

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**M125-4 AKTİNOMİSET İZOLATI KULLANILARAK
KERATİNÖZ ATIKLARDAN
KERATİNAZ ÜRETİM OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Deniz KUŞCUOĞLU

Tez Danışmanı : Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ KOCABAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 28.05.2012

**Bornova / İZMİR
2012**

Deniz KUŞCUOĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “M125-4 Aktinomiset İzolatı Kullanılarak Keratinöz Atıklardan Keratinaz Üretim Optimizasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28.05.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ KOCABAŞ	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN	

ÖZET**M125-4 AKTİNOMİSET İZOLATI İLE KERATİNÖZ
ATIKLARDAN KERATİNAZ ÜRETİM OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

KUŞCUOĞLU, Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tez danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ KOCABAŞ
Mayıs 2012, 90 sayfa

Tez çalışmasında, mevcut aktinomiset izolatlarının proteaz ve keratinaz aktivitesi açısından taranarak seçilen izolattan keratinöz atık kullanılarak keratinaz üretiminin optimizasyonu ve karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda; ilk aşamada, 180 adet alkalifilik aktinomiset izolatı proteaz aktivitesi açısından taranmış ve seçilen iyi üreticiler substrat olarak keratinöz atıklar (tavuk tüyü, koyun yünü) kullanılarak derin kültür fermentasyon çalışmasına alınmıştır. Fermentasyon sıvıları keratinaz aktiviteleri açısından değerlendirilerek izolat M125-4 ve substrat olarak tavuk tüyü ileri çalışmalar için seçilmiştir. Çeşitli özellikleri incelenen izolatın *S. albidofalavus* grubunda yer aldığı belirlenmiştir. Daha sonra pH, inokulum miktarı ve zaman değişkenlerinin keratinaz üretiminde birbirleri ile olan etkileşimi yanıt yüzeyi yöntemi (YYY) ile incelenmiş ve buna göre keratinaz üretimi için optimum koşullar pH 7.0, 30°C ve 4 gün olarak belirlenmiştir. Ardından substrat miktarının optimizasyonu YYY ile elde edilen koşullar altında gerçekleştirilerek, en iyi enzim üretiminin 15g/L tavuk tüyü ile 12 U/ml olduğu belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda enzim üretimi, % 50 oranında arttırılmış ve fermentasyon süresi 2 gün kısaltılmıştır. Enzim iyon değişim kromatografi kolonundan elüsyon sonucu % 13.7 verimlilik ile 44.1 kat saflaştırılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değeri 37°C, pH 9.0 olarak belirlenmiş, 1 saat süre sonunda 45°C’de % 80 ve pH 12’de ise % 84 aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Keratinazın moleküler kütlesi 20 kDa olarak tahmin edilmiştir. Bunu takiben; çeşitli substratların, inhibitörlerin, deterjanların ve organik solventlerin farklı derişimlerde enzimatik reaksiyona etkisi belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aktinomiset, *Streptomyces* sp., keratinaz, proteaz, tavuk tüyü, optimizasyon, yanıt yüzeyi yöntemi, saflaştırma, karakterizasyon.

ABSTRACT**OPTIMIZATION OF THE KERATINASE PRODUCTION FROM
ACTINOMYCETES M125-4 USING KERATINOUS WASTES
AND CHARACTERIZATION OF KERATINASE**

KUŞCUOĞLU, Deniz

MSc. Thesis in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. E. Esin HAMEŞ KOCABAŞ

May 2012, 90 pages

The aim of the thesis is to optimize the production of keratinase using keratin based wastes from actinomycete isolates that screened for their ability to produce proteases and to perform enzymes' purification and characterization.

In this study primarily a total of 180 actinomycetes isolate were investigated for their extracellular protease producing capacities and the best producers were evaluated for keratinase production in shake flask fermentation. Isolate M125-4 which have a potential to produce keratinase in specified level of literature or more than that was chosen for further studies. The selected isolate was identified in *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of its various characteristics. In the second step of the thesis based on preliminary studies three variables; temperature, initial pH and incubation time were selected and optimized by Response Surface Methodology (RSM). Also amount of substrate in fermentation was optimized using One variable at a time (OVAT) method. For the production of keratinase optimum conditions were determined as pH 7.0, 30°C, 4 days and 15 g/L chicken feather. As a result of optimization studies, the enzyme production was increased 50 % and also the fermentation time of the enzyme was shortened 2 days. Following the optimization, enzyme was purified 44.1 fold by ion exchange chromatography with 13.7 % yield. The optimal temperature and pH for the keratinolytic activity were determined 37°C and 9.0 respectively. Temperature and pH stability of the keratinase after 1 hour at 45°C and pH 12 were defined as 80 % and 84 % respectively. The enzyme molecular mass was estimated 20 kDa by SDS-PAGE analysis. Finally for the determination of the various substrates, inhibitors, detergents and organic solvents effects of enzyme activity they added to enzymatic reaction to certain concentrations.

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces* sp., optimization, Response surface methodology, purification, characterization.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince emeğini ve sabrını esirgemeyerek beni yönlendiren, bilgi ve desteği ile yetişmemde büyük katkısı olan tez danışmanım Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ KOCABAŞ'a, çalışma süresince kıymetli bilgi ve deneyimlerini paylaşarak her türlü engeli aşmamızı sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na, çalışmanın yürütülmesindeki destek ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Ataç UZEL'e, değerli görüşlerini paylaşarak sonuçlara ulaşmamı kolaylaştıran Dr. Ali ZEYTÜNLÜOĞLU'na ve yüksek lisans tez çalışmamı yürütmeme imkan sağlayan Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) Müdürü ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

SDS-PAGE çalışmaları için Kanser Biyolojisi Laboratuvar çalışanlarına, mikropilaka okuyucu kullanımı için Hayvan Hücre Kültür Laboratuvar çalışanlarına, endüstriyel santrifüj ve ultrafiltrasyon kullanımı için Proses Laboratuvar çalışanlarına yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Her türlü sorunumda yanımda olan çalışma arkadaşlarım Artun SUKAN ve Ferhat Can ÖZKAYA'ya, çalışmalarım sırasında benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Özlem ÖNER, Besra ÖZMEN, Cansu ALAPINAR, Tuğçe DEMİR, Canberk İŞLER, Güner EKİZ ve Özge AKYÜZ'e, en stresli zamanlarımda yanımda olan Can ÜÇÜNCÜ'ye ve maddi, manevi destekleri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme, annem Sultan AKBOĞA KUŞCUOĞLU ve babam İbrahim KUŞCUOĞLU'na çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Keratinöz Substratlar	3
2.2. Keratinazlar	6
2.2.1. Keratinazların yapısal ve katalitik özellikleri	10
2.2.2. Mikrobiyal keratinolizis	12
2.2.3. Keratinazların küresel piyasa değeri	15
2.3. Mikrobiyal Keratinazların Endüstriyel Uygulama Alanları	16
2.3.1. Agroendüstri	17
2.3.2. Film ve yapışkan yapımı için yarı hidrolize keratin	18
2.3.3. Deterjan endüstrisi	18
2.3.4. Prion proteininin parçalanması	19
2.3.5. Deri endüstrisi	19
2.3.6. Diğer uygulamalar	20
2.4. Keratinolitik Mikroorganizmalar	20
2.4.1. Aktinomisetler ve <i>Streptomyces</i> sp.	22

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. MATERYAL.....	23
3.1. Mikroorganizmalar	23
3.2. Besiyerleri	23
3.3. Çözelti, Tampon ve Substratlar.....	28
3.4. Makine ve Teçhizatlar.....	30
4. YÖNTEMLER	31
4.1. İzolatların Proteaz Aktivitesi Açısından Taranması	31
4.2. Spor Süspansiyonu Hazırlanması	31
4.3. İzolatın Tanılanmasında Kullanılan Yöntemler	31
4.3.1. Gram boyama.....	31
4.3.2. Biyokimyasal yöntemler	32
4.3.3. Taramalı elektron mikroskobu.....	33
4.3.4. Genomik DNA İzolasyonu	33
4.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu	33
4.3.6. Agaroz jel elektroforezi	34
4.3.7. DNA dizileme yöntemi.....	34
4.4. Fermentasyon Çalışmaları	35
4.5. Optimizasyon Çalışmaları.....	35
4.5.1. İnkübasyon süresi, pH ve Sıcaklığın Optimizasyonu	36
4.5.2. Karbon ve azot kaynağı olarak tavuk tüyü optimizasyonu.....	37
4.6. Keratinaz Aktivite Ölçümü	37
4.6.1. <i>p</i> -Nitroanilid standart grafiği	38
4.7. Proteaz Aktivite Ölçümü.....	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.7.1. Tirozin standart grafiği	39
4.8. Toplam Protein Tayini	39
4.8.1. Protein standart grafiği	39
4.9. Enzimin Kısmi Saflaştırılması	40
4.9.1. Ultrafiltrasyon.....	40
4.9.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	40
4.9.3. Diyaliz.....	40
4.9.4. Kolon kromatografi işlemleri	40
4.10. Enzim Karakterizasyonu	41
4.10.1. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi	41
4.10.2. Sıcaklık ve pH kararlılığının belirlenmesi	41
4.10.3. Moleküler kütle tayini (SDS – PAGE)	42
4.10.4. Zimogram.....	42
4.10.5. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi.....	43
4.10.6. Enzimin substrat özgüllüğünün belirlenmesi.....	43
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	44
5.1. İzolatların Proteaz Aktivitesi Açısından Taranması	44
5.2. İzolatın Tanılama Çalışmaları	46
5.2.1. İzolatın fenotipik ve biyokimyasal özellikleri	46
5.3. Optimizasyon Çalışmaları.....	54
5.3.1. İnkübasyon süresi, pH ve Sıcaklığın Optimizasyonu	54
5.3.2. Substrat olarak tavuk tüyü optimizasyonu.....	58
5.4. Enzimin Kısmi Saflaştırılması	59

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.5. Enzim Karakterizasyonu	60
5.5.1. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi.....	60
5.5.2. Sıcaklık ve pH kararlılığının belirlenmesi.....	62
5.5.3. Moleküler kütle tayini (SDS – PAGE)	64
5.5.4. Zimogram	65
5.5.5. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi	66
5.5.6. Enzimin substrat özgülüğünün belirlenmesi.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	75
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 α heliks ve β tabaka'nın şematik gösterimi.	3
2.2 Keratinöz atık miktarı ve kompozisyonu.	4
2.3 Bazı keratinazların substrat özgüllükleri	11
5.1 İzolatların oluşturduğu zonların görünümü	44
5.2 İzolatın farklı keratinöz substratlar üzerindeki parçalama etkinliği	45
5.3 M125-4'ün petrideki görünümü.	46
5.4 İzolatın gram boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü	47
5.5 İzolatın elektron mikroskop görüntüsü	47
5.6 İzolatın farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği	48
5.7 İzolatın farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği	48
5.8 İzolatın 16S rDNA sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç	49
5.9 Hata dağılım grafiği.	56
5.10 pH – Sıcaklık etkileşiminin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	57
5.11 pH – zaman etkileşiminin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	57
5.12 Karbon ve azot kaynağı optimizasyonu.	58
5.13 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	61
5.14 pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi	62
5.15 Sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine etkisi	63
5.16 pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi.	64
5.17 Keratinazın molekül kütle tayini.	65
5.18 Keratinazın zimogram analizi.	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Keratinazların karakteristik özellikleri	8
2.2 Uygulama alanına göre küresel enzim market değerleri	15
2.3 Keratinazların bazı endüstriyel uygulama alanları	16
2.4 Keratinaz üreticisi mikroorganizmaların karakteristikleri.....	21
4.1 Tasarımın faktör ve seviyelerinin gösterimi	36
5.1 Tarama sonucunda zon/koloni çap oranına göre belirlenen izolatlar	44
5.2 İzolat M125 – 4 farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği..	51
5.3 M125-4 izolatının 16S rDNA kısmi dizisi	53
5.4 Üretim koşullarının optimizasyon sonuçlarının gösterilmesi	54
5.5 Tasarımın Varyans Analizi (ANOVA).....	55
5.6 Enzimin saflaştırma basamakları.....	60
5.7 Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi	67
5.8 Enzimin substrat seçiciliği.	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ACTINOCC	Aktinomiset kültür koleksiyonu
BOD	Biochemical oxygen demand
BRI	Bioresource International, Inc
BSA	Bovine serum albumin
CAGR	Compound annual growth rate
CCD	Central composite design
COD	Chemical oxygen demand
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid
FAO	Food and Agricultural Organization
IFPs	α keratin
KAPs	β keratin
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
pNA	p-nitroanalide
PrPc	Prion cellular form
PrPsc	Prion scrapie associated form
SDS	Sodium dodecyl sulfate
YYY	Yanıt yüzeyi yöntemi

Simgeler

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
BaCl_2	Baryum klorid
CaCl_2	Kalsiyum klorid
CaCO_3	Kalsiyum karbonat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
L	Litre
µmol	Mikromol
°C	Santigrat derece
kDa	Kilodalton
G	Guanin
C	Sitozin
A	Adenin
T	Timin
FeSO ₄	Demir sülfat
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Demir sülfat heptahidrat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
KCl	Potasyum klorid
kDa	Kilodalton
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
MnCl ₂ .4H ₂ O	Mangan klorid tetrahidrat
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	Disodyum fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorid
NaCO ₃	Sodyum karbonat
NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	Disodyum fosfat dihidrat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
ZnSO ₄	Çinko sülfat
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat

1. GİRİŞ

Dünya çapında ciddi miktarlarda keratin atığı ortaya çıkaran agroendüstri, faaliyetleri sonucunda; dünyada yaklaşık 5.6 milyon ton, ülkemizde ise yaklaşık 16.500 ton tavuk tüy atığı oluşturmaktadır. Açığa çıkan bu yan ürünün temel maddesi olan keratin; tripsin, pepsin gibi bilinen birçok proteaz grubu enzim tarafından parçalanamayan sıkı katlanmış bir proteindir.

Bu tür ürünlerin parçalanmasında rol oynayarak biyodönüşümü sağlayan mikrobiyal keratinazlar, son yıllarda biyoteknolojik olarak önem kazanmışlardır. Doğada her organizma tarafından sentezlenemeyen bu tür keratinolitik enzimleri bazı fungus, *Bacillus* sp. ve *Streptomyces* sp. türleri üretmektedir. Potansiyel kullanım alanı oldukça geniş olan keratinazlar yaygın olarak hayvancılık sektöründe kullanılırlar. Bunun yanında, deri endüstrisinde kıl gideriminde, deterjan, kozmetik, biyomedikal ve farmasötik sanayinde doğrudan katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Keratinazlar aracılığı ile elde edilen tüy unu, hayvan yemlerine ilave edilerek sindirimi kolaylaştırmada, beslenme kalitesini arttırmada ve organik tarımda doğal gübre kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, enzimin kısıtlı proteolitik aktivitesinden yararlanılıp proteinler yapısal olarak modifiye edilebilmekte ve çok daha kullanışlı hale getirilebilmektedir.

Tavukçuluk sektörü faaliyetleri sonucunda yüksek miktarlarda ortaya çıkan tüylerin, sisteme tekrar geri döndürülmesi ile önemli ekonomik kazançlar sağlanabilir. Günümüzde firmaların rekabet güçlerini arttırmaları, minimum atık üretmelerine ve oluşturdıkları yan ürünlerden yine kendi kullanabilecekleri veya yan sanayi dallarına pazarlayabilecekleri ürünleri elde etmelerine bağlıdır. Bu bağlamda, tavukçuluk sektörünün en önemli yan ürünü olan tavuk tüylerinin yine sektörün veya diğer alanların kullanabileceği katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Keratinöz yan ürünlerin değerlendirilmesinin her aşamasında katalizör olarak kullanılan keratinaz enzimi bu noktada dikkat çekmektedir. BCC Research (2007) tarafından yapılan araştırmaya göre; 2012 itibariyle keratinaz gibi enzimlerin yaygın olarak kullanıldığı hayvan yem enzim marketinin, en çok büyümeyi

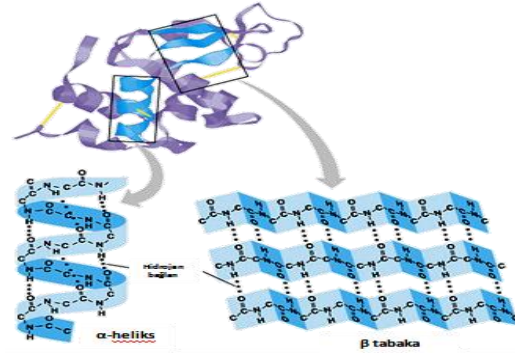
göstererek diğer endüstriyel enzim marketlerini geride bırakacağı öngörülmüştür. Yine aynı araştırmaya göre; 2007-2012 yılları arasında pazar payında en fazla çıkış yapacağı düşünülen enzimlerden biri olan keratinazın, yıl sonu itibari ile 375 milyon dolar market değerine sahip olması beklenmektedir. Bu nedenle, keratinaz enziminin farklı kaynaklardan üretim potansiyellerinin araştırılması ve karakteristik özelliklerinin aydınlatılması hem sanayi hemde Ar-Ge çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan tez çalışmasında, keratinaz üreten M125-4 aktinomiset izolatının istatistiksel olarak Yanıt yüzeyi yöntemi (YYY) kullanılarak, derin kültürde üretim optimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve üretilen enzimin kısmen saflaştırılıp karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Tez çalışması ile birçok sektörde kullanım potansiyeli bulunan keratinazın üretim optimizasyonunun yapılması, olası ileri ölçek büyütme çalışmalarına veri sağlamış olacaktır. Bununla birlikte *Streptomyces* genusu üyesinden elde edilen keratinazın temel bazı karakteristik özellikleri de belirlenmiş olacaktır. Şu ana kadar birçok farklı keratinaz tipi mikroorganizmalardan elde edilerek karakterize edilmiş ve bunların potansiyel endüstriyel uygulamaları araştırılmıştır. Bu çalışmayla sekonder metabolit üretiminde olduğu kadar ekstrasellüler enzim üretiminde de iyi birer aday olabilecek streptomisetlerin keratinaz üretimi açısından ne kadar ümit vaadedici adaylar oldukları belirlenmiş olacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Keratinöz Substratlar

Keratin, sistein aminoasitleri arasında disülfid çapraz bağlar içeren, yüksek kararlılık ve düşük çözünürlük gösteren bir protein tipidir. Kuşlarda, sürüngenlerde ve memelilerde bulunan keratin dokusu, insan ve hayvan derisinde korun tabakasının (stratum corneum) bir parçası iken kuş, sürüngen ve diğer memelilerde tüy, boynuz, toynak gibi dış iskelet yapılarını oluşturmaktadır (Zoccola et. al., 2009). Taşıdığı sülfür miktarına göre ‘sert’ ve ‘yumuşak’ olarak adlandırılan keratin, X ışın difraksiyon motifi olan α (α heliks) veya β (β tabaka) şeklinde yapılanmıştır (Şekil 2.1). Memelilerde bulunan keratinin tümü α tip iken, kuşlar ve sürüngenlerde hem α hem de β tip keratine rastlamak mümkündür (Friedrich and Kern 2003; Brandelli, 2005).

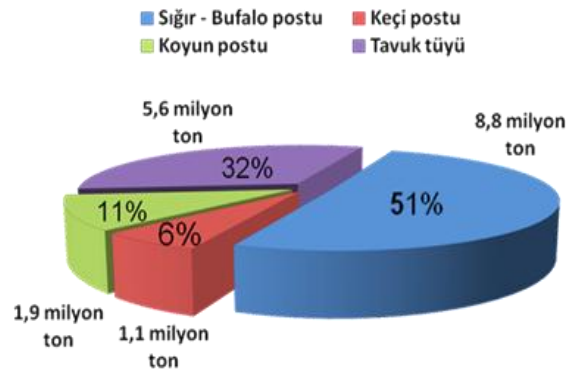


Şekil 2.1 α heliks ve β tabaka'nın şematik gösterimi.

Omurgalı boynuzsu proteinler iki grup altında incelenir. Birinci grup molekül kütlesi 40 – 70 kDa olan iplikçi proteinlerdir (α keratin / intermediate filament proteinler / IFPs) (Powell and Rogers, 1994; Coulombe and Omary, 2002). İkinci grup ise, 6 – 40 kDa molekül kütesine sahip keratin ilişkili proteinlerdir (β keratin / KAPs) (Powell and Rogers, 1994; Rogers et al., 2006). Bu proteinler α keratinin yapısında yer alan küçük proteinlerdir. Saç, tırnak, boynuz, yün gibi memelilerin sahip olduğu sert yapıdan farklı olarak, sürüngen ve kuş keratinositleri olan pul, tüy proteinleri β keratin olarak bilinir (Fraser et al., 1972; Brush, 1983). β keratin iplikçi proteinden; kompozisyon, kimyasal, fiziksel özellik ve polimerizasyon bakımından farklılık gösterir.

En çok glisin ve serin amino asitlerini içeren β keratin örneği olan tüy keratini, kovalent bağlar ve disülfid zincirler nedeniyle suda çözünmez. Genellikle disülfid bağlarının üre, guanidin hidroklorit, SDS (sodium dodecyl sulfate) gibi indirgen veya yükseltgen maddeler ile ayrılması sonucu çözünür hale getirilebilirler (Stevens, 1996). Yün % 95 oranında saf keratin içerir. β keratin tabakasına gömülmüş alfa heliks yapısı ile karakterize olan, iğ şeklindeki filamentöz proteinlerden oluşmuştur (Cardamone, 2010). Aynı zamanda bu yapı, glisin / tirozin miktarınca zenginliğiyle de bilinir. β keratinin içerdiği çoklu disülfid bağları, yapıyı kimyasal parçalanmaya karşı dirençli hale getirmiştir.

Çevre kirliliğine yol açan birçok sektörden biri olan agroendüstriyel sektör faaliyetleri sonucunda farklı keratinöz atıklar (tavuk tüyü, yün vb.) ortaya çıkarır. Gıda ve Tarım Örgütü (*Food and Agriculture Organization – FAO*)’nın 2009 verilerine göre, Dünya’da yaklaşık 17 milyon ton keratinöz atık açığa çıkmıştır (Şekil 2.2). Bu atığın % 51’ini büyükbaş hayvan postu oluştururken (8,8 milyon ton) % 32’sini tavukçuluk sektörünün faaliyetleri sonucu açığa çıkan tüyler oluşturmaktadır (5,6 milyon ton). Yüksek protein miktarı göz önünde bulundurulduğunda tüy ve yünler bir çok uygulama için büyük bir potansiyel teşkil etmektedir (Barone and Schmidt, 2005). Ancak çözünmeme özelliği, hayvan, bitki ve bilinen bir çok mikroorganizmanın enzimatik sindirimine karşı dirençli olması, tüy ve yünlerin katma değer bir ürün kaynağı olarak kullanımını son derece sınırlamaktadır.



Şekil 2.2 Keratinöz atık miktarı ve kompozisyonu.

Son zamanlarda, bu tür keratin atıklar üzerine bir çok çalışma yapılmış ve potansiyel kullanım alanları ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Bazı ülkelerde kümes hayvanlarından kesim sonrası elde edilen atık tüyler, tüy unu haline getirilerek hayvan yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Fakat Avrupa Birliği üyesi ülkelerde, deli dana hastalığı ve kuş gribi gibi enfeksiyöz hastalık tehlikelerinden dolayı, bu tür bir uygulama yapılmayıp tüyler bertaraf edilmektedir (Zoccola et al., 2009). Türkiye’de ise, kanatlı kesimhanelerinde açığa çıkan tüyler işlenerek hayvan yemi olarak kullanılmamakta, bunun yerine açığa çıkan diğer atıklar ile birlikte tüyler doğrudan tavuk unu üretiminde kullanılmaktadır (Aslantaş, 2004).

Bugün Dünya’da tüy unu üretiminde, *hidrotermal uygulama* veya *mikrobiyal keratinolizis*’den yararlanılmaktadır (Aslantaş, 2004). Genelde *hidrotermal uygulama* prosesi, ya yüksek sıcaklıkta yada yüksek basınçta ortama, seyrek hidroklorik asit gibi asitlerin veya sodyum hidroksit gibi tuzların konması ile gerçekleştirilmektedir. Tüyün fiziki yapısını bozmak için uygun sıcaklığa ve basınca ihtiyaç vardır. Eğer uygun olmayan bir basınç ve sıcaklıkta hidrolizasyon uygulanır ise, tüyler pişer ve protein kalitesi son derece düşük olur (Aslantaş, 2004). Bunun gibi kimyasal işlemler atık keratini daha sindirilebilir kılsada keratinin yapısındaki çeşitli amino asitlerin bozulmasına yol açtığından alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Papadopoulos et al., 1986).

Mikrobiyal keratinolizis ile tüylerin biyodegradasyonu, hidrotermal uygulamaya karşı alternatif bir yöntemdir. Mikrobiyal keratinolizis ile diğer metotların aksine, proses sonucunda ortamdan herhangi bir kimyasal uzaklaştırılması gerekmemektedir (Brandelli, 2008). Ayrıca yapılan çalışmalar, bu yol ile üretilen tüy ununun sindirilebilirliğinin ve içerdiği amino asit miktarının hidrotermal uygulama ile elde edilen ürüne göre çok daha iyi olduğunu göstermiştir (Cao et al. 2008; Syed et al. 2009). Mikrobiyal keratinolizis sonucu elde edilen tüy unu ile beslenen hayvanların gelişiminin, pozitif yönde etkilendiği de belirlenmiştir (Onifade et al., 1998). Ayrıca açığa çıkan son ürün (tüy unu) direkt mikrobiyal keratinaz ile muamele edildiğinden, prion kontaminasyonu ve dolaylı olarak deli dana hastalığı gibi enfeksiyöz hastalıklar açısından çok daha güvenli bir ürün açığa çıktığı göz önünde bulundurulmalıdır (Langeveld et al.

