



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KERATİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ÇEŞİTLİ
KİMYASALLARIN ETKİSİ**

Gülsüm UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAHRAMANMARAŞ
Ocak -2009**



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KERATİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ÇEŞİTLİ
KİMYASALLARIN ETKİSİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. ÖZLEM EREN KIRAN**

GÜLSÜM UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAHRAMANMARAŞ
OCAK-2009**

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ÇEŞİTLİ
KİMYASALLARIN ETKİSİ**

Gülsüm UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kod No:

Bu Tez 24.01.2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Yrd. Doç. Dr. Özlem EREN KIRAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Metin DIĞRAK
ÜYE

.....
Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Süleyman TOLUN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No:2008/1-18

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

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
ÖNSÖZ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.2. Enzimler.....	2
1.2.1. Enzimlerin Adlandırılması.....	2
1.2.2. Enzim Aktivitesi.....	3
1.2.3. Salgılanma Şekillerine Göre Enzimler.....	5
1.2.3.1. İntraselüler Enzimler	5
1.2.3.2. Ekstraselüler Enzimler	5
1.3. Bakteriler	5
1.3.1. <i>Bacillus</i>	6
1.3.1.1. Ortam Bileşimi ve Sıcaklık Etkisi.....	6
1.3.1.2. Ortam Bileşimi ve pH Etkisi	6
1.3.2. <i>Bacillus</i> sp.nin Kullanım Sebepleri	7
1.3.3. Bakterilerden Elde Edilen Bazı Enzimler	7
1.3.3.1. Proteolitik Enzimler	7
1.3.3.2. Serin Alkali Proteaz.....	7
1.3.3.3. Selülaz	7
1.3.3.4. Amilaz	8
1.3.3.5. Ksilenz.....	9
1.3.3.6. Proteaz	9
1.3.3.7. Keratinaz	10
1.3.4. Keratini Parçalayan Mikroorganizmalar ve Özellikleri.....	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri	15
3.2.1. Keratinaz Aktivitesi için Kullanılan Besiyeri (Sıvı).....	15
3.2.2. Jelöz Besiyeri	15
3.2.3. Nutrient Buyyon.....	15
3.2.4. Kazein Besiyeri.....	15
3.2.5. Simon's Sitrat Besiyeri	16
3.2.6. Üre Agar	16
3.2.7. Yumurtalı Agar.....	16
3.2.8. Glukozlu Buyyon.....	17
3.2.9. Mannitollu Buyyon	17
3.2.10. İndol Besiyeri (pH:7.2)	17
3.2.11. Jelatin Besiyeri (pH:7.0).....	17

3.2.12. Skimmilk-agarlı Besiyeri.....	17
3.2.13. M9-Nişasta Agarı	18
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	18
3.3.1. Keratinaz Aktivitesi Üzerine Kimyasalların Etkisini Saptayabilmek Amacıyla Kullanılan Kimyasallar	18
3.3.2. Keratin Azure	18
3.3.3. Kovaks Ayıracı.....	18
3.4. Metod	19
3.4.1. Topraktan <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu.....	19
3.4.2. Bakteri Karakterizasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Testler.....	19
3.4.2.1. Ürenin Hidrolizi	19
3.4.2.2. Jelatinin Hidrolizi	19
3.4.2.3. Katalaz Testi.....	19
3.4.2.4. Nişastanın Hidrolizi	20
3.4.2.5. Voges-Proskauer Testi.....	20
3.4.2.6. Yüzey Zar Oluşumu.....	20
3.4.2.7. İndol Testi.....	20
3.4.2.8. Kazeinin Hidrolizi.....	20
3.4.2.9. Simons-Sitrat Testi	20
3.4.2.10. β -Hemoliz Testi	21
3.4.2.11. Lesitin Hidroliz Testi	21
3.4.2.12. Glikozdan Gaz Oluşumu	21
3.4.2.13. Mannitolden Gaz Oluşumu	21
3.4.2.14. Hareket Testi	21
3.4.3. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.4.4. Keratin Kaynağının Elde Edilişi	22
3.4.5. Keratinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.4.6. Keratinolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	22
3.4.7. Keratinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	23
3.4.8. Keratinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	23
3.4.9. Sıcaklık Stabilitesi.....	23
3.4.10. Keratinaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	24
4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu	24
4.2. Optimum pH	25
4.3. Optimum Sıcaklık.....	25
4.4.Sıcaklık Stabilitesi.....	26
4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkileri	27
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	39

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZET

**KERATİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ÇEŞİTLİ
KİMYASALLARIN ETKİSİ**

Gülsüm UÇAR

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özlem EREN KIRAN

Yıl: 2009 Sayfa:

**Jüri : Yrd. Doç. Dr. Özlem EREN KIRAN
Prof. Dr. Metin DIĞRAK
Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE**

Bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği'nden tavuk tüyü ve bu tüyü parçalayan *Bacillus* UK69 suşu izole edilmiştir. *Bacillus* UK69 suşu doğal tavuk tüyü içeren besi ortamında üretildiğinde yüksek keratinolitik aktivite göstermiştir. *Bacillus* UK69 suşu biokimyasal testler ve morfolojik özelliklerine göre teşhis edilmiştir. Maksimum keratinaz üretimi 60°C' de gözlenmiştir. Enzim geniş pH (optimal pH 10.5) ve sıcaklık aralığında (optimal sıcaklık 60°C) aktivite göstermiş ve 60°C' ye kadar stabilitesini korumuştur. Keratinolitik aktivite, EDTA, Triton X-100, DMSO, ZnCl₂, NaCl, CaCl₂, Tween 80, SDS, Glukoz tarafından kısmen inhibe edilmiştir.

Sonuç olarak *Bacillus* UK69 suşu biyoteknolojik proseslerde başarı ile kullanılabilir.
Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, keratinaz, tavuk tüyü.

**T.R.
UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

MSc THESIS

ABSTRACT

**THE EFFECTS OF VARIOUS CHEMICALS ON THE KERATINASE
ACTIVATION**

Glsm UÇAR

Supervisor: Assist. Prof. Dr. zlem EREN KIRAN

Year: 2009 Pages: 39

**Jury : Assist. Prof. Dr. zlem EREN KIRAN
Prof. Dr. Metin DIĞRAK
Assoc. Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE**

In this study a feather-degrading *Bacillus* UK69 was isolated from poultry farm in Kahramanmaraş Stç İmam University Agriculture Faculty of Application and Researching Farm. High keratinolytic activity produced by *Bacillus* UK69 was observed when it was cultured on broth containing native feather powder. The *Bacillus* UK69 identification was based on morphological and biochemical tests.

Maximum keratinase production was observed at 60°C. The enzyme was active in a wide range of pH (optimal 10.5) and temperature (with optimal 60°C) and relatively heat stable (up to 60°C).

Keratinolytic activity was partially inhibited by EDTA, Triton X-100, DMSO, ZnCl₂, NaCl, CaCl₂, Tween 80, SDS, Glucose.

As a result *Bacillus* UK69 seems to be useful use for biotechnological process.

Key Words: *Bacillus*, keratinase, chicken feather.

ÖNSÖZ

Endüstriyel öneme sahip olan keratinaz enziminin üretimi ve teknolojiye kullanılabilirliğinin arttırılmasına yönelik olarak yapılan bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde organize edilip başlatılan enzim üretim projesinin bir bölümünü oluşturmaktadır.

Bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği'nden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının keratinaz aktiviteleri araştırılmıştır.

Öncelikle çalışmalarım esnasında her türlü desteğini ve yardımını benden esirgmeden sunan, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem EREN KIRAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Metin DIĞRAK, Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ' e ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni yüreklendiren ailemin değerli üyelerinin her birine şükranlarımı sunarım.

Ocak 2009
KAHRAMANMARAŞ

Gölsüm UÇAR

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. Enzimleri Sınıflama Sistemi.....	4
Çizelge 2. UK69 nolu <i>Bacillus</i> suşunun İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testler	26
Çizelge 3. Çeşitli Kimyasalların Keratinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	30

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil 1: Keratinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	27
Şekil 2: Keratinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	28
Şekil 3: Keratinazın Sıcaklık Stabİlitesi.....	28

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
μ	: Mikron
Lt	: Litre
ml	: Mililitre
EC	: Enzimi simgeleyen bir numara
μmol	: Mikromol
rpm	: Rotary per minute
nm	: Nanometre
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sulfoksit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetikasit
PMSF	: Fenil metil sulfonil florid
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
LB	:Luria-Bertani
W/V	: Weight/volume
M	: Mol
Mm	: Milimol
AX	: Arabinoxylan

1. GİRİŞ

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır (Wiseman, 1987).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede dünyada ki enzim satışının 450 milyon doları bulduğu belirtilmektedir. Bugün dünyada ki enzim satışında 2-3 kat artış olduğu bilinmektedir (Wiseman, 1987).

Bu çerçevede de önem arz eden enzimlerden birisi de keratinazdır. Keratin ve keratinazın biyoteknolojik uygulamaları araştırmacıların oldukça ilgisini çekmiştir. Özellikle de çeşitli endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyelleri bu ilgiyi uyandırmıştır. Bunlara örnek olarak, atık suların arıtılmasında, tekstil alanında, tıpta, kozmetik ürünlerin elde edilmesinde ve deri endüstrisinde olduğu kadar, kümes hayvancılığı endüstrisinde uygulanabilecek özelliklere sahip olması bakımından ciddi öneme sahiptir.

Her yıl tavukçuluk işletmelerinde 20.000'den fazla tavuk tüyü atıkları sağlanmaktadır. Mekanik ya da kimyasal işlemler uygulanmak suretiyle hidrolize edilen bu tüyleri yem, gübre, yapıştırıcı (tutkal) ve foyalara (foils) dönüştürmek mümkün olduğu gibi bunlar, aminoasit ve peptitlerin üretilmesinde de kullanılabilir (Pfleiderer ve Reiner, 1988; Mukhopadyay ve Chandra, 1990). Çevre kirliliğine sebebiyet veren bu atıkların temizlenmesi amacıyla; biyoteknolojik proje uygulamalarında aminoasit ve peptitlerin üretilmesinde de kullanılabilirler. Bu nedenle, keratinaz ölü kümes hayvanlarından keratin, kollojen ve elastin gibi proteinlerin hızlıca ayrıştırılmasında kullanılabilir. Ayrıca keratinaz, kıl, tüy ve yünü değerli aminoasitlere (serin, sistin, prolin gibi nadir aminoasitlere) dönüştürülerek (Wyman ve Godman, 1993), hayvan yemlerinin hazırlanmasında da kullanılabilirler (Lahl ve Braun, 1994, Ichida ve ark., 2001; Burt ve Ichida, 2001). Bu enzimatik proses, ticari uygulamalar içinde bir avantaj sağlamaktadır. Aksi halde, son üründen ayrıştırılması zorunlu olan büyük miktarlarda ki tuzların üretimi yapılamazdı. Keratinaz üretimi şimdiye kadar yalnızca mezofilik mantarlar ve *Actinomyces*'lerden üretilmekteydi. Ancak doğal haldeki tüy ve yünleri parçalama yetenekleri olduğu saptanan *Bacillus* suşlarından izole edildiği belirtilmiştir (Böckle ve ark.,1995; Kunert, 1972, 1981 ; Wawrzekiewicz ve ark., 1987; Yu ve ark., 1969a, 1971; Lin ve ark.,1992; Takami ve ark., 1992; Williams ve ark.,1990).

Endüstri alanında kullanılan 10'dan fazla mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Özellikle *Bacillus* cinsi proteolitik enzimlerin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Kalisz , 1988).

Bu çalışmada, farklı endüstri dallarında kullanılabilen keratinaz üreticilerinin toprak mikroorganizmaları taranarak izole edilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği'nden toprak örnekleri toplanarak *Bacillus* suşları olmak üzere keratinaz üreten mikroorganizmalar izole edilmiş, keratinaz üretimi yüksek olan mikroorganizmalar içinden birer izolat, seçilmiş en iyi üretici olan izolat üzerinde çalışmalara devam edilmiştir. Bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etki eden diğer parametrelerden inhibitörler belirlenmesi amaçlanmıştır.

