

Trichophyton sp. Suşundan Keratinaz Üretimi, Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu

Donay PARLAK¹, Hüseyin TANIŞ^{2*}, Ashabil AYGAN³

Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Avşar kampüsü Onikişubat-K..Maras
¹<https://orcid.org/0000-0002-8940-5842>, ²<https://orcid.org/0000-0002-2012-7864>, ³<https://orcid.org/0000-0003-4936-9872>

✉: huseyintanis23@hotmail.com

ÖZET

Keratinaz aktivitesi gösteren *Trichophyton* sp. Tr-9 suşu keratin tozu-feather meal içeren minimal besiyerinde büyütürek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Süpernatanttan Amonyum sülfat çöktürme sonrası, Sephadex G-100 ve DEAE Sepharose kolon kromatografi uygulamaları ile enzim saflaştırılması yapılmıştır. Maksimum keratinolitik aktivite pH 7.5 ve 37°C'de gözlenmiştir. Enzim pH 5.5-8.0 ve 20°C-40°C sıcaklık aralıklarında stabilite gösterirken, enziminin moleküler ağırlığı SDS page ve zimogram analizlerinde yaklaşık 34 kDa olarak hesaplandı. CaCl₂ (5mM) keratinaz aktivitesini (%148) stimüle edici etki gösterdi. Diğer taraftan EDTA (5mM) ve SDS (%1) sırasıyla %49, % 49 etki göstererek kısmen inhibe etti, PMSF (1mM ve 5mM) ile tam inaktivasyon elde edildi. Sonuç olarak, enzimin fiziko-kimyasal özellikleri birçok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanışlı olabileceğini göstermiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 22.01.2020

Kabul Tarihi : 13.03.2020

Anahtar Kelimeler

Trichophyton sp.,
Keratinaz
Saflaştırma
Karakterizasyon

Isolation and Partial Characterization of Keratinase from *Trichophyton* sp.

ABSTRACT

Keratinase enzyme production was accomplished from *Trichophyton* sp. Tr-9 in minimal medium containing feather meal. Enzyme was purified with Ammonium sulfate, Sephadex G-100 and DEAE Sepharose column. Maximum keratinolytic activity was obtained at pH 7.5 and 37°C. Enzyme was highly stable between pH 5.5-7.5 and 20-40°C. With the SDS-Page analysis of the enzyme, molecular weight of the enzyme was calculated as 34 kDa. CaCl₂ (5mM) had a stimulatory effect (148%) on enzyme. On the other hand, EDTA (5mM) and SDS (%1) inhibited enzyme activity up to 49% and 49%, respectively. PMSF (1-5mM) has strongly inhibited enzyme. As a result, physico-chemical properties of the enzymes showed that *Trichophyton* sp. Tr-9 could be useful in various industrial and biotechnological applications.

Research Article

Article History

Received : 22.01.2020

Accepted : 13.03.2020

Keywords

Trichophyton sp.,
Keratinase
Purification
Characterization

To Cite : Parlak D, Tanış H, Aygan A 2020. *Trichophyton* sp. Suşundan Keratinaz Üretimi, Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 23 (5): 1135-1143. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.678756.

GİRİŞ

Biyokimyasal olayların gerçekleşmesinde önemli role sahip olan enzimler özelleşmiş fonksiyonlara sahip katalizörlerdir. Enzimler çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Endüstriyel anlamda kullanım potansiyeli yüksek olan enzimler daha çok mikrobiyal kaynaklı olanlardır (Gupta ve ark., 2003). Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanda tercih edilmelerinin başlıca sebepleri istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, katalitik aktivitelerinin yüksek olması, oldukça stabil ve ucuz olmaları, yüksek oranda ve saflıkta elde edilebilmeleridir (Horikoshi, 1999). Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin birçoğu hücre içinde aktif iken bazıları hücre dışına salgılanıp hücre dışında aktif olabilir, böyle enzimlere ekstraselüler enzimler denir. Ekstraselüler enzimler,

mikroorganizmaların ihtiyacı olan besin kaynaklarını hidrolizleyerek kullanabilmelerini sağlar. Biyoteknolojik alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık % 75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır (Bhat, 2000). Bunlardan proteazlar (E.C. 3.4.21/24 / 99) doğada hemen hemen her alanda bulunabilen yaygın enzimlerdir. Proteolitik enzimler, protein substratlarının hidrolizini içeren biyoteknolojik uygulamalar için endüstride yaygın kullanılır. Piyasadaki proteazların önemli bir bölümü ise mikrobiyal keratinazlardır (Rao ve ark., 1998).

Keratin, doğada bulunan en önemli yapısal proteinlerden biridir ve yaygın olarak omurgalıların dış yüzeylerinde bulunur. Kollajenden sonra hayvanlarda karşılaşılan en önemli biyopolimerdir. Kıl ve tüy atıkları tarımsal sanayide yan ürün olarak