2003; Chen et al. 2005; Wang et al. 2005; Shih et al., 2006). Bütün bunların yanısıra, tüylerin biyodegradasyon sürekliliğinin sağlanması ile çöp fırınları ve kontrollü depolamanın önüne geçilebilecektir. Keratinolitik mikroorganizmaların kullanılması gibi, atık tüylerden faydalanmak için geliştirilen çevre ile daha uyumlu alternatif metotlar her ne kadar umut vaat eden teknolojiler olsa da, bazı kısıtlamaları ve dezavantajları da beraberinde getirmektedir (Manczinger et al., 2003). Mevcut durumda proste alkalın proteazların kullanılması engelleyen en büyük dezavantaj, enzim üretiminin pahalı olmasıdır. Bununla birlikte, mikroorganizmaların tersine enzimler kendilerini çoğaltamazlar ve zararlı ortamlarda uzun süre dayanıklılıklarını koruyamazlar. Bu nedenle sistemin sürekliliğini sağlamak amacı ile dışarıdan ortama devamlı enzim eklenmesi gerekir. Bu tür sistemlerde enzim değişiminin kontrol altında tutulması gereklidir (Manczinger et al., 2003). Bunların dışında atık tüylerin, toprağı örtmekte kullanılan filmler, polietilen ve biyobozunur plastiklerin yapısını destekleyici madde olarak kullanılması önerilmektedir (Brandelli, 2008).

Yün keratin atıkları, insan deri ve saç yapısına benzerliği nedeniyle, kozmetik ve doku mühendisliğinde hücre kültüvasyonu için sünger yapı iskeleleri oluşturulmak amacı ile kullanılmaktadır (Barba et al., 2008; Tachibana et al., 2005). Bununla beraber tekstilden biyomedikale kadar birçok değişik alanda potansiyel uygulama alanı bulunan alaşım nanofiber üretiminde de yün atığı kullanılmaktadır.

2.2. Keratinazlar

Keratinazlar, çözünmeyen keratin substratlarını parçalayabilme özelliğine sahip proteolitik enzimlerin özel bir sınıfını oluştururlar. Enzimin keratinöz substratları parçalama özelliğinin birçok endüstride uygulanabilirliği, son zamanlarda bu enzim ile ilgili yapılan çalışmalarda artışa yol açmıştır (Brandelli, 2008).

Mikrobiyal keratinazların özellikleri, üretici organizmanın özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu enzimler, genelde hücre dışı olarak üretilmekle beraber, hücre içi veya hücreye bağlı olarakta üretilmektedir.

(Gupta and Ramnani, 2006). Çoğu mikrobiyal keratinaz, pH 7,5 – 9 aralığında optimum çalışan nötral veya alkalın proteazdır. Bazı enzimler optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin yanı sıra, aşırı bazik veya az oranda asidik ortamlarda da çalışabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı keratinazların pH aralığının ne kadar geniş olabileceğini göstermiştir. Örneğin; *Nocardia* TOA – 1’den üretilen keratinazın optimum pH aralığı 1,5 ile 12 arasında değiştiği bulunmuştur (Mitsiuki et. al., 2002).

Günümüze kadar yapılmış çalışmalar keratinazların birkaç metalloproteaz dışında çoğunun serin proteaz olduğunu göstermiştir. Keratinolitik metalloproteaz üreticileri arasında Gram pozitif bakterilerin öne çıktığı görülmektedir. Bazı keratinazların genel özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir. Keratinazların molekül kütlesi 18 kDa ile 240 kDa arasında değişkenlik göstermekle beraber çoğu enzimin molekül kütlesi 50 kDa’nun altında bulunmuştur (Bkz. Çizelge 2.1). Keratinazların büyük bir kısmı monomerik olmasına rağmen multimerik keratinazlar da rapor edilmiştir (Nam et. al., 2002; Xie et. al., 2010).

Keratinazların optimum çalışma sıcaklığı da değişkenlik gösterir (Bkz. Çizelge 2.1). Termofilik bir mikroorganizmadan elde edilen keratinaz 80°C’de maksimum aktive gösterirken mezofilik bir mikroorganizmadan elde edilen keratinaz 40°C’de maksimum aktivite gösterir. Optimum çalışma sıcaklığı 100°C olan ve *Fervidobacterium islandicum* AW-1 suşundan üretilmiş değişik keratinazlar da rapor edilmiştir (Nam et al. 2002).

Keratinolitik aktivite üzerine yapılan çalışmalar, ortamda Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi divalent metal iyonlarının varlığının aktiviteyi arttırdığını göstermiştir. Bu pozitif etkinin, enzim aktif yapısı veya enzim – substrat yapısının kararlılığına bağlı olduğu düşünülmektedir (Farag and Hassan, 2004; Suntornsuk et. al., 2005; Cao et. al., 2009). Ayrıca metal iyonlarının enzimi ısı denatürasyona karşı koruyabileceği de düşünülmektedir (Bressoiler et. al., 1999; Kublanov et. al., 2009). Diğer yandan Cu^{+2} , Ag^{+} , Hg^{+2} ve Pb^{+2} gibi ağır metallerin ise aktiviteyi inhibe ettiği bildirilmiştir.

Çizelge 2.1 Keratinazların karakteristik özellikleri (Brandelli et al, 2010).

Mikroorganizma	Katalitik tip	Moleküler kütle (kDa)	Optimum pH	Optimum sıcaklık (T°)	Kaynak
<i>B. cereus</i> DCUW	Serin	80	8.5	50	Ghosh et al. 2008
<i>B. licheniformis</i> FK14	Serin	35	8.5	60	Suntornsuk et al. 2005
<i>B. licheniformis</i> K-508	Thiol	42	8.5	52	Rozs et al. 2001
<i>B. licheniformis</i> MSK103	Serin	26	9 – 10	60 – 70	Yoshioka et al. 2007
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Serin	33	7.5	50	Lin et al. 1992
<i>B. licheniformis</i> RPK	Serin	32	9.0	60	Fakhfakh et al. 2009
<i>B. pumilis</i>	Serin	65	8.0	65	Kumar et al. 2008
<i>B. subtilis</i> KS-1	Serin	25.4	7.5	-	Suh and Lee 2001
<i>B. subtilis</i> MTCC (9102)	Metallo	69	6.0	40	Balaji et al. 2008
<i>B. licheniformis</i> RPK	Serin	32	9.0	60	Fakhfakh et al. 2009
<i>B. subtilis</i> RM-01	Serin	20	9.0	45	Rai et al. 2009
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	28.7	8.0	55	Ionata et al. 2008
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metallo	64	8.5	50	Riffel et al. 2007
<i>C. indologenes</i> TKU014	Metallo	P1: 56	P1: 10	P1: 30 – 50	Wang et al. 2008
	Metallo	P2:40	P2: 7 – 8	P2: 40	
	Metallo	P3: 40	P3: 8 – 9	P3: 40 – 50	
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Serin	130	10	80	Friedrich et. al., 1996
<i>F. islandicum</i> AW1	Serin	> 200	9.0	100	Nam et al. 2002
<i>Kocuria rosea</i>	Serin	240	10	40	Bernal et al. 2006
<i>Kytococcus sedentarius</i>	Serin	30 – 50	7.0 – 7.5	40 - 50	Longshaw et al. 2002
<i>Lysobacter</i> sp. NCIMB 9497	Metallo	148	-	50	Allpress et. al., 2002

<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metallo	42	7.5	50	Thys and Brandelli et al., 2006
<i>Nesternkonia</i> sp. AL-20	Serin	23	10	70	Gessesse et al. 2003
<i>Nocardiopsis</i> sp. TOA-1	Serin	20	1.5 - 12.5	60	Mitsuiki et al. 2004
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Serin	35	7.8	40	Cao et al. 2009
<i>Streptomyces</i> sp. S7	Serin-Metallo	44	11	45	Tatineni et al. 2008
<i>Streptomyces</i> sp. strain 16	Serin	KI: 203	KI: 9	KI: 50	Xie et al. 2010
	Serin	KII: 100	KII: 9	KII: 50	
	Serin	KIII: 31	KIII: 9	KIII: 50	
	Serin	KIV: 19	KIV: 9	KIV: 60	
<i>S. albidoflavus</i>	Serin	18	6.0 – 9.0	40 - 70	Bressollier et al. 1999
<i>S. pactum</i>	Serin	30	7 – 10	40 – 75	Böckle et al. 1995
<i>S. gulbagensis</i> DAS 131	-	46	9	45	Syed et al. 2009
<i>S. thermoviolaceus</i>	-	40	8.0	55	Chitte et al. 1999
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. 1004-09	Serin	150	9.3	60	Kublanov et al. 2009
<i>T. keratinophilus</i>	Serin	135	8.0	85	Riessen et. al., 2001
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Serin	36	8.0	60	De Toni et al. 2002
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Serin	-	6.5 – 9.0	45	Santos et al. 1996
<i>Aspergillus oryzae</i>	Metallo	60	8.0	50	Farag and Hassan 2004
<i>Doratomyces microsporum</i>	Serin	30	8.0 – 9.0	50	Gradisar et al. 2005
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Serin	22	8.3	37	Moreira-Gasparin et al. 2009
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Serin	33	8.0	60 - 65	Gradisar et al. 2005
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Serin	36	8.0	40	Anbu et al. 2005
<i>Trichoderma atroviride</i> F6	Serin	21	8.0 – 9.0	50 – 60	Cao et al. 2008

2.2.1. Keratinazların yapısal ve katalitik özellikleri

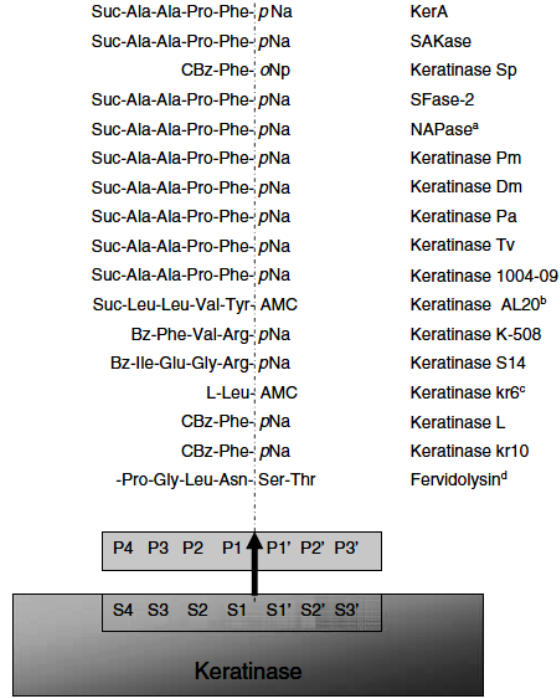
Keratinazlar diğer proteazlar ile karşılaştırıldığında, serin veya metallo aktif bölgeye sahip olmaları ve optimum pH değerleri nötralden alkaliye değişkenlik göstermesi nedeni ile proteazların subtilisin ailesine dahil oldukları düşünülmüştür. Daha sonra yapılan ayrıntılı araştırmalar, keratinazların N – terminal amino asit dizisinin subtilisin ailesi ile % 98 oranında homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur. Lin ve arkadaşlarının (1995) yaptığı çalışmada; incelenen mikrobiyal keratinazın, subtilisin Carlsberg ile % 99 homolojiye, subtilisin E, NAT, BPN ve J ile % 65 homolojiye, *Bacillus pumilis* proteaz ile % 64 homolojiye, proteinaz K ve fervidolisin ile % 30 homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir. Katalitik üçlü (Asp, His, Ser) hem subtilisin hemde keratinazda iyi korunmuştur.

Çoğu keratinaz spesifik substrat ve inhibitörler aracılığı ile belirlenmiş serin tip proteazdır. *Nocardiopsis* sp.’den üretilen bir keratinaz olan NAPase’ın P1 özgülüğü, 11 adet sentetik pNA (p – nitroanilide) substratı kullanılarak belirlenmiştir (Mitsuiki et. al. 2004). Keratinolitik *B. licheniformis* K-508, PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) tarafından inhibe edilmeyen ve benzoyl – Phe – Val – Arg – pNA üzerinde güçlü aktivite gösteren sıradışı bir keratinaz üretmektedir (Rozs et. al., 2001). *S. pactum* DSM 40530’dan üretilen keratinolitik serin proteazın, lizin ve arginin amino asitlerini içeren pNA çeşitlerine seçiciliği varken benzoyl – D – Arg – pNA üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (Böckle et. al., 1995).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, keratinolitik metalloproteazlar hakkında bilinenleri arttırmıştır. Allpress’e (2002) göre; *Lysobacter*’den elde edilen keratinolitik metalloproteaz carboxybenzoyl – Phe – pNA üzerinde çok güçlü bir etki göstermiştir. Gram negatif bir bakteri olan *Chryseobacterium* sp. kr6 tarafından üretilen ve EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 1,10 - phenanthroline tarafından inhibe edilen keratinaz, benzoyl – L – Arg – pNA substratını hidrolize edemediğinden metalloproteaz grubuna dahil olduğu belirlenmiştir (Riffel et. al., 2003). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, Gram-

negatif bakterilerden üretilen keratinazların genelde, Ca^{+2} ile aktive olduğunu göstermiştir (Sangali and Brandelli, 2000).

Katalitik tipten bağımsız olarak bakıldığında enzimin, hidrofobik ve aromatik amino asit uçları tercihen P1 pozisyonundan kestiği görülmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Bazı keratinazların substrat özgüllükleri. Ker A, *B. licheniformis* PWD – 1 (Evans et al., 2000); keratinase K – 208, *B. licheniformis* (Rozs et al, 2001); keratinase S14, *B. subtilis* (Macedo et al., 2008); SAKase, *S. albidoflavus* K₁₋₀₂ (Bressollier et al, 1999); keratinase Sp, *S. pactum* (Böckle et al., 1995); Sfase – 2, *S. fradiae* ATCC 14544 (Kitadokoro et al., 1994); keratinase AL20, *Nesterenkonia* sp. (Bakhtiar et al., 2005); NAPase, *Nocardiosis* sp. (Mitsuiki et al., 2004); keratinase Pm, *P. marquandii* ve keratinase Dm, *D. microsporus* (Gradisar et al., 2005); keratinase Tv, *Trichophyton vanbreuseghemii* (Moallaei et al., 2006); keratinase 1004-09, *Thermoanaerobacter* sp. (Kublanov et al., 2009); keratinase kr6, *Chryseobacterium* sp. (Silveira et al., 2009); keratinase L, *Lysobacter* sp. (Allpress et al., 2002); keratinase kr10, *Microbacterium* sp. kr10 (Thys and Brandelli, 2006); keratinase Pa, *P. aeruginosa* (Lin et al., 2009) ve fervidolysin, *F. pennivorans* (Kluskens et al., 2002). a: Enzimin Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNa sentetik substratına olan afinitesi de yüksek; b: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik substratında da enzimin spesifik aktivitesi yüksek; c: N-t-Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC senetik substratında da enzimin aktivitesi yüksek; d: enzimin katalitik bölgesinin 3D modellemesinden elde edilen bilgi (Kluskens et al., 2002).

Keratinazın keratinöz substratlar üzerindeki özgüllüğü, keratinin amino asit kompozisyonuna göre değişkenlik gösterir. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, P1 pozisyonunda Arg bulunması sadece bazı *Bacillus* sp. ve *Chryseobacterium* sp. türleri tarafından tercih edilmektedir.

Keratinolitik proteazların doğal ve sıkı substratları hidroliz etme yeteneklerinin, enzimin aktif bir bölgeye sahip olup substrata spesifik bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Böckle et al. 1995). *B. cereus* DCUW'dan elde edilmiş Vpr proteazın C – terminal ucunun, kuş tüyü gibi spesifik substratlara protein – protein etkileşimi ile non kovalent bağlanma yeteneği olduğu belirlenmiştir (Ghosh et al. 2009). Yapılmış çalışmalarda, keratinazın fibröz keratine olan adsorbsiyonunun elektrostatik etkileşimler ile olduğu da gösterilmiştir (Bressollier et al. 1999).

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen keratin hidrolizi, keratinolitik proteaz üretimi ile eş tutulamaz. Keratinöz materyal üzerinde meydana gelen mikrobiyal büyüme, etkin keratin parçalanması için gerekli olan disülfid bağlarının azalmasına neden olur (Cao et. al., 2008). Hücre içi veya hücre dışı disülfid redüktaz üretiminde, sülfid, tiyosülfat açığa çıkması ve hücre bağımlı redoks sisteminin bulunması sülfitolizisin varlığına işaret eder (Kumar et. al. 2008; Ramnani and Gupta, 2007). Funguslarda keratinolizis süreci sülfitolizisin yanı sıra keratinöz substrata fungusun miseliyal baskısı ile tutunma etkisini de içerir (Moreira et. al., 2007). Keratinolitik proteazların karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar, enzimin saflaştırma aşamasında disülfid bağlarının parçalanması için gerekli komponentlerin ortadan kaldırılabilceğini ortaya çıkarmıştır (Cao et. al., 2008). Bu yüzden keratinolizis prosesinin birkaç aşamadan oluştuğu düşünülmektedir.

2.2.2. Mikrobiyal keratinolizis

Mikrobiyal keratinolizis, keratinin parçalanmasına neden olan proteolitik bir prosestir. Karakterize edilmiş çoğu keratinolitik enzimin proteazlar gibi davrandığı ve keratin üzerine etki ettiği bilinmektedir. Günümüze kadar yapılan

alışmalar mikrobiyal keratinolizisin; mekanik keratinolizis, slfitolizis ve proteolizis olmak üzere 3 aşamadan oluştuğunu göstermiştir.

2.2.2.1. Mekanik keratinolizis

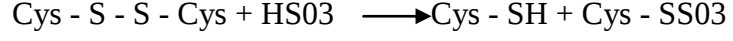
Bu mekanizma sadece funguslar ve aktinomisetler gibi miseliyal yapıya sahip keratin parçalayan bazı mikroorganizmalarda görülür. Malviya'ya (1992) göre, keratin parçalanması miseliyal büyüme ile orantılı olarak anlamlı bir hücre dışı keratinaz aktivitesi ölçülmeden başlamaktadır. Fungal miseliyal büyüme ve uzama, sert ve sıkı bir yapıda bulunan çözünmeyen substratı aşınmaya uğratır. Fungal invazyon hem mekanik basıncı hem de enzimatik hidrolizi tetikler. Figueras'ın (1997) yaptığı çalışmada, fungusun sa teline dikey tutunmasının yapı üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak görüntülenmiştir. Misel tarafından yapılan mekanik penetrasyonun, peptit bağlarının enzimatik kesimi için daha aktif bölgelerin ortaya çıkması için gerekli olabileceği düşünülmektedir. Varolan kanıtlar, enzimatik hidrolizden önce mekanik keratinolizisin meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca, mekanik ve enzimatik hidroliz arasında bir etkileşim olduğu da bilinmektedir.

2.2.2.2. Slfitolizis

Slfitolizis, karakteristik olarak tyde varolan yüksek sistein miktarı nedeni ile ortaya çıkmaktadır. Tüyün içeriğinde bulunan amino asit profilinde sisteinin fazla bulunması, sistein disülfid köprüleri nedeni ile tüye katı bir biyomoleküler yapılanma sağlamaktadır. Çoğu araştırmacı, keratin yıkılımının olası mekanizmalarından biri olan disülfid bağlarının indirgenmesi sorunu ile yüzyüze gelmiştir. Fakat, bu görüşü destekleyen çalışmalar yetersiz olsa da keratin hidrolizinin sadece disülfid bağların yıkılımından sonra başarıya ulaştığı ile ilgili ortak bir görüş mevcuttur.

Kunert'a (1992) göre, dermatofitler ve non – dermatofitler sülfür ve azot kaynağı olarak serbest veya bağlı sisteini metabolize edebilmektedir. Fungus sistein metabolizması tarafından meydana getirilen ürünler inorganik sülfür ve diğer ara ürünlerden oluşmaktadır. Kunert (1992), besiortamında artan sülfür

miktarının ortamda oksitlenerek sülfat ve sülfid formunda bulunduğunu göstermiştir. Aşağıdaki eşitlikte de gösterildiği gibi sülfid nötral ve alkali pH'da, sistein ve S – sülfosistein meydana getirir (Kunert, 1992).



Kunert'e (1992) göre, bu reaksiyon keratin gibi sistein içeren proteinlerde de gerçekleşerek keratinazların keratini denatüre etmesini sağlar. Ortamda daha sonra oluşan sülfosistein, tiyosülfat, sülfat, sistein gibi sülfidolizis peptid ürünlerinin de varlığı disülfid bağlarının parçalanmasını kanıtlar niteliktedir. Bununla birlikte çoğu araştırmacı, kültür ortamında ara bileşiklere rastlamamıştır. Tespit edilemeyecek kadar az miktarda bulunan ara bileşikler, bir sülfür kaynağı olarak sisteinin öncelikli olarak metabolize edildiği anlamına gelir. Kunert (1992), beş adet indirgeyici ajanın (sodyum sülfid, sistein, glutatyon, merkaptotanol, ditiyotreitol) *Microsporium gypseum*'un fungal proteaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, sodyum sülfid 30 mmol^{-1} (3.78 mg ml^{-1}) derişimde proteaz aktivitesini yaklaşık 2.9 kat arttırmıştır. Sistein, merkaptotanol ve glutatyonun $0.3 - 1.0 \text{ mmol}$ derişimde etki gösterdikleri belirlenirken sodyum sülfite göre daha az uyarıcı oldukları görülmüştür. İndirgeyici ajanlar arasında en zayıfının ditiyotreitol olduğu belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, DDT'nin bir bakteriyal proteinaz karışımında ve saf keratinazda keratinolitik aktivite üzerine katalitik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Böckle et. al., 1995).

2.2.2.3. Proteolizis

Keratinolizis aşamasında gerçekleşen proteolizis her ne kadar basit gibi gözüксе de, keratinazın farklı moleküler kütle, aktivitelere, optimal çevre koşullarına sahip olması nedeni ile protein yıkılım aşaması ile ilgili bugüne kadar yeterli bilgi elde edilememiştir. Aslında, sülfidolize keratinin spesifik olmayan proteazlar tarafından parçalanma kapasitesi, keratinazların spesifitesini anlaşılmaz hale getirmektedir. Selüloz, kitin ve diğer polisakkaritler gibi kompleks organik ürünlerin mikrobiyal metabolizmasında bu tür tutarsızlıklar ile sıklıkla karşılaşmaktadır. Buna rağmen, diğer proteazlar ile karşılaştırıldığında

keratinazların sürekli artan, yüksek proteoliz kapasiteleri onlara ayırdedici bir özellik sağladığı söylenebilir (Lin et. al., 1992).

2.2.3. Keratinazların küresel piyasa değeri

Bugün biyoteknolojik proseslerin temelini oluşturan endüstriyel enzimler; birçok yeni ürünün elde edilmesinde, varolan ürünlerin ve biyoteknolojik proseslerin geliştirilip iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ‘BCC Research’ tarafından yapılan araştırma, endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki ticari uygulama alanlarını ve market değerlerini ortaya çıkarmıştır (BCC Research, 2011). Açıklanan yeni teknik analiz, endüstriyel enzimlerin market değerinin 2007’de 2.3 milyar dolar olduğunu ve % 4’lük bir büyüme göstererek 2012’de 2.7 milyar dolara yükselebileceğini açığa çıkarmıştır (Çizelge 2.2).

Endüstriyel enzim marketi teknik, gıda ve hayvan yem enzimleri olmak üzere 3 ana bölüme ayrılmaktadır. Marketin % 50’sinden fazlasını oluşturan teknik enzimler 2007’de, 1.1 milyar dolarlık bir değere sahipken 2012 itibariyle bu rakamın % 3.5’lik CAGR (compound annual growth rate) ile 1.4 milyar dolara yükselmesi beklenmektedir. 2007 – 2012 yılları arasında en fazla büyümenin % 6’lık CAGR ile hayvan yem enzimleri sektöründe olması tahmin edilmektedir. Keratinaz gibi enzimlerin yaygın olarak kullanıldığı hayvan yem enzim sektörünün 2007’deki market değeri 280 milyon dolarken 2012’de 375 milyon dolara yükselmesi beklenmektedir. Bu sektördeki en büyük büyümenin, fosfat kirliliğini önlemek amacı ile kullanılacak olan fitaz enzimi ve hayvan yem kalitesini arttırmak amacı ile kullanılacak olan keratinaz enzimi tarafından getirileceği düşünülmektedir.

Çizelge 2.2 Uygulama alanına göre küresel enzim market değerleri (milyon dolar)

Uygulama alanı	2005	2006	2007	2012	CAGR % (2007 – 2012)
Teknik enzimler	1.075	1.105	1.140	1.355	3.5
Gıda enzimleri	775	800	830	1.010	4.0
Hayvan Yem enzimleri	240	260	280	375	6.0
Toplam	2.090	2.165	2.250	2.740	4.0

Yaptığımız çalışmalar keratinazın, sadece birkaç firma tarafından ticarileştirildiğini göstermiştir. Bunlardan biri olan Proteos biotech firması, *Bacillus licheniformis* (PWD)'ten *E.coli*'ye ilgili gen bölgesini aktararak enzim üretimini sağlamış ve enzimin ticarileşme yolunu açmıştır. Thailand's Agricultural Research Development Agency (ARDA) ve Betagro işbirliği ile tavuk sindirimini kolaylaştırması amacı ile yem olarak tavuk tüylerine eklenen *VersazymeTM*, ticarileştirilmiş keratinazlara bir başka örnektir. .