Büyük öneme sahip olan termofilik keratinolitik *Bacillus* sp. bu proje ile Kahraman Maraş ili çevresinde ilk kez araştırılmıştır. Böylelikle Kahraman Maraş ili çevresinden izolasyonu yapılan bu suşların ülke endüstrisine ekonomik sahalarda; ekmek, bira ve peynir üretimi gibi, günlük yaşamda, temizlik alanların da, ayrıca tıpta teşhis ve tedavide önemli rol oynamaktadır. Yine, kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, ziraatte ve hatta biyolojik savaş da katkısı ortaya çıkarılmıştır.

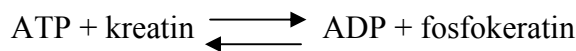
1.2. Enzimler

Enzimler, protein yapısındadırlar ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanmasının, deaminasyonun, sindirim vs.'nin temelini oluştururlar.

Canlı hücrelerde tepkimeler kural olarak 0–50 °C çoğunlukla da 20-42 °C arasında meydana gelir. Bu sıcaklıkta tepkimelerin oluşması biyokatalizör denen enzim ya da fermentörlerle aktivasyon enerjisinin düşürülmesi ile olur (Lehninger, 1979).

1.2.1. Enzimlerin Adlandırılması

Bir enzim, substratlarının veya katalizledikleri tepkimenin sonuna '-az'(-ase) ekinin getirilmesiyle adlandırılır. Örneğin, üreaz, ürenin amonyak ve CO₂'e hidroliz reaksiyonunu katalizler; fosfataz, fosfat esterlerinin hidrolizler. Bazı enzimler (pepsin, katalaz, tripsin) tepkimenin türünü belirten bu adlandırma kuralının dışında kalırlar. Bu sıra dışı adlandırmadan ve bulunan enzim sayının hızları artmasından dolayı Uluslararası Enzim Komisyonu, UEK (1955) enzimleri sınıflamak için sistematik bir metot geliştirmiştir. Her enzime kısa ve kullanıma uygun olarak önerilen bir ad, sistematik bir isim ve enzimi simgeleyen bir numara (EC) verilir; enzim numarası süreli yayınlarda, abstraktlarda ve indekslerde kullanılır. Örneğin;



tepkimesini katalizleyen enzim kreatin kinaz, sistematik adı katalizlediği tepkime alınarak – ATP kreatin fosfotransferaz, özgün numarası ise EC : 3.7.3.2'dir. Bu numara UEK sınıflandırma sistemine göre verilir. Enzim numarasında ilk rakam enzimin grubunu (transferaz); ikinci rakam alt grubu (fosfotransferaz); üçüncü rakam da bir alt grubu (fosfotransferazın azot grubu) göstermektedir. Genel olarak enzim grupları,

enzimlerin katalizledikleri gruplar ve alt grupları Çizelge 1’de verilmiştir (Lehninger, 1979).

1.2.2. Enzim Aktivitesi

Enzimlerin katalitik etkinliği “aktiviteleri” ile tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi enzimin yapısı dışında pH’a, sıcaklığa, basınç ve kesme gerilimlerine, kimyasal bileşenlere, ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonuna bağlıdır. Bu nedenle aktivite tanımını belli koşullarda yapılması gerekir.

Enzimlerin aktiviteleri genellikle katalizledikleri tepkimenin “başlangıç hızları” tayin edilerek bulunur. İki türlü aktivite tanımı yapılmaktadır. Enzim aktivitesi;

1^o Birim zamanda bir mol aktif enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı (turn – over sayısı) veya

2^o Dakikada bir μ mol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi) olarak tanımlanmaktadır (Aiba, 1973).

Molekül içi kuvvetler arasındaki denge, enzimlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder yani kararlı veya denatüre (bozunmuş) olmasını sağlar. Doğal enzimler sadece kendi çevrelerinde kararlıdır. Denatürasyon veya inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir ve bunun sonunda enzimler inaktif hale gelirler. Çevre etkili denatürasyon değişik fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle meydana gelir (Bailey ve Ollis, 1986., Schmid, 1979).

Enzim aktivitesi;

- pH,
- Sıcaklık,
- Mekanik kuvvetler – basınç ve kesme gerilimleri (hidrodinamik kuvvetler) hidrostatik basınç, arayüzey gerilimi
- Işık, ses ve iyonizasyon radyasyonu,
- Kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit, vb) ve
- Biyolojik etkenler gibi faktörlerden etkilenir

Çizelge 1. Enzimleri Sınıflama Sistemi

Grup	Katalizledikleri Tepkime	Katalizlenen Grup
1) Oksidoredüktaz	Yükseltgeme İndirgeme Tepkimeleri	1.1 >CH - OH 1.2 >C=O 1.3 -CH=CH- 1.4 >CH-NH ₂ 1.5 >CH-NH-
2) Tranferaz	Fonksiyonlu Grup Aktarımı	2.1 Tek-C'lu grup 2.2 Aldehit ve keton grupları 2.3 Asil grubu 2.4 Glikosil grubu 2.5 Fosfat grubu
3) Hidrolaz	Hidroliz Tepkimeleri	3.1 Esterler 3.2. Glukositik bağlar 3.3 Eter bağları 3.4 Peptit bağları
4) Liyaz	Çift Bağlara Ekleme/ Doyurma	4.1 >C=C< 4.2 >C=O 4.3 >C=N-
5) İzomeraz	İzomerizasyon Tepkimeleri	5.1 Rasemazlar
6) Ligaz	ATP Parçalanması ile Bağ Oluşturma	6.1 C-O 6.2 C-S 6.3 C-N 6.4 C-H

1.2.3. Salgılanma Şekillerine Göre Enzimler

1.2.3.1. İntraselüler Enzimler

İntraselüler enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneği olan moleküllerdir (John, 1987).

1.2.3.2. Ekstraselüler Enzimler

Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır.

Escherichia coli gibi gram negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü gram negatif bakteri duvarları gram pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptir. Bu yüzden gram pozitif bakterilerde enzimler direkt besiyerine salgılanır.

Çoğu değişken intraselüler enzimlerin aksine, ekstraselüler enzimlerin stabilitesi yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (John, 1987).

1.3. Bakteriler

Bakteriler prokaryot sınıftan olup tek hücreli ve bölünebilen mikroorganizmalar şeklinde tanımlanabilirler. Basit bakteriler spor, kamçı ve kapsül içermezler. 0.5–2.0 μ uzunluk ve 0.2–4 μ çapındadırlar. Prokaryotik bir yapı gösterdiğinden ökaryotik hücrelerden farklı olarak çekirdeklerinin çevresinde zar bulunmaktadır (Pekin, 1980., Mitchell, 1974).

Bakteriler tür ve çevresel koşullara göre tek, ikili, kümeli ya da uzun zincirli gruplar halinde bulunabilirler. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özellikte bu zar başlıca %50 protein, %28 yağ, %15–20 karbonhidrat içeren çift katmanlı bir yapı gösterir. Gram pozitif bakterilerin hücre zarında aromatik ve kükürt içeren amino asitler, arginin ve prolin bulunmaz. Gram negatiflerin hücre zarları ise lipit oranı yönünde daha zengindir. Hücre zarında elektron aktaran ve oksidatif fosfatlamayı sağlayan enzimler bulunmaktadır.

Bakteri hücrelerinde; endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi aygıtlarına rastlanmaz. Çubuk ve sarmal yapıda olanların bir ya da her iki ucunda bazen tüm yüzeyinde hareket etmeye yarayan kamçı bulunur.

Bazı bakteriler sitoplazmalarında spor bulundurma potansiyeline sahiptir. Spor, uygun besiyerinde ve çevre koşullarında bulunduğu zaman aktif olarak faaliyet göstermeye başlar. *Bacillus*, bilinen spor yapan bakterilerdendir. Bu bakterilerin sporları havada ve toprakta bulunmaktadır (Mitchell, 1974)

1.3.1. Bacillus

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu ortam koşulları için çok dirençli, tek endospora sahip, açık havada spor oluşturması engellenemeyen, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir (Lennete ve ark., 1985).

Bacillus zincirleri tek veya çok sayıda uzun zincirler meydana getirebilirler. Ana hücrede bulunan sporun şekli ve sporangium yeri, *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir özellik gösterir. *Bacillus* suşlarında yoğun halde bulunan müreinin tipi direkt birbirine bağlı mezo – diamino pimelik asit şeklindedir (Lennete ve ark., 1985).

Bazı *Bacillus* türlerinde kapsüller karbonhidrat yapısında olup, leva ve dekstran yapılar yaygın değildir. *Bacillus* türlerinin çoğunda, hareket peritrik kamçılar tarafından sağlanıp, sporları çok kompleks bir yapı göstermekte olup, vejetatif hücrede kolayca görülür. *Bacillus* hücrelerinin hücre duvar yüzeyi tabakaları parakristal şeklindedir ve hücre yüzeyini tamamen kaplamaktadır (Lennete ve ark., 1985).

Bacillus suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü genellikle çevresel faktörlerle değişir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bağlı bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin değişmesi ile kültürün kendisinde de bitakim değişiklikler olur. Yalnızca küçük koloni formlarını içeren suşların dışında koloni çapı, besiyeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Lennete ve ark., 1985).

Bazı *Bacillus* türleri katı besiyerinde, inokülasyondan önce ortamdaki nem uzaklaştırılmadığı takdirde kümeler halinde bulunma eğilimi gösterir. Çoğu *Bacillus* türü pigment üretmez. *Bacillus megaterium* suşları özellikle kazein agarda sarı renkte pigment oluştururlar (Lennete ve ark., 1985). *Bacillus* türleri toprakta, suda, fekal materyalde ve çeşitli gıdalarda bulunabilir (Banwart, 1983).

1.3.1.1. Ortam Bileşimi ve Sıcaklık Etkisi

Kimyasal tepkimelerin çoğu sıcaklık yükseldikçe daha hızlı gerçekleşir. Moleküllerin yüksek ısıda daha hızlı hareket etmeleri nedeniyle onların reaksiyona girmeleri kolaylaşır. Enzimle katalizlenen tepkime hızı 0-40 °C arasında yükselir. Ancak 40 °C'den itibaren enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C'de enzim tamamen protein yapısı denatüre olacağından bozulur (Horikoshi ve ark., 1982., Bhat, 2000., Mawadza ve ark., 2000).

1.3.1.2. Ortam Bileşimi ve pH Etkisi

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Hücrelerde her birinin pH'ya karşı davranışı farklı yüzlerce enzim mevcuttur ve pH'nın karmaşık hücre içi kontrol mekanizmasında önemli bir yeri vardır (Bhat, 2000).

1.3.2. *Bacillus* sp.nin Kullanım Sebepleri

Çoğu *Bacillus* türü; polisakkaritler, nükleik asitler ve lipitler gibi polimerleri parçalamaya yarayan ve hücre dışına salgılanan hidrolitik enzimler üretir. Bu moleküllerin parçalanmasıyla bakteri karbon kaynağı ya da elektron taşıyıcı olarak kullanabileceği ürünler elde eder. Örneğin; Alkalen proteaz, *Pseudomonas* sp. , *Aspergillus flavus*, *Microbacterium* sp. *Alcaligenes faecalis* gibi birçok mikroorganizmanın ürettiği bir enzimdir. Fakat *Bacillus* sp. hücre dışı proteaz örneğin keratinaz gibi enzimlerin spesifik üreticisidir.

Ayrıca; elliye yakın türü barındıran *Bacillus*'larda bütün türler Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Kanlı Agar gibi besiyerlerinde üreyebilir, topraktan kolaylıkla izole edilebilir, kolay şartlar altında ve çabuk üretilebilirler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler. Bütün bu sebeplerden dolayı biyoteknolojik alanda, endüstri ve sanayide çok kullanılırlar (Taubman, 1992).

1.3.3. Bakterilerden Elde Edilen Bazı Enzimler

1.3.3.1. Proteolitik Enzimler

Proteolitik enzimler peptit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir; katalizleme biçimlerine bağlı olarak peptidazlar ve proteazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Peptidazlar ancak uç amino asitleri veya dipeptitleri uzaklaştırabildiğinden ikincil öneme sahiptir.