üretilmektedir. Bu tür atıkların birikimi çevresel problemlere sebep olabilmektedir. Keratinler, yapısındaki sülfür içeriğine göre ise sert ve yumuşak keratinler olarak gruplandırılabilir. Yumuşak keratinler cilt ve nasırda bulunup daha az disülfid bağı içerir ve daha esnektir, yumuşak keratinlerin aksine sert keratinler ise saç, tüy, boynuz ve tırnak gibi uzantıları oluştur ve yüksek oranda disülfid bağı içerir (Voet ve Voet, 2008; Mckittrick ve ark., 2012). Keratince zengin atıkların bozulmaları zordur çünkü polipeptidler yoğun bir şekilde paketlenmiş olan çok güçlü hidrojen bağlarının varlığıyla daha stabil olmuştur. Ayrıca hidrofobik etkileşimler, protein zincirlerinin çarpaz bağlanmaları ve birçok disülfid bağı içermeleri nedeniyle oluşan yüksek mekanik stabilite, keratinlerin yaygın birçok proteazca parçalanmalarına direnç sağlar (Kreplak ve ark., 2004). Dirençlerine rağmen keratinler çok sayıda bakteri, fungus ve aktinomiset tarafından salgılanan keratinolitik proteazlar tarafından etkili bir şekilde parçalanabilir (Onifade ve ark., 1998). Mikrobiyal keratinazlar genellikle alkalın ve nötr proteazlardır ve optimum pH aralıkları 7.5– 9.0 arasında değişkenlik gösterir fakat bu aralığın dışında yer alan enzimlerde vardır. Extrem alkalofilik pH aralığında aktif olanların yanı sıra nadiren asidik pH 'da aktif keratinazlar da vardır (Takami ve ark., 1999). Çoğu keratinaz üreten mikroorganizma keratinaz üretimini büyük bir ölçüde bazal bir ortam içerisinde gerçekleştirir. Karbon ve azot kaynağı olarak ise keratini kullanmaktadır (Gousterova ve ark., 2005). Keratinaz üreticisi çeşitli mikroorganizmalar bir çok araştırmacı tarafından belirlenmiş ve enzim karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Gupta ve ark., 1999; Vidyasagar ve ark., 2006; Bernal ve ark. 2006 Riffel ve ark, 2007) . Ancak, dermatofitik fungusların keratinolitik potansiyelleri son zamanlarda dikkat çekmektedir, özellikle *Trichophyton* ve *Mikrosporum* gibi cinsler bu proteolitik etkileri nedeniyle ilgi uyandırmaktadır (Anbu ve ark, 2008). Bu özel grup patojenik fungusların keratin substratını en iyi parçalayan mikroorganizmalar arasında yer alması, keratin atıklarının biodegradasyonunda da önemli rol oynaması anlamına gelmektedir (Muhsin ve ark., 2002).

Günümüzde keratinaz enzimleri yem, gübre, deterjan, deri, ve ilaç endüstrileri gibi bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin keratinaz enzimler ile kısmen parçalanmış tüyler hayvan yemi katkısı olarak kullanılırken, deri endüstrisinde kıl giderim işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fakhfakh-Zouari ve ark., 2010). Son zamanlarda yapılan araştırmalar bakteriyel keratinazların deli dana ve scrapie hastalık etkeni olan prion proteinlerinin degradasyonunda da etkili olduğu tespit edilmiştir (Langeveld ve ark., 2003).

Bu çalışmada, keratinaz üreteicisi *Trichophyton* sp. Tr-

9 izolatının enzim üretimi potansiyeli araştırılmış ve üretilen enzimin kısmi saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenerek karakterizasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Mikroorganizma Örnekleri

Enzim üretimi gerçekleştiren izolatların belirlenmesi ve enzim üretimi potansiyellerinin değerlendirilmesi için KSU FEF Mikoloji laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür kolleksiyonlarından temin edilen *Trichophyton* sp. izolatları kullanılmıştır.

Mikroorganizma Kültürü ve Keratinolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mantar kültürü ve canlandırma-büyütme işlemleri Sabouraud dextrose agar (Merck 1.07315) da gerçekleştirilmiştir. Daha sonra suşların proteolitik aktivitelerini varlığını belirlemek amacı ile modifiye Skim-milk agar (Mohamedin, 1999) üzerine ekim yapılarak hidrolitik zonlar belirlenmiştir. Proteaz aktivitesi gösteren suşlar daha sonra keratin tozu (feather meal 0.5 g/L) içeren minimal besiyerinde ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.5, KCl -0.5, KH_2PO_4 -0.46, K_2HPO_4 -1, Agar agar -15 g/L) 15 gün üretilerek (Marcondes ve ark., 2008) keratinolitik aktivite belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Enzim üretimi

Keratinaz enzim üretimi için, sıvı Sabouraud dextrose da aktifleştirilmiş *Trichophyton* sp TR-9 suşundan 0.1 mL alınarak 0.5 g/L keratin tozu içeren minimal besiyerine ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.5, KCl -0.5, KH_2PO_4 -0.46, K_2HPO_4 -1,) (Marcondes ve ark., 2008) aşılılarak 30°C'de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür içeriği ve fungus hiflerifiltre kâğıdından (Whatman No 5) süzülerek filtrat toplanmıştır (Tanış ve Cihangir, 2009). Filtrat, daha sonraki çalışmalarda ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Enzimin Saflaştırılması

Tr-9 keratinaz enzim saflaştırılması, filtrat üzerine +4°C'de amonyum sülfat tuzu eklenerek ile fraksiyonel presipitasyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. Presipitasyona bırakılan enzim örnekleri % 40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'lık amonyum sülfat konsantrasyonları ile fraksiyonel olarak ayrı ayrı toplanmıştır. Presipitatların toplama işlemi 4020 gve +4°C' de 30 dk santrifüjde (Hettich Mikro 22R) gerçekleştirilmiştir. Enzim örnekleri daha sonra pH 7.5' daki 100 mM fosfat (Burhan ve ark., 2003) tamponunda çözdürülerek aynı tampona karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen örnekler pH 7.5' daki 100 mM fosfat tamponu ile dengelenmiş sephadex G-

100 (Sigma) kolon kromatografisinden (1× 30 cm) 14 mL/sa hızda aynı tampon ile elue edilmiştir. Daha sonra bir kısım eluat DEAE-Sepharose CL-6B (Sigma) kolondan (1x15 cm) geçirilerek ekstra saflaştırmaya tabii tutulmuştur. Kolona enzim yüklendikten sonra 20 mL/sa hızda 40 mL daki fosfat tamponu (pH7.5) geçirilmiştir. Kolonda tutulmuş enzim daha sonra 0.1 den 2 M konsantrasyonda değişen NaCl çözeltisi ile toplanmıştır.

Moleküler Ağırlık ve Zymogram Analizleri

Tr-9 Keratinaz enziminin moleküler ağırlığı %10'luk SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ile belirlenmiştir. Markör olarak, SDS6H2 (SIGMA) protein karışımı (Domuz miyozini -200 kDa, E. coli β-Galaktosidazı -116 kDa, tavşan kası fosforilazı b -97 kDa, sığır albümini- 66 kDa, ovalbumin- 45 kDa ve sığır eritrosit karbonik anhidrazı- 29 kDa) kullanılmıştır. Elektroferez sonrası protein bantları gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir (Rabilloud, 1999). Enzimin zymogram analizi için ise % 10' luk ayırıcı jelle içerisine amonyum persülfat eklenmeden hemen önce % 0.1' lik kazein eklenerek proteolitik aktivite tayini ile gerçekleştirilmiştir (Ferrero ve ark., 1996).