2.3. Mikrobiyal Keratinazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Mikrobiyal keratinazlara olan ilgi, özellikle enzimin tarım, gıda, deri, farmasötik gibi sektörlerde endüstriyel uygulama alanı bulması nedeni ile son yıllarda giderek artmaktadır (Çizelge 2.3). Günümüzde keratinazlar en çok kümes hayvanları sektörüne; besin değeri yüksek, ekonomik, çevre dostu tüy unu hazırlamakta kullanılmaktadır. Keratinazlar, diğer kullanım alanlarında ticarileştirilmeden önce, üzerinde daha kapsamlı araştırmalar yapılması gereklidir.

Çizelge 2.3 Keratinazların bazı endüstriyel uygulama alanları

Kullanım alanı	Uygulamalar
Agroendüstri	Yem hidrolizatlarının üretimi
	Yem destek maddesi
	Entomopatojenlerin üretim substratlarının hazırlanması
	Azotlu gübre üretimi
Farmasötik/ Biyomedikal	Prion hidrolizi
	İlaç taşınımı
	Dermatolojik uygulamalar
	Kozmetik
Endüstri	Deri tabaklama (deri endüstrisi)
	Fiber modifikasyonu (tekstil endüstrisi)
	Deterjan sanayi
	Protein yapısının modifikasyonu (gıda endüstrisi)
	Biyopolimer (film, kaplama, yapışkan)
Biyoenjerji	Atık su arıtımı
	Metan veya biyohidrojen üretimi için keratinöz atıkların biyodönüşümü

2.3.1. Agroendüstri

2.3.1.1. Besin kaynağı olarak tüy unu

Son birkaç yıl öncesine kadar tüyler, hayvan yem katkı maddesi olarak kullanılmak üzere yüksek sıcaklık ve basınçta pişirilerek tüy unu haline getirilmekteydi. Fakat son yıllarda, hidrotermal muamelenin hem pahalı olması hemde tüyün yapısındaki esansiyal amino asitleri yok ederek daha az sindirilebilir bir ürün ortaya çıkarması nedeni ile araştırmacılar yeni arayışlar içine girmiştir (Wang and Parsons, 1997). Bugün Dünya’da yapılan birçok araştırma ortaya çıkarmıştırki; atık tüyden tüy unu elde etmede keratinolitik mikroorganizmaların kullanılması hidrotermal muamelenin getirdiği dezavantajları büyük ölçüde azaltmaktadır (Onifade et.al., 1998).

Proses sonucunda elde edilen tüy unu nispeten ucuzdur ve valin, treonin gibi esansiyal amino asit miktarınca zengindir. Ayrıca saf enzim, besin katkı maddesi olarak kullanılarak etlik piliç üretim performansını önemli derecede artırır (Odetallah et. al., 2003). Fermentasyon, hem ortamda bulunan metiyonin, lizin, arginin gibi esansiyal amino asitlerin miktarını artırırken hemde oluşan mikrobiyal biyokütle zengin bir protein kaynağı oluşturmaktadır. *B. licheniformis* PWD1’den üretilen tüy lizatları ile beslenen tavukların gelişim grafiklerinin, standart soya küspesi ile elde edilen grafiklerden çok daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Williams et. al., 1990). Başlangıçta tüy lizatlarının üretimi için gerekli olan keratinaz PWD1 miktarını sağlayabilmek için 150 L’lik fermentörde üretim yapılmıştır (Wang and Shih, 1999). Daha sonra, hayvan yem endüstrisinin talebini karşılayabilmek amacı ile enzimin biyoimmobilizasyonu ve klonlanarak üretilmesi yollarına başvurulmuştur (Wang et. al., 2003). Keratinaz PWD1 üretim teknolojisi BRI – Bioresource International, Inc. tarafından lisanslanmış ve *Versazyme* ticari adı altında satışa sunulmuştur.

2.3.1.2. Gübre kaynağı olarak tüy unu

Kümes hayvanlarını beslemek amacı ile üretilen protein miktarınca zengin tüy unu aynı zamanda yavaş salınımlı gübre kaynağı olarakta kullanılabilir (Choi and Nelson, 1996). Organik tarımın temeli, topraktaki mikrobiyal aktiviteyi ve bitki büyümesini arttıran azotça zengin organik gübrelemeye dayanmaktadır. Geleneksel olarak, doğal gübre organik tarımda yaygın bir oranda kullanılmaktadır. Fakat doğal gübre pahalı olduğu için yeni alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Tüy unu ekonomik olması, kolay elde edilebilmesi ve içeriğinde bulunan % 15 azot ile zengin bir azot kaynağı olması nedeni ile doğal gübrenin yerini almaya adaydır. Tüy unu bir yandan mikrobiyal ve bitki büyümesini sağlarken aynı zamanda toprağın yapısını yeniden şekillendirerek su tutma kapasitesini arttırmaktadır.

2.3.2. Film ve yapışkan yapımı için yarı hidrolize keratin

Son yıllarda saç, tüy, hayvan kürkü, boynuzu gibi keratinöz atıklardan biyobozulabilir film, kaplama ve yapışkan üretimine olan ilgi giderek artmaktadır (Schrooyen and Radulf, 2004). Keratin, kimyasal olarak modifiye edilerek bu tür uygulamalar için stabil ürün üretmek amacı ile kullanılır. Alternatif olarak keratinin hidroliz kontrolü çevre dostu bir teknoloji olan keratinaz kullanılarak ta yapılabilir.

2.3.3. Deterjan endüstrisi

Geçmişten bugüne, proteolitik enzimler deterjan piyasasına her zaman hakim olmuşlardır. Deterjan endüstrisinde kullanılan enzimlerin % 89'unu alkalın proteazlar oluşturmaktadır. En büyük tedarikçi Novo Nordisk and Genencor International'dır (Gupta et. al., 2002). Bununla birlikte piyasa her zaman yeni özelliklere sahip daha iyi enzimlere ihtiyaç duyar. Keratinazların tüy gibi çözünmeyen, katı substratlara bağlanıp hidrolize edebilme özellikleri olduğundan deterjan endüstrisinde ön plana çıkmaktadırlar. Bu özellik deterjan endüstrisi için önemlidir. Çünkü endüstrinin katı yüzeylere tutunmuş proteinler üzerine etki eden enzimlere ihtiyacı vardır. Ayrıca keratinazlar birçok proteazın çıkaramadığı

gömlek yakalarındaki lekeler gibi inatçı lekeleri çıkartmada kullanılabilmektedirler (Gassesse et. al., 2003). Bunlar ile birlikte keratinöz atıklar ile tıkanmış boruların temizlenmesinde de keratinazlardan faydalanılmaktadır.

2.3.4. Prion proteininin parçalanması

Prion; sığırlarda deli dana hastalığı olarak bilinen sığır süngerimsi ensefalopitiye, insanlarda ise ölümcül nörodejeneratif süngerimsi ensefalopati (TSE)'ye neden olan protein yapısında bir partiküldür. Prion ile enfeksiyon zararsız PrPc'nin (cellular form), enfeksiyöz PrPsc'ye (scrapie associated form) dönüşmesi ile gerçekleşir. β – keratine zengin PrPsc formu, demansa neden olan kümeler meydana getirir (Musahl and Aguzzi, 2000). BRI'da çalışan Langeveld ve arkadaşları (2003) geniş spektrumlu keratinaz PWD1 (Versazyme)'in prionları süngerimsi ensefalopatik sığır beyinde başarı ile parçalayabildiğini gözlemlemişlerdir. Prionların enzimatik parçalanması özellikle Avrupa Birliği'nde çok tartışmaya neden olan hayvansal lizatların tekrar hayvan yemi olarak kullanılmasını yeniden teşvik edebilecektir. Ayrıca keratinaz PWD1 ile prion kontaminasyonundan şüphelenilen medikal alet ve ekipmanların (kontakt lens, dişçilik aletleri) dezenfekte edilebileceği de belirtilmiştir (Langeveld et. al., 2003).

2.3.5. Deri endüstrisi

Deri imalat teknolojisi bir dizi işlemten oluşur. Bu işlemler arasında ön tabaklama, tüm üretim aşamalarının neden olduğu kirliliğin % 70'ini oluşturan en çok kirliliğe neden olan aşamaları içerir. Ön tabaklama işlemi sonucunda açığa çıkan sodyum sülfid, kireç ve katı atıklar, toplam katı atık miktarında, biyokimyasal oksijen (BOD – biochemical oxygen demand) ve kimyasal oksijen (COD – chemical oxygen demand) isteğinde artışa neden olmaktadır (Thanikaivelan et. al., 2004). Biyokatalitik deri işleme prosesinde proteaz, lipaz gibi enzimler ön tabaklama işleminin değişik kısımlarında kullanılmıştır. Keratinolitik proteazlar, kollajenolitik aktivite göstermemeleri ve az elastolitik aktiviteye sahip olmaları nedeni ile kıl giderim çalışmalarında gösterdikleri etkinlik geniş bir biçimde araştırılmıştır. Enzim, folikül içindeki keratin dokusuna

seçici olarak etki ederek derinin gerilme direnci değişmeden istenmeyen kıllar uzaklaştırılabilmektedir (Macedo et. al., 2005). Yapılan birkaç çalışmada keratinazın aynı zamanda depilasyon ajanı olarak kullanılabileceği de gösterilmiştir (Letourneau et. al., 1998; Bressollier et. al., 1999; Allpress et. al., 2002; Friedrich and Kern, 2003). *B. subtilis* S14'ten üretilen keratinazın toksik sodyum sülfide olan ihtiyacı tamamen ortadan kaldıracığı rapor edilmiştir (Macedo et. al., 2005). Böylece BOD'nin artışına neden olan sülfid kullanılan kıl giderim prosesinin yerini keratinaz bazlı kıl giderimi alabilir.

2.3.6. Diğer uygulamalar

Keratinazın kısıtlı proteolitik aktivitesinden yararlanılıp proteinler yapısal olarak modifiye edilerek emülsüfikasyon, çözünürlük veya jelatinimsi özelliklerinde değişimler meydana getirilebilir. Ayrıca, keratince zengin endüstriyel atıklar, sivrisinek öldürücü toksin üretmek üzere entomopatojenik bakterilerin substratı olarak kullanılabilir. Keratin hidrolizatları ısınma ihtiyacını karşılamak üzere metan gazına ve yakacak substratlara dönüştürülebilirler. (Ichida et al. 2001). Bununla birlikte biyohidrojen üretimi için de kullanılabilirler. (Bálint et al. 2005). Biyomedikal, farmasötik ve kozmetik endüstrisinde; keratinaz, sedef hastalığında ve aknelerde bulunan keratinin uzaklaştırılmasında, nasır ve keratinize derinin eliminasyonunda, dermatofit tedavisi için aşı hazırlanmasında, tırnak ile ilgili ilaç geliştirilmesinde kullanılabilir (Gradisar et al. 2005; Mohorcic et al. 2007).

2.4. Keratinolitik Mikroorganizmalar

Keratinazlar, mikrobiyal dünyada yaygın olarak görülen enzimlerdir. Keratinolitik mikroorganizmalar, Antartika'dan sıcak kaplıcalara, aerobik bölgelerden anaerobik bölgelere kadar birçok değişik çevresel koşuldan izole edilmişlerdir. Bu yüzden mikrobiyal keratinazların biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri türden türe değişkenlik göstermektedir. Keratinaz üreticisi olarak *Aspergillus* sp., *Rhizomucor* sp. (Friedrich et al., 1999), *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton gallinae*, *Microsporum gypseum* (Wawrzkievicz et al., 1991), *Vibrio* sp. strain kr2 (Sangali and

Brandelli, 2000), *Microbacterium* (Thys et al., 2004), *Bacillus licheniformis* (Lin et al., 1992) gibi çeşitli bakteri ve fungus türlerinin yanı sıra *S. pactum*, *S. albus*, *S. thermoviolaceus*, ve *S. albidoflavus* gibi *Streptomyces* cinsi Aktinomisetler de (Bressollier et al.,1999; Bockle et al., 1995; Chitte et al., 1999) belirlenmiştir. Bazı mikrobiyal keratinaz üreticisi mikroorganizmaların karakteristikleri Çizelge 2.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4 Bazı mikrobiyal keratinaz üreticisi mikroorganizmaların karakteristikleri

Bakteriyal izolat	Orjin	Kaynak
Gram pozitif		
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Tavuk çiftlik atığı	Williams et al., 1990
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Toprak	Macedo et al., 2005
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , ve <i>Bacillus cereus</i>	Tavuk çiftlik atığı	Kim et al., 2001
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Bazik soda gölü	Gessesse et al., 2003
<i>Bacillus macroides</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Kuru çayır toprağı	Lucas et al., 2003
<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	Kültür koleksiyonu	Böckle et al., 1995
<i>Streptomyces albidoflavus</i> K ₁₋₀₂	Kümes toprağı	Bressollier et al., 1999
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Toprak	Chitte et al., 1999
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Kaplıca	Friedrich and Antranikian, 1996
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Çürüyen tavuk tüyü	Thys et al., 2004
<i>Microbispora aerate</i> , <i>S. flavus</i>	Antarktik toprağı	Gushterova et al., 2005
<i>Kocuria rosea</i>	Toprak	Bernal et al., 2006
Gram negatif		
<i>Vibrio</i> sp. kr2	Tavuk çiftlik atığı	Sangali and Brandelli, 2000
<i>Lysobacter</i> sp. NCIMB 9497	Kültür koleksiyonu	Allpress et al., 2002
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Geyik postu	Yamamura et al., 2002
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Çürüyen tavuk tüyü	Riffel et al., 2003
<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Janthinobacterium</i> <i>lividum</i>	Kuru çayır toprağı	Lucas et al., 2003

2.4.1. Aktinomisetler ve *Streptomyces* sp.

Aktinomiset teriminin kökeni; aktis (ışık demeti) ve mykes (mantar) kelimelerine dayanmaktadır. Aktinomisetler gram pozitif, iplikli, yüksek G + C oranına sahip büyük bir grup bakteriden oluşur. Doğada toprak, tatlı su ve denizel çevrelerde yaygın olarak bulunurlar. Selüloz, kitin gibi diğer birçok mikroorganizma tarafından metabolize edilemeyen organik materyalleri, sahip oldukları ekstraselüler enzimler sayesinde hidrolize etme yeteneğindedirler. Bu özellikleri ile topraktaki besinlerin dekompozisyon ve minerilizasyon döngülerinde önemli rol oynarlar (Liman, 2007).

Aktinomisetlerin içinde yer alan *Streptomyces* türleri başta olmak üzere bu gruba dahil birçok keratinaz üretici organizma tanımlanmıştır. Değişik bölgelerden izole edilen bu mikroorganizmalar; saç, yün, tüy gibi farklı tiplerdeki keratinöz substratları parçalama yeteneğindedirler. Örneğin; mezofilik *Streptomyces flavis* 2BG ve termofilik *Microbispora aerata* IMBAS-11A Antartika'dan izole edilmiş yüksek keratinolitik aktivite gösteren iki farklı aktinomisetir (Gushterova et. al., 2005). *Streptomyces gulbarguensis* (Syed et. al., 2009), *Streptomyces thermoviolaceus* (Chitte et. al., 1999) gibi değişik termofilik türlerde topraktan izole edilmiştir. Termofilik türlerin dışında *Streptomyces pactum* DSM 40530 (Böckle et. al., 1995), *Streptomyces graminofaciens* (Szabo et. al., 2000), *Streptomyces albidoflavus* K1-02 (Bressollier et. al., 1999) gibi mezofilik türlerde tanımlanmıştır.

3. MATERYAL

3.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilmiş izolatlardan oluşan Aktinomiset Kültür Koleksiyonunun (World Federation of Culture Collections, No: 952, Code: ACTIN OCC) toprak kökenli alkalifilik üyeleri kullanılmıştır.

3.2. Besiyerleri

Besiyeri 1: Tarama Ortamı

Aşağıda belirtilen ortam içeriği hazırlandıktan sonra pH 10.5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu ortam izolatların proteaz aktivitesi açısından taranmasında kullanılmıştır (Jensen et al., 2005).

Tarama Ortamı İçeriği

Nişasta	10 g
Maya özütü	4 g
Pepton	2 g
Skim milk	10 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

Besiyeri 2: Mineral – Tuz Fermentasyon Ortamı

Aşağıda belirtilen ortam içeriği hazırlandıktan sonra pH 9.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatın keratinaz üretim fermentasyonunda tavuk tüyü veya koyun yünü ortama eklenmiştir (Vasileva – Tonkova et al., 2009).

Mineral Tuz Ortamı İçeriği

NaCl	5 g
CaCO ₃	5 g
K ₂ HPO ₄	3 g

Tavuk tüyü / Koyun yünü	6 g
Distile su	1 L

Besiyeri 3: Soya unu – Mannitol Agar (SFM)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği hazırlandıktan sonra pH 8.0 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu ortam organizmanın kültürel devamlılığını sağlamak ve spor süspansiyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

Soya unu – Mannitol Agar İçeriği

Soya unu	20 g
Mannitol	20 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

Besiyeri 4: Glikoz – Maya Özütü Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği hazırlandıktan sonra pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatın kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Falkow et al., 2006).

Glikoz Maya Özütü Agar İçeriği

Glikoz	4g
Maya özütü	4g
Malt özütü	10g
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 5: LB Broth

Aşağıda belirtilen ortam içeriği hazırlandıktan sonra pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak

sterilize edilmiştir. DNA izolasyonu için kùltivasyonda kullanılmıştır (Hamaki et al., 2005).

LB Broth İçeriği

Trypton	10g
NaCl	10g
Maya özütü	5g
Distile su	1 L

***İz Element Solüsyonu**

Aşağıda belirtilen tuzlar çözülmüceye kadar karıştırılmış ve besiyeri 6, 7, 8 ve 10 için iz element solüsyon stoğu olarak kullanılmıştır.

İz Element Solüsyonu İçeriği

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.1g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1g
Distile su	100 ml

Besiyeri 6: Maya - Malt Özütü Agar (ISP – 2)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ortam otoklavlandıktan sonra 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş iz element solüsyonu ortama eklenmiştir. İzolatların kùltürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Maya - Malt Özütü Agar İçeriği:

Maya özütü	4g
Malt özütü	10g
Dekstroz	4g
Agar	20g
İz element solüsyonu	1 ml
Distile su	1 L

Besiyeri 7: Yulaf Agar (ISP – 3)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ortam otoklavlandıktan sonra 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş iz element solüsyonu ortama eklenmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Yulaf Agar İçeriği

Yulaf ezmesi	20g
Agar	18g
İz element solüsyonu	1 ml
Distile su	1 L

Besiyeri 8: Nişasta –İnorganik Tuz Agar (ISP – 4)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ortam otoklavlandıktan sonra 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş iz element solüsyonu ortama eklenmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Nişasta –İnorganik Tuz Agar İçeriği

Nişasta	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 9: Gliserol Asparajin Agar (ISP – 5)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ortam otoklavlandıktan sonra 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş iz element

solüsyonu ortama eklenmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Gliserol Asparajin Agar İçeriği

L- Asparajin	1g
Gliserol	10g
K ₂ HPO ₄	1g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 10: Pepton- Maya Özütü Agar (ISP – 6)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Pepton- Maya Özütü Agar İçeriği

Pepton demir agar	36g
Maya özütü	1g
İz element solüsyonu	1 ml
Distile su	1 L

Besiyeri 11: Tirozin Agar (ISP – 7)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ortam otoklavlandıktan sonra 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş iz element solüsyonu ortama eklenmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Tirozin Agar İçeriği

Gliserol	15g
L-tirozin	0.5g
L- asparjin	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

3.3. Çözelti, Tampon ve Substratlar

- **Kristal viole boyası:** Aşağıda verilen maddelerden kristal viole etanolde, amonyum oksalat suda çözülmüştür. Her iki çözelti homojen olarak çözüldükten sonra karıştırılır. İzolatın Gram boyama prosüdüründe kullanılmıştır.

Kristal viole	2g
% 95'lik Etanol	20 ml
Amonyum oksalat	0.8g
Distile su	80 ml

- **Gram İyodür Çözeltisi (Lugol Solusyonu):** Aşağıda verilen maddelerden iyot ile potasyum iyodür karıştırılarak toz haline getirilmiştir. Daha sonra üzerine yavaşça su eklenmiştir. Filtre kağıdından süzildükten sonra kullanılır. İzolatın Gram boyama prosüdüründe kullanılmıştır.

İyot	1g
Potasyum iyodür	2g
Distile su	300 ml

- **Gram Safranin Çözeltisi:** Safranin etanolde çözüldükten sonra su ilave edilerek karıştırılmıştır. Filtre kağıdından süzildükten sonra kullanılır. İzolatın Gram boyama prosüdüründe kullanılmıştır.

Safranin	0.25g
% 95'lik etanol	10 ml
Distile su	100 ml

- **50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tamponu:** 242 gram Tris baz 600 ml distile su içinde çözüldükten sonra 57.1 ml glasiyel asetik asit eklenmiş ve daha

sonra üzerine 0.5 M EDTA (pH 8)'dan 100 ml ilave edilmiştir. Hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır. İzolatın DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Potasyum Asetat Tamponu:** 5 M 30 ml potasyum asetat üzerine, 5.75 ml süssüz asetik asit eklenmiştir. 14.25 ml distile su ilave edilerek son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. İzolatın DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Lizis Tamponu:** 100 ml Lizis tamponu hazırlamak için; 6.3 g Tris – HCl, 1.2 g EDTA, 0.88 g NaCl ve 1 g SDS 100 ml ultra saf suyun içine eklenmiştir. Bileşenlerin homojen çözünmesi için pH 8'e ayarlanmıştır. Tampon, izolatın DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Sitrat – Fosfat Tamponu:** 0,2 M sitrik asit ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan belli oranlarda karıştırılarak pH 5 ve pH 6 için tampon hazırlanmıştır. Enzim karakterizasyonunda optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **Fosfat Tamponu:** 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ile pH 7 için tampon hazırlanmıştır. Enzim karakterizasyonunda optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **Tris Tamponu:** 0,2 M Tris ile pH 8 ve pH 9 için tampon hazırlanmıştır. Enzim karakterizasyonunda optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır. 0.05 M, pH 9.0 Tris tamponu ise keratinaz aktivite ölçümünde tampon olarak kullanılmıştır.

- **Karbonat – Bikarbonat Tamponu:** 0,2 M NaCO_3 ve 0,2 M NaHCO_3 'ten belli oranlarda karıştırılarak pH 10 için tampon hazırlanmıştır. Enzim karakterizasyonunda optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **KCl – NaOH Tamponu:** 0,2 M KCl ve 0,2 M NaCl'den belli oranlarda karıştırılarak pH 11 ve pH 12 için tampon hazırlanmıştır. Enzim karakterizasyonunda optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **Elüsyon Tamponu:** 10 mM pH 7.5 Tris – HCl 0,5 M NaCl kolon kromatografi işlemlerinde kullanılmıştır.

- **Dengeleme Tamponu:** 10 mM pH 7.5 Tris – HCl kolon kromatografi işlemlerinde kullanılmıştır.

- **Santrifugal filtre** (Vivaspin): Enzim saflaştırılmasında enzimi yoğunlaştırmak için kullanılmıştır.

- **Bradford reaktifi** (Sigma): Örneklerin protein miktar tayininde kullanılmıştır.

- **Elektroforez Markör** (Gene Ruler 100bp DNA)

- **Elektroforez Yükleme boyası** (6X Loading Dye Solution)

- **Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Primerler**

➤ **27F:** AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

➤ **1492R:** TACGGYTACCTTGTTACGAG

- **SDS – PAGE Markör** (Page Ruler 10 – 250 kDa)

3.4. Makine ve Teçhizatlar

- Otoklav (Hirayama)

- Çalkalamalı inkübatör (Zhicheng 2112 B)

- Inkübatör (Nüve ES 500 – FN 500)

- Derin dondurucu (Thermo -86°C)

- Kabin (Nuare Biological Safety Cabinets Class II)

- Mikro santrifüj (Hettich D59302)

- Endüstriyel santrifüj (Westfalia Seperator)

- Spektrofotometre (Versa max microplate reader)

- Işık Mikroskobu (Olympus)

- Elektron Mikroskobu (FEI Quanta 250 FEG)

- ABI 3100 Genetic Analyzer

- SDS – PAGE (CBS Scientific Co., MG 202)

- Ultrafiltrasyon (Sartorius)

- Biorad (Biological LP 2110) / DEAE kolon (Biorad catalog no: 732-4122)

- Terazî (Sartorius)

- pH metre (Hanna HI 2211)

- Hot plate (Stuart scientific Hotplates H1)

4. YÖNTEMLER

4.1. İzolatların Proteaz Aktivitesi Açısından Taranması

Çalışmada Batı Anadolu'nun farklı bölgelerinden alınmış toprak örneklerinden izole edilmiş 180 adet izolat kullanılmıştır. Aktinomiset kültür koleksiyonunda (World Federation of Culture Collections, No: 952, ACTINOCC) yer alan izolatlar, 1 No'lu besiyerinde proteaz aktivitesi açısından taranmış ve besiyerinde oluşan zon/koloni çapına göre iyi üretici izolatlar ileri çalışmalar için seçilmiştir.