Proteazlar biyokatalitik mekanizmaları dikkate alındığında dört gruba ayrılır. Bunlar; serin proteazlar (EC 3.4.2.1), sistin (tiyol) proteazlar (EC 3.4.22), aspartik (karboksil) proteazlar (EC 3.4.23), metallo (nötral) proteazlardır (EC 3.4.24) (John, 1987).

1.3.3.2. Serin Alkali Proteaz

Serin alkali proteaz endüstriyel enzimlerin en önemlilerindedir. Deterjan endüstrisinde kullanılan serin alkali proteaz toplam enzim üretiminin %35'ini oluşturmaktadır (John, 1987).

1.3.3.3. Selülaz

Selülaz birçok mikroorganizma tarafından üretilmesine rağmen bunlardan yalnızca birkaç tanesi ticari üretim için uygundur. Mikroorganizmalar endoglukonaz, ekzo-glukonaz ve β - glukosidaz enzimlerini üretebilme yeteneğine sahiptirler. Bakteriler arasında *Cellulomonas* sp, *Bacillus* sp. ve *Thermoactinomyces* sp. ekstraselülaz selüloolitik aktiviteye sahiptirler (John, 1987).

Selülotik enzimler,sıvı kazancını artırmak ve iyi bir renk elde etmek için alkol üretiminde kullanılmaktadır. Deterjanlarda selülazın varlığı renklerin canlanmasına, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca

selülaz kot pantolonların biyolojik olarak taşlanması için kullanılmaktadır (Niehaus ve ark., 1999). Aynı zamanda meyve ve sebze sularının berraklaştırılması için de kullanılmaktadır. Yine bu enzim, zeytinyağlarının ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır (Bhat, 2000). Özellikle endo-ksilanlarla beraber fırıncılık ürünlerinin kalitesinin artırılmasında kullanılmaktadır. Öte yandan biyoteknolojik olarak önemli bir yanı da; bira mayalanması ve şarap üretiminde rol almasıdır (Galante ve ark., 1998).

Selülazın diğer kullanım alanları, selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonudur (Niehaus ve ark., 1999). Bunların yanında selülaz enzimi kağıt endüstrisinde de kullanılmakta olup kağıt endüstrisi denilince; hammadde olan odun ve hurda kağıdın işlenmesinden, ağartılmasından, kağıdın yapımı ve atık suyun arıtılmasını da içine alan işlemler zinciri kastedilmektedir. Selülaz enzimi de bu işlemler sırasında özellikle kağıdın ağartılması işleminde sıkça kullanılan bir enzimdir (Karademir ve ark., 2002).

1.3.3.4. Amilaz

Amilazlar, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstraselüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, uygun koşullarla kısa sürede elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır.

Termostabil α -amilazın uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadır (Bailey ve Ollis, 1977; Bajpai ve Bajpai, 1987). Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo β -glukanazlardır (Demain ve Solomon, 1981).

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçıoğlu, 1979).

Amilaz enzimi ekmekçilikte, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim, 1988). Meyve suyu endüstrisinde de kullanım alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadığında toplandığında meyvede halen nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun ortama amilaz ilave ederek giderilmektedir.

1.3.3.5. Ksilenz

Bitki hücre duvarları mikroorganizmaların canlı bitki dokusuna geçişini engellemek için bir bariyer meydana getirmektedir (Chen ve ark., 1996). Doğal olarak

bulunan lignoselülozik bitki biyokütlesinin içeriğinin %20-30' unu heterojen polisakkaritler olan ve selülozla ilişkili bir şekilde bulunan hemiselülozik materyaller oluşturmaktadır. Biyokütle, dünyanın yakıt ihtiyacını karşılayan ve yeterince kısa bir döngüye sahip olan alternatif doğal kaynaklardır. Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik kısmının temel bileşenidir ve yüksek potansiyelde kullanışlı son ürünlere parçalanabilen ikinci en bol kaynaktır (Christov ve ark., 1996, Gessesse, 1998). Pek çok bakteri ve mantar ksilanı sindirmek için ksilenaza ihtiyaç duyar. Bu nedenle patojenler ve saprofitler hücre duvarını parçalayan enzimler üretmektedirler (Gamerith ve ark., 1992).

Ksilan ve ksilenazın endüstriyel uygulamaları araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bunlara örnek olarak kağıt hamuru ve kağıt endüstrileri, gıda ve yem endüstrileri verilebilir. Ksilenazların, çeşitli kullanışlı ürünlerin üretimini ekonomik bir şekilde arttırmada önemli potansiyelleri olduğu gösterilmiştir (Kulkarni ve ark., 1999).

Çevresel düzenlemeler kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ağartma işleminde klor kullanımını sınırlamıştır (Chen ve ark., 1996). Günümüzde çevreyi endüstriyel atıklardan korumak için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzim sistemlerinin uygulanması önem kazanmıştır (Jeffries, 1981). Bu nedenle çevre kirliliğini indirgeme yaklaşımlarından biri, kağıt hamurunun ksilenaz kullanılarak ön işlemlerden geçirilmesidir. Bu yaklaşım ağartma kimyasallarının özellikle de klor bileşiklerinin önemli derecede indirgenmesine ve kirliliğin azaltılmasına izin vermektedir (Salles ve ark., 2000).

Ksilenazlar gıda endüstrisinde de geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ksilenazların ekmek ve hamur kalitesinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Buğday unundaki ksilenaz için substrat olan arabinoxylan (AX) yoğun çalışmalara konu olmuştur. Ksilenazın ekmek kalitesini arttırmadaki etkinliği ekmek hacmindeki artış ile görülmektedir. Ayrıca ksilenaz, şıra ve meyve suyunun arıtılması, meyve ve sebzelerin suyunun elde edilmesi içinde kullanılmaktadır (Keskin, 1982).

1.3.3.6. Proteaz

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadır ve böylece besin döngüsünü ve bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır (Aoki, 1995).

Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, hayvan ve fungal proteazlar ile karıştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir (Banerjee ve ark., 1999).

Bu nedenle ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroorganizmalar araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Jasvir ve ark., 1998). Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Johnvesly ve Naik 2001). Çünkü çok geniş çeşitli ortamlardan izolasyonu kolaydır, bununla birlikte *Bacillus* hem

kompleks hem de sentetik ortamda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH' ya dayanmaktadır (Kaur ve ark., 2001).

Proteazlar, deterjan sanayisi gibi geniş uygulama alanlarında kullanıldıklarından çok önemli endüstriyel enzimlerdir (Matyar, 2002). Günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni proteazlar üzerinde durmaktadır (Mehrotra ve ark., 1999).

1.3.3.7. Keratinaz

Keratinler, disülfid bağlarından dolayı proteolitik parçalanmaya karşı mekanik stabilite ve direnç gösterirler. Bakteri, mantar ve actinomyces türlerinin pek çoğu proteolitik enzimler üretebilmektedir.

Keratinlerin yapısal modifikasyonlarında mikrobiyolojik proseslerden ziyade fizikokimyasal prosesler uygulamaktadır. Bu keratinolitik enzimlere keratinaz denir.

Keratinaz enzimi, disülfid bağlarını parçalamak yerine, keratinin parçalanmasını sağlar. Keratinaz ya da diğer keratinolitik enzimlerin, yoğun substratlar üzerindeki hareket kapasitesi, proteolitik enzimlerle kıyaslandığında daha fazladır. Bu özellik keratinazı diğer proteazlardan ayırır. Keratinazların pek çoğu hücre dışında aktiftir (Vignardet ve ark., 1999; Kunert, 1973).

Bacillus licheniformis PWD-1 ırkıdan üretilen keratinazın da tavuk tüyündeki keratini hidrolize edebilme yeteneği, öğütülmüş tavuk tüylerini, çözünebilir proteinlere peptit ve aminoasitlere dönüştürülmesi de dahil olmak üzere pek çok alanda kullanım şansı bulunmaktadır (Shih ve Wang, 1992).

1.3.3.8.Lipaz

Lipazlar, yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Enzim, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizi gerçekleştirir ve enzim reaksiyonunun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas ve ark., 2002).

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek lipolizis çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, proteolitik enzimler gibi lipazlarda mevcuttur.

Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margariner, şorteningler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır.

Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp.'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir.

Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan selüöz fibriller ise, selülaz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır (Hiol ve ark., 2000).

Lipaz enzimi de dericilikte kullanılan enzimlerden biridir. Bu enzim, yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir. Deriler işlenirken bu amaçla bazı proteinler parçalanıp, deriden uzaklaştırılır. Deriye ne derecede esneklik kazandırılacağı ise, derinin kullanılacağı alana bağlıdır.

Lipaz enzimi, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid (yağ) içeriğine etki etmektedir. Bu enzim içinde kullanım miktarı ve tipi oldukça önemlidir. Örneğin, yüksek miktarlarda kullanımda hamur özellikleri açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır. Öte yandan uygun lipaz tipinin seçilmesi de önemlidir. Türk ekmek üretim biçimine uygun olmayan lipaz tipinin ekmek özelliklerine olumlu bir katkısı bulunmamaktadır. Onlara uygun lipaz tipinin ilavesi; Hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmek içi yumuşaklık, ekmek hacminde artış sağlar

1.3.4. Keratini Parçalayan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Dermotofitler, canlı hayvanların keratinli substratlarında parazit yaşayan mikroorganizmalardır. Keratin içeren bir kültür ortamında üretildiklerinde azot ve karbon kaynağı olarak keratini kullanabilirler (Onifade ve ark., 1998, Bahuguna ve Kushwana, 1989).

Hücre dışı keratinazların sentezi konusunda yaklaşık 300 mantarla yapılan çalışmada (Friedriche ve ark. , 1999) bunların yaklaşık %54' ü çözünebilir keratinle agar plakaları üzerine üremiş ve enzim çıkarmıştır. En güçlü extraselüler keratinaz üretenler sırasıyla *Aspergillus flavus*, *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis*'dir.

Kamçılı mantarlar çeşitli hidrolitik enzimlerin sentezini yaparlar. Bazı türleri çeşitli proteazlar, karbonhidrazlar ve lipazlar gibi endüstri için oldukça önemli enzimlerin üretiminde kullanılırlar (Onifade ve ark. , 1998).

Keratinolitik enzimler, keratinli atıkların mikrobiyal biyolojik değişim proseslerinde de rol oynarlar. Bu nedenle enzimler, özellikle bakteri kökenliler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Örneğin: *Bacillus* sp. (Lin ve ark., 1992, Cheng ve ark.,1995).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Raubitshek (1961), keratinin mekanik parçalanmaya uğradığını ispatlamıştır. Mekanik parçalanma; keratinli substratların misel baskısı veya içine nüfus etmesinin bir sonucu olarak keratinin parçalanmasıyla açıklanır. Bu yalnızca mantarlar ve misel veren keratin parçalayan mikroorganizmalar için geçerlidir.

Yu ve ark., (1971), keratinolitik aktivite sergileyen endoproteazlar ya da hücreye bağlı enzimler konusunda çeşitli raporlar vermişlerdir. Bunlardan birinde *Trichophyton mentagrophytes*'in keratin parçalayıcılığı incelenmiş ve hücreye bağlı enzim aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır.

Elmayergi ve Smith (1971), mikrobiyal teknolojinin tüy prosesinde uygulanma sürecinde, besin maddeleri ile ilgili mikroorganizmaların kültür edilmesi ve keratinaz aktivitesi sonunda, tüy-keratin yapısında bir değişiklik meydana getirebildiğini ve bu durumda bunları tüketen hayvanların sindirim enzimlerine karşı olan tüy-keratin direncini değiştirebileceğini göstermişlerdir. Aynı zamanda *S. fradiae*'nin methionin açığa çıkaran bir mutanlığı ile fermente edilen tüyün metionin ve lizin içeriğinde marjinal bir artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Blank ve ark., (1972), keratinazların deri endüstrisinde, saçın elimasyonu ve dermatophytosis tedavisi için aşının hazırlanmasında, insan nasırının eliminasyonu, sedef hastalığı veya akne keratinin elimasyonunda kullanıldığını göstermiştir.