Enzim Aktivite İşlemleri

Mümkün olduğu kadar küçük parçalara bölünmüş keratin azure (Sigma Chemical, St, Louis, MO, USA) kullanılarak enzim aktivitesi kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (Suntornsuk ve Suntornsuk, 2003). Bunun için keratin azure 4mg/mL konsantrasyonda 0.01 M sodyum-fosfat (pH 7.5) tamponunda karıştırılmıştır (Esawy, 2007). Eşit miktardaki enzim ve substratın 37°C'de 150 rpm 'de 1saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra 4000 gve, +4°C'de, 15 dk santrifüj edilerek keratin azure uzaklaştırılmıştır. Daha sonra karışımdan 1mL alınarak spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda EZ 150) 595 nm'de okunup serbest kalan azoboyası ölçülmüştür. Bir ünite (U) keratinaz verilen koşullarda, 1 saatte 595 nm'de 0.1absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Tüm denemeler 3'lü tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktiviteleri ve Stabiliteleri Üzerine Etkisi

Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri pH 4.0-9.0 ve 20-45 °C sıcaklıklar arasında test edilerek belirlenmiştir. Optimum pH belirlemesi için Sitrat tamponu (pH 4.0-5.6), Sodyum fosfat (pH 6.0-7.5) ve Tris (pH8.0-9.0) tampon sistemlerinden yararlanılmıştır. Tr-9 enziminin sıcaklık stabilitesi için 20-70 °C arasında optimum pH'da 30 dk ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra belirlenmiştir. Diğer taraftan pH stabilite denemeleri ise optimum sıcaklıkta pH 4.0-9.0 arasında farklı pH'larda 30 dk ön inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Keratinaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Farklı kimyasalların Tr-9 üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda (1-5 mM) optimum sıcaklık ve pH'daki ön inkübasyonu ile belirlenmiştir. Bunun için FeCl₃, 1,10-Phenanthrolin monohidrat, EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid), PMSF (Fenilmetilsülfonil florit), ZnCl₂, Üre, CaCl₂, %1'lik Triton-X 114 ile %1'lik SDS kullanılmıştır.

Enzimin tüy parçalama yeteneğinin araştırılması

Kapaklı tüpler içerisine eklenmiş tavuk tüyleri üzerine 100 mM pH 7.5 fosfat tamponu ilave edilerek otoklavda 15 dk sterilizasyon gerçekleştirildi. Oda sıcaklığına ulaşan tüplere 1 mL filtrat/enzim ilave edilerek 150 rpm ve 37°C de inkübe edilerek enzimin tüy parçalama yeteneği gözlemlenmiştir (Korkmaz ve ark., 2003).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Toplam 15 *Trichophyton* sp.suşuproteolitik aktivite tayini için test edilmiş ve en yüksek proteolitik aktivite gösteren suşlar arasında keratinolitik aktivite gösterenlerden en geniş hidrolitik zon oluşturan Tr-9 *Trichophyton* sp.enzim üreticisi olarak seçilmiştir.

Enzimin saflaştırılması

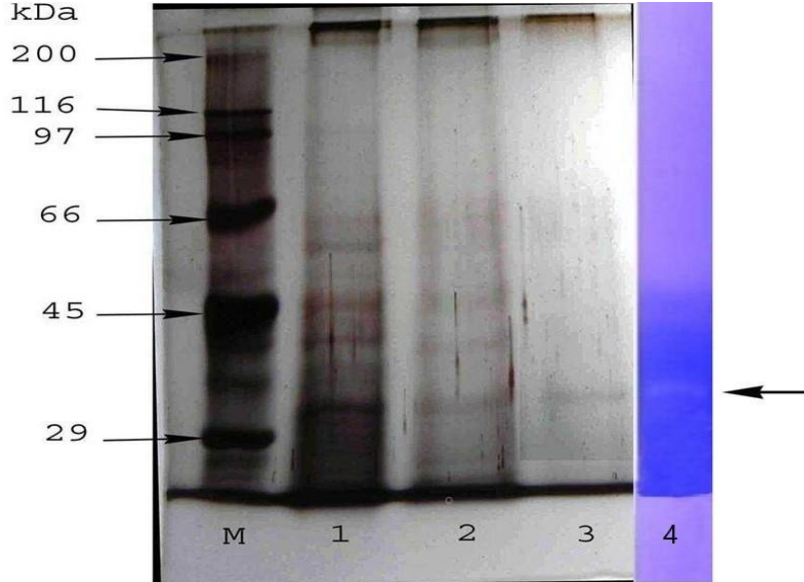
Tr-9 Keratinaz enzimi 3 aşamalı işlemle saflaştırılmıştır. Öncelikle Amonyum sülfat presipitasyonu ile kısmi saflaştırılması gerçekleştirilenörnekler daha sonra diyaliz (Sigma D9777, MWCO > 14 000 Da) işlemine tabii tutulmuştur. Diyaliz işlemleri sonunda en yüksek enzim aktivitesi %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örneklerde görülmüştür. Sonraki saflaştırma basamakları %40'lıkçöktürme örnekleri üzerinden yürütülmüştür. İkincil olarak enzim örnekleri sephadex G-100 (Sigma) kolonundan ve son olarak ise DEAE-Sepharose CL-6B (Sigma) kolonundan geçirilerek saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Şekil 1'de SDS-Page analizinde 3 nolu hat Tr-9 enziminin tek bant görüntüsü saflaştırma etkinliğini göstermektedir.

