilize olan erlenler yeterince soğuduktan sonra her bir besiyerinin içerisine 1 gün öncesinden TSB besiyerinde ön kültürü hazırlanmış EY2 kodlu izolattan 1'er ml alınarak aseptik koşullarda ekim işlemi yapıldı. Kültürler 5 gün süreyle 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir kültürden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktivitesi (spektrofotometrik olarak) ölçüldü.

3.2.5.b. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal sıcaklığın belirlenmesi

Yün protein hidrolizatını maksimum verimle elde etmek için gereken optimal sıcaklık değerini belirlemek için; yine bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi 100'er ml'lik yünlü besiyerlerinden 5 adet hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerinin pH'ları belirlenen optimal pH'ya ayarlandı. Sterilize edilen erlenler yeterince soğuduktan sonra her bir besiyerinin içerisine 1 gün öncesinden TSB besiyerinde ön kültürü hazırlanmış EY2 kodlu izolattan 1'er ml alınarak ekildi. Kültürler 5 gün süre ile aynı çalkalama hızına sahip (150 rpm) çalkalayıcılarda sırası ile 45°C, 50°C,55°C, 60°C, 65°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir kültürden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktivitesi (spektrofotometrik olarak) ölçüldü.

3.2.5.c. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal KH₂PO₄ miktarının belirlenmesi

Bu aşamada belirlenen optimal pH'da, sadece KH₂PO₄ miktarları farklı (0 gr/lt, 0.5 gr/lt, 1gr/lt, 1.5 gr/lt ve 2 gr/lt) olan 5 adet besiyeri hazırlandı. 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilen besiyerlerine bir gün önceden hazırlanmış EY-2 kodlu izolatin ön kültüründen 1'er ml alınarak, her birine aynı şartlarda inoküle edildi. İnokülasyon işlemi uygulanan kültürler, 5 gün süre ile ve optimal sıcaklıkta çalkalamalı

inkübatörde, inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda her bir kültürden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktivite tayinleri yapıldı ve spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5.d. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal MgSO₄ miktarının belirlenmesi

Bu aşamada optimal pH ve optimal KH₂PO₄ konsantrasyonunda, sadece MgSO₄ miktarları (0 gr/lt, 0.5 gr/lt, 1 gr/lt, 1.5 gr/lt, 2 gr/lt) farklı olan 5 adet besiyeri hazırlandı. Otoklavda steril edilen besiyelerine EY2 kodlu izolatın ön kültüründen 1'er ml alınarak, inoküle edildi. İnokülasyon işleminin ardından kültürler, 5 gün süre ile optimal sıcaklıkta inkübe edildi. İnokübasyondan sonra kültürlerden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktivite tayinleri yapıldı ve spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5.e. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal NaCl miktarının belirlenmesi

Bu aşamada optimal pH'nın yanısıra optimal KH₂PO₄ ve MgSO₄ konsantrasyonunda, sadece NaCl miktarları (0, 0.5 gr/lt, 1 gr/lt, 1.5 gr/lt, 2 gr/lt, 2.5 gr/lt) farklı olan 5 adet yünlü besiyeri hazırlandı. Otoklavlanarak steril edilen besiyelerine EY2 kodlu izolatın ön kültüründen 1'er ml alınarak, her birine aynı şartlarda inoküle edildi. İnokülasyon işlemi uygulanan kültürler, optimal sıcaklıkta 5 gün süre ile 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda her bir kültürden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5.f. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Yün protein hidrolizat eldesi optimizasyon çalışmalarının son aşamasında optimal inkübasyon süresi belirlendi. Bunun için önceden belirlenen ve maksimum verim elde edilen parametrelerde (optimal pH, optimal KH₂PO₄, MgSO₄ ve NaCl konsantrasyonu) besiyeri hazırlanmış ve hazırlanan besiyerin otoklavda steril edilip soğutulduktan sonra EY2 kodlu izolatın ön kültüründen 1 ml inoküle edildi. İnokülasyonun ardından besiyeleri optimal sıcaklıkta 7 gün süreyle 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Daha

sonra sırasıyla; 1-7 günlerin sonunda kültürden 1'er ml alınarak keratinaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.6. Optimal parametreler ile yüksek miktarda protein hidrolizat eldesi

Büyük miktarlarda hidrolizat üretimi için optimal şartlarda (optimal pH ve mineral kaynakları) toplam 2 L besiyeri hazırlanmış ve 20 tane erlene (her 250 ml'lik erlen içerisine 100 mL besiyeri) eşit olarak dağıtılmıştır. Erlenlere daha sonra 10 g/L seviyesinde koyun yünleri konulmuş, erlenler steril edilmiş, soğutulmuş ve ön kültür ile aşılansmıştır. Aşılans besiyerleri daha önceden belirlenen optimal sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda besiyerleri filtre kağıdından geçirildi ve kültürde parçalanmadan kalan yünler ayrıştırıldı. Geriye kalan sıvı kısımlar 5000 g'de 10 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üstte kalan süpernatantlar, 50 ml'lik beherlere aktarıldı. Beherler -80°C'ye konularak 1 gün süreyle donduruldu. İyice dondurulan örnekler liyofilizatör cihazı kullanılarak 48 saat süre ile liyofilize edildi. Liyofilizasyon işleminin ardından elde edilen kısım UV altında 15 dakika süre ile bekletildi. Örnekler, daha sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (Fakhfakh *et al.* 2012; Fontoura *et al.* 2014).

3.2.7. Elde edilen hidrolizatın antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi

Hidrolizatın antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla disk difüzyon testi yapıldı. Bunun için gram negatif ve gram pozitif 2 bakteri suşu; *Escherichia coli* (RSKK 06015), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), ile birlikte, hücre çeşitliliği sağlamak amacıyla *Aspergillus niger* (ATCC16888) küfü ve *Candida.albicans* (ATCC 14053) mayası dahil 4 adet mikroorganizma kullanıldı. Öncelikle nutrient agar üzerinde aktive edilen bakteriler, nutrient broth sıvı besiyerine alınarak bir gece inkübe edildi. Maya ve küf mikroorganizmalarını geliştirmek için ise, PDA (Potato Dextrose agar) besiyeri kullanıldı. İnkübasyonun ardından OD ölçümü yapıldı ve OD₆₀₀: 0,4 olacak şekilde fizyolojik suyla süspanse edilen solüsyonlardan 100'er µl alınarak petrilere konuldu ve drigalski özesi yardımıyla petrilere her tarafına iyice dağıtıldı. Daha sonra bu

besiyerlerinin üzerine boş diskler yerleştirildi. Pozitif kontrol amacıyla bakteriler için kloramfenikol antibiyotiği; maya ve küf için amfoterisin B antibiyotiği, negatif kontrol olarak ise TSB (Tryptic Soy Broth) sıvı besiyeri kullanıldı. Pozitif kontrol diskleri petriye yerleştirildikten sonra, hemen öncesinde 100 mg/ml konsantrasyonda, saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış yün protein hidrolizatından 20- 25 µl alınarak boş disklerin üzerine aktarıldı. Aynı şekilde negatif kontrol olarak kullanılan TSB besiyerinden de 20-25 µl alınarak bir diğer boş diske konuldu ve petriler inkübasyona bırakıldı. (Mikrobiyal gelişim sonucu oluşan pH düşüşünün antimikrobiyal etkisini engellemek amacıyla kültür süpernatantlarının pH'sı 7'ye ayarlanarak kullanıldı). *E. coli* ve *B. cereus* kültürleri 1 gün; *C. Albicans* kültürü 2 gün ve *A. niger* kültürü 5 gün süreyle inkübe edildi (Yildiz 2018).

3.2.8. Elde edilen hidrolizatın antioksidan özelliğinin belirlenmesi

3.2.8.a. DPPH radikal temizleyici test

Öncelikle etanolde 0.1 mM'lık bir DPPH çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 3'er mL'si, farklı konsantrasyonlardaki etanolde çözündürülerek hazırlanmış (1, 2, 3, 4, 5 mg / mL) ekstraksiyon solüsyonlarının her birinden 1'er ml alınarak karıştırıldı. Reaksiyon karışımı iyice vortekslendi. Ardından 30 dakika süre ile oda sıcaklığında ve karanlıkta bırakıldı.. İnkübasyon süresi sonunda tüplerdeki karışımın absorbansı 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi) (Shen *et al.* 2010; Fakhfakh *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2012; Khan *et al.* 2013).

3.2.9. Hazırlanan yün hidrolizatının pepton olarak değerlendirilmesi

Bu aşamada; elde edilen hidrolizatın, mikroorganizmalar için besiyerlerinde pepton kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli araştırıldı. Bu amaçla; *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli* olmak üzere bir küf, bir maya ve bir de bakteri kullanıldı. *S. cerevisiae* ve *E.coli* için nutrient broth besiyerleri kullanılarak, mikroorganizmaların 150 rpm'de 24 saat süreyle ön kültürleri hazırlandı. Ön kültürler

hazırlanırken *Saccharomyces cerevisiae* için inkübasyon sıcaklığı 30°C, *E. coli* için ise 37°C seçilmiştir. Hazırlanan ön kültürlerin 1 mL'si yün pepton ve ticari peptonla hazırlanan besiyerlerinin aşılınması için kullanılmıştır. *A. niger*'in ön kültürünün hazırlanması için, *A. niger* 1 hafta süreyle 30°C'de sporulasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda yatık agar kültürüne steril fizyolojik su eklenmiş ve spor homojenizasyonu için kültür, vorteks edilmiştir. Hazırlanan spor süspansiyonunun 1 ml'si yün peptonu ve ticari peptonla hazırlanan besiyerinin aşılınması için kullanılmıştır.

Üretim besiyerleri 20 g/L glikoz ve 4 g/L pepton ile birlikte 20 g/L glikoz ve 4 g/L yün protein hidrolizati içerecek şekilde dizayn edilmiştir. *A. niger* ve *S. cerevisiae* için besiyeri pH'sı 6.0'a, *E. coli* içinse 7.0'a ayarlanmıştır. Ön kültürlerin hazırlanmasında olduğu gibi, üretim çalışmaları içinde inkübasyon sıcaklığı *A. niger* ve *S. cerevisiae* için 30°C, *E. coli* içinse 37°C'ye ayarlanmıştır. Maya ve bakteri için 24 saat sonra hücrede optikal dansite (600 nm) ve kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. *A. niger*'in büyüme performansı için ise 4 günlük inkübasyon periyodunun sonunda kuru ağırlık ölçümü yapılmıştır.

Kuru ağırlık ölçümü için kültürler 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş, elde edilen ıslak hücreler steril fizyolojik suyla yıkanmış, sabit ağırlığa gelinceye kadar 100°C'de kurutulmuş ve kuru ağırlık ölçümü gerçekleştirilmiştir (Firat 2017).