Kunert (1972), *Dermatophytes*'ler tarafından keratinin parçalanması sırasında meydana gelen sülfitoliz olayının derinlemesine anlaşılmasını sağlamıştır. Keratin parçalanması sırasında disülfid ayrışmasını gösteren keratin üzerinde üretilen kültürlerin içinde sülfosistin, tiyosülfat, sülfat, sistin gibi sülfitoliz ürünlerinin varlığını göstererek, keratin parçalanmasını ispatlamıştır. Hücrenin kimyasak reaksiyonlarında katı keratin parçalanması sırasında ortaya çıkan lokasyonlarda fazla miktarda "S-sülfo grupları"nın varlığını ortaya koymuştur. Keratinazın izole ve saflaştırılmasıyla ilgili çıkardığı sonuç, saflaştırılan enzimler kullanıldığı zaman, muhtemel bir mekanizmanın varlığının yadsınmaz olduğunu mantarlarda tepkimelere ilişkin sıralamanın varsayımlara dayandığını göstermiştir.

Ruffin ve ark., (1976), tam bir keratin hidrolizinin, proteolitik sindirime karşı olağandışı stabil ve dirençli olmalarının temel kaynağını temsil eden disülfid köprülerin bölünmesi ve bu sayede başlatılan keratin parçalanmasının ancak tamamlandıktan sonra elde edildiğini kanıtlamışlardır.

Williams ve ark., (1990), tüy parçalayan bakterilerin izolasyonunu, teşhis ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kümes hayvanları atıklarında aerobik kısımdan kuş tüyünü sindiren *Bacillus licheniformis* (PWD-1) i izole etmişlerdir.

Lee ve ark., (1991), *Bacillus licheniformis*'ten hazırlanan ham keratinaz enziminin öncü kullanımını yem katkısı olarak yapmış ve tüy yiyeceğinin kümes hayvanları için önemli aminoasit kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir.

Fujiwara ve Yamamoto (1991), *Bacillus* B21 türünden üretilen alkali proteazların röntgen filmi üzerindeki jelatin tabakayı parçaladığını saptamışlardır. Bu proteolitik enzimlerin, X-ışınları (röntgen) filminden, gümüş kaplamaya kadar değişik alanlarda kullanılabileceğini bulmuşlardır.

Lin ve ark., (1992), *Bacillus licheniformis*' ten sağlanan keratinin, test edilen tüm protein substratlarını (sığır serum albumini, kollajen, elastin ve tüy keratini dahil) hidrolize etme yeteneğinde olduğunu bulmuşlardır.

Ming-Muh ve ark., (1995), kuş tüyünü parçalayan mikroorganizmaları ayırmaya çalışmışlardır ve tüylerin en etkili keratin biyo-parçalayıcısının gram (+), çubuk şekilli, endospor yapılı *Bacillus* sp. olduğunu belirlemişler.

Böckle ve ark., (1995), keratin parçalayan *Streptomyces pactum* DSM 40530'dan üretilen bir serin proteazı kazein agaroz çekimli kromatografi uygulayarak saflaştırmışlardır. Proteinaz 40-70°C sıcaklık ve pH değerlerinde optimal aktivite sergilemiştir.

Brutt ve ark., (1999), kuşların tüylerinin tamamında tüy parçalayan basilin bulunduğunu göstermişlerdir. Binsekizyüzelliüç yabancı kuş örneğinin %8'inde kuşların tüyleri içinde tüy parçalayan *Bacillus licheniformis*' in bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Lee, H., Suh, D., Hwange, J., Suh, H (2002). Yaptıkları çalışmada soya fasulyesinin macununun atıklarından keratinolitik proteaz üreten *Bacillus* sp. izole etmişlerdir. Elde edilen enzimin optimum sıcaklığının 40°C, pH'nın ise 7 olduğunu bulmuşlardır.

Md. Mozammel Hoq., Khanden Al Zaid Siddiquee., Hiroko Kawasaki ve Tatsuji Seki (2005). Tavuk çiftliği ve tabakhaneden 8 yeni *Bacillus* bakterisi izole etmişlerdir. Çoğunun anlamlı düzeyde keratinolitik aktivite gösterdiklerini bulmuşlardır.

Cheng-gang-Cai., Ji Shuang Chen., Jiong-Jiong Qi., Yun Yin ve xia-dang Zeng (2008). Yapmış oldukları çalışmada keratinaz üreten *Bacillus subtilis* KD-N2 suşunu izole edip saflaştırmışlardır. Bu suştan elde edilen enzim için optimum pH'nın 50°C'de 8.5, optimum sıcaklığın pH8.5'de 55°C olduğunu belirtmişlerdir.

Marina Corfezi., Jonas Contiero., Cristian J.B. deLima., Roberta B. Lovoglio ve Rubens Monti (2008). Yapmış oldukları çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* suşunu tavuk çiftliğinden izole etmişlerdir. Bu suştan elde edilen keratinazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 50°C ve 8 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD**3.1. Materyal****3.2. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri****3.2.1. Keratinaz Aktivitesi için Kullanılan Besiyeri (Sıvı)**

Keratinaz aktivitesi ölçülecek olan bakterinin üretilmesinde ve enzimin elde edilmesinde kullanılmıştır (Kim ve ark., 2001).

Besiyeri Bileşimi	(g/Lt)
NH ₄ Cl	0.5
NaCl	0.5
K ₂ HPO ₄	0.3
KH ₂ PO ₄	0.4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.1
Yeast Ekstraktı	0.1
Ezilmiş Tavuk Tüyü	10

3.2.2. Jelöz Besiyeri

Bacillus sp. bakterilerinin hareketli olup olmadığını görmek amacıyla kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Besiyeri Bileşimi	(g/Lt)
Et zt	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar	5

3.2.3. Nütrient Buyyon

Bakterileri üretmek amacıyla kullanılan sıvı besiyeridir (Çetin, 1968).

Besiyeri Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	10
Et zt	10
NaCl	5

3.2.4. Kazein Besiyeri

Bakterilerin kazeini hidrolize etme yeteneğinin saptanması amacı ile kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

Besiyeri Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	5
Maya	3
Süt tozu	1
Agar	12

3.2.5. Simon's Sitrat Besiyeri

Sitratın bakteriler tarafından karbon kaynağı olarak kullanılıp-kullanılmadığının belirlenmesinde kullanılmıştır (Mac Faddin, 2000).

Bileşimi	(g/Lt)
NaCl	5
MgSO ₄	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	2
Bromthymol Blue	0.08
Agar	20

Besiyerinin pH'sı 6.9'a ayarlanır ve eğik katı şeklinde hazırlanır.

3.2.6. Üre Agar

Bakterilerin üreyi hidrolize etme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Mac Faddin, 2000).

Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	1
NaCl	5
Üre	20
KH ₂ PO ₄	9.1
D(+)-Glukoz	1
Fenol kırmızısı	0.012
Agar	15

3.2.7. Yumurta Agar

Bakteri identifikasyonunda lesitin hidrolizini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır. 1 adet yumurta önce distile su ile yıkanır. Sonra %70'lik alkol çözeltisine konur. 1-3 saat bekletilir. Daha sonra alevden hızlıca geçirilir. Kabuğu bir ucundan hafifçe açılarak, 10ml steril serum fizyolojik içerisine, sadece sarısı akıtılır. Köpürmeden homojenize edilir. Steril edilmiş ve 40-50°C soğutulmuş jeloza ilave edilerek petri kutularına dökülür (Mac Faddin, 2000).

3.2.8. Glukozlu Buyyon

Bakterilerin glukoza kullanarak asit oluşturup oluşturmadıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Mac Faddin, 2000).

Bileşimi : Jelöz besiyerine %1 glukoza ilavesi ile elde edilir.

3.2.9. Mannitollu Buyyon

Bakterilerin mannitoll kullanarak asit oluşturup oluşturmadıklarının belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Mac Faddin, 2000).

Bileşimi: Jelöz besiyerine %1 mannitol ilavesi ile hazırlanır.

3.2.10. İndol Besiyeri (pH:7.2)

Bakteri identifikasyonunda uçucu indoln oluşumunu gözlemek için kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	20
NaCl	5
Triptofan	10

3.2.11. Jelatin Besiyeri (pH:7.0)

Bakterilerin identifikasyonunda jelatinin hidrolizini belirleyebilmek iin yapılmıştır (Bilgehan, 2002).

Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	10
Et zeti	10
NaCl	5
Jelatin	120

3.2.12. Skimmilk-agarlı Besiyeri

Bacillus olarak izole edilmiş bakteri suşlarının proteaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Mohamedin, 1999).

Bileşimi	(g/Lt)
Pepton	10
Et zeti	10
NaCl	5
Skimmilk	8
Agar	15

3.2.13. M9-Niasta Agarı

Amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (Kıran, 2001).

Bileşimi	(g/Lt)
Na ₂ H ₂ PO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄	0.24
CaCl ₂	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Agar	15

3.3. Kullanılan zeltiler

3.3.1. Keratinaz Aktivitesi zerine Kimyasalların Etkisini Saptayabilmek Amacıyla Kullanılan Kimyasallar

Bu alımada DMSO, SDS, Triton X-100, EDTA, NaCl, CaCl₂, ZnCl₂ gibi kimyasalların keratinaz aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır.

3.3.2. Keratin Azure

Keratinaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile substrat olarak keratin azure kullanılmıştır.

Bu amaçla keratin azure (% 0.4, 10mM Tris-HCl, pH 8.5, içerisinde çözülmüş ve otoklav edilmiştir) 0.8 ml, kültür süpernatantından 0.2 ml ilave edilerek 50°C’ de 1 saat sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sresinin sonunda filtre edilen karışım 15000xg de 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatant 595 nm’de spektrofotometrede kre karşı okunmuştur. Pozitif değerdeki sular keratinaz pozitif olarak kabul edilmiştir (Suntornsuk, 2003; Letourneau, 1998).

3.3.3. Kovaks Ayıracı

İndol testi için kullanılır (etin, 1968).

Para-dimetil	5g
Aminobenzaldehit	
Amil veya Butil	75ml
Alkol	
%37’lik HCl	25ml

3.4. Metod

3.4.1. Toprakta *Bacillus* sp. Sularının İzolasyonu

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama iftliği'nden toprak örnekleri alınmış ve bu örneklerden 1gr. tartılarak 4,5 ml steril distile su ile süspansiyon haline getirilmiştir. İzole etmek istediğimiz *Bacillus* sp. sporlu bir bakteri olduğundan elde edilen süspansiyon 70°C' de 10 dakika veya 60°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir (Lennete ve ark., 1985).

Saf halde *Bacillus* kolonileri elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılarak, jelöz besiyerine yayma şeklinde ekim yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde gelişen farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçilerek keratinaz aktivitelerinin araştırılması amacı ile +4°C' de saklanmıştır.

Elde edilen izolatların *Bacillus* kolonileri olduğunun belirlenmesi amacıyla gram ve endospor boyama uygulanmıştır.

3.4.2. Bakteri Karakterizasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Testler

3.4.2.1. Ürenin Hidrolizi

Eğik katı şeklinde hazırlanmış üre agara bakteriler yzeyeye ze ile yayma metoduyla ekilip, 37°C' de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pembe renk oluşumu, amonyak üretimini, dolayısıyla üreaz enziminin varlığını göstermiştir (Demirbağ ve Demir., 2005).

3.4.2.2. Jelatinin Hidrolizi

Jelatinaz üretiminin tesbiti bakteri identifikasyonunda önemli bir testtir. Jelatin bir hayvansal kollojen derivatı olan bir proteindir. Jelatini hidrolize eden enzim jelatinaz adını alır. Jelatinaz retimi bazı bakteriler için virülens faktörü olabilmektedir. Bu amaçla jelatin ile hazırlanmış jelöz besiyerine batırma kültür şeklinde bakterinin saf kültüründen ekim yapılmış 37°C' de 48 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyonu takiben besiyerleri 37°C' de sıvı halde olduğunda ve buzdolabına konduğunda besiyeri katılaşma göstermez ise bakteri jelatini hidrolize etmiş demektir. Katılaşma gözlenmiş ise haftada bir kontrol yapılarak 4 haftaya kadar bekletilir (etin, 1968).