Moleküler Ağırlık Tayini ve Zymogram Analizi

Saflaştırma etkinliği ve moleküler ağırlık analizi %10'luk SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Protein bantları gümüş boyama (Rabilloud, 1999) ile elektroferezden sonra görünür hale getirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Tr-9 keratinaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 34 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Keratinaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları üretildiği organizmalara göre farklılıklar göstermekle beraber genel anlamda 18-200 kDa arasındadır (Nam ve ark., 2002). Genellikle yüksek moleküler ağırlıklı keratinazlar metalloproteaz

sınıfında bulunurlar ve termofilik karakter gösterirler (Farag ve Hassan, 2004). Ancak, Tr-9 keratinaz enzimi 50 kDa'dan daha düşük, serin tip proteaz olması ve mezofilik özelliği ile genel bir keratinaz profili sergilemektedir. Bu sonuçlar diğer bir çok araştırmacının *Trichophyton* sp.den izole ettikleri 30-

50 kDa arasında Keratinaz enzimleri ile uyum içerisindedir (Day ve ark., 1968; Apodaca ve McKerrow, 1985; Asahi ve ark., 1985; Tsuboi ve ark.,1987; Rojanavanich ve ark., 1990; Qin ve ark.,1992; Moallaei ve ark.,2006; Anbu ve ark., 2008; Cai ve Zheng, 2009).



Şekil 1. Tr-9 Keratinaz enziminin gümüş boyama ve zimogram analizi görüntüsü.

Figure 1. Silver staining and zymogram analysis of the keratinase enzyme TR-9.

M Markör (Sigma, SDS6H2) **1** Süpernatant **2** Amonyum sülfat presipitasyonunun (%40'lık grup) ardından Sephadex G 100 kolon kromotografisinden geçirilen enzim örneği, **3** Amonyum sülfat presipitasyonunun (%40'lık grup) ardından sırasıyla Sephadex G 100 kolon kromotografisi ve DEAE sepharose kolon kromotografisinden (0.5 M'lık NaCl eluatı) geçirilen enzim örneği, **4** Tr-9 enzim örneğinin zymogram analizi

M Marker (Sigma, SDS6H2) **1** Süpernatant **2** Enzyme sample subjected to Ammonium sulfate precipitation (40%) then Sephadex G 100 column **3** Enzyme sample subjected to Ammonium sulfate precipitation (40%) then Sephadex G 100 column and DEAE sepharose (0.5 M of NaCl eluat) **4** Zymogram analysis of TR-9 enzyme

Tr-9 Keratinazın Enzimatik Özellikleri

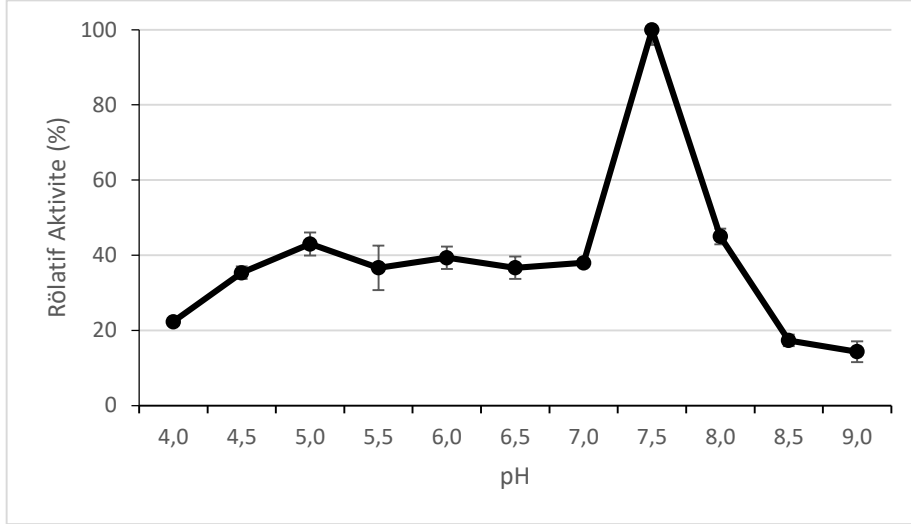
Tr-9 keratinaz enziminin farklı pH aralıklarında tampon sistemleri kullanılarak belirlenen optimum pH'sının 7.5 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Literatüre bakıldığında keratinazların birçoğunun alkali ve nötral pH aralığında aktif olduğu görülmektedir, nadiren de asidik pH aralıklarında aktiftirler (Takami ve ark., 1999; Asahi ve ark. 1985 McKerrow ve Apodaca, 1985; Riffel ve ark., 2003; Anbu ve ark., 2008).

Optimum sıcaklık denemelerinde, enzim 20°C'de %52 rölative aktivite gösterirken daha sonraki sıcaklık değerlerinde kademeli bir artış göstermiş ve 37°C'de ise %100'e ulaşmıştır (Şekil 3). Keratinaz enzimi ile yapılan diğer optimum sıcaklık çalışmalarında bir çok araştırmacı 40-65 °C arasında bir değer rapor ederken (Bernal ve ark.,2003; Raju ve ark., 2007; Anbu ve ark., 2008; Moreira ve ark. 2009) *Myrothecium verrucaria*'dan izole ettikleri enzimin optimum sıcaklığını benzer şekilde 37°C olarak saptamışlardır. Tr-9 Keratinaz enziminin insan ve hayvan vücut yüzeylerinde aktif olduğu düşünülecek olursa 37°C gibi bir optimum sıcaklık değerinin normal olduğu kabul edilebilir.

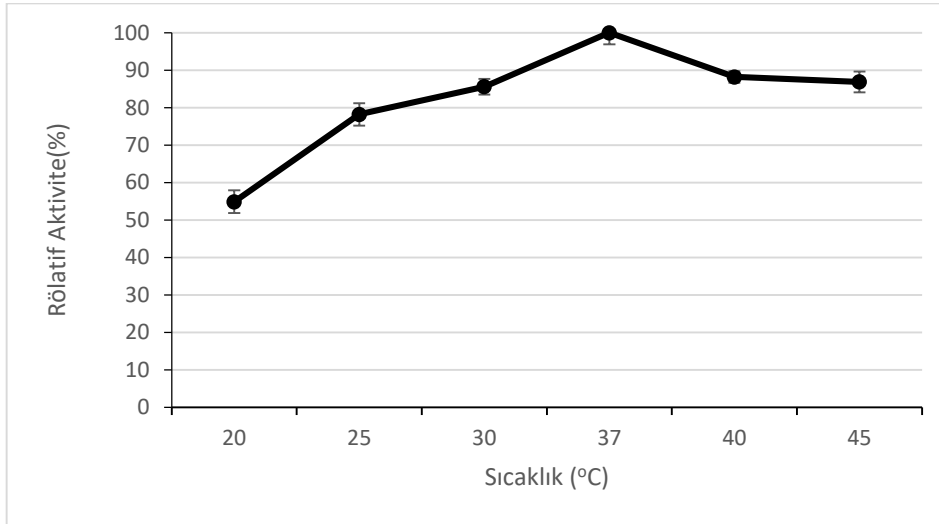
Enzimin 30 dk ön inkübasyonu sonrası 20°C'de enzimin aktivitesinin % 70'e yakın korunduğu, 30°C'de % 65 korunduğu, 40°C'de % 63 oranında korunduğu 40°C'nin altındaki değerlerde ise enzim aktivitesinin kademeli olarak düştüğü görülmüştür. Sonuçta enzim 20-40°C aralığında aktivitesini % 60 ın üzerinde korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Anbu ve ark. 2008, ise *Trichophyton* HA-2 suşundan elde ettikleri ekstraselüler keratinazın 20-45°C aralığında stabil olduğunu bildirerek bu çalışmayla hemen hemen aynı sonucu elde etmişlerdir.