3.2.10. Hücre hatlarının çözülmesi, pasajlanması ve dondurulması

Yapılan çalışmada; insan kolon kanser hücreleri (HT-29, Caco-2), insan prostat kanser hücreleri (DU-145) ve insan akciğer kanser hücreleri (A-549); hücre besiyeri olarakta %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren RPMI 1640 kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak bütün malzemeler, %70'lik etanol ile silinerek, steril kabin içine alındı. Deneyde, öncelikle dondurulmuş hücreler, 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürüldü. Çözünen hücreler, içerisinde taze besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. Tüpler, 1500 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı. Geride kalan hücre peleti, taze besiyeri ile

resüspanse edilerek, içerisinde yeni besiyeri bulunan kültür kaplarına aktarıldı. Hücreler daha sonra, 37°C’de, % 90 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. %80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin bir kısmı pasajlandı, bir kısmı da sayım yapılarak deneyde kullanıldı. Pasajlama işlemi için, eski besiyeri kültür kabından uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler, PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. Ardından hücreleri yüzeyden kaldırmak için %0,25’lik Tripsin/EDTA eklendi ve 37°C’de 2 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, santrifüj tüpüne alınan hücreler, 1500 rpm’de 5 dk süre ile santrifüjlendi. Taze besiyeri ile resüspanse edilen hücreler, içerisinde yeni besiyeri bulunan kültür kabına aktarılıp pasajlandı. Geriye kalan fazla hücre peleti, %90 besiyeri ve %10 DMSO (Dimetilsülfoksit) içeren 1 ml dondurma besiyeri ile resüspanse edildi, ardından kriyo tüplere aktarıldı. Tüpler önce yarım saat 4°C’de, sonra 1 saat -20°C’de, en son bir gece -80°C’de bekletildi ve ardından sıvı azot tankına kaldırıldı (Yıldız 2018).

3.2.11. Hücre sayımı ve ekimi

Hücre sayımında, canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla ölü hücreleri boyayan % 0,4’lük tripan blue boyası kullanıldı. Bunun için; 10 µl boya ile 10 µl hücre, süspanse edilerek thoma lamına aktarıldı ve canlı hücreler sayıldı. Sayımın ardından her kuyuda 5000 hücre olacak şekilde seyreltilen hücreler, 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı. 37°C’de, %90 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda 24 saat süre ile inkübe edildi (Yıldız 2018).

3.2.12. Elde edilen hidrolizat için WST-1 analizi

Yün protein hidrolizatı ekstraktının HT-29, DU-145, A-549 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 hücre canlılık kiti (BosterBio, USA) ile analiz edildi. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 96-kuyucuklu plakalara herbir kuyucukta en az 5000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler çoğalma aşamasında iken ekstrakt, hücrelere değişen dozlarda hücre besiyeriyle eklendi. Kontrol grubu hücrelerine ise ekstraksız hücre besiyeri eklendi. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 3 µl WST-1 konularak

2 saat sonra 450 nm'de (referans dalgaboyu 690 nm) elisa cihazında (SpectraMax Molecular Devices, USA) kolorimetrik olarak ölçüm alındı.

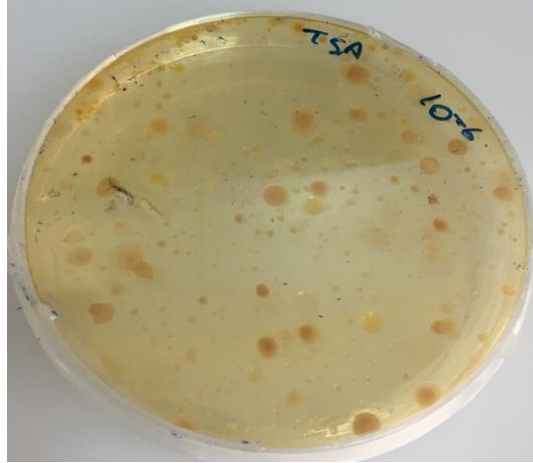
3.2.13. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için graphpad prism 5 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılarak incelendi. $p < 0,05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Önemlilik derecesi, yıldız sayısı ile belirtilmiştir. $p < 0,05$ için bir yıldız (*=önemli), $p < 0,01$ için iki yıldız (**=çok önemli) ve $p < 0,001$ için üç yıldız (***=yüksek derecede önemli) olacak şekilde belirtildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Yn Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışmanın ilk aşamasında; Erzurum ilinde günlük kullanım için satılan, herhangi bir deterjana maruz bırakılmamıŐ 1 gr kuru koyun yn Atatürk niversitesi kampüsünde 1 ay süreyle farklı bölgelerde toprağa bırakılmıştır. 1 aylık sürenin sonunda topraktan çıkarılan koyun yn, KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CuSO_4$ mineral maddeleri içeren besiyeri içerisine aktarılmıŐ ve besiyerleri 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda keratinaz enzim aktivitesi ile yn parçalayarak geliŐimini tamamlayan bakteriler katı besiyerine (TSA) alınmıŐ, daha sonra, koloni oluŐumlarının gözlendiği karışık kültürden (Şekil 4.1) koloni morfolojisi ve mikroskop görüntülerinden yola çıkılarak farklı yn örneklerinden toplam 48 adet bakteri izole edilmiştir.



Şekil 4.1. 6 kat seyreltilen besiyerinin TSA'ya aktarıldığı karışık kültür

4.2. Yün Parçalama Miktarı ve Keratinaz Enzim Aktivitesine Göre Uygun Bakterinin Seçilmesi

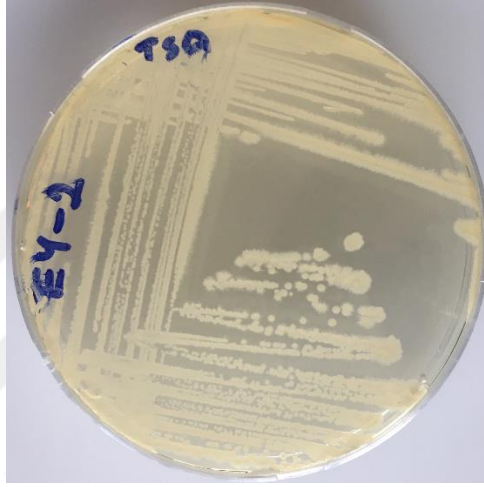
Saflaştırılan bütün bakteriler, yünlü besiyerinde aynı ortam ve kültür koşullarında geliştirildikten sonra kültür sıvıları kullanılarak bölüm 3.2.3. verilen protokole göre keratinaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Kültür sıvıları süzildükten sonra geriye kalan yün artıkları folyo üzerine alınarak 1 gün süreyle kurutulmuş ve sonraki gün parçalanmadan kalan yünlerin kuru ağırlıkları ölçülerek her bir izolatın parçalayabildiği yün miktarı belirlenmiştir. 5 günlük süre sonunda toplam 48 bakteri arasında sadece 8 izolatın yüksek keratinaz aktivitesi ve yün parçalama potansiyeli gösterdiği belirlenmiştir. Bu yüzden, Çizelge 4.1’de sadece 8 izolat için elde edilen değerler verilmiştir.

Çizelge 4.1. Saflaştırılan bakterilerin keratinaz enzim aktivitesi ve parçalayabildikleri yün miktarı değerleri

Yünlü Besiyeri			
Bakteri Kodu	OD (600 nm)	Aktivite (595 nm)	Parçalanan yün miktarı (g)
EY1	1,440	0,332	0,43
EY2	1,786	0,411	0,65
EY3	1,776	0,404	0,55
EY4	1,696	0,360	0,49
EY5	1,552	0,346	0,47
EY6	1,779	0,406	0,59
EY7	1,625	0,347	0,47
EY8	1,690	0,385	0,50

Kültür koşulları: pH: 8, inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, sıcaklık 55 °C, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 1 g/l NaCl, çalkalama hızı 150 rpm.

İzole edilen 48 bakteriden en yüksek keratinaz enzim aktivitesi (0,411) gösteren ve en çok miktarda yünü parçalayabilen bakterinin EY2 kodlu izolat (Şekil 4.2) olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterinin geliştiği yünlü besiyerine eklenen başlangıç yün miktarı 1.0 g (10 g/l koyun yünü) iken inkübasyon süresi sonrasında besiyerinden geri alınarak kurutulan en son yün miktarının 0,35 g/l'ye düştüğü görüldü. Diğer bir ifade ile bu bakterinin 1 gr koyun yününün 0.65 gr'ının parçalandığı tespit edildi.



Şekil 4.2. EY2 kodlu bakterinin saflaştırılmış petri görüntüsü

En yüksek keratinaz enzim aktivitesi gösteren ve en çok oranda yünü parçalayabilen EY2 kodlu bakteri, tezin diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçildi. Sonrasında bu bakterinin sekans analizi ve optimizasyon çalışmalarına geçildi.

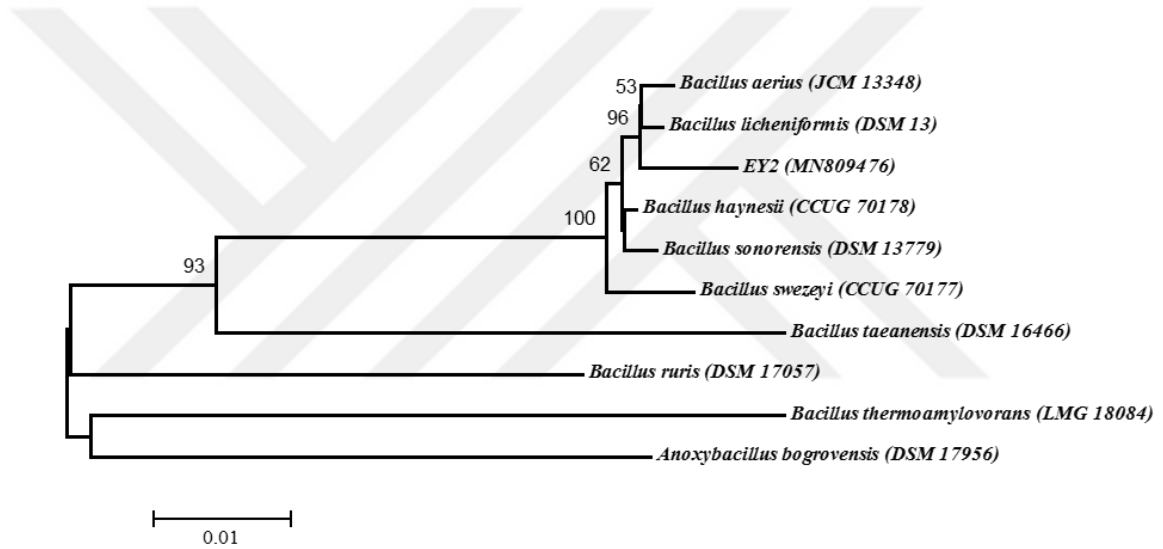
4.3. Sekans Analizi Sonuçları

Macrogen firması tarafından analiz edilen 16S rRNA sekans verileri sonucu NCBI'dan elde edilen benzerliğe göre EY2 kodlu izolatımızın *Bacillus licheniformis* (Gen Bank No: MN809476) türüne ait olduğu belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteri ve benzerlik oranı