3.4.2.3. Katalaz Testi

Eğik katı besiyerinde üretilmiş (18-24 saatlik) saf kültür üzerine %3'lük H₂O₂ çözeltisinden 1 ml ilave edilir, gaz çıkışı gözlenir. Gaz oluşumu katalaz reaksiyonunun pozitifliğini ifade eder (Bilgehan, 2002).

3.4.2.4. Niastanın Hidrolizi

Bakteriler 37°C’ de çalkalanarak üretildikten sonra M9 niastalı besiyerine tek koloni oluşturacak Şekilde yayma Şeklinde ekim yapılarak 72 saat üretilmiş, koloniler petri kutusunun kapağına dökülen iyot buharına tutularak boyanmıŐtır. Zemin maviye boyanırken α -amilaz enzimi üreten kolonilerin çevresinde boyamayan Şeffaf zonlar meydana gelmiŐtir (Kırın, 2001).

3.4.2.5. Voges-Proskauer Testi

Karbonhidrat metabolizmasının ara ürünü olan asetil-metil-karbinoln oluşumu temeline dayanan bir testtir. Bu madde KOH ve hava varlığında diasetile okside olur. Diasetil ise –naftol ve peptonda bulunan bir amino asit olan arginin varlığında 2-4 saat içerisinde karıŐıma kırmızı bir renk verir. Çözelti ilave edildikten sonra sonuçların değerlendirilmesi 4 saat içerisinde gerçekleŐtirilmelidir. Bakteri, 24 saatlik buyyon kültüründen bir zeyle alınarak daha önceden hazırlanmış 5ml’ lik Clark-lups besiyerine inoküle edilir. 37°C’ de 2-4 gün inkübe edilir. Inkbasyonu takiben 1ml çözelti tp içerisine ilave edilir. Renk deđiŐimi gözlenir. Kırmızı renk bu testin pozitif olduğunu gösterir (Mac Faddin, 2000).

3.4.2.6. Yüzey Zar Oluşumu

Bakterinin saf kültüründen alınan bir ze rnek LB (Louria Broth) besiyerine ekilir. 37°C’de 24 saat etüvde inkübe edilir. Inkübasyon sonunda bakteriler, yüzey zar oluŐturarak üreme gösterip göstermediklerine göre değerlendirilir (etin, 1968).

3.4.2.7. İndol Testi

Bu test mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayırıŐtırarak indol meydana getirme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılır. İçinde triptofan bulunan sıvı besiyeri 6ml Şeklinde tüplere hazırlanır. 37°C’de 24 saat inkübe edilir. Inkübasyon sonrası tüplerin üzerine kovaks ayırıcından 0.3ml ilave edilip iyice karıŐtırılır. Tüplerin st kısmında birkaç dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif, sarı halkanın oluşması negatif olarak değerlendirilir (Seeley ve Vandermark., 1981).

3.4.2.8. Kazeinin Hidrolizi

Bakterilerin salgıladığı bu enzimi tespit etmek amacıyla besiyerine inoküle edilen bakteriler 37°C’ de 1-2 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon sresinin sonunda bakteri üremesinin etrafında Şeffaf zonlar görülmesi kazeinin pozitif olduğunun göstergesidir (Gcin ve Dülger., 1995).

3.4.2.9. Simons-Sitrat Testi

Buyyon besiyerine karbon kaynağı olarak yalnız sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) konursa bazı bakteriler bu maddeyi kullanırlar ve besiyerinde

rerler. Kullanamayan bakterilerde üreme gözlenmez. Simons-Sitratl besiyerinin yüzeyine bakterinin taze kültüründen yayma metoduyla ekim yapılmıştır. 37°C' de 3 gün bekletilir. Bakteriler sitrat karbon kaynağı olarak kullanırsa indikatör mavi renk alır. Mavi rengin oluşumu pozitif sonucu gösterir (Çetin, 1968).

3.4.2.10. β-Hemoliz Testi

Bazı bakteriler insan yada hayvanların eritrositlerini lizi eden hemolizinler salgırlar. Eğer hemoglobini bütünüyle parçalayın enzim salgılanmışsa bu tip hemoliz β-hemolizdir. Bakterinin taze kültüründen alınan örnek kanlı agar üzerine çizgi şeklinde ekilmiş ve 24 saat 37°C' de inkübe edilmiştir. Üreme çizgisi etrafında oluşın şeffaf zon β-hemoliz oluşumunun göstergesidir (Çetin, 1968).

3.4.2.11. Lesitin Hidroliz Testi

Lesitinler fosfolipit olarak sınıflandırılırlar. Yağ asiti fosforik asit, gliserol ve kolin içeren bileşiklerin bir grubudur. Lesitin yumurta sarısının normal bir bileşenidir. Lesitinaz yumurta sarısının bileşeni lipoproteine etki ederler. Lesitin hidrolizi kolin ve fosforu serbest bırakır ve çözünmez yağ preparasyonu opaklaşmaya neden olur. Kolonileri çevreleyen opak zon lesitin hidrolizini gösterir. Yumurta sarısı-tuzlu su karışımı, belli bakteriyel toksinler veya lesitinaz ile karıştırıldığında, opaklaşır ve flokülasyon gözlenir (Mac Faddin, 2000).

3.4.2.12. Glikozdan Gaz Oluşumu

%1 oranında glikoz ihtiva eden buyyona bakteri ekilmiş ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda durham tüpü içerisinde oluşın hava boşluğu, sonucun pozitif olduğunu göstermiştir (Mac Faddin, 2000).

3.4.2.13. Mannitolden Gaz Oluşumu

%1 oranında mannitol ihtive eden buyyona bakteri ekilmiş ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda durham tüpü içerisinde oluşın hava boşluğu, sonucun pozitif olduğunu göstermiştir (Mac Faddin, 2000).

3.4.2.14. Hareket Testi

Bakterilerin besiyerindeki hareketlerini saptamak amacıyla, yumuşak tabakalı jeloz (%0.5 agar ihtiva eden) kullanılmıştır. Bakterinin saf kültüründen alınan örnek, iğne öze ile batırma kültür şeklinde ekilmiş, 24 saat inkübe edilmiştir. Ekim çizgisi boyunca üremenin görülmesi hareketsizliği, ekim çizgisinden besiyerinin içine doğru yayılarak üreme davranışı, bakterinin hareketli olduğunun kanıtıdır (Çetin, 1968).

3.4.3. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bacillus sp. olarak tanımlanmış 54 adet suş için proteaz aktivitesi pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu amaçla % 0.8 oranında skimmilk bulunan jelöz besiyerine, bakterilerin stok kültürlerinden nokta metoduyla ekim yapılarak 37°C' de 1 gece

inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyonu takiben üreme alanlarının çevresinde şeffaf zon oluşturanlar, proteaz pozitif suş olarak belirlenmiş, keratinaz aktivitesi açısından değerlendirilmek amacıyla stok kültür şeklinde +4°C’ de saklanmışlardır (Kim ve ark., 2001).

3.4.4. Keratin Kaynağının Elde Edilişi

Keratin kaynağı olarak tavuk tüyü kullanılmıştır. Bu tüyler; önce eşme suyuyla daha sonra saf su ile yıkanıp temizlenerek, kesilip kurutulmuştur. Dvlecek konuma kesilerek getirilmiş tüyler, petri kaplarına yerleştirilmiştir. 37°C’ de etüvde kurutulmuştur. Daha sonra havan ile dövülerek ve kesilerek toz haline getirilmiştir. Bu n işlemeden sonra besiyeri hazırlanarak çalışılmaya başlanmıştır (Kim ve ark., 2001).

Besiyeri bu kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır. Steril etmeden önce pH 7,5’e ayarlanmış ve otoklavda 120°C’ de 15 dk. steril edilmiştir. Besiyeri soğuduktan sonra bakteri kültürü eklenmiştir.  gün üreme için 80-100 rpm’de ki çalkalanmalı inkübatör’e konulmuştur.  günlük süre sonunda üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Üreme olduğunda besiyeri filtre kağıdından szlmştir. Sznt (süpernatant) 6000 rpm’de (Micro 22R) 20 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra řu basamaklar takip edilmiştir.

Öncelikli olarak 0.0064 g Keratin Azur tartılarak tüplere konulmuş ve üzerine pH 8.5 olarak ayarlanmış Tris-HCl tamponundan 1.6 ml eklenerek otoklavda steril edilmiştir.

Sterilizasyondan sonra 0.4 ml stsıvı tüplere eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir bu süre sonunda 50°C ‘de 1 saat sıcak su banyosunda beklettikten sonra 595nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur (Gessesse ve ark., 2003; Letourneau ve ark., 1998).

3.4.5. Keratinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Keratinaz retme yeteneği olan bakteriler tüylü minimal besi ortamına inoküle edilerek 3 gün süre ile orbital shakerda 80-100 rpm’de çalkalanarak üretilmiştir. remeyi takiben kültür filtre kağıdından süzülerek bakteriler uzaklaştırılmış ve temiz sznt 6000 rpm devirde (Micro 22R) 20 dakika + 4 °C’ de santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz steril şişelere alınarak enzim karakterizasyonu deneyleri için +4°C’de saklanmıştır (Kim ve ark., 2001; Bressollier ve ark., 1999; Riffel ve ark., 2003).

3.4.6. Keratinolitik Aktivitenin Belirlenmesi

10mM Tris-HCl (pH: 8.5) tamponu içerisinde hazırlanmış keratin azure [%0.4 (w/v)].....1.6 ml
Kltrspernatantı...0.4 ml

Hazırlanan reaksiyon karışımı 50° C' de 1 saat inkübasyon sresinden sonra 6.000 rpm'de (Micro 22R) 20 dakika santrifüj edilmiş, filtre kağıdından szldkten sonra 595 nm'de spektrofotometrede kültür süpernatantı içermeyen reaksiyon karışımından hazırlanmış kre karşı okunmuştur (Gessesse ve ark., 2003; Letourneau ve ark., 1998). Spektrofotometre sonuçları dikkate alındığında en yüksek sonucu veren suş seçilmiştir.

3.4.7. Keratinaz Aktivitesi zerine Sıcaklığın Etkisi

Keratinaz aktivitesi üzerine sıcaklığın belirlenmesi amacı ile enzim preparatı 20-80°C sıcaklık aralıklarında 30 dakika inkübe edilmiş aktivite spektrofotometrede okunarak sonuçlar grafiksel olarak gösterilmiştir (Letourneau, 1998; Böckle, 1995).

3.4.8. Keratinaz Aktivitesi zerine pH'nın Etkisi

Keratinaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 5-12 pH aralığında farklı tamponlar kullanılarak belirlenmiştir (Letourneau, 1998).

50 mM Citrik asit/Na ₂ HPO ₄	(pH 5.0-7.0)
50 mM Tris.HCl	(pH 7.5-9.0)
50 mM NaHCO ₃ /NaOH	(pH 9.5-12.0)

3.4.9. Sıcaklık Stabilitesi

Sıvı haldeki enzim 30 dakika süreyle, 20-80°C' lerde farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra, 60°C' de keratin azure ile 1 saat inkübe edilerek spektrofotometrede okunmuş ve sonuçlar grafiksel olarak gösterilmiştir (Letourneau, 1998; Böckle, 1995).

3.4.10. Keratinaz Aktivitesi zerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Kültür süpernatant sıvısı 15 dakika, farklı kimyasallarla oda sıcaklığında inkübe edilerek, keratin azure ilavesi yapılmıştır. Enzim aktivitesi için gerekli aşamalar tamamlandıktan sonra spektrofotometrede sonuçlar değerlendirilmiştir (Letourneau, 1998; Bressollier, 1999).