Diğer yandan Tr-9 enzimi pH: 5.5-7.5 aralığında başlangıç aktivitesinin yaklaşık olarak % 100 oranında korunduğu görülmektedir (Şekil 5).

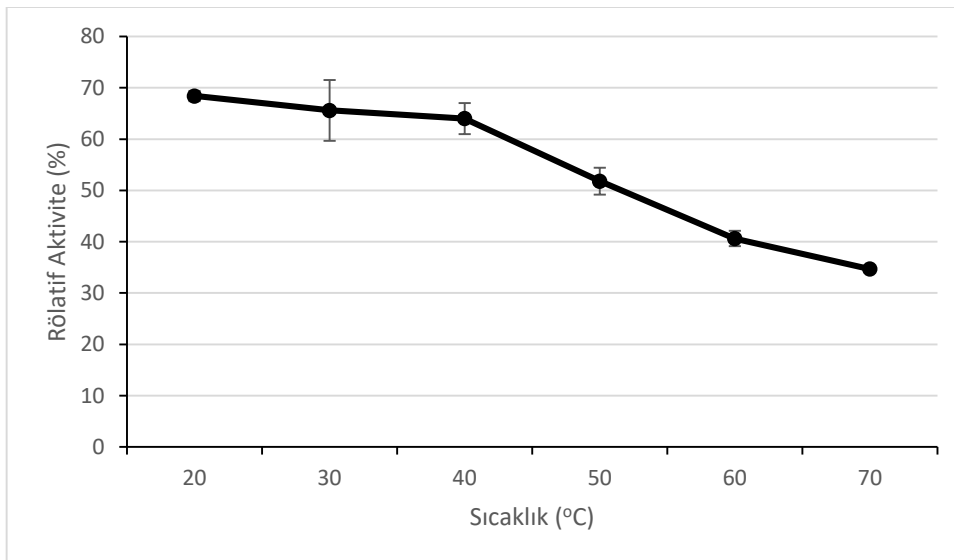
pH 8.0'den itibaren enzimin aktivitesinde kademeli bir düşüş yaşanmaktadır öyle ki pH: 9.0 'da enzim aktivitesini %85 oranında kaybettiği görülmektedir. Birçok araştırmacı pH 5.0 ile 12.0 arasında değişen oranlarda stabilite tespit etmişler (Gradisar ve ark. 2005; Anbu ve ark. 2008; Moreira ve ark. 2009) ve Tr-9 Keratinaz enzimi de bu bulgular ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür.



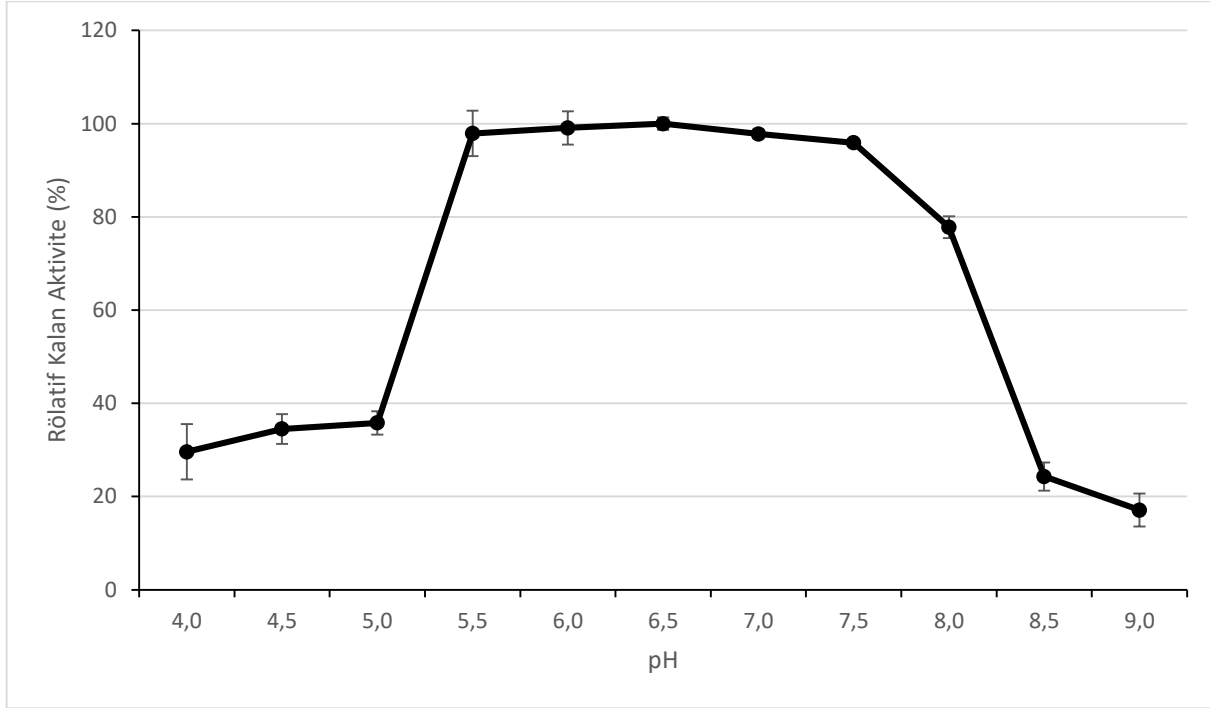
Şekil 2. Tr-9 Keratinaz enzimi üzerine pH'nın etkisi
Figure 2. The effect of pH on the activity of Tr-9 Keratinase