İzolat Kodu	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı (%)	Genbank Numarası
EY2	<i>Bacillus licheniformis</i>	% 98,57	MN809476

Daha sonra elde edilen izolatın, NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.3)



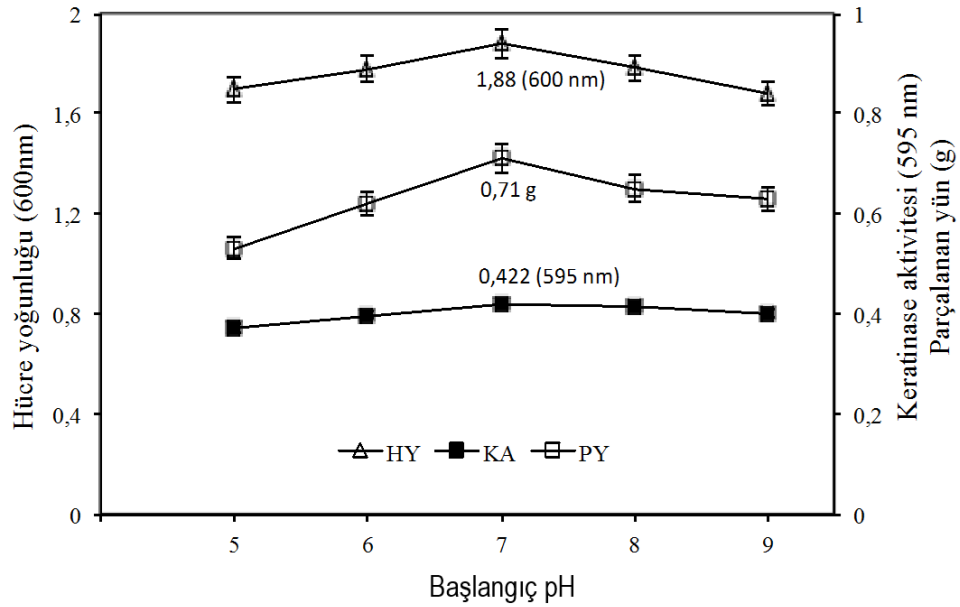
Şekil 4.3. EY2 kodlu izolatın, 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining filogenetik ağacı (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) *Anoxybacillus bogrovensis* dış grup olarak kullanılmıştır.

4.4. Optimizasyon Çalışmaları

Atık yünü maksimum verimle parçalayarak protein hidrolizatı elde edebilmek için keratinaz enzim aktivitesi optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Amaç, en yüksek keratinaz enzim aktivitesi ile maksimum miktarda yünün parçalanabildiği ve yüksek protein içeriğine sahip hidrolizatın elde edilebildiği parametre değerlerinin belirlenmesidir.

4.4.1. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal pH'nın belirlenmesi

Protein hidrolizatı üretiminde optimum pH değerinin belirlenebilmesi için bölüm 3.2.5.a'da anlatılan şekilde deney düzeneği kuruldu ve sırasıyla 5,6,7,8,9 pH değerleri denendi. Elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.3) izolatın pH 7'de maksimum keratinaz enzim aktivitesi gösterdiği bulundu. Çalışmanın diğer basamaklarına besiyeri pH'sı 7'ye ayarlanarak devam edildi.



Şekil 4.4. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal pH'nın belirlenmesi

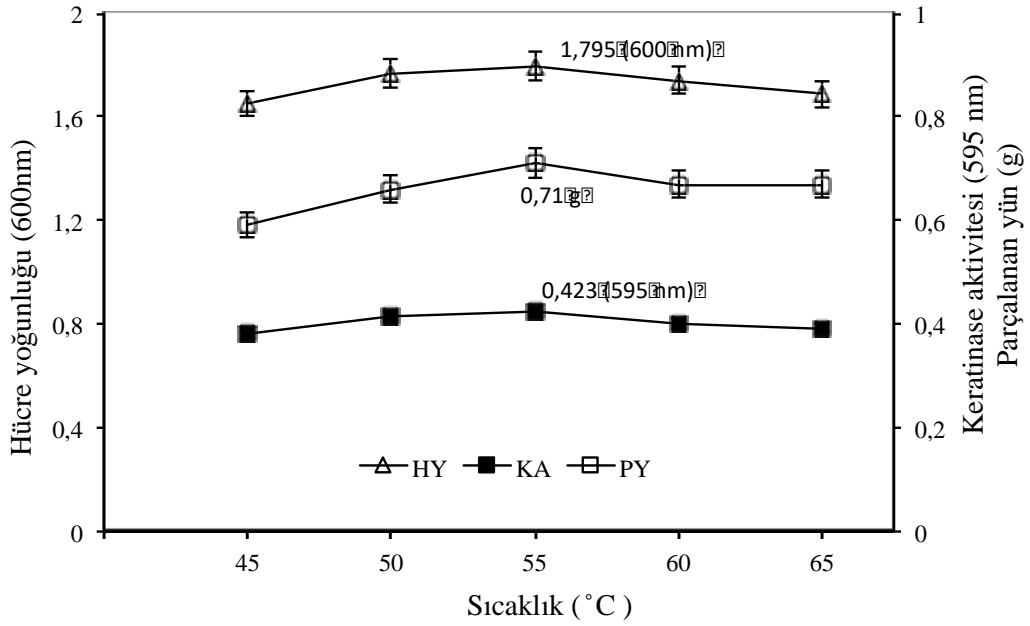
(Kültür koşulları: inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, sıcaklık 55°C, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 1 g/l NaCl, çalkalama hızı 150 rpm)

Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerinde elde edilen keratinaz enzim aktivitesi sonuçları

Başlangıç pH	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalanmış yün
5	1,700	0,371	0,53
6	1,779	0,398	0,62
7	1,880	0,422	0,71
8	1,78	0,413	0,65
9	1,681	0,402	0,63

4.4.2. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

Protein hidrolizat eldesinde maksimum verim elde etmek için; bakterinin geliştirdiği ve en iyi keratinaz enzim aktivitesi gösterebildiği, sıcaklık değerini tespit etmek amacıyla yapılan optimizasyon denemeleri, bölüm 3.2.5.b’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Farklı inkübasyon sıcaklık denemeleri sonucunda elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 4.5 ve Çizelge 4.4’te gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre optimum inkübasyon sıcaklığı 55°C olarak belirlendi.



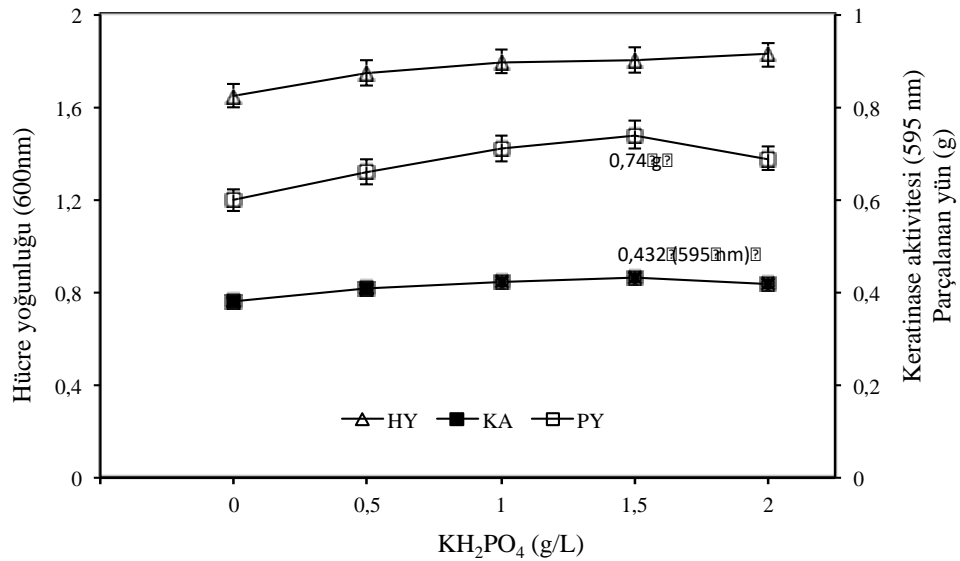
Şekil 4.5. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi
Kültür koşulları: pH: 7, inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 1 g/l NaCl, çalkalama hızı 150 rpm.

Çizelge 4.4. İnkübasyon sıcaklığının hidrolizat eldesi verimi üzerindeki etkisi

Sıcaklık (°C)	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalanmış yün
45	1,65	0,380	0,59
50	1,766	0,415	0,66
55	1,795	0,423	0,71
60	1,740	0,402	0,67
65	1,687	0,393	0,67

4.4.3. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal KH_2PO_4 , MgSO_4 ve NaCl konsantrasyonlarının belirlenmesi

Maksimum verim ile yün protein hidrolizatı üretebilmek amacıyla mineral (KH_2PO_4 , MgSO_4 ve NaCl) konsantrasyonlarının keratinaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi bölüm 3.2.5.c, 3.2.5.d, 3.2.5.e’de anlatıldığı gibi yapılan deneylerle belirlendi. KH_2PO_4 optimizasyonu için elde edilen enzim aktivitesi Şekil 4.6 ve Çizelge 4.5’te, MgSO_4 optimizasyonu için elde edilen değerler Şekil 4.7 ve Çizelge 4.6’da, NaCl optimizasyonu için elde edilen enzim aktivite değerleri Şekil 4.8 ve Çizelge 4.7’de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre optimum KH_2PO_4 miktarı 1.5 g/lt, MgSO_4 miktarı 0.5 g/lt, NaCl miktarı ise 2 g/lt olarak belirlendi.