Bu kimyasalların konsantrasyonları aşağıdaki gibidir:

5 mg/ml	EDTA
0.1 (w/vol)	SDS
1 M	NaCl
1 M	CaCl ₂
1 M	ZnCl ₂
% 1a	Tween80
% 4a	Triton X-100
%1 (vol/vol)	DMSO
%1 (w/v)	Glikoz

Proteaz aktivitesi gösteren 54 suş, keratinaz aktivitesi için temel tüylü besiyerinde 3 gün süre ile üretildikten sonra, kültür süpernatant keratin azure ile muamele edilip, keratinaz varlığı ve aktivite düzeyi spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Test edilen, proteaz pozitif 54 suştan, 4 suşun keratinaz ürettiği saptanmıştır. Keratinaz pozitif olarak seçilen 4 suşa gram ve endospor boyama yapılmış ve boyama sonucunda suşlar *Bacillus* olarak tanımlanmıştır. Bu suşlardan en yüksek keratinaz aktivitesi gösteren suş UK69 şeklinde isimlendirilmif ve tanımlanması için gerekli testler, indikatörler çalışılmıştır (Holt, 1993; Mac Faddin, 2000).

Bacillus UK69 olarak suşun tanımlanmasında elde edilen veriler izelge 1'de gösterilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden alınan toprak örneğinden, jelöz besiyerindeki üreme davranışları dikkate alınarak *Bacillus* olduğu belirlenen 54 adet suş seçilerek eğik katı jelöze ekilip stok kültürü alınmıştır. Her bir suş skim milk (%10) agar besiyerine nokta şeklinde ekilerek, 37°C' de, 24 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda koloni etrafında şeffaf hidroliz zonu olanlar proteaz pozitif olarak belirlenmiştir.

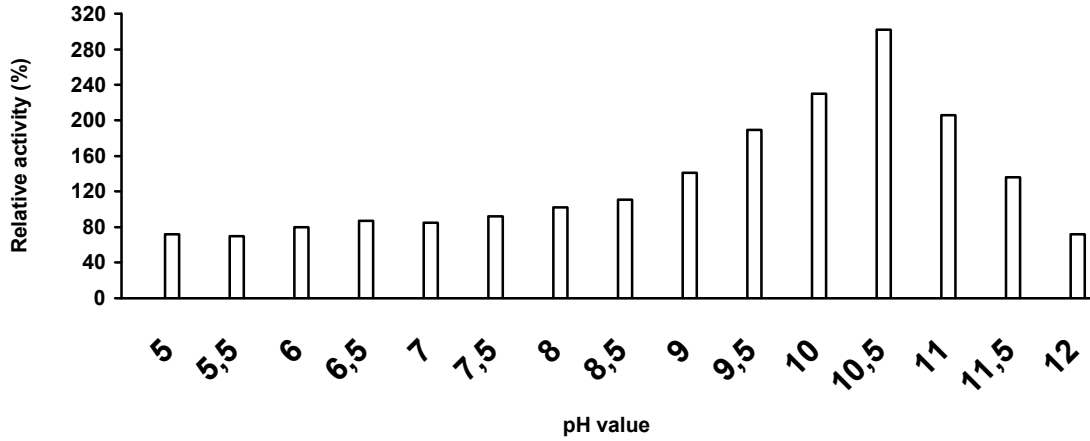
Çizelge 2. UK69 Nolu *Bacillus* Suşunun İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testler (Mac Faddin, 2000).

Uygulanan Biokimyasal Testler	<i>Bacillus</i> İdentifikasyonunda biokimyasal testler	<i>licheniformis</i> kullanılan	Test organizma <i>Bacillus</i> suşu
Gram Boyama	+		+
Katalaz	+		+
Nitratın indirgenmesi	+		+
Spor oluşumu	+		+
• Elipsoidal	-		-
• Sperik			
Beta hemoliz	+		+
Kapsül	-		-
Hareket	+		+
Karbonhidratlar	-		-
• Glikoz	-		-
• Mannitol			
Jelatinin hidrolizi	+-		+
Üreaz	D		+
Lesitinaz	-n		
Nişastanın hidrolizi	+		+
Voges- Proskauer	+		+
Simons sitrat	+		+
Yüzey zarı	+		+
Dipte çökelti	+		+
İndol oluşumu	-		-

+:pozitif, -: negatif, D: Değişken, -n: zayıf veya geç pozitif

4.2. Optimum pH

Keratinaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi farklı pH'larda 3 farklı tampon sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Enzim alkali pH'da aktivite göstermiştir, enzimin optimum pH değeri 10.5 olarak bulunmuştur (Şekil 1). Suntornsuk ve Suntornsuk (2003) yapmış oldukları çalışmada bakterilerin ürettiği, tüylerin parçalandığı ve keratinaz üretiminin gerçekleştiği optimum pH'yı *Bacillus* türleri için 9 olarak, Korkmaz ve ark., (2004) ise *Bacillus lithoniformis* HK-1 için optimum pH'yı 11 olarak bildirmişlerdir. Yine aynı şekilde, Kim ve ark., (2001) yılında *Bacillus subtilis*' in optimum enzim aktivitesinin pH 5-9 arasında görüldüğünü, Huang ve ark.,(2003) ise *Bacillus pumilis* için keratinolitik aktivite açısından alkali serin proteazda optimum pH'nın 10 olduğunu ifade etmişlerdir. Tatineni ve ark., (2007) *Streptomyces* sp'de alkali keratinazın optimum aktivite gösterdiği pH'yı 11 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen veriler bu çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

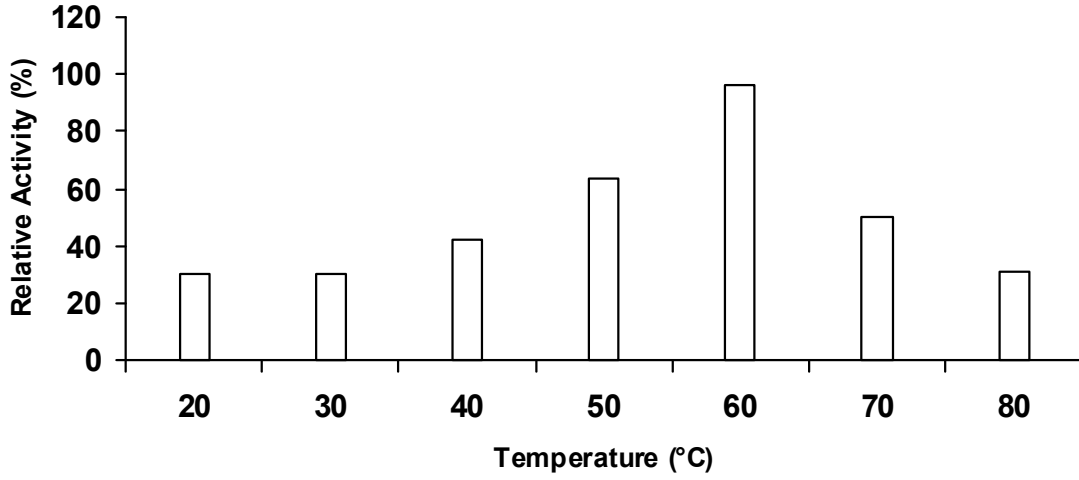


Şekil 1: Keratinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

4.3. Optimum Sıcaklık

Keratinaz enzimi 20-80°C' de aktif olup, optimum sıcaklık 60°C olarak saptanmıştır (Şekil 2). Daha önce Korkmaz ve ark., (2004) yılında yapmış oldukları çalışmada *Bacillus licheniformis* HK-1'de optimum aktivitenin 60°C' de olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Lin ve ark., (1992) *Bacillus licheniformis* PW-1 suşu ile yapmış oldukları çalışmada optimum enzim sentezleme sıcaklığının 50°C olduğunu bildirmişlerdir. Allpress ve ark., (2002) keratinolitik aktivite için optimum sıcaklığı 50°C olarak, Farag ve Hassan., (2004) *Aspergillus oryzae* için maksimum aktivitenin görüldüğü sıcaklığı 60°C olarak, Muhsin ve Aubaid., (2001) *Trichopyton mentagrophytes* için en yüksek keratinaz aktivitesinin gözlemlendiği sıcaklığı 50°C olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

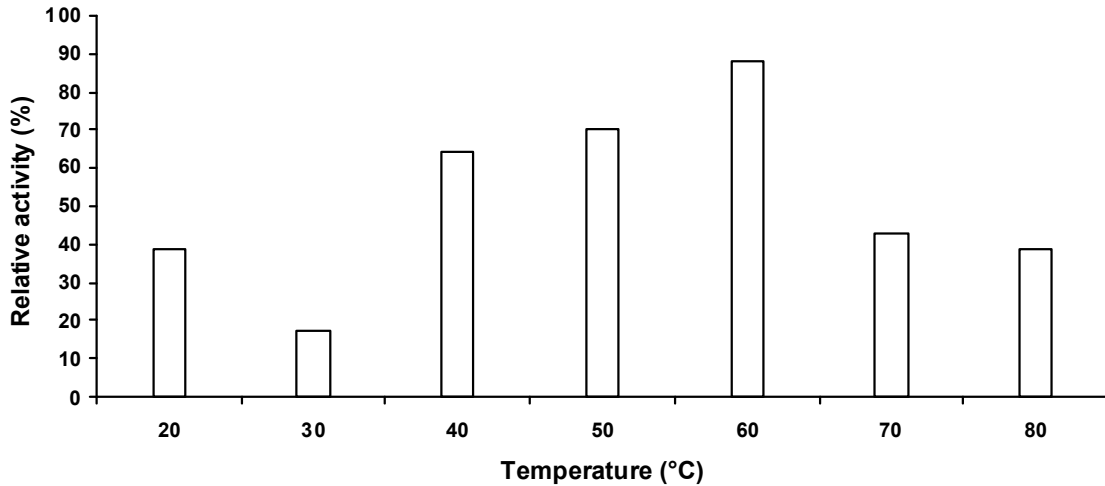
Yapılan çalışmada elde edilen veriler ile daha önce yapılan ve literatürde geçen sonuçlar arasında bir uyum gözlenmektedir.



Şekil 2: Keratinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.

4.4.Sıcaklık Stabilitesi

Enzimin sıcaklık stabilitesi, farklı sıcaklıklarda (20-80°C) 30 dk süre ile bekletilmesi ile saptanmıştır. Enzimin 60°C' nin üzerinde aktif olduğu; 80°C' de bile yaklaşık % 57 oranında aktif kaldığı gözlenmiştir (Şekil 3). Korkmaz ve ark., (2004) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus licheniformis* HK-1'de enzimin sıcaklık stabilitesinin 60°C olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde, Tapia ve Contiero., (2008) *Streptomyces* ile yapmış oldukları çalışmada keratinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin 40-60°C olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 3: Keratinazın Sıcaklık Stabilitesi

4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkileri

Enzim preparasyonu çeşitli kimyasallar ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, aktivitedeki artma ve azalmalar spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bazı kimyasallar, metal iyonları ve glukozun keratinaz aktivitesi üzerine etkileri çizelge 3'de gösterilmiştir. İnhibitörler, metal iyonları, tuzlar ve glukoz, enzime farklı şekillerde etki etmişlerdir. Çizelgede verilen bu sonuçlar dikkate alındığında, Tween 80 ve TritonX- 100' ün bakterilerde enzim üretimini baskı altına aldığı görülmektedir. Bununla birlikte Tween 80, TritonX-100, glukoz besiyerinde iken, keratinaz üretimini inhibe ederler (Suntornsuk, 2003). TritonX- 100 (% 91), tween 80 (% 30) ve glukozun (%61) varlığında tüylerin parçalanması baskı altına alınarak keratinaz üretimi inhibe edilmiştir. Suntornsuk ve Suntornsuk., (2003) *Bacillus* sp. FK 46 da yapmış oldukları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Tapia ve Contiero., (2008) *Streptomyces*' lerde yaptıkları çalışmada aynı etkiyi gözlemlemişlerdir.

Enzim NaCl (%87), ZnCl₂ (%58), CaCl₂ (%76) gibi metal iyonlarının varlığında kısmen inhibe olmuştur. Tapia ve Contiero., (2008) *Streptomyces*' de yapmış oldukları çalışmada, enzimin NaCl, ZnCl₂ ve CaCl₂ iyonlarının varlığında kısmen inhibe olduğunu, Korkmaz ve ark., (2003) CaCl₂ ve ZnCl₂ varlığında, *Streptomyces* strain BA7 suşunda keratinaz aktivitesinin azalma gösterdiğini bildirmişlerdir.