Şekil 3. Sıcaklığın Tr-9 keratinaz üzerine etkisi
Figure 3. The effect of temperature on Tr-9 keratinase



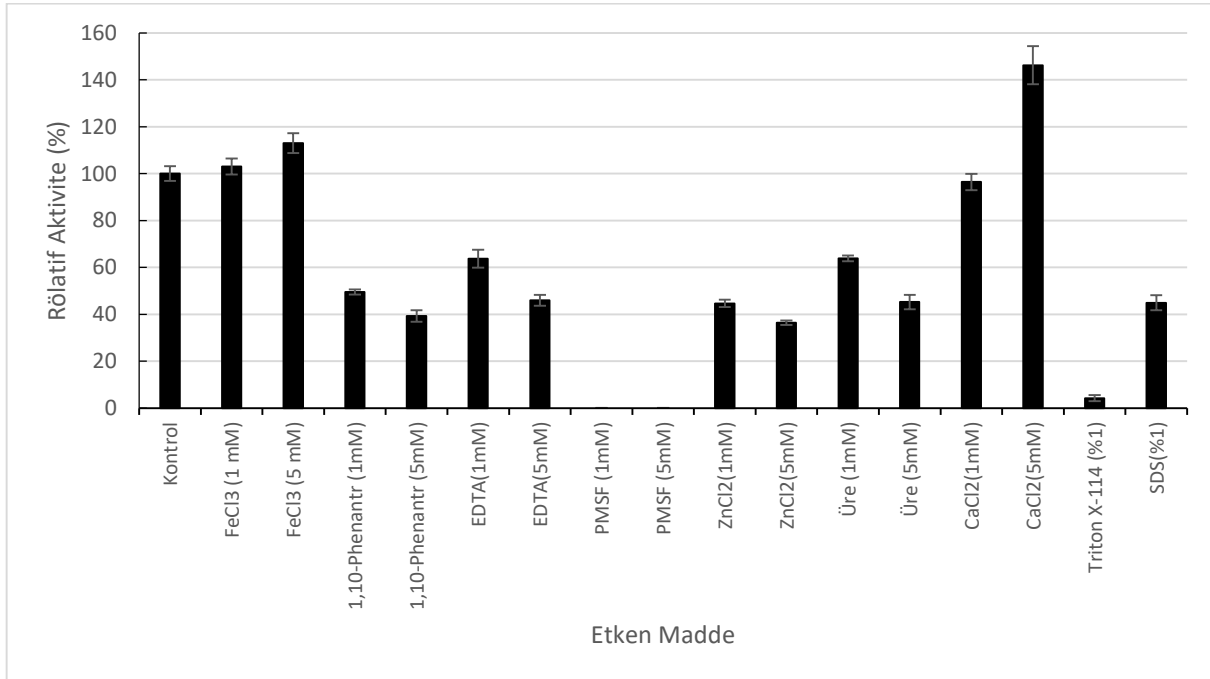
Şekil 4. Tr-9 keratinaz enziminin termal stabilitesi
Figure 4. Thermal stability of Tr-9 keratinase



Şekil 5.Tr-9 keratinaz enziminin pH stabilitesi
Figure 5. Tr-9pH stability of Tr-9 keratinase

Enzim üzerine farklı kimyasalların etkisi araştırıldığında $FeCl_3$ ve $CaCl_2$ hem 1mM hem de 5mM konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırdığı, özellikle $CaCl_2$ 'nin 5mM konsantrasyonunda aktiviteyi % 148

oranında çıkardığı görülmektedir, $ZnCl_2$ 'nin ise 1mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %56 oranında azalttığı, 5mM konsantrasyonda ise aktiviteyi %66 oranında azalttığı görülmektedir (Şekil 6).



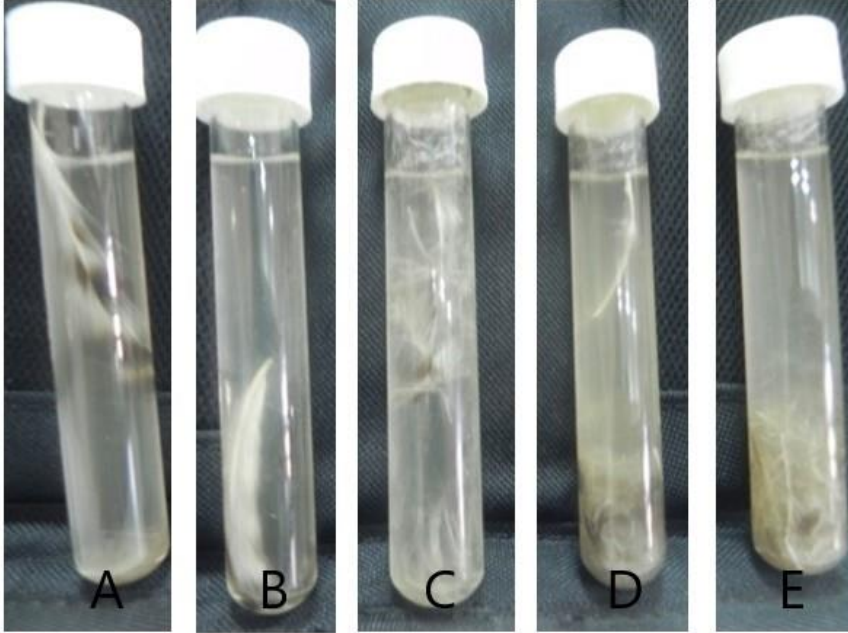
Şekil 6. Tr-9 Keratinaz enzimi üzerine metal iyonları, inhibitör, deterjanlar ve şelatörlerin etkisi
Figure 6. Tr-9 Effect of metal ions, inhibitors, detergents and chelators on Tr-9 keratinase enzyme