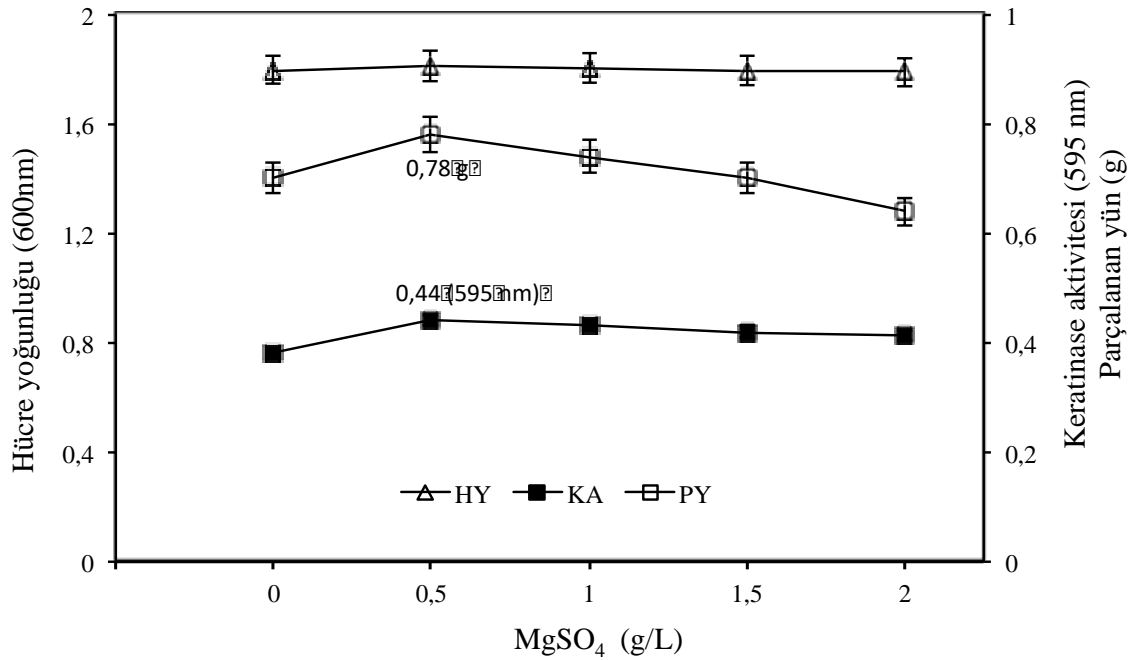


Şekil 4.6. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal KH_2PO_4 miktarının belirlenmesi

Kültür koşulları: pH 7, inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, sıcaklık 55°C , 1 g/l MgSO_4 , 1 g/l NaCl , çalkalama hızı 150 rpm.

Çizelge 4.5. KH_2PO_4 miktarının etkisi

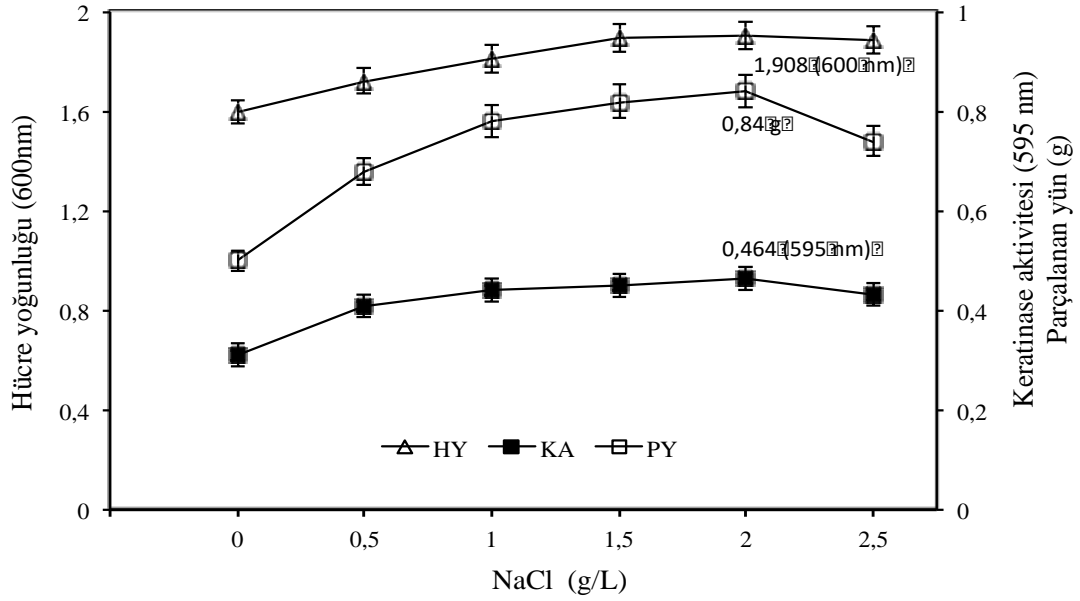
KH_2PO_4 (g/L)	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalan yün
0	1,649	0,381	0,60
0.5	1,746	0,411	0,66
1	1,798	0,421	0,71
1.5	1,804	0,432	0,74
2	1,827	0,420	0,69

**Şekil 4.7.** Keratinaz enzim aktivitesinde optimal MgSO_4 miktarının belirlenmesi

Kültür koşulları: pH 7, inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, sıcaklık 55°C , 1.5 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l NaCl, çalkalama hızı 150 rpm.

Çizelge 4.6. MgSO_4 miktarının etkisi

MgSO_4 (g/l)	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalan yün
0	1,800	0,382	0,70
0.5	1,811	0,440	0,78
1	1,805	0,433	0,74
1.5	1,800	0,420	0,70
2	1,790	0,414	0,64



Şekil 4.8. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal NaCl miktarının belirlenmesi

Kültür koşulları: pH 7, inkübasyon süresi 5 gün, yün konsantrasyonu 1 g/l, sıcaklık 55°C, 1.5 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, çalkalama hızı 150 rpm.

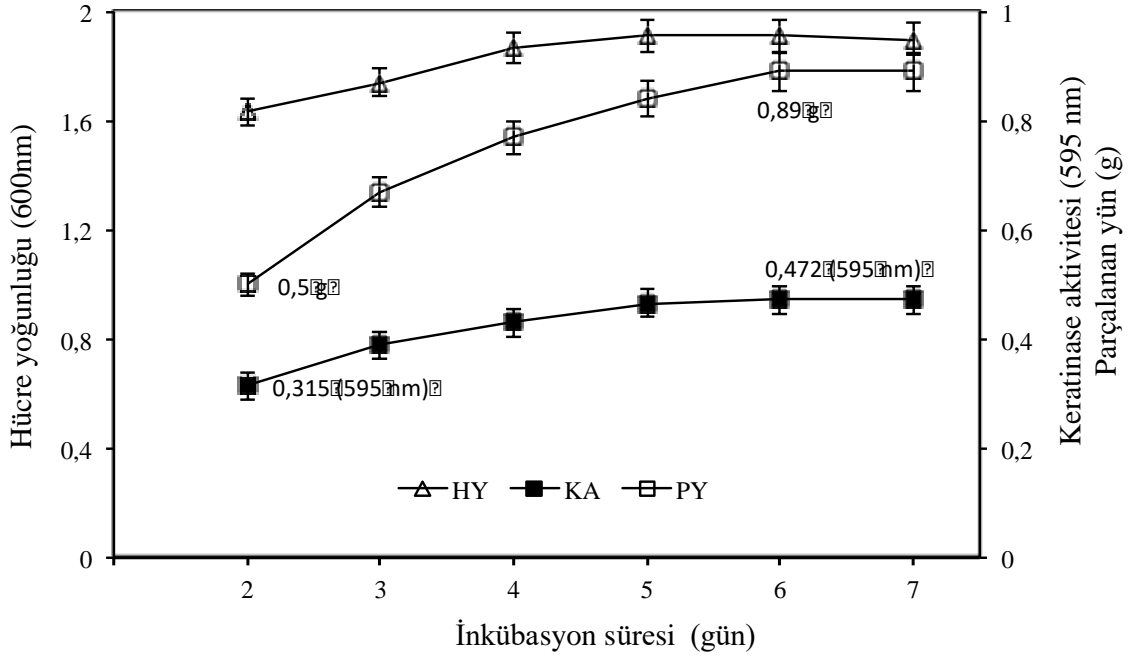
Çizelge 4.7. NaCl miktarının etkisi

NaCl (g/l)	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalanmış yün
0	1,600	0,311	0,50
0.5	1,721	0,410	0,68
1	1,811	0,440	0,78
1.5	1,900	0,450	0,82
2	1,908	0,464	0,84
2,5	1,890	0,433	0,74

4.4.4. Yün protein hidrolizat eldesi için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Protein hidrolizat üretiminde maksimum verim elde etmek amacıyla son olarak inkübasyon süresi optimizasyon denemeleri, bölüm 3.2.5.f'de anlatıldığı gibi yapıldı. İnkübasyon süresi denemeleri sonucunda elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 4.9 ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre maksimum yün parçalanması ve keratinaz aktivitesi için optimum inkübasyon süresi 6 gün olarak belirlendi. Bu

inkübasyon süresinin sonunda 1 gr yünün 0,89 gramının parçalandığı ve keratinaz aktivitesinde 0,472 (595nm) olduğu belirlendi. 2 günlük inkübasyon süresinin sonunda 1 gr yünün yarısının (0,5 gr) parçalandığı tespit edildi.

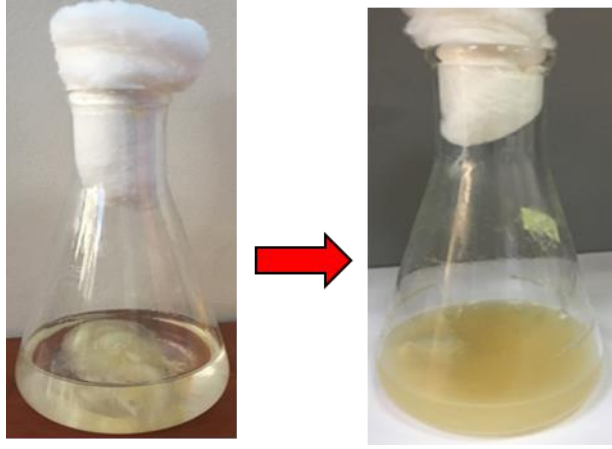


Şekil 4.9. Keratinaz enzim aktivitesinde optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Kültür koşulları: pH 7, yün konsantrasyonu 1 g/L, sıcaklık 55°C, 1,5 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄, 2 g/l NaCl, çalkalama hızı 150 rpm.