4.2. Spor Süspansiyonu Hazırlanması

Spor süspansiyonu hazırlamak amacıyla izolat, 3 No'lu besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekilmiş ve 28°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında olgun sporlar steril pamuk yardımı ile % 20 steril gliserol içerisine alınarak - 20°C ve - 86°C'de stoklanmıştır. Spor süspansiyonunda ne kadar spor olduğunun belirlenebilmesi için sayım yapılmıştır. Bunun için süspansiyondan 10⁻⁹'a kadar seyreltmeler yapılmıştır. Daha sonra bu seyreltmelerden 4 No.'lu besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekim yapıp 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 15 – 300 arasında koloni bulunduran petriyerler alınarak spor sayısı spor/ml (cfu-colony forming unit/ml) ile ifade edilecek şekilde hesaplanmıştır.

4.3. İzolatın Tanılanmasında Kullanılan Yöntemler

4.3.1. Gram boyama

İzolat ışık mikroskobu incelemesi için 3 No'lu besiyerine ekilmiştir. 28°C'de, 3-4 gün inkübasyondan sonra oluşan substrat ve havasal misellerin yapısal özelliklerinin ve izolatın Gram reaksiyonunun belirlenmesi için Gram boyama yapılmıştır. Bunun için petriden öze ucu ile mikroorganizma lam üzerine alınarak ısı ile fikse edilmiştir. Daha sonra hazırlanmış preparat üzerine kristal viole damlatılıp 2 – 3 dakika beklenmiştir. Distile su ile yıkanarak kristal viole uzaklaştırılmış ve ardından preparat lugol solusyonu ile 1 – 2 dakika muamele

edilmiştir. Lugol solusyonunu uzaklaştırmak için önce etanol ile 10 saniye, daha sonra distile su ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra örnek safranin ile 20 saniye muamele edilmiş ve distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Preparat ışık mikroskobu altında farklı büyütmelemlerde incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

4.3.2. Biyokimyasal yöntemler

4.3.2.1. pH toleransının belirlenmesi

İzolatin pH toleransının belirlenmesi için 4 No'lu besiyeri pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olacak şekilde hazırlanmış ve petrilere her bir izolattan çizgi ekim yapılarak 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.2.2. Sıcaklık toleransının belirlenmesi

İzolatin üreyebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi için her bir izolat 4 No'lu besiyeri içeren 9 petriye çizgi ekim yapılmış, 4°C, 10°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C ve 60°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.2.3. Tuz toleransının belirlenmesi

İzolatin tuz toleransının belirlenmesi için 4 No'lu besiyerine %0, %2.5, %5, %7.5, %10, %12.5, %15 ve %17.5 oranlarında NaCl ilave edilerek petrilere paylaştırılmıştır. İzolatin ekimi yapıldıktan sonra 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.2.4. Şeker kullanımının belirlenmesi

İzolatin kullandığı şekerleri belirlemek amacı ile 4 No'lu besiyerine yalnız glikoz, sukroz, ksiloz, inositol, mannitol, fruktoz, ramnoz, rafinoz ve selüloz içeren petrilere hazırlanmıştır. Ekim yapıldıktan sonra 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynaklarının kullanımı 4 No'lu besiyerinde 7 gün sonunda, karbon kaynağı içeren pozitif kontrol ortamı ve karbon kaynağı içermeyen negatif kontrol ortamı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

4.3.3. Taramalı elektron mikroskobu

İzolatın spor yüzey yapılarının belirlenmesi için 25.000 ve 65.000'lik büyütme yapılarak FEI Quanta 250 FEG model taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. İzolat elektron mikroskop incelemesi için 3 No'lu besiyerine yerleştirilen 0,45 µm'lik filtre kağıdı üzerine ekilmiştir. 28°C'de, 48 saat inkübasyondan sonra ekim yapılan filtre kağıdı, steril koşullarda pens yardımıyla besiyeri üzerinden alınarak steril hava kabininin içinde kurutulmuştur. Daha sonra altın kaplanan örnekler Taramalı Elektron Mikroskobu ile farklı büyütme oranlarında incelenmiştir. Kullanılan Taramalı Elektron Mikroskobu için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü laboratuvarından faydalanılmıştır.

4.3.4. Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler DNA izolasyonu Liu et al. (2000)'a göre yapılmıştır. İzolat 5 No.lu besiyerinde 28°C'de, 150 devir/dakika'da, 48 saat inkübe edilmiştir. Fermentasyondan sonra, ortamdan 1 – 1.5 ml alınıp 7.000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst fazdaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelletlerin üzerine 0.01 mg lizozim ilave edilip 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra pelletler üzerine 500 µl lizis tamponu eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında pellet üzerine 150 µl potasyum asetat tamponu eklenmiş ve 12.000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiş ve aynı şekilde santrifüjlenerek DNA çöktürülmüştür. Üst faz atılmış ve çöken DNA'nın üzerine 300 µl % 70'lik soğuk etanol eklenmiştir. Üst faz alınarak dibe çöken pellet kurumaya bırakılmıştır. Ardından etanolü uzaklaştırılmış pellet üzerine 50 µl TE tamponu eklenerek izole edilen DNA süspanse edilmiştir. Daha sonra agaroz jel elektroforezi ile DNA'nın bütünlüğü ve saflığı kontrol edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.3.6).

4.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu

16S ribozomal RNA dizisini kodlayan gen bölgesini, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltmak için Bölüm 3.2'de dizisi verilen 27F ve 1492R

primerleri kullanılmıştır. PZR karışımı 10X Taq buffer, 0.2 mM dNTP, 0.75 mM MgCl₂, 1.25 U Taq polimeraz (Fermantas), 0.4 pmol/μL primer ve 150 ng DNA içerecek şekilde toplam 50 μL hacimde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PZR programı ise ön denatürasyon için 94°C’de 30 saniye, ardından 30 döngü 94°C’de 30 saniye, 50°C’de 30 saniye ve 72°C’de 45 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürününün 5 μl’si %1’lik agaroz jelde yürütülerek kalitesi ve miktarı kontrol edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.3.6).

4.3.6. Agaroz jel elektroforezi

%1’lik agaroz jel hazırlamak için 1g agaroz 100 mL 1X TAE (Tris asetik asit edta) tamponuna eklenmiş ve mikrodalga fırında çözülmüştür. Karışımın homojen olması sağlanmıştır. Yaklaşık 40-45°C’ye kadar soğutulurken son konsantrasyonu 5μg/100 ml olacak şekilde 10000X GelRed boyası eklenmiş ve jel kasete dökülmüştür. 30-60 dakika süre ile donması beklenmiştir. Taraklar çıkarılmış ve jel, içinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

Genomik DNA ve PZR örneklerinden 8 μl alınarak 2 μl jel yükleme tamponu (6X) ile karıştırılmış ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk kuyucuğa DNA standardı yüklenmiş ve yürütme işlemi 100 V altında gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA’ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Öner, 2011).

4.3.7. DNA dizileme yöntemi

PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünlerinin sekans PZR ve dizileme çalışmaları RefGen (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji) Merkezinden hizmet alımı ile yaptırılmıştır. 16S rDNA PZR ürünü filtrasyon kiti (Centricon®) ile temizlenmiş ve ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile sekansı gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için, 40-50 ng kalıp DNA, 3.2 pmol primer, 8 μl Big Dye (Applied Biosystems) eklenmiş ve üzerine son hacim 20 μl olana kadar su ilave edilmiştir. 16S rDNA reaksiyonları için F27 (5’-aga gtt tga tcm tgg ctc ag-3’) ve R1492 (5’-tac ggy tac ctt gtt acg ag-3’) primerleri

kullanılmıştır. Referans türlerin nükleotid dizileri NCBI Gene Bank web sayfasından indirilerek incelenmiştir. 16S rDNA dizi verileri kullanılarak izolatlar için BLAST analizi yapılmıştır. Çoklu dizi analizi Bio Edit sequence alignment editor v7.0.5 (Isis Pharmaceutical Inc.) programı ile gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç, filogenetik analiz programı MEGA v4.0 ile yapılmıştır. Ağaç oluşturulurken Neighbour-joining yöntemi ve 3000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

4.4. Fermentasyon Çalışmaları

Seçilen izolatların keratini parçalama etkinliğini belirlemek amacı ile derin kültür fermentasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için substrat olarak sadece tavuk tüyü ve koyun yünü içerecek şekilde 2 No'lu besiyerinden hazırlanmıştır. Küçük çaplı fermentasyon denemeleri, 250 ml'lik erlenlerde 50 ml besiyerinde 28°C'de, 180 rpm'de, 6 gün inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sonrasında santrifüjle hücrelerinden ayrılan fermentasyon sıvısında hücre dışı keratinolitik aktiviteye göre, en iyi keratinaz üreticisi olan organizmanın hangi keratinöz atığı daha etkin parçaladığı belirlenmiştir. Bir sonraki aşama olan üretim optimizasyonuna, seçilen organizma ve substrat ile devam edilmiştir.

4.5. Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada, keratinaz üretimi için seçilen değişkenlerin arasındaki etkileşimi anlamak ve optimum proses koşullarını belirlemek amacı ile Yanıt yüzeyi yöntemi (YYY) ve One Variable at a Time (OVAT) yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Yanıt yüzeyi yöntemi (Response surface methodology) farklı değişkenlerin sistem üzerine etkilerini ve birbirleriyle olan etkileşimlerini belirlemek, belli bir sistemin matematiksel modelini oluşturmak ve bu modelin istatistiksel olarak anlamlılığını ve tutarlılığını belirlemek için kullanılan bir metottur. OVAT ise; her deney setinde, sadece bir faktörün değiştirilip diğer faktörlerin sabit tutulması esasına dayanan yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir.

4.5.1. İnkübasyon süresi, pH ve sıcaklığın optimizasyonu

İlk aşamada, üretim üzerine etkisi olan *pH*, *sıcaklık* ve *zaman* faktörlerinin arasındaki etkileşimi anlamak ve optimum koşulları belirlemek amacı ile YYY protokolünden yararlanılmıştır. Elde edilen verilerin grafiksel analizi ve matematiksel modelin eldesi için 'Design Expert 6.0 (deneme sürümü)' programı kullanılmıştır.

Seçilen 3 faktör olan pH, sıcaklık ve zaman parametreleri için 5 seviyeli Merkezi Tümlşik Tasarım (Central Composite Design-CCD) yapılmış ve 3 faktör 5 seviyede ($\alpha=1,68$) incelenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Tasarımın faktör ve seviyelerinin gösterimi

Seviye	Faktör		
	pH	Sıcaklık (°C)	Zaman (gün)
- α	5.00	15.00	2.00
-1	6.42	20.07	3.22
0	8.50	27.50	5.00
+1	10.58	34.93	6.78
+ α	12.00	40.00	8.00

Proseste kullanılan mikroorganizma mezofilik karakterde olduğundan sıcaklık için alt ve üst değerler 15 ve 40 °C olarak belirlenmiştir. Yine mikroorganizmanın alkalifilik karakterde olması sebebiyle pH için alt ve üst değerler 5 – 12 olarak alınmıştır. Organizmanın büyüme karakteristiği gözönünde bulundurularak proses süresinin alt ve üst değerleri 2 – 8 gün olarak belirlenmiştir.

Üretim koşullarının optimizasyonu 6 tekrar içeren CCD ile yapılmıştır (Çizelge 4.2). Her bir deney setinde verilen pH değeri dikkate alınarak, 250 ml'lik erlenlerde 50 ml ortam olacak şekilde 2 No'lu besiyerinden hazırlanmıştır (Bkz. Bölüm 3.2). Daha önceden hazırlanmış spor süspansiyonundan her bir erlene steril koşullarda 10^8 spor/ml kadar inokulasyon yapılmıştır. Her bir erlen 150 devir/dakika'da, deney setlerinin gerektirdiği sıcaklık ve zaman dikkate alınarak inkübasyona kaldırılmıştır.

Çizelge 4.2 Keratinaz enziminin üretim koşullarının 2^3 Merkezi Tümlşik Tasarım seviyelerinin kodlanmış ve gerçek değerler ile gösterimi

Deney no	Değişkenlerin kodlanmış seviyeleri			Değişkenlerin gerçek seviyeleri		
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Sıcaklık (°C)	Zaman (Gün)
1	-1	-1	-1	6.5	20.0	3.2
2	+1	-1	-1	10.5	20.0	3.2
3	-1	+1	-1	6.5	35.0	3.2
4	+1	+1	-1	10.5	35.0	3.2
5	-1	-1	+1	6.5	20.0	6.8
6	+1	-1	+1	10.5	20.0	6.8
7	-1	+1	+1	6.5	35.0	6.8
8	+1	+1	+1	10.5	35.0	6.8
9	-2	0	0	5.0	27.5	5.0
10	+2	0	0	12.0	27.5	5.0
11	0	-2	0	8.5	15.0	5.0
12	0	+2	0	8.5	40.0	5.0
13	0	0	-2	8.5	27.5	2.0
14	0	0	+2	8.5	27.5	8.0
15	0	0	0	8.5	27.5	5.0
16	0	0	0	8.5	27.5	5.0
17	0	0	0	8.5	27.5	5.0
18	0	0	0	8.5	27.5	5.0
19	0	0	0	8.5	27.5	5.0
20	0	0	0	8.5	27.5	5.0

4.5.2. Karbon ve azot kaynağı olarak tavuk tüyü optimizasyonu

İkinci aşamada; YYY ile belirlenen optimum koşullar altında, keratinaz üretimi için ortamda bulunması gereken optimum tavuk tüyü miktarı optimize edilmiştir. Bunun için 2 No.'lu besiyeri 10, 15, 20 ve 25 g/L tavuk tüyü olacak şekilde hazırlanmıştır (Bkz. Bölüm 3.2). Her bir erlen aynı miktar spor ile aşıl原因arak, istatistiksel optimizasyon denemelerinde elde edilen optimum koşullarda inkübe edilmiştir. Fermentasyon sonunda hücrelerinden ayrılan fermentasyon sıvısı için keratinaz aktivitesi değerlendirilmiştir (Bkz. Bölüm 4.6).

4.6. Keratinaz Aktivite Ölçümü

Keratinaz aktivitesi Delmar et. al. (1979)'a göre yapılmıştır. 140 µl 0,05 M Tris HCl, 50 µl 1mM Suc-AAPF-pNA (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA) substratı ve 10 µl enzim örneği içeren reaksiyon karışımı 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında açığa çıkan pNA miktarı 410 nm'de köre karşı (150 µl

0,05 M Tris HCl ve 50 µl 1 mM Suc-AAPF-pNA) spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Aktivite ölçümünde üç tekrarlı deney seti kullanılmıştır. 1 Unit keratinolitik aktivite, standart koşullarda dakikada açığa çıkan µmol pNA miktarı olarak ifade edilmiştir.

4.6.1. *p*-Nitroanilid standart grafiği

50 mM derişimde stok *p*-nitroanilid çözeltisi hazırlanmıştır. Stok pNA çözeltisinden mikrolakaya son hacim 200 µl olacak şekilde sırası ile 0.25 µmol, 0.5 µmol, 1 µmol ve 2 µmol'lük seyreltmeler yapılmıştır. Kör olarak 200 µl deney tamponu olan 0,05 M Tris HCL kullanılmıştır. Mikrolaka okuyucu ile 410 nm'de köre karşı okuma yapılarak absorbans değerleri elde edilmiştir. Derişim değerlerinin karşılık geldiği absorbans değerleri göz önünde bulundurularak pNa standart grafiği çizilmiş ve enzim aktivitesi buna göre belirlenmiştir.

4.7. Proteaz Aktivite Ölçümü

Proteaz aktivitesi Takami et. al. (1989)'a göre yapılmıştır. Substrat olarak kazein, BSA (bovine serum albumin), skim milk, tavuk tüyü veya koyun yünü kullanılmıştır. Çözünür substratlar olan skim milk, BSA ve kazeinden sadece birini içerecek şekilde % 0.6'lık çözelti, 0.05 M Tris HCL (pH 9.0) ile hazırlanmıştır. 25 µl substrat çözeltisine, 5 µl enzim örneğinden eklenerek 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben aktiviteyi durdurmak amacı ile reaksiyon karışımının üzerine 25 µl 0.44 M (trikarboksilik asetik asit) TCA eklenmiştir. Örnekler 8 dakika 5000 rpm'de santrifüjlendikten sonra üst sıvıdan 50 µl alınarak üzerine 0.5 M Na₂CO₃'ten 250 µl ve folin reaktifinden 50 µl eklenerek alt üst edilmiştir. Örnekler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 660 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Aktivite ölçümünde üç tekrarlı deney seti kullanılmıştır. 1 Unit proteolitik aktivite, 37°C'de standart koşullarda dakikada açığa çıkan nmol tirozin miktarı olarak ifade edilmiştir.

Çözünmez substratlar olan tavuk tüyü ve koyun yünü için yukarıda anlatılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Tavuk tüyü ve koyun yününden sadece

birini içerek şekilde % 1.0'lık, 500 µl süspansiyon 0.05 M Tris HCL (pH 9.0) ile hazırlanmıştır. Substrat süspansiyonunun üzerine 500 µl kısmi saf enzimden eklenmiş ve 37°C'de 250 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 8 dakika 5000 devir/dakika'da santrifüjlendikten sonra, üst sıvıdan 50 µl alınarak üzerine 0.5 M Na₂CO₃'ten 250 µl ve folin reaktifinden 50 µl eklenmiştir. Örnekler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 660 nm'de boş örnekleme karşı spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Aktivite ölçümünde üç tekrarlı deney seti kullanılmıştır. 1 Unit proteolitik aktivite, 37°C'de standart koşullarda saatte açığa çıkan nmol tirozin miktarı olarak ifade edilmiştir.

4.7.1. Tirozin standart grafiği

5 mM stok tirozin çözeltisinden 10, 50, 100, 150, 200, 250, 350 ve 450 nmol olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Her bir seyreltmeden 50 µl alınıp üzerine 250 µl Na₂CO₃ ve 50 µl Folin reaktifinden eklenmiştir. 30 dakika inkübasyon sonrasında 660 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Derişim değerlerinin karşılık geldiği absorbans değerleri göz önünde bulundurularak protein standart grafiği çizilmiş ve enzim aktivitesi buna göre belirlenmiştir.

4.8. Toplam Protein Tayini

Örneklerde varolan protein miktarı, BSA (Bovin serum albumin) proteini standart olarak alınarak, Bradford (1976) metoduna göre tayin edilmiştir. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı bir yöntem olan Bradford, boyanın asidik bölgesi ile proteinin bazik bölgesinin etkileşme esasına dayanır.

4.8.1. Protein standart grafiği

1 mg/ml stok BSA çözeltisinden 100, 250, 500, 1000 ve 1400 µg/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Her bir seyreltmeden kuyucuklara 10 µl aktarılıp üzerine 200 µl Bradford reaktifinden eklenmiştir. 30 dakika inkübasyon sonrasında mikroluka okuyucuda 595 nm'de okutulmuştur. Derişim değerlerinin

karşılık geldiği absorbans değerleri göz önünde bulundurularak protein standart grafiği çizilmiş ve örnekteki protein miktarı buna göre değerlendirilmiştir.

4.9. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Saflaştırma basamaklarındaki tüm işlemler + 4°C’de yapılmıştır.

4.9.1. Ultrafiltrasyon

Büyük çapta üretimi yapılan keratinaz enzimini deriştirmek amacı ile ultrafiltrasyon yapılmıştır. Ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius) ile por genişliği 10 kDa olan membran kullanılarak fermentasyon sıvısının hacmi 3.5 L’den 1 L’ye indirilerek enzim 3.5 kat deriştirilmiştir.

4.9.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Ultrafiltrasyon ile deriştirilmiş fermentasyon sıvısına % 80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Presipitasyon sonrasında fermentasyon sıvısı 7000 g’de 10 dakika +4°C’de santrifüjlenmiştir. Presipitat olabilecek en az hacimde saf suda çözülerek +4°C’de saklanmıştır.

4.9.3. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen derişik enzim solüsyonu 10 kDa por çapına sahip selüloz diyaliz membran ile +4°C’de saf suya karşı 48 saat diyalizlenmiştir. Diyaliz süresince saf su 4 kez değıştirilmiştir.

4.9.4. Kolon kromatografi işlemleri

Diyaliz ile örnekte varolan tuz uzaklaştırıldıktan sonra ileri saflaştırma için örnek iyon değışim kromatografisine (DEAE kolon, Biorad catalog no: 732-4122) uygulanmıştır. Örnek kolona yüklenmeden önce kolon 10 mM pH 7.5 Tris – HCl tamponu ile dengelenmiştir. Kolon 1 ml/dk akış hızı ile 1 saat dengelendikten sonra, protein derişimi yaklaşık 10 mg/ml olan örnekten 2 ml yüklenmiştir. Daha sonra 10 mM pH 7.5 Tris – HCl 0,5 M NaCl tamponu ile

kolona 0,15 M - 0,30 M tuz gradienti uygulanmıştır. Akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanan kolondan, her biri 1 ml örnek içeren 60 fraksiyon toplanmıştır. Son olarak kolondan 0,5 M NaCl geçirilerek yıkanmıştır. Toplanan fraksiyonların keratinaz aktivitesi Bölüm 4.6’de verilen yönteme göre tayin edilmiştir. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirilerek membran çapı 10 kDa olan santrifugal filtre ile ultrafiltre edilmiştir. Hem deriştirilen hemde tuzu uzaklaştırılan örnek karakterizasyon çalışmaları için - 20°C’ye depolanmıştır.

4.10. Enzim karakterizasyonu

4.10.1. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi

Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerini belirlemek amacı ile enzim aktivitesi 20, 28, 37, 45, 55 ve 65°C’de Bölüm 4.6’de verilen yönteme göre ölçülmüştür. Keratinaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık saptanmıştır.

Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile 5 farklı tampon sistemi kullanılmıştır (Bkz. Bölüm 3.3). Sitrata tamponu pH 5.0 – 6.0 için, fosfat tamponu pH 6.0 – 7.0 için, Tris – HCl tamponu pH 7.0 – 9.0 için, karbonat – bikarbonat tamponu pH 9.0 – 11.0 için, KCl – NaOH tamponu pH 11.0 – 12.0 için kullanılmıştır. Her bir tampon sistemi ile enzim aktivitesi Bölüm 4.6’de verilen yönteme göre belirlenmiştir.

4.10.2. Sıcaklık ve pH kararlılığının belirlenmesi

Enzimin farklı sıcaklıklara olan kararlılığını belirlemek amacı ile elde edilen örnek 20, 28, 37, 45, 55 ve 65°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra Bölüm 4.6’de verilen yönteme göre keratinaz aktivitesi belirlenmiştir. 0°C’de 1 saat inkübe edilmiş enzimin aktivite değeri 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin kalan aktivitesi hesaplanmıştır.

Enzimin farklı pH’lara olan kararlılığını belirlemek amacı ile elde edilen örnek pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12’de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra Bölüm 4.6’de verilen yönteme göre keratinaz aktivitesi belirlenmiştir. Aktivitesi en

yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağlı aktivitesi hesaplanmıştır.

4.10.3. Moleküler kütle tayini (SDS – PAGE)

Enzimin moleküler kütlelerini belirlemek amacı ile % 12'lik ayırma (separating) ve % 5'lik dengeleme (stacking) jeli hazırlanmıştır. Örnekler, % 10 β -merkaptoetanol içeren Laemmli (40 mM Tris pH 6.8, 4 mM EDTA, % 4 SDS, % 20 gliserol, 200 μ l Bromfenolblue) tamponunda 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Markör olarak Fermentas PageRuler (10 – 250 kDa) kullanılmıştır. Yürütme tamponu (3 g Trizma base, 14.4 g Glisin, 1 g SDS, 1 L distile su) tanka eklendikten sonra örnekler ve markör kuyucuklara yüklenmiş ve 80 V'ta 5 saat yürütme yapılmıştır. Daha sonra jel, Comassie brilliant blue R-250 ile 15 dakika boyanmıştır. Protein bantlarının gözlemlenebilmesi için jel, % 10 metanol, % 10 asetik asit içeren yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra görünür ışık altında incelenip fotoğraflanmıştır.

4.10.4. Zimogram

Saflaştırılan enzimin jelde aktivitesini belirlemek amacı ile 10 mg/ml jelatin içeren % 10'luk ayırma (separating) jeli ve % 5'lik dengeleme (stacking) jeli hazırlanmıştır. Örnekler, % 10 β -merkaptoetanol içeren Laemmli tamponunda Bkz. Bölüm 4.9.3) 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Jel 80 V'ta 5 saat yürütülmüştür. Elektroforezi takiben yüklenen proteinlerin renatürasyonu için jel, Triton X-100 (% 2,5, v/v) ile oda sıcaklığında 30 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra distile su ile yıkanarak enzimin optimum aktivite gösterdiği koşullar olan 37°C ve pH 9'da (50 mM Tris – HCl) 12 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonrasında comassie brilliant blue R-250 ile 15 dakika boyanan jel, hidroliz bantlarının netleşmesi için 12 saat yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Görünür ışık altında incelenip fotoğraflanmıştır.