Benzer şekilde (Asahi ve ark. 1985) *T. rubrum*'un ürettiği ekstraselüler proteazın ve (Tsuboi ve ark. 1989) *T. mentagrophytes*'den elde edilen ekstraselüler proteazla yapılan çalışmalarında da $CaCl_2$ 'nin enzim

aktivitesini %220 arttırdığı bildirilmiştir. Bir non-iyonik deterjanlar olan Triton-X 114 'ün % 1'lik konsantrasyonu % 98 oranında bir aktivite kaybına sebep olmuştur. SDS (% 1) ise enzimde % 51 oranında

bir inhibisyon gerçekleştirmiştir. PMSF, enzimi tamamen inhibe ederken EDTA ve ürekonstrasyon arttıkça artan bir inhibisyon gerçekleştirmiştir. PMSF ile güçlü EDTA ile kısmi bir inhibisyon enzimin serin tip proteaz olduğunu göstermektedir (Riffel ve ark., 2003; Moreira ve ark., 2009; Dubey ve ark., 2010). Enzim aynı zamanda bir metallo proteaz inhibitörü

olan 1.10-phenantroline ile de kısmen aktivite kaybına uğramıştır. EDTA'nın artan konsantrasyonunda inhibisyonun varlığı ve Ca^{2+} varlığında ise aktivasyonun artması enzimin metalik kofaktör ihtiyacını ve enzim stabilizasyonunun arttığını göstermektedir (Habbeche ve ark., 2013).



Şekil 7. Tr-9 Keratinaz ile inkübasyona bırakılan tavuk tüyleri
A: 1. Gün B: 2.Gün C:4. Gün D: 6.Gün E: 9.Gün
Figure 7. Chicken feathers treated with Tr-9 keratinase enzyme
A: Day 1, B: Day 2, C: Day 4, D: Day 6, E: Day 9

Trichophyton sp. keratinazlarının tavuk tüyünü parçalamada oldukça başarılı ve önemli bir rolünün olduğu belirtilmiştir (Okaför ve Ada, 2000). Şekil 7 de görüldüğü gibi Tr-9 keratinaz enzimi de tavuk tüyleri üzerine aktivasyonu ortaya konmuştur. (Anbu ve ark. 2008; Pandian ve ark., 2012) da yaptıkları çalışmalarda ekstrasellüler keratinazların tavuk tüyleri üzerine etkinliklerini ortaya koymuşlardır. Tavuk eti işletmelerinde üretilen tüy atıkları faydalı protein ve aminoasitlerin üretim potansiyellerini barındırmaktadır. Bu ise fayvan beslemeciler için ucuz ve alternatif yem katkısı olarak önem arz etmektedir (Onifade ve ark. 1998).

SONUÇ

Mikrobiyal keratinazlar, oldukça sert yapıda olan ve güçlü çapraz bağlara sahip, çözünmesi zor olan keratini parçalama kabiliyetlerinden ötürü biyoteknolojik olarak önemli yer tutmaktadır. Özellikle hayvan beslenmesinde, derilerin tabaklama işlemlerinde, biyohidrojen üretiminde ve bazı tarımsal-biyomedikal uygulamalarda keratinazlardan faydalanılmaktadır (Balint, 2005; Friedrich ve ark., 2005; Gradisar ve ark., 2005; Mohorcic ve ark., 2007).

Mikrobiyal kaynaklar, keratin gibi birçok polimerin

biyolojik dönüşümü için büyük ölçekli üretimleri açısından önemli endüstriyel aktörlerdir. Bu çalışmada keratinaz enzimi üretebilen *Trichophyton* sp. Tr-9 suşundan keratinaz üretimi, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Nötr bir optimum pH'ya sahip olması, pH 5.5 – 7.5 arasında %100'e yakın bir pH stabiliteye sahip olması, vücut sıcaklığında optimum sıcaklık sergilemesi bir çok endüstriye alanda ve özellikle farmakolojik-kozmetik uygulamalarda potansiyele sahip keratinaz enzimidir.

Teşekkür

Bu çalışma KSU Bilimsel araştırmalar birimi tarafından 2009/4-6M Nolu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar çatışması beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkı Oranları

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağladıklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anbu P, Hilda A, Sur HW, Hur BK, Jayanthi S 2008. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 62:287-292.
- Apodaca G, McKerrow, JH 1985. Purification and Characterization of a 27,000- Mr Extracellular Proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Infect. Immun*,57(10): 3072–3080.
- Arikan B, Unaldi N, Coral G, Colak O, Aygan A, Gulnaz O 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38:1397-1403.
- Asahi M, Lindquist R, Fukuyama K, Apodaca G, Epstein W.L, McKerrow JH 1985. Purification and Characterization of Major Extracellular Proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.*, 232:139–144.
- Balint B, Bagi Z, Toth A, Rakhelye G, Perei K, Kovacs KL 2005. Utilization of Keratin-Containing Biowaste to Produce Biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:404-410.
- Bernal C, Vidal L, Valdivieso E, Coello N 2003. Keratinolytic Activity of *Kocuria rosea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19:255–261.
- Bernal C, Cairo J, Coello N 2006. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme Microbial Technol* 38:49–54.
- Bhat MK 2000. Cellulases and Related Enzymes Inbiotechnology. *Biotechnology Advances*, 18:355-383.
- Cai, CG, Lou, BG, Zheng XD 2008. Keratinase Production and Keratin Degradation by a Mutant Strain of *Bacillus subtilis*. *Zhejiang Univ. Sci. B*, 9:60–67.
- Day WC, Tonic P, Stratman SL., Leuman U, Harmon SR 1968. *Biochim. Biophys. Acta*, 167: 596-606.
- Dubey R, Adhikary S, Kumar J, Sinha N 2010. Isolation, Production, Purification, Assay and Characterization of Alkaline Protease Enzyme from *Aspergillus niger* and Its Compatibility with Commercial Detergents, *Developmental Microbiology and Molecular Biology*, 1(1):75-94.
- Esawy MA 2007. Isolation and Partial Characterization of Extracellular Keratinase from a Novel Mesophilic *Streptomyces albus* AZA. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6):808-817.
- Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Haddar A, Kanoun S, Nasri M 2010. A Novel Serine Metallokeratinase from a Newly Isolated *Bacillus pumilus* A1 Grown on Chicken Feather Meal: Biochemical and Molecular Characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 162:329–344.
- Farag AM, Hassan MA 2004 Purification, Characterization and Immobilization of a Keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 34:85–93.
- Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigori MD, Sineriz F1996. Thermostable Alkaline Proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, Production and Characterization. *Appl MicrobiolBiotechnol.*, 45:327-332.
- Friedrich J, Gradisar H, Vrecl M, Pogacnik A 2005. In vitro Degradation of Porcine Skin Epidermis by a Fungal Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 36:455–460.
- Gradisar H, Friedrich J, Krizaji I, Jerala R 2005. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3420–3426.
- Gupta R, Gupta K, Saxena RK, Khan S 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Letts* 21:135–138.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B 2003. Microbial α amylases: a Biotechnological Perspective. *Process Biochem.*, 1-18.
- Gousterova A, Braikova D, Goshev I, Christov P, Tishinov K, Vasileva-Tonkova E, Haertlé T, Nedkov P2005, Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis *Lett Appl Microbiol.*40(5):335-40.
- Habbeche A, Saoudi B, Jaouadi B, Haberra S, Kerouaz B, Boudelaa M, Badis A, Ladjama A 2014. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomyces keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J. Biosci. Bioeng.* 117:413-421.
- Horikoshi K 1999. Alkaliphiles: Some Applications of their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol. Bio.*, 63:735-750.
- Korkmaz H, Unaldi MN, Aslan B, Coral G, Arikan B, Dinçer S, Colak O 2003. Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Ann Microbiol.*, 53: 85-93.
- Kreplak L, Doucet J, Dumas P, Briki F 2004. New Aspects of the α -helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers. *Biophys. J.*, 87:640–647.
- Langeveld JPM, Wang JJ, Van de Wiel DFM, Shih GC, Garsen J, Bossers A, Shih JCH 2003. Enzymatic Degradation of Prion Protein in Brain Stem from Infected Cattle and Sheep. *JID.*, 188:1782–1789.
- Marcondes NR, Taira CL, Vandresen DC, Svidzinski TIE, Kadowaki MK, Peralta RM 2008. New Feather-Degrading Filamentous Fungi. *Microb. Ecol.*, 56:13–17.