Çizelge 4.8. İnkübasyon süresinin hidrolizat eldesi verimi üzerindeki etkileri

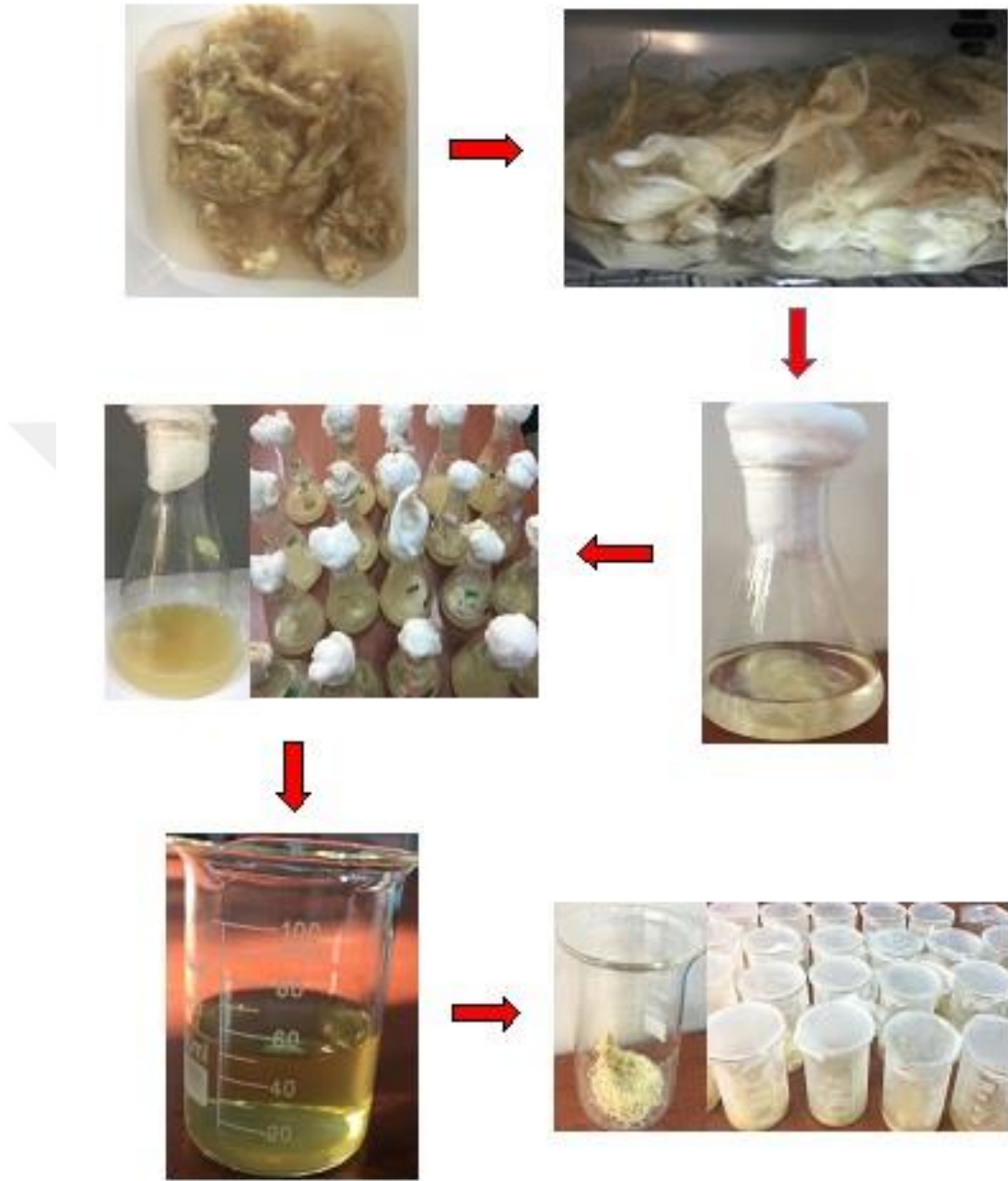
İnkübasyon Süresi (gün)	Hücre yoğunluğu	Enzim aktivitesi	Parçalanmış yün
2	1,630	0,315	0,50
3	1,741	0,390	0,67
4	1,868	0,430	0,77
5	1,910	0,465	0,84
6	1,910	0,472	0,89
7	1,900	0,472	0,89



Şekil 4.10. Başlangıçtaki yünlü besiyeri/ Parçalanmanın olduğu yünlü besiyeri

4.4.5. Optimal parametreler ile yüksek miktarda protein hidrolizat eldesi

Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı üzere aşağıda verilen deney basamakları takip edilerek yün protein hidrolizatı elde edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Liyofilizasyon işleminin ardından elde edilen yün protein hidrolizati

4.4.6. Elde edilen hidrolizatın antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde kurulan deney düzeneği ile protein hidrolizatının antimikrobiyal etkisi test edildi. Ancak yapılan çalışma sonucunda, elde edilen hidrolizatın herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gözlemlendi.

4.4.7. Elde edilen hidrolizatın antioksidan özelliğinin belirlenmesi

4.4.7.a. DPPH radikal temizleyici test

Bölüm 3.2.8.a’da anlatıldığı şekilde kurulan deney düzeneği ile, hidrolizatın antioksidan özelliğinin olup olmadığı araştırıldı. Yapılan spektrofotometrik ölçüm sonucunda yün protein hidrolizatın yeterli miktarda antioksidan etki göstermediği bulundu.

4.4.8. Test mikroorganizmalarının gelişme performansları açısından yün protein hidrolizatı ve ticari peptonun karşılaştırılması

Yün protein hidrolizatın, test mikroorganizmalarının gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için ticari pepton (TP; tripton pepton) ile karşılaştırıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.9’da anlatıldığı şekilde deney düzeneği kuruldu (Şekil 4.12). Spektrofotometrik OD ölçüm sonuçları ve kuru ağırlık ölçüm sonuçları sırasıyla Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da gösterildi.

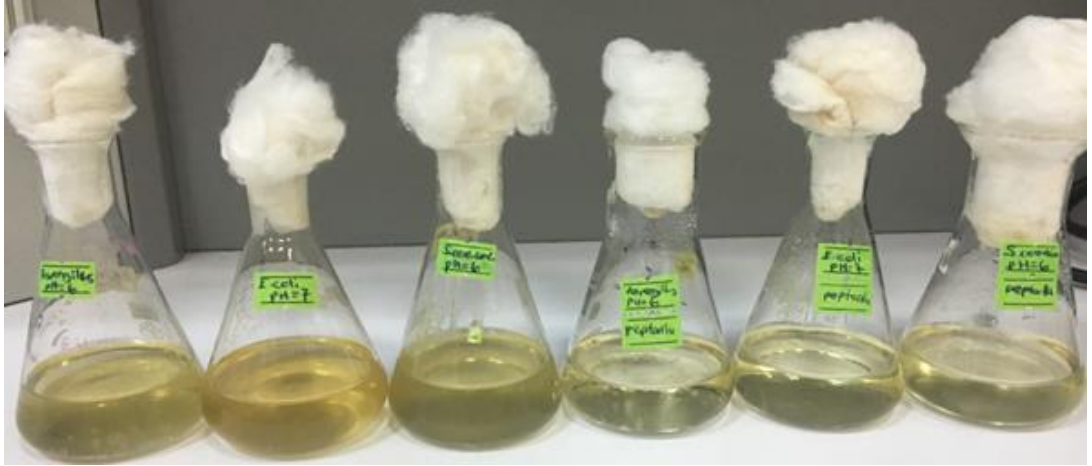
Çizelge 4.9. Test mikroorganizmalarının ticari peptonla ve yün protein hidrolizatıyla hazırlanmış besiyerlerinde büyüme oranları

Mikroorganizma	Peptonlu besiyeri 24. Saat OD ₍₆₀₀₎	Hidrolizatlı besiyeri 24. Saat OD ₍₆₀₀₎
<i>S. cerevisiae</i>	1,807	1,571
<i>E. coli</i>	0,531	0,556

Çizelge 4.10. Test mikroorganizmalarının kuru ağırlık ölçüm sonuçları

Mikroorganizma	Ticari pepton	Yün pepton
<i>S. cerevisiae</i>	2,4 (g/l)	1
<i>E. coli</i>	0,4	1,4
<i>A. niger</i>	7,6	8

Yapılan ölçümler sonucunda; *E. coli* (1,4 g/l) ve *A. niger* (8 g/l) maksimum biyokütle konsantrasyonuna yün protein hidrolizatlı ortamda ulaşırken, *S. cerevisiae* için maksimum biyokütle konsantrasyonuna (2,4 g/l) ticari pepton (trytone pepton) içeren ortamında ulaşılmıştır. Yün peptonunun ticari peptona oranla *E.coli* için 3.5 kat daha fazla hücre büyümesi sağladığı tespit edilmiştir.



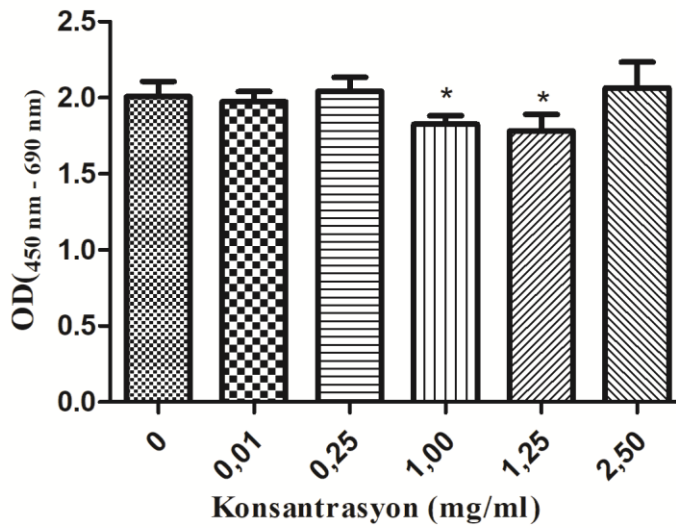
Şekil 4.12. İnkübasyon öncesi ticari pepton ve yün protein hidrolizatı ile hazırlanmış besiyerlerinde mikroorganizma kültürleri



Şekil 4.13. İnkübasyon sonrası ticari pepton ve yün protein hidrolizatı ile hazırlanmış besiyerlerinde mikroorganizma kültürleri

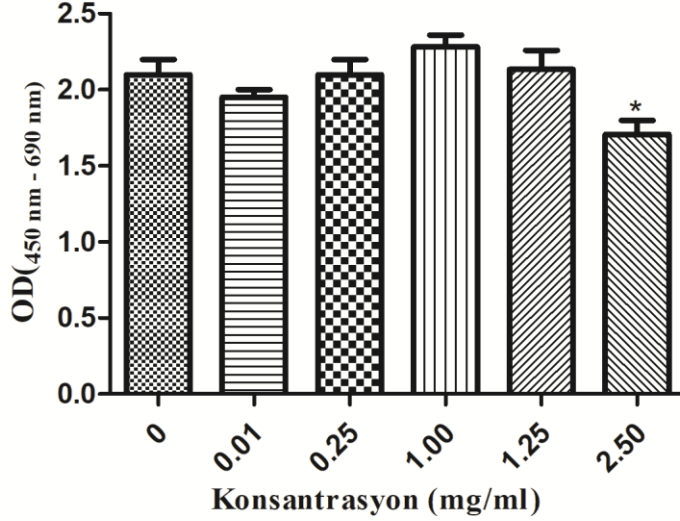
4.4.9. WST 1 assay hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığı analizi WST-1 assay ile yapıldı. İlk olarak insan kolon kanser hücreleri (HT-29) kullanıldı. Bu hücrelerde Şekil 4.14'te gösterildiği üzere yüksek dozlarda (1,00 mg/ml -1,25 mg/ml) verilen yün protein hidrolizatı, kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdi.