4.10.5. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi

Enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile PMSF, DTT, EDTA, EGTA (ethyleneglycoltetraacetic acid) gibi kimyasallar, Mg^{+2} ($MgSO_4$), Ca^{+2} ($CaCl_2$), Cu^{+2} ($CuSO_4$), Zn^{+2} ($ZnSO_4$), Ba^{+2} ($BaCl_2$), Fe^{+2} ($FeSO_4$) gibi metal iyonları, H_2O_2 , SDS, Triton X – 100, metanol, etanol, bütanol, isopropanol, asetonitril, etil asetat, DMSO gibi deterjan ve organik çözümler farklı derişimlerde enzime ilave edilerek 37°C’de, 30 dakika bekletilmiştir. Keratinolitik aktivite Bölüm 4.8’de verilen yöntemle göre belirlenmiştir. Kontrol olarak kimyasal ile muamele edilmemiş enzim kullanılmıştır. Kontrolün aktivite değeri 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

4.10.6. Enzimin substrat özgüllüğünün belirlenmesi

Enzimin kazein, BSA, skim milk, tavuk tüyü ve koyun yünü üzerinde gösterdiği proteolitik etkinlik Bölüm 4.7’de anlatılan yöntemle göre belirlenmiştir. Sentetik substratlar olan Suc-AAA-pNA (Suc-Ala-Ala-Ala-NA) ve Suc-AAPF-pNA için aktivite ölçümü Bölüm 4.6’de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Her bir substrat için spesifik aktivite hesaplandıktan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. İzolatların Proteaz Aktivitesi Açısından Taranması

Aktinomiset kültür koleksiyonunda yer alan ve proteaz aktivitesi açısından iyi olan üreticiyi belirlemek amacı ile tarama çalışması yapılmıştır. 180 adet aktinomiset izolatı, 1 No'lu besiortamında 28°C'de 6 gün inkübe edilmiştir (Şekil 5.1). Değerlendirme, inkübasyon sonrası koloni çevresindeki şeffaf zonlar dikkate alınarak yapılmıştır. Zon/koloni çap oranı en yüksek olan 10 farklı izolat ileri çalışmalar için seçilmiştir (Çizelge 5.1).



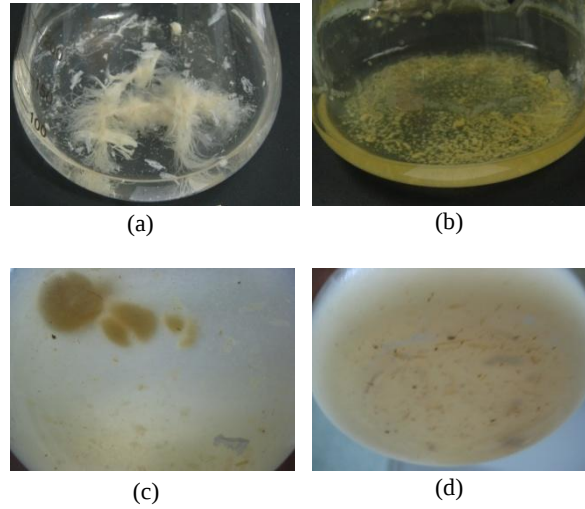
Şekil 5.1 İzolatların inkübasyon sonrasında oluşturduğu zonların görünümü

Çizelge 5.1 Tarama sonucunda zon/koloni çap oranına göre belirlenen izolatlar

İzolat kodu	Koloni çapı	Zon çapı	Zon/Koloni çapı
M49-5	0.7	1.9	2.7
M34-2	0.8	2.2	2.7
M49-3	0.8	2.3	2.8
136K-3	1.0	3.0	3.0
2M21	1.0	3.0	3.0
M34-1	0.4	1.2	3.0
M49-1	0.8	2.7	3.3
M45-2	0.6	2.1	3.5
M125-4	0.6	2.2	3.6
M127-1	0.6	2.6	4.3

Seçilen organizmaların, koyunyünü ve tavuk tüyünü parçalayabilme kapasitelerini ve keratinaz üretim potansiyellerini belirlemek amacı ile ön

fermentasyon denemesi yapılmıştır. Karbon ve azot kaynağı olarak sadece tavuk tüyü veya koyun yünü içeren 2 No'lu besiyerinde, 28°C'de, 150 rpm'de tavuk tüyü için 6 gün, koyun yünü için 14 gün inkübasyon sonrasında her bir izolat için keratinaz aktivitesi belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 4.6). Tavuk tüyü ve koyun yünü kullanılarak gerçekleştirilmiş fermentasyon çalışmasına ait erlen fotoğrafları Şekil 5.2'de verilmiştir. Keratinaz aktivitesi en iyi olan M125 – 4 izolatının, hem tavuk tüyünü (5 U/ml) hemde koyun yünü parçalayabildiği gözlemlenmiştir. Tavuk tüyünün agroendüstri açısından daha tonajlı bir atık olması ve organizmanın tavuk tüyü üzerinde çok daha etkin ve hızlı parçalama gerçekleştirmesi nedeni ile optimizasyon çalışmalarına substrat olarak tavuk tüyü ile devam edilmiştir. Seçilen izolatın, spor süspansiyonu hazırlanmış ve ileri çalışmalar için – 20°C ve – 86°C'de stoklanmıştır.



Şekil 5.2 İzolat M125-4'ün farklı keratinöz substratlar üzerindeki parçalama etkinliği a) Tavuk tüyü - 0. gün, b) Tavuk tüyü - 6. gün, c) Koyun yünü - 0. gün, d) Koyun yünü - 14. gün

Literatürde varolan diğer çalışmalarda mikroorganizma seçimi için, öncelikle proteaz aktivitesine bakılarak tarama yapıldığı, daha sonra keratinolitik aktivite belirlenerek buna göre organizma seçimi yapıldığı görülmüştür. Tatineni ve arkadaşları (2008), toprak örneğinden izole ettikleri *Streptomyces* sp. S7 suşunun kazein agarda yüksek proteolitik aktivite gösterdiğini belirledikten sonra keratinaz aktivitesini belirleyerek ileri çalışmalara bu organizma ile devam etmişlerdir. Yine yapılan başka bir çalışmada, toprak örneğinden elde edilmiş *Streptomyces* sp. BA₇ suşu, skim milk agarda proteaz aktivitesi açısından iyi

aktivite gösterdiği belirlendikten sonra keratinolitik aktivitesi ölçülerek seçilmiştir (Korkmaz vd., 2003).

5.2. İzolatın Tanılama Çalışmaları

5.2.1. İzolatın fenotipik ve biyokimyasal özellikleri ile 16S rDNA dizi analizi

Seçilen izolatın, DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)'den elde edilen *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ve *Prokaryotes* kaynaklarına göre hazırlanmış '*Compendium of Actinobacteria*'ya göre çeşitli kültürel, mikroskopik ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. 16S rDNA dizi analiz sonuçları göz önünde bulundurularak tanılması yapılmıştır (Bkz. Bölüm 4.5). İzolatın, 3 No'lu besi ortamında ve ISP (*International Streptomyces Project*) ortamlarında streptomiset benzeri koloni görünümüne sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 M125-4'ün petrideki görünümü.

Organizmanın spor zincir yapısı, fragmentasyon oluşumu hakkında ayrıntılı gözlem yapabilmek ve Gram reaksiyonunu belirlemek amacı ile Gram boyaması yapılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Şekil 5.4). Buna göre; izolatın, rectiflexibilis tip spor zincir yapısına sahip olduğu, sporangia ve fragmentasyon oluşturmadığı belirlenmiştir.



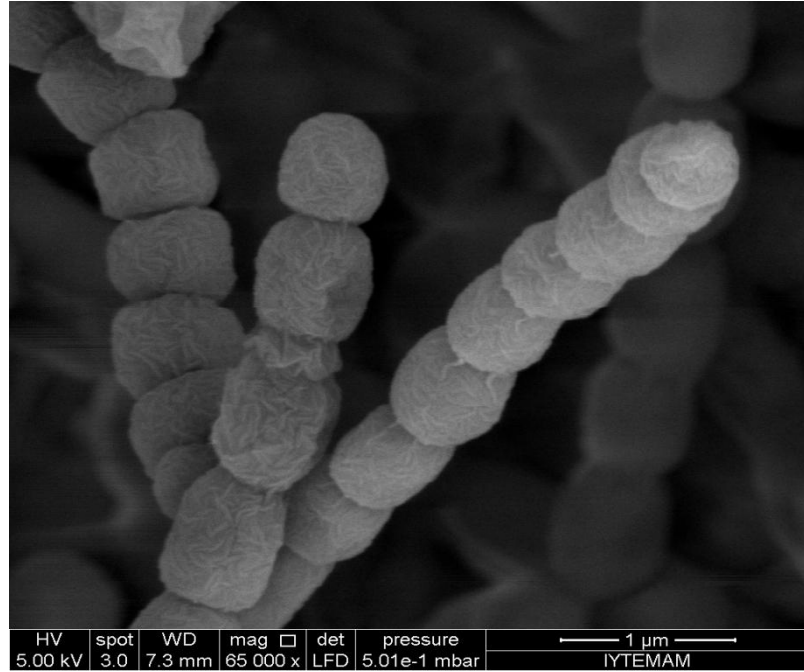
SFM ortamı / 28 °C 3 gün / 40x



SFM ortamı / 28 °C 4 gün / 40x

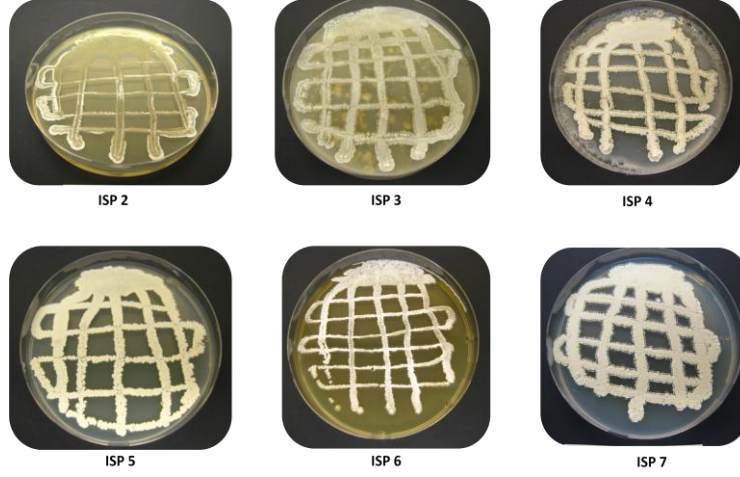
Şekil 5.4 M125 – 4 izolatının gram boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü

Gram boyama sonucunda organizmanın Gram pozitif olduğu ve tipik spor zinciri morfolojisi Şekil 5.4'te verilmiştir. Spor yapısı hakkında daha ayrıntılı bilgi edinmek amacı ile izolat, daha yüksek büyütmelede taramalı elektron mikroskopunda incelenmiş ve pürüzsüz (smooth) spor yüzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.5). Organizmanın $0.7 \mu\text{m}$ spor çapına sahip olduğu taramalı elektron mikroskobu ile gözlemlenmiştir (Şekil 5.5).

**Şekil 5.5** M125 – 4 izolatının elektron mikroskop görüntüsü

M125-4 izolatının, farklı besiortamlarında farklı büyüme karakteristikleri gösterdiği belirlenmiştir. Bölüm 3.2'de anlatılan şekilde 6 çeşit ISP ortamı (6, 7, 8, 9, 10, 11 No'lu besiyerleri) hazırlanmıştır. Herbir besiyerine organizmanın

ekimi yapılarak 28°C’de, 7 gün inkübasyon sonrasında havasal ve substrat miselleri incelenmiştir (Şekil 5.6). Havasal misel renginin değerlendirilmesinde ral color sistemi kullanılmıştır (RAL color chart, 2012).



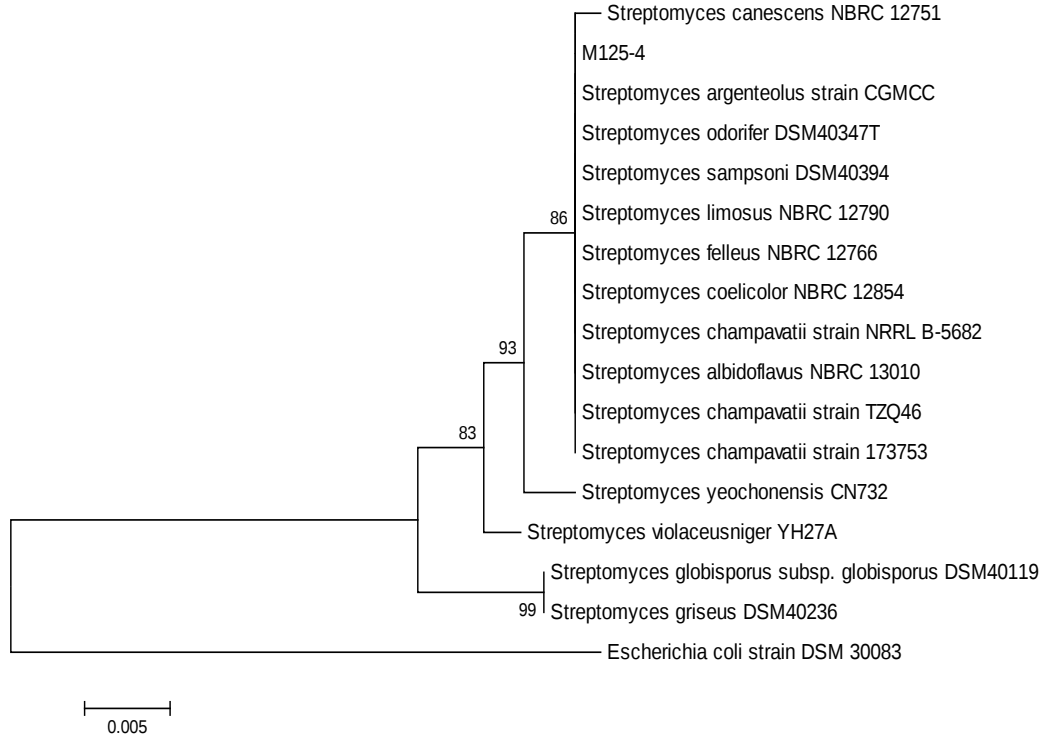
Şekil 5.6 M125 – 4 izolatının farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği

İzolatın sıcaklık, tuz ve pH toleransı, karbon kaynağı olarak şeker kullanımı gibi çeşitli biyokimyasal karakteristiklerinin belirlenmesi amacı ile Bölüm 4.5.6’da anlatılan yöntemler kullanılmıştır. M125-4 izolatının geniş bir pH aralığı olan pH 6 – 12 aralığında yaşayabildiği belirlenmiştir (Şekil 5.7). Alkolotolerant M125-4’ün optimum büyüme gösterdiği sıcaklık 30°C olarak tespit edilmiştir. İzolatın tuz toleransının % 12 gibi oldukça yüksek bir değer olduğu yapılan testler ile açığa çıkarılmıştır (Şekil 5.7). İzolatın kullandığı şekerleri belirlemek amacı ile 4 No’lu besiyerine yalnız glikoz, sukroz, ksiloz, inositol, mannitol, fruktoz, ramnoz, rafinoz ve selüloz içeren petriler hazırlanmıştır. Buna göre organizmanın karbon kaynağı olarak glikoz, mannitol ve fruktozu kullanabildiği belirlenmiştir.



Şekil 5.7 M125 – 4 izolatının farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği a) 4 No’lu besiyeri pH12, b) 4 No’lu besiyeri % 12 NaCl

Organizmanın 16S rDNA dizi analiz sonucu esas alınarak filogenetik ağacı çizilmiştir (Şekil 5.8). Buna göre; genel olarak 5 küme altında toplanan *Streptomyces* sp. türleri (*Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces violaceusniger* ve *Streptomyces yeochonensis*) arasında izolat M125-4'ün, *Streptomyces albidoflavus* kümesine dahil olduğu görülmüştür (Kumar and Goodfellow, 2010).



Şekil 5.8 M125-4'ün 16S rDNA sekans analiz sonucuna dayanılarak çizilen filogenetik ağaç

İzolatin, *S. albidoflavus* kümesinde yer alan 9 adet organizmadan hangisine daha yakın olduğunu belirlemek amacı ile türlerin çeşitli mikroskopik ve biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Seçilen 9 organizmanın tip türlerinin karakteristik özellikleri, DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – kataloğundan yararlanılarak elde edilmiştir (*Streptomyces canescens* DSM40001, *Streptomyces felleus* DSM40130, *Streptomyces limosus* DSM131, *Streptomyces globisporus* DSM40199, *Streptomyces coelicolor* DSM40233, *Streptomyces odorifer* DSM347, *Streptomyces sampsonii* DSM40394, *Streptomyces albidoflavus* DSM40455, *Streptomyces champavatii* DSM40841).

Çizelge 5.2’de seçilen 9 tip türün, izolat M125-4 ile karşılaştırılması net bir şekilde görülmektedir. Buna göre; organizmaların ISP ortamlarında oluşturdıkları havasal misel rengi karşılaştırıldığında izolat M125-4’ün en çok *S. albidoflavus* DSM40455 ve *S. champavatii* DSM40841 ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Mikroorganizmaların spor zincir yapısının ve spor yüzey yapısının, *S. globisporus* DSM40199 hariç hepsinin rectiflexibilis tip zincir yapısı ve pürüzsüz spor yüzey yapısı gösterdiği belirlenmiştir. Karşılaştırma yapılan 9 tip tür organizmada olduğu gibi, izolat M125-4’te de sporangia ve fragmentasyon yapısı oluşmadığı görülmüştür.

Streptomisetlerin tanısında önemli bir kriter olan melonoid pigment oluşumu açısından negatif olan M125-4 izolatı, bu noktada *S. felleus* DSM40130 ve *S. sampsonii* DSM40394 ile farklılık göstermiştir. Tuz toleransı açısından karşılaştırma yapılan organizmaların hiçbirisi ile benzerlik göstermeyen izolatın % 12,5 gibi oldukça yüksek bir tuz tolerasına sahip olduğu belirlenmiştir. Organizmaların pH ve sıcaklık toleransı açısından görece birbirine yakın değerlere sahip oldukları tespit edilmiştir (pH 5.0-8.0/30°C). Bununla birlikte, izolat M125-4 pH 12.0’ye kadar tolerans göstermesi ile diğerlerinden ayrılmıştır.

Karbon kullanımı açısından organizmaların, birbirinden çok farklı özelliklere sahip olması ile beraber benzerlik gösterdikleri noktalarda olduğu belirlenmiştir. İzolat M125-4 glikoz, sukroz, ksiloz, inositol, mannitol, fruktoz, ramnoz, rafinoz ve selüloz içerisinde, sadece glikoz, mannitol ve fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak *S. canescens* DSM40001, *S. felleus* DSM40130, *S. sampsonii* DSM40394 ve *S. champavatii* DSM40841 ile benzerlik göstermiştir.

Elde edilen çeşitli deneme sonuçlarına ait veriler incelendiğinde; organizmanın *S. albidoflavus* kümesinde yer aldığı ve bu küme içerisinde kültürel karakteristiklerine göre, en çok *S. champavatii* DSM40841 ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. M125-4 izolatının, *S. champavatii* DSM40841 tip türü ile olan akrabalığı, DNA – DNA hibridizasyon tekniği gibi ileri çalışmalar yapılarak daha iyi anlaşılabilir.

Çizelge 5.2 İzolat M125 – 4 farklı besiyerlerinde büyüme karakteristiği. - , büyüme yok; +, zayıf büyüme; ++, iyi büyüme; *, Havasal ve substrat misel rengi RAL color chart (2012)’a göre belirlenmiştir. a) Havasal misel rengi; b) Substrat misel rengi; c) rectiflexibilis tip spor zincir yapısı; d) data not available; 1, *Streptomyces canescens* DSM40001; 2, *Streptomyces canescens* DSM40130; 3, *Streptomyces limosus* DSM131; 4, *Streptomyces globisporus* DSM40199; 5, *Streptomyces coelicolor* DSM40233; 6, *Streptomyces odorifer* DSM347; 7, *Streptomyces sampsonii* DSM40394; 8, *Streptomyces albidoflavus* DSM40455; 9, *Streptomyces champavatii* DSM40841; 10, M125-4 aktinomiset izolatu.

Karakteristik	<i>S.canescens</i> 1	<i>S.felleus</i> 2	<i>S.limosus</i> 3	<i>S.globisporus</i> 4	<i>S.coelicolor</i> 5	<i>S.odorifer</i> 6	<i>S.sampsonii</i> 7	<i>S.albidoflavus</i> 8	<i>S.champavatii</i> 9	<i>M125-4</i> 10
Besiyerleri										
ISP- 2										
Büyüme	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
HMR ^{a*}	yellow	sparse/ivory	sparse/white	ochre/yellow	sparse /ivory	yellow	spase/white	spase/white	white	white
SMR ^{b*}	yellow/brown	yellow/brown	yellow/brown	oster white	yellow/brown	yellow/brown	yellow	colorless	brown	beige
ISP -3										
Büyüme	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+
HMR	yellow	white/yellow	ivory	oyster white	white	yellow	ivory	none	white	ivory
SMR	yellow	white	yellow	ivory	white	yellow	ivory	colorless	beige	beige
ISP-4										
Büyüme	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
HMR	sparse/white	white	sparse/ivory	light grey	ivory	yellow	spase/white	spase/white	white	white
SMR	yellow	yellow	yellow	green brown	grey green	yellow	yellow	colorless	yellow	colorless
ISP-5										
Büyüme	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
HMR	white	white	white	none	white	white	white	white	yellow	yellow
SMR	yellow/brown	yellow	yellow	ivory	yellow/brown	yellow/brown	yellow	colorless	brown	beige
ISP-6										
Büyüme	-	++	+	+	+	+	+	++	+	++
HMR		white	none	none	none	none	none	white	none	white
SMR		yellow	yellow	sand yellow	yellow/brown	beige	beige	brown	yellow	brown
ISP-7										
Büyüme	-	++	+	+	+	+	+	++	++	++
HMR		white	none	none	none	none	none	sparse/white	white	white
SMR		yellow	yellow	beige	yellow/brown	beige	beige	colorless	yellow	colorless

Karakteristik	<i>S.canescens</i> 1	<i>S. felleus</i> 2	<i>S. limosus</i> 3	<i>S.globisporus</i> 4	<i>S.coelicolor</i> 5	<i>S. odorifer</i> 6	<i>S. sampsonii</i> 7	<i>S.albidoflavus</i> 8	<i>S.champavatii</i> 9	<i>M125-4</i> 10
Spor zincir yapısı	RF ^c	RF	RF	NA ^d	RF	RF	RF	RF	RF	RF
Sporangia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fragmentasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spor yüzey yapısı	smooth	smooth	smooth	NA	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth
Melanoid pigment	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Tuz toleransı	% 5	% 7,5	% 7,5	NA	% 7,5	%2,5	% 7,5	% 7,5	% 2,5	% 12,5
pH toleransı	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 5-8	pH 6-12
Sıcaklık toleransı	30°C	30°C	30°C	28°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Karbon kullanımı										
Glikoz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sukroz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Fruktoz	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Ramnoz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Selüloz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tanımlama çalışması sonucunda, *Streptomyces* sp. M125-4 için elde edilen diziler aşağıda verilmiştir (Çizelge 5.3). NCBI (National Center for Biotechnology Information) web sayfasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) nükleotid dizi veri bankası kullanılarak BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılmış ve izolatın *Streptomyces* genusu üyesi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen 16S rDNA dizisi NCBI nükleotid veri bankasına BankIt JX000224 numarası ile kaydettirilmiştir. Çizelge 5.3'te görülen 16S rDNA dizisi kayıt altına alınmıştır.

Çizelge 5.3 M125-4 izolatının 16S rDNA kısmi dizisi

```
CCAATCCGAAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCG
GGTGTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTC
ACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGC
AGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTGGAGATTGCTCCACCTCACGGTATCGC
AGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATG
ACTTGACGTGTCCTCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCCGTGAGTCCCA
GCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCAC
AAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGAAGGTTCTTC
GCGTTGCGTTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTT
TGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGC
ACGGACAACGTGGAATGTTGCCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGAATACC
AGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCA
GAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCA
GGAATTCCGATCTCCCCTACCGAAGTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGG
TTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCA
ATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTAC
AACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTG
CAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGG
CCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCACTACCTCACCA
ACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTACACCATCCACCAT
GCGGCAGACGGTCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCAGAGTGCA
GGGCAGATTGCCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTAATCCCCGCCCGAAAGCGGT
TCATCGTCACTGCATGGTAAGCACGCCGGCCCAAGTTTTA
```

5.3. Optimizasyon Çalışmaları

Keratinaz üretimi üzerine etkili olan 3 farklı parametrenin (sıcaklık, pH, zaman) yanıt yüzeyi yöntemi ile, tavuk tüyü optimizasyonu OVAT ile Bölüm 4.4'te verilen bilgiler çerçevesinde yapılmıştır.