- Mckittrick J, Chen PY, Bodde SG, Yang W, Novitskaya EE, Meyers MA 2012. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. *JOM*, Vol. 64, No. 4.
- Moallaei H, Zaini F, Larcher G, Beucher B, Bouchara JP 2006. Partial Purification and Characterization of a 37 kDa Extracellular Proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia*, 161:369–375.
- Mohamedin AH 1999. Isolation, Identification and some Cultural Conditions of a Protease Producing Thermophilic *Streptomyces* strain Grown on Chicken Feathers as a substrate. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 43:13–21.
- Mohorcic M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S 2007. An Investigation into Keratinolytic Enzymes to Enhance Ungual Drug Delivery. *Int. J. Pharm.*, 332:196–201.
- Moreira-Gasparin FG, Souza CGM, Costa AM, Alexandrino AM, Bracht CK, Boer CG, Peralta RM 2009. Purification and Characterization of an Efficient poultry Feather Degrading-Protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, 20:727–736.
- Muhsin TM, Hadi RB 2002. Degradation of Keratin Substrates by Fungi Isolated from Sewage Sludge. *Mycopathologia*, 154: 185-189.
- Nam GW, Lee DW, Lee HS, Lee NJ, Kim B, Choe EA, Hwang JK, Suhartono, MT, Pyun YR 2002. Native-Feather Degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a Newly Isolated Keratinase-Producing Thermophilic Anaerobe. *Arch. Microbiol.*, 178:538–547.
- Okafor JI, Ada N 2000. Keratinolytic Activity of five Human Isolates of the Dermatophytes. *Journal of Common Diseases*, 32,300–305.
- Onifade AA, Al-Sane NA, Al-Musallam, AA, Al-Zarban, S 1998. Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganisms and their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources. *Bioresour. Technol.*, 66:1–11.
- Pandian S, Sundaram J, Panchatcharam P 2012. Isolation, Identification and Characterization of Feather Degrading Bacteria. *European Journal of Experimental Biology*, 2(1):274-282.
- Qin LM, Dekio S, Jidoi J 1992. Some Biochemical Characteristics of a Partially Purified Extracellular Keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. *Zentralbl Bakteriol.*, 277:236–244.
- Rabilloud T, Blisrick T, Heller M, Luche S, Aebersold R, Lunardi J, Braun-Breton C 1999. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis*, 20, 3603-3610.
- Raju K C, Neogi U, Saumya R, Goud N R 2007. Studies on Extracellular Enzyme Keratinase Dermatophyte *Microsporium gypseum*. *International Journal of Biological Chemistry*, 1(3): 174-178.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3):597-635.
- Riffel A, Ortolan S, Brandelli A 2003. De-hairing Activity of Extracellular Proteases Produced by Keratinolytic Bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(8): 855-859.
- Riffel A, Brandelli A, Bellato S, de M, Gustavo HMF, Eberlin MN, Tavares FCA 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J Biotechnol* 128:693–703.
- Rojanavanich V, Yoshiike T, Tsuboi R, Takamori K, Ogawa, H 1990. Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from *Hendersonula toruloidea*. *Infect. Immun.*, 58(9): 2856–2861.
- Suntornsuk W, Suntornsuk L 2003. Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in Submerged Cultivation. *Bioresour. Technol.*, 86:239–243.
- Takami H, Nogi Y, Horikoshi K 1999. Reidentification of Keratinase Producing Facultatively Alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles*, 3:293-296.
- Tanış H, Cihangir N 2009. Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in Proteaz Aktivitelerinin Araştırılması. *F.Ü. Sağ.Bil. Tıp Derg.*, 23(3):137-144.
- Tsuboi R, Ko IJ, Takamori K, Ogawa H 1989. Isolation of a Keratinolytic Proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with Enzymatic Activity at Acidic pH. *Infect. Immun.*, 57:3479–3483.
- Vidyasagar M, Prakash S, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K. 2006. Optimization of cultural conditions for the production of halo thermophilic protease from halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *World. J Microbiol Biotechnol* 23:655–662
- Voet D, Voet JG, Pratt CW 2008. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level. 3rd. ed. New York: Wiley.*