EDTA (%98) ve DMSO (%92) varlığında çok önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Doddapanemi ve ark., (2007). Tapia ve Contiero., (2008) çalışmalarında benzer etkiyi gözlemlemişlerdir. Allpress ve ark., (2002) *Lysobacter* NCIMB 9497' de yapmış oldukları çalışmada EDTA varlığında enzim aktivitesinde azalma gözlemlemişlerdir. Farag ve Hassan., (2004) EDTA' lı ortamda *Aspergillus oryzae*' den elde edilen keratinaz enziminde azalma saptamışlardır.

SDS (% 70) varlığında enzim üretiminde bir azalma gözlenmiştir. Korkmaz ve ark., (2003) *Streptomyces* strain BA7 de yapmış oldukları çalışmada SDS varlığında enzim üretiminde düşüş olduğunu ifade etmişlerdir. Yine benzer şekilde Mitsui ve ark., (2004) enzim üretimi üzerine SDS nın azaltıcı yönde etki ettiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 3. Çeşitli Kimyasalların Keratinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Substrat	Konsantrasyon (%)	Relative Aktivite (%)
Kontrol	-	100
SDS	0,1	70
Tween 80	1	30
DMSO	1	92
Triton X – 100	4	91
EDTA	5 mm	98
NaCl	1 M	87
ZnCl ₂	1 M	58
CaCl ₂	1 M	76
Glikoz	1	61

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Bacillus* UK69 suşundan izole edilen keratinaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu amacı ile çeşitli parametreler test edilmiştir. Yapılan testlerin sonuçlarına göre elde edilen enzimin ekstrasellüler alkalik termostabil keratinaz olduğu, en yüksek enzim üretiminin 60°C’ de ve besiyeri pH’ sının 10.5 olduğu ortamlarda gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen enzimin yüksek seviyede keratolitik aktivite göstermesi, tüylerin etkin bir şekilde parçalanmasından dolayı keratinin hidrolizi gereken uygulamalarda kullanılabilir bir enzim olabileceği anlamına gelmektedir. Enzimin geniş bir pH (5-12) ve sıcaklık (20-80°C) aralığında aktif olup, optimum aktivitenin pH 10.5, 60°C sıcaklıkta olması, yüksek sıcaklıkta da (60°C) stabil bulunması farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilirliğini göstermektedir.

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerin de yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde transformasyon geçiren, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır. Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Dünyada, 1980-1983 yılları arasında sadece 300 küçük biyoteknoloji şirketi çalışma yaparken, bu sayı 1985 yılında sadece Amerika Birleşik Devletleri’ nde (A.B.D.) 400 düzeyine ulaşmıştır. Günümüzde A.B.D.’ nde 900, bütün dünyada ise yaklaşık 1200 biyoteknoloji şirketi çalışmalarını çeşitli alanlarda sürdürmektedirler. Örneğin sadece farmasötik alanında 2000’li yıllarda kullanılan biyoteknolojik ürünlerin toplam değerinin yaklaşık 60 milyar dolar/yıl düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir. Biyoteknoloji kaynaklı çalışmalar A.B.D.’ nde odaklanmış olmakla birlikte, günümüzde Japonya ve Kanada, biyoteknolojiyi (özellikle moleküler biyoteknolojiyi) stratejik alan kategorisinde değerlendirerek, özel şirketlerin yanısıra, hükümetler düzeyinde destekleme ve geliştirme kararı almışlardır.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı olmaları dikkate alındığında, bu konu daha da önemli duruma gelmektedir.

Pek çok çeşitteki enzim; gıda, temizlik, tekstil, tıp, kozmetik, deri gibi endüstri kuruluşlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Teknolojideki gelişmelere bağlı olarak kullanım alanları yaygınlaşarak daha da önem arz eder hale gelmektedir. Bu enzimlerin elde edilmesinde ise mikroorganizmaların önemi her geçen gün daha fazla artmaktadır.

Önemi her geçen gün artan enzimler arasında keratinazlar da yer almaktadır. Keratinazlar diğer enzimler gibi pek çok uygulama alanında kullanılabilir. En önemli kullanım alanlarından biri de, atık materyal olarak bilinen tüy, saç, tırnak gibi materyallerin geri dönüşümünü sağlamak; hem de çevreyi bu atık materyallerden korumaktır. Keratinler yem sanayinde kullanılabilirler. Hayvanların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadırlar.

Yapılan bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği'nden izolasyonu yapılan *Bacillus* UK69' dan elde edilen keratinaz enzimi, doğada bol miktarda bulunan *Bacillus* suşlarından kolay bir şekilde elde edilebilmesi, elde edilmesi sırasında çevreye herhangi bir kirletici bırakılmaması (çevre kirliliğine sebep olan bazı materyallerin ortamdan uzaklaştırılması), yüksek sıcaklık ve pH da aktivitesini koruyabilmesi, çeşitli kimyasallar ve metal iyonlarının varlığında enzim üretiminin fazla etkilenmemesi gibi özellikleri dikkate alındığında bir çok biyoteknolojik proseslerde kullanılabilir özelliktedir.

Williams ve Shih (1989), *Bacillus licheniformis* suşlarını, tavuk tüylerinin karışık olduğu tavuk çiftliği atıklarından izole etmişler ve proteolitik, keratinolitik aktivite gösterdiklerini, *Bacillus pumilis* ve *Bacillus cereus* tarafından keratinolitik proteazın üretiminin tüylerle teşvik edilebileceğini bildirmişlerdir. Kim ve ark., (2001) *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerini kümes hayvanları atıklarından izole etmişler ve bu suşların tüyleri başarılı bir şekilde parçaladıklarını bildirmişlerdir.

Proteolitik enzimler ve karbohidratazların önemli bir kaynağını oluşturan *Bacillus* sp. suşlarıdır. Örneğin keratinaz enzimi *Bacillus* sp. grubunda oldukça yaygın bir şekilde bulunur ve özellikle endüstri ve çevre problemlerinin çözümlenmesinde rol oynar. Kümes hayvanlarının tüy ve diğer atıklarının; gübre, doğal gaz ve hayvan yemine dönüştürülmesi ile ölü kuş ve atık tüylerin değerlendirilmesinin gerçekleştirildiği prosesler hem çevreyi korumakta, hemde ekonomik kazanç sağlamaktadır. Ayrıca deterjan endüstrisinde, protein bazlı lekelerin kumaştan çıkarılması için proteinleri parçalama yeteneğinde olan enzim ilavesi yapılmaktadır. Bundan dolayı suda çözünmeyen keratini, parçalama aktiviteli enzimler, etkili katkı maddesini oluştururlar (Burrt ve ark., 1999).

Kümes hayvanları tüyü ve diğer keratinler, çiftlik hayvanları yeminin yadsınmaz protein kaynağıdır. Keratin parçalayan mikroorganizmaların doğal varlığı; besin maddelerini daha dengeli ve geleneksel hidrotermal prosesle elde edilenden daha iyi sindirebilen ürün üretme kapasitesine sahip uygun bir mikrobiyal enzim teknolojisi sunar. Ayrıca mikrobiyal enzim teknolojisi, düşük enerji tüketen ve çevreyle barışık bir teknolojidir.

Günümüzde mikrobiyal enzim üretimi ve satışı bazı ülkeler için ticari kaynak olarak önem arz etmektedir. Özellikle fermentasyon endüstrisi, medikal ve analitik uygulamalar için birçok ülke yurt dışına milyonlarca dolar aktarmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları endüstriyel alanlarda yapılacak olan çalışmalara veri sağlamak bakımından ve daha sonra yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak olması nedeniyle önemlidir.

KAYNAKLAR

- ABBAS H., HIOL A., DEYRIS V., COMEAU L., 2002. Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase From *Mucor* sp Strain Isolated From Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 968-975.
- AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MLLES, N. F., 1973. *Biochemical Engineering*, Academic Pres Inc. New York.
- ALLPRESS J.D., MOUNTAIN G., GOWLAND P.C., 2002. Production, Purification and Characterization of An Extracellular Keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497, *Letters in Applied Microbiology*. p. 337-342.
- ANONM, 1988. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Permrgan Pres Oxford. p. 104-105.
- AOK, K., MYAMOTO, K., MURAKAM, S., SHNKE, R., 1995. Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Putrifaction and Characterization of The Enzymes. *Soil Biol. Biochem.* 27: No. 11. 1377-1382.
- BAHUGUNA S.KUSHWAHA, R.K.S., 1989. Hair Perforation by Keratinophylic Fungi, *Mycoses*. 32: 340-343.
- BAILEY, I. E., OLLIS, D. F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2. Ed. McGrow Hill, New York.
- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1977 *Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition*, Chapter. 1-7: 39-50.
- BAJPAI, P., BAJPAI, K.P., 1987. High-Temperature Alkaline α -Amylase from *Bacillus lichneiformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*. 33: 72-78.
- BANERJEE, U.C., SAN, R.K., AZM, W., SON, R., 1999. Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochemistry*. 35: 213-219.
- BANWART, G.J., 1983. *Basic Food Microbiology* Avi. Publishing Company Inch. Wesport-Connecticut. p. 72-74.
- BHAT, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 355-383.
- BLGEHAN, H., 2002. *Klinik Mikrobiyolojik Tan*. Şafak Matbaacılık, İzmr, 768s.
- BLANK, F., DAY, W.C., HARMON, S.R., TONCIE, P.F., YU, R.J., 1972. Keratinolytic Enzyme Isolated from *Tricophyton mentagrophytes* and Process Therefore. *US Patent*. 3: 674.

- BOCKLE, B., GALUNSKY, B., MULLER, R., 1995. Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. Environmental Microbiology, Oct. p. 3705- 3710.
- BRESSOLLIER, P., LETOURNEAU, F., URDACI, M., VERNEUIL, B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus* , Appl. And Environ. Microbiology, June. P. 2570-2576.
- BURTT, E.H., ICHIDA, J.M., 2001. Bacteria, Birds and the Degradation of Feathers: Agricultural, Environmental, Evolutionary Biology. Natural Sciences.
- BURTT, J.R., EDWARD, H., ICHIDA, J.M., 1999. Keratinase Produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 768227.
- CHEN, X., WHITMIRE, D., BOWEM, J.P., 1996. Xylanase Homology Modeling Using The Inverse Protein Folding. Approach. Protein Science. 5: 705-708.
- CHENG, S.W., HU, H.M., SHEN, S.W., TAKAGI, H., ASANO, M., TSAI, Y.C., 1995. Production and Characterization of Keratinase of a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 2239-2243.
- CHENG-GANG-CAI., JI SHUANG CHEN., JIONG-JIONG QI., YUN YIN and XIA-DANG ZHENG., 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. Journal of Zhejiang University-Science B. 9: 713-720.
- CHRISTOV, L.P., AKHTAR, M., PRIOR, B.A., 1996. Impact of Xylanase and Fungal Pretreatment on Alkali Solubility and Brightness of Dissolving Pulp. Biobleaching of Sulphite Pulp. 50: 579-582.
- ETİN, E.T., 1968. Pratik Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Mentis Matb. İstanbul 645s.
- DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, 3-14p. Scientific American, Freeman & Company, San Fransisco.
- DEMİRBAĞ, Z., DEMİR, İ., 2005. Genel Mikrobioloji Laboratuvarı. Trabzon. p. 88.
- DODDAPANEMI K.K., 2007. Optimization of Keratinase Production and Enzyme Activity Using Response Surface Methodology with *Streptomyces* sp7., Applied Microbiology and Biotechnology. 141(2-3): 187-201.
- ELMAYERGI, H.H., SMITH, R.E., 1971. Influence of Growth of *Streptomyces fradiae* on Pepsin-HCl Digestibility and Methionine Content of Feather Meal. Brazilian Journal of Microbiology. 17: 1067-1072.