5.3.1. İnkübasyon süresi, pH ve sıcaklığın optimizasyonu

YYY tasarımı sonucunda herbir deney setine karşılık gelen ve tasarım tarafından beklenen keratinaz aktivitesi (Bkz. Bölüm 4.6) Çizelge 5.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.4 Keratinaz enziminin üretim koşullarının 2^3 Merkezi Tümlşik Tasarım ile optimizasyon sonuçlarının gösterilmesi

Deney no	Değişkenlerin kodlanmış seviyeleri			Keratinaz aktivitesi (U/ml)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Elde edilen cevap	Beklenen cevap
1	-1	-1	-1	2,87	5,70
2	+1	-1	-1	5,51	5,76
3	-1	+1	-1	12,06	9,87
4	+1	+1	-1	1,55	0,21
5	-1	-1	+1	2,29	0,43
6	+1	-1	+1	9,60	8,59
7	-1	+1	+1	3,83	4,60
8	+1	+1	+1	4,84	3,04
9	-2	0	0	8,59	8,33
10	+2	0	0	5,29	7,08
11	0	-2	0	5,04	4,39
12	0	+2	0	1,06	3,23
13	0	0	-2	5,21	4,95
14	0	0	+2	1,12	2,90
15	0	0	0	9,65	11,29
16	0	0	0	12,63	11,29
17	0	0	0	11,39	11,29
18	0	0	0	12,15	11,29
19	0	0	0	11,65	11,29
20	0	0	0	10,56	11,29

Yanıt değerlerinin analizi ve yorumlanması için varyans analizi (analysis of variance - ANOVA) yapılmıştır (Çizelge 5.5). Yüzey yanıt modelinin varyans analizine göre F değeri 9.45 olarak belirlenmiştir. Regresyon eşitliği ile açıklanan varyasyon miktarının bir ölçüsü olan F değerinin büyük olması; model sonucunda

elde edilen eşitliğin, sonuçları anlamlı bir şekilde açıklama olasılığının da büyük olduğunu ifade eder. Varyans analizinde p – değerinin (Prob>F) 0.05’ten küçük çıkması modelin ‘significant’ yani anlamlı olduğunu göstermiştir. Buna göre modelde; X_1X_2 , X_1X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 anlamlı olan terimlerdir. Model F değerinin bu derece büyük olması, sadece % 0.06 şans ile tasarıma dahil edilmeyen faktörlerden kaynaklanabilir. Model tarafından açıklanan varyasyonların bir ölçümü olan R^2 değeri 0,8730 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.5 Tasarımın Varyans Analizi (ANOVA)

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F değeri	p değeri Prob > F	
Model	287.5	8	34.82	9.45	0.0006	Anlamlı
X_1 (pH)	1.9	1	1.9	0.52	0.4873	
X_2 (sıcaklık)	1.61	1	1.61	0.44	0.5225	
X_3 (zaman)	5.07	1	5.07	1.37	0.2658	
X_1*X_2	47.27	1	47.27	12.83	0.0043	
X_1*X_3	32.81	1	32.81	8.90	0.0124	
X_1^2	23.20	1	23.20	6.30	0.0290	
X_2^2	100.86	1	100.86	27.37	0.0003	
X_3^2	97.74	1	97.74	26.52	0.0003	
<i>Uyum eksikliği</i>	34.65	6	5.77	4.91	0.0509	Anlamsız
<i>Saf hata</i>	5.89	5	1.18			
Genel	319.12	19				
Std Sapma	1.92		R^2		0.8730	
Ortalama	6.84		R^2_{adj}		0.7806	
C. V. %	28.05		R^2_{pred}		0.3888	
Duyarlılık	195.06		A_{deg} Duyarlılığı		8.606	

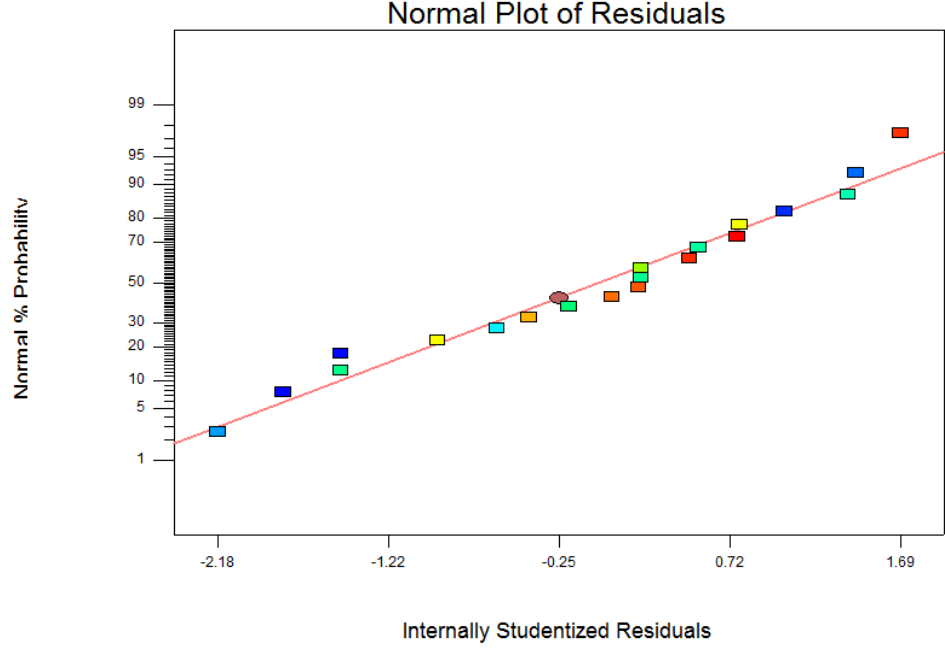
Deneysel sonuçlara göre elde edilen denklem şu şekildedir;

$$y_1 = 6.3952X_1 + 3.9235X_2 + 3.2058X_3 - 0.1571X_1X_2 + 0.5455X_1X_3 - 0.2929X_1^2 - 0.0478X_2^2 - 0.8184X_3^2 - 75.5965$$

Yukarıda verilen denkleme göre; y tahmin edilen enzim aktivite değerini, X_1 , X_2 , X_3 ise sırası ile pH, sıcaklık ve zaman değişkenlerinin kodlanmış değerlerini ifade eder.

Bir modelin uygunluğu, model ile veriler arasındaki korelasyonun derecesine bağlı olmakla birlikte hata dağılımının niteliğine de bağlıdır. Hataların lineer dağılımı, bu hataların belirli olasılık bölgelerinde yoğunlaşmadığını gösterir. Yani hata dağılımının lineer olmasıyla modelin daha uygun olduğu

söylenbilir. Şekil 5.9’da gösterilen hata dağılımı modelin uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.9 Hata dağılım grafiği.

Şekil 5.10’de, pH – sıcaklık etkileşiminin zaman ile değişiminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Zaman 4 – 4,5 gün aralığında tutulduğunda, her iki faktör içinde optimum koşulların grafikte net bir şekilde görülebildiği gözlenmiştir. Buna göre; pH’nın nötralden hafif bazik bölge olan pH 8.5’e kadar aktiviteye olumlu etki ettiği, sıcaklığın ise 23 ile 31°C’ye kadar aktiviteyi pozitif etkilediği belirlenmiştir. Buna karşın yüksek sıcaklık ve düşük pH değerinin enzim aktivitesinde çok hızlı bir düşüşe neden olduğu açık bir şekilde grafikten anlaşılmaktadır.

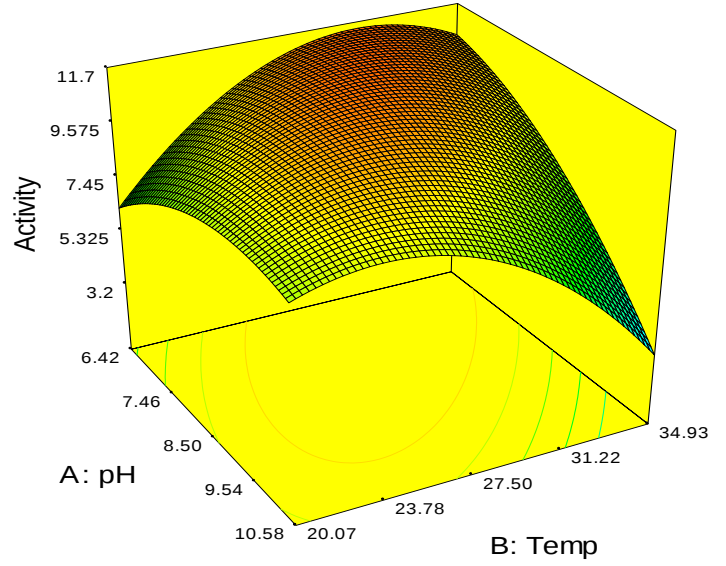
Şekil 5.11’de, pH – zaman etkileşiminin sıcaklık ile değişiminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Sıcaklık 30°C’de tutulduğunda, her iki faktör için de optimum koşulların grafikte net bir şekilde görülmüştür. Buna göre; pH’nın nötralden hafif bazik bölge olan pH 8.5’e kadar aktiviteye olumlu etki ettiği, zamanın 4.5 ile 5 güne kadar aktiviteyi pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca pH sıcaklık ile olduğu gibi zaman parametresiyle de benzer bir değişim grafiği göstermiştir.

Design-Expert® Software

Activity
 12.6321
 1.05644

X1 = A: pH
 X2 = B: Temp

Actual Factor
 C: Time = 4.28



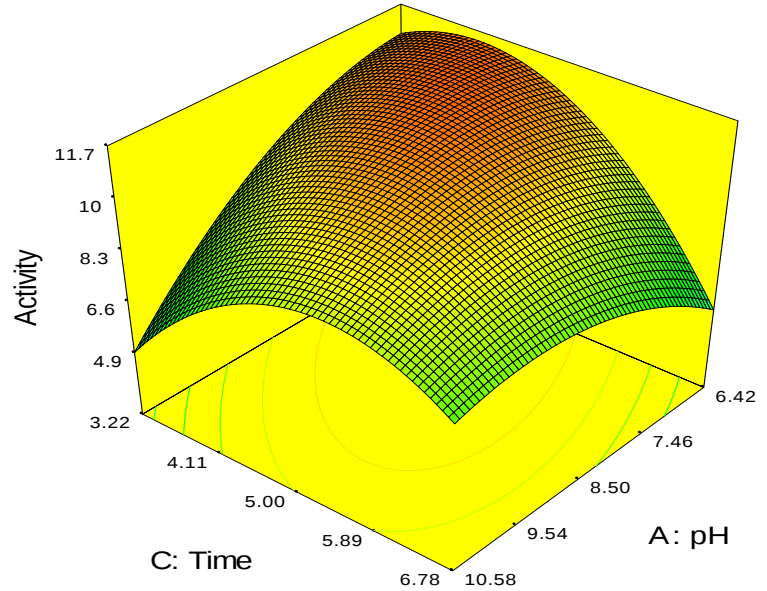
Şekil 5.10 pH – Sıcaklık etkileşiminin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software

Activity
 12.6321
 1.05644

X1 = A: pH
 X2 = C: Time

Actual Factor
 B: Temp = 29.11

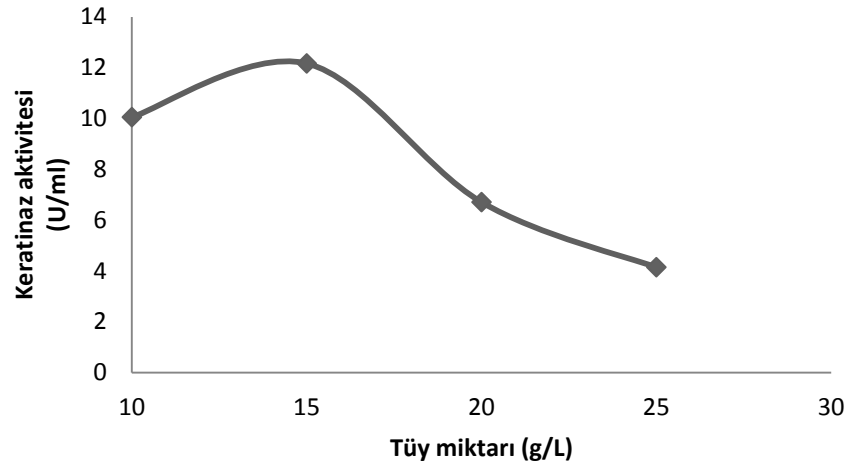


Şekil 5.11 pH – zamanın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Yüzey yanıt metodolojisi ile yapılan tasarım sonucunda elde edilen sonuçlara göre 0.903 tercih edilme değeri ile, enzim aktivitesinin optimum olduğu üretim koşulları pH 7.0'de, 30°C'de, 4 gün olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yapılan üretim sonucunda tahmini elde edilecek enzim aktivite değeri model tarafından 11.5 U/ml olarak belirlenmiştir. Doğrulama için yapılan denemede enzim aktivitesi 9.9 U/ml çıkmıştır. Elde edilen değer model tarafından belirlenmiş alt ve üst sınır değerleri olan 9.75 – 13.26 U/ml aralığına belirlenmiş ve model doğrulanmıştır.

5.3.2. Substrat olarak tavuk tüyü optimizasyonu

Tavuk tüyünün optimizasyonu Bölüm 4.5.2'de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. YYY ile belirlenen koşullarda (pH 7.0, 30°C ve 4 gün) yapılan fermentasyon sonucunda her bir tavuk tüy miktarına karşılık gelen keratinaz aktivitesi hesaplanıp değerlendirilmiştir. Şekil 5.12'de görüldüğü gibi ortamdaki tüy miktarı 15 g/L olduğunda yukarıda belirtilen koşullarda maksimum 12.1 U/ml keratinaz aktivitesi elde edilmiştir.



Şekil 5.12 Karbon ve azot kaynağı optimizasyonu.

Tavuk tüyü (15g/L) ile elde edilen en yüksek enzim aktivite değeri (12.1 U/ml) YYY yönteminin vermiş olduğu 9.75 – 13.26 U/ml aralığında kalmıştır. Bu aşamada 4 günün sonunda erlenlere konulan farklı miktarlardaki tüm tüyler parçalanıp kullanılarak biyokütleyle dönüştürülmüştür. Ancak enzim

aktivitelerinde büyük bir artış oluşmamıştır. Daha fazla tavuk tüyünün biyokütleye dönüştürülmesinde bu veriler kullanılabilir. Böylelikle proseste hem çok daha fazla tavuk tüyünün biyodönüşümü sağlanmış hemde keratinaz üretim verimi korunmuş olacaktır.

Optimizasyon çalışmaları ile;

- Keratinaz üretiminde optimize olmayan koşullara göre yaklaşık % 50'lik bir artış
- Proses süresinin 6 günden 4 güne düşürülmesi sağlanmıştır.

Sonuç olarak optimizasyon çalışmaları ile olası büyük çapta üretim optimizasyonu için temel bilgiler sağlanmıştır. Bu tür optimizasyon çalışmalarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli nokta proses ekonomisidir. Laboratuvar ölçeğinde düşük olan maliyetler, ölçek büyüdükçe fazlası ile artmaktadır. Yapılan optimizasyon çalışmasında pH'nın nötral koşullara çekilmesi ile pH ayarlamak için kullanılacak olan NaOH miktarı azaltılmış ve dolayısıyla maliyetler düşürülmüştür.

5.4. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Saflaştırma aşamasında 3,5 L fermentasyon sıvısı kullanılmıştır. İlk aşamada hücrelerinden santrifüjle ayrılan fermentasyon sıvısı ultrafiltrasyon ile yoğunlaştırılmıştır. (Bkz. Bölüm 4.9). Hacmi 1 L'ye indirilerek 3,5 kat deriştirilen fermentasyon sıvısına % 80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Üst sıvıdan amonyum sülfat çöktürme basamağı ile 4,8 saflaştırma faktörü ve % 40.3 verimlilik ile elde edilen enzim lizatu, 4°C'de saf suya karşı 48 saat diyalizlenmiştir (Çizelge 5.6). Daha sonra örnek, ileri saflaştırma basamağı olan iyon değişim kromatografisine uygulanmıştır (Bkz. Bölüm 4.9.4). Elüsyon tamponu ile kolona 0,15 M – 0,30 M tuz gradienti uygulanarak toplanan 60 fraksiyonun her birinin keratinaz aktivitesine bakılmıştır. En yüksek aktivite gösteren 20 ile 28. fraksiyonlar birleştirilerek membran çapı 10 kDa olan santrifugal filtre ile ultrafiltre edilmiştir. *Streptomyces* sp. M125-4 suşundan izole edilen keratinaz enzimi, iyon değişim kromatografi kolonundan elüsyon sonucunda % 13.7 verimlilik ile 44.1 kat saflaştırılabilmektedir.

Çizelge 5.6 Enzimin saflaştırma basamakları

Adım	Total aktivite (Unit)	Total protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma Faktörü (kat)	Verim (%)
Kültür üst sıvısı	1460.5	260	5.6	1	100
% 80 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	585.6	21.5	27.2	4.8	40.3
DEAE kolon fraksiyonları	80.6	0.325	247.9	44.1	13.7

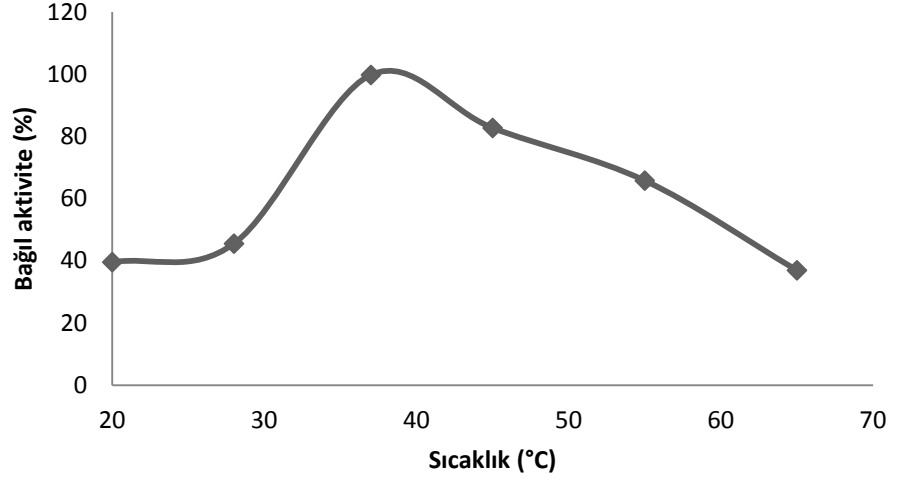
Bugüne kadar birçok farklı kaynaktan keratinaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Jaouadi ve arkadaşları (2010), *Streptomyces* sp. SP1'den elde ettikleri keratinazı 4 basamakta, % 24 verim ile 86 kat saflaştırmışlardır. Başka bir çalışmada Long ve arkadaşları (2010), *Chryseobacterium* L99 sp.'den elde ettikleri keratinazı 3 basamakta, % 29 verim ile 10 kat saflaştırmışlardır. Tatineni ve arkadaşları *Streptomyces* sp. S7'den elde ettikleri keratinazı 2 basamakta % 66.7 verimle 2.5 kat saflaştırmışlardır. Yaptığımız çalışmada 2 basamakta % 13.7 verimlilik ile 44.1 kat saflaştırılmış keratinaz elde edilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar literatürde varolan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, verimin görece düşük, fakat buna karşılık saflaştırma faktörünün görece yüksek olduğu görülmektedir. Bunun özellikle, % 80 (NH₄)₂SO₄ çöktürme veriminin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer çalışmalarda elde edilen keratinazlar, amonyum sülfat çöktürme basamağı ile sırası ile % 81, 69 ve 94.6 verim ile 9, 1.7 ve 1.1 kat saflaştırılırken bizim çalışmamızda bu basamak ile % 40 verim ve 4.8 kat saflaştırma faktörü elde edilmiştir. Enzimin moleküler kütlesinin küçük olması, bu sonucun nedenlerinden biri olarak düşünülmüştür. Diyaliz sonrasında çöken proteinlerin etkin bir şekilde çözündürülüp diğer basamağa dahil edilememesi bu sonuç için bir başka neden olabilir.

5.5. Enzim Karakterizasyonu

5.5.1. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi

Streptomyces sp. M125 – 4 izolatından üretilen keratinaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacı ile 20 – 65°C'de keratinolitik aktivite ölçülmüştür (Bkz. Bölüm 4.10.1). Buna göre enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir (Şekil 5.13). Enzim 45 ile 55°C arasında iyi aktivite gösterirken 65°C'de aktivite de düşüş olduğu görülmüştür.

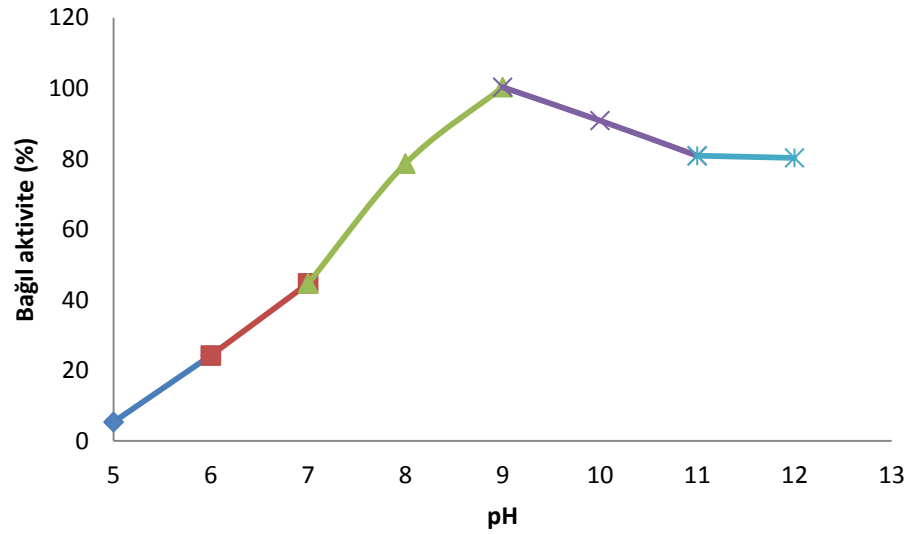
Daha düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesinin görece daha az olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.13 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Literatüre bakıldığında farklı organizmalardan üretilmiş keratinazların optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının 37°C ile 60°C arası değiştiği görülür. Bu çalışmada izole edilen mezofilik *Streptomyces* sp. M125 – 4 suşu yine mezofilik bir sıcaklıkta optimum aktivite gösteren keratinaz üretmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen veriler ile literatürde varolan çalışmalar arasında uyum olduğu görülmektedir (Bressolier et al., 1999; Tatineni et al., 2008).

Keratinaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenebilmesi için 5 farklı tampon sistemi kullanılmıştır (Bkz. Bölüm 4.10.1). Buna göre pH 5.0 – 12.0 aralığında keratinolitik aktivite ölçülmüş ve enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin pH 9.0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.14). Enzimin yüksek pH değerlerinde (pH 10, 11 ve 12) düşük pH değerlerine göre daha iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda *Streptomyces* sp. M125-4'ten üretilen keratinazın alkali özellikte olduğu söylenebilir.



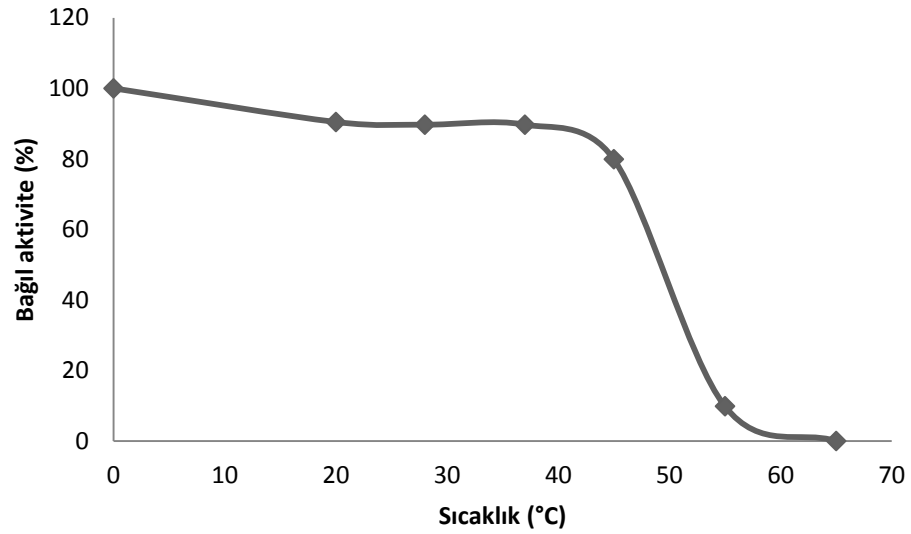
Şekil 5.14 pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi. pH 5.0 – 6.0 sitrat tamponu; pH 6.0 – 7.0 fosfat tamponu; pH 7.0 – 9.0 Tris – HCl tamponu; pH 9.0 – 11.0 karbonat – bikarbonat tamponu; pH 11.0 – 12.0 KCl – NaOH tamponu.

Bugüne kadar *Streptomyces* türlerinden optimum pH değeri türden türe farklılık gösteren birçok keratinaz üretilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde üretilen keratinazların birçoğunun alkali özellik gösterdiği görülmüştür. Böckle ve arkadaşları (1995) *Streptomyces pactum* türünden izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 7.0 ile pH 10.0 arasında değiştiğini, Bressollier ve arkadaşları (1999) *Streptomyces albidoflavus* türünden izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 6.0 ile pH 9.0 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Chitte ve arkadaşları (1999) *Streptomyces thermoviolaceus* türünden izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 8.0, Chitte ve arkadaşları (1999) *Streptomyces thermoviolaceus* türünden izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 8.0, Tatineni ve arkadaşları (2008) *Streptomyces* sp. S7 suşundan izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 11.0, Syed ve arkadaşları (2009) *Streptomyces gulbagensis* DAS 131 suşundan izole ettikleri keratinazın optimum pH değerini pH 9.0 olarak belirlemişlerdir.

5.5.2. Sıcaklık ve pH kararlılığının belirlenmesi

Enzimin farklı sıcaklıklara olan kararlılığını belirlemek amacı ile elde edilen preparat 20, 28, 37, 45, 55 ve 65°C'de 1 saat inkübe edilmiştir (Bkz. Bölüm

4.10.2). Enzimin 45°C'ye kadar aktivitesini % 80 düzeyinde koruduğu görülmüştür (Şekil 5.15). Fakat sıcaklık 55°C'ye yükseltildiğinde enzim aktivitesinin % 10 düzeyine kadar düştüğü tespit edilmiştir. 65°C'de ise aktivitenin tamamen yok olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, enzimin 20 – 45°C aralığında gerçekleştirilen biyoteknolojik proseslerde kullanılabileceğini göstermiştir.