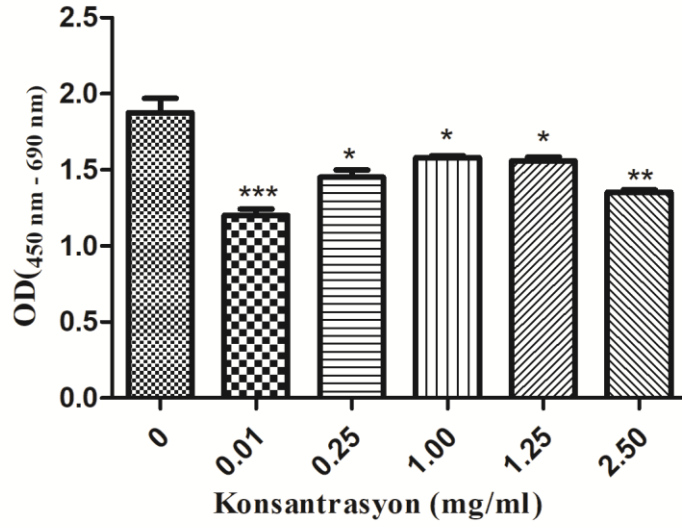
Şekil 4.14. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı HT-29 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$)

İkinci hücre hattı olarak insan prostat kanser hücreleri (DU-145) kullanıldı. Bu hücrelerde, Şekil 4.15'te gösterildiği üzere 2,5 mg/ml konsantrasyonda verilen yün protein hidrolizatı prostat kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdi.



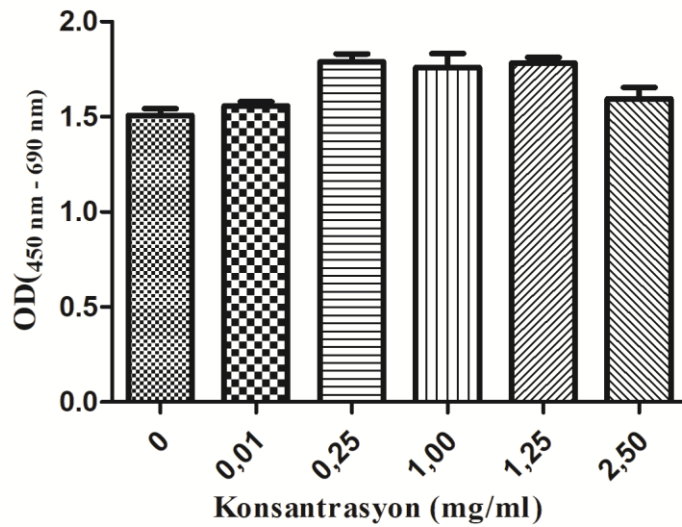
Şekil 4.15. Yün protein hidrolizat konsantrasyonuna bağlı DU-145 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu (0 mg/ml kontrol grubudur,* p<0.05)

Üçüncü hücre hattı olarak, insan akciğer kanser hücreleri (A-549) kullanıldı. Bu hücrelerde, Şekil 4.16'da gösterildiği üzere hidrolizatın bütün konsantrasyonları, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdi ancak en yüksek oranda etki en düşük dozda (0,01 mg/ml) görüldü.



Şekil 4.16. Yün protein hidrolizat konantrasyonuna bağlı A-549 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu(0 mg/ml kontrol grubudur,* p<0.05)

Son olarak yine insan kolon kanser hücre hattı olan Caco-2 hücreleri üzerinde, elde edilen yün protein hidrolizatının sitotoksik etkisi incelendi. Diğer hücre hatlarından farklı olarak bu hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmedi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Yün protein hidrolizat konantrasyonuna bağlı Caco-2 hücrelerinin 24 saatlik WST-1 Assay hücre canlılık analiz sonucu(0 mg/ml kontrol grubudur,* p<0.05)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Protein hidrolizatları, günümüzde; balık atıkları, soya, yumurta, istiridye, bezelye, peynir altı suyu, midye, tüy ve yün gibi protein açısından zengin maddeler kullanılarak üretilmektedir. Yapılan çalışmalar elde edilen bu hidrolizatların; tıp (diyabet, obezite, parkinson, kanser, fenilketonüri, ülser, alzheimer, akut ve kronik karaciğer hastalıklarında, bağırsak sendromunda, ateşli bağırsak hastalığında, pankreasla ilgili hastalıkların tedavisinde), ziraat (bitki gübresi, hayvan yemi), mikroorganizmalar için pepton kaynağı, farmakoloji, kozmetik ve gıda endüstrisi (diyet ürünlerinde, enerji içeceklerinde) gibi sektörlerde geniş uygulama alanları bulabildiklerini göstermiştir (Eremeev *et al.* 2009; Fakhfakh *et al.* 2011). Protein hidrolizatları kimyasal ve enzimatik yolla üretilbildikleri gibi mikrobiyal proseslerle de üretilmektedir. Mikrobiyal prosesle üretimin sahip olduğu; düşük maliyet ve kısa sürede yüksek verim sağlayabilme, içeriği değişmemiş daha doğal yapılı hidrolizatlar elde edebilme gibi avantajlarından dolayı bu yöndeki araştırmalar dikkat çekmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda; *Bacillus licheniformis* (Grazziotin *et al.* 2007), *Bacillus cereus* (Manni *et al.* 2010), *Streptomyces exfoliatus* (Jain *et al.* 2012), *Bacillus pumilis* (Jemil *et al.* 2014), *Stenotrophomonas maltophilia* (Bhange *et al.* 2016), *Fervidobacterium islandicum* (Callegaro *et al.* 2018), *Pseudomonas aeruginosa* (Hammami *et al.* 2018) vb. mikroorganizmalar kullanılarak mikrobiyal yolla protein hidrolizatları üretilmiştir. Bu hidrolizatların üretiminde yukarıda bahsedilen kaynaklardan yararlanılsa da, atık koyun yünü kullanarak protein hidrolizat eldesi çalışmaları sınırlı sayıdadır. Ancak artmakta olan dünya nüfusunun beraberinde getirdiği beslenme, çevre kirliliği sorunları, hastalık sayılarındaki artış ve ilaçlara karşı kazanılan direnç mekanizmaları gibi faktörler özellikle çevresel atık olarak düşünülen ve diğer yönden içeriğinde yüksek miktarda peptit dizisi bulduran koyun yünü gibi yan ürünlerin değerlendirilmesine yönelik yapılacak çalışmalara duyulan ihtiyacı artırmaktadır. Bu ihtiyaç göz önünde bulundurularak yapılan tez çalışmamızda; mikrobiyal proses ile yünü parçalayarak, protein hidrolizatı üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yünü degrade edebilen, keratinaz enzim aktivitesine sahip bakteriler izole edilmiş, ardından izole edilen mikroorganizmalar içerisinden en yüksek keratinaz enzim aktivitesi gösteren ve yüksek

miktarda yün parçalayabilen izolat kullanılarak daha yüksek miktarda hidrolizat eldesi için optimum koşullar (pH, sıcaklık, mineral konsantrasyonu, inkübasyon süresi) belirlenmiş ve üretilen hidrolizatın; antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojen özelliklerine birlikte, mikroorganizma besiyerlerinde pepton kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır.

Çalışmamızda, yüksek keratinaz enzim aktivitesine sahip bakterilere odaklanılmıştır. Ön seçim aşamasında 1'er gr koyun yünü farklı toprak ortamlarına yerleştirilmiş ve yaklaşık 20 gün süreyle toprakta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda koyun yünleri çıkartılmış ve kendisine tutunmuş olan toprakla birlikte 100 ml besiyeri içerisine aktarılmıştır (pH 8.0). 10 gün süreyle 55°C'de inkübe edilmiş ve bu şekilde, sınırlı besinsel şartlarda gelişebilen, bu ortama adapte olabilen bakterilerin izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır. 10 günlük sürenin ardından TSA katı besiyerine ekim yapılmış ve 55°C'de, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, petrilere gelişen ve birbirlerinden farklı koloni morfolojisi gösteren bakteriler seçilerek, saflaştırılmıştır. Bu şekilde toplam 48 bakteri suşu izole edilmiştir. Çalışmamızda izole ettiğimiz 48 bakteri içerisinde sadece 8 izolatin yüksek keratinaz enzim aktivitesi ve yün parçalama potansiyeli gösterdiği belirlenmiştir. Bu 8 izolat arasından da EY2 kodlu izolatin en yüksek keratinaz enzim aktivitesine sahip olduğu bulunmuş ve çalışmanın diğer aşamalarına EY2 izolatu ile devam edilmiştir. Sekans analizi sonrasında bu izolat, *Bacillus licheniformis* olarak tespit edilmiştir. Literatür taraması yapıldığında, *Bacillus* cinslerinin özellikle tavuk tüyünden hidrolizat eldesi çalışmalarında sıklıkla kullanıldığı görülmüştür (Fakhfakh *et al.* 2011; Maciel *et al.* 2017; Callegaro *et al.* 2018; Kalaikumari *et al.* 2019).

Enzim aktivitesinin artırılmasında; inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, mineral konsantrasyonu gibi parametreler oldukça önemli kriterlerdir. Bu nedenle yaptığımız tez çalışmada bu parametrelerin optimizasyon denemeleri de gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının ilk basamağında optimum pH araştırılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere maksimum hidrolizat biyokütlesi ve keratinaz enzim aktivitesi pH:7'de

gözlenmiştir. Bu da çoğu tüy degrade edici *Bacillus* türü için literatür verileri ile uyumaktadır. Örneğin De Oliveira *et al.* (2016)'da yaptıkları çalışmada izole ettikleri *Bacillus sp.*'nin tercihen 7 ila 9 arasındaki pH değerlerinde tüy bozunması için yüksek verimlilik sağladığını bildirmişlerdir. Yine Singh *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* türünün maksimum keratinaz enzim aktivitesini pH:7'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Parashar *et al.* (2017) ise *Bacillus olironius* türünü kullanarak keratinaz enzim üretim çalışmasında optimum pH'yı 7,5 olarak belirlemişlerdir. Literatür verileri incelendiğinde keratinaz enzimi için optimal pH'nın genellikle kullanılan mikroorganizmaya da bağlı olarak pH: 6-10 arasında yüksek verim sergilediği görülmektedir (Fakhfakh *et al.* 2011; Fontoura *et al.* 2014; De Oliveira *et al.* 2016). Bu veriler, mevcut çalışmamızda elde edilen optimal pH değeri ile örtüşmektedir.