- FARAG M.A., HASSAN A. M, 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. International Biodeterioration and Biodegradation. 34: 85-93.
- FUJIWARA, N., YAMAMOTO, K., MASUI, A., 1991. Utilization of a Thermostable Alkaline Protease from an Alkalophilic Thermophile for Recovery of Silver from Used X-Ray Film. Journal of Fermentation and Bioengineering. 72: 306-308.
- GALANTE, Y.M., DE CONTI, A., MONTEVERDI, R., 1998. Application of *Trichoderma* Enzymes in Food and Feed Industries. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. p . 327-42.
- GAMERİTH, G., GROİCHER, R., ZEİLİNGER, S., HERZOG, P., KUBİCEK, C.P., 1992. Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUTC-30 on Hemicellulase Substrates. Applied Microbiology and Biotechnology. 38: 315-322.
- GESSESSE, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology. p. 3533-3535.
- GÜCİN, F., DÜLGER, B., 1995. Genel Mikrobiyoloji Laboratuar Klavuzu, Bursa. p. 71.
- HIOL A., JONZO M. D., RUGANİ N., DRUET D., SADRA L., COMEAU L.C., 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from Palm Fruit. Enzyme and Microbial Technology. 26: 421-430.
- HOLT, J.D., 1993 Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- HORIKOSHI, K, AKIBA, T., 1982. Alkalophilic Microorganisms:A New Microbial World. Tokyo:Japan Scientific Societies Pres and Berlin: Springer- Verlag, Chem. 35: 1407-1414.
- HUANG Q., PENG Y., LI X., WANG H., ZHANG Y., 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. Current Microbiology . 46(3): 169-173.
- ICHIDA, J.M., KRIZOVA, L., LEFEVRE, C. A., KEENER, H.M., ELWELL, D.L., BURTT, E.H., Jr., 2001. Bacterial Inoculum Enhances Keratin Degradation

- and Biofilm Formation in Poultry Compost. Journal of Microbiological Methods. 47: 199-208.
- JASVİR, S., NAVDEEP, G., GİNA, D., DEBENDRA, K., 1998. Studies on Alkaline Protease by *Bacillus* sp. NG312. All Rights of Any Nature Whatsoever Reserved. 0273-2289/99/76/0057.
- JEFFRIES, T.W., 1981. Conserved Motifs in Xylanases for Pulp Bleaching. USDA, Forest Service.
- JOHN, F.K., 1987. Enzyme Tecnology (H.J. REHM., G. REED editr). Biotechnology, New York. 7a: 37-67.
- KARADEMİR, A., AKGL, M., TUTUŞ, A., 2002. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. K.S.. Fen ve Mhendislik Dergisi 5(1).
- KAUR, S., VOHRA, R.M., KAPOOR, M., BEG, Q.K., HOONDAL, G.S., 2001. Enhanced Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus* sp. P-2. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 17: 125-129.
- KIM, J.M., LIM, W.J., SUH, H.J., 2001. Feather-Degrading *Bacillus* sp. from Poultry Waste. Process Biochemistry. 37: 287-291.
- KIRAN, ., 2001. Doğal Ortamdan İzole Edilen Alkalifilik *Basillus* sp. Suşlarında α -Amilaz retimi, Enzimin pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Araştırılması. Doktora Tezi. p. 37.
- KORKMAZ H., HR H., DİNÇER 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., NALDI, M.N., ASLAN, B., CORAL, G., ARIKAN, B., DİNÇER, S., ÇOLAK, ., 2003. Keratinolytic Activity of Streptomyces Strain BA7, A New Isolate from Turkey. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 53: 85-93.
- KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M., 1999. , Moleculer and Biotechnological Aspects of Xylanases. FEMS Microbiology Reviews. 23: 411-456.
- KUNERT, J., 1972. Keratin Decomposition by Dermatophytes Evidence of Sulphitolysis of the Protein. Experientia. 28: 1025-1026.
- KUNERT, J., 1973. Keratin Decomposition by *Dermatophytes* : 1. Sulfite Production as a Possible Way of Substrate Denaturation. Zeltschrife Fuer Allgermerine Microbiologie Morphologie, Genetic und Oekologie der Microrganismen. 13 : 489-498.

- KUNERT, J., KRAJCI, 1981. An Electron Microscopy Study of Keratin Degradation by the Fungus, *Microsporium gypseum* in Vitro. Mykosen. 24: 485-496.
- LAHL, W.J., BRAUN, S.D. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. Food Technology. 48: 68-71.
- LEE, G.G., FERKET, P.R., SHIH, J.C.H., 1991. Improvement of Feather Digestibility by Bacterial Keratinase as a Feed Additive. FASEB J. 59: 1312.
- LEE, H., SUH, D., HWANGE, J., SUH, H., 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. Applied Biochemistry and Biotechnology. 97(2): 123- 133(11).
- LEHNINGER, A. L., 1979. Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York.
- LENNETE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER, J.W.JR, SHADOMY, J.H., 1985. Manual of Clinical Microbiology, USA. 4: 1149.
- LETOURNEAU, F., SOUSSOTTE, V., BRESSOLLIER, P., BRANLAND, P., VERNEUIL, B., 1998. Keratinolytic Activity of Streptomyces sp. S.K.1-02 a New Isolated Strain. Letters in Applied Microbiology. 26: 77-80.
- LIN, X., LEE, C., CASALE, E.S., SHIH, J.C.H., 1992. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain. Applied and Environmental Microbiology. 58: 3271-3275.
- MAC FADDIN, J.F., 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Third Edition, USA. p. 06-509.
- MARINA CORFEZI., JONAS CONTIERO., CRISTIAN J.B. DELİMA., ROBERTA B. LOVOGLIO and RUBENS MONTİ., 2008. Characterization of feather degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* Protease: A new strain. World journal of Agricultural Sciences. 4(5): 648-656.
- MATYAR, F., 2002. Anaerobik Ortamlardan İzole Edilen Bakteri Gruplarında Amilaz ve Selülaz Aktivitelerinin Araştırılması ve Yapılabilecek Genetik Maniplasyonlar, ukurova niversitesi, Doktora Tezi, Adana, 1-23s.
- MAWADZA, C., KAUL, R.H., ZVAUYA, R., MATTİASON, B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnonolgy. 83: 177-187.

- MD.MOZAMMEL HOQ., KHANDEN AL ZARD SIDDIQUEE., HIROKO KAWASAKI and TATSUJI SEKI., 2005. Keratinolytic Activity of some newly isolated *Bacillus* species. *Journal of Biological Sciences*. 5(2): 193-200.
- MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R., DARMWAL, N.S., 1999. The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* species Isolate. *Biosource Technology*. 67: 201-203.
- MING-MUH K., HSING-YAO L., 1995. The Study of the Selection of Feather-Degrading Microorganisms. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 5 : 37-43.
- MITCHELL, P., 1974. *Introduction to Environmental Microbiology*, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- MITSUIKI et al., 2004. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. 34: 482-489. İT3.
- MOHAMEDIN, A.H., 1999. Isolation, Identification and Some Cultural Conditions of a Protease-Producing Thermophilic *Streptomyces* Strain Grown on Chicken Feather as a Substrate. *International Biodeterioration Biodegradation*. 43: 13-21.
- MUHSIN T.M., AUBAID A.H., 2001. Partial Purification and Some Biochemical Characteristics of Exocellular Keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*, *Mycopathologia*. 150(3): 121-125.
- MUKHOPADNYAY, R, CHANDRA, A.L., 1990. Keratinase of a Streptomycete. *Indian Journal of Experimental Biology*. 25: 575-577.
- NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER, M., ANTRANİKIAN, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Application Microbiology Biotechnology*. 51: 711-729.
- ONIFADE, A.A., AL-SANE, N.A., AL-MUSAL-LAM, A.A., AL-ZARBAN, S., 1998. A Review: Potentials for Biotechnological Applications of Keratin- Degrading Microorganisms and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources, *Bioresource Technology*. 66: 1-11.
- ÖZELİK, S., 1998. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuz, Isparta, 36-43s.
- PEKIN, B., 1980. Biyokimya Mhendisliği Ege ni. Kim. Fak. Yayınları, İzmir.
- PFLEIDERER, E., REINER, R., 1988. Microorganisms in Processing of Leather, in H. J. Rehm Led. *Biotechnology, Special Microbial Processes*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Germany. 6b: 730-739.

- RAUBITSHEK, F., 1961. Mechanical Versus Chemical Keratinolysis by *Dermatophytes*. *Sabouraudia*. 1: 87-90.
- RIFFEL, A., LUCAS, F., HEEB, P., BRANDELLI, A., 2003. Charecterization of a New Keratinolytic Bacterium That Completely Degrades Native Feather Keratin. 179: 258-265.
- RUFFIN, P., ANDRIEU, S., BISERTE, G., 1976. Sulphytolysis in Keratinolysis Biochemical Proof. *Sabouraudia*. 14: 181-184.
- SALLES, B.C., CUNHA, R.B., FONTES, W., SOUSA, M.V., FİLHO, E.X.F., 2000. Purification and Characterization of a New Xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology*. 81: 199-204.
- SCHMID, R. D., 1979. Stabilized Soluble Enzymes, *Advances Biochemical Engineering/ Biotechnology*. 12: 41.
- SEELEY, H. W., VANDERMARK, P.J., 1981. *Microbes in Action A Laboratory Manuel of Microbiology*. p. 92.
- SHIH, J.C.H., WANG, J., 1992. Immobilization of Keratinase, Streptavidin Fusion Protein for Keratinolysis. North Coroline State university, Raleigh, NC USA.
- SUNTORNUSUK, W., and SUNTORNUSUK, L., 2003. Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in Submerged Cultivation. 86: 239-243.
- TAKAMI et al., 1992. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 101-108.
- TAPIA, D.M.T., 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.
- TARAKÇIOĞLU, Y., 1979. An Amylase Producing Maltotiose from *Bacillus subtilis*. *Agriculture Biology Chemistry*, 49(4): 1901-1097.
- TATINENI R., DODDAPANEMI K.K. POTUMARTHI R.C., MANGAMOORI L.N., 2007. Optimization of Keratinase Production and Enzyme Activity Using Response Surface Methodology with *Streptomyces* sp7., *Applied Microbiology and Biotechnology*. 141(2-3): 187-201.
- TAUBMAN, S., 1992, Genus *Bacillus*, *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. p. 355-356.

- VIGNARDET, C., GUILLAUME, Y.C., FRIEDRICH, J., MILLET, J., 1999. A First Order Experimental Design to Assess Soluble Proteins Released by a New Keratinase from *Doratomyces microsporus* on Human Substrates. *International Journal of Pharmaceutics*. 191: 95-102.
- WAWRZKIEWICZ, K., LOBARZEWSKI, J., WOLSKI, T., 1987. Intracellular Keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 25: 261-268.
- WILLIAMS, C.M., RICHESTER, C.S., MACKENZI, J.M., SHIH, J.C.H., 1990. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 1509-1515.
- WILLIAMS, C.M., SHIH, J.C.H., 1989. Enumeration of Some Microbial Groups in Thermophilic Poultry Waste Digesters and Enrichment of a Feather Degrading Culture. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 25-35.
- WISEMAN, A., 1987. *Handbook of Enzym Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. p. 274-373.
- WYMAN, C.E., GOODMAN, J., 1993. Keratin as a Source of Amino Acids. (R.M., Busche Editr), In *Opportunities for Innovation : Biotechnology*, Gaithersberg, MD:US Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology. p. 151-190.
- YU, R.J., HARMON S.R., and BLANK F., 1969a. Hair Digestion by a Keratinase of *Trichophyton mentogrophytes*. *Journal of Investigate Dermatology*. 53: 166-171.
- YU, R.J., HARMON, S.R., GRAPPEL, S.F., BLANK, F., 1971. Two Cell Bound Keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Investigate Dermatology*. 56: 27-32.
- KALISZ, H.M., 1988. *Microbial Proteinases*. (A. FIETCHER ed.), *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Springer, Berlin Heidelberg, New York. 36: 3-61.
- KESKİN, H., 1982. *Besin Kimyası*. Cilt II. S: 558. Fatih Yayınevi, İstanbul.
- JOHNVESLY, B., NAIK, G.R., 2001. Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*. 37: 139-144.

ÖZGEÇMİŞ

Gölsüm UÇAR

1984 İzmit'te doğdu. İlk ve Orta Okulu İzmit' de, Lise öğrenimimi Adana' da tamamladı. 2002 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. Bu bölümden 2006 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl içerisinde Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesinde Moleküler Biyoloji alanında yüksek lisansa başladı. Halen bu bölümde öğrenimimi sürdürmektedir.