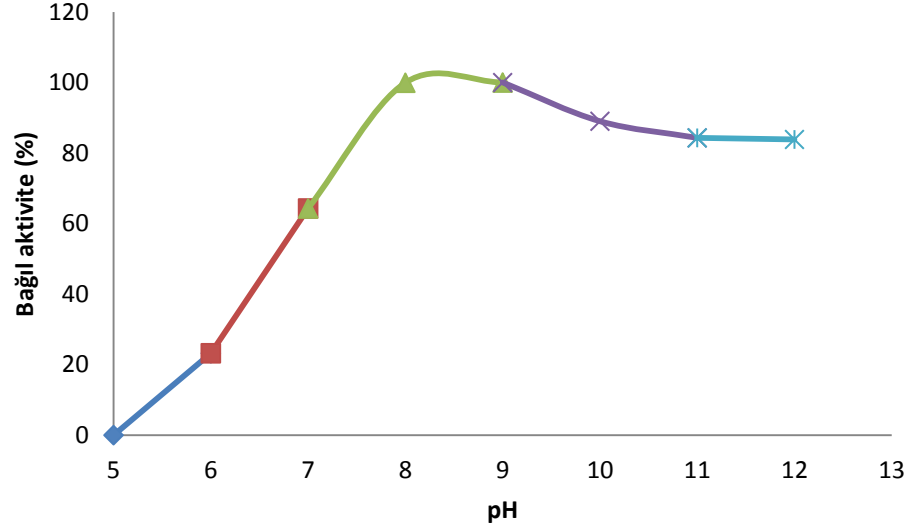


Şekil 5.15 Sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine etkisi

Streptomyces albidoflavus türünden izole edilen keratinazın 50°C'de, 1 saatte % 80 düzeyinde aktivitesini koruduğu (Bressollier et al., 1999), benzer şekilde *Streptomyces* sp. S7 suşundan izole edilen keratinazın 50°C'de, 1 saatte % 80 düzeyinde aktivitesini koruduğu (Tatineni et al, 2008) ve *Streptomyces gulbagensis* DAS 131 suşundan izole edilen keratinazın 60°C'de, 2 saatte % 40 düzeyinde aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Long et al, 2010).

Enzimin farklı pH'lara olan kararlılığını belirlemek amacı ile elde edilen preparat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'de 1 saat inkübe edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.10.2). Enzim pH 8 – 12 aralığında aktivitesini % 84 oranında korumuştur (Şekil 5.16). Daha düşük pH değerleri olan pH 6 ve pH 7'de enzim aktivitesini, sırası ile % 23 ve % 64 oranında korumuştur. pH 5'te ise aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Bu sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda enzimin pH 7 ile pH 12 arasında gerçekleştirilen proseslerde kullanılabileceği öngörülmektedir. Özellikle

yüksek pH değerlerinde aktivitenin kararlı kalması nedeni ile enzimin alkalifilik koşullarda başarı ile kullanılabileceği görülmüştür.

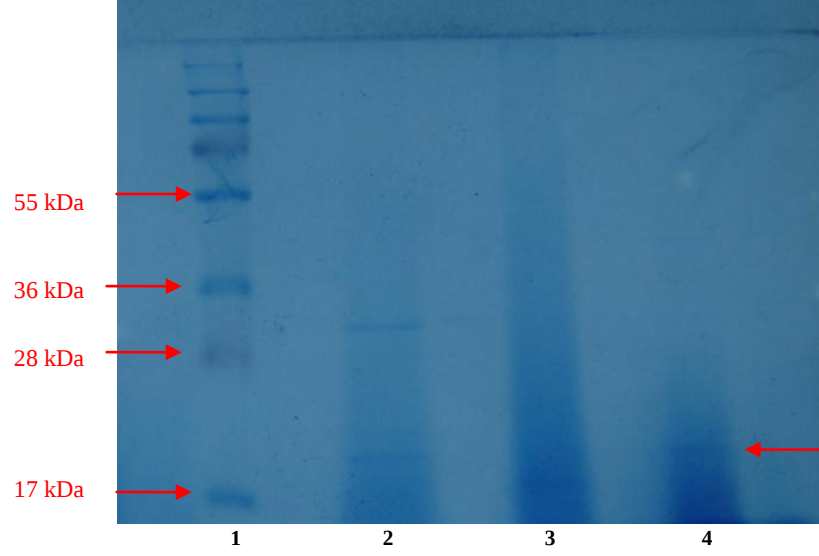


Şekil 5.16 pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi. pH 5.0 – 6.0 sitrat tamponu; pH 6.0 – 7.0 fosfat tamponu; pH 7.0 – 9.0 Tris – HCl tamponu; pH 9.0 – 11.0 karbonat – bikarbonat tamponu; pH 11.0 – 12.0 KCl – NaOH tamponu.

Birçok araştırmacı keratinaz enziminin değişik pH'lardaki kararlılığı üzerine araştırma yapmıştır. Bressollier ve arkadaşları (1999) *Streptomyces albidoflavus* türünden izole ettikleri keratinazın pH 7.0 ile pH 12.0 arasında kararlılığını % 90 oranında koruduğunu, Tatineni ve arkadaşları (2008) *Streptomyces* sp. S7 suşundan izole ettikleri keratinazın pH 9.0 ile pH 12.0 arasında kararlılığını % 80 oranında koruduğunu, Syed ve arkadaşları (2009) *Streptomyces gulbagensis* DAS 131 suşundan izole ettikleri keratinazın 7.0 ile pH 9.0 arasında kararlılığını % 80 oranında koruduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen veriler ile literatürde varolan çalışmalar arasında uyum olduğu görülmüştür.

5.5.3. Moleküler kütle tayini (SDS – PAGE)

Enzimin moleküler kütlesini belirlemek amacı ile SDS – PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel) yapılmıştır (Bkz. Bölüm 4.10.3). Saflaştırma basamakları sonrasında elde edilen keratinazın moleküler kütlesi yaklaşık 20 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 5.17).



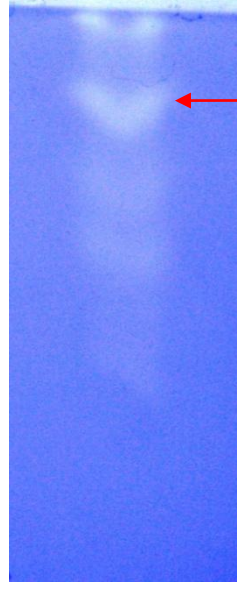
Şekil 5.17 Keratinazın molekül kütle tayini. 1) Marker, 2) Fermentasyon sıvısı, 3) Amonyum sülfat çöktürme sonrası, 4) DEAE kolon fraksiyonu

Yapılmış çalışmalar incelendiğinde farklı keratinaz üreticisi *Streptomyces* sp. türlerinden değişik moleküler kütleyle sahip enzimlerin üretildiği görülmüştür. Tatineni ve arkadaşları (2008) karakterize ettikleri keratinazın 44 kDa molekül kütlesine sahip olduğunu, Xie ve arkadaşları (2010) *Streptomyces* sp. strain 16'dan elde ettikleri 4 farklı keratinazın sırası ile 203, 100, 31 ve 19 kDa molekül kütlesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yine yapılan bir başka çalışmada ise; Bressollier ve arkadaşları (1999) *Streptomyces albidoflavus* K₁-02'tan karakterize ettikleri keratinazın 18 kDa moleküler kütleyle sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler ile çalışmamızda elde ettiğimiz veriler arasında bir uyum gözlemlenmiştir.

5.5.4. Zimogram

Saflaştırılan enzimin jelde aktivitesini belirlemek amacı ile zimogram yapılmıştır (Bkz. Bölüm 4.10.4). Jelde, izole edilen enzim tarafından jelatinin parçalanması ile oluşan zon net bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 5.18).

Literatürde, enzimin jelde aktivitesini belirlemek amacı ile farklı substratlar kullanılarak yapılmış birçok zimogram çalışması vardır (Tiway et al., 2010; Jaouadi et al., 2010; Tatineni et al., 2008).



Şekil 5.18 Keratinazın zimogram analizi.

5.5.5. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi

Enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile çeşitli inhibitörler, metal iyonları, deterjan ve organik çözügenler farklı derişimlerde enzimatik reaksiyona ilave edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.10.4). Ön inkübasyon sonrasında kontrole karşı kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Çizelge 5.7).

Serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin (5 mM) keratinolitik aktiviteyi tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuç enzimin serin proteaz karakterde olduğunu göstermektedir. *Streptomyces* sp. türlerinden elde edilmiş birçok keratinazın serin proteaz olması, elde edilen verinin yapılmış çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermiştir (Böckle et al., 1995; Bressolier et al., 1999; Tatineni et al., 2008; Xie et al., 2010). Metalloproteaz grubu enzimlerin aktivite gösterebilmesi için gerekli olan iki değerlilikli iyonların şelatlanmasına neden olan EDTA ve EGTA'nın, enzime 10 ve 1.0 mM derişimde uygulanması sonrasında aktivitenin sırası ile % 82 ve % 85 oranında korunduğu belirlenmiştir. Buna göre enzimin metalloproteaz karakterde olmadığı tespit edilmiştir. Leke çıkarıcı olarak deterjanlara eklenen bu tür ajanlara karşı enzimin hassasiyet göstermemesi potansiyel uygulama alanları için önem teşkil etmektedir. İndirgeyici ajan olan DTT'nin (1.0 mM) ve β – merkaptöetanol'ün (0.25 M)

enzime uygulandıktan sonra keratinolitik aktiviteyi sırası ile % 140 ve % 93 oranında değiştirdiği belirlenmiştir.

Çizelge 5.7 Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi

Çeşitli kimyasal ajanlar	Derişim	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	-	100
PMSF	5.0 mM	0
DTT	1.0 mM	140
EDTA	10 mM	82
EGTA	1.0 mM	85
β – merkaptotanol	0.25 M	93
H₂O₂	% 5	34
Metal iyonları		
Mg⁺² (MgSO₄)	5.0 mM	125
Ca⁺² (CaCl₂)	5.0 mM	95
Zn⁺² (ZnSO₄)	5.0 mM	96
Ba⁺² (BaCl₂)	5.0 mM	126
Fe⁺² (FeSO₄)	5.0 mM	93
Deterjanlar/Organik solventler		
SDS	% 0.5	12
Triton X – 100	% 2.5	105
Tween 80	% 5	82
Metanol	% 50	86
Etanol	% 50	84
Bütanol	% 50	84
Isopropanol	% 50	65
Asetonitril	% 50	105
Etil asetat	% 50	133
DMSO	% 50	159

Bugüne kadar yapılmış birçok çalışmada DTT, β – merkaptotanol, sodyum sülfid gibi indirgeyici ajanların keratinolitik aktiviteyi arttırdığı rapor edilmiştir (Gupta and Ramnani, 2006). Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi bu sonuçlar, bu tür ajanların ortamda bulunmaması durumunda etkin bir parçalama gerçekleştiremeyen saflaştırılmış keratinazların indirgeyici ajanlara olan ilgisini de destekler niteliktedir.

Metal iyonlarından olan Mg⁺² (MgSO₄), Ca⁺² (CaCl₂), Zn⁺² (ZnSO₄), Ba⁺² (BaCl₂), Fe⁺² (FeSO₄) enzime 5 mM derişimde uygulandıktan sonra aktivitenin sırası ile % 125, %95, % 96, % 126 ve % 93 oranında değiştiği gözlemlenmiştir. Enzimin endüstriyel uygulamaları için bu tür ajanlara olan dayanıklılığı çok önemlidir. Çünkü enzimin substratı olan keratinin yapısındaki disülfid bağlar bu tür ajanlar kullanılarak zayıflatılabilmekte ve böylece enzimin substrat üzerinde daha etkili olması sağlanmaktadır. Ağartıcı bir ajan olan

H₂O₂'nin (% 5) enzime uygulanmasından sonra aktivitenin % 34 oranında korunduğu ortaya çıkmıştır. Literatüre bakıldığında bu tür ajanlara karşı aktifliğini koruyan sadece birkaç proteaz grubu enzimin var olduğu görülmüştür (Gupta et al., 2002; Jaouadi et al., 2008). Enzimin bu özelliği protein mühendisliği alanında öne çıkmasına neden olabilir (Radha and Gunasekaran, 2008). Güçlü anyonik sürfektan olan SDS'e (% 0.5) karşı enzim aktivitesini ancak % 12 düzeyine kadar koruyabilmiştir. Tatineni ve arkadaşları (2008), *Streptomyces* sp.'den karakterize ettikleri keratinaz enziminin, ortamda % 0.1 ve % 0.5 SDS varlığında aktivitesinin sırası ile % 38 ve % 20 düzeyine kadar korunabildiğini belirlemişlerdir. Kimyasal ajanlardan Triton X – 100 (% 2.5) ve Tween 80 (% 5) enzime uygulandıktan sonra aktivitenin sırası ile % 105 ve % 82 oranında değiştiği gözlemlenmiştir. Farklı organik çözümler, enzim aktivitesi üzerine farklı etkiler göstermiştir. DMSO, Asetonitril ve etil asetat ile muamele sonucunda enzim aktivitesinin sırası ile % 159, % 105 ve % 133 oranında arttığı belirlenmiştir. İsoopropanol ile muamele sonucunda aktivite % 65'e düşerken metanol, etanol ve bütanol ile muamele sonucunda aktivite sırası ile % 86, % 84 ve % 85 oranında korunmuştur. Enzim aktivitesinin organik çözümlere karşı olan kararlılığının yüksek olması enzimin, düşük su derişimlerinde peptit sentezinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu sonuçlar, enzimin saflaştırma basamaklarında amonyum sülfat çöktürmesine alternatif olarak organik solvent ile çöktürme yolu ile elde edilebileceğini göstermiştir.

5.5.6. Enzimin substrat özgüllüğünün belirlenmesi

Enzimin substrat özgüllüğü Bölüm 4.10.6'da anlatılan yöntemle göre belirlenmiştir. Enzimin çözünür (kazein, BSA ve skim milk) ve çözünmeyen (tüy, yün) substratlar üzerindeki etkisi; substratların yapısal farklılıklarına göre değişkenlik gösterdiğinden her iki grup için hesaplanan spesifik aktivite kendi içinde değerlendirilmiştir. Benzer şekilde sentetik peptit üzerinde enzimin gösterdiği etkinlik yine kendi içinde değerlendirilmiştir.

Kısmi saf keratinazın çözünür substratlar arasında en yüksek aktiviteyi kazein üzerinde gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.8). Çözünmez keratin substratlarından olan tavuk tüyü ve koyun yünü üzerinde enzimin tavuk tüyünde

daha etkin bir parçalama gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Literatürde, keratinazların substrat seçiciliğinin belirlenmesinde doğal substratlar ile yapılmış birçok çalışma bulunmuştur (Letourneau et al., 1998; Bressolier et al., 1999; Jaouadi et al., 2010).

Çizelge 5.8 Enzimin substrat özgülüğü.

Substrat	Konsantrasyon	Spesifik aktivite (U/mg)
Doğal protein		
Kazein ^a	% 0.6	151.4
BSA ^a	% 0.6	98.5
Skim milk ^a	% 0.6	29.8
Tüy ^b	% 1.0	60
Yün ^b	% 1.0	35
Sentetik peptit^c		
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-NA	1 mM	618
Suc-(Ala) ₃ -NA	1 mM	-

a: 1 Unit proteolitik aktivite standart koşullarda dakikada açığa çıkan nmol tirozin miktarına eşittir;

b: 1 Unit proteolitik aktivite standart koşullarda saatte açığa çıkan nmol tirozin miktarına eşittir; c:

1 Unit keratinolitik aktivite, standart koşullarda dakikada açığa çıkan nmol pNA miktarına eşittir.

Brandelli (2005)'nin yaptığı çalışmada, *Chryseobacterium* sp. kr6'dan elde edilen keratinazın hem tavuk tüyü hemde koyun yününde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalar arasında, bunun gibi hem tüy hemde yün parçalama özelliğine sahip sadece birkaç keratinaz tanımlanmıştır (Cai et al., 2008; Cao et al., 2009). Karakterize edilen keratinazın bu özelliği, enzimin hem agroendüstri sektöründe hemde deri endüstrisinde kullanılabilir olmasını sağlayabilir. Bununla birlikte enzimin kısıtlı proteolitik ve kazeinolitik aktivitesinden yararlanılıp kazein hidrolizatları elde edilebilir yada proteinler modifiye edilerek bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilebilir (Wang et al., 2003).

Keratinazın Suc-(Ala)₃-NA sentetik peptidi yerine, Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA peptidine yüksek seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Böylelikle, enzimin sentetik substratın P1 ucundaki aromatik fenilalanin (-Phe) kalıntısını tercih ettiği anlaşılmıştır. Literatürde, keratinazların sentetik peptitler üzerindeki spesifitesi hakkında yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Brandelli et al., 2010). Bugüne kadar karakterize edilmiş 14 farklı keratinazdan, 9'nun Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA sentetik peptidine yüksek seçiciliği olduğu belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 2.2.1) (Evans et al., 2000; Bressollier et al., 1999; Kitadokoro et al., 1994; Mitsuiki et al., 2004; Gradisar et al., 2005; Moallaei et al., 2006; Kublanov et al., 2009; Lin et al.,

2009). *S. albidoflavus*'un hidrofobik ve aromatik amino asitlere özgülüğü olan kimotripsin benzeri bir keratinaz ürettiği sentetik peptitler aracılığı ile belirlenmiştir (Bressolier et. al. 1999). Mitsuiki ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA sentetik peptitinde P1 pozisyonunda Alanin yerine Prolin amino asiti geldiğinde, *Nocardiosis* sp. TOA-1'den elde edilmiş NAPase enziminin kcat/Km değerinin 37 kat arttığı belirlenmiştir.

Bu bilgilerden yola çıkarak; çalışma süresince enzimin keratinolitik aktivitesi yüksek seçicilik gösterdiği Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA sentetik peptidi ile izlenmiştir. Bu tür bir yöntemin izlenmesi ile hem saflaştırma basamaklarında çok değerli olan enzim örneği en az hacimde kullanılmış hemde aktivite enzime özgül olarak ölçülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, keratinaz üreten *Streptomyces* sp. M125-4 izolatının istatistiksel YYY ve klasik yöntem kullanılarak derin kültürde üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve üretilen enzim kısmi saflaştırılarak karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu doğrultuda öncelikle, mevcut aktinomiset kültür koleksiyonunda (ACTIN OCC) yer alan izolatlar proteaz etkinlikleri açısından taranmıştır. Ardından iyi üreticiler olan M49-5, M34-2, M49-3, 136K-3, 2M21, M34-1, M49-1, M45-2, M125-4 ve M127-1 izolatları, ön derin kültür fermentasyon çalışmasına alınmış ve keratinaz aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda keratinaz aktivitesi iyi olan M125-4 izolatı ileri çalışmalar için seçilmiş ve çeşitli kültürel, fenotipik, biyokimyasal ve 16S rDNA dizi analizi dikkate alınarak tanılaması yapılmıştır. Öncelikle izolatın 16S rDNA dizi analizi yaptırılmış ve filogenetik ağacı çizilmiştir. Buna göre; izolatın *Streptomyces albidoflavus* kümesinde yer alan *Streptomyces canescens* DSM40001, *Streptomyces felleus* DSM40130, *Streptomyces limosus* DSM131, *Streptomyces globisporus* DSM40199, *Streptomyces coelicolor* DSM40233, *Streptomyces odorifer* DSM347, *Streptomyces sampsonii* DSM40394, *Streptomyces albidoflavus* DSM40455 ve *Streptomyces champavatii* DSM40841 türleri ile yakın akraba olduğu belirlenmiştir. Bu türler ile akrabalık derecelerinin daha iyi anlaşılabilmesi için DSMZ'den elde edilen *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ve *Prokaryotes* kaynaklarına göre hazırlanmış '*Compendium of Actinobacteria*' baz alınarak çeşitli fenotipik ve biyokimyasal testler yapılmıştır (Bkz. Bölüm 5.2.1). İzolatın, NCBI nükleotid veri bankasında *Streptomyces* sp. M125-4 adı ile erişim numarası (JX000224) alınarak 16S rDNA dizisi kayıt altına alınmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında seçilen parametrelerin optimum proses koşulları belirlenmiştir. 3 parametrenin (*pH*, *inokulum miktarı* ve *inkübasyon süresi*) üretim üzerindeki etkisine bağlı olarak optimizasyonu, YYY yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tasarım sonucunda program tarafından öngörülen sonuçların gerçekte elde edilen deneysel sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür (Bkz. Bölüm 5.3). Modelin varyans analizine göre; X_1X_2 , X_1X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 anlamlı olan terimlerdir (X_1 : pH, X_2 : sıcaklık, X_3 : zaman). Modelin R^2 değeri

0,8730 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç model tarafından varyasyonun % 87.3 oranında açıklanabileceğini anlatmaktadır ki bu değer istatistiksel anlamda iyi bir değer olarak yorumlanır. Yapılan modele göre pH – sıcaklık etkileşiminde, yüksek sıcaklık ve düşük pH değerinin enzim aktivitesinde çok hızlı bir düşüşe neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda pH'nın zaman parametresiyle de benzer şekilde etkileştiği belirlenmiştir. **Sonuç olarak YYY ile yapılan dizayna göre; 0.903 tercih edilme değeri ile, enzim aktivitesinin optimum olduğu üretim koşulları pH 7.0'de, 30°C'de, 4 gün olarak belirlenmiştir.** YYY ile belirlenen optimum koşullar altında, keratinaz üretimi için ortamda bulunması gereken tavuk tüyü miktarı optimize edilmiştir. Buna göre, ortamdaki tüy miktarı 15 g/L olduğunda optimum üretim koşullarında maksimum 12.1 U/ml keratinaz aktivitesi elde edilmiştir. **Proseste kullanılan substrat miktarı 2.5 kat arttırılarak hem çok daha fazla tavuk tüyünün biyodönüşümü sağlanmış hemde keratinaz üretim verimi korunmuştur. Sonuç olarak yapılan optimizasyon çalışmaları ile; proses süresi 6 günden 4 güne, üretim ortamının pH değeri bazikten nötrale düşürülmüş ve keratinaz üretiminde yaklaşık % 50'lik bir artış sağlanmıştır.**

Tez çalışması ile endüstride birçok uygulama alanı bulunan keratinazın *Streptomyces* sp. M125-4'ten üretim optimizasyonu yapılmış ve olası büyük çapta üretim optimizasyonu için temel bilgiler sağlanmıştır. Bu çalışma ile streptomisetlerden keratinaz üretim optimizasyonu ile ilgili literatürde varolan az sayıdaki çalışmaya bir yenisi daha eklenmiş ve streptomisetlerin keratinaz üretimi ile ilgili potansiyeli daha iyi anlaşılmıştır.

Optimizasyon sonrası enzimin bazı özelliklerinin incelenerek potansiyel uygulama alanları ve koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. (Bkz. Bölüm 5.4). Bunun için öncelikle 3.5 L fermentasyon sıvısı, ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek 1 L'ye indirilmiş, daha sonra % 80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak enzim % 40.3 verimlilik ile 4.8 kat saflaştırılmıştır. İleri saflaştırma için örnek, DEAE –Polypropylene iyon değişim kromatografisine uygulanmış ve **bunun sonucunda enzim % 13.7 verimlilik ile 44.1 kat saflaştırılabilmektedir.** Buna göre; daha önceden Bölüm 5.4'te anlatıldığı gibi, elde edilen verimin literatürde varolan çalışmalara oranla görece düşük, buna karşılık saflaştırma faktörünün

yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonucu verim açısından iyileştirmek için, amonyum sülfat çöktürme basamağından kromatografi basamağına en az kayıp ile geçiş yapmaya çalışmak iyi olabilir. Bunun için varolan proteinin tamponda en fazla miktarda çözündüğünden emin olunduktan sonra örnek kolona uygulanabilir.