Bir sonra ki optimizasyon çalışmasında, farklı sıcaklıkların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mevcut deneyler sıcaklığın keratinaz aktivitesini etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Şekil 4.5'te gösterilen sonuçlar, sıcaklığın enzim aktivitesini etkilediğini bildiren önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. (Demir *et al.* 2015; Parashar *et al.* 2017; Singh *et al.* 2017).Yapılan çalışmada, seçilen bakteri için en iyi hücre büyüme performansı ve enzim aktivitesi 55°C'de elde edilmiştir. Termofilik bakteriler için en iyi gelişme aralığı 45°C- 90°C olduğu bilgisi göz önüne alındığında (Gomes *et al.* 2004) mevcut bakterininde termofilik özellikte olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Diğer bir optimizasyon çalışmasıyla kültür ortamına eklenen düşük konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 , MgSO_4 ve NaCl minerallerinin etkisi incelenmiştir. Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8'de gösterilen sonuçlara göre KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl minerallerinin hidrolizat eldesi için besiyerlerinde bulunmaları gereken optimum değerlerin sırasıyla 1,5, 0.5, 2 g/l olduğu tespit edilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, besiyerlerine katılan bu mineral maddelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak, enzim aktivitelerinin değiştiği ve çalışmamızda bulunan konsantrasyonlarla paralel sonuçların enzim aktivitesini artırdığı görülmüştür (Fakhfakh-Zouari *et al.* 2010; Lv *et al.* 2010).

Optimizasyon çalışmalarının son basamağında en uygun inkübasyon süresi araştırılmış ve inkübasyon süresine bağlı olarak enzim aktivitesinde değiştiği gözlenmiştir. Literatür verilerinde de, keratinaz enzim aktivitesi için inkübasyon süresinin oldukça önemli bir parametre olduğu belirtilmiş ve yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi için bu süreler optimize edilmiştir. Örneğin; Singh *et al.* (2017), tüy atık maddesini kullanarak yaptıkları çalışmada maksimum keratinaz enzim üretimine 72 saatin sonunda ulaşırken, Fontoura *et al.* (2014), 48 saatlik inkübasyonun ardından yüksek verimde tavuk tüyü protein hidrolizatı elde etmişlerdir.

Optimizasyon denemelerinin ardından, elde edilen optimum koşullar kullanılarak yüksek miktarda yün protein hidrolizatı üretilmiş, daha sonra bu hidrolizat liyofilize edilerek toz haline getirilmiştir. Liyofilize haldeki hidrolizat suda çözünebildiğinden bu hidrolizatın, farklı konsantrasyonlarda solüsyonları hazırlanarak antimikrobiyal ve antioksidan testleri yapılmıştır. Antimikrobiyal analiz sonucunda petrielerde pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında zon oluşumu meydana gelirken, hidrolizatın inoküle edildiği diskin çevresinde herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir. Yine antioksidan deneyi sonucunda elde edilen veriler pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asitle karşılaştırıldığında, kayda değer bir antioksidan özellik göstermediği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bu sonuçlar literatür verileriyle paralellik göstermemiştir. Çünkü yapılan çalışmalar incelendiğinde, protein hidrolizatlarının genellikle antimikrobiyal ve antioksidan özellikte oldukları bildirilmiştir.(Fontoura *et al.* 2014; Bouhamed *et al.* 2018; Sinkiewicz *et al.* 2018; Ben Hamad Bouhamed *et al.* 2019). Bu sonuçlar, bize çalışmada elde edilen yün protein hidrolizatının, içerisinde bulunan peptitlerin antimikrobiyal ve antioksidant özelliğe sahip peptitler olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda, elde edilen hidrolizatın mikroorganizma besiyerlerinde pepton kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli de araştırılmış ve bir sonraki deneyde; yün protein hidrolizatın test mikroorganizmalarının gelişimi üzerindeki etkisi, ticari peptonla kıyaslanmıştır. Çizelge 4.10'da gösterildiği üzere, *E. coli* (1,4 g/l) ve *A. niger* (8 g/l) maksimum biyokütle konsantrasyonuna yün protein hidrolizatlı ortamda ulaşmıştır. Yün

peptonunun ticari peptona oranla *E.coli* için 3.5 kat daha fazla hücre büyümesi sağladığı tespit edilmiştir. Literatür araştırması yapıldığında, atık ürünler kullanılarak üretilen hidrolizatların mikroorganizmalar için pepton kaynağı olarak kullanılabilmesi önerisinin Taskin *et al.* (2016) tarafından daha önce bildirildiği görülmüştür ancak şimdiye kadar mikrobiyal yolla, ucuz bir prosesle üretilen yün protein hidrolizatının bu amaçla kullanımına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mevcut tez çalışmasında elde edilen yün protein hidrolizatının, antikanserojen etkisini araştırmak üzere insan kolon kanser hücreleri (HT-29, Caco-2), insan prostat kanser hücreleri (DU-145) ve insan akciğer kanser hücreleri (A-549) kullanılmış, hücre canlılığı analizi WST-1 assay ile yapılmıştır. HT-29 hücrelerinde, yüksek dozlarda (1,00 mg/ml - 1,25 mg/ml) verilen yün protein hidrolizatı, kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir ancak en yüksek dozda (2,5 mg/ml) bu etki görülmemiştir. Diğer taraftan, DU-145 hücrelerine 2,5 mg/ml konsantrasyonunda ve A549 hücrelerine ise 0,01 mg/ml konsantrasyonlarında verilen hidrolizatın bu hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu görülmüştür. Ancak bu hücre hatlarından farklı olarak, yün protein hidrolizatı, Caco-2 kanser hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Bu sonuçlar, hücre hatlarına ve verilen dozlara bağlı olarak, yün hidrolizatının antikanser etkisinde değiştiği gözlemlenmiştir.

Literatür taramasında, yapılan çalışmalar incelendiği zaman farklı kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatlarının antikanser etkilerinin araştırıldığı ve çalışmamızda da gözlemlendiği gibi bu hidrolizatların farklı hücre hatları üzerinde antikanser etki gösterdiği görülmüştür. Örneğin Markowicz *et al.* (2014) yılında yaptıkları çalışmada insan saçını enzimatik olarak hidrolize ederek hazırladıkları protein hidrolizatının insan melanoma ve insan mesane kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini gözlemlenmişlerdir. Damps *et al.* (2017), tarafından yapılan başka bir çalışmada kimyasal proses ile elde edilen yün hidrolizatının, karsinoma hücrelerinin canlılığını %67'ye kadar azalttığı bildirilmiştir. Yine tavuk tüyü ile yapılan çalışmada (Omran 2016) kısmen saflaştırılmış metabolitlerin, (400 µg / ml), meme kanseri hücrelerini (MCF-7) %44-51 oranında, normal hepatik hücreleri ise (WRL-68) %9 oranında inhibe

ettiği bildirilmiştir. Bu verilere dayanarak, protein hidrolizatlarının antikanser özelliklerinden yararlanılabileceği ve tedavide kullanılabilmeleri için bu yönde yapılacak olan çalışmalara öncelik verilmesi gerektiği düşünölmektedir.

Elde ettiğimiz hidrolizatla yapmış olduğumuz çalışmalar neticesinde; gerek mikrobiyal uygulamalar için alternatif pepton kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli, gerekse tıbbi uygulamalar için önemli olan antikanserojen özellik gibi efektif sonuçlar elde edilmiştir. Bu yönüyle tezimiz, hem bilim dünyası için hem ölkemiz ekonomisi için önemli çıktıların elde edilebileceği çalışmalara temel oluşturmaktadır.



KAYNAKLAR

- Albayrak, Ş., 2018. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açından Önemliolan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Oxford Üniversitesi Yayınları 4th edition.
- Allison, L. A., 2014. *Temel Moleküler Biyoloji*. Palme Yayınevi, 656, s, Ankara.
- Avissar, Y., Choi, J., DeSaix, J., Jurukovski, V., Wise, R. and Rye, C., 2017. *Biology*.
- Baltacı, M. O., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Barba, C., Méndez, S., Roddick-Lanzilotta, A., Kelly, R., Parra, J. L., and Coderch, L., 2008. Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. *Skin Research and Technology*, 14(2), 243-248.
- Ben Hamad Bouhamed, S., Chaari, M., Bellassoued, K., Naifar, M., Makni-Ayadi, F., Boudaouara, T., El Feki, A. and Kechaou, N., 2019. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of feather protein hydrolysate in high-fat diet-fed mice. *Engineering in Life Sciences*, 19 (3), 175-183.
- Beyhan, T., 2011. Bazı Zenginleştirici Ürünlerin *Artemia* (*Artemia Salina* Linnaeus, 1758)'nin Besinsel İçeriğine ve Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Bhange, K., Chaturvedi, V. and Bhatt, R., 2016. Feather degradation potential of *Stenotrophomonas maltophilia* KB13 and feather protein hydrolysate (FPH) mediated reduction of hexavalent chromium. *3 Biotech*, 6 (1), 42.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., and Bhat, H. F., 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5377-5392.
- Boeckle, B., Galunsky, B. and Mueller, R., 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (10), 3705-3710.
- Bouhamed, S. B. H., Krichen, F., Kechaou, N., 2018. Feather protein hydrolysates: A study of physicochemical, functional properties and antioxidant activity. *Waste and Biomass Valorization*, 1-12.
- Cai, C. G., Chen, J. S., Qi, J. J., Yin, Y. and Zheng, X. D., 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(9), 713-720.
- Callegaro, K., Welter, N. and Daroit, D. J., 2018. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. *Process biochemistry*, 75 1-9.

- Chalamaiah, M., Yu, W. and Wu, J., 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*, 245 205-222.
- Damps, T., Laskowska, A. K., Kowalkowski, T., Prokopowicz, M., Puszko, A. K., Sosnowski, P., Czuwara, J., Konop, M., Różycki, K., Borkowska, J. K., Misicka, A. and Rudnicka, L., 2017. The effect of wool hydrolysates on squamous cell carcinoma cells in vitro. Possible implications for cancer treatment. *PloS one*, 12 (8), e0184034.
- Darah, I., Nur-Diyana, A., Nurul-Husna, S., Jain, K. and Lim, S. H., 2013. *Microsporium fulvum* IBRL SD3: as novel isolate for chicken feathers degradation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171 (7), 1900-1910.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B. and Lopez-Fandino, R., 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67 (9), 1939-1944.
- de Oliveira, C. T., Pellenz, L., Pereira, J. Q., Brandelli, A. and Daroit, D. J., 2016. Screening of bacteria for protease production and feather degradation. *Waste and biomass valorization*, 7 (3), 447-453.
- Demir, T., Hameş, E. E., Öncel, S. S. and Vardar-Sukan, F., 2015. An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 134-140.
- Demiralp, Ö. D., Naşit, İ., Selen, P. and Beycan, A., 2014. *Temel Proteomik Stratejiler*. Ankara Üniversitesi Yayınları, 122 s.
- Dimitrios, B., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 505-512.
- El-Refai, H. A., AbdelNaby, M. A., Gaballa, A., El-Araby, M. H. and Fattah, A. A., 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40(7), 2325-2332.
- Eremeev, N. L., Nikolaev, I. V., Keruchen'ko, I. D., Stepanova, E. V., Satrutdinov, A. D., Zinov'ev, S. V., Ismailova, D. Yu., Khotchenkov, V. P., Tsurikova, N. V., Sinitsyn, A. P., Volik, V. G. and Koroleva, O. V., 2009. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates. *Applied biochemistry and microbiology*, 45(6), 648.
- Fakhfakh, N., Gargouri, M., Dahmen, I., Sellami-Kamoun, A., El Feki, A. and Nasri, M., 2012. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. *African Journal of Biotechnology*, 11 (4), 938-949.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L. and Nasri, M., 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian journal of microbiology*, 55 (4), 427-436.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I. H., Dahmen, I. and Nasri, M., 2011. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochemistry*, 46 (9), 1731-1737.

- Fakhfakh-Zouari, N., Haddar, A., Hmidet, N., Frikha, F. and Nasri, M., 2010. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry*, 45 (5), 617-626.
- Firat, A., 2017. *Koyunyünü Hidrolizatından Mikrobiyal Pepton Üretimi*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Fontoura, R., Daroit, D. J., Correa, A. P., Meira, S. M., Mosquera, M. and Brandelli, A., 2014. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme-and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New biotechnology*, 31 (5), 506-513.
- Friedrich, A. B. and Antranikian, G., 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (8), 2875-2882.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, 42(4), 223-225.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva-Tonkova, E., Haertle, T. and Nedkov, P., 2005. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in applied microbiology*, 40 (5), 335-340.
- Grazziotin, A., Pimentel, F. A., Sangali, S., de Jong, E. V. and Brandelli, A., 2007. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource technology*, 98 (16), 3172-3175.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 71-80.
- Hammami, A., Bayouhd, A., Abdelhedi, O. and Nasri, M., 2018. Low-cost culture medium for the production of proteases by *Bacillus mojavensis* SA and their potential use for the preparation of antioxidant protein hydrolysate from meat sausage by-products. *Annals of microbiology*, 68 (8), 473-484.
- Han, M., Luo, W., Gu, Q. and Yu, X., 2012. Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (9), 2211-2221.
- Hill, P., Brantley, H. and Van Dyke, M., 2010. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, 31 (4), 585-593.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. and Wu, G., 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 24.
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P., 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology* 45 (3), 217-222.
- Ishak, N. H. and Sarbon, N. M., 2018. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food and bioprocess technology*, 11(1), 2-16.
- Jain, R., Jain, P. C. and Agrawal, S. C., 2012. Feather degradation by *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068. *Annals of microbiology*, 62(3), 973-978.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S. B., Mehiri, M. And Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates

- prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963-972.
- Jeong, J. H., Lee, O. M., Jeon, Y. D., Kim, J. D., Lee, N. R., Lee, C. Y. and Son, H. J., 2010. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. *Process Biochemistry*, 45(10), 1738-1745.
- Kalaikumari, S. S., Vennila, T., Monika, V., Chandraraj, K., Gunasekaran, P. and Rajendhran, J., 2019. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. *Journal of cleaner production*, 208 44-53.
- Kaul, S. and Sumbali, G., 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia*, 139 (3), 137-140.
- Khan, M. A., Rahman, A. A., Islam, S., Khandokhar, P., Parvin, S., Islam, M. B., Hossain, M., Rashid, M., Sadik, G., Nasrin, S. and Mollah, M.N. H., 2013. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L.(Moraceae). *BMC Research Notes*, 6(1), 24.
- Khardenavis, A. A., Kapley, A. and Purohit, H. J., 2009. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. *Waste management*, 29 (4), 1409-1415.
- Kshetri, P., Roy, S. S., Sharma, S. K., Singh, T. S., Ansari, M. A., Prakash, N. And Ngachan, S. V. 2019. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. *Waste and biomass valorization*, 10(1), 1-11.
- Kumar, D. M., Priya, P., Balasundari, S. N., Devi, G. S. D. N., Rebecca, A. I. N. and Kalaichelvan, P. T., 2012. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential. *Middle-east journal of scientific research*, 11(7), 900-907.
- Lateef, A., Oloke, J. K., Kana, E. G., Sobowale, B. O., Ajao, S. O. And Bello, B. Y. 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2), 162-165.
- Lee, H., Suh, D. B., Hwang, J. H. and Suh, H. J., 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied biochemistry and biotechnology*, 97(2), 123-133.
- Lewis, D. M. and Rippon, J. A., 2013. *The coloration of wool and other keratin fibres*. John Wiley & Sons, 464 s.
- Lopes, F. C., Tichota, D. M., Daroit, D. J., Velho, R. V., Pereira, J. Q., Corrêa, A. P. F. and Brandelli, A., 2011. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme research*, 2011.
- Lv, L. X., Sim, M. H., Li, Y. D., Min, J., Feng, W. H., Guan, W. J. and Li, Y. Q., 2010. Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov. *Process Biochemistry*, 45(8), 1236-1244.
- Maciel, J. L., Werlang, P. O., Daroit, D. J. and Brandelli, A., 2017. Characterization of protein-rich hydrolysates produced through microbial conversion of waste feathers. *Waste and biomass valorization*, 8(4), 1177-1186.

- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I. and Nasri, M., 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Markowicz, S., Matalinska, J., Kurzepa, K., Bochynska, M., Biernacka, M., Samluk, A., Dudek, D., Skurzak, H., Yoshikawa, M. and Lipkowski, A. W., 2014. Anticancer properties of peptide fragments of hair proteins. *PloS one*, 9(6), e98073.
- 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. *Applied microbiology and biotechnology*, 82 (5), 941-950.
- Mokrejš, P., Krejčí, O. and Svoboda, P., 2011. Producing keratin hydrolysates from sheep wool. *Oriental Journal of Chemistry*.
- Mouro, C. and Gouveia, I. C., 2016. Antimicrobial functionalization of wool: assessment of the effect of Cecropin-B and [Ala5]-Tritrp7 antimicrobial peptides. *The Journal of the Textile Institute*, 107(12), 1575-1583.
- Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., Hwang, J.-K., Suhartono, M. T. and Pyun, Y. R., 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178(6), 538-547.
- Navone, L. and Speight, R., 2018. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PloS one*, 13 (8), e0202608.
- Navone, L., Moffitt, K., Hansen, K. A., Blinco, J., Payne, A. and Speight, R., 2020. Closing the textile loop: Enzymatic fibre separation and recycling of wool/polyester fabric blends. *Waste Management*, 102, 149-160.
- Omran, R., 2016. Production Of Antimicrobial And Anticancer Fom Feather-Keratinolytic *Nocardiosis* sp. 28ror As A Novel Strain Using Feather Meal Medium.
- Parashar, D., Bhatia, D. and Malik, D. K., 2017. Optimization of keratinase production by *Bacillus olironius* isolated from poultry farm soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 1129-1134.
- Patkowska-Sokoła, B., Dobrzański, Z., Osman, K., Bodkowski, R. and Zygodlik, K., 2009. The content of chosen chemical elements in wool of sheep of different origins and breeds. *Archives Animal Breeding*, 52 (4), 410-418.
- Patrucco, A., Visai, L., Fassina, L., Magenes, G. and Tonin, C., 2019. Keratin-based matrices from wool fibers and human hair. In *Materials for Biomedical Engineering*, Elsevier, 375-403
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J., Guérard, F., Chabeaud, A. and Piot, J. M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41 (5), 1217-1222.
- Pihlanto, A., 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*, 16(11), 1306-1314.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 597-635.

- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y. and Xue, S. J., 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108(2), 727-736.
- Sarmadi, B. H. and Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31 (10), 1949-1956.
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X. and Li, P., 2010. Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe*, 16(4), 380-386.
- Singh, S., Masih, H., Jeyakumar, G. E., Lawrence, R. and Ramteke, P. W., 2017. Optimization of fermentative production of keratinase by *Bacillus subtilis* strain S1 in submerged state fermentation using feather waste. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6(12), 1499-1510.
- Sinkiewicz, I., Staroszczyk, H. and Śliwińska, A., 2018. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *Journal of food biochemistry*, 42(2), e12494.
- Sivakumar, N. and Raveendran, S., 2015. Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage. *British poultry science*, 56(2), 210-217.
- Smid, E. J. and Lacroix, C., 2013. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 148-154.
- Taskin, M. And Kurbanoglu, E. B., 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of applied microbiology*, 111(4), 826-834.
- Taskin, M., Unver, Y., Firat, A., Ortucu, S. and Yildiz, M., 2016. Sheep wool protein hydrolysate: a new peptone source for microorganisms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(6), 1675-1680.
- Tripathi, A. D., Mishra, R., Maurya, K. K., Singh, R. B. and Wilson, D. W., 2019. Estimates for world population and global food availability for global health. *The Role of Functional Food Security in Global Health*, Elsevier, 3-24.
- Wan, M.-Y., Dong, G., Yang, B.-Q. and Feng, H., 2016. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysate. *Biotechnology letters*, 38 (4), 643-649.
- Yildiz, M., 2018. Azurin in *Lactococcus lactis*'te Rekombinant Üretimi, Antimikrobiyal ve Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Zhang, Y. X., Zou, A. H., Manchu, R. G., Zhou, Y. C. and Wang, S. F., 2008. Purification and antimicrobial activity of antimicrobial protein from brown-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *J Zool Syst Evol Res*, 29, 627-632.
- Zoccola, M., Aluigi, A. and Tonin, C., 2009. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*, 938 (1-3), 35-40.

ÖZGEÇMİŞ

12.12.1994 tarihinde Erzurum'da doğdu. İlk öğretimini Erzurum İMKB İnönü İlköğretim Okulu'nda, orta öğretimini Gazi Ahmet Muhtar Paşa Ortaokulu'nda tamamladı. Ardından 2008-2012 yılları arasında Erzurum Lisesi'nde (Anadolu) öğrenim gördü. 2012-2016. tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.