Enzimin karakterizasyonu yapmak için moleküler kütle tayini ve jelde aktivite tayini (zimogram) yapılmış ve optimum aktivite gösterdiği pH, sıcaklık değerleri, sıcaklık ve pH kararlılığı, çeşitli kimyasalların aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. (Bkz. Bölüm 5.5). **Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değeri sırası ile 37°C ve pH 9.0 olarak bulunmuştur. Enzimin aktivitesini 45°C'ye kadar % 80, pH 12'ye kadar % 84 düzeyinde koruduğu tespit edilmiştir. Kısmi saflaştırılan keratinazın SDS-PAGE analizine göre moleküler kütlesi 20 kDa olarak tahmin edilmiştir.** Enzimin jelde, jelatini parçalaması ile oluşan zon net bir şekilde görülmüş ve böylelikle jelde aktivite tayini yapılmıştır. Enzim PMSF (5 mM) ile inhibe olurken EDTA (10 mM) ve EGTA (1.0 mM) gibi şelatlayıcı ajanlar ile inhibe olmamıştır. **Bu, enzimin serin proteaz ailesine dahil olduğunu göstermiştir.** İndirgeyici ajan olan DTT'nin (1.0 mM) ve β – merkaptotanol'ün (0.25 M) enzime uygulandıktan sonra keratinolitik aktiviteyi pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Metal iyonlarından olan Mg^{+2} ($MgSO_4$), Ca^{+2} ($CaCl_2$), Zn^{+2} ($ZnSO_4$), Ba^{+2} ($BaCl_2$), Fe^{+2} ($FeSO_4$) enzimatik reaksiyona 5 mM derişimde uygulandıktan sonra aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir. Ağartıcı bir ajan olan H_2O_2 (% 5) enzimatik reaksiyona uygulandıktan sonra aktivite % 34 oranında korunmuştur. Anyonik sürfektan olan SDS'e (% 0.5) karşı enzim aktivitesini % 12 düzeyine kadar koruyabilirken denatüre edici ajanlardan olan Triton X – 100 (% 2.5) ve Tween 80 (% 5)'e karşı enzim aktivitesini % 105 ve % 82 düzeyinde tutabilmiştir. DMSO, asetonitril ve etil asetat ile muamele sonucunda enzim aktivitesi artarken isopropanol ile muamele sonucunda aktivitenin % 65'e düştüğü belirlenmiştir. **Metanol, etanol ve bütanol ile muamele sonucunda aktivitenin % 85 civarında korunduğu görülmüştür.** Kısmi saf keratinazın çözünür substratlar arasında (BSA, skim milk, kazein) en yüksek aktiviteyi kazein üzerinde gösterdiği tespit edilmiştir (151.4 U/mg). **Keratinazın çözünmez keratin substratlarından olan tavuk tüyü ve koyun yününün her ikisinde de parçalama gerçekleştirdiği belirlenmekle beraber enzimin tavuk tüyünde daha etkin olduğu**

görülmüştür. Bununla birlikte keratinazın Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA peptidine yüksek seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir. Böylelikle, enzimin sentetik substratın P1 ucundaki aromatik fenilalanin (-Phe) kalıntısını tercih ettiği anlaşılmıştır.

Bu sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda; streptomiset grubu bir bakteri olan M125-4 izolatının keratinaz üretiminde büyük bir potansiyel taşıdığı görülmektedir. Ürettiği keratinaz, hem tavuk tüyü hemde koyun yününü parçalaması ile literatürde varolan bu özelliğe sahip sadece birkaç enzim arasına girmektedir. (Cai et al., 2008; Cao et al., 2009). Bununla birlikte yine bu sonuçlar doğrultusunda enzimin, 35 – 55°C ve pH 8 – 12 aralığında gerçekleşen biyoteknolojik proseslerde rahatlıkla kullanılabileceği öngörülmektedir. Enzimin EDTA, EGTA, DTT, metal iyonları gibi kimyasallara olan yüksek dayanıklılığı keratinazın katalizör olarak kullanıldığı tüm endüstriyel uygulamalar için avantaj sağlamaktadır. Keratinazın en çok ilgi gördüğü sektör olan agroendüstri için tüy unu üretiminde, bu özellik avantaj sağlayabilir. Bununla birlikte, H₂O₂'ye karşı aktifliğini koruyarak sadece birkaç proteaz grubu enzimin içinde yer alan keratinaz, bu özelliği ile protein mühendisliği alanında öne çıkabilir. Enzim aktivitesinin organik çözümlere karşı olan kararlılığı, enzimin düşük su derişimlerinde peptit sentezinde kullanılabileceğini göstermektedir.

İleri çalışmalar için, bu araştırmada elde edilen sonuçlar detaylandırılarak enzim hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilebilir. Enzimin protein sekans analizi yapılarak bugüne kadar karakterize edilmiş diğer keratinazlar ile karşılaştırılabilir ve benzerlik, farklılıkları ortaya çıkarılabilir. Enzimin koyun yününü parçalayabilmesinden yola çıkarak, deri endüstrisi için kıl giderim çalışmalarındaki etkinliği belirlenebilir. Bununla birlikte, enzim farklı mataryeller üzerine immobilize edilerek uygulama alanı bulduğu proseslerde daha etkin ve uzun süreli kullanım olanağı bulabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adıgüzel, A.C., Bitlisli, B.O., Yaşa, I. and Eriksen, N.T.,** 2009, Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool, J Appl Microbiol, 107:226–234.
- Allpress, J.D., Mountain, G. and Gowland, P.C.,** 2002, Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497, Lett Appl Microbiol, 34:337–342.
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Lakshmipriya, T. and Annadurai, G.,** 2005, Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity, Enzyme Microb Technol, 36:639–647
- Aslantaş, Y.,** 2004, Yem Kaynağı Olarak Rendering Ürünlerinin Hayvan Beslemede Kullanımı, National Renderers Association (NRA), Çukurova Öğrenci Seminerleri Dizisi, Çukurova Üniversitesi Zootekni Bölümü, 8 - 9 pp.
- Auld, D.S.,** 1995, Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases, Methods Enzymol, 248:228–242.
- Bakhtiar, S., Estiveira, R.J. and Hatti-Kaul, R.,** 2005, Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20, Enzyme Microb Technol, 37:534–540.
- Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R. and Sehgal, P.K.,** 2008, Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102), World J Microbiol Biotechnol, 24:2741–2745.
- Bálint, B., Bagi, Z., Tóth, A., Rákhely, G., Perei, K. and Kovács, K.L.,** 2005, Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen, Appl Microbiol Biotechnol, 69:404–410.
- Barba, C., Méndez, S., Roddick-Lanzilotta, A., Kelly, R., Parra, J.L. and Coderch, L.,** 2008, Skin Res. Technol., 14 (2) 243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barone, J.R., Schmidt, W.F. and Liebner, C.F.E.**, 2005, Thermally processed keratin films, *J Appl Polym Sci*, 97, 1644–1651 pp.
- BCC Research**, Enzymes for Industrial Applications - Report code: BIO030E, <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030e.html>, (Erişim tarihi: 5 Mayıs 2008).
- Bernal, C., Cairó, J. and Coello, N.**, 2006a, Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*, *Enzyme Microb Technol*, 38:49–54.
- Böckle, B., Galunski, B. and Müller, R.**, 1995, Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530, *Appl Environ Microbiol*, 61:3705–3710.
- Brandelli, A. and Riffel, A.**, 2005, Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers, *Electron J Biotechnol*, 8, 35–42 pp.
- Brandelli, A.**, 2008, Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond, *Food Bioprocess Technol*, 1, 105–116 pp.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. and Verneuil, B.**, 1999, Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*, *Appl Environ Microbiol*, 65, 2570–2576 pp.
- Brush, A.H. and Wyld, J.A.**, 1980, Molecular correlates of morphological differentiation: avian scutes and scale, *J Exp Zool*, 212, 153–7 pp.
- 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, *J Zhejiang Univ Sci B*, 9:713–720.
- Cao, L., Tan, H., Liu, Y., Xue, X. and Zhou, S.**, 2008, Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather, *Lett Appl Microbiol*, 46:389–394.
- Cao, Z.J., Zhang, Q., Wei, D.K., Chen, L., Wang, J., Zhang, X.Q. and Zhou, M.H.**, 2009, Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- high keratinase activity and purification of the enzyme, *J Ind Microbiol Biotech*, 36:181–188.
- Cardamone J. M.**, 2010, Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR), *Journal of Molecular Structure*, 969, 97–105 pp.
- Chen, C.Y., Rojanatavorn, K., Clark, A.C. and Shih, J.C.H.**, 2005, Characterization and enzymatic degradation of Sup35NM, a yeast prion-like protein, *Protein Sci*, 14, 2228–2235 pp.
- Chitter, R., Nalawade, V.K. and Dey, S.**, 1999, Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8, *Lett Appl Microbiol*, 28, 131–136.
- Choi, J.M. and Nelson P.V.**, 1996, Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources, II. Using poultry feathers, *J Am Hort Sci.* 121:634–638.
- Coulombe, P.A. and Omary, M.B.**, 2002, ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments, *Curr Opin Cell Biol*, 14, 110–22 pp.
- De Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A.P. and Termignoni C.**, 2002, Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain, *Can J Microbiol*, 48:342–348.
- DelMar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W. and Geokas, M.C.**, 1979, A sensitive new substrate for chymotrypsin, *Anal. Biochem.*, 99, 316–320.
- Evans, K.L., Crowder, J. and Miller, E.S.**, 2000, Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Can J Microbiol*, 46:1004–1011.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L. and Nasri, M.**, 2009, Production and biochemical and molecular characterization of a serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK, *Microbiol*, 427–436.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Farag, A.M. and Hassan, M.A.,** 2004, Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus orizae*, *Enzyme Microb Technol*, 34:85–93.
- Figueras, M. J., Gurrado, J. and Zaror, L.,** 1997, Ultrastructural aspects of hair digestion in black piedra infection, *J. Med. Vet. Mycol*, 35, 1-6.
- Fraser, R.D. and Parry, D.A.,** 1996, The molecular structure of reptilian keratin, *Int J Biol Macromol*, 19, 207–11 pp.
- Friedrich, A.B. and Antranikian, G.,** 1996, Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermatogales, *Appl Environ Microbiol*, 61:3705–3710.
- Friedrich, J., Gradisar, H., Mandin, D. and Chaumont, J.P.,** 1999, Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes, *Lett Appl Microbiol*, 28:127–130.
- Friedrich, J. and Kern, S.,** 2003, Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*, *J Mol Catal B Enzym*, 21, 35–37 pp.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A. and Mattiasson, B.,** 2003, Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather, *Enzyme Microb Technol*, 32:519–524.
- Ghosh, A., Chakrabarti, K. and Chattopadhyay, D.,** 2009, Cloning of featherdegrading minor extracellular protease from *Bacillus cereus* DCUW: dissection of the structural domains, *Microbiology*, 155:2049–2057.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaj, I. and Jerala, R.,** 2005, Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases, *Appl Environ Microbiol*, 71:3420–3426.
- Gradisar, H., Kern, S. and Friedrich, J.,** 2000, Keratinase of *Doratomyces microsporus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53:196–200.
- Gupta, R. and Ramnani, P.,** 2006, Microbial keratinases and their prospective applications: an overview, *Appl Microbiol Biotechnol*, 70:21–33.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P.,** 2002, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *ApplMicrobiol Biotechnol*, 59:15–32.
- Gushterova, A., Vasileva-Tonkova, E., Dimova, E., Nedkov, P. and Haertlé, T.,** 2005, Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains, *World J Microbiol Biotechnol*, 21:831–834.
- Ichida, J.M., Krizova, L., LeFevre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L. and Burt, E.H.,** 2001, Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost, *J Microbiol Methods*, 47:199–208.
- Ionata, E., Canganella, F., Bianconi, G., Benno, Y., Sakamoto, M., Capasso, A., Rossi, M. and La Cara, F.,** 2008, A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds, *Microbiol Res*, 163:105–112.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J. and Fenical, W.,** 2005, Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments, *Environ. Microbiol.*, 7 (7): 1039-1048 pp.
- Kim, J.M., Lim, W.J. and Suh, H.J.,** 2001, Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste, *Process Biochem*, 37:287–291.
- Kitadokoro, K., Tsuzuki, H., Nakamura, E., Sato, T. and Teraoka, H.,** 1994, Purification, characterization, primary structure, crystallization and preliminary crystallographic study of a serine proteinase from *Streptomyces fradiae* ATCC 14544, *Eur J Biochem* 220:55–61.
- Kluskens, L.D., Voorhorst, W.G.B., Siezen, R.J., Schwerdtfeger, R.M., Antranikian, G., Van der Oost, J. and De Vos, W.M.,** 2002, Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*, *Extremophiles*, 6:185–194.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Korkmaz, H., Hür, H. and Dinçer, S.,** 2004, Characterization of Alkaline Keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from Poultry Waste, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 54(2): 201-211.
- Korkmaz, H., Ünaldı, M.N., Aslan, B., Coral, G., Arıkan, B., Dinçer, S. and Çolak, Ö.,** 2003, Keratinolytic Activity of *Streptomyces* Strain BA7, A New Isolate from Turkey, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 53: 85-93.
- Kublanov, I.V., Perevalova, A.A., Slobodkina, G.B., Lebedinsky, A.V., Bidzhieva, S.K., Kolganova, T.V., Kaliberda, E.N., Rumsh, L.D., Haertlé, T. and Bonch-Osmolovskaya, E.A.,** 2009b, Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia), *Appl Environ Microbiol*, 75:286–291.
- Kublanov, I.V., Tsiroulnikov, K.B., Kaliberda, E.M., Rumsh, L.D., Haertlé, T. and Bonch-Osmolovskaya, E.A.,** 2009a, Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal rift zone, *Microbiology*, (Russia) 78:67–75.
- Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N. and Sekaran, G.,** 2008, Characterization of an alkaline active—thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*, *J Appl Microbiol*, 104:411–419.
- Kumar, Y. and Goodfellow, M.,** 2010, Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., *Streptomyces scomycenicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycenicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 769–775.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kunert, J.**, 1992, Effects of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*, *Mycoses*, 35, 343-348.
- Langeveld, J.P.M., Wang, J.J., Van de Wiel, D.F.M., Shih, G.C., Garssen, G.J., Bossers, A. and Shih, J.C.H.**, 2003, Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep, *J Infect Dis*, 188, 1782–1789 pp.
- Lee, H., Suh, D.B., Hwang, J.H. and Suh, H.J.**, 2002, Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3, *Appl Biochem Biotechnol*, 97:123–133.
- Liman, R.**, 2007, *Streptomyces coelicolor*'daki Metabolik Değişiklikler Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 107s.
- Lin, H.H., Yin, L.J. and Jiang, S.T.**, 2009, Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system, *J Agric Food Chem*, 57:3506–3511.
- Lin, X., Kelemen, D.W., Miller, E.S. and Shih, J.C.H.**, 1995, Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1, *Appl Environ Microbiol*, 61:1469–1474.
- Lin, X., Lee, C., Casale, E. S. and Shih, J. C. H.**, 1992, Purification and characterization of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3271-3275.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pederson, J.**, 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology* 38, 471p.
- Long, X. L., Ming, H.S., Yu, D.L., Jie, M., Wei, H. F., Wen, J. G., Yong, Q. L.**, 2010, Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov., *Process Biochemistry* 45, 1236–1244.
- Longshaw, C.M., Wright, J.D., Farrell, A.M. and Holland, K.T.**, 2002, *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes, *J Appl Microbiol*, 93:810–816.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lucas, F.S., Broennimann, O., Febbraro, I. and Heeb, P.,** 2003, High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil, *Microb Ecol*, 45:282–290.
- Macedo, A.J., Silva, W.O.B. and Termignoni, C.,** 2008, Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase, *Can J Microbiol*, 54:180–188.
- Macedo, A.J., Silva, W.O.B., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J.A.P. and Termignoni, C.,** 2005, Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities, *Appl Environ Microbiol*, 71:594–596.
- Malviya, H. K., Rajak, R. C. and Hasija, S. K.,** 1992, Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India *Mycopathologia*, 120, 1-4.
- Malviya, H. K., Tiwari, S., Rajak, R. C. and Hasija, S. K.,** 1993, Keratinolysis by four fungi isolated from the soil and effluent of a gelatin factory at Jabalpur (M.P.), *Crypt. Bot.*, 3, 108-116.
- Manczinger, L., Rozs, M., Lgyi, V.G. and Kevei, F.,** 2003, Isolation and characterization of a newkeratinolytic *Bacillus licheniformis* strain, *World J. Microbiol Biotechnol.*, vol 19, pp 35-39.
- Mitsuiki, S., Ichikawa, M., Oka, T., Sakai, M., Moriyama, Y., Sameshima, Y., Goto, M. and Furukawa, K.,** 2004, Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1, *Enzyme Microb Technol*, 34:482–489.
- Moallaei, H., Zaini, F., Larcher, G., Beucher, B. and Bouchara, J.P.,** 2006, Partial purification and characterization of a 37 kDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*, *Mycopathologia*, 161:369–375.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mohammed El-Akied, Z.M.**, 1987, Microbial production of amino acids and proteins by thermophilic actinomycetes as a biodegradation of chicken feather, Master thesis, Zagazig University, Egypt.
- Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J. and Murdan, S.**, 2007, An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery, *Int J Pharm*, 332:196–201.
- Moreira, F.G., Souza, C.G.M., Costa, M.A.F., Reis, S. and Peralta, R.M.**, 2007, Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*, *Mycopathologia*, 163:153–160.
- Moreira-Gasparin, F.G., Souza, C.G.M., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., Bracht, C.K., Boer, C.G. and Peralta, R.M.**, 2009, Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*, *Biodegradation*, 20:727–736.
- Musahl, C. and Aguzzi, A.**, 2000, Prions. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of microbiology*, 2nd edn. Academic, San Diego, pp 809–823.
- 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, *Arch Microbiol*, 178:538–547.
- NCBI**, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> , (Erişim tarihi: 19 Mayıs 2012).
- Odetallah, N.H., Wang, J.J., Garlich J.D. and Shih, J.C.H.**, 2003, Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks, *Poult Sci*, 82:664–670.
- Öner, Ö.**, 2011, Denizel Kaynaklardan Aktinomiset Grubu Mikroorganizmaların izolasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, 107s.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A. and Al-Zarban, S.**, 1998, Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources, *Bioresour Technol*, 66, 1–11 pp.

Papadopoulos, M. C., El Boushy, A. R., Roodbeen, A. E. and Ketelaars, E. H., 1986, Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal, *Animal Feed Science and Technology*, 14, 279–290 pp.

Powell, B. and Rogers, G., 1994, Differentiation in hard keratin tissues: hair and related structure, In: Leigh I, Lane B, Watt F, editors, *The keratinocyte handbook*, Cambridge University Press, Cambridge UK, 401–36 pp.

Radha, S. and Gunasekaran, P., 2008, Sustained expression of keratinase gene under PxylA and PamyL promoters in the recombinant *Bacillus megaterium* MS941, *Bioresour. Technol.*, 99, 5528–5537.

Rai, S.K., Konwarh, R. and Mukherjee, A.K., 2009, Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline β -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate, *Biochem Eng J*, 45:218–225.

RAL Color Chart, Color space system, <http://www.ralcolor.com/>, (Erişim tarihi: 6 Mayıs 2012).

Ramnani, P. and Gupta, R., 2007, Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation, *World J Microbiol Biotechnol*, 23:1537–1540.

Riessen, S. and Antranikian, G., 2001, Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity, *Extremophiles*, 5:399–408.

Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C.M., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N. and Tavares, F.C.A, 2007, Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6, *J Biotechnol*, 128:693–703.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P. and Brandelli, A.,** 2003, Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin, *Arch Microbiol*, 179:258–265.
- Rogers, G.E., Dunn, S. and Powell, B.,** 1999, Late events and the regulation of keratinocyte differentiation in hair and feather follicles, In: Chuong CM, editor, *Molecular Biology Intelligence Unit*, Austin TX, 315–38 pp.
- Rozs, M., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. and Kevei, F.,** 2001, Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett* 205:221–224
- Sangali, S. and Brandelli, A.,** 2000a, Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2., *J Appl Microbiol*, 89:735–743
- Sangali, S. and Brandelli, A.,** 2000b, Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain, *Appl Biochem Biotechnol*, 87:17–24.
- Santos, R.M.D.B., Firmino, A.A.P., Sá, C.M. and Felix, C.R.,** 1996, Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Curr Microbiol*, 33:364–370.
- Schrooyen, P.M.M. and Radulf, B.,** 2004, Keratin-based products and methods for their productions, US Patent 20,040,210,039.
- Shih, J.C.H. and Wang, J.J.,** 2006, Keratinase technology: from feather degradation and feed additive, to prion destruction, *Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour*, 1, 6 p.
- Silveira, S.T., Jaeger, M.K. and Brandelli, A.,** 2009, Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6., *J Chem Technol Biotechnol*, 84:361–366.
- Sinha, U. S., Wolz, A. and Pushkaraj, J. L.,** 1991, Two new extracellular serine proteinases from *Streptomyces fradiae*. *Int. J. Biochem.*, 23, 979-984.
- Stevens, L.,** 1996, *Avian Biochemistry and Molecular Biology*, Cambridge University Press, Cambridge UK, 144 - 145 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suh, H.J. and Lee, H.K.,** 2001, Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1., J Protein Chem, 20:165–169.
- Suntornsuk, W., Tongjun, J., Onnim, P., Oyama, H., Ratanakanokchai, K., Kusamran, T. and Oda, K.,** 2005, Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium, World J Microbiol Biotechnol, 21:1111–1117.
- Syed, G.D., Lee, J.C., Li, W.J., Kim, C.J. and Agasar, D.,** 2009, Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*, Bioresour Technol, 100, 1868–1871 pp.
- Szabo, L., Benedek, A., Szabo, M.L. and Barabas, G.,** 2000, Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain, World J Microbiol Biotechnol, 16:252–255.
- Tachibana, A., Kaneko, S., Tanabe, T. and Yamauchi, K.,** 2005, Biomaterials 26, 297.
- Takami, H., Nakamura, F., Aono, R. and Horishiri, K.,** 1992, Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from alcalophilic *Bacillus* sp. no. AH 101, Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 1667-1669.
- Tapia, D.M.T. and Contiero, J.,** 2008. Production and Partial Characterization of Keratinase Produced by a Microorganism Isolated from Poultry Processing Plant Wastewater. African Journal of Biotechnology, Vol.7 (3), pp. 296-300.
- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M.T., Kolli, N., Mangamoori, L.N.,** 2008, Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp., Bioresour Technol 99:1596–1602.
- Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U. and Ramasami, T.,** 2004, Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing, Trends Biotechnol, 22:181–188.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thys, R.C.S. and Brandelli, A.,** 2006, Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp., J Appl Microbiol, 101:1259–1268.
- Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P. and Brandelli, A.,** 2004, Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species, Lett Appl Microbiol, 39:181–186.
- Wang, J.J. and Shih, J.C.H.,** 1999, Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29., J Ind Microbiol Biotech, 22:608–616.
- Wang, J.J., Borwornpinyo, R., Odetallah, N. and Shih, J.C.H.,** 2005, Enzymatic degradation of a prion-like protein, Sup35NM-His6, *Enzyme Microb Technol*, 36, 758–765 pp.
- Wang, J.J., Swaisgood, H.E. and Shih, J.C.H.,** 2003, Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis, *Enzyme Microb Technol*, 32:812–819.
- Wang, S.L., Hsu, W.T., Liang, T.W., Yen, Y.H. and Wang, C.L.,** 2008, Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium, *Bioresour Technol*, 99:5679–5686.
- Wang, X., and Parsons, C. M.,** 1997, Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meal, *Poult. Sci.*, 76, 491-496.
- Wawrzekiewicz, K., Wolski, T. and Lobarzewski, J.,** 1991, Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro, *Mycopathologia*, 114, 1-8.
- Williams, C.M., Richter, C.S., Mackenzie, J.M. and Shih J.C.H.,** 1990, Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1509-1515.
- Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y. and Qian, S.,** 2010, Purification and characterization of four keratinases produced by

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Streptomyces sp. strain 16 in native human foot skin medium, *Bioresour Technol*, 101:344–350.

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Rao, S.R., Murakami, Y., Yokoyama, K. and Tamiya, E., 2002, Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *J Biosci Bioeng*, 93:595–600.

Yoshioka, M., Miwa, T., Horii, H., Takata, M., Yokoyama, T. and Nishizawa, K., 2007, Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 509–515.

Zoccola, M., Aluigi, A. and Tonin, C., 2009, Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes, *Journal of Molecular Structure*, 938, 35–40 pp.

ÖZGEÇMİŞ

DENİZ KUŞCUOĞLU

6007/1 sokak No:1 D:14 Karşıyaka / İZMİR

Ev: (232) 3647098, Cep: (505) 2630017

E-mail: denizkuscuglu@gmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu: TC

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 23/11/1987

Medeni Durum : Bekar

EĞİTİM DURUMU

2009 - : Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoteknoloji Bölümü

2004 – 2009 : Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Mikrobiyoloji ABD

TEZLER

2012 / Yüksek Lisans Tezi, M125-4 aktinomiset izolatu kullanılarak keratinöz
atıklardan keratinaz üretim optimizasyonu ve
karakterizasyonu

2009 / Lisans Bitirme Tezi, Yeni fonksiyonel dizi alanlarının kaynağı olan
'metagenom'a erişim

PROJELER / STAJLAR

01 - 30/06/2008: Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD 20 iş günü stajyer

2011/2012: Ege Üniversitesi 11 MÜH 005 no.'lu BAP projesinde araştırmacı personel

Konferans ve seminerler;

- X. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Ekim 2011, Çanakkale
Poster sunumu, Bazı Keratinöz Atıkların Değerlendirilmesinde Aktinomisetlerin Potansiyeli
- V. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi, Haziran 2010
- Ege Üniversitesi Aşı Sempozyumu, Nisan 2010
- Ege Üniversitesi 2. Kök Hücre Sempozyumu, Mart 2010
- Ege Üniversitesi 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Kong., Ağustos 2008
- Ege Üniversitesi Temel ve End. Mikrobiyoloji Sempozyumu, Mart 2008

Görev alınan etkinlikler;

- Üniversite Sanayi İş Birliği Ulusal Kongresi, Haziran 2011, İzmir
- Ege Üni. Teknoloji Günleri (AREGE), Aralık 2010, İzmir

SERTİFİKALAR

- TS-EN ISO 14001 – Çevre Yönetim Sistemi, Elginkan, 2012
- TS-EN ISO 9001 – Kalite Yönetim Sistemi, Elginkan, 2012
- GMP (Good Manufacturing Practices) Sertifika Programı, Biyokimyagerler Derneği, 16 – 17 Ekim 2010, Katılım Belgesi

BİLGİSAYAR

Microsoft Ofis 2007; Excel, Word, PowerPoint, internet veritabanı araştırması; moleküler biyoloji, protein veritabanları ve patent, literatür tarama, Design expert.

AKTİVİTELER

2007 yılının Haziran-Eylül aylarında, Amerika'nın Ohio eyaletinde bulunan Cedar Point eğlence merkezinde 3 ay süreyle çalıştım.